



Synthèse métallo-catalysée de phosphonates trans-but-2'-ényl de nucléosides sous forme prodrogue

Maxime Bessières

► To cite this version:

Maxime Bessières. Synthèse métallo-catalysée de phosphonates trans-but-2'-ényl de nucléosides sous forme prodrogue. Chimie organique. Université d'Orléans, 2016. Français. NNT : 2016ORLE2054 . tel-04416257

HAL Id: tel-04416257

<https://theses.hal.science/tel-04416257>

Submitted on 25 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

THÈSE présentée par :
Maxime BESSIERES

Soutenue à huis-clos le : **14 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Chimie Organique

**Synthèse métallo-catalysée de phosphonates
trans-but-2'-ényl de nucléosides sous forme
prodigue**

THÈSE dirigée par :

Luigi A. Agrofoglio
Vincent Roy

Professeur, Université d'Orléans
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Christophe Hoarau
Nadège Lubin-Germain

Professeur, INSA de Rouen, Université de Rouen
Professeur, Université de Cergy-Pontoise

JURY:

Luigi A. Agrofoglio
Alain Burger
Christophe Hoarau
Nadège Lubin-Germain
Sylvie Pochet
Vincent Roy

Professeur, Université d'Orléans
Professeur, Université de Nice Sophia Antipolis
Professeur, INSA de Rouen, Université de Rouen
Professeur, Université de Cergy-Pontoise
D.R. CNRS, HDR, Institut Pasteur
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans sous la direction du Pr. Luigi Agrofoglio et du Dr. HDR Vincent Roy.

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr. Luigi. A. Agrofoglio pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse dans son laboratoire, et pour la confiance qu'il a pu me porter. Je le remercie également pour m'avoir laissé la liberté de conduire les projets qu'il m'a confié. J'aimerais aussi le remercier pour son investissement permanent à l'égard des doctorants qu'il encadre.

Je souhaiterais remercier par la suite le Dr. Vincent Roy, pour son encadrement au quotidien. Je le remercie aussi pour ses conseils avisés, sa très grande disponibilité ainsi que sa bonne humeur. Je le remercie aussi pour m'avoir fait confiance dans l'encadrement des TP à l'IUT.

J'aimerais sincèrement remercier le Pr. Nadège Lubin-Germain et le Pr. Christophe Hoarau d'avoir pris de leur temps pour accepter de juger mon travail de thèse.

Je remercie aussi le Pr. Alain Burger et la DR Sylvie Pochet pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier les gens sans qui le travail au quotidien serait bien difficile, et notamment Marie Madeleine Le Floch, Yann Vital, Christophe Dubois, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif.

La suite de mes remerciements va bien entendu au labo 6, grâce auquel j'ai passé trois années extras. Je remercie donc Coco, Lala et Aleks pour m'avoir bien intégré au labo, mais aussi aux membres que j'ai pu rencontrer plus tard : Poko, Dacia, Loïc, Jonathan (merci pour ton bon travail), Sevil, Gimli, Zahira, et aux nouveaux V2 et Nico. Je remercie également Momo pour ses élans de tendresse étranges et pour la touche féminine qu'il apporte quotidiennement au laboratoire.

Des remerciements plus particuliers pour Flo, parce que si j'ai passé trois années excellentes dans ce labo c'est en grande partie grâce à toi, à nos délires que je ne compte plus. Merci pour ta patience et ta bonne humeur permanente.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues et amis en dehors de cet espace, et j'en oublierai sûrement : Toto, Joe, Gillou, Matthieu, Nuno, Lucas, Liliana, Audrey, Joseph, Marion, Célia, Régis, Manu, Floris, Juju, Romain, les oumpas loupas du L5 et du L1, Geoffrey, Fanny etc...

Des remerciements plus spéciaux pour Ben, avec qui on a formé un super duo pendant ces trois ans de thèse et qui a été une véritable soupape d'humour durant les journées, les soirées etc... contrairement au mexicain grincheux du labo 5, mais avec qui on a bien ri quand même. Merci pour tout.

Merci à Mcm et Coupe sec d'avoir égayé certaines de mes soirées avec des parties de CoD ou de CoC, et pour tout le reste, pour toutes les années géniales que j'ai passé avec eux.

Je tiens à remercier du fond du coeur ma famille, qui a toujours été là pour moi et qui m'a toujours soutenu quoique je fasse. Je remercie aussi ma grande soeur, qui m'a orienté dans les moments de doute, et qui a

toujours cru en moi. Enfin je remercie particulièrement mes parents, qui m'ont toujours écouté, conseillé et qui ont toujours été là. Je ne vous remercierai jamais assez et j'espère que je serai aussi bon parent avec mes enfants que ce que vous avez été pour moi.

Pour finir, je tiens bien sûr à remercier Doina, avec qui j'ai partagé les coups durs, les rires, les larmes au cours de cette thèse et dans la vie en général. Merci d'avoir été un aussi bon soutien, de m'avoir écouté quand j'en avais besoin. Merci pour tous les sourires et tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

SIGLES ET ABREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ANP : Acyclo Nucléoside Phosphonate
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adénosine Triphosphate
AZT : Azidothymidine

B

BINAP : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle
Boc : *tert*-Butoxycarbonyl
BSA : *bis*triméthylsilylacétamide
BDBV : Virus Bundibugyo
BVDU : Brivudine

C

CAL-B : *Candida Antarctica* Lipase B
CC₅₀ : Concentration cytotoxique pour réduire de 50% le niveau d'ADN/ARN sain
CMP : Cytidine Monophosphate
CMP : Cytosine arabinoside 5'-monophosphate
CMV : Cytomégalovirus

D

DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAP : 2,6-diaminopurine
DAPY : 2,6-diaminopyrimidine
DCM : Dichlorométhane
DEAD : Diéthyl azodicarboxylate
DEM : Diéthoxyméthane
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA : Diisopropyl éthylamine
DHPA : (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adénine
DMA : Diméthylacétamide
DMF : Diméthylformamide
DMPU : 1,3-Diméthyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone

DRX : Diffraction à rayon X
d4T : 2',3'-didéhydro-3'-désoxythymidine

E

EBOV : Virus Ebola
EC₅₀ : Concentration nécessaire pour réduire de 50% le niveau d'ARN/ADN viral
EtOH : Ethanol

F

FDA : *Food and Drug Administration*

G

GDP : Guanosine diphosphate
GMP : Guanosine monophosphate
GP : Glycoprotéine
GTP : Guanosine triphosphate

H

HBV : Hépatite B Virus
HCMV : Cytomégalovirus humain
HCV : Hépatite C Virus
HDP : Hexadécylpropyloxy
HHV-6 : Virus 6 de l'herpès humain
HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
HPMP : 3-hydroxy-2-(phosphono-méthoxy)propyle
HPMPA : 3-hydroxy-2-(phosphono-méthoxy)propyle adénine
HPMPC : 3-hydroxy-2-(phosphono-méthoxy)propyle cytosine
HPMPDAP : 3-hydroxy-2-(phosphono-méthoxy)propyle 2,6-diaminopyrimidine
HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
HSV 1 et 2 : Virus de type I et type II de l'herpès simplex

hTPMK : Kinase humaine de Thymidine monophosphate

hUCK : Kinase humaine UMP-CMP

I

IC₅₀ : Concentration requise pour avoir 50% d'inhibition d'une enzyme

IDU : Idoxuridine

L

LLOV : Virus LLOV

M

MARV : Virus Marburg

MeOH : Méthanol

MOM : Méthoxyméthyle

MS : Spectrométrie de masse

MSV : Virus de la striure du maïs

N

NMPK : Kinase de nucléoside monophosphate

NOESY : *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

NPC1 : Niemann Pick C1

O

ODE : Octadécylethoxy

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PBMC : Cellule mononuclée sanguine périphérique

PDB : Base de données de protéines

PME : Phosphonométhoxyéthyle

PMEA : Phosphonométhoxyéthyle adénine

PMEG : Phosphonométhoxyéthyle guanine

PMP : 2-Phosphonylméthoxypropyl

PMPA : 9-(2-Phosphonylméthoxypropyl) adénine

PMPDAP : 2-(phosphonométhoxypropyl) 2,6-diaminopyrimidine

POC : isopropyl oxyméthyl carbonate

POM : pivaloyl oxyméthyl

PPL : Lipase de pancréas porcin

ppts : pyridinium *p*-toluènesulfonate

PTS : Polyoxyéthanyl- α -tocophéryl Sébacate

R

RAVV : Virus Ravn

RESTV : Virus Reston

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RT : Transcriptase inverse

S

SAH : S-Adénosyl-L-Homocystéine

SAR : Relations Structures-Activités

SATE : S-pivaloyl-2-thioéthyle

SI : Indice de sélectivité

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SUDV : Virus Sudan

T

TAF : Ténofovir Alafénamide

TAFV : Virus Tai Forest

TBAF : Fluorure de *tert*-butylammonium

TBAB : Bromure de *tert*-butylammonium

TBDMS : *tert*-butyldimethylsilane

TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilane

Tf : Triflate

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

THP : Tétrahydropyrane

TIPS : Triisopropyl silane

TK : *Thymidine kinase*

TMP : Thymidine monophosphate

TMPK : Kinase de Thymidine monophosphate

TMSI : Iodure de triméthylsilane

TMSBr : Bromure de triméthylsilane

Ts : Tosylate

U

UMP : Uridine monophosphate

V

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

VV : Virus de la vaccine

VZV : Virus Varicelle Zona

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

I. Virus : Structures et mécanismes d'infection	17
II. Les stratégies antivirales par les nucléotides	19
1 Mécanisme d'action d'un nucléotide	19
2 Quelques exemples d'antiviraux nucléosidiques	20
III. Les acyclonucléosides phosphonates	21
1 Trois leads : PMEAs, PMPAs et HPMPs	21
2 Modulation de la nucléobase	26
3 Modulation de la chaîne acyclique.....	27
IV. Les prodrogues.....	28
1 Concept et intérêt	28
2 Principales classes	29

VERS UNE NOUVELLE FAMILLE D'ACYCLONUCLEOSIDES PHOSPHONATES

I. Objectifs de la thèse et plan de travail	37
II. Conception et synthèse de <i>trans</i>-2'-butényles <i>N</i>-nucléosides phosphonates	39
1 Les acyclonucléosides phosphonates oléfiniques	39
2 Travaux antérieurs du laboratoire	45
3 Rétrosynthèse envisagée	51
4 Résultats et discussions.....	51
5 Conclusions et perspectives	85

EXPERIMENTAL PART

III. Conception et synthèse de <i>trans</i>-2'-butényles <i>O</i>-nucléosides phosphonates	113
1 Etat de l'art.....	113
2 Rétrosynthèse envisagée	115
3 Résultats et discussions.....	117
i. Résultats en série 2'-OAc-alkényle-O-2,6-diaminopyrimidine	117

ii. Modulation du groupement en position C ⁴ du 2'acetoxy-but-2'-ényle phosphonate diaminopyrimidine sous sa forme HDP/POC.....	133
iii. Résultat en série alkényle-O-2,6-diaminopyrimidine non substitués	137
iv. Synthèse du <i>bis</i> (POM) 2'-méthyl-but-2'-ényle O-2,6-diaminopyrimidine	148
v. Composés comportant le noyau diaminopyrimidine comme squelette central	149
4 Conclusion et Perspectives.....	152

EXPERIMENTAL PART

IV. Synthèse de *trans*-2'-butényles N-nucléosides phosphonoamidates à base pyrimidique 203

1 Etat de l'art	203
2 Objectifs et rétrosynthèse proposée.....	206
3 Résultats et discussion	207
i. Synthèse du composé (<i>E</i>)-N ¹ -(4'-phosphinyl-2'-butényl)thymine sous sa forme phosphonamide	207

V. Conclusion et perspectives 219

EXPERIMENTAL PART

TRAVAUX ANNEXES

NOUVEAUX DERIVES BENZIMIDAZOLES DANS L'INFECTION AU VIRUS EBOLA

I. Généralités sur le virus Ebola.....	239
1 Présentation, cycle infectieux et aspects thérapeutiques	239
2 La protéine Niemann Pick C1 (NPC1)	245
II. Positionnement du sujet et travaux antérieurs de l'équipe.....	248
III. Objectifs synthétiques et plan de travail	250
1 Structure générale.....	250
2 Rétrosynthèses envisagées	252
IV. Résultats et discussion	253
1 Composés présentant une rotule éther	253
2 Composés présentant une rotule méthylène	260
3 Evaluation <i>in silico</i> des composés par profil ADME.....	268
V. Conclusion et perspectives	270

EXPERIMENTAL PART

CONCLUSION GENERALE

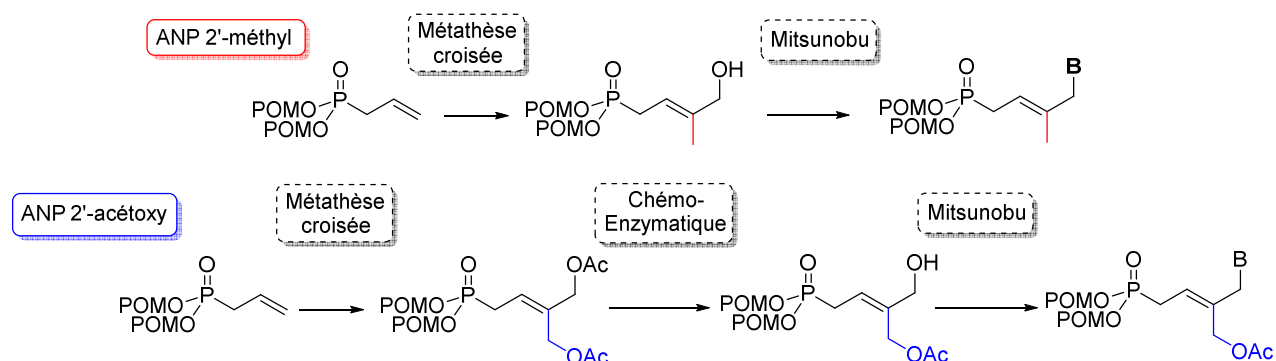
ARTICLES ET COMMUNICATIONS DE L'AUTEUR

Introduction générale

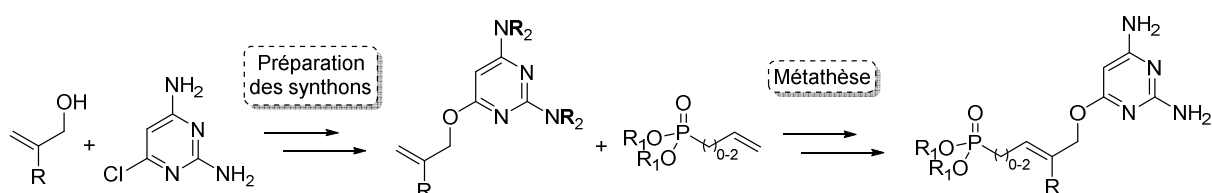
Actuellement, un des problèmes de santé publique majeur est représenté par les infections virales, qui au travers des siècles ont causé la mort de millions d'individus par de véritables épidémies (Variole, grippe espagnole...). Parmi les différentes thérapies basées sur l'utilisation de petites molécules, les analogues nucléos(t)idiques sont depuis plus d'un demi-siècle au centre des thérapies antivirales par une quarantaine de composés. Toutefois, avec l'apparition de résistances aux traitements actuels, des phénomènes de mutation virale et l'émergence de nouveaux virus (Zika, H1N1...) il est toujours d'actualité de développer de nouvelles molécules.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le sujet de notre travail durant cette thèse. Dans une introduction concise, nous aborderons quelques généralités à propos des virus, leur mode de réplication... Pour certains d'entre eux, nous rappellerons quelques antiviraux parmi les plus actifs avec leurs structures, et mécanismes d'action. Nous accentuerons l'importance des acyclonucléosides phosphonates, molécules devenues cruciales dans la lutte contre le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'hépatite B (VHB) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Par la suite nous aborderons l'approche pro-nucléotide, technologie en pleine expansion qui permet l'amélioration de l'activité antivirale des phospho(no)nucléosides.

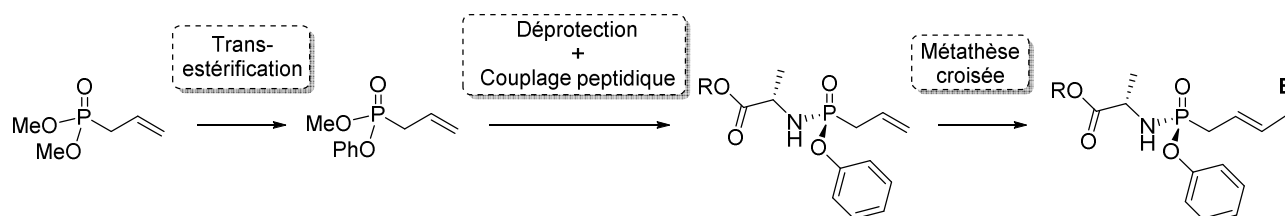
Dans le premier chapitre, nous détaillerons la synthèse de dérivés 2'-méthyl-*trans*-but-2'-ényle phosphonates. Les étapes clé de la synthèse pour ce type d'ANP reposent entre autres sur une réaction de métathèse croisée activée sous ultrasons, et un couplage de Mitsunobu afin d'introduire la nucléobase sur un synthon phosphonate portant des groupements biolabiles. Suivant cette stratégie, nous aborderons la synthèse de dérivés 2'-acétoxy-*trans*-but-2'-ényles phosphonates, à l'aide d'une étape additionnelle de déprotection sélective *via* une réaction chémo-enzymatique.



Dans le second chapitre, une importance toute particulière sera donnée à une nucléobase non canonique présentant un fort potentiel thérapeutique, la 2,4-diaminopyrimidine. Ce noyau hétérocyclique est présent sur des molécules possédant un potentiel antiviral marqué. Afin d'ajouter cette nucléobase aux motifs acyclonucléoside phosphonate développé par le laboratoire, une longue mise au point a été nécessaire sur la réaction de métathèse croisée entre le synthon phosphonate portant des groupements biolabiles et les pyrimidines fonctionnalisées. Une diversité au niveau des groupements biolabiles portés par les phosphonates, de la partie acyclique et de la base seront introduits en vue d'obtenir de la diversité moléculaire et le meilleur profil thérapeutique.

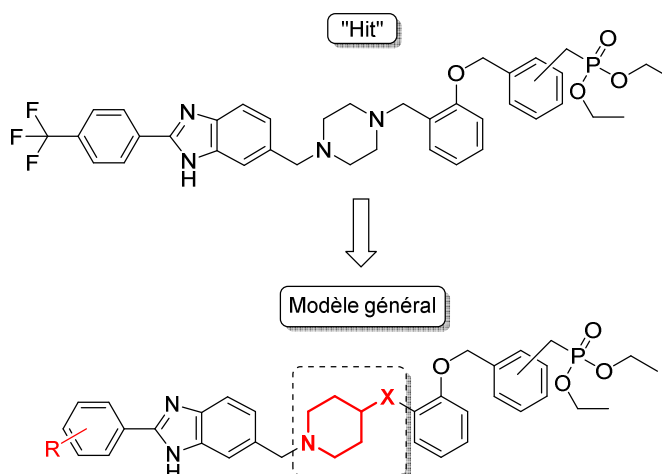


Dans un troisième chapitre, nous développerons une méthode de synthèse autour d'un pronucléotide à large potentiel, la prodrogue phosphonoamidate. Dans ce contexte, une série d'acyclonucléosides comportant ce pronucléotide sera développée, montrant la fonctionnalisation d'un phosphonate en phosphonoamidate, suivie d'une métathèse croisée afin de coupler la nucléobase. Il sera discuté des conditions de ce couplage métallo-catalysé, ainsi que de la polyvalence de cette synthèse avec divers esters d'alanine et une variété de bases nucléiques.



Enfin, lors de travaux annexes, nous nous sommes intéressés à développer une série de petites molécules en tant qu'agents antiviraux dans le but d'inhiber le virus Ebola, sujet ayant fait l'objet d'une précédente thèse au laboratoire et venant de faire l'objet d'un dépôt de brevet. Cette espèce très virulente, présente une facilité de transmission ainsi qu'un taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 90 % et ne possède pas de thérapie efficace ou de vaccin. Par conséquent, la recherche est en plein expansion dans ce domaine depuis les récentes épidémies qui ont touché l'Afrique.

Pour cette suite de travaux, nous nous sommes penchés vers la pharmacomodulation de composés benzimidazoles. Plusieurs synthèses ont été mise au point afin de construire ces hétérocycles autour du noyau pipéridine, cœur de ces structures originales.



Les activités antivirales des composés synthétisés lors de ces chapitres sont pour certains toujours évalués par des équipes partenaires internationales et seront présentées et discutées tout au long de ce manuscrit.

INTRODUCTION

I. Virus : Structures et mécanismes d'infection

Un virus est une particule microscopique infectieuse qui nécessite une cellule hôte pour pouvoir se répliquer. En effet, ces entités sont incapables de se développer sans le matériel cellulaire et le métabolisme présents dans la cellule infectée. Ces espèces virales, appelées virions, sont assez simples, seulement constituées d'un filament d'acide nucléique (ADN ou ARN) et d'une capside, boîte protéique destinée à protéger ce matériel génétique. Ils sont en général dépourvus d'enzymes productrices d'énergie et sont incapables de se répliquer par eux mêmes. Afin de pouvoir infecter les cellules nécessaires à leur prolifération, ces parasites peuvent présenter une membrane lipidique, dérivée des parois cellulaires, ainsi que des glycoprotéines, pouvant leur permettre de reconnaître une cible spécifique. Leur mécanisme d'infection peut être généralisé selon un schéma global (Schéma 1).

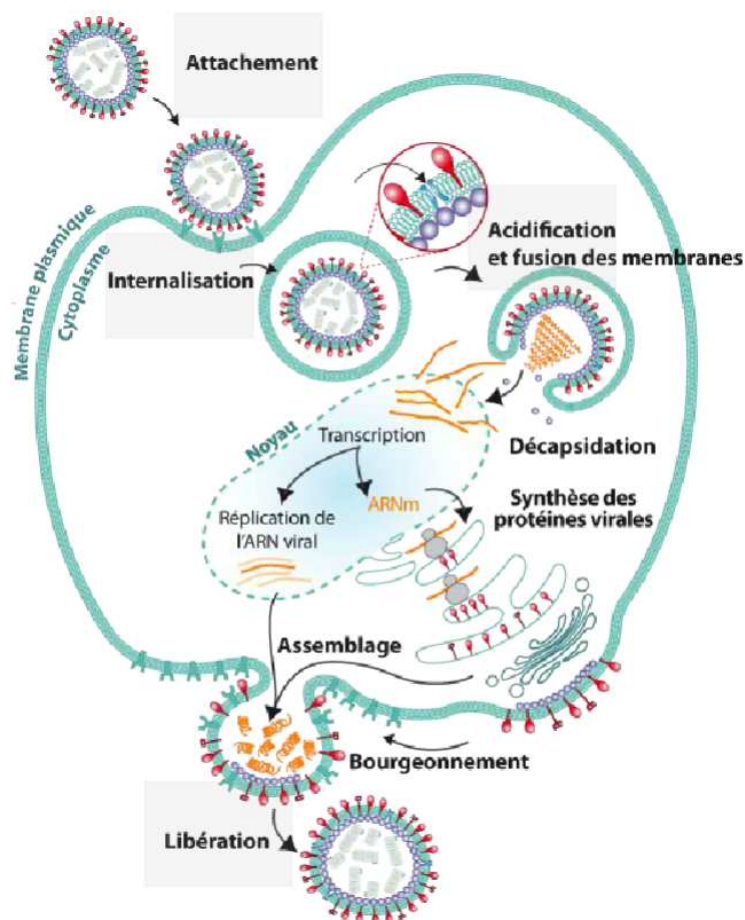


Schéma 1. Infection et réplication d'un virus

- Adsorption du virion sur la membrane cellulaire
- Internalisation et libération du matériel génétique par endocytose, suivie de la fusion des membranes / décapsidation
- Transcription éventuelle dans le noyau suivie de la réplication de l'ARN viral
- Synthèse des protéines à l'aide des ribosomes cellulaires
- Assemblage des composés viraux
- Libération des virions par exocytose

Environ 200 espèces de virus sont pathogènes pour l'homme. Si certains sont bénins, provoquant des symptômes mineurs comme des rhinites, d'autres présentent une gravité majeure. Certains d'entre eux ont provoqués des épidémies très meurtrières, comme la grippe espagnole qui a causé 40 millions de morts en 1918, la polyomélite dans les années 30, la grippe asiatique dans les années 1960, le VIH depuis les années 1980, les hépatites B et C ainsi qu'Ebola, sans oublier d'autres virus plus historiques comme la variole et la rougeole,¹ auteurs d'environ 500 millions de morts avant leurs éradications respectives en 1960 et 1977. Tous ces virus sont classés en familles par leur type d'acides nucléiques et par leur arrangement en simple ou double (Tableau 1).

Tableau 1. Famille des virus à ADN/ARN

Famille	Virus	Maladies associées
ARN		
<i>Double brin</i>		
Réoviridae	Rotavirus	Diarrhées
<i>Simple brin</i>		
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A ,B ,C	Grippe
Paramyxoviridae	Morbillivirus Rubulavirus	Rougeole Oreillons
Rhabdoviridae	Lyssavirus	Rage
Filoviridae	Ebola	Fièvres hémorragiques
Arenaviridae	Lassa	Fièvres hémorragiques
Retroviridae	VIH	SIDA
Coronaviridae	Coronavirus	SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère)
Picornaviridae	Rhinovirus Coxsackie A, B Poliovirus	Rhume Agent causal de méningites, myocardites, péricardites Poliomyélite
Togaviridae	Rubivirus	Rubéole
ADN		
<i>Double brin</i>		
Poxviridae	Vaccine Molluscum contagiosum Variole	- Lésions dermatologiques Variole
Adenoviridae	Adénovirus	Malades respiratoires
Herpesviridae	HSV-1 HSV-2 VZV (Varricella Zoster) EBV (Epstein Barr) CMV (Cytomegalo) KSHV (Kaposi's Sarcoma)	Herpès buccal Herpès génital Varicelle, Zona Mononucléose, lymphome Rétinite Lymphome
Papovaviridae	Papillomavirus Polyomavirus	Verrues, cancers du col utérin Dégénérescence neurologique, polyomes
Hepadnaviridae	VHB, VHC	Infection du foie
<i>Simple brin</i>		
Parvoviridae	Parvovirus B19	Erythème bénin

¹ Paré, A. Traité de la petite vérole et de la rougeole. Paris, André Wechel (1568)

II. Les stratégies antivirales par les nucléotides

1 Mécanisme d'action d'un nucléotide

La lutte contre les infections virales s'est développée de façon exponentielle depuis le début du XX^{ème} siècle. Jusque dans les années 1960, lorsque possible la stratégie principale de lutte contre ces parasites consistait quasi-exclusivement à la vaccination de masse de la population qui, bien qu'efficace, constituait un moyen de prévention plutôt qu'un moyen de guérison. En parallèle du développement de ces vaccins ont donc émergé les différentes thérapies chimiques présentant l'avantage de pouvoir servir dans le traitement d'infections. Depuis l'expansion de ces agents thérapeutiques, parmi le nombre de molécules approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) se retrouve une quarantaine de nucléosides modifiés, ce qui en fait une classe de constituants majeurs. En effet, les nucléosides sont des constituants essentiels dans le patrimoine génétique, puisqu'ils constituent les *building-blocks* de l'ADN. Ces nucléosides sont des médicaments pour le traitement de maladies telles que par les virus à herpès (Cytomégalovirus CMV, Virus Varicelle Zona VZV, virus herpès simplex HSV), le VIH, les hépatites (VHB, VHC), le cytomégalovirus (CMV) ou même le virus varicella zoster (VZV). Cependant, malgré le nombre croissant de nucléosides en phases cliniques, il est nécessaire de trouver de nouveaux composés pour surmonter des problèmes tels que la résistance aux thérapies actuelles, une biodisponibilité limitée ou même une toxicité trop élevée. Si les analogues de nucléosides présentent des structures très différentes, leur mécanisme d'action reste similaire à l'intérieur de la cellule (Figure 1).

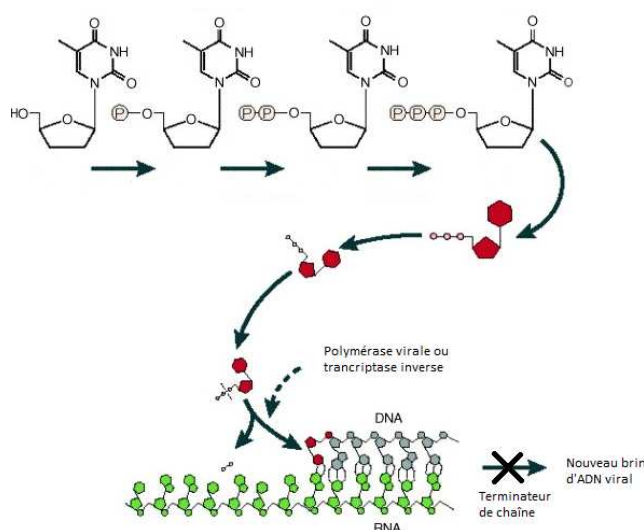


Figure 1. Mécanisme d'action d'un nucléoside²

Le composé rentre dans la cellule à l'aide de transporteurs nucléosidiques.³ Une fois dans la cellule, ces molécules sont par la suite successivement phosphorylées par une première, seconde et troisième kinase,

² De Clercq, E., & Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **4** (11), 928–940. (2005)

³ Cano-Soldado, P. & Pastor-Anglada, M. Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med. Res. Rev.* **32**, 428–457 (2012).

qui aboutit à la formation du nucléoside triphosphorylé. S'ils peuvent être reconnus par certaines enzymes intracellulaires, ils peuvent aussi être introduit dans l'ADN / ARN humain entraînant la destruction du génome viral. Structuralement, ces nucléosides sont constitués d'une nucléobase (pyrimidine ou purine) et d'un sucre (ribose ou désoxyribose). Dans le cas d'un nucléotide, un groupement phosphate est lié au sucre sur sa position 5'. De nombreuses modifications chimiques (halogénations, méthylation...) et structurales (carbanucléosides, acyclonucléosides...) (Schéma 2) ont pour but d'augmenter leur spécificité par rapport aux kinases et polymérases virales, et donc à atténuer la toxicité liée à la prise de ces composés.

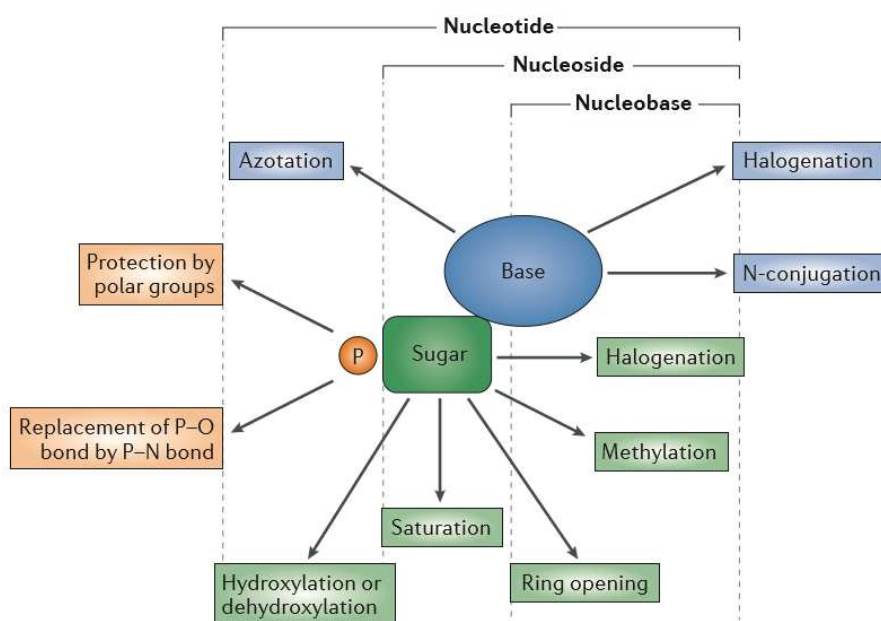


Schéma 2. Modulations chimiques courantes d'un nucléos(t)ide ⁴

2 Quelques exemples d'antiviraux nucléosidiques

La première molécule à activité antivirale marquée a été découverte dans la fin des années 1960 par William Prusoff (Figure 2).⁵ Développé dans un premier temps en tant qu'anticancéreux, l'idoxuridine **1** (IDU), isostère de la thymidine, a finalement été approuvé par la FDA comme le premier agent antiviral en 1962, pour traiter des kératites dues à HSV. Suite au succès de cet agent antiviral, diverses modifications ont été apportées successivement sur la base nucléique, sur le sucre et sur les phosphates. L'apparition de virus comme le VIH a poussé beaucoup d'équipes de recherche vers la synthèse de nucléosides modifiés. Diverses familles de nucléosides ont ainsi été créées, comme les carbanucléosides, les C-nucléosides, les L-nucléosides ou les acyclonucléosides. Par exemple, l'AZT **2** ne possède pas de groupement hydroxy en position 3', remplacé par un azoture.⁶ Cette modification en fait un anti rétroviral très puissant avec une activité de 0.5 nM sur le VIH. Un autre exemple d'anti-rétroviral est le carbovir **3**, constitué d'une guanosine

⁴ Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F. & Dumontet, C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 447–464 (2013).

⁵ Prusoff, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochim. Biophys. Acta.* **32**, 295–6 (1959).

⁶ De Clercq, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **33**, 307–320 (2009).

et d'un 2',3'-didésoxyribose insaturé.⁷ Il présente une activité très forte de 40 nM contre le VIH, et fait partie des médicaments essentiels d'après le classement de l'OMS. D'autres composés, les C-nucléosides, peuvent présenter une liaison CH-CH entre le sucre et la nucléobase, plus stables *in cellulo*. C'est notamment le cas de la pseudouridine **4**, modification de base la plus fréquente dans l'ARN.⁸ Les acyclonucléosides se distinguent par leurs parties osidiques ouvertes. La première molécule à avoir été approuvée par la FDA a été l'acyclovir **5**, commercialisé en 1982. Mise au point par Schaefer et Elion,^{9,10} l'acyclovir est un analogue non-naturel de la guanosine, ne présentant sur l'ensemble du ribose que l'enchaînement C^{1'}-O-C^{4'}, mimant la partie "supérieure" du sucre.

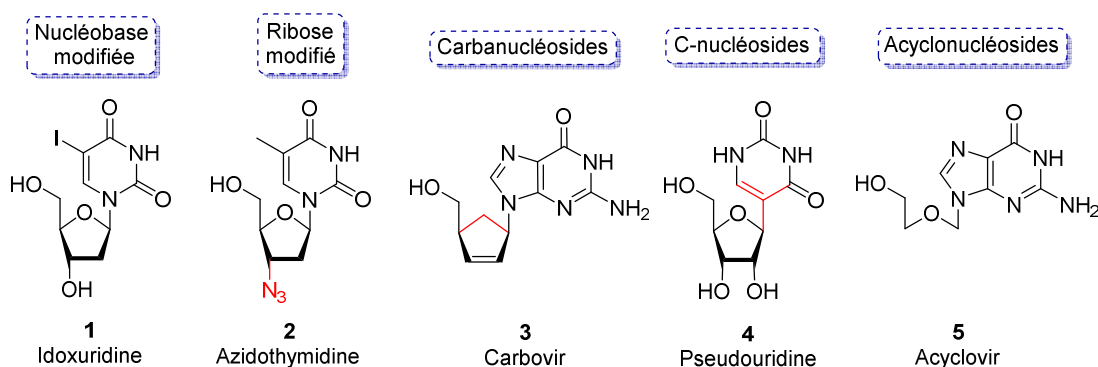


Figure 2. Différentes classes de nucléosides

III. Les acyclonucléosides phosphonates

Une des problématiques majeures des nucléosides est l'étape limitante de première phosphorylation. Il n'est cependant pas possible d'administrer les composés sous leur forme monophosphate, instables en milieu physiologique. Afin de contourner ce problème, un phosphonate, bon isostère du groupement phosphate, peut être introduit en position 4' sur le nucléoside d'intérêt. Ces acyclonucléosides phosphonates ANPs, par leur liaison phosphore-carbone lié à la chaîne acyclique, présenteraient un intérêt particulier qui est celui de résister aux pyrophosphatases, enzyme qui à l'origine de l'hydrolyse des analogues de nucléosides triphosphatés.¹¹ Les pionniers de ces travaux ont été Antonin Holý et Erik De Clercq, qui en 1986 ont montré la première synthèse d'ANP.¹²

1 Trois leads : PMEA, PMPA et HPMPC

Cette synthèse décrivait la formation du (*S*)-9-(3-hydroxy-2'-phosphonomethoxypropyl)adenine **6** (*S*)-HPMPA) à partir du (*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adénine **7** (*S*)-DHPA), molécule commercialisée par cette

⁷ Parker, W. B. *et al.* Metabolism of carbovir, a potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1, and its effects on cellular metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1004–9 (1993).

⁸ Hamma, T. & Ferré-D'Amaré, A. R. Pseudouridine Synthases. *Chem. Biol.* **13**, 1125–1135 (2006).

⁹ Schaeffer, H. J., Gurwara, S., Vince, R. & Bittner, S. Novel substrate of adenosine deaminase. *J. Med. Chem.* **14**, 367–369 (1971).

¹⁰ Elion, G. B. *et al.* Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5716–20 (1977).

¹¹ Goldschmidt, V. & Marquet, R. Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1687–1705 (2004).

¹² (a) De Clercq, E. *et al.* A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature.* **323**, 464–7 (1986) (b) Holý, A. Antiviral acyclic nucleoside phosphonates structure activity studies. *Antiviral Res.* **71**, 248–53 (2006).

même équipe dans le cadre d'un traitement local d'herpès labial (Schéma 3).¹³ Si le DHPA s'est avéré moins efficace que l'acyclovir, molécule qui est rapidement devenue un standard dans la lutte contre HSV, le HPMPA a montré un large spectre d'activité antiviral, que ce soit sur les virus à ADN qu'à ARN.

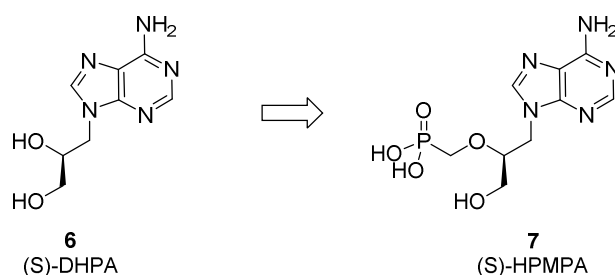


Schéma 3. DHPA et HPMPA

Plusieurs constats peuvent être tirés de ces résultats. Tout d'abord, le phosphonate présente effectivement une stabilité accrue et n'est pas dégradé par la phosphatase, grâce à une liaison P-C plus forte. Ayant des résultats biologiques bien meilleurs que ceux du DHPA, ce résultat montre le contournement de l'étape limitante de la première phosphorylation. En mimant le phosphate, l'ANP n'a alors plus besoin que de deux étapes phosphorylations pour former la forme diphosphate-phosphonate active et intégrable à l'ADN (Schéma 4).¹⁴

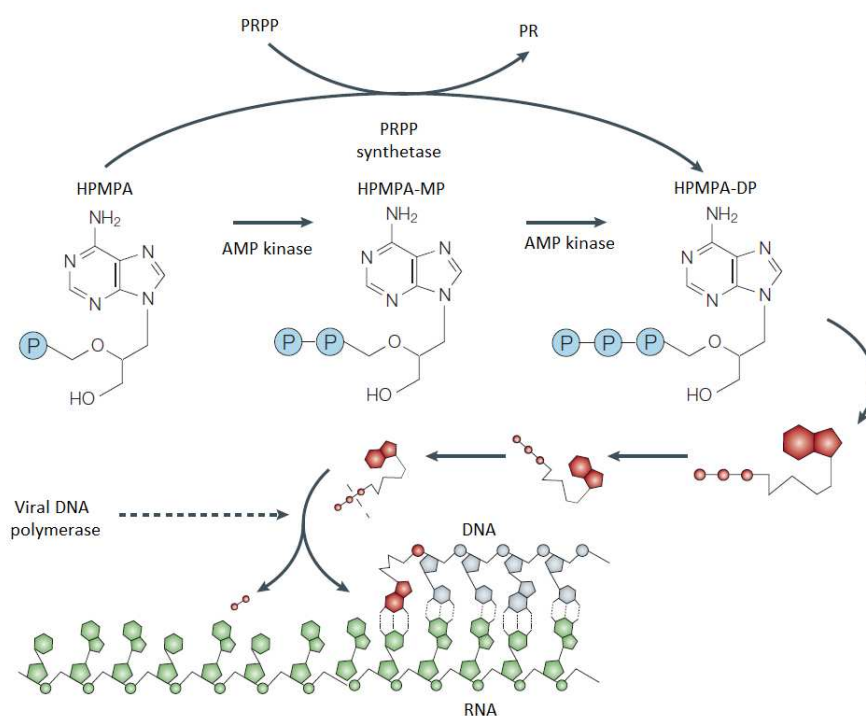


Schéma 4. Mécanisme d'action du HPMPA *in cellulo*.²

Ce mécanisme d'action est commun aux phosphononucéosides acycliques synthétisés par la suite. De nombreuses modulations ont été réalisées au niveau de la base nucléique ou de la chaîne acyclique. Cette

¹³ De Clercq, E., Descamps, J., De Somer, P. & Holý, A. (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: an aliphatic nucleoside analog with broad-spectrum antiviral activity. *Science*. **200**, 4341 (1978).

¹⁴ De Clercq, E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 704–20 (2004).

recherche a abouti à la mise sur le marché de trois composés qui restent aujourd'hui les seuls ANPs approuvés par la FDA dans le cadre de traitements antiviraux (Tableau 2).

Tableau 2. Tableau d'activité des trois ANPs commerciaux

Class of virus	Virus	Cidofovir (HPMPC)	Adefovir (PMEA)	Tenofovir (PMPA)
DNA virus	Papovaviridae			
	Polyoma	✓		
	Papilloma			
	Human papilloma	✓		
	Adenoviridae			
	Adeno	✓		
	Herpesviridae			
	HSV-1	✓	✓	
	HSV-2	✓	✓	
	Varicella-zoster	✓	✓	
	Cytomegalovirus	✓	✓	
	Epstein-Barr	✓	✓	
	HHV-6	✓	✓	
	HHV-7	✓	✓	
	HHV-8	✓	✓	
	Poxviridae			
	Variola	✓		
	Cowpox	✓		
	Monkeypox	✓		
	Camelpox	✓		
	Vaccinia	✓		
	Molluscum contagiosum	✓		
	Orf	✓		
	Hepadnaviridae			
	Hepatitis B		✓	✓
RNA virus	Retroviridae			
	HIV-1		✓	✓
	HIV-2		✓	✓
	Simian immunodeficiency virus		✓	✓
	Feline immunodeficiency virus		✓	✓

HHV, human herpes virus; HIV, human immunodeficiency virus; HPMPC, (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]cytosine; HSV, herpes simplex virus; PMEAs, 9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]adenine; PMPA, (R)-9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine.

- Le cidofovir (S)-HPMPC **8**, analogue du HPMPA présente une cytosine comme nucléobase à la place de l'adénine, commercialisé sous le nom de Vistide®.¹⁵ Synthétisé pour la première fois en 1987, il est actif sur un grand nombre de virus à ADN (papova-, adeno-, herpes-, poxvirus, ainsi que sur les virus d'Epstein Barr). De manière générale, le cidofovir est prescrit lors des infections aux CMV chez les immunodéprimés ainsi que dans le traitement des papillomavirus.¹⁶

¹⁵ (a) De Clercq, E. The discovery of antiviral agents: Ten different compounds, ten different stories. *Med. Res. Rev.* **28**, 929–953 (2008). (b) De Clercq, E. *et al.* Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Res.* **8**, 261–72 (1987). (c) De Clercq, E. Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev. Med. Virol.* **3**, 85–96 (1993).

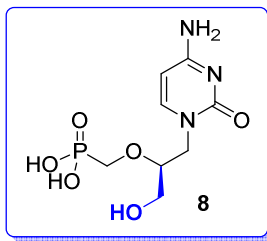
¹⁶ De Clercq, E. Yet another ten stories on antiviral drug discovery (part D): Paradigms, paradoxes, and paradiations. *Med. Res. Rev.* **30** (2009).

- L'adéfovir PMEA, présente une adénine comme base nucléique et diffère du cidofovir par son absence d'hydroxyméthyle, rendant cette molécule achirale. Elle est commercialisée sous le nom de Hepsera®, sous sa forme de prodrogue dipivoxil. Approuvée en 2002 par la FDA, cette molécule est active sur des virus à ADN (Herpes, Epstein Barr) ainsi que sur des virus à ARN (HIV). En raison d'une néphrotoxicité importante lors du traitement de HIV du aux doses administrées, cette molécule est principalement indiquée contre des infections chroniques de HBV.¹⁷
- Le Tenofovir PMPA est commercialisé sous forme prodrogue avec deux groupements biolabiles isopropyle oxyméthyle carbonate (POC) (Viread®). Il est aussi utilisé en combinaison : Truvada® (avec emtricitabine), Atripla® (avec efavirenz et emtricitabine), Complera® (avec rilpivirine et emtricitabine) et Stribild® (avec emtricitabine, elvitégravir et cobicistat). La FDA a récemment autorisé la mise sur le marché du Tenofovir alafénamide **11**, portant un groupement phényle et un isopropylate de valine sur le phosphore. S'il n'a pas encore été commercialisé seul, il l'est en combinaison sous les noms de Descovy® (avec emtricitabine), Genvoya® (avec Rilpivirine et emtricitabine) et Odefsey® (avec Rilpivirine et emtricitabine). Le PMPA se différencie de son analogue PMEA par un groupement méthyle en position 2', instaurant une chiralité. Actif principalement sur les virus à ARN (HIV, SIV ou FIV),¹⁸ et peut s'avérer aussi efficace que l'adéfovir dans les traitements de certains herpès.¹⁹

¹⁷ (a) Balzarini, J. *et al.* Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 332–6 (1989). (b) Yokota, T. *et al.* Comparative activities of several nucleoside analogs against duck hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1326–1330 (1990). (c) Yokota, T. *et al.* Inhibitory effects of selected antiviral compounds on human hepatitis B virus DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 394–397 (1991).

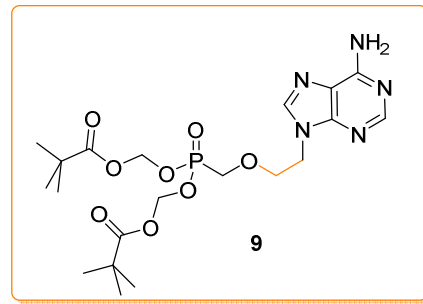
¹⁸ (a) Balzarini, J. *et al.* Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective in vitro and in vivo antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 332–338 (1993). (c) Tsai, C. C. *et al.* Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science*. **270**, 1197–9 (1995).

¹⁹ Marcellin, P. *et al.* Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2442–2455 (2008).



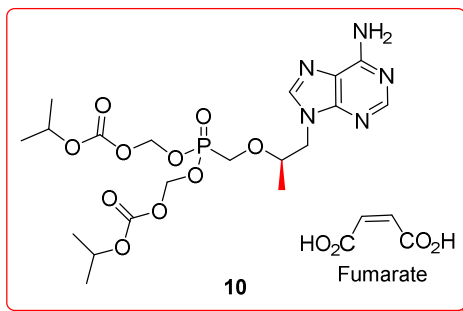
(S)-HPMPC
Cidofovir
Vistide®

Actif contre le CMV



bis(POM)-PMEA
Adéfovir
Hepsera®

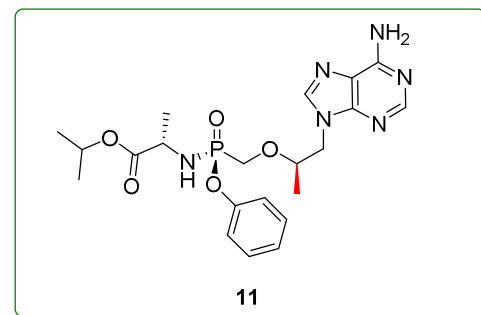
Actif contre HBV



bis(POC)-PMPA
Ténofovir
Seul : Viread®

Combinaison : Atripla®, Truvada®, Complera®, Stribild®

Actif contre HBV, VIH



Ténofovir alafenamide
Combinaison :

Genvoya® Odefsey® Descovy®

Actif contre HBV, VIH



2 Modulation de la nucléobase

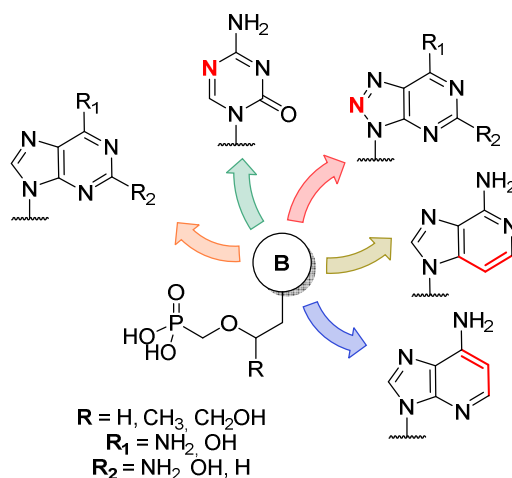


Schéma 5. Modulation de la nucléobase d'un ANP

Décrits par l'équipe de Holy et de De Clercq en 1986, ces trois leads ont subi de nombreuses modulations dans le but d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques et physico-chimiques (Schéma 5). Cela a abouti par la suite à la commercialisation du (S)-HPMPC, qui est plus actif que son analogue adénine, mais aussi à toute une gamme de nouveaux ANP modifiés sur la base hétérocyclique et principalement actifs sur les virus à ADN/ARN.

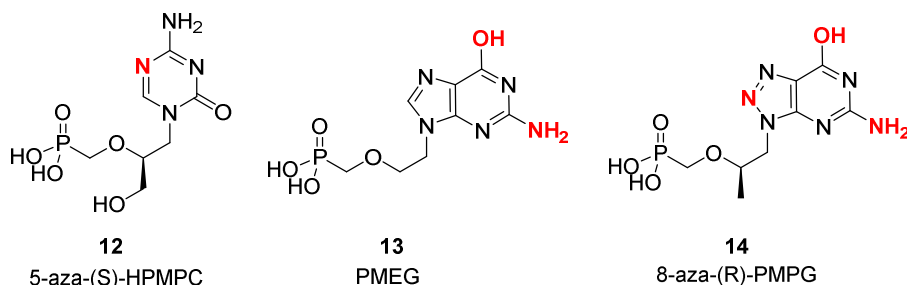


Figure 3. Quelques ANPs modifiés

A titre d'exemple, le 5-aza-(S)-HPMPC **12** (Figure 3), montre des activités de 2 à 7 fois plus importante que le Cidofovir, alliée à une toxicité minorée sur la plupart des virus à ADN ($EC_{50} = 77$ nM sur HSV-1, 27 nM sur VZV, $CC_{50} > 140$ μM).²⁰ En effet, il se mono/diphosphoryle 60 fois plus rapidement que le cidofovir, et s'intègre 45 fois plus vite à l'ADN, ce qui en fait un composé très prometteur. Le PMEG **13** s'est montré plus actif ($EC_{50} = 1.1$ μM) sur le virus de l'herpès que l'acyclovir. En revanche, ces fortes activités sont à modérer par une cytotoxicité non négligeable de ce composé (CC_{50} entre 17 et 30), qui ne présente par conséquent

²⁰ (a) Krečmerová, M. *et al.* Antiviral Activity of Triazine Analogues of 1-(S)-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-cytosine (Cidofovir) and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **50**, 1069–1077 (2007). (b) Krečmerová, M. *et al.* Ester Prodrugs of Cyclic 1-(S)-[3-Hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]-5-azacytosine: Synthesis and Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **50**, 5765–5772 (2007). (c) Krečmerová, M., Masojídková, M. & Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates with 5-azacytosine base moiety substituted in C-6 position. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 387–395 (2010).

qu'un faible index de sélectivité (SI).²¹ Franchetti *et coll.* ont quant à eux décrit la synthèse du 8-aza-(*R*)-PMPG **14**.²² Dans cette publication, ils montrent une synthèse convergente de cet analogue, possédant une activité intéressante de 12 μ M sur HIV-1 et HIV-2. D'une manière générale, les dérivés (*R*)-PMPG présentent un effet synergique intéressant en combinaison avec l'AZT *in vitro*, ce qui pourrait être intéressant à confirmer *in vivo*.

3 Modulation de la chaîne acyclique

Après les modulations apportées sur la partie nucléobase, l'intérêt s'est porté sur la chaîne acyclique. La longueur, la ramification par différents groupements ainsi que la position de l'hétéroatome ont été modifiées, permettant de nombreuses pharmacomodulations et l'obtention d'un large panel de composés.

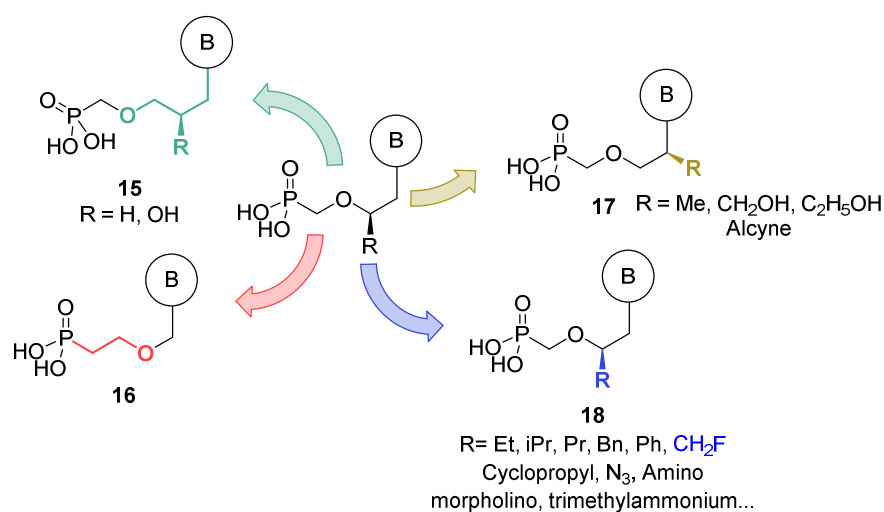


Schéma 6. Modulation de la chaîne acyclique d'un ANP

Dans un premier temps, il a été vérifié la longueur nécessaire de l'alkyle entre l'azote de la nucléobase et le pont éther (Schéma 6). Toute modification de cette longueur, avec ou sans substituant en β , se solde par la suppression de tout effet thérapeutique.²³ Le même effet a été observé lors du déplacement de l'atome d'oxygène sur la chaîne (composé **16**), la distance maximale entre le phosphore et l'atome d'oxygène est seulement d'un carbone. Par la suite la nature (composés **18**) et la position (composés **17**) des substituants sur la chaîne ont été étudiés. La présence de substituants en α d'une nucléobase **17** entraîne la perte d'activité des substances correspondantes.

²¹ Yu, K. L. *et al.* Synthesis and antiviral activity of methyl derivatives of 9-[2-(phosphonomethoxy)-ethyl]guanine. *J. Med. Chem.* **35**, 2958–2969 (1992).

²² Franchetti, P. *et al.* Synthesis and Antiviral Activity of 8-Aza Analogs of Chiral [2-(Phosphonomethoxy)propyl]guanines. *J. Med. Chem.* **38**, 4007–4013 (1995).

²³ (a) Jeffery, A. L., Kim, J.-H. & Wiemer, D. F. Synthesis of Acyclic Nucleoside and Nucleotide Analogues from Amino Acids: A Convenient Approach to a PMEA–PMPA Hybrid. *Tetrahedron*. **56**, 5077–5083 (2000). (b) Kundarapu, M., Marchand, D., Dumbre, S. G. & Herdewijn, P. Synthesis of new acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) substituted on the 1' and/or 2' positions. *Tetrahedron Letters*. **52**, 6896–6898, (2011). (c) Kotian, P. L. *et al.* An Efficient Synthesis Of Acyclic N⁷ - and N⁹ -Adenine Nucleosides Via Alkylation With Secondary Carbon Electrophiles to Introduce Versatile Functional Groups At the C-1 Position of Acyclic Moiety. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **25**, 121–140 (2006).

Parmi les analogues portant un substituant en α de la nucléobase, ou des ramifications autre que par H, CH_2OH , Me, seul un dérivé racémique portant un groupement CH_2F en position 2' présente un potentiel thérapeutique. En effet, si tous les autres composés sont dépourvus de toute activité biologique, le racémique 9-[(2*RS*)-3-fluoro-2'-phosphonyl-methoxypropyl] a montré une légère activité antirétrovirale, mais uniquement sur HIV-1 et HIV-2 ($\text{EC}_{50} \sim 10 \mu\text{M}$) du fait de leur affinité avec la transcriptase inverse.²⁴

Si certaines de ces molécules présentent un profil thérapeutique intéressant (5-aza-(*S*)-HPMPC, PMEG...), à l'heure actuelle, les trois leads restent le PMPA, le PMEA ainsi que le HPMPC. En revanche, une des limitations des ANPs en général restent leur faible pénétration cellulaire. Ils présentent en effet une biodisponibilité extrêmement faible, provoqué par les acides phosphoniques, empêchant leur internalisation dans la cellule. Afin de vectoriser ces composés à l'intérieur de ces dernières, une approche prodrogue a été mise en place.

IV. Les prodrogues

1 Concept et intérêt

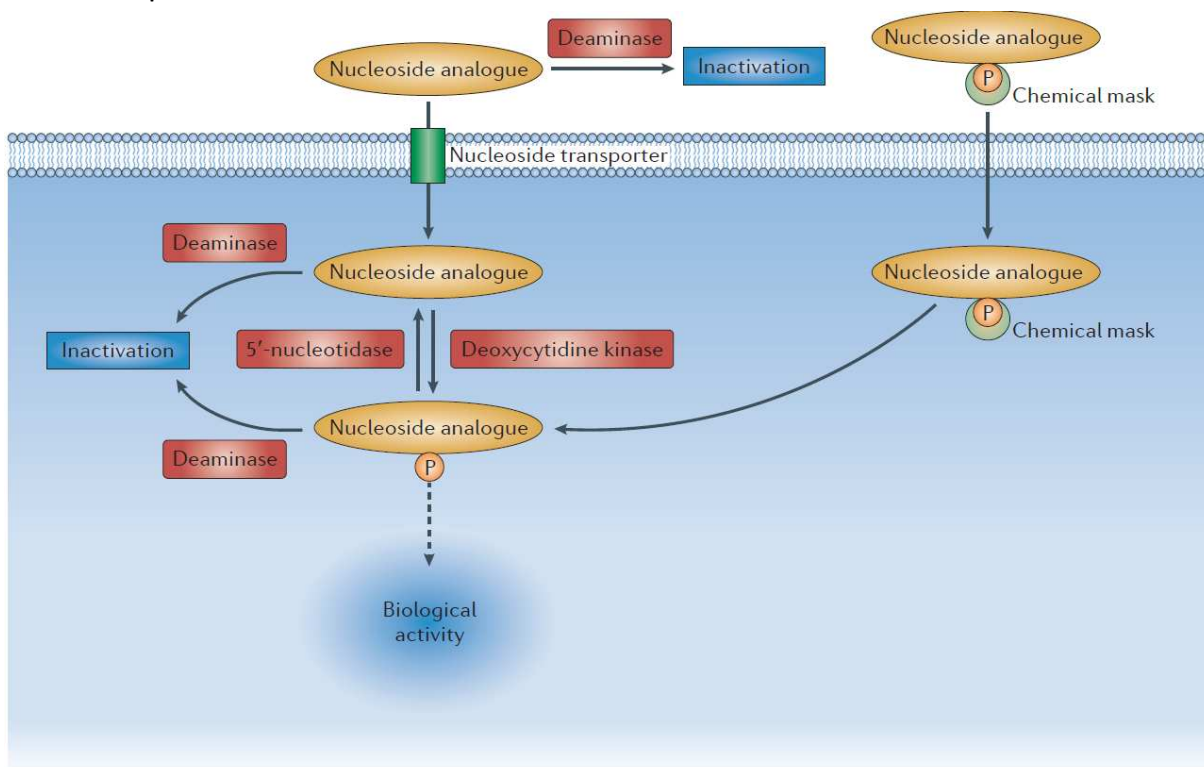


Figure 4. Principe d'action d'un pronucléotide⁴

Pendant les années qui ont suivi la découverte du pouvoir antiviral intrinsèque aux nucléosides, le profil de ces molécules a surtout été modifié sur la partie nucléobase et sur la chaîne acyclique, comme décrit précédemment. Les triphosphates étant trop polaires et ayant une stabilité physiologique faible, ils ne peuvent pas être candidats à une utilisation thérapeutique poussée. Les molécules sont donc introduites à l'état de nucléosides, et subissent la mono-, di- et triphosphorylation après l'internalisation dans la cellule

²⁴ Balzarini, J. *et al.* 9-[(2*RS*)-3-fluoro-2'-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4961–5 (1991).

comme étapes d'activation. Une façon élégante de contourner les deux premières étapes d'internalisation et de première phosphorylation est d'introduire un monophosphate masqué sur le nucléoside. Cette forme inactive va permettre au composé d'être plus stable chimiquement et physiologiquement, réalisée de façon à passer plus aisément les barrières biologiques (comme les membranes cellulaires) afin d'atteindre les cellules et tissus voulus avec une biodisponibilité accrue. Un second effet positif est induit par la présence d'un groupement phosph(on)ate sur la molécule, ce qui va permettre de contourner l'étape de première phosphorylation ainsi qu'une potentielle désactivation par d'autres enzymes intervenant lors de cette transformation enzymatique (Figure 4).

Les analogues de nucléosides possédant ces groupements protecteurs sur les phosph(on)ates sont dits sous forme "pronucléotide". La première molécule bioactive utilisant ce concept a été décrite en 1982 par Rosowsky *et al.*, qui présentaient l'alkylation d'un groupement phosphate de l'*ara*-CMP (cytosine arabinoside 5'-monophosphate), un anticancéreux.²⁵

2 Principales classes

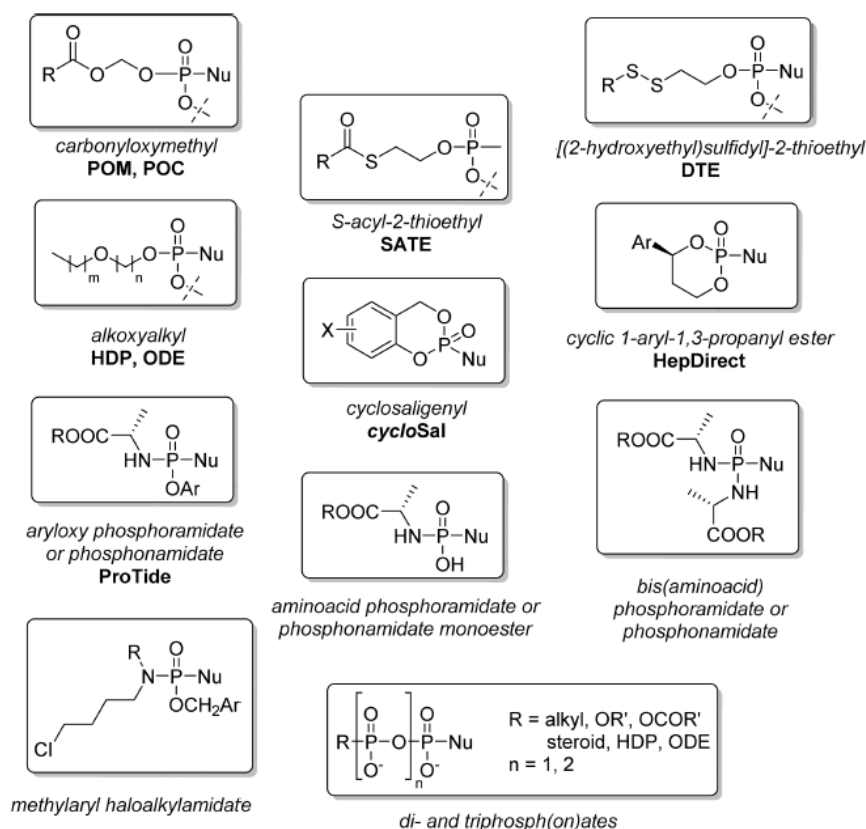


Figure 5. Principales prodrogues²⁶

Par la suite, plusieurs stratégies ont été développées aboutissant à la création de plusieurs prodrogues de type phospho- et phosphononucleosides (Figure 5). Certaines caractéristiques principales sont communes à

²⁵ Rosowsky, A., Kim, S. H., Ross, J. & Wick, M. M. Lipophilic 5'-alkyl phosphate esters of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and its N⁴-acyl and 2,2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs. *J. Med. Chem.* **25**, 171–178 (1982).

²⁶ Pradere, U. *et al.* Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **114** (18), 9154–9218 (2015).

une grande majorité de ces groupements biolabiles. De façon générale, ces groupements sont souvent de type mono- ou diester, possèdent une partie lipophile afin de rendre la pénétration cellulaire possible, tout en conservant une bonne solubilité dans des conditions physiologiques. Parmi le grand nombre de pronucléotides connus, on y retrouve notamment les carbonyloxyméthyl **POM/POC**²⁷ ainsi la technologie **ProTide**.²⁸ Tous ces groupements diffèrent par leurs structures, leurs mécanismes de dégradation intracellulaires qui vont orienter leurs utilisations.

➤ Les carbonyloxyméthyls (POM, POC)

A ce jour, sur les quatre acyclonucléosides phosphonates commercialisés, deux possèdent une prodrogue de type carbonyloxyméthyl : l'adéfovir, sous forme *bis*-pivaloyloxyméthyl (*bis*(POM)) et le ténofovir, sous forme *bis*-isopropylloxyméthyl carbonate (*bis*(POC)). En effet, ces groupements biolabiles permettent d'augmenter grandement la biodisponibilité des molécules concernées. A titre d'exemple, le PMEA ne présente sous sa forme d'acide phosphonique qu'une biodisponibilité de 8%. En présence d'un groupement *bis*(POM), cette biodisponibilité est augmentée à 30%, et son activité est multipliée par un facteur 200. Cette grande disponibilité et métabolisation est aussi une conséquence de sa stabilité. De plus, il a une durée de demi-vie supérieure à 24h et est indiqué pour une administration par voie orale.²⁹

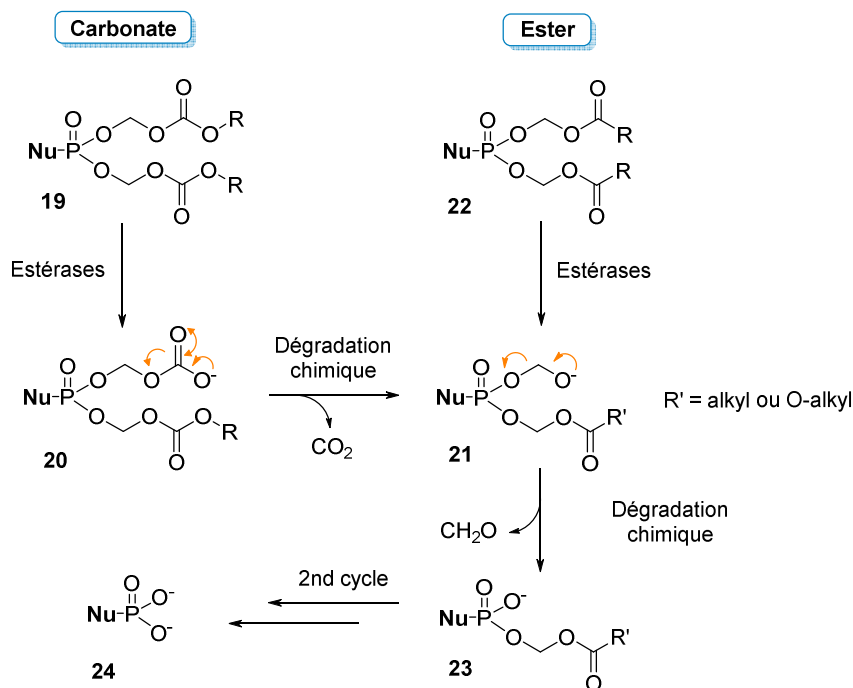


Schéma 7. Mécanisme d'activation des carbonyloxyméthylphosphates

²⁷ (a) Starrett, J. E., Tortolani, D. R., Hitchcock, M. J. M., Martin, J. C. & Mansuri, M. M. Synthesis and in vitro evaluation of a phosphonate prodrug: bis(pivaloyloxymethyl) 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Antiviral Res.* **19**, 267–273 (1992). (b) Naesens, L., Balzarini, J., Bischofberger, N. & De Clercq, E. Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, the bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 22–28 (1996).

²⁸ Cahard, D. Aryloxy Phosphoramidate Triesters as Pro-Tides. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**, (2004).

²⁹ (a) Starrett, J. E. J. et al. Synthesis, Oral Bioavailability Determination, and in vitro Evaluation of Prodrugs of the Antiviral Agent 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA). *J. Med. Chem.* **37**, 1857–1864 (1994). (b) Srinivas, R. V et al. Metabolism and in vitro antiretroviral activities of bis(pivaloyloxymethyl) prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2247–50 (1993).

Le mécanisme de libération des formes actives est similaire pour les formes carbonates et ester, mais il subsiste quelques différences (Schéma 7). Le composé **19** est hydrolysé par une estérase, libérant l'espèce **20** instable, qui va spontanément émettre du dioxyde de carbone pour former le composé **21**. Quant à l'ester, il ne subit que l'action de l'estérase pour former cet intermédiaire. Par la suite, cette molécule subit une dégradation chimique, formant le phosphonate **23**. Après un deuxième cycle d'élimination, le nucléoside monophosphate **24** est libéré dans la cellule.

➤ Aryloxyphosphoramidate

Dans les années 1990, les travaux de McGuigan ont abouti à la création de la technologie ProTide (PROdrug + nucleoTIDE) après un long travail de SAR (Structure-Activity Relationship). En 1992, ils ont étudié l'effet de diaryles phosphates **25** et d'aryloxyphosphoramidate **26** porté par l'AZT (Figure 6). Les aryloxyphosphoramidates testés ont montré une activité jusqu'à 300 fois plus importante que le nucléoside seul sur certaines lignées cellulaires, témoignée par une augmentation significative de la concentration intracellulaire d'AZT monophosphate. Cela se traduit par une pénétration cellulaire plus aisée pour l'AZT-ProTide, qui a un effet cytostatique plus marqué que l'antiviral commercial.³⁰ Ces prodrogues sont constituées d'un phénol, et d'un acide aminé sur le phosphate. Des études ultérieures ont montré un effet thérapeutique pour les phosphoramidates comportant un ester d'acide aminé alanine 10 fois plus fort que leurs analogues leuciniques et 100 fois plus fort que ceux glyciniques. Ils sont préparés facilement par double substitution sur le phosphodichloridate, induisant une chiralité sur l'hétéroatome.

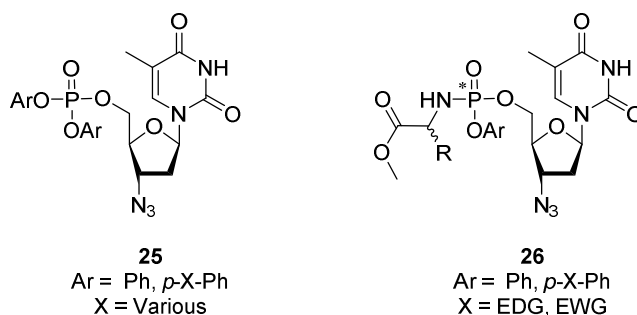


Figure 6. L'AZT, ses prodrogues diaryles et arylamidates

De par cette simplicité de préparation, ils se sont ensuite tournés vers l'amélioration des propriétés thérapeutiques et physico-chimiques de composés actifs. La stavudine **27**, aussi connu sous le nom de d4T, semble être un candidat idéal, conséquemment à la phosphorylation faible de sa forme monophosphate (Figure 7).³¹ Sous sa forme phosphoramidate, une optimisation a été menée, menant ainsi à une série de composés **28** avec différents esters d'alanines et phénols substitués. De manière générale, ces pronucléotides ont montré une activité dix fois supérieure à celle du d4T, allié à un SI supérieur (lignées

³⁰ (a) McGuigan, C., Pathirana, R. N., Balzarini, J. & De Clercq, E. Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* **36**, 1048–1052 (1993). (b) McGuigan, C., Pathirana, R. N., Mahmood, N., Devine, K. G. & Hay, A. J. Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* **17**, 311–321 (1992).

³¹ Balzarini, J., Herdewijn, P. & De Clercq, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **264**, 6127–33 (1989).

cellulaires CEM de HIV-1 et 2). De cette optimisation est ressorti la Stampidine **29**, actuellement en phase clinique I en tant qu'inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH.³²

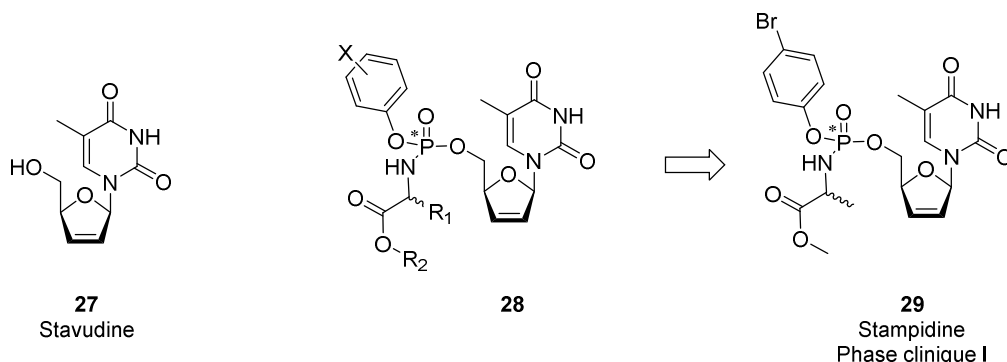


Figure 7. Le d4T et ses prodrogues phosphoramidates

Dans cette continuité, ces groupements biolabiles ont révélé pouvoir augmenter l'efficacité de certains nucléosides, allant même jusqu'à la révéler.³³ A l'heure actuelle, une petite dizaine de composés ont atteint le stade des tests en phases cliniques. Ces composés peuvent être des prodrogues de médicaments approuvés (comme la Thymectacine **30**, pronucléotide de la Brivudine)³⁴ ou même de molécules non commerciales (INX-08189 **31**). Ce succès synthétique a finalement permis la mise sur le marché de deux médicaments, le Ténofovir alafénamide **11** décrit précédemment, ainsi que le Sofosbuvir **32**, puissant inhibiteur très sélectif d'une polymérase de l'hépatite C (Figure 8).³⁵

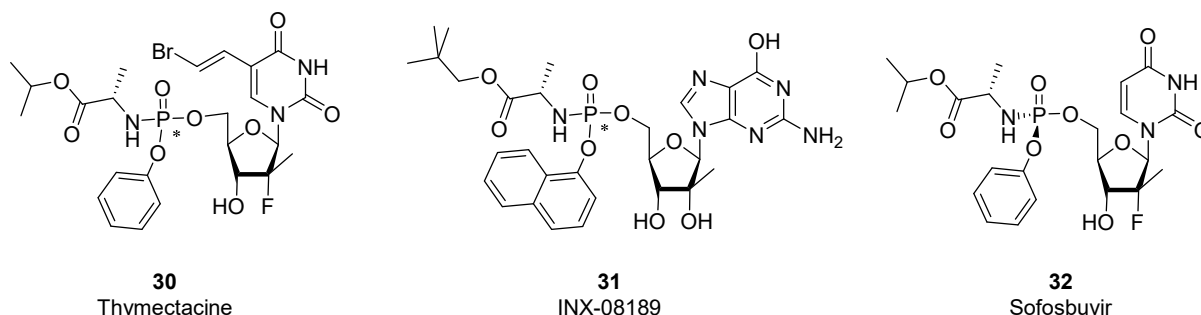


Figure 8. Aryloxyphosphoramidates bioactifs

Après avoir traversé la membrane cellulaire, le pronucléotide est pris en charge par une estérase ou la Cathepsin A, qui l'hydrolyse en carboxylate **33** (Schéma 8). Une molécule de phénol est libérée après une cyclisation intra-moléculaire, due à l'attaque du carboxylate sur le phosphore. Le cycle **34** est ensuite

³² (a) McGuigan, C., Cahard, D., Sheeka, H. M., De Clercq, E. & Balzarini, J. Aryl phosphoramidate derivatives of d4T have improved anti-HIV efficacy in tissue culture and may act by the generation of a novel intracellular metabolite. *J. Med. Chem.* **39**, 1748–53 (1996). (b) Siddiqui, A. Q. *et al.* Design and Synthesis of Lipophilic Phosphoramidate d4T-MP Prodrugs Expressing High Potency Against HIV in Cell Culture: Structural Determinants for in Vitro Activity and QSAR. *J. Med. Chem.* **42**, 4122–4128 (1999).

³³ (a) Mehellou, Y., Balzarini, J. & McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem*. **4**, 1779–1791 (2009). (b) Zemlicka, J. Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides. *Biochim. Biophys. Acta*. **1587**, 276–86 (2002).

³⁴ Lam, A. M. *et al.* PSI-7851, a Pronucleotide of -D-2'-Deoxy-2'-Fluoro-2'-C-Methyluridine Monophosphate, Is a Potent and Pan-Genotype Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3187–3196 (2010).

³⁵ Vernachio, J. H. *et al.* INX-08189, a phosphoramidate prodrug of 6-O-methyl-2'-C-methyl guanosine, is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1843–51 (2011).

hydrolysé, libérant le phosphonate **35**. Finalement une phosphoramidase, HINT-1, libèrera le principe actif **36** *in cellulo*.³⁶

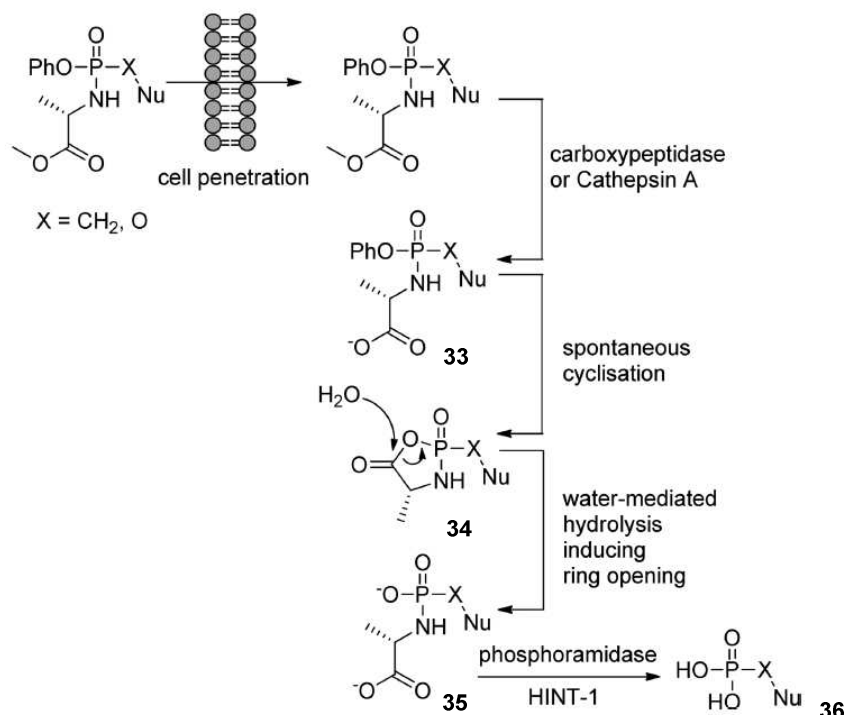


Schéma 8. Mécanisme d'action des aryloxyphosphoramidates

Après avoir introduit le concept et l'intérêt des nucléotides en chimie médicinale, et plus particulièrement l'importance des acyclonucléosides phosphonates, nous nous intéresserons à la synthèse de nouvelles familles d'ANP sous forme pronucléotide.

- Dans le premier chapitre, nous nous attacherons à développer la synthèse de 2'-méthylbut-2'-ényl nucléosides phosphonates. Après avoir établi les différentes voies d'accès aux synthons phosphonates, nous étudierons les méthodes décrites pour la synthèse d'alkényl acyclophosphononucléosides. Nous présenterons par la suite les travaux antérieurs du laboratoire, puis les travaux effectués au cours de ma thèse dans le cadre de la synthèse de *trans*-2'-méthylbut-2'-ényl phosphonates sous forme prodrogue.
- Dans le second chapitre, nous nous tournerons vers l'introduction du motif 2,4-diaminopyrimidine, en tant que nucléobase non canonique. Après un bref bilan de l'état de l'art dans ce domaine, nous exposerons les rétrosynthèses visant les charpentes visées. Par la suite, la synthèse de ces différents ANPs contenant ce motif sera exposé en détail.
- Dans le dernier chapitre, après développement de l'intérêt des prodrogues de type phosphoramidate, nous nous intéresserons à l'introduction de ce type de groupements sur les

³⁶ (a) Balzarini, J. *et al.* Mechanism of anti-HIV action of masked alaninyl d4T-MP derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7295–9 (1996). (b) Saboulard, D. *et al.* Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine. *Mol. Pharmacol.* **56**, 693–704 (1999).

ANPs oléfiniques. Les résultats biologiques nous permettront par la suite de juger de l'intérêt thérapeutique de ce type de prodrogue.

**VERS UNE NOUVELLE FAMILLE
D'ACYCLONUCLEOSIDES PHOSPHONATES**

I. Objectifs de la thèse et plan de travail

Face au problème général que représente la mutation des virus existants, et à l'apparition de virus émergents (H5N1, Zika...), il est toujours d'actualité de développer de nouvelles molécules. Compte tenu de l'importance des acyclonucléosides phosphonates et de leur potentiel antiviral, ajouté au développement des prodrogues, la synthèse dirigée de ces trois paramètres dans le but de créer de nouvelles molécules semble être un travail très prometteur.

- Dans un premier temps, suite au succès rencontré par le Tenofovir (actuellement employé dans huit traitements différents dans le cadre d'une infection au VIH), nous nous sommes inspirés de cette structure afin de créer une nouvelle classe d'acyclonucléosides. Cette originalité tiendra dans la modification de la chaîne acyclique, alliée à des bases pyrimidiques/puriques naturelles ou substituées sous leur forme carbonyloxyméthyle, prodrogue ayant déjà prouvé son efficacité (Figure 9). Parmi les méthodes de synthèses employées, nous nous efforcerons de pratiquer une chimie responsable en utilisant au maximum des moyens d'activation éco-compatibles comme des techniques d'activation alternatives de type micro-ondes ou ultrasons.

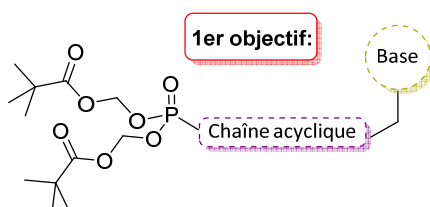


Figure 9. Modèle d'acyclonucléoside ciblé

- Par la suite, nous donnerons un rôle central à une nucléobase non-canonique, la 2,4-diaminopyrimidine (Figure 10). Afin d'étudier au maximum son potentiel thérapeutique, les substituants portés par cette chaîne acyclique seront étudiés, ainsi que les différents pronucléotides qui pourraient permettre une modulation de l'activité et du SI assez importante.

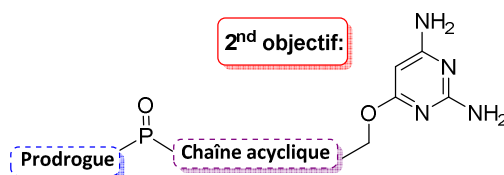


Figure 10. 2,4-diaminopyrimidine comme squelette central

- Pour finir, une importance particulière sera donnée à un type de prodrogue en plein essor : La prodrogue arylphosphonoamidate. Une méthodologie de synthèse autour de ces groupements sera mise au point, ainsi que l'impact thérapeutique de ces noyaux sur les ANP (Figure 11).

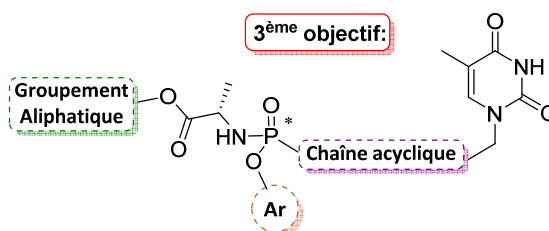


Figure 11. Dérivés arylphosphonoamidates

II. Conception et synthèse de *trans*-2'-butényles *N*-nucléosides phosphonates

1 Les acyclonucléosides phosphonates oléfiniques

➤ Modification de la chaîne acyclique : Du pont éther à l'oléfine

Après le fort développement des ANP en tant que molécules bioactives, beaucoup d'équipes se sont tournées vers la modulation de la chaîne acyclique, et notamment la modulation du pont éther présent sur cette partie. Ainsi, dans le but de mimer l'atome d'oxygène, certaines équipes se sont intéressées au potentiel des groupements amino,³⁷ sans que ces modifications n'apportent un réel bénéfice. D'autres modifications ont montré avoir un faible effet cytostatique, comme les molécules possédant un noyau isoxazolidine³⁸ ou acétamido³⁹, reliés à la base nucléique par un triazole. Ce même hétérocycle a d'ailleurs été utilisé directement comme espaceur entre le phosphonate et la base nucléique à l'aide d'une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, dit chimie "click". Si ces composés présentent une activité assez faible de 16 μ M sur HCV, ils ne présentent cependant pas de cytotoxicité.⁴⁰

L'étude des acyclonucléosides dépourvus d'hétéroatomes était aussi de mise. En effet, étant donné le succès des carbanucléosides, diverses équipes se sont adonnées à la synthèse d'acyclonucléosides phosphonates portant des chaînes saturées ou insaturées, ces dernières pouvant mimer l'effet électronique du phosphore. Dans ce contexte s'est construite la recherche visant à synthétiser les acyclonucléosides oléfiniques **38** (Figure 12).

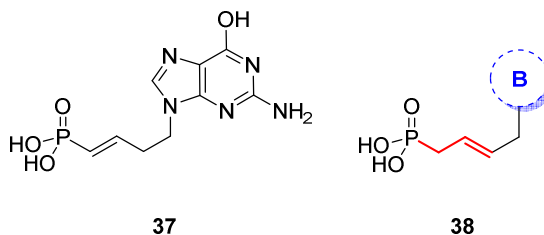


Figure 12. Quelques ANPs insaturés bioactifs

➤ Préparation des phosphonates oléfiniques

Selon le type de phosphonate à préparer, qu'il soit vinylique ou allylique, plusieurs moyens sont déjà décrits dans la littérature pour y parvenir.

³⁷ (a) Koszytkowska-Stawińska, M., Clercq, E. De & Balzarini, J. Synthesis and antiviral activity evaluation of acyclic 2'-azanucleosides bearing a phosphonomethoxy function in the side chain. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3756–3762 (2009). (b) Zhou, D., Lagoja, I. M. & Aerschot, A. Van. Some Novel Aminopropyl Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **26**, 563–566 (2007).

³⁸ Piotrowska, D. G., Balzarini, J. & Głowacka, I. E. Design, synthesis, antiviral and cytostatic evaluation of novel isoxazolidine nucleotide analogues with a 1,2,3-triazole linker. *Eur. J. Med. Chem.* **47**, 501–509 (2012).

³⁹ Głowacka, I. E., Balzarini, J. & Wróblewski, A. E. Novel Acyclic Phosphonylated 1,2,3-Triazolonnucleosides with an Acetamidomethyl Linker: Synthesis and Biological Activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **347**, 506–514 (2014).

⁴⁰ Elayadi, H. *et al.* Straightforward synthesis of triazoloacyclonucléotide phosphonates as potential HCV inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7365–7368 (2010).

La réaction la plus décrite est la réaction de Michaelis-Arbuzov, qui fait intervenir la trialkylphosphite en présence du bromure d'allyle voulu (Schéma 9).⁴¹

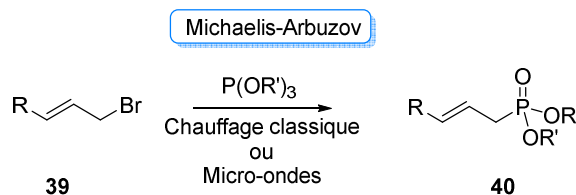


Schéma 9. Réaction de Michaelis-Arbuzov

Si cette réaction est efficace, permettant un accès rapide au produit désiré, elle souffre néanmoins de limitations : dégradation du produit à haute température ainsi que des isomérisations indésirables. D'autres chemins synthétiques sont toutefois envisageables, à partir du dialkylphosphite **41** (Schéma 10). Une des réactions les plus simples est celle de Michaelis-Becker, qui consiste à l'arrachement du proton du phosphite, suivi de la substitution nucléophile sur le bromure d'alkyle correspondant. Ce même phosphonate **42** peut aussi être obtenu par couplage pallado-catalysé entre ce même phosphite et l'allène substitué nécessaire. Une autre méthode d'obtention d'un phosphonate est une réaction de Pudovik entre le phosphite déprotoné et un aldéhyde α,β insaturé, donnant ici le composé **43**. De manière générale, l'énantiosélectivité peut être induite en alpha du phosphore grâce à des catalyseurs au titane ou à l'aluminium.⁴²

Cette même réaction de Pudovik, suivie d'un traitement acide et d'une élimination, permet aussi d'obtenir l'espèce vinylphosphonate **45**. Excepté la réaction de Michaelis-Becker, qui comme précédemment permet d'obtenir le vinylphosphonate après déprotonation, la plupart des méthodes développées dans le but d'obtenir ces espèces sont des couplages métallo-catalysés. Un catalyseur à base de rhodium va pouvoir effectuer une hydrophosphorylation entre un alcyne vrai et le phosphite portant un pinacol, permettant l'obtention du phosphonate **44** avec d'excellent rendements à température ambiante.⁴³ Des couplages plus conventionnels à base de palladium et de cuivre ont aussi été reportés, entre les dialkylphosphites et les bromures de vinyliques.⁴⁴

⁴¹ (a) Michaelis, A. & Kaehne, R. Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*. **31**, 1048–1055 (1898). (b) Bhattacharya, A. K. & Thyagarajan, G. Michaelis-Arbuzov rearrangement. *Chem. Rev.* **81**, 415–430 (1981).

⁴² (a) Abell, J. P. & Yamamoto, H. Catalytic Enantioselective Pudovik Reaction of Aldehydes and Aldimines with Tethered Bis(8-quinolinato) (TBOx) Aluminum Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10521–10523 (2008). (b) Nakamura, S., Nakashima, H., Yamamura, A., Shibata, N. & Toru, T. Organocatalytic Enantioselective Hydrophosphonylation of Sulfonylimines having a Heteroarenesulfonyl Group as a Novel Stereocontroller. *Adv. Synth. Catal.* **350**, 1209–1212 (2008).

⁴³ Zhao, C.-Q., Han, L.-B., Goto, M. & Tanaka, M. Rhodium-Catalyzed Hydrophosphorylation of Terminal Alkynes Leading to Highly Selective Formation of (E)-Alkenylphosphonates: Complete Reversal of Regioselectivity to the Palladium-Catalyzed Counterpart. *Angew. Chemie Int. Ed.* **40**, 1929–1932 (2001).

⁴⁴ (a) Hirao, T., Masunaga, T., Ohshiro, Y. & Agawa, T. Stereoselective synthesis of vinylphosphonate. *Tetrahedron Lett.* **21**, 3595–3598 (1980). (b) Gelman, D., Jiang, L. & Buchwald, S. L. Copper-Catalyzed C–P Bond Construction via Direct Coupling of Secondary Phosphines and Phosphites with Aryl and Vinyl Halides. *Org. Lett.* **5**, 2315–2318 (2003).

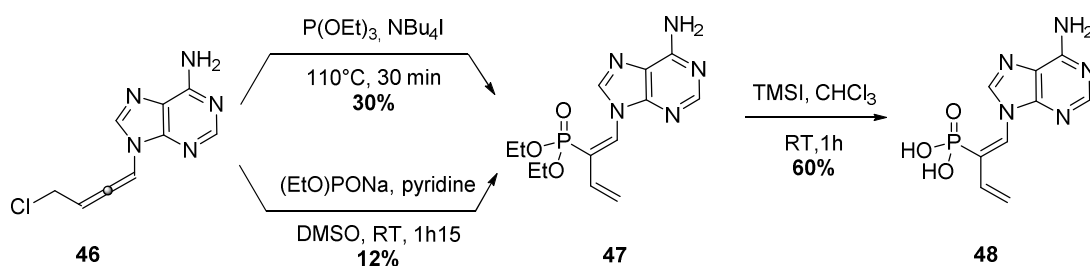


Schéma 11. Synthèse du premier éthényl ANP

Lazrek *et coll.* a décrit la synthèse d'ANP portant un motif éthényl non substitué (Schéma 12). La stratégie employée dans le but d'obtenir les oléfines **50** passe par une réaction de Michael sur des phosphonates comportant un alcyne vrai en alpha de l'atome de phosphore.⁴⁶ Après optimisation, les meilleurs rendements sont obtenus en utilisant le carbonate de potassium en tant que base, avec un ratio *Z/E* de 8/2 pour les bases puriques, et 2/8 pour les bases pyrimidiques. Cette dernière base étant plus forte, l'attaque de la nucléobase se fait sur le phosphonate, électrophile "dur", et non sur l'alcyne, électrophile "mou". La déprotection des groupements éthyles se fait à l'aide de bromure de triméthylsilane dans le DMF pendant 20h, formant ainsi les acides phosphoniques désirés **51**. Cependant, ces molécules n'ont pas montré d'activités thérapeutiques.

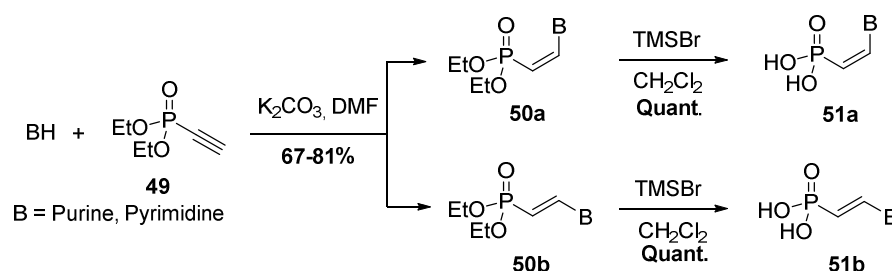


Schéma 12. Synthèse des acides phosphoniques selon Lazrek

➤ Acyclonucléosides phosphonates butényles

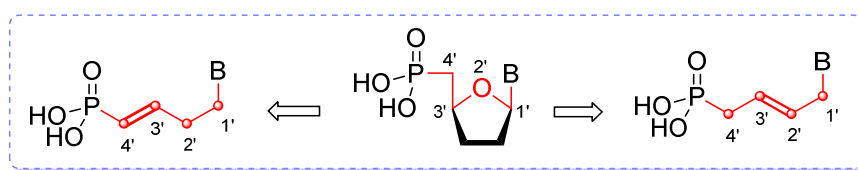


Figure 14. Analogie entre les acyclonucléosides butényles et un nucléoside

La longueur entre le phosphore et la base nucléique pour ce type d'ANP est de quatre chaînons, espaceur de même taille que ceux présents sur les nucléosides naturels (Figure 23). Le pont éther y est ici remplacé par une double liaison en 3'-4' (vinylphosphonate) ou en 2'-3' (allylphosphonate).

En 1993, Perkins a proposé la première synthèse de phosphonates vinyliques.⁴⁷ Dans un premier temps, il s'est attaché à la synthèse de noyaux ANP vinyliques non substitués. Ce squelette a été préparé en version

⁴⁶ (a) Lazrek, H. B., Khaïder, H., Rochdi, A., Barascut, J.-L. & Imbach, J.-L. Synthesis of new acyclic nucleoside phosphonic acids by Michael addition. *Tetrahedron Lett.* **37**, 4701–4704 (1996). (b) Lazrek, H. B. *et al.* Synthesis of (Z) and (E) α -alkenyl phosphonic acid derivatives of purines and pyrimidines. *Tetrahedron.* **54**, 3807–3816 (1998).

⁴⁷ Harnden, M. R., Parkin, A., Parratt, M. J. & Perkins, R. M. Novel Acyclonucleotides: Synthesis and Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **36**, 1343–1355 (1993).

cis et *trans* par deux méthodes d'oléfinations différentes. Tout d'abord, la version *E*-sélective est préparée par une réaction de Wadsworth-Emmons, produisant l'*isopropylphosphonate* **53a**. Son analogue *Z* est synthétisé par la réaction de Peterson, qui ne permet cependant pas d'obtenir le dérivé *cis* de façon sélective. Les acides phosphoniques **54a-b** sont ensuite obtenus après la déprotection du groupement silyle, l'introduction de la base par réaction de Mitsunobu et le clivage des esters de phosphonates (Schéma 13).

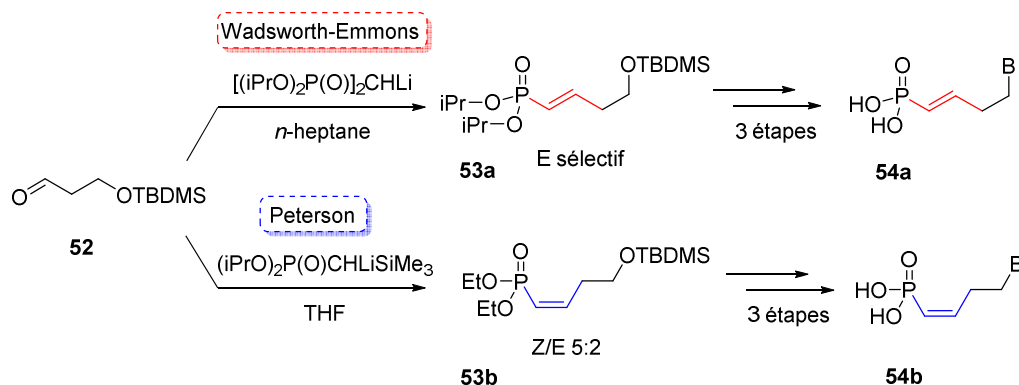


Schéma 13. Obtention des dérivés but-3-ényles sous leurs formes *cis* et *trans*

Cette équipe s'est aussi tournée vers la synthèse d'ANP substitués en position 2'. La stratégie de synthèse est cependant légèrement modifiée, après la prise en compte de l'introduction d'un groupement hydroxyle potentiellement réactif. Dans un premier temps, le composé phosphonate est obtenu de la même façon que précédemment, par une oléfination de Wadsworth-Emmons. Après une réaction de Wadsworth-Emmons et une série de protection-déprotection, le diol monosilylé **112** est sujet à une réaction de Mitsunobu, suivi de la déprotection des différents groupements, menant aux acides phosphoniques espérés **113** (Schéma 14).

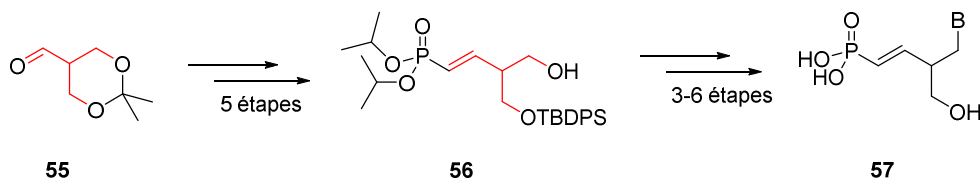


Schéma 14. Synthèse d'analogues d'ANP possédant un hydroxyméthyle

Parmi ce large éventail de molécules synthétisées, certaines molécules atteignent des résultats biologiques assez intéressants de l'ordre du micromolaire sur HIV-1 (0.10 μ M), VZV (15 μ M) ou même CMV (0.53 μ M).

L'ANP but-3-ényle a aussi été préparé sous sa forme non substituée en 2012 par l'équipe de Brel. Dans un premier temps, l'allène phosphorylé est synthétisé directement à partir de l'alcool **58** par un réarrangement sigmatropique de Horner-Mark. La substitution du chlore par l'hétérocycle azoté libère l'allène substitué qui instable, se réarrange en alcyne **60**. Une post-hydrogénolyse suivie de la déprotection du phosphonate forme les acides phosphoniques **54b** (Schéma 15).⁴⁸

⁴⁸ (a) Brel, V. Synthesis and some transformation of acyclic nucleotide phosphonate analogues with triple bond. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 535–536 (2008). (b) Brel, V. A New Approach to the Synthesis of Acyclic Nucleotide Phosphonate Analogues with Triple or Double Bonds. *Synthesis*. **44**, 2359–2364 (2012).

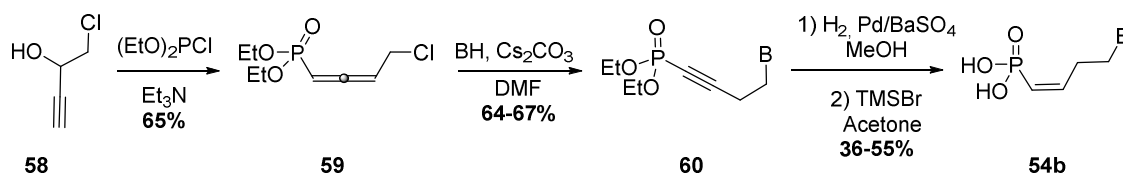


Schéma 15. Synthèse de (Z)-but-3-ényle phosphononuécléosides

Si la série but-3-ényle a été sujette à de nombreuses recherches, il n'en est pas de même pour les molécules possédant une chaîne but-2'-ényle. En effet, ces composés n'ont été décrit qu'une fois en 1992 par Zemlicka,⁴⁵ qui n'a toutefois pas reporté d'activité antivirale pour les composés synthétisés. L'adénine **63** est obtenue en deux étapes successives : Dans un premier temps, une réaction de Michaelis-Arbuzov entre le triéthylphosphite et l'adénine substituée **61**, suivie d'une déprotection à l'iodure de triméthylsilyle, afin de libérer l'acide phosphonique correspondant. La stratégie de synthèse reste la même dans le cas du composé *cis* **65**, subissant finalement un traitement à l'aide d'acide chlorhydrique aqueux, dans le but d'oxyder la position 6 de la purine, la transformant en guanine **66** (Schéma 16).

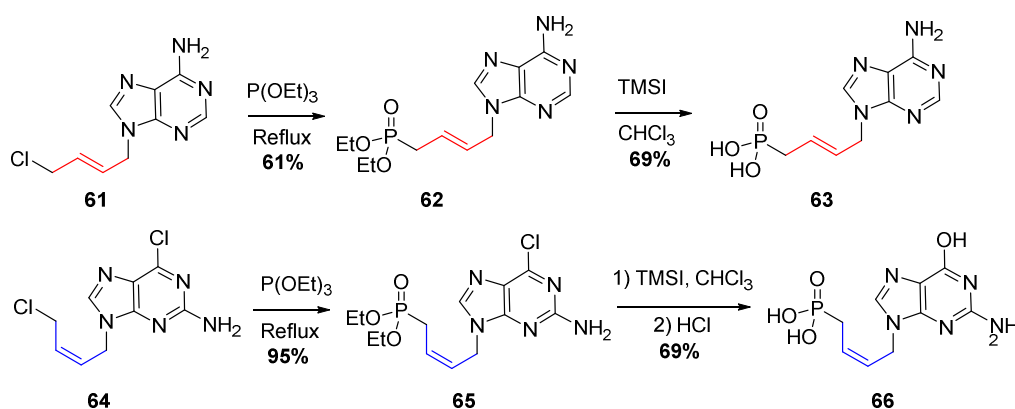


Schéma 16. Obtention des dérivés but-2'-ényles

➤ Acyclonuécléosides phosphonates pentényle

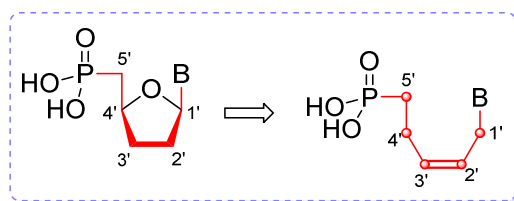


Schéma 17. Modèle d'ANP pentényle

En 2006, Hostetler a développé les acyclonuécléosides phosphonates en série pent-2'-ényle, montrant leur potentiel anti-HSV (Schéma 18).⁴⁹ Dans un premier temps, le butynol **67** subit des protections/déprotection/substitution afin de pouvoir bromer sélectivement le groupement hydroxy présent en β de l'alcyne. Une réaction de Michaelis-Arbuzov, récurrente dans la synthèse d'analogues de nucléosides, permet d'obtenir le phosphonate **69**. Après une hydrogénéolyse sur palladium empoisonné

⁴⁹ (a) Hostetler, K.Y., Beadle, J.R., Choo, H. Phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides and analogs, WO2006137953 (A1), 2006-12-28 (b) Choo, H., Beadle, J. R., Chong, Y., Trahan, J. & Hostetler, K. Y. Synthesis of the 5-phosphono-pent-2-en-1-yl nucleosides: A new class of antiviral acyclic nucleoside phosphonates. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 1771–1779 (2007).

avec du sulfate de baryum, l'alcène Z est désilylé en présence de TBAF dans le THF. L'intermédiaire synthétique **70** ainsi formé va ensuite subir la condensation d'une base nucléique (purine ou pyrimidine), suivie de la déprotection des groupements éthoxy présents sur le phosphore. A partir de l'acide phosphonique, la prodroge hexadécylpropyloxy, initié par ce groupe de recherche, est ensuite introduit efficacement sur les composés d'intérêt. Certains de ces composés montrent des activités submicromolaires sur HSV ($EC_{50} = 0.90 \mu M$), à nuancer cependant par un indice de sélectivité assez faible de 8.

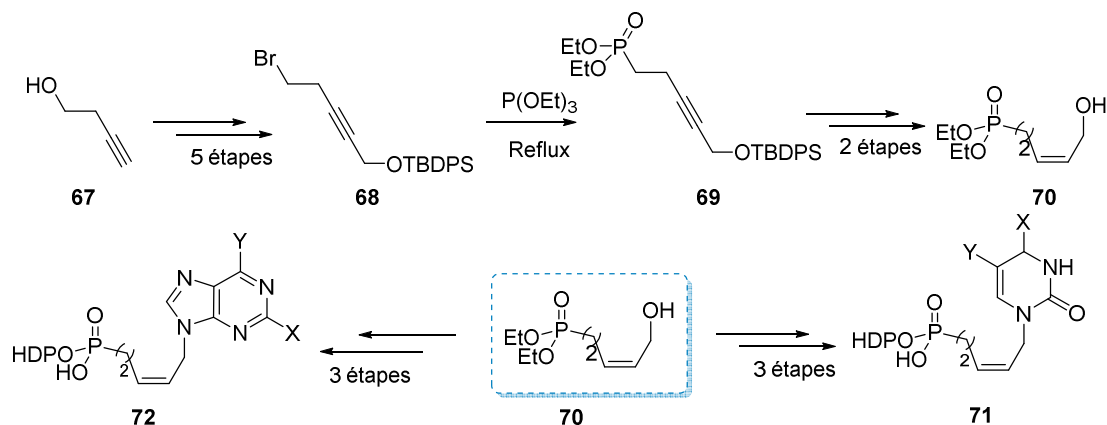


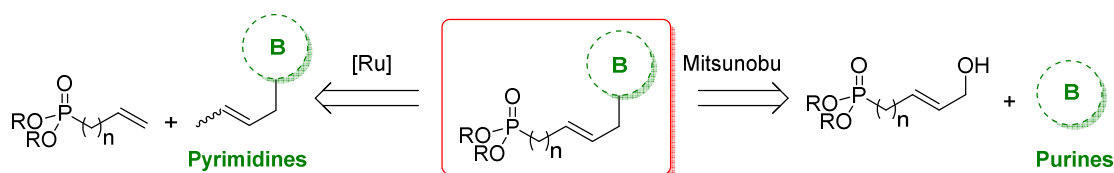
Schéma 18. Synthèses des ANPs en série pentényle

2 Travaux antérieurs du laboratoire

Depuis 2005, notre équipe s'est intéressée aux synthèses d'alkénylephosphonates, et plus précisément au le motif but-2'-ényle.⁵⁰ Les différents nucléosides ont été synthétisés sous forme acide ainsi que sous forme prodroge, pour évaluer la potentialité thérapeutique des principes actifs, mais aussi juger de l'efficacité des pronucléotides et de leur impact sur la pénétration cellulaire.

La principale méthodologie de synthèse qui a été mise au point au laboratoire dans le but de développer de nouveaux ANP repose sur une étape clef : la métathèse croisée entre un phosphonate et une nucléobase modifiée (Schéma 19). Les pyrimidines substituées sont fonctionnalisées en N^1 après une protection en N^3 tandis que les phosphonates peuvent être préparés par une réaction de Michaelis-Becker. Une réaction de métathèse croisée est une méthode convergente permettant d'obtenir les ANP pyrimidiques voulus en peu d'étape. En ce qui concerne les bases puriques, elles sont introduites dans des conditions de Mitsunobu sur le phosphonate hydroxylé correspondant. En effet, en présence de ruthénium, l'abondance des atomes d'azotes empoisonnent le catalyseur, empêchant toute réactivité.

⁵⁰ (a) Agrofoglio, L.A., Roy, V. Novel antiviral acyclic nucleoside phosphonates, WO2012034719 (A1) 2012-03-22 (b) Montagu, A., Pradère, U., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. Expedient convergent procedure for the preparation of bis(POC) prodrugs of new (E)-4-phosphono-but-2-en-1-yl nucleosides. *Tetrahedron*. **67**, 5319–5328 (2011). (c) Hamada, M. *et al.* Synthesis and broad spectrum antiviral evaluation of bis(POM) prodrugs of novel acyclic nucleosides. *Eur. J. Med. Chem.* **67**, 398–408 (2013). (d) Roy, V. *et al.* Cross-Metathesis Mediated Synthesis of New Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. **26**, 1399–1402 (2007). (e) Bessières, M. *et al.* in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 14.11.1-14.11.17 (John Wiley & Sons, Inc., 2014).



➤ Analogues pyrimidiniques non substitués

Dans ce contexte, les trois séries suivantes ont été développées (Figure 15).

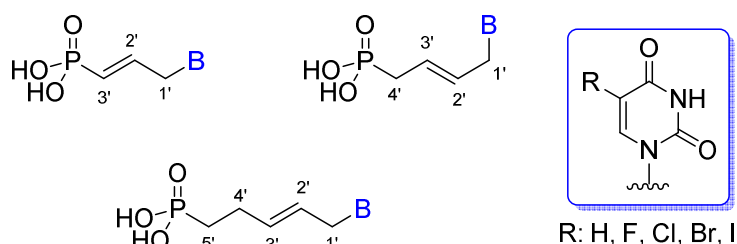
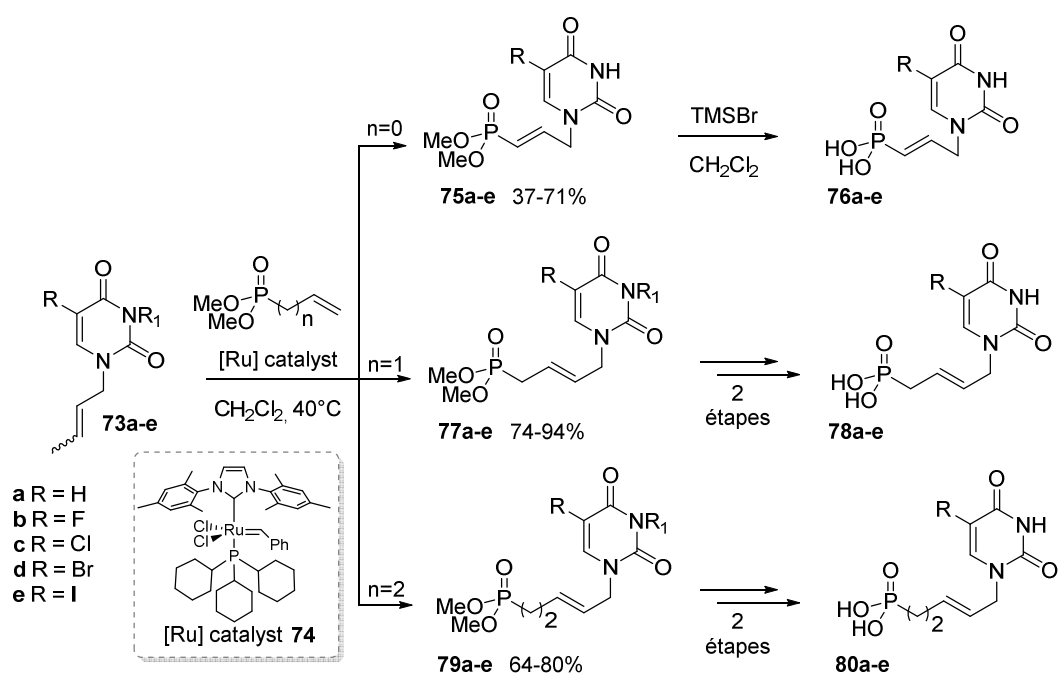


Figure 15. Acides phosphoniques en série propyle, butényle et pentényle

Selon le schéma précédent (Schéma 20), les pyrimidines crotylées sont préparées dans un premier temps. Après la benzylation sélective en position N³, les crotyles sont introduits par substitution nucléophile en position N¹. Une fois les pyrimidines substituées **73a-e** produites, elles sont engagées dans une réaction de métathèse, catalysée par le catalyseur de Nolan-Grubbs **74**. Cette réaction se réalise au reflux du dichlorométhane, permettant d'obtenir les composés **75a-e** et **77a-e** avec des rendements compris entre 64 et 94%. La série propyle **79a-e** est obtenue quand à elle par métathèse directe entre les pyrimidines présentant un NH libre en position 3. Les méthoxyphosphonates **E** sont par la suite déprotégés dans le but de libérer les acides phosphoniques **76**, **78** et **80**.



Une des limitations des acyclonucléosides phosphonates est leur faible reconnaissance par les *nucleosides monophosphate* kinase humaine (NMPK), empêchant leur formation finale en triphosphate actif.⁵¹ L'inhibition mesurée de ces composés sur la *thymidine monophosphate kinase humaine* (hTMPK) et *human UMP-CMP kinase* (hUCK), en comparaison avec l'incorporation des désoxynucléotides. De ces essais, nous en avons conclu la chaîne but-2'-ényle est la mieux reconnue par la hTMPK (Figure 16).

Dans un second temps, l'influence de la stéréochimie de la double liaison sur la phosphorylation des principes actifs a été évaluée. L'étude a été réalisée entre les stéréoisomères *Z* et *E* de la série butényle, dans le but de déterminer lequel présente la meilleure affinité avec la hTMPK, indiquant les isomères *E* comme meilleurs substrats (Figure 17).

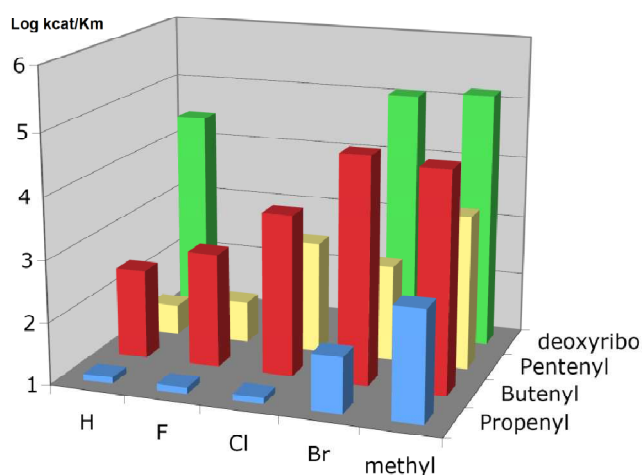


Figure 16. Histogramme de l'efficacité de la hTMPK sur les différents substrats

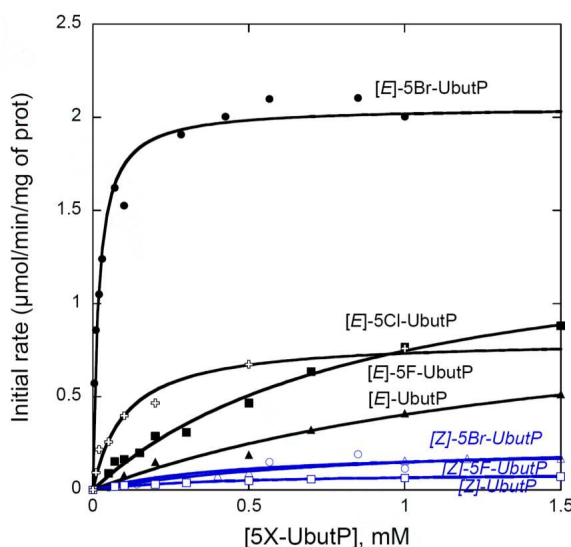


Figure 17. Taux de phosphorylation des substrats en fonction de la stéréochimie de ce dernier

Ces résultats sont en accord avec les données cristallographiques. En effet, le composé **78e** phosphorylé a été co-cristallisé avec la hTMPK, et comparé avec les données connues de son analogue naturel, la

⁵¹ Topalis, D. *et al.* Novel antiviral C⁵-substituted pyrimidine acyclic nucleoside phosphonates selected as human thymidylate kinase substrates. *J. Med. Chem.* **54**, 222–32 (2011).

thymidine diphosphate. Les deux structures présentent une très bonne superposition au sein de l'enzyme, ce qui montre le potentiel de la série but-2'-ényle.

La faible biodisponibilité causée par la présence d'un diacide phosphonique provoque une activité faible, voir nulle. Afin de contourner cette limitation, ces molécules ont été converties sous leur forme prodrogue, pour améliorer cette biodisponibilité et de libérer leurs formes actives dans la cellule.⁵² Trois prodrogues différentes ont été choisies : le POM (pivaloyloxyméthyl), les groupements POC (*isopropyl oxyméthyl carbonate*), ainsi que le monoester hexadecylpropyloxy d'Hostetler (HDP). La synthèse de ces différents composés a été effectuée avec la même stratégie que précédemment (Figure 57). Les bases nucléiques *N*¹ crotylées possédant une fonction NH libre en position 3 est mis en réaction avec les phosphonates portant les groupements biolabiles, synthétisés à partir du diméthylallylphosphonate commercial. La réaction de métathèse croisée permet un accès direct aux molécules de configuration *E* **82**. Seule étape optionnelle, la déprotection d'un groupement POC en OH afin d'obtenir la prodrogue HDP/OH d'Hostetler. La déprotection d'un groupement POC en OH en présence de NaOH 0.1M a été mise au point au laboratoire. Après évaluation biologique des différents composés synthétisés, le groupement biolabile ayant montré le plus d'efficacité s'avère être le groupement pivaloyloxyméthyl POM (Figure 18).

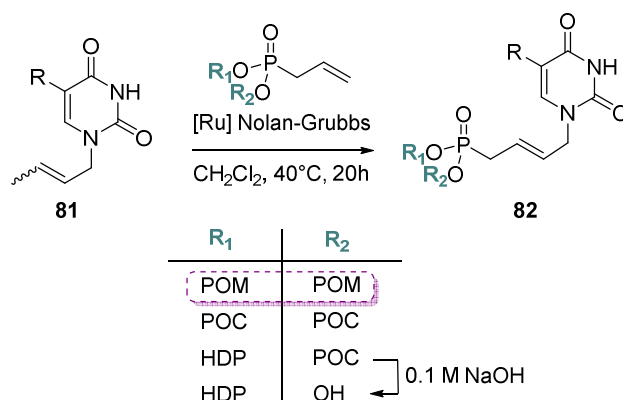


Figure 18. Synthèse des ANPs pyrimidines sous forme prodrogue

Le composé le plus efficace est l'ANP comportant la thymine, portant les deux groupements POM. Ce phosphonate présente une IC₅₀ sur VZV TK⁻ de 0.19 µM pour une CC₅₀ de 38.1 µM, ce qui fait de ce dérivé un des composés nucléosidiques les plus puissants sur ce virus.

➤ *bis*(POM) ANPs but-2'-ényles phosphonate avec une base purique

La chaîne but-2'-ényle phosphonate a aussi été développée avec des nucléobases puriques. Cependant la stratégie de synthèse précédemment utilisée doit être modulée, dû aux hétérocycles fortement azotés que sont les bases puriques. Dans un premier temps, il est donc nécessaire de préparer le synthon **84** qui pourra être engagé dans une réaction de Mitsunobu, étape clef d'introduction de ces bases nucléiques. Une réaction de métathèse croisée est réalisée entre le *bis*(POM) allylphosphonate **83**, et son partenaire dihydroxylé. Après une brève optimisation avec différents alcools allyliques, le *cis*-butan-1,4-diol apparaît comme être le composé produisant le meilleur rendement en présence de 5 mol% de catalyseur, au reflux du dichlorométhane. Cet alcool allylique **84** est ensuite sujet à une réaction de Mitsunobu, qui permet de

⁵² Pradère, U., Clavier, H., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The Shortest Strategy for Generating Phosphonate Prodrugs by Olefin Cross-Metathesis - Application to Acyclonucleoside Phosphonates. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 7324–7330 (2011).

manière générale d'aboutir à la formation du composé **85** avec des rendements compris entre 39 et 74% (Schéma 21).

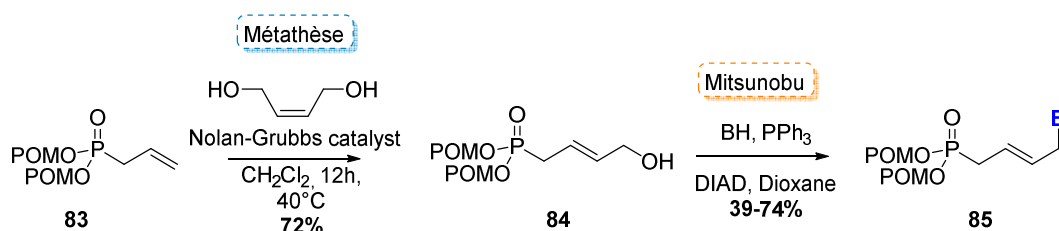
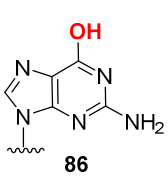
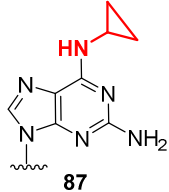
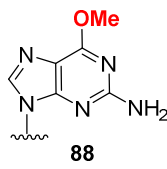


Schéma 21. Schéma synthétique général

Toutes les molécules synthétisées ont été évaluées sur divers virus tels que VV, HSV-1 et 2, VZV, VSV, Influenza, HIV-1 et 2, et trois molécules ont montré de fortes activités sur VZV ainsi que sur HIV. Encore une fois, ces activités sont à pondérer avec une cytotoxicité assez élevée (Tableau 3).

Tableau 3. Activités des molécules les plus intéressantes

			
EC ₅₀ μM VZV TK⁺	1.0 + 0.0	0.8 + 0.0	0.1 + 0.4
EC ₅₀ μM VZV TK⁻	0.8 + 0.4	0.8 + 0.0	0.5 + 0.3
EC ₅₀ μM HIV-2	/	/	0.3 + 0.1
CC ₅₀ μM	4.1 + 0.1	2.3 + 0.1	1.6 + 0.4

➤ Analogues substitués en position 2' (Type HPMP ou PMP)

Une fois le potentiel thérapeutique démontré pour cette série de molécule, l'équipe s'est tournée vers la synthèse de composés substitués en position 2' par un méthyle et un hydroxyméthyl, inspirés de la série PMP et HPMP.

Ces composés possèdent une oléfine tri-substituée, véritable challenge *via* la métathèse croisée.⁵³ Une optimisation de cette étape a permis de déterminer des conditions permettant l'obtention du diacétate **89** avec un excellent rendement, après irradiation sous ultrasons. Une fois le diacétate synthétisé, le composé **90** est par la suite désymétrisé par une réaction de déprotection sélective enzymatique d'un acétate, donnant le composé **91** avec un bon rendement de 83%. Une optimisation en fonction de l'enzyme employée a été effectuée, révélant la lipase B de *Candida Antarctica* (CAL-B) comme étant la plus sélective. Cet hydroxyle produit permet ensuite l'introduction de la base d'intérêt par un couplage de Mitsunobu

⁵³ Sari, O., Hamada, M., Roy, V., Nolan, S. P. & Agrofoglio, L. A. The preparation of trisubstituted alkenyl nucleoside phosphonates under ultrasound-assisted olefin cross-metathesis. *Org. Lett.* **15**, 4390–3 (2013).

comme précédemment, avec des bases puriques comme pyrimidiques, conduisant aux acides phosphoniques **92** en présence de bromure de triméthylsilane (Schéma 22).

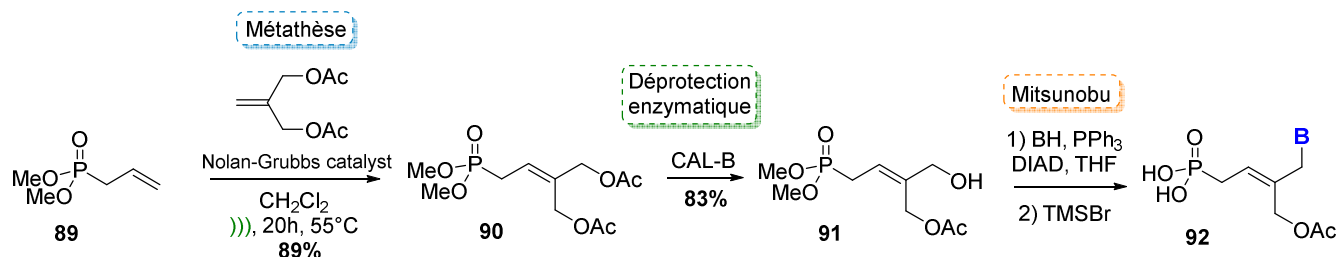


Schéma 22. Chemin synthétique pour ANP portant un alcène trisubstitué

En ce qui concerne les analogues portant un substituant méthyle en position 2', les travaux préliminaires ont été effectués au laboratoire, suivant la même stratégie que précédemment en version acide phosphonique. La réaction de métathèse est réalisée entre le diméthylallylphosphonate **80** et le 2-méthylprop-1-ène-3-ol avec un bon rendement de 79% selon les conditions optimisées sous ultrasons, avec une charge catalytique de 15 mol% dans le dichlorométhane. Le couplage de Mitsunobu entre le synthon **84** et les bases nucléiques suivi d'une étape de déprotection permet d'aboutir aux acides phosphoniques **85** (Schéma 23).

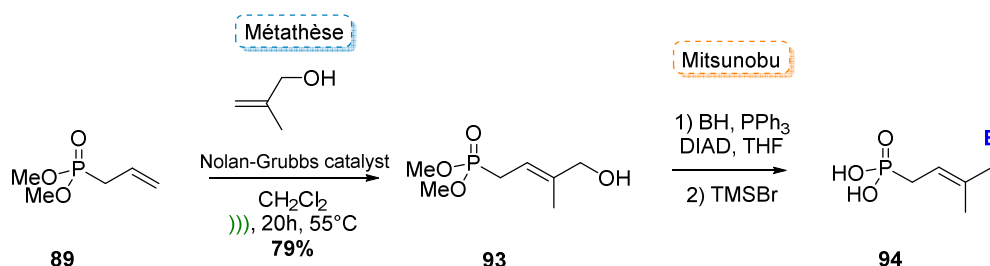


Schéma 23. Synthèses des acides phosphoniques portant un méthyle en 2'

Les bases pyrimidiques s'introduisent quand à elle par métathèse croisée, donnant les composés **96a-c**. La préparation de ces bases nucléiques **95a-c** est convergente, par benzylation sélective de la position N^3 suivie par alkylation de la position N^1 par simple substitution nucléophile. La nucléobase peut ensuite servir de partenaire dans le couplage métallo-catalysé, suivie d'une déprotection des groupements benzoyles à l'aide d'une solution de NH_3 dans le méthanol, pour finir par celle des groupements méthoxy à l'aide de bromure de triméthylsilane (Schéma 24).

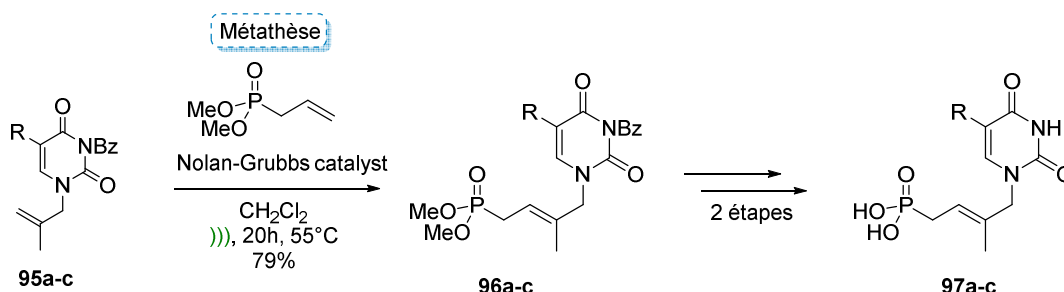


Schéma 24. Synthèse des ANPs 2' méthyle en série pyrimidine

3 Rétrosynthèse envisagée

Après la synthèse des acides phosphoniques, l'objectif est d'adapter la synthèse de ces derniers en version pronucléotide. Comme précédemment, le groupement bioactif le plus intéressant à introduire est le groupement *bis*(POM) (Figure 19). Dans la série acyclonucléoside phosphonate classique, à laquelle appartient l'Adéfovir ou le Ténofovir, l'impact du groupement méthyle en position 2' par rapport à la base nucléique fut très profond, puisque désormais capable de lutter contre des infections comme le VIH plus efficacement. Cette modulation peut aussi s'appliquer à notre classe d'alkénylacyclonucléotide, puisqu'avec des outils synthétiques adaptés, l'introduction du groupement méthyl en 2' est désormais possible. Pour finir, dans l'optique de démontrer des propriétés thérapeutiques optimales, la nature de différentes nucléobases seront étudiées.

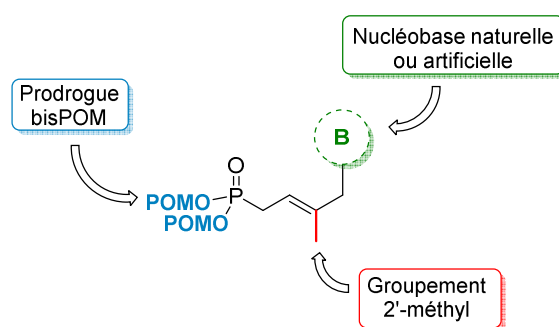


Figure 19. Modèle de nucléoside à synthétiser

Pour ce faire, les ANP visés **98** subiront une réaction de Mitsunobu dans le but d'introduire la base nucléique. Pour obtenir l'alcool allylique nécessaire à cette réaction, le synthon alcool peut être introduit à partir du composé **83**, par réaction entre le *bis*(POM)allylphosphonate et le propèneol correspondant (Schéma 25).⁵⁴

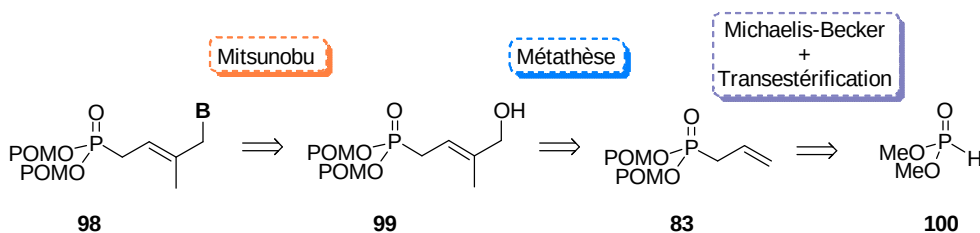


Schéma 25. Rétrosynthèse envisagée

4 Résultats et discussions

➤ Rappels sur la métathèse d'oléfines

⁵⁴ Bessières, M. *et al.* Sonication-Assisted Synthesis of (*E*)-2-Methyl-but-2-enyl Nucleoside Phosphonate Prodrugs. *ChemistrySelect* **1**, 3108–3113 (2016).

La réaction de métathèse d'oléfines est un des outils synthétiques les plus puissants menant à la formation de liaisons C-C dans le domaine de la chimie organique.⁵⁵ Elle a d'ailleurs valu à ses inventeurs R.H. Grubbs, Y. Chauvin et R. Schrock le prix Nobel de chimie en 2005. Cet outil est incontournable pour plusieurs raisons:

- L'accessibilité : En effet, si de manière générale les oléfines terminales ou disubstituées sont facilement accessibles, il est en revanche plus compliqué de synthétiser des oléfines tri- ou tétrasubstituées. Ces dernières représentent un véritable challenge synthétique, que ce soit par leur encombrement stérique ou même par la configuration *cis/trans*, problématique à contrôler.
- Le mécanisme de métathèse : Compte tenu du mécanisme catalytique, le seul sous-produit dégagé lors de cette réaction est l'éthylène dans le cas d'une réaction de métathèse cyclisante, qui peut être facilement séparé du milieu réactionnel par simple évaporation ou dégazage.⁵⁶
- D'un point de vue chimique, les alcènes présentent deux réels avantages : leur stabilité ainsi que leur réactivité. Ils sont très stables dans le temps et présentent en outre une réactivité non négligeable grâce à la liaison π qui leur permet une implication dans un grand nombre de réactions (hydroboration, époxydation, cycloaddition etc..)
- Quand au dernier aspect, il est purement synthétique. En effet, cette réaction est basée sur un procédé catalytique, reposant sur un temps de réaction généralement faible dans des conditions douces et aujourd'hui une grande diversité de groupements réactionnels et de solvants sont tolérés, ce qui tend à rendre ces réactions éco-compatibles.

Les réactions de métathèse d'oléfines peuvent être groupées en trois catégories (Schéma 26).

- La métathèse cyclisante, dite RCM (Ring-closing metathesis). Cette méthode est de loin la plus utilisée et a pour but de réaliser une cyclisation sur une molécule comportant deux oléfines terminales. Si les réactions de métathèses sont basées sur une série d'équilibres successifs, la RCM permet de contourner cette limitation. Une des forces motrices de cette réaction est l'entropie générale du système, qui pousse à la formation du cycle.⁵⁷
- La métathèse polymérisante par ouverture de cycle ROMP (Ring-opening Metathesis Polymerization). Ce procédé va ouvrir un cycle contenant un alcène avec une oléfine acyclique qui polymérise. La force motrice est dans ce cas le relâchement de la contrainte enthalpique du cycle, ce qui entraîne un quasi-état d'irréversibilité.
- La métathèse croisée, dite CM (Cross-metathesis). Cette dernière variante est la plus difficile à rendre sélective. En effet, avec deux partenaires oléfiniques différents, il faut éviter les réactions d'homodimérisation, et contrôler le ratio *Z/E* des substrats obtenus.

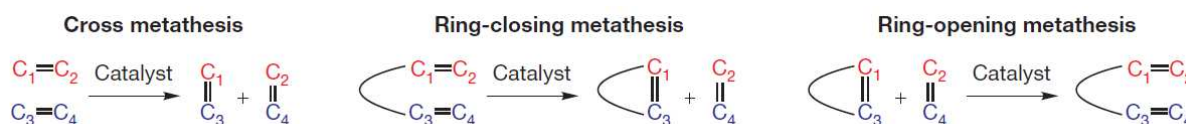


Schéma 26. Différents types de métathèse

⁵⁵ (a) Żukowska, K. & Grela, K. in *Comprehensive Organic Synthesis II* 1257–1301 (Elsevier, 2014). (b) Hoveyda, A. H. & Zhugralin, A. R. The remarkable metal-catalysed olefin metathesis reaction. *Nature*. **450**, 243–251 (2007).

⁵⁶ Trost, B. M. The atom economy—a search for synthetic efficiency. *Science*. **254**, 1471–7 (1991).

⁵⁷ Fu, G. C. & Grubbs, R. H. The application of catalytic ring-closing olefin metathesis to the synthesis of unsaturated oxygen heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5426–5427 (1992).

Le mécanisme général de la métathèse croisée passe dans un premier temps par la coordination du substrat sur le métal résultant vers la formation du métallocyclobutane **B**. Ce cycle à 4 chaînons va se réarranger tout en libérant de l'éthylène. Le carbène **C** ainsi formé va interagir avec le second substrat pour former un second métallocyclobutane **D**, qui après le réarrangement de ce second cycle libérera l'oléfine visée **103** (Schéma 27).⁵⁸

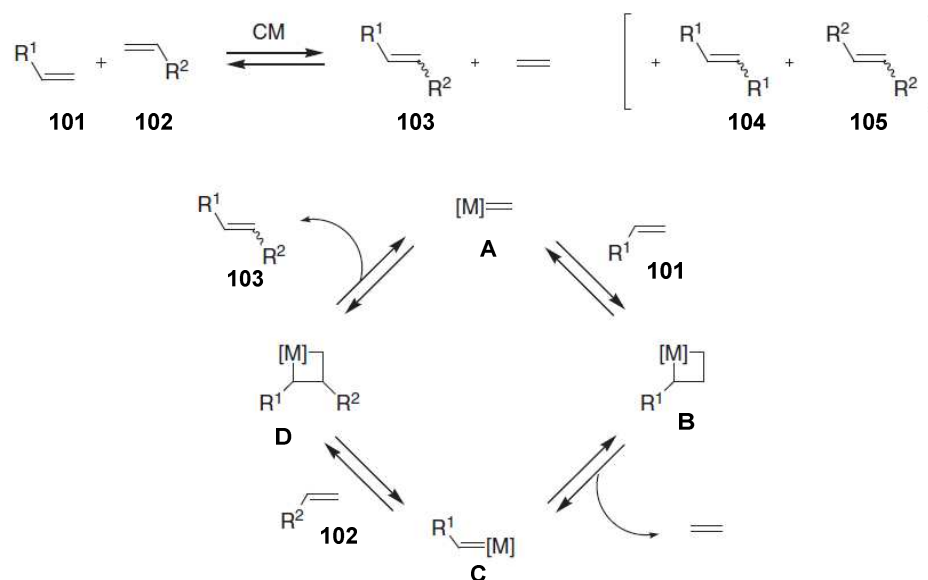


Schéma 27. Mécanisme de la métathèse croisée

En terme de produits potentiellement créés après ce cycle catalytique, il y a donc l'hétérodimère voulu **103**, et les composés **104** et **105**, homodimères de chacun des alcènes. Une des problématiques majeures consiste en l'équilibre homo- et hétérodimère. Le réengagement des homodimères dans ce cycle catalytique est un des enjeux principal d'une réaction de métathèse croisée afin de faire basculer cet équilibre en faveur de la formation du produit souhaité.

La recherche du meilleur métal de transition permettant de catalyser cette métathèse a fait l'objet de nombreuses études aux fils des années, révélant le molybdène, tungstène et ruthénium comme étant les meilleurs métaux (Figure 20). Les premiers catalyseurs ont été ceux développés par Schrock dans les années 1990 (Sch-I). Bien qu'efficace, ces catalyseurs au molybdène souffrent d'une instabilité à l'air et à l'humidité, ce qui empêche leur utilisation dans l'industrie.⁵⁹ S'en est suivie la commercialisation des catalyseurs au ruthénium (catalyseurs de Grubbs), qui portaient dans un premier temps deux ligands phosphines.⁶⁰ D'une manière générale, ils sont beaucoup plus stables que les catalyseurs de Schrock, mais ont une réactivité limitée envers les oléfines substituées. Un des deux ligands phosphine a été par la suite remplacé par un ligand *N*-hétérocyclique carbène (NHC) qui donne une liaison σ au métal de transition. Portant un ligand tricyclohexylphosphine, ces catalyseurs sont dit "de seconde génération" et sont beaucoup plus réactifs que les catalyseurs de première génération, permettant des réactions sur des

⁵⁸ (a) Hérisson, J.-L. & Chauvin, Y. Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène. II. Télomérisation des oléfines cycliques en présence d'oléfines acycliques. *Die Makromol. Chemie.* **141**, 161–176 (1971). (b) Connon, S. J. & Blechert, S. Recent Developments in Olefin Cross-Metathesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **42**, 1900–1923 (2003).

⁵⁹ Schrock, R. R., Luo, S., Lee, J. C., Zanetti, N. C. & Davis, W. M. Living Polymerization of *o*-(Trimethylsilyl)phenylacetylene by Molybdenum ImidoAlkylidene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3883–3895 (1996).

⁶⁰ Nguyen, S. T., Johnson, L. K., Grubbs, R. H. & Ziller, J. W. Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3974–3975 (1992).

oléfines plus substituées. Ils sont aussi plus stables à l'air et à l'eau, ce qui facilite leur utilisation. L'équipe de Nolan a été la première à synthétiser ces catalyseurs au ruthénium en 1999 (**Gru-II'**),⁶¹ puis par Grubbs dans la même année (**Gru-II**).⁶² Les catalyseurs d'Hoveyda ont aussi vu de la première à la deuxième génération un de leurs ligands phosphine transformé en NHC. La différence réside cependant sur le second ligand, qui est un éther porté par le groupement benzylidène, chélatant le ruthénium et facilitant son activation (**Hov-II**).⁶³

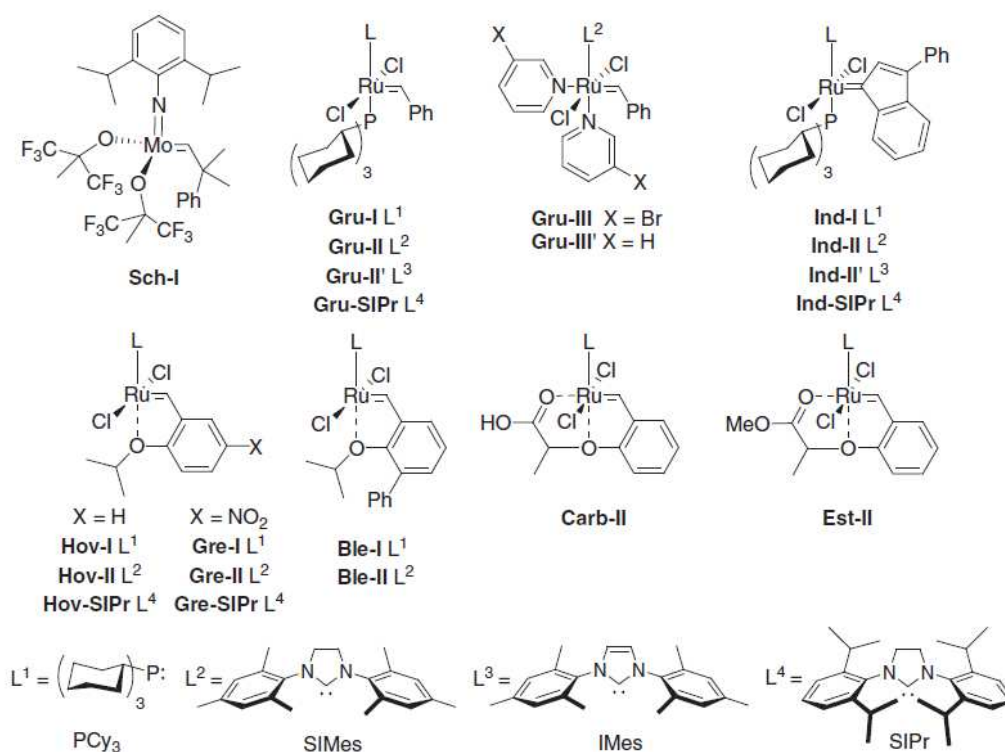


Figure 20. Sélection de catalyseurs

Quelque soit le catalyseur utilisé, la sélectivité reste cependant un obstacle important. En effet, la figure 20 montre bien la production d'homo- et d'hétérodimères, ainsi qu'une production d'éthylène. La composition chimique du brut réactionnel va dépendre de la réactivité des oléfines envers le catalyseur. Grubbs a proposé un classement empirique de réactivité avec différents substrats en fonction du catalyseur auquel il est associé.⁶⁴

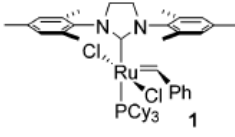
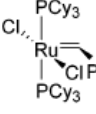
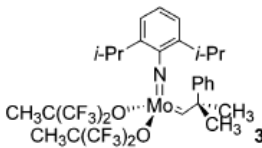
⁶¹ Huang, J., Stevens, E. D., Nolan, S. P. & Petersen, J. L. Olefin Metathesis-Active Ruthenium Complexes Bearing a Nucleophilic Carbene Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2674–2678 (1999).

⁶² (a) Scholl, M., Trnka, T. M., Morgan, J. P. & Grubbs, R. H. Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazolin-2-ylidene ligands. *Tetrahedron Lett.* **40**, 2247–2250 (1999). (b) Scholl, M., Ding, S., Lee, C. W. & Grubbs, R. H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *J. Org. Lett.* **1**, 953–956 (1999).

⁶³ (a) Gessler, S., Randl, S. & Blechert, S. Synthesis and metathesis reactions of a phosphine-free dihydroimidazolecarbene-ruthenium complex. *Tetrahedron Letters*. **41**, (2000). (b) Garber, S. B., Kingsbury, J. S., Gray, B. L. & Hoveyda, A. H. Efficient and Recyclable Monomeric and Dendritic Ru-Based Metathesis Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8168–8179 (2000). (c) Vougioukalakis, G. C. & Grubbs, R. H. Ruthenium-Based Heterocyclic Carbene-Coordinated Olefin Metathesis Catalysts. *Chem. Rev.* **110**, 1746–1787 (2010).

⁶⁴ Chatterjee, A. K., Choi, T.-L., Sanders, D. P. & Grubbs, R. H. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11360–11370 (2003).

Tableau 4. Modèle de sélectivité⁶³

Olefin type	 1	 2	 3
Type I (fast homodimerization)	terminal olefins, ⁶ 1° allylic alcohols, esters, ^{6h,20} allyl boronate esters, ^{6f} allyl halides, ^{6f,6i} styrenes (no large ortho substit.), ^{6c,d,f,i} allyl phosphonates, ^{6d} allyl silanes, ²⁵ allyl phosphine oxides, ^{6h} allyl sulfides, ^{6h} protected allyl amines ^{6h}	terminal olefins, ⁸ allyl silanes, ^{14,18,19} 1° allylic alcohols, ethers, esters, ^{8,19,21} allyl boronate esters, ^{10f} allyl halides ¹⁷	terminal olefins, ^{11a,b,12,14} allyl silanes ^{11b}
Type II (slow homodimerization)	styrenes (large ortho substit.), ^{6d,f} acrylates, ^{6b,i} acrylamides, ^{6c} acrylic acid, ^{6c} acrolein, ^{6b,24} vinyl ketones, ^{6b} unprotected 3° allylic alcohols, ^{6f,h} vinyl epoxides, ^{6b} 2° allylic alcohols, perfluorinated alkane olefins ^{6b,23}	styrene, ¹⁶ 2° allylic alcohols, vinyl dioxolanes, ⁸ vinyl boronates ⁸	styrene, ^{11a,11b} allyl stannanes ¹⁵
Type III (no homodimerization)	1,1-disubstituted olefins, ^{6a,g} non-bulky trisub. olefins, ^{6a,g} vinyl phosphonates, ^{6d} phenyl vinyl sulfone, ²² 4° allylic carbons (all alkyl substituents), 3° allylic alcohols (protected)	vinyl siloxanes ¹⁶	3° allyl amines, ¹⁴ acrylonitrile ¹²
Type IV (spectators to CM)	vinyl nitro olefins, trisubstituted allyl alcohols (protected)	1,1-disubstituted olefins, ⁸ disub. α,β-unsaturated carbonyls, 4° allylic carbon-containing olefins, ⁸ perfluorinated alkane olefins, ⁸ 3° allyl amines (protected) ¹⁴	1,1-disubstituted olefins ^{11a}

Suivant ce tableau de sélectivité, les oléfines de type I suivent un processus d'homodimérisation rapide, mais ces homodimères sont ensuite consommés par un réengagement dans ce cycle catalytique. Ce sont souvent des alcènes terminaux, ou enrichis en électrons à l'aide de groupements donneurs. La catégorie d'alcène de type II s'homodimérise lentement, en donnant des dimères qui se réengagent partiellement dans ce cycle. Quand aux types III, ils ne s'homodimérisent pas, mais peuvent tout de même réagir dans ce cycle catalytique avec une autre espèce beaucoup plus réactive. Pour finir, les oléfines de type IV, fortement substituées et/ou appauvries en électrons, pouvant être dû à des groupements fortement attracteurs, ne participent pas du tout à ce couplage.

Tableau 5. Règles générales de sélectivité

	Type I	Type II	Type III	Type IV
Type I	Statistique	Sélective	Sélective	Pas de réaction
Type II	Sélective	Non sélective	Sélective	Pas de réaction
Type III	Sélective	Sélective	Non sélective	Pas de réaction
Type IV	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction

Cette réaction souffrait cruellement d'un manque de contrôle et de sélectivité, ce qui nuisait à la conversion et au rendement global de la réaction. Ici, en fonction du catalyseur, la prédiction du déroulement de la réaction peut maintenant être envisageable en fonction des différents types d'oléfines engagées (Tableau 5). Dès lors, la métathèse croisée est devenue plus populaire. Il est à noter que ce tableau s'appuie sur des données expérimentales et non théoriques. Il est donc susceptible de subir quelques légères variations, dues à d'autres facteurs que la nature de la double liaison (les différents groupements, l'encombrement stérique...)

Les réactions de métathèses entre alcènes de type I et II ont prouvé fonctionner avec de très bons rendements, mais qu'en est-il pour les alcènes de types III ? En utilisant le catalyseur de Schrock, pourtant très réactifs, l'équipe de Crowe n'avait pas réussi à faire réagir des doubles liaisons de type III en 1993.⁶⁵ Cependant, en 1999, l'équipe de R.H. Grubbs a créé une méthode générale pour la synthèse d'alcènes trisubstitués à l'aide de leur catalyseur de 2nde génération, démontrant la polyvalence de ce nouveau catalyseur, réussissant à coupler des oléfines de type I/II (principalement des acétates) avec des hydrocarbures insaturés de type III. Ils ont de ce fait achevé les premiers exemples de métathèse croisée aboutissant à des alcènes trisubstitués.⁶⁶

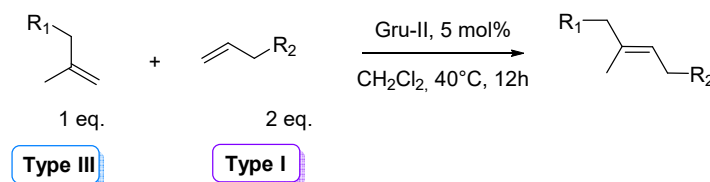


Schéma 28. Métathèse croisée entre type I / type III

Par la suite, l'extrapolation des travaux a montré dans un modèle général la nécessité de présenter un alcène en excès par rapport à l'autre. En effet, dans ce premier cas, les hydrocarbures de type I étaient en excès par rapport aux alcènes de types III. Dans ce sens, les molécules les plus réactives réagissent rapidement, se transformant en homodimères, qui réagissent par la suite avec les oléfines de types III, beaucoup moins réactives, ce qui pourrait se résumer par le modèle résumé dans le schéma 28.

➤ Notre travail

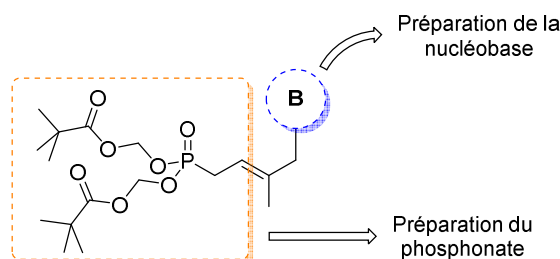


Figure 21. Formule générale

Dans cette série, le but est de synthétiser des ANP comportant un groupement méthyle en position 2' sous forme prodrogue (Figure 21). Dans un premier temps, nous allons donc nous attacher à la synthèse du groupement *bis*(POM)allylphosphonate. Ensuite nous nous pencherons sur la réaction de métathèse croisée et de son optimisation, entre ce groupement biolabile fonctionnalisé et le méthylpropénol. Pour

⁶⁵ Crowe, W. E. & Zhang, Z. J. Highly selective cross-metathesis of terminal olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10998–10999 (1993).

⁶⁶ Chatterjee, A. K. & Grubbs, R. H. Synthesis of Trisubstituted Alkenes via Olefin Cross-Metathesis. *Org. Lett.* **1**, 1751–1753 (1999).

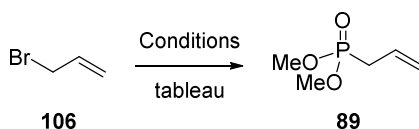
finir, une optimisation sera aussi nécessaire dans le but d'introduire les différentes bases nucléiques sur la chaîne aliphatique.

- Synthèse du groupement phosphonate

L'introduction de la prodrogue en fin de synthèse sur les acides phosphoniques nus est souvent accompagnée d'un rendement très médiocre, n'excédant les 20% que très rarement, dû à la faible réactivité des acides phosphoniques dans les réactions concernées. Dans notre cas, nous avons élaboré une méthode de synthèse pour le groupement biolabile prouvant de ce fait, la flexibilité et l'efficacité des procédés synthétiques employés.

Dans cette optique, le synthon *bis*(POM)allylphosphonate **83** est synthétisé en deux étapes, en employant deux méthodes différentes pour la formation du phosphonate: la réaction de Michaelis-Arbuzov et Michaelis-Becker. Cette première méthode permet d'obtenir le diméthylallylphosphonate **89**, mais la conversion ne dépasse pas 65% (Entrée 1, Tableau 6). Le triméthylphosphite et l'allylphosphonate ayant sensiblement les mêmes rapports frontaux (Rf), il est nécessaire d'avoir une conversion complète. La réaction de Michaelis-Becker, en présence de carbonate de potassium et d'un agent de transfert de phase (*tert*-butylammoniumbromide TBAB), a ensuite été envisagée. Le phosphite alors déprotoné va substituer le bromoalcène, avec un rendement de 78%. Lors du passage à l'échelle de 50 grammes, le rendement reste dans le même ordre de grandeur, et le composé **89** est purifié par distillation sous pression réduite.

Tableau 6. Comparaison entre Michaelis-Arbuzov et Becker



Entrée	Phosphite	Réactifs	Solvant	Conditions	Conversion
1	P(OMe) ₃	/	DMF	MW, 2 min, 200°C	65%
2	HP(O)(OMe) ₂	K ₂ CO ₃ , TBAB	THF	12h, 90°C	100% (78%) ^a
3 ^b	HP(O)(OMe) ₂	K ₂ CO ₃ , TBAB	THF	12h, 90°C	100% (75%) ^a

^aRendement

^bLancé sur une échelle de 50g

Par la suite, deux moyens existent actuellement dans la littérature dans le but de produire la prodrogue à partir d'un méthoxyphosphonate. La première stratégie consiste à déprotéger les groupements méthoxy en acide phosphonique, puis d'effectuer une substitution nucléophile dans le but d'intégrer la prodrogue visée à l'aide de chlorométhylpivalate. La deuxième stratégie permet de contourner cette première étape de déprotection en ajoutant dans le milieu réactionnel de l'iodure de sodium. En effet, l'iodure de sodium va échanger son halogène avec l'espèce chlorée (chlorométhylpivalate), rendant l'attaque du groupement méthoxy possible sur la position halogénée. Après libération de l'iode, l'halogénure attaque ainsi le méthyl, libérant le produit comportant la prodrogue (Schéma 29). Nous avons donc suivi ce deuxième chemin synthétique. Il est à noter qu'il est nécessaire d'être dans des conditions strictement anhydres de par la grande réactivité des intermédiaires formés, avec notamment des sels d'iode séchés à haute température sous vide, pour éliminer toutes traces d'eau résiduelle.

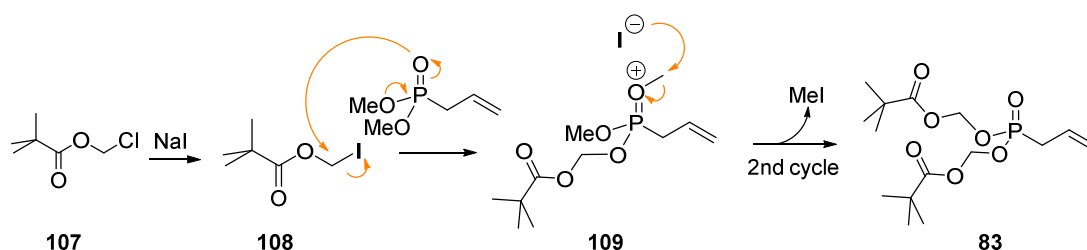


Schéma 29. Mécanisme d'insertion des groupements POM

Cette réaction a été mise au point par chauffage classique et sous activation micro-onde. Malgré un gain de temps, passant de 72h à 2h sous irradiation micro-ondes, une perte de rendement de l'ordre de 20% est observée. (Figure 47).

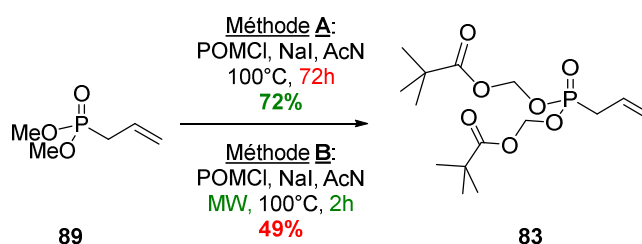


Schéma 30. Synthèse de l'allylphosphonate de départ de métathèse

➤ Réaction de métathèse

L'autre partenaire nécessaire à la métathèse est le 2-méthyl-2-propèn-1-ol commercial. Ce couplage nécessite une mise au point, puisque dépendant des paramètres suivants, comme ;

- Le choix du catalyseur

Comme il l'a été montré dans le tableau recensant les différents types d'oléfines, cette réactivité est dépendante du catalyseur. Ici, le but est d'introduire un alcène 1,1-disubstitué sur une oléfine terminale, ce qui n'est pas possible avec les catalyseurs de Schrock ou ceux de première génération. En effet, ces derniers ne sont pas réactifs envers les composés 1,1-disubstitués, les classant en tant qu'alcènes de type IV, spectatrices à la métathèse croisée. L'attention s'est donc tournée vers les catalyseurs de type Grubbs de seconde génération, notamment deux en particulier (Figure 22):

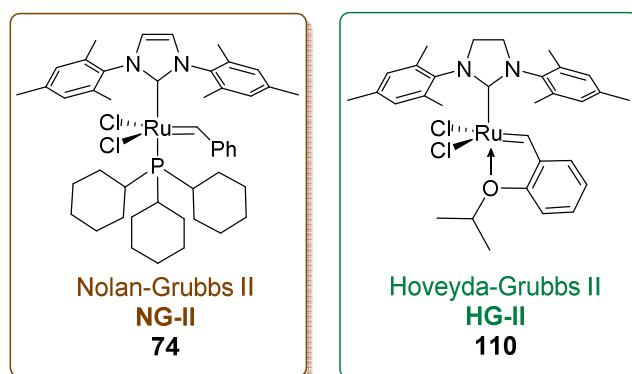


Figure 22. Différents types de catalyseurs employés

- Le catalyseur de Nolan-Grubbs (NG-II) **74**, qui diffère seulement du catalyseur de Grubbs-II par une insaturation présente sur l'hétérocycle du carbène.
- Le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs (HG-II) **110**, possède un groupement chélatant *ortho*-isopropoxy attaché au cycle benzénique. Cet atome d'oxygène chélatant remplace un groupement tricyclohexylphosphine. Cette modification a pour effet de faciliter le passage de l'espèce de 16 électrons à celle active de 14 électrons (par la perte d'un ligand L de chélation).

- Le nombre d'équivalents

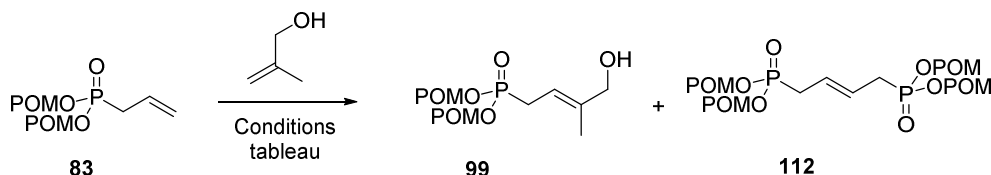
Les métathèses croisées entre des oléfines de type I et de type III reportées dans la littérature démontrent des divergences expérimentales. De fait, l'espèce la moins réactive est introduite en excès dans le but d'augmenter la probabilité de formation d'un métallocycle comportant le motif 1,1-disubstitué. D'autre part, Grubbs a aussi reporté des cas où l'oléfine la plus réactive était introduite en excès pour favoriser la formation en homodimère et augmenter la proportion de l'hétérodimère.

- Le moyen d'activation

Les précédentes avancées du laboratoire sur la mise au point des réactions de métathèses croisées ont concerné les moyens d'activation. Le chauffage classique a principalement permis de synthétiser des oléfines 1,2-disubstituées, tandis que les moyens alternatifs comme les micro-ondes ou les ultrasons ont prouvés être plus utiles dans la synthèse d'alcènes plus ramifiés.

Une mise au point apportée dans le tableau 8 a été nécessaire entre le *bis*(POM)allylphosphonate **77** et l'oléfine disubstituée correspondante, le 2-méthylprop-3-énol (Tableau 7).

Tableau 7. Conditions optimisées de métathèse croisée



Entrée	Catalyseur (mol%)	Equivalents (Phosphonate - hydroxyoléfine)	Moyen d'activation	Conditions	Rendement
1	NG-II (3 x 5)	1 - 2	Chauffage classique	40°C, 24h	35 %
2	NG-II (3 x 5)	2 - 1	Chauffage classique	40°C, 24h	41 %
3	HG-II (3 x 5)	2 - 1	Chauffage classique	40°C, 24h	45 %
4	HG-II (15)	2 - 1	Micro-ondes	80°C, 1h	47 %
5	HG-II (3 x 5)	1 - 2	Ultrasons	55°C, 20h	60 %
6	NG-II (3 x 5)	2 - 1	Ultrasons	55°C, 20h	75 %
7	HG-II (3 x 5)	2 - 1	Ultrasons	55°C, 20h	95 %
8	HG-II (3 x 3)	2 - 1	Ultrasons	55°C, 20h	61 %

Entrée 1 : Les premiers essais avec 15 mol% de catalyseur de Nolan-Grubbs (NG-II), introduits en 3 ajouts de 5 mol% à $t = 0, 2$ et 4h avec un excès d'oléfine de type III. Après 24h de reflux sous chauffage classique, le composé **99** est obtenu avec un rendement de 35%.

Entrée 2 et 3 : Les proportions de chaque oléfine ont été interverties, passant à 2 équivalents de phosphonate et 1 équivalent d'hydroxycalcène, ce qui a abouti à une légère augmentation du rendement (41%). La production majoritaire d'homodimère **112** est observée en passant de HG-II à NG-II dans les mêmes conditions, conduisant à un rendement de 45%.

Entrée 4 : Le chauffage classique est remplacé par une activation au micro-onde. Ce changement implique aussi un ajout simple de catalyseur, donc non-séquentiel, mais aussi une atmosphère qui va se charger en éthylène, conséquence directe d'une réaction en tube scellé. Avec un gain de temps passant de 24h à une heure, les rendements n'excèdent pas les 50%.

Entrée 5 : Nous avons également étudié l'activation sous ultrasons, avec un excès de propénol par rapport au phosphonate. Une activation durant 20h à 55°C a permis d'obtenir un rendement de 60%.

Entrée 6 : Sous ultrasons, la variation du nombre d'équivalents, avec introduction du phosphonate en excès par rapport à l'hydroxyloléfine, et donne en présence du catalyseur de HG-II 75% d'hétérodimères.

Entrée 7 : Le remplacement du catalyseur de Nolan-Grubbs II par celui d'Hoveyda-Grubbs II conduit à un excellent rendement de 95% de produit souhaité.

Entrée 8 : La nécessité d'une charge catalytique de 15 mol% a été vérifiée par l'introduction de 9 mol% de catalyseur. Le rendement passe dans ces conditions de 95% à 61% de rendement, ce qui justifie l'utilisation de cette charge.

Ce travail d'optimisation a souligné l'importance des ultrasons dans cette réaction de métathèse, qui permettent l'obtention d'oléfines trisubstituées avec d'excellents rendements.

La sonochimie, l'étude des ondes ultrasonores sur les réactions chimiques, est devenu un domaine très exploité. Ces ultrasons sont émis à une fréquence entre 20 KHz et 10 MHz, hors du spectre auditif humain, qui sont une suite de phases de compressions et de relachements et qui provoque un phénomène de cavitation lorsque ces ultrasons sont transmis à un liquide.

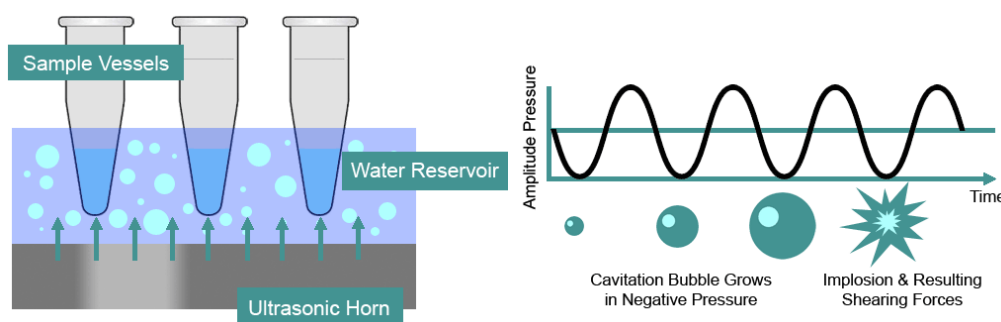


Schéma 31. Phénomène de cavitation

Dans ce cas, ce phénomène provoque une création de bulles gazeuses, qui se compriment lors des phases de compressions et qui subissent une expansion lors du relachement. Ces bulles grandissent et finissent par

implorer, créant des pressions locales au dessus de 1000 atm alliées à des températures autour de 5000 °C (Schéma 31).⁶⁷

Dans une réaction de métathèse, l'espèce active est celle qui a perdu son ligand phosphine ou le ligand éther dans le cas des catalyseurs d'Hoveyda. Cette activation d'espèce catalytique est dans la plupart des cas provoquée par une activation thermique ou chimique. Les ultrasons représentent quand à eux une autre méthode d'activation, une activation mécanique. En effet, par le biais de la cavitation, l'énergie alors libérée lors de l'implosion des bulles est thermique, mais aussi mécanique, ce qui va suffire à rompre les liaisons faibles. Dans les exemples publiés par l'équipe de Sijbesma,⁶⁸ cette énergie est appliquée sur des catalyseurs aux ruthénium portant deux carbènes, dans le but de cibler avec cette force mécanique des liaisons de substituants portés par ces NHC. Ils ont par la suite montré le pouvoir de scission des ultrasons en prouvant le départ d'un des ligands à la suite de leurs expositions aux ondes acoustiques.

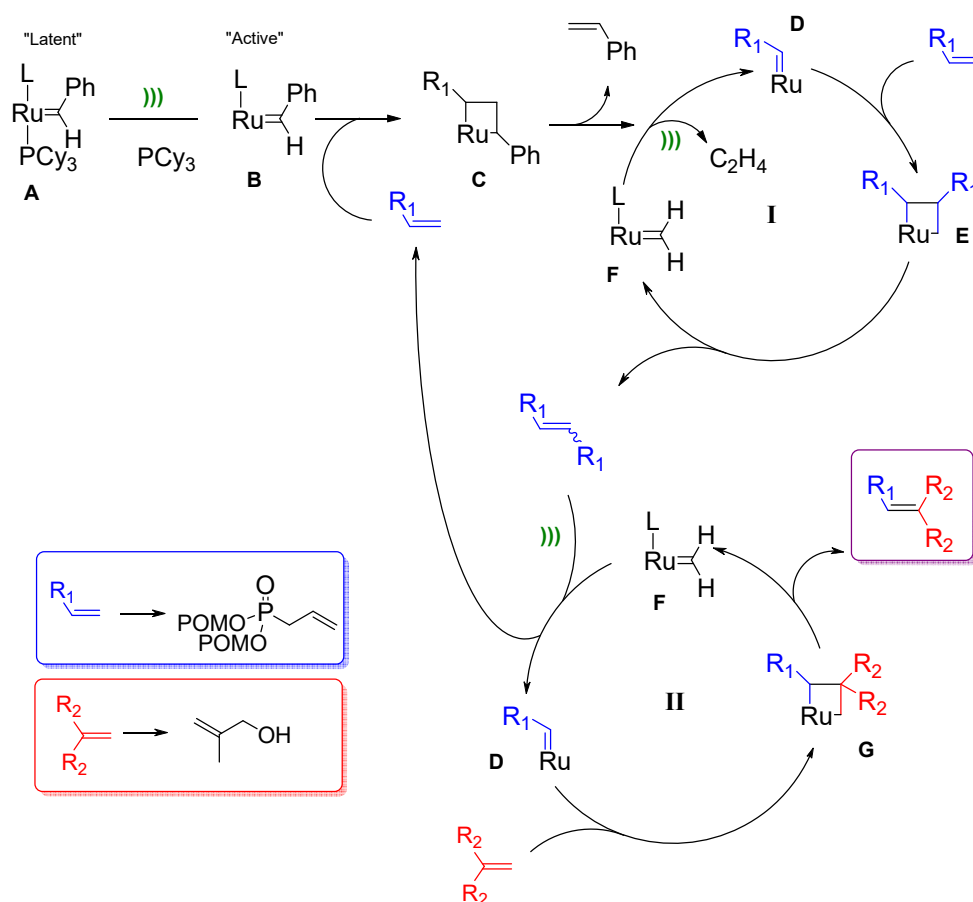


Schéma 32. Cycle catalytique de métathèse sous ultrasons⁵³

Pour comprendre quelles sont les autres actions dues à cet apport d'énergie, il faut se pencher sur le cycle catalytique impliqué dans la réaction de métathèse. Dans un premier temps, l'espèce catalytique **A** représentée dans le schéma 32 va subir une dissociation entre le ruthénium central et son ligand le plus

⁶⁷ (a) Ashokkumar, M., Mason, T. J., Ashokkumar, M. & Mason, T. J. in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (John Wiley & Sons, Inc., 2007). (b) Casadonte, D. J., Li, Z. & Mingos, D. M. P. in *Comprehensive Organometallic Chemistry III* 307–339 (Elsevier, 2007).

⁶⁸ (a) Piermattei, A., Karthikeyan, S. & Sijbesma, R. P. Activating catalysts with mechanical force. *Nat. Chem.* **1**, 133–137 (2009). (b) Jakobs, R. T. M. & Sijbesma, R. P. Mechanical Activation of a Latent Olefin Metathesis Catalyst and Persistence of its Active Species in ROMP. *Organometallics*. **31**, 2476–2481 (2012).

labile, la tricyclohexylphosphine sous l'action mécanique des ondes acoustiques. L'espèce à 14 électrons **B** ainsi formée va ensuite se faire attaquer par l'oléfine la plus réactive, représentée en bleue. Le métallocyclobutane **C** va quand à lui se réarranger en produit **D**, en dégageant de l'éthylène comme sous produit. C'est à ce moment qu'interviennent les ultrasons, puisqu'en dégazant le milieu, ils empêchent cette espèce de se réengager dans ce cycle. Ce composé **D** peut ensuite se faire réattaquer par une autre molécule de type I, produisant **E** qui va produire de l'homodimère non désiré et l'espèce catalytique régénérée. Lors de l'utilisation des ultrasons par rapport au chauffage classique, nous remarquons l'apparition puis la disparition progressive de l'homodimère dans le milieu réactionnel à l'aide d'un suivi CCM. Cela veut donc dire que les ultrasons sont aussi impliqués dans le réengagement de cet homodimère ainsi produit dans le second cycle catalytique. Une fois le cyclobutane **D** formé, il peut se faire attaquer par l'alcène moins réactif de type III, qui va libérer le produit souhaité ainsi que le catalyseur activé **F**.

Les apports multiples des ultrasons dans ces deux cycles expliquent avec clarté l'impact qu'ils ont sur notre schéma réactionnel. En effet, l'accumulation des homodimères et l'incapacité à dégazer l'éthylène avec un flux d'argon ou d'azote sont les problèmes majeurs de ce cycle, et peuvent être palliés par l'utilisation de la sonochimie. Un autre avantage majeur va être la douceur des conditions employés, car si le micro-onde dégrade fortement le catalyseur en chauffant à 100°C dans le but de dissocier le métal de son ligand, les ondes acoustiques vont permettre le même résultat sans chauffer à une température excessive, préservant et prolongeant par le fait la durée de vie de ce dernier.

Une fois le synthon hydroxylé en main, plusieurs scénarii sont alors possible en vue d'introduire la base nucléique sur le squelette, comme une substitution nucléophile sur l'espèce bromée. Seulement, la présence d'une base nécessaire à cette substitution arrache d'abord un des protons acides en α du phosphore, provoquant la délocalisation des électrons π et le départ de l'halogénure, donnant le composé **114** (Schéma 33).

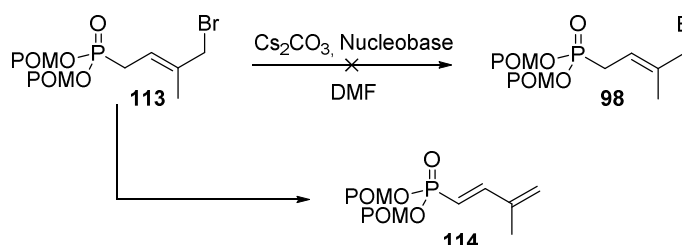


Schéma 33. Réaction parasite en présence d'une base

Dans le but de réaliser le couplage de notre chaîne phosphonate sur la base nucléique, nous nous sommes alors tournés vers la réaction de Mitsunobu. La littérature recense de beaucoup d'exemple permettant d'introduire ces nucléobases avec un rendement optimal sur les noyaux hydroxylés, et conseillent de protéger les NH_2 libres des purines, comme des pyrimidines.⁶⁹

➤ Préparation des nucléobases

Dans notre cas, il n'est pas possible d'utiliser des groupements protecteurs se clivant en milieu basique, car ces mêmes conditions cliverait les groupements des prodrogues. La protection des nucléobases concernées

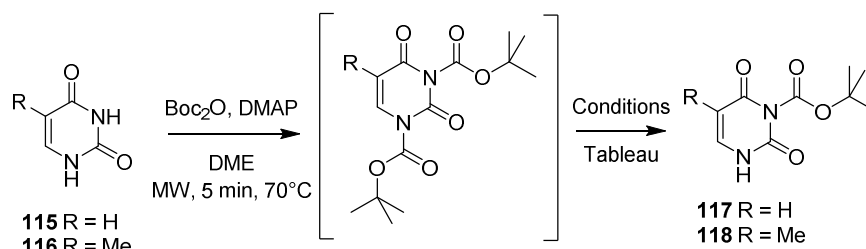
⁶⁹ (a) Yang, J., Dai, L., Wang, X. & Chen, Y. Di-*p*-nitrobenzylazodicarboxylate (DNAD): an alternative azo-reagent for the Mitsunobu reaction. *Tetrahedron*. **67**, 1456–1462 (2011). (b) Liao, X. *et al.* Synthesis of 2'- β -C-methyl-neplanocin derivatives as anti-HCV agents. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4149–4152 (2008). (c) Vincent, S. P., Mioskowski, C. & Lebean, L. Regioselective N^1 -Alkylation of Guanosine Derivatives Protected at N^2 by an *N,N*-DialkylAmidine Group. *Nucleosides and Nucleotides*. **18**, 2127–2139 (1999).

est faite avec des groupements Boc. Dans un premier temps nous allons développer les diverses protections en série pyrimidique, puis sur les bases puriques.

- Les pyrimidines

Pour que le groupement protecteur puisse être clivé par des conditions acides, nous nous penchons sur la synthèse de pyrimidines portant un groupement Boc. Certaines conditions ont déjà été reportées dans la littérature par deux équipes. Tout d'abord celles de Gothelf *et coll.* qui avait préparé la thymine protégée en N^3 par un groupement Boc, mais cette synthèse ne présentait qu'un modeste rendement global de 31%.⁷⁰ Alternativement, l'équipe de Porcheddu avaient préparé la cytosine *bis*Boc sur la position N^4 -exocyclique avec un rendement de 60%.⁷¹ Ces méthodes possèdent toutefois comme inconvénients une réactivité faible provoquant de longs temps de réactions, des procédures d'isolation et de purification de produit assez lourdes et des rendements globaux non satisfaisants. Nous avons donc optimisé (Tableau 8) la protection sélective de la position N^3 par un groupement Boc, faisant varier plusieurs paramètres tels que le solvant, la méthode et le temps d'activation en présence de SiO_2 .⁷²

Tableau 8. Protection sélective de la pyrimidine en position N^3



Entrée	Solvant	Substrat	R	Conditions	Rendement
1	DCM	SiO_2 (60% w/w)	H	RT, 5h	43 %
2	DCM / MeOH (9:1)	SiO_2 (60% w/w)	H	RT, 1h30	93 %
3	DCM / MeOH (9:1)	/	H	RT, 12h	77 %
4	DCM / MeOH (9:1)	SiO_2 (60% w/w)	H	60°C, 1h	96 %
5	DCM / MeOH (9:1)	SiO_2 (60% w/w)	H	MW, 70°C, 2 min	97 %
6	DEM / EtOH (9:1)	SiO_2 (60% w/w)	H	MW, 70°C, 2 min	95 %
7	DEM / EtOH (9:1)	SiO_2 (60% w/w)	Me	MW, 70°C, 2 min	95 %

La *per*protection de l'uracile se fait avec du dicarbonate de *tert*butyle, catalysée par du DMAP. Si la conversion est totale dans le THF, ce solvant a été changé par du diéthoxyméthane DEM, une alternative

⁷⁰ Jacobsen, M. F., Knudsen, M. M. & Gothelf, K. V. Efficient N-arylation and N-alkenylation of the five DNA/RNA nucleobases. *J. Org. Chem.* **71**, 9183–90 (2006).

⁷¹ Porcheddu, A., Giacomelli, G., Piredda, I., Carta, M. & Nieddu, G. A Practical and Efficient Approach to PNA Monomers Compatible with Fmoc-Mediated Solid-Phase Synthesis Protocols. *European J. Org. Chem.* **2008**, 5786–5797 (2008).

⁷² Bessières, M., Roy, V. & Agrofoglio, L. A. A convenient, highly selective and eco-friendly N-Boc protection of pyrimidines under microwave irradiation. *RSC Adv.* **4**, 59747–59749 (2014).

non toxique par rapport aux solvants conventionnels, ce qui en fait un solvant vert industriel.⁷³ La déprotection sélective en position N^1 a ensuite été optimisée selon le Tableau 8.

Entrée 1 : S'inspirant des travaux de Zhang *et coll.*,⁷⁴ l'uracile *per*protégée est mise en présence de silice (SiO_2 , 60% w/w) dans le dichlorométhane à température ambiante. Au bout de 5h, la réaction est arrêtée, suite à la détection du produit di-déprotégé. Le composé **117** est obtenu avec un rendement moyen de 43%.

Entrée 2 et 3 : Dans les mêmes conditions, un ajout de 10% de méthanol, permet d'obtenir le composé voulu en 1h30 avec un excellent rendement de 93%. La silice a une incidence sur la cinétique et la conversion de la réaction puisque en son absence, nous observons une chute de rendement à 77% en 12h à température ambiante.

Entrée 4 et 5 : Nous avons également observé un effet bénéfique de la température, abaissant le temps de réaction à 1h à 60°C. L'activation sous micro-ondes permet d'obtenir quantitativement le produit **17** en seulement 2 minutes.

Entrée 6 : Afin de rendre cette réaction éco-compatible, de par la toxicité des solvants utilisées, le dichlorométhane et le méthanol sont remplacés respectivement par le diéthoxyméthane et l'éthanol, donnant des rendements quantitatifs sous micro-ondes.

Entrée 7 : La thymine N^3 protégée **118** est obtenue dans ces conditions optimales, avec un rendement de 95%.

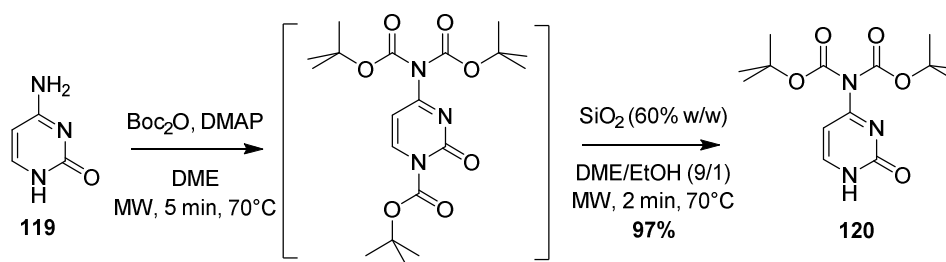


Schéma 34. Protection de la cytosine

Suivant ces conditions, la cytosine N^4 bis-protégée **120** est également obtenue quantitativement (Schéma 34).

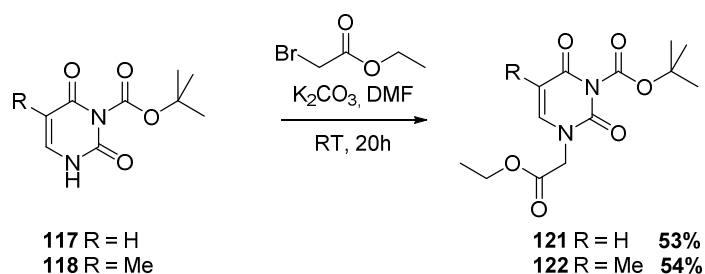


Schéma 35. Dérivatisation sur la position N^1 pour des études RMN

⁷³ Boaz, N. W. & Venepalli, B. Applications of Diethoxymethane as a Versatile Process Solvent and Unique Reagent in Organic Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* **5**, 127–131 (2001).

⁷⁴ Zhang, M. J., Yuan, X-H, Li, M., Zhao, J-Y. & Gao L-X. Selective Deprotection of N-Boc Catalyzed by Silica Gel. *Chem. J. Chinese U*, **12**, 2330-2332 (2007).

Afin de prouver la régiosélectivité de cette protection, nous avons alkylé les molécules **117** et **118** en présence de bromo acétate d'éthyle et de K_2CO_3 dans le DMF donnant les composés **121** et **122** respectivement. (Schéma 35).

La structure des pyrimidines substituées a été confirmée par analyse HMBC. Sur la figure 23 est représenté à titre d'exemple la molécule **122**, les protons portés par le C^1 ont une corrélation directe avec les carbones C^2 et $C^{2'}$, mais corrèle également avec le C^6 , ce qui confirme cette sélectivité.

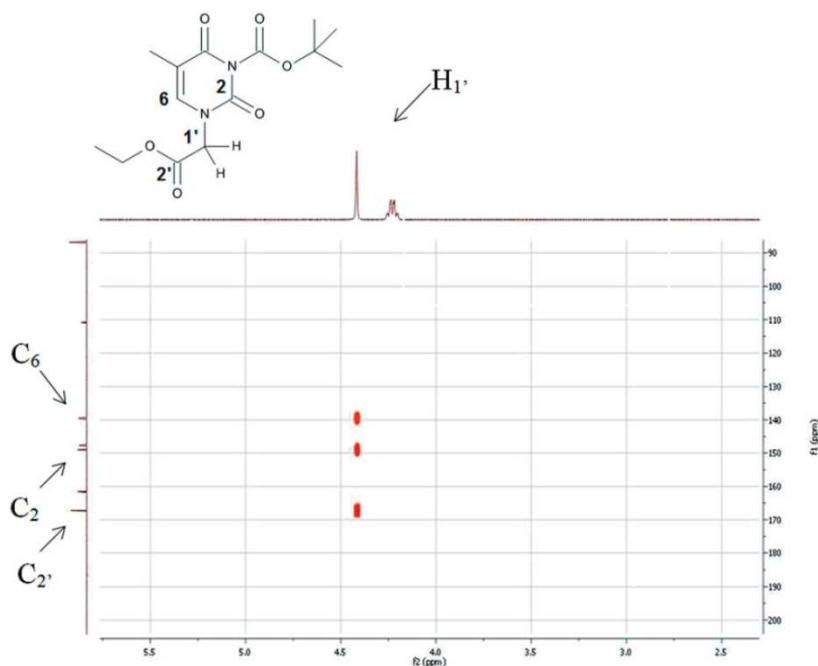


Figure 23. Analyse HMBC du composé 170

Dans le but de compléter ces études et d'aboutir à une série complète de molécules, nous avons également synthétisé des pyrimidines modifiées avec des halogènes en C^5 pour des modifications ultérieures sur la molécule (couplages métallo-catalysés, diverses substitutions, formation de bicycliques pyrimidiques etc...). En présence d'un halogène en position 5, la formation de composés portant le groupement Boc en position 3 **124a-c** est largement minoritaire, laissant place à un groupement protecteur de type *tert*-butyle (composés **125a-c**), comme résumé dans le schéma 36.

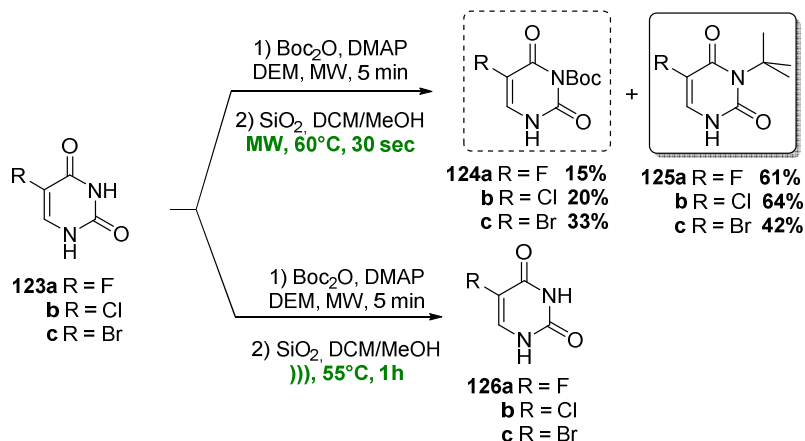


Schéma 36. Déprotection des halogénouraciles bis-Boc

Une explication à ce résultat serait que dans nos conditions légèrement acides, l'effet électronique des halogènes peuvent aider à cliver le groupement Boc présent sur la position N^3 . Le N^3 plus nucléophile peut attaquer l'isobutène libéré pour former un groupement protecteur *tert*-butyle (composés **125a-c**). En marge de nos travaux, Buslov et Hu ont montré une synthèse alternative du fluorouracile N^3 -Boc, avec un faible rendement de 26%.⁷⁵

➤ Purines

Pour introduire les bases puriques dans les meilleures conditions possibles, nos premiers essais sont réalisés avec les amines exo protégées.⁵³ L'objectif principal est donc de *perprotéger* la molécule avec le groupement Boc, puis déprotéger sélectivement la position N^9 , s'inspirant du travail effectué sur les pyrimidines. Deux méthodes sont donc appliquées pour obtenir les molécules présentant un NH_2 protégés. La première (Méthode A), plus conventionnelle, *perprotège* la molécule concernée (**127-128**) à l'aide d'un excès de di-*tert*-butyldicarbonate en présence de DMAP catalytique pendant 8h à température ambiante, suivie de la déprotection sélective du Boc en position N^9 par le $NaHCO_3$ dans le méthanol. Afin de réduire les temps réactionnels, une seconde méthode est proposée (Méthode B): les groupements présentant des NH libres sont protégés à l'aide de Boc dans les mêmes conditions que précédemment, à l'exception faite du moyen d'activation, passant de 8h à température ambiante à 10 minutes sous irradiation micro-ondes à 70°C. La déprotection se fait par la suite avec de la silice dans un mélange DCM/MeOH, suivie d'une activation au micro-onde pendant 18 min. à 60°C, donnant les espèces **129-130**. Il est à noter que la baisse du temps de réaction permet toutefois de conserver des rendements comparables (Schéma 37).

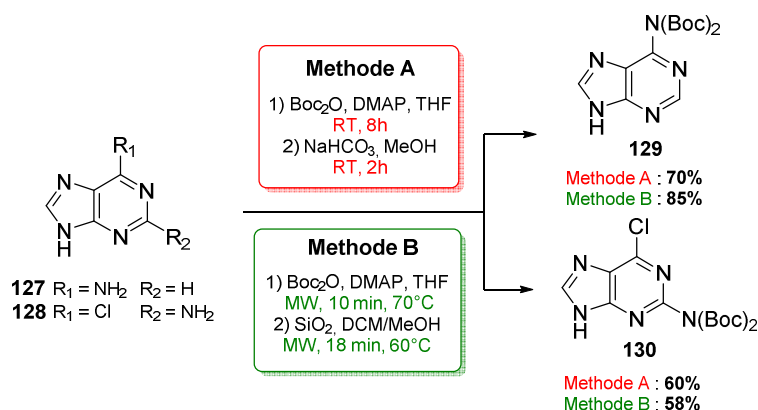


Schéma 37. Protection des amines exocycliques

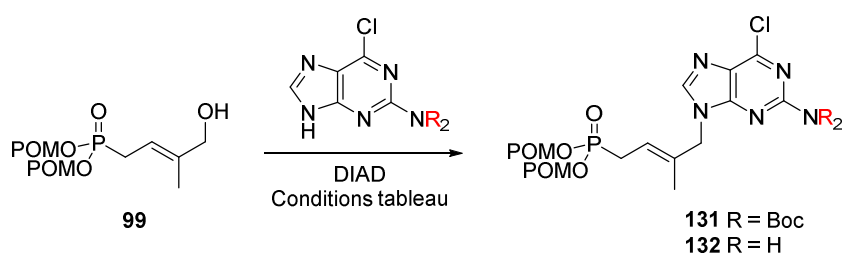
Une fois couplées au squelette phosphonate, des modulations pourront être apportées en C^6 pour élargir la gamme des composés synthétisés.

➤ Réaction de Mitsunobu et optimisation

Dans un premier temps, l'optimisation de cette réaction a été faite entre le synthon hydroxylé portant les groupements biolabiles (POM) **90** et la nucléobase 2-amino-6-chloropurine protégée **122** ou non **123** sur l'amine exocyclique.

⁷⁵ Buslov, I. & Hu, X. Transition Metal-Free Intermolecular α -C-H Amination of Ethers at Room Temperature. *Adv. Synth. Catal.* **356**, 3325–3330 (2014).

Tableau 9. Optimisation de la réaction de Mitsunobu



Entrée	Solvant	B-R (eq.)	Phosphine (eq.)	99 (eq.)	Conditions	Rendement
1	Dioxane	H (1.5 eq.)	PPh ₃ (1.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
2	Dioxane	H (1.5 eq.)	PPh₃ supporté^a (1.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
3	Dioxane	H (2.5 eq.)	PPh₃ supporté^a (2.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
4	Dioxane	Boc (2.5 eq.)	PPh₃ (2.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
5	Dioxane	Boc (2.5 eq.)	PPh₃ supporté^a (2.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
6	Dioxane	Boc (2.5 eq.)	PPh₃ supporté^b (2.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
7	CH₂Cl₂	Boc (1.1 eq.)	PPh₃ supporté^a (1.1 eq.)	1 eq.	40°C , 24h	X
8	THF	Boc (1 eq.)	PPh₃ (1.1 eq.)	1.1 eq.	70°C , 24h	~10%
9	THF	Boc (1 eq.)	PPh₃ (2 x 2 eq.)	2 x 1 eq.	70°C, 24h	~10%
10	THF	H (1.5 + 1 eq.)	PPh₃ (1.5 + 1 eq.)	1 eq.	70°C, 24h	26%
11	THF	H (1 eq.)	PPh₃ (2 x 2 eq.)	2 x 1 eq.	70°C, 24h	60%

^a Triphenylphosphine 100-200 mesh lié sur polymère

^b Triphenylphosphine 200-400 mesh lié sur polymère

Entrées 1 et 2 : Tout d'abord, les réactions s'effectuent dans le dioxane, entre le synthon hydroxylé **99**, la nucléobase **130** (1.5 équivalent) à température ambiante dans le dioxane pendant 24h.⁷⁶ En présence de triphénylphosphine libre ou supportée, une très faible conversion est observée par CCM ainsi que des produits de dégradation.

Entrée 3 : L'ajout d'un excès de nucléobase et de phosphine dans le mélange réactionnel. Ce supplément n'a toutefois pas permis l'obtention du produit souhaité.

Entrées 4 à 7 : Un des procédés précédemment exploité au laboratoire était de remplacer la purine par sa version protégée avec des groupements protecteurs Boc, ce qui leur permettait de faciliter les purifications et d'éviter la formation de produits secondaires. Cependant, quelque soit la source de triphénylphosphine utilisée (non-supportée ou supportée sur polymère à différentes concentrations), ces changements n'initient pas de conversion. Le remplacement du dioxane au profit du dichlorométhane, après 24h à 40°C n'a pas montré d'amélioration sur la réaction.

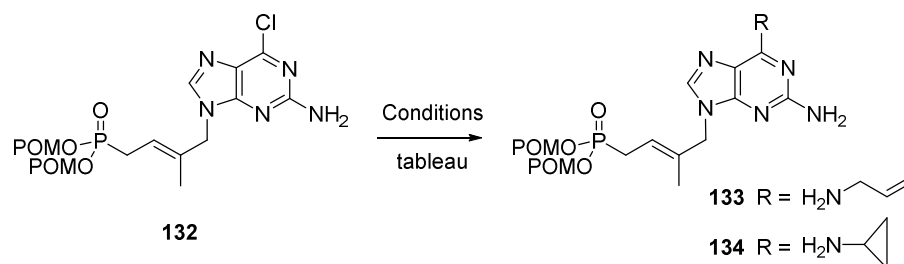
⁷⁶ (a) Thèse Ozkan Sari, soutenue le 11 décembre 2013 (b) Tam, E. K. W. *et al.* Cell-Based Proteome Profiling Using an Affinity-Based Probe (Af BP) Derived from 3-Deazaneplanocin A. *Chem. - An Asian J.* **8**, 1818–1828 (2013).

Entrées 8 et 9 : La littérature rapporte des couplages dans les conditions de Mitsunobu nécessitant une mise au point, car souvent substrat dépendant.⁷⁷ Le choix du solvant se porte au reflux du THF, en présence d'un mélange réactionnel quasi-équimolaire (léger excès du PPh₃, alcool et DIAD). Après 24h à 70°C, une conversion est enfin observée, aboutissant à un faible rendement d'environ 10%. Ce même rendement est observé lors du doublement du nombre d'équivalents du synthon hydroxylé, ainsi que du PPh₃ et du DIAD.

Entrée 10 : Les faibles rendements obtenus peuvent aussi être expliqués par une potentielle gêne stérique provoquée par les groupements Boc, ainsi qu'une nucléophilie amoindrie. Le premier essai avec la nucléobase présentant le NH₂ se fait avec un excès de PPh₃, de DIAD, et un équivalent de phosphonate. Après 16h à 70°C, un autre équivalent de PPh₃, de nucléobase et de DIAD sont ajoutés dans le mélange réactionnel pour déplacer la conversion. Dans ces conditions, un rendement de 26% est observé.

Entrée 11 : Finalement, les conditions de Mitsunobu développées par l'équipe de Shah *et coll.* ont été reprises.⁷⁸ Un mélange équimolaire de phosphonate et de nucléobase sont mis à réagir en présence de PPh₃ et de DIAD pendant 16h à 70°C. L'ajout d'un équivalent de **99**, de phosphine et de carboxylate, suivi d'un chauffage à 70°C pendant 6h a conduit au composé souhaité **132** avec un rendement de 60%. Il est à noter que la régiosélectivité sur le N⁹ est totale, les analyses RMN ne montrant pas d'isomère N⁷.

Tableau 10. Substitution en position C⁶ du 2-amino-6-chloro ANP



Entrée	Solvant	Amine	Base	Conditions	Conversion
1	Allylamine / DCM 1:10		/	40°C, 48h	<10%
2	Cyclopropylamine / DCM 1:10		/	40°C, 48h	36% ^a
3	Allylamine / DCM 1:10		Et ₃ N	MW, 50°C, 30 min	<10%
4	Cyclopropylamine / EtOH 1:10		/	MW, 80°C, 1h	40% ^a
5	Cyclopropylamine / THF 1:5		/	MW, 80°C, 1h	31% ^a

^aConversion

⁷⁷ (a) Fletcher, S., Shahani, V. M., Lough, A. J. & Gunning, P. T. Concise access to N⁹-mono-, N²-mono- and N²,N⁹-di-substituted guanines *via* efficient Mitsunobu reactions. *Tetrahedron*. **66**, 4621–4632 (2010). (b) Fletcher, S., Shahani, V. M. & Gunning, P. T. Facile and efficient access to 2,6,9-tri-substituted purines through sequential N⁹, N² Mitsunobu reactions. *Tetrahedron Letters*. **50**, (2009). (c) Shahani, V. M. *et al.* A 2,6,9-hetero-trisubstituted purine inhibitor exhibits potent biological effects against multiple myeloma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 5618–5628 (2013).

⁷⁸ Manvar, A. & Shah, A. Diversity oriented efficient access of trisubstituted purines *via* sequential regioselective Mitsunobu coupling and S_NAr based C 6 functionalizations. *Tetrahedron*. **69**, 680–691 (2013).

Le dérivé 6-chloropurine est un excellent substrat pour diverses substitutions nucléophiles, ce qui en fait un synthon de choix pour l'introduction, de groupement méthoxy ou divers groupements amino-alkyles comme l'allylamine ou la cyclopropylamine (Tableau 10). Ces bases modifiées possèdent des activités inhibitrices sur des virus à ADN et ARN avec la chaîne but-2'-ényle phosphonate non substituée. Les conditions nécessaires à l'introduction de cette chaîne sur des acyclonucléosides-phosphonates oléfiniques ont été précédemment publiées par notre équipe.⁷⁹

Entrée 1 et 2 : Les conditions décrites sur ce type de squelette montre l'utilisation d'un excès d'amine dans un mélange (amine substituée / dichlorométhane) en proportion (1/10). Ici, c'est dans un mélange allyl- ou cyclopropylamine / dichlorométhane chauffé à reflux pendant 48h qu'est engagée la réaction. Dans ces deux cas, les conversions sont très faibles et mènent à une séparation du produit de départ **132** et des composés finaux **133/134** difficile en chromatographie classique.

Entrée 3 : Une activation sous micro-ondes a été mise en œuvre et une étude nous a montré qu'après 10 min de réaction à 50°C, la conversion ne dépassait pas les 10%. L'ajout d'une base comme la triéthylamine suivie de 20 minutes supplémentaires d'activation n'a pas montré d'effet bénéfique.

Entrée 4 : Un essai de changement de polarité de solvant pour l'éthanol plus polaire a été mené avec une température au micro-onde ajustée à 80°C, et pour une durée allant jusqu'à 1h. Dans ce cas une augmentation de la conversion à 40% a été observée.

Entrée 5 : La substitution de l'éthanol au profit du THF, avec une concentration en cyclopropylamine plus élevée ne permettent pas d'augmenter la conversion, restant autour des 31%.

L'incapacité de séparer efficacement le produit de départ et les produits d'arrivée nous ont poussés à trouver un moyen alternatif de synthétiser ces molécules. En effet, un autre chemin synthétique peut conduire à la synthèse de ces ANPs par la modification de la nucléobase en C⁶ avant la réaction de couplage avec le synthonphosphonate. Cette voie permettrait une introduction plus efficace de ces groupements, facilitant également l'étape de purification.

➤ Préparation des nucléobases non canoniques

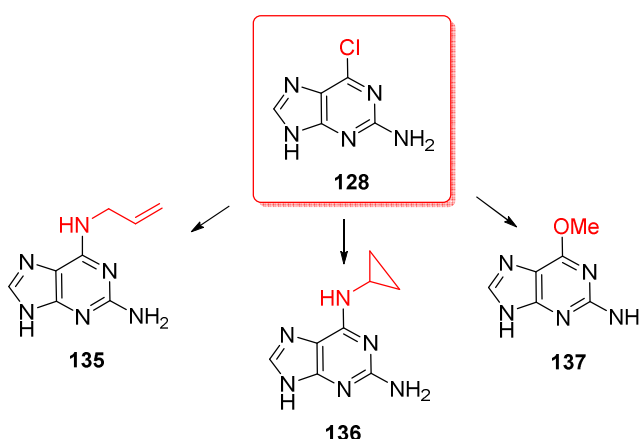


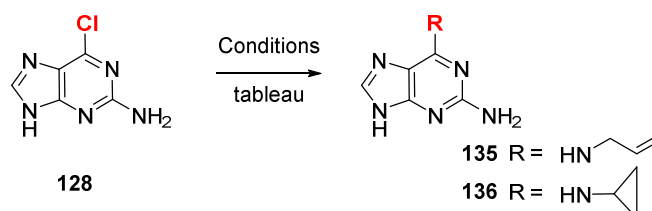
Schéma 38. Nucléobases à synthétiser

⁷⁹ Pradère, U. *et al.* Synthesis and antiviral evaluation of bis(POM) prodrugs of (E)-[4'-phosphono-but-2'-en-1'-yl]purine nucleosides. *Eur. J. Med. Chem.* **57**, 126–33 (2012).

A titre de rappel, parmi la diversité de bases nucléiques artificielles possédant un potentiel thérapeutique, seules trois d'entre elles ont démontré un réel effet antiviral lors des précédents travaux du laboratoire.^{50b} Il s'agissait des dérivés de purines : la 2-amino-6-allylamine **135**, de la 2-amino-6-cyclopropylamine **136** et de la 2-amino-6-méthoxy **137** toutes trois pouvant être issus de la 2-amino-6-chloropurine (Schéma 38).

Les composés aminés **135** et **136** sont obtenus *via* une optimisation préalable du solvant et de la nature de l'activation (Tableau 11).

Tableau 11. Modification en C⁶ par des alkylamines



Entrée	R	Base	Solvant	Conditions	Rendement
1	<chem>NCC=C</chem>	/	EtOH	80°C, 16h	75%
2	<chem>NCC=C</chem>	Et ₃ N	<i>n</i> -BuOH	120°C, 16h	80%
3	<chem>NCC=C</chem>	Et ₃ N	<i>n</i> -BuOH	MW, 140°C, 40 min	90%
4	<chem>N[C@H]1CC1</chem>	Et ₃ N	<i>n</i> -BuOH	MW, 140°C, 40 min	91%
5	<chem>N[C@H]1CC1</chem>	Et ₃ N	<i>n</i> -BuOH	MW, 110°C, 15 min	78%

Entrée 1 : La première approche a été décrite par l'équipe de Holy en 2001, qui introduit le motif azoté à l'aide d'un large excès d'allylamine dans l'éthanol à reflux.⁸⁰ Dans ces conditions, après 16h de réaction à 80°C, la purine **135** est obtenue avec un bon rendement de 75%.

Entrée 2 : L'ajout de Et₃N afin d'assister la substitution nucléophile aromatique du chlore, et la substitution de l'éthanol au profit du *n*-butanol, induit à 120°C pendant 16h une hausse de rendement de 5%.

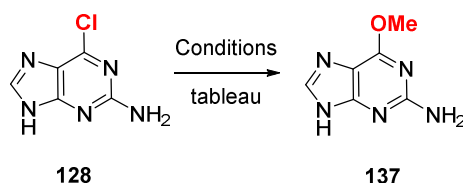
Entrée 3 : Le mode d'activation est ensuite modifié, sous micro-ondes, après 40 minutes d'irradiation à 140°C d'obtenir la purine substituée avec un excellent rendement de 90%.

Entrée 4 et 5 : Les mêmes conditions sont appliquées au motif cyclopropylamine, qui aboutissent au composé **136** avec 91% de rendement après 40 minutes d'activation. Afin de justifier la nécessité de conditions si dures aux micro-ondes, un dernier essai est lancé à 110°C pendant 15 minutes, ce qui ne permet d'obtenir l'hétérocycle visé qu'avec un rendement de 78%.

Une fois les purines aminées synthétisées, l'intérêt s'est porté vers la synthèse du noyau possédant le motif méthoxy en position C⁶. Si ce dernier est commercial, il est toutefois intéressant d'optimiser l'obtention de cette molécule (Tableau 12).

⁸⁰ Holý, A., Votruba, I., Tloušťová, E. & Masojídková, M. Synthesis and Cytostatic Activity of N-[2-(Phosphonomethoxy)alkyl] Derivatives of N⁶-Substituted Adenines, 2,6-Diaminopurines and Related Compounds. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **66**, 1545–1592 (2001).

Tableau 12. Synthèse de la 2-amino-6-méthoxypurine



Entrée	Substrat	Solvant	Conditions	Rendement
1	MeONa	NMP	MW, 100 °C, 1 min	X
2	Na	MeOH	70°C, 48h	35 %
3	NaOH	MeOH	70°C, 48h	56%
4	NaOH	MeOH	MW, 100°C, 45 min	97 %

Entrée 1 : Basé sur la littérature, la première approche tentée a été la substitution de l'atome de chlore avec du méthanolate de sodium dans la N-méthyl-2-pyrrolidone, irradiée aux micro-ondes pendant 1 minute à 100°C.⁸¹ Dans notre cas, ces conditions ne nous ont toutefois pas permis de synthétiser le produit attendu **137**, aucune trace de produit n'ayant été observé en masse, ni en RMN.

Entrée 2 : Dans ces conditions, le méthanolate de sodium est formé *in situ*, par dissolution de sodium métallique dans le méthanol. Après reflux de la solution pendant 48h, l'hétérocycle **137** est obtenu avec un rendement de 35%.

Entrée 3 : Plutôt que de former du méthanolate de sodium, un mélange hydroxyde de sodium et méthanol porté à reflux pendant 48h permet d'obtenir le composé **137** avec un rendement de 56%.

Entrée 4 : Cette méthode a été appliquée aux micro-ondes, avec un temps de réaction de 45 minutes à 100°C, un rendement presque quantitatif est obtenu pour ce produit.

➤ Réaction de couplage dans les conditions de Mitsunobu

Une fois ces nucléobases en main, la réaction de couplage dans les conditions de Mitsunobu est utilisée pour synthétiser les ANPs souhaités (Schéma 39).

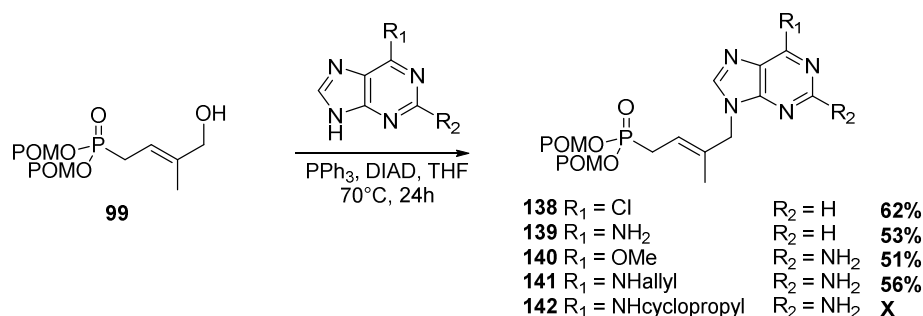


Schéma 39. Extension de la réaction de Mitsunobu optimisée à d'autres substrats⁸²

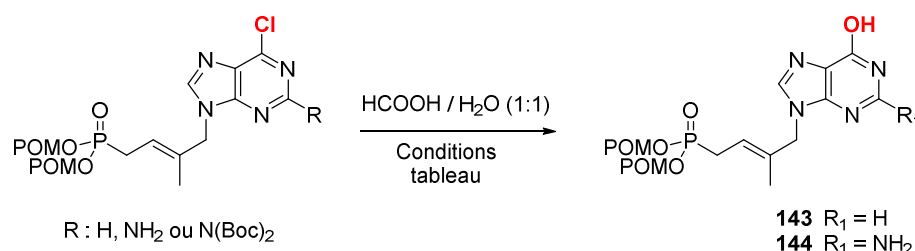
⁸¹ Huang, L.-K. *et al.* An efficient synthesis of substituted cytosines and purines under focused microwave irradiation. *Tetrahedron*. **63**, 5323–5327 (2007).

⁸² Travaux effectués avec Ozkan Sari

L'introduction de l'adénine et de la chloropurine s'effectue doucement au reflux du THF pendant 24h pour donner les composés phosphonates **138** et **139** avec des rendements respectifs de 62% et 53% (Schéma 39). En ce qui concerne les purines C²-amino, si les composés substitués par des groupements méthoxy **140** et allylamino **141** présentent des rendements moyens de l'ordre de 55%, ce n'est cependant pas le cas de celui substitué par la cyclopropylamine **142**. En effet, quelques soient les conditions, le composé souhaité **142** n'a jamais pu être obtenu. Après une recherche plus précise de ce type de composés dans la littérature et des problèmes qu'aurait pu incomber ce type de noyau sur la réaction de Mitsunobu, un exemple d'introduction de la base **136** sur un carbosemblet semblait aussi mener à un mélange de dégradation et de produit de départ.⁸³

Si la substitution ultérieure sur l'atome de chlore présent dans le noyau 2-amino-6-chloropurine ne put servir dans des réactions de substitution nucléophile, il est en revanche possible d'oxyder cette position. Cette réaction permettra donc d'obtenir les ANPs présentant les bases nucléiques hypoxanthine (issu du composé **138**) et guanine (issu du composé **131/132**) (Tableau 13).

Tableau 13. Formation d'ANP possédant le noyau hypoxanthine/guanine



Entrée	R	R ₁	Conditions	Rendement
1	H	H	40°C, 16h	78%
2	H	H	MW, 80°C, 20 min	Quant.
3	NH ₂	NH ₂	40°C, 16h	79%
4	NH ₂	NH ₂	MW, 80°C, 20 min	Quant.
5	N(Boc) ₂	NH ₂	MW, 80°C, 20 min	Quant.

Entrée 1 : La première oxydation a été réalisée en conditions "classiques", c'est à dire à 40°C dans une solution d'acide formique aqueux. Après purification, le dérivé souhaité **143** est obtenu avec 78% de rendement.

Entrée 2 : Les conditions sont ensuite adaptées afin d'en réduire les temps de chauffage. Sous activations micro-ondes, le composé souhaité est obtenu quantitativement en 20 minutes. La seule étape de purification nécessaire est une extraction suivie de l'évaporation des volatiles, ce qui fait de cette technique une réelle plus-value.

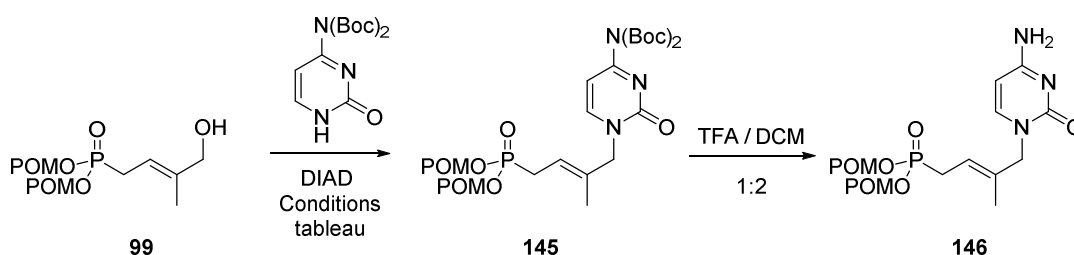
⁸³ Aubin, Y., Audran, G., Monti, H. & De Clercq, E. Chemoenzymatic synthesis and antiviral evaluation of conformationally constrained and 3'-methyl-branched carbanucleosides using both enantiomers of the same building block. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 374–381 (2008).

Entrée 3 et 4 : Dans la même optique, une comparaison entre les deux conditions de chauffage, afin de confirmer ou d'infirmar ces résultats avec des composés plus polaires. Les résultats sont très similaires, puisque sous activation MW, l'ANP **143** sont obtenus avec un rendement quantitatif après une simple extraction.

Entrée 5 : Il est à noter qu'en présence du dérivé protégé **122**, cette technique ne permet pas seulement d'oxyder la position C⁶ de la base purique, mais permet aussi de déprotéger les groupements Boc acido-labiles. La polyvalence de cette technique en fait un outil de post-fonctionnalisation très efficace, permettant encore une fois l'obtention du composé **144** quantitativement et sans purifications.

La dernière base à introduire par réaction de Mitsunobu est la cytosine. Cette base présente notamment un NH₂ exocyclique qui complique fortement sa compatibilité aux réactions de métathèses croisées directes. En revanche, elle est de manière générale plus facilement couplée dans les conditions de Mitsunobu que ses analogues puriques. Les conditions utilisées seront donc plus douces dans un premier temps (Tableau 14).

Tableau 14. Obtention de l'ANP avec un motif cytosine



Entrée	Solvant	Cytosine (eq.)	Phosphine (eq.)	Alcool (eq.)	Conditions	Rendement / 2 étapes
1	Dioxane	1.5 eq.	PPh ₃ (1.5 eq.)	1 eq.	RT, 24h	X
2	Dioxane	1 eq.	PPh ₃ supporté (1.5 eq.)	1.5 eq.	RT, 24h	33%
3	THF	1 eq.	PPh ₃ (2 x 2 eq.)	2 x 1 eq.	RT, 20h	42%

Entrée 1 : Dans ce cas, les conditions généralement utilisent la nucléobase protégée **120** en excès, ainsi que la triphénylphosphine et le DIAD. Pourtant, aucun produit n'a été détecté après 24h de réaction à température ambiante.

Entrée 2 : Comme précédemment, la nucléobase est donc introduite dans la réaction en tant que réactif limitant. La source de phosphine devient la triphénylphosphine supportée, dans le but de simplifier la purification ultérieure, et après 24h à température ambiante, le composé est purifié. N'étant que partiellement pur, le mélange est engagé dans une étape de déprotection des groupements Boc à l'aide d'un mélange d'acide trifluoroacétique / dichlorométhane en proportion 1:2, et après 2h à température ambiante, l'ANP **146** dérivant de la cytosine est obtenu avec un rendement global de 33% sur 2 étapes.

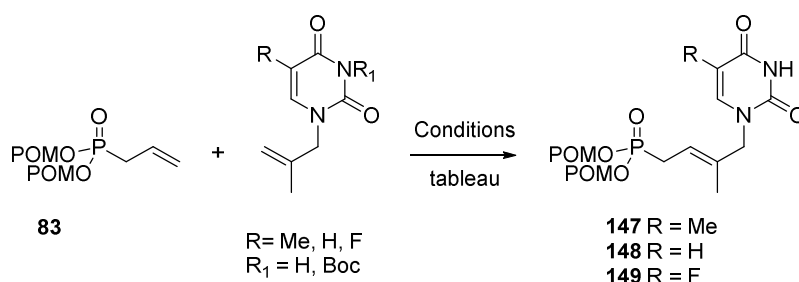
Entrée 3 : Le solvant est changé au profit du THF, avec une source de triphénylphosphine non supportée. Les ajouts de phosphine, de DIAD et de phosphonate sont séquencés afin de s'assurer d'une réactivité maximale.

Après 20 heures à température ambiante, et après la déprotection des *tert*-butyloxycarbonyles par le TFA, le composé **146** est obtenu avec un rendement global de 42% sur 2 étapes.

➤ Métathèse croisée directe

En ce qui concerne les bases pyrimidiques, la métathèse peut être expérimentée entre les synthons pyrimidines fonctionnalisés et le phosphonate *bis*(POM) allylique **83** (Tableau 15).

Tableau 15. Synthèse des composés possédant un motif pyrimidine⁸⁴



Entrée	R	R ₁	Equivalents (Phosphonate - base)	Catalyseur ^a	Conditions	Rendement
1	Me	Boc	2 - 1	HG-II	]]], DCM, 55°C, 20h	X
2	Me	Boc	1 - 2	HG-II	]]], DCM, 55°C, 20h	X
3	Me	H	1 - 2	HG-II	]]], DCM, 55°C, 20h	33%
4	H	H	1 - 2	HG-II	]]], DCM, 55°C, 20h	27%
5	F	H	1 - 2	HG-II	]]], DCM, 55°C, 20h	39%

^a Catalyseur introduit en 3 x 5 mol % à t = 0, 2 et 4h

Entrée 1 et 2 : La réactivité de la thymine protégée par un groupement Boc est évaluée dans la réaction de métathèse avec le catalyseur plus réactif d'Hoveyda-Grubbs sous les conditions précédemment optimisées (ultrasons à 55°C pendant 20h avec ajout séquentiel de 3 x 5 mol% du catalyseur). Quelque soit l'excès de type d'oléfine (type I ou type III), seul l'homodimère *bis*phosphonate est obtenu à l'issue des cycles catalytiques. Le métal du catalyseur n'étant pas sensible aux fonctions protégées, ce résultat semble plutôt indiquer une approche difficile de la nucléobase encombrée par rapport au catalyseur. En vue de confirmer ou d'infirmer cette théorie, la gêne stérique sera diminuée en enlevant le groupement Boc.

Entrée 3 : La thymine non protégée est par conséquent mise en réaction avec le groupement phosphonate dans les conditions précédentes. Cette fois ci, démunie du *tert*-butoxycarbonyle, l'ANP **147** est isolé avec un faible rendement, mais indique donc bien une approche plus aisée de ce produit par rapport au catalyseur, ce qui confirme donc l'hypothèse d'encombrement stérique.

Entrée 4 et 5 : Ces conditions sont reproduites avec l'uracile et le fluorouracile substitués en N¹, et non protégés sur l'azote N³. Les deux réactions permettent l'obtention des ANPs pyrimidiques **148** et **149** avec des rendements respectifs de 27 et 39%, qui restent toutefois très modestes.

⁸⁴ Travaux effectués avec Ozkan Sari

La réactivité faible d'un alcène de type III allié à un groupement amino libre peut assez facilement conduire à une chute drastique de rendement. En revanche, cette réaction ne nécessite pas de déprotection, permettant d'obtenir directement les produits finaux.

Ces deux stratégies (métathèse et couplage dans les conditions de Mitsunobu) nous ont permis d'obtenir une dizaine d'ANPs sous leur forme prodroge, après optimisation de ces différents systèmes (Figure 24), qui ont été évalués pour leurs propriétés antivirales.

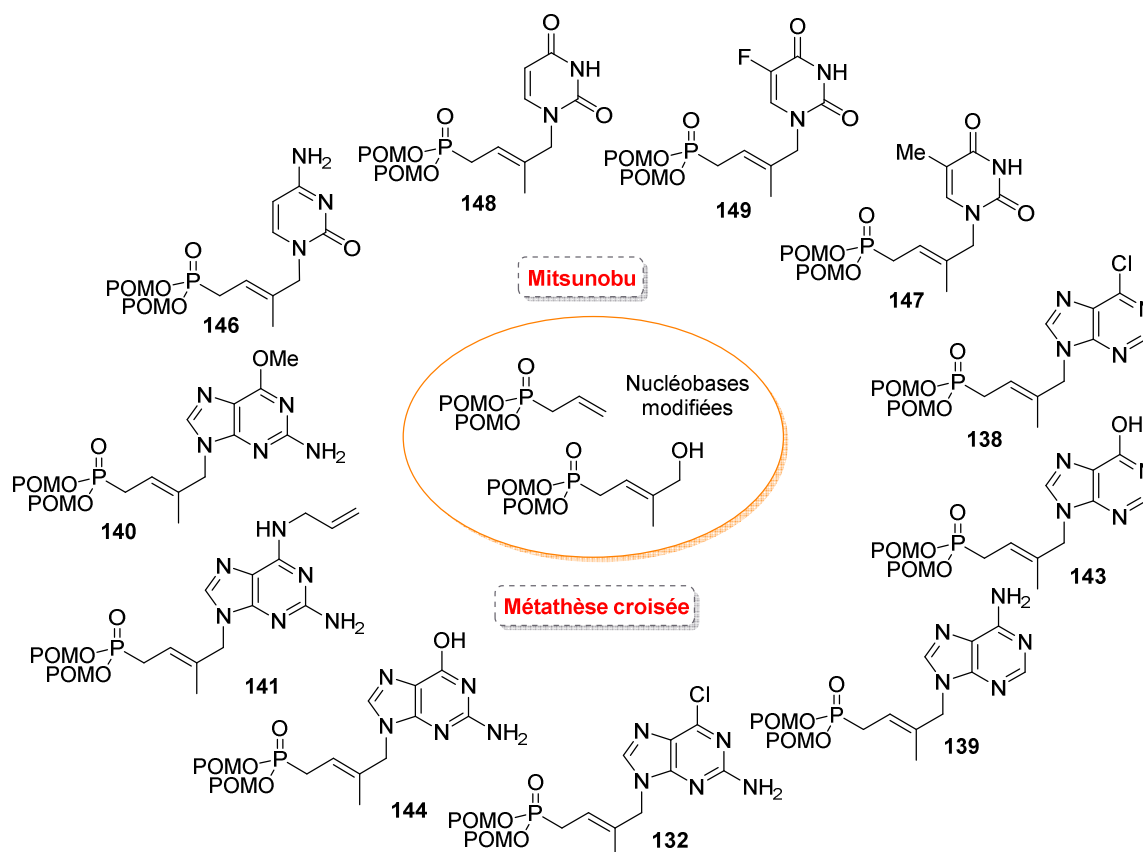


Figure 24. Représentation des différentes molécules synthétisées

➤ Tests biologiques

Ces molécules ont été envoyées en tests biologiques, sur des virus à ADN/ARN en collaboration avec le Dr. Raymond F. Schinazi à Emory University (Atlanta, USA) et avec les Prof. Robert Snoeck et Graciela Andrei du REGA Institute (Louvain, Belgique)

Les activités mesurées sur les différents virus à ADN montrent une légère inhibition du VZV et le CMV, TK- et TK+. Les différentes molécules références comme la brivudine montrent une réelle affinité avec le VZV présentant la TK comparativement à la souche qui en est dépourvu, ce qui souligne l'intérêt de nos composés sur ces souches de VZV TK- (Tableau 16).

Tableau 16. Résultat de l'évaluation antivirale contre VZV et CMV

Entrée	Composé	EC ₅₀ (μM) ^a				MCC ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)
		TK+ VZV	TK- VZV	CMV	CMV		
		(OKA)	(07/1)	(AD-169)	(Davis)		
1	132	44.7	40.7	>100	100	>100	>100
2	140	39.9	41.7	>100	54.7	>100	>100
3	141	100	73.6	44.7	44.7	>100	>100
4	Acyclovir	2.5 ± 0.3	92 ± 70	-	-	> 300	470 ± 490
5	Ganciclovir	-	-	7.5 ± 2.3	7.1 ± 0	> 350	130 ± 86
6	Brivudine	0.0087	74	-	-	> 150	> 100
7	Cidofovir	-	-	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

Dans le cadre d'une infection au VIH, deux molécules présentent un EC₅₀ assez intéressant, le composé présentant un NHallyl en position C⁶ **141** et celui présentant un groupement hydroxyle **144**. Le composé **141** a cependant une activité plus importante que son analogue hétérocyclique guanine **144**. L'allylamine joue dans ce cas le rôle d'une prodrogue, permettant l'internalisation du composé au sein de la cellule, suivie de sa déamination puis de son intégration à la polymérase virale.

Tableau 17. Résultats de l'évaluation antivirale sur VIH-1

Entrée	Composé	HIV-1		IC ₅₀ (μM) ^c		
		EC ₅₀ (μM) ^a	EC ₉₀ (μM) ^b	PBM	CEM	VERO
1	132	12.8	>100	12.7	9.2	19.8
2	140	8.7	>100	7.0	3.7	13.4
3	141	1.1	4.2	24.1	8.9	11.8
4	144	7.7	18.6	90.7	40.2	36.9
5	146	26.6	>100	>100	2.0	65.0
6	AZT	0.00053	0.0078	>100	14.3	56.0

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 90% .

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

➤ Modélisation moléculaire

Les études de docking ont été réalisées avec le Prof. Andrzej Bojarski et Dawid Warszycki du Polish Academy of Sciences (Cracovie, Pologne), et nous ont permis d'étudier l'affinité du composé **135-pp**, métabolite actif du composé en comparaison avec des anti VIH comme le PMPA et le carbovir. En effet, le composé **144** possède une analogie structurale avec ces composés très actifs. Cet ANP est supposé être diphosphorylé dans la cellule, et agir sur la polymérase virale.

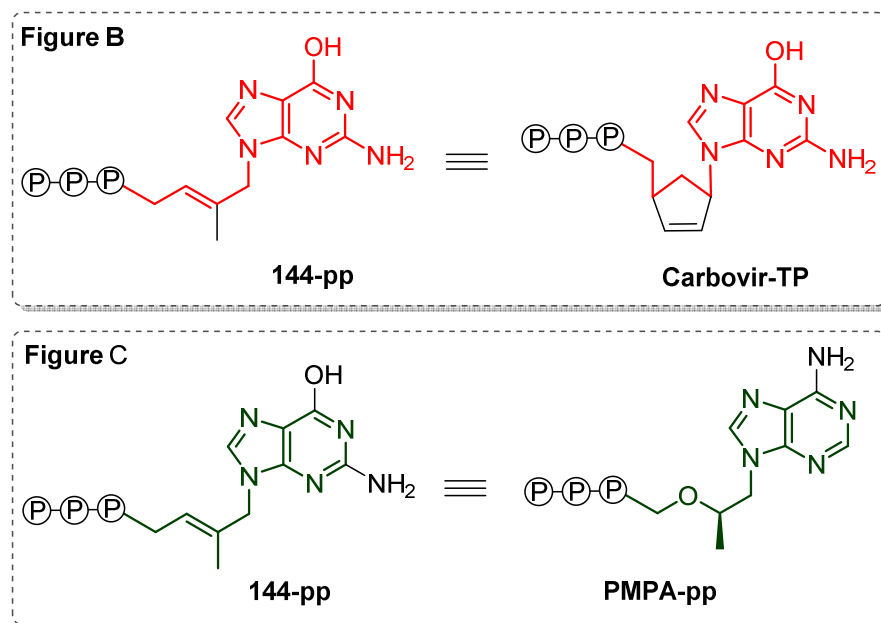


Figure 25. Analogie structurale entre les composés commerciaux et le composé 177

Une forte similarité est effectivement présente entre ces composés. L'abacavir est métabolisé au niveau intracellulaire en son métabolite actif, représenté ici par la forme triphosphate du carbovir (TP-Carbovir) (Figure 25). La cyclopropylamine en C⁶ est prise en charge par une déaminase une fois dans la cellule, libérant ainsi le carbovir qui est triphosphorylé par la suite. Le carbovir souffre quant à lui d'une faible biodisponibilité, ce qui n'est pas le cas de l'abacavir. La cyclopropylamine peut donc être considérée comme une prodrogue du Carbovir, améliorant ses propriétés physico-chimiques. La molécule **141** est structuralement très proche de l'abacavir. Il est donc supposé qu'elle est aussi prise en charge par une déaminase, libérant après la triphosphorylation la version triphosphate du composé **144** (**144-pp**), qui a par conséquent aussi une charpente très similaire au TP-Carbovir. De plus, le **144-pp** a aussi une ressemblance certaine par rapport à la forme active du PMPA, le TP-PMPA, présentant en plus l'assemblage diphosphate-phosphonate en commun avec le Tenofovir métabolisé. L'intérêt serait donc de faire des études de docking sur les composés de la figure B et C. Pour définir les affinités entre les composés **144-pp** et les composés commerciaux triphosphorylés, le docking est effectué dans le site actif de la transcriptase inverse du VIH-1.

Les complexes cristallins de la transcriptase inverse ont été sélectionnés dans la PDB (ProteinDataBase, PDB ID : 4R5P, résolution 2.89 Å) et préparés dans le logiciel ProteinPreparationWizard, présentant les paramètres par défaut.⁸⁵ Les structures tridimensionnelles, leurs conformations et états de conformations

⁸⁵ (a) MadhaviSastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).

ont été générées par LigPrep à pH = 7.4.⁸⁶ Pour finir, Glide a été utilisé pour réaliser les expériences de docking.⁸⁷ Chaque position a été classée selon leurs scores d'affinités, et le meilleur score a été choisi pour les analyses ultérieures. Le composé **144-pp** y est représenté en superposition avec le carbovir (Figure 26) et avec le PMPA (Figure 27).

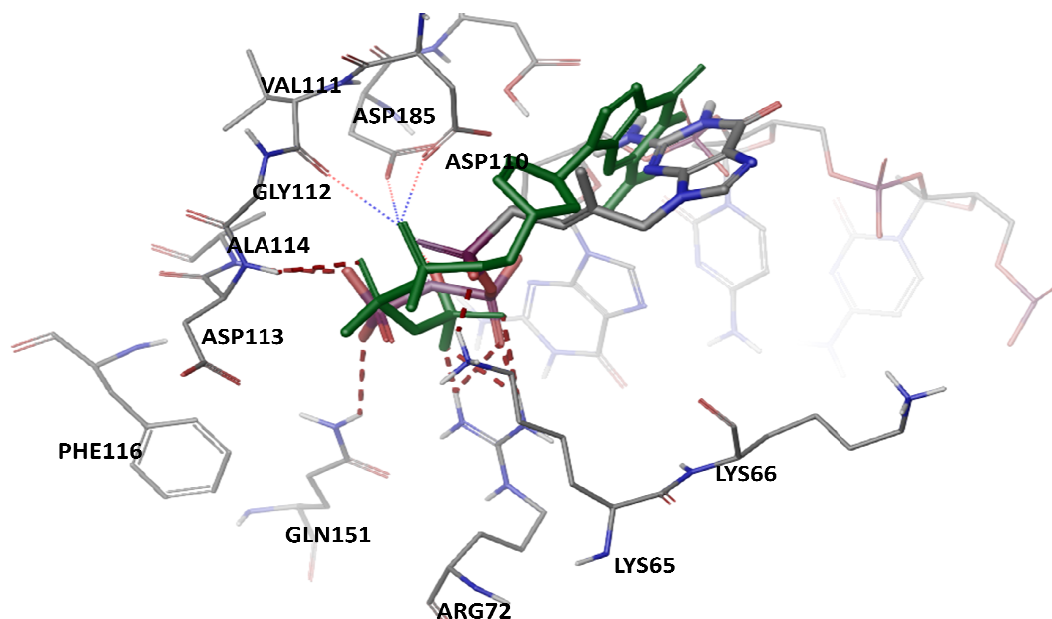


Figure 26. Position du composé 144-pp dans le site actif de la transcriptase inverse (PDB ID : 4R5P) du VIH-1. Les composés sont représentés en représentation "stick and ball". Seuls les résidus situés à moins de 4 Å ont été représentés par souci de clarté. Le composé de référence, le TP-Carbovir, est représenté en vert. Les liaisons hydrogènes entre la RT et les composés sont représentées en rouge. Les coordinations avec l'ion magnésium sont indiqués avec des lignes pointillées fines.

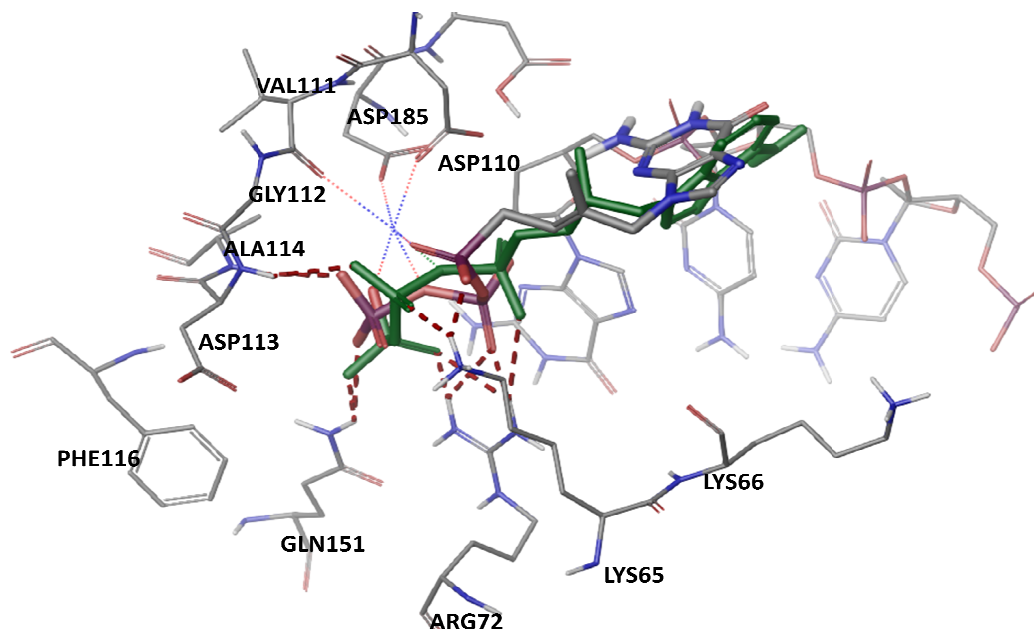


Figure 27. Position du composé 144-pp dans le site actif de la transcriptase inverse (PDB ID : 4R5P) du VIH-1. Les composés sont représentés en représentation "stick and ball". Seuls les résidus situés à moins de 4 Å ont été représentés par souci de clarté. Le composé de référence, le TP-PMPA, est représenté en vert. Les liaisons hydrogènes entre la RT et les composés sont représentées en rouge. Les coordinations avec l'ion magnésium sont indiqués avec des lignes pointillées fines.

⁸⁶ LigPrep, LigPrep, version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.

⁸⁷ Glide, version 7.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.

Si les études de docking effectuées corroborent avec une affinité favorable avec la RT du VIH-1, ces représentations montrent que l'interaction de ces composés dans le site actif de la molécule peut être améliorée.

5 Synthèses d'ANP comportant un acétoxyméthyl en position 2'

i. Schéma rétrosynthétique

Les trois grandes familles d'ANPs commercialisés sont l'Adéfovir, le Ténofovir et le Cidofovir. La synthèse d'une famille inspirée de ces deux premiers comportant un motif oléfinique a démontré un grand potentiel thérapeutique. De ce fait, il serait intéressant d'introduire un hydroxyméthyle en position 2' afin de juger son impact sur l'effet thérapeutique provoqué. Le groupement 2'-acétoxyméthyle agira comme une prodrogue de l'hydroxyméthyle, suivant le modèle décrit dans la figure 28.

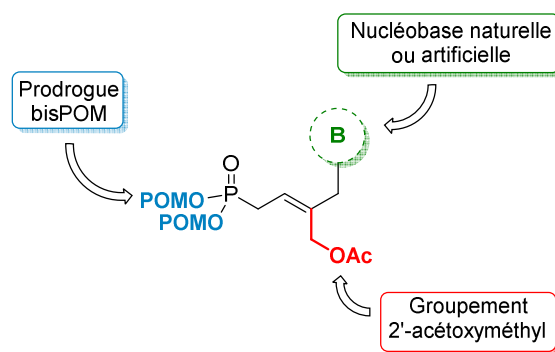


Figure 28. Modèle d'ANP à suivre

Dans ce cas spécifique, la rétrosynthèse peut différer un peu de celle proposée précédemment, du fait de la présence d'un groupement chimique plus réactif en position 2'.

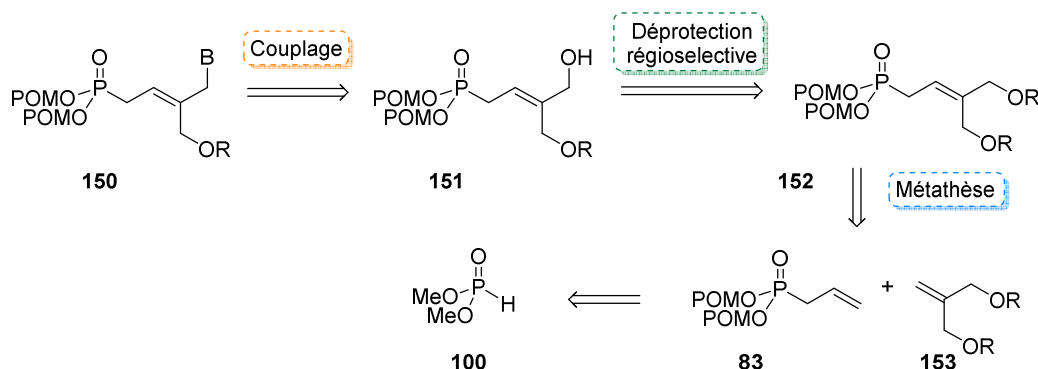


Schéma 40. Rétrosynthèse envisagée

Sur ce chemin réactionnel, la nucléobase est introduite par une réaction de couplage à partir du synthon hydroxylé **151**. Cet intermédiaire est obtenu par une étape de déprotection sélective du phosphonate protégé **152**. Ce composé peut être synthétisé par réaction de métathèse à partir du bis(POM)allylphosphonate et le composé **153**. La nature du groupement protecteur sera sujette à modification, en fonction de la régiosélectivité de sa déprotection (Schéma 40).

ii. Résultats et discussion

➤ Synthèse des composés **141**

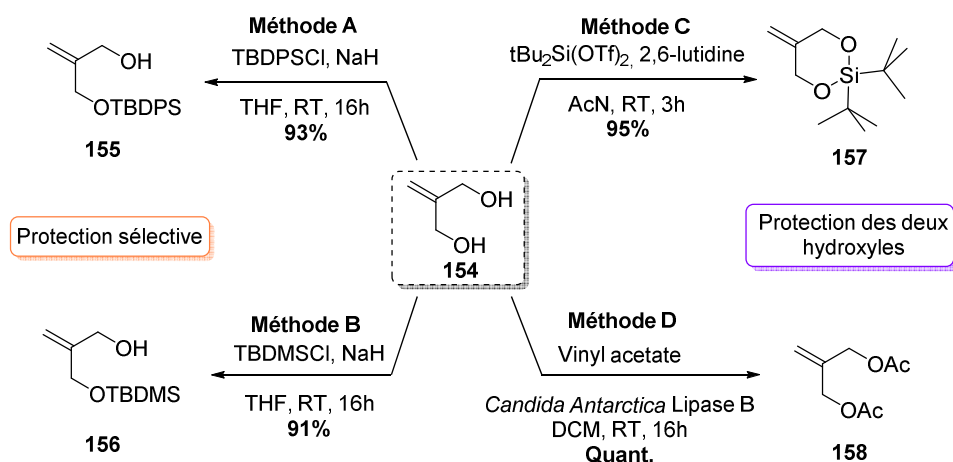


Schéma 41. Synthèse des composés **155-158**, précurseurs à la métathèse

Dans le but d'avoir un rendement global maximum sur le procédé de synthèse, plusieurs synthons de départ sont préparés afin d'être engagés dans la réaction de métathèse ultérieure. En effet, ces différentes espèces étant obligatoirement de type III, leur réactivité par rapport au catalyseur est faible, et très substrat dépendante, raison de cette diversification (Schéma 41).

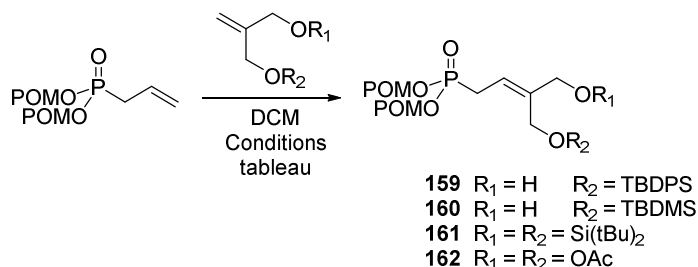
Deux catégories globales de synthons ont été préparés :

- Les diols monoprotégés. Quelque soit le type de couplage ultérieur avec les nucléobases, le phosphonate nécessitera une désymétrisation dans le but d'introduire sélectivement la base nucléique à une position donnée. Les mono-alcools **155-156** offrent la possibilité d'obtenir directement ces phosphonates. Pour effectuer cette protection sélective, le diol est déprotoné avec de l'hydrure de sodium, puis mis en réaction avec du chlorure de *tert*-butyldiphénylsilane pendant 16h à température ambiante. Le même protocole est appliqué avec du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane, ce qui permet d'obtenir les composés **155** et **156** avec des rendements respectifs de 93 et 91%.
- Les diols diprotégés. L'avantage de ces composés est qu'ils présentent souvent de meilleurs rendements lors de couplages métallo-catalysés, induits par la protection des groupements réactifs envers ces métaux. Dans le cas précis de la métathèse, un autre avantage est l'absence de mélange *cis/trans*, en conséquence de la symétrie de la molécule résultante. Deux stratégies de synthèses ont alors été envisagées, et se traduisent par la formation des composés **157** (protégés par un groupement silylène) et **158** (hydroxyles masqués par deux acétates). Ce premier composé est synthétisé avec un excellent rendement de 95%, par la réaction du diol avec le triflate de silylène en présence de lutidine. Quant au composé **158**, il est diacétylé à l'aide d'une enzyme, la lipase B de *Candida Antarctica*, qui dans ces conditions spécifiques permet la consommation complète du propénol **145** en présence d'acétate de vinyle.

Une fois ces composés en main, la synthèse du *bis*(POM)allylphosphonate **83** ayant déjà été décrite précédemment, la prochaine étape est donc la métathèse impliquant ces composés (Tableau 18).

➤ Réalisation de la métathèse

Tableau 18. Optimisation de la métathèse



Entrée	R ₁ / R ₂	Equivalents (Phosphonate - base)	Catalyseur (mol%)	Conditions	Rendement
1	H / TBDPS	1 - 2	NG-II (3 x 4)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
2	H / TBDPS	2 - 1	NG-II (3 x 4)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
3	H / TBDPS	2 - 1	HG-II (3 x 4)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
4	H / TBDMS	2 - 1	NG-II (3 x 3)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
5	O-Si(tBu) ₂ -O	2 - 1	NG-II (3 x 2)	]]], DCM, 55°C, 20h	61%
6	OAc / OAc	2 - 1	NG-II (3 x 3.3)	]]], DCM, 55°C, 20h	73%

Les premiers synthons à avoir été testés furent ceux présentant un groupement hydroxyle libre.

Entrée 1 à 4 : Plusieurs essais furent effectués, en reprenant les conditions d'activation optimisées précédemment, par sonication pendant 24h à 55°C. Quelque soit le groupement silylé présent sur la molécule, l'excès d'oléfine ou même la nature du catalyseur, aucune de ces conditions n'a mené à une quelconque conversion. La taille du groupement silylé et la difficulté d'une oléfine 1,1-disubstituée à s'engager dans ce type de couplage sont probablement la cause de ces différents échecs.

Entrée 5 : En ce qui concerne le diol cyclisé par le groupement silylène, les conditions optimisées permettent, après mise en présence de deux équivalents de phosphonate pour un équivalent de silylène, d'obtenir après réaction avec 6 mol% de catalyseur de Nolan-Grubbs l'hétérodimère **161** attendu avec un rendement correct de 61% malgré la faible charge catalytique. Ce bon résultat peut s'expliquer par un groupement silyl cyclique, qui contraint les groupements encombrants dans l'espace, les empêchant d'exercer une gêne stérique trop importante.

Entrée 6 : Quant au diol protégé par deux groupements acétates, il réagit avec le *bis*(POM)allylphosphonate dans les conditions précitées, avec un ajout séquentiel de 10 mol% de catalyseur, présentant un rendement final de 73% pour donner le composé **162**.

Le composé **162** peut également être obtenu par un deuxième chemin réactionnel, en introduisant le groupement biolabile après l'étape de métathèse. L'intermédiaire réactionnel **163** est isolé après

métathèse catalysée avec HG-II avec un excellent rendement de 89%. L'échange des groupes méthoxy contre les groupements biolabiles POM se fait dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (110°C durant 2 jours dans des conditions parfaitement anhydres) (Schéma 42).

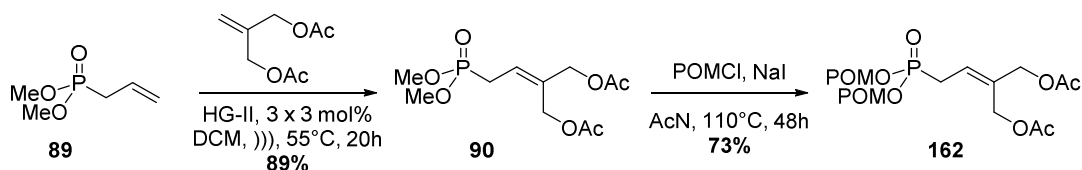


Schéma 42. Synthèse alternative pour l'obtention du composé 195

Après l'obtention de ces intermédiaires, il a fallu mettre au point une étape de déprotection régiosélective de ces composés, afin de pouvoir introduire la nucléobase nécessaire à la formation des ANPs.

➤ Déprotection régiosélective des composés

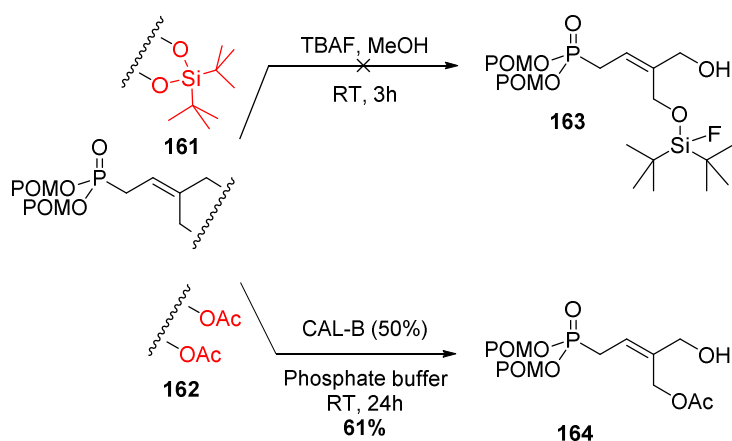


Schéma 43. Accès aux composés possédant un groupement hydroxyle libre

Basé sur la littérature, seule une méthode est décrite pour désymétriser un silylène par un clivage partiel (Schéma 43).⁸⁸ Malheureusement, dans nos conditions, cela ne nous permet pas d'aboutir au composé **163**, menant directement au diol libre.

En revanche, la déprotection régiosélective du diacétate est possible *via* une réaction chémo-enzymatique. Les travaux précédents du laboratoire révèlent que l'enzyme la plus efficace dans la désymétrisation sélective de ce type de composés est la lipase B de *Candida Antarctica* (CAL-B). Pour cette réaction en particulier, des essais supplémentaires ont révélé que le taux enzymatique idéal pour cette réaction est de 50% en masse. Ferrières *et coll.* avaient révélé la potentialité d'un liquide ionique comme co-solvant, le [bmim]PF₆ en mélange avec le tampon phosphate, qui avait la capacité d'influer sur la sélectivité de la réaction.⁸⁹ Ce n'est cependant pas le cas ici, car quelque soit le pourcentage de liquide ionique, le composé reste sous sa forme diacétylée. Les conditions retenues sont donc en présence de 50% d'enzyme en masse, dans un tampon phosphate à pH = 7, ce qui permet d'obtenir le produit **164** après 24h de réaction avec un

⁸⁸ (a) Matsuda, D. *et al.* In vitro metabolism of pyripyropene A and ACAT inhibitory activity of its metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **68**, 27–34 (2015). (b) Ohtawa, M., Tomoda, H. & Nagamitsu, T. Regioselective Mono-Deprotection of Di- *tert* -butylsilyleneAcetal Derived from 1,3-Diol with Ammonium Fluoride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **87**, 113–118 (2014).

⁸⁹ Gervaise, C., Daniellou, R., Nugier-Chauvin, C. & Ferrières, V. Influencing the regioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis with [bmim]PF₆. *Tetrahedron Lett.* **50**, 2083–2085 (2009).

bon rendement de 61%. Il est à noter qu'il est important de garder ce composé à -20°C dans une absence de lumière, car il peut être sujet à une racémisation intramoléculaire par migration de l'acyle.

➤ Couplage aux nucléobases

Deux chemins réactionnels sont envisageables pour la réaction de couplage entre le synthon hydroxylé **164** et les nucléobases correspondantes. La première méthode est celle précédemment utilisée, la réaction de Mitsunobu. Ce schéma réactionnel présente certains avantages, comme l'obtention du composé visé en une seule étape allié à une sélectivité marquée. Il serait toutefois intéressant de se pencher sur une réaction peu utilisée, qui est l'introduction directe de la base nucléique sur une position bromée à l'aide de fluorure *tert*-butyl ammonium. En effet, ces conditions sont beaucoup plus douces qu'une substitution nucléophile classique, et a déjà été reportée comme étant assez efficace sur des charpentes aryles comme aliphatiques (Schéma 44).⁹⁰

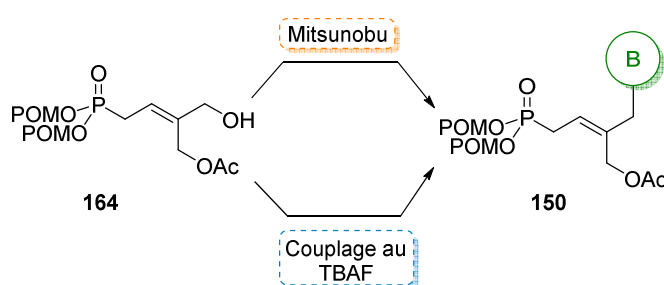


Schéma 44. Chemins synthétiques envisagés pour la formation des ANPs correspondant

Tout d'abord, la voie de synthèse employée pour l'obtention d'un ANP **150** fut tentée suivant les conditions de Mitsunobu optimisée précédemment (Schéma 45). Après 24h à 70°C avec un ajout séquentiel des réactifs, le composé **165** est obtenu avec un rendement moyen de 51%. Ce couplage fut aussi effectué avec la 6-chloropurine ne présentant pas le groupement amino en position C², avec un rendement de 47% (**166**).

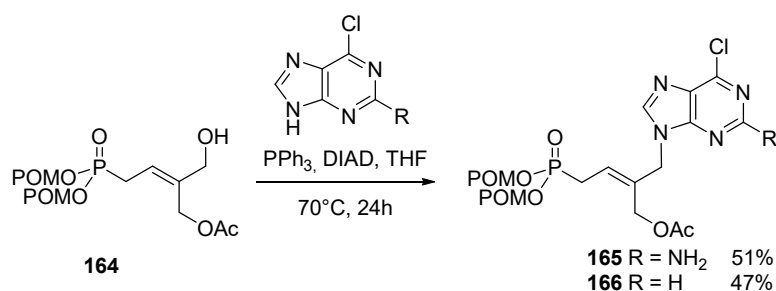


Schéma 45. Réaction de Mitsunobu entre le composé **164** et deux chloropurines

Dans le but d'améliorer ces rendements, nous nous sommes penchés sur la méthode alternative de couplage au TBAF. Pour pouvoir effectuer ce couplage, il est nécessaire d'obtenir le dérivé bromé **165** en position allylique. Une des synthèses les plus couramment utilisées repose sur l'utilisation de tribromure de phosphore (PBr₃) dans l'éther diéthylique, ce qui permet d'obtenir le composé **167**. Il n'est cependant pas possible d'isoler cet intermédiaire, du fait d'une dégradation lors de toute tentative de purification. La réaction de couplage au TBAF est alors engagée sur l'intermédiaire, mais ne permet pas d'obtenir l'ANP

⁹⁰ Brik, A., Wu, C.-Y., Best, M. D. & Wong, C.-H. Tetrabutylammonium fluoride-assisted rapid N⁹-alkylation on purine ring: application to combinatorial reactions in microtiter plates for the discovery of potent sulfotransferase inhibitors in situ. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4622–6 (2005).

157. Cet échec est probablement dû à l'instabilité de l'intermédiaire réactionnel, car cette réaction fut aussi engagée avec succès sur le bromure de crotyle qui est beaucoup plus stable que le bromoacétate **156** (Schéma 44).

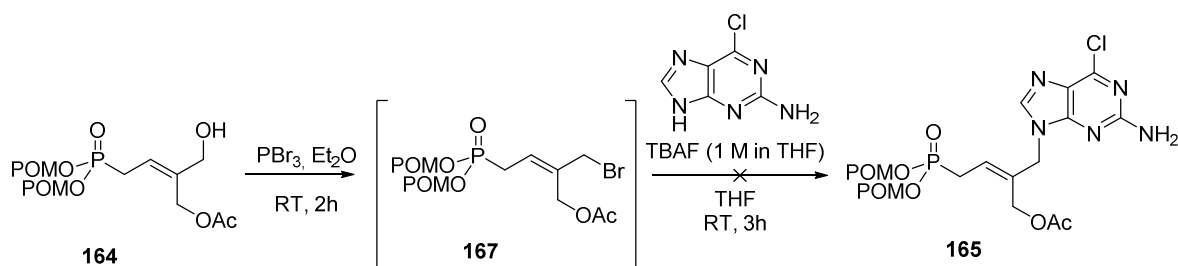


Schéma 46. Bromation de l'alcool allylique et couplage au TBAF

- Tests biologiques

Ces deux molécules, faisant état de preuve de concept, ont par la suite été testées biologiquement sur des virus à ADN en collaboration avec les Prof. Robert Snoeck et Graciela Andrei du REGA Institute (Louvain, Belgique).

Tableau 19. Evaluation biologique des ANP synthétisés

Entrée Composé		EC ₅₀ (μM) ^a								MCC ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)
		TK+ VZV	TK- VZV	CMV	CMV	HSV-1		HSV-2	VV		
		(OKA)	(07/1)	(AD-169)	(Davis)	KOS	TK- (KOS) ACVr	G			
1	165	1.05	0.80	15.29	6.84	7.0	9.5	10.5	34.0	>100	14.25
4	Acyclovir	2.5 ± 0.3	92 ± 70	-	-	0.2	85	0.2	>250	> 300	470 ± 490
5	Ganciclovir	-	-	7.5 ± 2.3	7.1 ± 0	0.032	8.9	0.06	>100	> 350	130 ± 86
6	Brivudine	0.0087	74	-	-	0.04	50	50	5.8	> 150	> 100
7	Cidofovir	-	-	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0	2	3.8	2	29	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

Le composé **165** présente de bons résultats sur VZV, CMV, diverses souches de HSV et aussi sur VV (Tableau 19). Si son activité est du même ordre de grandeur que le composé de référence sur VV, cette activité est à modérer par une forte cytotoxicité. En revanche, cette activité est décuplée sur le virus du VZV TK-, ce qui en fait un composé très intéressant. La modulation de la position C⁶ de la nucléobase est actuellement en cours, par des groupements ayant précédemment prouvé leur intérêt comme l'allylamine, la cyclopropylamine ou le méthoxyle. Des bases pyrimidiques sont aussi introduites, afin d'exploiter entièrement le potentiel thérapeutique de ce noyau.

6 Conclusions et perspectives

Dans cette partie, l'intérêt s'est principalement porté sur la synthèse d'ANP portant des nucléobases canoniques et artificielles, avec un espaceur but-2'-ényle sous forme pronucléotide carbonyloxyméthyl de type *bis*(POM).

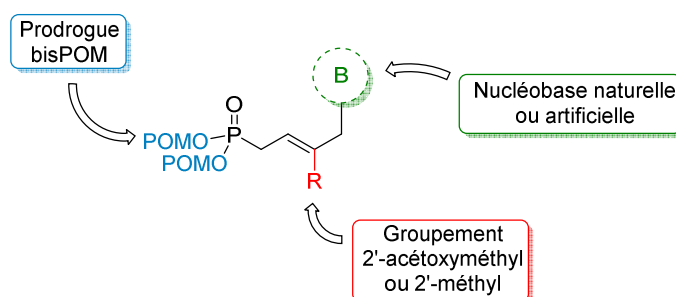


Figure 29. Type d'ANPs synthétisés

Nous avons développé une approche convergente basée sur deux réactions clefs :

- La réaction de métathèse croisée : Les oléfines trisubstituées sont très difficiles à synthétiser, quelque soit la méthode d'oléfination envisagée. Dans ce contexte intervient ce couplage de métathèse croisée qui permet d'obtenir les composés envisagés avec des rendements excellents, en utilisant des méthodes alternatives et intéressantes comme l'activation aux ultrasons. Cette méthode éco-responsable se détache par sa sélectivité ainsi que par les rendements provoqués par son utilisation.
- La réaction de Mitsunobu. Utilisée dans le couplage des bases nucléiques aux synthons hydroxylés, cette méthode polyvalente permet l'introduction de nombreuses bases puriques et pyrimidiques avec une remarquable sélectivité.

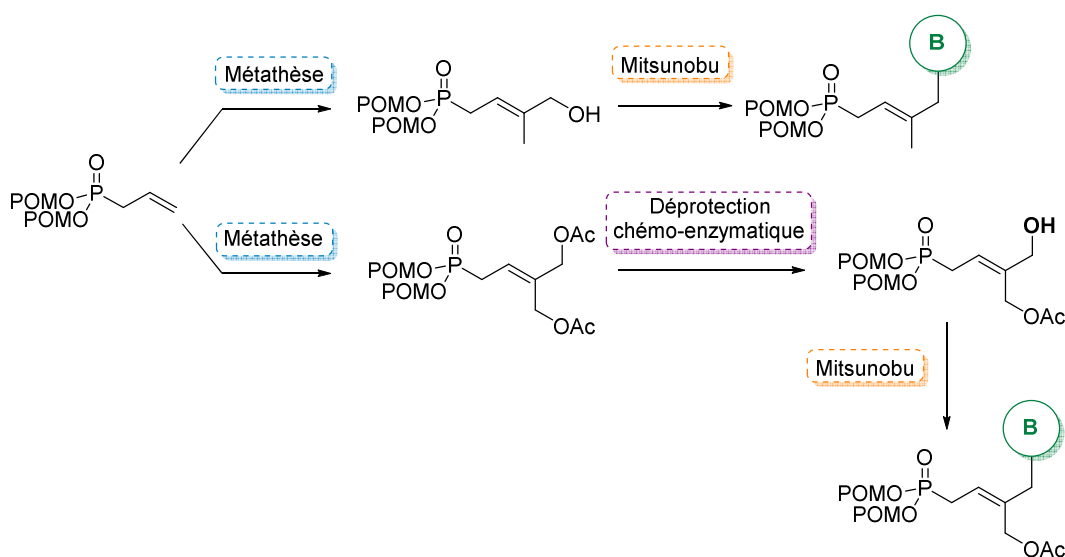


Schéma 47. Schéma global d'obtention des différents ANPs

Ces composés présentent des activités antivirales avec un IC_{50} de l'ordre du micromolaire sur divers virus à ADN. Ces actions ne justifient toutefois pas une extension méthodologique avec d'autres nucléobases dans le but d'accroître ces différentes activités.

En revanche, l'ANP comportant l'hétérocycle 2-amino-6-chloropurine en série 2'-acétoxyméthyle présente un potentiel thérapeutique intéressant avec des activités submicromolaires sur le VZV. Si le SI n'est pas optimal, il serait d'intérêt de synthétiser quelques composés avec des motifs puriques plus intéressants.

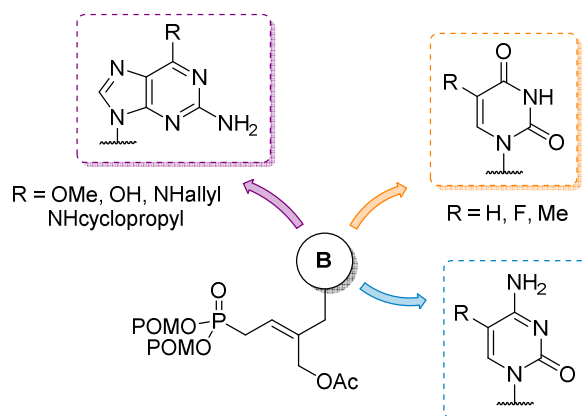


Figure 30. Exemplification et diversification des bases nucléiques introduites

Ces travaux sont actuellement poursuivis au laboratoire par l'introduction de bases nucléiques alternatives dans les conditions de Mitsunobu. En effet, les meilleurs résultats obtenus dans les séries d'ANPs produites précédemment l'ont été avec des pyrimidines ou des purines substituées en C⁶ par des groupements méthoxy ou aminés.

Pour justifier de la toxicité, et pour mieux comprendre le mécanisme de ces molécules *in vitro* comme *in vivo*, il serait nécessaire de synthétiser les molécules diphosphate-phosphonates. Leurs interactions avec la polymérase virale montreraient plus clairement si cette enzyme est réellement celle visée par nos ANPs, et pourrait aussi indiquer quelle est l'étape limitante freinant les capacités thérapeutiques des composés synthétisés.

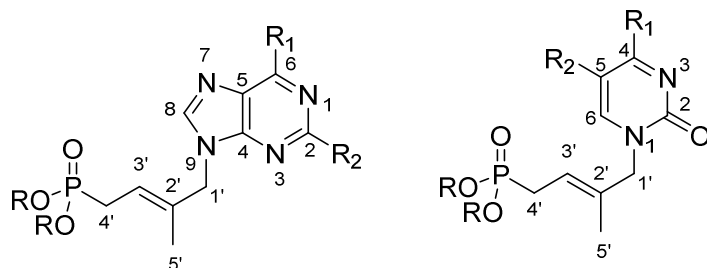
La toxicité pouvant aussi être due aux produits de dégradation des groupements *bis*(POM) *in vivo*, il serait intéressant d'introduire d'autres prodrogues (par exemple phosphonoamidates), dont les sous produits seraient moins toxiques.

EXPERIMENTAL PART

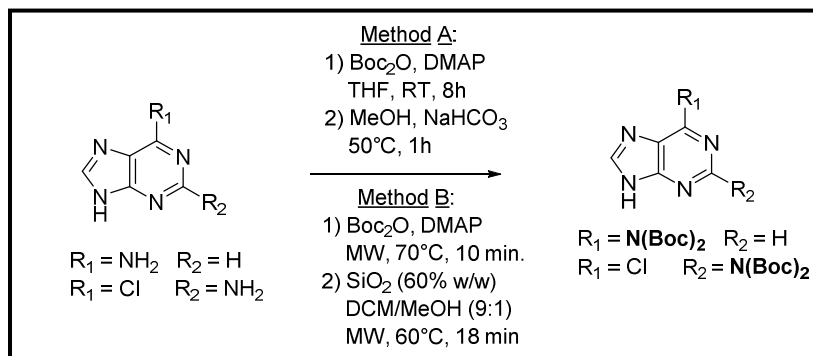
GENERAL

Commercially available chemicals were of reagent grade and used as received. All reactions requiring anhydrous conditions were carried out using oven-dried glassware and under an atmosphere of dry Ar or N₂. Microwave reactions were carried out in a Biotage Initiator apparatus. The reactions under ultrasound were carried out with Elmasonic P30H apparatus with a frequency of 80 kHz and effective power of 100 W. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis using silica gel precoated plates (Kieselgel 60F254, E. Merck). Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with phosphomolybdic acid (PMA) stain, potassium permanganate solution or ninhydrin stain, followed by charring at around 150°C. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 M (0.040-0.063 mm, E. Merck). Melting points were determined with a Kofler Heizbank Reichert Type 7841 apparatus and are uncorrected. The infrared spectra were measured with Perkin–Elmer Spectrometer. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 250 or Bruker Avance 400 Spectrometers. Chemical shifts are given in ppm and are referenced to the deuterated solvent signal or to TMS as internal standard and multiplicities are reported as s (singlet), d(doublet), t (triplet), q (quartet) and m (multiplet). Carbon multiplicities were assigned by distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiments. ¹H and ¹³C signals were attributed on the basis of H–H and H–C correlations. High Resolution Mass spectra were performed on a Bruker Q-TOF MaXis spectrometer by the “Fédération de Recherche” ICOA/CBM (FR2708) platform.

Numérotation des ANP



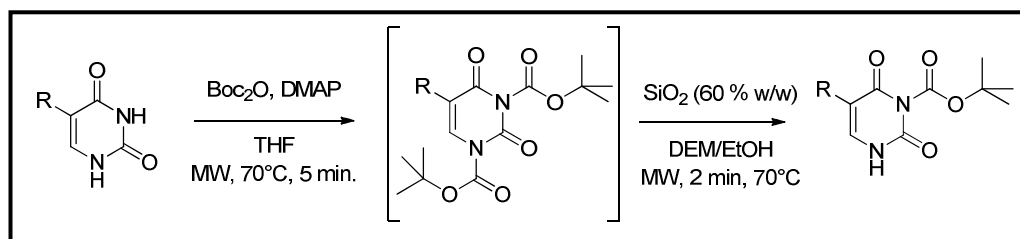
GENERAL PROCEDURE 1



Method A: To a solution of purine (10 mmol) in THF (100 mL) DMAP (10 mol%) and Boc_2O (4 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred under argon atmosphere for 8 h at room temperature. The THF excess was removed by rotary evaporation to give a yellow oil. *Tris*-boc purine (10.0 mmol, unpurified) was dissolved in 400 mL of EtOAc and washed with 1 N aq HCl (30 mL) followed by brine (3 x 100 mL). The EtOAc layer was dried over MgSO_4 and evaporated to give a colorless oil. This crude was dissolved in 100 mL of MeOH, to which 45 mL of saturated solution NaHCO_3 was added. The turbid solution was stirred at 50°C for 1 h. After evaporation of MeOH under reduced pressure, 100 mL of water was added to the suspension and the aqueous layer was extracted with CHCl_3 (2x 300 mL). The organic layers were dried over MgSO_4 , filtered, and evaporated to give a *bis*-Boc purine as a white solid.

Method B: A 10-20 mL vial was charged with purine base (3 mmol), DMAP (0.35 equiv.) and Boc_2O (4 equiv.) in THF (20mL). The vial was sealed and the solution was stirred under microwave irradiation for 10 min at 70°C . The volatiles were then removed *in vacuum*, and the obtained mixture was dissolved in dichloromethan (18 mL) and methanol (2 mL). To this solution SiO_2 (60% w/w from starting purine compound) was added, followed by the irradiation of this compound under microwaves for 18 min at 60°C . The solvents were evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to afford desired compounds as white solids.

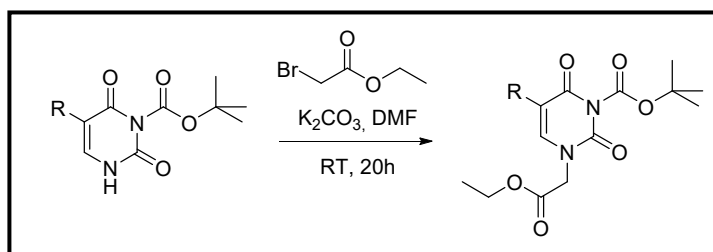
GENERAL PROCEDURE 2



To a solution of C^5 -substituted uracil (300 mg) in THF (20 mL) Boc_2O (3 eq.) and DMAP (0.35 eq.) were added. After microwave irradiation at 70°C for 5 minutes, the solution was evaporated under reduced pressure and the N^1,N^3 -bis-boc-uracil was used in the next step without further purification. The crude was then diluted in 5 mL of DEM/EtOH (9/1) with SiO_2 (60% w/w), and activated under microwave irradiation

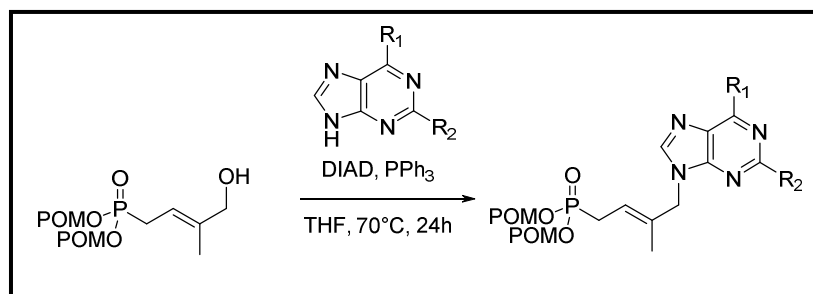
(MW, 70°C, 2 min). After evaporation of all the volatiles, the resulting *N*³-substituted uracil was purified by flash chromatography (ethyl acetate) to afford pure products as white solids.

GENERAL PROCEDURE 3



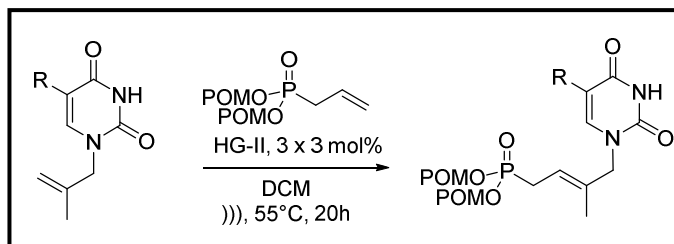
To a DMF (2 mL) solution of the substituted protected uracil (1 eq.) ethyl bromoacetate (1 eq.) and K_2CO_3 (1 eq.) were added. The solution was stirred 20h at room temperature, and afterwards dissolved in 10 mL of EtOAc and 10 mL of NH_4Cl . The aqueous layer was extracted 3 times with 10 mL of EtOAc, and the organic layers were washed with H_2O (5 x 10 mL), and brine (10 mL). These were then dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduced pressure to afford pure products as colorless oils.

GENERAL PROCEDURE 4



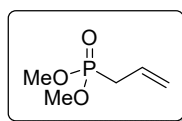
To a solution of *bis*-POM hydroxyl synthon (1 equiv.) in THF (0.1 M), nucleic base (1 equiv.) and PPh_3 (2.1 equiv.) were sequentially added. Then DIAD (2.1 equiv.) was added dropwise at 0 °C. After 6h at reflux, the second portion of *bis*-POM hydroxylphosphonate (1 equiv.), PPh_3 (2.1 equiv.) and DIAD (2.1 equiv.) were added one after another. The mixture was then refluxed during 12h. After evaporation of all volatiles, residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH) to give desired coupling product.

GENERAL PROCEDURE 5



To a solution of *bis*(POM) allylphosphonate (150 mg) and *N*¹-alkylated-C⁵-substituted uracil (2.0 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (5 mL, 0.1 M) Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst (9 mol%) was added. The catalyst was added in three equal portions of 3 mol% at *t* = 0, 2, 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at 55 °C (80 kHz, 100 W) under a gentle nitrogen flow for 20 h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/Petroleum ether, 5:5) to give the desired *bis*-POM phosphonate derivatives as a colorless oil.

Dimethyl allylphosphonate (89)



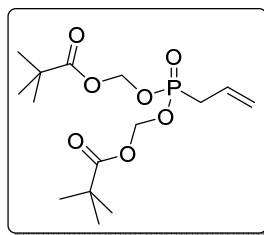
Chemical Formula: C₅H₁₁O₃P
Molecular Weight: 150,11

Under inert atmosphere, allyl bromide (51 mL, 1.25 eq., 0.57 mol) was dissolved in THF (400 mL). To this mixture potassium carbonate (94 g, 1.5 eq., 0.68 mol), *tert*-butylammonium bromide (2.9 g, 2 mol%, 9.1 mmol) and finally dimethylphosphite (41.2 mL, 1 eq., 0.45 mol) were added. The resulting solution was stirred for 36 hours at room temperature, followed by the filtration of all solids present in the flask. The filtrate was then evaporated under reduced pressure, and the crude product was then distilled at 130°C under 40 mm/Hg. After collection of the different fractions, the clean product was obtained as a colorless liquid. (53 g, 75%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.80 (m, 1H, CH=CH₂), 5.23 (m, 2H, CH₂=CH), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.62 (ddt, *J* = 22.0, 7.4, 1.3 Hz, 2H, CH₂-P).

CAS : 757-54-0

bis(POM) allylphosphonate (83)



Chemical Formula: C₁₅H₂₇O₇P
Molecular Weight: 350,35

Method A:

In a microwave vial under argon atmosphere, dimethyl allylphosphonate (1.5 g, 1 eq., 9.98 mmol), sodium iodide (9.1 g, 6 eq., 59.9 mmol) and chloromethyl pivalate (4.37 mL, 3 eq., 29.95 mmol) were solubilized in anhydrous acetonitrile (15 mL). The vial was sealed, and the resulting solution was irradiated at 100°C during 2h under microwave. The crude product was diluted with Et₂O (50 mL), washed with water (10 mL), with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Further purification of the product on silica column using PE/EtOAc 8:2 to 7:3 as eluent yielded **83** (1.71 g, 49%) as a colorless oil.

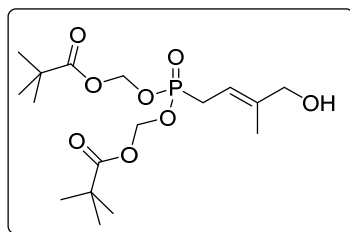
Method B:

Under inert atmosphere, dimethyl allylphosphonate (4.78 mL, 1 eq, 33.31 mmol), sodium iodide (9.99 g, 2 eq., 66.6 mmol) and chloromethyl pivalate (12.1 mL, 2.5 eq., 83.28 mmol) were dissolved in anhydrous acetonitrile (40 mL). The solution was then refluxed at 110°C for 3 days. The crude product was diluted with Et₂O (150 mL), washed with water (30 mL), with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (30 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Further purification of the product on silica column using PE/EtOAc 8:2 to 7:3 as eluent allowed the obtention of **83** (8.38 g, 72%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.67 (m, 5H, O-CH₂-O, CH=CH₂), 5.21 (m, 2H, CH₂=CH), 2.67 (ddt, *J* = 22.7, 7.4, 1.2 Hz, 2H, CH₂-P), 1.20 (s, 18H, CH₃).

CAS : 1258789-63-7

(*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-*bis*(POM)phosphonate (**99**)



Chemical Formula: C₁₇H₃₁O₈P
Molecular Weight: 394,40

To a solution of *bis*(POM) allylphosphonate **83** (300 mg, 0.86 mmol, 2.0 eq.) and 2-methyl-2-propen-1-ol (36 μL, 1.0 eq., 0.43 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) Hoveyda-Grubbs Catalyst 2nd Generation (40 mg, 15 mol%, 0.064 mmol) was added. The catalyst addition was performed in three equal portions of 5 mol% (13.3 mg, 0.021 mmol) at *t* = 0, 2 and 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at 55 °C under nitrogen atmosphere for 20 h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column

chromatography (EtOAc/PE, 7:3) to give the desired phosphonate derivative **99** as brown oil (161 mg, 95 %).

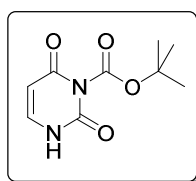
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.77-5.56 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.49 – 5.38 (m, 1H, CH=CH₂), 4.03 (s, 2H, CH₂-OH), 2.70 (dd, *J* = 22.7, 7.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.17 (s, 1H, OH), 1.70 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H, CH₃), 1.24 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 141.2 (d, *J* = 14.8 Hz), 111.8 (d, *J* = 11.7 Hz), 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 67.9 (d, *J* = 3.0 Hz), 38.7, 26.8, 26.7 (d, *J* = 140.2 Hz), 13.9 (d, *J* = 2.6 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 28.4.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₇H₃₂O₈P : 395.1829, found : 395.1828.

***tert*-butyl-2,4-dioxypyrimidine-3-carboxylate (**117**)**



Chemical Formula: C₉H₁₂N₂O₄
Molecular Weight: 212.21

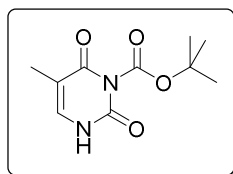
The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white solid. (95 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.12 (s, 1H, NH), 7.20 (dd, *J* = 7.8, 5.6 Hz, 1H, H⁶), 5.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H⁵), 1.60 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160.84, 150.52, 147.52, 139.82, 102.18, 87.15, 27.49.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₃N₂O₄ 213.0876, found 213.0870.

***tert*-butyl-5-methyl-2,4-dioxypyrimidine-3-carboxylate (**118**)**



Chemical Formula: C₁₀H₁₄N₂O₄
Molecular Weight: 226.23

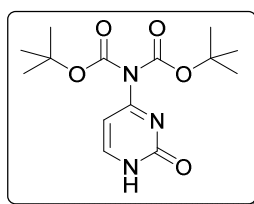
The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white solid. (95 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.12 (s, 1H, NH), 7.06 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H⁶), 1.91 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CH₃), 1.59 (s, 9H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.90, 150.80, 147.91, 136.10, 110.47, 86.97, 27.46, 12.27.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₅N₂O₄ : 227.1033, found 227.1032.

bis-Boc cytosine (120)



Chemical Formula: $C_{14}H_{21}N_3O_5$
Molecular Weight: 311,34

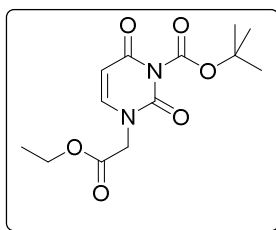
To a THF (20 mL) solution of cytosine (500 mg) Boc_2O (4 eq.) and DMAP (0.35 eq.) were added. After microwave irradiation at 70°C for 7 minutes, the solution was concentrated *in vacuo*. The crude was then diluted in 5 mL of DEM/EtOH (9/1) with SiO_2 (60% w/w), and activated by microwave irradiation (MW, 70°C, 2 min). After the evaporation of all the volatiles, the crude product was purified by flash chromatography (eluting ethyl acetate) to afford **120** as a white solid. (1.38 g, 97%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.01 (s, 1H, NH), 7.68 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H^6), 7.09 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H^5), 1.53 (s, 18H, CH_3 Boc).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.67, 158.46, 149.44, 145.61, 96.72, 84.97, 27.71.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{14}H_{22}N_3O_5$ 312.1560, found 312.1560.

tert-butyl-3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2,6-dioxypyrimidine-1-carboxylate (121)



Chemical Formula: $C_{13}H_{18}N_2O_6$
Molecular Weight: 298,30

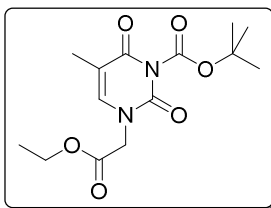
The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product **121** as a colorless oil. (53 %)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^6), 5.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^5), 4.42 (s, 2H, CH_2 -N), 4.22 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2 -O), 1.56 (s, 9H, CH_3 - CH_2), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3 Boc).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 166.94, 160.37, 148.94, 147.41, 143.44, 102.30, 86.95, 62.34, 48.73, 27.43, 13.95.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{19}N_2O_6$ 299.1243, found 299.1244.

***tert*-butyl-3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxypyrimidine-1-carboxylate (122)**



Chemical Formula: C₁₄H₂₀N₂O₆
Molecular Weight: 312,32

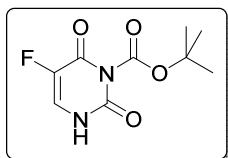
The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product **122** as a colorless oil. (54 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (s, 1H, H⁶), 4.42 (s, 2H, CH₂-N), 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.92 (s, 3H, CH₃ Thymine), 1.58 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.28, 161.49, 148.98, 147.69, 139.54, 110.86, 86.78, 62.21, 48.69, 27.41, 14.06, 12.35.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₁N₂O₆ 313.1400, found 313.1399.

***tert*-butyl-5-fluoro-2,4-dioxypyrimidine-3-carboxylate (124a)**



Chemical Formula: C₉H₁₁FN₂O₄
Molecular Weight: 230,20

The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white solid. (15 %)

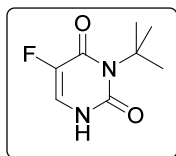
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.32 (s, 1H, NH), 7.10 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H⁶), 1.75 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.39 (d, *J* = 24.0 Hz), 152.43, 140.85 (d, *J* = 232.5 Hz), 120.57 (d, *J* = 32.4 Hz), 63.84, 29.73.

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -164.03 (d, *J* = 3.8 Hz).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂FN₂O₄ 231.0782, found 231.0777.

5-fluoro-3-*tert*-butylpyrimidine-2,4-dione (125a)



Chemical Formula: C₈H₁₁FN₂O₂
Molecular Weight: 186,19

The title compound was a side product generated in the synthesis of compound **124a**, prepared according to the general procedure 2, giving compound **125a** as a white solid. (61 %)

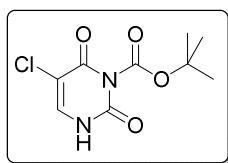
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.32 (s, 1H, NH), 7.10 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H⁶), 1.75 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.39 (d, *J* = 24.0 Hz), 152.43, 140.85 (d, *J* = 232.5 Hz), 120.57 (d, *J* = 32.4 Hz), 63.84, 29.73.

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ -164.03 (d, *J* = 3.8 Hz).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₂FN₂O₂ 187.0884, found 187.0879.

***tert*-butyl-5-chloro-2,4-dioxypyrimidine-3-carboxylate (124b)**



Chemical Formula: C₉H₁₁ClN₂O₄
Molecular Weight: 246,65

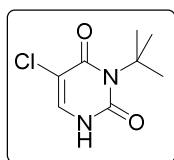
The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white solid. (20 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (s, 1H, H⁶), 1.61 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 156.99, 149.52, 146.52, 136.72, 109.38, 88.02, 27.44.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂ClN₂O₄ 247.0486, found 247.0484.

5-chloro-3-*tert*-butylpyrimidine-2,4-dione (125b)



Chemical Formula: C₈H₁₁ClN₂O₂
Molecular Weight: 202,64

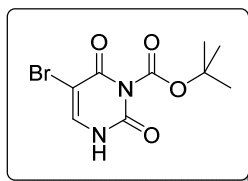
The title compound was a side product generated in the synthesis of compound **125a**, prepared according to the general procedure 2, giving compound **125b** as a white solid. (64 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.00 (s, 1H, NH), 7.29 (s, 1H, H⁶), 1.70 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.08, 152.33, 133.89, 109.83, 63.79, 29.68.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂N₂O₄ 203.0588, found 203.0579.

***tert*-butyl-5-bromo-2,4-dioxypyrimidine-3-carboxylate (**124c**)**



Chemical Formula: C₉H₁₁BrN₂O₄
Molecular Weight: 291,10

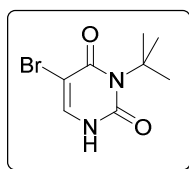
The title compound was prepared according to the general procedure 2, affording after purification the desired product as a white solid. (33 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H, H⁶), 1.63 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 157.10, 149.99, 146.67, 139.76, 96.74, 88.03, 27.44.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂BrN₂O₄ 290.9981, found 290.9975.

5-bromo-3-*tert*-butylpyrimidine-2,4-dione (125c**)**



Chemical Formula: C₈H₁₁BrN₂O₂
Molecular Weight: 247,09

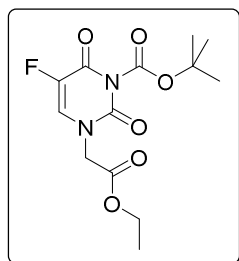
The title compound was a side product generated in the synthesis of compound **124c**, prepared according to the general procedure 2, giving compound **125c** as a white solid. (42 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.24 (s, 1H, NH), 7.45 (s, 1H, H⁶), 1.71 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.17, 153.53, 137.35, 97.85, 63.86, 29.73.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂BrN₂O₄ 247.0083, found 247.0080.

***tert*-butyl-5-fluoro-3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxypyrimidine-1-carboxylate**



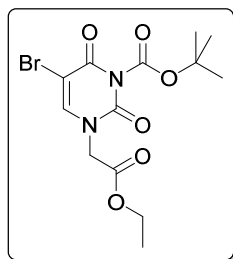
Chemical Formula: C₁₃H₁₇FN₂O₆
Molecular Weight: 316,29

The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a colorless oil. (76 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, H⁶), 4.31 (s, 2H, CH₂-N), 4.23 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.69 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.45, 159.16 (d, *J* = 24.4 Hz), 150.70, 140.21 (d, *J* = 24.4 Hz), 125.01 (d, *J* = 33.4 Hz), 64.10, 62.09, 50.17, 29.66, 14.08.

***tert*-butyl-5-bromo-3-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,6-dioxypyrimidine-1-carboxylate**



Chemical Formula: C₁₃H₁₇BrN₂O₆
Molecular Weight: 377.19

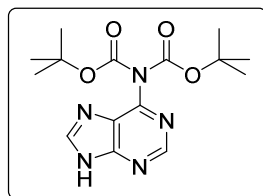
The title compound was prepared according to the general procedure 3, affording after purification the desired product as a colorless oil. (73 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (s, 1H, H⁶), 4.35 (s, 2H, CH₂-N), 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.67 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.32, 160.83, 151.30, 140.64, 97.51, 64.10, 62.14, 50.19, 29.59, 14.08.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₈BrN₂O₆ 377.0349, found 377.0344.

***bis*-Boc-Adenine (129)**



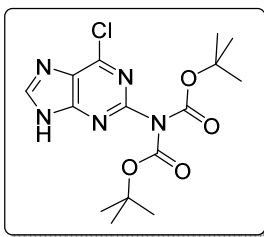
Chemical Formula: C₁₅H₂₁N₅O₄
Molecular Weight: 335.36

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as a white solid. (Method A: 70%, Method B: 85%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H, H²), 8.45 (s, 1H, H⁸), 1.42 (s, 18H, CH₃)

CAS : 309947-86-2

N,N(bis-Boc)-2-amino-6-chloropurine (130)



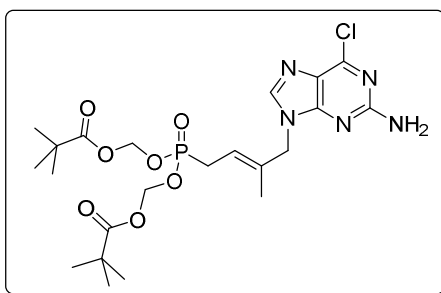
Chemical Formula: $C_{15}H_{20}ClN_5O_4$
Molecular Weight: 369,81

The title compound was prepared according to the general procedure 1, affording after purification the desired product as a white solid. (Method A: 60%, Method B: 58%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.30 (s, 1H, H^8), 1.48 (s, 18H, CH_3)

CAS : 309947-87-3

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)2-amino-6-chloropurine (132)



Chemical Formula: $C_{22}H_{33}ClN_5O_7P$
Molecular Weight: 545,96

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a colorless oil. (60 %)

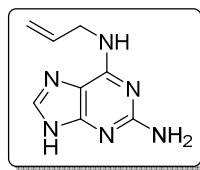
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72 (s, 1H, H^8), 5.63 (m, 4H, O- CH_2 -O), 5.43 (dd, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H, $CH=CH_2$), 5.29 (bs, 2H, NH_2), 4.62 (d, J = 4.5 Hz, 2H, CH_2-N), 2.69 (dd, J = 23.0, 7.8 Hz, 2H, CH_2-P), 1.63 (dd, J = 4.5, 1.5 Hz, 3H, CH_3), 1.20 (s, 18H, CH_3 -POM).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 176.85, 159.23, 153.95, 151.35, 142.14, 135.4 (d, J = 15.2 Hz), 125.11, 117.1 (d, J = 11.6 Hz), 81.6 (d, J = 6.4 Hz), 50.5 (d, J = 3.2 Hz), 38.71, 27.1 (d, J = 140.5 Hz), 26.83, 14.6 (d, J = 2.8 Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 27.0.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{22}H_{34}ClN_5O_7P$: 546.1885, found : 546.1879.

2-amino-6-allylaminopurine (135)



Chemical Formula: $C_8H_{10}N_6$
Molecular Weight: 190,21

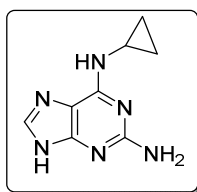
A 2-5 mL vial was charged with 2-amino-6-chloropurine (250 mg, 1 eq., 1.47 mmol), n-butanol (3 mL), allylamine (331 μ L, 3 eq., 4.42 mmol) and distilled triethylamine (617 μ L, 3 eq., 4.42 mmol). After microwave irradiation at 140°C for 40 min, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to afford **135** as a white solid (250 mg, 90%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.06 (s, 1H, NH Ar), 7.65 (s, 1H, H⁸), 7.18 (s, 1H, NH), 5.94 (ddt, J = 17.2, 9.5, 5.1 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.66 (s, 2H, NH₂), 5.15 (d, J = 17.2 Hz, 1H, CH₂=CH), 5.04 (d, J = 9.5 Hz, 1H, CH₂=CH), 4.09 (bs, 2H, CH₂-N).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 160.49, 154.84, 152.78, 136.79, 135.91, 115.18, 113.09, 42.42.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for $C_8H_{11}N_6$: 191.0146, found : 190.0147.

2-amino-6-allylaminopurine (136)



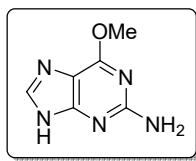
Chemical Formula: $C_8H_{10}N_6$
Molecular Weight: 190,21

A 2-5 mL vial was charged with 2-amino-6-chloropurine (250 mg, 1 eq., 1.47 mmol), n-butanol (3 mL), allylamine (331 μ L, 3 eq., 4.42 mmol) and distilled triethylamine (617 μ L, 3 eq., 4.42 mmol). After microwave irradiation at 110°C for 15 min, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to afford **136** as a white solid (256 mg, 91%).

^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ 7.75 (s, 1H, H⁸), 2.93 (tt, J = 7.2, 3.6 Hz, 2H, CH-CH₂), 0.85 (bs, 2H, CH₂-CH), 0.62 (bs, 2H, CH₂-CH).

CAS : 120503-69-7

2-amino-6-methoxypurine (137)



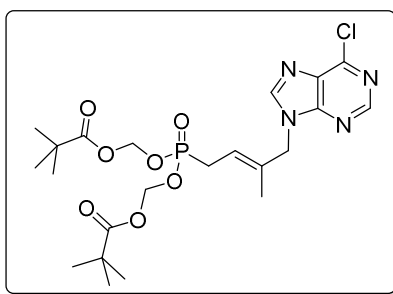
Chemical Formula: C₆H₇N₅O
Molecular Weight: 165,16

To a 2-5 mL vial a solution of 2-amino-6-chloropurine (250 mg, 1 eq., 1.47 mmol) and NaOH (177 mg, 3 eq., 4.42 mmol) in methanol (3 mL) was loaded. After microwave irradiation at 100°C for 40 min, the volatiles were distilled under reduced pressure and the resulting residue purified afterwards by silica gel chromatography (DCM/MeOH 9:1) to afford **137** as a white solid (215 mg, 97%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s, 1H, H⁸), 4.06 (s, 18H, CH₃)

CAS : 20535-83-5

(*E*)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)6-chloropurine (138)



Chemical Formula: C₂₂H₃₂ClN₄O₇P
Molecular Weight: 530,94

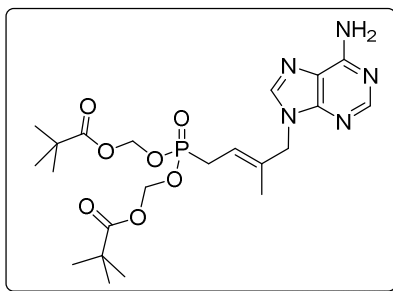
The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a colorless oil. (62 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H, H²), 8.13 (s, 1H, H⁸), 5.79 – 5.57 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.50 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.84 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH₂-N), 2.72 (dd, *J* = 23.0, 7.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.66 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H), 1.21 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.8, 152.1, 152.0, 151.1, 145.1, 135.1 (d, *J* = 15.0 Hz), 131.5, 118.0 (d, *J* = 11.8 Hz), 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 51.0 (d, *J* = 3.0 Hz), 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.6 Hz), 26.8, 14.6 (d, *J* = 2.6 Hz).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₃ClN₄O₇P : 531.1770, found : 531.1770.

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)adenine (139)



Chemical Formula: C₂₂H₃₄N₅O₇P
Molecular Weight: 511,52

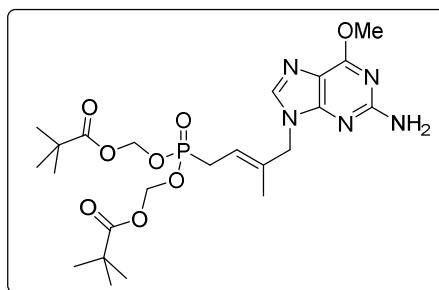
The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a colorless oil. (53 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (s, 1H, H²), 7.83 (s, 1H, H⁸), 6.20 (bs, 2H, NH₂), 5.83 – 5.51 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.43 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.76 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂-N), 2.73 (dd, *J* = 22.9, 7.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.68 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H, CH₃), 1.24 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.8, 152.1, 152.0, 151.1, 145.1, 135.1 (d, *J* = 15.0 Hz), 131.5, 118.0 (d, *J* = 11.8 Hz), 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 51.0 (d, *J* = 3.0 Hz), 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.6 Hz), 26.8, 14.6 (d, *J* = 2.6 Hz).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₅N₅O₇P : 512.2269, found : 512.2263.

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)2-amino-6-methoxypurine (140)



Chemical Formula: C₂₃H₃₆N₅O₈P
Molecular Weight: 541,54

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a colorless oil. (51 %)

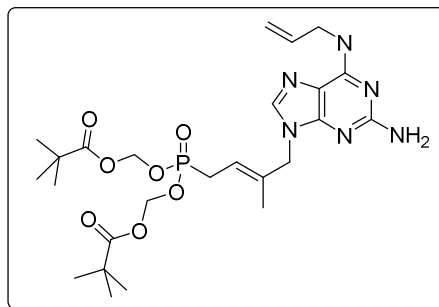
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (s, 1H, H⁸), 5.62 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.88 (s, 2H, NH₂), 4.59 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH₂-N), 4.04 (s, 3H, OMe), 2.66 (dd, *J* = 22.8, 7.5 Hz, 2H, CH₂-P), 1.60 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, CH₃), 1.18 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.84, 161.64, 159.45, 153.99, 139.15, 136.1 (d, *J* = 14.3 Hz), 116.28 (d, *J* = 11.8 Hz), 115.47, 81.68 (d, *J* = 6.5 Hz), 53.86, 50.17, 38.72, 28.19 (d, *J* = 141.8 Hz), 26.84, 14.60 (d, *J* = 2.7 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.3.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₃H₃₇N₅O₈P : 542.2380, found : 542.2372.

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)2-amino-6-allylaminopurine (141)



Chemical Formula: C₂₅H₃₉N₆O₇P
Molecular Weight: 566,60

The title compound was prepared according to the general procedure 4, affording after purification the desired product as a colorless oil. (56 %)

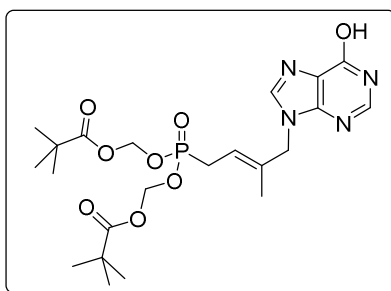
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.64 (s, 1H, H⁸), 5.96 (m, 1H, CH=CH₂), 5.59 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.18 (m, H^{3'}, CH₂=CH), 4.60 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H^{1'}), 4.14 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.76 (dd, *J* = 22.9, 7.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.67 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H, CH₃), 1.18 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 180.62, 164.65, 141.68, 140.77 (d, *J* = 14.9 Hz), 138.69, 136.10, 118.64, 118.31 (d, *J* = 12.4 Hz), 116.97, 107.73, 85.68 (d, *J* = 6.6 Hz), 53.00, 42.25, 33.28, 29.90 (d, *J* = 140.7 Hz), 29.76, 17.38 (d, *J* = 2.7 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.7.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₄₀N₆O₇P : 567.2697, found : 567.2698.

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)hypoxanthine (143)



Chemical Formula: C₂₂H₃₃N₄O₈P
Molecular Weight: 512,50

A solution of compound **138** (72 mg, 0.14 mmol) in a 1:1 mixture of water (2 mL) and formic acid (2 mL) was stirred for 20 min at 80 °C under microwave irradiation. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to give compound **143** as a colorless oil (55 mg, 78 %).

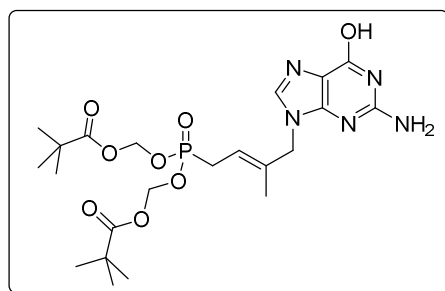
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.10 (s, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, H²), 7.81 (s, 1H, H⁸), 5.75 – 5.60 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.75 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂-N), 2.73 (dd, *J* = 22.9, 7.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.66 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, CH₃), 1.23 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.8, 159.1, 149.3, 145.3, 140.0, 135.7 (d, *J* = 15.0 Hz), 124.4, 117.2 (d, *J* = 11.7 Hz), 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 50.8, 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.6 Hz), 26.8, 14.6 (d, *J* = 2.6 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.2.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₄N₄O₈P : 513.2109, found : 513.2111.

(*E*)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)guanine (144)



Chemical Formula: C₂₂H₃₄N₅O₈P
Molecular Weight: 527,51

To a solution of formic acid (1.5 mL) and water (1.5 mL) the compound **132** (50 mg, 0.10 mmol) was added. The mixture was irradiated at 80°C during 20 min under microwave irradiation. After evaporation of the volatiles in vacuo, the residue was purified by silica gel column chromatography to afford **144** as a white solid (41 mg, 79 %).

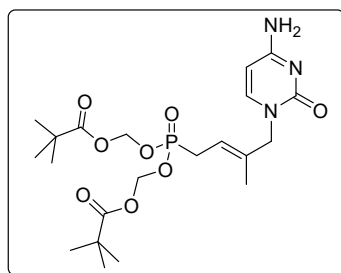
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.68 (s, 1H, H⁸), 5.63 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.27 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.62 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH₂-N), 2.80 (dd, *J* = 22.9, 7.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, CH₃), 1.21 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.7, 158.0, 153.9, 151.9, 138.2, 136.7 (d, *J* = 14.9 Hz), 116.1, 115.9 (d, *J* = 12.3 Hz), 81.8 (d, *J* = 6.7 Hz), 49.4, 38.3, 25.9 (d, *J* = 139.8 Hz), 25.8, 13.4 (d, *J* = 2.8 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.5.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₅N₅O₈P : 528.2223, found : 528.2224.

(*E*)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)cytosine (146)



Chemical Formula: C₂₁H₃₄N₃O₈P
Molecular Weight: 487,49

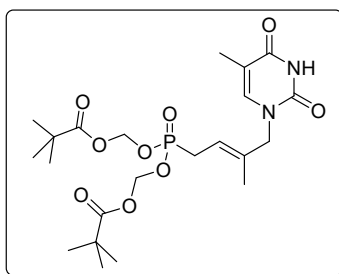
Following the general procedure 3, the crude product was submitted to a deprotection step, using a 1:2 mixture of trifluoroacetic acid/dichloromethane for 2h at room temperature. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 96:4) to afford **146** as a white solid (42% / 2 steps).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H⁶), 5.82 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H⁵), 5.67 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.36 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.38 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂-N), 2.72 (dd, *J* = 22.7, 7.6 Hz, 2H, CH₂-P), 1.66 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H, CH₃), 1.24 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 165.5, 156.5, 144.6, 136.8 (d, *J* = 14.9 Hz), 116.3 (d, *J* = 11.7 Hz), 94.66, 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 55.00, 38.74, 27.1 (d, *J* = 140.2 Hz), 26.87, 26.39, 14.5 (d, *J* = 2.6 Hz).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₅N₃O₈P : 488.2162, found : 488.2157.

(*E*)-N¹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)thymine (147)



Chemical Formula: C₂₂H₃₅N₂O₉P
Molecular Weight: 502.50

The title compound was obtained from **83** following the general procedure 5 giving the product as a colorless oil (35%).

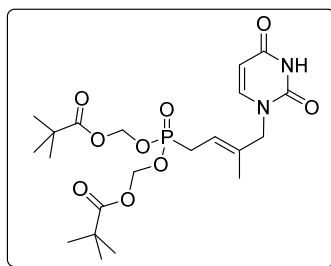
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 1H, NH), 6.97 (d, *J* = 1.2 Hz, H⁶), 5.71 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.43 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, H^{3'}), 4.30 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H^{1'}), 2.74 (dd, *J* = 22.9, 7.7 Hz, H^{4'}), 1.94 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CH₃-Ar), 1.65 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, CH₂-P), 1.25 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.8, 163.8, 150.9, 139.0, 135.9 (d, *J* = 15.0 Hz), 117.2 (d, *J* = 11.6 Hz), 111.2, 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 53.7, 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.6 Hz), 26.9, 14.31 (d, *J* = 2.5 Hz), 12.3.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.1.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₆N₂O₉P : 503.2153, found : 503.2150.

(*E*)-N¹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)uracil (148)



Chemical Formula: C₂₁H₃₃N₂O₉P
Molecular Weight: 488.47

The title compound was obtained from **83** following the general procedure 5 yielding the desired product as a colorless oil (27%)

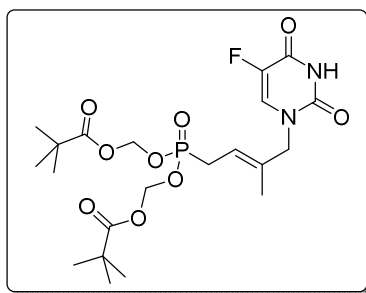
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (s, 1H, NH), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H⁶), 5.77 (dd, *J* = 7.9, 2.4 Hz, H⁵), 5.68 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.44 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H^{3'}), 4.33 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, H^{1'}), 2.75 (dd, *J* = 22.9, 7.7 Hz, 2H, CH₂-P), 1.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, CH₃), 1.26 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 162.9, 150.7, 143.1, 135.5 (d, *J* = 15.2 Hz), 117.8 (d, *J* = 11.9 Hz), 102.7, 81.6 (d, *J* = 6.5 Hz), 54.0, 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.4 Hz), 26.9, 14.3.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.1.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₄N₂O₉P : 489.1996, found : 489.1994.

(*E*)-*N*¹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-methyl-but-2-enyl)-5-fluorouracil (149)



Chemical Formula: C₂₁H₃₂FN₂O₉P
Molecular Weight: 506.46

The title compound was obtained from **83** following the general procedure 5 giving the product as a colorless oil (39%).

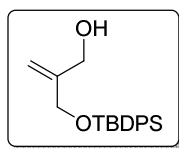
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.52 (s, 1H, NH), 7.27 (s, 1H, H⁶), 5.77-5.58 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H^{3'}), 4.31 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, H^{1'}), 2.75 (dd, *J* = 23.0, 7.7 Hz, 2H, CH₂-P), 1.68 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, CH₃), 1.24 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 157.0 (d, *J* = 26.4 Hz), 149.7, 140.69 (d, *J* = 238.6 Hz), 135.2 (d, *J* = 14.9 Hz), 127.1 (d, *J* = 32.6 Hz), 118.5 (d, *J* = 11.8 Hz), 81.6, (d, *J* = 6.5 Hz), 54.3, 38.7, 27.1 (d, *J* = 140.5 Hz), 26.8, 14.3 (d, *J* = 2.6 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.0.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₃FN₂O₉P : 507.1902, found : 507.1902.

2-(((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)methyl)prop-2-en-1-ol (155)



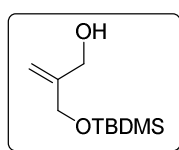
Chemical Formula: C₂₀H₂₆O₂Si
Molecular Weight: 326.51

2-methylenepropane-1,3-diol (2 g, 1 eq., 34.1 mmol) was dissolved in THF (200 mL) and cooled to 0°C, followed by the slow addition of NaH (1.40 g, 1 eq., 34.1 mmol). After 1h, TBDPSCI (6.24 g, 1 eq., 34.1 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 16 h. The solution was then cooled to 0 °C, quenched with cold water and then extracted with diethyl ether (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of Na₂CO₃ (50 mL), brine (50 mL) and dried over MgSO₄. After evaporation of all volatiles, the desired compound **155** was obtained after silica gel column chromatography eluting PE/EtOAc 8:2, as a colorless oil. (6.89 g, 93 %)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (m, 4H, H^{Ar}), 7.40 (m, 6H, H^{Ar}), 5.13 (m, 2H, CH=C), 4.26 (s, 2H, CH₂-OSi), 4.18 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.78 (bs, 1H, OH), 1.07 (s, 9H, CH₃).

CAS : 177606-51-8

2-(((*tert*-Butyldiméthylsilyl)oxy)methyl)prop-2-en-1-ol (156)



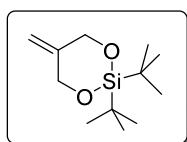
Chemical Formula: C₁₀H₂₂O₂Si
Molecular Weight: 202,37

2-methylenepropane-1,3-diol (1 g, 1 eq., 11.3 mmol) was dissolved in THF (100 mL) and cooled to 0°C, followed by the slow addition of NaH (452 mg, 1 eq., 11.3 mmol). After 1 h, TBDMSCl (1.7 g, 1 eq., 11.3 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 16h. The solution was then cooled to 0 °C, quenched with cold water then extracted with diethyl ether (2 x 30 mL). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO₃ (30 mL), brine (30 mL) and dried over MgSO₄. After evaporation of all volatiles, the desired compound **156** was obtained after silica gel column chromatography eluting PE/EtOAc 8:2, as a colorless oil. (2.10 g, 91%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.06 (m, 2H, CH₂=C), 4.22 (s, 2H, CH₂-OSi), 4.14 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂-OH), 1.91 (bs, 1H, OH), 0.88 (s, 9H, CH₃ tBu), 0.06 (s, 6H, CH₃).

CAS : 116700-73-3

2,2-di-*tert*-butyl-5-methylene-1,3,2-dioxasilinane (157)

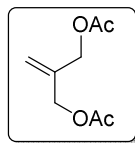


Chemical Formula: C₁₂H₂₄O₂Si
Molecular Weight: 228,40

To a solution of 2-methylenepropan-1,3-diol (300 mg, 1 eq., 3.40 mmol) in acetonitrile (10 mL) at 0°C lutidine (1.18 mL, 3 eq., 10.21 mmol) and tBu₂Si(OTf)₂ (1.33 mL, 1.2 eq., 4.08 mmol) were added. After 3h stirring at room temperature, the volatiles were then removed *in vacuo*, and the residue was purified by flash column chromatography (PE / EtOAc 8:2) affording desired product **157** as a white solid. (739 mg, 95%)

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 4.97 (s, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.53 (s, 4H, CH_2), 1.01 (s, 18H, CH_3).

1,3-diacetoxy-2-methylenepropane (158)



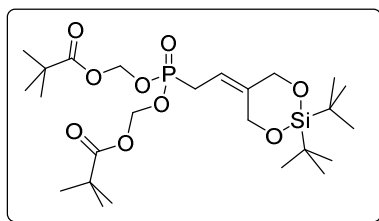
Chemical Formula: $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$
Molecular Weight: 172.18

To a solution of 2-methylenepropan-1,3-diol (3.48 g, 1 eq., 39.5 mmol) in DCM (17 mL) vinyl acetate (7.61 g, 2 eq., 79.0 mmol) and *Candida antarctica* lipase B (CAL-B, 10 % w/w, 348 mg) were sequentially added. The solution was stirred at room temperature for 16 hours, followed by the removal of all solids by simple filtration. The filtrate was concentrated by rotary evaporation, and the crude product was filtrated on a layer of silica gel, to afford the desired compound **158** as a colorless oil (6.80 g, quant.).

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 5.25 (s, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.57 (s, 4H, CH_2), 2.06 (s, 6H, CH_3).

CAS : 3775-29-9

bis(POM)-(3,4-ditert-butyl-dioxasilinane)-but-2'-enyl-phosphonate (161)



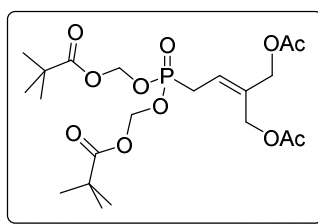
Chemical Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{PSi}$
Molecular Weight: 550.70

To a solution of *bis*(POM) allylphosphonate (307 mg, 2.0 eq., 0.88 mmol) and compound **157** (100 mg, 1.0 eq., 0.44 mmol) in dry CH_2Cl_2 (4 mL), Nolan-Grubbs Catalyst 2nd Generation (36 mg, 6 mol%, 0.039 mmol) was added. This addition was performed in three equal portions of 2 mol% (12 mg, 0.013 mmol) at $t = 0, 2$ and 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at 55°C under nitrogen atmosphere for 20 h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/PE, 7:3) to give the desired phosphonate derivative **161** as a colorless oil (148 mg, 61 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.66 (m, 5H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$, $\text{CH}=\text{C}^{\text{quat}}$), 4.62 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, CH_2-OSi), 4.42 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, CH_2-OSi), 2.81 (dd, $J = 22.8, 7.5$ Hz, 2H, CH_2-P), 1.18 (s, 18H, CH_3 POM), 1.16 (s, 18H, CH_3 -C-Si).

HRMS-ESI (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{PSi}$ 551.2805, found 551.2794.

***bis*(POM)-4-acetoxy-3-(acetoxymethyl)-but-2'-enyl-phosphonate (162)**



Chemical Formula: $C_{21}H_{35}O_{11}P$
Molecular Weight: 494,47

Method A:

To a solution of *bis*(POM) allylphosphonate (3.81 g, 2.0 eq., 10.9 mmol) and compound **158** (937 mg, 1.0 eq., 5.45 mmol) in dry CH_2Cl_2 (50 mL), Nolan-Grubbs Catalyst 2nd Generation (1.0 g, 10 mol%, 0.55 mmol) was added. This was performed in three equal portions of 3.3 mol% (166 mg, 0.18 mmol) at $t = 0, 2$ and 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at $55^\circ C$ under nitrogen atmosphere during 20h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/PE, 7:3) to give the desired phosphonate derivative **162** as a colorless oil (1.96 g, 73 %).

Method B:

Under inert atmosphere, compound **90** (1.80 g, 1 eq., 6.13 mmol), sodium iodide (1.84 g, 2 eq., 12.26 mmol) and chloromethyl pivalate (2.22 mL, 2.5 eq., 15.32 mmol) were dissolved in anhydrous acetonitrile (7 mL). The solution was then refluxed at $110^\circ C$ for 2 days. The crude product was diluted with Et_2O (60 mL), washed with water (12 mL), with an aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (12 mL), dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated under vacuum at cold temperature. Further purification of the product on silica column using DCM/MeOH 97:3 as eluent allowed the production of **162** (2.20 g, 73%) as a colorless oil.

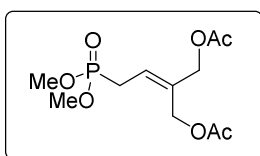
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.63 (m, 5H, O- CH_2 -O, $CH=C$), 4.62 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, CH_2 -OAc), 4.56 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H, CH_2 -OAc), 2.83 (dd, $J = 23.2, 7.9$ Hz, 2H, CH_2 -P), 2.04 (s, 3H, CH_3 Ac), 2.03 (s, 3H, CH_3 Ac), 1.21 (s, 18H, CH_3 POM).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 176.8, 170.6, 170.5, 134.7 (d, $J = 14.3$ Hz), 121.6 (d, $J = 11.0$ Hz), 81.5 (d, $J = 6.6$ Hz), 65.6 (d, $J = 2.2$ Hz), 59.2 (d, $J = 1.9$ Hz), 38.7, 26.9 (d, $J = 140.3$ Hz), 26.8, 20.7, 20.6.

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 26.52.

HRMS-ESI (m/z) : $[M+H]^+$ calcd for $C_{21}H_{36}O_{11}P$ 495.1990, found 495.1990.

***bis*(OMe)-4-acetoxy-3-(acetoxymethyl)-but-2'-enyl-phosphonate (90)**



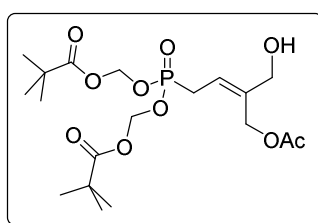
Chemical Formula: $C_{11}H_{19}O_7P$
Molecular Weight: 294,24

To a solution of *bis*(OMe) allylphosphonate (500 mg, 1.0 eq., 3.33 mmol) and compound **158** (1.15 g, 2.0 eq., 6.66 mmol) in dry CH₂Cl₂ (33 mL), Nolan-Grubbs Catalyst 2nd Generation (366 mg, 12 mol%, 0.39 mmol) was added. This addition was performed in three equal portions of 4 mol% (122 mg, 0.13 mmol) at t = 0, 2 and 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at 55 °C under nitrogen atmosphere for 20 h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/PE, 7:3) to give the desired phosphonate derivative **90** as light brown oil (861 mg, 88 %).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.66 (dt, *J* = 7.5, 7.0 Hz, 1H, CH=C), 4.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂-OAc), 4.57 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, CH₂-OAc), 3.74 (s, 3H, OMe), 3.70 (s, 3H, OMe), 2.75 (dd, *J* = 22.7, 8.1 Hz, 2H, CH₂-P), 2.04 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.03 (s, 3H, CH₃ Ac).

CAS : 1450880-20-2

***bis*(POM)-4-acetoxy-3-(hydroxymethyl)-but-2'-enyl-phosphonate (164)**



Chemical Formula: C₁₉H₃₃O₁₀P
Molecular Weight: 452.44

In a flask charged with compound **162** (1 g, 1 eq., 2.02 mmol) phosphate buffer (20 mL, 0.1 M, pH = 7.0) and *Candida antarctica* lipase B (CAL-B, 50% w/w, 500 mg) were added. The resulting mixture was stirred for 24h at room temperature, then filtered and the recovered solids were washed with EtOAc (3 x 30 mL). The organic layers were afterwards collected, dried over magnesium sulfate and all the volatiles were removed by rotary evaporation. The residue was purified on a silica gel column, allowing the obtention of compound **164** as a colorless oil. (510 mg, 57%). This compound was stored at -20°C in the dark, in order to prevent any racemization.

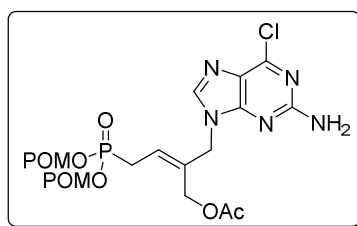
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.66 (m, 5H, O-CH₂-O, CH=C^{quat}), 4.67 (s, 2H, CH₂-OAc), 4.12 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂-OH), 2.83 (dd, *J* = 23.1, 8.1 Hz, 2H, CH₂-P), 2.56 (bs, 1H, OH), 2.05 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.23 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 170.9, 139.7 (d, *J* = 14.6 Hz), 118.7 (d, *J* = 11.6 Hz), 81.6 (d, *J* = 6.4 Hz), 64.9 (d, *J* = 2.6 Hz), 59.6 (d, *J* = 2.1 Hz), 38.7, 26.9 (d, *J* = 140.4 Hz), 26.8, 20.8.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.06.

HRMS-ESI (*m/z*) : [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₃₄O₁₀P 453.1884, found 453.1880.

(E)-N⁹-(4'-bis(POM)-phosphinyl-2'-acetyloxymethyl-but-2-enyl)2-amino-6-chloropurine (165)



Chemical Formula: C₂₄H₃₅ClN₅O₉P
Molecular Weight: 603.99

To a solution of *bis*-POM hydroxyl synthon **83** (38 mg, 1 eq., 0.084 mmol) in THF (3 mL), 2-amino-6-chloropurine (13 mg, 1 eq., 0.084 mmol) and PPh₃ (46 mg, 2.1 eq., 0.17 mmol) were sequentially added. Then, DIAD (34 μ L, 2.1 eq., 0.17 mmol) was added dropwise at 0 °C. After 6h at reflux, the second portion of *bis*-POM hydroxylphosphonate (38 mg, 1 eq., 0.084 mmol), PPh₃ (46 mg, 2.1 eq., 0.17 mmol) and DIAD (34 μ L, 2.1 eq., 0.17 mmol) were subsequently added. The mixture was then refluxed during 36h. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to give desired coupling product **165**. (20 mg, 51%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (s, 1H, H⁸), 5.76 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{3'}), 5.61 (2 x s, 4H, O-CH₂-O), 5.25 (bs, 2H, NH₂), 4.73 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, CH₂-OAc), 4.57 (s, 2H, CH₂-N), 2.85 (dd, *J* = 23.8, 8.5 Hz, 2H, CH₂-P), 1.99 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.21 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.9, 170.4, 159.20, 153.93, 151.39, 142.21, 139.8 (d, *J* = 14.9 Hz), 125.19, 123.7 (d, *J* = 11.8 Hz), 81.7 (d, *J* = 6.2 Hz), 59.6 (d, *J* = 2.1 Hz), 47.6 (d, *J* = 2.5 Hz), 38.7, 27.2 (d, *J* = 140.8 Hz), 26.8, 20.6.

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.60.

HRMS-ESI (*m/z*) : [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₆ClN₅O₉P 604.1940, found 604.1933.

III. Conception et synthèse de *trans*-but-2'-ényles O-nucléoside phosphonates

1 Etat de l'art

En marge des pyrimidines et purines canoniques, d'autres hétérocycles se démarquent par un fort potentiel thérapeutique. C'est notamment le cas du motif 2,4-diaminopyrimidine, qui est un motif récurrent dans un certain nombre de molécules possédant un effet antiviral ou anticancéreux marqué.

➤ Les diaminopyrimidines nucléosides

Ces molécules constituent une nouvelle classe d'acyclonucléosides phosphonates, où cette pyrimidine substituée est liée à la chaîne acyclique par un pont oxygène. Elle diffère donc des bases nucléiques classiques, où l'alkyle est lié sur le N¹ d'une pyrimidine ou sur le N⁹ d'une purine. Néanmoins, cette base s'avère être un excellent mime des diaminopurines, métabolisables en guanines *in cellulo* (Figure 31).

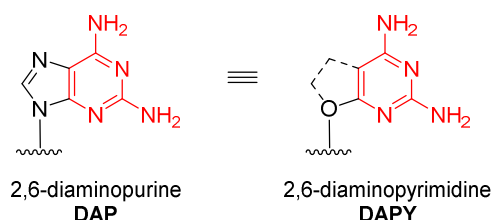


Figure 31. Analogie structurale entre les DAP et les DAPy

Holy *et coll.* se sont donc tourné vers l'insertion de ce nouveau motif sur leurs trois molécules phares, le PMEa, le PMPA et l'HPMPC, en vue d'évaluer l'impact thérapeutique que pourrait avoir ce nouvel hétérocycle sur les propriétés antivirales des ANPs.

- PMEa-DAPy

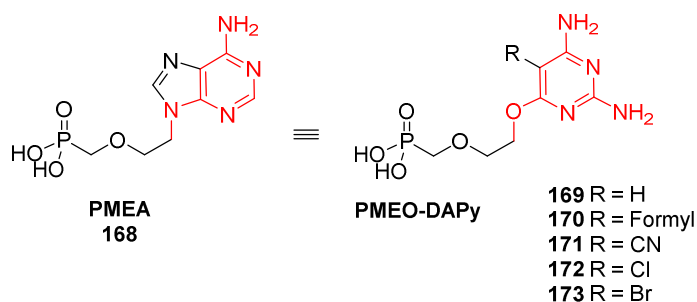


Figure 32. Le PMEa sous sa forme O-DAPy

Une petite série de molécules modifiées sur le C⁵ du DAPy fut synthétisée sur la base du PMEa. Les composés **169** à **173** résultants ont été évalués sur la plupart des virus à ADN et à ARN (Figure 32). Sur le VIH-1, VIH-2 et sur MSV, la variante DAPy du PMEa a montré être 3 à 9 fois plus active que ce dernier (EC₅₀ = 2.9 µg/mL / HIV-1 CEM, EC₅₀ = 0.4 µg/mL / MSV, CC₅₀ = 11 µg/mL). Cette activité est encore renforcée par l'introduction d'un groupement en position C⁵, comme le groupement méthyle. Un constat similaire est tiré du profil anti-

HBV, puisque contrairement au lead originel, sa contrepartie diaminée s'avère très efficace contre cette infection ($EC_{50} = 0.07 \mu\text{g/mL}$). Cette fois ci cependant, la meilleure activité est exercés par le squelette DAPY non substitué, ce qui est aussi le cas pour les infections au VZV, où l'analogue diamino a fini de démontrer un effet antiviral ($EC_{50} \sim 1 \mu\text{g/mL}$).⁹¹

- (R)-PMPO-DAPy

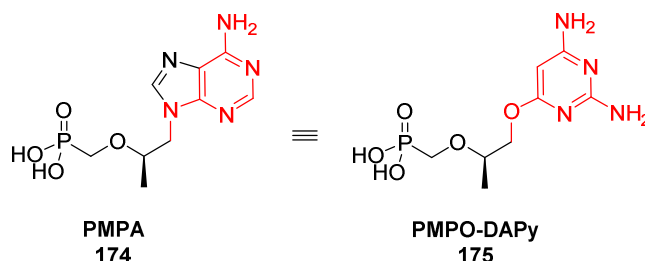


Figure 33. Le PMPA sous sa forme O-DAPY

Le PMPO-DAPy **175** présente des résultats assez concordants avec son analogue adénine dans le cadre de son activité anti-VIH ($EC_{50} \sim 1 \mu\text{g/mL}$, $CC_{50} = 60 \mu\text{g/mL}$), mais présente toutefois une activité plus marquée sur les infections par MSV ($EC_{50} = 0.05 \mu\text{g/mL}$) (Figure 33). Similairement au PMPA, cette molécule montre aussi une action assez intéressante sur HSV, seul virus à ADN sur lequel il a une action significative. En effet, son champ d'action reste assez restreint pour ce type de virus, ne montrant que des activités marginales sur les d'autres virus à herpès comme le VZV ($EC_{50} \sim 6 \mu\text{g/mL}$).⁹²

- HPMPO-DAPY

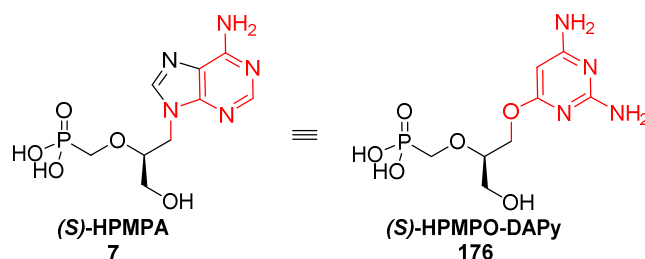


Figure 34. Le HPMPA sous sa forme DAPY

Si le HPMPA commercial est structuellement assez éloigné du HPMPO-DAPy **176**, ce n'est cependant pas le cas du HPMPA **7**. En effet, si cet ANP est approuvé par la FDA sous sa forme cytosine, la potentialité de son analogue adénine n'est pas pour autant inexistante, comme expliqué dans l'introduction. Contrairement aux DAPYs en série PMP ou PME, en version HPMP ces analogues présentent des résultats comparables à HPMPA sur les adéno-, pox-, papilloma- et herpèsvirus ($EC_{50} = 0.6 - 1.6 \mu\text{M}$) (Figure 34). S'ils ne se démarquent pas particulièrement par rapport à la série adénine/cytosine, il est difficile de dire si ces composés peuvent outrepasser le Cidofovir, le Ténofovir ou même l'Adéfovir en terme d'activité *in vivo*, mais ils valident encore une fois l'intérêt de cette charpente acyclique et de sa modulation chimique, et

⁹¹ (a) Hockova, D. Nucleoside Phosphonate Analogues with Antiviral Activity. 5064–5073 (2003). (b) Holý, A. *et al.* 6-[2-(Phosphonomethoxy)alkoxy]pyrimidines with Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **45**, 1918–1929 (2002). (c) De Clercq, E. *et al.* Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-Phosphonomethoxy]alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **24**, 331–341 (2005).

⁹² Balzarini, J. *et al.* Antiretrovirus activity of a novel class of acyclic pyrimidine nucleoside phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2185–93 (2002).

nécessiterait des études plus poussées afin de pouvoir statuer plus clairement sur le potentiel de ces nouveaux noyaux.

2 Rétrosynthèse envisagée

Comme l'activité de cet hétérocycle en tant qu'alternative aux nucléobases canonique provoqua un vif intérêt synthétique et biologique, nous avons naturellement décidé de l'introduire sur notre famille d'ANP oléfinique.

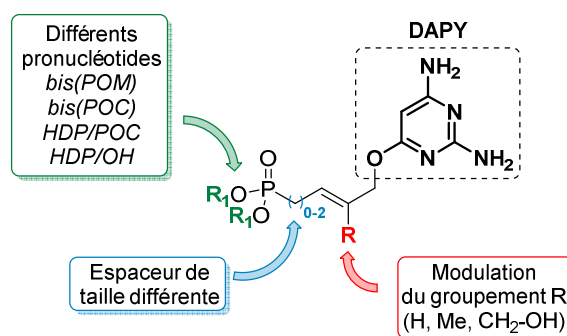


Figure 35. Modèle de molécules à synthétiser

Afin de pouvoir comparer l'efficacité des squelettes synthétisés au laboratoire et pouvoir en tirer des conclusions rationnelles, il est nécessaire de garder les groupements pivaloyloxyméthyles comme groupements biolabiles dans un premier temps (Figure 35). Nous avons modulé notre partie acyclique en faisant varier la longueur de la chaîne insaturée non substituée et évalué l'influence de la ramification de l'alcène de la chaîne à quatre carbones avec des groupements méthyle, hydroxyméthyle.

Pour ce faire, plusieurs schémas de rétrosynthèse sont envisageables en fonction de la taille de l'espaceur.

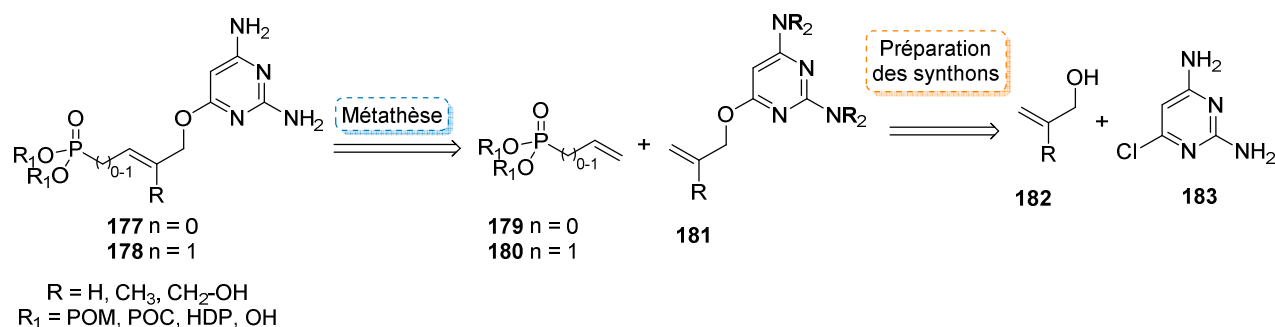


Schéma 48. Rétrosynthèse proposée pour n = 0,1

Dans le cas où n = 0 ou 1, les synthons finaux pourront être issus d'une réaction de métathèse croisée entre la pyrimidine alkylée avec les partenaires phosphonates (Schéma 48). En prévision d'une réactivité difficile, il sera probablement nécessaire de protéger les NH₂ exo des composés **183**, qui seraient susceptibles d'interférer avec le catalyseur empêchant à la conversion. Un des défis synthétiques sera aussi de d'obtenir les pyrimidines d'intérêt **181** à partir du composé **183**.

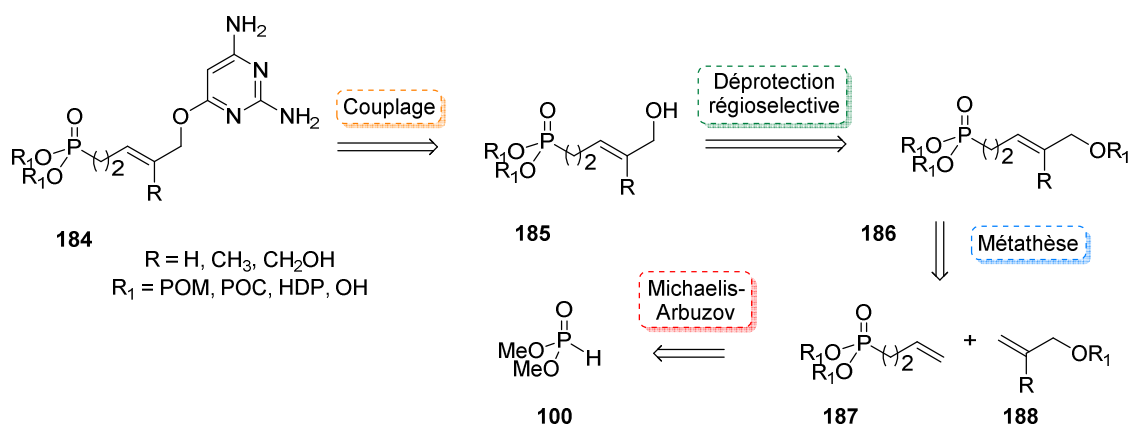


Schéma 49. Rétrosynthèse proposée pour n = 2

Dans le cas où n = 2, afin d'obtenir une chaîne à 5 carbones, une alternative synthétique est envisagée (Schéma 49). Dans la première partie, nous avons optimisé l'obtention d'un synthon similaire au **185**, avec un carbone de moins entre l'atome de phosphore et sa double liaison, dont les essais de réaction de substitution nucléophile pour introduire la base avaient abouti à une réaction d'élimination. Dans ce cas, le CH₂ surnuméraire permettrait une réaction de substitution nucléophile, par déprotonation de l'alcool terminal **185**, suivi de l'attaque sur la chlorodiaminopyrimidine correspondante. Ce précurseur peut être obtenu dans des conditions similaires à celles expérimentées précédemment, c'est à dire une déprotection régiosélective du groupement en position allylique du composé **186** et d'une réaction de métathèse sur les alcènes de départ déjà présentées **187** et **188**.

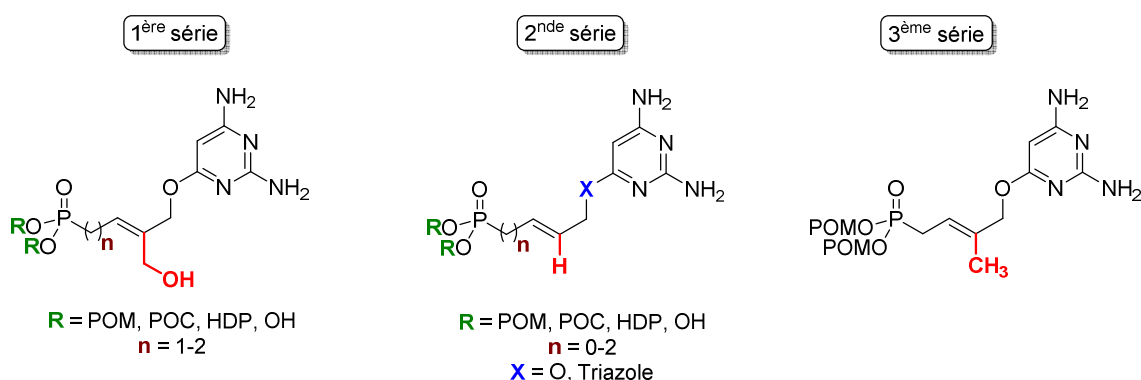


Figure 36. ANPs contenant le motif DAPY

Ces séries ont été développées en parallèle, mais par soucis de clarté, nous présentons trois séries distinctes, basées sur la nature du groupement en position 2' (Figure 36).

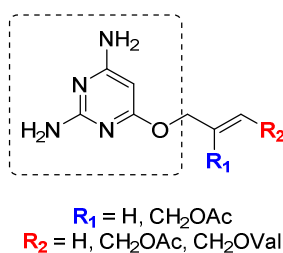


Figure 37. Acyclonucléosides contenant le motif DAPY

Par la suite, nous envisagerons le développement de molécules possédant la diaminopyrimidine comme motif central, afin de synthétiser une petite série d'acyclonucléosides. Plusieurs principe actifs approuvés par la FDA seront adaptés sous leur forme DAPY et oléfinique, comme l'acyclovir, le valacyclovir ou l'entécavir (Figure 37).

3 Résultats et discussions

i. Résultats en série 2'-OAc-alkényle-O-2,6-diaminopyrimidine

➤ Synthèse des diaminopyrimidines de départ

Il est nécessaire de passer par un intermédiaire DAPY fonctionnalisé, l'introduction des groupements sur l'oléfine étant plus difficile à réaliser après la métathèse *via* notre raisonnement synthétique. Comme précédemment, le groupement chimique le plus réactif présent sur la molécule représentée dans la figure 39 sont les groupements hydroxyméthyle et amino. L'optimisation sur la synthèse de ces composés hétérocycliques s'est faite sur les composés possédant les groupements hydroxyméthyle. Les conditions idéales pour cette synthèse seront par la suite adaptés sur avec tous les autres.

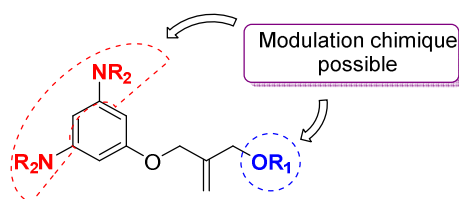


Figure 38. Cible structurale visée

Afin d'avoir un rendement optimal lors de la métathèse, il est nécessaire de coupler le phosphonate avec la diaminopyrimidine native, mono- ou di-protégée (sur les groupements hydroxy ou amino) (Figure 38).

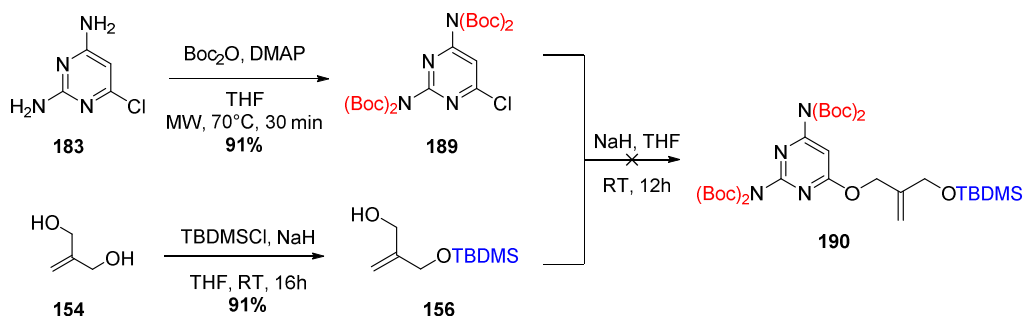


Schéma 50. Essai de couplage entre un alcool aliphatique et un DAPY protégé

Le composé 2,4-diamino-6-chloropyrimidine **183** est mis en présence de dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le THF aux micro-ondes pendant 30 minutes à 70°C, dans les conditions inspirées par la *per*protection des uraciles par le groupement *tert*-butoxycarbonyl décrite précédemment. Catalysée par la 4-diméthylaminopyrimidine, l'hétérocycle **189** comportant quatre Boc est obtenu avec un très bon rendement de 91%. Pour l'autre partenaire de métathèse, la mono-protection d'un hydroxyle par un groupement silylé TBDMS est choisi dans un premier temps, car de nombreuses conditions de protection et

de déprotection sélectives sont décrites.⁹³ Il est compatible avec les conditions choisies sur le chemin réactionnel et présente l'avantage de pouvoir se déprotéger dans les mêmes conditions acides que celles nécessaires pour enlever le groupement Boc. La synthèse du diol monoprotégé par un groupement TBDMS a été décrite dans le premier chapitre, et fournit l'alcool allylique désiré **156** avec un bon rendement de 91% (Schéma 50).⁹⁴ Cependant la substitution par l'alcoolate se faisant principalement sur les carbamates présents sur les groupements Boc, cette voie fut abandonnée car nous n'avons pas pu contrôler la sélectivité. Nous avons donc décidé de protéger la base après l'étape de substitution.

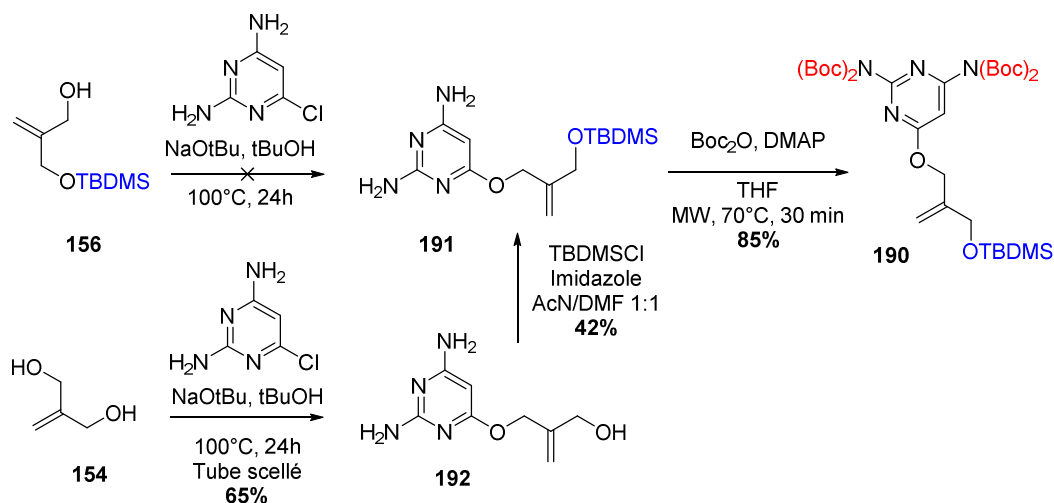


Schéma 51. Alternatives synthétiques pour l'obtention du composé **190**

Un couplage a été par la suite tenté, mais sans obtenir le produit **191**, entre l'espèce monosilylée **156** et la diaminopyrimidine chlorée **183**, en présence de *tert*-butoxyde de sodium dans le *tert*-butanol pendant 24h à 100°C. Ces conditions sont pourtant celles employées pour coupler le diol de départ **154** avec la choropyrimidine dans l'état de l'art.⁹⁵ Et effectivement, lors de l'application de ces conditions exactes, l'alkoxy se substitue sur le carbone 6 de la pyrimidine donnant le composé **192** avec un rendement de 65%. Lors de la montée en échelle, une chute drastique de rendement est observée. Il est donc nécessaire de réaliser cette manipulation sur des petites quantités. Un effet positif est également observé lors de l'activation dans un tube scellé plutôt que par un reflux classique. La silylation s'effectue ensuite dans des conditions classiques. Le groupement hydroxyle est déprotoné par l'imidazole, et son alcoolate correspondant attaque le TBDMSCl, provoquant la production de l'hétérocycle **191** avec un rendement assez faible de 42%. La *per*protection finale conduisant au composé **190** avec des groupements *tert*-butoxycarbonyle est réalisée aux micro-ondes avec un rendement de 85% (Schéma 51).

Plusieurs alternatives au groupement TBDMS sont développées, en prévision de l'importance de la nature de ce groupement sur la réussite de la métathèse : l'éther de méthoxyméthyle (MOM) présentant l'avantage d'être acido-labile, et le groupement acétate pouvant être hydrolysé *in cellulo* par les estérases.

⁹³ Wuts, P.G.M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*: Fifth Edition. © 2014 by John Wiley & Sons, Inc.

⁹⁴ Senter, T. J., Fadeyi, O. O. & Lindsley, C. W. Enantioselective Total Synthesis of (+)-Amabiline. *Org. Lett.* **14**, 1869–1871 (2012).

⁹⁵ Krawczyk, S.H., Nucleobase phosphonate analogs for antiviral treatment, WO20050123245 (A2) 2005-02-10

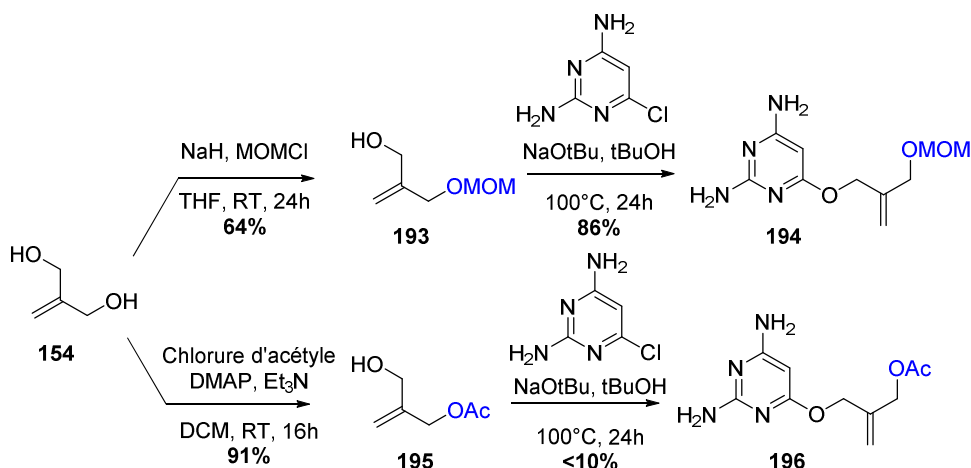


Schéma 52. Formation de la diaminopyrimidine protégée par un éthoxy/acétate

Les monoprotéctions du diol **154** sont obtenues dans des conditions décrites avec des rendements respectifs de 64% pour le produit **193** avec le groupement éther et de 75% dans le cas d'une protection avec un acétate pour le composé **195**.⁹⁶ Elles nécessitent une base afin d'arracher un proton sur l'alcool allylique et permettre la substitution/estérification résultante (Schéma 52). L'étape suivante se fait dans les conditions développées par Krawczyk *et coll.*, c'est à dire en présence de 2,4-diamino-6-chloropyrimidine, de *tert*-butoxyde de sodium dans le *tert*-butanol. Ces conditions permettent d'obtenir avec un rendement excellent la pyrimidine **194**, mais ne permettent pas une conversion optimale dans le cas de son analogue avec l'ester **196**. En effet, dans ce cas les réactions parasites sont nombreuses dues à la présence d'un ester réactif, ce qui induit une purification non envisageable à large échelle. L'utilisation d'un excès d'une base plus forte comme l'hydruide de sodium ne génère pas d'amélioration pour cette étape. C'est pourquoi nous avons décidé de reprendre le composé **192** et de développer plusieurs stratégies aboutissant à plusieurs synthons *perprotégés* dans la réaction de métathèse (Schéma 53).

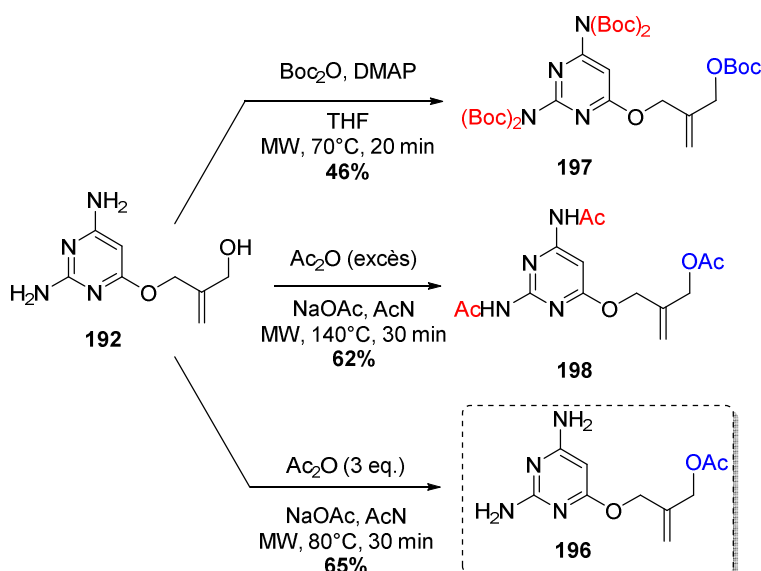


Schéma 53. Chemin synthétique pour trois précurseurs de métathèse

⁹⁶ (a) Cortijos, A. M. & Snape, T. J. Enzymatic desymmetrisation of (2-hydroxymethyl-oxiranyl)-methanol in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* **19**, 1761–1763 (2008).

En présence d'un excès de Boc_2O , les conditions habituelles de protection par groupement Boc permettent de *perprotéger* la molécule (amine et hydroxyles), fournissant le composé **197** avec un rendement moyen de 46%. En revanche, en présence d'un excès d'anhydride acétique, les groupements aminos exocycliques semblent être moins réactifs, puisqu'ils resteront monoacétylés, et ce malgré des conditions assez dures. Un ajout supplémentaire de base et d'anhydride, ainsi qu'un renforcement de la température ne changent pas ce résultat, laissant la molécule **198** sous sa forme triacétylée. Les comportements de ces deux molécules seront toutefois très intéressants à analyser durant le couplage métallo-catalysé de l'étape de métathèse suivante. Pour finir, la monoprotection de l'alcool en acétate est achevée avec une quantité de réactif acétylé plus modérée, avec des conditions d'activations beaucoup plus douces. Dans ces conditions, seul l'alcool est protégé et permet l'obtention du composé **196** avec un rendement correct de 65% (Schéma 53).

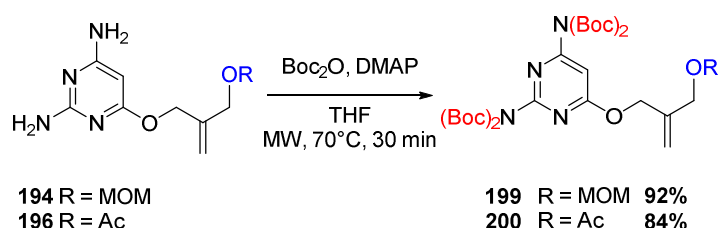
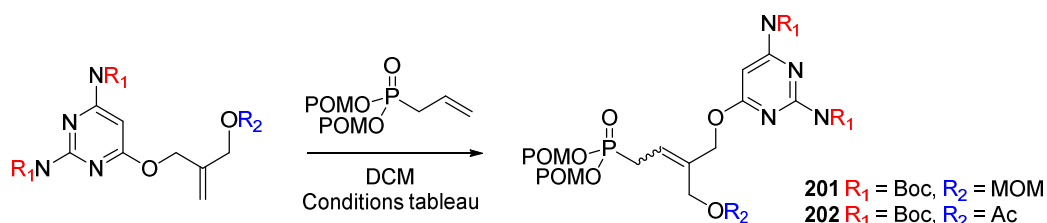


Schéma 54. Protection des groupements aminos restants

Les amines risquant d'empoisonner le catalyseur lors de la réaction de métathèse, leur protection par des groupement Boc est effectuée en une seule étape, permettant d'obtenir les composés **199** et **200** avec des rendements respectifs de 92% et 84% sous activation micro-ondes (Schéma 54).

➤ Réaction de métathèse

Tableau 20. Conditions de métathèse



Entrée	R_1 / R_2	Equivalents (Phosphonate - base)	Catalyseur (mol%)	Conditions	Rendement (Z/E)
1 ^a	NH_2 / OH	1 - 2	HG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
2	Boc / TBDMS	1 - 2	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
3	Boc / Boc	1 - 2	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
4	Boc / MOM	1 - 2	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	11 % (1:1)
5	NHAc / Ac	1 - 2	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	X
6	Boc / Ac	1 - 2	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	17 % (1:1)
7	Boc / Ac	2 - 1	NG-II (3 x 5 mol%)	]]], DCM, 55°C, 20h	15 % (1:1)

^a La base nucléique a été prétraitée avec un excès d'APTS

Une fois les composés synthétisés, ils sont engagés dans une réaction de métathèse avec le *bis*(POM)allylphosphonate, ou l'influence des groupements protecteurs a principalement été étudié (Tableau 20).

Entrée 1 : Afin de confirmer la nécessité de protéger les groupements réactifs, ce couplage au ruthénium est tenté avec la diaminopyrimidine non protégée avec le *bis*(POM)allylphosphonate. Une revue récemment publiée par Cossy *et coll.* fait état de la métathèse engageant des N-hétérocycles. Elle est entre autres parvenue à la conclusion que la basicité des azotes pouvait être responsable de la dégradation du catalyseur.⁹⁷ Pour contourner cet obstacle, la protonation des azotes avant cette réaction de métathèse pouvait être bénéficiaire à cette dernière, conduisant cette réaction avec le noyau hétéroaromatique sous forme de sels. Cette stratégie a été essayée, mais n'a cependant pas abouti à un résultat positif.

Entrée 2 et 3 : Les précurseurs protégés sont engagés dans la métathèse sans présenter de groupements réactifs libres. Dans ces deux exemples, les groupements aminos sont *perprotégés* par des *tert*-butoxycarbonyles, tandis que l'alcool allylique est protégé avec un groupement silylé ou carbonate. La réaction métallo-catalysée est engagée en présence de catalyseur de Nolan-Grubbs II, avec une charge catalytique globale de 15 %. Cependant, l'activation de cette réaction aux ultrasons n'a montré aucun résultat positif. L'explication viendrait de la gêne stérique provoquée par ce synthon. En effet, les groupements Boc et TBDMS induisent une forte contrainte dans l'espace, ce qui empêcherait l'approche de cette oléfine déjà peu réactive par rapport au catalyseur.

Entrée 4 et 5 : Afin de réduire la gêne stérique induite par les substituants de la charpente hétérocyclique par rapport au catalyseur, le groupement porté par l'hydroxyle est réduit à une taille plus raisonnable par un éther de méthoxyméthyle dans un premier temps. En conservant les groupements Boc et après la réaction de métathèse, le produit **201** est obtenu avec un faible rendement de 11%. Les quatre carbamates présents sur la base nucléique sont à leurs tours remplacés par deux acétates, beaucoup moins contraignants dans l'espace que leurs contreparties carbonylées. Néanmoins, cette modulation n'est pas fructueuse, puisque la conversion reste nulle. Il est donc nécessaire de garder les groupements aminos diprotégés.

Entrée 6 et 7 : L'acétate est laissé en position R₂, et les Boc sont réintroduits sur les amines libres. Dans ces conditions, avec un excès de base nucléique par rapport au phosphonate, le produit de couplage **202** est isolé avec un rendement de 17%. L'inversion des proportions d'équivalents donne un rendement très similaire de 15%, ce qui n'est pas significatif à la vue des masses mises en réaction.

Si les rendements restent médiocres, il ne faut pas perdre de vue la difficulté des produits à s'engager dans une réaction de métathèse. En effet, ce sont des oléfines de types III, incapables de s'homodimériser, présentant une grande gêne stérique et possédant plusieurs groupements très réactifs parfaitement capables d'inactiver le catalyseur. Additionnés, tous ces paramètres expliquent parfaitement la très faible réactivité de ce type de synthons.

⁹⁷ Lafaye, K., Bosset, C., Nicolas, L., Guérinot, A. & Cossy, J. Beyond catalyst deactivation: Cross-metathesis involving olefins containing N-heteroaromatics. *Beilstein J. Org. Chem.* **11**, 2223–2241 (2015).

➤ Clivage des groupements protecteurs

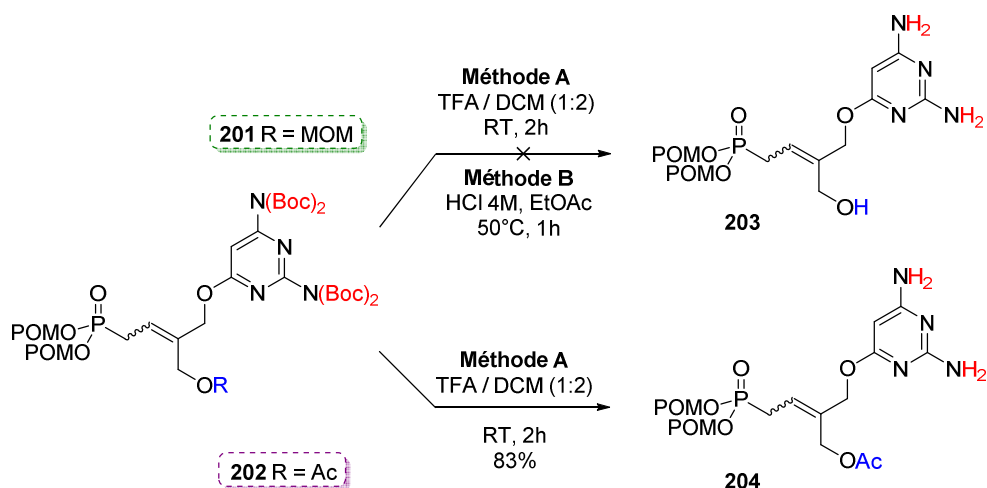


Schéma 55. Déprotection des divers groupements protecteurs

Seuls deux produits post-couplages ont été synthétisés et identifiés (**201** et **202**), ceux présentant les groupements protecteurs carbamates sur la diaminopyrimidine, avec respectivement un groupement acétoxy et un éther de type méthoxyméthyle. La fonction MOM présente l'avantage d'être clivable dans les mêmes conditions que les groupements *tert*-butoxycarbonyles. Introduit dans un mélange 1 pour 2 d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pendant 2 heures à température ambiante (Méthode A), ou dans l'acétate d'éthyle en conditions acides (Méthode B), seuls des produits de dégradation et d'isomérisation ont été isolés dans la tentative d'obtention du composé **203** (Schéma 55).

En revanche, lors de la seule déprotection des carbamates dans les mêmes conditions que précédemment (TFA / DCM 1:2), le composé **204** est obtenu avec un excellent rendement de 95%. Ce résultat laisse penser que l'espèce responsable de l'isomérisation et de la dégradation de l'espèce **203** sont les sous produits issus de la dégradation du MOM.

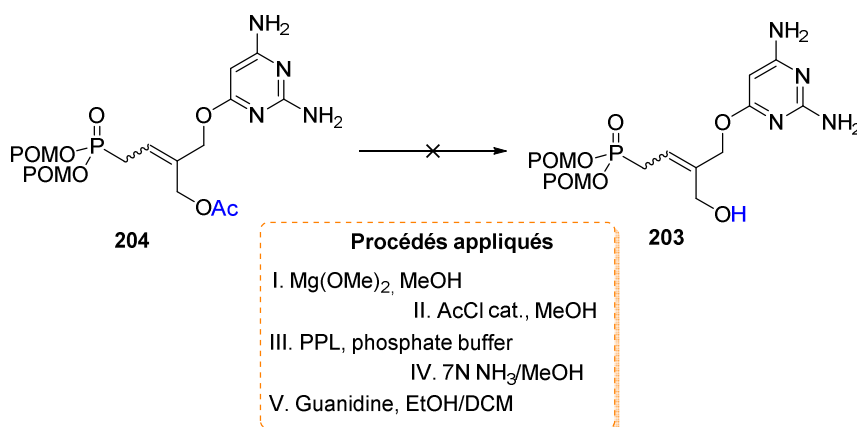


Schéma 56. Tentatives de déprotection du groupement acétate

L'acétate étant un groupement biolabile, il sera pris en charge par des estérases une fois dans la cellule, qui cliveront ce groupement et permettront la libération du principe actif. Pour jauger cette efficacité, il est alors envisagé de synthétiser le composé hydroxylé et de le tester biologiquement, pour mesurer l'impact réel d'une prodrogue acétate. La difficulté de cette réaction réside dans une réactivité très similaire entre le

groupement pivalate des groupements biolabiles et du groupement acétate. Seules quelques conditions décrites dans la littérature permettent de faire une différence entre ces deux esters et de déprotéger sélectivement l'acétate par rapport au pivalate. Nous avons tenté successivement différentes conditions : le méthoxyde de magnésium dans le méthanol,⁹⁸ une quantité catalytique de chlorure d'acétyle dans le méthanol,⁹⁹ la lipase porcine du pancréas (PPL) dans un tampon phosphate,¹⁰⁰ du méthanol ammoniacal¹⁰¹ et pour finir de la guanidine dans un mélange éthanol/dichlorométhane.¹⁰² Aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir le composé **203**, ne menant qu'à une déprotection complète et dégradation. Devant l'incapacité à produire sélectivement cet ANP, seul la molécule **204** est envoyé en test biologique (Schéma 56).

➤ Modulation de la prodrogue biolabile

Si les carbonyloxyméthyles s'étaient montrés être plus actifs des prodrogues biolabiles utilisées dans la série *bis*(POM)phosphonate but-2'-ényle à base uracile C⁵ substituées, il peut être intéressant de voir l'apport que pourraient avoir ces prodrogues dans cette série.

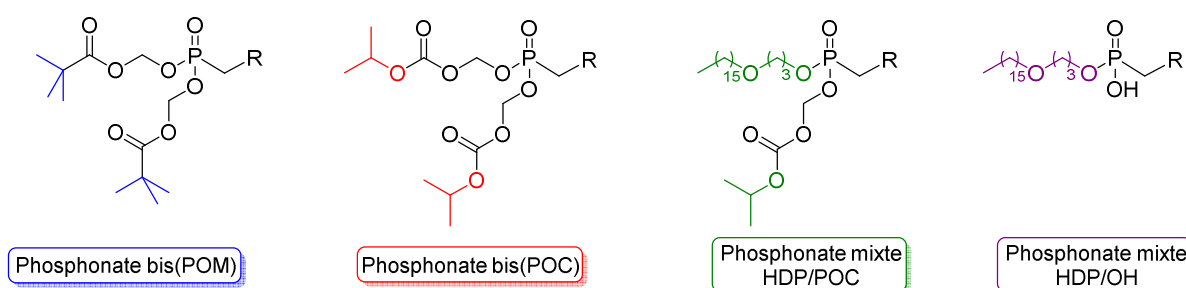


Figure 39. groupements biolabiles envisagées

L'intérêt sera d'abord porté à la modification du pronucléotide par quatre groupements biolabiles distincts (Figure 39). Dans un premier temps, les *isopropyl oxyméthyl carbonates* peuvent constituer un bon analogue des *bis*(POM) introduits précédemment, leur seule différence résidant dans la présence d'un groupement carbonate remplaçant le pivalate initialement présent. Hostetler a développé un type de prodrogue très lipophile comme l'hexadécylpropyloxy phosphonate, sur un monoacide phosphonique. Si la présence de l'HDP est compatible avec l'approche synthétique employée précédemment, ce n'est cependant pas le cas de l'acide phosphonique, induisant un nouveau site réactif et une trop grande polarité pour être présent sous cette forme dans cette approche réactionnelle. Il est donc décidé de synthétiser la prodrogue mixte HDP/POC développée au laboratoire, qui présente l'avantage d'être compatible dans ces conditions de synthèse. Ces molécules peuvent aussi provoquer un effet thérapeutique intéressant et seront donc testées telles quelles. Après clivage du POC, l'acide phosphonique sera produit et la prodrogue HDP/OH créée pourra être évaluée biologiquement.

⁹⁸ Yao-Chang, X., Bizuneh, A. & Walker, C. Selective deprotection of alkyl esters using magnesium methoxide. *Tetrahedron Lett.* **37**, 455–458 (1996).

⁹⁹ Yeom, C.-E., Lee, S. Y., Kim, Y. J. & Kim, B. M. Mild and Chemoselective Deacetylation Method Using a Catalytic Amount of Acetyl Chloride in Methanol. *Synlett* **2005**, 1527–1530 (2005).

¹⁰⁰ Houille, O., Schmittberger, T. & Uguen, D. A remarkably simple process for monoprotecting diols. *Tetrahedron Lett.* **37**, 625–628 (1996).

¹⁰¹ Neilson, T. & Werstiuk, E. S. Oligoribonucleotide Synthesis. II. Preparation of 2'-O -tetrahydropyranyl Derivatives of Adenosine and Cytidine Necessary for Insertion in Stepwise Synthesis. *Can. J. Chem.* **49**, 493–499 (1971).

¹⁰² Kunesch, N., Miet, C. & Poisson, J. Utilisation de la guanidine comme agent désacétylant sélectif: une méthode de désacétylation instantanée applicable aux sucres. *Tetrahedron Lett.* **28**, 3569–3572 (1987).

La rétrosynthèse envisagée pour synthétiser ces nucléotides sera la même que précédemment. En effet, les changements opérés sur les prodrogues n'induisent pas d'autre réactivité. Le carbonate reste un ester comme le pivalate, et la chaîne éthoxy est inerte dans les conditions utilisées.

Il est nécessaire de rappeler qu'un des intérêts majeurs de notre chimie reste de développer une synthèse chimique autour du motif phosphonate portant des groupements biolabiles.

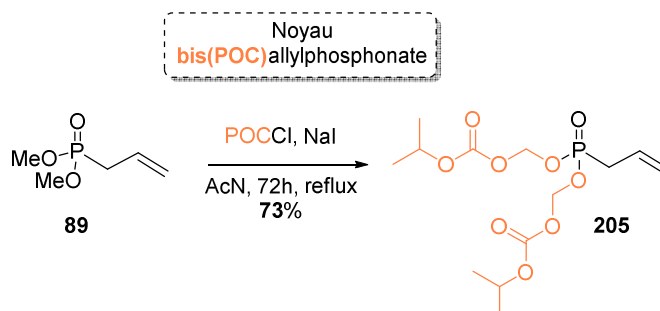


Schéma 57. Synthèse du *bis*(POC)allylphosphonate

En ce qui concerne la synthèse du *bis*(POC)allylphosphonate, les conditions sont les mêmes que celles utilisées dans la production de son analogue pivaloyle. Le diméthylallylphosphonate **89** est mis en présence de chlorométhyl *isopropyl* carbonate et d'iodure de sodium strictement anhydre au reflux de l'acétonitrile. Le rendement atteint 73% après 72h de réaction (Schéma 57).⁵³

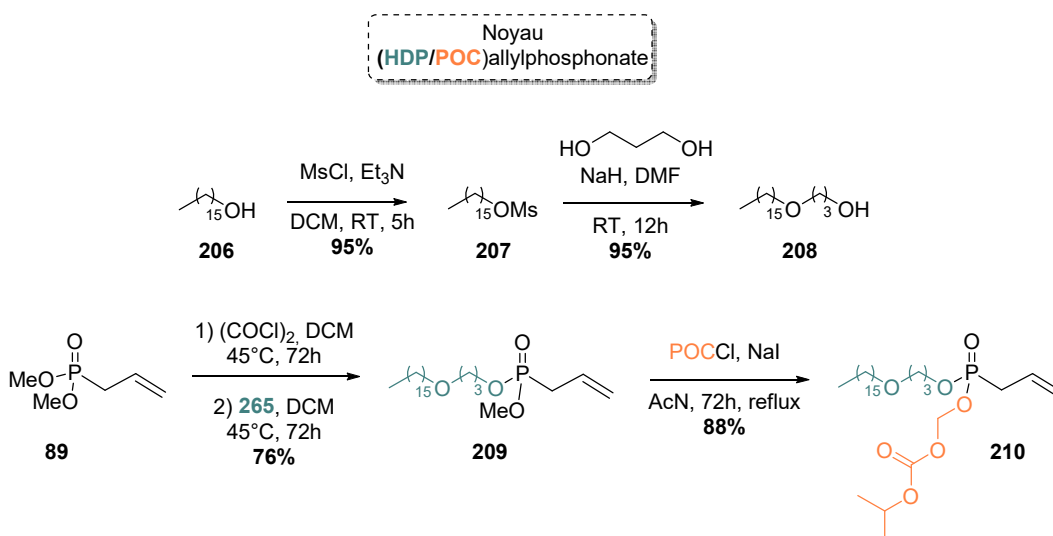


Schéma 58. Synthèse de l'HDP/POC allylphosphonate

La prodrogue mixte HDP/POC a un chemin réactionnel développé par le laboratoire. Le précurseur commercial hexadécanol est tout d'abord mésylé pour le transformer en bon groupement partant. Ce changement s'opère à température ambiante dans le dichlorométhane en présence de chlorure de méthanesulfonyle, et après 5h en conditions basiques, la sulfone correspondante **207** est obtenue avec un rendement de 95%.¹⁰³ Il est à noter que ce produit est très stable à l'air libre et peut être synthétisé sur une échelle de 50g. La substitution nucléophile ultérieure se produit en présence d'hydrure de sodium avec le propan-1,3-diol commercial. Monodéprotoné, ce composé substitue efficacement la chaîne grasse pour

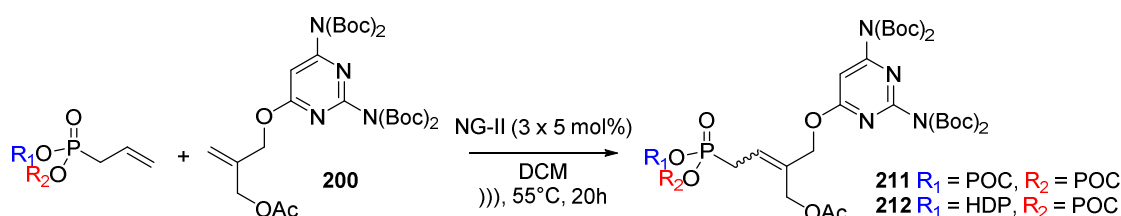
¹⁰³ Bennett, M., Lipid compounds targeting VLA-4, US20130079383 (A1) 2013-03-28

produire après 24h de réaction à température ambiante l'alcool HDPOH avec 95% de rendement.¹⁰⁴ Une fois l'alcool synthétisé, le diméthylallylphosphonate **89**, précurseur de toutes nos prodrogues, subit une monochloration en présence de chlorure d'oxalyle, pendant 72h au reflux du dichlorométhane. L'intermédiaire chloré est par la suite substitué par l'alcoolate d'hexadécylpropyloxy, permettant de ce fait l'obtention du composé **209** avec un bon rendement de 76%. Finalement, la transformation du groupement méthoxy en isopropyl oxyméthyl carbonate se fait dans les mêmes conditions que précédemment, aboutissant à la formation de ce pronucléotide HDP/POC visé avec un rendement final de 88%. Cette synthèse présente un rendement global de 60% et peut être effectué sur une échelle de plusieurs grammes, ce qui rend ce composé très facile d'accès (Schéma 58).

➤ Métathèse et déprotection

Dans un second temps, ces oléfines sont couplées aux pyrimidines synthétisées précédemment par réaction de métathèse.

Tableau 21. Extension de la réaction de métathèse



Entrée	R_1	R_2	Charge catalytique	Equivalents (Phosphonate - base)	Rendement ^a
1	HDP	POC	3 x 7 mol%	2 - 1	16%
2	HDP	POC	3 x 7 mol%	1 - 2	4%
3	POC	POC	3 x 7 mol%	2 - 1	23%

^a Conversion

Entrée 1 et 2 : Ici, le nucléoside visé comporte la prodrogue HDP/POC et un substituant de type acétoxy en position 2'. La différence entre ces deux réactions réside dans le nombre d'équivalents, avec dans la première réaction un excès de phosphonate avec la pyrimidine comme réactif par défaut, et l'inverse dans la seconde. En série *bis*(POM) but-2'-ényle et pent-2'-ényle, aucune différence réellement significative n'avait été noté. Ce n'est cependant pas le cas ici, puisque si un excès de phosphonate conduit à un rendement de 16% en accord avec ceux obtenus dans les autres séries, un excès de pyrimidine ne conduisant qu'à un très faible rendement calculé de 4% de l'ANP **211**.

Entrée 3 : Les conditions optimales sont donc reprises et appliquées lors de la préparation du *bis*(POC)ANP. Après 20h d'irradiation ultrasonique à 55°C, l'ANP protégé **212** est obtenu avec un rendement calculé de 23%.

La déprotection des groupements Boc se fait par la suite par un mélange d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, permettant l'obtention des composés **213** et **214** avec des rendements compris entre 79 et 88% (Schéma 59).

¹⁰⁴ Ware, R. W., Almond, M. R., Lampert, B. M., Phosphonate ester derivatives and methods of synthesis thereof, WO2012031045 (A2) 2012-03-08

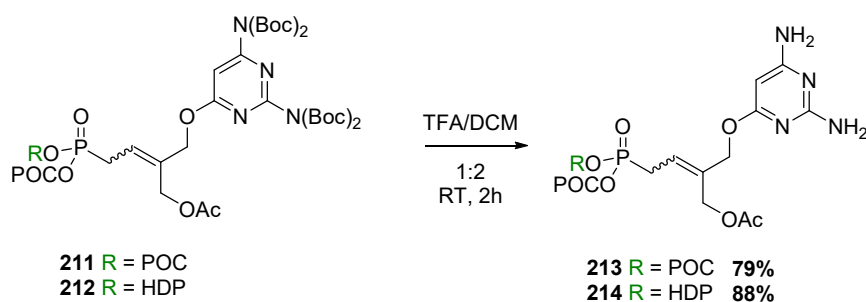


Schéma 59. Déprotection des carbamates

Lors de la production du composé HDP/POC comportant le groupement acétoxy en position 2', une fois le produit purifié, le résidu est ensuite caractérisé, stocké dans un pilulier, conservé à basse température et envoyé en tests biologiques. Les analyses RMN mettent en évidence la présence d'un mélange équivalent entre le composé Z et le composé E, obtenus avec un ratio 50/50. La présence des deux molécules est indiquée par deux pics en RMN du phosphore 31 découplé (Figure 40), puis par des analyses 2D HMBC, qui permet de caractériser les carbones, et NOESY (Figure 41), qui permet de prouver la configuration de ces différents composés.

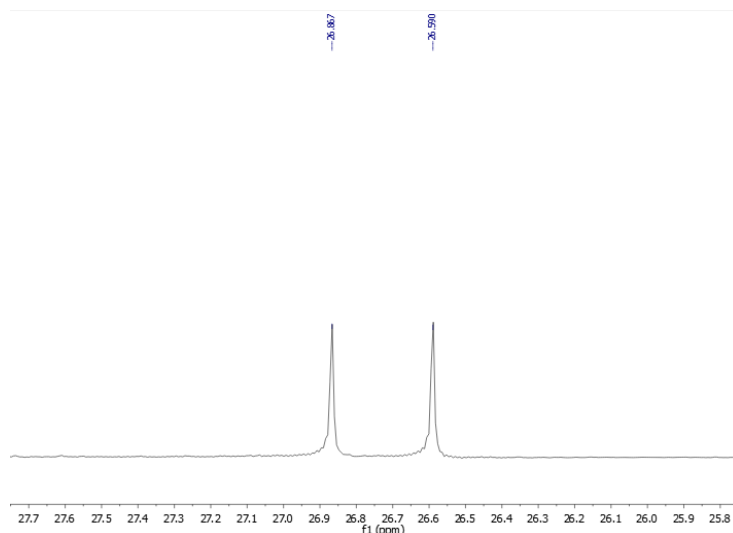


Figure 40. Spectre ^{31}P du composé 275

Dans cette corrélation de type NOESY (couplage proton-proton dans l'espace), il est possible de voir les atomes d'hydrogènes spatialement proches. Un zoom a été effectué sur la figure 41 afin de se concentrer sur la zone intéressante. Il s'agit du couplage entre les protons en alpha de la double liaison : du côté du phosphore ($\text{CH}_2\text{-P}$), de la pyrimidine ($\text{CH}_2\text{-ODAPY}$) et de l'acétate ($\text{CH}_2\text{-OAc}$). Les analyses ^1H , ^{13}C et HMBC ont conjointement permis d'attribuer avec précision chaque atome à sa position sur le spectre. Par la suite, l'analyse NOESY nous permet de confirmer ces structures, par deux signaux de corrélation entre les protons situés en alpha du phosphore et les CH_2 correspondant dans chaque isomère.

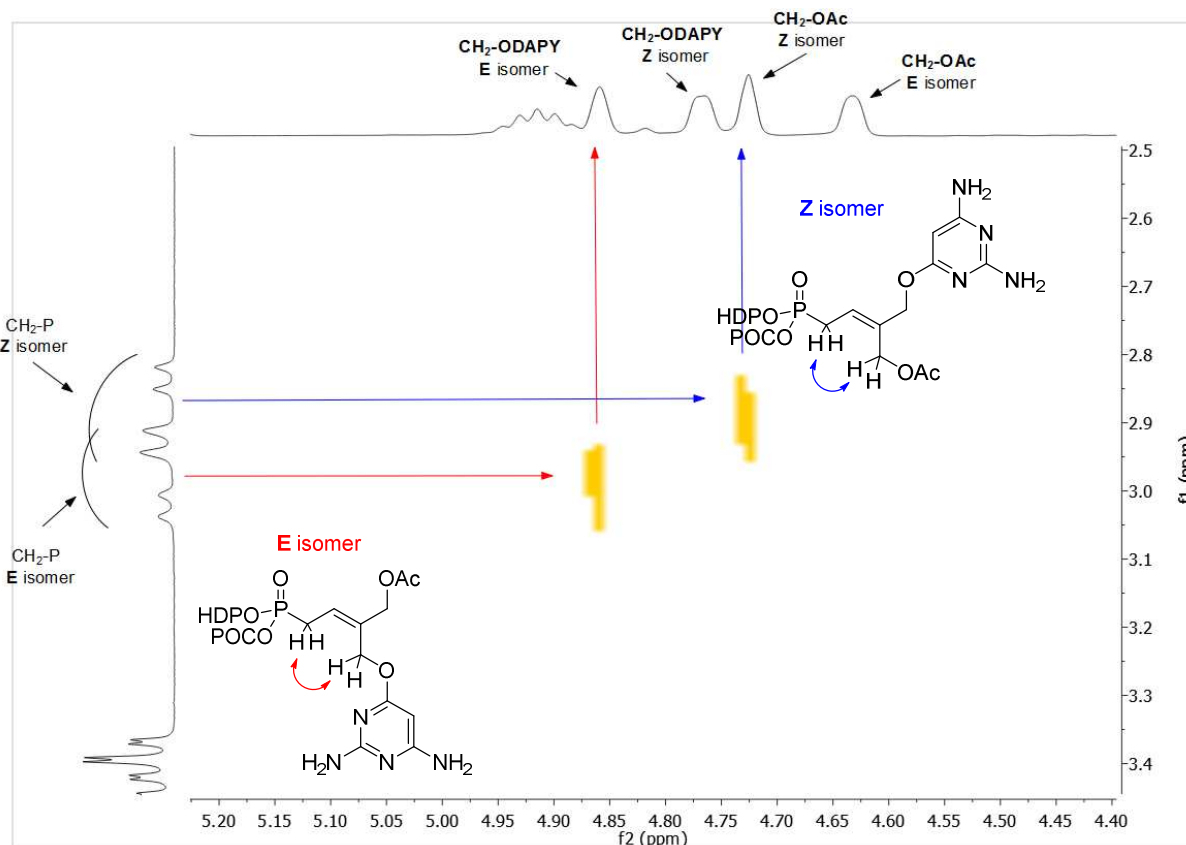


Figure 41. Spectre NOESY du composé 275

Compte tenu des résultats biologiques très encourageants, un second batch est réalisé dans les mêmes conditions dans le but d'obtenir plus de produit pour des analyses complémentaires, et de séparer les isomères Z/E. Lors de la seconde préparation, le mode opératoire reste le même. Une première analyse totale en RMN est effectuée, et de cette analyse résulte le même spectre que précédemment, présentant les deux isomères dans des proportions similaires.

Visuellement, ayant une couleur légèrement brune, il est supposé la présence de sous produits au ruthénium résiduels, bien que non détecté en RMN ou en HRMS. Plusieurs purifications sur colonne de silice sont effectuées, ce qui n'est cependant pas nécessairement suffisant pour affirmer avec certitude l'élimination de toutes les traces. Nous avons appliqué par la suite une méthode développée par Georg *et coll.*, dans le but d'éliminer les traces de ruthénium restant.¹⁰⁵ Le traitement des bruts réactionnels avec de l'oxyde de triphénylphosphine ou du diméthylsulfoxyde suivie d'une simple filtration sur silice a prouvé réduire le taux de sous produits issus de ruthénium par un facteur 50. Sans toutefois expliquer le mécanisme précis, il semblerait que ces produits agissent en tant que ligand sur le catalyseur, et l'espèce métallique formée serait ensuite piégée sur la silice.

Dans notre cas, le DMSO peut facilement être enlevé par évaporation sous vide, tandis que l'oxyde de triphénylphosphine risque de co-éluer sur silice avec le nucléoside. C'est pourquoi le composé **214** est donc mis en présence de DMSO (100 équivalent) pendant 16h à température ambiante. Après l'évaporation du sulfoxyde sous pression réduite à l'aide d'un système de pompe à palettes, le produit fut conservé au frigo. Etant donné la faible quantité de produit final formé (10 mg) nécessaire à l'évaluation biologique, il n'est

¹⁰⁵ Ahn, Y. M., Yang, K. & Georg, G. I. A convenient method for the efficient removal of ruthenium byproducts generated during olefin metathesis reactions. *Org. Lett.* **3**, 1411–1413 (2001).

pas possible d'effectuer d'analyses élémentaires qui aurait mesuré le taux de ruthénium présent. Pour vérifier la pureté de notre produit, ainsi que l'absence supposée du DMSO, une analyse RMN est réalisée.

Le résultat de cette analyse ne fut pas celui attendu, puisqu'après ce traitement, le taux *Z/E* passe de 50:50 à 65:35. 15 jours après cette RMN, une analyse totale fut refaite, montrant la disparition complète de l'isomère *E* (Figure 42).

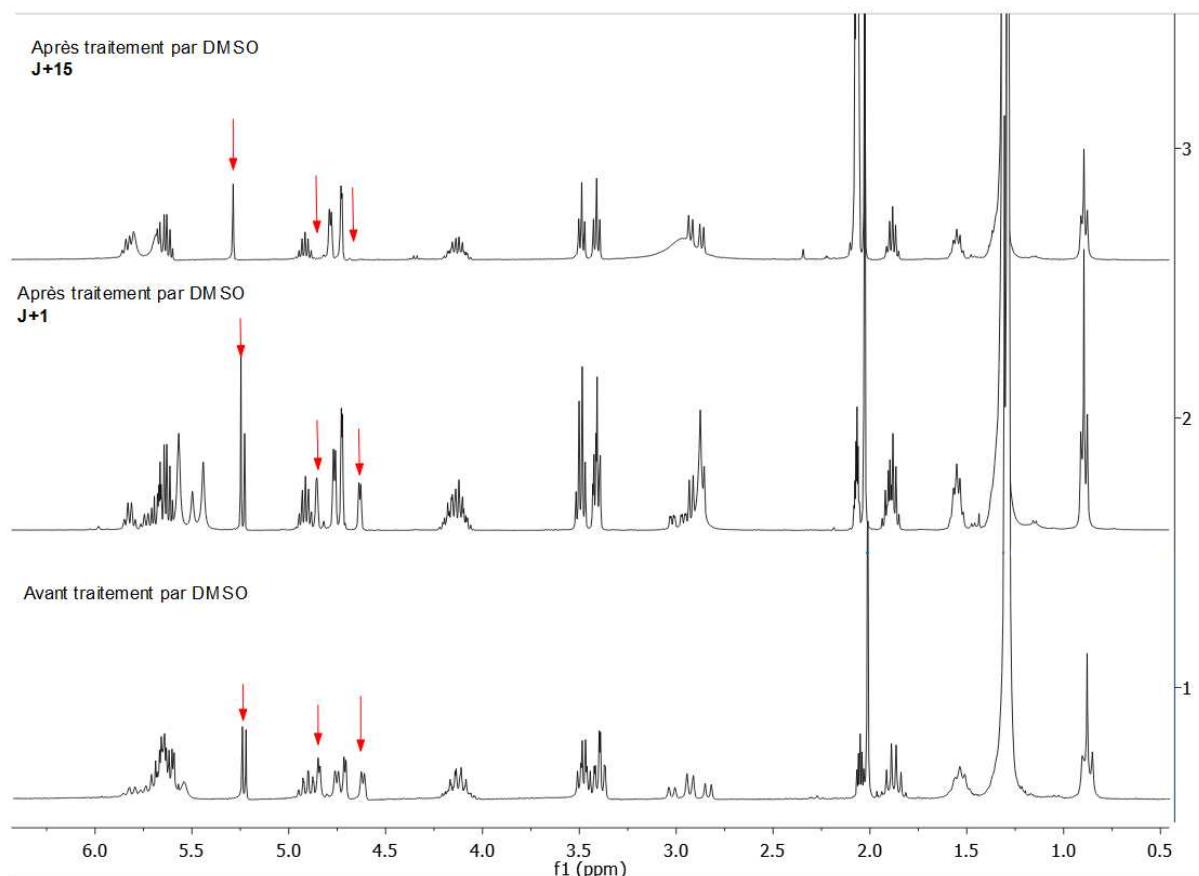


Figure 42. Comparaison des trois spectres RMN proton du composé 275 avant et après traitement

Ce phénomène d'isomérisation spontanée n'est pas très reporté dans la littérature. Il y a toutefois des cas d'isomérisation qui sont reportés. L'équipe de Lledos a par exemple décrit une isomérisation d'alcool allylique en sa cétone correspondante, dû à la présence d'une quantité catalytique de ruthénium.¹⁰⁶ Un cas similaire a été reporté par l'équipe de Romerosa, démontrant dans la même publication la possibilité pour le DMSO de servir de ligand pour le ruthénium.¹⁰⁷ L'isomérisation de *cis* à *trans* a aussi été reportée sous la forme d'une catalyse au palladium, dans des conditions très douces (10% de catalyseur dans le dichlorométhane à température ambiante). Ces conditions permettent de convertir une large gamme de composés *cis* en leurs isomères *trans*.¹⁰⁸

¹⁰⁶ Bellarosa, L. *et al.* Highly efficient redox isomerisation of allylic alcohols catalysed by pyrazole-based ruthenium(IV) complexes in water: Mechanisms of bifunctional catalysis in water. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 7749–7765 (2012).

¹⁰⁷ Serrano-Ruiz, M., Lorenzo-Luis, P., Romerosa, A. & Mena-Cruz, A. Catalytic isomerization of allylic alcohols in water by [RuClCp(PTA)₂], [RuClCp(HPTA)₂]Cl₂·2H₂O, [RuCp(DMSO-κS)(PTA)₂]Cl, [RuCp(DMSO-κS)(PTA)₂](OSO₂CF₃) and [RuCp(DMSO-κS)(HPTA)₂]Cl₃·2H₂O. *Dalt. Trans.* **42**, 7622 (2013).

¹⁰⁸ Yu, J., Gaunt, M. J. & Spencer, J. B. Convenient Preparation of *trans*-Arylalkenes via Palladium(II)-Catalyzed Isomerization of *cis*-Arylalkenes. *J. Org. Chem.* **67**, 4627–4629 (2002).

L'hypothèse que nous soumettons pour cette isomérisation non attendue, passe par l'extrapolation de ces méthodes par l'activation d'un résidu de ruthénium pouvant réagir avec l'isomère *E* très encombré et faciliter l'isomérisation en son analogue *Z*.

➤ Alternative synthétique avec $n = 2$

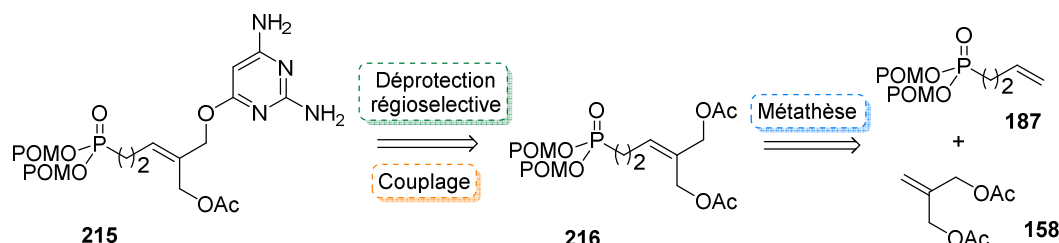


Schéma 60. Modèle portant une chaîne acyclique pentényle

Le schéma synthétique précédent utilisé, souffre cependant d'un rendement global très faible, dû à une étape de métathèse présentant de modestes rendements. De façon à améliorer l'efficacité d'ensemble de ce type de chemin synthétique, une alternative similaire à celle utilisée dans le chapitre 1 est envisagée (Schéma 60). Le composé phosphonate préparé **187** peut facilement être couplé au diacétate **158** dans des conditions identiques à celles employées, suivie d'une déprotection sélective d'un acétate du composé **216** à l'aide des conditions enzymatiques habituelles. L'étape la plus délicate reposera sur le couplage entre la pyrimidine chlorée et l'alcoolate du phosphonate pour donner le produit **215**.

➤ Préparation de l'alcool allylique **257**

Il est tout d'abord nécessaire de préparer le phosphonate de départ portant les groupements biolabiles. Le chemin réactionnel est le même que celui optimisé lors du premier chapitre.

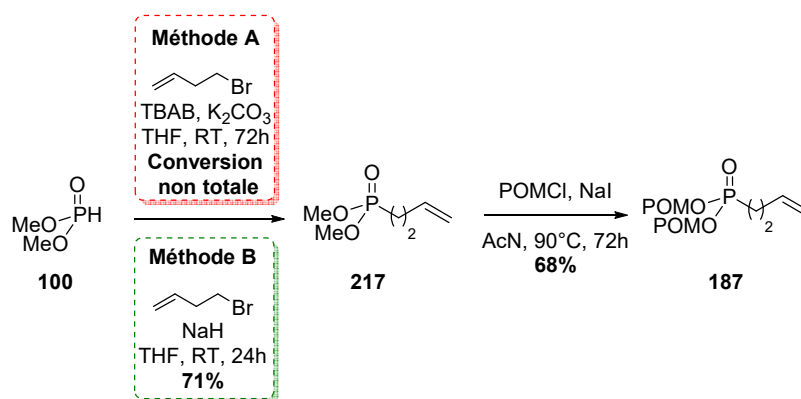


Schéma 61. Production du butényle de phosphonate

La reproduction exacte des conditions utilisées dans le cadre de la production du *bis*(POM) allylphosphonate **187** n'aboutit dans ce cas pas à une conversion complète, même après 72 heures de réaction. La différence de réactivité peut s'expliquer par une délocalisation des électrons pouvant aider à la substitution du bromure d'allyle lors de la synthèse d'allylphosphonate, ce qui n'est pas applicable dans ce cas. Les conditions sont donc renforcées, en utilisant une base plus forte comme l'hydrure de sodium. Le même protocole est appliqué, et après 24 heures de réaction, le composé **217** est obtenu avec un bon

rendement de 71%.¹⁰⁹ Le produit **217** est transestérifié après 72 heures au reflux de l'acétonitrile, permettant l'obtention du *bis*(POM) buténylephosphonate **187** (Schéma 61).

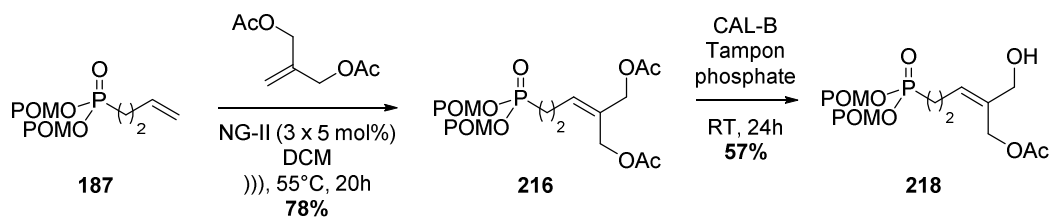


Schéma 62. Méthathèse puis déacétylation enzymatique

Le couplage organométallique est effectué dans les conditions optimisées précédemment, *i.e* avec le catalyseur de Nolan-Grubbs II au coeur du cycle catalytique, activé par les ultrasons pendant 20h au reflux du dichlorométhane (Schéma 62). La désymétrisation du composé **216** ainsi formé se fait par voie enzymatique, en présence de 50% w/w de la lipase B de *Candida Antarctica*, procurant le phosphonate **218** avec un rendement correct de 57%.

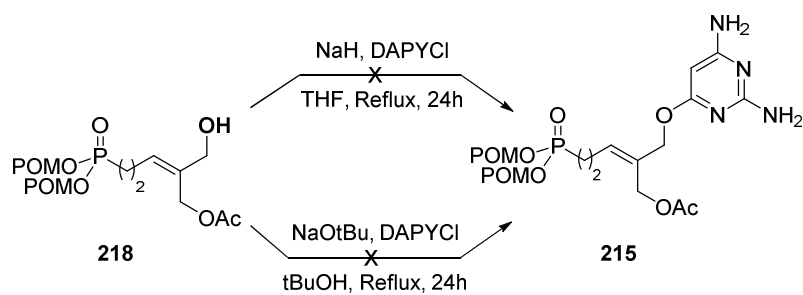


Schéma 63. Quelques exemples de substitutions tentées

Afin de réaliser le couplage entre le phosphonate et la pyrimidine, une base est introduite en présence de l'hydroxyle **218** afin de le transformer en alcoolate (Schéma 63). Dans ce cas précis, les fonctions allyliques étant de médiocres groupements partant, additionné au fait que les protons en alpha du phosphore ne puissent pas se délocaliser à l'aide de la double liaison empêche toute formation de diènes indésirables. Néanmoins, en dépit des différentes conditions utilisées, quelque soit la force de la base, les moyens d'activation ou les divers solvants employés, aucune trace de composé **215** n'est observé. Ce chemin synthétique est par conséquent abandonné, et le chemin synthétique précédent est adopté afin de faciliter la synthèse des composés pentényles.

➤ La synthèse originale réemployée

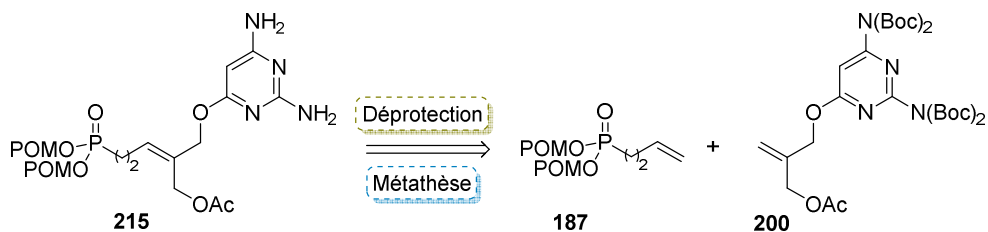
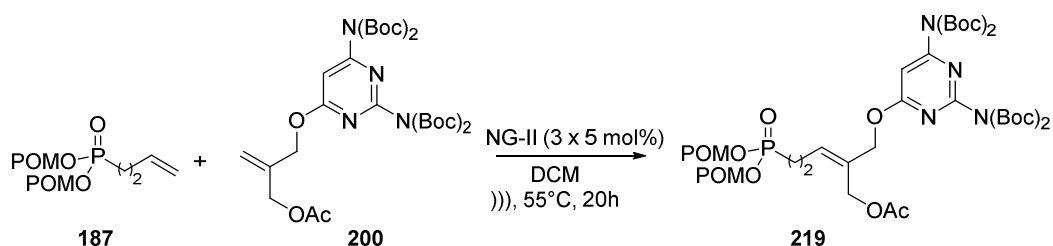


Schéma 64. Rétrosynthèse simplifiée

¹⁰⁹ André, V., Lahrache, H., Robin, S. & Rousseau, G. Reaction of unsaturated phosphonate monoesters with bromo- and iodo(bis-collidine) hexafluorophosphates. *Tetrahedron* **63**, 10059–10066 (2007).

Dans cette rétrosynthèse envisagée, les synthons de départ présentent l'avantage d'avoir leurs synthèse déjà mise au point (Schéma 64). En effet, les pyrimidines sont comme précédemment la crotyl pyrimidine et l'oléfine 1,1-disubstituée avec cette pyrimidine et le groupement acétoxy. Le composé **215** serait donc produits par deux étapes successives de métathèse et de déprotection.

Tableau 22. Couplage organométallique à partir de buténylphosphonate



Entrée	Equivalents (Phosphonate - base)	Rendement ^a
1	1 - 2	19%
2	2 - 1	17%

^a Conversion

Entrée 1 et 2 : La métathèse est effectuée entre l'hétérocycle azoté comportant une oléfine 1,1-disubstituée et le phosphonate de type I, donnant un rendement calculé compris entre 17 et 19% (Tableau 22). Il est à noter que quelque soit la proportion et l'excès des différents réactifs, la différence de rendement n'est pas significative pour statuer d'un réel effet des proportions des oléfines engagées dans la réaction.

Afin d'isoler le produit voulu et de dévoiler les structures des impuretés, ces composés sont engagés dans une réaction de déprotection, en présence d'un mélange d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane (Schéma 65). L'ANP **215** est obtenu avec un rendement de 15% sur deux étapes, identifiant les sous-produits de métathèse comme étant les homodimères Z/E du bis(POM) but-3-ényl phosphonate **187**.

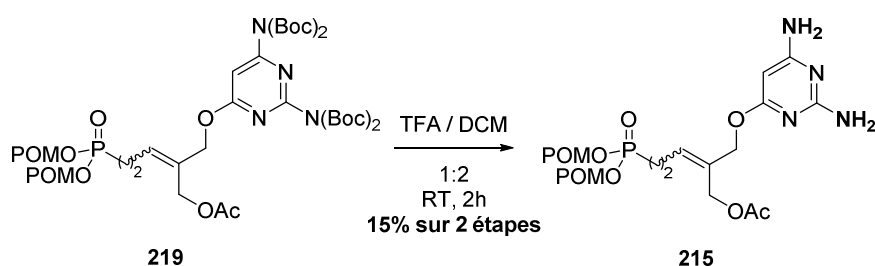


Schéma 65. Déprotection des carbamates de l'ANP **219**

➤ Evaluation biologique des composés synthétisés

Toutes ces molécules ont été évaluées pour leur activité biologique, sur des virus à ADN/ARN en collaboration avec le Dr. Raymond F. Schinazi à Emory University (Atlanta, USA) et avec les Prof. Robert Snoeck et Graciela Andrei du REGA Institute (Louvain, Belgique).

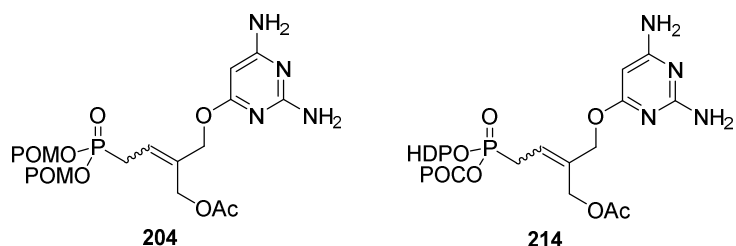


Figure 43. Molécules actives

Tableau 23. Evaluation biologique sur les souches VZV et CMV

Composé	EC ₅₀ (μM) ^a						MCC ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)
	TK+ VZV	TK+ VZV	TK- VZV	TK- VZV	CMV	CMV		
	(YS)	(OKA)	(07/1)	(YS/R)	(AD-169)	(Davis)		
204	0.36	0.14 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.06	8.56 ± 0.38	4.06 ± 2.27	100	2.03 ± 0.19
214	ND	0.012 ± 0.01	0.015 ± 0.02	ND	1.16 ± 0.63	0.10 ± 0.05	20	2.86 ± 1.14
Acyclovir	1.94 ± 0.03	2.5 ± 0.3	92 ± 70	66 ± 14	-	-	> 300	470
Ganciclovir	-	-	-	-	7.5 ± 2.3	7.1 ± 0	> 350	130 ± 86
Brivudine	0.026	0.0087	12	85 ± 20	-	-	> 150	> 100
Cidofovir	-	-	-	-	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

Tableau 24. Résultats biologiques sur les souches HSV et VV

Composé	EC ₅₀ (μM) ^a				MCC ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)
	HSV-1		HSV-2	VV		
	KOS	TK- (KOS) ACVr	G			
204	0.60 ± 0.20	0.60 ± 0.20	1.10 ± 0.70	2.90 ± 1.10	100	2.03 ± 0.19
214	0.4 ± 0.2	0.4	0.27 ± 0.07	0.4 ± 0.2	20	2.86 ± 1.14
Acyclovir	0.2	85	0.2	>250	> 300	470
Ganciclovir	0.032	8.9	0.06	>100	> 350	130 ± 86
Brivudine	0.04	50	50	5.8	> 150	> 100
Cidofovir	2	3.8	2	29	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

Leurs activités sont tout d'abord évaluées contre le VZV et le CMV, virus à ADN. L'activité du composé **204** est très forte sur le VZV, de l'ordre de 0.15 μM sur les virions TK+/TK- (Tableau 23). Il en est de même pour leur activité sur les différentes souches de HSV-1 et sur VV (Tableau 24). Si les résultats présentés ont démontré un fort potentiel thérapeutique, l'indice de sélectivité reste cependant assez faible, puisqu'il est de 15 sur le composé **204** contre VZV. A titre d'exemple, l'acyclovir présente une sélectivité de l'ordre de 1 000 à 10 000. Les activités antivirales les plus puissantes sont cependant induites par le composé **214**, présentant une activité moyenne sur VZV entre 10 et 15 nM avec un bon indice de sélectivité de l'ordre de 170 sur ce virus. De surcroît, cette molécule est aussi efficace sur d'autres virus à ADN, comme CMV, HSV ou VV, sur lesquels elle présente une activité comprise entre 100 et 400 nM, ce qui est largement supérieur aux molécules approuvées par la FDA dans le cas des virions de HSV-1 dépourvus de kinases, de la lignée cellulaire Davis du CMV et du VV. (Tableaux 28 et 29) Actuellement, nous sommes toujours en attente des résultats biologiques du composé **213**.

ii. *Modulation du groupement en position C⁴ du 2'acetoxy-but-2'-ényle phosphonate diaminopyrimidine sous sa forme HDP/POC*

Le composé qui ressort incontestablement par son potentiel thérapeutique est donc le composé **214**. Afin d'essayer d'améliorer encore le potentiel thérapeutique de cette molécule et d'augmenter son indice de sélectivité, nous nous sommes inspirés sur les résultats obtenus précédemment au laboratoire dans d'autres séries d'ANPs (voir chapitre 1) (Schéma 66).⁷⁹

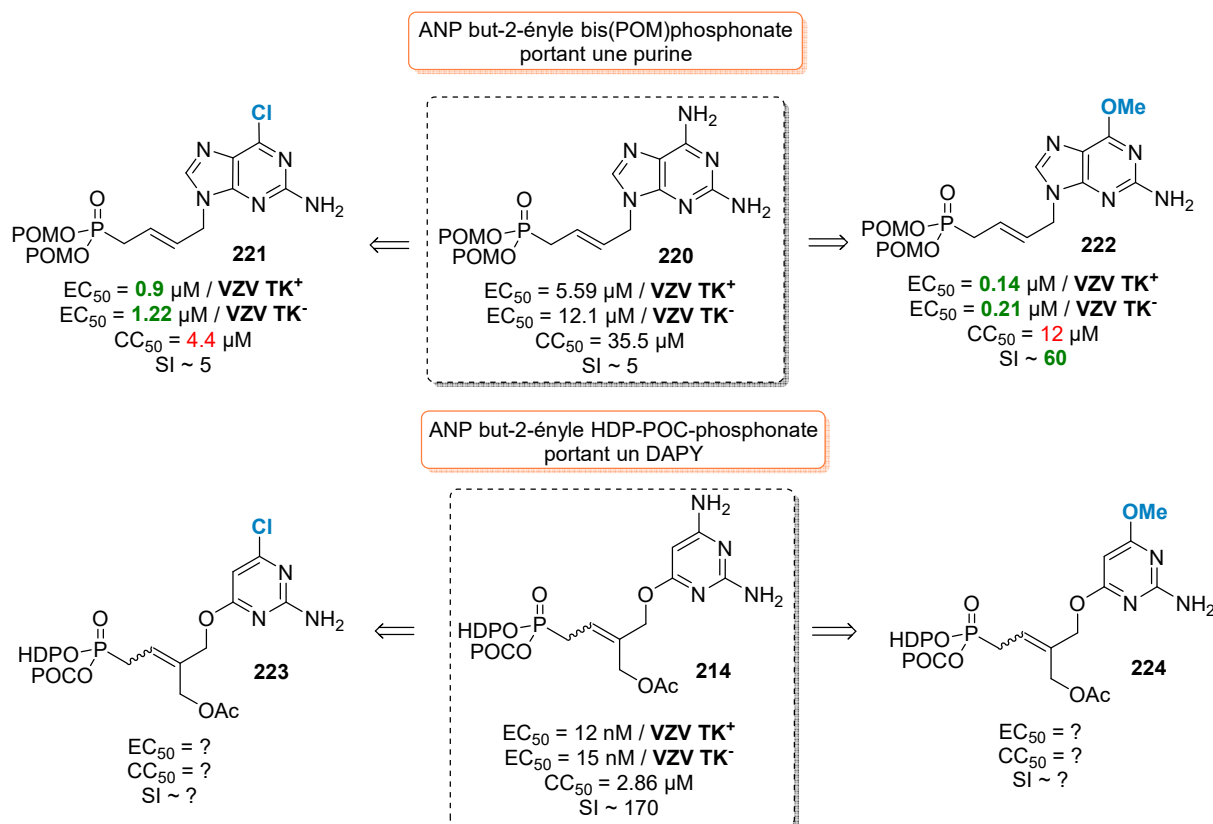


Schéma 66. Modifications envisagées sur le composé 275

Lors de la synthèse du composé 2,6-diaminopurine **220**, la modification de l'amine en position 6 avec des groupements chloro ou méthoxy permettent l'amélioration de l'activité jusqu'à un facteur 60 et une diminution de l'index de sélectivité par 6. La substitution de l'amine présent sur le C⁶ montre donc avoir un réel effet bénéfique. Par analogie, la diaminopyrimidine étant un mime de la 2,6-diaminopurine, il serait donc intéressant d'étudier quel serait l'effet de la substitution de l'amine en position 4 de la pyrimidine par un autre groupement (Figure 44).

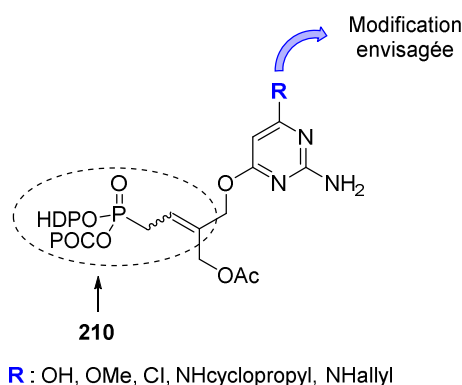


Figure 44. Molécules visées

Si le phosphonate **210** a été préparé précédemment, il faut dans cette série préparer chaque synthon diaminopyrimidine séparément. En effet, la rétrosynthèse est la même que précédemment, présentant comme première étape la substitution de la pyrimidine par le 2-méthylène-1,3-propanediol.

➤ Préparation des nucléobases non canoniques

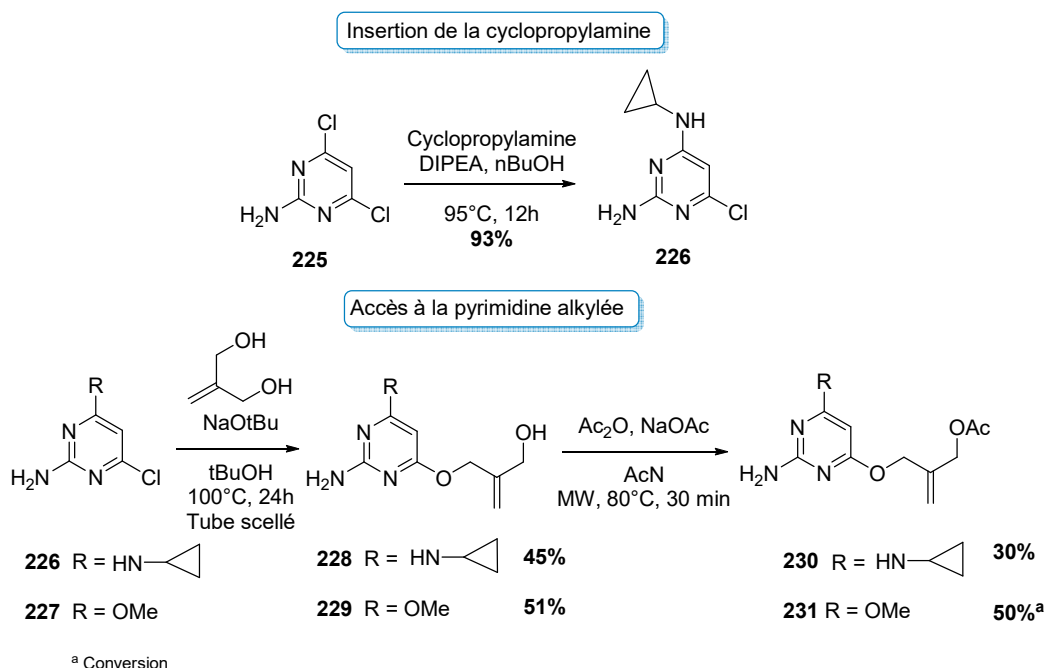


Schéma 67. Synthèse de pyrimidines libres acétylées

Selon le schéma synthétique prévu, les groupements hydroxyle et allylamine en position C⁴ sont insérés à la dernière étape par substitution nucléophile du chlore dans la dernière étape (Schéma 67). En effet, dans les séries d'ANPs précédemment synthétisés au laboratoire, l'insertion du groupement hydroxyle se fait

avec succès dans l'acide formique aqueux. Quant à l'allylamine, les divers essais d'introduction sur des purines conventionnelles n'ont pas été concluants (voir chapitre 1). Une pyrimidine portant ce motif n'est pas non plus préconisée pour une réaction de métathèse, car portant un groupement allyle en position C⁴, la réaction de métathèse s'effectuerait préférentiellement sur cette position par rapport à l'oléfine 1,1-disubstituée. Toutefois, les autres groupements ne présentant pas ce risque (OMe et cyclopropylamino) peuvent être introduits en début de synthèse.

Si la 2-amino-4-méthoxy-6-chloropyrimidine **227** est commerciale, ce n'est cependant pas le cas de son analogue cyclopropyle **306**. Les conditions développées par l'équipe de Scobie décrivent la synthèse de ce type de noyau.¹¹⁰ Après 12h à reflux du solvant, le produit **226** est obtenu avec un très bon rendement de 93%, sans traces d'hétérocycles triaminés. Les composés **226** et **227** sont par la suite tous deux engagés dans une réaction de O-alkylation avec le 2-méthylène-1,3-propanediol. Malgré des conditions assez dures, et l'échelle des deux réactions assez faibles, les composés ne sont obtenus qu'avec des rendements assez moyens de 45 à 51%, en partie dû à la production de dipyrimidine provoqué par la disubstitution du diol de départ. Par la suite, l'acétylation se fait en présence d'anhydride acétique, d'acétate de sodium dans l'acétonitrile sous irradiation micro-onde. Encore une fois, les rendements restent très moyens, dus à un manque de sélectivité de la réaction menant aux composés **230-231**. Pourtant dans les mêmes conditions que précédemment, une monoacétylation est aussi observée sur les exo-amines des hétérocycles dans ce cas, ce qui fait chuter le rendement de manière drastique et qui empêche une isolation efficace du composé **231** (Schéma 67).

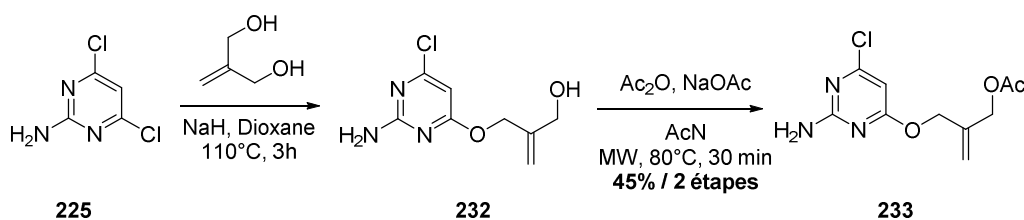


Schéma 68. Formation de la chloropyrimidine acétylée

Dans le cas où la pyrimidine de départ présente deux groupements équivalents (2 positions chlorées dans ce cas), et où elle est mise en réaction avec un composé présentant un diol, les conditions expérimentales avec le *tert*-butanolate de sodium dans le *tert*-butanol ne peuvent pas être appliquées, dû à l'excès de diol appliqué qui provoquerait une polysubstitution sur la nucléobase. Les conditions sont donc adaptées dans le but de n'utiliser qu'un équivalent strict de chaque réactif, afin de limiter au maximum la création de sous-produits indésirables. Le diol est monodéprotoné par de l'hydruure de sodium, et intervient par la suite dans une réaction de substitution nucléophile sur la pyrimidine **225**. Après deux purifications, l'hétérocycle alkylé **232** est toujours en mélange avec de la dipyrimidine issue d'une double alkylation du diol. Afin de permettre une purification plus aisée, l'acétylation subséquente permet d'obtenir l'acétate **233** avec un rendement correct de 45% sur deux étapes (Schéma 68).

¹¹⁰ Scobie, M., Diaminopyrimidines as MTH1 inhibitors for treatment of inflammatory and autoimmune conditions and their preparation, WO2015187089 (A1) 2015-12-10

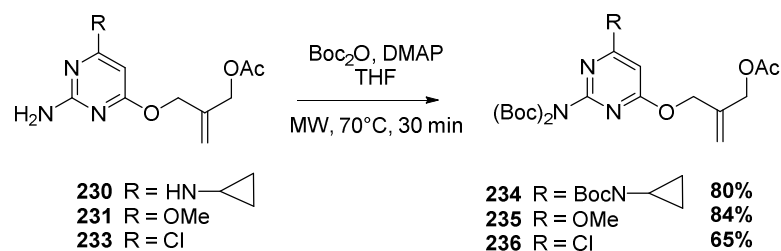


Schéma 69. Perprotection de la molécule par des *tert*-butoxycarbonyles

La préparation des oléfines disubstituées est finalisée par une *perprotection* de la molécule par des groupements carbamates de type Boc. Après 30 minutes d'irradiation micro-ondes à 70°C, les composés **234** à **236** sont isolés avec des rendements variant entre 65 et 84% (Schéma 69).

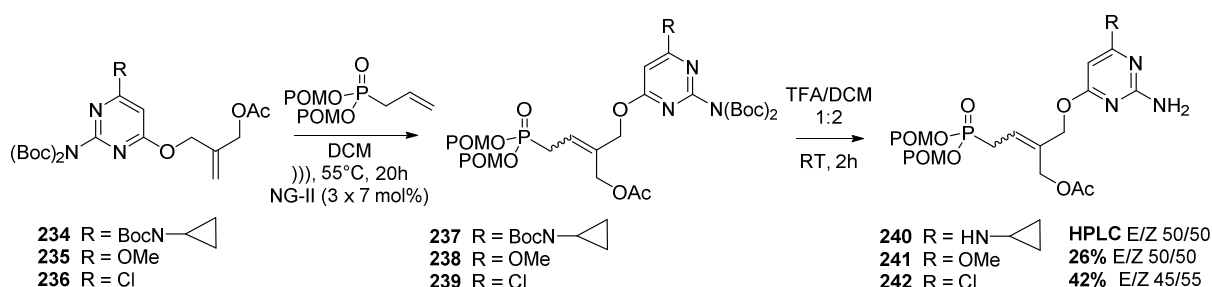


Schéma 70. Métathèse et déprotection des carbamates

La méthodologie de synthèse reportée précédemment est appliquée. Les composés **237** à **239** sont obtenus par le couplage organo-métallique au ruthénium, mais ne sont pas isolés. En effet, après plusieurs purifications à l'aide de systèmes d'élution différents, des impuretés coéluent toujours avec les ANPs protégés, et notamment le dimère de phosphonate. Cependant, après déprotection des groupements carbamates, l'augmentation très nette de polarité permet de séparer facilement les composés finaux **240** à **242** des impuretés présentes dans le milieu. Une purification par HPLC est toutefois requise pour le composé **240**, afin d'obtenir une pureté optimale dans l'optique des évaluations biologiques (Schéma 70).

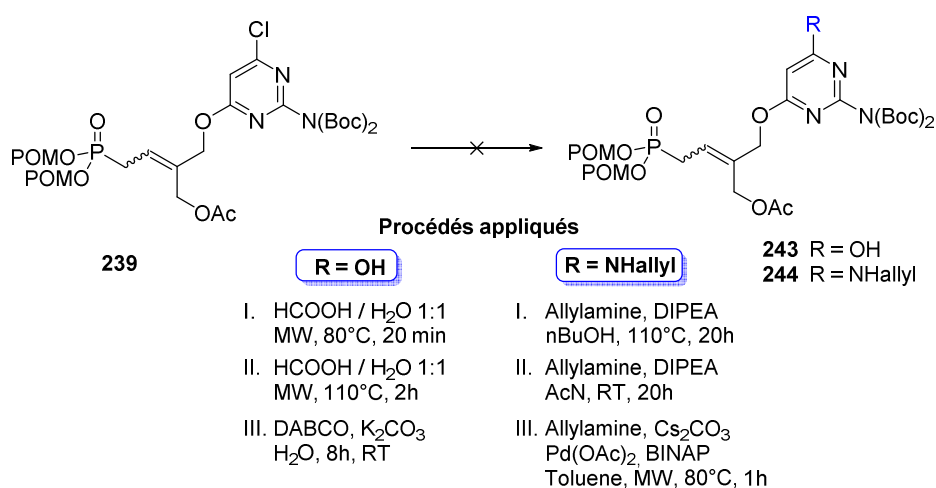


Schéma 71. Réactivité de la position C⁴ sur l'intermédiaire **319**

En revanche, toutes tentatives dans l'obtention des composés oxydés **243** ou allylamino **244** se sont soldées par des échecs. L'obtention du composé **243** s'est révélée impossible en présence d'acide formique

aqueux, contrairement à leurs analogues puriques aboutissant quantitativement à la guanine dans ces conditions. D'autres conditions, développées par Holy *et coll.* qui mettent en présence le 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), le K_2CO_3 en présence de pyrimidine, ne fonctionnent pas dans notre cas.^{91b} Dans tous ces précédents cas, la position chlorée reste intacte et ne s'oxyde jamais en l'alcool voulu. Des échecs sont aussi constatés lors des tentatives d'introductions d'allylamine par substitution nucléophile, qui vont réagir préférentiellement sur les phosphonates plutôt que sur la nucléobase. Un dernier essai est réalisé dans les conditions de Buchwald, couplage connu pour pouvoir accéder à des positions peu réactives, sans plus de succès puisqu'aucune conversion n'est observé en RMN et en MS (Schéma 71).¹¹¹

Toute cette série de composé est actuellement en cours d'évaluation biologique.

iii. Résultat en série alkényle-O-2,6-diaminopyrimidine non substitués

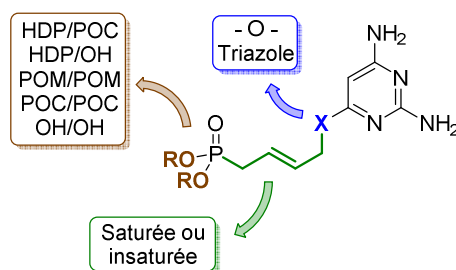


Figure 45. Modulation envisagée du nucléoside

Sur les différentes molécules traitées précédemment, les activités antivirales se sont avérées être très puissantes sur plusieurs virus comme le VZV, CMV, HSV ou même VV. Par conséquent, il est intéressant de développer la série sans le groupement acétoxy.

Dans ce but, plusieurs alternatives sont envisagées (Figure 45):

- Les prodrogues biolabiles : En vue de confirmer ou d'infirmer la prévalence des prodrogues mixtes HDP/POC par rapport aux carbonyloxyméthyles POM et POC sur les activités biologiques, cette série sera développée sous ces différentes formes.

- La nature de la chaîne acyclique : la taille de l'espaceur sera modulée entre trois et cinq chaînons. Il est aussi possible d'obtenir la chaîne saturée à l'aide d'une hydrogénolyse et de comparer l'activité de cette molécule avec son analogue insaturé moins flexible.

- Le remplacement de l'atome d'oxygène reliant la pyrimidine au phosphonate ramifié par un triazole. En effet, plusieurs travaux ont déjà été menés au laboratoire prouvant la potentialité de cet hétérocycle, par la synthèse de composés *bis*(POM)phosphonate but-2'-ényle triazole, présentant une bonne inhibition sur HCV (~ 90% à 10 μ M pour une CC_{50} moyenne de 80 μ M sur les lignées cellulaires PBM, CEM et Vero)^{50c}

¹¹¹ Wolfe, J. P. & Buchwald, S. L. Scope and Limitations of the Pd/BINAP-Catalyzed Amination of Aryl Bromides. *J. Org. Chem.* **65**, 1144–1157 (2000).

➤ Synthèse des ANPs

L'extension de la méthode développée dans la préparation des diaminopyrimidines oléfiniques a été appliquée aux autres nucléobases dans le but d'obtenir les différents acyclonucléotides visés.

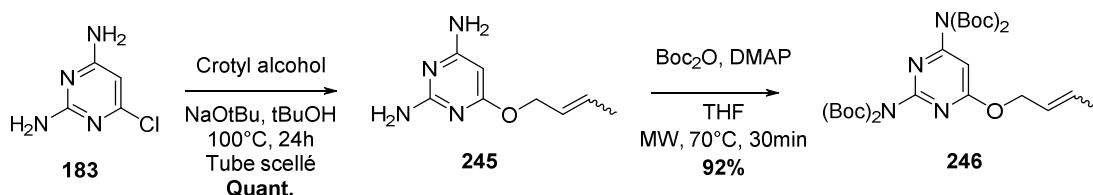


Schéma 72. Préparation des noyaux hétérocycliques pré-métathèse

La préparation de la diaminopyrimidine crotylée nécessaire à l'étape clef du couplage de métathèse a été réalisée par substitution entre la chloropyrimidine **183** et l'oléfine hydroxylée correspondant. Elle se déroule en présence de *tert*-butoxyde de sodium dans le *tert*-butanol pendant 24h à 100°C, permettant l'obtention quantitative de l'hétérocycle. La base nucléique est ensuite *perprotégée* à l'aide de *tert*-butoxycarbonyl produisant l'oléfine **246** à engager dans la réaction de métathèse (Schéma 72).

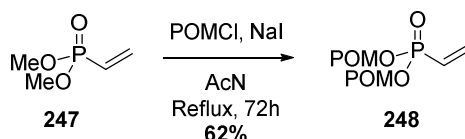
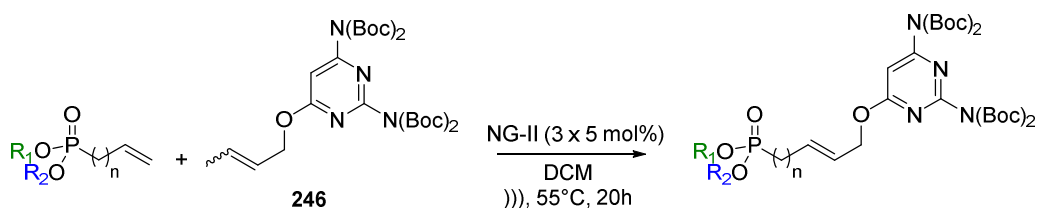


Schéma 73. Préparation du phosphonate vinylique

Quand au phosphonate vinylique, il est préparé de la même façon que son analogue allylique, par réaction avec le chlorométhylpivalate en présence d'iodure de sodium et d'acétonitrile dans des conditions strictement anhydres (Schéma 73).

Tableau 25. Obtention des ANP visés sous forme POC/POC et HDP/POC



Entrée	R ₁	R ₂	n	Equivalents (Phosphonate - base)	Rendement
1	POM	POM	0	2 - 1	31%
2	POM	POM	1	2 - 1	43%
3	POM	POM	2	2 - 1	39% ^a
4	HDP	POC	1	2 - 1	41% ^a
5	POC	POC	1	2 - 1	36% ^a

^a Conversion

Entrée 1 à 3 : La crotylpyrimidine est couplée avec le phosphonate correspondant en présence d'une charge catalytique de 15 mol% de catalyseur de Nolan-Grubbs II ajoutée séquentiellement, dans le dichlorométhane et sous ultrasons. Les nucléosides comportant des espaceurs comprenant entre 3 et 5 chaînons sont alors obtenus avec des rendements entre 31 et 43%. En effet, les oléfines de type II comme l'hétérocycle crotylé s'engagent beaucoup plus facilement dans le cycle catalytique, entraînant une nette hausse du rendement (Tableau 25).

Entrée 4 et 5 : Les couplages métallo-catalysés suivants sont effectués à partir de crotylpyrimidine avec les prodrogues HDP/POC et POC/POC. Cette réaction est conduite dans les mêmes conditions, sous sonication durant 20h, pour aboutir après purification à des rendements calculés respectifs de 41 et 36%. Il est important de noter que dans tous ces cas, le phosphonate est mis en excès par rapport à l'hétérocycle azoté.

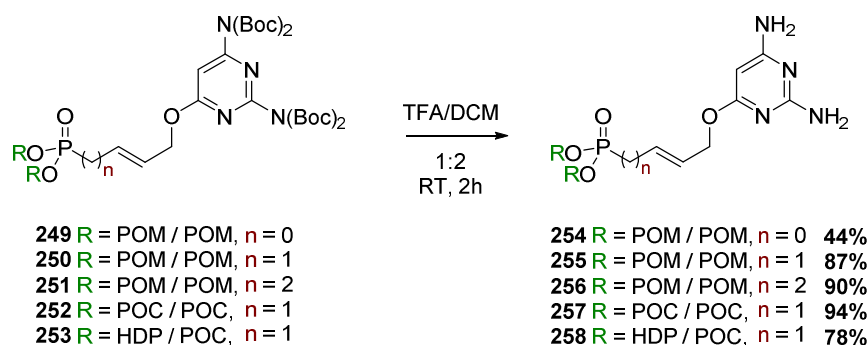


Schéma 74. Déprotection à l'acide trifluoroacétique

Dans une dernière étape, les groupements carbamates sont déprotégés par l'action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Après 2 heures à température ambiante, les ANPs correspondants sont obtenus avec des rendements compris entre 44 et 93% (Schéma 74).

En ce qui concerne le composé **256**, les conditions employées pour la déprotection des groupements carbamates entraînent aussi la déprotection des sous produits présents. Une analyse bidimensionnelle en RMN montre très clairement qu'il ne s'agit pas d'un mélange *cis/trans*. Après une première purification sur colonne de silice, le mélange de produits fut soumis à des analyses de masse haute résolution. De façon surprenante, ces espèces ont été identifiées comme étant le composé **256**, et des analogues présentant un CH₂ de plus et de moins. Il est nécessaire de faire des séparations HPLC sur ces composés, qui sont impurifiables en chromatographie par colonne de silice classique. Le composé **256** est ensuite isolé avec un rendement global de 35% sur deux étapes.

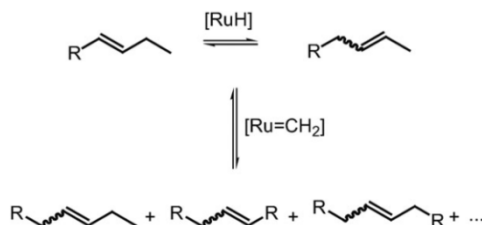


Schéma 75. Séquence d'isomérisation/de métathèse ¹¹²

¹¹² Consorti, C. S., Aydos, G. L. P. & Dupont, J. Tandem isomerisation-metathesis catalytic processes of linear olefins in ionic liquid biphasic system. *Chem. Commun.* **46**, 9058–9060 (2010).

Après une recherche approfondie dans la littérature, plusieurs exemples ont été reportés, expliquant ce type de phénomène (Schéma 75).¹¹² Les sous produits issus de la dégradation du ruthénium (dans leurs cas, principalement des hydrures) exercent un rôle d'isomérisation des alcènes, qui s'engagent par la suite dans des réactions de métathèse et qui donnent donc naissance à des espèces possédant un CH₂ de moins ou en plus.¹¹³

Pour finir cette série d'acyclonucléotides, dans le but d'obtenir une molécule dans la série HDP/OH, le phosphonate mixte **258**, comportant un HDP et un POC, est traité en conditions basiques à l'aide d'hydroxyde de sodium 0.1M pendant 5 heures, libérant le composé **259** HDP/OH. La polarité induite par ce groupement ne permet qu'une purification sur phase inverse, effectuée sur HPLC (Schéma 76).

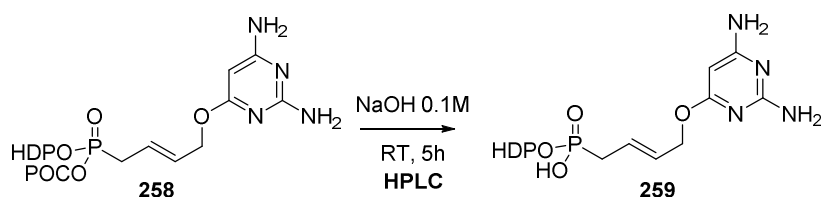


Schéma 76. Clivage du groupement biolabile POC

Dans le but d'étudier les cinétiques de di- et tri-phosphorylation de nos composés sur les kinases humaines et virales, la synthèse de l'acide phosphonique correspondant est envisagée à partir du diméthylallylphosphonate suivant le même schéma synthétique que précédemment.

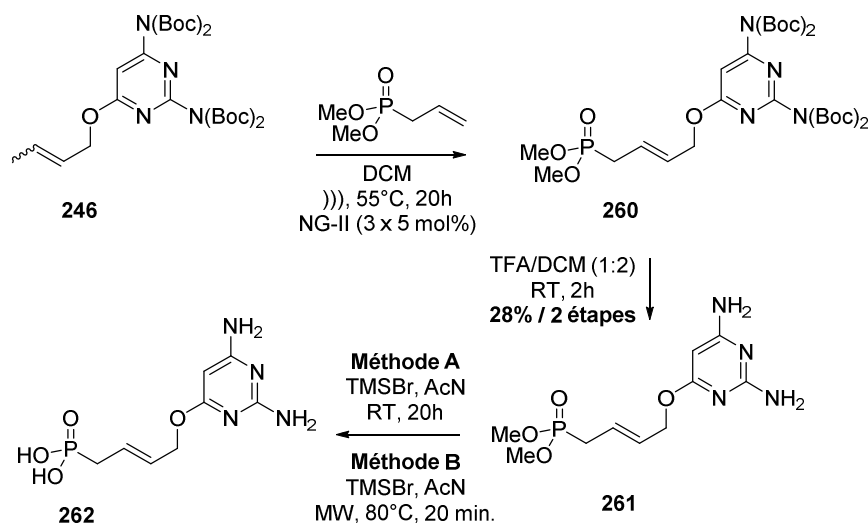


Schéma 77. Synthèse du composé **262**

La réaction de métathèse est effectuée entre la crotylpyrimidine **246** et le diméthylallylphosphonate sous ultrasons en présence du catalyseur de Nolan-Grubbs, conduisant au composé **260**. Sans être isolé, le produit est engagé dans l'étape de déprotection dans des conditions acides, menant à la perte des groupements *tert*-butoxycarbonyles avec un rendement de 28% sur 2 étapes. La dernière étape est la déprotection des méthoxy présents sur le composé **261** par 6 équivalents de bromure de triméthylsilane

¹¹³ (a) McGrath, D. V. & Grubbs, R. H. The mechanism of aqueous ruthenium(II)-catalyzed olefin isomerization. *Organometallics* **13**, 224–235 (1994). (b) Michalak, M. & Wicha, J. Efficient Olefin Isomerization-Ring-Closing Metathesis Reaction in Sterically Hindered Systems: Study on Simultaneous Use of the Grubbs Metathesis and Ruthenium Hydride Isomerization Catalysts. *Synlett* 2277–2280 (2005). (c) Dragutan, V. & Dragutan, I. A resourceful new strategy in organic synthesis: Tandem and stepwise metathesis/non-metathesis catalytic processes. *J. Organomet. Chem.* **691**, 5129–5147 (2006).

dans l'acétonitrile. Deux méthodes furent tentées, tout d'abord dans des conditions douces, pendant 20 heures à température ambiante, et dans un second temps par irradiation micro-ondes pendant 20 minutes à 80°C (Schéma 77). Ces deux méthodes mènent à un mélange de quatre produits comportant un acide phosphonique, déterminés par RMN du phosphore. La dégradation des groupements méthoxy pouvant peut être interagir avec le nucléotide, nous nous sommes tournés vers un autre groupement protecteur, le groupement *isopropyle*.

Une méthode simple et efficace de déprotection des groupements *isopropyles* présents sur les acyclonucléosides phosphonates a été décrite par l'équipe de Janeba.¹¹⁴ Ce procédé présente l'avantage d'être polyvalent, puisque par un simple traitement acide aux micro-ondes, l'obtention de l'acide phosphonique est obtenu après une filtration. Afin de vérifier l'efficacité de leur méthode sur nos composés allylés, différents de ceux comportant un pont éther, il a été décidé de comparer les différentes méthodes sur l'intermédiaire **263** (Schéma 78).

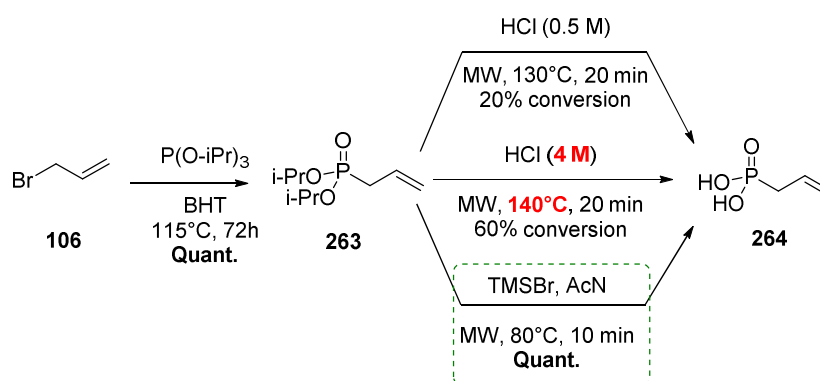


Schéma 78. Déprotection des *isopropyles* du phosphonate

Le produit de départ **263** est synthétisé par réaction de Michaelis-Arbuzov après l'activation de cette réaction sans solvant pendant 72h à 115°C (Schéma 78).¹¹⁵ La méthode éco-compatible décrite par Janeba n'aboutit dans ces conditions qu'à une très faible conversion de 20%, le reste du produit n'étant pas hydrolysé par les conditions acides. Le renforcement de ces conditions avec de l'acide chlorhydrique 4M avec des conditions renforcées aux micro-ondes (140°C, 20min) n'aboutissent toujours pas à une conversion totale, mais se limitant à 60%. Finalement, les conditions de déprotections usuelles au bromure de triméthylsilane ont dans ce cas démontré un fort potentiel, puisqu'après seulement 10 minutes à 80°C, et d'un traitement eau/éthanol sous sonication,¹¹⁶ le produit est obtenu sous forme de solide blanc avec un rendement quantitatif.

¹¹⁴ Jansa, P., Baszczyński, O., Procházková, E., Dračinský, M. & Janeba, Z. Microwave-assisted hydrolysis of phosphonate diesters: an efficient protocol for the preparation of phosphonic acids. *Green Chem.* **14**, 2282–2288 (2012).

¹¹⁵ Gharakhanian, E. G. & Deming, T. J. Versatile Synthesis of Stable, Functional Polypeptides via Reaction with Epoxides. *Biomacromolecules.* **16**, 1802–1806 (2015).

¹¹⁶ Jansa, P. *et al.* An efficient microwave-assisted synthesis and biological properties of polysubstituted pyrimidinyl- and 1,3,5-triazinylphosphonic acids. *Tetrahedron.* **68**, 865–871 (2012).

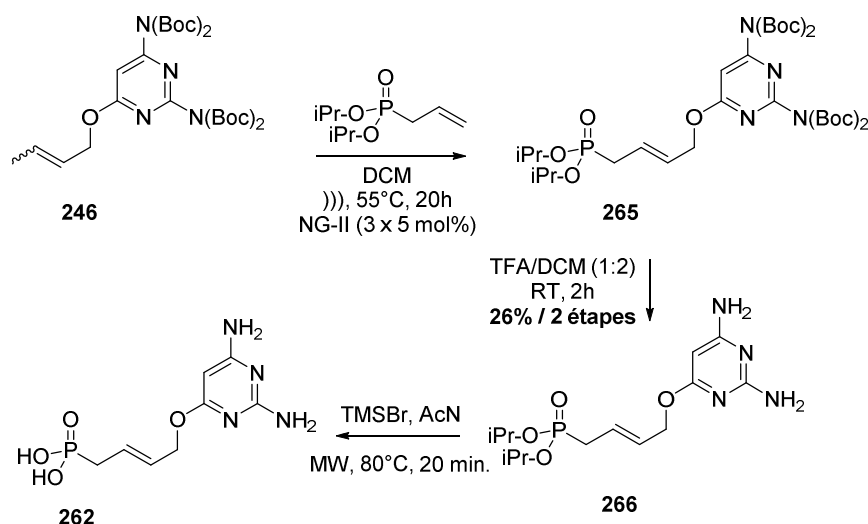


Schéma 79. Alternative dans la synthèse du composé **262**

Les deux premières étapes sont constituées d'une réaction de métathèse entre l'*isopropylphosphonate* et l'hétérocycle correspondant. La déprotection ultérieure des groupements Boc à l'acide trifluoroacétique permet d'obtenir l'oléfine **266** avec un rendement global de 26% sur deux étapes, proche de celui obtenu dans le cadre de la synthèse de méthoxyphosphonate comportant le motif DAPY. La déprotection des *isopropyles* dans les conditions optimisées précédemment aboutit à une dégradation partielle de la charpente du nucléoside, donnant 4 produits comportant un acide phosphonique. Une isomérisation de la double liaison sur la chaîne (en position vinylique ou allylique) ainsi qu'une possible coupure de la liaison C-O en présence de base, nous oblige donc à utiliser d'autres méthodes plus douces dans l'optique de l'obtention du composé **262** avec un rendement acceptable (Schéma 79).

Une autre possibilité serait de reprendre le protocole utilisé dans la monodéprotection de la prodrogue mixte HDP/POC. En effet, cette réaction ne requière que la présence d'une base très diluée comme l'hydroxyde de sodium en concentration 0.1M. Ces conditions, beaucoup plus douces qu'un large excès de bromure de triméthylsilane, pourraient permettre la formation de l'acide phosphonique attendu.

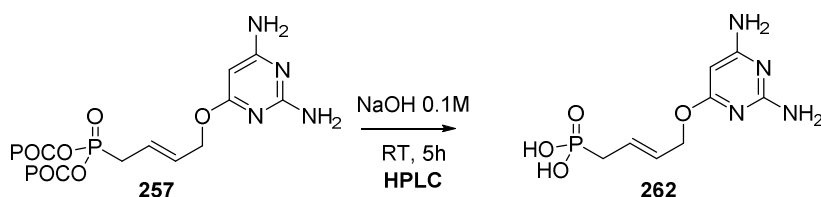


Schéma 80. Déprotection des groupements carbonates

Les groupements carbonates se clivent doucement dans ces conditions. Etant donné la sensibilité de la charpente nucléotidique sous sa forme acide phosphonique, les volatiles sont évaporés sous vide à froid afin de statuer sur l'aboutissement de cette réaction (Schéma 80). Si dans ce cas, le produit **262** semble être présent en majorité, une analyse LC-MS du brut réactionnel semble confirmer l'apparition d'isomères de positions. En effet, quelques pics correspondant à la masse souhaitée sont présents dans plusieurs pics du spectre de LC. Il est donc décidé de purifier cet acide phosphonique par HPLC sur phase inverse, dans le but d'isoler l'ANP convoité.

Afin d'évaluer l'impact de l'insaturation bloquant la configuration de cette chaîne acyclique sur les enzymes visées, il est envisagé de synthétiser un ANP à chaîne acyclique saturée. La comparaison entre les résultats biologiques des deux analogues montrera si cette double liaison a un réel effet ou si elle peut être sujette à d'autres modulations dans le but d'augmenter son potentiel thérapeutique.

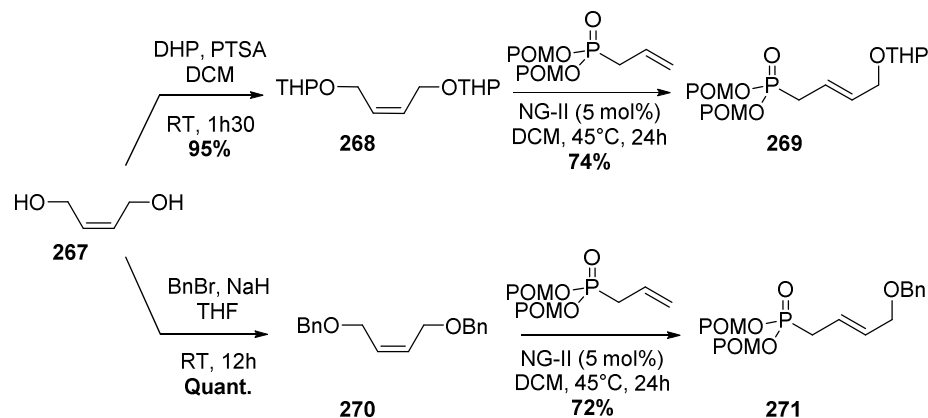


Schéma 81. Préparation des phosphonates - hydroxy protégés

La synthèse envisagée passe par la formation d'alcools terminaux et la substitution des DAPY par ces alcools, ou plus simplement la bromation de ces positions et la substitution par les alcools du DAPY. Dans ce but, le *cis*-but-2-ène-1,4-diol est protégé par des groupements pyranes¹¹⁷ et benzyles,¹¹⁸ qui supportent très bien les conditions de métathèse et présentant une introduction et un clivage aisé. Une fois les oléfines **269** et **271** en main, la réaction de métathèse est effectuée dans des conditions classiques, par chauffage classique pendant 24h à 45°C, avec seulement 5 mol% de catalyseur. En effet, lors d'un couplage d'un alcène de type I à un type II, il n'est pas absolument nécessaire de recourir à la technologie de sonication, les rendements étant déjà très convenables sans cette dernière avec une charge catalytique relativement faible (Schéma 81).

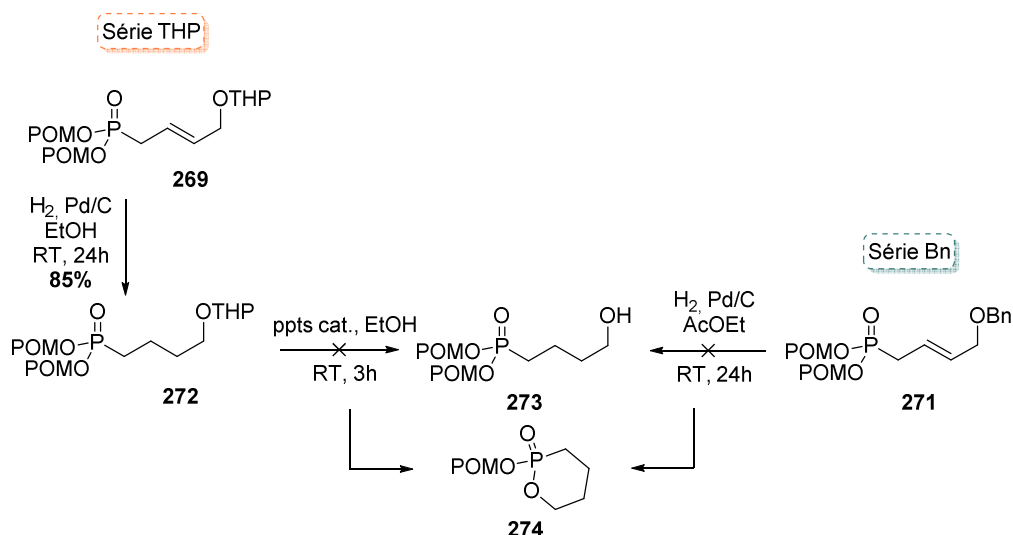


Schéma 82. Réaction parasite dans la formation du phosphonate 290

¹¹⁷ Denmark, S. E., Kobayashi, T. & Regens, C. S. Total synthesis of (+)-papulacandin D. *Tetrahedron* **66**, 4745–4759 (2010).

¹¹⁸ Nishizono, N. *et al.* Synthesis of thietane nucleoside with an anomeric hydroxymethyl group. *Tetrahedron* **67**, 358–363 (2011).

Afin de préparer la chaîne saturée portant le groupement alcool, le phosphonate portant le tétrahydropyrane **269** subit dans un premier temps l'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon, puis la déprotection du pyrane **272** en présence de pyridinium *para*-toluène sulfonate (ppts) (Schéma 82). En série benzyle, une simple hydrogénolyse suffit à déprotéger et hydrogéner la double liaison du composé **288**. Néanmoins, les deux méthodes n'aboutissent pas au composé visé **273**, mais au cycle **274** (Schéma 82).

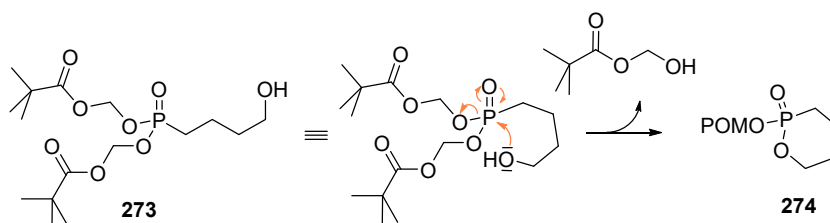


Schéma 83. Transestérification intramoléculaire

L'hypothèse formulée basée sur ce résultat est que l'intermédiaire **273** est effectivement formé, mais aussitôt engagé dans une réaction de transestérification, libérant momentanément de l'hydroxyméthyl-pivalate (hydrolysé ou non en fonction des conditions), et le cycle **274** (Schéma 83).

Du fait de la cyclisation du composé, cette approche semble donc obsolète. Une alternative synthétique consisterait à effectuer la synthèse du composé **255** et de l'hydrogéner dans des conditions classiques par traitement sur palladium sur charbon, pendant 24 heures à température ambiante dans l'acétate d'éthyle. Cependant aucune conversion n'a été remarquée, ce qui peut être dû à la présence de groupements aminos sur la pyrimidine. Dans un second temps, il est donc décidé de réaliser cette hydrogénation dans les mêmes conditions sur le phosphonate protégé avec des groupements Boc. Cette fois ci, un produit portant une chaîne saturée est isolé, mais cette molécule ne possède plus que deux groupements carbamates. L'hypothèse la plus probable est que la solution légèrement acide a pu provoquer le départ d'un des deux groupements *tert*-butoxycarbonyl, produisant le phosphonate saturé **276** avec un rendement moyen de 55%. Les deux groupements protecteurs restant sont clivés en conditions acides, à l'aide d'acide trifluoroacétique dilué dans du dichlorométhane, formant le phosphonate saturé sous sa forme diamino **275** (Schéma 84).

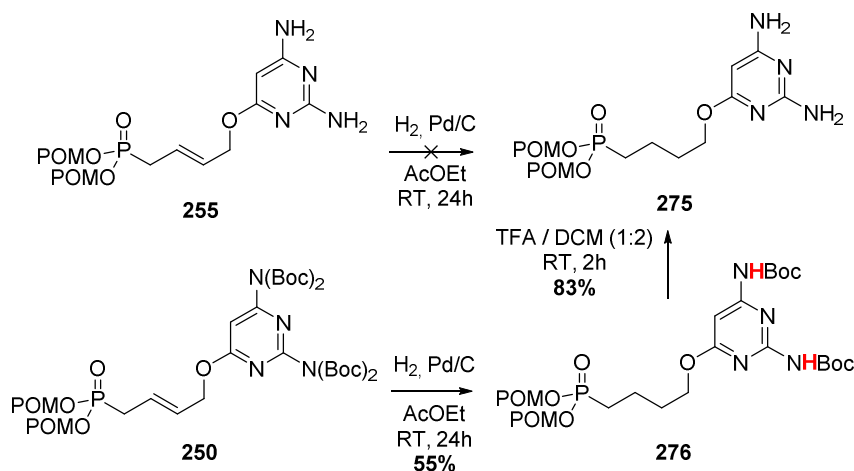


Schéma 84. Synthèse de l'ANP saturé portant un motif DAPY

Pour finir, nous allons étudier l'importance du lien entre la chaîne insaturée et la diaminopyrimidine. Assurée jusqu'ici par un pont éther, il pourrait être intéressant d'imaginer d'autres motifs, comme un triazole. En effet, cette charpente a déjà montré un intérêt thérapeutique tout particulier dans les séries de nucléosides acycliques synthétisés précédemment au laboratoire, et présente l'avantage d'être facile d'accès à l'aide de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, plus connue sous le nom de chimie "click". De manière générale, cette réaction est catalysée par une espèce métallique à base de cuivre, entre un azoture et un alcyne, de façon à former le triazole.

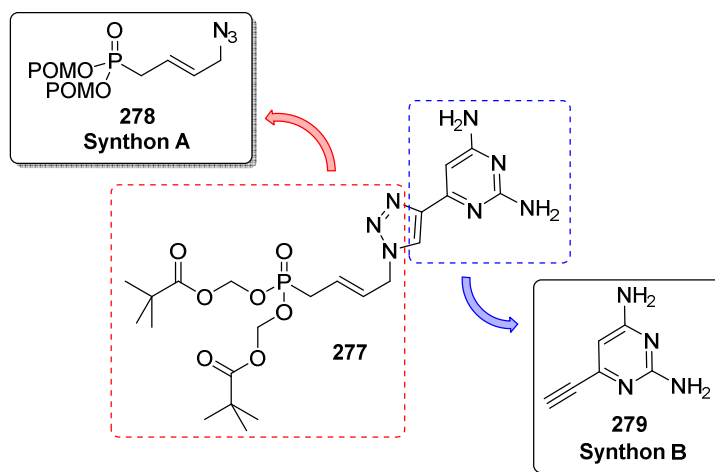


Figure 46. Structure recherchée

En remplaçant l'oxygène qui lie la diaminopyrimidine à la chaîne phosphonate par un lien triazole, le phosphonate résultant est représenté par le composé **277** (Figure 46). Il peut correspondre au résultat d'une réaction click entre le synthon A, l'azidobutényle phosphonate dont la synthèse a déjà été effectuée au laboratoire,^{50c} et le synthon B qui est le composé 2,4-diamino-6-éthynylpyrimidine décrit par l'équipe de Holy.¹¹⁹

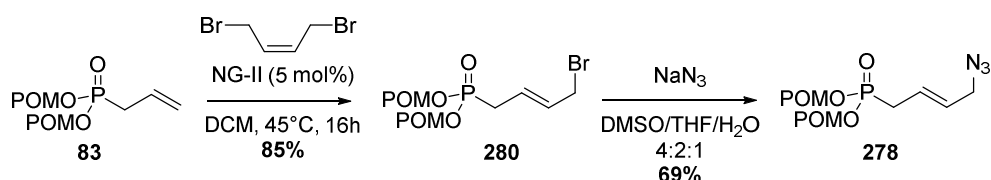


Schéma 85. Synthèse du phosphonate

Dans un premier temps, nous nous attachons à la synthèse du phosphonate, réalisable en 2 étapes à partir du *bis*(POM)allylphosphonate. La première étape consiste en un couplage de métathèse avec le 1,4-dibromobut-2-ène, activé par chauffage classique en présence de 0.05 équivalents de catalyseur de Nolan-Grubbs II. Le composé bromé **280** est formé avec un très bon rendement de 85%. Ce brome est ensuite substitué par un azoture, en présence de son sel de sodium dans un mélange de solvant DMSO/THF/H₂O dans des proportions 4:2:1. Après 24h de réaction à température ambiante, l'azoture formé **278** est observé *via* des analyses infrarouges et isolé avec un rendement de 69% (Schéma 85). Il est à noter que cet azoture est parfaitement stable sur paillasse et peut être synthétisé à l'échelle du gramme.

¹¹⁹ Hocková, D., Holý, A., Masojídková, M. & Votruba, I. An efficient synthesis of cytostatic mono and bis-alkynylpyrimidine derivatives by the Sonogashira cross-coupling reactions of 2,4-diamino-6-iodopyrimidine and 2-amino-4,6-dichloropyrimidine. *Tetrahedron* **60**, 4983–4987 (2004).

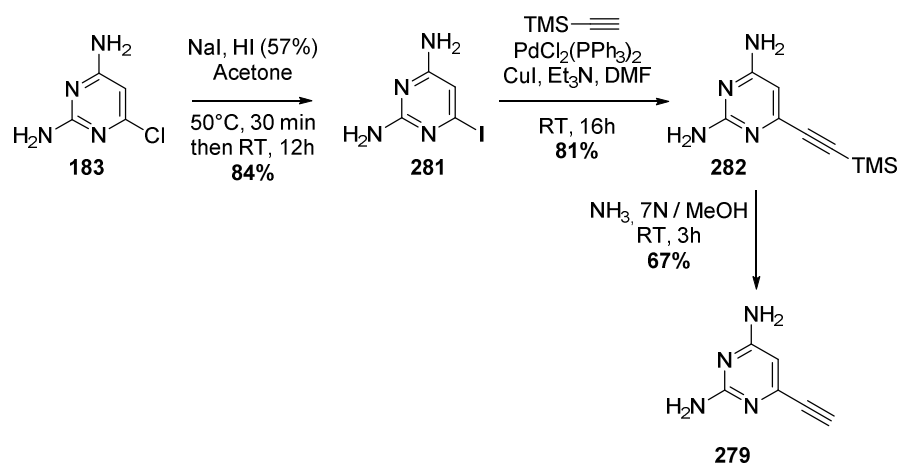


Schéma 86. Synthèse de l'éthynylDAPY

Par la suite, la synthèse de la pyrimidine portant le motif alcyne **279** est effectuée en trois étapes qui consistent successivement en une iodation, une réaction de Sonogashira puis une déprotection du groupement silylé sur l'alcyne. Tout d'abord, l'iodation peut être réalisée sur la pyrimidine chlorée, en la mettant en réaction avec de l'acide iodhydrique aqueux et de l'iodure de sodium dans l'acétone. Après 30 minutes à 50°C, puis 12h à température ambiante, l'iodopyrimidine est isolé après une simple filtration et extraction avec un bon rendement de 84%.¹²⁰ Ce composé est à garder à l'abri de la lumière, de l'humidité et à conserver à froid pour éviter toute dégradation. Cette iodopyrimidine est un excellent partenaire de Sonogashira et en présence d'un partenaire palladé et cuivré (sous les formes de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ et CuI), d'une base et de l'éthynyltriméthylsilane commercial, ce couplage permet la création du silane **282**. La dernière étape est par conséquent la déprotection du groupement triméthylsilane en conditions basiques, par la présence d'ammoniac méthanolique 7N, qui permet le clivage du silane. Comme le composé iodé **281**, l'alcyne vrai **279** possède une instabilité assez marquée et a besoin des mêmes conditions de stockage afin d'éviter toute dégradation (Schéma 86).

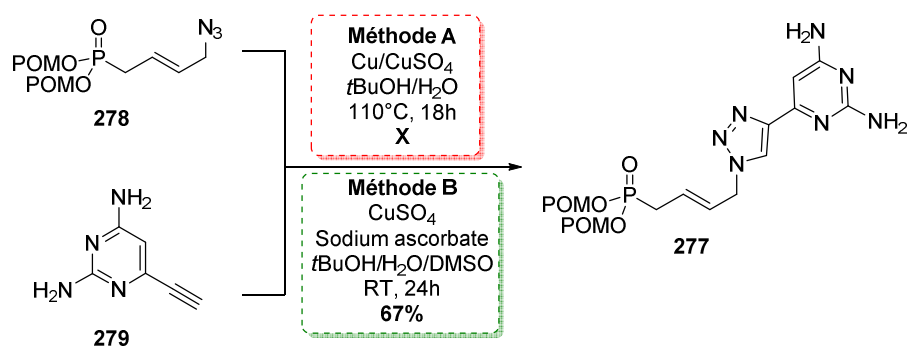


Schéma 87. Obtention du composé **295** par cycloaddition 1,3-dipolaire

De façon à réaliser la réaction "click", la première méthode employée fut celle développée au laboratoire pour former des ANPs,^{50c} avec comme source de métal le cuivre natif et sous sa forme sulfate, dans le mélange $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$. Après 18 heures à 110°C, aucune conversion n'est observée. Une deuxième méthode utilise le sulfate de cuivre, mais cette fois-ci en présence de sodium ascorbate dans un mélange ternaire

¹²⁰ Doláková, P., Masojídková, M. & Holy, A. Efficient Synthesis of Pyrimidinecarbonitriles and Their Derivatives. *Heterocycles* **71**, 1107 (2007).

tert-butanol/eau/diméthylsulfoxyde.¹²¹ Cette fois ci, le composé **277** est obtenu avec un rendement de 67% (Schéma 86).

Cette série est par la suite envoyée en tests biologiques afin d'évaluer l'efficacité de ces molécules.

➤ Evaluation biologique

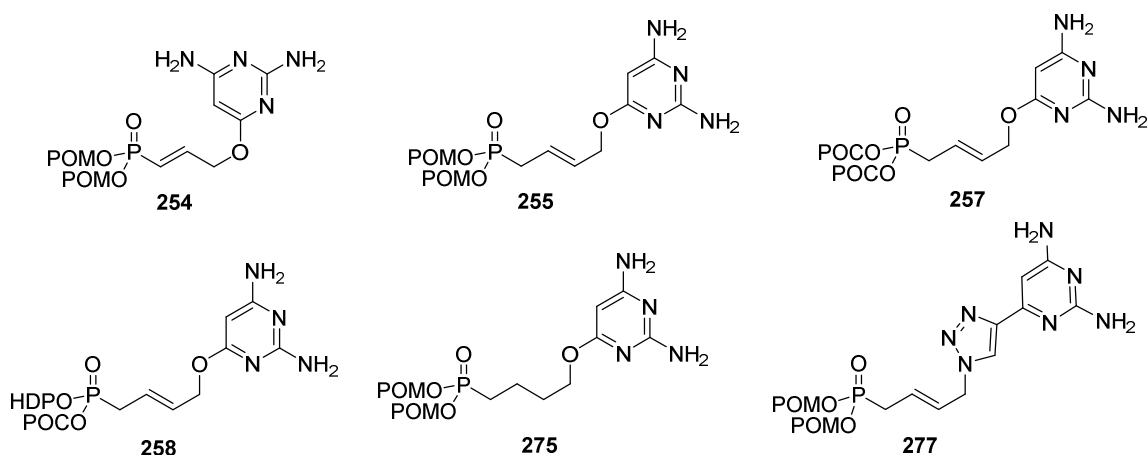


Figure 47. Composés les plus actifs

Tableau 26. Evaluations biologiques sur les virions VZV et CMV

Composé	EC ₅₀ (μM) ^a						MCC ^b (μM)	CC ₅₀ ^c (μM)
	TK+ VZV	TK+ VZV	TK- VZV	TK- VZV	CMV	CMV		
	(YS)	(OKA)	(07/1)	(YS/R)	(AD-169)	(Davis)		
254	-	76.5	-	-	-	-	>100	>100
255	2.40 ± 1.60	0.8	1.40 ± 0.40	1.7	44.7	44.7	>100	5.1
257	ND	0.86 ± 0.72	1.25 ± 0.64	ND	44.72	36.57	100	>100
258	ND	0.18 ± 0.06	0.24 ± 0.08	ND	7.08 ± 1.86	7.26 ± 0.92	100	14.49 ± 1.74
275	ND	4.45 ± 2.86	44.72	ND	44.72	> 20	100	-
277	ND	47.19	-	ND	-	76.47	100	-
Acyclovir	1.94 ± 0.03	2.5 ± 0.3	92 ± 70	66 ± 14	-	-	> 300	470
Ganciclovir	-	-	-	-	7.5 ± 2.3	7.1 ± 0	> 350	130 ± 86
Brivudine	0.026	0.0087	12	85 ± 20	-	-	> 150	> 100
Cidofovir	-	-	-	-	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50%.

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

¹²¹ Gehringer, M., Forster, M. & Laufer, S. A. Solution-Phase Parallel Synthesis of Ruxolitinib-Derived Janus Kinase Inhibitors via Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *ACS Comb. Sci.* **17**, 5–10 (2015).

Dans le tableau ci-contre ne sont représentés que les résultats significatifs. Les composés présentant une chaîne acyclique à 3 et 5 carbones sont beaucoup moins actifs que leurs analogues but-2'-ényle en série *bis*(POM). Les composés **257** et **258** présentent des activités comprises entre 0.1 et 1 µM sur toutes les souches de VZV, avec un indice de sélectivité globale entre 60 et 100, ce qui est bien mieux que les résultats de sélectivité obtenus en série *bis*(POM) (composé **255**), avec des activités comparables. Cependant, si ces molécules sont efficaces, ces activités restent toutefois modestes en comparaison avec leurs analogues ramifiés 2'acétoxy.

Tableau 27. Evaluations biologiques sur HSV et VV

Composé	EC ₅₀ (µM) ^a				MCC ^b (µM)	CC ₅₀ ^c (µM)
	HSV-1		HSV-2	VV		
	KOS	TK- (KOS) ACVr	G			
255	13.40 ± 6.60	13.40 ± 6.60	13.40 ± 6.60	32.50 ± 12.50	>100	5.1
257	3.75 ± 2.25	5.75 ± 4.25	1.8 ± 1.1	-	100	-
275	39 ± 6	42 ± 8	39 ± 6	-	100	-
Acyclovir	0.2	85	0.2	>250	> 300	470
Ganciclovir	0.032	8.9	0.06	>100	> 350	130 ± 86
Brivudine	0.04	50	50	5.8	> 150	> 100
Cidofovir	2	3.8	2	29	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogenicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

iv. Synthèse du *bis*(POM) 2'-méthyl-but-2'-ényle O-2,6-diaminopyrimidine

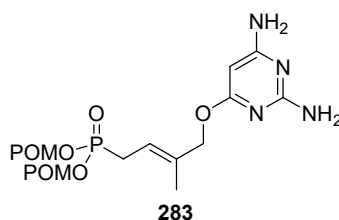


Figure 48. Objectif synthétique

Cette dernière série représente la synthèse d'une série d'ANP possédant un CH₃ en position 2'. Dans un premier temps, seul le composé **283** sera synthétisé, afin de déterminer l'interêt à porter aux ANP-DAPY portant un groupement méthyle en position 2' (Figure 48).

Il est tout d'abord nécessaire de synthétiser la diaminopyrimidine substituée **244** (Schéma 87)

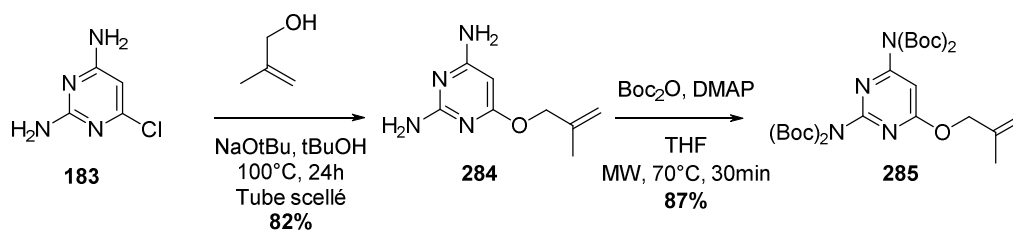


Schéma 88. Synthèse de la diaminopyrimidine oléfinique

La diaminopyrimidine oléfinique a été obtenue après substitution de la chloropyrimidine par l'hydroxyle allylique correspondant en présence de *tert*-butoxyde de sodium dans le *tert*-butanol pendant 24h à 100°C. Par ce chemin réactionnel, l'hétérocycle azoté **284** est formé avec un bon rendement de 82%. La base nucléique est ensuite *per*protégée à l'aide de Boc₂O et de DMAP, produisant l'oléfine **285** (Schéma 88).

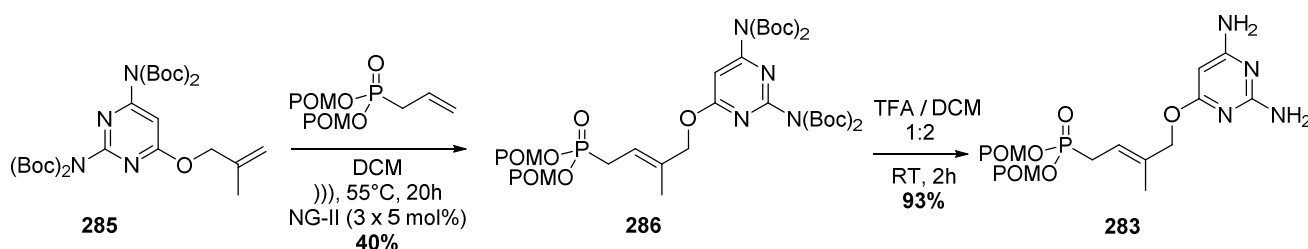


Schéma 89. Métathèse et déprotection

Par la suite, la réaction de métathèse est effectuée dans les conditions optimisées précédemment, par sonication pendant 20h avec une charge catalytique totale de 15 mol%, permettant l'obtention de l'intermédiaire synthétique **286** protégé avec un rendement modeste de 40% (Schéma 89). Cette molécule est ensuite déprotégée en condition acides à l'aide d'une mixture acide trifluoroacétique / dichlorométhane avec un excellent rendement de 93%.

Ce composé a par la suite été évalué biologiquement, mais n'a malheureusement montré aucune activité sur les virus à ADN / ARN, arrétant de ce fait le développement de cette série de molécules.

v. Composés comportant le noyau diaminopyrimidine comme squelette central

Ce noyau diaminopyrimidine a démontré posséder une action antivirale très marquée. En effet, dans le cas des ANPs à chaîne acyclique oléfinique, ces composés ont montré plus d'efficacité que leurs analogues puriques. Certains médicaments approuvés par la FDA sont simplement constitués d'une base purique liée soit à un sucre ou une chaîne acyclique. A la vue des résultats prolifiques obtenus lors du remplacement des purines par les O-diaminopyrimidine dans les séries d'ANP développés au laboratoire, l'introduction d'une pyrimidine à la place de ces purines pourrait être profitable.

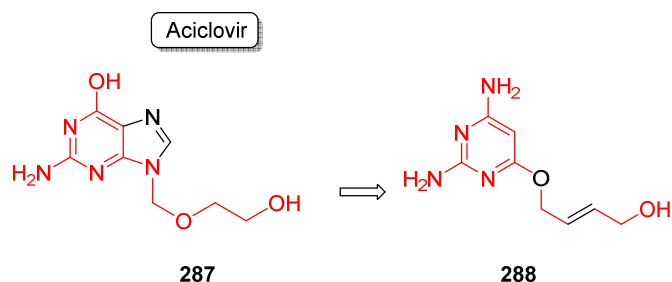


Figure 49. Comparaison structurale entre l'Aciclovir et la molécule recherchée

Un médicament correspondant à ces critères et pouvant être adapté sous la forme DAPY est l'Aciclovir, doté d'une grande spécificité et par conséquent uniquement actif sur HSV-1, 2 et VZV. De par notre stratégie, le pont éther serait remplacé par une double liaison et la 2,4-diaminopyrimidine remplaçant la guanine présente sur la molécule **287** de référence (Figure 49).

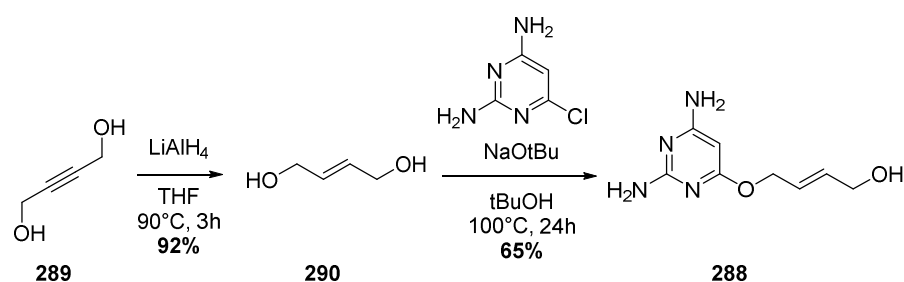


Schéma 90. Synthèse de l'acyclonucléoside **288**

La préparation du composé d'intérêt peut se faire en deux étapes. Tout d'abord, une réduction sélective de la triple liaison du but-2-yn-1,4-diol permet après 3h à reflux du THF en présence de tétrahydruroaluminat de lithium d'obtenir de façon spécifique le composé *trans* **290**.¹²² Il est à noter qu'il est possible d'effectuer cette synthèse sur plusieurs grammes, en prenant toutefois les précautions d'usage (par rapport à la réactivité du LiAlH₄). Par la suite, le diol **290** peut être introduit de la même façon qu'avec le 2-méthylène-1,3-propanediol, *i.e.* avec un excès d'alcool et de base par rapport à l'hétérocycle, ce qui va pousser à la production du composé **288** avec un bon rendement de 65% après purification du brut réactionnel (Schéma 90).

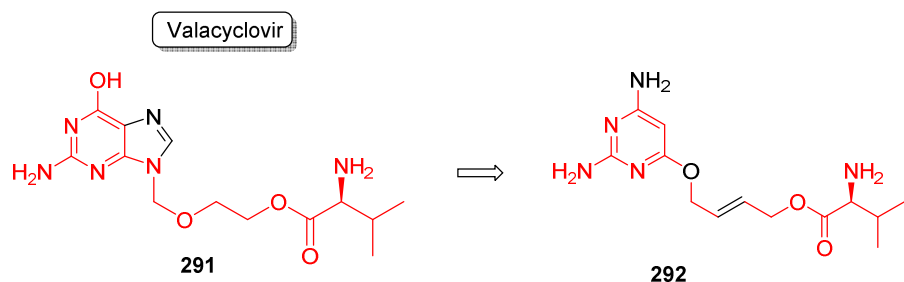


Figure 50. Acyclovir et la pyrimidine **292** avec leurs prodrogues de type L-valine

L'acyclovir est plus largement commercialisé sous sa forme prodrogue, le valacyclovir, sur laquelle l'alcool terminal est remplacé par un aminoester de type L-valine (Figure 50). Cet acide aminé permet d'augmenter

¹²² Bugarin, A. & Connell, B. T. Z-Selective, Mg-mediated synthesis of α,β -unsaturated- β -iodo Morita-Baylis-Hillman-type adducts. *Tetrahedron Letters* **56**, (2015).

la biodisponibilité de l'acyclovir, passant d'environ 15% pour l'acyclovir natif à plus de 50% sous sa forme ester. Encore une fois, cette modification est réalisable par une simple étape de couple peptidique suivie d'une éventuelle déprotection dans le cas de notre diaminopyrimidine (Schéma 91).

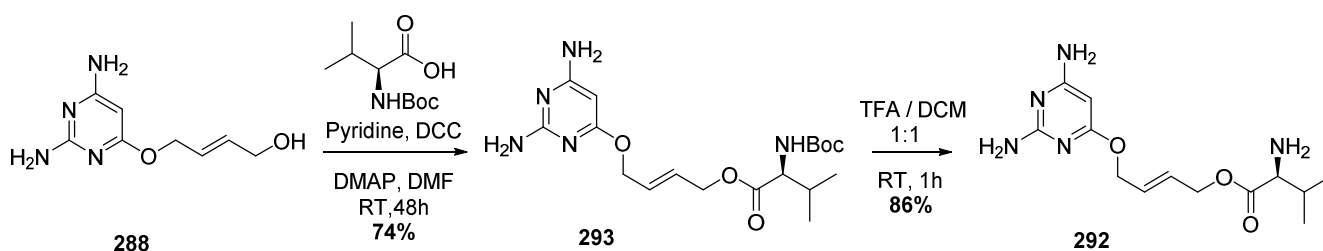


Schéma 91. Couplage peptidique et déprotection

Un couplage peptidique est tout d'abord effectué dans les mêmes conditions que celles utilisées pour assembler la valine à l'acyclovir.¹²³ L'alcool **288** est mis en présence d'une base, la pyridine, d'un agent de couplage, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), d'un catalyseur comme la DMAP et finalement de la L-valine monoprotégée par un Boc. Après 48 heures d'agitation à température ambiante, l'ester **293** est obtenu avec un bon rendement de 74%. La dernière étape consiste donc en la déprotection du carbamate en présence d'acide trifluoroacétique afin de libérer après purification l'acide aminé **292** (Schéma 91).

Après la synthèse d'analogues de l'acyclovir, une autre molécule pouvant être une cible des DAPY est l'entécavir. Ce nucléoside est composé d'un 2-désoxycarbosucrose possédant une double liaison exo à la place de l'oxygène du furane. La base nucléique présente dans ce nucléoside est une guanine, comme dans le cas de l'acyclovir. Ce médicament, approuvé en 2005 par la FDA, possède des propriétés antivirales remarquables dans le cas d'une infection au HBV.

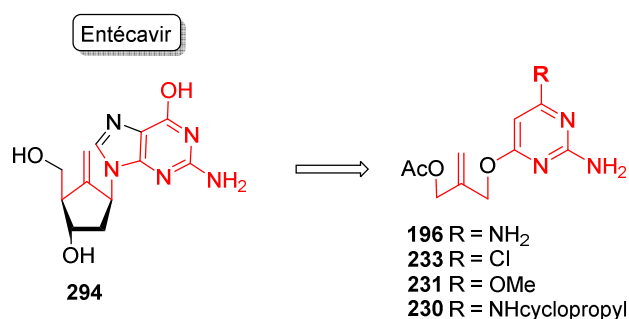


Figure 51. Comparaison structurale entre l'entécavir et les pyrimidines synthétisées

Dû à sa double liaison exo positionné sur un carbosucrose, l'entécavir est une molécule qui représente un réel défi synthétique.¹²⁴ Ce problème est atténué lors du passage en série acyclonucléoside, puisqu'il se trouve que certains intermédiaires réactionnels utilisés précédemment présentent déjà une grande analogie avec le composé **328** (Figure 51). En l'absence de couplage impliquant l'allylamine après cette étape, il serait intéressant dans ce cas précis de synthétiser cette charpente avec un groupement R allylamine en position C⁴.

¹²³ Beauchamp, L. M., Orr, G. F., de Miranda, P., Bumette, T. & Krenitsky, T. A. Amino Acid Ester Prodrugs of Acyclovir. *Antivir. Chem. Chemother.* **3**, 157–164 (1992).

¹²⁴ Bessières, M., Chevrier, F., Roy, V. & Agrofolgio, L. A. Recent progress for the synthesis of selected carbocyclic nucleosides. *Future Med. Chem.* **7**, 1809–1828 (2015).

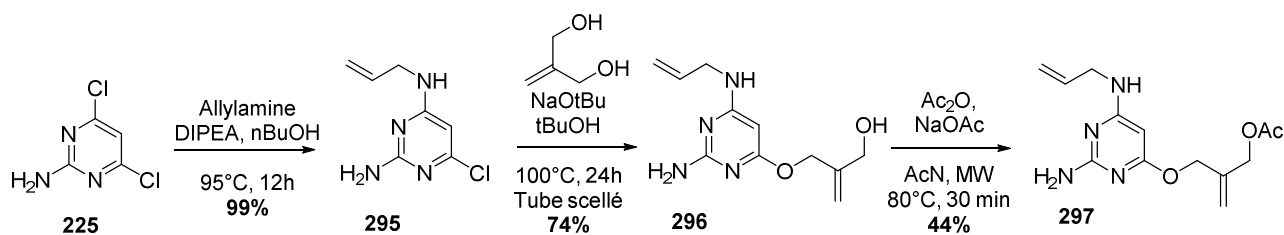


Schéma 92. Alkylation de l'hétérocycle allylaminé

Comme dans le cas de la cyclopropylamine, l'allylamine est insérée sur la 2-amino-4,6-dichloropyrimidine par monosubstitution nucléophile en présence de DIPEA dans le *n*-butanol. Après 12h de reflux, le composé **295** est isolé avec un rendement quantitatif. La O-alkylation de l'hétérocycle **295** se fait en tube scellé avec le 1,3-propanediol en présence d'acétate de sodium et de *tert*-butanol. Isolé avec un rendement de 74%, l'alcool **296** est ensuite protégé en acétate **297** par une protection sélective en présence d'acétate de sodium, d'anhydride acétique dans l'acétonitrile (Schéma 92).

Les composés **196**, **230**, **231**, **233**, **288**, **292** et **297** ainsi synthétisés sont ensuite envoyés au REGA Institute à Louvain et sont actuellement en cours d'évaluation biologiques.

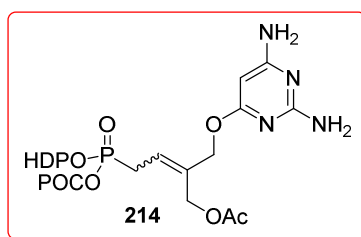
4 Conclusion et Perspectives

Au cours de ce projet, nous avons décrit une nouvelle famille d'acyclonucléotides par la synthèse d'une vingtaine de molécules possédant un motif 2-aminopyrimidine, pour lesquelles des modulations ont été évalués :

- La taille de la chaîne acyclique entre le phosphonate et la base nucléique. Cet espaceur, comprenant entre 3 et 5 chaînons, a montré une efficacité induite par la chaîne but-2'-ényle plus marquée que pour les prop- et pentényles.
- La nature des différentes prodrogues. Après une variation de différentes prodrogues sur le phosphonate, le pronucléotide mixte HDP/POC a présenté un potentiel bien supérieur à celui des carbonyloxyméthyles.
- La nature de cette chaîne acyclique. L'insaturation présente en 2' sur ce nucléoside a présenté un réel effet bénéfique, et l'éther a prouvé être un meilleur groupement que le triazole dans le but d'attacher cette pyrimidine à l'alkyle.
- La présence d'un substituant en position 2'. De l'hydrogène, du méthyl et du groupement acétoxy, l'acétate montre augmenter de façon significative l'action antivirale des ANPs synthétisés.

Tous ces composés ont été développés par métathèse croisée directe entre le phosphonate, accessible en large échelle, et les pyrimidines alkylées fonctionnalisables par de simples étapes de substitution/protection. Ce couplage ruthéno-catalysé permet un accès à des oléfines hautement substituées, portant des groupements induisant une gêne stérique. De plus, cette catalyse supporte la présence d'hétérocycliques polyazotés, connus pour être une grande contrainte par leur interaction avec

l'espèce catalytique active. Les groupements biolabiles POM, POC et HDP ont montré une grande compatibilité avec les conditions utilisées.



12 nM / TK+ VZV
 15 nM / TK- VZV
 400 nM / HSV-1 (KOS)
 270 nM / HSV-2 (G)
 400 nM / HSV-1 TK- KOS ACV
 400 nM / VV
 300 nM / Feline Herpes Virus CFRK
 100 nM / CMV Davis

Figure 52. Activités biologiques induites par l'ANP le plus efficace

Les composés furent analysés par le REGA Institute, par les Pr. Snoeck & Andrei. Parmi ces composés, le composé O-2,6-diaminopyrimidine 2'-acétoxyméthyl-but-2'-ényl phosphonate sous sa forme HDP/POC présente des résultats remarquable (Figure 52). En effet, cet ANP montre une activité très élevée entre 12 et 15 nM sur VZV TK+ comme VZV TK-. Le plus puissant composé commercial dans le cadre d'une infection au VZV est la brivudine, et possède une activité similaire à notre composé sur VZV TK+ ($EC_{50} = 8$ nM). En revanche, la brivudine n'est pas active sur les lignées mutantes de VZV ne comportant pas de kinases, contrairement à notre composé qui est dans ce cas 1000 fois plus actif. Une activité toute aussi remarquable est observée sur le CMV, avec une activité de 100 nM sur les lignées cellulaires Davis. *In vitro*, le cidofovir, médicament référence pour le traitement des infections aux CMV, ne possède qu'une activité d'1 μ M.

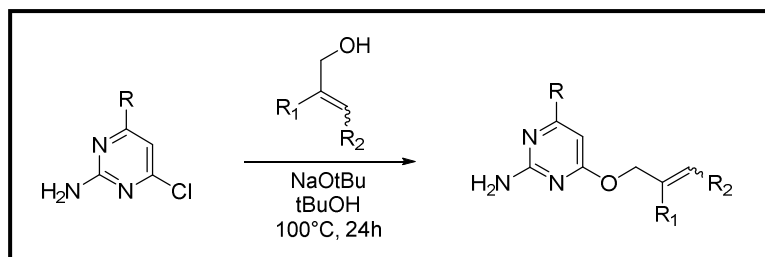
Suite aux propriétés remarquables démontrées par cette molécule, la valorisation de cette nouvelle classe d'acyclonucléoside phosphonate est mise en avant par le dépôt d'un brevet en partenariat avec la SATT, dans le but de synthétiser d'autres composés lors de la maturation de ce dernier.

Une collaboration avec le Dr. Jennifer Moffatt (Upstate Medical University, Syracuse) nous permettra d'étudier l'effet de nos composés *in vivo* sur des souris humanisées dans le cadre des infections au VZV. En effet, ce virus n'étant présent que chez les humains, il est nécessaire de travailler avec des modèles animaux humanisés.

Si les résultats *in vivo* présentent un caractère aussi intéressant que ceux obtenus lors des tests *in vivo*, il sera alors envisagé d'évaluer les différents composés sélectionnés par une étude préclinique, afin d'approfondir les données pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques.

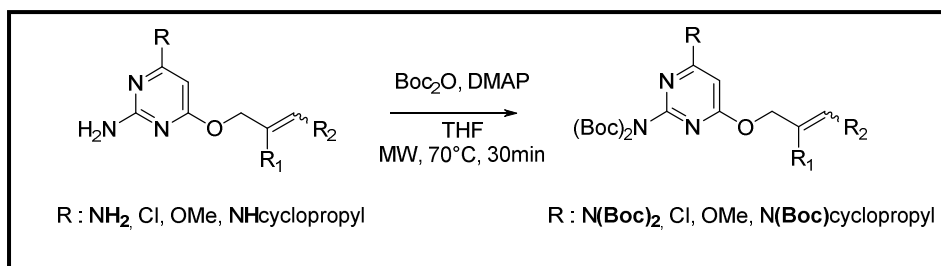
EXPERIMENTAL PART

GENERAL PROCEDURE 1



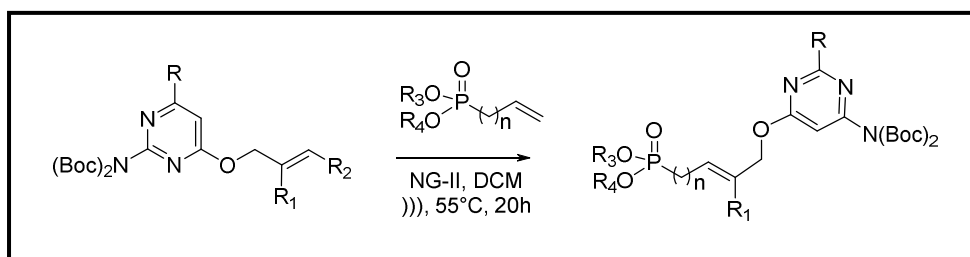
To a mixture of 6-chloropyrimidine (1 eq.) in tBuOH, the corresponding allylic alcohol (3 eq.), followed by NaOtBu (2 eq.) were introduced. After 24h stirring at 100°C, the mixture was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (eluting DCM/MeOH) to give desired compounds.

GENERAL PROCEDURE 2



Di-*tert*-butyl dicarbonate (6 eq.) and 4-(Dimethylamino)pyridine (0.35 eq.) were added to a solution of compound (1 eq.) in THF in a closed microwave reaction vessel. After MW-irradiation for 30 min at 70°C, the reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by flash column chromatography using petroleum ether/EtOAc as eluent affording expected compounds as colorless oils.

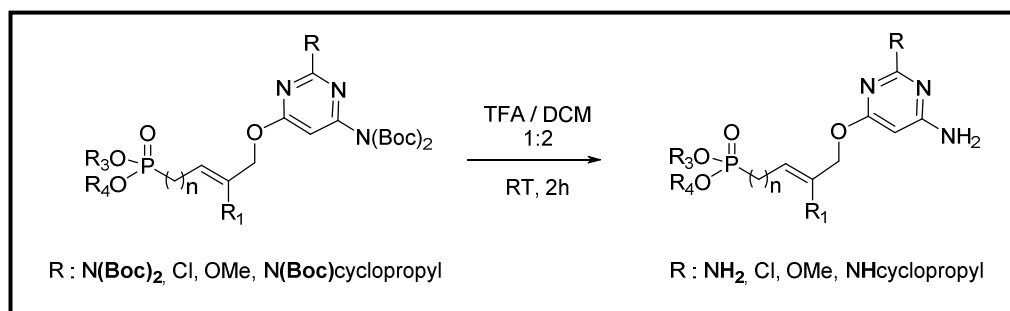
GENERAL PROCEDURE 3



To a solution of pyrimidine and phosphonate in freshly distilled CH₂Cl₂ (0.1 M), 5mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst was added. The mixture was sonicated at 55°C (80 kHz, 100 W) under a gentle nitrogen flow. After 2h, 5mol% of the ruthenium catalyst was added to the

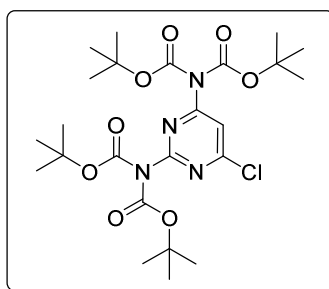
solution. The reaction was sonicated again for 2h at 55°C before the addition of a third portion of 5 mol% of the ruthenium catalyst. The mixture was left under sonication for an additional 14 hours and then concentrated to dryness. After evaporation of all volatiles, the purification by flash column chromatography using an elution gradient of Petroleum ether/EtOAc gave desired compounds as oils.

GENERAL PROCEDURE 4



Trifluoroacetic acid (100 eq.) was added dropwise to a mixture of Boc-compound (1 eq.) in CH_2Cl_2 (2:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ v/v). The reaction was stirred at room temperature for 2h and then volatiles were removed under reduced pressure. The crude product was extracted with EtOAc, washed with NaHCO_3 until pH 7, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. Pure compounds were obtained after purification by flash column chromatography with DCM/MeOH (95:5) as eluent.

***tert*-butyl N-[2-[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-chloro-pyrimidin-4-yl]-N-*tert*-butoxycarbonyl-carbamate (**189**)**



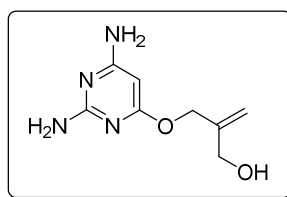
Chemical Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{ClN}_4\text{O}_8$
Molecular Weight: 545,03

In a 10-20 mL microwave vial, a solution of 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (500 mg, 1 eq., 3.45 mmol) was dissolved into THF (20 mL). To this mixture, dimethylaminopyridine (147 mg, 0.35 eq., 1.21 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (4.05 g, 6 eq., 20.7 mmol) were added, and the reaction was stirred under microwave irradiation at 70°C for 30 minutes. After evaporation of all volatiles, pure compound **189** was isolated after purification on silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether / Ethyl acetate 95:5. (3.40 g, 91%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s, 1H, H^5), 1.54 (s, 18H, CH_3 Boc), 1.44 (s, 18H, CH_3 Boc).

CAS : 1378039-31-6

2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]prop-2-en-1-ol (**192**)



Chemical Formula: $C_8H_{12}N_4O_2$

Molecular Weight: 196,21

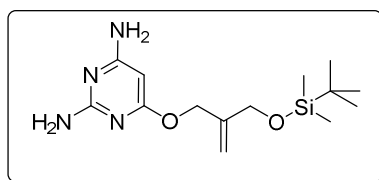
Following the general procedure 1, from 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (300 mg, 1 eq., 2.08 mmol), 2-methylene-1,3-propenediol (0.5 mL, 3 eq., 6.22 mmol) and NaOtBu (400 mg, 2 eq., 4.15 mmol) in *t*BuOH (12 mL), compound **192** was obtained as a colorless oil (271 mg, 63%) after purification by flash column chromatography with EtOAc/petroleum ether (9:1) followed by EtOAc and then EtOAc/MeOH (98:2) as eluent.

^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.60 (bs, 2H, NH_2), 5.51 (bs, 2H, NH_2), 5.24 (s, 1H, H^5), 5.17 (m, 1H, $H^{3'}$), 5.11 (m, 1H, $H^{3'}$), 4.74 (s, 2H, CH_2-O), 4.10 (s, 2H, CH_2OH).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 171.64 (C^6), 167.39 (C^2), 164.18 (C^4), 147.10 ($C^{2'}$), 111.64 ($C^{3'}$), 77.96 (C^5), 66.04 (CH_2-O), 63.46 (CH_2-O).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_8H_{13}N_4O_2$ 197.1033, found 197.1029.

tert-butyl N-[2-[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-chloro-pyrimidin-4-yl]-N-*tert*-butoxycarbonyl-carbamate (**191**)



Chemical Formula: $C_{14}H_{26}N_4O_2Si$

Molecular Weight: 310,47

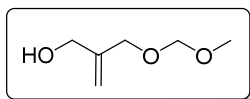
To a solution of compound **192** (750 mg, 1 eq., 3.82 mmol) in a mixture of AcN/DMF 1:1 (5 mL / 5 mL) were added *tert*butyldimethylsilyl chloride (576 mg, 1 eq., 3.82 mmol), imidazole (286 mg, 1.1 eq., 4.20 mmol) and then dissolved. After one hour at room temperature, all volatiles were removed under reduced pressure. The mixture was then purified by silica gel column chromatography, affording the compound **191** as a white solid. (498 mg, 42%)

^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.49 (bs, 2H, NH_2), 5.34 (bs, 2H, NH_2), 5.23 (s, 1H, H^5), 5.19 (s, 1H, $CH_2=C$), 5.13 (s, 1H, $CH_2=C$), 4.71 (s, 2H, CH_2-O), 4.24 (s, 2H, CH_2-OSi), 0.92 (s, 9H, CH_3tBu), 0.09 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.62 (C^6), 166.45 (C^4), 163.27 (C^2), 145.27 ($C^{2'}$), 110.70 ($CH_2=CH$), 77.00 (C^5), 64.86 ($C^{1'}$), 63.58 ($C^{3'}$), 25.35 (CH_3tBu), 17.97 ($C^{quat}-Si$), -6.16 (CH_3).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{14}H_{27}N_4O_2Si$: 311.1904, found: 311.1898.

2-(methoxymethoxymethyl)prop-2-en-1-ol (**193**)



Chemical Formula: C₆H₁₂O₃

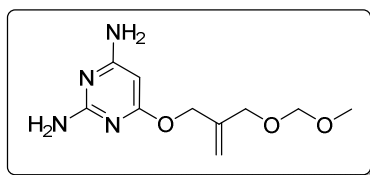
Molecular Weight: 132,16

Under inert atmosphere, NaH (453 mg, 60% in dispersed oil, 1 eq., 11.3 mmol) was dissolved in THF (112 mL). The mixture was cooled at 0°C, and then 2-methylene-1,3-propenediol (926 µL, 1 eq., 11.3 mmol) was added. After 10 minutes at 0°C, methoxymethyl chloride (862 µL, 1 eq., 11.3 mmol) was slowly added, then the reaction was stirred at room temperature during 2h. The mixture was quenched at 0°C with the addition of 20 mL of H₂O, extracted thrice with EtOAc (3 x 50 mL) and dried over MgSO₄. After evaporation of all volatiles and a silica gel column chromatography purification eluting PE/EtOAc 6:4, the desired product **193** was isolated as a colorless oil. (960 mg, 64%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.19 (s, 1H, CH₂=CH), 5.15 (s, 1H, CH₂=CH), 4.64 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂-OMOM), 4.17 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, CH₂-OH), 3.38 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H, CH₃).

CAS : 141502-80-9

6-[2-(methoxymethoxymethyl)allyloxy]pyrimidine-2,4-diamine (**194**)



Chemical Formula: C₁₀H₁₆N₄O₃

Molecular Weight: 240,26

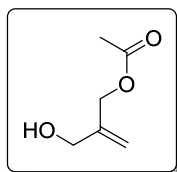
In a 2-5 mL vial, to a solution of compound **193** (920 mg, 3 eq., 6.96 mmol) in *tert*butanol (4.5 mL) sodium *tert*butoxide (446 mg, 2 eq., 4.64 mmol) and 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (335 mg, 1 eq., 2.32 mmol) were added. The vial was sealed and heated at 100°C for 24h. The crude product was then dissolved in a mixture of EtOAc/EtOH 9:1 and water, and extracted twice with EtOAc/EtOH 9:1 (2 x 50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After a silica gel column chromatography, the pure compound **194** was isolated as a white solid. (480 mg, 86%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.57 (bs, 2H, NH₂), 5.46 (bs, 2H, NH₂), 5.24 (s, 1H, H⁵), 5.19 (dd, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂=C), 4.73 (s, 2H, CH₂-O), 4.61 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, O-CH₂-O), 4.09 (s, 2H, CH₂-OMOM), 3.31 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.58 (C⁶), 166.46 (C⁴), 163.29 (C²), 142.59 (C^{2'}), 112.70 (CH₂=CH), 95.40 (O-CH₂-O), 76.98 (C⁵), 67.52 (C^{3'}), 64.91 (C^{1'}), 54.37 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₇N₄O₃: 241.1301, found: 241.1291.

2-(hydroxymethyl)allyl acetate (**195**)



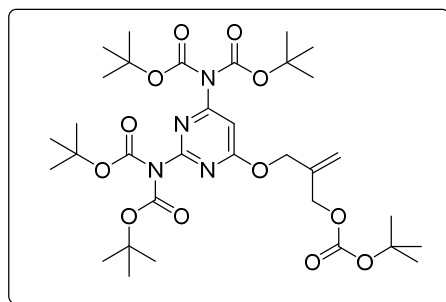
Chemical Formula: C₆H₁₀O₃
Molecular Weight: 130,14

2-methylene-1,3-propenediol (1 g, 2 eq., 11.35 mmol) was dissolved into DCM (115 mL). To this solution, DMAP (69 mg, 0.1 eq., 0.568 mmol), freshly distilled triethylamine (1.15 mL, 1.5 eq., 8.52 mmol) and acetyl chloride (410 μ L, 1 eq., 5.68 mmol) were sequentially added. The mixture was then stirred at room temperature for 16h, followed by the evaporation of all volatiles *in vacuo* at low temperature. The resulting crude was finally purified by silica gel column chromatography, eluting Petroleum Ether/Ethyl Acetate (1:1), to afford desired product **195** as a colorless liquid. (671 mg, 91%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.18 (s, 1H, CH=C quat), 5.11 (s, 1H, CH=C quat), 4.58 (s, 2H, CH₂-OAc), 4.08 (s, 2H, CH₂-OH), 2.36 (s, 1H, OH), 2.03 (s, 3H, CH₃).

CAS : 130239-36-0

2-[[2,6-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl tert-butyl carbonate (**197**)



Chemical Formula: C₃₃H₅₂N₄O₁₂
Molecular Weight: 696,80

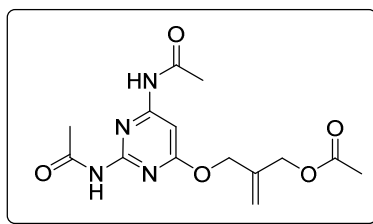
In a 2-5 mL microwave vial, a solution of pyrimidine **192** (82 mg, 1 eq., 0.42mmol) was dissolved in THF (2 mL). To this mixture dimethylaminopyridine (18 mg, 0.35 eq., 0.14 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (544 mg, 6 eq., 2.49 mmol) were added, and the reaction was stirred under microwave irradiation at 70°C for 20 minutes. After evaporation of all volatiles, pure compound **197** was isolated after purification on a silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether / Ethyl acetate 92:8. (132 mg, 46%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.97 (s, 1H, H⁵), 5.33 (d, 5.75 Hz, 1H, CH₂=CH), 4.86 (s, 2H, CH₂-O-Base), 4.62 (s, 2H, CH₂-O-Boc), 1.50 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.47 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.42 (s, 18H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.29 (C=O), 159.99 (C⁴), 156.51 (C²), 153.31 (C=O Boc), 150.47 (C=O Boc), 150.02 (C=O Boc), 138.55 (C=CH₂), 117.00 (CH₂=C), 96.15 (C⁵), 84.29 (C^{quat} Boc), 83.21 (C^{quat} Boc), 82.46 (C^{quat} Boc), 67.08 (CH₂-O), 67.07 (CH₂-O), 27.94 (CH₃ Boc), 27.86 (CH₃ Boc), 27.84 (CH₃ Boc).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₃H₅₂N₄O₁₂: 697.3661, found: 697.3658.

2-[(2,6-diacetamidopyrimidin-4-yl)oxymethyl]allyl acetate (**198**)



Chemical Formula: $C_{14}H_{18}N_4O_5$
Molecular Weight: 322,32

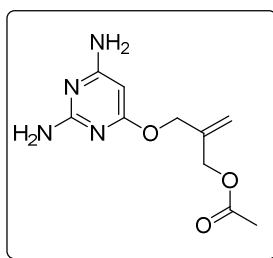
In a 2-5 mL microwave vial, a solution of pyrimidine **192** (82 mg, 1 eq., 0.42 mmol) was dissolved in AcN (2 mL). Sodium acetoxide (42 mg, 2 eq., 0.51 mmol) and acetic anhydride (0.17 mL, 7 eq., 1.79 mmol) were added to the vial, and irradiated under microwaves for 30 min at 140°C. The residue was then dissolved into water (5 mL), extracted twice with EtOAc (2 x 10 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. After purification by flash column chromatography (EtOAc), compound **198** was isolated as a white powder. (51 mg, 62%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.91 (bs, 1H, NH_2), 10.22 (bs, 1H, NH_2), 7.44 (s, 1H, H^5), 5.30 (s, 2H, $CH_2=CH$), 4.83 (s, 2H, CH_2-O), 4.65 (s, 2H, CH_2-O), 2.63 (s, 3H, CH_3), 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 175.27 (C^6), 171.05 ($C=O$), 170.98 ($C=O$), 170.61 ($C=O$), 160.14 (C^4), 156.37 (C^2), 138.64 ($C=CH_2$), 116.68 ($CH_2=C$), 90.56 (C^5), 67.20 (CH_2-O), 64.68 (CH_2-OAc), 26.07 (CH_3), 24.55 (CH_3), 20.93 (CH_3).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{14}H_{18}N_4O_5$ 323.1356, found 323.1348.

2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]allyl acetate (**196**)



Chemical Formula: $C_{10}H_{14}N_4O_3$
Molecular Weight: 238,25

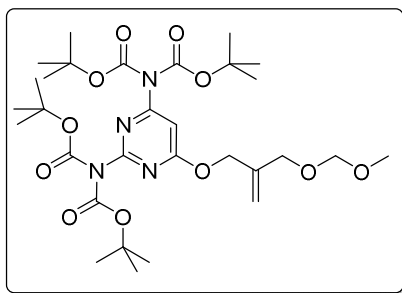
Compound **192** (106 mg, 1 eq., 0.54 mmol), acetic anhydride (0.15 mL, 3 eq., 1.59 mmol) and NaOAc (89 mg, 2 eq., 1.08 mmol) were added in anhydrous acetonitrile (2 mL) in a microwave sealed tube. The mixture was irradiated for 30 min at 80°C. The crude product was extracted with EtOAc, washed twice with water (2 mL), dried with $MgSO_4$, filtrated and concentrated under vacuum. Purification by flash column chromatography with EtOAc followed by EtOAc/MeOH (95:5) as eluent gave the mono-acetylated compound **196** (84 mg, 65%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.73 (bs, 2H, NH_2), 5.66 (bs, 2H, NH_2), 5.28 (m, 1H, H^3), 5.27 (s, 1H, H^5), 5.23 (m, 1H, H^3), 4.76 (s, 2H, CH_2-O), 4.64 (s, 2H, CH_2-OAc), 2.05 (s, 3H, CH_3).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 171.34 (C⁶), 170.66 (C=O), 167.25 (C⁴), 164.06 (C²), 141.67 (C^{2'}), 114.95 (C^{3'}), 77.87 (C⁵), 65.73 (CH₂-O), 64.96 (CH₂-OAc), 20.69 (CH₃).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₅N₄O₃ 239.1139, found 239.1137.

***tert*-butyl N-[2-[*bis*(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-[2-(methoxymethoxymethyl)allyloxy]pyrimidin-4-yl]-N-*tert*-butoxycarbonyl-carbamate (**199**)**



Chemical Formula: C₃₀H₄₈N₄O₁₁
Molecular Weight: 640,73

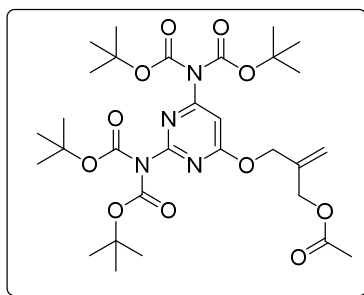
Di-*tert*-butyl dicarbonate (2.02 g, 6 eq., 9.24 mmol) and 4-(Dimethylamino)pyridine (66 mg, 0.35 eq., 0.54 mmol) were added to a solution of compound **194** (370 mg, 1 eq., 1.54 mmol) in THF (10 mL), pursuing conditions of general procedure 2. The expecting compound **199** (520 mg, 92%) was obtained as a colorless oil after purification by flash column chromatography.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.00 (s, 1H, H⁵), 5.30 (s, 2H, CH₂=CH), 4.91 (s, 2H, CH₂-O), 4.66 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.15 (s, 2H, CH₂-OMOM), 3.39 (s, 3H, CH₃), 1.53 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.45 (s, 18H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.34 (C⁶), 159.85 (C⁴), 156.42 (C²), 150.37 (C=O), 149.93 (C=O), 140.40 (C^{2'}), 115.35 (CH₂=CH), 96.03 (C⁵), 95.67 (O-CH₂-O), 84.16 (C^{quat} Boc), 83.06 (C^{quat} Boc), 67.78 (C^{3'}), 67.15 (C^{1'}), 55.34 (CH₃), 27.81 (CH₃ Boc), 27.73 (CH₃ Boc).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₃₀H₄₉N₄O₁₁: 641.3399, found: 641.3393.

2-[[2,6-*bis*[*bis*(*tert*-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (200**)**



Chemical Formula: C₃₀H₄₆N₄O₁₁
Molecular Weight: 638,72

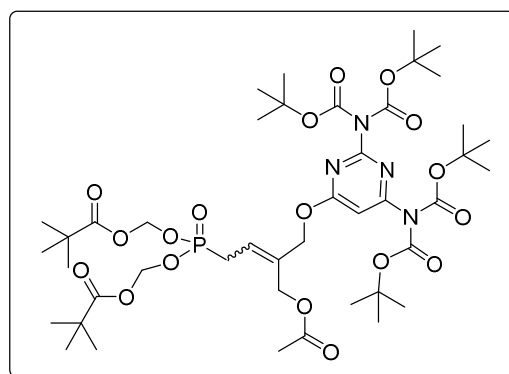
General procedure 2 was applied with compound **196** (118 mg, 1 eq., 0.50 mmol), di-*tert*-butyl dicarbonate (649 mg, 6 eq., 2.97 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (21 mg, 0.35 eq., 0.17 mmol) in THF (3 mL) to give tetra-Boc-protected compound **200** (265 mg, 84%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (s, 1H, H⁵), 5.31 (s, 1H, H^{3'}), 5.27 (s, 1H, H^{3'}), 4.84 (s, 2H, CH₂-O), 4.62 (s, 2H, CH₂-OAc), 2.04 (s, 3H, CH₃), 1.48 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.41 (s, 18H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.24 (C⁶), 170.57 (C=O^{Ac}), 159.97 (C⁴), 156.45 (C²), 150.44 (C=O^{Boc}), 149.96 (C=O^{Boc}), 138.68 (C^{2'}), 116.75 (C^{3'}), 96.03 (C⁵), 84.27 (C^{quat Boc}), 83.17 (C^{quat Boc}), 67.00 (CH₂-O), 64.67 (CH₂-OAc), 27.88 (CH₃ Boc), 27.78 (CH₃ Boc), 20.88 (CH₃).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₃₀H₄₇N₄O₁₁ 639.3236, found 639.3231.

[[[*Z/E*]-3-(acetoxymethyl)-4-[2,6-bis[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxy-but-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (202)



Chemical Formula: C₄₃H₆₉N₄O₁₈P
Molecular Weight: 961.01

Following the general procedure 3 from compound **200** (265 mg, 2 eq., 0.41 mmol) with allyl-*bis*(POM)phosphonate (73 mg, 1 eq., 0.21 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (29 mg, 0.03 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (2 mL, 0.1 M), compound **202** (34 mg, 17%) was isolated as a light brown oil after purification by silica gel column chromatography using petroleum ether/EtOAc (8:2 to 7:3) as eluent.

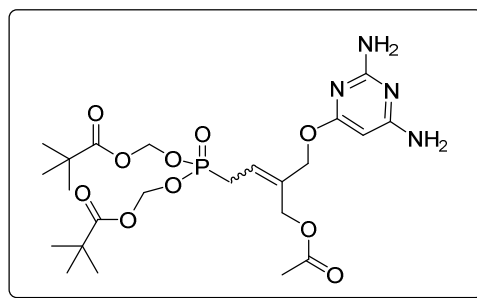
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (s, 1H, H⁵), 5.78 (m, 1H, H^{3'}), 5.65 (m, 4H, O-CH₃-O), 4.91 (s, 1H, CH₂-O), 4.83 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH₂-O), 4.70 (s, 1H, CH₂-O), 4.62 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH₂-O), 2.88 (dd, *J* = 23.2, 8.0 Hz, 2H, H^{4'}), 2.03 (s, 3H, CH₃), 1.50 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.44 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.22 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.94, 176.90 (C=O^{POM}), 171.23, 171.21 (C⁶), 170.69, 170.54 (C=O^{Ac}), 160.05, 160.02 (C⁴), 156.56, 156.44 (C²), 150.55, 150.48, 150.03, 149.99 (C=O^{Boc}), 135.13, 135.07, 134.93 (C^{2'}), 122.09, 122.05, 121.94 (C^{3'}), 96.10, 96.00 (C⁵), 84.35, 84.32, 83.31, 83.26 (C^{quat Boc}), 81.85, 81.82, 81.78, 81.76 (O-CH₂-O), 68.45, 65.87, 62.31, 59.60 (CH₂-O), 38.87, 38.86 (C(CH₃)₃ POM), 29.82 (C^{4'}), 27.97, 27.93, 27.85 (CH₃^{Boc}), 26.98 (C^{quat POM}), 26.46 (C^{4'}), 20.96, 20.86 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.46.

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₄₃H₇₀N₄O₁₈P 961.4417, found 961.4414.

[[[(Z/E)-3-(acetoxymethyl)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy-but-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (204)



Chemical Formula: $C_{23}H_{37}N_4O_{10}P$
Molecular Weight: 560,54

General procedure 4 was applied with compound **202** (34 mg, 1 eq., 0.04 mmol), TFA (0.27 mL, 100 eq., 3.54 mmol) in CH_2Cl_2 (0.55 mL) for 1 h to give the deprotected compound **204** (16 mg, 83%) as a colorless oil after flash column chromatography purification with EtOAc.

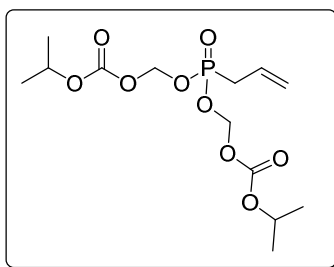
^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.77 (s, 1H, H^5), 5.67 (m, 4H, O- CH_2 -O), 5.53 (bs, 2H, NH_2), 5.42 (bs, 2H, NH_2), 5.22 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H^5), 4.84 (s, 2H, CH_2 -O, Z isomer), 4.74 (d, J = 4.6 Hz, 2H, CH_2 -O, Z isomer), 4.70 (s, 2H, CH_2 -O, Z isomer), 4.61 (d, J = 4.1 Hz, 2H, CH_2 -O, Z isomer), 2.97 (dd, J = 23.1, 8.0 Hz, 2H, $H^{4'}$), 2.01 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 18H, CH_3 POM).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 177.17, 177.13 ($C=O^{POM}$), 171.36, 171.17 (C^6), 170.86, 170.59 ($C=O$ Ac), 167.36 (C^2), 164.13, 164.08 (C^4), 137.20, 137.11, 137.05, 136.96 ($C^{2'}$), 121.66, 121.55, 121.41, 121.30 ($C^{3'}$), 82.59, 82.55, 82.52, 82.49 (O- CH_2 -O), 78.05, 78.01 (C^5), 66.96, 66.93, 66.19, 66.17 (CH_2 -O), 60.98, 60.96, 60.23, 60.21 (CH_2 -O), 39.29 ($C^{quat\ POM}$), 28.23, 28.12 ($C^{4'}$), 27.14 (CH_3^{POM}), 26.85, 26.74 ($C^{4'}$), 20.79, 20.73 (CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.62.

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{23}H_{38}N_4O_{10}P$ 561.2320, found 561.2319.

bis-POC-allylphosphonate (205)



Chemical Formula: $C_{13}H_{23}O_9P$
Molecular Weight: 354,29

To an acetonitrile (11.5 mL) solution of dimethyl allylphosphonate (1.7 g, 1 eq., 11.3 mmol), anhydrous sodium iodide (3.4 g, 2 eq., 22.6 mmol) and chloromethylisopropylcarbonate (4.25 g, 2.5 eq., 28.3 mmol) were added. This solution was stirred at reflux for 72 h under N_2 atmosphere. After cooling, the mixture was diluted with 110 mL of diethyl ether, washed by 20 mL of water and aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (20 mL).

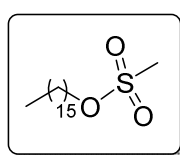
The organic layer was dried over magnesium sulfate, evaporated and purified by silica gel column chromatography (EtOAc/hexanes, 1/4) to give 2.76 g (73%) of pure *bis*(POC) allylphosphonate **205** as a colorless oil

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.76 (m, 1H, CH=CH₂), 5.68 (dd, *J* = 11.6, 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-O), 5.65 (dd, *J* = 11.6, 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-O), 5.26 (m, 2H, CH₂=CH), 4.94 (m, 2H, CH-O), 2.74 (ddt, *J* = 22.8, 7.4, 1.1 Hz, 2H, CH₂-P), 1.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 12H, CH₃ POC).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+Na]⁺ calcd for C₁₃H₂₃NaO₉P: 377.0977, found: 377.0990.

CAS : 1258789-64-8

Hexadecyl methanesulfonate (**207**)



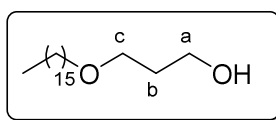
Chemical Formula: C₁₇H₃₆O₃S
Molecular Weight: 320,53

Triethylamine (5.75 mL, 1 eq., 41.2 mmol) was added to a solution of starting material hexadecyl alcohol (10 g, 1 eq., 41.2 mmol) and dichloromethane (100 mL). The temperature was set to 0°C, and methanesulfonyl chloride (3.2 mL, 1 eq., 41.2 mmol) was added dropwise. The solution was then stirred at room temperature during 5h. The resulting mixture was kept at -4°C during 72h, followed by the filtration of the precipitate. The filtrate was evaporated and purified by silica gel column (PE/AE 9:1) to afford desired compound **207** as a white powder. (12.5 g, 95%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-O), 3.00 (s, 3H, CH₃-S), 1.71 (tt, *J* = 14.5, 6.6 Hz, 2H, CH₂-β-O), 1.23 (s, 27H, CH₂), 0.85 (m, 3H, CH₃).

CAS : 124-63-0

Hexadecyloxypropyl alcohol (**208**)



Chemical Formula: C₁₉H₄₀O₂
Molecular Weight: 300,53

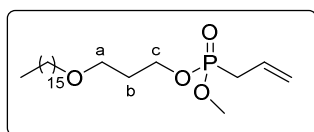
Under N₂ atmosphere, commercial 1,3-propanediol (9.02 mL, 5 eq., 124.8 mmol) was dissolved in 200 mL DMF, and sodium hydride (60% in oil, 2.49 g, 2.5 eq., 62.4 mmol) was carefully added. The solution was stirred 30 minutes at room temperature, followed by the addition of **207** (8 g, 1 eq., 25 mmol). This mixture was stirred overnight at room temperature, and the crude product was quenched with cold water (200 mL), dissolved in EtOAc (100 mL), extracted 5 times with water

(5 x 100 mL), washed with brine (100 mL) and dried over MgSO_4 . After evaporation of all volatiles, the product was purified by flash column chromatography (PE/EtOAc 8:2) to give compound **208** as a white powder. (7.12 g, 95%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.75 (q, J = 5.5 Hz, 2H, CH_2), 3.58 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2), 3.40 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2), 2.46 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH_2), 1.80 (p, J = 5.6 Hz, 2H, H^b), 1.23 (s, 26H, CH_2), 0.85 (m, 3H, CH_3).

CAS : 23377-40-4

1-[3-[allyl(methoxy)phosphoryl]oxypropoxy]hexadecane (209)



Chemical Formula: $\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{O}_4\text{P}$
Molecular Weight: 418,60

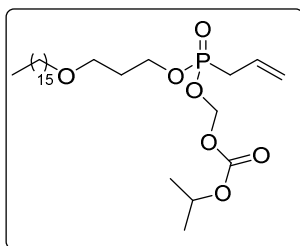
Oxalylchloride (2.04 mL, 3 eq., 23.8 mmol) was added to a solution of dimethyl allylphosphonate (1.19 g, 1eq., 7.9 mmol) in dichloromethane (35 mL). This mixture was gently refluxed during 3 days at 45°C . After evaporation of all volatiles, the crude compound was diluted in 35 mL of dichloromethane. Hexadecyloxypropyl alcohol (2.5 g, 1.05 eq., 8.3mmol) and freshly distilled triethylamine (1.6 mL, 1.5 eq., 20 mmol) were then added subsequently and the resulting solution was refluxed during 3 days at 45°C . The volatiles were removed under reduced pressure, and the residue was purified by flash column chromatography (eluting PE/EtOAc 9:1 - 6:4 - 0:1) to afford **209** as a white amorphous solid. (2.52 g, 76%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.75 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.23 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 4.13 (dt, J = 6.5, 1.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-c}$), 3.73 (d, J = 10.9 Hz, 3H, O- CH_3), 3.48 (t, J = 6.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-a}$), 3.38 (t, J = 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 2.62 (ddt, J = 22.0, 7.4, 1.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-P}$), 1.91 (p, J = 6.3Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-b}$), 1.54 (p, J = 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 1.32-1.22 (m, 26H, CH_2), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 28.3.

CAS : 1258789-65-9

Allyl(3-hexadecyloxypropoxy)phosphoryloxymethyl isopropyl carbonate (210)



Chemical Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{53}\text{O}_7\text{P}$
Molecular Weight: 520,69

209 (2.20g, 1 eq., 5.26 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (5 mL). Chloromethyl-isopropylcarbonate (1.05 mL, 1.5 eq., 7.89 mmol) and anhydrous sodium iodide (828 mg, 1.05 eq., 5.52 mmol) were respectively added and the mixture was refluxed at 90°C during 3 days under N₂ atmosphere. To the resulting solution was added 100 mL of diethyl ether and 20 mL of water. The organic layer was then washed with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL), brine (20 mL) and dried over MgSO₄. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (PE/EtOAc 75:25) to afford **210** as a colorless oil. (2.4 g, 88%)

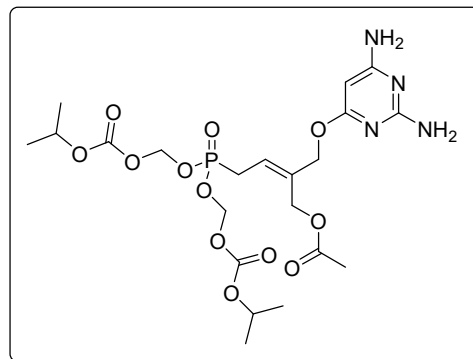
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.74 (m, 1H, CH-γ phosph), 5.62 (m, 1H, O-CH₂-O), 5.21 (m, 2H, CH₂-β phosph), 4.90 (sept., *J* = 6.3 Hz, 2H, CH-CH₃ POC), 4.17 (m, 2H, CH₂-c), 3.45 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-a), 3.36 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂-O), 2.65 (dd, *J* = 22.4, 7.4 Hz, 2H, CH₂-P), 1.89 (p., *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-b), 1.52 (p., *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.33-1.20 (m, 32H, CH₂, CH₃ POC), 0.85 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.7.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₅₄O₇ 521.3607, found 521.3599.

CAS : 1258789-66-0

[(Z)-4-[bis(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]-2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]but-2-enyl] acetate (213)



Chemical Formula: C₂₁H₃₃N₄O₁₂P
Molecular Weight: 564,4848

Starting from **205** (198 mg, 2 eq., 0.56 mmol), the general procedure 3 was applied with compound **200** (180 mg, 1 eq., 0.28 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (36 mg, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (5 mL). The pure product was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/AcOEt 75/25 as eluting system. General procedure 4 was used with intermediar compound (62 mg, 1 eq., 0.06 mmol), TFA (0.45 mL, 100 eq., 0.6 mmol) in CH₂Cl₂ (0.9 mL) for 1h, giving deprotected compound **213** as a colorless oil. (31 mg, 18%, E/Z 1:1)

Pure diastereoisomer Z:

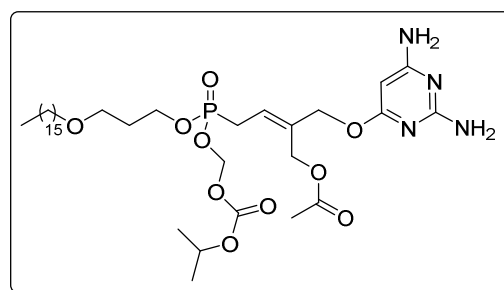
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.67 (m, 9H, CH=CH₂, O-CH₂-O, NH₂), 5.27 (s, 1H, H⁵), 4.94 (sept, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH-O), 4.77 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, CH₂-ODAPY), 4.72 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH₂-OAc), 2.97 (dd, *J* = 23.3, 8.0 Hz, 2H, CH₂-P), 2.02 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.31 (d, *J* = 6.2 Hz, 12H, CH₃ POC).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.49 (C⁶), 169.96 (C=O OAc), 165.80 (C⁴), 162.63 (C²), 153.12 (C=O POC), 136.16 (d, *J* = 14.7 Hz, C³), 120.69 (d, *J* = 11.6 Hz, C²), 84.18 (d, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂-O), 77.11 (C⁵), 72.77 (C^{CH} POC), 66.29 (d, *J* = 2.5 Hz, C¹), 59.27 (d, *J* = 2.1 Hz, CH₂-OAc), 26.46 (d, *J* = 139.4 Hz, CH₂-P), 20.92 (CH₃ POC), 19.83 (CH₃ Ac)

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.51

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₄N₄O₁₂P: 565.1911, found: 565.1904.

[(*E/Z*)-2-[(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxymethyl]-4-[3-hexadecoxypropoxy(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]but-2'-enyl] acetate (214)



Chemical Formula: C₃₅H₆₃N₄O₁₀P
Molecular Weight: 730.88

Starting from **210** (765 mg, 2 eq., 1.47 mmol), the general procedure 3 was applied for compound **200** (470 mg, 1 eq., 0.74 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (93 mg, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (15 mL). The pure product was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/AcOEt 75/25 as eluting system. General procedure 4 was used for intermediar compound (120 mg, 1 eq., 0.11 mmol), TFA (1.21 mL, 100 eq., 10.6 mmol) in CH₂Cl₂ (2.4 mL) for 1h, giving deprotected compound **214** as a colorless oil. (65 mg, 14%)

Diastereoisomer mixture:

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.81 (m, 1H, H³), 5.64 (m, 6H, NH₂, O-CH₂-O), 5.23 (s, 1H, H⁵), 4.88 (sept., *J* = 6.1 Hz, 2H, CH-CH₃ POC), 4.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, CH₂-ODAPY, E isomer), 4.75 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂-ODAPY, Z isomer), 4.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂-OAc, Z isomer), 4.62 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂-OAc, E isomer), 4.12 (m, 2H, CH₂-c), 3.48 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂-a), 3.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-O), 2.93 (dd, *J* = 23.4, 8.0 Hz, 2H, CH₂-P), 2.01 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.88 (m, 2H, CH₂-b), 1.55 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.31 (m, 33H, CH₂, CH₃ POC), 0.87 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.41 (C⁶/ C=O), 169.83 (C⁶/ C=O), 166.18 (C⁴/C²), 162.98 (C⁴/C²), 153.19 (C=O POC), 135.60 (d, *J* = 14.5 Hz, C³), 121.47 (d, *J* = 11.3 Hz, C²), 84.43 (d, *J* = 6.0 Hz, O-CH₂-O), 77.09 (C⁵), 72.60 (C^{CH} POC), 70.62 (CH₂-O), 66.24 (C¹), 65.34 (CH₂-a), 63.04 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂-c), 60.17 (CH₂-OAc), 59.31 (CH₂-OAc), 31.75 (CH₂ aliphatic), 30.69 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₂-b), 29.52(CH₂ aliphatic), 29.48(CH₂ aliphatic), 29.39(CH₂

aliphatic), 29.18(CH₂ aliphatic), 26.24 (d, *J* = 138.9 Hz, CH₂-P), 26.08(CH₂ aliphatic), 22.44(CH₂ aliphatic), 20.95(CH₂ aliphatic), 19.88(CH₂ aliphatic), 13.48 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.72, 26.59.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₅H₆₄N₄O₁₀P: 731.4359, found: 731.4351.

Pure diastereoisomer Z:

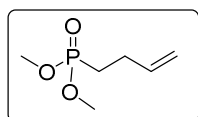
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.82 (q, *J* = 8.1 Hz, 3H, H^{3'}, NH₂), 5.65 (m, 4H, H^{2'}, NH₂), 5.22 (s, 1H, H⁵), 4.88 (sept., *J* = 6.1 Hz, 2H, CH-CH₃ POC), 4.78 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂-ODAPY), 4.72 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, CH₂-OAc), 4.12 (m, 2H, CH₂-c), 3.49 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂-a), 3.41 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-O), 2.90 (dd, *J* = 23.4, 8.0 Hz, 2H, CH₂-P), 2.03 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.88 (m, 2H, CH₂-b), 1.56 (m, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.31 (m, 33H, CH₂, CH₃ POC), 0.87 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.41 (C⁶), 169.83 (C=O OAc), 153.19 (C=O POC), 135.31 (C^{3'}), 122.90 (d, *J* = 11.1 Hz, C^{2'}), 84.40 (d, *J* = 5.6 Hz, O-CH₂-O), 77.12 (C⁵), 72.58 (C^{CH} POC), 70.60 (CH₂-O), 66.45 (C^{1'}), 65.20 (CH₂-a), 63.02 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂-c), 59.28 (CH₂-OAc), 31.73 (CH₂ aliphatic), 30.68 (d, *J* = 6.1 Hz, CH₂-b), 29.65 (CH₂ aliphatic), 29.46 (CH₂ aliphatic), 29.37 (CH₂ aliphatic), 29.17 (CH₂ aliphatic), 26.11 (d, *J* = 138.9 Hz, CH₂-P), 26.07 (CH₂ aliphatic), 22.42 (CH₂ aliphatic), 20.92 (CH₂ aliphatic), 19.83 (CH₂ aliphatic), 13.44 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.59.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₅H₆₄N₄O₁₀P: 731.4359, found: 731.4351.

***bis*-OMe-3-butenyl phosphonate (217)**



Chemical Formula: C₆H₁₃O₃P
Molecular Weight: 164.14

Commercially available dimethyl phosphite (4 g, 1 eq., 36.4 mmol) was added dropwise to a solution of NaH (60% in oil, 1.45 g, 1 eq., 36.4 mmol) in THF (40 mL) at 0°C. After 30 min. stirring at 0°C, bromo buten-3-yl (3.7 mL, 1 eq., 36.4 mmol) was added dropwise, and the reaction was stirred 24h at room temperature. To the solution 20 mL of water was added, extracted 3 times with dichloromethane (3 x 20 mL), and the organic layers were dried over MgSO₄. The mixture was filtrated and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography (AcOEt/MeOH 95:5) affording **217** (4.1 g, 71%) as a colorless oil.

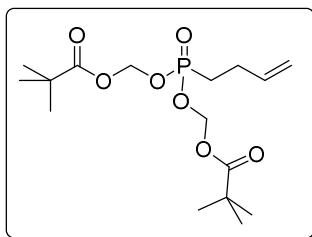
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.80 (ddt, *J* = 16.6, 10.1, 6.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.01 (m, 2H, CH₂=CH), 3.73 (s, 3H, CH₃-O), 3.68 (s, 3H, CH₃-O), 2.31 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 1.80 (m, 2H, CH₂-P).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 137.01 (d, *J* = 17.4 Hz, CH=CH₂), 115.26 (d, *J* = 1.2 Hz, CH₂=CH), 52.29 (d, *J* = 6.6 Hz, CH₃-O), 26.38 (d, *J* = 4.5 Hz, CH₂-CH=CH₂), 24.02 (d, *J* = 140.9 Hz, CH₂-P)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 34.09.

CAS : 205644-46-8

bis-POM-3-butenyl phosphonate (187)



Chemical Formula: $C_{16}H_{29}O_7P$
Molecular Weight: 364.37

Dimethyl butenylphosphonate **217** (2 g, 1 eq, 12.1 mmol), sodium iodide (3.65 g, 2 eq., 24.4 mmol) and chloromethylpivalate (4.3 mL, 2.5 eq., 30.5 mmol) were dissolved in anhydrous acetonitrile (13 mL), and refluxed for 3 days. The crude product was diluted with Et₂O (50 mL), washed with water (10 mL), aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Further purification of the product on silica column using PE/EtOAc 8:2 to 7:3 as eluent yielded **187** (3.02g, 68%) as a colorless oil.

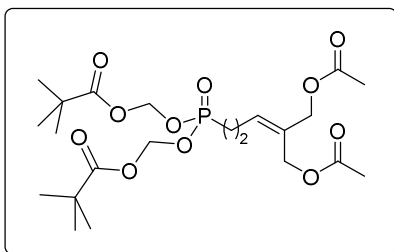
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.81 (ddt, *J* = 16.7, 10.3, 6.3 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.67 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H, O-CH₂-O), 5.04 (m, 2H, CH₂=CH), 2.34 (m, 2H, CH₂-CH₂=CH), 1.94 (m, 2H, CH₂-P), 1.24 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.85 (C=O), 138.41 (d, *J* = 18.6 Hz, CH=CH₂), 115.55 (d, *J* = 1.0 Hz, CH₂=CH), 81.32 (d, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂-O), 38.72 (C^{quat} POM), 26.84 (CH₃), 26.00 (d, *J* = 4.7 Hz, CH₂-CH=CH₂), 25.81 (d, *J* = 139.90 Hz, CH₂-P)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 32.40.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₃₀O₇P 365.1730, found 365.1723.

[[5-acetoxy-4-(acetoxymethyl)pent-3-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (216)



Chemical Formula: C₂₁H₃₅O₁₁P
Molecular Weight: 508.50

To a solution of bis(POM) 3-butenylphosphonate **187** (800 mg, 1.0 eq., 2.28 mmol) and compound **158** (785 mg, 2 eq., 4.56 mmol) in dry CH₂Cl₂ (25 mL), Nolan-Grubbs Catalyst 2nd Generation

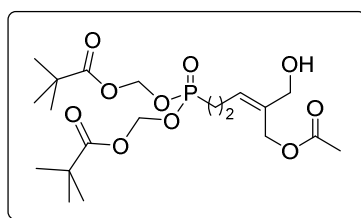
(318 mg, 15 mol%, 0.33 mmol) was added. This addition was performed in three equal portions of 5 mol% (106 mg, 0.11 mmol) at $t = 0, 2$ and 4 h over the course of the reaction. The solution was sonicated at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ under nitrogen atmosphere for 20 h. Volatiles were evaporated and the residue was purified by silica gel column chromatography (EtOAc/PE, 7:3) to give the desired phosphonate derivative **216** as a colorless oil (901 mg, 78%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.69 (m, 5H, $\text{CH}=\text{C}$, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.64 (s, 2H, CH_2-OAc), 4.56 (s, 2H, CH_2-OAc), 2.47 (dt, 15.0, 7.7 Hz, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.92 (m, 2H, CH_2-P), 1.24 (s, 18H, CH_3 POM).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 176.83 (C=O), 170.61 (C=O), 170.56 (C=O), 133.30 (d, $J = 17.1$ Hz, $\text{CH}=\text{C}$), 130.79 (d, $J = 1.7$ Hz, $\text{C}=\text{CH}$), 81.40 (d, $J = 6.2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 66.14 (CH_2-OAc), 59.46 (CH_2-OAc), 38.72 ($\text{C}^{\text{quat}}_{\text{POM}}$), 26.84 (CH_3 POM), 26.16 (d, $J = 134.6$ Hz, CH_2-P), 20.88 (Ac), 20.78 (Ac), 20.52 (d, $J = 4.7$ Hz, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$).

HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_{11}\text{P}$: 509.2152, found: 509.2144.

[[*(Z)*-3-(acetoxymethyl)-4-hydroxy-but-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (218**)**



Chemical Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_{10}\text{P}$
Molecular Weight: 466.46

In a flask charged with compound **216** (300 mg, 1 eq., 0.59 mmol) phosphate buffer (6 mL, 0.1 M, $\text{pH} = 7.0$) and *Candida antarctica* lipase B (CAL-B, 50% w/w, 150 mg) were added. The resulting mixture was stirred for 24h at room temperature, then all the solids were filtered off and washed with EtOAc (3 x 20 mL). The organic layer was then collected, dried over MgSO_4 and all the volatiles were removed by rotary evaporation. The residue was purified on a silica gel column eluting PE/EtOAc 4:6 to 2:8, allowing the obtention of compound **218** as a colorless oil. (510 mg, 57%). This compound is was stored at -20°C in the dark to prevent any racemization.

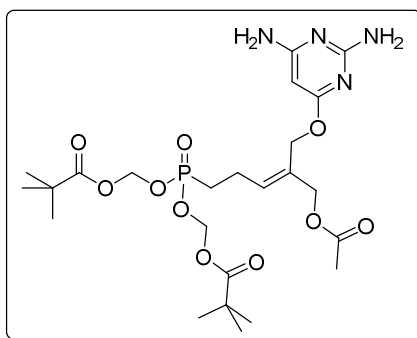
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.69 (m, 5H, $\text{CH}=\text{C}$, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.67 (s, 2H, CH_2-OAc), 4.09 (s, 2H, CH_2-OH), 2.45 (dt, 15.5, 7.7 Hz, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$), 2.06 (s, 3H, Ac), 1.93 (dt, 18.0, 7.7 Hz, 1H, 2H, CH_2-P), 1.23 (s, 18H, CH_3 POM).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 176.97 (C=O), 170.61 (C=O), 171.08 (C=O), 135.43 (d, $J = 1.3$ Hz, $\text{C}=\text{CH}$), 129.87 (d, $J = 14.8$ Hz, $\text{CH}=\text{C}$), 81.36 (d, $J = 6.3$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 65.08 (CH_2-OH), 59.75 (CH_2-OAc), 38.72 ($\text{C}^{\text{quat}}_{\text{POM}}$), 26.83 (CH_3 POM), 26.27 (d, $J = 140.6$ Hz, CH_2-P), 20.85 (Ac), 20.43 (d, $J = 5.0$ Hz, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 31.52.

HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{P}$: 467.2047, found: 467.2038.

[[*(E)*-4-(acetoxymethyl)-5-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy-pent-3-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (215)

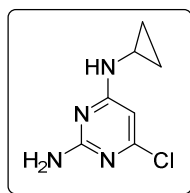


Chemical Formula: $C_{24}H_{39}N_4O_{10}P$
Molecular Weight: 574.57

Starting from **187** (297 mg, 2 eq., 0.81 mmol), the general procedure 3 was applied with compound **200** (260 mg, 1 eq., 0.41 mmol) and 15 mol% $RuCl_2PCy_3IMes$ benzylidene ruthenium catalyst (57 mg, 0.06 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH_2Cl_2 (8 mL). The pure product was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 75/25 as eluting system. General procedure 4 was used with the intermediate compound (75 mg, 1 eq., 0.077 mmol) and TFA (600 μ L) in CH_2Cl_2 (1.2 mL) for 1h, giving deprotected compound **215** as a colorless oil. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS-ESI (*m/z*) $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{40}N_4O_{10}P$: 575.2481, found: 575.2478.

6-chloro-*N*⁴-cyclopropyl-pyrimidine-2,4-diamine (226)



Chemical Formula: $C_7H_9ClN_4$
Molecular Weight: 184.63

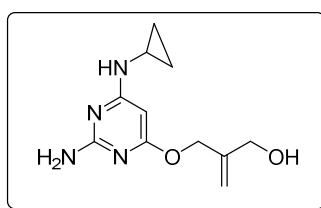
Under inert atmosphere, 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (2g, 1 eq., 12.2 mmol) was dissolved in *n*-butanol (40 mL). To this solution, cyclopropylamine (850 μ L, 1 eq., 12.2 mmol) and diisopropylethylamine (2.3 mL, 1.1 eq., 13.4 mmol) were sequentially added. The mixture was then refluxed at 95°C for 12h, then all the volatiles were removed under reduced pressure. The resulting crude product was then dissolved in ethyl acetate (80 mL) and water (80 mL). The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 x 80 mL), and the organic phases washed with water (40 mL). In order to extract all trace of product from the

aqueous phase, this layer was extracted 5 times with a mixture of chloroform/isopropanol 4:1 (4 x 100 mL), the combined organic phases washed once with brine (50 mL), dried over MgSO_4 and evaporated. The residue was then purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95:5), to give the desired product **226** as a white solid. (2.1 g, 93%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 6.00 (s, 1H, H^5), 2.54 (bs, 1H, CH cyclopropyl), 0.77 (dt, $J = 7.1, 4.8$ Hz, 2H, CH_2 cyclopropyl), 0.51 (dt, $J = 4.7, 4.0$ Hz, 2H, CH_2 cyclopropyl).

CAS : 21573-09-1

2-[[2-amino-6-(cyclopropylamino)pyrimidin-4-yl]oxymethyl]prop-2-en-1-ol (**228**)



Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$
Molecular Weight: 236,28

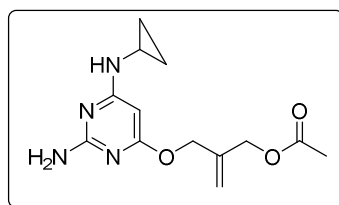
Following the general procedure 1 from **226** (300 mg, 1 eq., 1.65 mmol), 2-methylene-1,3-propenediol (398 μL , 3 eq., 4.87 mmol) and NaOtBu (317 mg, 2 eq., 3.30 mmol) in $t\text{BuOH}$ (3.2 mL), compound **228** was obtained as a white solid (173 mg, 45%) after purification by flash column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5.

^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.03 (bs, 1H, NH cyclopropyl), 5.51 (bs, 2H, NH_2), 5.41 (s, 1H, H^5), 5.18 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 5.13 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 4.77 (s, 2H, $\text{H}^{1'}$), 4.12 (s, 2H, $\text{H}^{3'}$), 2.91 (s, 1H, OH), 2.47 (m, 1H, CH cyclopropyl), 0.71 (dt, $J = 6.8, 4.8$ Hz, 2H, CH_2 cyclopropyl), 0.48 (dt, $J = 6.8, 4.0$ Hz, 2H, CH_2 cyclopropyl).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.70 (C^6), 166.84 (C^2), 162.84 (C^4), 146.16 ($\text{C}^{2'}$), 110.84 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 76.00 (C^5), 65.21 ($\text{C}^{1'}$), 62.56 ($\text{C}^{3'}$), 23.12 (CH cyclopropyl), 6.58 (CH_2 cyclopropyl).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$: 237.1352, found: 237.1345.

2-[[2-amino-6-(cyclopropylamino)pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (**230**)



Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$
Molecular Weight: 278,31

Acetic anhydride (596 μL , 3 eq., 6.30 mmol) and sodium acetate (348 mg, 2 eq., 4.24 mmol) were sequentially added to a solution of compound **228** (500 mg, 1 eq., 2.12 mmol) in AcN (16 mL). This vial was sealed and heated under microwave irradiation for 30 min. at 80°C. The crude product was dissolved in EtOAc (40 mL), extracted twice with water (2 x 20 mL), once with brine (20 mL), dried over MgSO_4 and the volatiles removed under *vacuo*. The residue was finally purified by

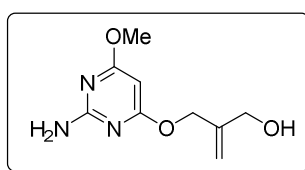
column chromatography (DCM/MeOH 99:1) in order to yield the desired product **230** as a white solid. (180 mg, 30%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.13 (bs, 1H, NH cyclopropyl), 5.60 (bs, 2H, NH₂), 5.43 (s, 1H, H⁵), 5.30 (s, 1H, CH=C), 5.24 (s, 1H, CH=C), 4.78 (s, 2H, H¹), 4.65 (m, 2H, H²), 2.48 (s, 1H, CH cyclopropyl), 2.05 (s, 3H, CH₃ Ac), 0.72 (dt, J = 6.8, 4.6 Hz, 2H, CH₂ cyclopropyl), 0.49 (dt, J = 6.8, 4.3 Hz, 2H, CH₂ cyclopropyl).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.48 (C⁶), 169.80 (C=O Ac), 166.85 (C²), 162.85 (C⁴), 146.16 (C^{2'}), 114.19 (CH₂=C), 75.99 (C⁵), 64.96 (C^{1'}), 64.13 (C^{3'}), 23.13 (CH₃ Ac), 19.86 (CH cyclopropyl), 6.61 (CH₂ cyclopropyl).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₉N₄O₃: 279.1457, found: 279.1453.

2-[(2-amino-6-methoxy-pyrimidin-4-yl)oxymethyl]prop-2-en-1-ol (**229**)



Chemical Formula: C₉H₁₃N₃O₃
Molecular Weight: 211.22

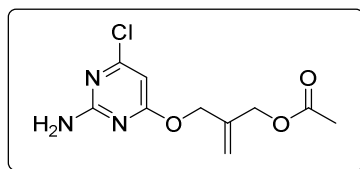
Following the general procedure 1, 2-amino-4-methoxy-6-chloropyrimidine (300 mg, 1 eq., 1.88 mmol), 2-methylene-1,3-propanediol (460 μ L, 3 eq., 5.64 mmol) and NaOtBu (361 mg, 2 eq., 3.76 mmol) in *t*BuOH (5 mL), compound **229** was obtained as a white solid after purification by flash column chromatography with DCM/MeOH 92:8. (202 mg, 51 %)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.93 (bs, 2H, NH₂), 5.39 (s, 1H, H⁵), 5.21 (s, 1H, CH₂=C), 5.15 (s, 1H, CH₂=C), 4.80 (s, 2H, C^{1'}), 4.14 (d, J = 5.8 Hz, 2H, C^{3'}), 3.96 (t, J = 5.8 Hz, 1H, OH), 3.80 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 172.31 (C⁴), 171.61 (C⁶), 163.00 (C²), 145.76 (C^{2'}), 110.87 (CH₂=C), 79.05 (C⁵), 65.71 (C^{1'}), 62.53 (C^{3'}), 52.64 (CH₃).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₄N₃O₃: 212.1036, found: 212.1034.

2-[(2-amino-6-chloro-pyrimidin-4-yl)oxymethyl]allyl acetate (**233**)



Chemical Formula: C₁₀H₁₂ClN₃O₃
Molecular Weight: 257.67

To a solution of 2-methylene-1,3-propanediol (3 g, 1 eq., 18.3 mmol) in dioxane (72 mL), sodium hydride (60% in oil, 732 mg, 1 eq., 18.3 mmol) was slowly added, and the solution was stirred 30 min. at 70°C. 2-amino-4,6-dichloropyrimidine was then added and the mixture was refluxed 3h at 110°C. After evaporation of all volatiles, the residue was loaded onto a silica gel column and purified using DCM/MeOH (99:1) as eluent, affording 4 g of a white powder. The product, contaminated with dipyrimidine moiety side-product, was then directly engaged in the following step, in order to separate these compounds. 8 vials of 10-20 mL

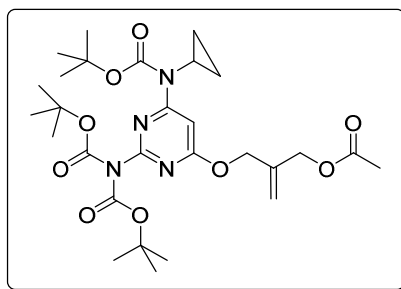
were filled each with 500 mg of product and dissolved in AcN (16mL). To these mixtures, acetic anhydride (439 μ L, 2 eq., 4.64 mmol) and sodium acetate (571 mg, 3 eq., 6.96 mmol) were added and each vial was afterwards submitted to microwave irradiation for 30 min. at 80°C. Over these collected fractions, 100 mL of ethyl acetate was added, extracted twice with water (40 mL), once with brine (40 mL), dried over MgSO_4 and evaporated under reduced pressure. Pure compound **233** was then obtained after silica gel chromatography, eluting dichloromethane to afford desired product as a white solid (2.12 g, 45%).

^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.35 (bs, 2H, NH_2), 6.11 (s, 1H, H^5), 5.33 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 5.29 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.85 (s, 2H, $\text{H}^{1'}$), 4.66 (s, 2H, $\text{H}^{3'}$), 2.05 (s, 3H, Ac).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.65 (C^6), 169.67 ($\text{C}=\text{O}$ Ac), 163.12 (C^4), 160.73 (C^2), 139.83 ($\text{C}^{2'}$), 115.26 ($\text{C}^{3'}$), 95.20 (C^5), 66.04 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 63.91 ($\text{CH}_2\text{-OAc}$), 19.76 (CH_3).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{O}_3$: 258.0646, found: 258.0640.

2-[[2-[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-[tert-butoxycarbonyl(cyclopropyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (234)

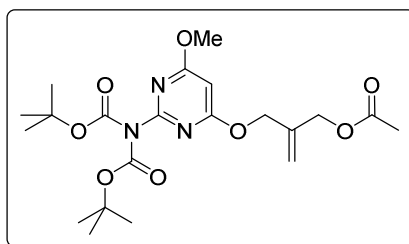


Chemical Formula: $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9$
Molecular Weight: 578,66

Following general procedure 2, in a 2-5 mL microwave vial, a solution of compound **230** (56 mg, 1 eq., 0.20 mmol) was dissolved into THF (2 mL). To this mixture dimethylaminopyridine (9 mg, 0.35 eq., 0.07 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (264 mg, 6 eq., 1.21 mmol) were added, and the reaction was stirred under microwave irradiation at 70°C for 30 minutes. After evaporation of all volatiles, pure compound **234** was isolated after purification on a silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether / Ethyl acetate 93:7. (93 mg, 80 %)

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9$: 579.3030, found: 579.3026.

2-[[2-[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-methoxy-pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (235)



Chemical Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_8$
Molecular Weight: 453,49

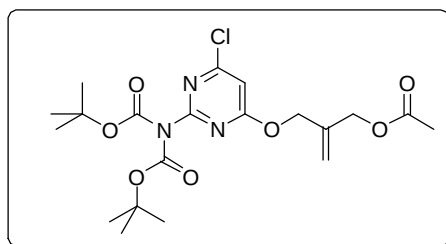
Compound **231** (590 mg, 1 eq., 2.79 mmol), acetic anhydride (0.53 mL, 3 eq., 5.59 mmol) and NaOAc (687 mg, 2 eq., 8.37 mmol) were suspended in anhydrous acetonitrile (18 mL) in a microwave sealed tube. The mixture was irradiated for 30 min at 80°C. The crude product was extracted with EtOAc, washed twice with water (2 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. After purification on silica (eluting DCM / MeOH 99:1), the obtained product was directly engaged in the next step. Following general procedure 2, in a microwave vial, the mono-acetylated product (350 mg, 1 eq., 1.38 mmol) was dissolved in THF (10 mL). To this mixture dimethylaminopyridine (59 mg, 0.35 eq., 0.48 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (1.81 g, 6 eq., 8.29 mmol) were added, and the reaction was stirred under microwave irradiation at 70°C for 30 minutes. After evaporation of all volatiles, pure compound **235** was isolated after purification on a silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether / Ethyl acetate 93:7. (532 mg, 42 % over 2 steps)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (s, 1H, H⁵), 5.33 (s, 1H, CH₂=C), 5.29 (s, 1H, CH₂=C), 4.85 (s, 2H, C^{1'}), 4.65 (s, 2H, C^{3'}), 3.92 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃Ac), 1.47 (s, 3H, CH₃Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.20 (C⁴), 171.20 (C⁶), 170.57 (C=O Ac), 156.66 (C²), 150.62 (C=O Boc), 138.84 (C^{2'}), 116.66 (CH₂=C), 88.42 (C⁵), 66.83 (C^{1'}), 64.65 (C^{3'}), 52.64 (CH₃OMe), 27.86 (CH₃ Boc), 20.84 (CH₃ Ac).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₂N₃O₈: 454.2190, found: 454.2183.

2-[[2-[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-chloro-pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (**236**)



Chemical Formula: C₂₀H₂₈ClN₃O₇
Molecular Weight: 457.91

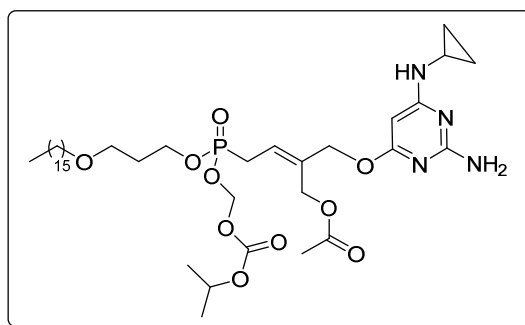
Following general procedure 2, in a microwave vial, a solution of compound **233** (389 mg, 1 eq., 1.51 mmol) was dissolved in THF (14 mL). To this mixture dimethylaminopyridine (65 mg, 0.35 eq., 0.52 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (1.98 g, 6 eq., 9.08 mmol) were added, and the reaction was stirred under microwave irradiation at 70°C for 30 minutes. After evaporation of all volatiles, pure compound **236** was isolated after purification on a silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether / Ethyl acetate 93:7. (447 mg, 65 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (s, 1H, H⁵), 5.34 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, CH=C), 4.89 (s, 2H, H^{1'}), 4.65 (s, 2H, H^{3'}), 2.08 (s, 3H, CH₃Ac), 1.48 (s, 18H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.73 (C⁶), 170.49 (C=O Ac), 161.24 (C⁴), 157.29 (C²), 150.10 (C=O Boc), 138.15 (C=O Boc), 117.51 (CH=C), 105.22 (C⁵), 83.74 (C^{quat} Boc), 67.48 (C^{1'}), 64.48 (C^{3'}), 27.83 (CH₃ Boc), 20.81 (CH₃ Ac).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₂₉ClN₃O₇: 458.1694, found: 458.1691.

[(E/Z)-2-[[2-amino-6-(cyclopropylamino)pyrimidin-4-yl]oxymethyl]-4-[3-hexadecoxypropoxy(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]but-2'-enyl] acetate (240)

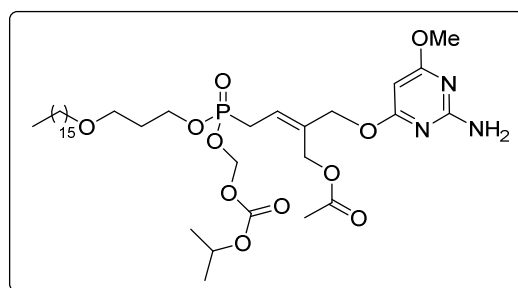


Chemical Formula: $C_{24}H_{39}N_4O_{10}P$
Molecular Weight: 770.95

Starting from **210** (108 mg, 2 eq., 0.21 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **234** (60 mg, 1 eq., 0.10 mmol) and 21 mol% $RuCl_2PCy_3IMes$ Benzylidene ruthenium catalyst (19.5 mg, 0.021 mmol, added in 3 equal portions of 7 mol%) in freshly distilled CH_2Cl_2 (3 mL). The crude mixture was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 7/3 as eluting system. General procedure 4 was employed on the intermediar compound (22mg, 1 eq., 0.021 mmol) and TFA (157 μ L, 100 eq., 2.05 mmol) in CH_2Cl_2 (300 μ L) for 2h, giving deprotected compound **240** as a white solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{38}H_{68}N_4O_{10}P$: 771.4673, found: 771.4670.

[(E/Z)-2-[[2-[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-methoxy-pyrimidin-4-yl]oxymethyl]-4-[3-hexadecoxypropoxy(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]but-2'-enyl] acetate (241)



Chemical Formula: $C_{22}H_{36}N_3O_{11}P$
Molecular Weight: 745.89

Starting from **210** (358 mg, 2 eq., 0.69 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **235** (156 mg, 1 eq., 0.34 mmol) and 21 mol% $RuCl_2PCy_3IMes$ Benzylidene ruthenium catalyst (43 mg, 0.051 mmol, added in 3 equal portions of 7 mol%) in freshly distilled CH_2Cl_2 (7 mL). The crude mixture was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 8/2 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (130mg, 1 eq., 0.14 mmol) and TFA (1.05 mL, 100 eq., 13.7 mmol) in CH_2Cl_2 (2.1 mL) for 2h, giving deprotected compound **241** as a white solid. (E/Z 50/50, 48 mg, 26%)

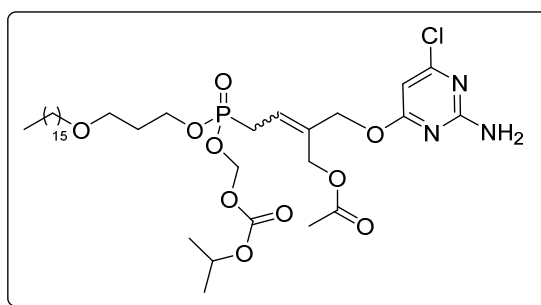
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.93 (bs, 1H, NH), 5.85 (bs, 1H, NH), 5.74 (m, 1H, H^{3'}), 5.63 (m, 2H, O-CH₂-O), 5.34 (2 x s, 1H, H⁵), 4.87 (sept., *J* = 2.5 Hz, 2H, CH-CH₃ POC), 4.86 (m, 2H, H^{1'}/CH₂-OAc), 4.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H^{1'}/CH₂-OAc), 4.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, H^{1'}/CH₂-OAc), 4.59 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, H^{1'}/CH₂-OAc), 4.09 (m, 2H, CH₂-c), 3.75 (2 x s, 3H, CH₃-O), 3.45 (2 x t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂-a), 3.36 (2 x t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-O HDP), 2.92 (m, 2H, CH₂-P), 1.98 (s, 3H, CH₃ Ac), 1.84 (2 x sept, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-b), 1.49 (m, 2H, CH₂, CH₂-CH₂-O), 1.31 (m, 33H, CH₂, CH₃ POC), 0.87 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 172.30 (C=O), 171.37 (2 x C⁶), 169.77 (2 x C⁴/C²), 162.94 (2 x C⁴/C²), 153.17 (C=O POC), 135.21 (2 x d, *J* = 14.4 Hz, C^{2'}), 121.96 (2 x d, *J* = 11.5 Hz, C^{3'}), 84.42 (2 x d, *J* = 6.0 Hz, O-CH₂-O), 79.19 (2 x C⁵), 77.09 (C^{quat}), 72.58 (2 x C^{CH} POC), 71.25 (CH₂-O HDP), 66.86 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 66.41 (CH₂-a), 65.29 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 63.06 (2 x d, *J* = 7.6 Hz, CH₂-c), 60.81 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 59.27 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 52.64 (CH₃-O), 31.73 (CH₂ aliphatic), 30.68 (2 x d, *J* = 6.2 Hz, CH₂-b), 29.64 (CH₂ aliphatic), 29.49 (CH₂ aliphatic), 29.35 (CH₂ aliphatic), 29.16 (CH₂ aliphatic), 26.06 (CH₂-P), 22.41 (CH₂ aliphatic), 20.92 (CH₂ aliphatic), 19.84 (2 x CH₂ aliphatic), 13.44 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.52, 26.26.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₈H₆₈N₄O₁₀P: 746.4351, found: 746.4348.

[(*E/Z*)-2'-[(2-amino-6-chloro-pyrimidin-4-yl)oxymethyl]-4-[3-hexadecyloxypropoxy(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]but-2'-enyl] acetate (242**)**



Chemical Formula: C₃₅H₆₁ClN₃O₁₀P
Molecular Weight: 750,31

Starting from **210** (954 mg, 2 eq., 1.83 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **236** (420 mg, 1 eq., 0.92 mmol) and 21mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (117 mg, 0.138 mmol, added in 3 equal portions of 7mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (18 mL, 0.1 M). The crude mixture was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/-EtOAc 8/2 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (405mg, 1 eq., 0.43 mmol) and TFA (3.26 mL, 100 eq., 42.6 mmol) in CH₂Cl₂ (6.5 mL) for 2h, giving deprotected compound **242** as a colorless oil. (*E/Z* 45:55, 289 mg, 42%)

Diastereoisomer mixture:

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.09 (2 x s, 1H, H⁵), 5.81 (2 x q, *J* = 2.5 Hz, 1H, H^{3'}), 5.63 (m, 2H, O-CH₂-O), 5.42 (bs, 1H, NH), 5.19 (bs, 1H, NH), 4.92 (sept., *J* = 2.5 Hz, 2H, CH-CH₃ POC), 4.88 (t, *J* = 3.4 Hz, 2H, CH₂-O), 4.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, CH₂-O), 4.68 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, CH₂-O), 4.62 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂-O), 4.14 (m, 2H, CH₂-c), 3.45 (2 x t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-a), 3.35 (2 x t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂-O), 2.92 (m, 2H, CH₂-P), 2.05 (2 x s,

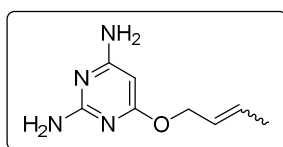
3H, CH₃ Ac), 1.90 (m, 2H, CH₂-b), 1.54 (m, 2H, CH₂, CH₂-CH₂-O), 1.31 (m, 33H, CH₂, CH₃ POC), 0.87 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.64 (2 x C⁶/C=O), 170.43 (2 x C⁶/C=O), 162.16 (2 x C⁴/C²), 160.93 (2 x C⁴/C²), 153.23 (C=O POC), 134.12 (2 x d, *J* = 14.7 Hz, C^{2'}), 122.30 (2 x d, *J* = 11.5 Hz, C^{3'}), 97.15 (2 x C⁵), 84.42 (2 x d, *J* = 5.3 Hz, O-CH₂-O), 77.09 (C^{quat}), 73.22 (2 x C^{CH} POC), 71.25 (CH₂-O HDP), 68.17 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 66.41 (CH₂-a), 65.70 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 63.59 (2 x d, *J* = 7.6 Hz, CH₂-c), 60.17 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 59.31 (2 x C^{1'}/CH₂OAc), 31.92 (CH₂ aliphatic), 30.70 (2 x d, *J* = 6.2 Hz, CH₂-b), 29.71 (CH₂ aliphatic), 29.69 (CH₂ aliphatic), 29.65 (CH₂ aliphatic), 29.61 (CH₂ aliphatic), 29.35 (CH₂ aliphatic), 26.62 (2 x d, *J* = 140.8 Hz, CH₂-P), 26.16 (CH₂ aliphatic), 22.68 (CH₂ aliphatic), 21.64 (CH₂ aliphatic), 20.79 (2 x CH₂ aliphatic), 14.11 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.87, 26.59.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₅H₆₂N₃O₁₀P: 750.3868, found: 750.3856.

6-[(*E*)-but-2-enoxy]pyrimidine-2,4-diamine (245)



Chemical Formula: C₈H₁₂N₄O
Molecular Weight: 180.21

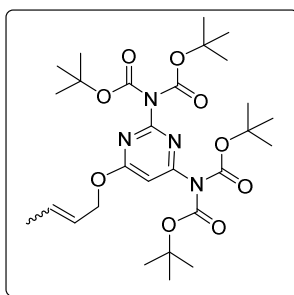
Following the general procedure 1, to a solution of 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (100 mg, 1eq., 0.69 mmol) in *t*BuOH (2 mL) was introduced crotyl alcohol, mixture of *cis* and *trans* isomers (0.18 mL, 3 eq., 2.08 mmol) and NaOtBu (133 mg, 2 eq., 1.38 mmol). Desired compound **245** was obtained after purification as a colorless oil, as a *cis* and *trans* mixture. (125 mg, quantitative yield)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.70 (m, 2H, H^{2'/3'}), 5.53 (bs, 2H, NH₂), 5.45 (bs, 2H, NH₂), 5.15 (s, 1H, H⁵), 4.56 (m, 2H, CH₂-O), 1.66 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 171.50 (C⁶), 167.15 (C²), 164.15 (C⁴), 129.96 (C^{2'/3'}), 127.65 (C^{2'/3'}), 77.78 (C⁵), 66.26 (CH₂-O), 17.85 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₃N₄O 181.1084, found 181.1081.

tert-butyl-*N*-[2-[*bis*(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-[(*E*)-but-2-enoxy]pyrimidin-4-yl]-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-carbamate (246)



Chemical Formula: C₂₈H₄₄N₄O₉
Molecular Weight: 580.68

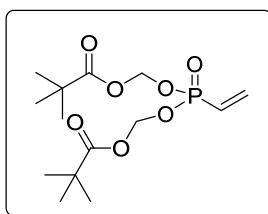
Di-*tert*-butyl dicarbonate (2.9 g, 6 eq., 13.32 mmol) and 4-(Dimethylamino)pyridine (95 mg, 0.35 eq., 0.78 mmol) were added to a solution of compound **245** (400 mg, 1 eq., 2.22 mmol) in THF (10 mL), pursuing conditions of general procedure 2. The expecting compound **246** (1.19 g, 92%) was obtained as a colorless oil after purification by flash column chromatography.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.85 (s, 1H, H⁵), 5.81 (m, 1H, H^{3'}), 5.67 (m, 1H, H^{2'}), 4.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-O), 1.69 (dd, *J* = 6.4, 1.5 Hz, 3H, CH₃), 1.47 (s, 18H, CH₃-Boc), 1.40 (s, 18H, CH₃-Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.51 (C⁶), 159.87 (C⁴), 156.5 (C²), 150.47 (C=O^{Boc}), 150.02 (C=O^{Boc}), 131.55 (C^{2'/3'}), 125.19 (C^{2'/3'}), 96.63 (C⁵), 84.07 (C^{quat Boc}), 83.03 (C^{quat Boc}), 67.78 (CH₂-O), 27.87 (CH₃ Boc), 27.77 (CH₃ Boc), 17.84 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₄₅N₄O₉ 581.3181, found 581.3179.

[2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy(vinyl)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (248)



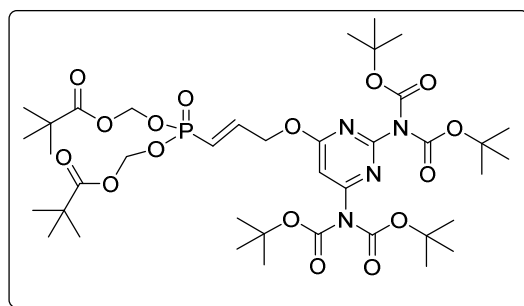
Chemical Formula: C₁₄H₂₅O₇P
Molecular Weight: 336.32

Dimethylvinylphosphonate (1 g, 1 eq, 7.35 mmol), sodium iodide (2.20 g, 2 eq., 14.7 mmol) and chloromethylpivalate (2.6 mL, 2.5 eq., 18.4 mmol) were dissolved in anhydrous acetonitrile (7 mL), and refluxed for 3 days. The crude product was diluted with Et₂O (50 mL), washed with water (10 mL), with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL), dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Further purification of the product on silica column using PE/EtOAc 8:2 to 7:3 as eluent allowed the production of **248** (1.47 g, 62%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.21 (m, 3H, CH₂=CH), 5.67 (m, 4H, O-CH₂-O), 1.21 (s, 18H, POM).

CAS : 1258789-61-5

[[/E)-3-[2,6-bis[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxyprop-1-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (249)



Chemical Formula: C₃₉H₆₃N₄O₁₆P
Molecular Weight: 874.92

Following the general procedure 3, crotyl-pyrimidine **246** (350 mg, 1 eq., 0.60 mmol) and *bis*(POM)vinylphosphonate (405 mg, 2 eq., 1.20 mmol) were dissolved in freshly distilled CH₂Cl₂ (6 mL, 0.1 M) after which 12mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (66 mg, 0.06 mmol, added in 3 equal portions of 4mol%) was added. After evaporation of all volatiles, purification by flash column chromatography using an elution gradient of Petroleum ether/EtOAc (8:2 to 6:4) gave *trans*-compound **249** as a light brown oil (164 mg, 31%).

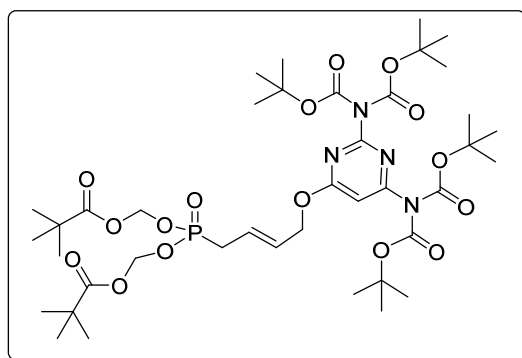
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.97 (s, 1H, H⁵), 6.87 (ddt, *J* = 24.2, 17.3, 3.3 Hz, 1H, H^{2/3'}), 6.04 (ddt, *J* = 21.0, 17.3, 1.6 Hz, 1H, H^{2/3'}), 5.61 (m, 4H, O-CH₂-O), 4.94 (m, 2H, O-CH₂), 1.46 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.38 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.16 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.69 (C=O^{POM}), 170.53 (C⁶), 160.05 (C⁴), 156.39 (C²), 150.30 (C=O^{Boc}), 149.79 (C=O^{Boc}), 146.75 (d, *J* = 6.9 Hz, C^{3'}), 117.11 (d, *J* = 193.9 Hz, C^{2'}), 95.35 (C⁵), 84.33 (C^{quat Boc}), 83.23 (C^{quat Boc}), 81.55 (d, *J* = 5.5 Hz, O-CH₂-O), 65.36 (d, *J* = 23.8 Hz, CH₂-O), 38.72 (C^{quat POM}), 27.82 (CH₃ Boc), 27.71 (CH₃ Boc), 26.83 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 17.59.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₆₄N₄O₁₆P 875.4049, found 875.4047.

[[*(E)*-4-[2,6-bis[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxybut-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (250)



Chemical Formula: C₄₀H₆₅N₄O₁₆P
Molecular Weight: 888.95

Following the general procedure 3 from compound **246** (50 mg, 1 eq., 0.09 mmol) with allyl-*bis*(POM)phosphonate (60 mg, 2 eq., 0.17 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (12 mg, 0.013 mmol, added in 3 equal portions of 3 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (2 mL), compound **250** (33 mg, 43%) was isolated as a light brown oil after purification by silica gel column chromatography using petroleum ether/EtOAc (8:2 to 7:3) as eluent.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.91 (s, 1H, H⁵), 5.88 (ddt, *J* = 15.5, 5.5, 5.1 Hz, 1H, H^{2/3'}), 5.76 (ddt, *J* = 15.3, 7.0, 6.9 Hz, 1H, H^{2/3'}), 5.67 (m, 4H, O-CH₂-O), 4.79 (dd, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂-O), 2.72 (dd, *J* = 22.6, 7.0 Hz, 2H, H⁴ⁱ), 1.50 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.43 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.23 (s, 18H, CH₃ POM).

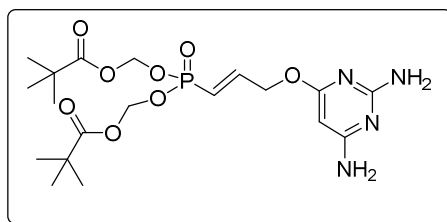
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.97 (C=O^{POM}), 171.27 (C⁶), 159.99 (C⁴), 156.57 (C²), 150.54 (C=O^{Boc}), 150.05 (C=O^{Boc}), 130.55 (d, *J* = 15.0 Hz, C^{2/3'}), 122.55 (d, *J* = 12.1 Hz, C^{2/3'}), 96.36 (C⁵), 84.27 (C^{quat Boc}), 83.22 (C^{quat}).

^{Boc}), 81.72 (d, *J* = 6.4 Hz, O-CH₂-O), 66.82 (*J* = 2.4 Hz, CH₂-O), 38.87 (C^{quat POM}), 31.05 (d, *J* = 140.0 Hz, C^{4'}), 27.98 (CH₃ Boc), 27.86 (CH₃ Boc), 26.99 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.13.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₄₀H₆₆N₄O₁₆P 889.4206, found 889.4200.

[[*(E)*-3-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxyprop-1-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (254)



Chemical Formula: C₁₉H₃₁N₄O₈P
Molecular Weight: 474.45

Following general procedure 4, trifluoroacetic acid (1.4 mL, 100 eq., 18.6 mmol) and Boc-compound **249** (163 mg, 1 eq., 0.19 mmol) were diluted in CH₂Cl₂ (3 mL, 2:1 CH₂Cl₂/TFA v/v). Pure compound **254** (39 mg, 44%) was obtained after purification by flash column chromatography with EtOAc followed by EtOAc/MeOH (95:5) as eluent.

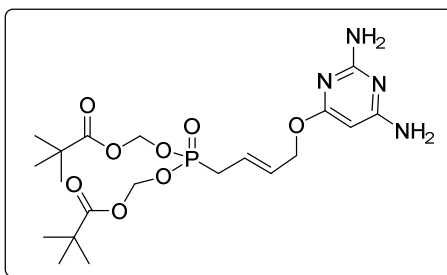
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.91 (ddt, *J* = 24.0, 17.2, 3.7 Hz, 1H, H^{2'/3'}), 6.02 (ddt, *J* = 22.0, 17.2, 2.1 Hz, 1H, H^{2'/3'}), 5.67 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.60 (bs, 2H, NH₂), 5.43 (bs, 2H, NH₂), 5.28 (s, 1H, H⁵), 4.94 (dd, *J* = 3.7, 2.1 Hz, 2H, CH₂-O), 1.19 (s, 18H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 177.00 (C=O^{POM}), 170.79 (C⁶), 167.48 (C⁴), 164.12 (C²), 149.99 (*J* = 6.1 Hz, C^{3'}), 117.14 (*J* = 190.8 Hz, C^{2'}), 82.39 (*J* = 5.4 Hz, O-CH₂-O), 77.87 (C⁵), 64.46 (*J* = 23.6 Hz, CH₂-O), 39.26 (C^{quat POM}), 27.11 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 17.71.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₃₂N₄O₈P 475.1952, found 475.1954.

[[*(E)*-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (255)



Chemical Formula: C₂₀H₃₃N₄O₈P
Molecular Weight: 488.48

Following the general procedure 4 from compound **250** (177 mg, 1 eq., 0.20 mmol) using TFA (1.5 mL, 100 eq., 19.91 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) for 2h, deprotected compound **256** (85 mg, 87%) was obtained as a colorless oil after flash column chromatography with EtOAc then EtOAc/MeOH (95:5).

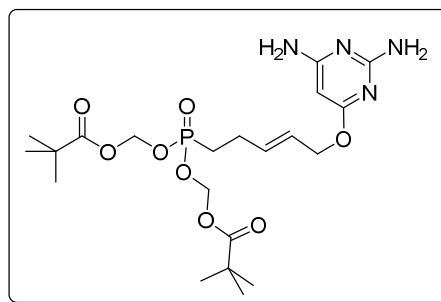
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.89 (ddt, *J* = 15.3, 5.9, 5.6 Hz, 1H, H^{2'/3'}), 5.70 (m, 5H, H^{2'/3'}, O-CH₂-O), 5.60 (bs, 2H, NH₂), 5.50 (bs, 2H, NH₂), 5.21 (s, 1H, H⁵), 4.67 (dd, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂-O), 2.76 (dd, *J* = 22.4, 7.2 Hz, 2H, H^{4'}), 1.22 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 177.11 (C=O^{POM}), 171.30 (C⁶), 167.27 (C⁴), 164.14 (C²), 132.55 (d, *J* = 15.1 Hz, C^{2'/3'}), 122.20 (d, *J* = 11.5 Hz, C^{2'/3'}), 82.42 (d, *J* = 6.3 Hz, O-CH₂-O), 77.91 (C⁵), 65.38 (d, *J* = 2.3 Hz, CH₂-O), 39.24 (C^{quat POM}), 31.21 (d, *J* = 139.6 Hz, C^{4'}), 27.11 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.99.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₃₄N₄O₈P 489.2109, found 489.2109.

[[*(E)*-5-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxypent-3-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (256)



Chemical Formula: C₂₁H₃₅N₄O₈P
Molecular Weight: 502,50

Following the general procedure 3 from compound **187** (93 mg, 2 eq., 0.26 mmol) using **246** (75 mg, 1 eq., 0.13 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (18 mg, 0.018 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (1 mL, 0.1 M). The crude compound was not isolated and engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 7/3 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (47 mg, 1 eq., 0.05 mmol), TFA (0.40 mL, 100 eq., 5.2 mmol) in CH₂Cl₂ (0.80 mL) for 1h to give deprotected compound **256** (23 mg, 35%) as a colorless oil after FCC with EtOAc to EtOAc /MeOH 95:5. The residue was finally purified on a reverse phase onto HPLC, eluting AcN/H₂O (0 to 100%)

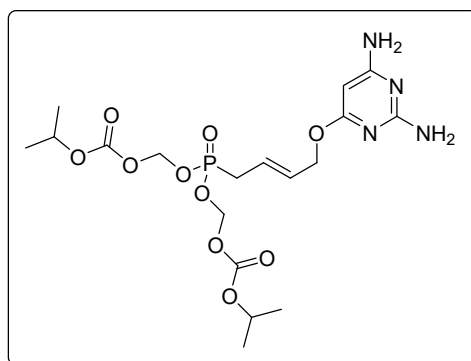
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.78 (m, 2H, H^{2'}, H^{3'}), 5.68 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.48 (bs, 2H, NH₂), 5.34 (bs, 2H, NH₂), 5.19 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H⁵), 4.63 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂-O), 2.35 (m, 2H, CH₂, H^{4'}), 1.94 (dt, *J* = 19.5, 8.2 Hz, 2H, H^{5'}), 1.21 (d, *J* = 1.4 Hz, 18H, CH₃-POM).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 176.22 (C=O POM), 170.53 (C⁶), 166.41 (C⁴), 163.28 (C²), 132.16 (d, *J* = 17.3 Hz, C^{3'}), 126.78 (d, *J* = 1.2 Hz, C^{2'}), 81.37 (d, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂-O), 77.03 (C⁵), 64.86 (CH₂-O), 38.37 (C^{quat POM}), 26.23 (CH₃^{POM}), 25.72 (d, *J* = 138.04 Hz, C^{5'}), 24.80 (d, *J* = 4.6 Hz, C^{4'})

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 31.27.

HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ calcd for C₂₁H₃₆N₄O₅P 503.2270, found 503.2265.

**[[*E*]-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2'-enyl]-
(isopropoxycarbonyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl isopropyl carbonate (257)**



Chemical Formula: C₁₈H₂₉N₄O₁₀P
Molecular Weight: 492,42

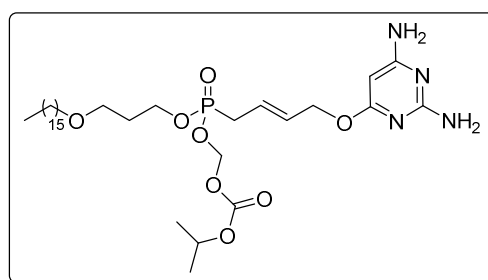
Following the general procedure 3 from compound **205** (137 mg, 2 eq., 0.36 mmol) using **246** (103 mg, 1 eq., 0.18 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (25 mg, 0.027 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (2 mL, 0.1 M). The crude compound was not isolated, and then engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 75/25 as eluting system. General procedure 4 was followed on the intermediar compound (57 mg, 1 eq., 0.06 mmol), TFA (0.49 mL, 100 eq., 6.4 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) for 1h to give deprotected compound **257** after FCC with DCM/MeOH 95:5 as a colorless oil.(30 mg, 34%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.80 (m, 2H, H^{2'}, H^{3'}), 5.66 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.54 (bs, 2H, NH₂), 5.40 (bs, 2H, NH₂), 5.21 (s, 1H, H⁵), 4.90 (p, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH-POC), 4.68 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂-O), 2.77 (dd, *J* = 22.5, 7.2 Hz, 2H, H^{4'}), 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 12H, CH₃ POC).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.43 (C⁶), 166.37 (C⁴), 163.21 (C²), 153.12 (C=O), 131.87 (d, *J* = 15.4 Hz, C^{3'}), 121.12 (d, *J* = 11.2 Hz, C^{2'}), 119.99, 84.10 (d, *J* = 6.1 Hz, O-CH₂-O), 77.02 (C⁵), 72.74 (CH-CH₃ POC), 64.53 (CH₂-O), 31.47 (under Acetone peak, d), 20.89 (CH₃ POC).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 27.08.

**[[*E*]-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2'-enyl]-(3-hexadecoxypropoxy)phosphoryl]oxymethyl
isopropyl carbonate (258)**



Chemical Formula: C₃₂H₅₉N₄O₈P
Molecular Weight: 658,82

Starting from **210** (206 mg, 2 eq., 0.38 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **246** (112 mg, 1 eq., 0.19 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (25 mg, 0.027 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (4 mL, 0.1 M). The crude mixture was not isolated, and then engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 8/2 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (70 mg, 1 eq., 0.065 mmol), TFA (0.50 mL, 100 eq., 6.5 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) for 1h, giving deprotected compound **258** as a colorless oil. (45 mg, 32%)

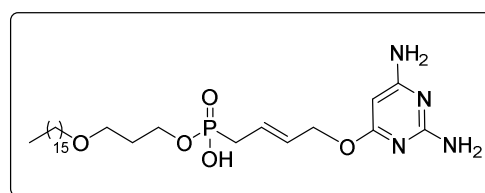
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.81 (m, 2H, H^{3'}, H^{2'}), 5.62 (m, 6H, O-CH₂-O, NH₂), 5.22 (s, 1H, H⁵), 4.90 (sept., *J* = 6.2 Hz, 1H, CH-CH₃ POC), 4.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H^{1'}), 4.13 (m, 2H, CH₂-c), 3.48 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂-a), 3.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂-O), 2.70 (dd, *J* = 22.4, 6.9 Hz, 2H, CH₂-P), 1.87 (p, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂-b), 1.54 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂-CH₂-O), 1.41 – 1.21 (m, 32H, CH₂, CH₃ POC), 0.86 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.50 (C⁶), 166.12 (C⁴/C²), 162.99 (C⁴/C²), 153.19 (C=O POC), 131.17 (d, *J* = 14.7 Hz, C^{2'}), 122.20 (d, *J* = 11.3 Hz, C^{3'}), 84.34 (d, *J* = 6.0 Hz, O-CH₂-O), 77.06 (C⁵), 72.55 (C^{CH} POC), 70.60 (CH₂-O), 66.23 (CH₂-a), 64.69 (H^{1'}), 62.93 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂-c), 31.73 (CH₂ aliphatic), 30.82 (under acetone peak, d), 30.70 (d, *J* = 6.1 Hz, CH₂-b), 29.65 (CH₂ aliphatic), 29.51 (CH₂ aliphatic), 29.49 (CH₂ aliphatic), 29.37 (CH₂ aliphatic), 29.17 (CH₂ aliphatic), 26.07 (CH₂ aliphatic), 22.42 (CH₂ aliphatic), 20.94 (CH₂ aliphatic), 13.45 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.80.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₂H₆₀N₄O₈P 659.4149, found 659.4145.

[(*E*)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2'-enyl]-(3-hexadecoxypropoxy)phosphinic acid (259**)**

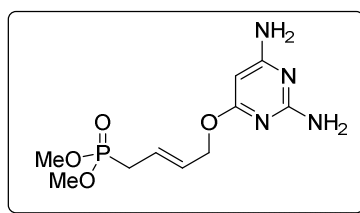


Chemical Formula: C₂₇H₅₁N₄O₅P
Molecular Weight: 542.70

Compound **258** (40 mg, 1 eq., 0.06 mmol) was added to a 0.1 M NaOH solution in ELGA® water (6 mL, 0.01M). This mixture was acidified by the addition of HCl 0.1M, followed by the removal of the volatiles under reduced pressure. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₅₁N₄O₅P 543.3675, found 543.3667.

6-[(*E*)-4-dimethoxyphosphorylbut-2'-enoxy]pyrimidine-2,4-diamine (**261**)



Chemical Formula: C₁₀H₁₇N₄O₄P

Molecular Weight: 288,24

Starting from **89** (185 mg, 2 eq., 0.89 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **246** (260 mg, 1 eq., 0.45 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (57 mg, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (17 mL). The pure product was not isolated, but engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 75/25 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (100 mg, 1 eq., 0.14 mmol) and TFA (1.02 mL, 100 eq., 14.0 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) for 1h, giving deprotected compound **261** as a colorless oil. (39 mg, 26%)

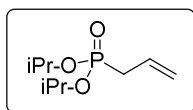
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 5.82 (m, 2H, CH=CH), 5.27 (s, 1H, H⁵) 4.67 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂-O), 3.74 (t, *J* = 11.0 Hz, 6H, CH₃-O), 2.75 (dd, *J* = 22.6, 7.1 Hz, 2H, CH₂-P).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN) δ 170.55 (C⁶), 164.43 (C⁴), 161.16 (C²), 130.35 (d, *J* = 14.8 Hz, CH=CH), 122.89 (d, *J* = 11.3 Hz, CH=CH), 76.93 (C⁵), 65.64 (d, *J* = 1.9 Hz, CH₂-O), 52.99 (d, *J* = 6.7 Hz, CH₃-O), 27.96 (d, *J* = 139.9 Hz, CH₂-P).

³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN) δ 29.20

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₈N₄O₄P: 289.1066, found: 289.1062.

2-[allyl(isopropoxy)phosphoryl]oxypropane (**263**)



Chemical Formula: C₉H₁₉O₃P

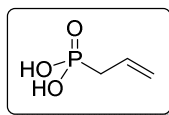
Molecular Weight: 206,22

Triisopropylphosphite (5 mL, 1 eq., 20 mmol), allylbromide (1.8 mL, 1 eq., 20 mmol) and butylated hydroxytoluene BHT (10 mg, 0.5 mol%, 0.1 mmol) were heated at 115°C for 16 hours. A second portion of allyl bromide (1.8 mL, 1 eq., 20 mmol) was added, and the mixture was then stirred at 115°C for 56 hours. The crude product was then concentrated under reduced pressure, and the product **263** was then isolated after a distillation under vacuum as a colorless liquid. (4.17 g, quant.)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.75 (m, 1H, CH=CH₂), 5.15 (m, 2H, CH₂=CH), 4.63 (m, 2H, CH-CH₃), 2.53 (ddt, *J* = 21.9, 7.4, 1.2 Hz, 2H, CH₂-P), 1.28 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H, CH₃), 1.26 (d, *J* = 4.4 Hz, 6H, CH₃).

CAS : 1067-70-5

Allylphosphonic acid (**264**)



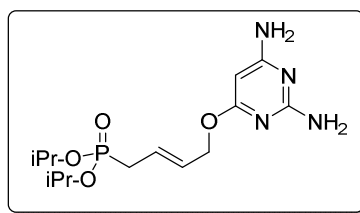
Chemical Formula: C₃H₇O₃P
Molecular Weight: 122,06

In a 2-5mL vial, compound **263** (50 mg, 1 eq., 0.24 mmol) was dissolved in acetonitrile (4.5 mL). Trimethylsilyl bromide (475 μ L, 15 eq., 3.6 mmol) was then added to the solution, and the sealed tube was irradiated under microwave activation at 80°C for 10 min. After evaporation of all volatiles, the mixture was dissolved in 10 mL EtOH and 10 mL H₂O. The solution was then sonicated at 80 KHz during 10 minutes, followed by the concentration of the solution under reduced pressure. The residue was once again dissolved in a mixture EtOH/H₂O (10 mL / 10 mL), sonicated and evaporated. The desired compound **264** was obtained as white crystals without further purification. (44 mg, quant.)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.75 (m, 1H, CH=CH₂), 5.15 (m, 2H, CH₂=CH), 2.53 (ddt, J = 21.9, 7.3, 1.2 Hz, 2H, CH₂-P).

CAS : 6833-67-6

6-[(*E*)-4-diisopropoxyphosphorylbut-2'-enoxy]pyrimidine-2,4-diamine (**266**)



Chemical Formula: C₁₄H₂₅N₄O₄P
Molecular Weight: 344,35

Starting from **263** (185 mg, 2 eq., 0.89 mmol), the general procedure 3 was applied on compound **246** (260 mg, 1 eq., 0.45 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (57 mg, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (17 mL). The pure product was not isolated, but engaged in the next step after a simple filtration on silica gel, using PE/EtOAc 75/25 as eluting system. General procedure 4 was used on the intermediar compound (100 mg, 1 eq., 0.14 mmol) and TFA (1.02 mL, 100 eq., 14.0 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) for 1h, giving deprotected compound **266** as a colorless oil. (39 mg, 26%)

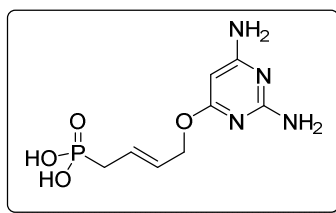
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.78 (m, 2H, CH=CH), 5.21 (s, 1H, H⁵), 4.61 (m, 4H, CH₂-O, CH-CH₃), 2.61 (dd, J = 22.4, 7.1 Hz, 2H, CH₂-P), 1.28 (d, J = 4.4 Hz, 6H, CH₃), 1.26 (d, J = 4.4 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 170.54 (C⁶), 166.17 (C⁴), 162.68 (C²), 130.34 (d, J = 14.6 Hz, CH=CH), 122.71 (d, J = 11.3 Hz, CH=CH), 76.25 (C⁵), 71.11 (d, J = 7.0 Hz, CH₂-O, CH-CH₃), 65.37 (d, J = 2.0 Hz, CH₂-O, CH-CH₃), 30.26 (d, J = 140.5 Hz, CH₂-P), 22.90 (CH₃), 22.86 (CH₃), 22.84 (CH₃), 22.79 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 25.86

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₆N₄O₄P: 345.1692, found: 345.1687.

[(E)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2-enyl]phosphonic acid (262)

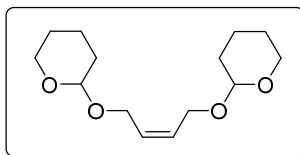


Chemical Formula: $C_8H_{13}N_4O_4P$
Molecular Weight: 260,1898

Under inert atmosphere, compound **257** was dissolved in a solution of NaOH (8 mL, 0.1M in ultrapure water), and stirred for 5 hours at room temperature. Then water was removed at room temperature using a vacuum pump. The obtained residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS-ESI (*m/z*) [$M+H$]⁺ calcd for $C_8H_{14}N_4O_4P$: 261.0753, found: 261.0742.

2-[(Z)-4-tetrahydropyran-2-yloxybut-2-enoxy]tetrahydropyran (268)



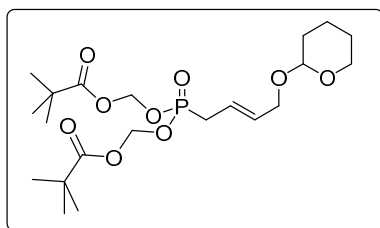
Chemical Formula: $C_{14}H_{24}O_4$
Molecular Weight: 256,34

To a solution of *cis*-but-2-èn-1,4-diol (3.73 mL, 1 eq., 45.4 mmol) in dichloromethane (50 mL), *paratoluenesulfonic acid* (51 mg, 0.6 mol%, 0.27 mmol) and dihydropyran (8.3 mL, 2 eq., 90.7 mmol) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 1h30. Triethylamine (5 mL) and activated charcoal were afterwards added to the solution. The mixture was filtered on a pad of Celite®, washed with dichloromethane, and concentrated under reduced pressure. After a flash column chromatography eluting PE/EtOAc 9:1, affording **268** as a colorless oil. (11.03 g, 95%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 5.70 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H, CH=CH), 4.59 (dd, *J* = 4.2, 2.8 Hz, 2H, O-CH-O), 4.25 (m, 2H, CH₂-CH=CH), 4.07 (m, 2H, CH₂-CH=CH), 3.83 (m, 2H, CH₂-O), 3.45 (m, 2H, CH₂-O), 1.70 (m, 14H, CH₂).

CAS : 72900-28-8

[2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy-[(E)-4-tetrahydropyran-2-yloxybut-2-enyl]phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (269)



Chemical Formula: $C_{21}H_{37}O_9P$
Molecular Weight: 464,49

bis(POM)allylphosphonate (2 g, 1 eq., 5.7 mmol) was added to a solution of compound **268** (2.93 g, 2 eq., 11.4 mmol) in dichloromethane (60 mL) and the mixture was stirred at reflux for 24h. The volatiles were then evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 8:2). The desired product **269** was obtained as a colorless oil. (2.02 g, 74%)

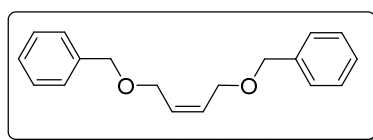
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.81 (dq, *J* = 16.0, 5.2 Hz, 1H, CH=CH), 5.70 (m, 5H, CH=CH, O-CH₂-O), 4.63 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, O-CH-O), 4.22 (dt, *J* = 12.0, 5.6 Hz, 2H, CH₂-CH=CH), 3.97 (dt, *J* = 12.0, 5.6 Hz, 1H, CH₂-CH=CH), 3.86 (m, 1H, CH₂-O), 3.52 (m, 1H, CH₂-O), 2.72 (dd, *J* = 22.4, 7.2 Hz, 2H, CH₂-P), 1.66 (m, 7H, CH₂), 1.25 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.83 (C=O), 133.06 (d, *J* = 15.2 Hz, CH=CH), 120.30 (d, *J* = 11.8 Hz, CH=CH), 97.99 (O-CH-O), 81.54 (d, *J* = 6.6 Hz, O-CH₂-O), 66.95 (d, *J* = 2.5 Hz, CH₂-CH=CH), 62.16 (CH₂-O), 38.73 (C^{quat}), 30.95 (d, *J* = 139.5 Hz, CH₂-P), 30.26 (CH₂), 26.86 (CH₃ POM), 25.41 (CH₂), 19.40 (CH₂).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.76.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₈O₉P: 465.2254, found: 465.2244.

[(*Z*)-4-benzyloxybut-2-en-1-yl]methylbenzene (270**)**



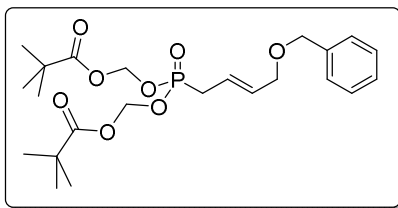
Chemical Formula: C₁₈H₂₀O₂
Molecular Weight: 268,36

Under inert atmosphere, NaH (1.12 g, 60% in oil, 2.6 eq., 29.4 mmol) was added to dimethylformamide (25 mL), and the solution was then cooled to 0°C. To this mixture, a solution of *cis*-but-2-ene-1,4-diol (1 g, 1 eq., 11.3 mmol) in 5 mL DMF was added dropwise, and stirred for 1h at RT. Finally, benzyl bromide (3.5 mL, 2.6 eq., 29.4 mmol) was added dropwise to the reaction mixture, which was stirred for 12h at room temperature. The reaction was quenched by the addition of NH₄Cl (40 mL), extracted thrice with diethyl ether (3 x 80 mL), washed 5 times with water (40 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After a flash column chromatography eluting PE/EtOAc 9:1, affording **270** as a colorless oil. (3.05 g, Quant.)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 10H, H^{Ar}), 5.78 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH=CH), 4.48 (s, 4H, CH₂-Bn), 4.06 (m, 4H, CH₂-O).

CAS : 68972-96-3

[[*(E)*-4-benzyloxybut-2-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (271**)**



Chemical Formula: C₂₃H₃₅O₈P
Molecular Weight: 470,50

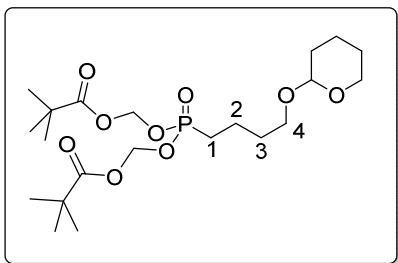
bis(POM)allylphosphonate (400 mg, 1 eq., 1.14 mmol) was added to a solution of compound **270** (612 mg, 2 eq., 2.28 mmol) in dichloromethane (25 mL) and the mixture was stirred at reflux during 24h. The volatiles were then evaporated, and the residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EtOAc 82:18). The desired product **271** was obtained as a colorless oil. (389 mg, 72%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (m, 5H, H^{Ar}), 5.78 (dq, *J* = 16.4, 5.6 Hz, 1H, CH=CH), 5.63 (m, 5H, O-CH₂-O, CH=CH), 4.47 (s, 2H, CH₂-Bn), 3.96 (t, *J* = 16.4 Hz, CH₂-O), 2.68 (dd, *J* = 22.4, 7.2 Hz, 2H, CH₂-P), 1.19 (s, 18H, CH₃ POM).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.75

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₃H₃₆O₈P: 471.2148, found: 471.2142.

[2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy(4-tetrahydropyran-2-yloxybutyl)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (272**)**



Chemical Formula: C₂₁H₃₉O₉P
Molecular Weight: 466,51

Under argon atmosphere, compound **269** (200 mg, 1 eq., 0.42 mmol) was dissolved in EtOH (6 mL). The flask was purged with argon, and palladium on carbon (10% w/w, 20 mg) was introduced in the mixture. The solution was then degassed with H₂ during 1 min., then the atmosphere was filled with H₂. After 12h, the solution and the atmosphere were purged with argon, and the mixture was filtered on Celite® and concentrated under reduced pressure. After a flash column chromatography, eluting PE/EtOAc 8:2, the desired product **272** was obtained as a colorless oil. (171 mg, 85 %)

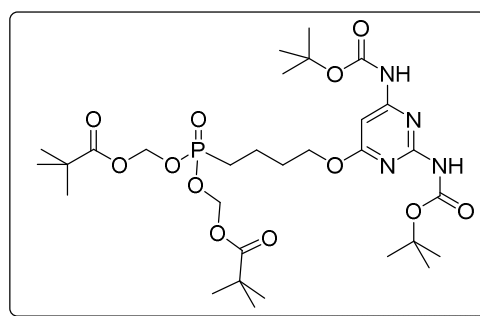
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.69 (d, *J* = 13.0 Hz, 4H, O-CH₂-O), 4.57 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, O-CH-O), 4.22 (dt, *J* = 12.0, 5.6 Hz, 1H, H₄), 3.85 (dt, *J* = 10.3, 6.0 Hz, 1H, CH₂-O), 3.51 (dt, *J* = 10.0, 4.8 Hz, 1H, H₄), 1.70 (m, 13H, CH₂), 1.25 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.83 (C=O), 98.85 (O-CH-O), 81.30 (d, *J* = 6.2 Hz, O-CH₂-O), 66.61 (d, *J* = 1.3 Hz, H⁴), 62.27 (CH₂-O), 38.73 (C^{quat}), 30.66 (CH₂), 30.42 (CH₂, *J* = 18.0 Hz, C²), 26.66 (CH₃ POM), 26.36 (d, *J* = 139.8 Hz, CH₂-P), 25.44 (CH₂), 19.56 (CH₂), 19.12 (CH₂, *J* = 5.1 Hz, C³).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 33.11

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₄₀O₉P: 467.2411, found: 467.2405.

[5-[2,6-bis(tert-butoxycarbonylamino)pyrimidin-4-yl]pentyl-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (276)



Chemical Formula: C₃₀H₅₁N₄O₁₂P
Molecular Weight: 690.73

Compound **250** (125 mg, 1 eq., 0.141 mmol) was diluted with ethyl acetate (4 mL) under N₂ atmosphere. The solution was degassed with N₂ during 1 min., then the atmosphere was purged with N₂ during 5 min. 10% Pd/C (20% w/w, 25 mg) was added slowly in the flask under inert atmosphere. The solution was once more degassed with N₂ during 1 min., and the atmosphere for 5 min. in the same conditions. H₂ was then introduced into the flask using a balloon, firstly degassing the solution during 1 min., then the atmosphere for 5 min. The outlet was removed, and the mixture was stirred during 20h at room temperature. The solution and the containing flask were degassed with Arg, and the catalyst was then removed on a pad Celite®, washed with ethyl acetate (3 x 20 mL), and the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography, (PE/EtOAc 6:4) affording the expected compound **276** as a white solid. (58mg, 55%)

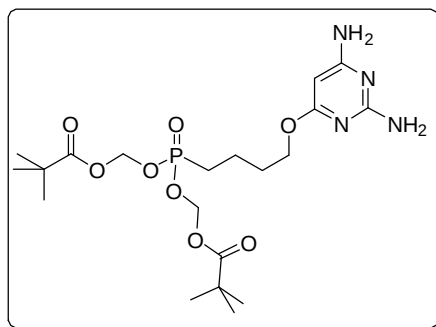
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (bs, 1H, NH), 7.67 (bs, 1H, NH), 6.91 (s, 1H, H⁵), 5.68 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.64 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.24 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H¹), 1.81 (m, 6H, H^{2'}, H^{3'}, H^{4'}), 1.50 (s, 9H, CH₃-BOC), 1.47 (s, 9H, CH₃-BOC), 1.22 (s, 21H, CH₃POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.90 (C=O POM), 171.42 (C⁶), 159.42 (C^{quat}), 156.25 (C^{quat}), 151.74 (C^{quat}), 150.75 (C^{quat}), 87.89 (C⁵), 81.34 (d, *J* = 6.0 Hz, O-CH₂-O), 65.77 (C¹), 38.74 (C^{quat} POM), 29.44 (d, *J* = 17.0 Hz, CH₂), 28.19 (CH₃ Boc), 28.11 (CH₃ Boc), 26.86 (CH₃ POM), 26.14 (d, *J* = 138.4 Hz, CH₂-P), 18.86 (d, *J* = 5.3 Hz, CH₂).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 32.75

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₀H₅₂N₄O₁₂P: 691.3320, found: 691.3311.

[5-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)pentyl-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (275)



Chemical Formula: C₂₀H₃₅N₄O₈P
Molecular Weight: 490,49

General procedure 4 was applied to compound **276** (28 mg, 0.04 mmol) and TFA (0.31 mL, 4.10 mmol) in CH₂Cl₂ (0.62 mL) for 1h to give, after flash column chromatography (DCM/MeOH 95:5), di-deprotected compound **275** as a colorless oil. (16 mg, 83%)

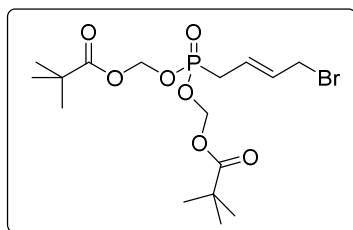
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.66 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.23 (s, 1H, H⁵), 4.13 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H^{1'}), 2.02 – 1.92 (dt, *J* = 18.0, 7.6 Hz, 2H, CH₂-P), 1.81 (m, 2H, H^{2'}), 1.73 (m, 2H, H^{3'}), 1.23 (d, *J* = 1.6 Hz, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 176.73 (C=O POM), 170.86 (C⁶), 166.16 (C⁴/C²), 162.66 (C⁴/C²), 81.44 (d, *J* = 6.4 Hz, O-CH₂-O), 76.02 (C^{5'}), 64.98 (C^{1'}), 38.34 (C^{quat} POM), 29.20 (d, *J* = 17.0 Hz, C^{3'}), 25.83 (CH₃ POM), 25.24 (d, *J* = 140.4 Hz, CH₂-P), 18.66 (d, *J* = 5.4 Hz, C^{2'}).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 33.13

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₃₆N₄O₈P: 491.2270, found: 491.2265.

[[*(E)*-4-bromobut-2-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (280)



Chemical Formula: C₁₆H₂₈BrO₇P
Molecular Weight: 443,27

To a solution of allyl *bis*(POM) phosphonate **1** (1.5 g, 1.0 eq., 4.3 mmol) in 24 mL of freshly distilled CH₂Cl₂ (*E*)-1,4-dibromobut-2-ene (3.66 g, 4.0 eq., 17.1 mmol) and 5 mol% RuCl₂PCy₃lMesBenzylidene ruthenium catalyst (68.6 mg, 0.05 eq., 0.08 mmol) were successively added. This solution was gently refluxed at 40°C for 18h, followed by the evaporation of all volatiles. The crude product was purified by silica gel chromatography eluting Petroleum ether/ethyl acetate (4:1) to give (*E*)-4-bromo-*bis*(POM)-but-2-enylphosphonate **280** (1.61 g, 85%) as a light brown oil.

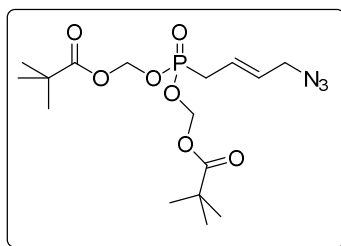
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.86 (m, 1H, CH=CH), 5.68 (m, 5H, CH=CH, O-CH₂-O), 3.92 (dd, *J* = 7.5, 3.5 Hz, 2H, CH₂-Br), 2.70 (dd, *J* = 22.7, 7.3 Hz, 2H, CH₂-P), 1.25 (s, 18H, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.8.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+Na]⁺ calcd for C₁₆H₂₈O₇NaBrP: 465.0654, found: 465.0671.

CAS : 1365350-40-8

[[*(E)*-4-azidobut-2-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (278)



Chemical Formula: C₁₆H₂₈N₃O₇P
Molecular Weight: 405,39

280 (910 mg, 1.0 eq., 2.05 mmol) was dissolved in a mixture of DMSO (20 mL), THF (8 mL) and H₂O (4 mL). Sodium azide (667 mg, 5.0 eq., 10.3 mmol) was then added and the solution was stirred 24h at room temperature. The mixture was diluted with Et₂O (50 mL) and H₂O (10 mL). The aqueous phase was extracted 5 times with 50 mL of Et₂O, then washed with brine (20 mL) and dried over MgSO₄. The volatiles were distilled *in vacuo* and the residue was purified by silica gel column chromatography, eluting with Petroleum ether / EtOAc (4:1) to give **278** (140.0 mg, 69%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.65 (m, 6H, CH=CH), 3.74 (dd, *J* = 8.8, 3.5 Hz, 2H, CH₂-N₃), 2.71 (dd, *J* = 22.4, 6.0 Hz, 2H, CH₂-P), 1.21 (s, 18H, CH₃).

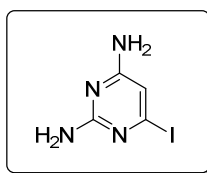
³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.7.

IR : *ν* max 3455.1, 2976.4, 2099.1, 1747.8, 1260.5 1134.2, 961.5 cm⁻¹.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₂₉N₃O₇P: 406.1743, found: 406.1737.

CAS : 1365350-63-5

2,4-diamino-6-iodopyrimidine (281)



Chemical Formula: C₄H₅IN₄
Molecular Weight: 236,02

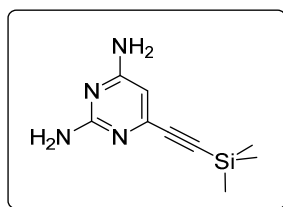
2,4-diamino-6-chloropyrimidine (1 g, 1 eq., 6.92 mmol) was dissolved in 57% HI (10 mL) and then NaI (3.11 g, 3 eq., 20.8 mmol) was slowly added. The resulting solution was then diluted with acetone (5 mL) and the resulting mixture was heated at 50 °C for 1h and then stirred at room temperature overnight in the absence of UV source. The subsequent precipitate was filtrated and washed with dichloromethane. The filtrate was dissolved in 90 mL EtOAc, 10 mL EtOH and 20 mL NaHCO₃. The organic phase was washed with an aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL) and brine (20 mL). The crude product was used without further purification yielding the desired product **281** (1.34 g, 84%) as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.40 (bs, 2H, NH₂), 6.21 (bs, 2H, NH₂), 6.05 (s, 1H, H⁵).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₄H₆N₄I 236.9636, found 236.9631.

CAS : 727651-44-7

2,4-diamine-6-(2-trimethylsilylethynyl)pyrimidine (**282**)



Chemical Formula: C₉H₁₄N₄Si
Molecular Weight: 206,32

Dimethylformamide (11 ml), ethynyltrimethylsilane (1.28 mL, 3 eq., 6.35 mmol) and Et₃N (317 μL) were added successively in an argon-filled round bottom flask containing 2,6-diamino-6-iodopyrimidine **281** (500 mg, 1 eq., 2.12 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (104 mg, 0.07 eq., 0.148 mmol) and CuI (21 mg). The mixture was stirred at room temperature overnight in the absence of UV source. After evaporation of all the volatiles, the crude compound was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 95/5) affording compound **282** as light yellow solid. (351 mg, 81%)

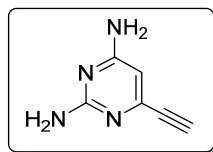
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.44 (bs, 2H, NH₂), 6.00 (bs, 2H, NH₂), 5.78 (s, 1H, H⁵), 0.05 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.68 (C⁴), 163.48 (C²), 147.05 (C⁶), 104.78 (C⁵), 98.11 (C^{1'}), 92.47 (C^{2'}), -0.20 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₅N₄Si 207.1065, found 207.1060.

CAS :727651-47-0

2,4-Diamino-6-ethynylpyrimidine (**279**)



Chemical Formula: $C_6H_6N_4$
Molecular Weight: 134,14

2,4-diamino-6-(2-trimethylsilylethynyl)pyrimidine **282** (185 mg, 1 eq., 0.90 mmol) was dissolved in methanolic ammonia (28 ml) and the mixture was then stirred at room temperature for 4 h. After evaporation of all volatiles, the residue was loaded on a small pad of silica gel, eluting DCM/MeOH 93/7, affording **279** as an unstable light yellow solid. (80 mg, 67%)

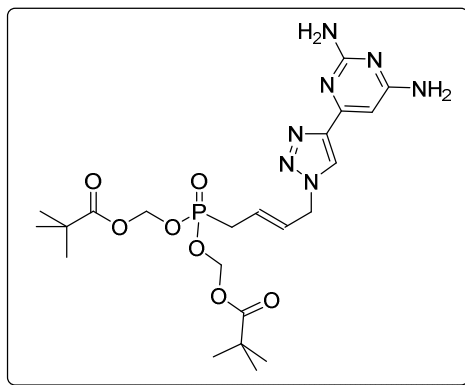
^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.46 (bs, 2H, NH_2), 6.10 (bs, 2H, NH_2), 5.80 (s, 1H, H^5), 4.11 (s, 1H, H^2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.48 (C^4), 163.52 (C^2), 147.20 (C^6), 98.78 (C^5), 82.80 (C^1).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_4$: 135.0670, found: 135.0665.

CAS : 727651-52-7

[[*(E)*-4-[4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)triazol-1-yl]but-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (**277**)



Chemical Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$
Molecular Weight: 539,53

Bis(POM)phosphonate **278** (178 mg, 1 eq., 0.44 mmol) was dissolved in a mixture of *tert*-butanol/water/DMSO (5.6/1.4/2.8 mL). To this solution **279** (59 mg, 1 eq., 0.44 mmol), sodium ascorbate (26 mg, 0.3 eq., 0.13 mmol) and copper sulfate pentahydrate (22 mg, 0.2 eq., 0.09 mmol) were successively added and the mixture was stirred at room temperature for 24h. The crude reaction mixture was evaporated under reduced pressure, and the resulting crude was submitted overnight to high vacuum pump. The resulting powder was purified by flash column chromatography, eluting dichloromethane/methanol (96/4 to 93/7) to afford **277** as a yellow solid. (120 mg, 67%)

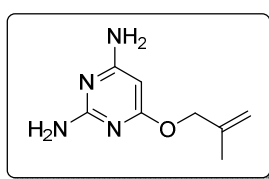
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 8.22 (s, 1H, H triazole), 6.67 (s, 1H, H⁵), 6.02 (bs, 3H, NH₂, H^{3'}), 5.76 (m, 7H, O-CH₂-O, H^{3'}, NH₂), 5.08 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂-N), 2.84 (dd, *J* = 22.6, 7.3 Hz, 2H, H^{4'}), 1.21 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 176.27 (C=O POM), 165.41 (C⁴), 163.81 (C²), 156.45 (C⁶), 147.29 (C^{quat} triazole), 129.53 (d, *J* = 15.4 Hz, C^{3'}), 124.52 (d, *J* = 11.4 Hz, C^{2'}), 122.77 (CH^{triazole}), 90.44 (C⁵), 81.67 (d, *J* = 6.4 Hz, O-CH₂-O), 51.24 (d, *J* = 2.3 Hz, CH₂-N), 38.37 (C^{quat} POM), 30.33 (d, *J* = 138.5 Hz, C^{4'}), 26.23 (CH₃ POM).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.41.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₄N₇O₇P: 540.2335, found: 540.2327.

6-(2-methylallyloxy)pyrimidine-2,4-diamine (284)



Chemical Formula: C₈H₁₂N₄O
Molecular Weight: 180.21

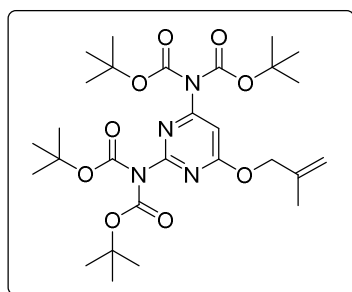
Following the general procedure 1 from 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (250 mg, 1 eq., 1.73 mmol), 2-methyl-2-propen-1-ol (0.44 mL, 3 eq., 5.19 mmol) and NaOtBu (332 mg, 2 eq., 3.46 mmol) in *t*BuOH (5 mL), compound **284** was obtained as a colorless oil (256 mg, 82%) after purification by flash column chromatography with EtOAc/petroleum ether (9:1) then EtOAc as eluent.

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 5.69 (bs, 2H, NH₂), 5.64 (bs, 2H, NH₂), 5.25 (s, 1H, H⁵), 4.98 (s, 1H, H^{3'}), 4.86 (s, 1H, H^{3'}), 4.61 (s, 2H, CH₂-O), 1.75 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 171.57 (C⁶), 167.32 (C²), 164.20 (C⁴), 142.48 (C^{2'}), 111.90 (C^{3'}), 77.79 (C⁵), 68.69 (CH₂-O), 19.64 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₃N₄O 181.1084, found 181.1080.

tert-butyl *N*-[2-[*bis*(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-(2-methylallyloxy)pyrimidin-4-yl]-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-carbamate (285)



Chemical Formula: C₂₈H₄₄N₄O₉
Molecular Weight: 580.68

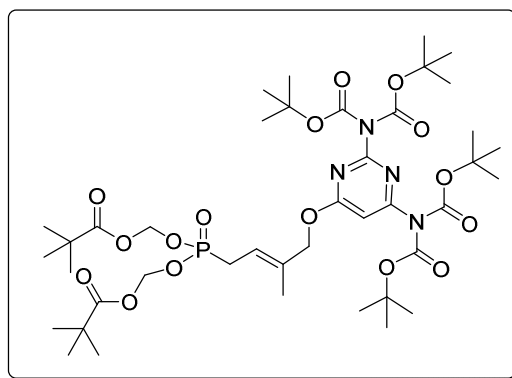
General procedure 2 was followed on compound **284** (200 mg, 1 eq., 1.11 mmol), di-*tert*-butyl dicarbonate (1.45 g, 6 eq., 6.66 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (47 mg, 0.35 eq., 0.39 mmol) in THF (3.5 mL) to give Boc-protected compound **285** (563 mg, 87%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.93 (s, 1H, H⁵), 5.00 (s, 1H, H^{3'}), 4.91 (s, 1H, H^{3'}), 4.73 (s, 2H, CH₂-O), 1.76 (s, 3H, CH₃), 1.48 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.40 (s, 18H, CH₃ Boc).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.58 (C⁶), 159.94 (C⁴), 156.52 (C²), 150.45 (C=O^{Boc}), 150.02 (C=O^{Boc}), 139.98 (C^{2'}), 113.00 (C^{3'}), 96.23 (C⁵), 84.15 (C^{quat Boc}), 83.06 (C^{quat Boc}), 70.15 (CH₂-O), 27.87 (CH₃ Boc), 27.79 (CH₃ Boc), 19.52 (CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₄₅N₄O₉ 581.3181, found 581.3185.

[[*(E)*-4-[2,6-bis[bis(*tert*-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-4-yl]oxy-3-methyl-but-2'-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (286**)**



Chemical Formula: C₄₁H₆₇N₄O₁₆P
Molecular Weight: 902.97

Following the general procedure 3 from compound **285** (497 mg, 2 eq., 0.86 mmol) with allyl-*bis*(POM)phosphonate (150 mg, 1 eq., 0.43 mmol) and 15 mol% RuCl₂PCy₃IMesBenzylidene ruthenium catalyst (60 mg, 0.06 mmol, added in 3 equal portions of 5 mol%) in freshly distilled CH₂Cl₂ (7 mL), compound **286** (156 mg, 40%) was isolated as a light brown oil after purification by flash column chromatography using petroleum ether/EtOAc (8:2) as eluent.

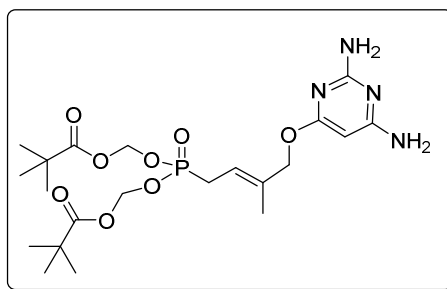
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.94 (s, 1H, H⁵), 5.67 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.54 (dt, *J* = 7.7, 7.3 Hz, 1H, H^{3'}), 4.73 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂-O), 2.72 (dd, *J* = 22.9, 7.7 Hz, 2H, H^{4'}), 1.74 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, H^{5'}), 1.51 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.43 (s, 18H, CH₃ Boc), 1.23 (s, 18H, CH₃ POM).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176.98 (C=O^{POM}), 171.53 (C⁶), 159.98 (C⁴), 156.56 (C²), 150.55 (C=O^{Boc}), 150.07 (C=O^{Boc}), 136.46 (d, *J* = 15.1 Hz, C^{2'}), 115.73 (d, *J* = 11.5 Hz, C^{4'}), 96.23 (C⁵), 84.28 (C^{quat Boc}), 83.21 (C^{quat Boc}), 81.71 (d, *J* = 6.5 Hz, O-CH₂-O), 71.59 (CH₂-O), 38.87 (CH₃ POM), 27.98 (CH₃ Boc), 27.87 (CH₃ Boc), 27.04 (d, *J* = 140.6 Hz, C^{4'}), 27.00 (C^{quat POM}), 14.40 (d, *J* = 2.5 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 27.92.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₄₁H₆₈N₄O₁₆P 903.4362, found 903.4356.

[[*(E)*-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy-3-methyl-but-2-enyl]-(2,2-dimethylpropanoyloxymethoxy)phosphoryl]oxymethyl 2,2-dimethylpropanoate (283)



Chemical Formula: C₂₁H₃₅N₄O₈P
Molecular Weight: 502,50

General procedure 4 was followed on compound **286** (156 mg, 1 eq., 0.17 mmol), TFA (1.3 mL, 100 eq., 17.28 mmol) in CH₂Cl₂ (2.6 mL) for 1h to give deprotected compound **283** (81 mg, 93%) as a colorless oil after FCC with EtOAc.

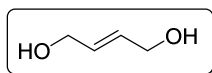
¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 7.66 (bs, 2H, NH₂), 7.47 (bs, 2H, NH₂), 5.61 (m, 4H, O-CH₂-O), 5.55 (dt, *J* = 7.7, 6.8 Hz, 1H, H^{3'}), 5.49 (s, 1H, H⁵), 4.75 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂-O), 2.82 (dd, *J* = 23.0, 7.7 Hz, 2H, CH₂-P), 1.75 (d, *J* = 4.1 Hz, 3H, H^{5'}), 1.22 (s, 18H, CH₃POM).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 177.17 (C=O^{POM}), 172.33 (C⁶), 159.63 (C⁴), 156.99 (C²), 136.72 (d, *J* = 15.0 Hz, C^{2'}), 117.08 (d, *J* = 11.5 Hz, C^{4'}), 82.56 (d, *J* = 6.1 Hz, O-CH₂-O), 77.68 (C^{5'}), 72.23 (d, *J* = 2.6 Hz, CH₂-O), 39.27 (CH₃ POM), 27.25 (d, *J* = 140.2 Hz, C⁴), 27.10 (C^{quat}^{POM}), 14.24 (d, *J* = 2.5 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, Acetone) δ 27.28.

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₆N₄O₈P 503.2265, found 503.2265.

(*E*)-but-2-ene-1,4-diol (290)



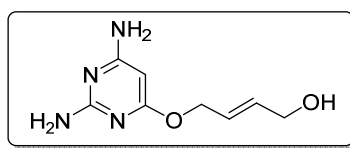
Chemical Formula: C₄H₈O₂
Molecular Weight: 88,11

Under inert atmosphere, THF (100 mL) was cooled down to 0°C. Lithium borohydride (2.64 g, 1.2 eq., 70 mmol) was then slowly added to this solution. But-2-yn-1,4-diol (5 g, 1 eq., 58 mmol) was dissolved in another flask in THF (100 mL), and this solution was then added to the first one over 30 minutes *via* cannulation. The mixture was then refluxed for 3 hours, and afterwards cooled down at 0°C, diluted with 200 mL of diethyl ether, quenched by the slow addition of H₂O (3 mL), 3M solution of NaOH (3 mL), H₂O (9 mL). The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 15 minutes, followed by the addition of sulfate magnesium. After 15 minutes under stirring, the solution was filtrated to remove the salts, washed with methanol and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography, eluting PE/EtOAc 1:9 to afford compound **290** as a colorless oil. (4.7 g, 92%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.87 (s, 2H, CH=CH), 4.14 (s, 4H, CH₂-OH), 1.60 (bs, 2H, OH).

CAS : 110-64-5

(E)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2-en-1-ol (288)



Chemical Formula: $C_8H_{12}N_4O_2$
Molecular Weight: 196,21

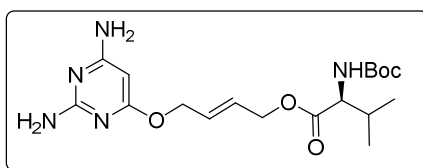
Following the general procedure 1, from 2,4-diamino-6-chloropyrimidine (600 mg, 1 eq., 4.15 mmol), E-buten-1,4-diol (1.10 g, 3 eq., 12.5 mmol) and NaOtBu (798 mg, 2 eq., 8.3 mmol) in tBuOH (25 mL), compound **288** was obtained as a white solid (530 mg, 65%) after purification by FCC with DCM/MeOH 92:8.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.43 (bs, 2H, NH_2), 6.35 (bs, 2H, NH_2), 5.82 (m, 2H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{3'}$), 5.12 (s, 1H, H^5), 4.76 (bs, 1H, OH), 4.66 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{H}^{1'}$), 3.95 (s, 2H, $\text{H}^{4'}$).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169.58 (C^6), 164.53 (C^2/C^4), 161.22 (C^2/C^4), 134.92 ($\text{C}^{3'}$), 124.54 ($\text{C}^{2'}$), 76.54 (C^5), 65.62 ($\text{C}^{1'}$), 61.15 ($\text{C}^{4'}$).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $C_8H_{13}N_4O_2$ 197.1038, found 197.1035.

[(E)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2-enyl] (2S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-methyl-butanoate (293)



Chemical Formula: $C_{18}H_{29}N_5O_5$
Molecular Weight: 395,46

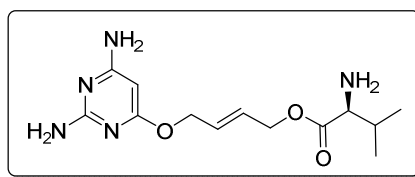
Under N_2 atmosphere, compound **288** (160 mg, 1 eq., 0.82 mmol) was diluted in DMF (4 mL). To this solution pyridine (4 mL), N-Boc-Valine (267 mg, 1.5 eq., 1.23 mmol), DMAP (20 mg, 0.2 eq., 0.16 mmol) and finally dicyclohexylcarbodiimide DCC (202 mg, 1.2 eq., 0.98 mmol) were successively added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days, and the reaction was partitioned between ethyl acetate (30 mL) and water (10 mL). The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), then the organic layer was washed with water (5 x 10 mL), brine (10 mL) dried over MgSO_4 and filtered. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 98:2 - 97:3 - 95:5) to afford the expected compound **293** as a yellow powder. (240 mg, 74%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.90 (m, 2H, $\text{H}^{2'}$, $\text{H}^{3'}$), 5.23 (s, 1H, H^5), 5.16 (bs, 1H, NH), 4.83 (bs, 2H, NH_2), 4.71 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{H}^{1'}/\text{H}^{4'}$), 4.67 (bs, 2H, NH_2), 4.63 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{H}^{1'}/\text{H}^{4'}$), 4.22 (bs, 1H, CH- NHBoc), 2.14 (m, 1H, CH iPr), 1.42 (s, 9H, CH_3 Boc), 0.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 iPr), 0.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 iPr).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 172.21 ($\text{C}=\text{O}$ Ac), 170.72 (C^6), 165.47 (C^2/C^4), 162.66 (C^2/C^4), 155.70 ($\text{C}=\text{O}$ Boc), 130.03 ($\text{C}^{3'}/\text{C}^{2'}$), 126.53 ($\text{C}^{3'}/\text{C}^{2'}$), 79.80 ($\text{C}^{\text{quat Boc}}$), 78.40 (C^5), 64.94 ($\text{C}^{1'}/\text{C}^{4'}$), 64.72 ($\text{C}^{1'}/\text{C}^{4'}$), 58.61 (CH NHBoc), 31.23 (CH iPr), 28.31 (CH_3 Boc), 19.04 (CH_3 iPr), 17.55 (CH_3 iPr).

HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ calcd for C₁₈H₃₀N₅O₅: 396.2246, found: 396.2240.

[(*E*)-4-(2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxybut-2-enyl] (2*S*)-2-amino-3-methyl-butanoate (292**)**



Chemical Formula: C₁₃H₂₁N₅O₃

Molecular Weight: 295.34

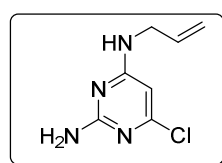
Trifluoroacetic acid (44 mg, 1 eq., 0.11 mmol) was added dropwise to a mixture of Boc-compound **293** (0.80 mL, 100 eq., 11.0 mmol) in CH₂Cl₂ (1.6 mL). The reaction was stirred at room temperature for 2h, followed by the removal of volatiles under reduced pressure. The residue was extracted with EtOAc, washed with a solution of NaHCO₃ until pH 7, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Pure compound **292** was obtained after purification by flash column chromatography with DCM/MeOH (95:5) as eluent as a colorless oil. (28 mg, 86%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 5.97 (tdd, *J* = 21.1, 15.5, 5.3 Hz, 2H, H^{2'}, H^{3'}), 5.21 (s, 1H, H⁵), 4.68 (m, 4H, H^{1'}, H^{4'}), 3.50 (s, 1H, CH-NH₂), 2.09 (sept, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH-*i*Pr), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃*i*Pr), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃*i*Pr).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 172.60 (C=O Ac), 170.50 (C⁶), 166.21 (C²/C⁴), 162.73 (C²/C⁴), 129.91 (C³/C^{2'}), 126.25 (C³/C^{2'}), 76.22 (C⁵), 64.90 (C¹/C^{4'}), 64.48 (C¹/C^{4'}), 58.98 (CH-NH₂), 31.30 (CH- *i*Pr), 17.54 (CH₃*i*Pr), 16.63 (CH₃*i*Pr).

HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+*H*]⁺ calcd for C₁₃H₂₂N₅O₃: 296.1722, found: 296.1718.

N⁴-allyl-6-chloro-pyrimidine-2,4-diamine (295**)**



Chemical Formula: C₇H₉ClN₄

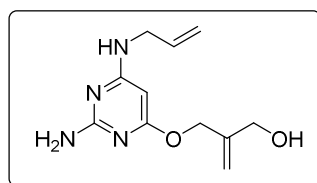
Molecular Weight: 184.63

Under inert atmosphere, 2-amino-4,6-dichloropyrimidine (2g, 1 eq., 12.2 mmol) was dissolved in *n*-butanol (40 mL). To this solution allylamine (916 μL, 1 eq., 12.2 mmol) and diisopropylethylamine (2.3 mL, 1.1 eq., 13.4 mmol) were sequentially added. This mixture was then refluxed at 95°C during 12h, then all the volatiles were removed under pressure. The resulting crude product was then dissolved in ethyl acetate (80 mL) and water (80 mL). The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 x 80 mL), the organic layer being washed with water (40 mL). In order to extract all trace of product from the aqueous phase, this layer was extracted 5 times with a mixture of chloroform/isopropanol 4:1 (4 x 100 mL), the combined organic phases being washed once with brine (50 mL), dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was then diluted in diethyl ether (5 mL) and the compound was precipitated with pentane. The resulted solid was then filtered off, resulting giving the pure compound **295** as a light yellow solid. (2.22 g, 99%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.51 (bs, 1H, NH), 5.90 (m, 1H, CH=CH₂), 5.88 (bs, 2H, NH₂), 5.86 (s, 1H, H⁵), 5.19 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, CH₂=CH), 5.07 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, CH₂=CH), 3.88 (t, *J* = 5.12 Hz, 2H, CH₂-NH).

CAS : 6266-70-2

2-[[6-(allylamino)-2-amino-pyrimidin-4-yl]oxymethyl]prop-2-en-1-ol (296)



Chemical Formula: C₁₁H₁₆N₄O₂
Molecular Weight: 236,28

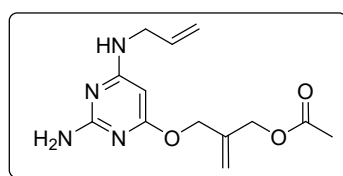
Following the general procedure 1 from **295** (300 mg, 1 eq., 1.65 mmol), 2-methylene-1,3-propenediol (398 μL, 3 eq., 4.87 mmol) and NaOtBu (317 mg, 2 eq., 3.30 mmol) in *t*BuOH (3.2 mL), compound **296** was obtained as a white solid after purification by flash column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5. (284 mg, 74 %)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.01 (bs, 1H, NH), 5.90 (ddt, *J* = 17.1, 10.3, 5.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.57 (bs, 2H, NH₂), 5.19 (s, 1H, H⁵), 5.18 (dq, *J* = 17.1, 1.8 Hz, 1H, CH₂=CH), 5.17 (m, 1H, CH=C quat), 5.12 (m, 1H, CH=C quat), 5.05 (dq, *J* = 10.3, 1.8 Hz, 1H, CH₂=CH), 4.74 (s, 2H, H^{1'}), 4.17 (s, 1H, OH), 4.11 (s, 2H, H^{3'}), 3.88 (m, 2H, CH₂-NH).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.54 (C⁶), 165.63 (C²), 163.00 (C⁴), 146.10 (C^{2'}), 135.74 (CH=CH₂), 114.59 (CH₂=CH), 110.89 (CH₂=C quat), 76.13 (C⁵), 65.25 (C^{1'}), 62.55 (C^{3'}), 43.27 (CH₂-N).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₁H₁₇N₄O₂: 237.1352, found: 237.1347.

2-[[6-(allylamino)-2-amino-pyrimidin-4-yl]oxymethyl]allyl acetate (297)



Chemical Formula: C₁₃H₁₈N₄O₃
Molecular Weight: 278,31

Acetic anhydride (630 μL, 3 eq., 6.66 mmol) and sodium acetate (364 mg, 2 eq., 4.44 mmol) were sequentially added to a solution of compound **296** (525 mg, 1 eq., 2.12 mmol) in AcN (17 mL). This vial was sealed and heated under microwave irradiation for 30 min. at 80°C. The crude product was dissolved in EtOAc (40 mL), extracted twice with water (2 x 20 mL), once with brine (20 mL), dried over MgSO₄ and the volatiles were removed under *vacuo*. The residue was finally purified by column chromatography (DCM/MeOH 99:1) in order to yield the desired product **297** as a white solid. (272 mg, 44%)

¹H NMR (400 MHz, Acetone) δ 6.01 (bs, 1H, NH), 5.90 (ddt, *J* = 17.2, 10.4, 5.2 Hz, 1H, CH=CH₂), 5.46 (bs, 2H, NH₂), 5.27 (m, 1H, CH=C quat), 5.21 (m, 1H, CH=C quat), 5.20 (s, 1H, H⁵), 5.18 (dq, *J* = 17.2, 1.8 Hz, 1H,

CH₂=CH), 5.05 (dq, $J = 10.3, 1.8$ Hz, 1H, CH₂=CH), 4.74 (s, 2H, H^{1'}), 4.62 (s, 2H, H^{3'}), 3.89 (t, $J = 5.2$ Hz 2H, CH₂-NH), 2.04 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, Acetone) δ 170.26 (C⁶), 169.72 (C=O Ac), 165.63 (C²), 162.99 (C⁴), 146.10 (C^{2'}), 135.83 (CH=CH₂), 114.47 (CH₂=CH), 114.04 (CH₂=C quat), 76.22 (C⁵), 64.80 (C^{1'}), 64.09 (C^{3'}), 43.19 (CH₂-N), 19.81 (CH₃ Ac).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₉N₄O₃: 279.1457, found: 279.1450.

IV. Synthèse de *trans*-2'-butényles N-nucléosides phosphonoamidates à base pyrimidique

1 Etat de l'art

➤ Interêt des phosphonamidates

Depuis le début des années 1990, les prodrogues de type phosphoramidates ont été l'objet d'une large expansion. Décrit par l'équipe de Christopher McGuigan, ces pronucléotides ont été extensivement étudiés et plusieurs composés sont actuellement en phases cliniques / approuvés par la FDA.

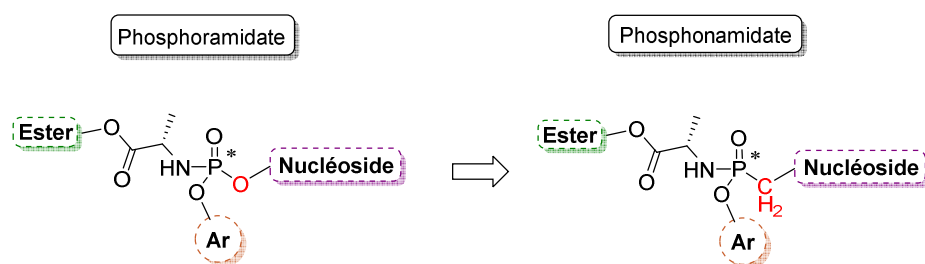


Figure 53. Modèle général d'un phosphoramidate / phosphonamidate

La différence entre un phosphoramidate et un phosphonamidate réside dans le groupement liant cette prodrogue au nucléoside. Dans le cas d'un phosphoramidate, un atome d'oxygène relie le nucléoside et l'atome de phosphore, tandis qu'il s'agit d'un méthylène dans le cas des phosphonamidates (Figure 53). Bien que ces derniers aient été beaucoup moins étudiés que leurs analogues, ces groupements biolabiles montrent un grand potentiel thérapeutique. A titre d'exemple, le Tenofovir alafenamide **332** a récemment été approuvé par la FDA dans le cadre d'une infection au VIH et le GS-9131 **333** est en phase clinique II (Figure 54).

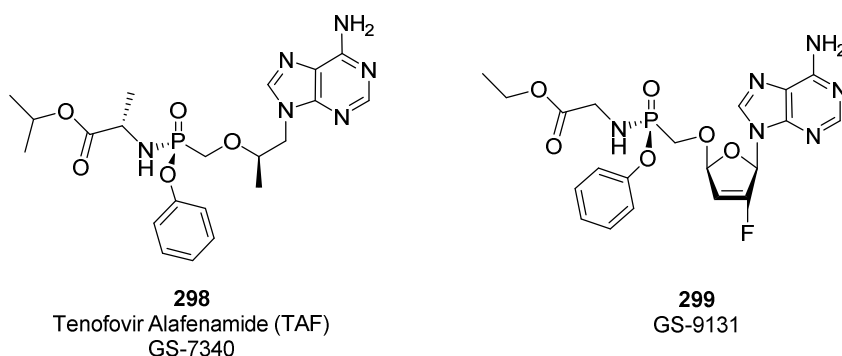


Figure 54. Quelques exemples de nucléosides phosphonamidates

En ce qui concerne le nucléoside phosphonate GS-9131, il possède un profil thérapeutique *in vivo* remarquable. Il montre une activité de 3 nM sur les cellules primaires infectées par HIV (isolée des tissus *ex vivo*, ce qui font d'elles les cellules les plus représentatives des systèmes vivants) 2000 à 3000 fois plus puissant que sous sa forme acide phosphonique. De plus, sur HIV-1 ou HIV-2, cette molécule est de 1.5 à 10 fois plus puissant que l'AZT, analogue nucléosidique de référence en tant qu'inhibiteur d'HIV, pour une cytotoxicité inexistante à 50 μ M. Il présente aussi une grande synergie en association avec l'AZT, l'abacavir

ou même l'efavirenz, ce qui pourrait en faire une de molécule très efficace dans une trithérapie. Un des problèmes majeurs est l'apparition de résistances développées par les souches du HIV. Encore une fois, cette molécule présente un profil très intéressant puisqu'étant efficace contre toutes les souches de HIV comme le montre la figure 55.¹²⁵

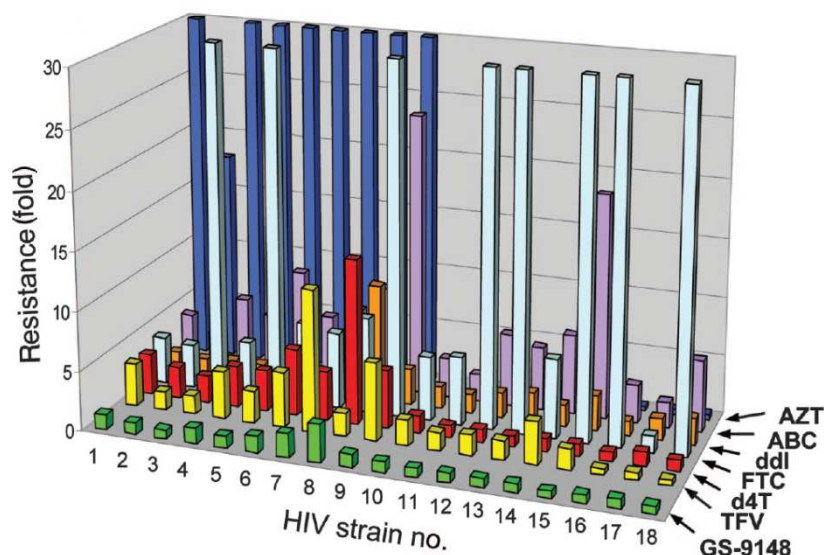


Figure 55. Comparaison du profil de résistance de GS-9148 (diacide phosphonique du composé GD-9131) par rapport aux molécules approuvées par la FDA

Le Tenofovir alafenamide (TAF) est quant à lui une forme pronucléotide du PMPA, drogue approuvée par la FDA sous sa forme *bis*(POC). Il a été développé une nouvelle prodrogue phosphoramidate augmentant d'un facteur 10 son activité dans les cultures cellulaires par rapport au Tenofovir sous sa forme *bis*(POC), passant d'un EC_{50} de 50 nM à 5 nM avec un excellent SI de 8000.¹²⁶ Sous cette forme prodrogue, des études ont montrés une meilleure métabolisation en sa forme triphosphate, ce qui en fait pronucléotide plus efficace que sa version carbonyloxyméthyle.¹²⁷

➤ Approche synthétique à ces pronucléotides

La préparation des phosphoramidates est une étape très fastidieuse, avec de faibles rendements et une stéréochimie qui ne peut être contrôlée. En effet, si les phosphoramidates sont souvent intégrés en début de synthèse *via* trois substitutions successives sur le trichlorure de phosphoryle ($POCl_3$), la liaison P-C présente dans le groupement phosphoramidate complique ce schéma de synthèse. Pour cette raison, la conversion en pronucléotide est souvent effectuée en guise de dernière étape, sur l'acide phosphonique. C'est en effet les stratégies synthétiques employées pour la formation du phosphonoamidate ci-dessous.

¹²⁵ (a) Cihlar, T. *et al.* Design and profiling of GS-9148, a novel nucleotide analog active against nucleoside-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1, and its orally bioavailable phosphonoamidate prodrug, GS-9131. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 655–65 (2008).

¹²⁶ Lee, W. A. *et al.* Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1898–906 (2005).

¹²⁷ Eisenberg, E. J., He, G.-X. & Lee, W. A. Metabolism of GS-7340, a novel phenyl monophosphoramidate intracellular prodrug of PMPA, in blood. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **20**, 1091–1098 (2001).

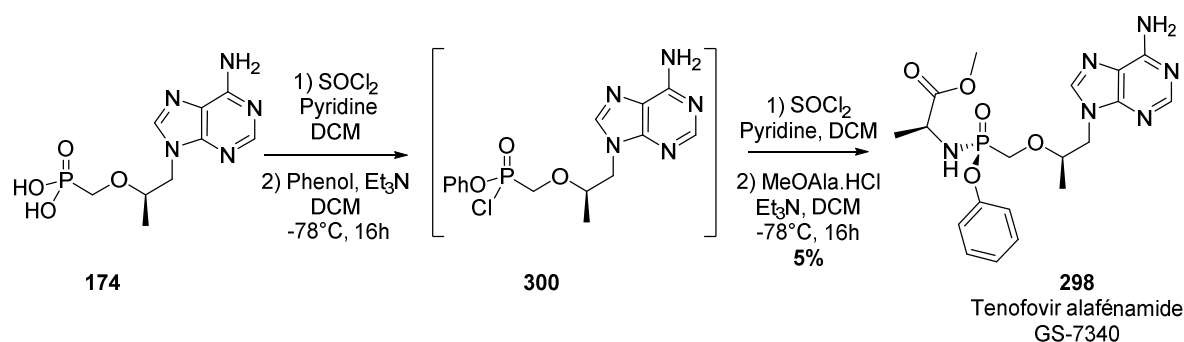


Schéma 93. Première synthèse du Ténofovir Alafénamide

Le premier chemin synthétique développé menant à l'analogue méthylé du TAF **298** se base sur le PMPA sous forme d'acide phosphonique. Une première substitution permet d'introduire le motif phénol sur le phosphore, puis la seconde permet le couplage peptidique avec l'acide aminé correspondant. La faiblesse de cette stratégie synthétique se traduit par un rendement de 5% sur 2 étapes, qui n'est bien sûr pas applicable à l'échelle industrielle (Schéma 93).¹²⁸

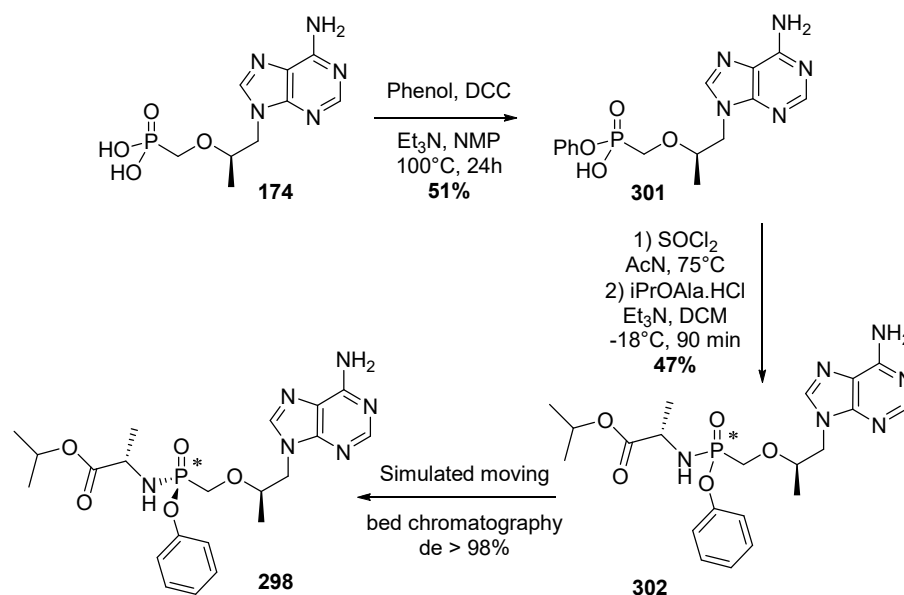


Schéma 94. Synthèse du TAF **298** à partir du PMPA

En revanche, la seconde synthèse, proposée par Chapman *et coll.*, permet l'obtention du TAF à l'échelle du kilogramme. Plutôt que de passer par une double substitution nucléophile successive, cette voie fait intervenir dans un premier temps un couplage à l'aide de dicyclohexylcarbodiimide en présence de triéthylamine (Schéma 94). Une fois le monoacide phosphonique **301** obtenu, cette position est ensuite chlorée afin d'introduire l'ester d'alanine et aboutir au mélange d'isomères **302** avec un rendement d'environ 24% sur ces deux étapes. Afin d'obtenir le diastéréoisomère Sp **298** actif, il est nécessaire d'utiliser un type de chromatographie applicable à large échelle. Bien qu'efficace, la HPLC ne peut être utilisée sur des quantités industrielles. Ils se sont donc tournés vers un dispositif appelé "*simulated moving bed chromatography*", procédé bien moins onéreux et qui permet la séparation et l'enrichissement des composés diastéréopurs sur des kilogrammes de produits. Encore une fois, la limitation se situe au

¹²⁸ Ballatore, C., McGuigan, C., De Clercq, E. & Balzarini, J. Synthesis and evaluation of novel amidate prodrugs of PMEA and PMPA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 1053–1056 (2001).

niveau du rendement, étant donné que le PMPA se synthétise industriellement en 6 étapes avec un rendement global de 15%,¹²⁹ conduisant après sa fonctionnalisation en phosphonamidate à un rendement de 3.5%.

Si le potentiel thérapeutique de ces noyaux est remarquable, il manque en revanche un accès synthétique efficace pour ces phosphonamidates. En effet, une approche plus performante et plus convergente menant à de meilleurs rendements pourrait pousser plus d'équipes de chercheurs à s'y intéresser, et développer la gamme d'application à ce pronucléotide qui est encore sous exploité. Nos travaux consisteront à développer une méthode efficace et polyvalente de synthèse d'un noyau phosphonamidate. Nous nous attacherons particulièrement à obtenir un rendement global supérieur à ceux recensés dans la littérature (5%), et à l'intérêt de ce type de pronucléotide en comparaison avec les autres ANPs correspondants produits au laboratoire.

2 Objectifs et rétrosynthèse proposée

Afin d'évaluer l'influence thérapeutique du motif phosphonamidate, nous avons choisi de nous reposer sur la (E)-N¹-(4'-dihydroxyphosphinyl-2'-butenyl)-thymine qui sous différentes formes prodrogues a montré de bonnes activités antivirales sur la famille des virus à herpès (Figure 56). C'est pourquoi dans ce chapitre nous avons développé une méthodologie de synthèse efficace, tant sur le rendement que sur la séparation de stéréoisomères, afin de convertir cet ANP en ses formes prodrogues phosphonamidates.

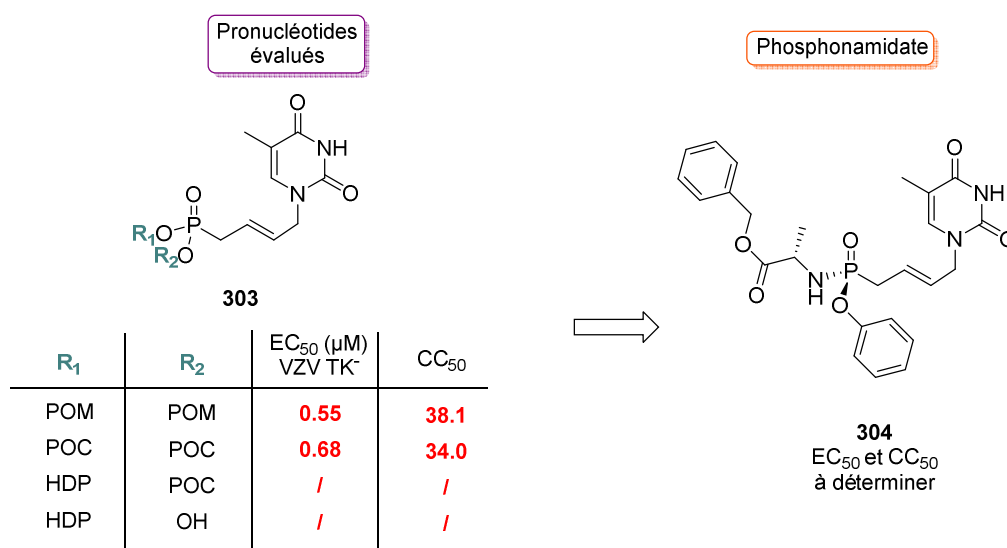


Figure 56. Objectif synthétique

Compte tenu des résultats biologiques antérieurs du laboratoire sur l'ANP **303** évalué sous sa forme *bis*(POM), *bis*(POC), HDP/POC et HDP/OH, il est un bon candidat à cette modulation.

¹²⁹ Bischofberger, N. PMPA preparation, US5733788 (A) 1996-07-26

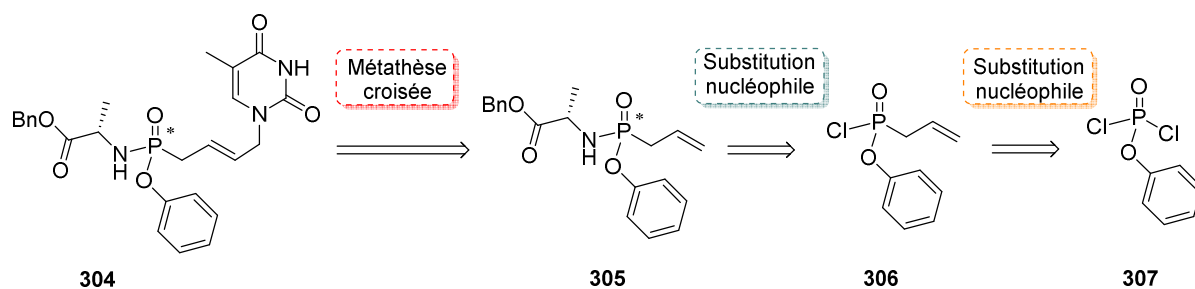


Schéma 95. Rétrosynthèse envisagée

La stratégie la plus convergente peut aboutir, à la formation de la molécule **304** en trois étapes (Schéma 95). La formation de l'ANP **304** peut être effectuée par une réaction de métathèse avec synthon allylé portant les groupements biolabiles **305**, qui peut être préparé au préalable par deux réactions de substitution nucléophiles pour l'introduction séquentielle de l'acide aminé et du groupement allyle sur le phosphore. Pour cette mise au point, la nature de l'aromatique et de l'ester d'alanine s'est portée sur un ester benzylique et un groupement phényloxy.¹³⁰

3 Résultats et discussion

i. Synthèse du composé *(E)*-*N*¹-(4'-phosphinyl-2'-butényl)thymine sous sa forme phosphoramidate

➤ Préparation du phosphoramidate de départ

Notre stratégie de synthèse a comme précurseur de départ le phényl dichlorophosphate **307** commercial et peu onéreux. Nous avons donc étudié la monosubstitution d'un des chlores par un nucléophile, en faisant varier, la source du nucléophile, la présence d'un co-substrat, solvant... avec comme difficulté inhérente le contrôle du degré d'alkylation (mono, di, ou aucune réaction)

¹³⁰ Mehellou, Y., Balzarini, J. & McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem.* **4**, 1779–1791 (2009).

Entrée	Réactif	Equivalents (Phosphonate - Oléfine)	Co-substrat	Solvant	Température	Rendement
1	BrMg 	1 - 1	/	THF	-78°C -> RT	Dialkylation
2	BrMg 	1 - 1	/	Et ₂ O	-78°C -> RT	Dialkylation
3	BrMg 	1 - 1	/	THF	-78°C	Pas de réaction
4	BrMg 	3 - 1	/	THF	-78°C	Pas de réaction
5	ClMg 	2 - 1	/	THF	-78°C	Pas de réaction
6	BrMg 	3 - 1	/	THF	0°C	Pas de réaction
7	BrMg 	1 - 1	CuCl	Et ₂ O	0°C	Pas de réaction
8	Br 	1 - 1.5	Indium	DMPU	60°C	Dégradation

Entrée 6 et 7 : Après l'augmentation de la température à 0°C, aucune conversion n'est observée dans ces conditions. Dans le but d'augmenter la réactivité, du chlorure cuivreux est introduit dans la réaction, mais en vain, puisque la conversion est toujours nulle.¹³¹

¹³¹ Bossu, M. & Dubois, J.E., Action of Grignard reagents on hindered acid chlorides in the presence of copper chloride. Aging of organomagnesium solutions and influence of magnesium metallic impurities. *Comptes Rendus des séances de l'Académie des Sciences*, **273** (19), 1270-1272 (1971)

Entrée 8 : Une dernière tentative est effectuée en présence d'indium, métal connu pour être une bonne alternative au magnésium présent dans les conditions de Barbier originales.¹³² Ces conditions, alliées au bromure d'allyle correspondant, ne permettent pas d'obtenir le composé **306** monoalkylé d'intérêt, mais mène à la dégradation du produit.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une réactivité plus grande de l'espèce monoalkylée par rapport au dichlorophosphate. Compte tenu de cette hypothèse, une autre synthèse est envisagée, ou le synthon clé 346 serait obtenu à partir du diméthylallylphosphonate **89** en deux étapes : déprotection et couplage peptidique précédées d'une transestérification (Schéma 96).

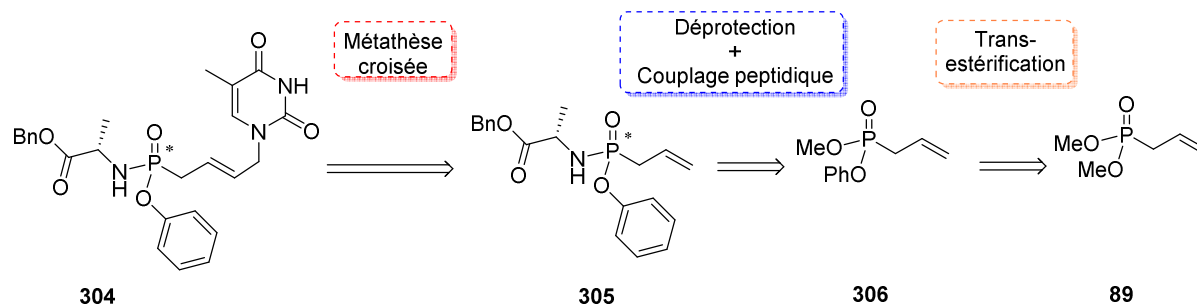


Schéma 96. Nouvelle rétrosynthèse envisagée

Ces stratégies de synthèse se basant sur le diméthylallylphosphonate **89**, des conditions de transestérification sur le phosphonate sont donc mises au point :

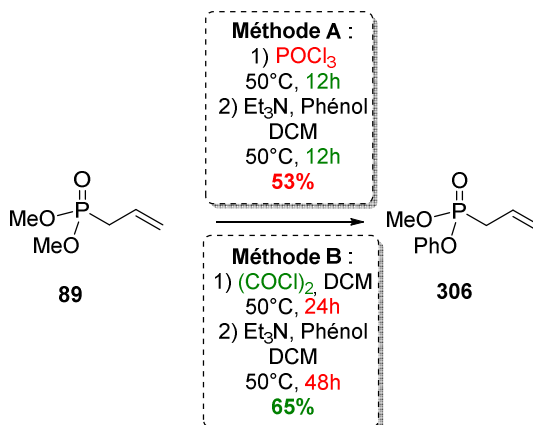


Schéma 97. Transestérification du diméthylallylphosphonate

Basés sur la littérature, deux méthodes (A et B) sont décrites afin d'effectuer la monoestérification et d'échanger un groupement méthoxy contre un groupement phénoxy (Schéma 97).¹³³ Dans le but de faire intervenir un intermédiaire chlorée sur le phosphore réactif, les espèces utilisées sont le trichlorure de phosphore ou le chlorure d'oxalyle. Après la formation de ces composés, la substitution nucléophile est effectuée dans les mêmes conditions, par le phénolate formé *in situ*. Des deux méthodes, la B, plus efficace

¹³² Paquette, L. A. & Mitzel, T. M. Addition of Allylindium Reagents to Aldehydes Substituted at C_α or C_β with Heteroatomic Functional Groups. Analysis of the Modulation in Diastereoselectivity Attainable in Aqueous, Organic, and Mixed Solvent Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1931–1937 (1996).

¹³³ Colton, I. J., Yin, D. T., Grochulski, P. & Kazlauskas, R. J. Molecular Basis of Chiral Acid Recognition by Candida rugosa Lipase: X-Ray Structure of Transition State Analog and Modeling of the Hydrolysis of Methyl 2-Methoxy-2-phenylacetate. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2529–2544 (2011). (b) Li, X. et al. Synthesis of a Diverse Series of Phosphacoumarins with Biological Activity. *Org. Lett.* **7**, 4919–4922 (2005).

reste celle employant le chlorure d'oxalyle, aboutissant à la formation du phénoxy **306** avec un rendement correct de 65%.

Une fois la mono trans-estérification effectuée, l'intermédiaire **306** n'est plus assez réactif pour s'engager dans une deuxième réaction de chloration. Il est donc nécessaire de contourner cet obstacle par une hydrolyse du groupement méthoxy, suivi du couplage peptidique entre ce composé et l'acide choisi.

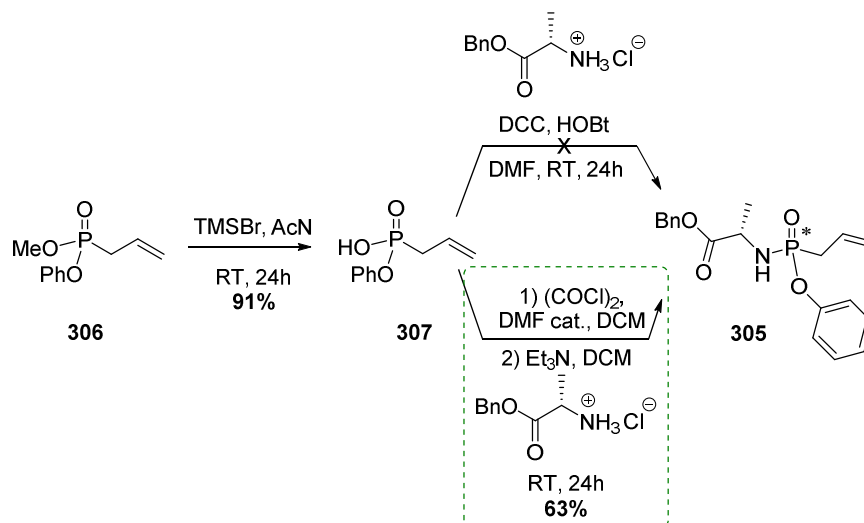


Schéma 98. Chemin synthétique visant l'obtention du phosphonamidate **305**

Le méthoxyphosphonate **306** est mis en présence de bromotriméthylsilane dans l'acétonitrile (Schéma 98). Après 24 heures de réaction à température ambiante, le produit **307** est facilement isolé avec un excellent rendement de 91%. Une fois cette espèce obtenue, un couplage peptidique est alors mis en oeuvre dans des conditions classiques, avec le 1-hydroxybenzotriazole HOBt et le dicyclohexylcarbodiimide DCC.¹³⁴ Cette activation ne suffit toutefois pas à former l'ainoester **305**, aucune conversion n'ayant été observée par suivi RMN, TLC et MS. Suivant un protocole similaire décrit par l'équipe de Gajda, l'acide phosphonique est mis en présence de chlorure d'oxalyle et d'une quantité catalytique de DMF.¹³⁵ Ces deux dernières espèces vont former un intermédiaire réactionnel très réactif, qui va rendre possible l'attaque de l'acide phosphonique, suivie de sa chloration. Pour finir la substitution sera effectuée par l'ainoester déprotoné à l'aide de triéthylamine. Le composé **305** est ainsi obtenu sous forme de diastéréoisomères avec un rendement de 63%.

Le mélange de diastéréoisomères peut être séparé après plusieurs purifications sur gel de silice avec différents systèmes d'élution. Afin d'obtenir la meilleure séparation possible, les deux isomères sont dans un premier temps séparés du reste des impuretés avec un éluant éther de pétrole / acétate d'éthyle. Une fois récoltée, la fraction contenant le mélange d'isomères peut seulement être séparée à l'aide d'un mélange pentane/éther diéthylique. Une fois isolée, la difficulté réside dans l'identification des différents isomères obtenus avec un ratio 1:1. En effet, la seule analyse nous permettant d'identifier la configuration absolue présente sur le phosphore, sans références préexistantes, est la diffraction par rayons X.

¹³⁴ König, W. & Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* **103**, 788–798 (1970).

¹³⁵ Sikora, D., Nonas, T. & Gajda, T. O -Ethyl 1-azidoalkylphosphonic acids versatile reagents for the synthesis of protected phosphonamidate peptides. *Tetrahedron*, **57**, 1619–1625 (2001).

Par conséquent, plusieurs essais de cristallisation ont été réalisés suivant divers procédés (Refroidissement, mélange de solvants, évaporation très lente...). Finalement, la seule technique ayant abouti à la formation de cristaux sous formes d'aiguilles incolores fut la cristallisation par goutte assise (Schéma 98).

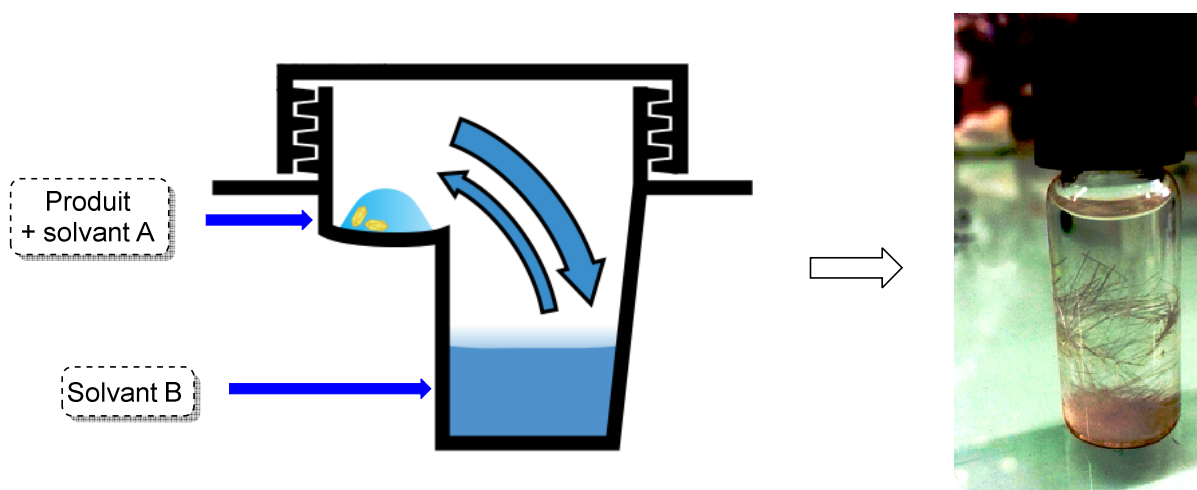


Schéma 99. Principe de la cristallisation par goutte assise.

La diffusion de vapeur est une des techniques les plus utilisées dans la cristallisation de protéine. Dans un environnement scellé, une dizaine de milligramme de produit est dissout dans un solvant dans lequel il est à peine soluble (Schéma 99). Ce paramètre a une importance majeure puisque si le solide n'est pas soluble, la cristallisation n'aura pas lieu, et dans le cas inverse, le produit restera soluble. Une fois le solvant **A** choisi, le solvant **B** doit quant à lui être très apolaire et posséder une grande diffusion de vapeur. Lorsque que les concentrations s'équilibrent dans le réservoir, cela déclenche la croissance des cristaux dans la goutte si les solvants choisis sont adéquats. Dans notre cas, le solvant **B** s'est avéré être du toluène, et le solvant **A** du pentane.

➤ Diffraction par Rayon X

Les deux diastéréoisomères ont par la suite été envoyés au Dr. Jean-François Lohier au Laboratoire de Chimie Moléculaire et Thio-organique à Caen.

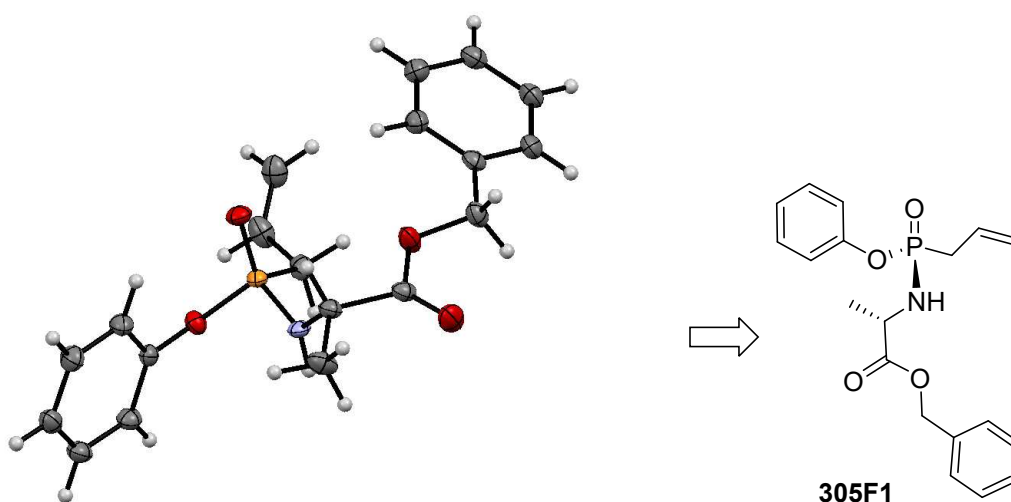


Figure 57. Diastéréoisomère **305F1** cristallisé sous représentation ORTEP

La cristallographie a révélé que le diastéréoisomère **305F1** possède une configuration de type R_p . Quand à l'autre centre asymétrique sur l'alanine, la configuration absolue est imposée par celle du précurseur commercial, et est donc de configuration S_p (Figure 57).

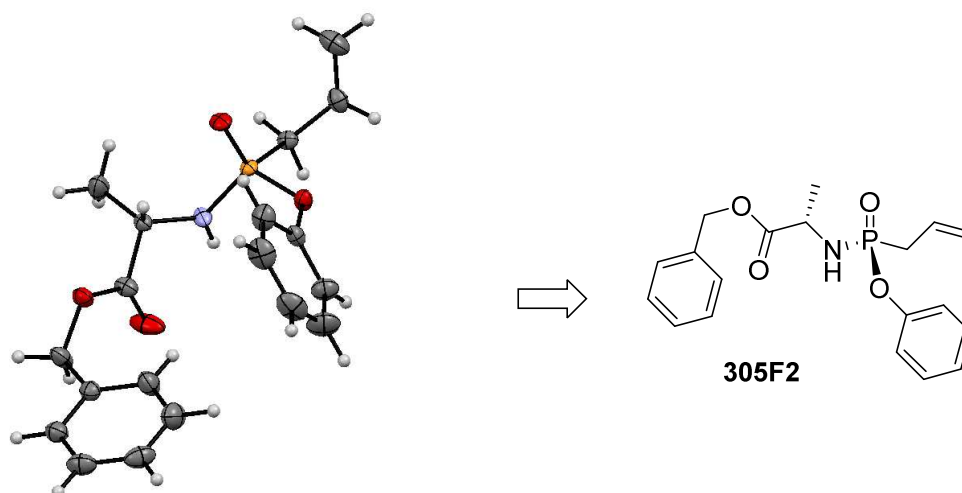


Figure 58. Diastéréoisomère **305F2** cristallisé sous représentation ORTEP

Après l'obtention du cliché DRX de l'autre diastéréoisomère, le phosphore apparaît cette fois ci sous la configuration S_p (Figure 58) ou la configuration absolue du carbone asymétrique reste sous forme S . Il est donc ici mis en évidence la nature des deux différents diastéréoisomères, (S,R_p) pour **305F1**, et (S,S_p) pour **305F2**.

➤ Préparation de la nucléobase N^1 -substituée

Une métathèse croisée directe entre le synthon thymine N^1 alkylé non protégé en position N^3 est tout d'abord envisagée, afin d'éviter une étape de déprotection ultérieure. Cet hétérocycle est alkylé sélectivement par une réaction de Vorbrüggen, connue pour permettre l'alkylation sélective d'analogues d'uraciles en position N^1 (Schéma 100).

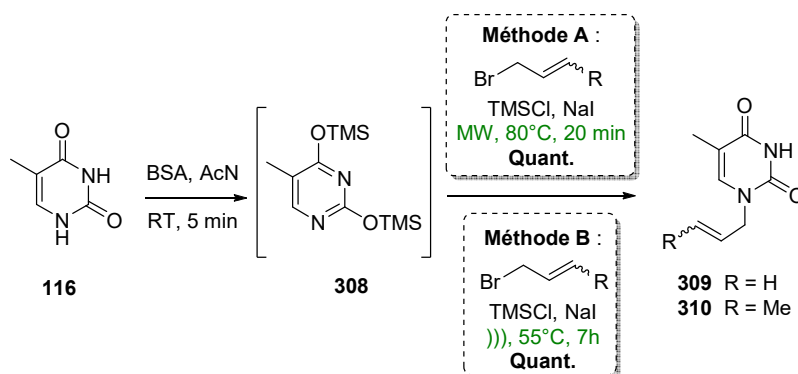


Schéma 100. Fonctionnalisation par réaction de Vorbrüggen modifiée

Basé sur les travaux de Negron-Silva, la *persilylation* de la thymine **116** se fait à l'aide de *bistriméthylsilylacétamide* (BSA) dans l'acétonitrile.¹³⁶ Cette silylation se traduit visuellement par une

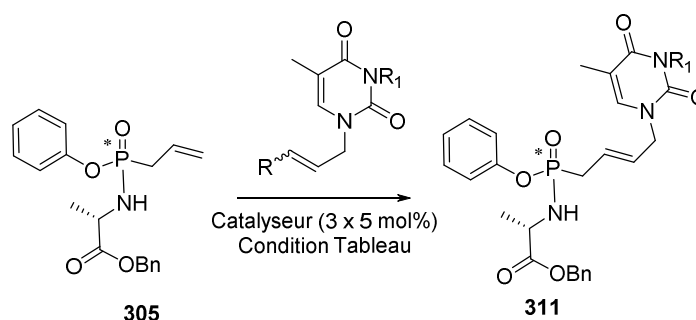
¹³⁶ Hernandez-Reyes, C. X. *et al.* Synthesis of azanucleosides through regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by sulphated zirconia under microwave and solvent-free conditions. *Molecules*. **17**, 3359–3369 (2012).

solubilisation totale de l'hétérocycle dans le milieu réactionnel. Il est rajouté par la suite les autres réactifs : le bromure d'allyle, l'iodure de sodium et le chlorure de triméthylsilane. L'activation a été étudiée soit par micro-ondes (méthode A) et sous ultrasons (méthode B), afin de déterminer les meilleures conditions. Si les résultats sont quantitatifs quelque soit le type d'irradiation, le choix se porte finalement sur les micro-ondes, plus rapide que les ultrasons à générer une conversion complète.

➤ Métathèse

Une fois les deux oléfines préparées, leur couplage par réaction de métathèse croisée a nécessité une mise au point dont les résultats sont reportés tableau 29.

Tableau 29. Tableau d'optimisation de la métathèse



Entrée	Solvant	Equivalents (Phosphonate - Nucleobase)	Catalyseur	Activation	R	R ₁	Rendement
1	DCM	1 - 2	HG-II	Δ, 50°C, 24h	CH ₃	H	/
2	DCM	1 - 4	HG-II	Δ, 50°C, 24h	H	H	/
3	DCM	1.3 - 1	HG-II	Δ, 50°C, 24h	CH ₃	H	/
4	DCM	1 - 1	HG-II, Cy ₂ BCl	Δ, 50°C, 24h	CH ₃	Boc	/
5	DCM	1.3 - 1	G-II	MW, 100°C, 1h	CH ₃	H	/
6	DCM	1.3 - 1	G-II, CuI	MW, 100°C, 1h	CH ₃	H	/
7	DCM	1.3 - 1	HG-II	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	/
8	DCM	1.3 - 1	G-II, CuI	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	/
9	DCM	1.3 - 1	G-II, BCl ₃ .SMe ₂	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	/
10	DCM	1.3 - 1	HG-II	))) , 55°C, 20h	CH ₃	Boc	/
11	DCM	1 - 2	Zhan 1B	))) , 55°C, 20h	CH ₃	Boc	/
12	H ₂ O	1 - 2	G-II ^c	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	38-41%
13	H ₂ O ^a	1 - 2	G-II ^c	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	40%
14 ^b	H ₂ O ^a	1 - 2	G-II ^c	))) , 55°C, 20h	CH ₃	H	35%

^a 2.5% de Polyoxyethanyl-α-tocopheryl Sebacate PTS

^b Réaction effectuée en tube scellé

^c Catalyseur introduit en quantité de 3 x 6 mol%

Entrée 1 à 3 : Etant donné qu'il s'agit d'une oléfine de type I à coupler à un alcène de type II, la réaction est tout d'abord essayé par chauffage classique. Les premières réactions font donc intervenir différents ratios de réactifs en présence de catalyseur d'Hoveyda Grubbs. Afin de pousser à la conversion, une thymine plus réactive sous la forme d'allyle est introduite en large excès. Cependant, aucune trace de l'hétérodimère ne fut décelée dans ce cas.

Entrée 4 : Grimaud *et coll.* ont montré que l'introduction d'un acide de Lewis boronique dans le cas de métathèse croisée en présence d'une oléfine aminée pouvait présenter un réel bénéfice.¹³⁷ Après protection de la position N³ par un groupement Boc, le phosphoramidate est par la suite mis en présence du catalyseur d'Hoveyda-Grubbs avec 10 mol% de chlorure de dicyclohexylborane. Malheureusement, l'introduction d'un acide de Lewis ne permet pas non plus de déplacer la réaction en faveur de la formation d'hétérodimère.

Entrée 5 à 6 : En présence du catalyseur de Grubbs II, le composé **305** est introduit avec la thymine crotylée dans un tube scellé, ensuite soumis à une irradiation par micro-ondes pendant 1heure à 100°C. Ces conditions ne permettent cependant pas la production de l'ANP désiré. Nous avons également suivi les conditions de Lipshutz *et coll.*, qui utilisent un adduit d'iodure cuivreux pour stabiliser le catalyseur à l'aide de l'ion iodure libéré¹³⁸, sans toute fois apporté d'amélioration à notre système.

Entrée 7 à 9 : Le moyen d'activation est changé au profit des ultrasons lors des réactions de métathèse. Dans ces trois cas, le système catalytique est modifié : le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs II / Grubbs II en présence d'iodure cuivreux ou de trichlorure de borane et d'acide de Lewis supporté.¹³⁹ Aucune de ces trois réactions n'a toutefois mené au produit souhaité.

Entrée 10 à 11 : Ces deux réactions sont menées avec la thymine présentant le groupement protecteur Boc en position N³ dans le but de diminuer les possibles interactions entre l'amine libre de la thymine et le catalyseur. Le catalyseur d'Hoveyda-Grubbs est choisi dans un premier temps, puis le catalyseur de Zhan 1B qui, bien que connu pour son efficacité dans les réactions de RCM visant à former des macrocycles, tolère aussi très bien la présence de d'analogues de phosphoramidates et de bases fortement azotées.¹⁴⁰ Encore une fois, l'échec de ces deux réactions nous pousse à changer de système, et nous avons décidé de varier le solvant.

En 2008, Gulaski *et coll.* ont montré l'intérêt de l'utilisation de l'eau comme solvant alternatif aux solvants usuels (DCM, toluène...).¹⁴¹ En effet, la sonication d'un milieu aqueux très concentré contenant les réactifs se traduit expérimentalement par une émulsion et des rendements remarquables pour des réactions de métathèse cyclisante ou croisée. Afin de vérifier l'impact réel de cette méthode sur des substrats plus fonctionnalisés, ces conditions sont adaptées à notre schéma réactionnel.

Entrée 12 à 14 : L'eau remplace donc le dichlorométhane comme solvant, avec la thymine crotylée présente en excès. Le milieu réactionnel est beaucoup plus concentré afin de permettre une émulsification

¹³⁷ Vedrenne, E., Dupont, H., Oualef, S., Elkaïm, L. & Grimaud, L. Dramatic Effect of Boron-Based Lewis Acids in Cross-Metathesis Reactions. *Synlett*. **2005**, 670–672 (2005).

¹³⁸ Voigtritter, K., Ghorai, S. & Lipshutz, B. H. Rate Enhanced Olefin Cross-Metathesis Reactions: The Copper Iodide Effect. *J. Org. Chem.* **76**, 4697–4702 (2011).

¹³⁹ Bentz, D. & Laschat, S. Synthesis of Perhydroindenes and Perhydroisindoles via One-Pot Enyne Metathesis/Diels-Alder Reaction; Remarkable Stability of Grubbs Catalyst under Lewis Acidic Conditions. *Synthesis*. **2000**, 1766–1773 (2000).

¹⁴⁰ Or, Y.S., Ma, J., Wang, G., Macrocyclic nucleoside phosphoramidate derivatives, WO2013173759 (A2) 2013.11.21

¹⁴¹ Gułajski, Ł., Śledź, P., Lupa, A. & Grela, K. Olefin metathesis in water using acoustic emulsification. *Green Chem.* **10**, 271 (2008).

du milieu réactionnel sous ultrasons. Après 20 heures à 55°C sous sonication, les ANPs **304F1** et **304F2** sont produits avec des rendements respectifs de 38 et 41% à partir des diastéréoisomères **305F1** et **305F2**. Afin d'améliorer ces rendements, nous nous sommes tournés vers les travaux de Lipshutz. Son équipe a en effet travaillé sur les réactions organométalliques en milieu aqueux et a développé toute une gamme de surfactants dans le but de développer une chimie verte dans ce milieu.¹⁴² Il s'est notamment intéressé à la réaction de métathèse et a obtenu de bons résultats en présence de certains surfactants comme le Polyoxyethanyl- α -tocopheryl Sebacate PTS.¹⁴³ Dans ce cas précis, le rendement reste sensiblement le même, que la réaction se passe en tube scellé ou non.

Les méthodes permettant l'obtention de phosphonamidates décrites dans la littérature permettaient d'obtenir les composés d'intérêts avec un rendement global compris entre 1 et 4%. Dans notre cas, la méthodologie développée permettant l'obtention de l'ANP fonctionnalisé présente quand à lui un rendement global qui se situe autour de 15%. Ces produits sont ensuite envoyés en tests biologiques afin d'estimer l'impact de ces groupements biolabiles sur leur activité antivirale et cytotoxicité.

➤ Evaluations biologiques

Les composés **304F1** et **304F2** ont été évalués au Rega Institute par les Pr. Robert Snoeck et Pr. Graciela Andrei sur le CMV et sur le VZV, afin de les comparer aux nucléotides synthétisés au laboratoire (Figure 59).

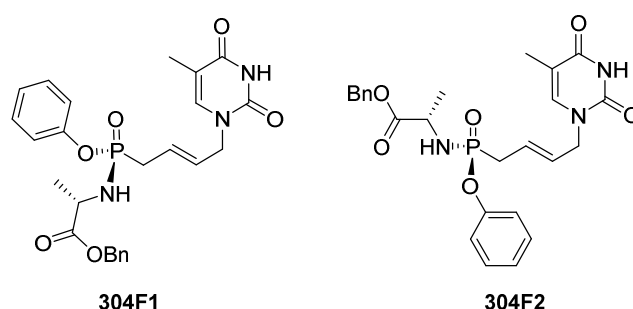


Figure 59. Diastéréoisomères du composé **345**

Les évaluations biologiques démontrent que ce soit sur le VZV ou sur le CMV, la même gamme d'activité 0.32 μ M et 0.4 μ M respectivement pour **304F1** et **304F2** sur VZV TK-. Le composé **304F2** possédant une cytotoxicité légèrement supérieure.

Par rapport aux prodrogues décrites précédemment, la version aryloxyamidate est finalement plus active sur les souches TK+ et TK- du VZV. La cytotoxicité est amoindrie d'un facteur 2, ce qui fait passer l'indice de sélectivité SI d'une valeur d'environ 50 pour le composé de référence *bis*(POM) à 200 pour **304F1** sur VZV

¹⁴² (a) Bhattacharjya, A., Klumphu, P. & Lipshutz, B. H. Kumada–Grignard-type biaryl couplings on water. *Nat. Commun.* **6**, 7401 (2015). (b) Handa, S., Lippincott, D. J., Aue, D. H. & Lipshutz, B. H. Asymmetric Gold-Catalyzed Lactonizations in Water at Room Temperature. *Angew. Chemie Int. Ed* **53**, 10658–10662 (2014). (c) Handa, S., Slack, E. D. & Lipshutz, B. H. Nanonickel-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Couplings in Water. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 11994–11998 (2015). (d) Slack, E. D., Gabriel, C. M. & Lipshutz, B. H. A Palladium Nanoparticle-Nanomicelle Combination for the Stereoselective Semihydrogenation of Alkynes in Water at Room Temperature. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 14051–14054 (2014). (e) Handa, S., Andersson, M. P., Gallou, F., Reilly, J. & Lipshutz, B. H. HandaPhos: A General Ligand Enabling Sustainable ppm Levels of Palladium-Catalyzed Cross-Couplings in Water at Room Temperature. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 4914–4918 (2016).

¹⁴³ Lipshutz, B. H. & Ghorai, S. in *Olefin Metathesis* 515–521 (John Wiley & Sons, Inc., 2014). doi:10.1002/9781118711613.ch21

TK-. Dans le même temps, l'introduction de cette prodrogue permet de révéler une activité de l'ordre 40µM sur le CMV, alors que les autres pronucléotides étaient dépourvus d'activité. (Tableau 30)

Tableau 30. Activité des phosphonamidates

Entrée	Composé	EC ₅₀ (µM)				MCC ^b (µM)	CC ₅₀ ^c (µM)
		TK+ VZV	TK- VZV	CMV	CMV		
		(OKA)	(07/1)	(AD-169)	(Davis)		
1	304F1	0.39± 0.14	0.32 ± 0.03	29.9	44.7	> 100	82 ± 18
2	304F2	0.57 ± 0.05	0.40 ± 0.1	34.2	52.5	> 100	55 ± 3
3	But-T- bis(POM)	2.9	0.55	-	-	> 100	38.1
4	But-T- bis(POC)	1.2	0.68	-	-	> 100	34.0
5	But-T- HDP/POC	14.3	-	-	-	> 100	14.9
6	But-T- HDP/OH	36.9	-	-	-	> 100	73.0
7	Acyclovir	2.5 ± 0.3	92 ± 70	-	-	> 300	470 ± 490
8	Ganciclovir	-	-	7.5 ± 2.3	7.1 ± 0	> 350	130 ± 86
9	Brivudine	0.0087	74	-	-	> 150	> 100
10	Cidofovir	-	-	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0	> 350	64 ± 16

^a Concentration requise pour réduire la cytopathogénicité virale à 50% .

^b Concentration cytotoxique minimum qui cause une altération morphologique des cellules visible au microscope

^c Concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la croissance des cellules.

Ces données montrent donc un fort intérêt impliqué par l'introduction de ce groupement biolabile, par l'augmentation de l'activité et la baisse de la toxicité associée à cette activité. Plusieurs hypothèses peuvent venir appuyer ces résultats, comme une biodisponibilité de la molécule accrue sous sa forme phosphoramidate par rapport à la forme *bis*(POM). C'était en effet le cas pour le Tenofovir alafenamide par rapport au Tenofovir *bis*(POC).¹²⁶ L'activité peut aussi être accrue par un meilleur temps de demie vie,¹⁴⁴ et la cytotoxicité plus modérée par des sous produits moins toxiques.

ii. Modulation des ANPs

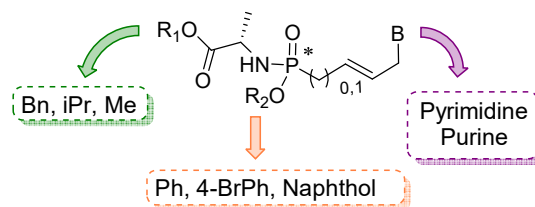


Figure 60. Modulation du noyau envisagé

¹⁴⁴ Ruda, G. F. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Prodrugs of 4-Phospho-D -erythronohydroxamic Acid, an Inhibitor of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *ChemMedChem* **2**, 1169–1180 (2007).

Par la suite, plusieurs modulations sur cette série d'ANPs ont été envisagées, dans le but d'étudier précisément le rôle de chaque groupement. Les phosphoramidates possèdent indéniablement un effet bénéfique dans le métabolisme de la molécule, mais de même que de leurs analogues oxygénés, il est impossible d'estimer quel ester, quel aryloxy ou quelle longueur de chaîne donnera les meilleures données thérapeutiques.¹⁴⁵ Il est alors à envisager de synthétiser une gamme de produits, dans le but de déterminer le meilleur phosphoramidate dans cette série d'acyclo nucléotides (Figure 60).

➤ Modulation de la nucléobase

Il pourrait être intéressant de regarder l'effet de l'introduction de différentes bases nucléiques sur l'activité biologique de l'ANP en résultant. Dans cet intérêt, plusieurs bases nucléiques ont été insérées. Par souci de temps, nous nous contenterons du mélange d'isomères **305** comme synthon de départ.

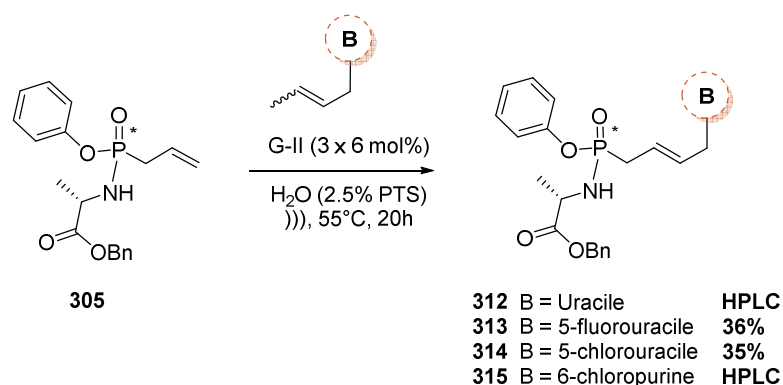


Schéma 101. Variation des bases nucléiques

La métathèse est effectuée dans l'eau, en présence de 2.5% de surfactant et d'une charge catalytique totale de 18 mol%. La base nucléique y est en excès (2 équivalents) et après 20h d'activation sous ultrasons à 55°C, les composés **312** à **315** sont obtenus avec des rendements modestes (Schéma 101). Si la description du procédé de synthèse a été décrit précédemment pour l'obtention des bases pyrimidiques substituées en N^1 par réaction de Vorbruggen, la synthèse de la 6-chloropurine crotylée n'est quand à elle pas envisageable avec cette méthode. Inspiré d'une méthodologie développée par l'équipe de Zerrouki, la nucléobase est déprotonée par l'hydruide de sodium dans le DMF au micro-onde pendant 2 min à 40°C.¹⁴⁶ L'oléfine bromée est ensuite introduite dans la réaction, puis irradiée sous micro-ondes pendant 6 minutes à la même température, aboutissant à la formation exclusive de l'isomère N^9 (Schéma 102).

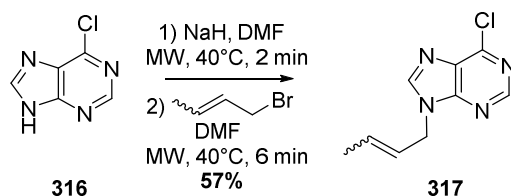


Schéma 102. Préparation de la 6-chloropurine crotylée

➤ Modulation de l'ester d'alanine

¹⁴⁵ Oliveira, F. M. *et al.* The diverse pharmacology and medicinal chemistry of phosphoramidates – a review. *RSC Adv.* **4**, 18998 (2014).

¹⁴⁶ Teste, K. *et al.* Solvent-controlled regioselective protection of 5'-O-protected thymidine. *Carbohydr. Res.* **343**, 1490–1495 (2008).

L'alanine étant l'acide aminé employé dans la majorité des noyaux phosphoramidates, seule la partie ester sera modulée. Les seules molécules en phase III ou approuvées par la FDA (GS-9131 et le Tenofovir alafenamide) présentent des groupements méthyles et isopropyles. McGuigan a aussi reporté l'utilisation de ces esters d'alanine sur les dérivés de l'abacavir.¹⁴⁷

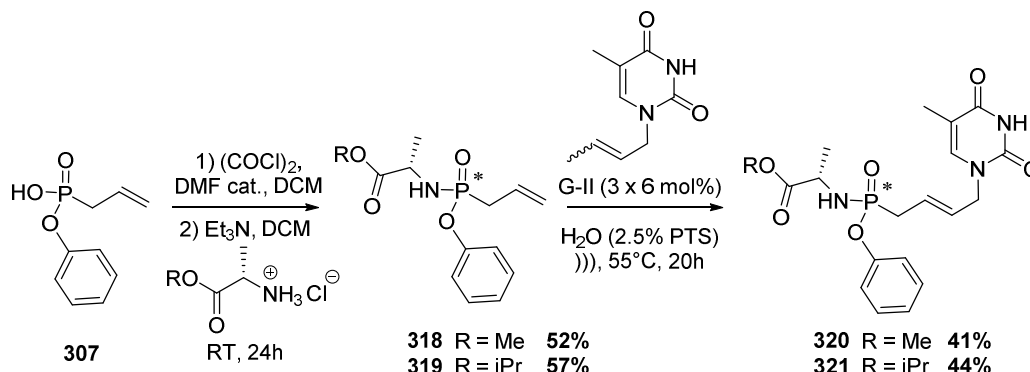


Schéma 103. Introduction de l'amidate et couplage organométallique

L'acide phosphonique **307** est tout d'abord traité avec du chlorure d'oxalyle en présence d'une quantité catalytique de DMF dans le dichlorométhane. Une fois chlorée, la substitution est effectuée avec l'acide aminé méthyle ou isopropyle correspondant. Les oléfines terminales **318** et **319** présentant les acides aminés sont obtenues avec des rendements de 52% et de 57% respectivement. Le couplage au ruthénium s'effectue par la suite en présence du catalyseur de Grubbs de seconde génération, sous ultrasons dans l'eau pendant 20h à 55°C, pour donner les composés finaux avec des rendements de 41% pour la molécule **320** et 44% pour **321** (Schéma 103).

➤ Perspectives

A son tour, l'aryloxy peut aussi être modifié au profit d'un naphthol ou d'un bromophénol, dont la capacité thérapeutique a déjà été démontrée.¹⁴⁸ Bien qu'il ait été démontré précédemment que la chaîne carbonée butényle était préférentielle à sa variante propényle, il peut toutefois être intéressant d'un point de vue méthodologique d'étudier la synthèse de ce type de squelette.

Par défaut de temps, seule la synthèse des acides phosphoniques a pu être réalisée, et les travaux sont actuellement en cours pour terminer la synthèse de ces molécules.

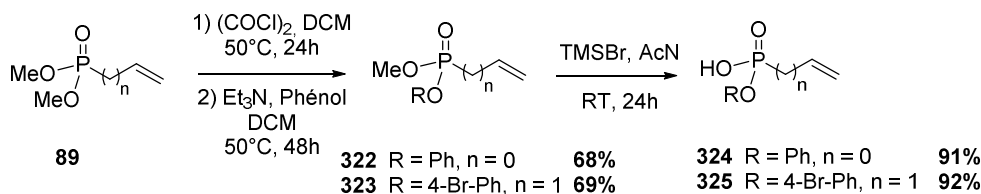


Schéma 104. Synthèse des acides phosphoniques

La même stratégie synthétique que précédemment est adoptée pour la formation des monoacides phosphoniques **324** à **325**. La première étape consiste en l'échange du groupement méthoxy par l'aryloxy

¹⁴⁷ McGuigan, C., Harris, S. A., Daluge, S. M., Gudmundsson, K. S., McLean, E. W., Burnette, T. C., Marr, H., Hazen, R., Condeary, L. D., Johnson, L., De Clercq, E., Balzarini, J., *J. Med. Chem.* **48**, 3504–3515 (2005).

¹⁴⁸ Siddiqui, A. Q. *et al.* Design and Synthesis of Lipophilic Phosphoramidate d4T-MP Prodrugs Expressing High Potency Against HIV in Cell Culture: Structural Determinants for in Vitro Activity and QSAR. *J. Med. Chem.* **42**, 4122–4128 (1999).

correspondant avec un rendement oscillant autour de 68-69%. La déprotection est ensuite effectuée à l'aide de bromure de triméthylsilane, pour aboutir aux acides phosphoniques (Schéma 104).

➤ Limitations

Le bénéfice imposé par l'insertion des groupements phosphonamidates par rapport aux carbonyloxyméthyles (*bis*(POM) ou *bis*(POC)) et aux prodrogues mixtes (HDP/POC ou HDP/OH) est indéniable, faisant gagner en activité et sur l'indice de sélectivité. Leur introduction sur les charpentes de type O-diaminopyrimidine exploitées précédemment pourrait être d'un grand intérêt. Malheureusement, les conditions optimisées de métathèse ne permettent pas dans ce cas l'introduction des diaminopyrimidines sur le synthon **305** (Schéma 105).

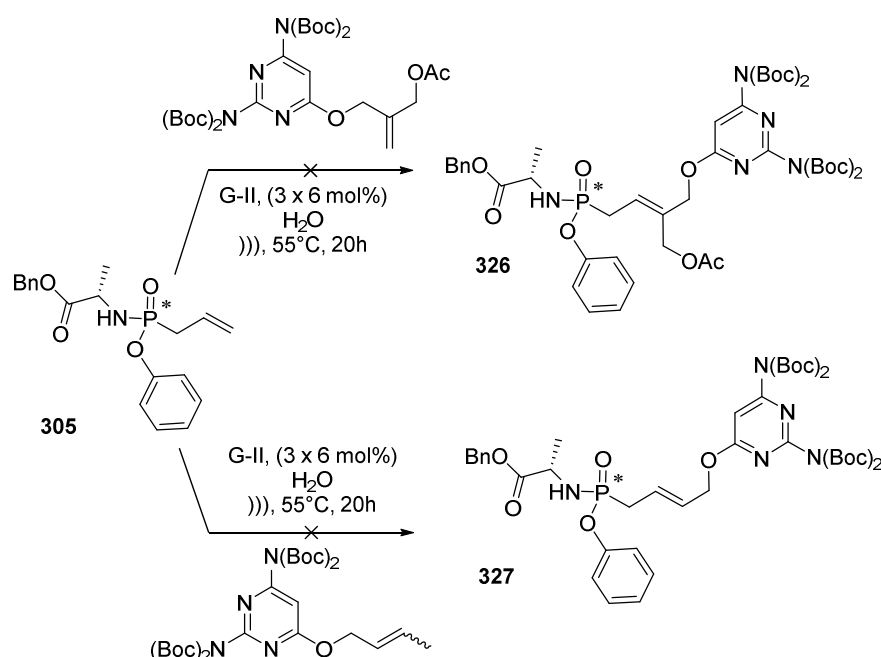


Schéma 105. Essais de métathèses entre les DAPYs et les phosphonamidates

V. Conclusion et perspectives

Au cours de ces différents projets, nous avons successivement évalué l'impact thérapeutique induit par les différents pronucléotides, la chaîne acyclique carbonée ainsi que la nature de la base nucléique. Parmi la diversité des composés formés, quelques uns ont présenté une activité remarquable, comme notamment la molécule présentant une prodrogue HDP/POC et une chaîne 2'-acetoxy-2'-butényle portant une 2,6-diaminopyrimidine. Cet ANP présente une des meilleurs potentiels jamais relevé pour un analogue nucléosidique sur le VZV dépourvu de kinase, et très actif sur tout une gamme de virus à ADN. Il est actuellement en cours de développement pour une évaluation biologique *in vivo*.

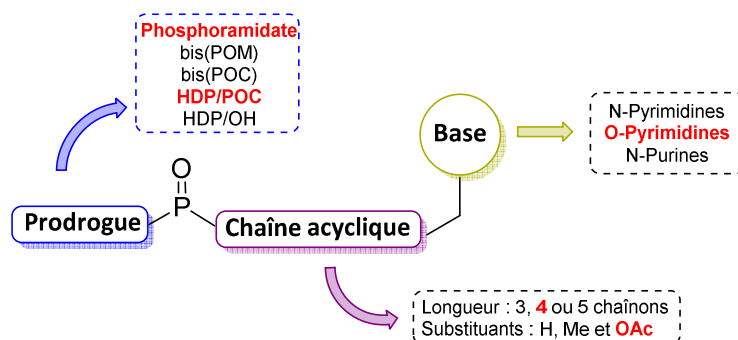


Figure 61. Schéma récapitulatif global

Contrairement aux stratégies habituellement reportées dans le cas d'introduction de pronucléotides, nous avons développé diverses méthodologies afin de garder un rendement global intéressant. Ces schémas synthétiques possèdent comme pierre angulaire la réaction de métathèse croisée, qui s'est révélé être un outil synthétique très puissant, capable de former des molécules très complexes en utilisant sa réactivité dans des conditions peu exploitées (ultrasons, eau, surfactants...).

En parallèle de ces travaux, nous avons développé la métathèse dans l'eau sous ultrasons. En présence de surfactant, une large variété de phosphonates a été introduite sur divers sucres, nucléosides et bases nucléiques possédant une oléfine.

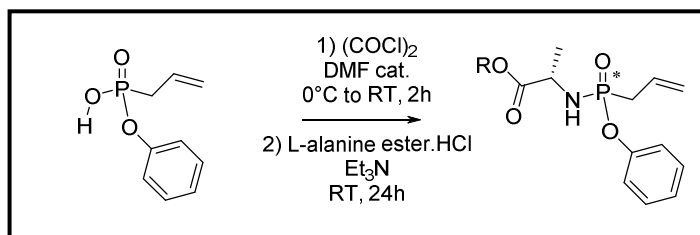
Plusieurs autres réactions se sont également avérées indispensables, comme les réactions de Michaelis, pour les formations de précurseurs phosphonates avec d'excellents rendements ou de Mitsunobu dans l'introduction de bases puriques et pyrimidiques variées. Dès que les réactions le permettaient, nous les avons adapté sous conditions ultrasoniques ou aux micro-ondes, plus particulièrement pour les diverses conditions de protections/déprotections.

Toutes ces modifications ont pour but final de créer des accès synthétiques simples, rapides et efficaces aux ANPs pour élargir cette famille de molécules très prometteuses.

En revanche, certains travaux supplémentaires sont nécessaires, notamment pour la diversification des hétérocyles ANPs 2'-acétoxy-2'-butényles portant des groupements *bis*(POM). Il en va de même pour les DAPYs modifiés en position C⁴, et il pourrait être intéressant par la même occasion de synthétiser des acyclonucléotides alliant les noyaux 2,6-diaminopyrimidine à la prodrogue phosphoramidate. Il serait aussi préconisé de synthétiser les acides phosphoniques des molécules biologiquement actives. Une fois le mécanisme de métabolisation élucidé, nous envisageons de synthétiser des molécules possédant un meilleur indice de sélectivité, critère nécessaire pour agrandir la fenêtre thérapeutique.

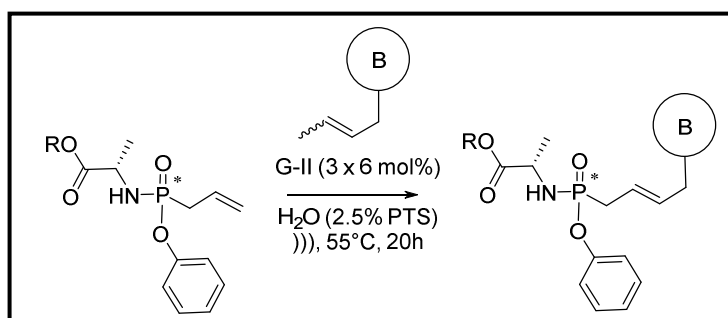
EXPERIMENTAL PART

GENERAL PROCEDURE 1



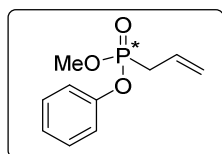
Under inert atmosphere, phosphonic acid (1 eq.) was dissolved in DCM. A catalytical amount of DMF (0.3 eq.) was then introduced, followed by the addition of oxalyl chloride (2 eq.). After 30 min. at 0°C and 1h30 at room temperature, the volatiles were removed, and the residue diluted with 20 mL of DCM to afford solution A. A second solution was prepared with L-alanine ester chlorhydrate (1.2 eq.), freshly distilled triethylamine (8 eq.) and DCM. To this mixture, the solution A was slowly added at 0°C, and stirred 24 h at room temperature. For 1 g. of starting phosphonate, the solution was successively washed with 10 mL of water, 10mL NaOH 1M, 10 mL water, 10 mL HCl 10%, 10 mL NaHCO₃ and 10 mL water. After this work-up, the aqueous phase was extracted with 4 x 10 mL with ethyl acetate, the organic phases were washed with brine (20 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified twice by flash column chromatography to afford the two diastereoisomers.

GENERAL PROCEDURE 2



To a 2.5% Polyoxyethanyl- α -tocopheryl Sebacate PTS solution of water (0.5 M) of phosphonoamidate (1 eq.) and crotylnucleobase (2 eq.), second generation Grubbs catalyst (6 mol%) was added. The reaction was irradiated under ultrasound activation (55°C, 80 KHz) for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). Volatiles were removed under reduced pressure, and the residue was submitted twice to flash chromatography purification, firstly DCM/MeOH 95/5 followed by a second one eluting toluene/acetone 6/4.

Methoxyphenoxy allylphosphonate (306)



Chemical Formula: C₁₀H₁₃O₃P
Molecular Weight: 212,18

To a mixture of dimethylallylphosphonate **89** (4.9 g, 1 eq., 32.5 mmol) and DCM (150 mL), oxalyl chloride (8.6 mL, 3 eq., 97.5 mmol) was added. The reaction was stirred 24h at reflux, followed by the removal of the volatiles *in vacuo* to obtain the chloromethyl allylphosphonate. In another flask, a solution of phenol (6.12 g, 2 eq., 65 mmol), triethylamine (8.8 mL, 2 eq., 65 mmol) and DCM (0.2 M) was stirred at room temperature. The phosphonate residue was then dissolved in DCM (0.2 M), and slowly added to this solution, and refluxed during 48h. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether/Ethyl acetate 8/2, to afford **306** as a colorless oil. (4.5 g, 65%)

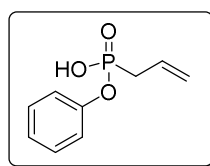
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (m, 2H, H^{Ar}), 7.15 (m, 3H, H^{Ar}), 5.80 (m, 1H, CH=CH₂), 5.24 (m, 2H, CH₂=CH), 3.76 (d, *J* = 11.1 Hz, 3H, OMe), 2.73 (dd, *J* = 22.0, 7.3 Hz, 2H, CH₂-P).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.46 (d, *J* = 8.5 Hz, C^{quat}), 129.72 (C^{Ar}), 126.59 (d, *J* = 11.6 Hz, CH=CH₂), 124.95 (d, *J* = 1.3 Hz, C^{Ar}), 120.67 (d, *J* = 14.8 Hz, CH₂=CH), 120.42 (d, *J* = 4.4 Hz, C^{Ar}), 53.16 (d, *J* = 5.1 Hz, OMe), 31.21 (d, *J* = 139.9 Hz, CH₂-P).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.06.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₄O₃P : 213.0681, found : 213.0675.

Phenyloxy allylphosphinic acid (**307**)



Chemical Formula: C₉H₁₁O₃P
Molecular Weight: 198,16

Bromotrimethylsilane (8.9 mL, 6 eq., 61.8 mmol) was slowly added to a solution of **306** (2.2 g, 1 eq., 10.3 mmol) in DCM (110mL). After 24h at room temperature and evaporation of all volatiles, the crude product was co-evaporated 5 times with methanol (5 x 15 mL). The residue was then purified by flash column chromatography (DCM / MeOH 95/5) to obtain desired product **307** as an amorphous white solid. (1.85 g, 91%)

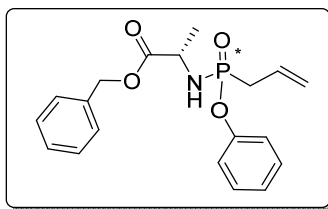
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H, OH), 7.28 (m, 2H, H^{Ar}), 7.14 (m, 3H, H^{Ar}), 5.79 (m, 1H, CH=CH₂), 5.22 (m, 2H, CH₂=CH), 2.67 (dd, *J* = 22.5, 7.3 Hz, 2H, CH₂-P).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.18 (d, *J* = 8.9 Hz, C^{quat}), 129.61 (C^{Ar}), 126.65 (d, *J* = 11.4 Hz, CH=CH₂), 124.92 (C^{Ar}), 120.79 (d, *J* = 4.4 Hz, C^{Ar}), 120.66 (d, *J* = 14.9 Hz, CH₂=CH), 31.55 (d, *J* = 141.5 Hz, CH₂-P).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.26.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₉H₁₂O₃P : 199.0525, found : 199.0518.

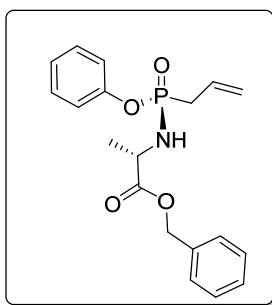
Benzyl N-[Phenoxy(allylphosphinyl)] alaninate (**305**)



Chemical Formula: $C_{19}H_{22}NO_4P$
Molecular Weight: 359,36

Following general procedure 1, compound **307** (1 g, 1 eq., 5.05 mmol) was dissolved in DCM (20 mL). A catalytical amount of DMF (0.12 mL) was then introduced, followed by the addition of oxalyl chloride (0.87 mL, 2 eq., 10.1 mmol). After 30 min. at 0°C and 1h30 at room temperature, the volatiles were removed, and the residue diluted with 20 mL of DCM to afford solution A. A second solution was prepared with L-alanine benzyl ester chlorhydrate (1.3 g, 1.2 eq., 6.06 mmol), freshly distilled triethylamine (5.5 mL, 8 eq., 40.5 mmol) and DCM (25 mL). To this mixture the solution A was added slowly at 0°C, and stirred 24 h at room temperature. After the described work-up, the residue was purified twice by flash column chromatography, first eluting PE/EA (7/3) and then Pentane/diethyl ether (55/45), to afford the two diastereoisomers as white powder. (1.14 g, 63%, ratio diastereoisomer 1 : diastereoisomer 2 of 6:4). In order to prove the structure of each diastereoisomers, the compounds were crystallized in a toluene/pentane mixture, to afford both compounds as colorless needles, and then submitted to X-ray diffraction.

Diastereoisomer 1 (**305F1**)



Chemical Formula: $C_{19}H_{22}NO_4P$
Molecular Weight: 359,36

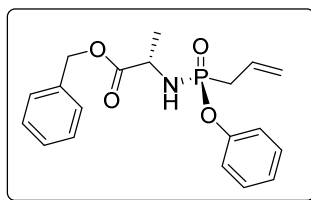
^1H NMR (400 MHz, Acetone) δ 7.37 (m, 7H, H^{Ar}), 7.24 (m, 2H, H^{Ar}), 7.14 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.89 (m, 1H, $CH=CH_2$), 5.18 (m, 4H, $CH_2=CH$, CH_2-O), 4.60 (t, J = 11.2 Hz, 1H, NH), 4.16 (m, 1H, $CH-NH$), 2.76 (ddd, J = 20.7, 7.1, 2.5 Hz, 2H, CH_2-P), 1.22 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 174.42 (d, J = 4.8 Hz, C=O), 151.94 (d, J = 9.1 Hz, C^{quat}), 137.12 (C^{quat}), 130.19 (C^{Ar}), 129.46 (d, J = 11.0 Hz, $CH=CH_2$), 129.28 (C^{Ar}), 128.92 (C^{Ar}), 128.88 (C^{Ar}), 125.09 (d, J = 1.1 Hz, C^{Ar}), 121.82 (d, J = 4.6 Hz, C^{Ar}), 119.86 (d, J = 14.3 Hz, $CH_2=CH$), 67.09 (CH_2-O), 50.47 ($CH-N$), 35.03 (d, J = 128.7 Hz, CH_2-P), 20.88 (d, J = 4.8 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, Acetone) δ 26.70.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{23}O_4NP$:360.1365, found : 360.1355.

Diastereoisomer 2 (**305F2**)



Chemical Formula: $C_{19}H_{22}NO_4P$

Molecular Weight: 359,3618

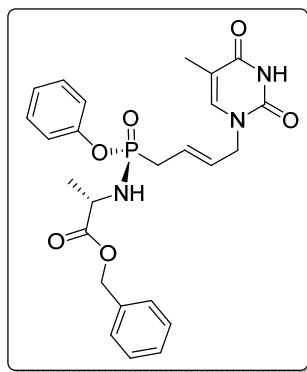
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.19 (m, 10H, H^{Ar}), 5.79 (m, 1H, $CH=CH_2$), 5.17 (m, 2H, $CH_2=CH$), 5.04 (s, 2H, CH_2-O), 4.06 (m, 1H, $CH-NH$), 3.49 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, NH), 2.69 (dd, $J = 21.5, 7.4$ Hz, 2H, CH_2-P), 1.27 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.56 (d, $J = 5.3$ Hz, $C=O$), 150.52 (d, $J = 9.0$ Hz, C^{quat}), 135.25 (C^{quat}), 129.65 (C^{Ar}), 128.62 (C^{Ar}), 128.48 (C^{Ar}), 128.21 (C^{Ar}), 127.45 (d, $J = 11.2$ Hz, $CH=CH_2$), 124.67 (C^{Ar}), 120.60 (d, $J = 14.3$ Hz, $CH_2=CH$), 120.56 (d, $J = 4.7$ Hz, C^{Ar}), 67.12 (CH_2-O), 49.61 ($CH-NH$), 34.25 (d, $J = 128.8$ Hz, CH_2-P), 21.57 (d, $J = 4.3$ Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 26.47.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{19}H_{23}O_4NP$: 360.1365, found : 360.1354.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)thymine (304F1)



Chemical Formula: $C_{25}H_{28}N_3O_6P$

Molecular Weight: 497,49

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **305F1** (68 mg, 1 eq., 0.19 mmol), crotylthymine **310** (68 mg, 0.38 mmol, 2 eq.) and second generation Grubbs catalyst (8 mg, 6 mol%, 0.0095 mmol) were added in the flask. The reaction was irradiated under ultrasound activation (55°C, 80 KHz) for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure *E* compound **304F1** was isolated as a white solid (36 mg, 38%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.35 (s, 1H, NH), 7.32 (m, 7H, H^{Ar}), 7.15 (m, 3H, H^{Ar}), 6.97 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H^6), 5.78 (dt, $J = 13.7, 7.3$ Hz, 1H, $H^{3'}$), 5.67 (dt, $J = 15.5, 4.8$ Hz, 1H, $H^{2'}$), 5.10 (d, AB system, $J = 13.0$ Hz, 2H, CH_2-O), 4.27 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, $H^{1'}$), 4.15 (dq, $J = 9.9, 7.3$ Hz, 1H, $CH-NH$), 3.38 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, NH), 2.76 (dt, $J = 21.0, 7.3$ Hz, 2H, CH_2-P), 1.89 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, CH_3-C^{quat}), 1.25 (s, 3H, CH_3-CH).

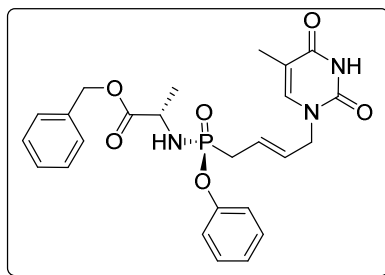
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.86 (d, $J = 5.9$ Hz, $C=O$), 163.77 ($C=O$), 150.59 ($C=O$), 150.24 (d, $J = 9.1$ Hz, C^{quat}), 139.73 (C^6), 135.28 (C^{quat}), 129.68 (C^{Ar}), 129.07 (d, $J = 14.0$ Hz, $C^{2'}$), 128.64 (C^{Ar}), 128.49 (C^{Ar}), 128.18

(C^{Ar}), 125.32 (d, $J = 11.5$ Hz, C^{3'}), 124.90 (C^{Ar}), 120.4 (d, $J = 4.6$ Hz, C^{Ar}), 110.97 (C⁵), 67.19 (CH₂-O), 49.75 (CH-NH), 49.53 (d, $J = 2.2$ Hz, C^{1'}), 32.88 (d, $J = 128.9$ Hz, CH₂-P), 21.31 (d, $J = 4.0$ Hz, CH₃-CH), 12.27 (CH₃-C_{quat}).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.00.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₂₉N₃O₆P :498.1794, found : 498.1786.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)thymine (304F2)



Chemical Formula: C₂₅H₂₈N₃O₆P
Molecular Weight: 497.49

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **305F2** (125 mg, 1 eq., 0.35 mmol), crotylthymine **310** (125 mg, 2 eq., 0.70 mmol) and second generation Grubbs catalyst (14 mg, 6 mol%, 0.017 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure *E* compound **304F2** was isolated as a white solid (70 mg, 41%)

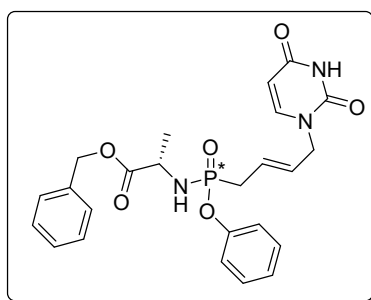
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.79 (bs, 1H, NH), 7.27 (m, 7H, H^{Ar}), 7.12 (m, 3H, H^{Ar}), 6.94 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.67 (m, 2H, H^{2'}, H^{3'}), 5.07(s, 2H), 4.23 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, CH₂-O), 4.03 (dq, $J = 9.6, 7.6$ Hz, 1H, CH-NH), 3.38 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, NH), 2.70 (dt, $J = 20.3, 5.7$ Hz, 2H), 1.84 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 1.27 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.46 (d, $J = 5.3$ Hz, C=O), 163.95 (C=O), 150.68 (C=O), 150.40 (d, $J = 9.1$ Hz, C^{quat}), 139.57 (C⁶), 135.19 (C^{quat}), 129.74 (C^{Ar}), 129.17 (d, $J = 14.4$ Hz, C^{2'}), 128.66 (C^{Ar}), 128.56 (C^{Ar}), 128.25 (C^{Ar}), 125.08 (d, $J = 11.1$ Hz, C^{3'}), 124.84 (C^{Ar}), 120.37 (d, $J = 4.9$ Hz, C^{Ar}), 111.00 (C⁵), 67.25 (CH₂-O), 49.67 (CH-NH), 49.17 (d, $J = 2.2$ Hz, C^{1'}), 32.73(d, $J = 128.2$ Hz), 21.46 (d, $J = 4.3$ Hz, CH₃-CH), 12.27 (CH₃-C_{quat})

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.60.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₂₉N₃O₆P :498.1794, found : 498.1789.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)-uracile (312)

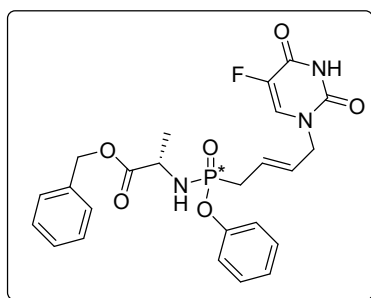


Chemical Formula: C₂₄H₂₆N₃O₆P
Molecular Weight: 483.46

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **305** (50 mg, 1 eq., 0.14 mmol), uracile **309** (46 mg, 2 eq., 0.28 mmol) and second generation Grubbs catalyst (6.8 mg, 6 mol%, 0.008 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure E compound **312** was isolated as a white solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₇N₃O₆P : 484.1638, found : 484.1633.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)-5-fluorouracine (313)



Chemical Formula: C₂₄H₂₅FN₃O₆P
Molecular Weight: 501.45

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **305** (64 mg, 1 eq., 0.18 mmol), N¹-crotyl-5-fluorouracile (66 mg, 2 eq., 0.36 mmol) and second generation Grubbs catalyst (9 mg, 6 mol%, 0.011 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added after 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure E compound **313** was isolated as a white solid (32 mg, 36%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.26 (bs, 1H, NH), 7.34 (m, 7H, H^{Ar}), 7.17 (m, 3H, H^{Ar}), 5.75 (m, 2H, CH=CH), 5.13 (s, 1H, CH₂ benzylic), 5.09 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H¹), 3.99 (2 x dq, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 1H, CH-NH), 3.72 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H, major NH-P), 3.45 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H, minor NH-P), 2.77 (m, 2H, CH₂-P), 1.29 (s, 3H, CH₃-CH).

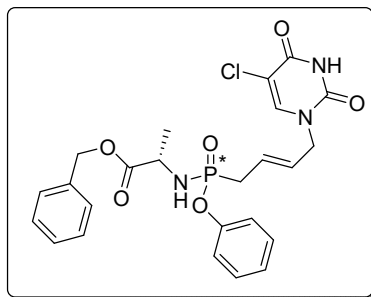
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.49 (d, *J* = 5.3 Hz, C=O), 159.14 (C=O), 150.38 (C=O), 150.27 (d, *J* = 9.1 Hz, minor C^{quat}), 149.75 (d, *J* = 9.1 Hz, major C^{quat}), 140.57 (C^{quat}), 135.21 (C⁶), 129.79 (C^{Ar}), 129.72 (C^{Ar}), 128.68

(C^{Ar}), 128.62 (d, $J = 4.7$ Hz, C^{Ar}), 128.49 (C^{Ar}), 128.30 (d, $J = 13.9$ Hz, C^{3'}), 128.28 (C^{Ar}), 128.18 (C^{Ar}), 126.50 (d, $J = 10.1$ Hz, minor C^{2'}), 126.28 (d, $J = 10.1$ Hz, major C^{2'}), 124.93 (C^{Ar}), 120.66 (d, $J = 4.6$ Hz, minor C^{Ar}), 120.38 (d, $J = 4.6$ Hz, major C^{Ar}), 67.30 (CH₂-O), 49.73 (CH-NH), 49.19 (CH₂-O), 32.51 (d, $J = 128.8$ Hz, CH₂-P), 21.36 (d, $J = 4.6$ Hz, major CH₃), 21.28 (d, $J = 4.6$ Hz, minor CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.95, 25.54.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₆FN₃O₆P :502.1544 found : 502.1537.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)-5-chlorothymine (314)



Chemical Formula: C₂₄H₂₅ClN₃O₆P
Molecular Weight: 517.90

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **305** (50 mg, 1 eq., 0.14 mmol), N¹-crotyl-5-chlorouracile (56 mg, 2 eq., 0.28 mmol) and second generation Grubbs catalyst (6.8 mg, 6 mol%, 0.008 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure *E* compound **314** was isolated as a white solid (33 mg, 35%)

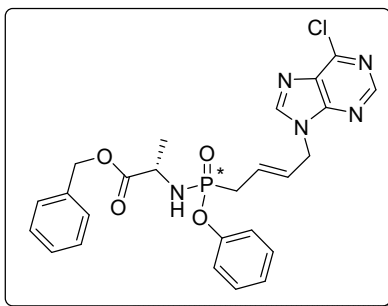
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.26 (bs, 1H, NH), 7.33 (m, 7H, H^{Ar}), 7.18 (m, 3H, H^{Ar}), 5.74 (m, 2H, CH=CH), 5.13 (s, 1H, CH₂ benzylic), 5.09 (s, 1H, H^{1'}), 4.07 (2 x dq, $J = 8.8, 7.0$ Hz, 1H, CH-NH), 3.68 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H, major NH-P), 2.77 (m, 2H, CH₂-P), 1.29 (s, 3H, CH₃-CH).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.47 (d, $J = 5.2$ Hz, C=O), 159.14 (C=O), 150.34 (d, $J = 9.1$ Hz, C^{quat}), 149.12 (C=O), 141.69 (C^{quat}), 139.33 (C^{quat}), 135.28 (C^{quat}), 135.21 (C⁶), 129.79 (C^{Ar}), 128.68 (C^{Ar}), 128.60 (C^{Ar}), 128.49 (C^{Ar}), 128.28 (d, $J = 20.6$ Hz, C^{3'}), 128.28 (C^{Ar}), 128.17 (C^{Ar}), 127.62 (C^{Ar}), 126.23 (d, $J = 11.0$ Hz, C^{2'}), 124.94 (C^{Ar}), 120.35 (d, $J = 4.8$ Hz, C^{Ar}), 67.31 (CH₂-O), 49.73 (CH-NH), 49.71 (CH₂-O), 32.48 (d, $J = 128.9$ Hz, CH₂-P), 21.35 (d, $J = 4.6$ Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 25.91, 25.53.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₆ClN₃O₆P :518.1248 found : 518.1242.

(E)-N¹-(4'-(N-Benzylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)-6-chloropurine (315)

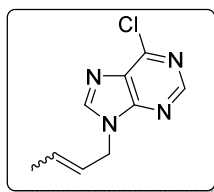


Chemical Formula: C₂₅H₂₅ClN₅O₄P
Molecular Weight: 525,93

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 300 μ L), phosphonoamidate **305** (53 mg, 1 eq., 0.15 mmol), chloropurine **317** (61 mg, 2 eq., 0.29 mmol) and second generation Grubbs catalyst (8 mg, 6 mol%, 0.009 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure E compound **315** was isolated as a white solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₂₆ClN₅O₄P :526.1412 found : 526.1410.

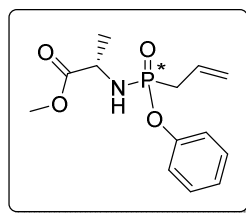
N⁹-crotyl-6-chloropurine (317)



Chemical Formula: C₉H₉ClN₄
Molecular Weight: 208,6490

In a 10-20 mL vial, 6-chloropurine (696 mg, 1 eq., 4.5 mmol) was dissolved into DMF (18 mL). To this solution, NaH (431 mg, 60% in dispersed oil, 2.5 eq., 11.25 mmol) was slowly added, and the resulting mixture was activated 2 minutes at 40°C under microwave irradiation. Crotyl bromide (1.16 mL, 2.5 eq., 11.25 mmol) was afterwards added, and the vial was submitted to microwave irradiation (40°C, 6 min.). The mixture was then dissolved in EtOAc (40 mL) and H₂O (20 mL), extracted three times with EtOAc (3 x 40 mL), the organic layers were washed five times (5 x 20 mL), brine (20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After a purification by flash column chromatography (PE/EtOAc 95:5), compound **317** was obtained as a white solid. (502 mg, 57%)

methyl (2S)-2-[[allyl(phenoxy)phosphoryl]amino]propanoate (318)



Chemical Formula: $C_{13}H_{18}NO_4P$
Molecular Weight: 283,26

Following general procedure 1, compound **307** (1.3 g, 1 eq., 6.56 mmol) was dissolved in DCM (25 mL). A catalytical amount of DMF (0.16 mL) was then introduced, followed by the addition of oxalyl chloride (1.13 mL, 2 eq., 13.1 mmol). After 30 min. at 0°C and 1h30 at room temperature, the volatiles were removed, and the residue diluted with 16 mL of DCM to afford solution A. A second solution was prepared with L-alanine methyl ester chlorhydrate (1.10 g, 1.2 eq., 7.87 mmol), freshly distilled triethylamine (7.09 mL, 8 eq., 52.5 mmol) and DCM. To this mixture the solution A was slowly added at 0°C, and stirred 24 h at room temperature. After the described work-up, the residue was purified twice by flash column chromatography, eluting PE/EA (55:45 to 5:5) to afford the mixture of the two diastereoisomers **318** as a colorless oil. (960 mg, 52%, ratio diastereoisomer 1 : diastereoisomer 2 of 55:45)

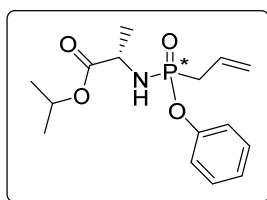
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30 (m, 2H, H^{Ar}), 7.18 (m, 3H, H^{Ar}), 5.87 (m, 1H, $CH=CH_2$), 5.27 (m, 2H, $CH_2=CH$), 4.08 (m, 1H, CH-NH), 3.66 (d, J = 10.6 Hz, 3H, OMe), 3.32 (2 x t, J = 10.1 Hz, 1H, NH), 2.77 (m, 2H, CH_2-P), 1.28 (2 x d, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3-CH).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174.53 (d, J = 6.1 Hz, C=O), 174.20 (d, J = 5.3 Hz, C=O), 150.53 (d, J = 9.5 Hz, C^{quat}), 150.45 (d, J = 9.9 Hz, C^{quat}), 129.65 (C^{Ar}), 129.60 (C^{Ar}), 127.68 (d, J = 11.4 Hz, $CH=CH_2$), 127.52 (d, J = 11.2 Hz, $CH=CH_2$), 124.72 (d, J = 1.2 Hz, C^{Ar}), 124.68 (d, J = 1.1 Hz, C^{Ar}), 120.70 (d, J = 4.8 Hz, C^{Ar}), 120.60 (d, J = 14.4 Hz, $CH_2=CH$), 120.57 (d, J = 4.8 Hz, C^{Ar}), 52.35 (CH_3-O), 49.62 (CH-NH), 49.45 (CH-NH), 34.32 (d, J = 128.3 Hz, CH_2-P), 34.30 (d, J = 128.3 Hz, CH_2-P), 21.60 (d, J = 4.3 Hz, CH_3), 21.46 (d, J = 3.8 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 26.78, 26.34.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{13}H_{19}NO_4P$: 284.1052 found : 284.1045.

isopropyl (2S)-2-[[allyl(phenoxy)phosphoryl]amino]propanoate (319)



Chemical Formula: $C_{15}H_{22}NO_4P$
Molecular Weight: 311,32

Following general procedure 1, compound **307** (1.3 g, 1 eq., 6.56 mmol) was dissolved in DCM (25 mL). A catalytical amount of DMF (0.16 mL) was then introduced, followed by the addition of oxalyl chloride (1.13 mL, 13.1 mmol, 2 eq.). After 30 min. at 0°C and 1h30 at room temperature, the volatiles were

removed, and the residue diluted with 16 mL of DCM to afford solution A. A second solution was prepared with L-alanine isopropyl ester chlorhydrate (1.32 g, 1.2 eq., 7.87 mmol), freshly distilled triethylamine (7.09 mL, 8 eq., 52.5 mmol) and DCM. To this mixture the solution A was slowly added at 0°C, and stirred 24 h at room temperature. After the described work-up, the residue was purified twice by flash column chromatography, eluting PE/EA (65:35) to afford the mixture of the two diastereoisomers **319** as a colorless oil. (1.16 g, 57%, ratio diastereoisomer 1 : diastereoisomer 2 of 6:4)

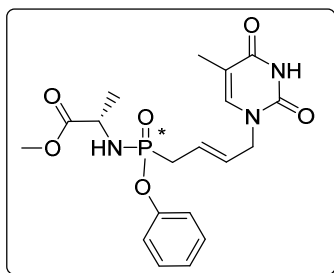
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32 (m, 2H, H^{Ar}), 7.19 (m, 3H, H^{Ar}), 5.92 (m, 1H, CH=CH₂), 5.28 (m, 2H, CH₂=CH), 4.99 (pd, *J* = 6.3, 4.9 Hz, 1H, CH-iPr), 4.04 (m, 1H, CH-NH), 3.38 (2 x t, *J* = 10.1 Hz, 1H, NH), 2.78 (m, 2H, CH₂-P), 1.26 (m, 9H, CH₃-CH-NH, CH₃ iPr).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.24 (d, *J* = 5.7 Hz, C=O), 150.58 (d, *J* = 9.5 Hz, C^{quat}), 150.45 (d, *J* = 9.9 Hz, C^{quat}), 129.65 (C^{Ar}), 129.59 (C^{Ar}), 127.71 (d, *J* = 11.4 Hz, C^{2'}), 127.53 (d, *J* = 11.4 Hz, C^{2'}), 124.69 (C^{Ar}), 124.65 (C^{Ar}), 120.75 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.70 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.68 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.64 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.59 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.55 (C^{3'}/C^{Ar}), 120.50 (C^{3'}/C^{Ar}), 69.09 (CH iPr), 69.07 (CH iPr), 49.77 (CH-NH), 49.62 (CH-NH), 34.30 (d, *J* = 129.3 Hz, CH₂-P), 21.71 (CH₃), 21.70 (CH₃), 21.67 (CH₃), 21.62 (CH₃), 21.60 (CH₃), 21.57 (CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.77, 26.35.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₂₃NO₄P : 312.1365 found : 312.1359.

(*E*)-N¹-(4'-(N-Methylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)thymine (320)



Chemical Formula: C₁₉H₂₄N₃O₆P
Molecular Weight: 421.39

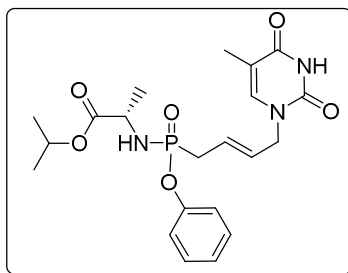
Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μL), phosphonoamidate **318** (50 mg, 1 eq., 0.18 mmol), crotylthymine **310** (64 mg, 2 eq., 0.35 mmol) and second generation Grubbs catalyst (9 mg, 6 mol%, 0.017 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After evaporation of all volatiles and after two flash chromatography purifications (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure *E* compound **320** was isolated as a white solid (30 mg, 41%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (bs, 1H, NH), 7.27 (m, 2H, H^{Ar}), 7.15 (m, 3H, H^{Ar}), 6.97 (bs, 1H, H⁶), 5.73 (m, 2H, CH=CH), 4.28 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂-N), 4.00 (m, 1H, CH-NH), 3.72 – 3.59 (m, 3H), 3.42 (m, 1H, NH), 2.74 (dd, *J* = 20.9, 6.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.88 (m, 3H, CH₃ thym), 1.26 (m, 3H, CH₃-CH).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.01, 25.51.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₅N₃O₆P : 422.1481 found : 422.1480.

(E)-N¹-(4'-(N-isopropylalaninate-phenoxy)-phosphinyl-2'-butenyl)thymine (321)



Chemical Formula: C₂₁H₂₈N₃O₆P
Molecular Weight: 449,44

Following general procedure 2, 2.5% PTS in water (0.5 M, 400 μ L), phosphonoamidate **319** (50 mg, 1 eq., 0.16 mmol), crotylthymine **310** (58 mg, 2 eq., 0.32 mmol) and second generation Grubbs catalyst (8 mg, 6 mol%, 0.0096 mmol) were mixed together. The mixture was then sonicated at 55°C / 80KHz for 20 hours (two additional portions of 6 mol% Grubbs catalyst were respectively added at 2h and 4h). After evaporation of all volatiles and after two flash chromatography (DCM/MeOH 95/5 and toluene/acetone 6/4), pure E compound **321** was isolated as a white solid (32 mg, 44%)

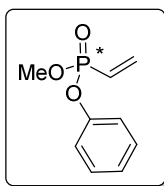
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.38 (bs, 1H, NH), 7.30 (m, 2H, H^{Ar}), 7.16 (m, 3H, H^{Ar}), 7.00 (s, 1H, H⁶), 5.75 (m, 2H, CH=CH), 4.96 (d sept., J = 6.3, 2.1 Hz, 1H, CH-iPr), 4.31 (t, J = 4.7 Hz, 1H, H^{1'}), 3.99 (m, 1H, CH-NH), 3.45 (2 x t, J = 10.8 Hz, 1H, NH), 2.77 (m, 2H, CH₂-P), 1.88 (s, 3H, CH₃-C_{quat}) 1.26 (m, 9H, CH₃-CH-NH, CH₃ iPr).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.17 (C=O), 163.76 (C=O), 150.60 (C=O), 150.54 (C^{quat}), 139.69 (C^{quat}), 139.59 (C⁶), 129.74 (C^{Ar}), 129.67 (C^{Ar}), 129.12 (d, J = 14.0 Hz, C^{2'}), 125.20 (d, J = 11.1 Hz, C^{3'}), 124.85 (C^{Ar}), 120.65 (C^{Ar}), 120.61 (C^{Ar}), 120.44 (C^{Ar}), 120.40 (C^{Ar}), 111.03 (CH-iPr), 69.09 (CH iPr), 69.07 (CH iPr), 49.77 (CH-NH), 49.64 (CH-NH), 49.19 (CH₂-O), 32.70 (d, J = 129.4 Hz, CH₂-P), 21.68 (CH₃), 21.60 (CH₃), 21.58 (CH₃), 21.54 (CH₃), 21.57 (CH₃-C_{quat}).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.02, 25.61.

HRMS (ESI) : m/z [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₂₉N₃O₆P :450.1795, found : 450.1789.

Methoxyphenoxy vinylphosphonate (322)



Chemical Formula: C₉H₁₁O₃P
Molecular Weight: 198,16

To a mixture of dimethylvinylphosphonate (2 g, 1 eq., 14.7 mmol) in DCM (60 mL), oxalyl chloride (3.78 mL, 3 eq., 44.1 mmol) was added. The reaction was stirred 24h at reflux, followed by the removal of the volatiles *in vacuo* to obtain the chloromethyl vinylphosphonate. In another flask, a solution of phenol (2.77 g, 2 eq., 29.4 mmol), triethylamine (3.97 mL, 2 eq., 29.4 mmol) and DCM (60 mL) was stirred at room temperature. The phosphonate residue was then dissolved in DCM (60 mL), and slowly added to this solution, and refluxed for 48h. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel

column chromatography, eluting Petroleum ether/Ethyl acetate 8/2, to afford **322** as a colorless oil. (1.98 g, 68%)

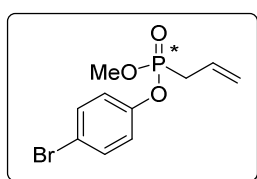
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 (m, 2H, H^{Ar}), 7.21 (m, 3H, H^{Ar}), 6.27 (m, 3H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 3.79 (d, J = 11.4 Hz, 3H, OMe).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.91(d, J = 7.1 Hz, C^{quat}), 141.79 (d, J = 2.0 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 134.86 (C^{Ar}), 130.65 (d, J = 183.8 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 129.98 (C^{Ar}), 125.65 (d, J = 4.2 Hz, C^{Ar}).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 19.95.

HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3\text{P}$: 199.0525 found : 199.0518.

4-bromophenoxymethoxy allylphosphonate (**323**)



Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{BrO}_3\text{P}$
Molecular Weight: 291.08

To a mixture of dimethylallylphosphonate (2 g, 1 eq., 13.3 mmol) in DCM (60 mL), oxalyl chloride (3.42 mL, 3 eq., 39.9 mmol) was added. The reaction was stirred 24h at reflux, followed by the removal of the volatiles *in vacuo* to obtain the chloromethyl allylphosphonate. In another flask, a solution of 4-bromophenol (4.6 g, 2 eq., 26.6 mmol), triethylamine (3.6 mL, 2 eq., 26.6 mmol) and DCM (60 mL) was stirred at room temperature. The phosphonate residue was then dissolved in DCM (60 mL), slowly added to this solution, and refluxed for 48h. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel column chromatography, eluting Petroleum ether/Ethyl acetate 7:3, to afford **323** as a colorless oil. (2.70 g, 69%)

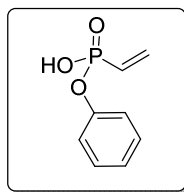
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.10 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 5.81 (ddt, J = 17.0, 10.0, 7.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.26 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 3.80 (d, J = 11.2 Hz, 3H, OMe), 2.77 (dd, J = 22.0, 7.3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-P}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 149.61(d, J = 8.8 Hz, C^{quat}), 132.74 (C^{Ar}), 126.33(d, J = 11.9 Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 122.27(d, J = 4.5 Hz, C^{Ar}), 120.97 (d, J = 15.2 Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 120.42 (d, J = 4.4 Hz, C^{quat}), 53.36 (d, J = 7.0 Hz, OMe), 31.21(d, J = 139.9 Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 25.41.

HRMS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{BrO}_3\text{P}$: 290.9786 found : 290.9777.

Phenyloxy vinylphosphinic acid (**324**)



Chemical Formula: $C_8H_9O_3P$
Molecular Weight: 184,13

Bromotrimethylsilane (1.24 mL, 3 eq., 9.39 mmol) was slowly added to a solution of **322** (620 mg, 3.13 mmol, 1 eq.) in DCM (25 mL). After 24h at room temperature and evaporation of all volatiles, the crude product was co-evaporated 5 times with methanol (5 x 10 mL). The residue was then purified by flash column chromatography (DCM / MeOH 95:5) to obtain the desired product **324** as an amorphous white solid. (524 mg, 91%)

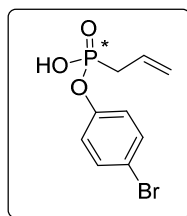
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.05 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.15 (m, 2H, $CH_2=CH$), 5.90 (dd, J = 48.4, 11.2 Hz, 1H, $CH_2=CH$).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 152.20 (d, J = 6.7 Hz, C^{quat}), 130.60 ($CH_2=CH$), 130.57 (d, J = 182.6 Hz, $CH=CH_2$), 128.88 (C^{Ar}), 123.19 (C^{Ar}), 120.51 (d, J = 4.2 Hz, C^{Ar}).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 28.17.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_8H_{10}O_3P$: 185.0368 found : 185.0363.

4-bromophenyloxy allylphosphinic acid (**325**)



Chemical Formula: $C_9H_9BrO_3P$
Molecular Weight: 277,05

Bromotrimethylsilane (2.99 mL, 22.7 mmol, 3 eq.) was slowly added to a solution of **323** (2.2 g, 7.6 mmol, 1 eq.) in DCM (60 mL). After 24h at room temperature and evaporation of all volatiles, the crude product was co-evaporated 5 times with methanol (5 x 30 mL). The residue was then purified by flash column chromatography (DCM / MeOH 95:5) to obtain the desired product **325** as an amorphous white solid. (1.92 g, 92%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.49 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.14 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 5.89 (ddt, J = 17.3, 10.1, 7.2 Hz, 1H, $CH=CH_2$), 5.26 (m, 2H, $CH_2=CH$), 2.77 (dd, J = 21.9, 7.3 Hz, 2H, CH_2-P).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.41 (d, J = 7.9 Hz, C^{quat}), 132.20 (C^{Ar}), 128.07 (d, J = 11.0 Hz, $CH=CH_2$), 122.39 (d, J = 4.4 Hz, C^{Ar}), 118.75 (d, J = 14.7 Hz, $CH_2=CH$), 116.71 ($C^{quat}-Br$), 31.94 (d, J = 138.9 Hz, CH_2-P).

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 21.63.

HRMS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_9H_{11}BrO_3P$:276.9629 found : 276.9621.

Autres travaux réalisés au cours de la thèse

**NOUVEAUX DERIVES BENZIMIDAZOLES DANS
L'INFECTION AU VIRUS EBOLA**

I. Généralités sur le virus Ebola

1 Présentation, cycle infectieux et aspects thérapeutiques

➤ Les filovirus

Le virus Ebola (EBOV) fait parti de la famille des filovirus, qui contient trois classes d'agents infectieux distincts : les virus Marburg, Cueva et Ebola. Ces virions existent sous la forme d'ARN simple brin, filamenteux et se manifestent sous la forme d'une fièvre hémorragique chez l'humain et autres primates, ou d'autres animaux comme le porc. Après une période d'incubation de 4 à 9 jours en moyenne, les symptômes se traduisent dans un premier temps par des maux de têtes, douleurs musculaires et de la fièvre. Dans les dix jours qui suivent, la maladie s'étend principalement au foie et aux reins (nausées, diarrhées), au système vasculaire (saignement internes et externes) et au système nerveux (état de choc, œdème cérébral, coma). En fonction des épidémies, le taux létal de cette maladie est compris entre 25 et 90% de mortalité, avec une valeur moyenne d'approximativement 50%.¹⁴⁹ Cette maladie peut être transmise par contact direct avec les fluides biologiques (salive, sang, fécès...) entre humains ou avec les animaux.

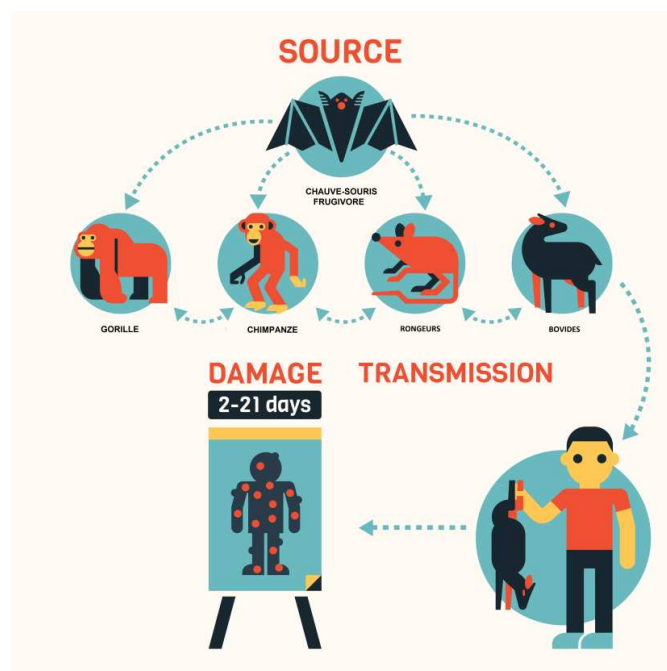


Schéma 106. Mode de transmission des filovirus¹⁵⁰

Le réservoir naturel des filovirus semble être les chauves-souris frugivores, qui sont porteuses-saines de cette maladie.¹⁵¹ La transmission se fait de façon indirecte avec les primates, les rongeurs ou les bovidés, ou directe dans le cas de l'ingestion d'un animal contaminé (Schéma 106).

¹⁴⁹ Singh, S. K. & Ruzek, D. *Viral hemorrhagic fevers*. (CRC Press, 2014).

¹⁵⁰ <https://www.alldaychemist.com/blog/ebola-disease-rare-deadly-disease-caused-one-ebola-virus-strains/>

¹⁵¹ Laupland, K. B. & Valiquette, L. Ebola virus disease. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. = J. Can. des Mal. Infect. la Microbiol. médicale*. **25**, 128–9 (2014).

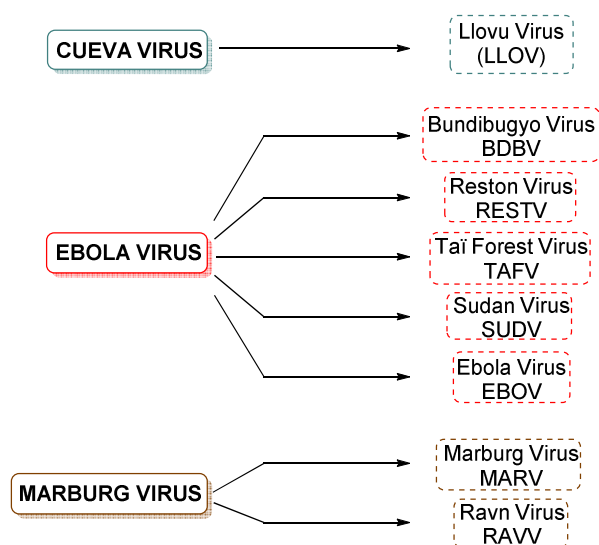


Schéma 107. Famille des Filovirus

La famille des filovirus compte trois espèces distinctes, divisées elles-mêmes en 8 sous espèces (Schéma 107). La forme la plus virulente parmi les familles des virus Ebola est l'espèce EBOV (Ebola Virus). Elle est aussi la plus mortelle et la plus représentée puisqu'elle a provoqué plus d'épidémies que toutes les autres espèces. Entre sa découverte en 1976 et 2013, elle est à l'origine de 24 épisodes contagieux totalisant 1716 personnes infectées. L'épidémie majeure fut quant à elle responsable de plus de 11.000 morts entre 2013 et 2016 en Afrique de l'ouest avec un taux de létalité de 40%.¹⁵²

➤ Cycle de réplication

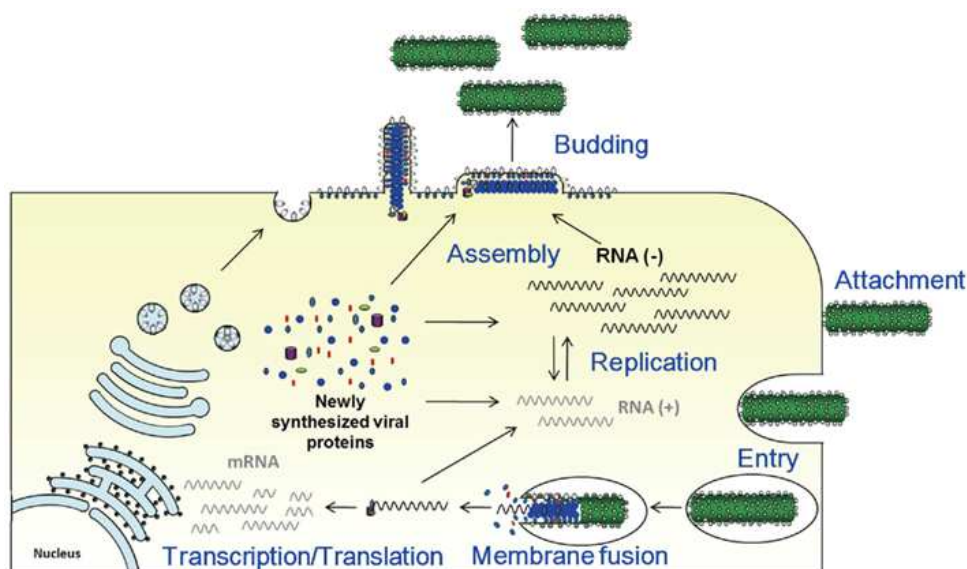


Schéma 108. Mécanisme infectieux d'un filovirus.¹⁵³

¹⁵² <http://apps.who.int/gho/data/view.ebola-sitrep.ebola-summary-latest?lang=en>

¹⁵³ Takada, A. Filovirus Tropism: Cellular Molecules for Viral Entry. *Front. Microbiol.* **3**, 34 (2012).

Afin d'entrer dans la cellule, le virus attache ses récepteurs à la cellule visée et subit une internalisation après une endocytose/macropinocytose.¹⁵⁴ Ils vont par la suite interagir avec des endo/lysosomes, puis être libéré dans le cytoplasme. Après une étape de transcription en ARNm, ces organites rejoignent les ribosomes où ils seront traduits et répliqués. Une fois que les nouveaux virions sont produits, ils sont encapsulés et rejoignent ensuite le site de bourgeonnement, d'où les nouveaux virus seront relâchés (Schéma 108).

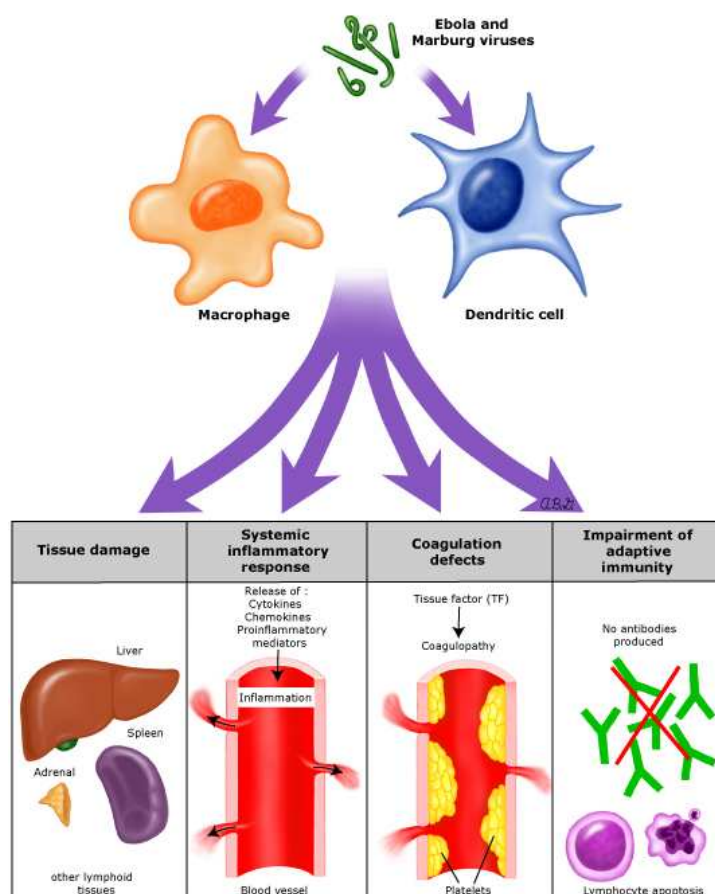


Schéma 109. Pathogénèse des filovirus¹⁵⁵

Les principales cibles d'EBOV sont surtout les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et endothéliales.¹⁵⁶ Les macrophages sont les premières cellules visées, et leurs infections résultent à une post-apoptose de ces entités. A partir de là, les virions intègrent la circulation sanguine et parviennent rapidement au système lymphatique. Par la suite, les lymphocytes sont aussi touchés par cette apoptose, ce qui va mener à une faible concentration de ces derniers, provoquant l'immunodépression du patient infecté. Quant aux cellules endothéliales, elles sont aussi atteintes sous trois jours, et leur infection provoque par la suite une défaillance du mécanisme de coagulation. Alliée à la réponse inflammatoire provoquée par la réplication des virus, les hémorragies résultantes provoquent une baisse de volume sanguin général et peut mener au collapsus cardio-vasculaire, ce qui est la raison majeure des décès dus à cette maladie (Schéma 109).

¹⁵⁴ Miller, E. H. & Chandran, K. Filovirus entry into cells – new insights. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 206–214 (2012).

¹⁵⁵ <http://ebolaresearchinstitute.com>

¹⁵⁶ Funk, D. J. & Kumar, A. Ebola virus disease: an update for anesthesiologists and intensivists. *Can. J. Anesth. Can. d'anesthésie.* **62**, 80–91 (2015).

➤ Cibles thérapeutiques

Dans le but de neutraliser cette infection, plusieurs cibles thérapeutiques sont envisageables, et deux processus cellulaires sont visés :

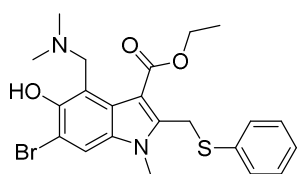
- **L'internalisation du virus dans la cellule.** C'est en effet un moyen efficace de bloquer le développement des virions en les empêchant d'entrer dans la cellule, ou de mettre en place leurs stratégies de réplication. Une fois dans la cellule, les vésicules contenant les filovirus rejoignent les endosomes, dans lesquels ils sont activés par des protéases de type cathepsine.¹⁵⁷ EBOV est ensuite internalisé dans d'autres endosomes *via* la protéine Niemann Pick C1, qui appartient à la membrane plasmique et qui a pour rôle principal, le transport de cholestérol et de sphingolipides.¹⁵⁸ L'inhibition de ces protéines aurait pour conséquence d'interdire l'accès au matériel génétique cellulaire nécessaire à leur développement, et ainsi à stopper l'infection.

- **La réplication.** Empêcher la réplication de ces virions revient à stopper la propagation de la maladie. Plusieurs équipes se sont penchées sur ce phénomène et ont développé un large éventail de molécules dans le but d'inhiber cette réplication comme des sérums,¹⁵⁹ des macromolécules,¹⁶⁰ des nucléosides¹⁶¹ ou des hétérocycles fonctionnalisés.¹⁶²

➤ Quelques inhibiteurs et leurs actions

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement antiviral capable de neutraliser efficacement le virus. Durant l'infection, les traitements n'impliquent généralement pas d'antiviraux, mais plutôt l'administration d'antipyrétiques, d'antibiotiques et d'électrolytes dans le but de contrer les symptômes provoqués par cette infection. Malgré un large développement de la recherche en faveur d'une thérapie préventive, aucun vaccin n'a été accepté par la FDA à ce jour. Cette infection dispose cependant de quelques inhibiteurs efficaces ciblant l'entrée ou la réplication du virus en phases cliniques plus ou moins avancées. Il est présenté ci-dessous quelques petites molécules ciblant efficacement ces processus biologiques.

➤ Umifenovir



328

Figure 62. Umifenovir

Constitué d'un indole polysubstitué, l'Umifenovir est commercialisé en Chine et en Russie dans le cadre du traitement de la grippe. Son mécanisme d'action consiste à empêcher la fusion entre la capsid virale et la membrane cellulaire, ce qui empêche son internalisation.¹⁶³ Dans une publication de 2016, Pécheur et

¹⁵⁷ Chandran, K., Sullivan, N. J., Felbor, U., Whelan, S. P. & Cunningham, J. M. Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. *Science*. **80**, 308, (2005).

¹⁵⁸ (a) Côté, M. *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann–Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*. **477**, 344–348 (2011). (b) Carette, J. E. *et al.* Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature*. **477**, 340–343 (2011).

¹⁵⁹ Gupta, M., Mahanty, S., Bray, M., Ahmed, R. & Rollin, P. E. Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola virus infection without complete inhibition of viral replication. *J. Virol.* **75**, 4649–54 (2001).

¹⁶⁰ Enterlein, S. *et al.* VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 984–93 (2006).

¹⁶¹ Reynard, O. *et al.* Identification of a New Ribonucleoside Inhibitor of Ebola Virus Replication. *Viruses*. **7**, 6233–6240 (2015).

¹⁶² Kota, K. P. *et al.* High Content Image Based Analysis Identifies Cell Cycle Inhibitors as Regulators of Ebola Virus Infection. *Viruses*. **4**, 1865–1877 (2012).

¹⁶³ Leneva, I. A., Russell, R. J., Boriskin, Y. S. & Hay, A. J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* **81**, 132–140 (2009).

coll. ont notamment montré l'efficacité de ce noyau sur EBOV, empêchant son entrée dans la cellule.¹⁶⁴ (Figure 62).

➤ Benzodiazépines

Après un screening de 52.500 composés de structures différentes, la benzodiazépine **329** a été identifiée comme outil thérapeutique intéressant. Basé sur un modèle de HIV comportant les glycoprotéines (GP) de surface d'EBOV, l'équipe de Basu a pris en compte plusieurs critères comme l'absence de cytotoxicité à 25 μ M, ainsi que la spécificité de reconnaissance des GP d'EBOV. Une fois ce candidat sélectionné, la modulation de ce noyau par l'introduction d'atomes chlore en position 7 et 8, composé **330**, permet d'améliorer l'IC₅₀, passant de 10 μ M à 3.7 μ M avec un SI de 14.8. Ces composés constituent un point de départ percutant pour des optimisations ultérieures (Figure 63).

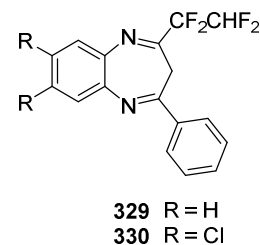


Figure 63. Benzodiazépine

➤ Favipiravir

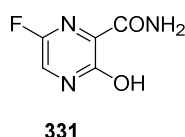


Figure 64. Favipiravir

Active contre un large spectre de virus à ARN comme la grippe ou la fièvre jaune,¹⁶⁵ le Favipiravir s'est aussi avéré efficace contre EBOV.¹⁶⁶ Il agit en tant qu'inhibiteur sélectif de la polymérase virale de ces virions. Lors d'une étude *in vivo* sur des souris infectées par EBOV, le traitement par ce composé a montré des résultats remarquables, par une survie de 100% des animaux jusqu'à J+6 post-infection.¹⁶⁷ Cette activité antivirale a provoqué le développement de ce composé en phase clinique début 2014 (Figure 64).

➤ BCX-4430

Plus connu sous le nom d'Immuciline A, le BCX4430 était initialement développé dans le traitement de l'hépatite C, mais il est maintenant développé dans le cadre d'infections aux filovirus (Figure 65). Constitué d'une 9-déazapurine insérée sur un iminosucre, ce C-nucléoside agit de la même façon que le Favipiravir **331**, en tant qu'inhibiteur spécifique de la polymérase virale. Doté d'un IC₅₀ de 11.8 μ M sans cytotoxicité, il est actuellement en phase clinique I et représente l'une des molécules les plus prometteuses dans la lutte contre les filovirus.¹⁶⁸

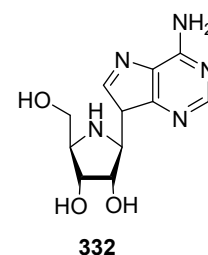


Figure 65. BCX-4430

¹⁶⁴ Pécheur, E.-I. *et al.* The Synthetic Antiviral Drug Arbidol Inhibits Globally Prevalent Pathogenic Viruses. *J. Virol.* **90**, 3086–92 (2016).

¹⁶⁵ Furuta, Y. *et al.* T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* **82**, 95–102 (2009).

¹⁶⁶ Smither, S. J. *et al.* Post-exposure efficacy of Oral T-705 (Favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model. *Antiviral Research.* **104**, (2014).

¹⁶⁷ Oestereich, L. *et al.* Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Research.* **105**, (2014).

¹⁶⁸ (a) Warren, T. K. *et al.* Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature.* **508**, 402–5 (2014). (b) Wong, G. *et al.* Post-exposure therapy of filovirus infections. *Trends Microbiol.* **22**, 456–63 (2014). (c) Izawa, K., Aceña, L., Wang, J. & Soloshonok, V. A. Small-Molecule Therapeutics for Ebola Virus (EBOV) Disease Treatment. 8–16 (2016)

➤ Brincidofovir

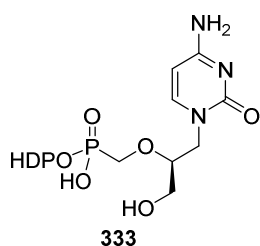


Figure 66. Brincidofovir

Le Brincidofovir **333** est la forme prodrogue, avec le groupement biolabile HDP de l'ANP Cidofovir (Figure 66). Il a pour cibles thérapeutiques principales les virus à ADN, mais présente toutefois un fort potentiel thérapeutique contre EBOV. Les hypothèses émises par le groupe de Florescu sur cette activité reposent sur une potentielle inhibition de la polymérase virale par le brincidofovir, ou par l'apoptose de la cellule lors de la phase de prolifération virale.¹⁶⁹

➤ FGI-103

Le FGI-103 a été découvert lors d'un screening de molécules par l'équipe de Warren. Présentant une EC₅₀ de 100 nM pour une cytotoxicité inexistante à 50 µM, ce composé très efficace stoppe la réplication virale par l'administration d'une seule dose de 10 mg de produit dans le modèle du petit animal. Ces activités sont marquées par la réduction de charge virale dans le foie, dans les reins et dans la rate. Cependant, le mécanisme d'action de cette molécule reste à ce jour inconnu (Figure 67).¹⁷⁰

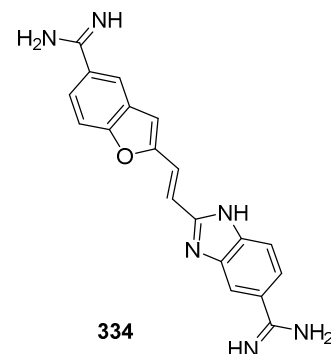


Figure 67. FGI-103

➤ 3-déazaneplanocine A

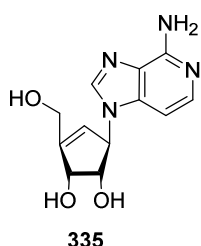


Figure 68.

3-déazaneplanocine A

Comme son analogue BCX-4430 **332**, la 3-déazaneplanocine A **335** possède une déazapurine insérée sur un sucre modifié (Figure 68). Bon inhibiteur de la SAH hydrolase, cette néplanocine empêche la méthylation de l'ARN viral. L'accumulation de l'ARN viral va donc par la suite induire une production massive d'interférons, protéines chargées de défendre l'organisme contre des agents pathogènes par l'inhibition de la réplication virale. A une concentration de 2 µM, l'administration de ce nucléoside jusqu'à deux jours après l'infection peut conduire au rétablissement des souris présentant EBOV.¹⁷¹

➤ Triazavirin

La triazavirine est une drogue antivirale présentant un noyau triazotriazine, développée dans un premier temps contre les virus grippaux, comme le Favipiravir **331** ou l'Umifenovir **328** (Figure 69). Si son mécanisme d'action n'est pas encore connu dans le cadre d'une infection à EBOV, son application potentielle est sur le point d'être évaluée contre cette maladie.

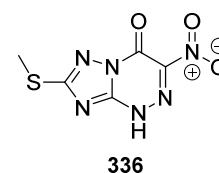


Figure 69. Triazavirin

¹⁶⁹ Florescu, D. F. *et al.* Administration of Brincidofovir and Convalescent Plasma in a Patient With Ebola Virus Disease. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 969–73 (2015).

¹⁷⁰ Warren, T. K. *et al.* Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of filovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2152–9 (2010).

¹⁷¹ Bray, M., Raymond, J. L., Geisbert, T. & Baker, R. O. 3-deazaneplanocin A induces massively increased interferon-alpha production in Ebola virus-infected mice. *Antiviral Res.* **55**, 151–9 (2002).

2 La protéine Niemann Pick C1 (NPC1)

➤ Entrée du virus dans la cellule

La longueur d'un filovirus est d'environ d'1 μM , ce qui provoque son internalisation majoritaire par macropinocytose. Afin de prouver ce chemin réactionnel, Aleksandrowicz *et coll.* ont administré une toxine inhibant cette macropinocytose, et ont par la suite constaté un déclin de cellules infectées. En marge de ce phénomène, une internalisation par endocytose est aussi remarquée pour de plus petits fragments de particules.¹⁷² Ce type de pénétration cellulaire reste toutefois très marginal comparativement à l'internalisation de vésicules par macropinocytose. Par la suite, ces vésicules seront menées jusqu'aux endosomes, dans lesquels les GP d'EBOV seront partiellement clivées par des cystéines protéases, des cathepsines. Il a été montré que les cathepsins B et L étaient en partie responsables du clivage de ces GP.¹⁷³ Néanmoins, Marzi *et coll.* ont démontré que ce clivage pouvait aussi être dû à plusieurs protéines.¹⁷⁴ Si les cathepsines restent une cible thérapeutique intéressante, la production d'inhibiteurs de protéases très spécifiques risque donc de ne pas provoquer l'effet bénéfique escompté. Après le clivage de ces protéines, le domaine amino-terminal du filovirus sert par la suite de site de reconnaissance par la protéine NPC1. Cette reconnaissance permet par la suite la libération du filovirus dans le cytoplasme (Schéma 110).

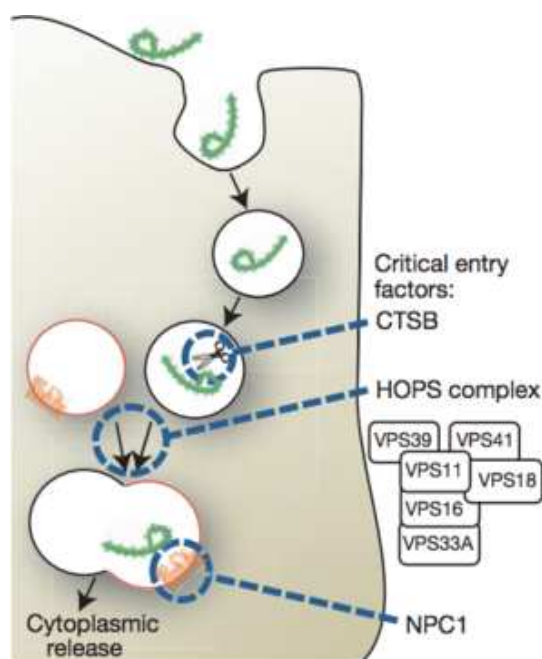


Schéma 110. Entrée du virus Ebola

➤ Généralités sur la protéine Niemann Pick C1

NPC1 est une protéine transmembranaire endosomale qui a pour rôle principal de réguler le transport de cholestérol et de phospholipides chez les mammifères. Elle a aussi un rôle prépondérant dans l'infection

¹⁷² Aleksandrowicz, P. *et al.* Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J. Infect. Dis.* S957–67 (2011)

¹⁷³ Schornberg, K. *et al.* Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* **80**, 4174–8 (2006).

¹⁷⁴ Marzi, A., Reinheckel, T. & Feldmann, H. Cathepsin B & L Are Not Required for Ebola Virus Replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1923 (2012).

aux filovirus. Il a été mis en évidence par l'équipe de Carette que la fusion entre l'endosome et la vésicule contenant le virus, est régulée par cette protéine membranaire. Son rôle précis reste cependant incertain, pouvant en effet agir directement en tant que récepteur de filovirus ou n'être qu'un intermédiaire. Une des solutions dans la neutralisation d'EBOV passe donc par l'inhibition de cette protéine.

➤ Quelques inhibiteurs

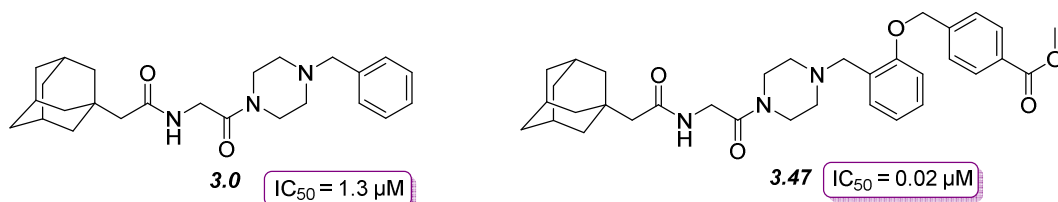


Figure 70. Composés 3.0 et 3.47

Après un screening virtuel d'une large bibliothèque de composés structurellement différents, Côté *et coll.* ont identifié un nouveau type d'inhibiteurs de NPC1, constitué d'un squelette adamantane comportant un amide et d'une pipérazine. La molécule **3.0** inhibe à 99% la concentration d'EBOV sur la lignée cellulaire Vero à une concentration de 10 μM sans présenter de toxicité. Elle présente également une spécificité d'EBOV puisqu'elle n'inhibe pas les autres virus. Pour optimiser ces résultats encourageants, une cinquantaine d'analogues furent synthétisés par la suite, aboutissant notamment au composé **3.47**. L' IC_{50} de ce composé est de 0.02 μM , ce qui en fait l'un des composés les plus efficace dans l'inhibition de NPC1 (Figure 70). Une des limites de ce composé réside cependant dans sa médiocre pharmacocinétique, puisque son temps de demi-vie est d'une heure. Il représente toutefois un des composés les plus prometteurs dans la lutte contre EBOV.

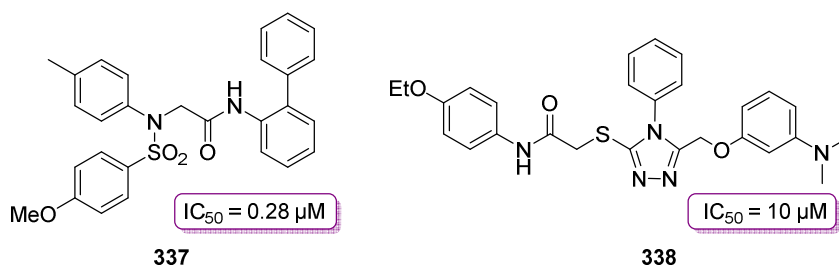


Figure 71. Inhibiteurs **337** et **338**

Afin de découvrir de nouveaux composés actifs, la même stratégie de screening virtuel de molécules a aussi été appliquée par Basu *et coll.* sur plus de 100.000 molécules.¹⁷⁵ Les composés **337** et **338** identifiés comme étant les plus prometteurs sont alors synthétisés et évalués (Figure 71). Aucune toxicité n'est observée à 50 μM sur les lignées cellulaires Vero et des IC_{50} de 0,28 μM (**337**) et 10 μM pour le composé **338**. Dans un second temps, il a été mesuré l'influence de ces molécules sur l'activité de la cathepsine B, afin de s'assurer d'une action spécifique sur NPC1. L'absence d'effet sur la protéase confirme par la suite cette théorie. Ces composés forment un bon point de départ pour le développement de modulations thérapeutiques ultérieures.

¹⁷⁵ Basu, A. *et al.* Novel Small Molecule Entry Inhibitors of Ebola Virus. *J. Infect. Dis.* **212**, S425–S434 (2015).

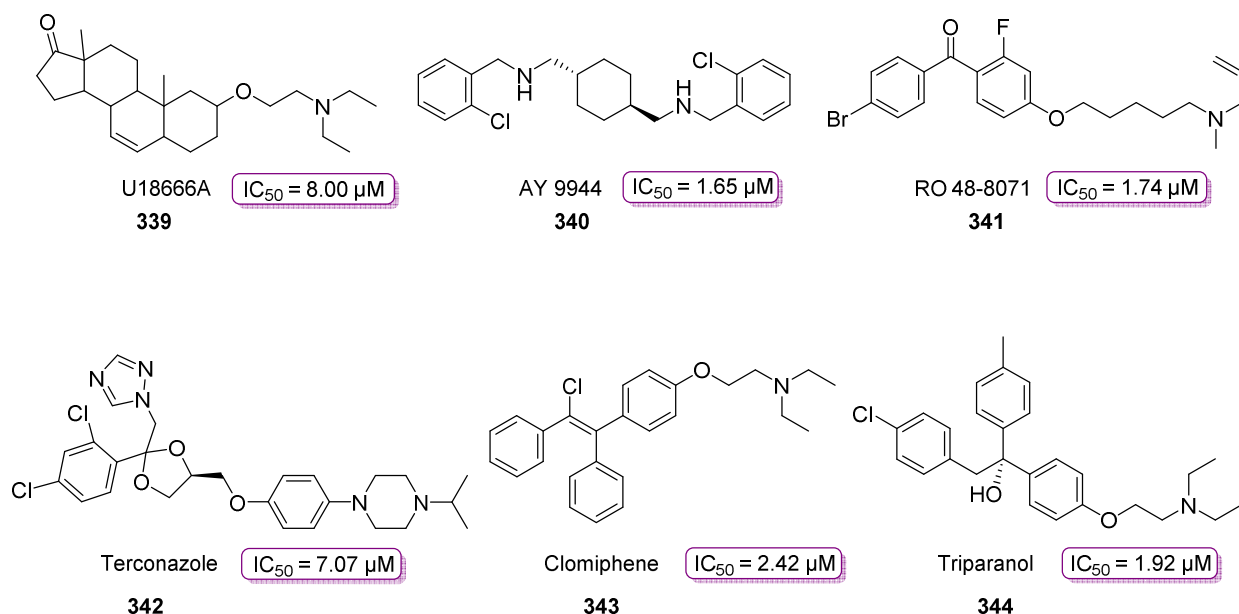


Figure 72. Cationic amphiphilic drugs (CAD)

L'équipe de White s'est penché sur 6 CADs possédant des activités intéressantes contre EBOV (Figure 72). Toutes les molécules induisent une accumulation de cholestérol dans les endosomes, ce qui prouve qu'ils inhibent EBOV *via* NPC1. Cependant, si **3.47** semblait bloquer le lien entre la glycoprotéine d'EBOV à NPC1, ce n'est pas l'effet de ces molécules. Ces résultats montrent qu'il y a un deuxième moyen d'empêcher l'internalisation de EBOV dans les endosomes par NPC1, ce qui a pour effet d'augmenter encore l'intérêt thérapeutique porté à cette protéine.

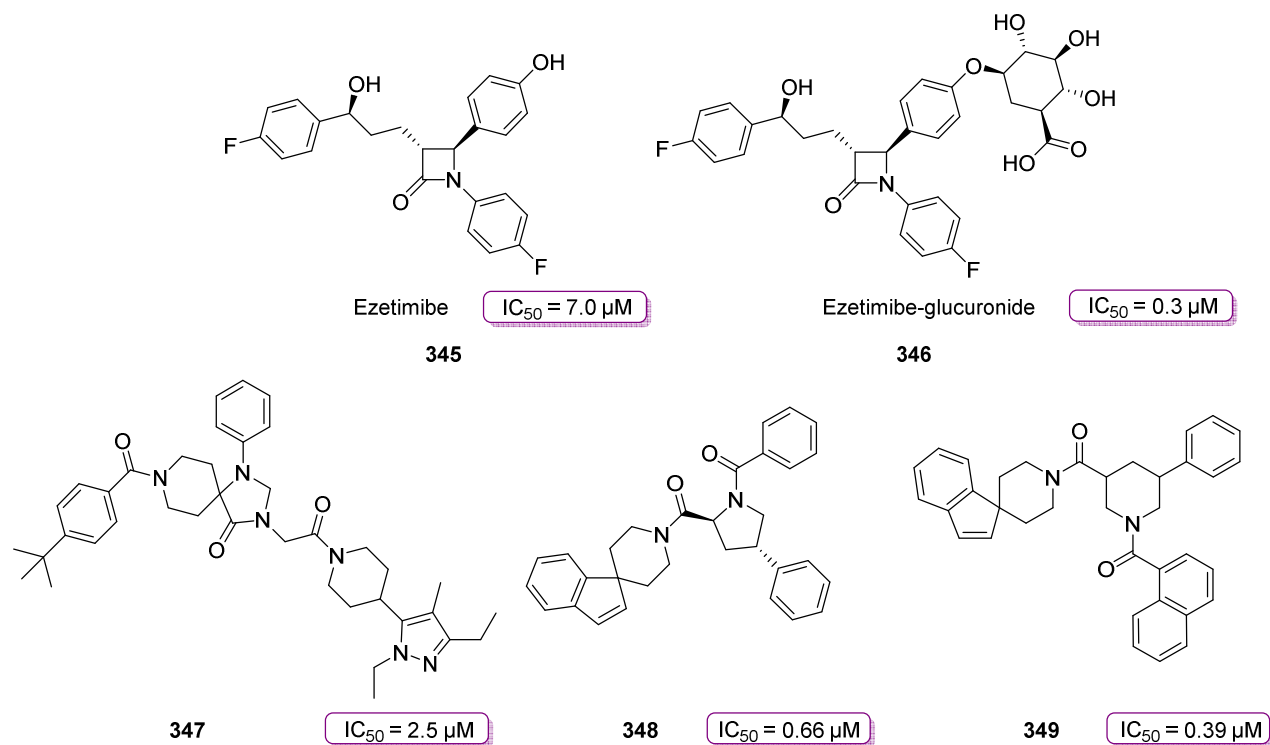


Figure 73. Inhibiteurs de NPC1L1

Homologue de la protéine NPC1, la protéine Niemann Pick C1 Like 1 (NPC1L1) est une cible thérapeutique pour traiter les cas d'hypercholestérolémie par son inhibition sélective. Ce mécanisme d'inhibition est similaire à celui employé pour inhiber NPC1 dans le cadre d'une infection à EBOV. Il pourrait donc être intéressant de tester le potentiel thérapeutique sur des infections par les filovirus.

Une des seules molécules approuvées par la FDA impliquant l'inhibition de la protéine NPC1L1 est l'Ezétimibe **345** qui a pour effet d'abaisser la concentration de cholestérol. Sa forme métabolique active est le glucuronide **346** qui permet d'abaisser son IC_{50} à $0.3 \mu M$.¹⁷⁶ Des composés spiro **347-349**, ont aussi présentés des activités intéressantes sur NPC1L1, allant jusqu'à une IC_{50} de $0.39 \mu M$ et montrant une baisse du cholestérol plasmatique significative lors de tests *in vivo* chez la souris (Figure 73).¹⁷⁷

II. Positionnement du sujet et travaux antérieurs de l'équipe

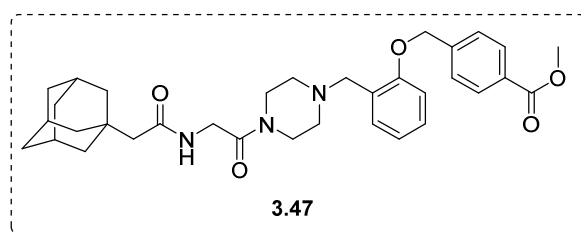


Figure 74. Molécule "lead"

Une des cibles thérapeutiques les plus attractives nous a donc semblé être l'entrée du virus dans la cellule, et plus spécifiquement l'inhibition de la protéine de Niemann-Pick C1. Parmi les différentes molécules présentées précédemment, la molécule la plus active est le composé **3.47**, qui présente une IC_{50} de $0.02 \mu M$ (Figure 74) sur le virus Ebola, mais avec un temps de demi-vie d'une heure, ce composé reste un précurseur à exploiter sur de nombreuses positions.¹⁷⁸

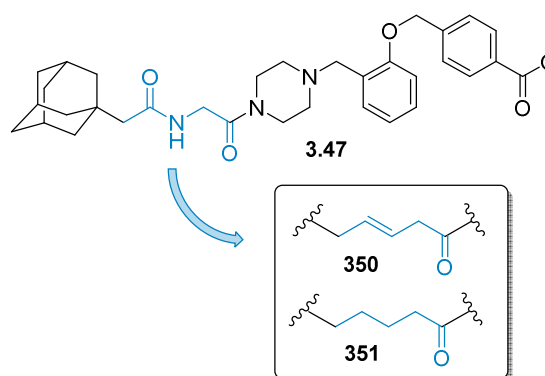


Figure 75. Modification de l'espaceur amido

¹⁷⁶ Toth, P., Phan, B. A. & Dayspring, T. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc. Health Risk Manag.* **8**, 415 (2012).

¹⁷⁷ (a) McMasters, D. R. *et al.* Spiroimidazolidinone NPC1L1 inhibitors. 1: Discovery by 3D-similarity-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **19**, 2965-2968 (2009). (b) Howell, K. L. *et al.* Spiroimidazolidinone NPC1L1 inhibitors. Part 2: Structure-activity studies and in vivo efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **20**, 6929-6932 (2010).

¹⁷⁸ Thèse d'Elzbieta Niemiec-Plebanek

De par l'hydrolyse possible du groupement amido par les peptidases pouvant expliquer le faible temps de demi-vie, il a été décidé de remplacer cette charpente par une chaîne saturée/insaturée plus robuste. Afin de parvenir à ce noyau, la réaction clef est une métathèse croisée entre l'acide 3-penténoïque et l'allyladamantane. Un couplage peptidique avec la pipérazine fonctionnalisée préparée par une amination réductrice permet l'obtention des composés **350** et **351**. Les activités induites par ces molécules montrent un léger effet antiviral lors du remplacement de ce motif par une chaîne saturée (85% d'inhibition à 10 μ M), activité qui est entièrement perdue lors de l'introduction de l'insaturation. Il est donc possible que les liaisons hydrogènes soient essentielles pour une activité anti EBOV. Il est à noter qu'une longueur de 5 chaînons entre la pipérazine et l'adamantane semble être acceptée. (Figure 75)

Le groupement adamantane et la chaîne amido sont alors changés par un groupement benzimidazole substitué, qui permettrait de conserver : la géométrie planaire de la fonction amide; l'effet hydrophobe de l'adamantane et aussi respecter la longueur de l'espaceur entre la pipérazine et le tricyclique carboné.¹⁷⁹ Cette approche fut confirmée par une étude en modélisation moléculaire, en superposant dans l'espace des modèles présentant le noyau hétérocyclique et le composé **3.47**. Une série de composés comportant cet hétérocycle azoté furent synthétisés par la suite.

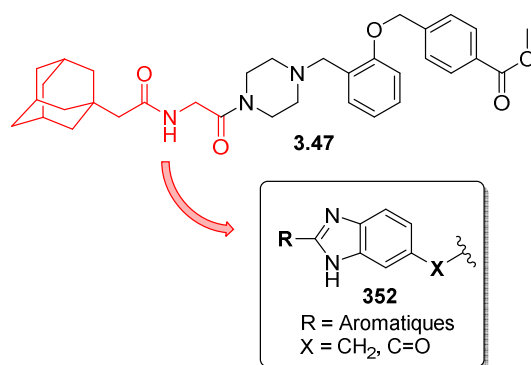


Figure 76. Introduction du noyau benzimidazole

Les résultats biologiques induits par le noyau benzimidazole sont particulièrement intéressants de par leur inhibition spécifique d'EBOV. La présence d'un groupement phényl-*m*-trifluorométhyle comme groupement R montre une excellente inhibition d'EBOV à 10 μ M de 92% (Figure 76). Il est à noter que la présence d'un carbonyle entre la benzimidazole et la pipérazine ne donne pas d'inhibition à 10 μ M. L'élaboration des molécules suivantes a donc été réalisée avec un lien CH₂.

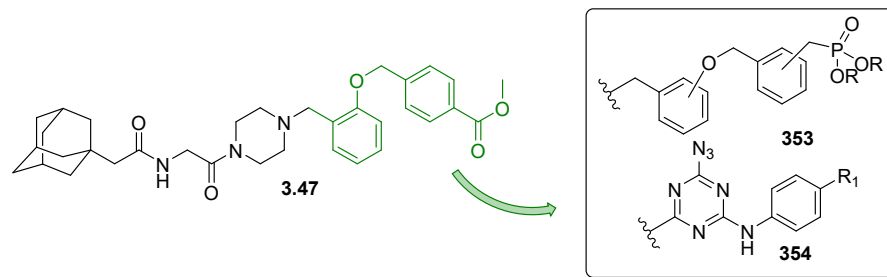


Figure 77. Modulation des hétérocycles aromatiques

¹⁷⁹ (a) Bansal, Y. & Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 6208–6236 (2012). (b) Shah, K., Chhabra, S., Shrivastava, S. K. & Mishra, P. Benzimidazole: a promising pharmacophore. *Med. Chem. Res.* **22**, 5077–5104 (2013). (c) Sivakumar, R. *et al.* Benzimidazole: An Attractive Pharmacophore in Medicinal Chemistry. *Int. J. Pharm. Res.* **3**, 19–31 (2011).

L'ester de méthyle situé à l'extrémité de la molécule est remplacé par un phosphonate, ainsi que leurs positions sur ces hétérocycles (Figure 77). Une autre modification fait intervenir la triazine comme hétérocycle central. De manière similaire, les stratégies de synthèses reposent essentiellement sur des couplages peptidiques entre la pipérazine et les différents synthons correspondants. De cette gamme de produits synthétisés, plusieurs phosphonates en *méta* ou en *para* présentent une excellente inhibition donne une échelle d'inhibition à 10 μ M.

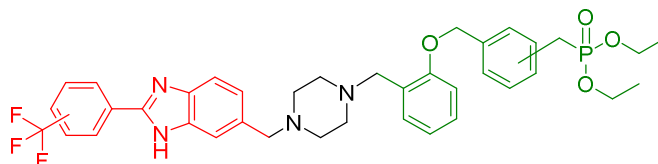


Figure 78. Combinaison de benzimidazoles fluorés avec un phosphonate

L'introduction de benzimidazoles fluorés et de phosphonates sur les composés dérivés de 3.47 ont démontrés de très bons pourcentages d'inhibition (Figure 78). Quatres composés présentant ces deux motifs, respectivement en *méta* et en *para*, ont été synthétisés et évaluer pour leur effet anti-Ebov à 10 μ M.

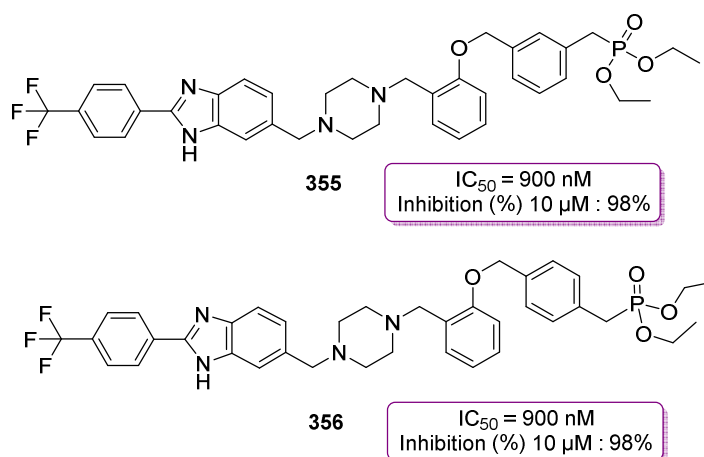


Figure 79. Composés possédant les meilleures évaluations biologiques

Parmi ces quatre composés, deux ont montrés des propriétés antivirales très intéressantes, puisqu'ils présentent tous deux une inhibition de 98% des virions à une concentration de 10 μ M et une IC_{50} de 900 nM (Figure 79). Par la suite, des études *in silico* d'ADME-Tox en collaboration avec le Pr Bojarsky (Absorption Distribution Métabolisation Excrétion Toxicité) ont été réalisées, montrant le meilleur profil pharmacologique pour le composé **356**.

III. Objectifs synthétiques et plan de travail

1 Structure générale

Les précédents travaux du laboratoire que nous venons de rappeler, ont permis de concevoir de nouveaux dérivés tête de série. La présence d'un groupement phosphonate et d'un benzimidazole induisent une forte

activité contre le développement d'EBOV. De plus, leur activité est spécifique envers ce virus, ce qui conforte l'hypothèse de l'inhibition effective de la protéine Niemann Pick C1. Ce grand potentiel laisse cependant de la place à une modulation de la partie centrale de la molécule.

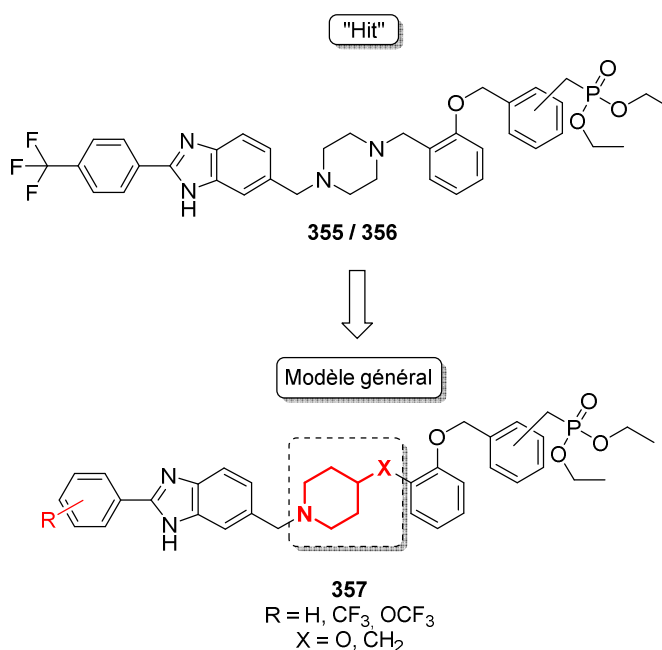


Figure 80. Innovation structurelle

En effet, si la partie benzimidazole et les deux cycles benzéniques situés entre le phosphonate et la pipérazine ont fait l'objet de SAR, ce n'est en revanche pas le cas de la pipérazine et de son lien au fragment contenant le groupement phosphonate (Figure 80). La pipérazine présente initialement peut être remplacée par un noyau pipéridine, pharmacophore très puissant incontournable dans la chimie thérapeutique.¹⁸⁰ De plus, l'absence d'un azote en tête de pont rend la structure chimiquement et physiologiquement plus robuste. Pour finir, la géométrie de la pipéridine est très proche des conformations adoptées par la pipérazine.¹⁸¹ La conformation spatiale appliquée par nos molécules sera donc structurellement très proche des charpentes benzimidazoles-pipérazine. Le lien entre cette pipéridine et l'hétérocycle phénolique sera constitué d'un méthylène ou d'un pont éther, qui sont deux bons isostères.¹⁸² En ce qui concerne les groupements fluorés, ils ont précédemment montré apporter un réel effet bénéfique dans l'évaluation biologique des composés. Plusieurs groupements comme le trifluorométhyle ou le trifluorométhoxy seront introduits en *méta* ou en *para*, et comparés avec le noyau aromatique non substitué, afin d'évaluer l'effet thérapeutique réel induit par ces groupements. Pour finir, le phosphonate sera aussi positionné en *méta* ou *para*, puisque ces deux positions ont montré de très bonnes activités dans la série précédente.

¹⁸⁰ Pati, B. Importance of Piperidine Moiety in Medicinal Chemistry Research: A Review. *J. Pharm. Res.* **55**, 5493–5509 (2012).

¹⁸¹ Parkin, A., Oswald, I. D. H. & Parsons, S. Structures of piperazine, piperidine and morpholine. *Acta Cryst.* **60**, 219–227 (2004).

¹⁸² Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **54**, 2529–2591 (2011).

2 Rétrosynthèses envisagées

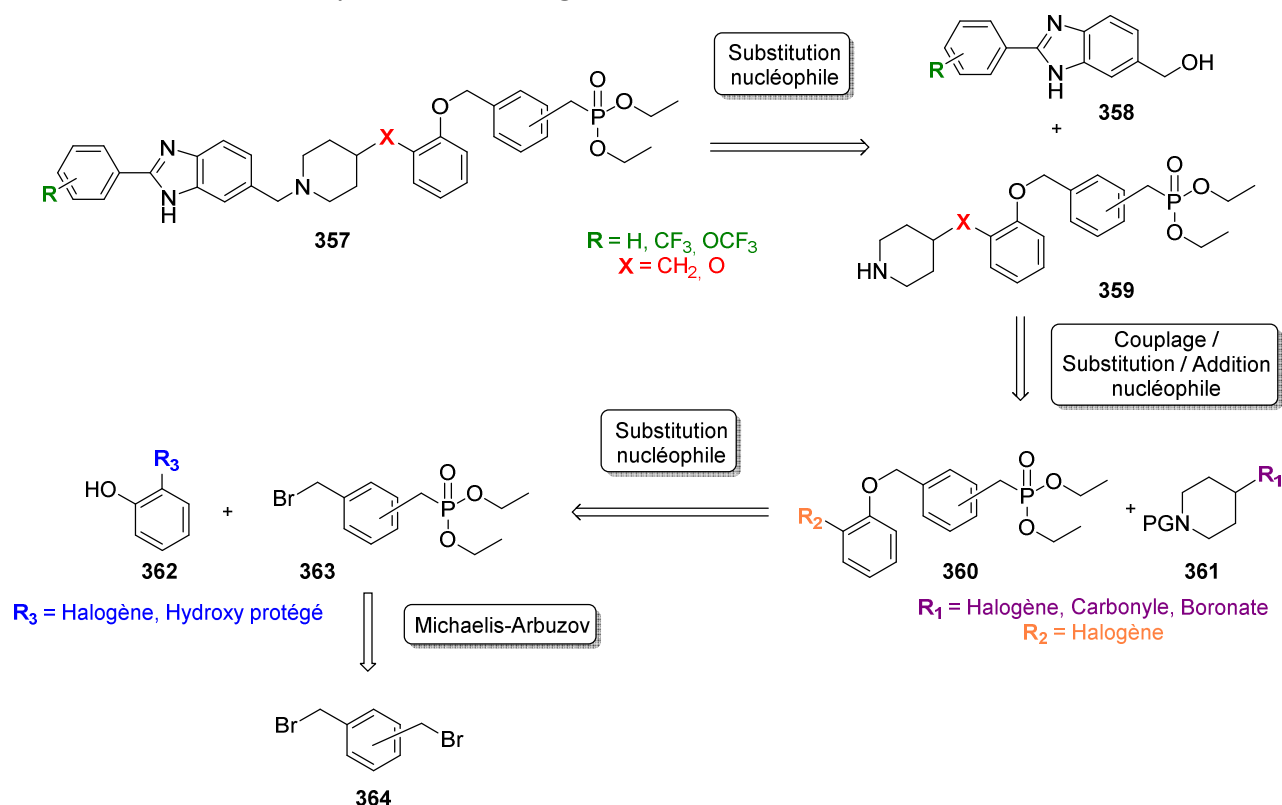


Schéma 111. Rétrosynthèse envisagée

Afin d'obtenir les composés souhaités, une stratégie polyvalente est proposée afin d'obtenir en peu d'étapes les composés **357** présentant la structure souhaitée. Ces charpentes seront obtenues par un couplage entre les deux fragments principaux, d'une part le benzimidazole **358** préalablement fonctionnalisée, et d'autre part la pipéridine **359**. L'étape clef sera la formation de ce noyau pipéridine, et une optimisation sera menée pour chaque synthèse des étapes de substitution, d'addition ou de couplages. Le phosphonate **360** sera quant à lui obtenu par une réaction de Michaelis-Arbuzov sur le composé **364**, suivi d'une substitution nucléophile avec le phénol correspondant (Schéma 111).

Telle qu'elle est décrite, cette rétrosynthèse présente l'avantage indéniable de permettre la synthèse de squelettes très fonctionnalisés, supportant une grande diversité chimique. Toutefois, pour des raisons de clarté, le plan de travail relatant les accès aux différentes charpentes sera séparé en deux parties :

- Dans la première, nous discuterons plus amplement de la synthèse des composés possédant un pont éther ($\text{X} = \text{O}$), qui paraissent plus simple d'obtention.
- Par la suite, nous détaillerons les chemins synthétiques ayant menés aux molécules comprenant un lien méthylène ($\text{X} = \text{CH}_2$).

IV. Résultats et discussion

3 Composés présentant une rotule éther

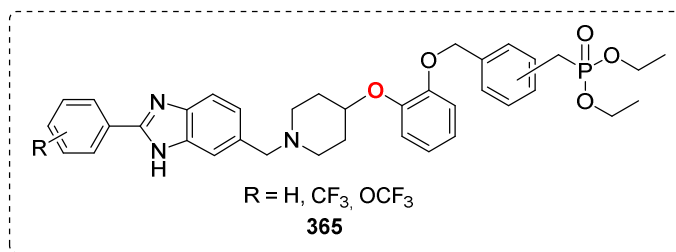


Figure 81. Objectif synthétique

Dans cette série, l'objectif est de synthétiser les charpentes possédant un pont éther, qui est le lien entre le C⁴ de la pipéridine et le fragment comportant les deux cycles aromatiques et le phosphonate (Figure 81). Nous allons nous attacher dans un premier temps à synthétiser les benzimidazoles fonctionnalisés.

➤ Synthèse des benzimidazoles

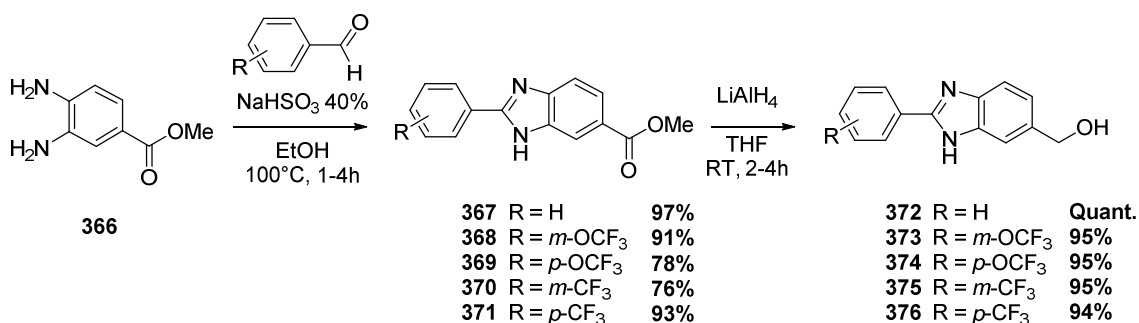


Schéma 112. Cyclisation et réduction

La première partie de la synthèse consiste en la formation des benzimidazoles fonctionnalisés en C². Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature afin d'introduire un groupement aromatique fonctionnalisé sur cette position.¹⁸³ La méthode employée dans notre cas est une simple réaction de condensation entre la diamine **366** et l'aldéhyde substitué correspondant, aboutissant à la formation des hétérocycles azotés **367-371** avec des rendements compris entre 76 et 97% (Schéma 112). Ces esters sont ensuite réduits en présence de tétrahydruroaluminat de lithium dans le THF à température ambiante. Les alcools correspondants **372-376** sont obtenus avec d'excellents rendements sous forme de poudres blanches.

➤ Synthèse de la pipéridine fonctionnalisée portant le phosphonate en position méta

¹⁸³ (a) Mahesh, D., Sadhu, P. & Punniyamurthy, T. Copper(I)-Catalyzed Regioselective Amination of *N*-Aryl Imines Using TMSN₃ and TBHP: A Route to Substituted Benzimidazoles. *J. Org. Chem.* **80**, 1644–1650 (2015). (b) Nguyen, T. B., Ermolenko, L., Dean, W. A. & Al-Mourabit, A. Benzazoles from Aliphatic Amines and *o*-Amino/Mercaptan/Hydroxyanilines: Elemental Sulfur as a Highly Efficient and Traceless Oxidizing Agent. *Org. Lett.* **14**, 5948–5951 (2012). (c) Kim, Y., Kumar, M. R., Park, N., Heo, Y. & Lee, S. Copper-Catalyzed, One-Pot, Three-Component Synthesis of Benzimidazoles by Condensation and C–N Bond Formation. *J. Org. Chem.* **76**, 9577–9583 (2011). (d) Bahrami, K., Khodaei, M. M. & Naali, F. Mild and Highly Efficient Method for the Synthesis of 2-Arylbenzimidazoles and 2-Arylbenzothiazoles. *J. Org. Chem.* **73**, 6835–6837 (2008).

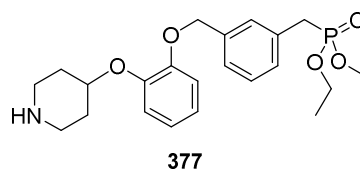


Figure 82. Fragment synthétique visé

Par la suite, il est nécessaire de synthétiser le phosphonate **377**, dans le but ultérieur de le coupler avec les benzimidazoles précédemment créées (Figure 82). Le composé **377** contient trois fractions distinctes : une pipéridine, un noyau catéchol et un phosphonate benzylique qui sera synthétisé dans un premier temps. La série contenant le motif phosphonate en position *mé*ta sera tout d'abord optimisée, puis appliquée aux composés portant ce groupement en position *para*.

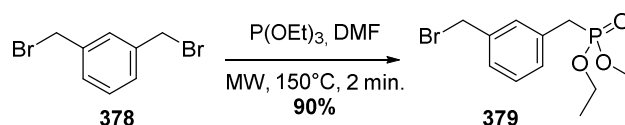


Schéma 113. Réaction de Michaelis-Arbuzov

Afin d'obtenir le composé **379**, le triéthylphosphite est mis en présence d' α,α' -dibromo-*m*-xylène **378** dans le DMF. Afin d'éviter la double Arbuzov, le composé dibromé **378** est mis en excès et activé pendant 2 minutes à 150°C sous irradiation micro-ondes. Le composé **379** est obtenu sous la forme d'un liquide incolore avec un très bon rendement de 90% (Schéma 113).

Cette position bromée peut être substituée à l'aide d'un des groupements hydroxyles présents sur le catéchol. Pour éviter toute réaction parasite, il est donc nécessaire de protéger le second groupement hydroxyle. La protection fait intervenir deux groupements protecteurs différents dans des réactions distinctes, menées en parallèle, pour établir un rendement global compétitif.

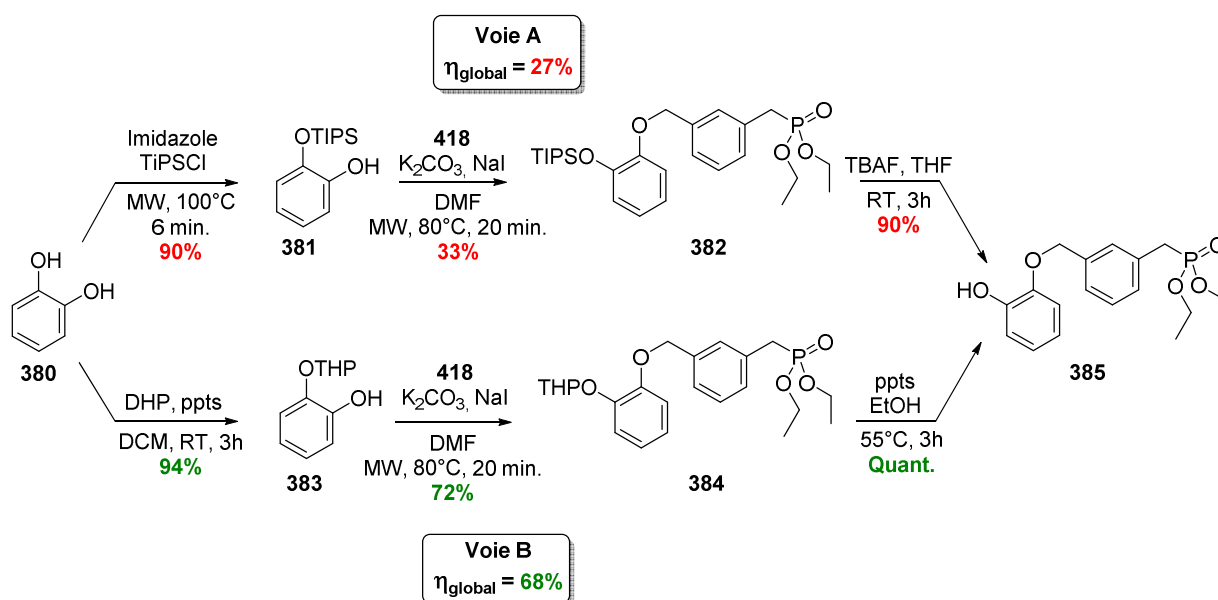


Schéma 114. Protection sélective, couplage et clivage du groupement protecteur

Quelques protections sélectives de catéchol sont reportées dans la littérature, comme par le triisopropylsilane¹⁸⁴ ou du tétrahydropyrane.¹⁸⁵

L'introduction de ce premier groupement silylé se fait aux micro-ondes dans un mélange de catéchol, de chlorotriisopropyl silane et d'imidazole sans solvant (Voie A). Suivant les conditions de Khalafi-Nezhad *et coll.*, après 6 minutes d'irradiation, le mono-alcool **382** est obtenu avec 90% de rendement. L'étape de substitution nucléophile suivante est soldée par un faible rendement de 33%, après mise en présence du catéchol **381**, du phosphonate **379**, de K₂CO₃ et d'iodure de sodium sous conditions micro-ondes. La déprotection se fait dans des conditions usuelles, en présence de fluorure de *tert*-butylammonium (TBAF) dans le THF aboutissant au composé **385** (Schéma 114).¹⁸⁶

L'autre stratégie consiste en la protection du catéchol par un tétrahydropyrane, effectuée après 3 heures à température ambiante en présence de dihydropyrane et de pyridinium *p*-toluenesulfonate (ppts), avec un excellent rendement de 94% (Voie B). Cette fois ci, de la réaction de substitution nucléophile résulte un rendement bien meilleur de 72%. La mise en présence du pyrane **383** avec le composé bromé **379** en présence de carbonate de potassium et d'une quantité catalytique d'iodure de sodium permet donc l'obtention de l'aromatique **384**. La déprotection du pyrane se fait rapidement en présence de ppts dans l'éthanol à 55°C, produisant le phosphonate **385**.

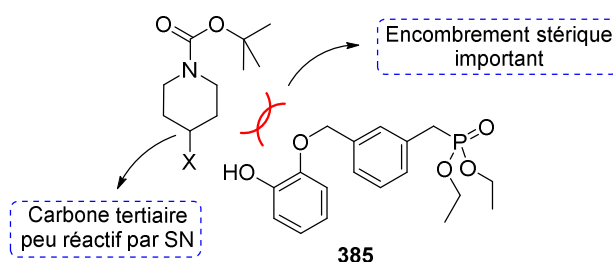


Figure 83. Interaction entre le composé 416 et une pipéridine N-protégée.

La synthèse se poursuit par le couplage entre l'espèce **385** et une pipéridine, afin d'obtenir le synthon voulu. Cette réaction s'accompagne cependant d'une réactivité assez faible, dû à une gêne stérique importante et d'un carbone tertiaire peu enclin à s'engager dans des réactions de substitutions nucléophiles (Figure 83). Les quelques réactions présentes dans la littérature avec ce type de substrat reportent des rendements faibles.¹⁸⁷ Il est donc essentiel de présenter des partenaires pipéridines très réactives, à l'aide de bon groupement partant en position 4.

➤ Préparation de quelques pipéridines fonctionnalisées

¹⁸⁴ Khalafi-Nezhad, A., Fareghi Alamdari, R. & Zekri, N. Efficient and Selective Protection of Alcohols and Phenols with Triisopropylsilyl Chloride/Imidazole Using Microwave Irradiation. *Tetrahedron*. **56**, 7503–7506 (2000).

¹⁸⁵ (a) Ralph, J., Zhang, Y. & M. Ede, R. Preparation of synthetic lignins with superior NMR characteristics via isotopically labeled monolignols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2609 (1998) (b) Grolik, J., Dudek, Ł. & Eilmes, J. Tuning the mesomorphic properties of liquid-crystalline dibenzotetraaza[14]annulenes — discotic nematic phases of tetraalkoxy-substituted derivatives. *Tetrahedron Lett.* **53**, 5127–5130 (2012).

¹⁸⁶ Cheng, J. C. Y., Hacksell, U. & Daves, G. D. Facile synthesis of 2'-deoxy-3'-keto- and 2'-deoxypseudouridine derivatives and analogues. Palladium(II)-mediated coupling reactions of furanoid glycals. *J. Org. Chem.* **51**, 3093–3098 (1986).

¹⁸⁷ Park, C.-H. *et al.* Synthesis and Evaluation of Tricyclic Derivatives Containing a Non-Aromatic Amide as Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors. *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**, 1650–1656 (2011).

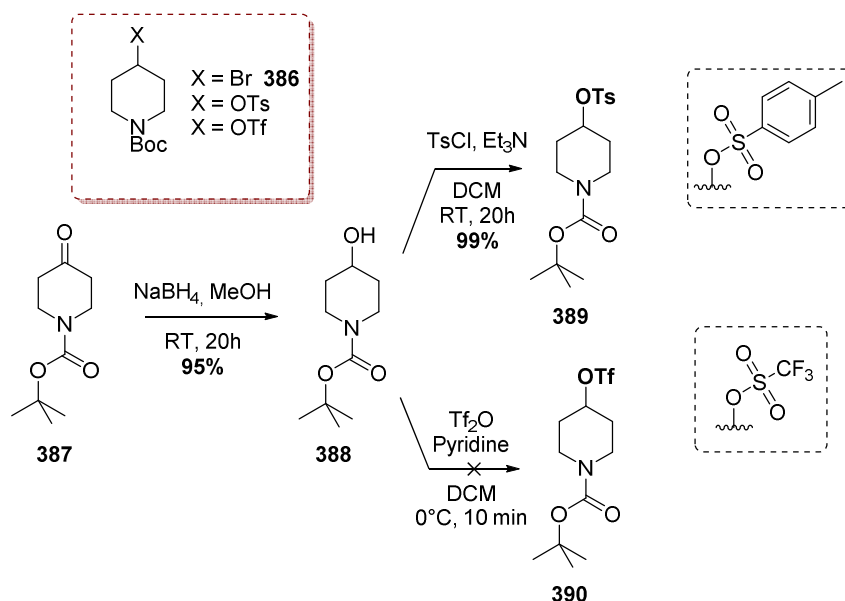


Schéma 115. Préparation des pipéridines protégées

Trois pipéridines portant divers nucléofuges sont envisagées, à savoir le brome, le tosylate et le triflate (Schéma 115). Les pipéridines sont protégées avec des groupements *tert*-butoxycarbamates en N^1 , puisque notre charpente phosphonate est stable dans les conditions de déprotection de ce dernier. La N^1 -Boc-4-bromopipéridine **386** étant commerciale, il n'est pas nécessaire de la préparer. Cependant, les sulfones (triflate/tosylate) ne l'étant pas, il est synthétisé dans un premier temps la N^1 -Boc-4-hydroxypipéridine tosylée **389**. La cétone **387** est mise en présence de borohydrure de sodium pendant 20h à température ambiante dans un solvant protique, aboutissant à la formation de l'alcool réduit correspondant avec un excellent rendement de 95%.¹⁸⁸ La tosylation de l'alcool formé se fait dans le dichlorométhane en présence de chlorure de tosyloxy et de triéthylamine, et permet l'obtention de la pipéridine **389**.¹⁸⁹ Quant à la protection de l'alcool intermédiaire **388** par un triflate, le composé final **390**, très réactif, n'est pas stable et se dégrade aussitôt après sa formation.

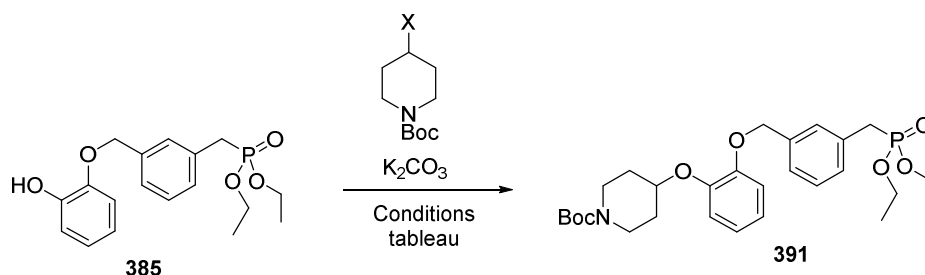
Pour les réactions de couplages ultérieurs, nous avons mis au point la réaction de couplage avec l'alcool **385** et le composé bromé **386** et tosylé **389** (Tableau 31).

➤ Insertion de la pipéridine et déprotection

¹⁸⁸ Zeng, L.-F. *et al.* Novel dimeric aryldiketo containing inhibitors of HIV-1 integrase: Effects of the phenyl substituent and the linker orientation. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7777–7787 (2008).

¹⁸⁹ Callahan, J.F., Kerns, J.K., Lin, X., Preparation of novel indazole carboxamide derivatives useful in treatment and prevention of disorders-associated with inappropriate IKK2 (also known as IKK β) activity. WO2007102883 (A2) 2007-09-13

Tableau 31. Formation de la charpente pipéridine-phosphonate



Entrée	X	Méthode d'activation	Solvant	Rendement
1	Br	MW, 80°C, 20 min	DMF	/
2	OTs	MW, 120°C, 20 min	DMF	15% ^a
3	OTs	Δ, 100°C, 16h	DMF	20% ^a
4	OTs	Δ, 70°C, 48h	DMA	61%
5	OTs	MW, 140°C, 30 min	DMA	71%

^a Conversion

Entrée 1 : Dans un premier temps, le couplage s'effectue entre la 4-bromopipéridine **386** et l'alcool **385**. Après l'introduction de ces deux espèces avec le carbonate de potassium et le DMF dans un tube scellé, le mélange est irradié sous micro-ondes pendant 20 minutes à 80°C. Après analyse du brut réactionnel, aucune conversion n'est observée. (Tableau 31).

Entrée 2 et 3 : Avec des conditions renforcées aux micro-ondes et un groupement partant tosylé plus réactif, le composé **391** n'est obtenu après 20 minutes de réaction à 120°C qu'avec un faible rendement de 15%. Le changement des conditions d'activation au profit d'un chauffage classique ne se traduit que par une légère augmentation de rendement de 5%.

Entrée 4 et 5 : Le solvant est changé au profit du diméthylacétamide DMA.¹⁹⁰ Après 48 heures de réaction à 70°C, le composé **391** est obtenu avec un rendement de 61%. Il existe donc un réel effet de solvant dans cette réaction. Par la suite, cette stratégie de synthèse est adaptée aux micro-ondes, et permet la production de la pipéridine protégée **391** avec 71% de rendement, après 30 minutes à 140°C.

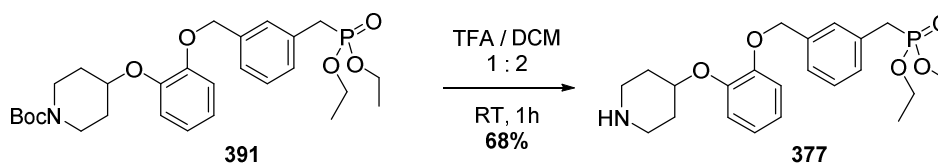


Figure 84. Déprotection au TFA

Une déprotection du carbamate présente sur l'azote de la pipéridine est effectuée par la suite dans des conditions classiques, comme précédemment. En présence d'acide trifluoroacétique en mélange dans le

¹⁹⁰ Bang, K. C., Jung, J. H., Moon, Y. H., Method for preparing 1-(4-(4-(3,4-dichloro-2-fluorophenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yl)oxy)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one. WO2014116070 (A1) 2014-07-31

dichlorométhane, le groupement Boc est déprotégé, laissant place à l'amine libre **377** avec un rendement de 68% (Figure 84).

➤ Association des deux fragments benzimidazoles et pipéridine

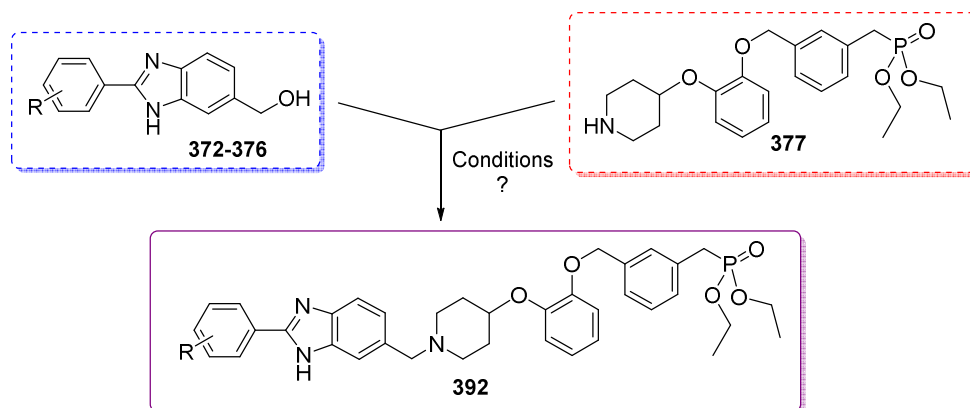


Schéma 116. Formation du squelette moléculaire voulu

Une fois ces synthons formés, il reste toutefois à trouver des conditions opératoires dans le but de coupler les benzimidazoles **372-376** à la pipéridine **377**. La stratégie principale consiste à transformer l'alcool présent sur le benzimidazole en bon nucléofuge, pour permettre une attaque par l'azote nucléophile de la pipéridine, produisant ainsi les molécules bioactives **392** (Schéma 116).

Néanmoins, afin de ne pas consommer inutilement du synthon phosphonate **416**, une optimisation aura lieu entre une benzimidazole et la pipéridine non substituée.

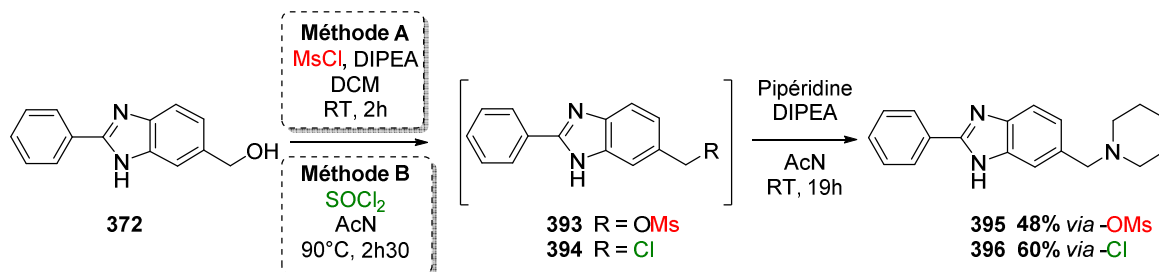


Schéma 117. Détermination des conditions expérimentales à appliquer

Deux nucléofuges sont mis en jeu : le mésylate et le chlore (Schéma 117). Leur introduction se fait tout d'abord dans le dichlorométhane ou dans l'acétonitrile en fonction des groupements à introduire. Les espèces **393** et **394** très instables ne sont pas isolées, et engagées directement dans la seconde étape en présence de pipéridine et de la diisopropyléthylamine. Les rendements globaux pour les deux espèces sont respectivement de 48% et de 60%. La meilleure capacité de groupement partant du composé mésylé **393** par rapport au chloré **394** mène à une dégradation précoce de l'intermédiaire **393**. Une des hypothèses permettant d'expliquer ce résultat passe par l'instabilité du composé **393** plus marquée que pour l'intermédiaire **394**.

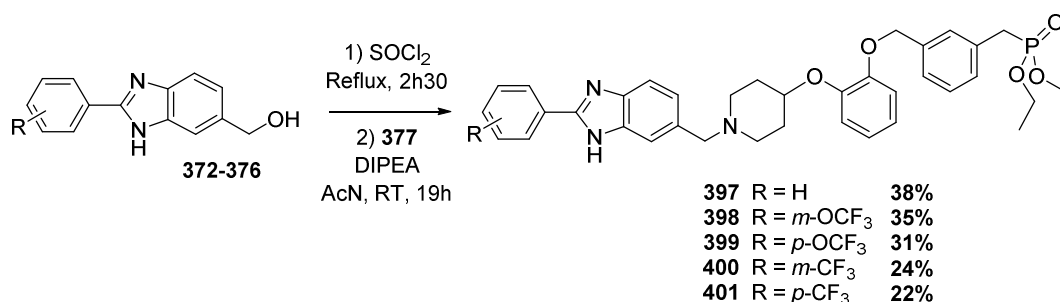


Schéma 118. Obtention des composés présentant le phosphonate en position méta

L'application des conditions mises en oeuvre précédemment avec le dérivé halogéné a mené à la formation des composés **397-401** avec des rendements faibles compris entre 22 et 38% dû à la grande gêne stérique imposée par ces deux noyaux (Schéma 118). Ce schéma synthétique est par la suite adapté à la série présentant un phosphonate en position *para*.

➤ Synthèse de la pipéridine fonctionnalisée portant le phosphonate en position *para*

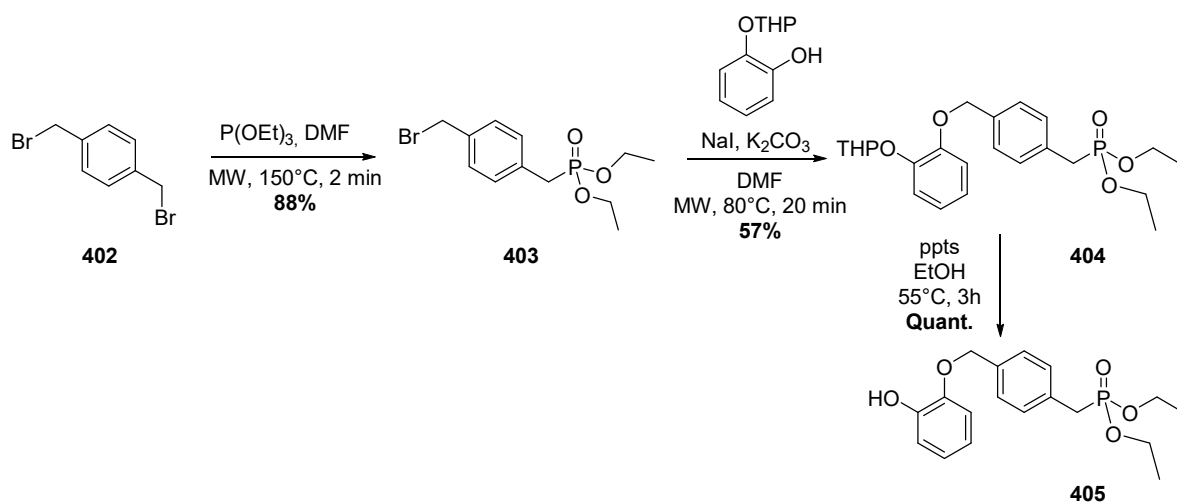


Schéma 119. Synthèse du composé intermédiaire 405

La stratégie de synthèse développée précédemment est reproduite dans la série *para* (Schéma 119). Dans un premier temps, le diéthylphosphonate est introduit par réaction de Michaelis-Arbuzov avec un très bon rendement de 88%. Le composé bromé **403** ainsi obtenu est substitué par le catéchol monoprotégé par le THP, en présence de carbonate de potassium et d'iodure de sodium. Néanmoins, les rendements sont légèrement inférieurs par rapport à ceux déjà obtenus, cela pouvant être dû à l'échelle de la réaction plus importante dans ce schéma synthétique. Le groupement pyrane présent sur le composé **404** est déprotégé en présence de PPTS dans l'éthanol générant l'alcool **405**.

Par la suite, le couplage s'effectue entre la position hydroxylée et la pipéridine tosylée correspondante (Schéma 120). Après 30 minutes à 140°C sous irradiation micro-ondes, le composé **406** est conçu avec un rendement calculé de 62%. La déprotection du groupement *tert*-butoxycarbonate se fait en présence de TFA afin d'obtenir la pipéridine **407** avec un rendement de 67%.

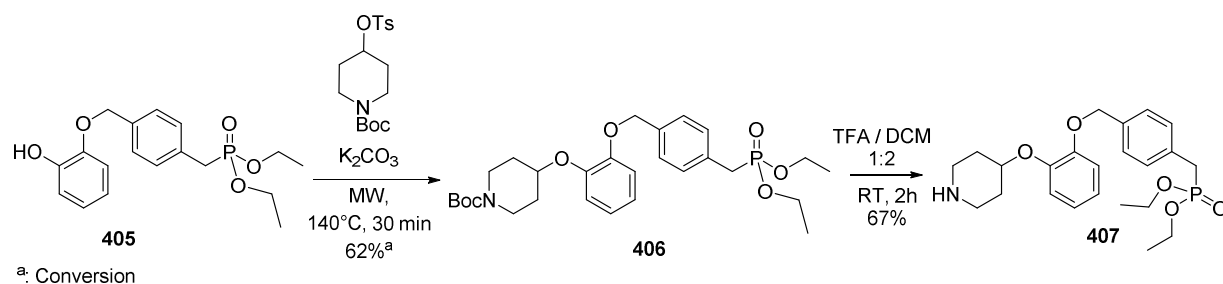


Schéma 120. Couplage et déprotection

Suivant le protocole déjà énoncé, le couplage est réalisé entre les hétérocycles benzimidazoles fonctionnalisés et la pipéridine **407** (Schéma 121). Après 2h30 au reflux du chlorure de thionyle SOCl_2 , l'intermédiaire chloré est mis en présence du phosphonate **407** pendant 19h à température ambiante dans l'acétonitrile, aboutissant à la formation des composés **408-412** avec des rendements moyens compris entre 21 et 40%.

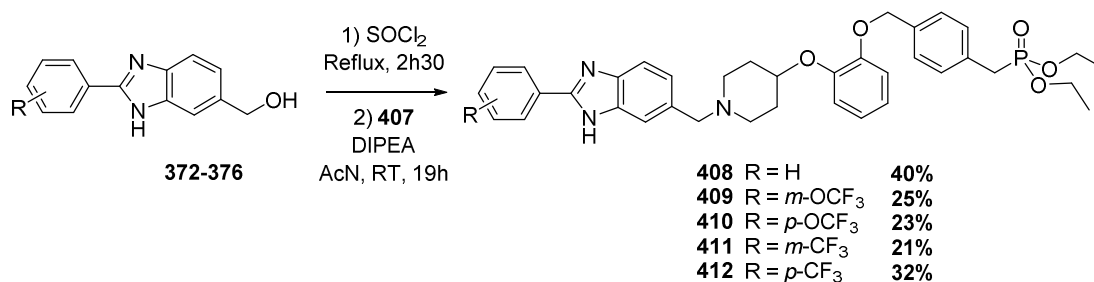


Schéma 121. Obtention des composés présentant le phosphonate en position para

4 Composés présentant une rotule méthylène

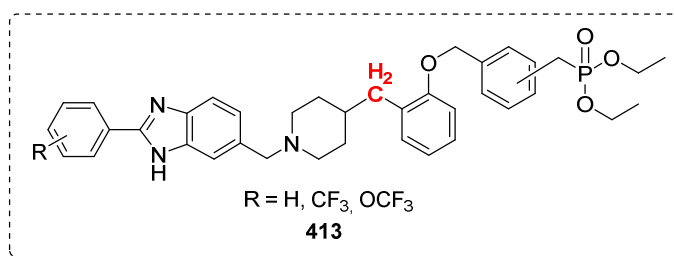


Figure 85. Objectif synthétique

La seconde série envisagée diffère par le remplacement du pont éther par un groupement méthylène CH_2 (Figure 85). Il ne sera donc pas possible de fonctionnaliser ce motif comme précédemment à l'aide de substitutions nucléophiles. L'utilisation de procédés alternatifs comme les réactions de Grignard, les couplages organométalliques ou les transmétalements à l'aide de lithium seront exploités pour cette série de molécules.

➤ Synthèse de la pipéridine **414**

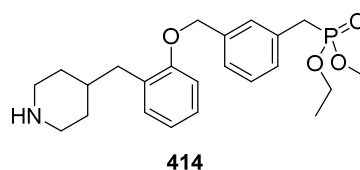


Figure 86. Formation du composé 453

La mise au point de la synthèse de pipéridine portant un pont méthylène sera d'abord réalisé pour l'obtention de la molécule **453**, afin de l'étendre par la suite aux autres substrats (Figure 86).

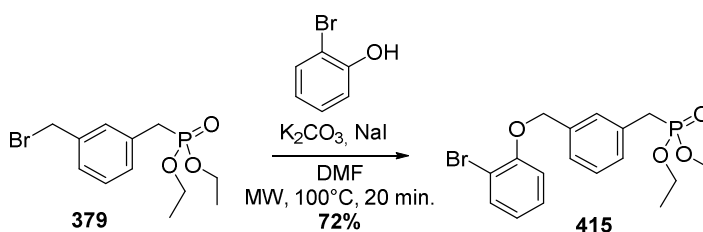


Schéma 122. Couplage entre le 2-bromophénol et le phosphonate **379**

Le composé **418** réagit avec le 2-bromophénol commercial (Schéma 122). Après 20 minutes d'irradiation aux micro-ondes à 100°C, le composé bromé **415** est obtenu avec un bon rendement de 72%.

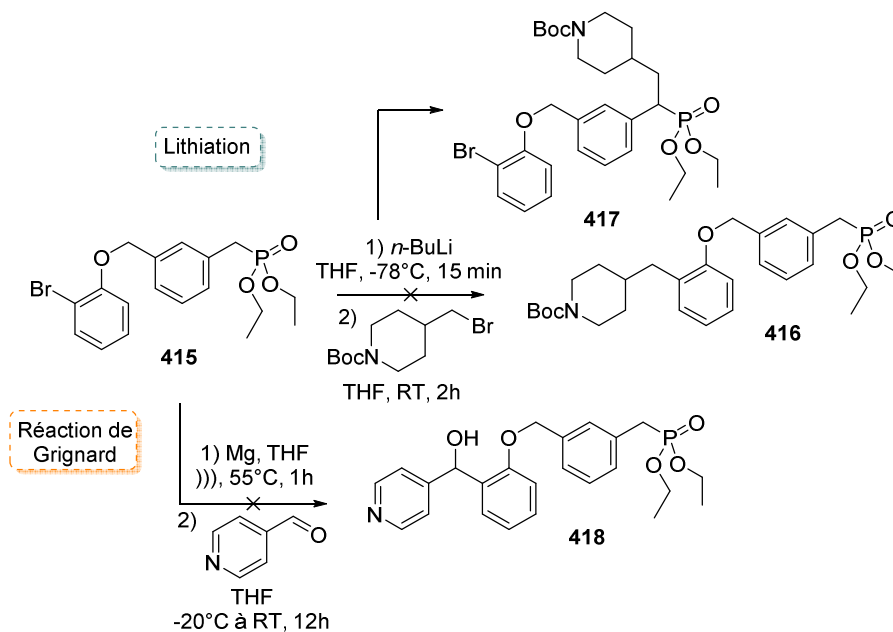


Schéma 123. Transmétallation / Réaction de Grignard

A partir de ce substrat **415**, nous avons dans un premier temps envisagé deux réactions afin d'insérer le motif souhaité sur le brome phénolique : une lithiation de cette position,¹⁹¹ suivie de l'attaque nucléophile sur une position bromée, et dans un second temps une réaction de Grignard.¹⁹² La première stratégie plus

¹⁹¹ Snyder, S. A., Treitler, D. S. & Brucks, A. P. Simple Reagents for Direct Halonium-Induced Polyene Cyclizations. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14303–14314 (2010).

¹⁹² Ágai, B., Proszenyák, Á., Tárkányi, G., Vida, L. & Faigl, F. Convenient, Benign and Scalable Synthesis of 2- and 4-Substituted Benzyloxy-piperidines. *European J. Org. Chem.* **2004**, 3623–3632 (2004).

convergente est effectuée en présence de *n*-butyllithium dans le THF, afin de procéder à l'échange bromo-lithium. Dans un second temps, l'intermédiaire lithié est mis en présence de la pipéridine bromée afin de permettre l'attaque de la position métallée. Cependant, cette réaction ne nous a pas conduit au composé **416** attendu. En effet, agissant dans un premier temps comme une base, le butyllithium introduit dans la réaction déprotone un proton acide en alpha du phosphore, qui attaque par la suite la position bromée réactive de la pipéridine, produisant par ce biais synthétique le phosphonate **417** (Schéma 123).

L'autre chemin réactionnel passant par la formation du réactif de Grignard est réalisé en présence de magnésium activé et de l'espèce bromée **415** sous activation ultrasons pendant 1h à 55°C.¹⁹³ La pyridine carboxaldéhyde est ensuite ajoutée au mélange dans des conditions strictement anhydres, mais après 2 heures à température ambiante, aucune conversion n'est observée (Schéma 123).

Nous nous sommes alors tournés vers un couplage organopalladé, dans les conditions de Suzuki Miyaura.

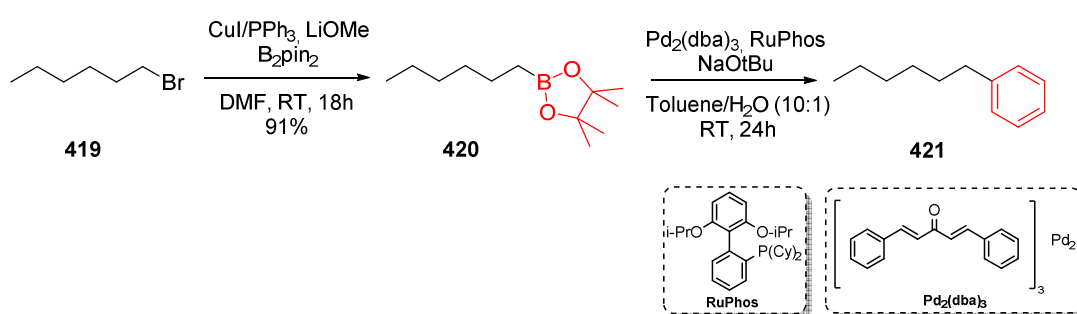


Schéma 124. Insertion du pinacolborane et couplage de Suzuki-Miyaura

Yang *et coll.* ont développé une méthode d'introduction originale d'ester boronique sur des carbones sp³, pour ensuite les introduire par couplage de Suzuki Miyaura sur un aromatique (Schéma 124).¹⁹⁴

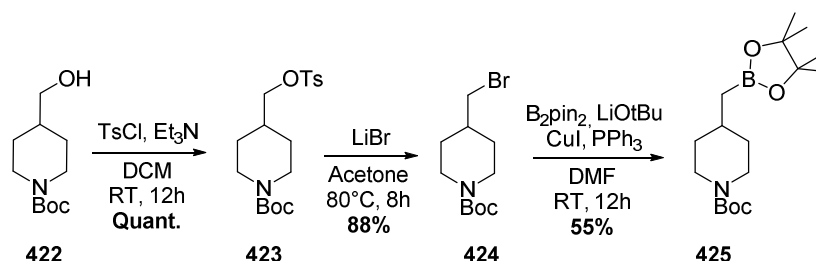


Schéma 125. Fonctionnalisation de la position C⁴

Afin d'obtenir le composé bromé nécessaire à l'insertion du boronate, la *N*-Boc-4-(hydroxyméthyl)pipéridine **422** est mise en présence de triéthylamine (Schéma 125). L'alcoolate ainsi créé va par la suite réagir avec le chlorure de toluène de *p*-toluenesulfonyl, formant quantitativement le dérivé tosylé **423**. Cette position est ensuite bromée par traitement au bromure de lithium dans l'acétone à reflux. La pipéridine **424** subit ensuite un couplage en présence d'iodure de cuivre, de triphénylphosphine, de LiOtBu et de *bis*(pinacol) borane. Après 12 heures à température ambiante, le composé **425** est obtenu avec un rendement de 55%.

¹⁹³ Baker, K. V., Brown, J. M., Hughes, N., Skarnulis, A. J. & Sexton, A. Mechanical activation of magnesium turnings for the preparation of reactive Grignard reagents. *J. Org. Chem.* **56**, 698–703 (1991).

¹⁹⁴ Yang, C. T. *et al.* Alkylboronic esters from copper-catalyzed borylation of primary and secondary alkyl halides and pseudohalides. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 528–532 (2012).

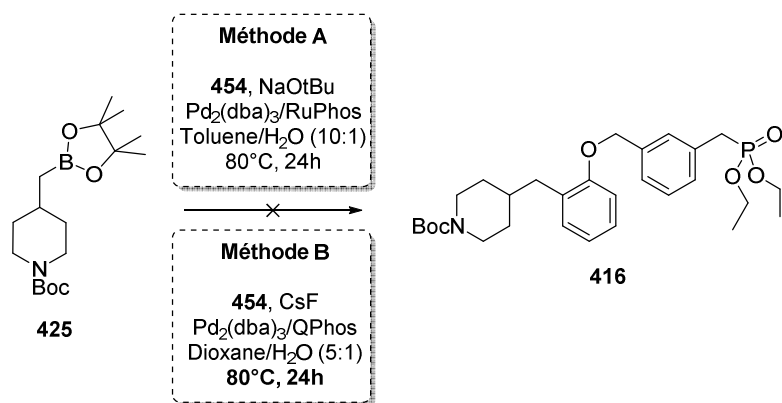


Schéma 126. Couplages métalliques au palladium

Le boronate **425** est engagé dans la réaction de couplage décrite par Yang (Méthode A, Schéma 126). Le système catalytique est constitué de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ et de RuPhos,¹⁹⁵ en présence de *tert*-butoxyde de sodium en tant que base et dans un système de solvant toluène/eau. Après 24h de réaction à 80°C, aucune conversion n'est observée. L'adaptation de ces conditions de réaction à celles développées par Hartwig ne change pas l'issue de cette réaction, qui reste sans conversion.¹⁹⁶

➤ Alternative synthétique à la préparation du composé **427**

Devant la difficulté de réaliser des réactions chimiques "classiques" (Grignard, couplages palladés, lithiation) sur ce type de charpentes fonctionnalisées, une autre approche est alors envisagée.

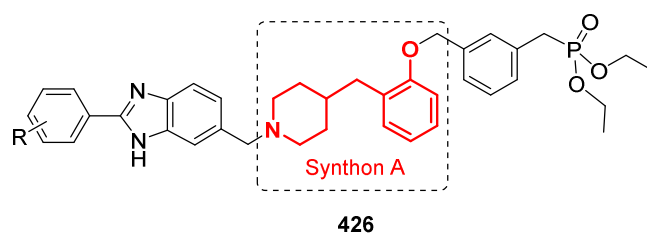


Figure 87. Composé **426**

Plutôt que de synthétiser cette molécule bloc par bloc, cette alternative se base sur la fonctionnalisation du coeur de cette molécule dans un premier temps, le synthon A (Figure 87).

¹⁹⁵ (a) Dreher, S. D., Lim, S.-E., Sandrock, D. L. & Molander, G. A. Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions of Primary Alkyltrifluoroborates with Aryl Chlorides. *J. Org. Chem.* **74**, 3626–3631 (2009) (b) Molander, G. A. & Ellis, N. Organotrifluoroborates: Protected Boronic Acids That Expand the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction. *Acc. Chem. Res.* **40**, 275–286 (2007).

¹⁹⁶ Li, Q., Liskey, C. W., & Hartwig, J. F. (2014). Regioselective Borylation of the C–H Bonds in Alkylamines and Alkyl Ethers. Observation and Origin of High Reactivity of Primary C–H Bonds Beta to Nitrogen and Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **136** (24), 8755–8765. (2014)

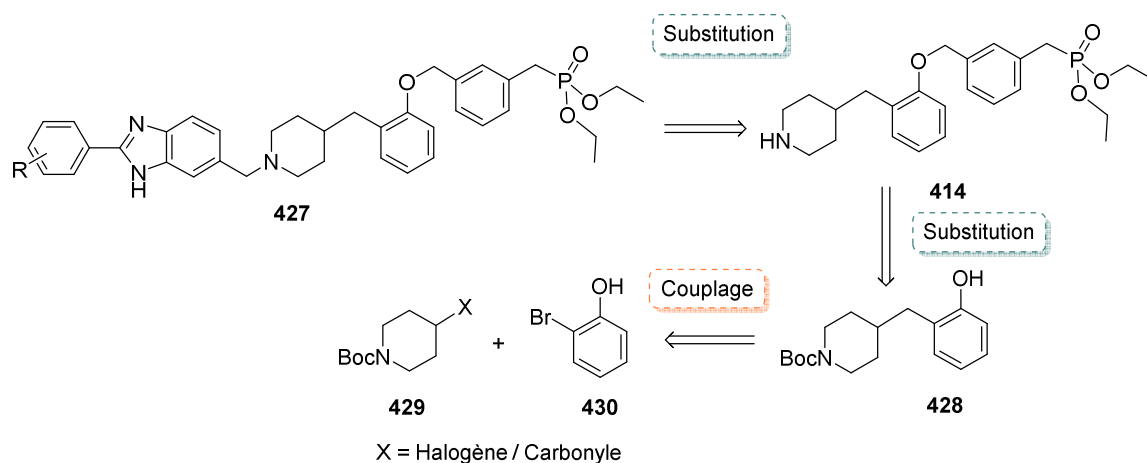


Schéma 127. Nouvelle rétrosynthèse proposée

Ce nouveau schéma rétrosynthétique repose sa dernière étape sur le couplage entre la benzimidazole et la pipéridine fonctionnalisée **414** correspondante (Schéma 127). Ici, la différence réside dans la formation du composé **414**, puisqu'il est maintenant synthétisé par une substitution entre le synthon A et le diéthylphosphonate bromé. Une optimisation sera toutefois nécessaire afin de déterminer les conditions d'obtention du synthon **428**.

➤ Production du synthon A

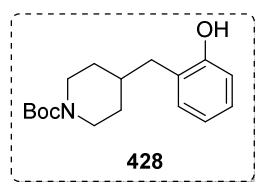


Figure 88. Synthon A

L'objectif synthétique étant établi, nous avons dans un premier temps envisagé de partir du 2-bromophénol **431**, d'effectuer la lithiation de la position bromée, puis de le faire réagir par la suite par substitution ou addition nucléophile (Schéma 128).

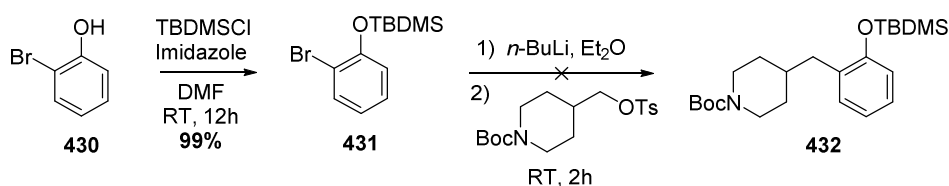


Schéma 128. Silylation suivie d'une tentative de substitution nucléophile

Le 2-bromophénol est alors protégé par un groupement TBDMS par l'action conjointe de l'imidazole et du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane dans le DMF (Schéma 128). Obtenue avec un rendement quantitatif, le phénol **431** est ensuite métallé à l'aide de *n*-butyllithium dans l'éther, puis engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec la pipéridine tosylée correspondante. Le changement de solvant au profit du THF, l'ajout de tamis ou le changement des conditions de température ne déplaceront pas la conversion. Néanmoins, il est à noter que si le réactif tosylé ne réagit pas pour donner le produit **432**, le silane **431** réagit bien avec le *n*-BuLi et la conversion semble s'effectuer de manière complète, la disparition du produit

de départ silylée étant observé en RMN et en MS. Il est donc nécessaire de changer les partenaires de cette réaction, non réactive dans ces conditions.

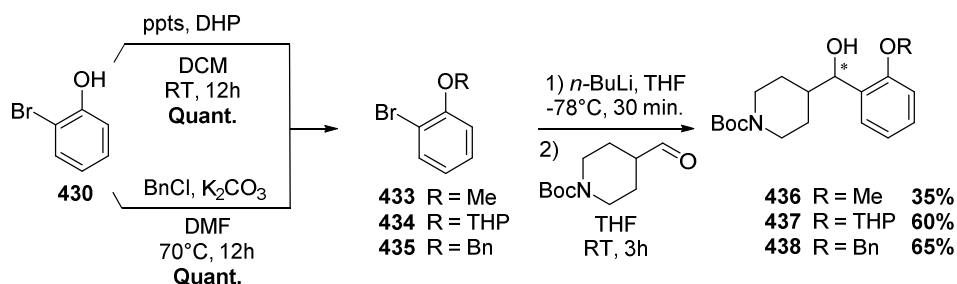


Schéma 129. Protections et addition nucléophile

Le 2-bromophénol est protégé d'une part avec un THP, à l'aide d'un mélange DHP/ppts à température ambiante pendant 12h comme décrit précédemment, et d'autre part avec un benzyle, introduit à l'aide de BnCl/K₂CO₃ à 70°C pendant 12h dans le DMF (Schéma 129). A ces deux bromophénols protégés obtenus quantitativement s'ajoute le 2-bromoanisole commercial. Les essais d'additions nucléophiles s'effectuent donc sur les composés **433** à **435**, en les traitant dans un premier temps avec du *n*-BuLi, à -78°C pendant 30 minutes dans le THF. Une fois l'espèce lithiée formée, la N-Boc-pipéridine-4-carboxaldéhyde est ajoutée au mélange réactionnel et la solution est agitée pendant 3h à température ambiante. Les composés **436** et **438** sont obtenus avec des rendements entre 60 et 65%. Le rendement plus faible de 35% sur l'aromatique anisole est en partie dû à une qualité médiocre du produit de départ commercial.

Par la suite, il est nécessaire de déshydrater la position benzylique, et de déprotéger sélectivement le groupement protecteur sur l'aromatique. En effet, la réaction suivante étant une substitution nucléophile entre le synthon A et le phosphonate bromé, il est indispensable de conserver le groupement protecteur sur la pipéridine pour assurer une bonne chimiosélectivité.

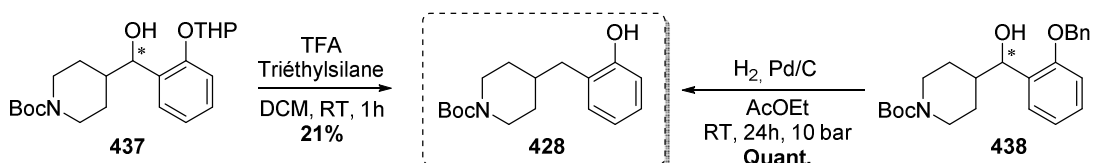


Schéma 130. Déprotection et déhydroxylation simultanées

L'équipe d'Apodaca a exposé une méthode permettant de déhydroxyler une position benzylique, située de surcroît sur un méthylène entre un carbocycle non aromatique et un motif benzène.¹⁹⁷ Possédant un motif analogue, ces conditions sont appliquées sur la charpente **437**. Elle est mise en présence de triéthylsilane et d'acide trifluoroacétique, et après une heure de réaction à température ambiante dans le dichlorométhane, le composé **438** est obtenu avec un faible rendement de 21%. Il est important de noter que le groupement pyrane se clive rapidement en conditions acides, ce qui a permis d'obtenir la pipéridine comportant toujours le groupement carbamate sur l'azote (Schéma 130). La déshydratation d'un alcool benzylique est aussi possible par hydrogénolyse sous pression.¹⁹⁸ Ces conditions permettraient aussi le clivage du groupement benzyle du composé **438**. Afin de vérifier cette hypothèse, le réactif benzylé est mis

¹⁹⁷ Apodaca, R. *et al.* A New Class of Diamine-Based Human Histamine H₃ Receptor Antagonists : 4- (Aminoalkoxy) benzylamines. *J. Med. Chem.* **46**, 3938–3944 (2003).

¹⁹⁸ Cheng, C. *et al.* Controlling chemoselective transformations of 4-acylpyridines via a Pd-C catalytic hydrodechlorination-hydrogenation. *Tetrahedron* **70**, 930–935 (2014)

en présence de palladium sur charbon (Pd/C) dans l'acétate d'éthyle. La pression d'hydrogène est réglée à 10 bars, et après 24 heures de réaction à température ambiante, le composé **428** est obtenu quantitativement sous forme de cristaux incolores. Afin d'attribuer la conformation adoptée par la pipéridine sur ces molécules, ces cristaux ont été envoyés en analyse DRX.

➤ Introduction du phosphonate et du benzimidazole

Une fois ce précurseur **428** en main, une mise au point sous activation micro-ondes a été nécessaire pour la réaction de substitution conduisant au composé **416**.

Tableau 32. Formation du composé **416**

Entrée	Méthode d'activation	Solvant	Rendement
1	MW, 80°C, 20 min	DMF	21%
2	MW, 140°C, 30 min	DMA	91%

La pipéridine benzyle **428** est donc mise en présence du phosphonate **379**, en présence d'iodure de sodium et de carbonate de potassium (Tableau 32). Les conditions employées sont extraites du tableau 33, qui montrait l'efficacité du solvant diméthylacétamide DMA par rapport à son analogue formamide. Ici aussi, l'activation plus robuste en présence du solvant DMA permet l'obtention de la pipéridine fonctionnalisée **416** avec un excellent rendement de 91%, en accord avec les constatations faites dans la série précédente.

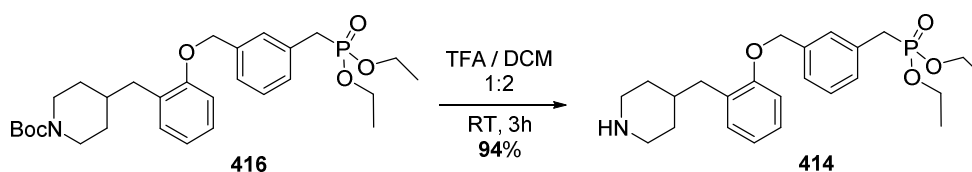


Schéma 131. Déprotection du carbamate

Par la suite, la pipéridine est déprotégée en conditions acides, en présence d'acide trifluoroacétique, et après 3h à température ambiante, la pipéridine **414** est obtenue avec un excellent rendement de 94% (Schéma 131).

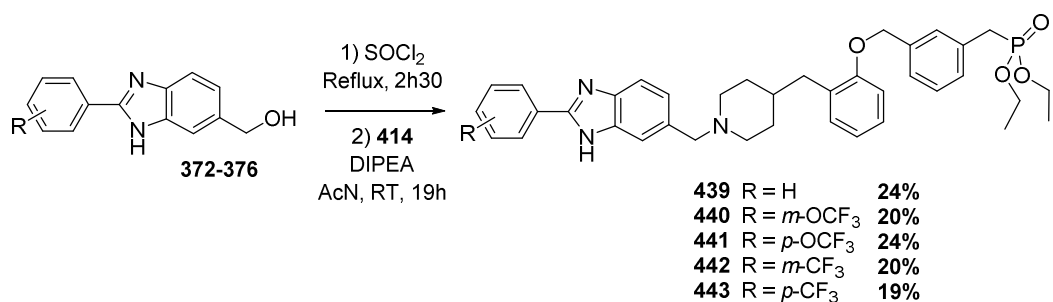


Schéma 132. Formation des composés comportant le phosphonate en méta

Pour finir cette série, les benzimidazoles sont couplées dans les mêmes conditions que précédemment. Ces hétérocycles azotés sont chlorés à l'aide de chlorure de thionyle, puis sont ensuite mis en présence de la pipéridine **414** et de diisopropyléthylamine, aboutissant aux composés **439** à **443** avec de faibles rendements compris entre 19 et 24% (Schéma 132).

➤ Synthèse de la pipéridine fonctionnalisée portant le phosphonate en position para

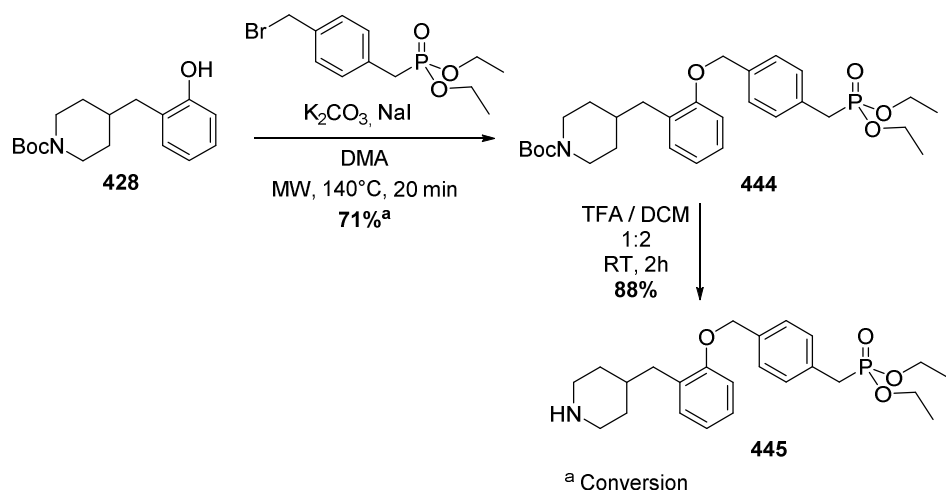


Schéma 133. Substitution nucléophile et déprotection

Un des avantages de cette stratégie de synthèse est la convergence impliquée par l'utilisation du composé **428**, permettant la fonctionnalisation plus tardive des fragments phosphonate et benzimidazoles. Par conséquent, le composé **444** est obtenu par une substitution nucléophile du phénol **428** sur le bromobenzène correspondant. Après 20 minutes à 140°C sous irradiation micro-ondes dans le diméthylacétamide, et une déprotection du carbamate en conditions acides, la pipéridine **445** est obtenue avec un rendement de 62% sur deux étapes (Schéma 133).

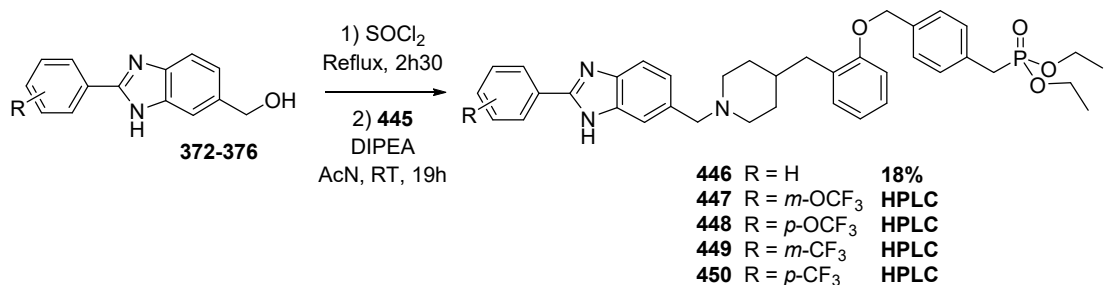


Schéma 134. Formation des composés possédant le phosphonate en position para

Dans ce cas, les purifications des composés voulus se sont avérées plus compliquées que précédemment. Sur les cinq réactions, seule l'obtention du composé **446** a été possible sans purification par HPLC (Schéma 134). Une réaction parasite crée un sous produit possédant le même rapport frontal que les produits finaux, rendant impossible cette purification sur colonne de silice classique.

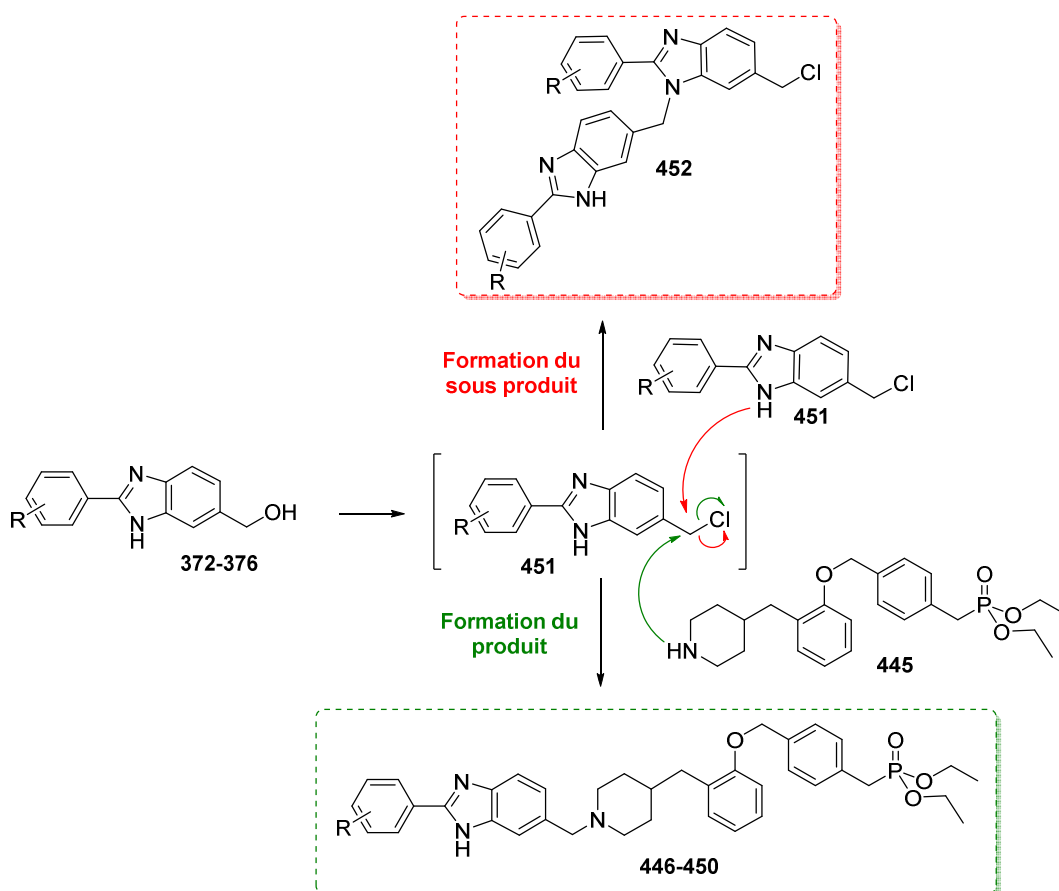


Schéma 135. Formation du sous produit

Cette réaction parasite se fait sur l'intermédiaire réactionnel chloré. Une attaque nucléophile compétitive entre l'azote du benzimidazole **491** et celui du composé **445** conduit à un mélange de produits (Schéma 135).

Tous ces composés formés sont actuellement en évaluation biologique contre le virus EBOV.

5 Evaluation *in silico* des composés par profil ADME

Pour intégrer le marché pharmaceutique, il n'est pas suffisant pour les molécules de présenter une bonne activité ou une bonne inhibition de la cible recherchée. Des analyses computationnelles permettent de quantifier l'effet d'une drogue sur l'organisme *via* quatre critères : L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. Ainsi, un médicament idéal sera absorbé oralement, transporté facilement vers la cible visée, métabolisée en produits non toxiques et excrétée rapidement sans provoquer d'accumulation de produits qui pourraient générer des effets indésirables. Dans le tableau 33 suivant, il est présenté les profils ADME de nos composés en comparaison avec le composé de référence 3.47. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec Dawid Warszycki et Andrzej Bojarski de l'Institut de pharmacologie à

Cracovie. Les propriétés de nos composés ont été effectuées avec le logiciel QikProp, couramment utilisé pour ce type d'analyses.

Tableau 33. Propriétés pharmacocinétiques par le profil ADME

	#stars	QPlogPo/w	QPlogKhsa	QPlogHERG	QPPCaco	QPPMDCK	Percent HumanOral Absorption	Rule of Five	Rule of Three
Range or recommended values	0-5	-2.0-6.5	-1.5-1.5	Below -5	<25 poor, >500 great	<25 poor, >500 great	<25 poor, >80% high	Max 4	Max 3
3.47	3	4.54	0.54	-5.21	60.06	71.04	72.39	1	1
397	4	6.90	1.18	-8.72	1113.77	625.09	95.94	2	1
398	7	8.07	1.49	-8.34	1033.88	2646.59	100	2	1
399	4	7.64	1.29	-7.66	1455.18	3833.36	100	2	1
400	7	7.88	1.44	-8.64	1113.92	2744.82	100	2	1
401	6	7.86	1.44	-8.58	1111.66	2721.34	100	2	1
408	2	6.31	1.04	-8.16	608.80	321.19	87.82	2	0
409	4	7.61	1.40	-7.90	736.35	1285.39	96.89	2	1
410	7	7.83	1.44	-8.33	752.54	1879.53	100	2	1
411	8	7.93	1.55	-8.33	748.73	1490.82	100	2	1
412	3	7.67	1.37	-7.71	1397.40	3433.29	100	2	1
439	0	6.32	1.02	-6.05	1741.80	997.06	96.08	2	0
440	1	7.36	1.26	-6.27	1731.97	3660.05	100	2	1
441	5	8.07	1.51	-7.51	1423.42	3672.55	100	2	2
442	1	7.53	1.36	-6.66	1728.33	3415.32	100	2	1
443	1	7.08	1.19	-5.86	1676.22	4173.72	100	2	0
446	2	6.81	1.27	-6.72	1063.19	584.78	95.09	2	0
447	4	8.19	1.57	-7.61	1600.71	4228.78	100	2	2
448	2	7.76	1.45	-6.92	1074.23	2528.62	100	2	2
449	2	7.51	1.41	-6.70	1125.38	2187.21	100	2	2
450	4	7.82	1.51	-7.49	949.12	2256.58	100	2	1

 Valeur en dehors de la gamme recommandée

➤ Analyse du tableau 33

- **#stars.** Ce paramètre est le plus révélateur de la capacité des composés à incarner un médicament, un composé idéal ayant un nombre d'étoile de 0. Dans notre cas, 3/4 de nos composés présentent un nombre d'étoiles dans la gamme préconisée, et le composé **439** présente quand à lui un nombre d'étoiles de 0. Cette valeur en fait un candidat-médicament idéal.
- **QPlogPo/W.** Ce coefficient de partition octanol/eau est un indice de l'hydrophilie de nos composés. Il représente aussi le seul inconvénient de nos molécules, présentant quasiment toutes une hydrophilie légèrement au dessus des valeurs recommandées. Seuls les composés **408** et **439** présentent des valeurs intéressantes.
- **QPlogKhsa.** Ce critère influe sur la distribution du composé par son affinité avec un sérum d'albumines humaines. Ici encore, la quasi-totalité de nos composés présentent des valeurs dans le registre imposé.

- **QlogHERG.** *In silico*, ce critère est représentatif de la cytotoxicité induite par les molécules évaluées.
- **QPPCaco** et **QPPMDCK.** Ces paramètres sont des modèles de la barrière intestinale et de la barrière hémato-encéphalique. Tous nos composés présentent des valeurs remarquables, jusqu'à 60 fois plus efficace que les valeurs du lead 3.47.
- **Rule of Five** et **Rule of three.** La plupart de nos composés montrent de légères violations de la règle de Lipinski (Rule of five) et de Jorgensen (Rule of Three).¹⁹⁹ Cependant, ces variables révélatrices de la biodisponibilité ne sont pas toujours essentielles dans l'évaluation des propriétés pharmacologiques des molécules.²⁰⁰

Dans le marché pharmaceutique actuel, l'activité et l'inhibition ne suffisent pas à faire un bon médicament. Une molécule possédant une activité un peu moins marquée, mais un profil ADME remarquable sera plus intéressante à développer lors des essais cliniques. De ce fait, nos composés semblent fort prometteurs, et notamment le composé **439** qui avec un score de 0 étoiles, est le candidat le plus prometteur pour un développement ultérieur (Figure 91).

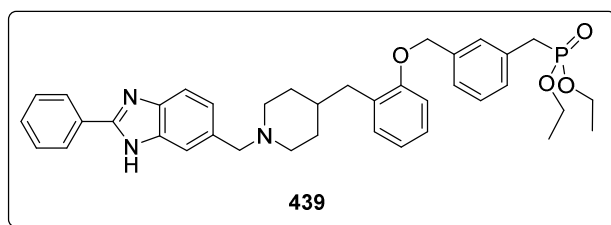


Figure 89. Composé 439

V. Conclusion et perspectives

Pour améliorer le profil thérapeutique 3.47 et ceux des diverses molécules synthétisées précédemment au laboratoire, nous nous sommes tournés vers la synthèse de composés possédant un noyau pipéridine avec un espaceur méthylène ou pont éther (Figure 92).

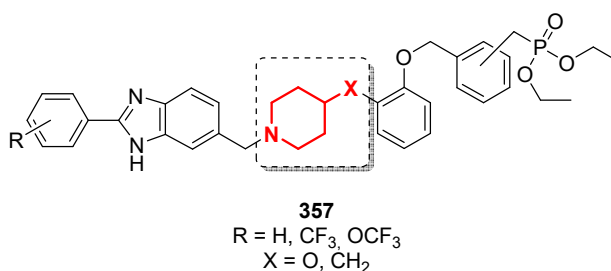


Figure 90. Modèle de molécules synthétisées.

¹⁹⁹ (a) Ntie-Kang, F. An *in silico* evaluation of the ADMET profile of the StreptomeDB database. *Springerplus* **2**, 353 (2013). (b) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).

²⁰⁰ Rees, D. C., Congreve, M., Murray, C. W. & Carr, R. Fragment-based lead discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 660–72 (2004).

L'évaluation biologique en cours de nos composés nous empêche de conclure sur l'efficacité de l'inhibition d'EBOV par la protéine Niemann-Pick C1. Cependant, les données *in silico* récoltées nous permettent d'affirmer avec certitude l'intérêt de nos molécules en tant que candidat pharmaceutiques. En effet, certaines molécules ont démontré à l'aide de cet outil un potentiel plus élevé que le lead 3.47. Les résultats d'activité et de toxicité sont cependant nécessaires afin de poursuivre le développement des molécules les plus intéressantes *in vivo*.

Suite aux propriétés *in silico* remarquables de ces molécules, la valorisation de ces charpentes benzimidazoliques a été valorisée par le dépôt d'un brevet, actuellement en cours de maturation. Une fois les résultats biologiques connus, nous nous tournerons vers la modulation de ces charpentes en fonction de ces derniers.

Il pourrait notamment être intéressant d'introduire un autre espaceur entre la pipéridine et l'aromatique portant le phosphonate, seule partie de la molécule n'ayant pas encore subi de modification. Sa modification par des bioisostères tels que le cyclopropane²⁰¹ et le bicyclo[1.1.1]pentane²⁰² pourrait permettre l'augmentation de la lipophilie, seul paramètre réellement handicapant dans le profil ADME.

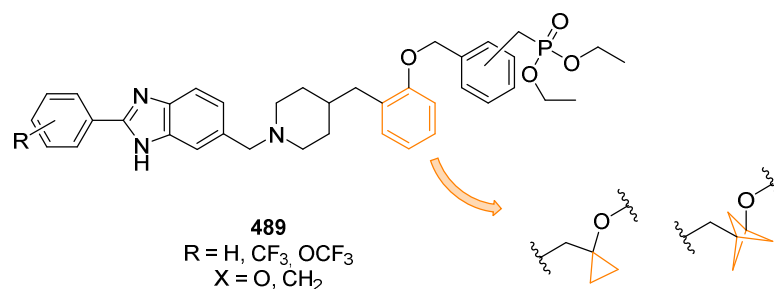


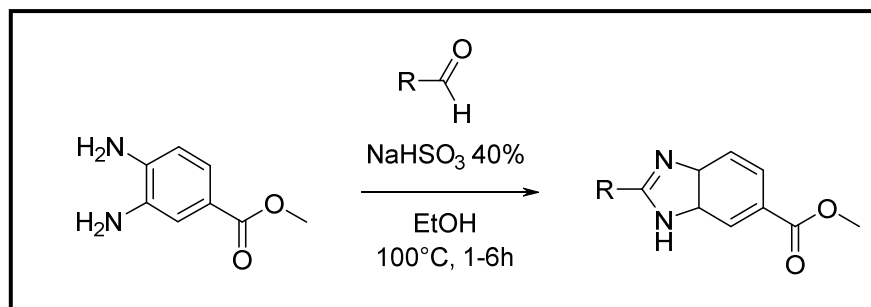
Figure 91. Proposition de modifications

²⁰¹ Qiao, J. X. *et al.* Achieving structural diversity using the perpendicular conformation of alpha-substituted phenylcyclopropanes to mimic the bioactive conformation of ortho-substituted biphenyl P4 moieties: Discovery of novel, highly potent inhibitors of Factor Xa. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 4118-4123 (2008).

²⁰² Stepan, A. F. *et al.* Application of the Bicyclo[1.1.1]pentane Motif as a Nonclassical Phenyl Ring Bioisostere in the Design of a Potent and Orally Active γ -Secretase Inhibitor. *J. Med. Chem.* **55**, 3414-3424 (2012).

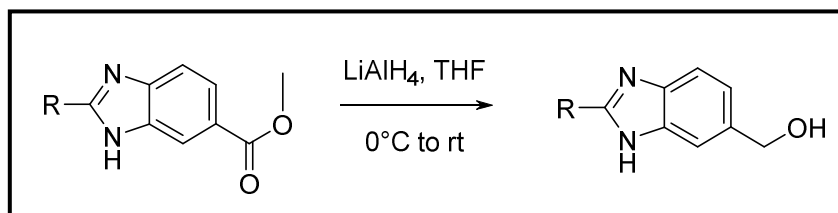
EXPERIMENTAL PART

GENERAL PROCEDURE 1



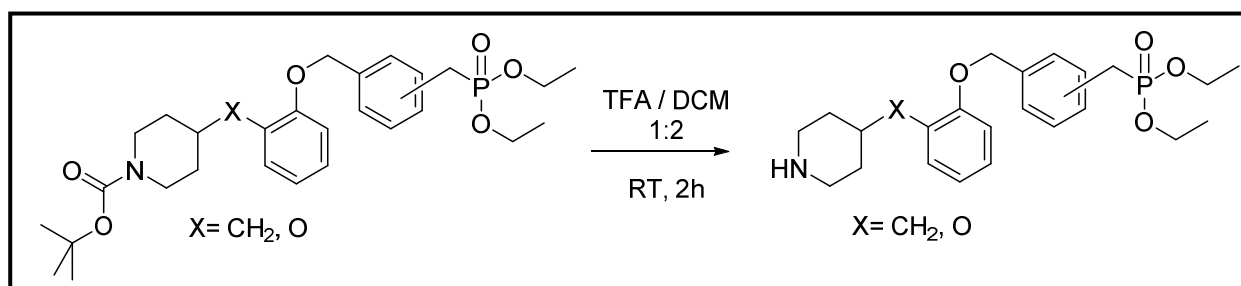
A solution of aldehyde (1eq.) in 40% $NaHSO_3$ was stirred 1h at room temperature. To this solution was added methyl 3,4-diaminobenzoate (1 eq.), and the mixture was refluxed at $100^\circ C$ during 1-6h. After evaporation of all volatiles, the residue was dissolved in $EtOAc$ and H_2O , extracted thrice with $EtOAc$, washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. Then the crude compound was purified by silica gel chromatography ($PE/EtOAc$) to afford desired products as white-creamy solid.¹

GENERAL PROCEDURE 2



Under Ar atmosphere, to a cooled solution of $LiAlH_4$ (2 eq.) in THF at $0^\circ C$, a solution of methyl 2-substituted methyl benzimidazole-5-carboxylate (1 eq.) in THF was slowly added. After removal of the ice bath, the mixture was stirred until the completion of the reaction (generally 2-4h). When no more starting material was seen on TLC, water and $EtOAc$ were added, and the aqueous phase was extracted three times with $EtOAc$. The organic phases were then washed with brine, dried over $MgSO_4$ and evaporated to afford desired products as white solids.

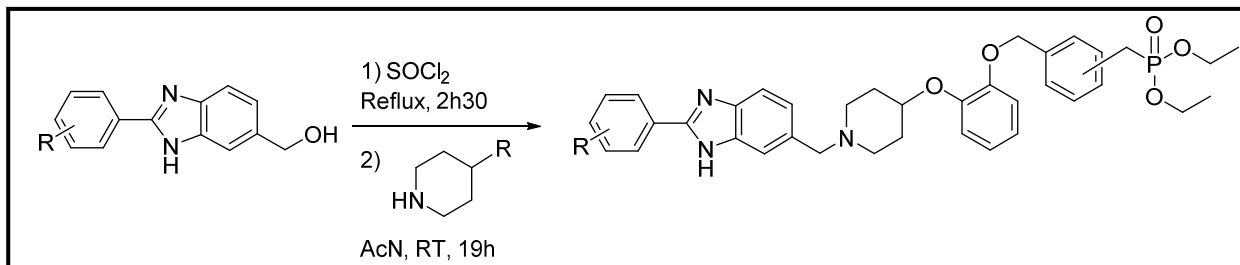
GENERAL PROCEDURE 3



Trifluoroacetic acid (100 eq.) was added dropwise to a mixture of Boc-compound (1 eq.) in CH_2Cl_2 (2:1 CH_2Cl_2/TFA v/v). The reaction was stirred at room temperature for 2h and then volatiles were removed

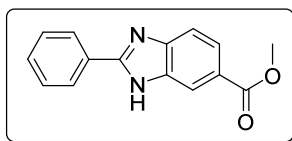
under reduced pressure. The crude product was extracted with EtOAc, washed with NaHCO₃ until pH 7, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under vacuum. Pure compounds were obtained after purification by flash column chromatography with DCM/MeOH (95:5) as eluent.

GENERAL PROCEDURE 4



To a flask containing benzimidazole derivative (1 eq.), SOCl₂ (29 eq.) was added and the resulted mixture was stirred for 2h30 at 80°C. After cooling to room temperature, SOCl₂ was evaporated and the obtained solid was diluted with AcN (4 mL) and cooled to 0°C. Then, to this solution, piperidine derivative (1 eq.) and diisopropylethylamine (5.3 eq.) were added. The ice bath was removed and the reaction mixture was allowed to stir for 16-19h at room temperature. After concentration, the crude product was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH) to give the desired product.

5-methyl carboxylate-2-phenyl-benzimidazole **367**



Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₂
Molecular Weight: 252,27

The title compound was prepared from benzaldehyde (0.4 mL, 1 eq., 3.94 mmol) following the general procedure 1. Compound **367** (0.97 g, 97%) was obtained as a white solid.

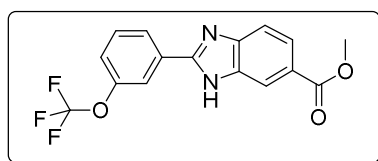
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (s, 1H, NH), 8.18 – 8.10 (m, 2H, H^{Ar}), 8.00 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.53 – 7.45 (m, 3H, H^{Ar}), 3.97 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.97 (C=O), 130.99(C^{Ar}), 129.44(C^{Ar}), 129.38(C^{Ar}), 127.08(C^{Ar}), 125.02(C^{Ar}), 124.70(C^{Ar}), 52.42 (CH₃).

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₁₃N₂O₂ 253.0972 found 253.0974.

CAS: 69570-97-4

Methyl 2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazole-6-carboxylate **368**



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₃
Molecular Weight: 336,27

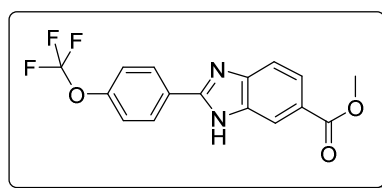
The title compound was prepared from 3-trifluoromethoxybenzaldehyde (0.75 mL, 1 eq., 5.3 mmol), in presence of 40% NaHSO₃ (5.4 mL), methyl 3,4-diaminobenzoate (881 mg, 1 eq., 5.3 mmol) and EtOH (3 mL) following the general procedure 1. Compound **368** (1.61 g, 91%) was obtained as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.24 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H^{Ar}), 8.16 (s, 1H, H^{Ar}), 7.88 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.75 (m, 2H, H^{Ar}), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 3.89 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.12 (C=O), 153.88 (C^{quat}), 152.66 (C^{quat}), 149.31 (C^{quat}), 132.26 (C^{Ar}), 131.81 (C^{quat}), 126.20 (C^{Ar}), 124.27 (C^{Ar}), 123.31 (C^{Ar}), 119.39 (C^{Ar}), 52.53 (CH₃)

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -56.71

Methyl 2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazole-6-carboxylate **369**



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₃

Molecular Weight: 336,27

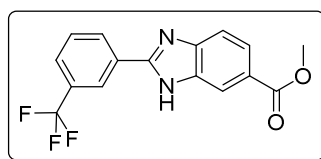
The title compound was prepared from 4-trifluoromethoxybenzaldehyde (0.75 mL, 1 eq., 5.3 mmol), in presence of 40% NaHSO₃ (5.4 mL), methyl 3,4-diaminobenzoate (881 mg, 1 eq., 5.3 mmol) and EtOH (3 mL) following the general procedure 1. Compound **369** (1.38 g, 78%) was obtained as a light yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 8.21 (s, 1H, H^{Ar}), 7.87 (dt, *J* = 8.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.59 3.88 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 167.15 (C=O), 152.98 (C^{quat}), 150.12 (C^{quat}), 129.31 (C^{Ar}), 129.25 (C^{Ar}), 126.73 (C^{Ar}), 124.11 (C^{Ar}), 123.96 (C^{Ar}), 121.99 (C^{Ar}), 121.77 (C^{Ar}), 52.50 (CH₃).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -56.64

5-methyl carboxylate-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzimidazole **370**



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂

Molecular Weight: 320,27

The title compound was prepared from 3-trifluoromethyl-benzaldehyde (0.24 mL, 1 eq., 1.8 mmol) following the general procedure 1. Compound **370** (0.44 g, 76%) was obtained as a white solid.

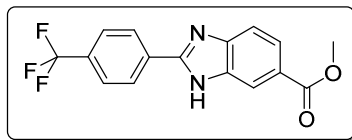
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.45 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H^{Ar}), 8.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 8.22 (s, 1H, H^{Ar}), 7.92 – 7.80 (m, 3H, H^{Ar}), 7.75 – 7.68 (m, 1H, H^{Ar}), 3.88 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.64, 152.21, 130.60, 130.55, 130.36, 130.03, 129.71, 126.85, 126.82, 125.35, 123.84, 123.66, 123.14, 123.10, 122.64, 52.05.

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -61.32.

HRMS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₁₂F₃N₂O₂ 321.0845 found 321.0848.

5-methyl carboxylate-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-benzimidazole 371



Chemical Formula: C₁₆H₁₁F₃N₂O₂
Molecular Weight: 320,27

The title compound was prepared from 4-trifluoromethyl-benzaldehyde (0.41 mL, 1 eq., 3.00 mmol) following the general procedure 1. Compound **371** (0.90 g, 93%) was obtained as a white solid.

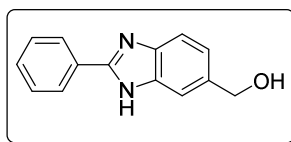
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.51 (s, 1H, NH), 8.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H^{Ar}), 8.35 – 7.99 (m, 1H, H^{Ar}), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.92 – 7.82 (m, 1H, H^{Ar}), 7.81 – 7.59 (m, 1H, H^{Ar}), 3.88 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.63 (C=O), 133.31(C^{Ar}), 130.33(C^{Ar}), 127.43(C^{Ar}), 126.05(C^{Ar}), 126.01(C^{Ar}), 125.40(C^{Ar}), 122.69(C^{Ar}), 111.82(C^{quat}), 52.05 (CH₃).

¹⁹F NMR: (376 MHz, DMSO) δ -61.30.

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₁₂F₃N₂O₂ 321.0845 found 321.0848.

5-hydroxymethyl-2-phenyl-benzimidazole 372



Chemical Formula: C₁₄H₁₂N₂O
Molecular Weight: 224,26

The title compound was prepared from **367** (0.10 g, 1 eq, 0.4 mmol) following the general procedure 2. Compound **372** (0.09 g, quant.) was obtained as a white solid.

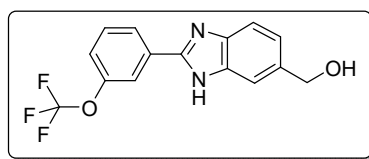
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.86 (s, 1H, NH), 8.16 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.76 – 7.36 (m, 5H, H^{Ar}), 7.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.20 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, OH), 4.60 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 130.24(C^{Ar}), 129.70(C^{Ar}), 128.91(C^{Ar}), 126.31(C^{Ar}), 63.40 (CH₂).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₃N₂O 225.1022 found 225.1024.

CAS : 361457-34-3

{2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl}methanol 373



Chemical Formula: C₁₅H₁₁F₃N₂O₂
Molecular Weight: 308,26

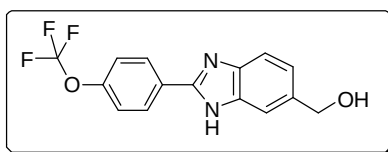
Compound **373** was prepared following general procedure 2, starting from compound **368** (1.61 g, 1 eq., 4.80 mmol), LiAlH₄ (364 mg, 2 eq., 9.59 mmol) in THF (24 mL). The product was isolated as a white solid. (1.41 g, 95%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.05 (bs, 1H, NH), 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 8.13 (s, 1H, H^{Ar}), 7.70 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.56 (s, 1H, H^{Ar}), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.21 (bs, 1H, OH), 4.62 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 150.02 (C^{quat}), 149.33 (C^{quat}), 132.94 (C^{Ar}), 131.64 (C^{quat}), 125.70 (C^{Ar}), 122.54 (C^{Ar}), 121.86 (C^{Ar}), 119.31 (C^{quat}), 118.93 (C^{Ar}), 63.80 (CH₂).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -56.69

{2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl}methanol 374



Chemical Formula: C₁₅H₁₁F₃N₂O₂
Molecular Weight: 308,26

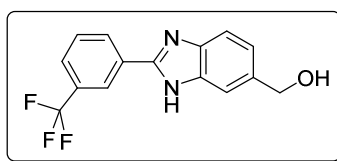
Compound **374** was prepared following general procedure 2, starting from compound **369** (1.38 g, 1 eq., 4.11 mmol), LiAlH₄ (312 mg, 2 eq., 8.22 mmol) in THF (21 mL). The product was isolated as a white solid. (1.21 g, 95%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.94 (s, 1H, NH), 8.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.61 (s, 1H, H^{Ar}), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.51 (s, 1H, H^{Ar}), 7.18 (s, 1H, H^{Ar}), 5.22 (s, 1H, OH), 4.61 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 150.30, 149.62, 144.25, 143.21, 138.14, 136.94, 135.50, 129.98, 128.77 (C^{Ar}), 124.35, 122.68 (C^{quat}), 121.91 (C^{Ar}), 121.80 (C^{Ar}), 121.49 (C^{quat}), 119.25, 118.20 (d, *J* = 157.8 Hz, C^{Ar}), 116.69, 110.53 (d, *J* = 174.2 Hz, C^{Ar}), 63.85 (CH₂).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO) δ -56.68

5-hydroxymethyl-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzimidazole 375



Chemical Formula: $C_{15}H_{11}F_3N_2O$
Molecular Weight: 292,26

The title compound was prepared from **370** (0.31 g, 1 eq., 0.96 mmol) following the general procedure 2. Compound **375** (0.27 g, 95%) was obtained as a white solid.

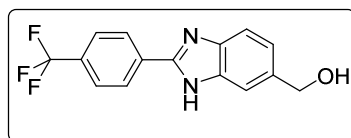
^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.44 (s, 1H, H^{Ar}), 8.34 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H^{Ar}), 7.85 – 7.71 (m, 2H, H^{Ar}), 7.69 – 7.55 (m, 2H, H^{Ar}), 7.31 (dd, $J = 8.3, 0.9$ Hz, 1H, H^{Ar}), 4.75 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 151.92, 132.76, 132.44, 132.10, 131.14, 127.66, 127.62, 126.77, 124.41, 124.37, 124.07, 65.55.

^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.33.

HRMS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{12}F_3N_2O$ 293.0896 found 293.0901.

5-hydroxymethyl-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-benzimidazole 376



Chemical Formula: $C_{15}H_{11}F_3N_2O$
Molecular Weight: 292,26

The title compound was prepared from **371** (0.40 g, 1 eq., 1.25 mmol) following the general procedure 2. Compound **376** (0.35 g, 94%) was obtained as a white solid.

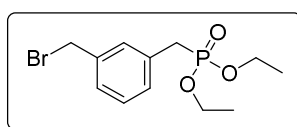
^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H^{Ar}), 7.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H^{Ar}), 7.62 – 7.49 (m, 2H, H^{Ar}), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H^{Ar}), 5.21 (s, 1H, OH), 4.62 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 149.58(C^{quat}), 134.01(C^{Ar}), 129.68(C^{Ar}), 126.95(C^{Ar}), 125.96(C^{Ar}), 125.92(C^{Ar}), 125.50(C^{Ar}), 122.79(C^{Ar}), 63.32 (CH_2).

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO) δ -61.16.

HRMS (ESI): m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{15}H_{12}F_3N_2O$ 293.0896 found 293.0900.

diethyl 3-(bromomethyl)benzylphosphonate 379



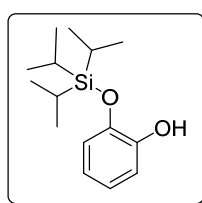
Chemical Formula: $C_{12}H_{18}BrO_3P$
Molecular Weight: 321,15

In a 2-5 mL vial, α,α' -dibromo-m-xylene (2 g, 2 eq., 7.6 mmol) was dissolved into DMF (4 mL), followed by the addition of triethylphosphite (650 μ L, 1 eq., 3.8 mmol). The mixture was then activated 2 minutes at 150°C under microwave irradiation. The obtained residue was dissolved in 20 mL of water and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 40 mL). The organic phases were washed 5 times with water (5 x 20 mL), brine (2 x 20 mL), dried over MgSO_4 and reduced *in vacuo*. The residue was purified onto a silica gel column chromatography (eluting PE/EtOAc 7:3 to 3:7), giving the desired compound **379** as a colorless oil. (1.09 g, 90%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.30 (m, 4H, H^{Ar}), 4.49 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 4.12 – 3.94 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.16 (d, J = 21.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-P}$), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH_3).

CAS : 120667-42-7

2-triisopropylsilyloxyphenol **381**



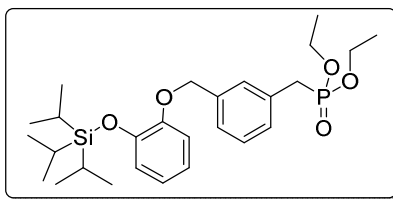
Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{Si}$
Molecular Weight: 266,46

In a 0.5-2 mL vial, catechol (500 mg, 1 eq., 4.54 mmol) and imidazole (925 mg, 3 eq., 13.60 mmol) were allowed to react with triisopropylsilane chloride (1.46 mL, 1.5 eq., 6.81 mmol). The tube was sealed and irradiated under microwave at 100°C for 6 minutes. After evaporation of all volatiles under reduced pressure, the residue was then purified by flash column chromatography (pure PE) affording compound **381** as a white solid. (1.2 g, 90%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.80 (m, 4H, H^{Ar}), 5.58 (s, 1H, OH), 1.30 (3 x sept, 3H, CH-Si), 1.10 (2 x s, 18H, $\text{CH}_3\text{-CH}$),

CAS : 308365-52-8

[2-[[3-(diethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methoxy]phenoxy]-triisopropyl-silane **382**



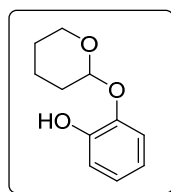
Chemical Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_5\text{PSi}$
Molecular Weight: 506,69

381 (456 mg, 1.1 eq., 1.71 mmol) was dissolved in DMF (5 mL) in a 5-10 mL microwave vial. To this solution were added potassium carbonate (431 mg., 2 eq., 3.12 mmol), compound **379** (500 mg, 1 eq., 1.56 mmol) and few crystals of sodium iodide (catalytic amount). The solution was then stirred 20 min. at 80°C under microwave irradiation. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel chromatography (PE/EtOAc 7:3) to afford desired product **382** as a colorless oil. (260 mg, 33%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 4H, H^{Ar}), 6.83 (m, 4H, H^{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-O-Ar), 3.97 (ddq, *J* = 8.0, 6.9, 1.6 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.12 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.19 (m, 9H, CH-CH₃, CH₃ Phosph), 1.05 (s, 9H, CH₃-CH), 1.02 (s, 6H, CH₃-CH).

HRMS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₇H₄₄O₅PSi 507.2696 found 507.2689.

2-(oxan-2-yloxy)phenol **383**



Chemical Formula: C₁₁H₁₄O₃
Molecular Weight: 194.23

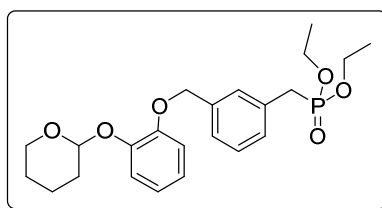
Catechol (2 g, 1 eq., 18.2 mmol) and dihydropyran (1.66 mL, 1 eq., 18.2 mmol) were added to a solution of pyridinium *p*-toluenesulfonate (46 mg, 1 mol%, 0.182 mmol) in DCM (35 mL). The solution was then stirred at room temperature for 3 hours, and the solvent were removed *in vacuo*. The resulted mixture was then dissolved in EtOAc, washed twice with NaHCO₃, once with brine, dried over MgSO₄ and concentrated to afford pure compound **383** (3.30 g, 94%) as a light yellow oil.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (ddd, *J* = 7.9, 1.1, 0.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.93 (m, 2H, H^{Ar}) 6.79 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.16 (dd, *J* = 5.2, 2.8 Hz, 2H, O-CH-O), 3.98 (m, 1H, CH₂-O), 3.57 (m, 1H, CH₂-O), 1.79 (m, 7H, CH₂).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+Na]⁺ calcd for C₁₁H₁₄NaO₂ 217.0840, found 217.0836

CAS : 21645-25-0

Diethyl ((3-[2-(oxan-2-yloxy)phenoxy]methyl)phenyl)methyl)phosphonate **384**



Chemical Formula: C₂₃H₃₁O₆P
Molecular Weight: 434.47

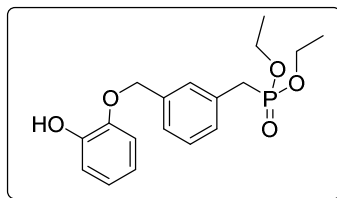
Compound **383** (665 mg, 1.1 eq., 3.43 mmol) was dissolved in DMF (10 mL) in a 10-20 mL microwave vial. To this solution were added potassium carbonate (868 mg., 2 eq., 6.28 mmol), compound **379** (1 g, 1eq., 3.14 mmol) and few crystals of sodium iodide (catalytic amount). The solution was then stirred 20 min. at 80°C under microwave irradiation. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel chromatography to afford desired product **384** as a colorless oil. (974 mg, 72%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 4H, H^{Ar}), 7.07 (s, 1H, H^{Ar}) 6.88 (m, 3H, H^{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-O- Ar), 3.97 (m, 5H, CH₂-O-P, O-CH-O), 3.57 (m, 1H, CH₂-O THP) 3.12 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.11-1.44 (m, 7H, CH₂ THP), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 26.21

HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NaO}_6\text{P}$ 457.1756, found 457.1760

Diethyl {[3-(2-hydroxyphenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **385**



Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{P}$
Molecular Weight: 350,35

To a solution of phosphonate **384** (1.60 g, 1 eq., 3.6 mmol) in ethanol (37 mL) pyridium p-toluenesulfonate (45 mg, 5 mol%, 0.18 mmol) was added. The mixture was then stirred at 55°C for 3 hours, followed by the evaporation of all volatiles. The residue was then purified by flash chromatography, eluting Petroleum Ether/EtOAc 65:35 to 1:1, to give unprotected compound **385** as a light brown oil. (1.28 g, quant.)

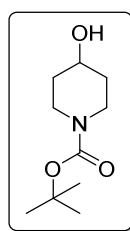
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (m, 4H, H^{Ar}), 6.89 (m, 4H, H^{Ar}), 5.75 (s, 1H, OH), 5.10 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.01 (ddq, $J = 8.2, 7.1, 3.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 3.17 (d, $J = 21.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-P}$), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 145.99 (C^{quat}), 145.76 (C^{quat}), 136.77 (d, $J = 3.2$ Hz, C^{quat}), 132.28 (d, $J = 9.0$ Hz, C^{quat}), 129.79 (d, $J = 6.7$ Hz, C^{Ar}), 129.11 (d, $J = 6.6$ Hz, C^{Ar}), 128.91 (d, $J = 3.0$ Hz, C^{Ar}), 126.26 (d, $J = 3.5$ Hz, C^{Ar}), 121.88 (C^{Ar}), 120.08 (C^{Ar}), 114.86 (C^{Ar}), 112.37 (C^{Ar}), 70.91 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 62.17 (d, $J = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 33.77 (d, $J = 138.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$), 16.37 (d, $J = 5.9$ Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 26.05

HRMS-ESI (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{P}$ 351.1362, found 351.1360

tert*-Butyl 4-hydroxypiperidine-1-carboxylate **388*



Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_3$
Molecular Weight: 201,27

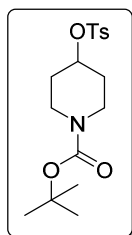
tert-Butyl 4-oxopiperidine-1-carboxylate (5 g, 1 eq., 25.1 mmol) was dissolved in MeOH (50 mL) under inert atmosphere. This solution was cooled at 0°C and sodium borohydride was subsequently added portionwise (950 mg, 1 eq., 25.1 mmol). The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for 20h. The solution was carefully quenched at 0°C with 2N sodium hydroxide (20 mL), followed by evaporation of all volatiles. The mixture was then dissolved in EtOAc (40 mL) and water (20 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 40 mL), the organic phases were washed with H_2O (20 mL), brine (20 mL), dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Purification by silica gel column chromatography (Petroleum Ether/EtOAc 8:2) afforded desired product **388** as a white solid. (4.8 g, 95%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.05 (d, *J* = 7.9, 1.1, 0.6 Hz, 1H), 6.97 – 6.88 (m, 2H), 6.85 – 6.72 (m, 1H), 6.54 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 5.16 (dd, *J* = 5.0, 2.4 Hz, 1H), 4.05 – 3.92 (m, 1H), 3.68 – 3.52 (m, 1H), 2.02 – 1.49 (m, 7H).

HRMS-ESI (*m/z*) : [M+H]⁺calcd for C₁₀H₂₀NO₃ 202.1443, found 202.1436

CAS : 109384-19-2

tert*-Butyl 4-[(4-methylbenzenesulfonyl)oxy]piperidine-1-carboxylate **389*



Chemical Formula: C₁₇H₂₅NO₅S
Molecular Weight: 355.45

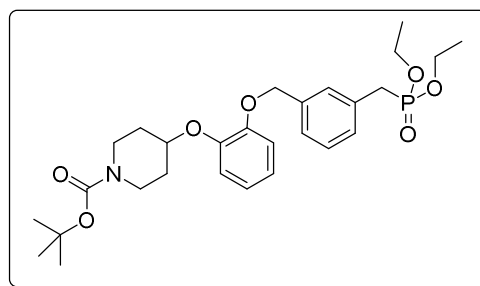
To a solution of compound **388** (5 g, 1 eq., 24.8 mmol) in DCM (50 mL), triethylamine (13.9 mL, 4 eq., 99.4 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (9.47 g, 2 eq., 49.7 mmol) were added. The mixture was stirred 20h at room temperature followed by the concentration of this solution *in vacuo*. The residue was then dissolved in DCM (20 mL) and water (20 mL), extracted with DCM (20 mL), washed with 1N HCl (40 mL), extracted twice with DCM (2 x 40 mL), dried over MgSO₄ and evaporated. The crude was then purified by silica gel column chromatography (Petroleum ether/EtOAc 8:2) to afford desired product **389** as a white crystalline solid. (8.7 g, 99%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 4.68 (tt, *J* = 7.5, 4.0 Hz, 1H, H⁴), 3.58 (ddd, *J* = 13.6, 7.4, 4.2 Hz, 2H, H², H⁶), 3.25 (ddd, *J* = 13.7, 7.4, 4.2 Hz, 2H, H², H⁶), 2.45 (s, 3H, CH₃), 1.72 (m, 4H, H³, H⁵), 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺calcd for C₁₇H₂₆NO₅S 356.1532, found 356.1525

CAS : 118811-07-7

tert*-butyl 4-[[2-({3-[(diethoxyphosphoryl)methyl]phenyl}methoxy)phenyl]methyl]piperidine-1-carboxylate **391*



Chemical Formula: C₂₈H₄₀NO₇P
Molecular Weight: 533.60

In a 2-5 mL microwave vial, phosphonate compound **385** (100 mg, 1 eq., 0.29 mmol) was dissolved in dimethylacetamide (DMA, 2.5 mL). To this solution potassium carbonate (81 mg, 2 eq., 0.57 mmol) and compound **389** (152 mg, 1.5 eq., 0.43 mmol) were afterwards added. This reaction mixture was stirred at 140°C for 30 min under microwave irradiation. The resulting residue was dissolved in EtOAc (10 mL) and water (5 mL), and the aqueous phase was extracted thrice with EtOAc (3 x 10 mL). The organic phases were then washed 5 times with water (5 x 5 mL), once with brine (5 mL) and dried over magnesium sulfate. The crude was concentrated under reduced pressure and purified by silica gel column chromatography, eluting DCM / MeOH 99:1, to afford desired product **391** as colorless oil. (100 mg, 71%)

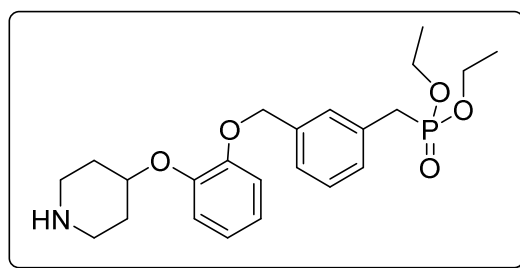
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.29 (m, 3H, H^{Ar}), 7.19 (s, 1H, H^{Ar}), 7.01 (m, 2H, H^{Ar}), 6.85 (m, 2H, H^{Ar}), 5.03 (s, 2H, CH₂-O), 4.41 (m, 1H, H⁴ pip), 3.87 (ddq, *J* = 6.9, 6.1, 0.4 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.56 (m, 2H, H², H⁶ pip), 3.17 (d, *J* = 21.5 Hz, 2H, CH₂-P), 3.15 (m, 2HH², H⁶ pip), 1.79 (s, 2H, H³, H⁵ pip), 1.51 (s, 2H, H³, H⁵ pip), 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.07 (dt, *J* = 6.9, 0.4 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 154.36 (C=O), 150.05 (C^{quat}), 147.18 (C^{quat}), 137.83 (d, *J* = 3.0 Hz, C^{quat}), 132.88 (d, *J* = 8.7 Hz, C^{quat}), 129.61 (d, *J* = 6.8 Hz, C^{Ar}), 129.07 (d, *J* = 6.8 Hz, C^{Ar}), 128.74 (d, *J* = 2.5 Hz, C^{Ar}), 126.00 (d, *J* = 3.7 Hz, C^{Ar}), 122.57 (C^{Ar}), 121.79 (C^{Ar}), 118.59 (C^{Ar}), 115.52 (C^{Ar}), 79.11 (C^{quat} Boc), 74.19 (C⁴ pip), 70.43 (CH₂-O), 61.83 (d, *J* = 6.5 Hz, CH₂-O-P), 39.74 (C², C⁶ pip, under DMSO peak), 32.71 (d, *J* = 134.0 Hz, CH₂-P), 31.00 (C³, C⁵ pip), 28.53 (CH₃ Boc), 16.64 (d, *J* = 5.9 Hz, CH₂-O-P).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO) δ 26.34

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₄₁NO₇P 534.2621, found 534.2615.

Diethyl ({3-[2-(piperidin-4-ylmethyl)phenoxy]methyl}phenyl)methylphosphonate **377**



Chemical Formula: C₂₃H₃₂NO₅P
Molecular Weight: 433.4848

Following general procedure 3, trifluoroacetic acid (1.5 mL, 100 eq., 19.7 mmol) was added to a solution of compound **391** (105 mg, 1 eq., 0.197 mmol) in DCM (3 mL). Pure compound **377** was obtained after flash column chromatography (DCM/MeOH 95:5), affording desired product as an orange solid. (58 mg, 68%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.29 (m, 1H, H^{Ar}), 7.15 (m, 2H, H^{Ar}), 6.96 (m, 4H, H^{Ar}), 4.98 (s, 2H, CH₂-O), 4.60 (s, 1H, H⁴ pip), 3.95 (2x ddq, *J* = 7.6, 6.6, 0.5 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.32 (td, *J* = 12.9, 3.8 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 3.12 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂-P), 3.09 (m, 2H, H², H⁶ pip), 2.25 (tdd, *J* = 12.8, 4.7, 2.2 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.96 (dd, *J* = 13.1, 2.9 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.22 (td, *J* = 7.1, 0.5 Hz, 6H, CH₃).

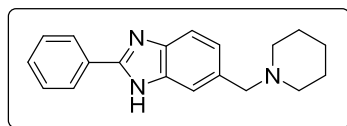
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 150.77 (C^{quat}), 146.38 (C^{quat}), 137.04 (d, *J* = 3.4 Hz, C^{quat}), 131.41 (d, *J* = 9.5 Hz, C^{quat}), 129.87 (d, *J* = 6.7 Hz, C^{Ar}), 128.91 (d, *J* = 6.0 Hz, C^{Ar}), 126.78 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{Ar}), 124.51 (d, *J* = 5.0 Hz, C^{Ar}).

C^{Ar}), 123.47(C^{Ar}), 121.87(C^{Ar}), 119.29(C^{Ar}), 114.14(C^{Ar}), 71.32(C^4 pip), 70.80 (CH_2 -O), 63.09 (d, J = 6.9 Hz, CH_2 -O-P), 39.44(C^2 , C^6 pip), 32.96 (d, J = 139.5 Hz, CH_2 -P), 26.66(C^3 , C^5 pip), 16.06 (d, J = 6.2 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 26.57

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{23}H_{33}NO_5P$ 434.2097, found 434.2094

2-phenyl-6-(1-piperidylmethyl)-1H-benzimidazole **395**



Chemical Formula: $C_{19}H_{21}N_3$
Molecular Weight: 291,40

Method A:

To a flask containing benzimidazole derivative **372** (100 mg, 1 eq., 0.46 mmol) in DCM (5 mL), $MsCl$ (53 mg, 1 eq., 0.46 mmol) and diisopropylethylamine (115 μ L, 1.5 eq., 0.67 mmol) were added at 0°C. After 3h at room temperature, the resulted mixture was evaporated and the obtained solid was diluted with AcN (4 mL) and cooled to 0°C. Then, to the obtained solution, piperidine (46 μ L, 1 eq., 0.46 mmol) and diisopropylethylamine (415 μ L, 5.3 eq., 2.44 mmol) were added. The ice bath was removed and the reaction mixture was allowed to stir for 19h at room temperature. After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **395** was obtained as a white solid. (58 mg, 48%)

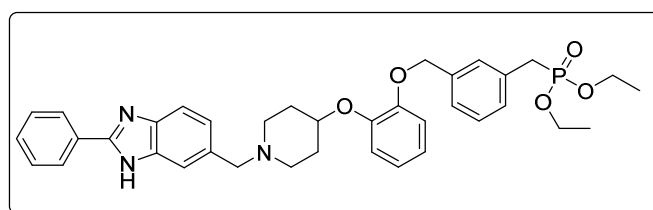
Method B:

The title compound **395** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **372** (100 mg, 1 eq., 0.46 mmol), $SOCl_2$ (976 μ L, 29 eq., 13.37 mmol) and then piperidine (46 μ L, 1 eq., 0.46 mmol), diisopropylethylamine (415 μ L, 5.3 eq., 2.44 mmol) in AcN (5 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **395** was obtained as a white solid. (78 mg, 60%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.25 (m, 2H, H^{Ar}), 7.78 (s, 1H, H^{Ar}), 7.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.31 (m, 4H, H^{Ar}), 4.09 (s, 2H, CH_2 -N), 2.91 (bs, 4H, H^2 pip, H^6 pip), 1.81 (bs, 4H, H^3 pip, H^5 pip), 1.41 (bs, 2H, H^4 pip).

HRMS (ESI) : m/z [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{19}H_{22}N_4$ 292.1814 found 292.1811.

diethyl ((3-[2-({1-[(2-phenyl-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl}oxy)phenoxy)methyl]phenyl)methyl)phosphonate **397**



Chemical Formula: $C_{37}H_{42}N_3O_5P$
Molecular Weight: 639,73

The title compound **397** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **372** (22 mg, 1 eq., 0.099 mmol), SOCl₂ (210 μL, 29 eq., 2.87 mmol) and then compound **377** (43 mg, 1 eq., 0.099 mmol), diisopropylethylamine (90 μL, 5.3 eq., 0.53 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **397** was obtained as an amorphous creamy solid. (24 mg, 38%)

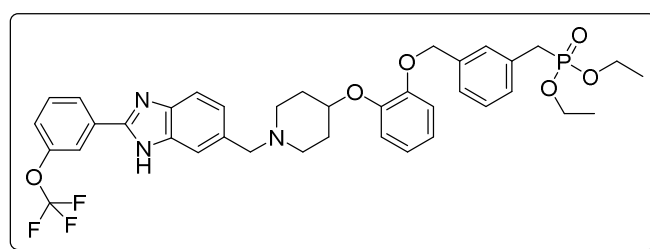
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.57 (m, 5H, H^{Ar}), 7.33 (m, 5H, H^{Ar}), 7.03 (m, 2H, H^{Ar}), 6.91 (m, 2H, H^{Ar}), 5.06 (s, 2H, CH₂-O), 4.43 (s, 1H, H⁴pip), 3.98 (ddq, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.84 (s, 2H, CH₂-N), 3.23 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.99 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.62 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.97 (m, 4H, H³, H⁵ pip), 1.20 (td, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 152.28 (C^{quat}), 150.16 (C^{quat}), 147.08 (C^{quat}), 137.88 (d, *J* = 3.3 Hz, C^{quat}), 131.61 (d, *J* = 9.4 Hz, C^{Ar}), 130.13 (C^{Ar}), 129.47 (C^{quat}), 129.13 (d, *J* = 6.6 Hz, C^{Ar}), 128.78 (C^{Ar}), 128.73 (d, *J* = 7.0 Hz, C^{Ar}), 128.32 (d, *J* = 3.4 Hz, C^{Ar}), 126.44 (C^{Ar}), 125.92 (d, *J* = 3.7 Hz, C^{Ar}), 122.36 (C^{Ar}), 121.44 (C^{Ar}), 118.51 (C^{Ar}), 115.19 (C^{Ar}), 70.54 (CH₂-O), 62.35 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 62.21 (CH₂-N), 49.29 (C², C⁶ pip), 32.32 (d, *J* = 137.7 Hz, CH₂-P), 29.41 (C³, C⁵ pip), 15.25 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.36

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₇H₄₃N₃O₅P 640.2941, found 640.2938

diethyl {[3-(2-[[1-({2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl]oxy}phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **398**



Chemical Formula: C₃₈H₄₁F₃N₃O₆P
Molecular Weight: 723.73

The title compound **398** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **373** (27 mg, 1 eq., 0.088 mmol), SOCl₂ (186 μL, 29 eq., 2.56 mmol) and then compound **377** (38 mg, 1 eq., 0.088 mmol), diisopropylethylamine (79 μL, 5.3 eq., 0.47 mmol) in AcN (2 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **398** was obtained as an amorphous creamy solid. (22 mg, 35%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.06 (ddd, *J* = 7.90, 1.6, 1.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 8.01 (s, 1H, H^{Ar}), 7.61 (q, *J* = 8.2 Hz, 3H, H^{Ar}), 7.33 (m, 6H, H^{Ar}), 6.98 (m, 2H, H^{Ar}), 6.88 (m, 2H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, CH₂-O), 4.39 (s, 1H, H⁴pip), 3.94 (ddq, *J* = 8.2, 7.0, 1.1 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.80 (s, 2H, CH₂-N), 3.20 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.95 (s, 2H, H², H⁶ pip), 2.57 (s, 2H, H², H⁶ pip), 1.91 (s, 4H, H³, H⁵ pip), 1.21 – 1.10 (dt, *J* = 7.0, 0.4 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.93 (C^{quat}), 150.15 (C^{quat}), 149.73 (C^{quat}), 147.09 (C^{quat}), 137.88 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{quat}), 131.73 (C^{Ar}), 131.61 (d, *J* = 9.3 Hz, C^{quat}), 130.71 (C^{quat}), 129.10 (d, *J* = 6.5 Hz, C^{Ar}), 128.72 (d, *J* = 6.7 Hz, C^{Ar}), 128.31 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{Ar}), 125.90 (d, *J* = 3.6 Hz, C^{Ar}), 125.01 (C^{Ar}), 122.34 (C^{Ar}), 121.44 (C^{Ar}), 118.93 (C^{Ar}),

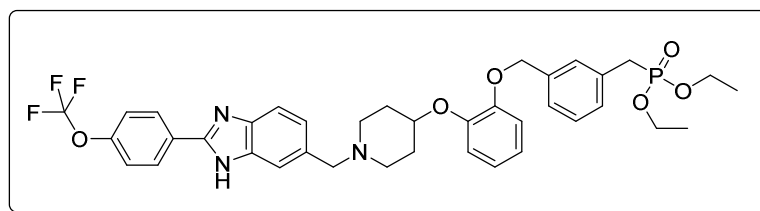
118.48 (C^{Ar}), 115.20 (C^{Ar}), 73.12 (C⁴ pip), 70.53 (CH₂-O), 62.34 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 62.17 (CH₂-N), 49.24 (C², C⁶ pip), 32.33 (d, *J* = 137.5 Hz, CH₂-P), 29.45 (C³, C⁵ pip), 15.25 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.36

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -59.38

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₆P 724.2760, found 724.2757

diethyl {[3-(2-{[1-(2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]-piperidin-4-yl]oxy}-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **399**



Chemical Formula: C₃₈H₄₁F₃N₃O₆P
Molecular Weight: 723.73

The title compound **399** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **374** (37 mg, 1 eq., 0.12 mmol), SOCl₂ (246 μL, 29 eq., 3.34 mmol) and then compound **377** (50 mg, 1 eq., 0.12 mmol), diisopropylethylamine (104 μL, 5.3 eq., 0.64 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **399** was obtained as an amorphous creamy solid. (19 mg, 31%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.63 (s, 2H, H^{Ar}), 7.39 (m, 7H, H^{Ar}), 7.03 (m, 2H, H^{Ar}), 6.92 (m, 2H, H^{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂-O), 4.44 (s, 1H, H⁴pip), 3.99 (dq, *J* = 7.8, 6.8, 3.0 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.83 (s, 2H, CH₂-N), 3.25 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, CH₂-P), 2.98 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.60 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.06 – 1.84 (m, 4H, H³, H⁵ pip), 1.22 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH₃).

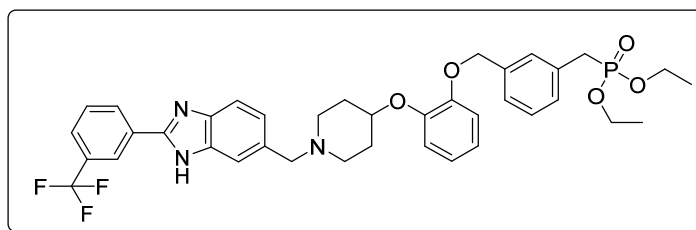
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 151.43 (C^{quat}), 151.25 (C^{quat}), 150.14 (C^{quat}), 147.14 (C^{quat}), 137.91 (d, *J* = 3.3 Hz, C^{quat}), 131.60 (d, *J* = 9.1 Hz, C^{quat}), 129.10 (d, *J* = 6.4 Hz, C^{Ar}), 128.72 (d, *J* = 6.5 Hz, C^{Ar}), 128.60 (C^{Ar}), 128.32 (C^{Ar}), 128.30 (d, *J* = 2.7 Hz, C^{Ar}), 125.90 (d, *J* = 3.7 Hz, C^{Ar}), 122.31 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 121.20 (C^{Ar}), 118.46 (C^{Ar}), 115.24 (C^{Ar}), 70.55 (CH₂-O), 62.35 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 62.32 (CH₂-N), 49.34 (C², C⁶ pip), 32.32 (d, *J* = 137.2 Hz, CH₂-P), 29.57 (C³, C⁵ pip), 15.25 (d, *J* = 6.1 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.36

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -57.38

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₆P 724.2760, found 724.2755

diethyl {[3-(2-{[1-({2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl}-oxy)phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **400**



Chemical Formula: $C_{38}H_{41}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 707,73

The title compound **400** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **375** (34 mg, 1 eq., 0.115 mmol), $SOCl_2$ (243 μ L, 29 eq., 3.35 mmol) and then compound **377** (50 mg, 1 eq., 0.115 mmol), diisopropylethylamine (100 μ L, 5.3 eq., 0.59 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **400** was obtained as an amorphous creamy solid. (20 mg, 24%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.40 (bs, 1H, H^{Ar}), 8.31 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.67 (m, 4H, H^{Ar}), 7.28 (m, 5H, H^{Ar}), 6.90 (m, 4H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, CH_2-O), 4.36 (s, 1H, H^4 pip), 3.94 (ddq, J = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, 4H, CH_2-O-P), 3.71 (s, 2H, CH_2-N), 3.19 (d, J = 21.7 Hz, 2H, CH_2-P), 2.86 (s, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.44 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.91 (dd, J = 12.9, 8.4 Hz, 4H, H^3 , H^5 pip), 1.16 (dt, J = 7.1, 1.0 Hz, 6H, CH_3).

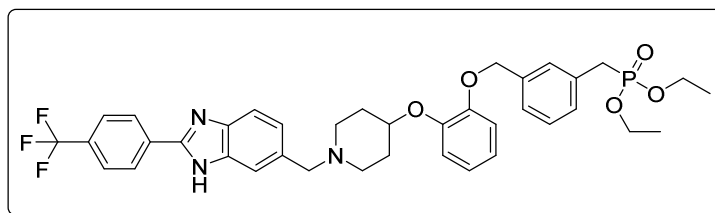
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.79 (C^{quat}), 150.07 (C^{quat}), 147.25 (C^{quat}), 137.94 (d, J = 3.2 Hz, C^{quat}), 131.57 (d, J = 9.4 Hz, C^{quat}), 131.38 (C^{quat}), 131.06 (C^{quat}), 130.65 (C^{quat}), 129.81 (C^{Ar}), 129.79 (C^{Ar}), 129.07 (d, J = 6.7 Hz, C^{Ar}), 128.70 (d, J = 6.7 Hz, C^{Ar}), 128.29 (d, J = 3.1 Hz, C^{Ar}), 126.37 (C^{Ar}), 125.88 (d, J = 3.6 Hz, C^{Ar}), 123.08 (C^{Ar}), 122.15 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 118.31 (C^{Ar}), 115.31 (C^{Ar}), 70.57 (CH_2-O), 62.53 (CH_2-N), 62.34 (d, J = 7.0 Hz, CH_2-O-P), 49.56 (C^2 , C^6 pip), 32.29 (d, J = 137.6 Hz, CH_2-P), 29.89 (C^3 , C^5 pip), 15.29, 15.26 (d, J = 6.0 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.36

^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.31

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{39}H_{42}F_3N_3O_5P$ 708.2811, found 708.2807

diethyl {[3-(2-{[1-({2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]-piperidin-4-yl}oxy)-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **401**



Chemical Formula: $C_{38}H_{41}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 707,73

The title compound **401** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **376** (34 mg, 1 eq., 0.115 mmol), $SOCl_2$ (243 μ L, 29 eq., 3.35 mmol) and then compound **377** (50 mg, 1 eq., 0.115 mmol), diisopropylethylamine (100 μ L, 5.3 eq., 0.59 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica

gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **401** was obtained as an amorphous creamy solid. (19 mg, 22%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.45 (bs, 1H, H^{Ar}), 8.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.83 (m, 1H, H^{Ar}), 7.78 (m, 1H, H^{Ar}), 7.63 (m, 2H, H^{Ar}), 7.42 (bs, 1H, H^{Ar}), 7.32 (m, 4H, H^{Ar}), 7.02 (m, 2H, H^{Ar}), 6.91 (m, 2H, H^{Ar}), 5.06 (s, 2H, CH₂-O), 4.42 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H⁴pip), 3.99 (m, 4H, CH₂-O-P), 3.80 (s, 2H, CH₂-N), 3.25 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.94 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.55 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.96 (m, 4H, H³, H⁵ pip), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

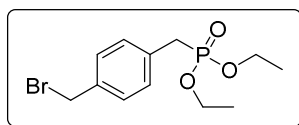
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.87 (C^{quat}), 150.11 (C^{quat}), 147.19 (C^{quat}), 137.94 (d, *J* = 3.0 Hz, C^{quat}), 131.58 (d, *J* = 9.5 Hz, C^{quat}), 131.39 (C^{quat}), 131.06 (C^{quat}), 130.63 (C^{quat}), 129.83 (C^{Ar}), 129.82 (C^{Ar}), 129.77 (C^{Ar}), 129.09 (d, *J* = 6.8 Hz, C^{Ar}), 128.71 (d, *J* = 6.9 Hz, C^{Ar}), 128.30 (d, *J* = 2.8 Hz, C^{Ar}), 126.40 (C^{Ar}), 125.89 (d, *J* = 3.7 Hz, C^{Ar}), 125.36 (C^{Ar}), 123.06 (C^{Ar}), 122.23 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 118.38 (C^{Ar}), 115.28 (C^{Ar}), 70.56 (CH₂-O), 62.38 (CH₂-N), 62.34 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 49.43 (C², C⁶ pip), 32.28 (d, *J* = 138.1 Hz, CH₂-P), 29.75 (C³, C⁵ pip), 15.26 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.36

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.31

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₅P 708.2811, found 708.2808

diethyl 4-(bromomethyl)benzylphosphonate **403**



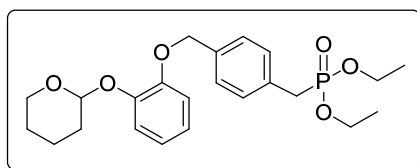
Chemical Formula: C₁₂H₁₆BrO₃P
Molecular Weight: 321.15

In a 2-5 mL vial, α,α'-dibromo-*p*-xylene (2.50 g, 2 eq., 9.47 mmol) was dissolved in DMF (4 mL), followed by the addition of triethylphosphite (811 μL, 1 eq., 4.73 mmol). The mixture was then activated 2 minutes at 150°C under microwave irradiation. The residue was dissolved in 20 mL of water and extracted thrice with ethyl acetate (3 x 40 mL). The organic phases were washed 5 times with water (5 x 20 mL), brine (2 x 20 mL), dried over MgSO₄ and reduced *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluting PE/EtOAc 7:3 to 3:7), giving the desired compound **403** as a colorless oil. (1.2 g, 88%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.28 (m, 2H, H^{Ar}), 4.49 (s, 2H, CH₂-Br), 3.99 (m, 4H, CH₂-O), 3.16 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂-P), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

CAS : 108228-81-5

diethyl ({4-[2-(oxan-2-yloxy)phenoxy]methyl}phenyl)methylphosphonate **404**



Chemical Formula: C₂₃H₃₁O₆P
Molecular Weight: 434.47

In a 10-20 mL microwave vial, compound **403** (1.12 g, 1 eq., 5.74 mmol) was dissolved in DMF (18 mL). To this solution, potassium carbonate (1.58 g, 2 eq., 11.48 mmol), compound **405** (2.03 g, 1.1 eq., 6.32 mmol) and few crystals of sodium iodide (catalytic amount) were added. The mixture was then stirred 20 min. at 80°C under microwave irradiation. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel chromatography to afford desired product **404** as a colorless oil. (1.42g, 57%).

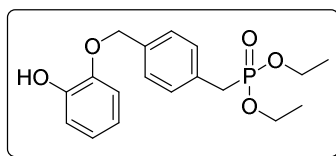
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.30 (dd, *J* = 8.2, 2.5 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.15 (m, 1H, H^{Ar}), 6.93 (m, 3H, H^{Ar}), 5.43 (s, 1H, H^{anomeric}), 5.09 (t, *J* = 2.1 Hz, 2H, CH₂-O), 4.01 (m, 4H, CH₂-O-Phosph), 3.60 (m, 1H, H⁵), 3.15 (d, *J* = 21.6 Hz, 2H, CH₂-P), 2.16 – 1.79 (m, 3H, H^{2/3/4/5}), 1.74 – 1.56 (m, 4H, H^{2/3/4/5}), 1.23 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.45 (C^{quat}), 147.16 (C^{quat}), 136.13 (d, *J* = 3.6 Hz, C^{quat}), 131.11 (d, *J* = 9.3 Hz, C^{quat}), 129.83 (d, *J* = 6.8 Hz, C^{Ar}), 127.42 (d, *J* = 3.0 Hz, C^{Ar}), 122.58 (C^{Ar}), 121.84 (C^{Ar}), 118.56 (C^{Ar}), 115.58 (C^{Ar}), 97.61 (C^{anomeric}), 71.06 (CH₂-O), 62.12 (d, *J* = 6.8 Hz, CH₂-O-P), 61.99 (C⁵), 33.55 (d, *J* = 138.1 Hz, CH₂-P), 30.39 (C^{2/3/4}), 25.30 (C^{2/3/4}), 18.72 (C^{2/3/4}), 16.36 (d, *J* = 5.9 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.27

HRMS-ESI (*m/z*) [M+Na]⁺ calcd for C₂₃H₃₁NaO₆P 457.1756, found 457.1760

diethyl {[4-(2-hydroxyphenoxy)methyl]phenyl}methyl}phosphonate **405**



Chemical Formula: C₁₈H₂₃O₅P
Molecular Weight: 350.35

To a solution of phosphonate **404** (1.16 g, 1 eq., 2.67 mmol) in ethanol (27 mL) pyridium p-toluenesulfonate (34 mg, 5 mol%, 0.13 mmol) was added. The mixture was then stirred at 55°C for 3 hours, followed by the evaporation of all volatiles. The residue was then purified by flash chromatography, eluting Petroleum Ether/EtOAc 65:35 to 1:1, to give unprotected compound **405** as a white solid. (936 mg, quantitative yield)

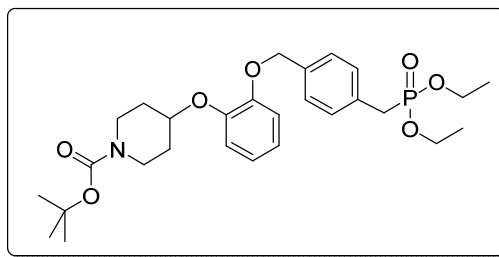
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (m, 4H, H^{Ar}), 6.89 (m, 4H, H^{Ar}), 5.68 (s, 1H, OH), 5.08 (s, 2H, CH₂-O), 4.02 (ddq, *J* = 10.2, 7.0, 3.0 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.17 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 145.96 (C^{quat}), 145.74 (C^{quat}), 135.02 (d, *J* = 3.8 Hz, C^{quat}), 131.95 (d, *J* = 9.3 Hz, C^{quat}), 130.10 (d, *J* = 6.5 Hz, C^{Ar}), 128.03 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{Ar}), 121.89 (C^{Ar}), 120.08 (C^{Ar}), 114.79 (C^{Ar}), 112.33 (C^{Ar}), 70.83 (CH₂-O), 62.17 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 33.54 (d, *J* = 138.0 Hz, CH₂-P), 16.38 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.08

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₂₄O₅P 351.1362, found 351.1353

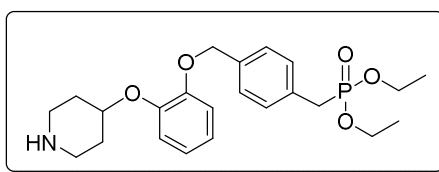
tert-butyl 4-[2-({4-[(diethoxyphosphoryl)methyl]phenyl}methoxy)phenoxy]piperidine-1-carboxylate **406**



Chemical Formula: $C_{28}H_{40}NO_7P$
Molecular Weight: 533,60

In a 10-20 mL microwave vial, phosphonate compound **405** (512 mg, 1 eq., 1.46 mmol) was dissolved in dimethylacetamide (13 mL). To this solution, potassium carbonate (404 mg, 2 eq., 2.92 mmol) and compound **34** (778 mg, 1.5 eq., 2.19 mmol) were then added and this mixture was stirred at 140°C during 30 min under microwave irradiation. The resulting residue was dissolved in EtOAc (20 mL) and water (25 mL), and the aqueous phase was extracted thrice with EtOAc (3 x 20 mL). The organic phases were then washed 5 times with water (5 x 25 mL), once with brine (25 mL) and dried over magnesium sulfate. The residue was concentrated under reduced pressure and purified by silica gel column chromatography, eluting DCM / MeOH 99:1, to afford desired product **406** as colorless oil, directly employed in the next step. (483 mg, 62% NMR yield)

diethyl ({4-[2-(piperidin-4-yloxy)phenoxy]methyl}phenyl)methylphosphonate **407**



Chemical Formula: $C_{23}H_{32}NO_5P$
Molecular Weight: 433,48

Following general procedure 3, trifluoroacetic acid (10.6 mL, 100 eq., 139 mmol) was added to a solution of compound **406** (740 mg, 1 eq., 1.39 mmol) in DCM (20 mL). Pure compound **407** was obtained after flash column chromatography (DCM/MeOH 95:5), affording desired product as an orange solid. (588 mg, 67%)

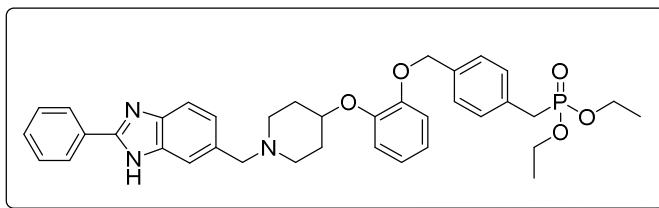
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.29 (d, J = 8.2, 2.5 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.09 (m, 2H, H^{Ar}), 7.01 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.94 (m, 1H, H^{Ar}), 5.10 (s, 2H, CH_2-O), 4.57 (quint., J = 4.3 Hz, 1H, H^4 pip), 4.04 (2x ddq, J = 7.7, 6.7, 2.3 Hz, 4H, CH_2-O-P), 3.38 (dt, J = 13.0, 7.0 Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.26 (d, J = 21.8 Hz, 2H, CH_2-P), 3.09 (m, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.13 (tdd, J = 12.8, 5.0 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 2.03 (dt, J = 7.1, 5.3 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 146.55 (C^{quat}), 135.15 (d, J = 3.8 Hz, C^{quat}), 129.78 (d, J = 6.6 Hz, C^{Ar}), 127.65 (d, J = 3.3 Hz, C^{Ar}), 123.08 (C^{Ar}), 121.41 (C^{Ar}), 118.82 (C^{Ar}), 114.95 (C^{Ar}), 70.80 (C^4 pip), 70.52 (CH_2-O), 62.35 (d, J = 7.0 Hz, CH_2-O-P), 40.24 (C^2 , C^6 pip), 31.86 (d, J = 138.0 Hz, CH_2-P), 27.06 (C^3 , C^5 pip), 15.24 (d, J = 6.1 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ 27.50

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{33}NO_5P$ 434.2097, found 434.2100

diethyl ({4-[2-({1-[(2-phenyl-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl}oxy)phenoxy)methyl]-phenyl)methyl}phosphonate **408**



Chemical Formula: $C_{37}H_{42}N_3O_5P$
Molecular Weight: 639,73

The title compound **408** was obtained following the general procedure **4** from benzimidazole **372** (31 mg, 1 eq., 0.138 mmol), $SOCl_2$ (293 μ L, 29 eq., 4.01 mmol) and then compound **407** (60 mg, 1 eq., 0.138 mmol), diisopropylethylamine (124 μ L, 5.3 eq., 0.73 mmol) in AcN (2 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **408** was obtained as an amorphous creamy solid. (29 mg, 40%)

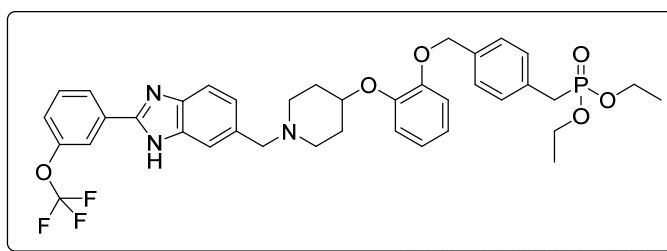
^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.12 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.63 (m, 5H, H^{Ar}), 7.37 (m, 5H, H^{Ar}), 7.04 (m, 2H, H^{Ar}), 6.91 (dq, J = 7.3, 1.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 5.06 (s, 2H, CH_2-O), 4.48 (s, 1H, H^4 pip), 4.00 (ddq, J = 8.8, 7.0, 1.8 Hz, 4H, CH_2-O-P), 3.93 (s, 2H, CH_2-N), 3.24 (d, J = 21.7 Hz, 2H, CH_2-P), 3.06 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.76 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.97 (m, 4H, H^3 , H^5 pip), 1.23 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.15 (C^{quat}), 147.01 (C^{quat}), 136.24 (d, J = 3.9 Hz, C^{quat}), 131.11 (d, J = 9.2 Hz, C^{quat}), 130.19 (C^{Ar}), 129.71 (d, J = 6.6 Hz, C^{Ar}), 129.42 (C^{Ar}), 128.79 (C^{Ar}), 127.59 (d, J = 4.0 Hz, C^{Ar}), 126.48 (C^{Ar}), 122.46 (C^{Ar}), 121.46 (C^{Ar}), 118.52 (C^{Ar}), 115.23 (C^{Ar}), 70.49 (CH_2-O), 62.30 (d, J = 6.9 Hz, CH_2-O-P), 62.09 (CH_2-N), 48.99 (C^2 , C^6 pip), 32.00 (d, J = 138.2 Hz, CH_2-P), 29.14 (C^3 , C^5 pip), 15.23 (d, J = 6.0 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.43

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{37}H_{43}N_3O_5P$ 640.2941, found 640.2935

diethyl {[4-(2-([1-({2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl}oxy)phen-oxymethyl)phenyl]methyl}phosphonate **409**



Chemical Formula: $C_{38}H_{41}F_3N_3O_6P$
Molecular Weight: 723,73

The title compound **409** was obtained following the general procedure **4** from benzimidazole **373** (36 mg, 1 eq., 0.12 mmol), $SOCl_2$ (244 μ L, 29 eq., 3.35 mmol) and then compound **407** (50 mg, 1 eq., 0.12 mmol), diisopropylethylamine (104 μ L, 5.3 eq., 0.61 mmol) in AcN (2 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **409** was obtained as an amorphous creamy solid. (18 mg, 25%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 8.03 (s, 1H, H^{Ar}), 7.62 (m, 3H, H^{Ar}), 7.41 (m, 3H, H^{Ar}), 7.31 (m, 3H, H^{Ar}), 6.99 (m, 2H, H^{Ar}), 6.88 (m, 2H, H^{Ar}), 5.02 (s, 2H, CH₂-O), 4.39 (s, 1H, H⁴pip), 3.99 (dq, *J* = 8.0, 7.0, 1.6 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.77 (s, 2H, CH₂-N), 3.21 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 2.91 (s, 2H, H², H⁶ pip), 2.54 (s, 2H, H², H⁶ pip), 1.91 (s, 4H, H³, H⁵ pip), 1.21 (dt, *J* = 7.0, 0.4 Hz, 6H, CH₃).

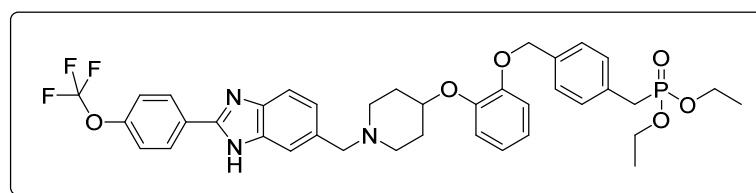
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.88 (C^{quat}), 150.06 (C^{quat}), 149.71 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, C^{Ar}), 147.15 (C^{quat}), 136.29 (d, *J* = 3.9 Hz, C^{quat}), 131.78 (C^{Ar}), 131.00 (d, *J* = 9.5 Hz, C^{quat}), 130.69 (C^{quat}), 129.66 (d, *J* = 6.7 Hz, C^{Ar}), 127.51 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{Ar}), 125.01 (C^{Ar}), 122.29 (C^{Ar}), 122.21 (C^{Ar}), 121.82 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 119.27 (C^{Ar}), 118.92 (C^{Ar}), 118.31 (C^{Ar}), 115.33 (C^{Ar}), 70.50 (CH₂-O), 62.43 (CH₂-N), 62.31 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂-O-P), 49.34 (C², C⁶ pip), 32.02 (d, *J* = 138.0 Hz, CH₂-P), 29.67 (C³, C⁵ pip), 15.24 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.43

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -59.35

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₆P 724.2760, found 724.2759

diethyl {[4-(2-[[1-({2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl]oxy}phen-oxymethyl)phenyl]methyl}phosphonate **410**



Chemical Formula: C₃₈H₄₁F₃N₃O₆P
Molecular Weight: 723.73

The title compound **410** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **374** (36 mg, 1 eq., 0.12 mmol), SOCl₂ (244 μL, 29 eq., 3.35 mmol) and then compound **407** (50 mg, 1 eq., 0.12 mmol), diisopropylethylamine (104 μL, 5.3 eq., 0.61 mmol) in AcN (2 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **410** was obtained as an amorphous creamy solid. (17 mg, 23%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.17 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.61 (m, 2H, H^{Ar}), 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.30 (m, 3H, H^{Ar}), 6.99 (m, 2H, H^{Ar}), 6.89 (m, 2H, H^{Ar}), 5.02 (s, 2H, CH₂-O), 4.40 (s, 1H, H⁴pip), 3.99 (dq, *J* = 9.8, 7.0, 1.6 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.80 (s, 2H, CH₂-N), 3.21 (d, *J* = 21.9 Hz, 2H, CH₂-P), 2.95 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.58 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.92 (m, 4H, H³, H⁵ pip), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

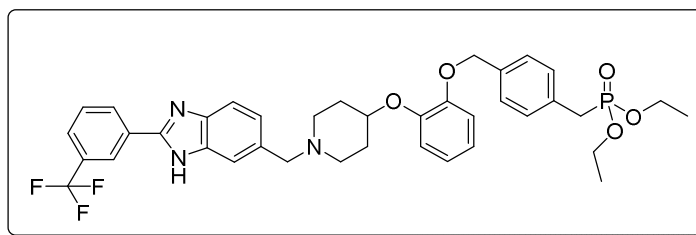
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 151.27 (C^{quat}), 150.42 (C^{quat}), 150.08 (C^{quat}), 147.13 (C^{quat}), 136.27 (d, *J* = 4.0 Hz, C^{quat}), 131.00 (d, *J* = 9.2 Hz, C^{quat}), 129.68 (d, *J* = 6.7 Hz, C^{Ar}), 128.59 (C^{Ar}), 128.33 (C^{Ar}), 127.53 (d, *J* = 2.7 Hz, C^{Ar}), 125.04 (C^{Ar}), 122.29 (C^{Ar}), 121.74 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 121.18 (C^{Ar}), 118.37 (C^{Ar}), 115.30 (C^{Ar}), 70.50 (CH₂-O), 62.30 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 62.30 (CH₂-N), 49.20 (C², C⁶ pip), 31.96 (d, *J* = 137.2 Hz, CH₂-P), 29.49 (C³, C⁵ pip), 15.24 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.43

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -59.34

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₆P 724.2760, found 724.2757

diethyl {[4-(2-{[1-({2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl]oxy}phen-oxymethyl)phenyl]methyl}phosphonate 411



Chemical Formula: $C_{38}H_{41}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 707.73

The title compound **411** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **375** (47 mg, 1 eq., 0.16 mmol), $SOCl_2$ (340 μ L, 29 eq., 4.68 mmol) and then compound **407** (70 mg, 1 eq., 0.16 mmol), diisopropylethylamine (144 μ L, 5.3 eq., 0.85 mmol) in AcN (4 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **411** was obtained as an amorphous creamy solid. (24 mg, 21%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.41 (bs, 1H, H^{Ar}), 8.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.71 (m, 5H, H^{Ar}), 7.32 (m, 4H, H^{Ar}), 6.94 (m, 4H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, CH_2 -O), 4.40 (s, 1H, H^4 pip), 3.96 (m, 4H, CH_2 -O-P), 3.82 (s, 2H, CH_2 -N), 3.19 (d, J = 23.3 Hz, 2H, CH_2 -P), 2.97 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.68 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.95 (m, 4H, H^3 , H^5 pip), 1.18 (t, J = 6.9 Hz, 6H, CH_3).

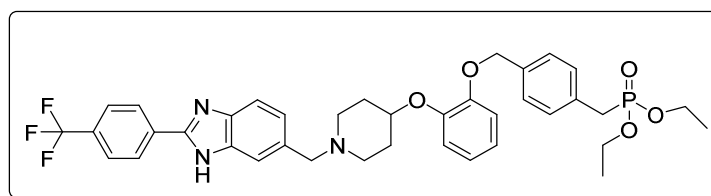
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.10 (C^{Ar}), 137.46 (d, J = 1.7 Hz, C^{Ar}), 136.93 (C^{Ar}), 136.27 (d, J = 3.7 Hz, C^{quat}), 129.87 (C^{Ar}), 129.82 (C^{Ar}), 129.68 (d, J = 6.7 Hz, C^{Ar}), 127.54 (d, J = 3.0 Hz, C^{Ar}), 123.85 (C^{Ar}), 122.34 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 118.42 (C^{Ar}), 115.29 (C^{Ar}), 70.51 (CH_2 -O), 62.30 (d, J = 6.8 Hz, CH_2 -O-P), 62.25 (CH_2 -N), 49.20 (C^2 , C^6 pip), 31.91 (d, J = 137.5 Hz, CH_2 -P), 29.34 (C^3 , C^5 pip), 15.21 (d, J = 5.9 Hz, CH_3).

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.44

^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.33

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{39}H_{42}F_3N_3O_5P$ 708.2811, found 708.2809

diethyl {[4-(2-{[1-({2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl]oxy}phenoxy-methyl)phenyl]methyl}phosphonate 412



Chemical Formula: $C_{38}H_{41}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 707.73

The title compound **412** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **376** (34 mg, 1 eq., 0.115 mmol), $SOCl_2$ (243 μ L, 29 eq., 3.35 mmol) and then compound **407** (50 mg, 1 eq., 0.115 mmol), diisopropylethylamine (100 μ L, 5.3 eq., 0.59 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica

gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **412** was obtained as an amorphous creamy solid. (28 mg, 32%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.42 (bs, 1H, H^{Ar}), 8.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.70 (m, 5H, H^{Ar}), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.28 (m, 3H, H^{Ar}), 6.98 (m, 2H, H^{Ar}), 6.88 (m, 2H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, CH₂-O), 4.37 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H⁴pip), 3.98 (m, 4H, CH₂-O-P), 3.75 (s, 2H, CH₂-N), 3.20 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂-P), 2.89 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.51 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.89 (m, 4H, H³, H⁵ pip), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

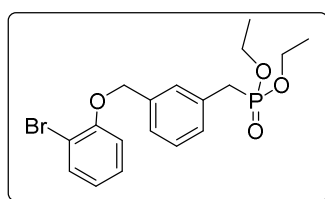
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 150.89 (C^{quat}), 150.05 (C^{quat}), 147.19 (C^{quat}), 136.29 (d, *J* = 3.0 Hz, C^{quat}), 131.36 (C^{quat}), 131.04 (C^{quat}), 130.94 (C^{quat}), 130.72 (C^{quat}), 130.63 (C^{quat}), 129.83 (C^{Ar}), 129.78 (C^{Ar}), 129.67 (d, *J* = 6.6 Hz, C^{Ar}), 127.50 (d, *J* = 3.3 Hz, C^{Ar}), 126.38 (C^{Ar}), 125.36 (C^{Ar}), 125.14 (C^{Ar}), 123.08 (C^{Ar}), 122.66 (C^{Ar}), 122.19 (C^{Ar}), 121.45 (C^{Ar}), 118.29 (C^{Ar}), 115.33 (C^{Ar}), 70.50 (CH₂-O), 62.48 (CH₂-N), 62.30 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂-O-P), 49.37 (C², C⁶ pip), 31.96 (d, *J* = 138.1 Hz, CH₂-P), 29.70 (C³, C⁵ pip), 15.25 (d, *J* = 5.9 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.42

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.25

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₂F₃N₃O₅P 708.2811, found 708.2812

1-bromo-2-[[3-(diethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methoxy]benzene **415**



Chemical Formula: C₁₈H₂₂BrO₄P
Molecular Weight: 413.25

In a 5-10 mL microwave vial, 2-bromophenol (200 μL, 1 eq., 1.72 mmol) was dissolved in DMF (5 mL). To this solution, potassium carbonate (431 mg., 2 eq., 3.12 mmol), compound **379** (500 mg, 1 eq., 1.56 mmol) and few crystals of sodium iodide (catalytic amount) were added. The reaction mixture was then stirred 20 min. at 100°C under microwave irradiation. After evaporation of all volatiles, the residue was purified by silica gel chromatography (PE/EtOAc 7:3) to afford desired product **415** as a colorless oil. (463 mg, 72%)

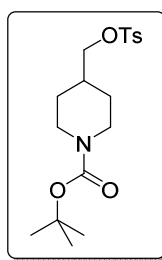
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.32 (m, 4H, H^{Ar}), 7.20 (m, 1H, H^{Ar}), 6.90 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.81 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.11 (s, 2H, CH₂-OAr), 3.97 (ddq, *J* = 8.4, 7.0, 1.2 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.14 (d, *J* = 21.7 Hz, 2H, CH₂-P), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154.96 (C^{quat Ar}), 136.85 (d, *J* = 3.0 Hz, C^{quat Ar}), 133.44 (C^{Ar}), 132.06 (d, *J* = 9.1 Hz, C^{quat Ar}), 129.42 (d, *J* = 6.4 Hz, C^{Ar}), 128.82 (d, *J* = 3.1 Hz, C^{Ar}), 128.38 (C^{Ar}), 128.37 (d, *J* = 6.6 Hz, C^{Ar}), 125.61 (d, *J* = 3.6 Hz, C^{Ar}), 122.17 (C^{Ar}), 113.89 (C^{Ar}), 112.49 (C^{quat Ar}), 70.60 (CH₂-OAr), 62.18 (d, *J* = 6.8 Hz, CH₂-O-P), 33.72 (d, *J* = 138.3 Hz, CH₂-P), 16.38 (d, *J* = 5.9 Hz, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 26.14

HRMS (ESI):*m/z* [M+H]⁺ calcd for C₁₈H₂₃BrO₄P 413.0518 found 413.0516.

tert*-butyl 4-(*p*-tolylsulfonyloxymethyl)piperidine-1-carboxylate **423*



Chemical Formula: $C_{18}H_{27}NO_5S$

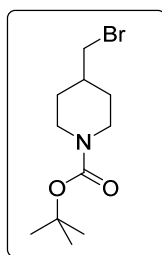
Molecular Weight: 369,48

Under inert atmosphere, *N*³-Boc-piperidinemethanol (1 g, 1 eq., 4.65 mmol) was added to dichloromethane (8 mL). To this solution tosyl chloride (975 mg, 1.1 eq., 5.12 mmol) and triethylamine (1.30 mL, 2 eq., 9.3 mmol) were successively added. After 12h at room temperature, another portion of tosyl chloride (975 mg, 1.1 eq., 5.12 mmol) and triethylamine (1.30 mL, 2 eq., 9.3 mmol) were added, and the solution was stirred for another 4 hours. The reaction was quenched with/ by the addition of a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (10 mL), followed by extraction with DCM (30 mL), washing with brine (15 mL), drying over $MgSO_4$ and concentration under reduced pressure. The residue was then purified by silica gel column chromatography, eluting PE/EtOAc 85:15, to afford desired compound **423** as a white solid. (1.68 g, quant.)

¹H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H^{Ar}), 4.05 (bd, J = 13.3 Hz, 2H, H^2 , H^6), 3.82 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2 -OTs), 2.62 (bt, J = 12.8 Hz, 2H, H^2 , H^6), 2.42 (s, 3H, CH_3), 1.79 (bs, 1H, H^4), 1.60 (bd, J = 13.3 Hz, 2H, H^3 , H^5), 1.41 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.08 (tq, J = 12.3, 6.2 Hz, 2H, H^3 , H^5).

CAS : 166815-96-9

tert*-butyl 4-(bromomethyl)piperidine-1-carboxylate **424*



Chemical Formula: $C_{11}H_{20}BrNO_2$

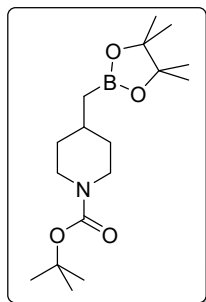
Molecular Weight: 278,19

In the dark and under inert atmosphere, LiBr (258 mg, 2 eq., 2.95 mmol) was dissolved in acetone (3 mL), followed by the addition of compound **423** (550 mg, 1 eq., 1.48 mmol). The solution was stirred at reflux for 8 hours. H_2O (10 mL) was then added to the reaction mixture. The aqueous phase was extracted with EtOAc (4 x 5 mL), the organic layers were treated with HCl 1M (10 mL), $NaHCO_3$ sat. (10 mL), washed with brine (10 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The desired product **424** was obtained without further purification as a white solid. (362 mg, 88%)

¹H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 4.10 (bd, J = 13.3 Hz, 2H, H^2 , H^6), 3.26 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2 -Br), 2.67 (bt, J = 12.4 Hz, 2H, H^2 , H^6), 1.77 (m, 3H, H^3 , H^4 , H^5), 1.41 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.16 (m, 2H, H^3 , H^5).

CAS : 159407-04-6

tert-butyl 4-[(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)methyl]piperidine-1-carboxylate 425



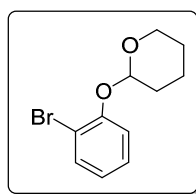
Chemical Formula: $C_{17}H_{32}BNO_4$
Molecular Weight: 325,26

In a 2-5 mL vial, copper iodide (24 mg, 10 mol%, 0.13 mmol), triphenylphosphine (42 mg, 13 mol%, 0.16 mmol), lithium *tert*-butoxide (201 mg, 2 eq., 2.52 mmol) and *bis*(pinacolato)diboron (480 mg, 1.5 eq., 1.89 mmol) were successively introduced. The vial was degassed several times with N_2 , followed by the addition of DMF (2.5 mL) and compound **424** (350 mg, 1 eq., 1.26 mmol), and the resulted mixture was stirred at room temperature for 12 hours. The residue was then extracted 3 times with EtOAc (3 x 10 mL), washed 5 times with H_2O (10 mL), brine (10 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The product was afterwards purified by silica gel column chromatography (PE/AE 9:1) to afford desired compound **425** as a white solid. (220 mg, 55%)

^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 4.01 (bd, $J = 13.2$ Hz, 2H, H^2 , H^6), 2.66 (bt, $J = 11.5$ Hz, 2H, H^2 , H^6), 1.57 (m, 3H, H^3 , H^4 , H^5), 1.42 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.21 (s, 12H, CH_3), 1.07 (m, 2H, H^3 , H^5), 3.26 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -B).

CAS : 1425335-44-9

2-(2-bromophenoxy)tetrahydropyran 434



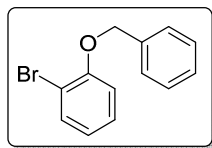
Chemical Formula: $C_{11}H_{13}BrO_2$
Molecular Weight: 257,13

Under inert atmosphere, dihydropyran (3.96 mL, 1.5 eq., 43.35 mmol) was added to a solution of 2-bromophenol (3.35 mL, 1 eq., 28.90 mmol) in dichloromethane (35 mL). A catalytic amount of pyridinium *p*-toluenesulfonate (726 mg, 0.1 eq., 2.89 mmol) was then inserted in the flask, and the mixture was stirred at room temperature for 12 hours. The volatiles were then removed *in vacuo*, and the residue was purified by silica gel column chromatography, eluting pure PE, to afford compound **434** as a colorless oil. (7.43 g, quant.)

^1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (ddd, $J = 7.9, 1.6, 0.3$ Hz, 1H, H^{Ar}), 7.18 (m, 2H, H^{Ar}), 6.86 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.7$ Hz, 1H, H^{Ar}), 5.52 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H, O-CH-O), 3.91 (m, 1H, CH_2 -O), 3.61 (m, 1H, CH_2 -O), 1.90 (m, 6H, CH_2).

CAS : 57999-46-9

1-(benzyloxy)-2-bromobenzene 435



Chemical Formula: C₁₃H₁₁BrO
Molecular Weight: 263,13

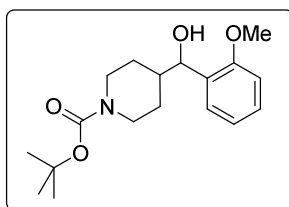
To a solution of 2-bromophenol (1.34 mL, 1 eq., 11.6 mmol) in DMF (20 mL), benzyl chloride (1.46 mL, 1.1 eq., 12.7 mmol) and potassium carbonate (3.19 g, 2 eq., 23.1 mmol) were added. The resulting mixture was stirred for 12h at 70°C. After evaporation of all volatiles, the residue was dissolved in a mixture of EtOAc (80 mL) and water (40 mL). The aqueous phase was extracted thrice with EtOAc (3 x 80 mL), the organic phases were washed three times with water (3 x 40 mL), three times with brine (3 x 40 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. After a filtration on silica gel, eluting petroleum ether/ ethyl acetate 8:2, the desired product **435** was obtained as a colorless oil. (3.1 g, quant.)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.49 (m, 2H, H^{Ar}), 7.40 (ddt, *J* = 7.9, 6.2, 1.1 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.29 (m, 2H, H^{Ar}), 6.90 (m, 2H, H^{Ar}), 5.17 (s, 2H, CH₂).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₁₂BrO 263.0072, found 262.9892

CAS : 31575-75-4

tert-butyl 4-[hydroxy-(2-methoxyphenyl)methyl]piperidine-1-carboxylate 436



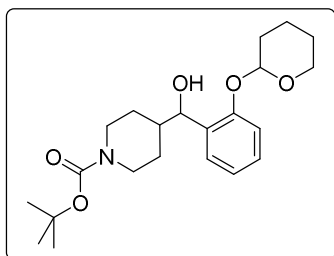
Chemical Formula: C₁₈H₂₇NO₄
Molecular Weight: 321,42

Under Ar atmosphere, 2-bromoanisole (660 μL, 1 eq., 5.34 mmol) was dissolved in THF (8 mL) on molecular sieves 4 Å and cooled at -78°C. After stirring for 5 minutes, *n*-BuLi (2.5 M in hexane, 2.14 mL, 1 eq., 5.34 mmol) was added dropwise to the mixture and stirred 30 min. at -78°C. A solution of 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinecarboxaldehyde (1.14 g, 1 eq., 5.34 mmol) in THF (8 mL) was then slowly introduced by cannulation into the flask. After 10 min at -78°C, the reaction mixture was then allowed to stir at room temperature for 3 hours and quenched by a slow addition of water (10 mL). The aqueous phase was subsequently extracted three times with ethyl acetate (3 x 30 mL), the organic layers dried over MgSO₄ and reduced *in vacuo*. The resulting product was then loaded onto a silica gel column and purified eluting Petroleum ether / Ethyl Acetate 8:2 to afford desired piperidine derivative **436** as white solid. (601 mg, 35%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (ddt, *J* = 7.7, 6.0, 1.6 Hz, 2H, H^{Ar}), 6.87 (ddt, *J* = 15.2, 7.7, 1.1 Hz, 2H, H^{Ar}), 4.54 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, CH-OH), 4.04 (m, 2H, H², H⁶), 3.81 (s, 3H, CH₃-O), 2.57 (m, 2H, H², H⁶), 1.86 (m, 3H, H³, H⁴, H⁵) 1.41 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.20 (m, 2H, H³, H⁵).

CAS : 1208333-17-8

tert-butyl 4-[hydroxy-(2-tetrahydropyran-2-yloxyphenyl)methyl]piperidine-1-carboxylate 437



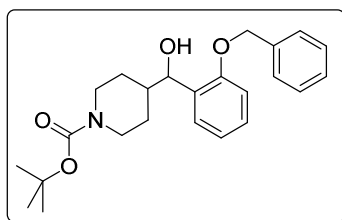
Chemical Formula: C₂₂H₃₃NO₅
Molecular Weight: 391,51

Under Ar atmosphere, compound **434** (1 g, 1 eq., 3.89 mmol) was dissolved in THF (8 mL) and cooled at -78°C. After stirring for 5 minutes, *n*-BuLi (2.5 M in hexane, 1.56 mL, 1 eq., 3.89 mmol) was added dropwise to the mixture and stirred 30 min. at -78°C. A solution of 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinecarboxaldehyde (830 mg, 1 eq., 3.89 mmol) in THF (8 mL) was then slowly introduced by cannulation into the flask. After 10 min at -78°C, the solution was then allowed to stir at room temperature for 3 hours and quenched by a slow addition of water (10 mL). The aqueous phase was subsequently extracted three times with ethyl acetate (3 x 30 mL) and the resulted organic layers dried over MgSO₄ and reduced *in vacuo*. The resulting product was then loaded onto a silica gel column and purified eluting Petroleum ether / Ethyl Acetate 8:2 to afford desired piperidine derivative **437** as white solid. (914 mg, 60%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (m, 3H, H^{Ar}), 6.97 (dt, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.40 (m, 1H, O-CH-O), 4.62 (dt, *J* = 12.2, 6.8 Hz, 1H, CH-OH), 4.07 (m, 2H, H², H⁶), 3.81 (m, 1H, CH₂-O), 3.59 (m, 1H, CH₂-O), 2.54 (m, 3H, OH, H², H⁶), 1.79 (m, 9H, CH₂, H³, H⁴, H⁵) 1.42 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.21 (m, 2H, H³, H⁵).

HRMS (ESI):*m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₃₄NO₅392.2438 found 392.2433.

tert-butyl 4-[[2-(benzyloxy)phenyl](hydroxy)methyl]piperidine-1-carboxylate 438



Chemical Formula: C₂₄H₃₁NO₄
Molecular Weight: 397,52

Under Ar atmosphere, bromobenzene **435** (3.36 g, 1.1 eq., 12.7 mmol) was dissolved in THF (19 mL) and cooled at -78°C. After stirring for 10 minutes, *n*-BuLi (2.5 M in hexane, 5.03 mL, 1.1 eq., 12.7 mmol) was added dropwise to the solution and stirred 30 min. at -78°C. A mixture of 1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinecarboxaldehyde (2.47 g, 1 eq., 11.6 mmol) in THF (19 mL) was then slowly

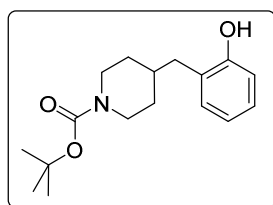
introduced by cannulation into the flask. After 10 min at -78°C, the solution was then allowed to stir at room temperature for 3 hours and quenched by the slow addition of water (20 mL). The aqueous phase was subsequently extracted three times with ethyl acetate (3 x 80 mL) and the resulted organic layers dried over MgSO₄ and reduced *in vacuo*. The resulting product was then loaded onto a silica gel column and purified eluting Petroleum ether / Ethyl Acetate 8:2 to afford desired piperidine derivative **438** as colorless crystals. (2.94 g, 65%)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (m, 5H, H^{Ar}), 7.22 (m, 2H, H^{Ar}), 6.94 (m, 2H, H^{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂benzylic), 4.61 (bs, 1H, CH-OH), 4.01 (m, 2H, H², H⁴, H⁶ pip), 2.53 (m, 3H, H², H⁴, H⁶ pip), 1.59 (m, 2H, H³, H⁵ pip), 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.15 (m, 2H, H³, H⁵ pip).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 155.77 (C=O), 154.86 (C^{quat}), 136.66 (C^{quat}), 131.05 (C^{quat}), 128.71 (C^{Ar}), 128.46 (C^{Ar}), 128.29 (C^{Ar}), 128.15 (C^{Ar}), 127.32 (C^{Ar}), 121.02 (C^{Ar}), 112.01 (C^{Ar}), 79.24 (C^{quat} Boc), 75.05 (CH-OH), 70.24 (CH₂benzylic), 43.93 (C⁴ pip), 42.56 (C², C⁶ pip), 28.74 (C³, C⁵ pip), 28.47 (CH₃ Boc), 28.25 (C³, C⁵ pip).

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₂NO₄ 398.2332, found 398.2326

tert*-butyl 4-[[2-(benzyloxy)phenyl](hydroxy)methyl]piperidine-1-carboxylate **428*



Chemical Formula: C₁₇H₂₅NO₃
Molecular Weight: 291.39

Method A :

In an autoclave, piperidine derivative **438** (1 g, 1 eq., 2.55 mmol) was dissolved in ethyl acetate (43 mL). The solution and the atmosphere in the apparatus were degassed with argon before the addition of 10% Pd/C (500 mg). The solution and the atmosphere were again saturated with argon, and then the autoclave was sealed and filled with H₂ until a pressure of 7 bars. The reaction mixture was stirred for 24h at room temperature, filtrated onto Celite®. The filtrate was evaporated, giving pure product **428** as colorless crystals. (733 mg, quant.)

Method B :

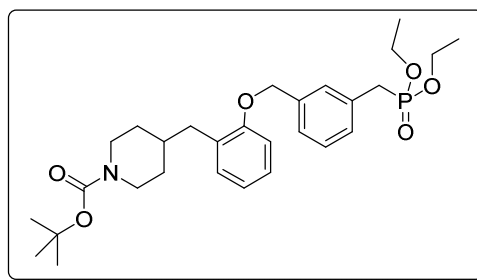
Under inert atmosphere, compound **437** (200 mg, 1 eq., 0.51 mmol) was dissolved in dichloromethane (4 mL). Triethylsilane (408 µL, 5 eq., 2.55 mmol) and TFA (196 µL, 5 eq., 2.55 mmol) were successively added to this solution, and stirred at room temperature for 1 hour. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (5 mL), extracted with EtOAc (3 x 10 mL), washed with brine (10 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The product was then purified by a flash column chromatography (PE/EtOAc 95:5), affording desired product **428** as colorless crystals. (30 mg, 21%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (m, 2H, H^{Ar}), 6.78 (m, 2H, H^{Ar}), 5.71 (s, 1H, OH), 4.01 (bd, *J* = 8.2 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 4.01 (bt, *J* = 11.9 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 2.53 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 1.69 (m, 1H, H⁴ pip), 1.59 (bd, *J* = 14.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.15 (bd, *J* = 11.9, 4.1 Hz, 2H, H³, H⁵ pip).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.04 (C=O), 154.06 ($\text{C}^{\text{quat}}-\text{CH}_2$), 131.23 (C^{Ar}), 127.21 (C^{Ar}), 126.51 ($\text{C}^{\text{quat}}-\text{OH}$), 120.22 (C^{Ar}), 115.26 (C^{Ar}), 79.45 (C^{quat} Boc), 44.10 (C^4 pip), 36.88 (C^2 , C^6 pip), 36.80 (CH_2), 31.98 (C^3 , C^5 pip), 28.50 (CH_3 Boc).

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_3$ 292.1913, found 292.1906

tert-butyl 4-{{2-{{3-[[diethoxyphosphoryl)methyl]phenyl}methoxy}phenyl)methyl}piperidine-1-carboxylate **416**



Chemical Formula: $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{NO}_6\text{P}$
Molecular Weight: 531.63

In a 2-5 mL microwave vial, phosphonate derivative **379** (331 mg, 1.5 eq., 1.03 mmol) was dissolved in DMA (5 mL). To this mixture were sequentially added potassium carbonate (190 mg, 2 eq., 1.37 mol), phenol **428** (200 mg, 1 eq., 0.69 mmol) and finally a catalytic amount of sodium iodide (few crystals). This reaction was stirred for 30 min at 140°C under microwave irradiation, and the obtained solution was dissolved in water (10 mL) and ethyl acetate (50 mL). The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL), and the organic phases washed with water (5 x 10 mL), once with brine (10 mL), dried over MgSO_4 and evaporated. The residue was consequently purified by column chromatography (DCM / MeOH 99:1) to afford desired piperidine **416** compound as a colorless oil. (330 mg, 91%)

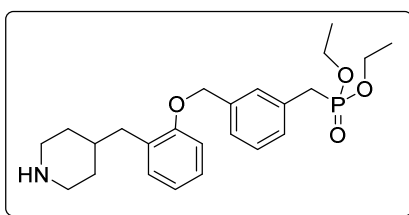
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (m, 4H, H^{Ar}), 7.07 (m, 2H, H^{Ar}), 6.82 (m, 2H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.96 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-O-P}$, H^2 , H^6 pip), 3.10 (d, $J = 21.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-P}$), 2.55 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, H^2 , H^6 pip), 1.73 (m, 1H, H^4 pip), 1.56 (bd, $J = 14.4$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.39 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.17 (m, 8H, CH_3 Phosph, H^3 , H^5 pip).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.58 ($\text{C}^{\text{quat}}-\text{CH}_2$), 154.86 (C=O), 137.79 (d, $J = 3.0$ Hz, C^{quat}), 131.90 (d, $J = 9.0$ Hz, C^{quat}), 131.01 (C^{Ar}), 129.17 (d, $J = 6.7$ Hz, C^{Ar}), 129.04 (C^{quat}), 128.73 (d, $J = 3.4$ Hz, C^{Ar}), 128.35 (d, $J = 6.6$ Hz, C^{Ar}), 127.18 (C^{Ar}), 125.51 (d, $J = 3.6$ Hz, C^{Ar}), 120.48 (C^{Ar}), 111.74 (C^{Ar}), 79.11 (C^{quat} Boc), 69.58 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 62.15 (d, $J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 44.28 (C^2 , C^6 pip), 37.34 (CH_2), 36.66 (C^4 pip), 33.82 (d, $J = 138.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-P}$), 32.15 (C^3 , C^5 pip), 28.46 (CH_3 Boc), 16.37 (d, $J = 6.7$ Hz, CH_3)

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 26.22

HRMS-ESI (m/z) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{P}$ 532.2828, found 532.2819

diethyl ({3-[2-(piperidin-4-ylmethyl)phenoxy]methyl}phenyl)methyl)phosphonate **414**



Chemical Formula: $C_{24}H_{34}NO_4P$

Molecular Weight: 431,51

Following general procedure 3, trifluoroacetic acid (4.5 mL, 100 eq., 58.3 mmol) was added to a solution of compound **416** (310 mg, 1 eq., 0.58 mmol) in DCM (9 mL). Pure compound **414** was obtained after flash column chromatography (DCM/MeOH 95:5), affording desired product colorless oil. (235 mg, 94%)

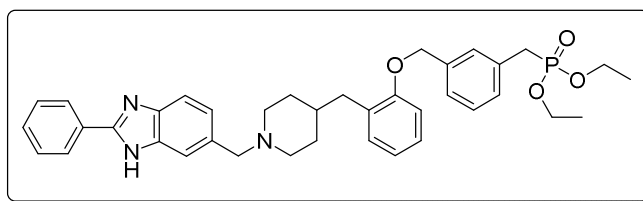
^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.39 (s, 1H, H^{Ar}), 7.26 (m, 3H, H^{Ar}), 7.11 (dt, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.06 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.93 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.83 (dt, J = 7.5, 0.7 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.01 (s, 2H, CH_2 -O), 3.96 (m, 4H, CH_2 -O-P), 3.27 (m, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.21 (d, J = 21.6 Hz, 2H, CH_2 -P), 2.80 (dt, J = 12.9, 2.3 Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.61 (d, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 1.86 (m, 1H, H^4 pip), 1.75 (bd, J = 14.1 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.45 (dq, J = 13.0, 10.9 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 157.91(C^{quat} - CH_2), 139.20 (d, J = 3.2 Hz, C^{quat}), 133.95 (d, J = 9.3 Hz, C^{quat}), 131.97(C^{Ar}), 130.47 (d, J = 6.7 Hz, C^{Ar}), 129.82 (d, J = 6.6 Hz, C^{Ar}), 129.74 (d, J = 3.1 Hz, C^{Ar}), 129.02(C^{quat}), 128.72(C^{Ar}), 127.05 (d, J = 3.7 Hz, C^{Ar}), 121.76(C^{Ar}), 113.04(C^{Ar}), 70.61(CH_2 -O), 63.79 (d, J = 6.9 Hz, CH_2 -O-P), 45.11(C^2 , C^6 pip), 37.31 (CH_2), 35.84 (C^4 pip), 33.54 (d, J = 138.0 Hz, CH_2 -P), 29.73 (C^3 , C^5 pip), 16.62 (d, J = 6.1 Hz, CH_3)

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.01

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{24}H_{35}NO_4P$ 432.2304, found 432.2299

diethyl ({3-[2-({1-[(2-phenyl-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}phenoxy]methyl}phenyl)methyl)phosphonate **439**



Chemical Formula: $C_{38}H_{44}N_3O_4P$

Molecular Weight: 637,76

The title compound **439** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **372** (26 mg, 1 eq., 0.12 mmol), $SOCl_2$ (246 μ L, 29 eq., 3.37 mmol) and then compound **414** (50 mg, 1 eq., 0.12 mmol), diisopropylethylamine (105 μ L, 5.3 eq., 0.61 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **439** was obtained as an amorphous creamy solid. (20 mg, 24%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.10 (dd, J = 8.1, 2.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.67 (s, 1H, H^{Ar}), 7.62 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.54 (m, 3H, H^{Ar}), 7.42 (s, 1H, H^{Ar}), 7.32 (m, 3H, H^{Ar}), 7.24 (m, 1H, H^{Ar}), 7.15 (dt, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (dd,

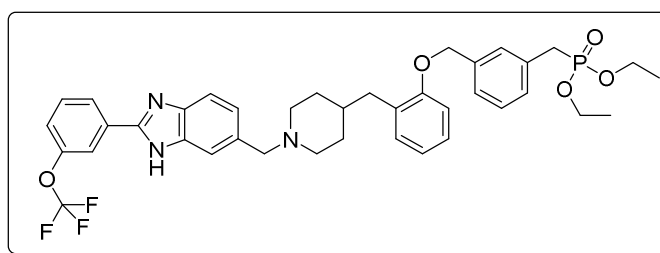
$J = 7.4, 1.6$ Hz, 1H, H^{Ar}), 6.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H^{Ar}), 6.86 (td, $J = 7.4, 0.8$ Hz, 1H, H^{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH_2-O), 3.96 (m, 6H, CH_2-O-P , CH_2-N), 3.24 (d, $J = 21.6$ Hz, 2H, CH_2-P), 3.18 (bd, $J = 11.6$ Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.64 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.47 (s, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.80 (m, 1H, H^4 pip), 1.74 (bd, $J = 14.9$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.45 (bq, $J = 14.4$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.59 ($C^{quat} -CH_2$), 153.14 (C^{quat}), 149.72 (d, $J = 2.0$ Hz, C^{quat}), 138.00 (d, $J = 3.4$ Hz, C^{quat}), 131.64 (d, $J = 9.2$ Hz, C^{quat}), 130.59 (C^{Ar}), 130.25 (C^{Ar}), 129.37 (C^{Ar}), 129.04 (d, $J = 6.7$ Hz, C^{Ar}), 128.82 (C^{Ar}), 128.43 (d, $J = 6.5$ Hz, C^{Ar}), 128.34 (d, $J = 3.2$ Hz, C^{Ar}), 128.29 (C^{Ar}), 127.17 (C^{Ar}), 126.50 (C^{Ar}), 125.72 (C^{Ar}), 125.62 (d, $J = 3.6$ Hz, C^{Ar}), 120.31 (C^{Ar}), 111.65 (C^{Ar}), 69.23 (CH_2-O), 62.38 (d, $J = 6.9$ Hz, CH_2-O-P), 61.80 (CH_2-N), 52.70 (C^2 , C^6 pip), 36.13 (CH_2), 35.38 (C^4 pip), 32.30 (d, $J = 137.8$ Hz, CH_2-P), 30.07 (C^3 , C^5 pip), 15.26 (d, $J = 6.0$ Hz, CH_3)

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.27

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{38}H_{45}N_3O_4P$ 638.3146, found 638.3141

diethyl {[3-(2-[[1-({2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **440**



Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 721.76

The title compound **440** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **373** (60 mg, 1 eq., 0.20 mmol), $SOCl_2$ (452 μ L, 29 eq., 6.20 mmol) and then compound **414** (80 mg, 1 eq., 0.20 mmol), diisopropylethylamine (168 μ L, 5.3 eq., 0.99 mmol) in AcN (4 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **440** was obtained as an amorphous creamy solid. (26 mg, 20%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.10 (ddd, $J = 7.8, 1.3, 0.6$ Hz, 1H, H^{Ar}), 8.05 (s, 1H, H^{Ar}), 7.66 (m, 3H, H^{Ar}), 7.45 (m, 2H, H^{Ar}), 7.28 (m, 4H, H^{Ar}), 7.14 (dt, $J = 7.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H, H^{Ar}), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H^{Ar}), 6.86 (td, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H^{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH_2-O), 3.98 (m, 6H, CH_2-O-P , CH_2-N), 3.25 (d, $J = 21.7$ Hz, 2H, CH_2-P), 3.17 (bd, $J = 10.2$ Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.64 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.47 (bt, $J = 11.8$ Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.81 (m, 1H, H^4 pip), 1.74 (bd, $J = 13.0$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.45 (bq, $J = 13.3$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH_3).

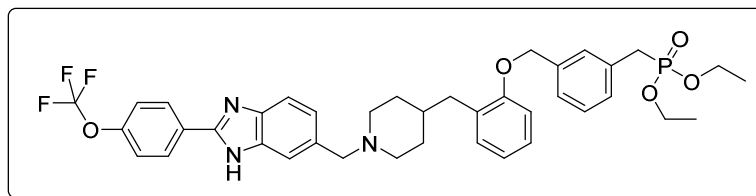
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.58 ($C^{quat} -CH_2$), 151.29 (C^{quat}), 149.72 (d, $J = 2.0$ Hz, C^{quat}), 137.99 (d, $J = 3.3$ Hz, C^{quat}), 131.63 (C^{quat}), 131.61 (d, $J = 9.9$ Hz, C^{quat}), 130.75 (C^{Ar}), 130.58 (C^{Ar}), 129.02 (d, $J = 7.1$ Hz, C^{Ar}), 128.41 (d, $J = 6.9$ Hz, C^{Ar}), 128.36 (C^{Ar}), 128.34 (d, $J = 3.7$ Hz, C^{Ar}), 127.15 (C^{Ar}), 125.61 (d, $J = 3.7$ Hz, C^{Ar}), 125.43 (C^{Ar}), 125.01 (C^{Ar}), 122.57 (C^{Ar}), 122.46 (C^{Ar}), 120.30 (C^{Ar}), 120.29 (C^{Ar}), 118.97 (C^{Ar}), 118.50 (C^{Ar}), 111.64 (C^{Ar}), 69.22 (CH_2-O), 62.36 (d, $J = 6.9$ Hz, CH_2-O-P), 61.80 (CH_2-N), 52.70 (C^2 , C^6 pip), 36.14 (CH_2), 35.41 (C^4 pip), 32.23 (d, $J = 137.7$ Hz, CH_2-P), 30.12 (C^3 , C^5 pip), 15.25 (d, $J = 6.0$ Hz, CH_3)

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.27

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -59.39

HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+*H*]⁺calcd for C₃₉H₄₄F₃N₃O₅P 722.2971, found 722.2964

diethyl {[3-(2-[[1-({2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **441**



Chemical Formula: C₃₉H₄₃F₃N₃O₅P
Molecular Weight: 721.76

The title compound **441** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **374** (60 mg, 1 eq., 0.20 mmol), SOCl₂ (452 μL, 29 eq., 6.20 mmol) and then compound **414** (80 mg, 1 eq., 0.20 mmol), diisopropylethylamine (168 μL, 5.3 eq., 0.99 mmol) in AcN (4 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **441** was obtained as an amorphous creamy solid. (31 mg, 24%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.21 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.67 (m, 2H, H^{Ar}), 7.49 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.44 (s, 1H, H^{Ar}), 7.31 (m, 4H, H^{Ar}), 7.16 (dt, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.00 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.88 (td, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.10 (s, 2H, CH₂-O), 4.00 (m, 6H, CH₂-O-P, CH₂-N), 3.27 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H, CH₂-P), 3.18 (bd, *J* = 11.8 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 2.67 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 2.47 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.81 (m, 1H, H⁴ pip), 1.75 (bd, *J* = 15.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.46 (bq, *J* = 10.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

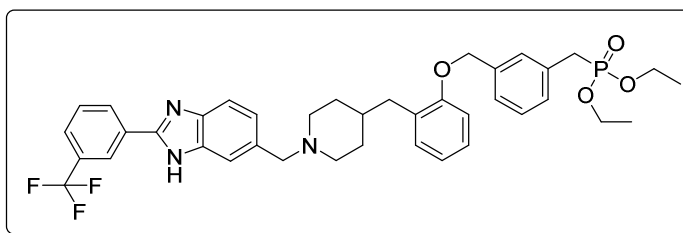
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.60 (C^{quat} -CH₂), 151.64 (C^{quat}), 150.52 (C^{quat}), 138.00 (d, *J* = 3.3 Hz, C^{quat}), 131.64 (d, *J* = 9.2 Hz, C^{quat}), 130.59 (C^{Ar}), 129.03 (d, *J* = 6.9 Hz, C^{Ar}), 128.50 (C^{Ar}), 128.43 (d, *J* = 6.6 Hz, C^{Ar}), 128.38 (C^{Ar}), 128.33 (d, *J* = 3.1 Hz, C^{Ar}), 127.15 (C^{Ar}), 125.62 (d, *J* = 3.7 Hz, C^{Ar}), 125.34 (C^{Ar}), 123.12 (d, *J* = 4.1 Hz, C^{Ar}), 121.74 (C^{Ar}), 121.25 (C^{Ar}), 120.29 (C^{Ar}), 119.20 (C^{Ar}), 111.65 (C^{Ar}), 69.23 (CH₂-O), 62.38 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 61.90 (CH₂-N), 52.87 (C², C⁶ pip), 36.20 (CH₂), 35.45 (C⁴ pip), 32.26 (d, *J* = 137.8 Hz, CH₂-P), 30.19 (C³, C⁵ pip), 15.25 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.27

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -59.39

HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+*H*]⁺calcd for C₃₉H₄₄F₃N₃O₅P 722.2971, found 722.2965

diethyl {[3-(2-{{1-{{2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl}methyl)piperidin-4-yl}methyl}-phenoxy)methyl}phenyl]methyl}phosphonate **442**



Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_4P$
Molecular Weight: 705,76

The title compound **442** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **375** (60 mg, 1 eq., 0.20 mmol), $SOCl_2$ (452 μ L, 29 eq., 6.20 mmol) and then compound **414** (80 mg, 1 eq., 0.20 mmol), diisopropylethylamine (168 μ L, 5.3 eq., 0.99 mmol) in AcN (4 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **442** was obtained as an amorphous creamy solid. (26 mg, 20%)

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.46 (s, 1H, H^{Ar}), 8.37 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.79 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.68 (m, 2H, H^{Ar}), 7.44 (s, 1H, H^{Ar}), 7.35 (m, 3H, H^{Ar}), 7.27 (m, 1H, H^{Ar}), 7.16 (dt, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.11 (dd, J = 7.4, 1.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.87 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.09 (s, 2H, CH_2 -O), 3.97 (m, 6H, CH_2 -O-P, CH_2 -N), 3.26 (d, J = 21.7 Hz, 2H, CH_2 -P), 3.13 (bd, J = 11.3 Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.65 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2), 2.38 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 1.78 (m, 1H, H^4 pip), 1.73 (bd, J = 13.4 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.44 (bq, J = 13.4 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H, CH_3).

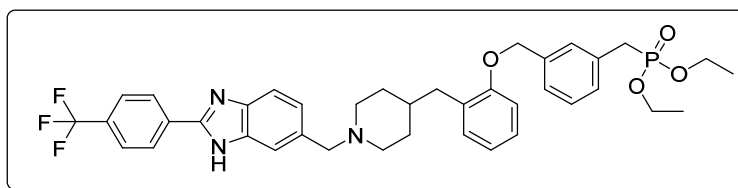
^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.59 (C^{quat} - CH_2), 151.20 (C^{quat}), 138.03 (d, J = 3.4 Hz, C^{quat}), 131.63 (d, J = 9.1 Hz, C^{quat}), 131.42 (C^{quat}), 131.10 (C^{quat}), 130.59 (C^{Ar}), 130.55 (C^{Ar}), 129.87 (C^{Ar}), 129.83 (C^{Ar}), 129.02 (d, J = 6.4 Hz, C^{Ar}), 128.46 (C^{Ar}), 128.37 (d, J = 4.4 Hz, C^{Ar}), 128.33 (d, J = 3.2 Hz, C^{Ar}), 127.09 (C^{Ar}), 126.50 (C^{Ar}), 125.60 (d, J = 3.8 Hz, C^{Ar}), 125.34 (C^{Ar}), 123.12 (d, J = 4.1 Hz, C^{Ar}), 122.64 (C^{Ar}), 120.26 (C^{Ar}), 111.64 (C^{Ar}), 69.22 (CH_2 -O), 62.36 (d, J = 7.0 Hz, CH_2 -O-P), 62.12 (CH_2 -N), 52.87 (C^2 , C^6 pip), 36.33 (CH_2), 35.64 (C^4 pip), 32.30 (d, J = 137.2 Hz, CH_2 -P), 30.46 (C^3 , C^5 pip), 15.25 (d, J = 5.9 Hz, CH_3)

^{31}P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.29

^{19}F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.34

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{39}H_{44}F_3N_3O_4P$ 706.3022, found 706.3013

diethyl {[3-(2-{{1-{{2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl}methyl)piperidin-4-yl}methyl}-phenoxy)methyl}phenyl]methyl}phosphonate **443**



Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_4P$
Molecular Weight: 705,76

The title compound **443** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **376** (60 mg, 1 eq., 0.20 mmol), SOCl₂ (452 μ L, 29 eq., 6.20 mmol) and then compound **414** (80 mg, 1 eq., 0.20 mmol), diisopropylethylamine (168 μ L, 5.3 eq., 0.99 mmol) in AcN (4 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **443** was obtained as an amorphous creamy solid. (24 mg, 19%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.46(s, 1H, H^{Ar}), 8.37 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.75 (m, 4H, H^{Ar}), 7.33 (m, 5H, H^{Ar}), 7.14 (dd, J = 7.8, 1.8 Hz, 2H), 7.01 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.88 (td, J = 7.4, 1.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-O), 4.26 (s, 2H, CH₂-N), 3.99 (dq, J = 9.5, 7.1, 1.5 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.38 (under MeOD peak, m, 2H, H², H⁶ pip), 3.22 (under MeOD peak, m, 2H, CH₂-P), 2.81 (t, J = 12.0 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 2.68 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 1.90 (m, 1H, H⁴ pip), 1.82 (bd, J = 13.5 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.55 (bt, J = 12.0 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.21 (td, J = 7.1, 0.6 Hz, 6H, CH₃).

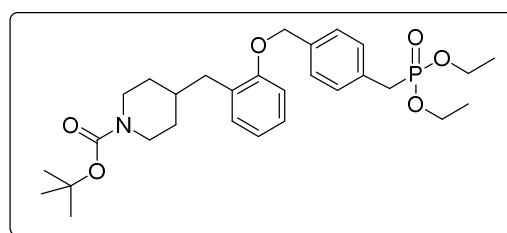
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.60 (C^{quat} -CH₂), 151.84 (C^{quat}), 137.93 (d, J = 3.3 Hz, C^{quat}), 131.69 (d, J = 9.3 Hz, C^{quat}), 131.56 (C^{quat}), 130.57 (C^{Ar}), 130.36 (C^{Ar}), 129.94 (C^{Ar}), 129.90 (C^{quat}), 129.10 (d, J = 6.6 Hz, C^{Ar}), 128.45 (d, J = 6.5 Hz, C^{Ar}), 128.34 (d, J = 3.4 Hz, C^{Ar}), 127.88 (C^{Ar}), 127.35 (C^{Ar}), 125.68 (d, J = 3.9 Hz, C^{Ar}), 123.25 (C^{Ar}), 123.18 (C^{Ar}), 120.40 (C^{Ar}), 111.68 (C^{Ar}), 69.24 (CH₂-O), 62.41 (d, J = 6.9 Hz, CH₂-O-P), 60.93 (CH₂-N), 52.34 (C², C⁶ pip), 35.70 (CH₂), 34.86 (C⁴ pip), 32.16 (d, J = 138.0 Hz, CH₂-P), 29.22 (C³, C⁵ pip), 15.24 (d, J = 6.0 Hz, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.22

¹⁹F NMR (376 MHz, MeOD) δ -64.36

HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₄F₃N₃O₄P 706.3022, found 706.3013

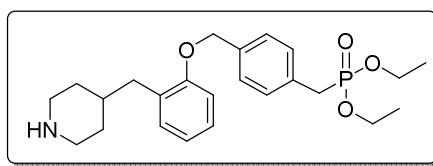
tert*-butyl 4-{{2-{{4-[(diethoxyphosphoryl)methyl]phenyl}methoxy}phenyl)methyl}piperidine-1-carboxylate **444*



Chemical Formula: C₂₉H₄₂NO₆P
Molecular Weight: 531.63

In a 10-20 mL microwave vial, phosphonate derivative (1.32 mg, 1.5 eq., 4.12 mmol) was dissolved in DMA (20 mL). To this mixture were sequentially added potassium carbonate (760 mg, 2 eq., 5.49 mol), phenol **428** (800 mg, 1 eq., 2.45 mmol) and finally a catalytic amount of sodium iodide (few crystals). This reaction was stirred for 30 min at 140°C under microwave irradiation, and the obtained solution was dissolved in water (20 mL) and diethyl ether (100 mL). The aqueous phase was then extracted twice ethyl acetate (2 x 50 mL), and the organic phases washed with water (5 x 40 mL), once with brine (40 mL), dried over MgSO₄ and evaporated. The residue was consequently purified by column chromatography (DCM / MeOH 99:1) to afford benzimidazole **444** compound as a white solid. (920 mg, 71%NMR yield)

diethyl ({4-[2-(piperidin-4-ylmethyl)phenoxy]methyl}phenyl)methyl)phosphonate **445**



Chemical Formula: C₂₄H₃₄NO₄P
Molecular Weight: 431,51

Following general procedure **3**, trifluoroacetic acid (7.2 mL, 100 eq., 94.0 mmol) was added to a solution of compound **444** (500 mg, 1 eq., 0.94 mmol) in DCM (15 mL). Pure compound **445** was obtained after flash column chromatography (DCM/MeOH 95:5), affording desired product as a light brown solid. (356 mg, 88%)

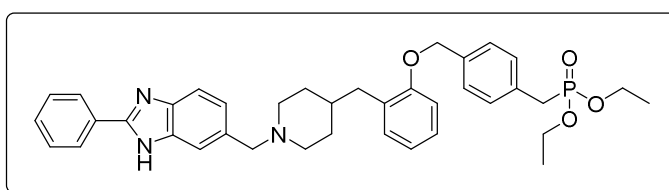
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.34 (dd, *J* = 8.0, 2.4 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.15 (m, 2H, H^{Ar}), 7.01 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.88 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.10 (s, 2H, CH₂-O), 4.04 (dq, *J* = 7.3, 7.2 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.35 (under MeOD peak, m, 2H, H², H⁶ pip), 3.26 (under MeOD peak, 2H, CH₂-P), 2.86 (dt, *J* = 12.5, 2.7 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 2.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.93 (m, 1H, H⁴ pip), 1.82 (bd, *J* = 15.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.42 (dq, *J* = 12.4, 3.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.65(C^{quat} -CH₂), 136.36 (d, *J* = 3.9 Hz, C^{quat}), 131.03 (d, *J* = 9.4 Hz, C^{quat}), 130.60(C^{Ar}), 129.76(d, *J* = 6.8 Hz, C^{Ar}), 127.62(C^{Ar}), 127.38(C^{Ar}), 127.32 (C^{Ar}), 120.44(C^{Ar}), 120.35(C^{Ar}), 111.87(C^{Ar}), 69.36(CH₂-O), 63.33 (d, *J* = 7.1 Hz, CH₂-O-P), 43.88 (C², C⁶ pip), 36.09(CH₂), 34.35(C⁴ pip), 31.96(d, *J* = 138.2 Hz, CH₂-P), 28.56 (C³, C⁵ pip), 15.24(d, *J* = 6.2 Hz, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.49

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₅NO₄P 432.2304, found 432.2306

diethyl ({4-[2-({1-[(2-phenyl-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}phenoxy]methyl}phenyl)-methyl)phosphonate **446**



Chemical Formula: C₃₈H₄₄N₃O₄P
Molecular Weight: 637,76

The title compound **446** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **372** (26 mg, 1 eq., 0.12 mmol), SOCl₂ (246 μL, 29 eq., 3.37 mmol) and then compound **445** (50 mg, 1 eq., 0.12 mmol), diisopropylethylamine (105 μL, 5.3 eq., 0.61 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **446** was obtained as an amorphous creamy solid. (13 mg, 18%)

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.11 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.65 (m, 2H, H^{Ar}), 7.57 (m, 3H, H^{Ar}), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.33 (m, 3H, H^{Ar}), 7.16 (dt, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.08 (s, 2H, CH₂-O), 4.02 (m, 6H, CH₂-O-P, CH₂-N), 3.25 (d, *J* =

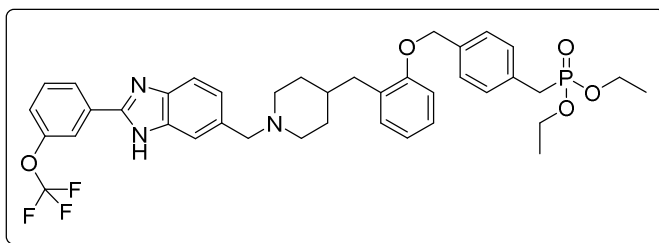
21.2 Hz, 2H, CH₂-P), 3.18 (bd, *J* = 12.1 Hz, 2H, H², H⁶ pip), 2.64 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 2.47 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 1.82 (m, 1H, H⁴ pip), 1.74 (bd, *J* = 14.5 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.45 (dq, *J* = 11.2, 2.7 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.62 (C^{quat} -CH₂), 153.11 (C^{quat}), 136.42 (d, *J* = 4.3 Hz, C^{quat}), 130.93 (d, *J* = 9.2 Hz, C^{quat}), 130.57 (C^{Ar}), 130.24 (C^{Ar}), 129.72 (d, *J* = 6.4 Hz, C^{Ar}), 129.38 (C^{Ar}), 128.81 (C^{Ar}), 128.30 (C^{Ar}), 127.26 (d, *J* = 3.2 Hz, C^{Ar}), 128.29 (C^{Ar}), 127.13 (C^{Ar}), 126.49 (C^{Ar}), 120.25 (C^{Ar}), 111.74 (C^{Ar}), 69.26 (CH₂-O), 62.30 (d, *J* = 7.3 Hz, CH₂-O-P), 61.89 (CH₂-N), 52.69 (C², C⁶ pip), 36.24 (CH₂), 35.25 (C⁴ pip), 31.88 (d, *J* = 138.1 Hz, CH₂-P), 30.13 (C³, C⁵ pip), 15.24 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₃)

³¹P NMR (162 MHz, MeOD) δ 27.27

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₈H₄₅N₃O₄P 638.3146, found 638.3144

diethyl {[4-(2-[[1-({2-[3-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **447**



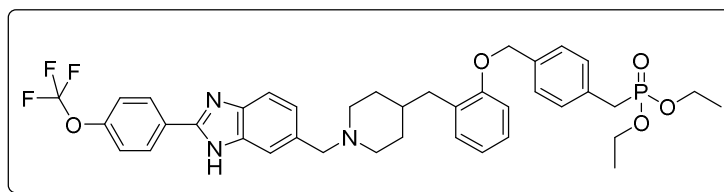
Chemical Formula: C₃₉H₄₃F₃N₃O₅P
Molecular Weight: 721.76

The title compound **447** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **373** (43 mg, 1 eq., 0.14 mmol), SOCl₂ (296 μL, 29 eq., 4.06 mmol) and then compound **445** (60 mg, 1 eq., 0.14 mmol), diisopropylethylamine (116 μL, 5.3 eq., 0.70 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **447** was obtained as an amorphous creamy solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H^{Ar}), 8.04 (s, 1H, H^{Ar}), 7.66 (m, 3H, H^{Ar}), 7.45 (m, 2H, H^{Ar}), 7.32 (m, 2H, H^{Ar}), 7.21 (m, 2H, H^{Ar}), 7.09 (m, 2H, H^{Ar}), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.82 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 4.98 (s, 2H, CH₂-O), 4.63 (s, 2H, CH₂-N), 3.92 (dq, *J* = 9.3, 7.2, 1.0 Hz, 4H, CH₂-O-P), 3.58 (m, 2H, H², H⁶ pip), 3.07 (d, *J* = 21.4 Hz, 2H, CH₂-P), 2.94 (bs, 2H, H², H⁶ pip), 2.68 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 2.09 (m, 2H, H², H⁶ pip), 1.82 (bd, *J* = 13.4 Hz, 2H, H³, H⁵ pip), 1.74 (m, 1H, H⁴ pip), 1.6 (m, 2H, H³, H⁵ pip), 1.13 (dt, *J* = 7.0, 0.3 Hz, 6H, CH₃).

HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]⁺ calcd for C₃₉H₄₄F₃N₃O₅P 722.2971, found 722.2967

diethyl {[4-(2-{{[1-({2-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **448**



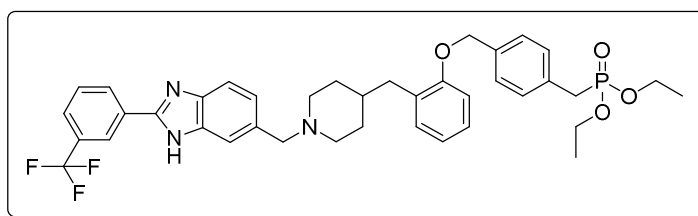
Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 721,76

The title compound **448** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **374** (43 mg, 1 eq., 0.14 mmol), $SOCl_2$ (296 μ L, 29 eq., 4.06 mmol) and then compound **445** (60 mg, 1 eq., 0.14 mmol), diisopropylethylamine (116 μ L, 5.3 eq., 0.70 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **448** was obtained as an amorphous creamy solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ 8.21 (d, J = 9.3 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.78 (s, 1H, H^{Ar}), 7.68 (s, 1H, H^{Ar}), 7.46 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.39 (s, 1H, H^{Ar}), 7.32 (m, 4H, H^{Ar}), 7.11 (m, 2H, H^{Ar}), 6.97 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.83 (td, J = 7.1, 0.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.05 (s, 2H, CH_2 -O), 4.37 (s, 2H, CH_2 -N), 3.99 (dq, J = 8.8, 7.1, 0.6 Hz, 4H, CH_2 -O-P), 3.42 (m, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.21 (d, J = 21.1 Hz, 2H, CH_2 -P), 2.94 (bs, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.61 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 1.95 (m, 1H, H^4 pip), 1.82 (bd, J = 15.8 Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.53 (m, H^3 , H^5 pip), 1.20 (dt, J = 7.1, 0.5 Hz, 6H, CH_3).

HRMS-ESI (m/z) [$M+H$] $^+$ calcd for $C_{39}H_{44}F_3N_3O_5P$ 722.2971, found 722.2966

diethyl {[4-(2-{{[1-({2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl}-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **449**



Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_4P$
Molecular Weight: 705,76

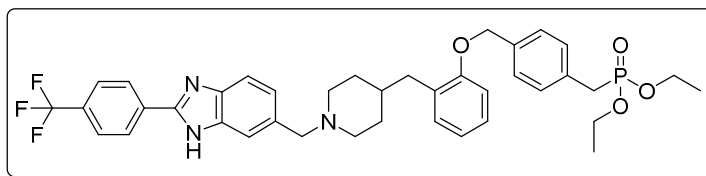
The title compound **449** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **375** (41 mg, 1 eq., 0.14 mmol), $SOCl_2$ (296 μ L, 29 eq., 4.06 mmol) and then compound **445** (60 mg, 1 eq., 0.14 mmol), diisopropylethylamine (116 μ L, 5.3 eq., 0.70 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **449** was obtained as an amorphous creamy solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ 8.44 (s, 1H, H^{Ar}), 8.36 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.96 (s, 1H, H^{Ar}), 7.75 (m, 5H, H^{Ar}), 7.53 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.44 (s, 1H, H^{Ar}), 7.32 (m, 2H, H^{Ar}), 7.18 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.08 (m, 1H, H^{Ar}), 6.81 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H^{Ar}), 4.96 (s, 2H, CH_2 -O), 4.63 (s, 2H, CH_2 -N), 3.97 (dq, J = 9.2, 7.0, 1.1 Hz, 4H, CH_2 -O-P), 3.13 (m, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.06 (d, J = 21.4 Hz, 2H, CH_2 -P), 2.67 (d, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 2.13 (m, 2H, H^2 , H^6 pip).

pip), 1.85 (bd, $J = 13.4$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.75 (m, 1H, H^4 pip), 1.44 (m, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.12 (dt, $J = 7.3$, 0.6 Hz, 6H, CH_3).

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{39}H_{44}F_3N_3O_4P$ 706.3022, found 706.3019

diethyl {[4-(2-[[1-({2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)methyl]piperidin-4-yl)methyl]-phenoxy)methyl]phenyl)methyl}phosphonate **450**



Chemical Formula: $C_{39}H_{43}F_3N_3O_4P$
Molecular Weight: 705.76

The title compound **450** was obtained following the general procedure 4 from benzimidazole **376** (41 mg, 1 eq., 0.14 mmol), $SOCl_2$ (296 μ L, 29 eq., 4.06 mmol) and then compound **445** (60 mg, 1 eq., 0.14 mmol), diisopropylethylamine (116 μ L, 5.3 eq., 0.70 mmol) in AcN (3 mL). After purification by silica gel column chromatography, eluting DCM/MeOH 95:5, the clean compound **450** was obtained as an amorphous creamy solid. The residue is currently being purified by high performance liquid chromatography.

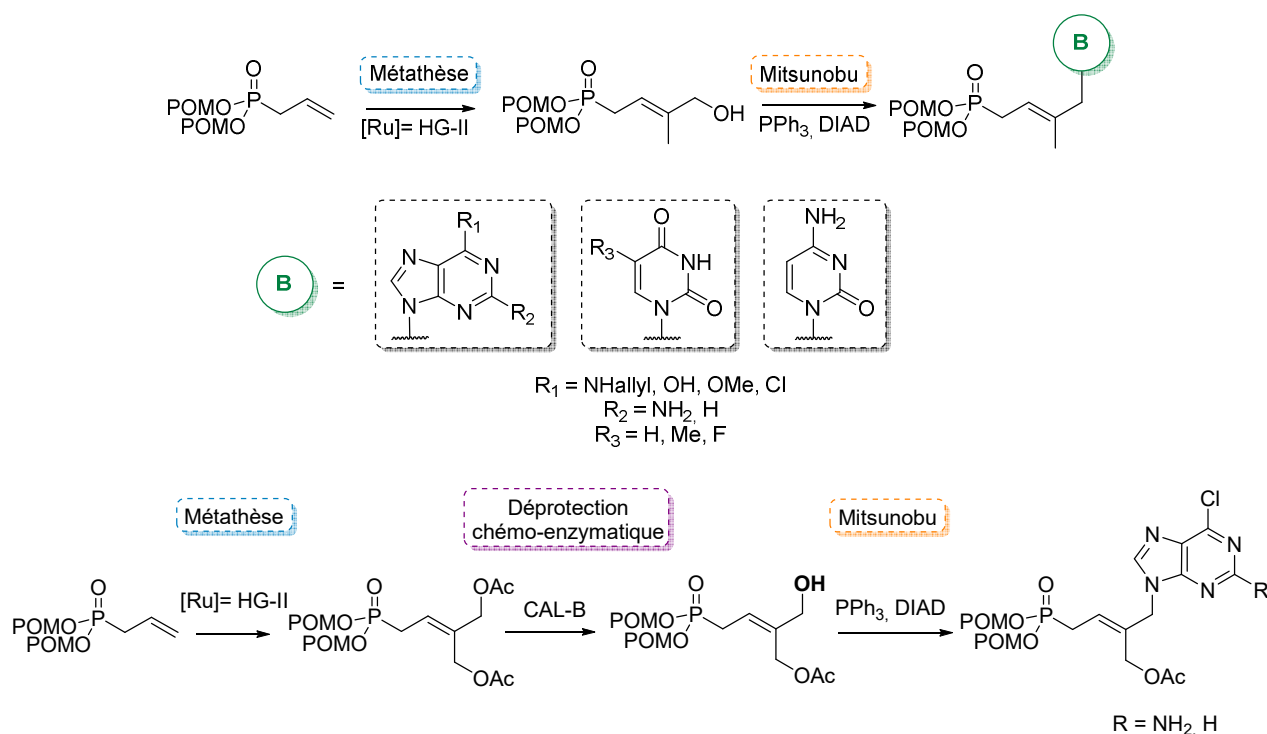
^1H NMR (250 MHz, MeOD) δ 8.45 (s, 1H, H^{Ar}), 8.36 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H^{Ar}), 7.75 (m, 4H, H^{Ar}), 7.35 (m, 5H, H^{Ar}), 7.10 (m, 2H, H^{Ar}), 6.96 (dd, $J = 8.2$, 0.9 Hz, 1H, H^{Ar}), 6.83 (dt, $J = 7.2$, 1.0 Hz, 1H, H^{Ar}), 5.04 (s, 2H, CH_2-O), 4.35 (s, 2H, CH_2-N), 3.99 (dq, $J = 8.6$, 7.1, 0.5 Hz, 4H, CH_2-O-P), 3.39 (bd, $J = 12.0$ Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 3.21 (d, $J = 21.6$ Hz, 2H, CH_2-P), 2.92 (bt, $J = 12.0$ Hz, 2H, H^2 , H^6 pip), 2.63 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.92 (m, 1H, H^4 pip), 1.81 (bd, $J = 14.7$ Hz, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.55 (m, 2H, H^3 , H^5 pip), 1.20 (td, $J = 7.0$, 0.5 Hz, 6H, CH_3).

HRMS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ calcd for $C_{39}H_{44}F_3N_3O_4P$ 706.3022, found 706.3017

Conclusion générale

Avec une quarantaine de composés approuvés par la FDA, les nucléosides restent une classe majeure dans la lutte contre les infections d'origine virales. L'apparition de lignées résistantes aux traitements actuels ainsi que de nouvelles espèces souligne l'importance de la conception et de la synthèse d'antiviraux inédites. Pour ce faire, il est possible de s'appuyer sur de nouveaux outils synthétiques puissants, comme les couplages organométalliques, ou les procédés d'activation alternatifs comme les ultrasons ou les micro-ondes. Ces types de réactions permettent un accès rapide et efficace à une large gamme de molécules, possédant de grandes diversités structurales.

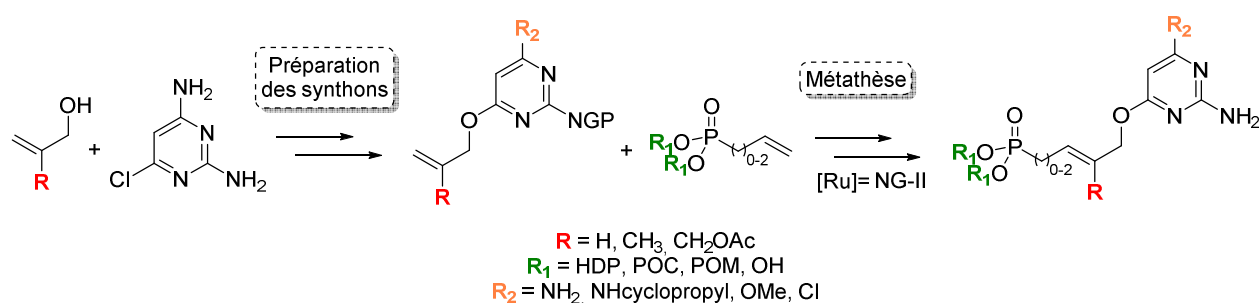
- Dans le premier chapitre, nous avons synthétisé des phosphonates *trans*-but-2'-ényl possédant une base purique ou pyrimidique sous forme bis(POM). Ces composés présentent un groupement méthyl et acétoxyméthyl en position 2'. Ils ont été formés à l'aide d'une réaction de métathèse croisée avec un synthon phosphonate portant des groupements biolabiles. Une déprotection chémo-enzymatique a été pratiquée sur ces derniers afin de permettre un couplage dans les conditions de Mitsunobu. Il est à noter qu'il a été développé des méthodes de synthèse de phosphonates, de fonctionnalisations sélectives de pyrimidines et de purines sous ultrasons et aux micro-ondes, afin de permettre un accès rapide et convergent aux ANPs désirés ce qui a fait l'objet de deux publications.



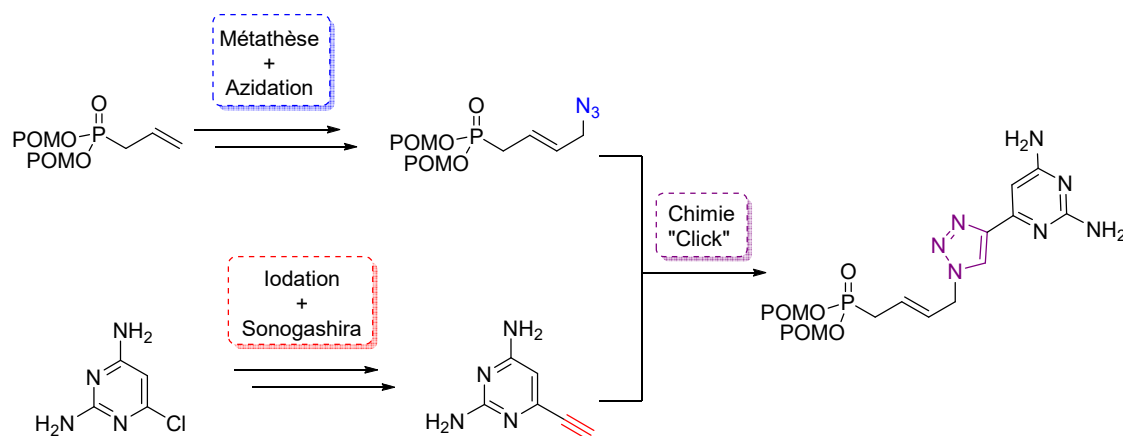
Nous avons par la suite évalué le potentiel antiviral de ces différents composés. En série 2'-méthyl, certains composés ont présenté des activités intéressantes sur HIV-1, allant jusqu'à un EC_{50} de 1.1 μM et un EC_{90} de 4.2 μM . En série 2'-acétoxy, sur les deux composés testés, la purine présentant un groupement amino en position 2' a montré un bon potentiel sur VZV TK+ et TK-, avec une activité de 0.80 μM . A la suite de ces très bons résultats, la modulation de la position C⁶ est actuellement en cours et dévoilera peut être des activités significatives sur ce virus à herpès.

- Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de composés intégrant le motif 2,4-diaminopyrimidine comme nucléobase non canonique. Possédant un pont éther le liant à la chaîne acyclique, ces hétérocycles sont dans un premier temps alkylés par les oléfines correspondantes. Encore

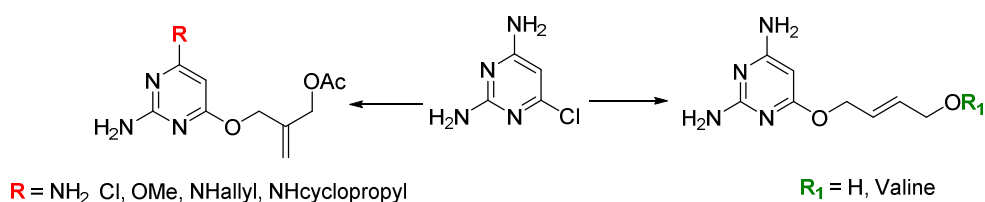
une fois, l'utilisation d'irradiation aux micro-ondes et aux ultrasons ont été prépondérants, pour la fonctionnalisation de ces noyaux.



Les couplages entre les synthons phosphonates et les pyrimidines alkylées sont réalisés par métathèse croisée sous ultrasons ou par cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen afin d'obtenir une large gamme d'ANPs.



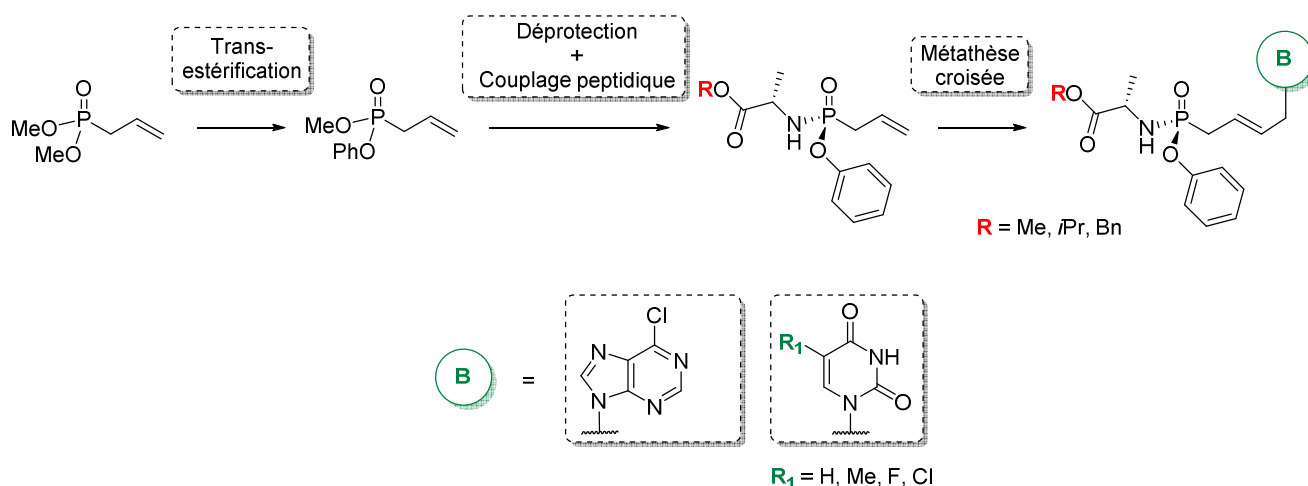
Pour finir, divers analogues structuraux inspirés de l'acyclovir, du valacyclovir et de l'entécavir furent synthétiser par simples substitutions nucléophiles de notre chloropyrimidine de départ.



Si les résultats biologiques de tous ces composés ne sont pas encore intégralement dévoilés, certains démontrent déjà des activités antivirales remarquables.

A titre d'exemple, le composé O-2,6-diaminopyrimidine 2'acétoxyméthyl-but-2'-ényl phosphonate sous sa forme HDP/POC montre une activité très élevée sur VZV TK+ et TK- de 12 et 15 nM, qui est *in vitro* 1000 fois plus actif que la brivudine de référence sur le VZV ne présentant pas de kinases. Un résultat tout aussi considérable est observé sur le CMV, sur lequel ce composé a une activité mesurée à 100 nM, ce qui est encore une fois plus puissant que le médicament administré lors d'infections à ce virus. La valorisation de ce projet est en cours par le dépôt d'un brevet sur cette série de molécules. Ces molécules sont envoyées au Dr. Jennifer Moffatt (Upstate Medical University, Syracuse) pour tester ces molécules sur le modèle animal, et plus précisément sur des souris humanisées.

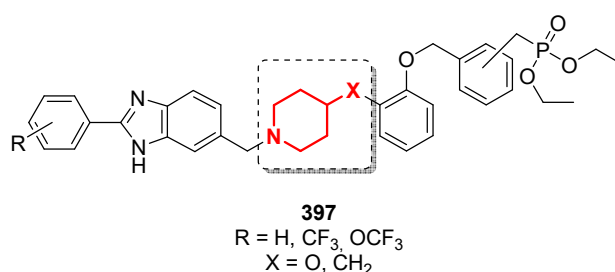
- Dans la troisième partie, nous avons cherché à développer nos ANPs sous forme phosphonoamidate. En effet, ces pronucléotides peu présents dans la littérature montrent des résultats très encourageants sur les molécules décrites, comme c'est notamment le cas sur le Tenofovir (Tenofovir alafenamide). Dans cette optique, il a été dans un premier temps décidé de synthétiser le noyau phosphonoamidate par substitution nucléophile suivie de l'introduction de l'acide aminé voulu. Dans un second temps, une optimisation de la métathèse croisée a été réalisée, mettant en évidence l'apport d'une activation aux ultrasons dans l'eau en présence de surfactants.



Ce procédé convergent constitue une alternative éco-compatible très puissante aux méthodes classiques de formation de phosphonoamidates. En effet, ces espèces phosphorées habituellement introduites en fin de synthèse s'accompagnent de rendements inférieurs à 5%. Notre méthode permet l'obtention d'un large panel de composés avec un rendement global autour de 15%.

L'analyse de ces composés en tant qu'antiviraux a montré un fort potentiel de la prodrogue phosphonoamidate, qui est deux à trois fois plus puissante que l'ANP sous forme bis(POM) et deux fois moins toxique que ce dernier.

- Dans la dernière partie, portant sur des travaux annexes pour l'inhibition du virus Ebola, nous avons développé une série de petites molécules portant sur l'inhibition supposée de la protéine Niemann-Pick C1. Après la synthèse des substrats benzimidazoles par la formation de ce cycle, et phosphonates par réaction de Michaelis-Arbuzov, ces deux parties hétérocycliques sont ensuite liées par un noyau pipéridine.



Les profils *in silico* de ces composés sont remarquables, montrant plusieurs candidats médicaments comportant un #stars compris entre 0 et 2, caractéristiques d'un profil ADME Tox très favorable. L'évaluation biologique des composés synthétisés pour leur activité anti Ebola sera réalisé et a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

ARTICLES ET COMMUNICATIONS DE L'AUTEUR

Publications

Bessières M., De Schutter C., Roy V., Agrofoglio L.A. Olefin Metathesis for the Synthesis of Alkenyl Acyclonucleosides Phosphonates, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2014**, 14.11

Bessières M., Roy V., Agrofoglio L.A. A convenient, highly selective and eco-friendly *N*-Boc protection of pyrimidines under microwave irradiation. *RSC Advances*, **2014**, 4, 59747-59749

Bessières M., Chevrier F., Roy V., Agrofoglio L.A. Recent progress for the synthesis of selected carbocyclic nucleosides. *Future Medicinal Chemistry*, **2015**, 7, 13, 1809-1828

Bessières M., Sari O., Roy V., Warszycki D., Bojarski A.J., Nolan S.P., Snoeck R., Andrei G., Schinazi R.F., Agrofoglio L.A. "Sonication-assisted synthesis of (E)-2-methyl-but-2-enyl nucleoside phosphonate prodrugs" *ChemistrySelect*, **2016**, 1, 12, 3108-3113

Chapitre d'ouvrage

Niemiec E, **Bessières M.**, Roy V., Agrofoglio L.A. Development of nucleosides analogues under microwave irradiation in « Microwaves in drug discovery and development: recent advances" Edited by John Spencer and Mark Bagley Publisher: *Future Science*, London. **2014**, Chapter 10.

Brevet

Agrofoglio L.A., Roy V., Niemiec-Plebanek E., **Bessières M.** « Benzimidazole derivatives for treating ebola virus infection » EP16306177 (dépôt 15/09/2016)

Communications

- Orales

Bessières, M. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Synthesis of new ANPs through an efficient ultrasonication-assisted route. SyCoCAL IX, Tours, 17-19 septembre 2014, **Prix de la meilleure communication**

Bessières, M. ; De Schutter, C. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Efficient access to new ANPs using ultrasonication as key step. Journées de la SCF, 18-20 février 2015

- Poster

Bessières, M. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Synthesis of Acyclo Nucleoside Phosphonates through an efficient ultrasonication-assisted route, SyCoCAL IX, Tours, 17-19 septembre 2014.

Bessières, M. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Synthesis of potential antiviral ANPs using eco-compatible strategies as versatile tools, RECOB 16, Aussois, 13-17 mars 2016

Bessières, M. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Potent access to new unsaturated acyclonucleoside phosphonates via acoustic/electromagnetic irradiation, BOSS XV, Antwerpen , 10-15 juillet 2016

Bessières, M. ; Sari, O. ; Roy, V. ; Nolan, S.P. ; Agrofoglio, L.A. Challenging syntheses of trisubstituted ANP as prodrug, achieved using microwave/acoustic irradiation, IRT XXII, Paris , 18-22 juillet 2016

Maxime BESSIERES

Synthèse métallo-catalysée de phosphonates *trans*-but-2'-ényl de nucléosides sous forme prodrogue

Résumé

Actuellement, les nucléosides représentent une classe majeure de composés dans les différentes thérapies anti-virales. Leur développement au cours des 50 dernières années a contribué à la mise sur le marché d'une quarantaine de composés, notamment dans la lutte des hépatites, des herpès et du VIH. Les infections virales représentent cependant toujours un large problème de santé publique, de par l'apparition de résistances aux médicaments existants ainsi que de nouvelles espèces virales. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux antiviraux plus actifs et plus sûrs. Dans ce manuscrit, il est décrit la synthèse métallo-catalysée d'acyclonucléosides phosphonate innovants, modifiés sur la partie phosphonate, nucléobase et sur la chaîne acyclique. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur des réactions de métathèses croisées et la synthèse convergente d'un large panel de nucléobases et phosphonates modifiés. Une importance toute particulière a été donnée à l'utilisation de nouvelles techniques d'activation comme le micro-ondes ou les ultrasons. Ces divers procédés de synthèse ont permis la synthèse de trois séries d'alkényl phosphononucléosides, qui se sont révélés d'une activité antivirale remarquable sur certains virus à herpès, comme le VZV ou le CMV.

Mots clés : nucléosides, anti-viraux, métathèse, acyclonucléosides, phosphonates, prodrogues, ultrasons, VZV, phosphonoamidate,

Metallo-catalyzed synthesis of *trans*-but-2'-enyl phosphonates nucleosides under prodrug form

Abstract :

Nucleosides represents a major class of compounds in different antiviral chemotherapies. Their development from now 50 years has led to the emergence of nearly 40 compounds, to contain many epidemics and in the fight against viral infections as HIV, hepatitis or herpes. Viral infections still represent a tremendous problem in public health with the emergence of resistance to known drugs and the appearance of new viruses. In this context, it's essential to develop new antivirals with higher activity and safer. This manuscript describes organo-metallic syntheses of new modified acyclonucleoside phosphonates, on the nucleobase, the phosphonate or the acyclic spacer. Thus, the use of cross-metathesis and convergent syntheses of a broad panel of nucleic bases and modified phosphonates represents a cornerstone of our work. A particular importance was given to the use of new activations way, as ultrasound or microwave irradiation. Those processes allowed us to synthesize three new families of acyclic phosphononucleosides, which revealed a remarkable antiviral activity against some herpes viruses, as VZV or CMV.

Keywords : nucleosides, antivirals, metathesis, acyclonucleosides, phosphonates, prodrug, ultrasound, VZV, phosphonamidate.



ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de Chartres
45067 Orléans cedex 2

