

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie de Strasbourg – UMR 7177

THÈSE

présentée par :

Mathilde MUNIER

soutenue le : 7 juillet 2016

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

Synthèses de prodrogues d'inhibiteurs de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) : des agents antituberculeux potentiels

THÈSE dirigée par :

Mme GROSDÉMANGE-BILLIARD Catherine
Mr. ROHMER Michel

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur Emérite, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme COSSY Janine
Mme ALVAREZ Karine

Professeur, ESPCI Paris Tech
Chargé de recherche, Université Aix Marseille II

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. HIBERT Marcel

Professeur de classe exceptionnelle, Université de
Strasbourg

Remerciements

Je remercie Madame le Professeur Janine Cossy de l'ESPCI Paris Tech, Madame la Chargée de Recherche Karine Alvarez de l'Université Aix Marseille II et Monsieur le Professeur Marcel Hibert de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse. Je tiens également à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Fondation de la Recherche en Chimie et l'Agence Nationale de la Recherche pour avoir financé ce projet.

Je remercie vivement le Professeur Michel Rohmer de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Merci pour sa confiance, sa formation scientifique, son aide mais également pour sa bonne humeur durant ces années de thèse. Je n'oublierai pas les nombreuses discussions scientifiques, botaniques, animalières, culinaires que nous avons eues et qui étaient souvent accompagnées de Bretzel.

Je remercie chaleureusement le Professeur Catherine Grosdemange-Billiard de m'avoir fait confiance pour mener ce projet, de m'avoir formée et épaulée durant les moments difficiles. Merci pour son amitié, son soutien quotidien et son écoute et de nous avoir approvisionné en centaines de Dinosaurius, petits gâteaux très appréciés au laboratoire.

Je remercie le Docteur Denis Tritsch qui a réalisé l'intégralité des tests biologiques. Un grand merci pour son aide, sa formation, sa générosité, pour les discussions et les « bonnes rigolades » au moment des apéros et surtout d'avoir répondu à mes nombreux « Denis j'ai une question ». Il pourra maintenant refaire la décoration de son bureau actuellement occupée par ma passion pour les animaux.

Je remercie les membres du service de RMN (Lionel, Bruno, Maurice et Jean-Daniel), du service de masse (Stéphanie et Mélanie) ainsi que les membres du magasin de chimie pour leur compétence et leur disponibilité.

Je remercie mes collègues et amis du laboratoire. Clément pour son soutien sans faille, sa joie de vivre et ces petits moments « philosophiques » que l'on avait pendant nos petites pauses. Je tiens plus particulièrement à remercier Fanny et « ma petite Aurore », mes

complices de paillasse et de bureau. Un grand merci et bravo à elles pour m'avoir encouragée, supportée et aidée pendant ces années de thèse. Je n'oublierai jamais les bons moments passés ensemble, les fous rires que l'ont a eus comme par exemple quand nous avons du éponger le laboratoire rempli d'eau, les pauses improvisées au niveau de l'escalier de secours quand il était tard et tous les bons « délires » que nous avons eu ensemble, trop nombreux pour tous les citer. Merci Aurore d'avoir permis la réintroduction des chansons de Céline Dion dans le laboratoire ! Je vous souhaite à toutes les deux bon courage pour la fin de votre thèse.

Je remercie également les autres membres du laboratoire : Nader, Wenjun, Agata, Mathieu, Céline, Antoine, Ouidad, Thibault et Elyse pour leur gaieté et leur présence. Je tenais également à remercier, nos gestionnaires, Paola Sager et Huguette Decker pour leur efficacité et leur disponibilité ainsi que les anciens membres du laboratoire : Magali, Philippe, Myriam, Claire et Morane.

Je remercie Elise, Patricia, Nicole et Justine, nos voisines de palier et membres du groupe du Professeur Bechinger, qui ont égayé nos pauses repas.

Je remercie tous mes amis Juju, Elodie, Nico K et Sophie... et plus particulièrement Marie-Laure et Nicolas mes comparses de révision pendant les années de Licence et Master et leur soutien durant ces années de thèse. Un grand merci à Marie-Cécile qui a toujours été présente et qui a su me remonter le moral quand j'en avais besoin.

Je remercie toute ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont toujours aidée, encouragée et permis de faire les études de mon choix.

Je tenais plus particulièrement à remercier mon copain Mathieu qui a été d'un immense soutien moral, non seulement durant ces quatre années de thèse mais également pendant les années de Licence de Master. Je le remercie du fond du coeur de m'avoir épaulée quotidiennement, de m'avoir réconfortée et rassurée dans les moments de doutes, de m'avoir encourager et surtout d'avoir toujours cru en moi.

Un immense merci à tous, car sans vous cette belle aventure n'aurait pas eu la même saveur.

Liste des abréviations

AG : arabinogalactane
AMK : amikacine
Araf: D-arabinofuranose
AZT : 3'-azido-3'-désoxythymidine
BEN : *N,N'*-éthylènebis(benzylidiimine)
CDI : *N,N'*-carbonyldiimidazole
CEM/O : lymphocyte humain
CEM/TK : lymphocyte humain déficitaire en thymidine kinase
CMI : concentration minimale inhibitrice
m-CPBA : acide *mé*ta-chloroperbenzoïque
CPM : capréomycine
d4A : 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxyadénosine
d4T : 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxythymidine
d4TMP : 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxythymidine monophosphate
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DCM : dichlorométhane
ddA : 2',3'-didésoxyadénosine
ddUMP : 2',3'-didésoxyuridine monophosphate
DIC : diisopropylcarbodiimide
DIM : dimycocérosate de phtiocérol
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMAPP diphosphate de diméthylallyle
DMB : 2,4-diméthoxybenzyle
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMT : dimycolate de thrélose
DXP : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate
DXR : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase
DXS : 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase
EC₅₀ : concentration efficace médiane
EDC.HCl : chlorhydrate de (*N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

EMB : éthambutol
ETH : éthionamide
FPP : diphosphate de farnésyle
FQ : fluoroquinolones
Gal β : D-galactofuranose
GAP : glycéraldéhyde 3-phosphate
GlcNAc : *N*-acétyl- β -glucosamine
GGPP : diphosphate de géranylgéranyle
GPP : diphosphate de géranyle
HBTU : *N,N,N',N'*-Tétraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HPOA : acide pyrazinoïque
IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane
IDR : intradermoréaction à la tuberculine
INH : isoniazide
IPP : diphosphate d'isopentényle
K_i : constante d'inhibition
KM : kanamycine
LAM : lipoarabinomannane
LiHMDS : bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
LM : lipomannane
Man β : D-mannopyranose
MDR-TB : tuberculose multirésistante (« Multi-Drug-Resistance Tuberculosis »)
MEP : 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate
MMT : monomycolate de tréhalose
MurNGlyc : acide *N*-glycosyl- β -D-muramique
MVA : mévalonate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMI : *N*-méthylimidazole
3'-OAcdT : 3'-*O*-acétyl-2'-désoxythymidine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PG : peptidoglycane
PGL : dimycocérosates de phénol phtiocérol
PI : phosphatidylinositol

PIM : phosphatidylinositol mannoside

PMEA : 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine ou adéfovir

PMPA : 9-(*R*)-(2-phosphonométhoxypropyl)adénine ou ténofovir

POA⁻ : anion pyrazinoate

PSA : acide *p*-aminosalicylique

PyBOP : (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

PZA : pyrazinamide

RMP : rifampicine

SL : sulfolipides

SM : streptomycine

TBAF.3(H₂O) : fluorure de tétrabutylammonium trihydraté

TBHP : hydroperoxyde de *t*-butyle

TEA : triéthylamine

TFA : d'acide trifluoracétique

TMSBr : bromotriméthylsilane

TPP : diphosphate de thiamine

XDR-TB: tuberculose ultra-résistante (« Extensively Drug Resistance Tuberculosis »)

Table des matières

Introduction générale	1
I. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1. Généralités.....	2
2. L'enveloppe de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
a. La membrane plasmique.....	3
b. La paroi.....	4
c. La capsule	7
II. La tuberculose.....	11
1. De sa découverte à nos jours	11
2. Quelques chiffres.....	12
3. Le cycle infectieux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
a. La primo-infection.....	14
b. La réactivation.....	15
4. Vaccination et intradermoréaction	16
a. Vaccination par le BCG.....	16
b. L'intradermoréaction à la tuberculine	17
5. Les antituberculeux	18
a. Les antituberculeux de première intention	19
b. Les antituberculeux de seconde intention	22
III. Les isoprénoïdes	25
1. Généralités.....	25
2. Biosynthèse de l'IPP et DMAPP.....	28
3. La voie du mévalonate (MVA)	29
4. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).....	30
a. Étape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS).....	32
b. Étape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR)	33
5. Les inhibiteurs de la DXR.....	39
a. Les inhibiteurs naturels.....	39
b. Les inhibiteurs synthétiques	41
IV. Les prodrogues.....	51
1. Prodrogues de phosphates et phosphonates.....	52

2. Les prodrogues d'inhibiteurs de la DXR.....	62
V. Objectif de la thèse.....	65
Chapitre I : Synthèse de prodrogues de type <i>cyclo</i>Saligényle d'inhibiteurs phosphonates et phosphates de la DXR	84
Introduction - Les prodrogues <i>cyclo</i>Saligényles.....	85
I. Mécanisme de libération de la prodrogue.....	87
II. Synthèses des dérivés d'acide salicyliques et des prodrogues <i>cyclo</i> Saligényles.....	88
III. Les <i>cyclo</i> Saligényles dans la littérature.....	90
1. Première génération de <i>cyclo</i> Saligényle phosphate	90
2. Synthèse diastéréosélective de prodrogue de type <i>cyclo</i> Saligényle.....	93
3. Première génération de <i>cyclo</i> Saligényle phosphonate	95
4. Deuxième génération de <i>cyclo</i> Saligényle phosphate	96
5. Troisième génération de <i>cyclo</i> Saligényle.....	98
6. Les bis- <i>cyclo</i> Sal-pronucléotides.....	100
Partie 1 : Prodrogues de type <i>cyclo</i>Saligényles d'inhibiteurs phosphonates de la DXR	106
I. Synthèse des prodrogues 161a-b et 162a-b	106
1. Mise au point de l'étape clé de la synthèse	106
a. Synthèse via le dichlorophosphonyle	107
b. Synthèse via un acide phosphonique.....	109
2. Application de la méthode pour la synthèse des composés 161a-b et 162a-b	112
II. Conclusion	116
Partie 2 : Synthèse de la fosfoxacine et de ses analogues – Evaluation et comparaison avec leurs analogues phosphonates	120
I. La fosfoxacine.....	120
II. Synthèse de la fosfoxacine et de ses analogues	121
1. Synthèse des acides rétro-hydroxamiques phosphates 30 et 177	121
2. Synthèse des acides hydroxamiques phosphates 178a et 178b	125
III. Détermination des propriétés inhibitrices.....	129
IV. Conclusion	135
Partie 3 : Prodrogues de type <i>cyclo</i>Saligényle d'inhibiteurs phosphates de la DXR.	138
I. Test de stabilité du <i>cyclo</i> Saligényle phosphate à différents pH.....	138

II. Synthèse des prodrogues de type <i>cyclo</i> Saligényle d'inhibiteurs phosphates de la DXR	145
1. Schémas rétrosynthétiques pour la synthèse des composés 199-200 et 201-202	146
2. Synthèse des intermédiaires de type B et H	147
3. Synthèse des différents dérivés d'alcool salicylique	152
4. Synthèse des dérivés <i>cyclo</i> Salphosphochloridates	153
5. Etape clé : réaction d'addition-élimination des alcools 209-212 sur les <i>cyclo</i> Salphosphochloridates 195a-g	154
6. Etape finale : déprotection sélective	157
III. Etude spectroscopique des conformations des acides rétro-hydroxamique et hydroxamique	158
1. Molécules comprenant un acide rétro-hydroxamique 207 à 210 et 215a-g , 216a-g , 199 et 200	158
2. Molécules comprenant un acide hydroxamique 211 , 212 , 217a-g , 218a-g , 201 et 202	163
IV. Evaluation du pouvoir inhibiteurs des prodrogues	165
V. Synthèse des composés 220 et 221	171
VI. Conclusion	175

Chapitre II : Synthèse de prodrogues de type aryl phosphoramidate d'inhibiteurs phosphates de la DXR.....	180
I. Introduction	181
II. Synthèse des composés 239a-b et 240a-b	188
1. Schéma rétrosynthétique	188
2. Synthèse des intermédiaires réactionnels de type B et D	189
3. Synthèse de l'intermédiaire réactionnel de type C	191
4. Réaction d'addition élimination : obtention des composés 240a-b , 241a-b , 243a-b et 244a-b	191
5. Déprotection finale	194
III. Evaluation du pouvoir inhibiteur des molécules 240a-b à 244a-b	195
IV. Conclusion	197
Conclusion générale et perspectives	202
Partie expérimentale	206

Introduction générale

I. *Mycobacterium tuberculosis*

1. Généralités

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des Actinomycétales, comprenant de nombreuses espèces comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent pathogène de la tuberculose) mais également *Mycobacterium leprae* (agent responsable de la lèpre). Ce sont des bacilles aérobies qui, d'un point de vue morphologique, ont une forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés. Ils sont immobiles, ne formant ni spores ni capsules (Figure 1).

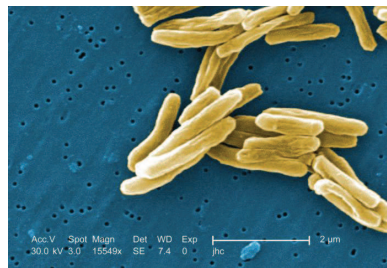


Figure 1 : *Mycobacterium tuberculosis*.

La composition particulière de leur paroi ne permet pas une coloration par les méthodes conventionnelles, bien que quelquefois ces bactéries réagissent positivement à la coloration de Gram. Des techniques dérivées de la méthode Ziehl-Neelsen permettent de mettre en évidence le bacille tuberculeux : la coloration préalable avec la fuchsine basique résiste aux traitements à l'acide puis à l'alcool. Les bactéries apparaissent ainsi roses. Ces bacilles sont alors dits acido-alcool-résistants (BAAR), qui est une des trois caractéristiques des mycobactéries. Les deux autres sont la présence d'acides mycoliques de 60 à 90 atomes de carbone et le taux élevé de guanine-cytosine de l'ADN généralement compris entre 61 et 71%.¹ Les espèces appartenant au genre *Mycobacterium* peuvent être divisées en deux groupes : (i) les bactéries à croissance rapide c'est-à-dire qui se développent en colonies en moins de 7 jours et (ii) les bactéries à croissance lente qui ne formeront une colonie qu'après 7 jours sur milieux solides. Généralement les bacilles à croissance lente sont pathogènes pour l'Homme, comme *M. tuberculosis* et *M. leprae* alors que ceux à croissance rapide le sont peu ou pas comme *M. smegmatis*.

2. L'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis*

L'enveloppe cellulaire des mycobactéries est non seulement essentielle pour leur croissance mais aussi pour leur survie chez l'hôte. Elle possède une structure unique différente de celle des autres bactéries. En effet, sa haute teneur en lipides rend cette enveloppe relativement imperméable vis à vis de molécules hydrophiles et polaires. On parle alors de résistance innée.

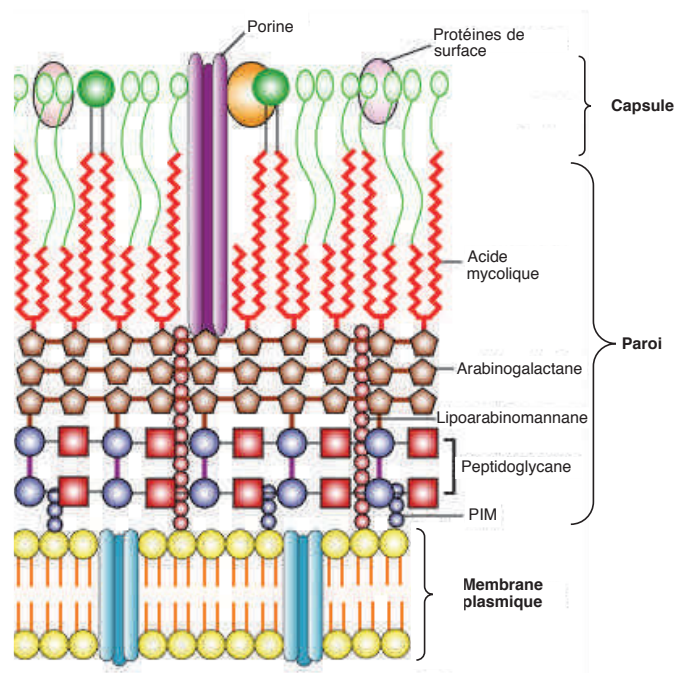


Figure 2 : Schéma de la membrane mycobactérienne (Copyright © Gary E. Kaiser, <http://faculty.ccbcmd.edu/>).

L'enveloppe mycobactérienne est constituée de trois éléments majeurs : la membrane plasmique qui est entourée d'une paroi cellulaire (riche en lipides et en dérivés de glucides) qui est elle-même, recouverte d'une capsule composée de protéines, de polysaccharides et d'une faible quantité de lipides (Figure 2).

a. La membrane plasmique

La membrane plasmique de *M. tuberculosis* ne diffère pas de celles des autres bactéries. Elle est constituée de lipides à têtes polaires, de phospholipides associés à des protéines afin de former une barrière imperméable entourant le cytosol. Les lipides à têtes

polaires contiennent des acides gras à courtes chaînes, comme les acides palmitique ($C_{16:0}$), octadécénoïque ($C_{18:1}$) et 10-méthyloctadécénoïque ou tuberculostéarique (C_{19r}). Les principaux phospholipides présents au niveau de la membrane sont le phosphatidylglycérol, le phosphatidylinositol mannoside (PIM), la cardiolipine et la phosphatidyléthanolamine. Du phosphatidylinositol est également présent mais en petite quantité.² La membrane plasmique sert également de point d'ancrage aux lipoarabinomannanes présents dans la paroi de la mycobactérie mais est également impliquée dans les processus pathologiques.³ Elle contient d'autres composants tels que les caroténoïdes impliqués dans la protection contre les dommages photolytiques, ainsi que des ménaquinones responsables des transferts d'électrons.

b. La paroi

Les peptidoglycanes (PG)

Les peptidoglycanes des mycobactéries sont similaires à ceux des autres bactéries. Ils donnent la rigidité et la forme aux bacilles. Cet hétéropolymère est formé d'un enchainement successif de *N*-acétyl- β -glucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-glycosyl- β -D-muramique (MurNGlyc) via une liaison $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosidique. La *N*-glycolylation de l'acide muramique est spécifique aux mycobactéries, car cet acide est généralement *N*-acétylé chez les autres bactéries.⁴ La fonction carbonyle de l'acide muramique est liée à un tétrapeptide, le L-alanyl-D-isoglutaminy-*méso*-diaminopimétyl-D-alanine (L-Ala-D- γ -Glu-*m*-DAP-D-Ala), qui permet d'associer les différentes chaînes glycanes entre elles pour former un réseau conférant la rigidité au peptidoglycane (Figure 3). Ces chaînes glycanes sont liées de deux façons différentes, soit par une liaison entre deux résidus d'acide diaminopimélique soit par une liaison entre un acide diaminopimélique et une D-alanine.⁵ La position C-6 du MurNGlyc est substituée (10-12 %) par un lien disaccharidique phosphorylé (L-Rhap(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GlcNAc-1-P) permettant de lier de façon covalente le peptidoglycane avec l'arabinogalactane (Figure 4).⁶

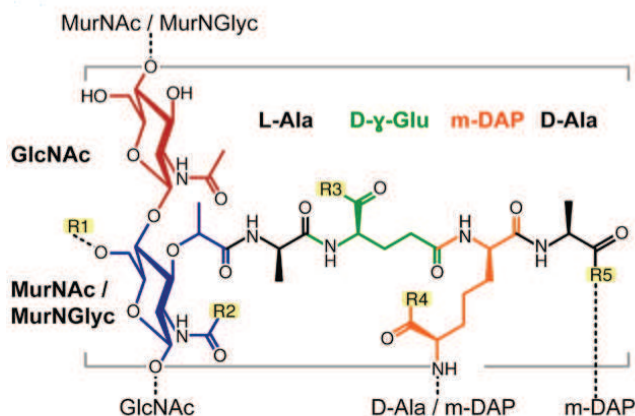


Figure 3 : Structure du peptidoglycane : $R^1=H$ ou lien avec arabinogalactane, $R^2=CH_2OH$, $R^3=R^4=OH$, $R^5=OH$ ou liaison amide avec *m*-DAP. (Yao *et al. J. Mol. Biol.*, **2012**, 416, 208-220).

Les arabinogalactanes (AG)

L'arabinogalactane est le composé majeur de la paroi mycobactérienne (35 % du poids sec). Il est composé de D-galactofuranose (Gal_f) et de D-arabinofuranose (Ara_f).⁷ Le domaine galactane représente la chaîne principale de ce polymère. Il est construit à partir d'une succession d'environ 30 résidus de D-galactofuranose liés alternativement par des liaisons $\beta(1\rightarrow5)$ et $\beta(1\rightarrow6)$ -glycosidique. Le domaine arabinane est composé de 27 résidus de D-arabinofuranose liés en $\alpha(1\rightarrow5)$ -glycosidique et ramifié en position C-3 tous les 4 résidus. Ce squelette arabinane est accroché sur le squelette galactane au niveau des positions C-5 ou du C-6.^{2,5} L'arabinogalactane est lié au peptidoglycane via un lien disaccharide phosphorylé, le L-Rhap(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-GlcNAc-1-P (Figure 4).⁸

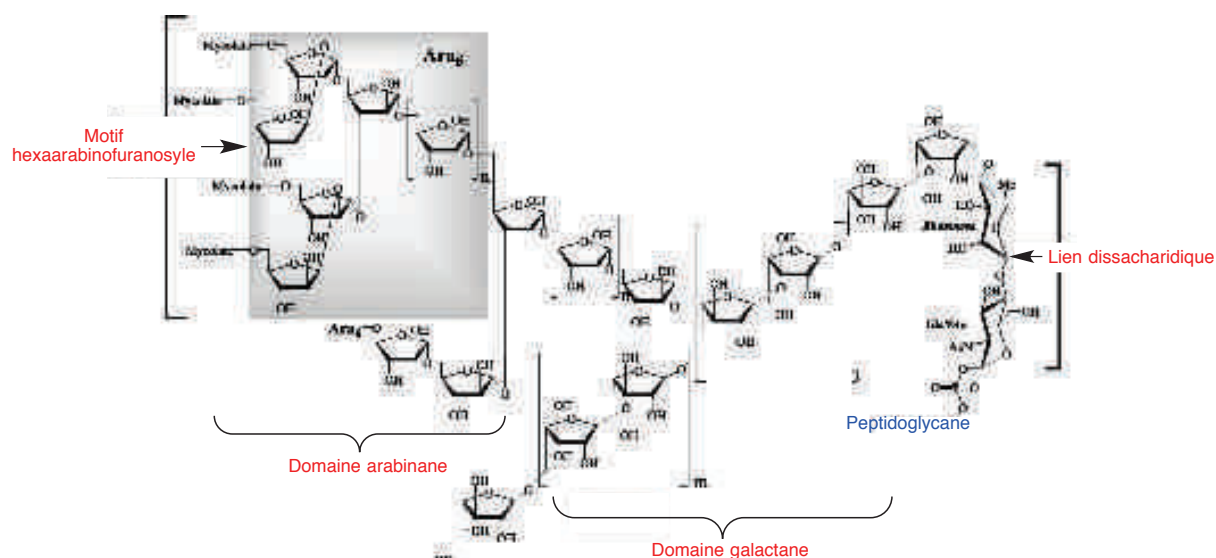


Figure 4 : Structure des arabinogalactanes de *Mycobacterium* (Lee *et al. Glycology*, **2005**, 15, 139-151).

Les domaines arabinanes se terminent par un motif hexaarabinofuranosyle dont deux tiers des extrémités non réductrices sont estérifiées par des acides mycolique.⁹

Les acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras α -ramifiés et β -hydroxylés longs de 70 à 90 atomes de carbone, qui sont présents dans la paroi des bactéries Gram positives. Ils sont composés de deux chaînes : une chaîne courte ou chaîne alpha comportant 24 à 26 atomes de carbone et une chaîne longue appelée chaîne méromycolique formée de 48 à 62 atomes de carbone (Figure 5).

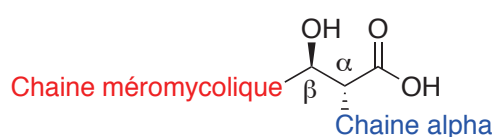


Figure 5 : Structure générale des acides mycoliques.

La chaîne méromycolique peut être fonctionnalisée par des groupements en deux positions différentes de la chaîne aliphatique, les positions distale et proximale. Si aucune des deux chaînes alpha et méromycolique n'est oxygénée on parle d' α -mycolate, par contre si la chaîne méromycolique est oxygénée on parle de mycolates oxygénés. Dans le cas de *M. tuberculosis* les acides mycoliques les plus rencontrés sont un α -mycolate (chaîne méromycolique non oxygénée), deux méthoxymycolates et deux oxomycolates (chaîne méromycolique oxygénée) (Figure 6).¹⁰

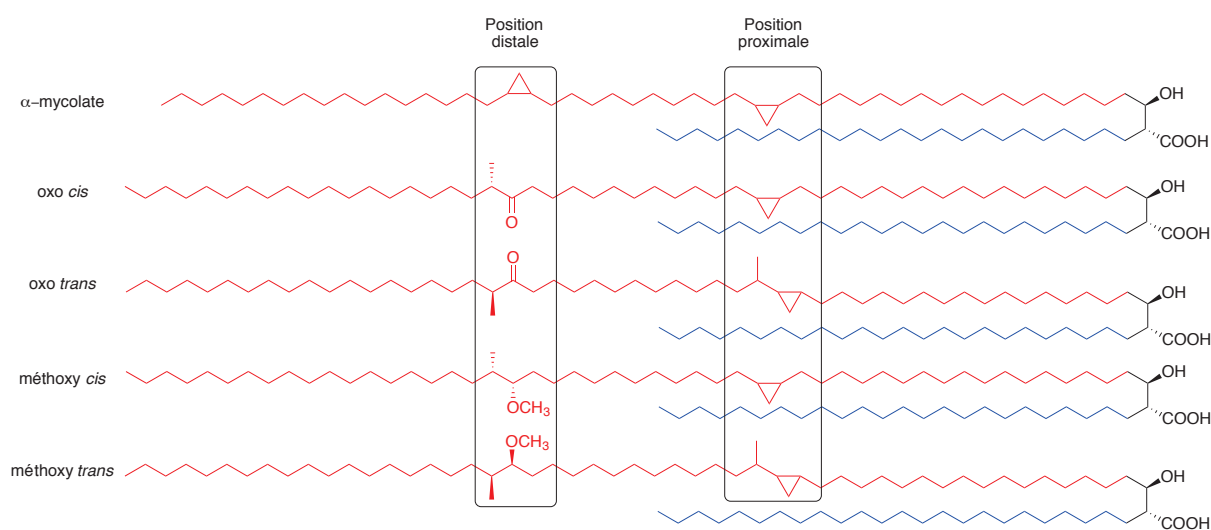


Figure 6 : Les principaux acides mycoliques présents chez *M. tuberculosis*.

Dans la mycomembrane deux types d'acides mycoliques sont présents : ceux liés au squelette pariétal sur les unités hexaarabinofuranosyles de l'arabinogalactane (Figure 4) et ceux non liés à la paroi et qui sont estérifiés par un tréhalose (le monomycolate de tréhalose (MMT) et le dimycolate de thréhalose (DMT)), appartenant aux lipides extractibles de la capsule.⁵

c. La capsule

La mycomembrane est une pseudo-bicouche lipidique composée d'un feuillet interne et d'un feuillet externe. Les acides mycoliques liés de façon covalente à l'arabinogalactane sont les constituants du feuillet interne. Des lipides dits « extractibles » composent le feuillet externe : ils ne sont pas liés de manière covalente à la paroi mais simplement associés entre eux par des liaisons hydrophobes (Figure 2). Ils sont dits « extractibles » car ils peuvent être extraits de la paroi par des solvants organiques. Dans cette partie, une description des composants formant la capsule sera abordée de manière succincte.

Les lipides extractibles

Les glycolipides présents dans la capsule représentent 2 à 3 % de la masse du bacille. Ils sont formés en quatre grandes familles : les glycolipides phénoliques, les lipides à tréhalose, les lipides à mannose et les glycopeptidolipides. Cette dernière famille étant absente chez *M. tuberculosis*, elle ne sera pas développée dans ce paragraphe.

- Les glycolipides phénoliques : le dimycocérosate de phtiocérol (DIM) et les dimycocérosates de phénol phtiocérol (PGL)

Le DIM est le lipide « extractible » majeur chez le bacille tuberculeux. Il est extrêmement apolaire et peut être considéré comme une cire (Figure 7). Le squelette principal est une longue chaîne composée de 35 atomes de carbone portant deux fonctions hydroxyles, le phtiocérol. Le diol est estérifié par deux acides mycocérosiques ayant une longueur de chaîne carbonée allant de C₂₇₋₃₁.¹¹ Les PGL, produits en plus petites quantités chez *M. tuberculosis*, sont également construits avec un squelette phtiocérol, mais dont une extrémité porte un phénol substitué par un oligosaccharide, qui varie selon la nature de la bactérie. Chez *M.*

tuberculosis, le glucide est composé d'un résidu fucose totalement *O*-méthylé et de deux résidus rhamnose (Figure 7). Le DIM et PGL sont impliqués dans la virulence des bacilles tuberculeux, mais également dans la très faible perméabilité de leur enveloppe.

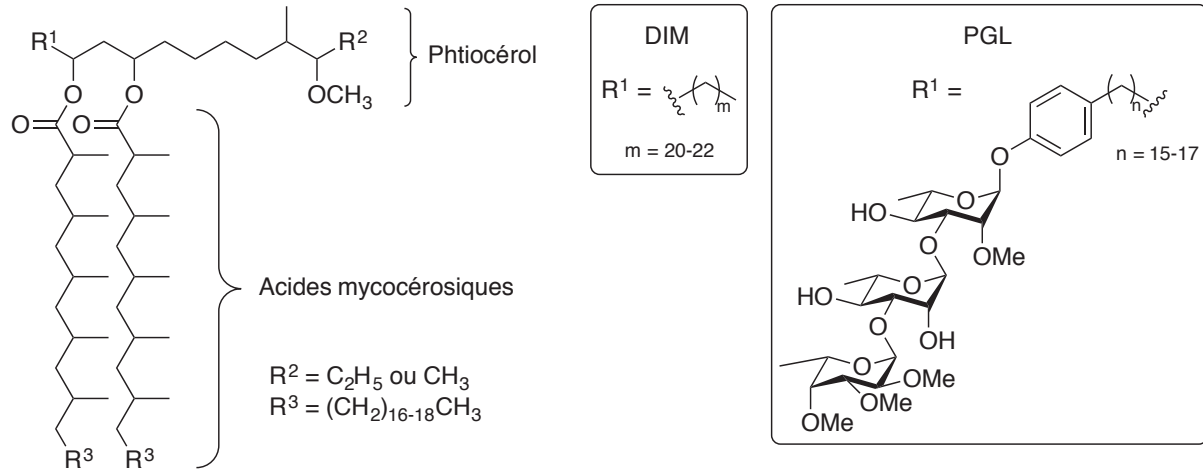


Figure 7 : Structure du dimycocérosate de phthiocérol (DIM) et du dimycocérosate de phénolphthiocérol (PGL) (Siméone *et al.* *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 4597-4602).

- les lipides à tréhalose

Cette catégorie est représentée par du tréhalose estérifié par des acides mycoliques, le mono et le dimycolate de tréhalose (MMT et DMT Figure 8-A). L'interaction du DMT avec certains récepteurs provoque la sécrétion de cytokines, molécules impliquées dans la réponse inflammatoire provoquée par *M. tuberculosis*. De plus, il réduit l'activité des enzymes dépendantes du cofacteur NADH.²

Les sulfolipides (SL) sont composés d'une molécule de tréhalose sulfaté en position C-2 et estérifiés par quatre acides gras en C-2', C-3', C-6' et C-6.^{12,13} Les études de Goren *et al.* ont permis de mettre en évidence la nature des quatre acides gras substituant le glucide : la position C-2' est substituée par l'acide palmitique ou stéarique, la position C-3' par de l'acide phthiocéranique, enfin les positions C-6 et C-6' par l'acide hydroxyphthiocéranique (Figure 8-B).¹⁴ Ces molécules seraient à l'origine de la modulation de la réponse cellulaire comme la fusion phagosome-lysosome et la production de cytokine.¹⁵

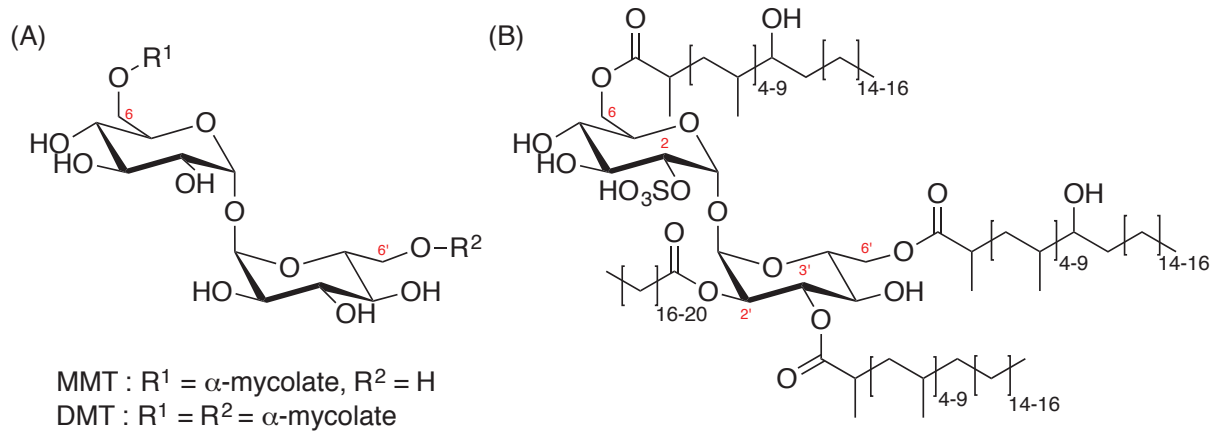


Figure 8: (A) Monomycolate de tréhalose (MMT) et dimycolate de tréhalose (DMT).
 (B) Sulfolipide majeur présent chez *M.tuberculosis*.

- les lipides à mannose

Cette famille est constituée du phosphatidylinositol mannoside (PIM), du lipomannane (LM) et du lipoarabinomannane (LAM) (Figure 9). Le LAM est un lipopolysaccharide s'enchevêtrant de manière non covalente dans la paroi mycobactérienne. Il est composé de deux domaines, un domaine glycosidique qui est un polymère de mannose (*Manp*) et d'arabinose (*Araf*) et un domaine lipidique ancré dans la membrane plasmique. Ce point d'ancrage est constitué d'un groupement phosphatidylinositol (PI) estérifié au niveau du glycérol par des acides palmitique et tuberculostéarique (R^1 et R^2). Le *myo*-inositol porte en position C-2 un mannose acétylé (R^3). En position C-6 du *myo*-inositol commence le domaine glucidique constitué d'un polymère de mannose (10 à 20 unités) lié en $\alpha(1\rightarrow6)$ -glycosidique. Ce glycoside est plus ou moins ramifié en C-2 par d'autres unités mannoses via une liaison $\alpha(1\rightarrow2)$ -glycosidique (Figure 9). Ce polymère de mannose ramifié et branché sur un PI est appelé lipomannane (LM). Le LAM dérive du LM par adjonction d'un polymère ramifié d'arabinose (*Araf*) sur un mannose (*Manp*) du LM. Les liaisons impliquées dans le polymère d'arabinose sont de type $\alpha(1\rightarrow5)$ -glycosidique. Le type de liaison glycosidique au niveau de l'embranchement mannose-arabinose seraient de type $\alpha(1\rightarrow2)$ -glycosidique.^{3,16} Ce polymère est branché avec des tétramères ou des hexamères d'arabinose dont les domaines terminaux varient selon les espèces. En effet, chez les espèces à croissance lente, comme *M. tuberculosis*, un mono ou oligosaccharide de mannose coiffe l'extrémité non réductrice de la plupart des branches d'arabinose : on parle alors de ManLAM.¹⁷ A l'inverse, chez les espèces à croissance rapide comme *M. smegmatis*, la coiffe est un phospho-*myo*-inositol : on parle

alors de AraLAM (Figure 9).¹⁸ La nature de ces coiffes serait impliquée dans les processus pathologiques des mycobactéries. En effet, les LAM permettent l'induction d'une gamme variée de cytokines associées aux macrophages. Certaines cytokines moduleraient l'activation des macrophages alors que d'autres sembleraient promouvoir la croissance des bacilles.³

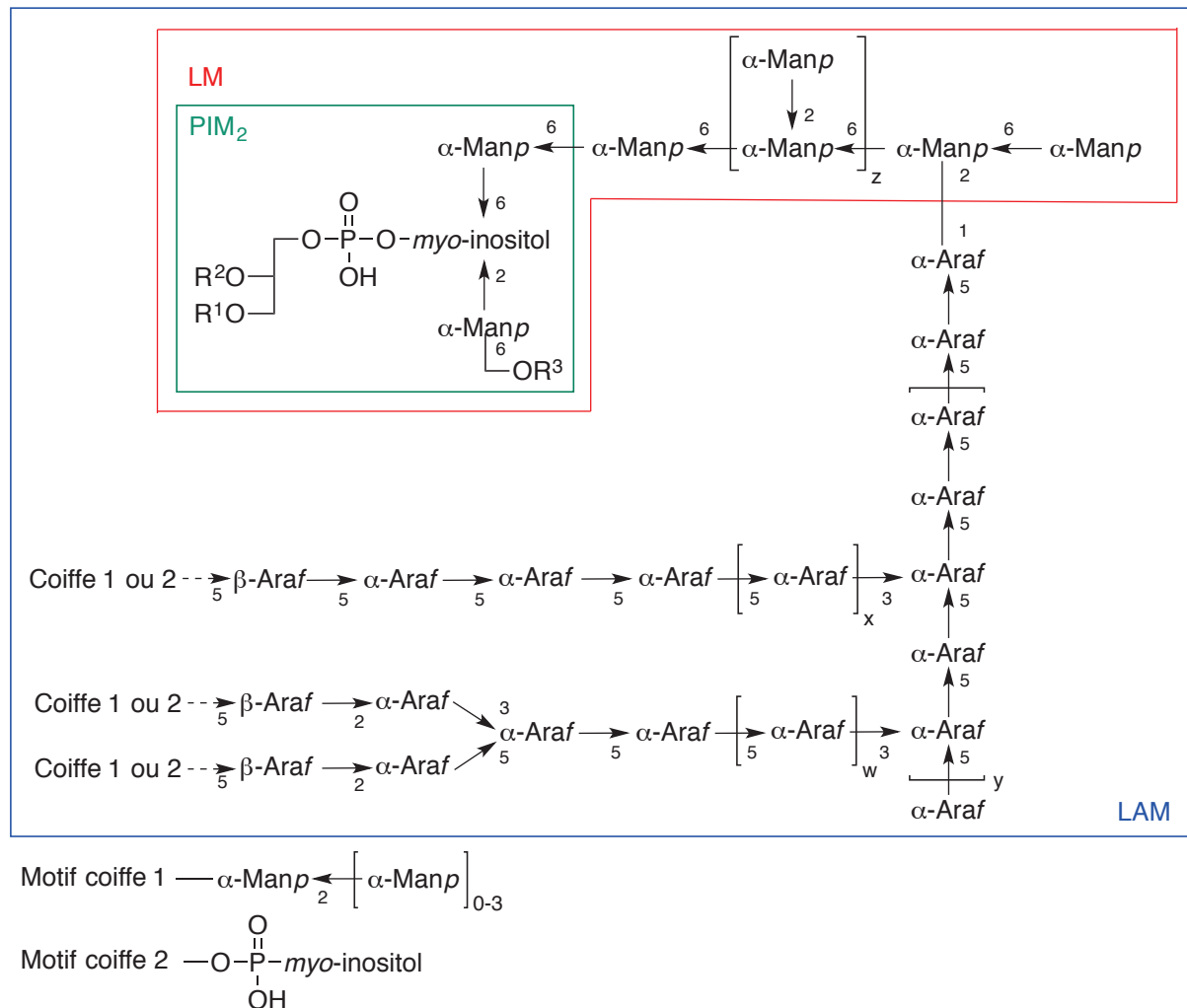


Figure 9 : Structure générale d'une molécule de lipoarabinomannane (LAM) – Phosphatidylinositol dimannoside (PIM₂) – Lipomannane (LM). R¹ et R² sont généralement de l'acide palmitique et tuberculstéariques et R³ = acétyle. Les valeurs w, x, y, et z varient selon les espèces. La coiffe de type 1 est présente chez *M. tuberculosis* et la coiffe 2 est présente chez *M. smegmatis*. (Kremer *et al. M/S Med. Sci.*, **1999**, 15, 842-850).

Les polysaccharides

Les principaux polysaccharides présents dans la capsule sont le glycane (polymère de α -D-glucose ramifié en position C-6 par un résidu mono ou diglycosylé) et un

hétérosaccharide, l'arabinomannane (polymère de mannose ramifié avec un polymère d'arabinose). Le rôle de ces saccharides serait d'empêcher la diffusion de petites molécules à travers la membrane. Ils participeraient également à l'hydrophobicité de la capsule de façon conjointe avec les lipides « extractibles ».

Les protéines

La capsule contient de nombreuses protéines excrétées (24kDa et 45-47 kDa) et résidentes (19 kDa, 30-31 kDa et 38 kDa). La protéine de 19 kDa est une lipoprotéine impliquée dans la virulence de *M. tuberculosis*, celle de 38 kDa permet la fixation des phosphates et celle de 30-31 kDa sert à fixer la fibronectine et inhibe la phagocytose. Une protéine de 29 kDa a été identifiée par Dover *et al.* comme étant un récepteur pour le complexe de fer-exochéline.¹⁹ Les exochélines sont des molécules extracellulaires dont la production augmente lorsque les mycobactéries sont dans un milieu carencé en fer. Cette protéine s'avère donc essentielle pour la croissance des bactéries chez l'hôte, car la disponibilité en fer est limitée lors des mécanismes de défense.

II. La tuberculose

1. De sa découverte à nos jours

La tuberculose est une maladie causée par un agent pathogène : *Mycobacterium tuberculosis* qui est également connu sous le nom de Bacille de Koch en référence au médecin allemand Robert Koch, qui le découvrit en 1882. À cette époque, la tuberculose fut décrite comme la « maladie du siècle » et il fallut attendre les années 1920 pour voir la tuberculose reculer avec la mise au point du vaccin Calmette et Guérin (BCG), vaccin encore utilisé de nos jours. La vaccination intensive, la découverte d'agents antituberculeux comme la streptomycine dans les années 1940, l'amélioration des conditions de vie ont permis la régression de la maladie. Un accroissement du nombre de personnes atteintes de la tuberculose a cependant été observé dans les années 1980. Cette recrudescence est étroitement liée à l'émergence de l'épidémie du SIDA. La tuberculose a une distribution mondiale et ne touche pas uniquement les pays en voie de développement, mais également les pays développés où certaines classes de population comme les personnes âgées, les personnes en

précarité, les sans domicile fixe, les migrants, les détenus ou encore les personnes atteintes par le virus du SIDA ont plus de risques de développer la maladie.

En 1993, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclare la tuberculose comme une urgence mondiale. Deux ans plus tard, elle décide de lancer la stratégie DOST (« Directly Observed Therapy Short-Course ») qui consiste à améliorer la détection, la chimiothérapie et le suivi des patients tuberculeux. Or ce plan n'a pas permis l'éradication de la maladie, puisqu'une augmentation du nombre de cas a été enregistrée. En effet, la co-infection tuberculose/VIH (TB/VIH) accélère de façon synergique leurs progressions respectives. De plus l'apparition de souches de bactéries multi-résistantes (MDR-TB « Multi-Drug-Resistance Tuberculosis »), bacille résistant à deux antituberculeux utilisés dans le traitement de première intention (l'isoniazide et la rifampicine) contribue également à la recrudescence de la maladie. En 2006 l'OMS lance un nouveau programme intitulé « Halte à la tuberculose » dont les plus grands axes sont (i) de renforcer la stratégie DOST, (ii) de lutter contre la co-infection TB/VIH, (iii) de veiller à ce que tous les patients aient accès aux soins et à des médicaments de qualité et (iv) de promouvoir la recherche sur la mise au point de nouveaux traitements. Ce plan semble probant puisqu'il est observé une baisse du nombre de cas de tuberculose de 1,5 % par an depuis 2000, et que le taux de mortalité a chuté de 47 % entre 1990 et 2015. L'OMS estime à 43 millions le nombre de vies sauvées. D'ici à 2035, un nouvel objectif a été fixé par l'OMS, il consiste à réduire de 95 % le nombre de décès causé par la tuberculose et de diminuer de 90 % le taux d'incidence de la maladie.

2. Quelques chiffres

Selon l'OMS, un tiers de la population mondiale est atteinte de la tuberculose sous sa forme latente, ce qui signifie que les personnes sont infectées par le bacille mais qu'elles n'ont pas développé la maladie. Celle-ci se développera dans 10 % des cas, on parle alors de tuberculose active.

En 2014, 9,6 millions de personnes ont contracté la tuberculose et près de 1,5 million en sont mortes dont 95 % dans les pays peu ou pas industrialisés. Bien que cette maladie soit présente dans le monde entier, il y a des zones géographiques où le nombre de nouveaux cas enregistré est très important, notamment en Asie du Sud-Est et dans la région Pacifique

occidentale. Toutefois, l'Afrique reste le continent le plus sévèrement touché par la tuberculose, avec plus de 280 cas pour 100 000 habitants. En 2014, 1,2 million de personnes séropositives ont déclaré la tuberculose dont près de 75 % en Afrique et 400 000 en sont décédées.²⁰

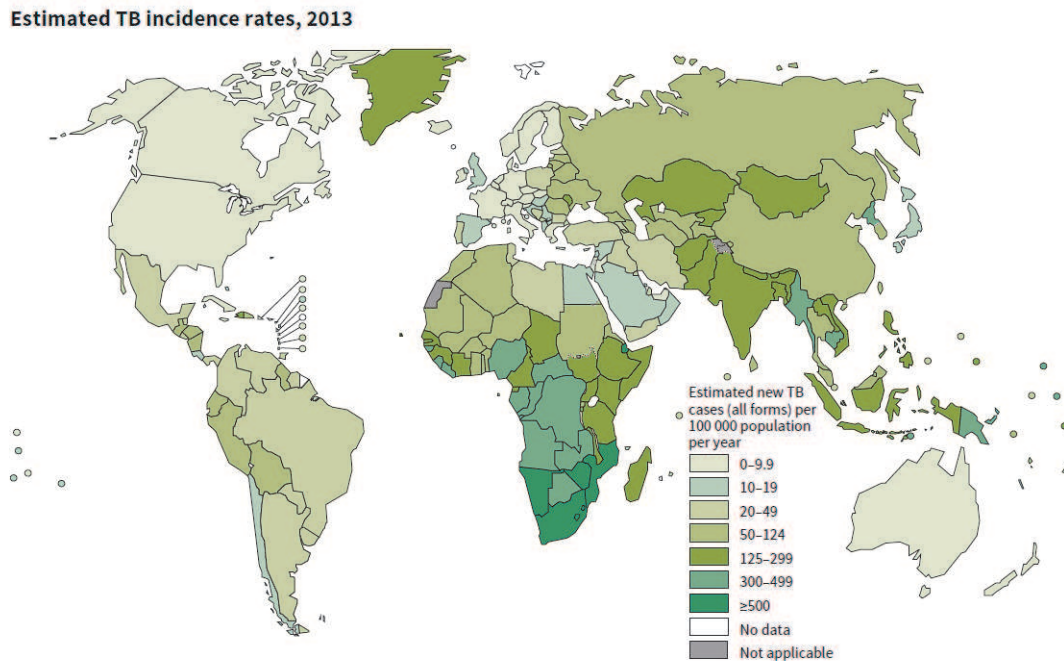


Figure 10 : Taux d'incidence de la tuberculose estimée en 2013
(<http://www.fares.be/fr/tbc-la-tbc-en-belgique-et-dans-le-monde/> Page consultée le 8 mars 2016).

La tuberculose multirésistante (MDR-TB) est également un problème majeur dans la lutte contre cette maladie. Elle est généralement due à la prise d'un traitement inadapté, l'utilisation inappropriée de médicaments, mais également au non-respect du traitement sur la durée de six mois. Ces bacilles résistants ne réagissant plus aux médicaments de première intention, un traitement de seconde intention est donc mis en place afin d'éradiquer les souches résistantes. Dans certain cas, une résistance encore plus sérieuse apparaît, on parle alors de tuberculose ultra-résistante (XDR-TB « Extensively Drug Resistance Tuberculosis »), qui est une forme de la maladie qui répond positivement à un nombre très restreint de médicaments. Dans ce cas, même le traitement de deuxième intention est limité. En 2014, l'OMS a relevé 480 000 cas de tuberculose résistante dont près de 10 % étaient des tuberculoses ultra-résistantes.

3. Le cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculose est une maladie principalement pulmonaire localisée dans les sécrétions bronchiques de l'individu malade. Le mode de transmission est l'inhalation par un individu sain, d'un aérosol de fines particules contenant l'agent pathogène, lorsque qu'un sujet malade tousse, parle ou encore éternue. Un seul microorganisme est suffisant pour provoquer une infection. De plus, un individu malade de tuberculose active non soigné peut contaminer entre 10 à 15 personnes par an. Il existe différents mécanismes d'infection, ils sont brièvement présentés dans la partie ci-dessous.

a. La primo-infection

Lorsque les bacilles atteignent les poumons, ils sont rapidement pris en charge par les macrophages alvéolaires. L'internalisation de la mycobactérie conduit à une réponse inflammatoire, ce qui a pour conséquence l'acheminement de macrophages et de monocytes à partir des vaisseaux sanguins proches. Ces monocytes forment la matrice pour la formation du granulome, lequel est caractéristique de la maladie. Le granulome est composé, au centre, de macrophages infectés par le bacille qui sont entourés par des cellules géantes multinucléées issues de la fusion de plusieurs macrophages contenant des gouttelettes lipidiques ; les macrophages « foamy » et à la périphérie se trouvent des lymphocytes T.⁷ Au début de sa formation, le granulome est fortement vascularisé afin d'apporter la réponse immunitaire nécessaire ; par la suite la vascularisation diminue et une coiffe fibreuse se développe autour du granulome ce qui a pour conséquence d'encapsuler le granulome mais également de « l'isoler » de la majorité des lymphocytes T. A ce stade la réplication rapide des bacilles tuberculeux prend fin, c'est le début du confinement durant laquelle la maladie ne peut se développer, l'hôte n'est pas contagieux. Au centre du granulome, la diminution de la vascularisation entraîne la nécrose des macrophages infectés et la formation d'un centre nécrotique, le caséum.²¹⁻²² Cependant la présence des macrophages « foamy », riches en substances lipidiques, créerait un environnement favorable pour la persistance du bacille tuberculeux pendant plusieurs années. On parle alors de tuberculose latente.²³ Dans 90 % des cas, la maladie ne se développe pas, le granulome évolue vers la calcification, il est alors visible par radiographie du thorax et est plus connu sous le nom de « complexe de Ghon » (Figure 11).

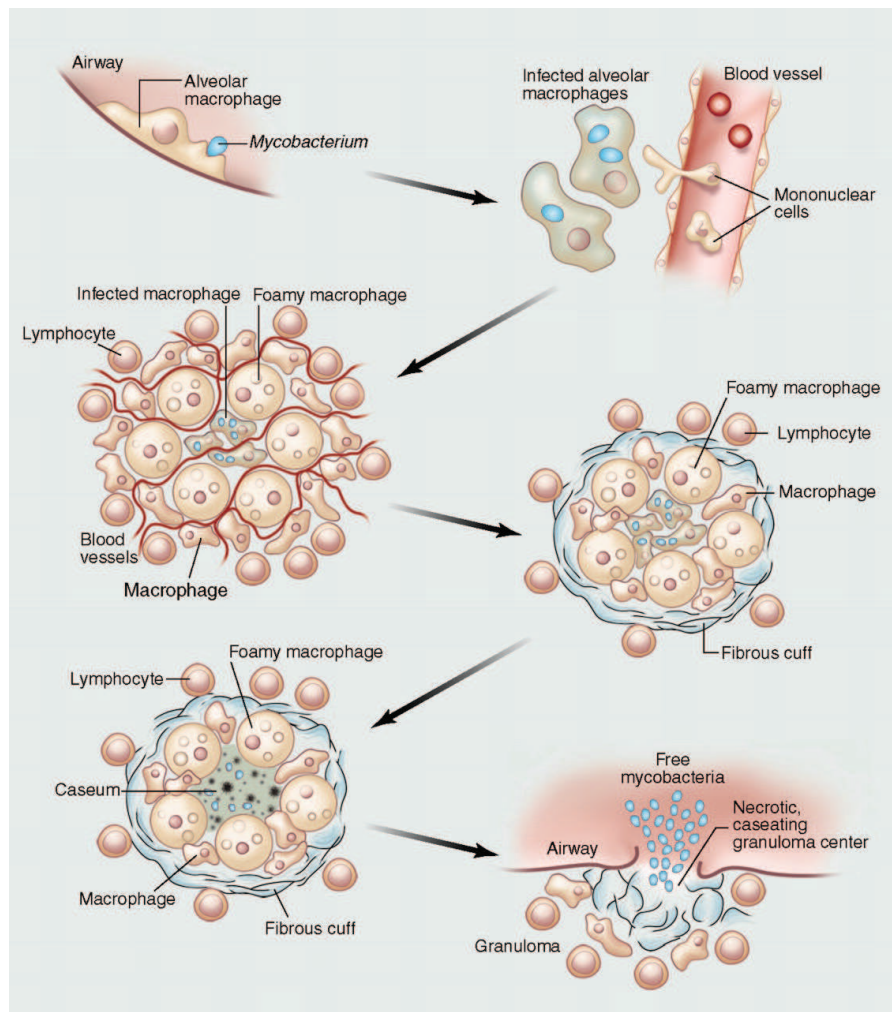


Figure 11 : Cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis* (Russell *et al.*, *Nat Immunol.*, **2009**, 10, 943-948).

b. La réactivation

La réactivation se produit dans 10 % des cas des sujets infectés par *M. tuberculosis*. Généralement elle a lieu chez des sujets dont le système immunitaire est fragilisé, ce qui peut être lié au vieillissement, à une malnutrition, ou à une co-infection avec le VIH. La tuberculose active peut se développer soit tout de suite après la primo-infection soit plusieurs années après l'infection initiale. Au niveau cellulaire, la réactivation se traduit par la liquéfaction et l'affaissement du granulome ce qui a pour conséquence de libérer des milliers de bacilles tuberculeux dans le milieu environnant.²¹ Les signes cliniques associés à la tuberculose sont de la fièvre, une altération de l'état général, des sueurs nocturnes, un

amaigrissement, une toux non ou peu productive, des expectorations hémoptoïques et des douleurs thoraciques.²⁴ Le diagnostic de la maladie est réalisé généralement par la mise en évidence de bacille de Koch dans des prélèvements respiratoires du patient ou encore par radiologie pulmonaire.

4. Vaccination et intradermoréaction

a. Vaccination par le BCG

Il s'agit d'un vaccin bactérien vivant dérivant d'une souche atténuée de *Mycobacterium bovis*, qui fut isolée par Nocard et cultivée à partir de 1908 par les scientifiques français Albert Calmette et Camille Guérin, dont le nom du BCG dérive pour Bacille de Calmette et Guérin. Ces bactériologistes effectuèrent de nombreux repiquages afin de perdre ou diminuer la virulence de l'agent. De plus, ils constatèrent que la vaccination de jeunes veaux leur permettait de survivre au contact de bovins tuberculeux, alors que les veaux non vaccinés ne survivaient pas à ce contact. De juillet 1921 à juin 1922, la première campagne de vaccination fut effectuée sur 120 nourrissons.²⁵ Cependant de 1930 à 1970, l'efficacité du vaccin a été remise en question, car des études montrèrent que son pouvoir protecteur permettait une réduction de 80 % de la maladie en Grande-Bretagne, alors qu'elle était quasi nulle en Inde. Dans les années 1990, deux autres études effectuées sur les enfants révèlent que la vaccination est efficace dans la prévention des méningites et des tuberculoses miliaires avec un pouvoir protecteur de 64 à 86 %. Cependant les résultats des études sur les tuberculoses pulmonaires sont plus hétérogènes. Une troisième étude a montré qu'une vaccination chez les nouveau-nés et les nourrissons permet une protection de 50 % contre l'ensemble des formes de tuberculose. En France, la vaccination fut obligatoire à partir de 1950, mais il fallut attendre 1997 pour que 95 % des enfants soient vaccinés. Depuis 2004, un décret et un arrêté stipulent que la revaccination n'est plus nécessaire, mais que la primovaccination reste obligatoire.²⁶ Les enfants infectés par le VIH font partie des rares cas où la vaccination BCG est contre-indiquée, car le vaccin est faiblement efficace et peut entraîner une infection disséminée à *M. bovis*. La durée de protection du vaccin est estimée à 10-15 ans, mais chez les adultes le BCG se révèle d'être d'une faible efficacité voir d'une absence totale de protection. Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'hétérogénéité des différentes études montrant une variabilité de l'efficacité du BCG : (i) la souche originelle aurait muté et ce de façon différente selon les pays producteurs du vaccin, (ii) *M. tuberculosis*

et *M. bovis* ne présentent pas le même répertoire antigénique, (iii) l'exposition à des mycobactéries non pathogènes dans certaines régions tropicales peut diminuer l'effet protecteur du BCG.

La protection conférée par le BCG étant très limitée, il devient donc urgent de trouver de nouvelles stratégies vaccinales, dont les axes principaux sont (i) l'utilisation de souches vivantes atténuées comme *M. microti* ou *M. tuberculosis*, (ii) l'utilisation de sous-unités comprenant des antigènes conférant une protection et (iii) l'amélioration génétique des souches de BCG.⁷

b. L'intradermoréaction à la tuberculine

Le diagnostic d'une tuberculose latente ne peut être réalisé par un simple examen clinique car souvent la primo-infection est asymptomatique. Il est donc nécessaire de réaliser un test, l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR). Il permet de mettre en évidence la présence d'une hypersensibilité cutanée retardée induite par les antigènes mycobactériens. La lecture de l'induration se fait entre 48 et 72 h après l'injection. L'interprétation de l'IDR se fait en fonction du contexte et du statut vaccinal du patient.

Chez un sujet sain avec une immunité normale :

- Si le diamètre est inférieur à 5 mm, l'IDR est considérée comme négative.
- Si le diamètre est compris entre 5 et 10 mm, l'IDR est alors positive. Cependant une IDR positive ne signifie pas uniquement une infection au bacille tuberculeux. En effet, la vaccination au BCG et l'exposition à des mycobactéries non pathogènes donnent lieu à des réactions croisées qui ont pour conséquence de rendre l'IDR positive.
- Si l'IDR est supérieure à 10 mm, il peut s'agir d'une tuberculose mais également de l'immunisation par le BCG
- Si l'IDR est supérieure à 15 mm il s'agit alors d'une tuberculose. Le patient devra subir des examens supplémentaires afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic.

En l'absence de vaccination par le BCG, une induration de 10 mm est synonyme d'une infection tuberculeuse.^{7,26}

Récemment de nouveaux tests immunologiques ont été mis au point. Ils reposent sur le fait que les lymphocytes T d'un individu infecté par *M. tuberculosis* libèrent l'interféron- γ lorsque ces lymphocytes sont en contact avec des antigènes mycobactériens.²⁷ Ces tests

présentent une spécificité envers *M. tuberculosis* supérieure à 90 % et ne sont ni perturbés par la vaccination antérieure au BCG ni par le contact avec d'autres mycobactéries non pathogènes. Cependant ils ne permettent toujours pas de faire la distinction entre une tuberculose latente ou active.²⁸

5. Les antituberculeux

Sans traitement efficace la tuberculose est mortelle. Ce dernier doit être efficace sur les bacilles en phase de multiplication mais également sur les bacilles dormants afin d'éradiquer la maladie. Actuellement la médication, répartie en deux phases, est basée sur l'association de quatre antibiotiques pour prévenir les cas de résistances aux antituberculeux :

- La « phase initiale » d'une durée de deux mois, où il sera administré au patient un cocktail de quatre antibiotiques dits de première ligne ou première intention : l'isoniazide (INH), la rifampicine (RMP), le pyrazinamide (PZA) et l'éthambutol (EMB).
- La « phase de continuation » d'une durée de quatre mois, où le patient ne prend plus que deux des quatre antibiotiques initialement prescrit, l'INH et la RMP.

L'intérêt majeur de cette thérapie combinée est de diminuer les effets de résistance aux antibiotiques (comme ce fut le cas pour la streptomycine qui a été utilisée en monothérapie pour le traitement de la tuberculose) mais aussi de cibler des populations différentes de *M. tuberculosis* (bacilles en phase de multiplication, dormants). Cependant certaines souches de *M. tuberculosis* sont résistantes à ces antibiotiques de première intention, il est donc nécessaire de traiter les patients avec des antibiotiques différents dits de deuxième intention. Cette classe de médicament regroupe les aminoglycosides, les fluoroquinolones ou encore l'acide *p*-aminosalicylique. Ces médicaments entraînent généralement un allongement du traitement (deux ans) et de nombreux effets secondaires ce qui rend le traitement plus difficile.

Dans le paragraphe suivant, les mécanismes d'action des antibiotiques de première et deuxième intentions seront brièvement présentés, ainsi que les mécanismes de résistance de *M. tuberculosis* vis à vis de ces médicaments.

a. Les antituberculeux de première intention

L'isoniazide (INH)

Depuis sa découverte en 1952, l'INH est présent dans le traitement de la tuberculose. Le bacille de Koch est très sensible à cette molécule car la concentration minimale inhibitrice (CMI) est comprise entre 0,02-0,2 $\mu\text{g/ml}$.²⁹ L'INH n'est actif que sur les bacilles en phase de multiplication et interfère avec une enzyme impliquée dans le système FAS II (fatty acid synthases) de la biosynthèse des acides mycoliques.

L'INH est une prodrogue, qui doit préalablement être activée pour donner sa forme active. L'activation est réalisée par la catalase-peroxydase KatG, codée par *katG*, qui produit des espèces réactives ou radicalaires comme des composés oxygénés (peroxydes d'hydrogène, superoxyde, radical hydroxyle et oxyde nitrique) mais également des radicaux organiques comme le radical acyle isonicotinoyle. La cible préférentielle de ce radical serait l'énoyl-ACP réductase (InhA), codée par *inhA*, enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques. Ce radical acyle va se lier de façon covalente au NADH pour donner un adduit INH-NAD (Figure 12), qui va ensuite inhiber l'activité catalytique de l'énoyl-ACP réductase (InhA) pour conduire à la lyse cellulaire.³⁰ Cependant des résistances à l'INH ont été observées, *in vitro* la fréquence de mutation est de 1 sur 10^{5-6} bacilles. Les deux mécanismes de résistance les plus décrits sont (i) la mutation du gène *katG* codant pour KatG rendant alors impossible l'activation de la prodrogue en radical actif et (ii) la mutation du gène *inhA* modifiant le site actif de l'InhA ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de l'adduit IHN-NAD avec ce dernier.³¹

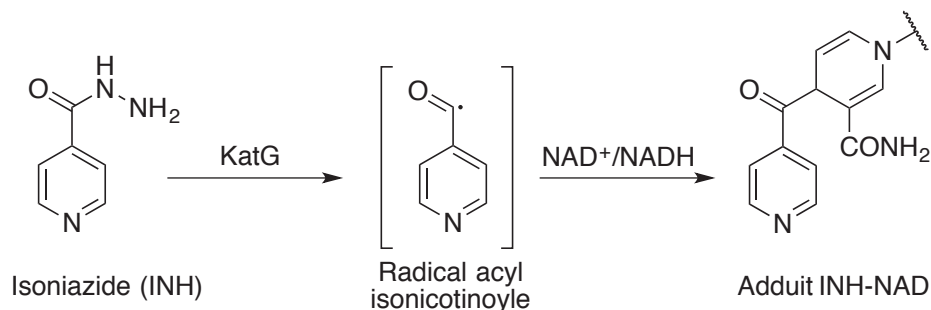
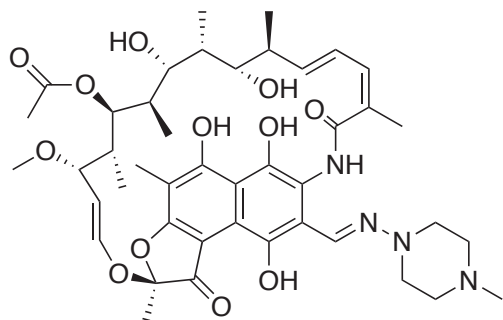


Figure 12 : Mécanisme d'action de l'isoniazide (INH).

La rifampicine (RMP)



La rifampicine (RMP) est un antibiotique de la famille des ansamycines isolées de culture de *Streptomyces mediterranei* à la fin des années 1950. En 1972, elle a été utilisée comme antituberculeux, car ses propriétés bactéricides envers *M. tuberculosis* lui confèrent une bonne CMI allant de 0,05-0,1 µg/ml. Tout comme l'INH, la RMP est active sur les bacilles en phase de multiplication, mais également sur ceux en phase stationnaire.¹ La cible de la RMP est la sous-unité β de l'ARN polymérase, ce qui a pour conséquence d'empêcher l'élongation des ARN messagers (ARNm). Cependant des phénomènes de résistance envers cette molécule sont également rencontrés. En effet, la mutation d'une région bien définie du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase est observée dans 96 % des isolats de *M. tuberculosis* résistant à la RMP. Cette région est connue sous le nom de RRDR pour « Rifampicin Resistance-Determining Region » et inclut les codons 507-533.³² Le changement de conformation de la protéine a pour conséquence de diminuer l'affinité de la molécule pour son site de fixation et ainsi de rendre le médicament inefficace. Généralement les souches résistantes à la RMP le sont également à l'INH.

Le pyrazinamide (PZA)

Le pyrazinamide (PZA) est un médicament de première ligne utilisé en association avec l'INH et la RMP. Son utilisation a permis de raccourcir la durée du traitement de 9-12 mois à 6 mois, car il détruit les bacilles semi-dormants ou persistants dans un environnement acide alors que les autres médicaments en sont incapables. La valeur de la CMI de la pyrazinamide est pH dépendante. En effet à un pH de 6 la CMI est 3,2 fois plus élevée qu'à un pH de 5,5.³³ Le PZA est structuralement proche du nicotinamide et tout comme l'INH il s'agit d'une prodrogue qui doit subir une étape préliminaire d'activation pour donner la forme active, l'anion pyrazinoate (POA⁻). Cette réaction d'activation est catalysée par une enzyme, la pyrazinamidase/nicotinamidase (PZase) codée par le gène *pncA* (Figure 13-A). Cependant bien que cette molécule soit utilisée depuis les années 1950 dans le traitement de la tuberculose, son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. Il est souvent décrit que la pénétration du PZA à l'intérieur de *M. tuberculosis* s'effectue par diffusion passive, puis est

activée en POA^- par la PZase. L'anion carboxylate résultant va dans un premier temps ressortir de la cellule par diffusion passive et à l'aide de pompes à efflux bien que peu nombreuses. Si le milieu extracellulaire est acide (pH de 5,5 environ) une partie du POA^- peut alors se reprotoner en acide pyrazinoïque (HPOA), qui peut facilement pénétrer à travers la membrane. Il est à noter que l'influx de HPOA est supérieur à l'efflux du POA^- , ce qui conduit à une accumulation de HPOA dans le cytoplasme. A pH physiologique l'HPOA va être déprotoné et ainsi libérer un proton dans le milieu ce qui va conduire à l'acidification du cytoplasme et par conséquent à l'inactivation de certains systèmes enzymatiques. D'autres mécanismes d'action sont également envisagés (i) le HPOA pourrait également perturber la force protomotrice de la membrane et ainsi gêner le transport cellulaire.³⁴ (ii) le PZA et *a fortiori* les espèces HPOA et POA^- , structuralement très proches du nicotinamide, pourraient prendre la place du NAD^+/NADH dans les sites catalytiques d'enzymes utilisant ce cofacteur et ainsi empêcher les réactions d'oxydo-réduction d'avoir lieu (Figure 13-B).

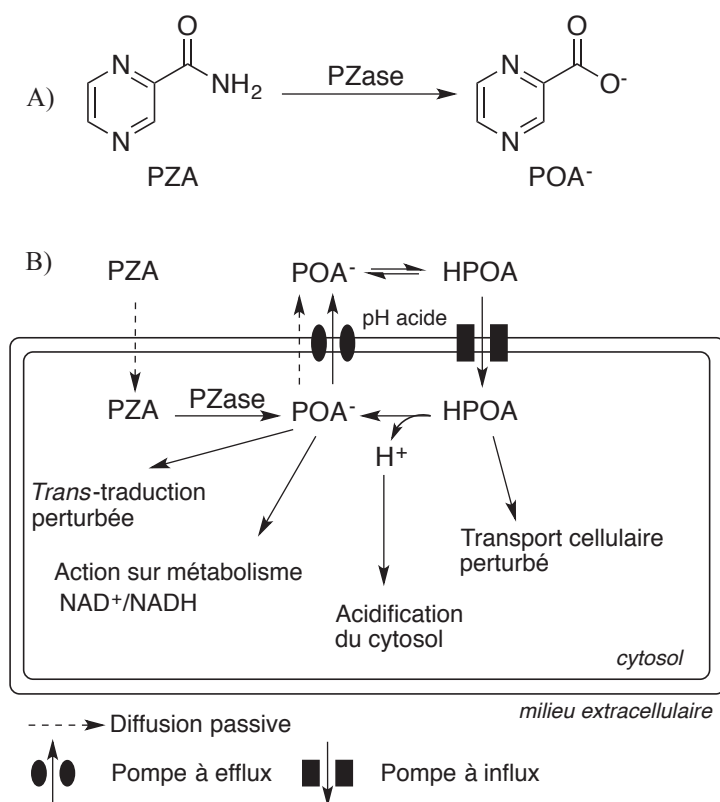
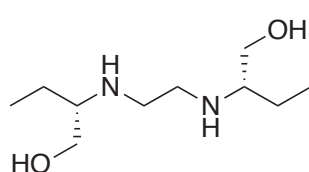


Figure 13 : A) Activation du PZA en POA^- et B) Mécanisme d'action du PZA.
(Zhang *et al. Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, 7, 6-21).

Ce modèle permet de comprendre pourquoi le PZA est actif uniquement à pH acide. La mutation du gène *pncA* est à l'origine de la résistance à la PZA chez *M. tuberculosis*. Plus

récemment un autre mécanisme d'action a été identifié. Le POA⁻ formé intracellulairement se lierait à la protéine ribosomique S1 (RpsA). Cette protéine est impliquée dans la traduction des ARNm en protéines mais une fonction secondaire est la trans-traduction intervenant lors du blocage de la traduction en se liant avec l'ARN transfert-messager (ARNtm). Le POA affecterait les interactions entre RpsA et l'ARNtm.³⁵ Ce processus de trans-traduction est important pendant des périodes de stress et de déficit de certains nutriments comme c'est le cas lors des périodes stationnaires ou dormantes.

L'éthambutol (EMB)

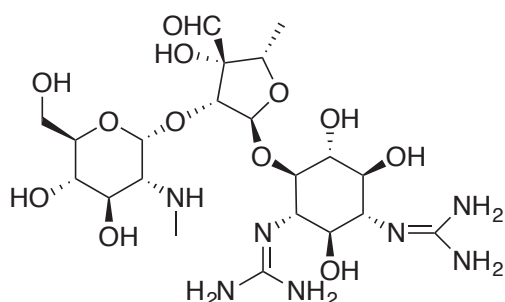


L'éthambutol (EMB) est un antituberculeux de première ligne utilisé en association avec l'INH, le RMP et le PZA afin de prévenir les phénomènes de résistance. Cet agent est bactériostatique et actif sur les bacilles en état de multiplication et

inactif sur les bacilles dormants. Pour *M. tuberculosis* les CMI varient de 0,5 à 2 µg/ml.¹ La cible de l'EMB serait l'arabinosyle transférase qui est impliquée dans la biosynthèse de l'arabinogalactane et du lipoarabinomannane, polysaccharides entrant dans la composition de la paroi mycobactérienne (Figure 4 p.5 et Figure 9 p.10).³⁶ Ce blocage entraîne l'accumulation d'intermédiaires biosynthétiques au sein de la mycobactérie⁸ mais également l'accumulation d'acides mycoliques, qui perdent leur point d'ancrage dans la paroi.³⁷ L'arabinosyle transférase est codée par le gène *embB*, qui est au sein de l'opéron *embCAB*. La mutation du gène *embB* provoque la résistance de *M. tuberculosis* envers l'EMB.³⁸ Cette mutation est présente chez environ 70 % des souches résistantes à cet agent. Il a été montré qu'une des mutations les plus fréquentes (47 % des souches résistantes) chez *M. tuberculosis* est le remplacement de la méthionine 306 par une isoleucine ou une valine.³⁹

b. Les antituberculeux de seconde intention

La streptomycine (SM)

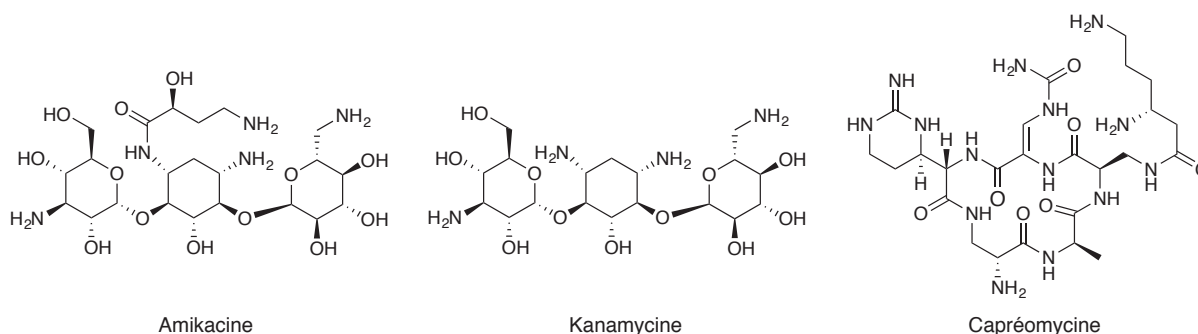


De la famille des aminoglycosides, cette dernière a été isolée de *Streptomyces griseus*.³¹ Ce fut le premier antibiotique utilisé pour le traitement de la

tuberculose, mais son utilisation en monothérapie a entraîné de nombreux phénomènes de résistance de *M. tuberculosis*. De plus, l'arrivée sur le marché dans les années 1960, de nouveaux médicaments tels que l'isoniazide et la rifampicine a conduit à diminuer son utilisation pour en faire un antibiotique de seconde ligne. En effet, elle est notamment utilisée lorsque les médicaments de première intention (INH, RMP, PZA et EMB) se montrent inefficaces.⁴⁰

La streptomycine (SM) possède une CMI de 2-4 µg/ml. Elle est active sur les bacilles en phase de multiplication, mais inactive sur les bacilles dormants.²⁹ Elle inhibe la synthèse protéique en se liant à la sous unité 30S du ribosome mycobactérien ce qui empêche l'initiation de la traduction de l'ARNm. Deux sites d'action lui sont connus, la protéine ribosomique S12 ainsi que l'ARNr 16S, qui sont respectivement encodés par les gènes *rpsL* et *rrs*. C'est la mutation de ces deux gènes qui entraîne les principaux mécanismes de résistance. La substitution dans le codon 43, présent dans le gène *rpsL*, d'une lysine par une arginine, entraîne une modification structurale ce qui a pour conséquence de diminuer l'affinité de la SM pour la protéine ribosomique S12. Dans le cas du gène *rrs*, il semblerait que des mutations au niveau des nucléotides 530 et 915 soient à l'origine des mécanismes de résistance.³¹ Cependant 20 à 30 % des souches résistantes à la SM ne comportent pas de modifications au niveau des gènes *rpsL* et *rrs* ce qui laisse penser qu'il existe d'autres gènes intervenant dans les mécanismes de résistance. Des études récentes ont montré que la mutation de *gidB* codant la 7-méthylguanosine méthyltransférase, enzyme modifiant l'ARNr 16S entraîne une résistance à la SM de faible ampleur.⁴¹ En effet cette mutation n'a entraîné que 33 % de résistance sur un isolat de *M. tuberculosis* résistant à la SM.

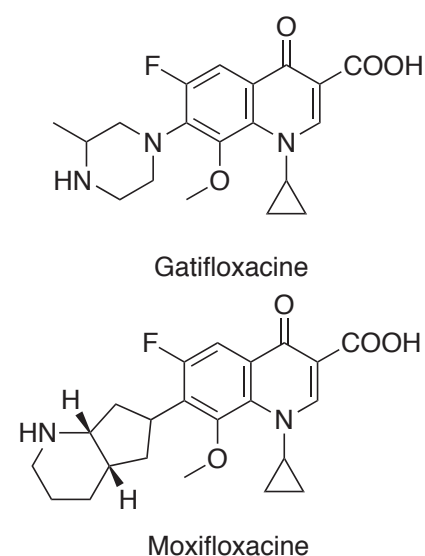
L'amikacine (AMK), la kanamycine (KM) et la capréomycine (CPM)



Tout comme la SM, l'amikacine (AMK) et la kanamycine (KM) font partie de la famille des aminoglycosides. Ces deux molécules inhibent également la synthèse protéique

bactérienne en agissant sur l'ARNr 16S qui est encodée par le gène *rrs*. La mutation en position 1401 d'une adénine par une guanine entraîne une modification structurale de l'ARNr 16S ce qui implique une haute résistance envers ces antibiotiques.⁴² La capréomycine (CPM), un peptide cyclique, inhibe également la synthèse protéique. Le gène *tylA* codant l'ARNr méthyltransférase est impliqué dans le phénomène de résistance.⁴³ Il existe des résistances croisées entre la KM, AMK et CPM, mais les souches résistantes à la SM s'avèrent être encore sensibles à la KM et à l'AMK.

Les fluoroquinolones (FQ)

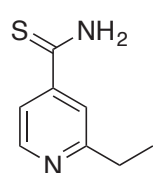


Les quinolones sont une famille d'antibiotiques bactéricides découverte au milieu des années 1960. La première génération regroupait la ciprofloxacine et l'ofloxacine, dérivés synthétiques de l'acide nalidixique.³¹

La seconde génération, plus récente, est composée de la gatifloxacin et de la moxifloxacin. La CMI des quinolones varie de 0,5-2,5 µg/ml.²⁹ Généralement les fluoroquinolones agissent sur l'ADN gyrase (topoisomérase II) et la topoisomérase IV, or cette dernière n'est pas présente chez *M. tuberculosis*. Le mode d'action se fait donc uniquement sur la topoisomérase II. Cette

ADN gyrase est un tétramère constitué de deux sous-unités A et B, codées respectivement par *gyrA* et *gyrB*. En se liant au complexe ADN-ADN gyrase, la fluoroquinolone va le rendre stable ce qui va bloquer le surenroulement de l'ADN et conduire à la mort cellulaire.⁴⁴ Les principales mutations sont observées chez *gyrA*, au niveau de l'alanine 90 et de l'acide aspartique 94, entraînant une résistance aux fluoroquinolones. Les mutations au sein de *gyrB* entraînent des résistances de niveau plus faible.

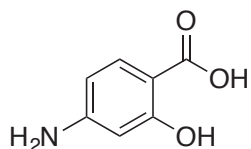
L'éthionamide (ETH)



L'éthionamide (ETH) est un bactéricide de la famille des thioamides, qui possède un CMI de 0,5-2 µg/ml sur *M. tuberculosis*.²⁹ Il s'agit également d'une prodrogue qui est préalablement activée par l'EtaA/EthA, une enzyme de la

famille des monooxygénases.⁴⁵ La substance active ainsi libérée aura pour cible la même enzyme que l'INH, l'enzyme InhA impliquée dans la synthèse des acides mycoliques de la paroi cellulaire. La principale résistance de ce médicament est due à une mutation de l'enzyme activatrice EtaA/EthA.

*L'acide *p*-aminosalicylique (PSA)*



L'acide *p*-aminosalicylique (PSA) est un antibiotique utilisé en association avec l'INH et la SM pour lutter contre la tuberculose. Sa CMI est comprise entre 2,5-10 µg/ml. Des souches résistantes à la PSA ont montré des mutations au niveau du gène *thyA* qui code pour le thymidylate synthase A impliquée dans la biosynthèse de la thymine.³¹

Actuellement, pour lutter contre la tuberculose, différents antituberculeux possédant des modes d'actions diverses sont utilisés. Certains ont pour cible l'ARN ribosomique 16S, d'autres ont pour cible la biosynthèse de constituants essentiels de la paroi comme les acides mycolique et l'arabinogalactane. Cependant l'utilisation intensive de ces médicaments pendant de nombreuses années ainsi que l'absence de découvertes de nouveaux antituberculeux ont entraîné une recrudescence de bacilles résistants. Il devient nécessaire de trouver de nouveaux agents ayant de nouveaux modes d'action. Une cible pourrait être la biosynthèse des isoprénoïdes. Ces composés sont présents chez tous les organismes vivants et certains sont essentiels à leur vie. Par exemple, chez *M. tuberculosis*, la chaîne latérale des ménaquinones ainsi que le diphosphate de décapyrényle (intermédiaire biosynthétique des peptidoglycanes) sont des dérivés isopréniques. L'inhibition de cette voie biosynthétique entraînerait un déficit en composants essentiels à la vie de la mycobactérie ce qui conduirait à sa mort.

III. Les isoprénoïdes

1. Généralités

Les isoprénoïdes sont une grande famille de composés présents chez tous les organismes vivants. Bien qu'issues de la même famille, ces molécules ont des propriétés

physico-chimiques et des activités biologiques différentes. Ce sont soit des métabolites primaires comme les stérols, la chaîne latérale des ménaquinones soit des métabolites secondaires comme les monoterpènes des huiles essentielles. Tous les isoprénoides sont issus de la condensation d'une unité en C_5 , le 2-méthylbuta-1,3-diène aussi connu sous le nom d'isoprène **1** (Figure 14). C'est en 1887, que Wallach proposa l'existence de motifs isopréniques issus de la condensation de type « tête à queue » de plusieurs sous-unités en C_5 donnant ainsi des composés en C_{5n} .⁴⁶ Par la suite en 1953, Ruzicka établit la « règle isoprénique biogénétique » permettant d'énoncer la règle de condensations successives des sous-unités.^{47,48} Cette règle isoprénique permet de déduire le nombre de condensation mis en jeu à partir de n'importe quel squelette carboné d'isoprénoides en faisant appel à des réactions classiques de chimie organique telles que la formation d'isoprénoides acyclique par condensation d'unités isopréniques, la formation de carbocation induisant la cyclisation de 1,5-polyènes⁴⁹ et des réarrangements de Wagner-Meerwein.⁵⁰

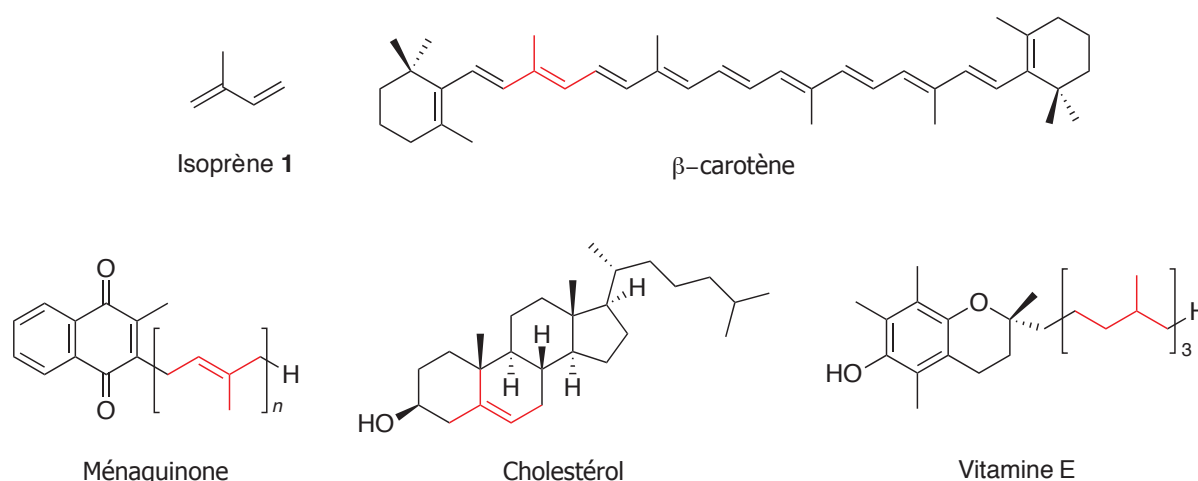


Figure 14 : L'isoprène **1** et exemples de quelques isoprénoides.

Chez tous les organismes vivants, les précurseurs de tous les isoprénoides sont le diphosphate d'isopentényle **2** (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle **3** (DMAPP).

La biosynthèse des isoprénoides se fait à partir de ces deux sous-unités, l'IPP **2** et le DMAPP **3** (Figure 15). Une isomérisation de l'IPP en DMAPP est possible grâce à l'IPP isomérase.^{51,52} La première étape de cette voie de biosynthèse est la condensation entre l'IPP **2** (entité nucléophile) avec le DMAPP **3** (entité électrophile) pour donner le diphosphate de géranyle **4** (GPP), qui est le précurseur des monoterpènes (C_{10}) tels que le limonène ou le menthol (Figure 15). Une deuxième condensation du GPP **4** avec de l'IPP **2** conduit au diphosphate de

farnésyle **5** (FPP), qui est impliqué dans la synthèse des sesquiterpènes (C_{15}) où l'on retrouve par exemple le farnésol ou encore l' α -cadinène (Figure 15). Ces deux premières condensations entre IPP **2** et le DMAPP **3** et l'IPP **2** et le GPP **4** sont de type « tête à queue ». À partir du FPP **5**, deux types de condensations différentes peuvent se dérouler. Une première alternative est une condensation de type « tête à queue » entre le FPP **5** et l'IPP **2** pour obtenir le diphosphate de géranylgeranyle **6** (GGPP), le précurseur des diterpènes et des caroténoïdes (C_{20}) (Figure 15).

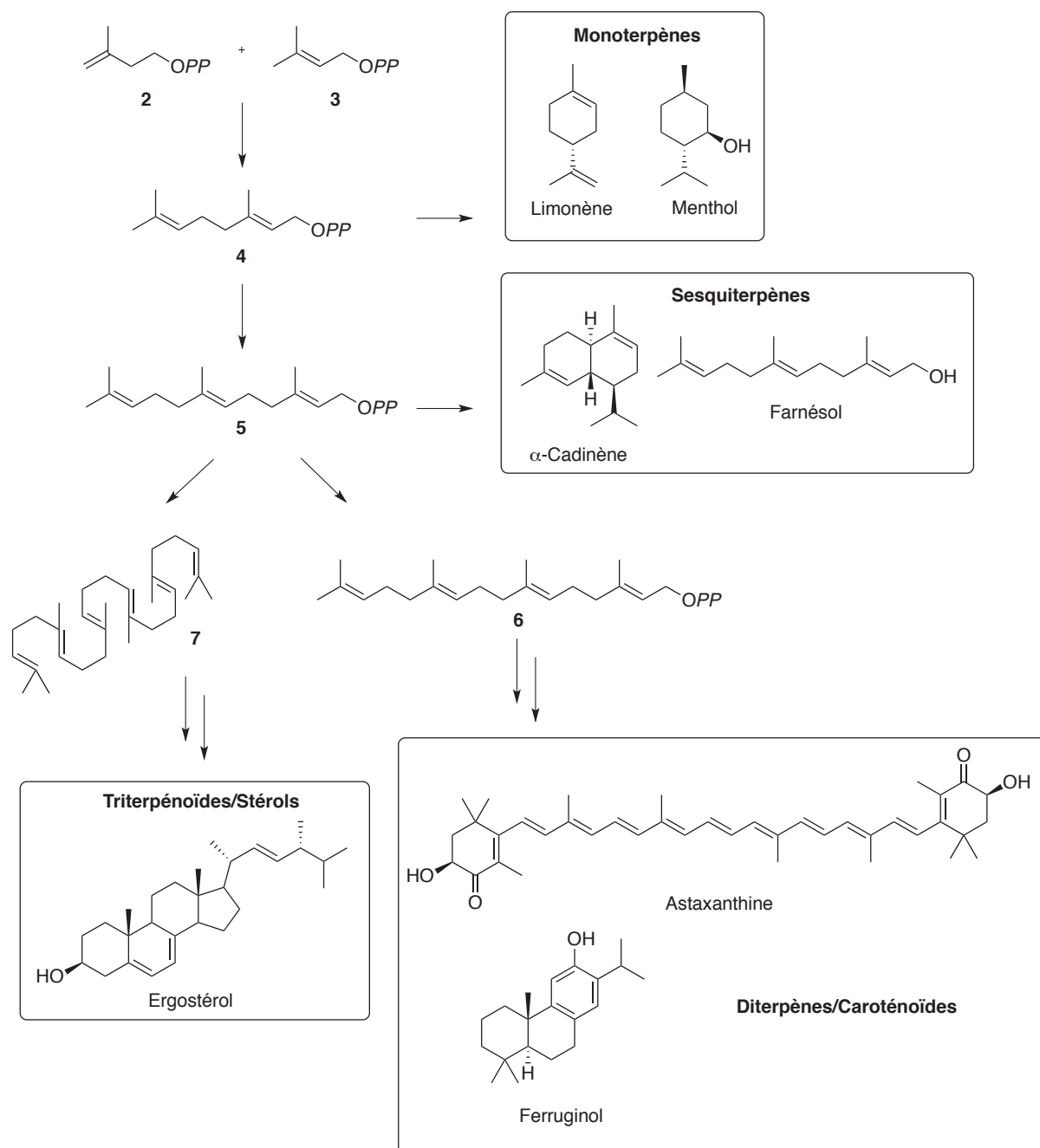


Figure 15 : Biosynthèse des isoprénoïdes à partir de l'IPP **2** et DMAPP **3**.

L'autre alternative est de faire une condensation de type « tête à tête » entre deux molécules de FPP **5** afin d'accéder au squalène **7** (C₃₀) qui est le précurseur des triterpénoïdes, dont les stérols et les hopanoïdes. L'élongation des chaînes prénylées par addition successive d'IPP est catalysée par des enzymes de la famille des prényltransférases.⁵⁰ Par la suite diverses réactions chimiques telles que des cyclisations, des transpositions et des oxydations permettent de passer des précurseurs acycliques à toutes les familles d'isoprénoïdes.

2. Biosynthèse de l'IPP et DMAPP

La biosynthèse de ces deux sous-unités de construction, l'IPP **2** et le DMAPP **3**, a fait l'objet de nombreuses études. C'est dans les années 1950 que la voie du mévalonate (MVA) fut découverte. Pendant de nombreuses années, il fut admis que la voie du MVA était l'unique voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP chez tous les organismes vivants.^{53,54} Ce n'est qu'au début des années 1990 que la voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP) fut découverte, ce qui ne faisait plus une mais deux voies pour la biosynthèse de ces deux sous-unités en C₅.⁵⁵ Dès lors, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer la distribution des voies du MEP et du MVA chez les organismes vivants.

De nos jours il a été montré que la voie du MVA est présente chez les animaux, les champignons, certaines bactéries et dans le cytoplasme des végétaux,⁵⁶ tandis que la voie du MEP est présente chez la plupart des bactéries dont *Mycobacterium tuberculosis*,⁵⁷ les algues vertes unicellulaires,⁵⁸ dans le chloroplaste des végétaux⁵⁹ et chez le protozoaire responsable de la malaria *Plasmodium falciparum*.⁶⁰ Cependant il arrive qu'il y ait coexistence des deux voies chez certains microorganismes. C'est le cas chez des *Streptomyces* sp. où la voie du MEP est utilisée pour synthétiser les métabolites primaires comme les ménaquinones lors de la phase de croissance exponentielle des bactéries, alors que la voie du MVA s'exprime au moment de la phase stationnaire pour la synthèse de métabolites secondaires tels que des antibiotiques à motif isopréniques.⁶¹ Chez les végétaux, il y a une compartimentation des deux voies. La voie du MVA est présente dans le cytoplasme permettant la biosynthèse des triterpènes, des stérols et de la chaîne prénylée de l'ubiquinone alors que la voie du MEP est localisée dans les chloroplastes où se déroule la synthèse du phytol et des caroténoïdes.^{62,63,64}

3. La voie du mévalonate (MVA)

Les premiers travaux furent réalisés par Bloch et Rittenberg qui ont obtenu du cholestérol marqué chez la souris à partir d'acétate marqué au deutérium, leur faisant postuler que les stérols sont construits à partir d'une entité en C₅.⁶⁵ Par la suite de nombreuses équipes travaillèrent sur l'élucidation de cette voie de biosynthèse afin de proposer un schéma biogénétique pour la formation des unités isopréniques.^{53,54}

Dans un premier temps ; une condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétyl-CoA **8** permet l'obtention de l'acétoacétyl-CoA **9** (Figure 16).

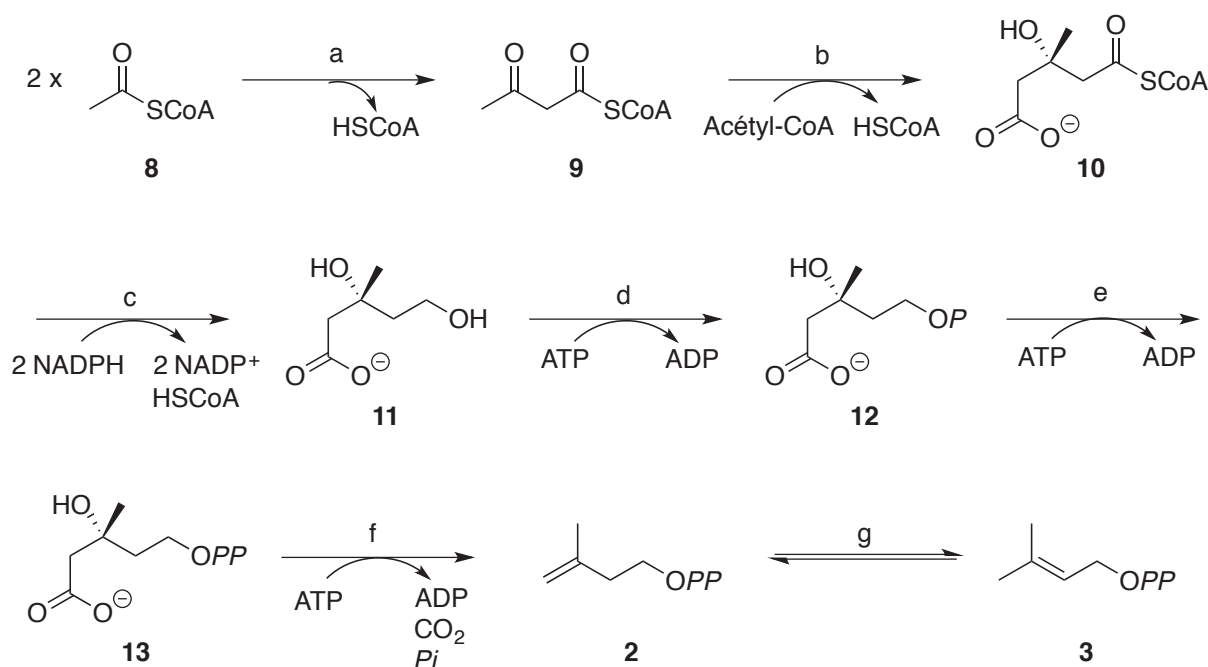


Figure 16 : Biosynthèse de l'IPP **2** selon la voie du mévalonate.

a. Acétyl-CoA thiolase, b. HMG-CoA synthase, c. HMG-CoA réductase, d. Mévalonate kinase, e. Mévalonate 5-phosphate kinase, f. Mévalonate 5-diphosphate décarboxylase, g. IPP isomérase. *P* = phosphate et *PP* = diphosphate.

Par la suite une seconde condensation de l'acétyl-CoA avec l'acétoacétyl-CoA **9** donne le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA **10** (HMG-CoA) qui est ensuite réduit en mévalonate **11** (MVA) par l'HMG-CoA réductase. Une première phosphorylation, catalysée par la mévalonate kinase, permet de phosphoryler l'hydroxyle primaire du MVA **11** pour donner le phosphate de mévalonate **12**. Cet intermédiaire monophosphate est transformé en diphosphate de mévalonate **13** par la mévalonate 5-diphosphate kinase. Pour finir, la

décarboxylation ATP-dépendante de **13** par la mévalonate 5-diphosphate décarboxylase permet d'aboutir à l'IPP **2** qui peut être isomérisé en DMAPP **3** grâce à l'IPP isomérase (Figure 16).⁵⁴

4. La voie du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP)

La voie du MEP fut découverte de manière fortuite lors d'expériences d'incorporation, chez des bactéries, d'acétate marqué au ^{13}C .^{55,66} Les résultats expérimentaux obtenus étaient en contradiction avec la prédiction faite pour la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du mévalonate.⁶⁷ Par la suite de nombreuses expériences d'incorporation avec de l'acétate ou du glucose marqués au ^{13}C furent réalisées sur différentes souches de bactéries.^{55,68} Les résultats obtenus ont permis d'identifier l'origine de tous les carbones des unités isopréniques, ainsi que les précurseurs de cette nouvelle voie à savoir le pyruvate **14** et le glycéraldéhyde 3-phosphate **15** tous deux issus du métabolisme du glucose.⁵⁸ Parallèlement à ces études sur les bactéries, la voie du MEP a également été mise en évidence par incorporation de glucose marqué chez *Ginkgo biloba*, montrant ainsi que cette voie était également présente chez les plantes supérieures.^{64,69}

Description succincte de la voie du MEP

La voie du MEP commence par la condensation entre une molécule de pyruvate **14** avec une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate **15**, réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), pour conduire au 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **16** (DXP) (Figure 17). La deuxième étape de la voie du MEP est catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) permettant le réarrangement intramolécule du DXP **16** en un aldéhyde non isolable qui est réduit grâce au NADPH en 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **17** (MEP). Les étapes suivantes correspondent à des modifications du MEP. La formation du 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **18** (CDP-ME) est catalysée par l'IspD. L'IspE permet, par la suite, la phosphorylation de l'hydroxyle tertiaire du CDP-ME en 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol **19** (2P-CDP-ME). L'avant dernière étape de la voie du MEP consiste en la formation intramolécule d'un cycle à huit chaînons, le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate **20** (MEDCP). Ce composé est ensuite réduit par une enzyme à cluster [4Fe-4S] en (*E*)-4-hydroxy-3-méthylbut-

2-ényle **21** (HMBPP), qui est transformé en diphosphate d'isopentényle **2** (IPP) et en diphosphate de diméthylallyle **3** (DMAPP). Cette dernière étape catalysée par IspH, une enzyme comprenant également un cluster [4Fe-4S].

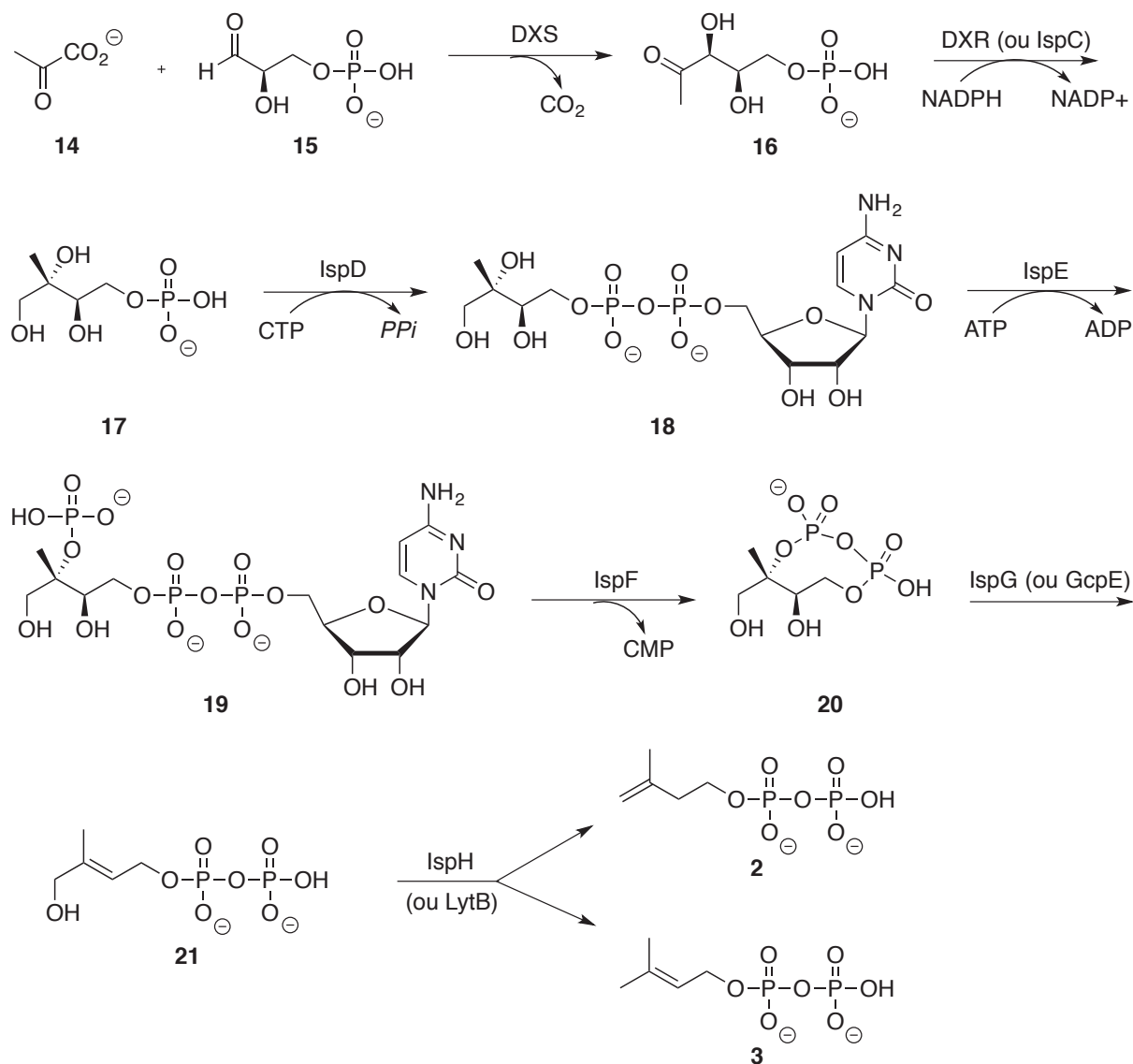


Figure 17 : Biosynthèse de l'IPP **2** et le DMAPP **3** selon la voie MEP.

DXS : 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR ou IspC : 1-Désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase ; IspD : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol synthase ; IspE : 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol kinase ; IspF : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase ; IspG : 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate réductase ou 4-hydroxyméthylbut-2-ényle diphosphate synthase ; IspH ou LytB : 4-hydroxyméthylbut-2-ényle diphosphate réductase.

La formation du squelette isoprénique à cinq atomes de carbones est réalisée lors des deux premières étapes du schéma de biosynthèse, auxquelles nous allons nous intéresser plus en détails.

a. Étape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS)

L'enzyme catalysant la formation du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate **16** à partir du pyruvate **14** et du GAP **15** est une enzyme similaire aux transcétolases et a été identifiée pour la première fois chez *E. coli*. Le clonage et la surexpression du gène *dxs* encodant cette enzyme ont permis d'obtenir la DXS purifiée et de la caractériser.^{70,71,72}

C'est un homodimère, composé de deux sous-unités de 67 kDa, qui a besoin pour fonctionner d'un cofacteur, le diphosphate de thiamine (TPP). Celui-ci s'additionne sur le pyruvate **14** pour former un adduit covalent, l'hydroxyéthylthiamine **22**, après une décarboxylation préalable (Figure 18). Cet intermédiaire nucléophile réagit avec le GAP **15** conduisant un adduit DXP-cofacteur, suivi de la libération du DXP **16**. Un rôle essentiel de l'histidine-49 dans le processus de libération du DXP **16** a été mis en évidence chez *E. coli*.⁷³ Le DXP n'est pas uniquement un intermédiaire pour la biosynthèse de l'IPP **2** et du DMAPP **3**, il l'est également chez certaines bactéries pour la biosynthèse de la thiamine et du pyridoxal, qui sont respectivement des précurseurs de la vitamine B1 et B6.^{74,75}

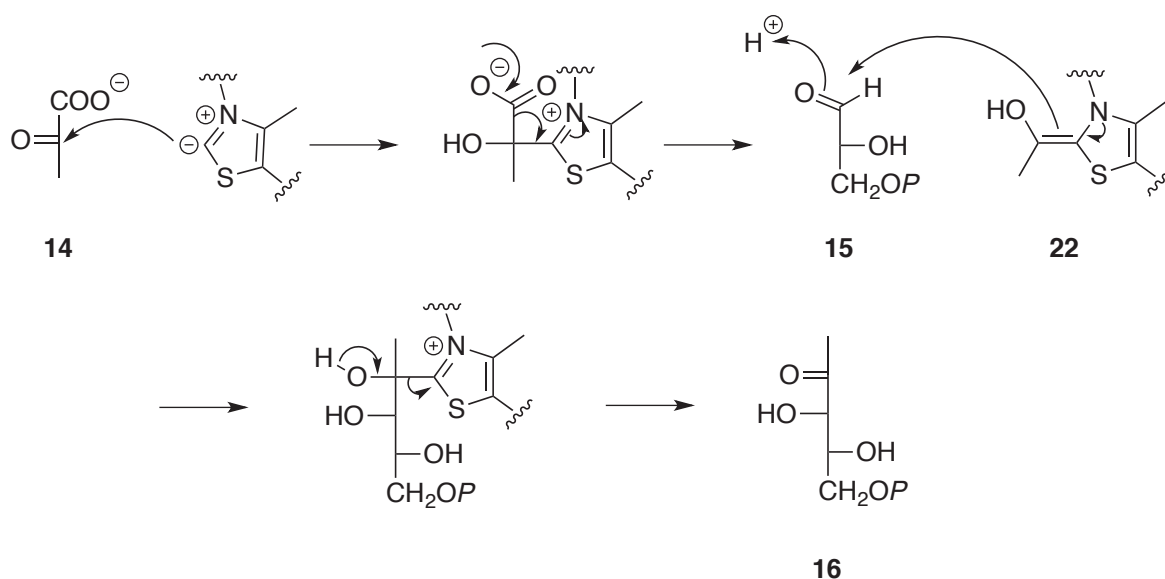


Figure 18 : Etape catalysée par la 1-désoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS).

Actuellement, peu d'inhibiteurs de la DXS ont été synthétisés. Des dérivés de la 3-(4-chloro-phényl)-5-benzyl-4*H*-pyrazolo[1,5]pyrimidine-7-one ont montré des pouvoirs inhibiteurs sur la DXS de *M. tuberculosis*. Bien qu'un de ces composés ait une activité *in vivo* intéressante ($IC_{50} = 7.6 \mu M$), ces dérivés se sont également révélés être des inhibiteurs des transcétolases des cellules animales.⁷⁶ Plus récemment une étude portant sur les acétylphosphonates a montré que ces derniers inhibent de façon sélective la DXS d'*E. coli* par rapport à d'autres enzymes de la famille de transcétolase.⁷⁷ Un dérivé de la famille des oxoclomazones a montré une activité inhibitrice sur DXS de *Haemophilus influenzae* avec une IC_{50} de $1 \mu M$ ainsi qu'un effet modéré sur la croissance bactérienne.⁷⁸

a. Étape catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR)

La DXR catalyse le réarrangement intramoléculaire du DXP **16** en 2-*C*-méthyl-D-érythritol 4-phosphate **17** (MEP). Cette protéine est encodée par le gène *dxr*, encore appelé *ispC* ou *yaeM*.⁷⁹

Afin que l'enzyme puisse fonctionner de manière optimale plusieurs facteurs sont nécessaires :

- la présence d'un cation divalent tel que du Mg^{2+} ou du Mn^{2+} ,
- un cofacteur, le NADPH, agissant comme donneur d'hydrure,
- la présence d'un groupement 5-phosphate sur le substrat pour que ce dernier se lie au site actif de l'enzyme. En effet, il a été démontré que le désoxyxylulose (DX) n'est pas substrat de la DXR, prouvant l'importance du groupement phosphate.⁸⁰

Description du mécanisme de la DXR

La DXR catalyse le réarrangement intramoléculaire du DXP **16** en un aldéhyde intermédiaire non isolable, le 2-*C*-méthyl-D-érythrose 4-phosphate **23** qui est réduit en MEP **17** grâce à l'intervention du NADPH (Figure 19).⁸¹

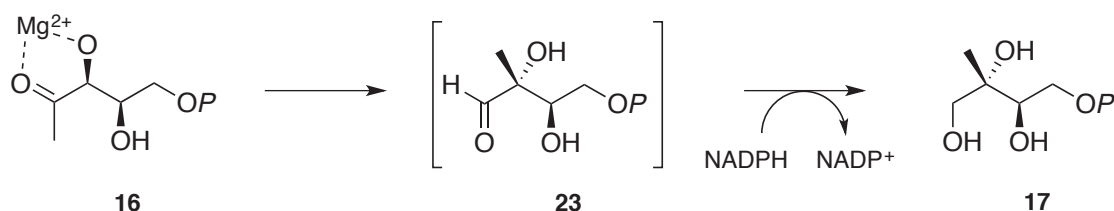


Figure 19 : Réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR).

Mécanisme réactionnel et stéréochimie de l'étape de réduction de la DXR

L'aldéhyde intermédiaire **23** est synthétisé via un réarrangement intramoléculaire du DXP **16**. Deux mécanismes réactionnels ont été proposés pour expliquer ce réarrangement : l'un serait un réarrangement de type α -cétole acido-catalysé (Figure 20 Mécanisme A)⁸² et l'autre une réaction de type rétro-aldol/aldol (Figure 20 Mécanisme B). En effet, si le réarrangement passe par la voie A, un intermédiaire carboxonium serait formé. Alors que si le réarrangement passe par la voie B ce serait un énolate qui se formerait.

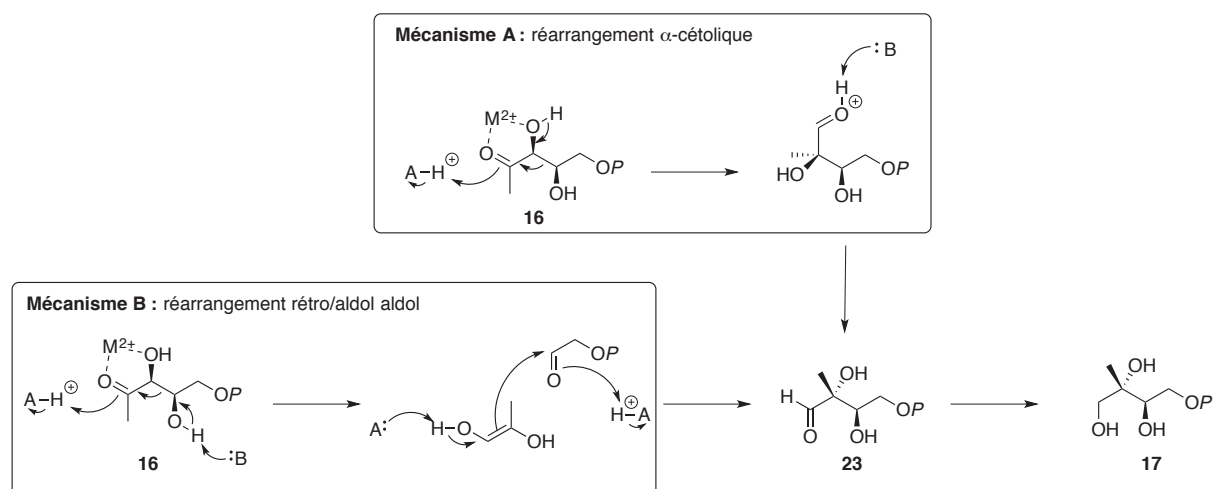


Figure 20 : Mécanismes proposés pour la transformation du DXP **16** en MEP **17**.

Afin de déterminer lequel de ces deux mécanismes est impliqué dans le réarrangement de DXP en MEP de nombreuses études ont été réalisées par différents groupes. Le groupe de Poulter a synthétisé des analogues du DXP mono- **24**, di- **25** et trifluoré **26** en position C-1 (Figure 21).

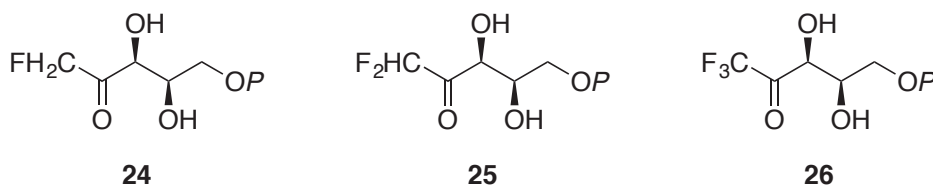


Figure 21 : Analogues fluorés du DXP **16**.

En effet, la présence d'un ou plusieurs atomes de fluor sur le DXP déstabiliserait la formation du carboxonium intermédiaire, alors que celle de l'énolate serait favorisée

permettant ainsi la rupture de la liaison carbone-carbone. Sur les trois molécules testées, seul le composé monofluoré du DXP **24** est substrat de l'enzyme, les composés **25** et **26** étant de faibles inhibiteurs. Des études cinétiques comparatives entre l'incubation du DXP **16** et de **24** ont été réalisées sur la DXR en présence de ses cofacteurs. Les résultats obtenus montrent que le réarrangement intramoléculaire de **24** se produit plus rapidement que celui avec le substrat naturel, ce qui est en faveur d'un mécanisme de type rétro-aldol/aldol.^{83,84}

Le groupe de Liu s'est intéressé aux effets cinétiques isotopiques secondaires d'isotopomères du DXP marqué au deutérium en position C-3 ou C-4. Cet effet cinétique isotopique secondaire permet d'étudier le changement d'hybridation des carbones. En effet, les deux mécanismes diffèrent par la nature des liaisons rompues, formées, et la réhybridation des différents carbones. Les résultats obtenus sont en faveur d'un mécanisme de type rétro-aldol/aldol, car il y a réhybridation des deux carbones portant les alcools secondaires pendant la réaction.⁸⁵

Enfin, une autre étude menée par Cox *et al.* a également permis de confirmer que le mécanisme passait bien par une réaction de type rétro-aldolisation/aldolisation.⁸⁶ L'incubation du DXP **16** avec l'enzyme purifiée, c'est à dire l'apoenzyme, a permis de mettre en évidence la formation d'un diastéréoisomère du DXP **27** en faible concentration (Figure 22).

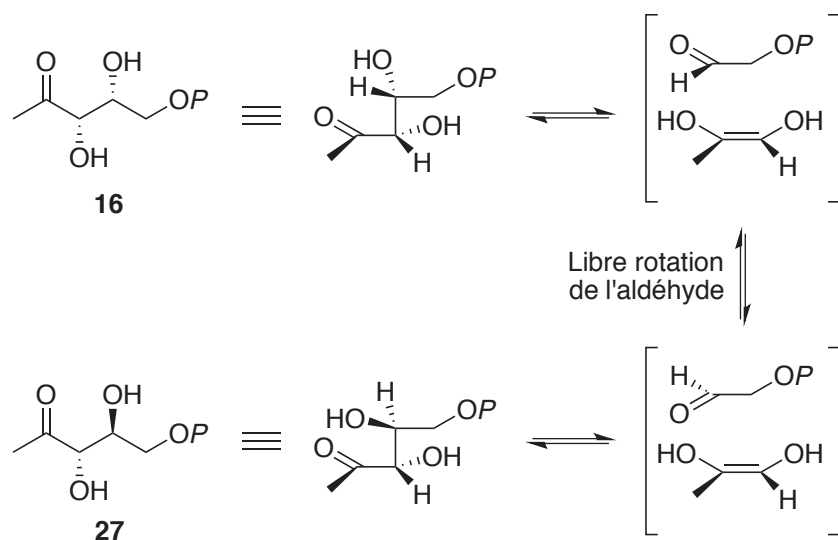


Figure 22 : Mécanisme de formation de **27**.

Ce composé **27** ne peut être issu que d'un réarrangement de type rétro-aldol/aldol. En présence du cation divalent, l'aldéhyde formé par la rétro-aldolisation ne peut pas tourner librement dans le site actif, impliquant que seule la face *si* est attaquée lors de l'aldolisation par l'énol. Or en absence du métal, la libre rotation est possible ce qui implique que la réaction d'aldolisation peut avoir lieu sur la face *re* de l'aldéhyde et ainsi conduire au composé **27**. Bien que ce diastéréoisomère soit formé en très faible quantité, il permet néanmoins de confirmer que le réarrangement qui a lieu est de type rétro-aldol/aldol.

Après formation de l'aldéhyde intermédiaire **23** une étape de réduction assistée par le NADPH a lieu. La stéréochimie de l'étape de réduction a été étudiée chez une plante supérieure *Liriodendron tulipifera* et chez une cyanobactérie *Synechocystis* sp. (PCC6803).^{87,88} Ces études ont permis de mettre en évidence que le proton pro-*S* en C-1 du MEP **17** provient du proton en C-3 du DXP **16**, lors de la réaction catalysée par la DXR de *Synechocystis* sp.⁸⁹ Le proton pro-*R* porté par le carbone C-1 du MEP **17** provient de l'hydrure pro-*S* du NADPH sur la face *re* de l'aldéhyde **23** (Figure 23). Cette enzyme fait partie de la famille des déshydrogénases de classe B. Le groupe d'Arigoni a mené ces études sur la DXR d'*E. coli* et a abouti à la même conclusion.⁹⁰

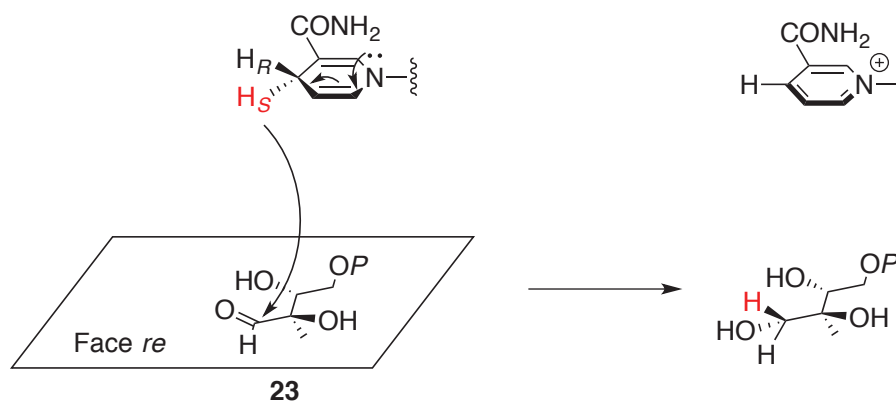


Figure 23 : Aspect stéréochimique de la réduction de l'aldéhyde **23** en MEP **17**.

Structure cristalline de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase

Au début des années 2000 de nombreux groupes se sont intéressés à la structure cristalline de la DXR chez différents microorganismes comme *E. coli*, *M. tuberculosis*^{91,92} ou encore *Zymomonas mobilis*.⁹³ Différentes structures ont été décrites pour l'enzyme seule,⁹⁴ le

complexe enzyme-NADPH,⁹⁵ le complexe enzyme-métal(Mn^{2+})-inhibiteur(fosmidomycine)⁹⁶ ainsi que le complexe enzyme-inhibiteur(fosmidomycine)-NADPH.⁹⁷ La DXR est une métalloenzyme qui assure la deuxième réaction de la voie du MEP. Pour fonctionner de manière optimale, deux cofacteurs sont nécessaires : un cation divalent (Mg^{2+} , Mn^{2+}) dont la nature peut varier selon la bactérie et le NADPH assurant la réduction de l'aldéhyde intermédiaire **23**.

La DXR est un homodimère de 96 x 60 Å où chaque dimère peut être décrit comme formant un sillon en forme de V avec une boucle flexible. Chaque monomère de 39 à 45 kDa (selon l'espèce) peut être divisé en trois domaines (Figure 24).

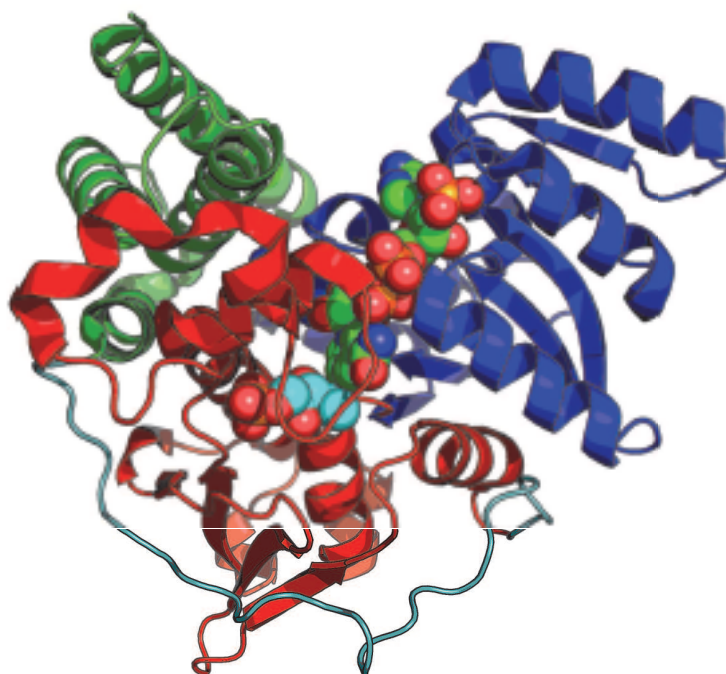


Figure 24 : Structure cristalline d'un monomère de la DXR d'*E. coli* avec le DXP **16** et le NADPH.

- Le domaine N-terminal, représenté en bleu, correspondant aux résidus 1 à 150 est composé de sept feuillets- β antiparallèles et de sept hélices- α . Il constitue un des bras du V et sert de site de fixation au NADPH.
- Le domaine C-terminal, représenté en vert, correspondant des résidus 312 à 398 est composé de quatre hélices- α . Il a un rôle structural car il sert de support au site catalytique.

- Le domaine central ou intermédiaire, représenté en rouge, s'étend des résidus 150 à 285 est composé d'hélices- α et de sept feuillets- β . Il assure la connexion entre les deux extrémités de la protéine et à l'association des deux monomères pour former l'homodimère. Il est également le siège du site catalytique c'est à dire que l'on y retrouve les sites de liaison du cation divalent et du phosphate ainsi que la boucle catalytique (résidus 206-216). Cette dernière joue un rôle essentiel car elle change de conformation lors de la fixation du substrat ou de l'inhibiteur. En effet, lorsqu'il n'y a pas de substrat la boucle est ouverte, elle se ferme lorsque le substrat entre ce qui permet le rapprochement entre le NADPH et le substrat pour permettre la réaction de réduction.

Afin de développer de nouveaux inhibiteurs, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance du site actif de l'enzyme ainsi que des interactions ayant lieu entre l'enzyme et le substrat ou un inhibiteur. Une structure cristalline de la DXR d'*E. coli* a été obtenue avec inhibiteur naturel de la DXR, la fosmidomycine **28**, un phosphonohydroxamate.⁹⁶ Le site catalytique peut être divisé en trois domaines (Figure 25).

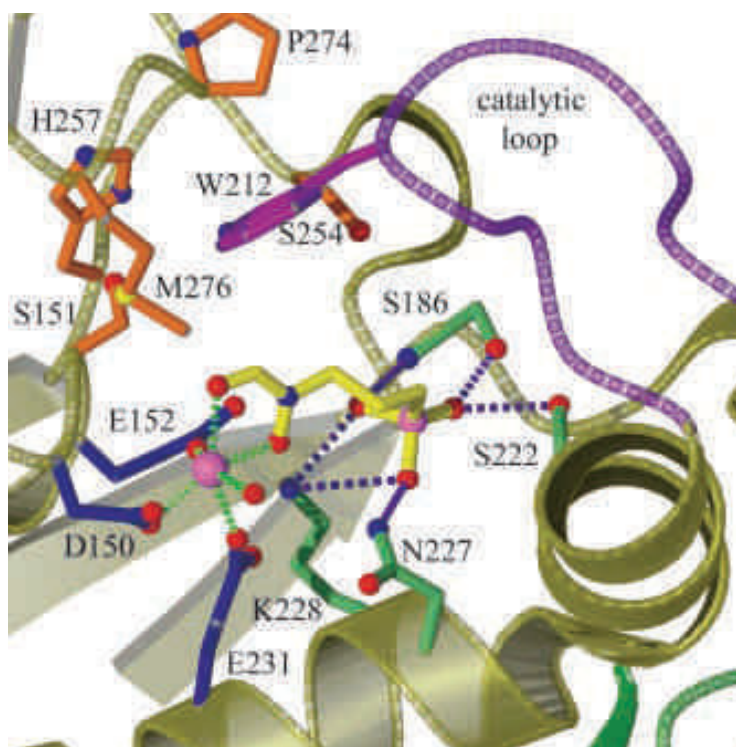


Figure 25 : Structure du site catalytique de la DXR d'*E. coli* complexée avec la fosmidomycine.

- Une poche chargée positivement permet la fixation du groupement phosphonate de la fosmidomycine. Ces interactions hydrophiles se font entre les oxygènes du phosphonate avec des résidus hautement conservés d'une espèce à l'autre tels que la Ser-186, l'His 209, la Ser-222, et la Lys-228.
- Une région amphipathique occupée par l'hydroxamate de la fosmidomycine se liant au cation divalent, dans ce cas le Mg^{2+} . Le groupement (*N*-formyl-*N*-hydroxy)amine de l'inhibiteur forme une pince chélatante qui va se lier au métal. La sphère octaédrique du cation va être complétée par l'Asp-149, le Glu-151, le Glu 230 et une molécule d'eau. L'oxygène de la fonction *N*-formyle est situé en *trans* du Glu-230 alors que l'oxygène du *N*-hydroxyle est placé en *trans* de l'Asp-149.
- Une région hydrophobe où la Met-276, la Met-214 et le Trp-212 interagissent via des liaisons hydrophobes avec le squelette carboné de l'inhibiteur.

La DXR utilise le NADPH comme cofacteur et non le NADH. Il a été montré que la Thr-10 via une liaison hydrogène avec le phosphopentose de l'adénosine permet la fixation du NADPH et que la Lys-37 permet d'ancrer le cofacteur grâce à des interactions électrostatiques. Il semblerait que la Thr-10 soit un résidu très important pour la fixation du NADPH car cet acide aminé est hautement conservé.⁹⁵

5. Les inhibiteurs de la DXR

a. Les inhibiteurs naturels

Dans les années 1980, le groupe d'Imanaka a isolé et caractérisé la fosmidomycine (FR-31524) **28** et son analogue méthylé le FR-900098 **29** à partir de *Streptomyces lavendulae* et *Streptomyces rubellomurinus* respectivement (Figure 26).^{98,99,100} La fosmidomycine inhibe la croissance de bactéries Gram-négative et de certaines bactéries Gram-positive mais présente une faible toxicité envers les animaux. Cependant ces molécules sont inactives sur *Staphylococcus aureus*.¹⁰¹ Chez d'autres bactéries comme par exemple chez *E. coli*, ces phosphonohydroxamates entraînent une baisse de la teneur en métabolites essentiels avec une nette diminution de la quantité en ménaquinones et ubiquinones, alors que chez *Micrococcus luteus* il a été observée une diminution des caroténoïdes.¹⁰² Ce n'est que plus tard que les travaux de Seto. *et al* ont permis de mettre en évidence que la fosmidomycine **28** et le FR-

900098 **29** inhibaient la biosynthèse des isoprénoïdes chez les organismes possédant la voie du MEP et touchaient plus particulièrement la deuxième enzyme, la DXR.^{79,101}

Une étude menée par le groupe de Jomaa a montré que ces deux composés **28** et **29** étaient capables d'inhiber la croissance de *Plasmodium* sp, et de les considérer alors comme de nouveaux médicaments antipaludéens.⁶⁰ Toutefois, des études cliniques menées sur des patients atteints de la malaria ont montré que l'efficacité de l'association d'un antipaludéens, la clindamycine, avec la fosmidomycine était plus importante que la monothérapie avec uniquement fosmidomycine pour le traitement de la malaria.¹⁰³ Un autre composé le dérivé phosphate de la fosmidomycine **28**, la fosfoxacine **30** a été isolée dans les années 1990 de *Pseudomonas fluorescens* PK-52 (Figure 26). Ce composé phosphate **30** a montré un bon pouvoir inhibiteur sur le DXR de *Synechocystis* sp.^{104,105}

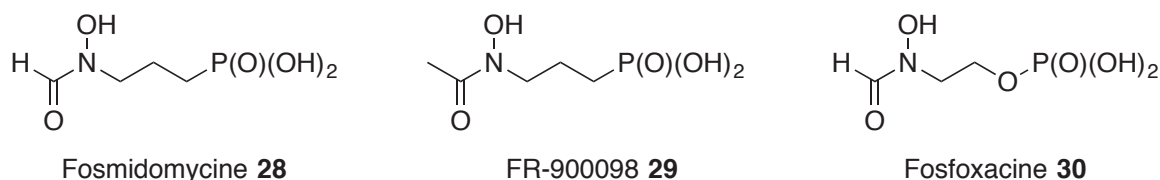


Figure 26 : Inhibiteurs naturels de la DXR.

Certaines bactéries ne sont cependant pas sensibles à la fosmidomycine, car cet agent a besoin d'un transporteur, le glycérol 3-phosphate (GlpT) pour pénétrer dans la cellule.¹⁰⁶ Or les mycobactéries ne possèdent pas ce transporteur, ce qui implique une résistance innée de ces bactéries envers la fosmidomycine.¹⁰⁷ De plus, certaines bactéries ont développé une résistance acquise à la fosmidomycine, en incorporant dans leur membrane plasmique des pompes à efflux rejetant l'antibiotique dans le milieu extracellulaire.^{108,109}

Dans ce contexte de nombreux groupes se sont intéressés au développement de nouvelles molécules ayant des activités inhibitrices sur la DXR. Des modifications du substrat naturel **16** ou de la fosmidomycine **28** ont été envisagées pour la conception de nouveaux inhibiteurs.

b. Les inhibiteurs synthétiques

Les analogues du DXP

Dans le but de comprendre le mode de liaison du DXP **16** avec le site actif de l'enzyme, des analogues du DXP où la fonction hydroxyle en C-3 **31** ou en C-4 **32** a été substituée par un atome d'hydrogène, ont été synthétisés au laboratoire (Figure 27). Ces deux molécules ont permis de mettre en évidence l'importance de la fonction hydroxyle en C-4 pour la catalyse de la réaction. Les molécules **31** et **32** se sont également avérées être des inhibiteurs réversibles de type mixte de la DXR d'*E. coli* avec des constantes d'inhibition (K_i) de 800 μM pour **31** et de 120 μM pour **32**.⁸¹ Ces mêmes composés ont été testés sur la DXR de *Synechocystis* sp. Dans ce cas ils se sont avérés être des inhibiteurs compétitifs avec des K_i respectifs de 150 μM et 30 μM .¹¹⁰ Wong *et al.* ont synthétisé des analogues monofluorés en C-3 **33** et en C-4 **34**. Des tests sur la DXR d'*E. coli* ont montré que ces composés étaient des inhibiteurs non-compétitifs avec des K_i respectifs de 444 μM et 733 μM (Figure 27).¹¹¹

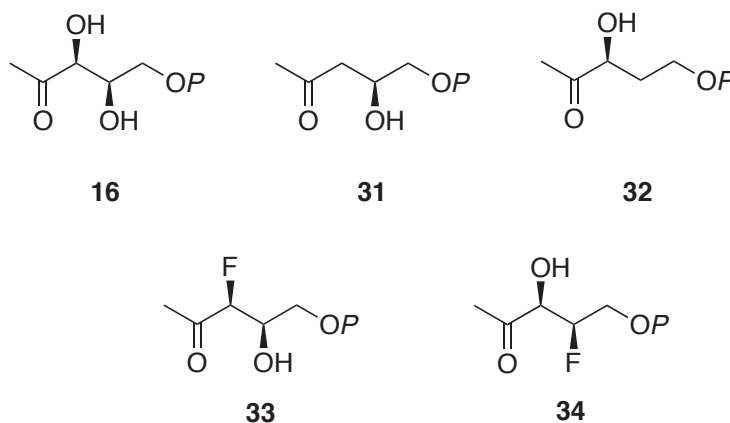


Figure 27 : Analogues désoxy-DXP **31-32** et fluoro-DXP **33-34**.

D'autres analogues du DXP ont été synthétisés où la fonction cétone a été modifiée. Le groupe de Poulter a remplacé le groupement carbonyle par un acide carboxylique **35**, un acide hydroxamique **36**, un ester méthylique **37**, un amide **38**, un alcool **39** ou une amine **40** (Figure 28). Les tests sur la DXR d'*E. coli* ont montré que quatre molécules **35**, **37**, **38** et **39** inhibent faiblement l'enzyme avec des concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) comprises entre 0,25 et 5,5 mM alors que les molécules **36** et **40** ne possèdent aucune propriété inhibitrice.¹¹² Sur la DXR de *Synechocystis* sp., la molécule **38** a un K_i de 90 μM .¹¹⁰

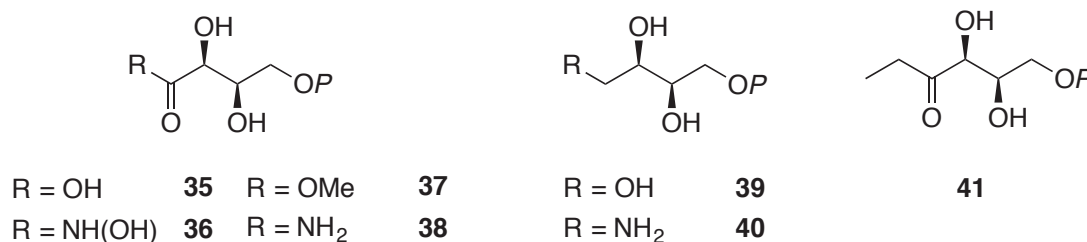


Figure 28 : Inhibiteurs analogues du DXP.

Enfin, des modifications du méthyle C-1 ont également été entreprises pour l'élucidation du mécanisme de la DXR. Des molécules mono-**24**, di-**25**, et trifluorée **26** (Figure 21) ont été synthétisées ainsi qu'un homologue portant un groupement éthyle **41** (Figure 28). Comme il l'a été indiqué dans le paragraphe « Mécanisme de la DXR », le composé monofluoré **24** est un bon substrat de la DXR, alors que les molécules **25**, **26** et **41** sont de faibles inhibiteurs de la DXR d'*E. coli* avec des IC_{50} respectives de 3,4 mM, 2,0 mM et 6,2 mM.⁸⁴ La molécule **41** a également été testée sur la DXR de *Synechocystis* sp., possédant un K_i de 630 μM .¹¹⁰

Les analogues des inhibiteurs naturels.

Les caractéristiques structurales de la fosmidomycine **28** et du FR-900098 **29** sont

- une fonction acide rétro-hydroxamique se chélatant au cation divalent du site actif de l'enzyme,
- un bras espaceur en C_3 de nature hydrophobe,
- une fonction phosphonate servant de point d'ancrage dans le site actif de l'enzyme via des interactions hydrophiles.

Au vu de ces trois propriétés, de nombreux groupes de recherche se sont attelés à la conception de nouveaux inhibiteurs en modifiant une ou plusieurs des trois caractéristiques structurales citées précédemment.

- Modification de l'acide hydroxamique

En 2005, dans notre laboratoire, L. Kuntz développe la synthèse des acides phosphonohydroxamiques **42** et **43**, où la pince chélatante est inversée par rapport à celle des inhibiteurs naturels (Figure 29). Ces deux molécules **42** et **43** (IC_{50} respectives de 170 nM et

de 48 nM) inhibent la DXR d'*E. coli* avec quasiment la même efficacité que la fosmidomycine **28** ($IC_{50} = 32$ nM). De plus, le composé *N*-méthylé **43** est actif sur des souches résistantes à la fosmidomycine.¹¹³

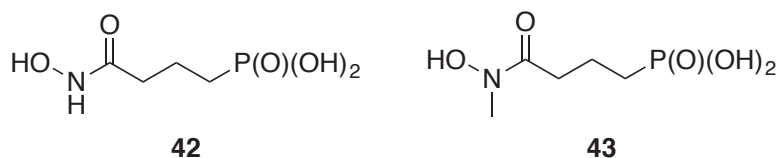


Figure 29 : Inhibiteurs de type acide phosphonohydroxamique.

La même année, le groupe de R.J. Cox publie la synthèse d'analogues de la fosmidomycine où la pince chélatante est remplacée par des groupements linéaires (amino, cétoamido) ou cyclique (oxazolidin-2-one, *N*-hydroxy-oxazolidin-2-one). Ces composés ont été testés sur la DXR d'*E. coli* et se sont avérés être de faibles inhibiteurs avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre du micromolaire.¹¹⁴ Le composé **44** où l'acide hydroxamique est compris dans un cycle à 6 chaînons, a été synthétisé et évalué sur la DXR de *M. tuberculosis* (Figure 30). L' IC_{50} de ce composé est de 53 μ M contre 0,08 μ M pour la fosmidomycine.¹¹⁵

Deng *et al.* ont publié la synthèse de composés où l'acide rétro-hydroxamique a été remplacé par un catéchol, groupement connu pour chélater les métaux divalents. Les composés **45a** et **46** ont une activité inhibitrice sur la DXR d'*E. coli* avec des valeurs respectives d' IC_{50} de 24,8 μ M et 4,5 μ M (Figure 30).¹¹⁶ Au laboratoire, l'activité inhibitrice des molécules **45a** et **45b** a également été évaluée sur la DXR d'*E. coli*. La molécule **45a** a une IC_{50} de 1200 μ M contre 32 μ M pour la fosmidomycine, alors que la molécule **45b** ne présente aucune activité.¹¹⁷ Cette différence de résultats peut s'expliquer car la détermination des IC_{50} a été réalisée dans des conditions opératoires différentes (temps d'incubation 20 min vs 2 min et [DXP] = 100 μ M vs 500 μ M). Testé sur la DXR de *M. tuberculosis*, le composé **46** présente une IC_{50} de 41 μ M.¹¹⁵

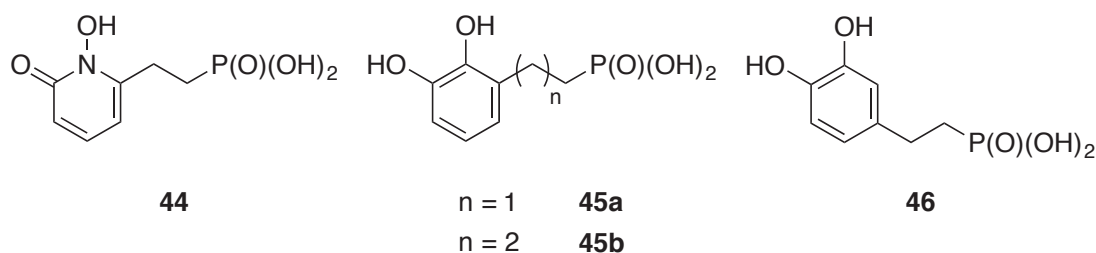


Figure 30 : Analogues de la fosmidomycine avec pince chélatante cyclique ou substitué par un catéchol.

Des analogues où la pince chélatante, l'acide hydroxamique a été remplacée par un groupement de type hydroxamate *O*-méthylé **47**, un dithiocarbamate **48** et un hydrazide **49** (Figure 31) ont été synthétisés au laboratoire. Ces molécules testées sur la DXR d'*E. coli*, ne présentent aucune activité inhibitrice, car leur IC₅₀ est de l'ordre du millimolaire.¹¹⁷

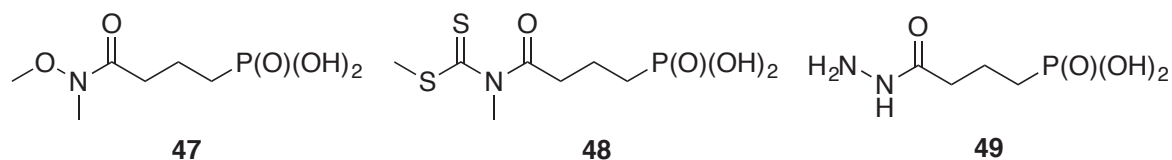


Figure 31 : Analogues de la fosmidomycine avec pince chélatante modifiée.

Des études relation structure activité ont permis de mettre en évidence que les composés hétéroaromatiques **50** et **51** pouvaient présenter un nouveau mode de liaison au sein du site actif de l'enzyme (Figure 32). En effet leur étude montre que le Trp-211 présent dans le site actif de la DXR d'*E. coli* joue un rôle important dans l'interaction enzyme-inhibiteur. En effet, des interactions de type π - π stacking et transferts de charge pourraient exister entre la pyridine ou la quinoléine de ces inhibiteurs et l'indole du Trp-211.¹¹⁸ Le composé **50** présente un pouvoir inhibiteur intéressant sur la DXR d'*E. coli* et sur la DXR de *M. tuberculosis* avec des Ki respectifs de 0,42 μ M et 3,2 μ M.¹¹⁹

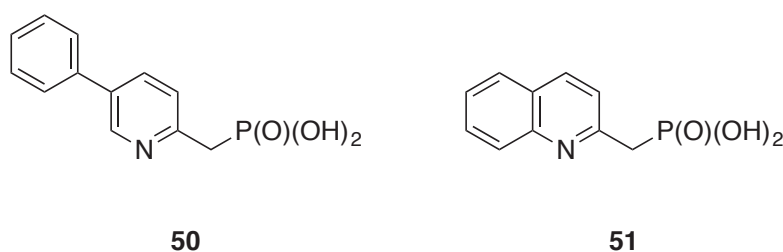
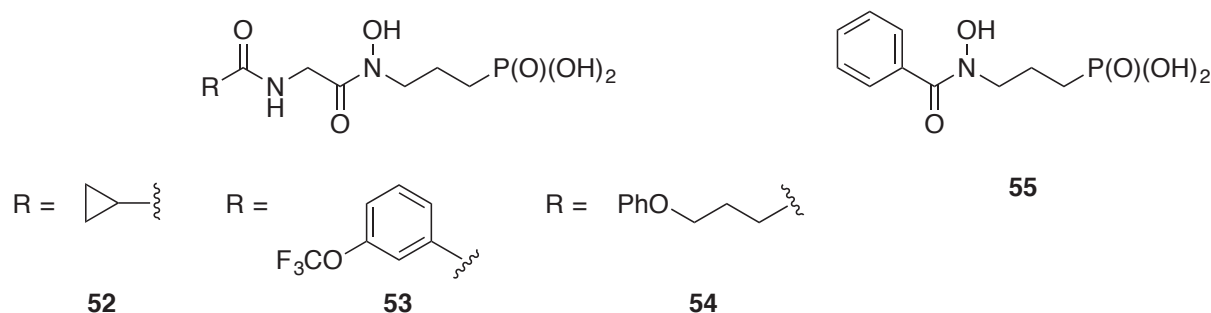


Figure 32 : Inhibiteurs de la DXR possédant une pyridine ou une quinoléine substituée.

Enfin, dans le but de voir s'il y avait un autre site de liaison, le groupe de Link a synthétisé des analogues de la fosmidomycine **28** avec un site d'élongation au niveau de l'acide rétro-hydroxamique. Les composés **52-55** ont été synthétisés et testés sur la DXR d'*E. coli* et de *P. falciparum* montrant de bonnes propriétés inhibitrices (Figure 33 et Tableau 1).¹²⁰

Figure 33 : Inhibiteurs **52-55** analogues de la fosmidomycine.

Composés	Ki (μM) DXR <i>E. coli</i>	Ki (μM) DXR <i>P. falciparum</i>
52	7,1	3,3
53	5,1	2,9
54	1	0,4
55	0,13	0,06

Tableau 1 : Valeurs des constantes d'inhibition des produits **52-55** sur les DXRs d'*E. coli* et *P. falciparum*.

- Modification du bras espaceur

Au laboratoire, une étude de l'influence de la longueur du bras espaceur sur les propriétés inhibitrices a été effectuée. Dans ce but, les molécules **42** et **43** avec un bras espaceur en C₂ et C₄ ont été synthétisées. Les propriétés inhibitrices de ces molécules ont été étudiées sur la DXR d'*E. coli*. Les valeurs des IC₅₀ des composés possédant un bras espaceur en C₂ chutent de manière considérable alors que ceux ayant un bras espaceur en C₄ ont un pouvoir inhibiteur modéré.¹²¹ Des modifications analogues ont également été réalisées sur la fosmidomycine **28** et le FR-900098 **29**. Dans ce cas aussi, les composés présentent un faible pouvoir inhibiteur.¹²² Ces expériences ont montrées que la longueur idéale du bras espaceur est en C₃. Cependant l'introduction d'une insaturation en α du phosphonate **56** permet d'augmenter l'activité inhibitrice envers la DXR de *M. tuberculosis* (Figure 34).¹²²

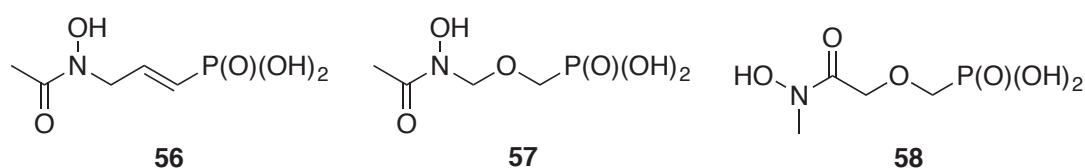


Figure 34 : Analogues de la fosmidomycine avec modification du bras espaceur.

En 2008, Haemers *et al.* décrivent la synthèse de molécules où un groupement méthylène est remplacé par un atome d'oxygène en β ou γ par rapport au phosphonate. Les acides rétro-hydroxamique **57** et hydroxamique **58** ont été testés d'une part sur la DXR d'*E. coli* et d'autre part la souche 3D7 de *P. falciparum* et ont montré une activité inhibitrice semblable à celle du FR-900098 **29** (Figure 34).¹⁰⁵

L'analogue phosphate de fosmidomycine, la fosfoxacine **30** possède un meilleur pouvoir inhibiteur sur la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803 que son analogue phosphonate **28**.¹²³ En effet, le groupement phosphate étant plus acide que le groupement phosphonate, il en résulte qu'à pH physiologique il y est une plus grande proportion de molécules doublement déprotonées et par conséquent une meilleure interaction avec les acides aminés du site catalytique. Cependant comme le phosphate est un groupement qui peut être facilement hydrolysé en milieu biologique, l'équipe de Van Calenbergh a décrit la synthèse de composés α -phosphonohalogénés.¹²⁴ L'introduction d'un atome halogène, tel un chlore **59** ou un fluor **60** et **61** en α du phosphore a pour but de mimer le phosphate (Figure 35). Trois composés ont été synthétisés et testés *in vitro* sur deux souches de *P. falciparum*. Pour la souche Pf-K1, les trois molécules **59**, **60** et **61** ont montré de meilleurs pouvoirs d'inhibition que la fosmidomycine **28** et le FR-900098 **29**.¹²⁴

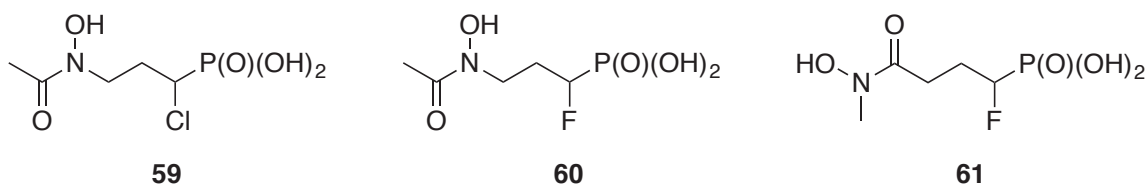
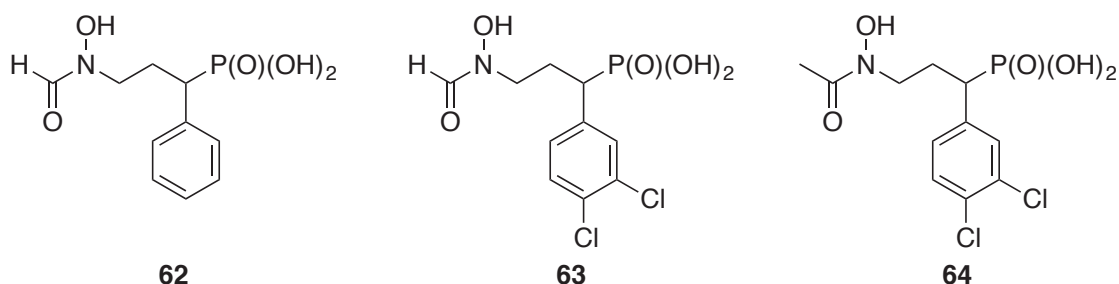


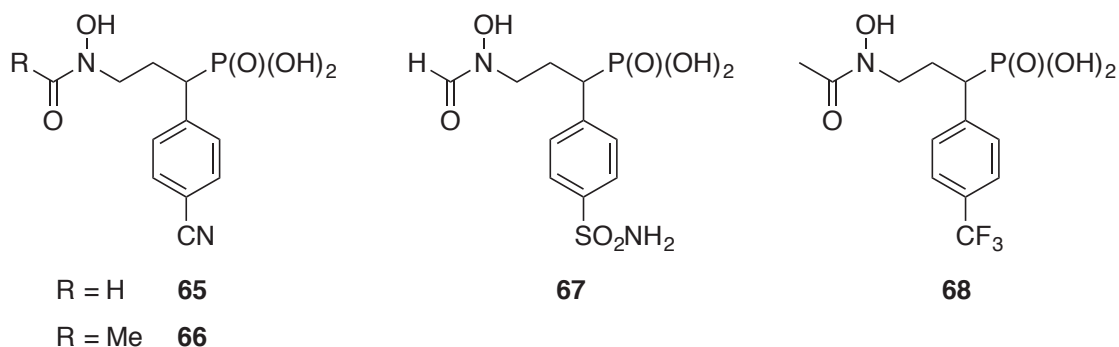
Figure 35 : Composés α -phosphonohalogénés analogues du FR-900098 **29** et du composé **43**.

De nombreux travaux de la littérature rapportent la synthèse d'analogues de la fosmidomycine substitués en α du phosphonate par un groupement aromatique électrodéficient. Cette modification induisant une diminution du pK_{a2} de l'acide phosphonique, aurait pour conséquence d'augmenter l'interaction avec le point d'ancrage de l'enzyme et ainsi d'obtenir de meilleurs inhibiteurs. De plus, l'ajout d'un tel substituant augmenterait le caractère lipophile des composés, ce qui faciliterait sa pénétration à travers la membrane plasmique des bactéries.

En 2006, Haemers *et al.* décrivent la synthèse de composés présentant, en α du phosphonate, un groupement phényle fonctionnalisé ou non (Figure 36). Une perte du pouvoir inhibiteur sur la DXR d'*E. coli* est observée lorsque la molécule porte un phényle non substitué **62**. Un pouvoir inhibiteur semblable à celui de la fosmidomycine **28** ($IC_{50} = 0,030 \mu M$) est cependant obtenu avec le composé 3,4-Cl-Ph **63** dont l' IC_{50} est de $0,059 \mu M$.¹²⁵ Le pouvoir inhibiteur des composés **63** et **64** a été évalué sur la DXR de *M. tuberculosis*. Le composé **63** a une IC_{50} de $0,15 \mu M$ équivalente à celle du FR-900098 **28** ($IC_{50} = 0,16 \mu M$) alors que l' IC_{50} du composé **64** est 4,5 fois plus élevé que le FR-900098 **29**.¹²⁶

Figure 36 : Inhibiteurs α -arylphosphonates.

Par la suite le groupe de Van Calenbergh a développé la synthèse de composés dérivés de la fosmidomycine α -arylés, où le groupement phényle est substitué en position *para* soit par un nitrile **65** et **66**, soit par un sulfonamide **67** ou encore par un trifluorométhyle **68** (Figure 37). Les composés *N*-acétylés **66**, **67** et **68** ont montré une inhibition de la DXR d'*E. coli* plus faible que celle induite par la fosmidomycine **28**, mais avec des valeurs d' IC_{50} cependant très intéressantes, comprises entre $0,12$ - $0,36 \mu M$. Le composé *N*-formylé **65** a un pouvoir inhibiteur ($IC_{50} = 0,054 \mu M$) équivalent à celui de la fosmidomycine ($IC_{50} = 0,056 \mu M$).¹²⁷

Figure 37 : Analogues α -arylés de la fosmidomycine.

Dans le but de varier le groupement aromatique présent en α du phosphonate, Xue *et al.* ont remplacé le groupement phényle par une pyridine liée en *méta* **69** et **70** ou en *para* **71** et **72** au squelette carboné de l'inhibiteur (Figure 38). Cette série de molécules a été testée sur la DXR d'*E. coli*, seuls les deux composés **70** et **71** se montrent être aussi actifs que la fosmidomycine. Par contre sur la DXR de *P. falciparum*, l'activité inhibitrice de ces molécules est supérieure à la fosmidomycine **28**. Par exemple pour le composé **70**, le K_i est de 1,9 nM alors que celui de l'inhibiteur naturel **28** est de 21 nM.¹²⁸ Cependant, lorsque la pyridine est remplacée par un groupement azoture, amide, éther ou triazole le pouvoir inhibiteur diminue fortement.¹²⁹

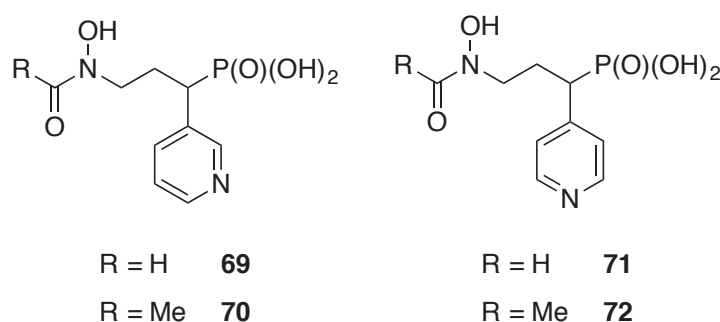
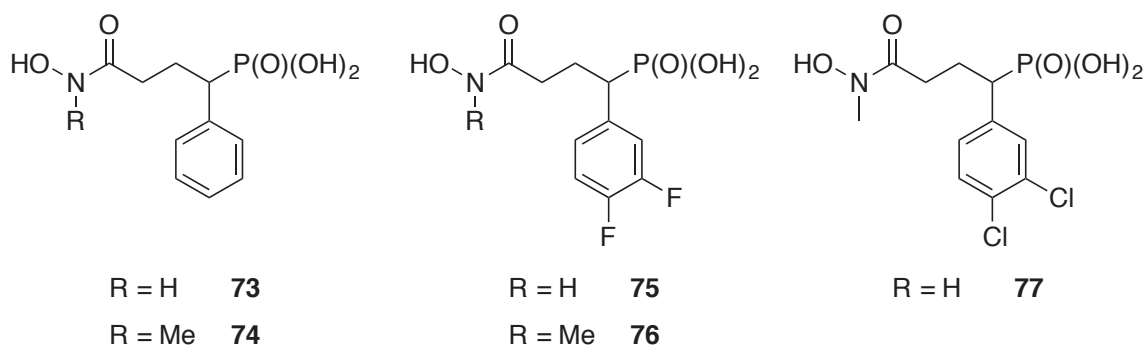
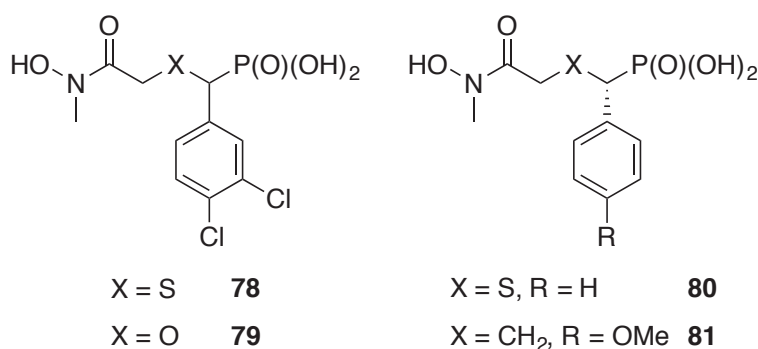


Figure 38 : Analogues de la fosmidomycine substitués en α du phosphonate par une pyridine.

La plupart des molécules **56** à **70** sont des analogues α -substitués de la fosmidomycine **28** et du FR-900098 **29** où la pince chélatante est un acide rétro-hydroxamique. Des études similaires ont été réalisées sur des analogues des composés **42** et **43** où la pince chélatante est inversée par rapport à celle de la fosmidomycine (Figure 39). Ainsi en 2010, les composés **73** et **74** ont été synthétisés par l'équipe de Kurz et ont montré de bonnes propriétés inhibitrices sur la DXR de *P. falciparum*, alors que leur action est plus modérée chez *E. coli*. Par exemple, la molécule **74** est cinq fois plus active que le FR-900098 **29** sur la DXR de *P. falciparum*.¹³⁰ L'année suivante, Kurz continue son investigation en publiant la synthèse de composés où le cycle aromatique est substitué en positions C-3 et C-4 par des atomes de chlore ou de fluor. Dans ce cas aussi, les molécules **75**, **76** et **77** présentent une bonne activité inhibitrice chez *P. falciparum* mais également chez *E. coli*, avec des IC_{50} de 3 nM pour le composé **75** et **76** contre 0,14 μM pour la fosmidomycine **28** (Figure 39).¹³¹

Figure 39 : Analogues α -arylphosphonate des molécules **42** et **43**.

Dans le prolongement des travaux sur les composés α -substitués et au vu des bons résultats d'inhibition des composés β -oxa isostères (Figure 34), plusieurs équipes ont entrepris la synthèse de composés α -aryl β -oxa et α -aryl β -thia isostères de la molécule **43**.^{132,133} Les composés **78** et **79** ont des IC_{50} respectives de 4,5 nM et 14 nM sur la DXR de *P. falciparum*. De plus, Kufermann *et al.* ont montré que pour le composé **80**, l'activité inhibitrice sur la DXR de *P. falciparum* de l'énantiomère S-(+) ($\text{IC}_{50} = 9,4$ nM) est 1250 fois supérieure à celle de l'énantiomère R-(-) ($\text{IC}_{50} = 12000$ nM). Récemment Konzuch *et al.* ont rapporté que le composé **81** inhibe la DXR d'*E. coli* avec une IC_{50} de 0,07 μM . Des études cristallographiques confirment que l'énantiomère S-(+) de **81** a une meilleur affinité avec le site actif de l'enzyme que l'analogue R-(-) (Figure 40).¹³⁴

Figure 40 : Composés α -aryl β -oxa et α -aryl β -thia isostères de la molécule **43**.

L'influence de la flexibilité la chaîne carbonée sur l'inhibition a été étudiée par l'équipe de Van Calenbergh. Les composés comportant soit un cyclopentane¹³⁵ (**82** et **83**), soit un cyclopropane (**84** et **85**)¹³⁶ ont été synthétisés et été testés sur la DXR d'*E. coli* (Figure 41).

Les IC_{50} sont comprises entre 0,05 μM à 12 μM . Le composé **85** possède une activité inhibitrice comparable à celle de la fosmidomycine **28**, avec une IC_{50} de 0,050 μM . Les composés **84** et **85** ont également été testés sur deux souches de *P. falciparum* Dd2 et 3D7 au stade intra-érythrocytaire. Les résultats montrent que le composé **85** est aussi efficace que la fosmidomycine sur les deux souches.

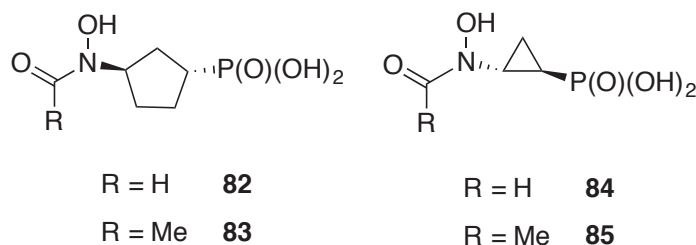


Figure 41 : Inhibiteurs cycliques de la DXR.

- Modification du point d'ancrage

Plusieurs modifications au niveau du phosphonate ont également été envisagées : remplacement du phosphonate par un sulfonate¹²¹, une sulfone,¹³⁷ un sulfonamide,¹³⁷ un sulfamate,^{123,138} un carboxylate^{121,123} ou encore des tétrazoles.¹³⁹ Tous ces composés se sont montrés inactifs sur la DXR d'*E. coli* ou de *Synechocystis* sp. Ces résultats mettent en évidence l'importance du groupement phosphonate pour l'ancrage des molécules dans le site actif de l'enzyme.

Afin d'augmenter l'inhibition de la fosmidomycine, de nombreux analogues ont été synthétisés et testés la DXR de différentes espèces. Plusieurs variations structurales des inhibiteurs naturels **28** et **29** ont été envisagées (i) une modification de la pince chélatante (ii) une modification du bras espaceur et (iii) une modification du point d'ancrage. Certaines molécules présentent une activité inhibitrice meilleur que la fosmidomycine **28** ou le FR-900098 **29**, comme par exemple certains composés α -arylés **70** et **75-76**, les analogues β -oxa-isostères **57-58**, le dérivé phosphate **30** (fosfoxacine) ou encore les acides phosphonohydroxamiques **42** et **43**. La modification du point d'ancrage n'a pas permis d'avoir de bons inhibiteurs, ce qui implique que le groupement phosphonate ou phosphate soit essentiel. Cependant ces deux groupements confèrent une biodisponibilité assez réduite aux molécules, diminuant leur pénétration par diffusion au sein de la bactérie. La synthèse de ces molécules sous forme de prodrogues serait un bon moyen de contourner ce problème et ainsi

espérer la pénétration des molécules au sein de la cellule. Après libération de la molécule active, cette dernière pourrait atteindre la DXR et ainsi empêcher son activité catalytique avec comme conséquence l'arrêt de la synthèse de l'IPP **2** et du DMAPP **3**, qui sont des précurseurs de composés essentiels à la vie.

IV. Les prodrogues

Le terme prodrogue a été introduit pour la première fois par A. Albert en 1958 et définit comme étant un composé destiné à l'usage thérapeutique devant subir une biotransformation après son administration à un organisme afin de libérer la substance active.^{140,141} Ces molécules peuvent donc être considérées comme des médicaments contenant des groupements protecteurs non toxiques utilisés de manière temporaire afin de modifier ou d'éliminer les propriétés indésirables de la molécule parente. Cette stratégie est souvent utilisée pour optimiser les propriétés médicamenteuses que sont l'absorption, la distribution, la métabolisation, l'excrétion et la toxicité (ADMET).¹⁴² Les prodrogues peuvent être classées en deux groupes : les bioprécurseurs et les « carrier-linked prodrugs ».¹⁴³

Les « carrier-linked prodrugs »

Ce sont des composés dont la substance active est attachée de façon temporaire par un lien chimique labile à une entité appelée « transporteur ». Ce transporteur va modifier les propriétés physico-chimiques du médicament, le rendant généralement moins actif, voire même inactif, mais augmentant ses propriétés pharmacocinétiques. C'est la séparation *in vivo* de ces deux entités qui permet de libérer la substance active (Figure 42).

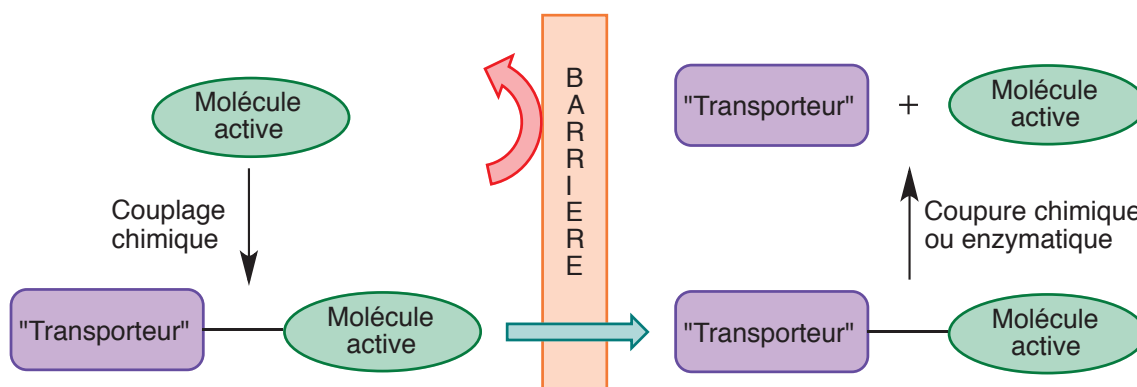


Figure 42 : Formation d'une «carrier-linked prodrugs » et mécanisme de libération.

Les « carrier-linked prodrugs » peuvent être classés en trois sous-groupes.

- Les prodrogues bipartites sont des prodrogues à deux partenaires comprenant la molécule active et le transporteur agissant comme un groupement masquant.
- Les prodrogues tripartites sont des prodrogues à trois partenaires comprenant toujours la molécule active et le transporteur, mais séparés par un espaceur. Généralement une première réaction enzymatique permet la libération du transporteur. Le composé résultant toujours inactif, subit une coupure spontanée de l'espaceur afin de libérer le médicament.
- Les prodrogues mutuelles sont des prodrogues dans lesquelles les deux partenaires liés sont des molécules actives.

Les bioprécurseurs

Les bioprécurseurs sont des composés qui sont inactifs et qui doivent être convertis en molécules actives. Contrairement aux « carrier-linked prodrugs », les bioprécurseurs ne sont pas transformés en molécule active par simple perte du transporteur. Ce sont des composés qui nécessitent une modification chimique telle que des oxydations, des réductions, des phosphorylations ou des hydrolyses.

1. Prodrogues de phosphates et phosphonates

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux prodrogues de phosphates et phosphonates. Ces fonctions chimiques sont présentes dans de nombreux agents anticancéreux et antiviraux. La présence d'un groupement phosphate ou phosphonate sur des molécules actives présente cependant des inconvénients majeurs. En effet, ces groupements portent une ou deux charges négatives à pH physiologique, ce qui en fait des molécules extrêmement polaires. Ces espèces ne pourront donc pas pénétrer par diffusion passive à travers les membranes plasmiques des cellules. La synthèse de molécules neutres permet de diminuer la polarité de ces molécules tout en augmentant leur lipophilie, ce qui facilite le passage des molécules actives à travers les membranes plasmiques. Si les phosphonates présentent une meilleure stabilité chimique en milieu biologique, les phosphates par contre peuvent être hydrolysés par des phosphatases. Ainsi les molécules où la charge négative du

phosphate est masquée permettent d'éviter cette étape d'inactivation. Les charges négatives de ces deux fonctions chimiques peuvent être masquées soit par deux groupements identiques soit par des groupements différents.

- Si les deux groupements masquant sont identiques (par exemple deux groupements acyloxyalkylesters), le premier sera éliminé par une estérase qui libérera l'acide phosphonique mono protégé chargé négativement. Cet intermédiaire est généralement un mauvais substrat pour une estérase. C'est pourquoi la coupure du deuxième groupe acyloxyalkylester se fera généralement par une deuxième enzyme, telle une phosphodiesterase.
- Dans le cas où les deux groupements sont différents, il faut que le premier groupement soit éliminé par une enzyme et que le second se dégrade très rapidement par simple hydrolyse.

Les prodrogues présentées ci-dessous ont fait l'objet de nombreuses études et ont été décrites à plusieurs reprises dans des revues.^{144,145,146} Dans cette section, nous nous sommes intéressés aux groupements masquants pouvant être appliqués aux phosphates et aux phosphonates.

Les acyloxyalkylesters

Les esters d'acide carboxylique de phosphate sont rapidement dégradés *in vivo* par des carboxyestérases alors que les esters d'alkyle de phosphate sont quant à eux trop stables en milieu biologique. C'est pourquoi ces deux types d'esters ne sont pas utilisés dans la stratégie de prodrogues. Pour pallier à ce problème, une classe de prodrogues a été mise au point, les acyloxyalkylesters, qui sont des prodrogues tripartites. Ces prodrogues sont capables de traverser les membranes des cellules par diffusion passive et de libérer *in vivo* l'acide phosphonique.

Mécanisme de libération (Figure 43)

Une fois dans la cellule, la prodrogue **86** va être prise en charge par une estérase qui va hydrolyser la partie acyle d'un des deux groupes pour conduire à l'analogue hydroxyméthyle **87**. Ce dernier est spontanément dissocié avec l'élimination d'un aldéhyde et du monoester **88**. Pour la rupture du second ester deux mécanismes sont envisageables. Soit le monoester subit la même transformation chimique que précédemment, soit la libération de l'acide

phosphonique est catalysée par une phosphodiesterase. Généralement l'espaceur est un groupement méthylène ($R^1=H$) qui engendre lors de son élimination du formaldéhyde cytotoxique pour les cellules. Pour pallier à ce problème, le carbone méthylénique peut être substitué par un méthyle ($R^1=Me$), ce qui induira la libération d'acétaldéhyde, composé moins toxique.

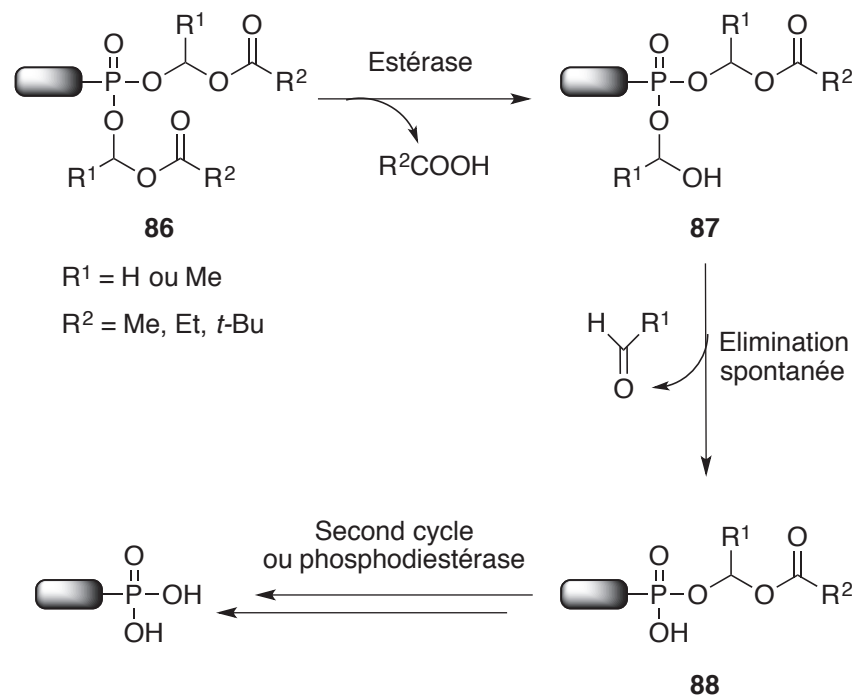


Figure 43 : Mécanisme de libération des prodrogues de type acyloxyalkylesters.

Exemples

En 1992, Starrett *et al.* ont synthétisé une prodrogue bis(pivaloyloxyméthyl) de l'adéfovir **89** (BisPOM-PMEA) afin d'augmenter son activité antivirale (Figure 44).¹⁴⁷ Cette étude montre que la prodrogue **89** est 150 fois plus active *in vivo* contre le virus de l'herpès HSV-2 que le composé parent (PMEA), ce qui serait dû à une amélioration de la pénétration de la prodrogue. Le composé **89** a une biodisponibilité orale de 30 %, mais l'introduction d'un méthyle sur le méthylène du bras espaceur **90** augmente sa biodisponibilité à 74 % chez la souris.¹⁴⁸ Ces prodrogues de type BisPOM présentent cependant des inconvénients : (i) la libération de l'acide pivalique lors de l'étape catalysée par les estérases peut perturber l'homéostasie de la carnitine¹⁴⁹ et (ii) la prodrogue est trop rapidement métabolisée en son composé parent.¹⁵⁰

Plus récemment, le LB80380 **91**, une prodrogue BisPOM d'un nucléotide est actuellement en essai clinique de phase II pour le traitement de l'hépatite B résistante à la lamivudine.¹⁵¹

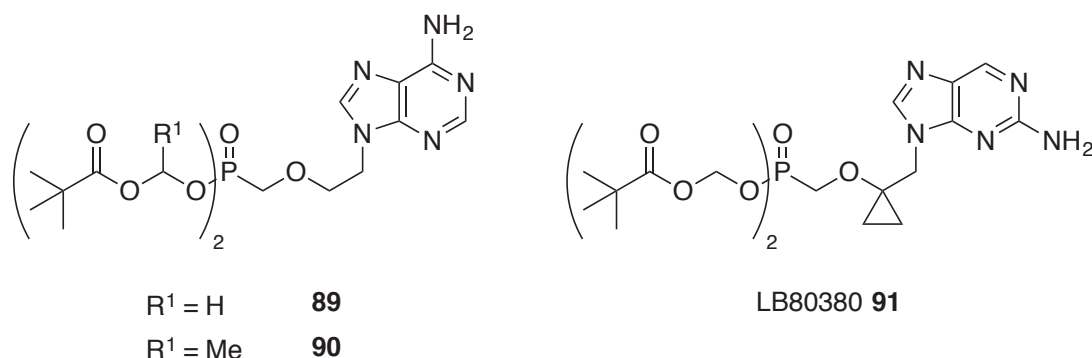


Figure 44 : Prodrogues acyloxyalkylester – BisPOM-PMEA **89** et **90** et LB80380 **91**.

Les dioxolénones (Figure 45) sont des prodrogues appartenant à la famille des acyloxyalkylesters. Tout comme les acyloxyalkylesters, ces prodrogues sont rapidement hydrolysées dans le sérum par des estérases. Elles présentent deux avantages, l'absence de centre stéréogène ainsi que la libération d'une dicétone relativement non toxique plutôt que du formaldéhyde.

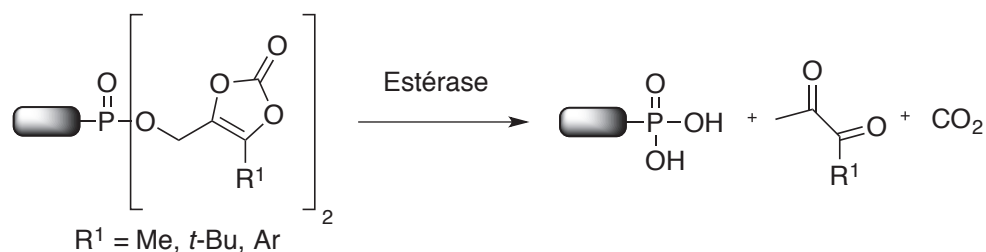


Figure 45 : Prodrogue de type dioxolénones.

Les alkyloxycarbonyloxyalkylesters

Les prodrogues de type alkyloxycarbonyloxyalkylester ont été conçues pour pallier les problèmes rencontrés avec les prodrogues BisPOM. Dans ce cas, ce n'est plus un groupement acyle mais un groupement carbonate qui compose cette prodrogue. Comme précédemment la diffusion par voie passive de ce composé à travers la membrane va être facilitée.

Mécanisme de libération (Figure 46)

Dans un premier temps la prodrogue **92** est prise en charge par une estérase qui va libérer l'acide carbonique intermédiaire **93**. Ce produit est instable et va spontanément se réarranger en **94** en libérant du CO₂ et un aldéhyde. Pour la libération de l'acide phosphonique, le monoester **94** subit soit le même schéma réactionnel soit il est hydrolysé par une phosphodiesterase. De l'isopropanol est libéré lors de la première étape, composé n'ayant pas d'impact sur l'homéostasie de la carnitine.

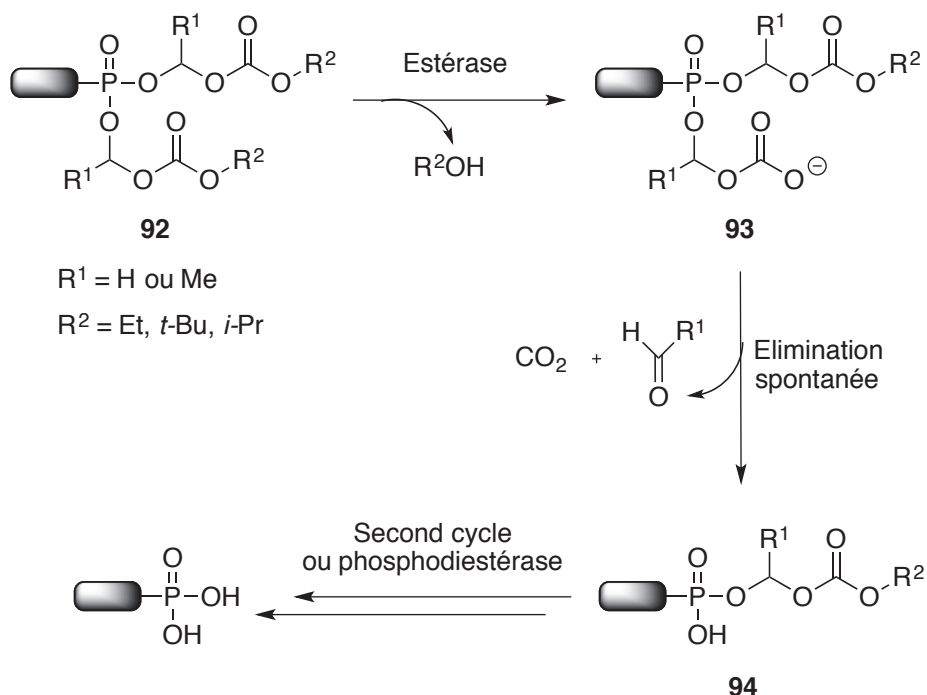


Figure 46 : Mécanisme de libération des prodrogues de type alkyloxycarbonyloxyalkylester.

Exemples

Le ténofovir ou PMPA est un phosphonate de nucléoside qui s'est montré efficace contre le virus de l'immunodéficience humain (VIH). C'est un inhibiteur de la réplication du VIH-1 qui a une concentration efficace médiane (EC₅₀) de 0,63 μM sur des lymphocytes T de type MT-2. Afin d'améliorer la biodisponibilité de cette molécule une prodrogue de type BisPOC-PMPA a été synthétisée et s'est révélée être 90 fois plus active que la molécule parente (Figure 47).¹⁵² En 2001, ce composé a été approuvé par la FDA (« Food and Drugs Administration ») pour le traitement chronique des patients infectés par le VIH. Il est commercialisé sous le nom de Viread®.

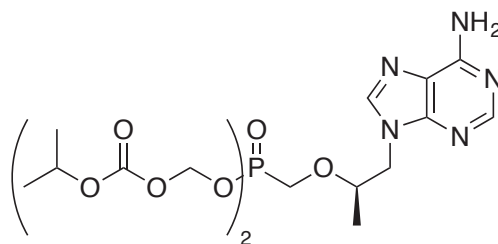


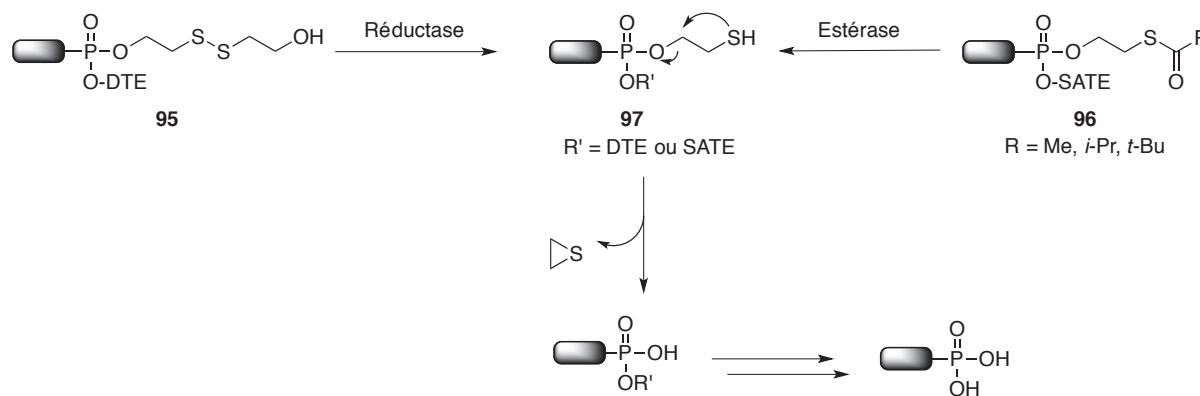
Figure 47 : BisPOC-PMPA.

S-Acétylthioéthanol (SATE) et dithioéthanol (DTE) esters

Dans les exemples précédents, le groupe espaceur était un groupement méthylène. Dans les deux exemples suivants, le groupe espaceur est un thioéthylène. Le dithioéthanol **95** (DTE) et le *S*-acétylthioéthanol **96** (SATE) sont généralement utilisés pour délivrer des nucléotides ou des nucléosides monophosphates.

Mécanisme de libération (Figure 48)

La libération du phosphate ou phosphonate se produit en deux étapes. Dans un premier temps, le substrat est pris en charge par une enzyme. Cette enzyme est différente s'il s'agit du DTE ou du SATE. Dans le cas du DTE **95** l'enzyme qui intervient est une réductase qui va réduire la liaison S-S pour libérer l'intermédiaire thioéthyle **97**, alors que dans le cas du SATE **96**, l'enzyme est une estérase qui hydrolyse le thioester pour donner le même intermédiaire thioéthyle **97**. Dans un deuxième temps, l'intermédiaire **97** étant instable se décompose spontanément pour donner le nucléotide mono-protégé ainsi que du sulfure d'éthylène ou thiirane.

Figure 48 : Mécanismes généraux de libération des prodrogues DTE **95** et SATE **96**.

Les risques de toxicité liés au produit secondaire formé ont limité le développement de ces prodrogues. Elles sont cependant largement utilisées dans l'étude *in vivo* pour la libération intracellulaire des phosphates et phosphonates, particulièrement dans le domaine des antiviraux.

Exemples

Les premières prodrogues de type SATE **98** et DTE **99** portent sur la didésoxyuridine monophosphate (ddUMP) (Figure 49). Elles ont montré une activité anti-VIH dans des cellules humaines de type T, ce qui implique qu'elles ont une capacité à pénétrer la cellule.^{153,154}

En 1996, Benzaria *et al.* décrit la prodrogue BisSATE-PMEA **100** qui possède des propriétés antivirales équivalentes à celles du BisPOM-PMEA **89** dans des systèmes cellulaires ainsi qu'une meilleure résistance au milieu gastrique acide humain.^{154,155}

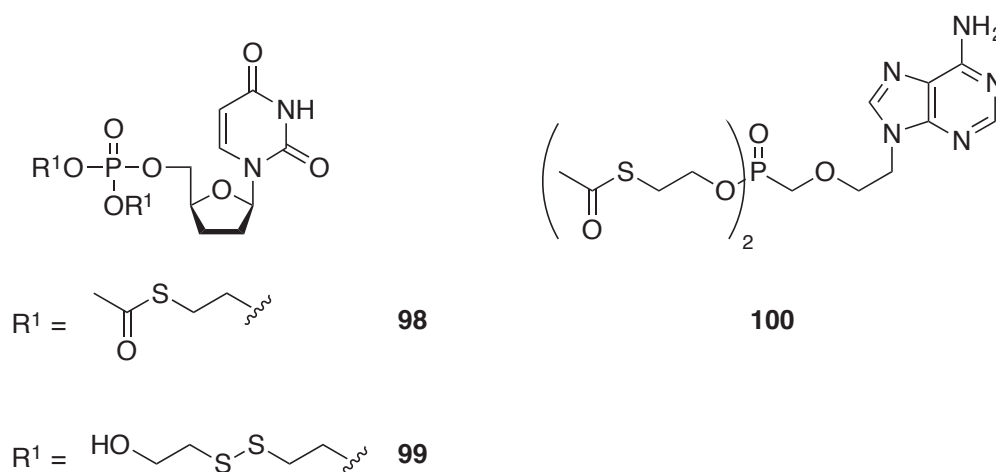


Figure 49 : Prodrogues du BisSATE-ddUMP **98**, BisDTE-ddUMP **99** et BisSATE-PMEA **100**.

Esters cycliques 1-aryl-1,3-propanyl ou HepDirect

Les prodrogues de type HepDirect ont été conçues pour être métabolisées dans le foie et ainsi traiter les maladies du foie. Les caractéristiques importantes de cette prodrogue sont (i) une grande absorption orale (ii) une activation rapide par une enzyme présente en grandes quantités dans le foie (iii) une bonne stabilité de cette prodrogue dans les solutions aqueuses, dans le sang et dans les tissus non hépatiques et (iv) des sous-produits issus de la métabolisation de la prodrogue non toxiques.

Mécanisme de libération (Figure 50)

Le mécanisme de coupure commence par l'oxydation du carbone benzylique adjacent à l'atome d'oxygène. Cette oxydation est réalisée par un cytochrome P₄₅₀. L'ouverture de l'hémicétal suivie d'une β -élimination permet de libérer le phosphate ou le phosphonate. Le sous-produit formé, une aryle vinyle cétone, est un composé très électrophile et donc potentiellement toxique pour les organismes vivants. Pour les cellules du foie, une étude a montré que les cellules ayant beaucoup de cytochrome P₄₅₀ contiennent également beaucoup de glutathion, molécule comportant un groupement thiol, donc nucléophile. Le glutathion réagit par addition 1-4 avec le sous-produit pour le capturer quantitativement.^{156,157} Pour avoir un meilleur rendement de l'oxydation, la substitution de l'aryle par un groupement électro-attracteur (tel un chlore) en position *meta* est conseillée. De plus une configuration *cis* des deux substituants du cycle est un facteur important.

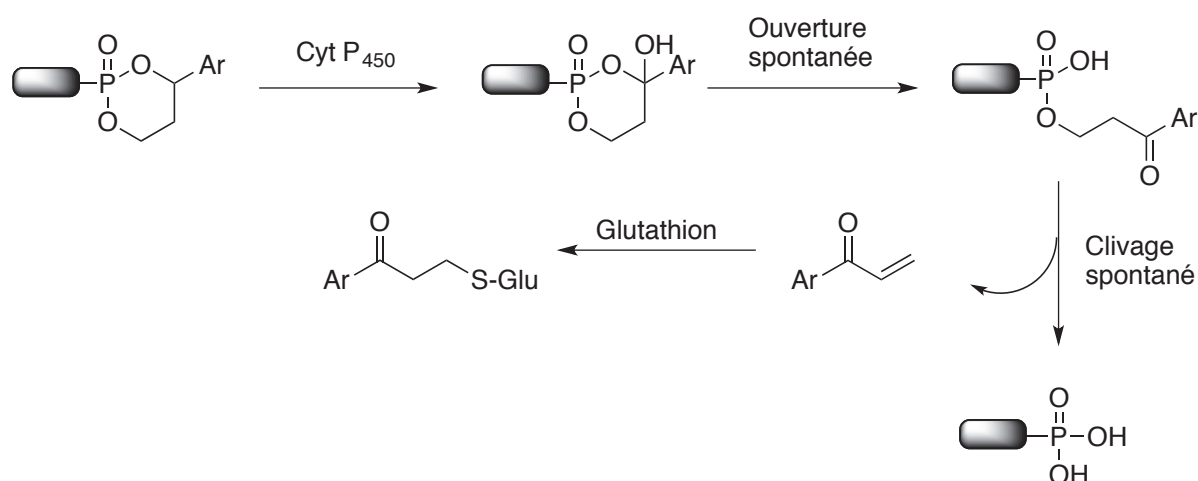


Figure 50 : Mécanisme de libération d'une prodrogue HepDirect.

Exemples

Ces prodrogues sont utilisées dans le développement d'agents antiviraux et anticancéreux, notamment pour les maladies du foie. Par exemple, le pradéfovir **101** est une prodrogue du PMEA (adéfovir) utilisée pour le développement de médicament contre le virus de l'hépatite B (Figure 51). La phase II des essais cliniques a démontré qu'une dose de 10-30 mg de pradéfovir induit une meilleure activité antivirale que le BisPOM-PMEA **89**.^{145,158} Un autre exemple : le MB07133 **102** est une prodrogue de type HepDirect utilisée dans le traitement du carcinome hépatocellulaire qui est un cancer primitif du foie.¹⁵⁹

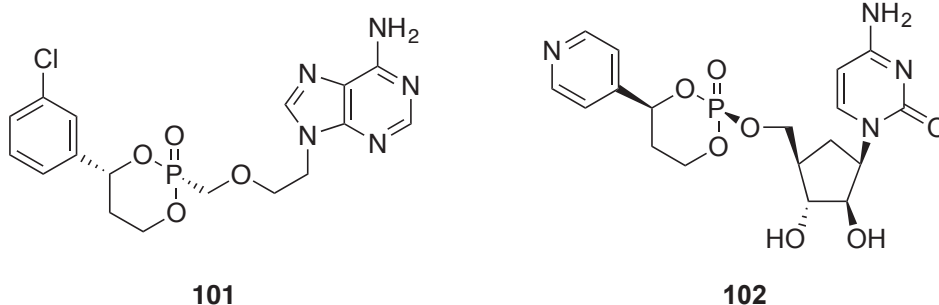


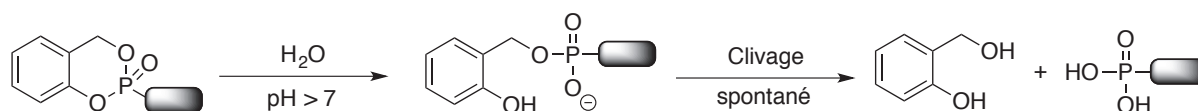
Figure 51 : Prodrogues de type HepDirect.

Le cycloSaligényle ou cycloSal

Cette prodrogue a été mise au point par C. Meier afin de libérer des nucléosides monophosphate dans le cadre du traitement du VIH.¹⁶⁰ Elle présente l'avantage de ne pas avoir besoin d'un système enzymatique pour la libération du phosphate ou phosphonate ainsi que d'être stable en milieu acide. Cependant en milieu faiblement basique et neutre, elle subit deux hydrolyses successives afin de libérer le nucléoside monophosphate et du saligénol. Le principe sur lequel repose cette prodrogue est la différence de stabilité existant entre un ester benzylique et un ester phénolique de phosphate

Mécanisme de libération (Figure 52)

Dans une première étape, la liaison ester de phénol est hydrolysée, car la charge négative résultante peut être délocalisée sur le cycle aromatique. Cette ouverture change la nature du substituant en *ortho* du groupement benzylique. En effet dans la molécule de départ, le substituant en *ortho* est un accepteur (phosphate) alors qu'après ouverture il devient donneur (hydroxyle). Cet umpolung induit le clivage spontané du diester pour libérer le monoester ainsi que du saligénol. Cette prodrogue sera davantage développée dans le Chapitre 1.

Figure 52 : Mécanisme de libération d'une prodrogue de type *cycloSaligényle*.

Les phosphoramidates et les phosphonamidates

On parle de phosphoramidate lorsqu'il s'agit d'une prodrogue de phosphate et de phosphonamidate pour une prodrogue de phosphonate. Elles sont beaucoup utilisées dans la synthèse de prodrogues de nucléoside monophosphate. Il s'agit également de prodrogues tripartites où l'espaceur est un acide aminé. Mais contrairement à ce qui précède, la prodrogue est constituée de deux groupements différents : (i) un groupement phényle et (ii) un ester d'acide aminé, généralement l'alanine.

Mécanisme de libération (Figure 53)

Il se produit en trois étapes successives. La première étape est initiée par une estérase qui hydrolyse l'ester en acide carboxylique. A pH physiologique, l'acide carboxylique est déprotoné en carboxylate, qui par une réaction d'addition-élimination sur le phosphore libère le phénol et produit un intermédiaire cyclique. Cet intermédiaire cyclique à cinq chaînons est ensuite hydrolysé, ce qui constitue la deuxième étape de la réaction. Enfin, dans un troisième temps, le dérivé monoamidate est hydrolysé par une phosphoramidase pour donner le phosphonate ou le phosphate.

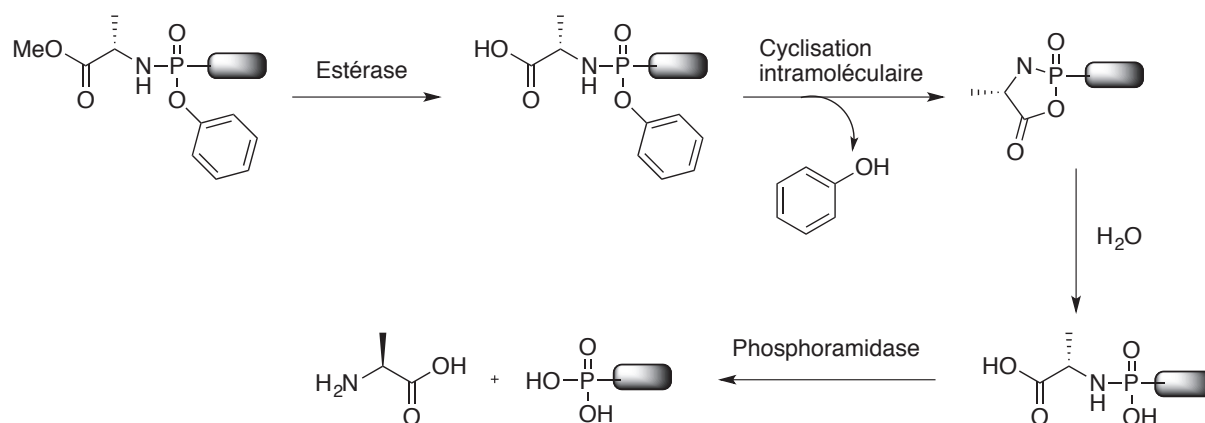


Figure 53 : Mécanisme général de libération d'une prodrogue de type phosphoramidate.

Il est à noter que la présence de deux substituants différents sur l'atome de phosphore ainsi que la présence de l'alanine entraîne la formation d'un centre stéréogène et l'obtention de deux diastéréoisomères. Lors de la cyclisation intramoléculaire, il y a libération de phénol dans le milieu, composé toxique à faible dose. Cette prodrogue sera d'avantage développée dans le Chapitre 2.

Ces prodrogues de phosphate et phosphonate ont surtout été développées pour la synthèse de molécules à visées antivirales et anticancéreuses. C'est donc un challenge de développer ce type de prodrogue pour l'application aux antimicrobiens et aux antibiotiques.

2. Les prodrogues d'inhibiteurs de la DXR

Des équipes travaillant sur le développement de nouveaux inhibiteurs de la DXR se sont proposées d'étudier l'effet des prodrogues pour augmenter la biodisponibilité de certains composés (cf. paragraphe « Inhibiteur de la DXR »). Quelques composés ont été décrits dans la littérature. Par exemple en 2001, Reichenberg *et al.* publient la synthèse des esters de phosphonate phénolique **103** à **105**, qui sont des prodrogues du FR-900098 **29** (Figure 54). Leurs activités ont été testées sur des souris infectées par *Plasmodium vinckei*. Le diphénylphosphonate **103** s'est montré être plus actif que le FR-900098 après administration par voie orale, alors que le composé **104** est le moins actif. L'ester bis-(*p*-méthoxyphénolique) **105** est le meilleur inhibiteur dans cette série. En effet, administré par injection, il a une activité semblable au FR-900098. Ces molécules doivent cependant être injectées en grandes quantités, et du phénol est produit pendant l'étape de libération de l'inhibiteur, composé connu pour avoir des propriétés cytotoxiques. C'est pourquoi cette stratégie d'ester phénolique de phosphonate n'a pas été poursuivie.¹⁶¹

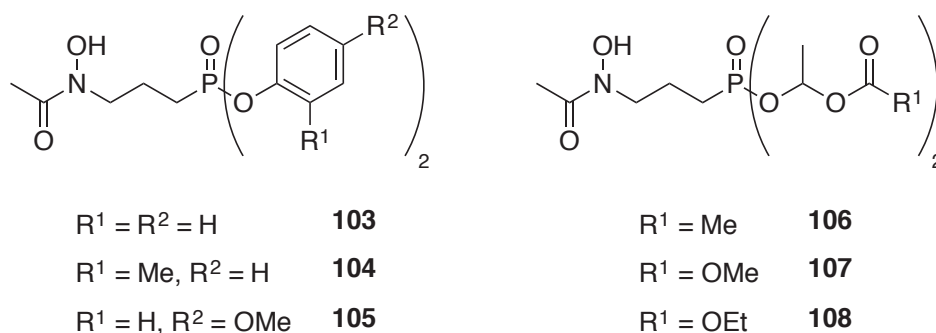


Figure 54 : Prodrogues du FR-900098 **29**.

Par la suite, le groupe de Schlitzer développe la synthèse de prodrogues de type acyloxyalkylester et alkoxycarbonyloxyethylester.^{162,163} Pour la première série, neuf composés ont été synthétisés, et l'évaluation de l'activité anti-malarique a été réalisée comme précédemment. Tous les composés ont montré une bonne activité anti-malarique dont certaines surpassent même celle du FR-900098 **29**. Par exemple, le composé **106** est meilleur

que le composé parent ; en effet, une dose de 20 mg/kg a de meilleurs effets que 40 mg/kg de FR-900098.¹⁶² Pour la seconde série de type alkoxycarbonyloxyethylester, les composés **107** et **108** sont également plus actifs que le FR-900098 **29**, car ils induisent un retard de deux jours sur le développement du parasite dans le sang (Figure 54).¹⁶³

Les composés substitués en α du phosphonate et où le groupement β -méthylène est remplacé par un atome d'oxygène ont montré des pouvoirs inhibiteurs intéressants (cf. paragraphe « Inhibiteurs de la DXR » p.45). C'est pourquoi, ces composés ont également été synthétisés sous forme de prodrogue de type pivaloyloxyméthylester afin d'augmenter leurs biodisponibilité. Deux études parues en 2006 ont montré que certaines prodrogues, testées sur des souches de *P. falciparum* 3D7 selon la méthode mise au point par Desjardin,¹⁶⁴ avaient des IC_{50} semblable à celle du FR-900098 sous forme de prodrogue **109** (Figure 55). En effet, les composés **110** et **111** ont des valeurs respectives d' IC_{50} de 0,3 μ M et 0,9 μ M alors que la prodrogue **109** a un IC_{50} de 0,4 μ M.^{165,166} La molécule **58** qui a une IC_{50} de 0,072 μ M sur la DXR d'*E. coli*, a également été synthétisée sous forme de prodrogue pivaloyloxyméthylester **112** (Figure 55). Cette molécule est capable d'inhiber la croissance des souches de *P. falciparum* 3D7 et possède une IC_{50} de 0,051 μ M. Elle est deux fois plus active que **109** qui dans les mêmes conditions a une IC_{50} de 0,099 μ M.¹⁰⁵

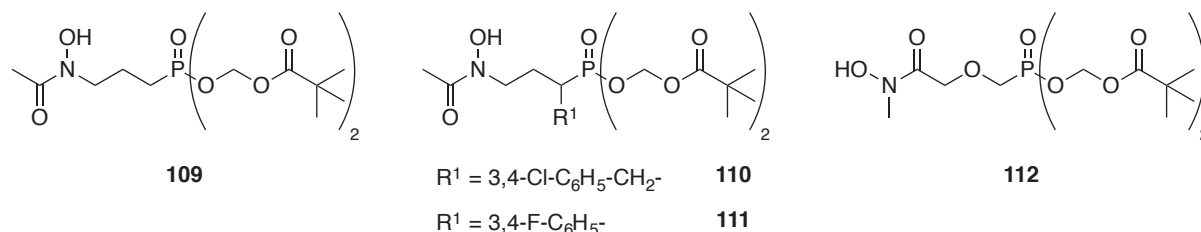


Figure 55 : Prodrogue de type pivaloyloxyméthylester du FR-900098 et de la molécule **58**.

Au laboratoire, S. Ponaire et C. Zinglé se sont aussi intéressées à la synthèse de prodrogues de type acyloxyalkylester des acides phosphonohydroxamiques **42** et **43**. Les composés en série *N*-H **113**, **115** et **117** n'ont pas empêché la croissance de *M. smegmatis*, alors que les composés *N*-méthylés **114**, **116** et **118** l'ont permis, avec une meilleure activité pour le composé **114** (Figure 56). Afin de compléter ces travaux, la fosmidomycine et le FR-900098 ont été synthétisés sous forme de prodrogue portant une chaîne latérale un groupement *n*-propyle **119** et **120** (Figure 56). Malheureusement, ces deux prodrogues se sont

montrées inefficaces pour stopper la croissance de cette mycobactérie.¹⁶⁷ Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : (i) la molécule **114** n'utiliserait pas le même transporteur que les molécules **119** et **120** (ii) les prodrogues **119** et **120** ou leurs composés parents **28** et **29** pourraient être expulsés de la cellule par des pompes à efflux ou encore être inactivés.

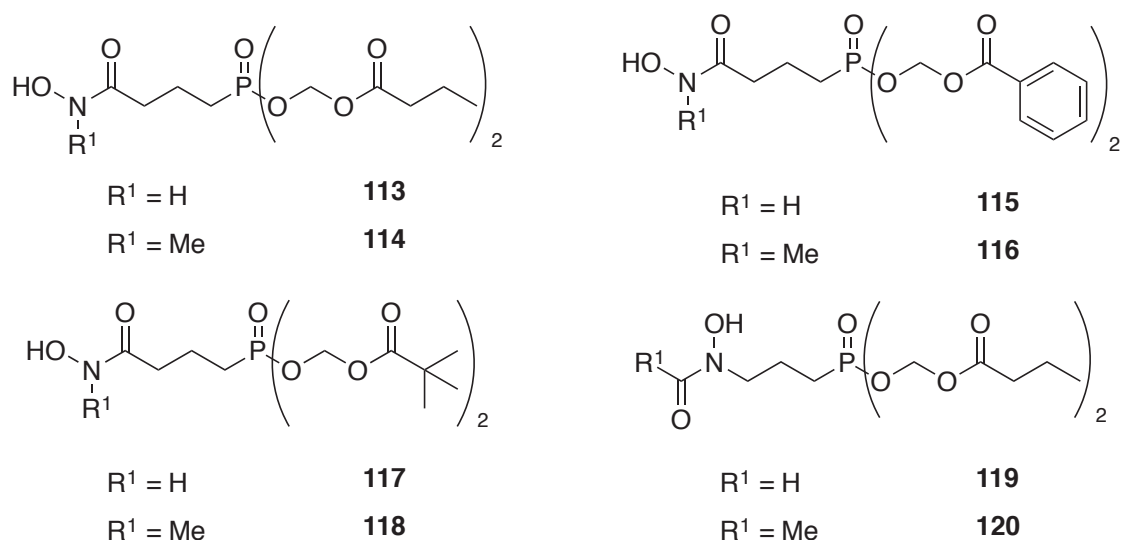


Figure 56 : Prodrogues d'inhibiteur de la DXR synthétisées au laboratoire.

En 2015, le groupe de Kurz publia la synthèse de doubles prodrogues, où le phosphonate est masqué par un groupement de type acyloxyalkylester et où l'acide hydroxamique est masqué par un carbonate **122** ou un carbamate **123** et **124** (Figure 57).

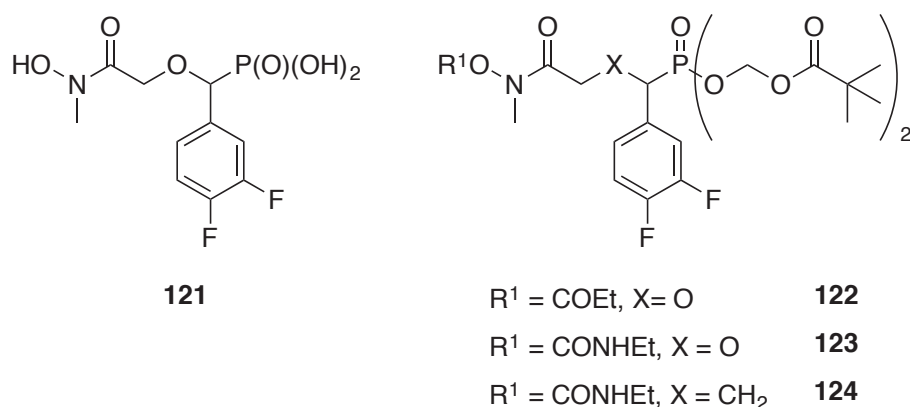


Figure 57 : Double prodrogue d'inhibiteurs de la DXR.

Ces composés ont été testés sur la DXR de *P. falciparum* ainsi que sur différentes souches de *P. falciparum* (Dd2 et 3D7). La présence de la double prodrogue ne semble pas

augmenter la capacité à inhiber la croissance des deux souches de *P. falciparum*, car les IC₅₀ sont équivalentes à celle de la molécule **121**. Le composé **124** s'est avéré être très efficace envers la croissance des souches de *P. falciparum* Dd2, avec une IC₅₀ de 4 nM alors que la molécule parente **76** a une IC₅₀ de 40 nM (cf Figure 39 p.49).^{132,168}

La stratégie des prodrogues semble être un bon moyen d'augmenter la biodisponibilité des inhibiteurs et ainsi favoriser la pénétration de la substance active au sein de la cellule. Les mycobactéries ont une paroi cellulaire extrêmement lipophile due notamment à la présence d'acides mycoliques. En masquant le groupement polaire du phosphonate ou du phosphate des inhibiteurs de la DXR, la lipophilie de l'inhibiteur serait augmentée ce qui faciliterait sa diffusion passive à travers la paroi mycobactérienne. Nous souhaitons donc explorer de nouvelles prodrogues d'inhibiteurs de la DXR.

V. Objectif de la thèse

De nos jours la tuberculose est une des deux maladies les plus meurtrières au monde, arrivant en seconde position après le Sida. Actuellement le traitement pour lutter contre cette maladie est lourd puisqu'il nécessite l'association de quatre antibiotiques durant une période minimum de 6 mois. Ces antituberculeux étant utilisés depuis des dizaines d'années, *Mycobacterium tuberculosis* a développé des mécanismes de résistances. Il devient donc urgent de développer de nouveaux antimicrobiens agissant sur d'autres cibles. L'une de celles-ci pourrait être la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. En effet, *M. tuberculosis* utilise la voie du MEP pour synthétiser ses isoprénoïdes alors que l'Homme utilise la voie du MVA. Toutes les enzymes de la voie du MEP représentent des cibles potentielles pour la conception de nouveaux antimicrobiens. Au laboratoire, nous nous intéressons au développement d'inhibiteur de la deuxième enzyme de la voie du MEP, la DXR. A ce jour, plusieurs inhibiteurs naturels de la DXR sont connus: la fosmidomycine **28** et son analogue méthylé le FR-900098 **29**. De nombreux inhibiteurs de cette enzyme ont été synthétisés par différents groupes, mais dans la majorité des cas, ce sont des analogues des acides rétro-phosphonohydroxamiques naturels **28** et **29**. Au laboratoire, nous avons synthétisé les acides phosphonohydroxamiques **42** et **43**, où la pince chélatante est inversée. Ces deux molécules **42** et **43** se sont montrées actives sur une souche d'*E. coli* résistante à la fosmidomycine. Toutefois comme à pH physiologique les groupements phosphonates sont chargés

négativement, ces antimicrobiens nécessitent un transporteur pour pouvoir pénétrer dans la cellule. Les mycobactéries ne possédant pas ce transporteur, les acides hydroxamiques naturels **28** et **29** et synthétiques **42** et **43** sont inactifs chez *M. tuberculosis*.

Par ailleurs, l'analogue phosphate de la fosmidomycine, la fosfoxacine **30** a montré un pouvoir inhibiteur très prometteur sur la DXR de *Synechocystis* sp. Cependant cette molécule **30** n'a pas été testée sur les DXR d'*E. coli* et de *Mycobacterium smegmatis*. Afin de compléter notre étude sur la DXR, nous avons entrepris de synthétiser les dérivés phosphates **30** et également les inhibiteurs **42** et **43** en version phosphate (Figure 58). Ces composés seront testés *in vitro* sur la DXR de ces deux souches afin d'évaluer leur pouvoir inhibiteur.

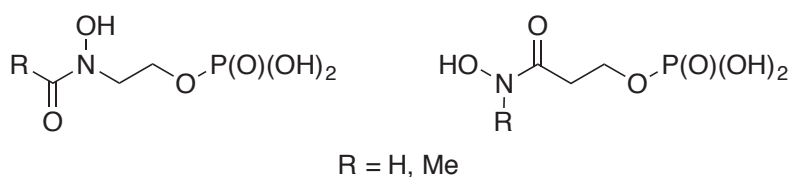


Figure 58 : Fosfoxacine et analogues phosphates.

Toutefois, comme à pH physiologique les groupements phosphonates et phosphates sont chargés négativement, ces antimicrobiens ne peuvent traverser la paroi bactérienne par diffusion passive. La présence d'un transporteur est nécessaire, dans le cas d'*E. coli*, le transporteur du glycérol 3-phosphate est sollicité pour que les inhibiteurs pénètrent dans la cellule. Les mycobactéries ne possédant pas ce transporteur, les acides rétro-hydroxamiques naturels **28** et **29** et hydroxamiques **42** et **43** sont inactifs sur *M. smegmatis*. De plus, de par la présence chez les mycobactéries d'une paroi complexe formant une barrière protectrice, la synthèse de nouveaux antituberculeux reste un défi. Pour pallier à ces problèmes de biodisponibilité, il est important d'augmenter la lipophilie de ces molécules. Pour ce faire, nous avons choisi de synthétiser des prodrogues de la fosmidomycine **28** et **29** et de ses analogues **42** et **43** dont le groupe phosphate/phosphonate est masqué.

Dans un premier temps, nous avons choisi de préparer des prodrogues dont le groupe phosphate/phosphonate est masqué par un groupement *cyclo*Saligényle. Ce type de prodrogue présente deux avantages : le premier est que la libération de la substance active ne nécessite pas la présence d'enzyme, la libération se faisant par une réaction d'hydrolyse, celle-ci étant favorisée à pH basique et le second étant la modulation de sa stabilité en milieu aqueux en substituant le cycle aromatique en position 3 et 5 avec un groupement électro-attracteur ou

électro-donneur. Bien que les prodrogues de type *cycloSaligényles* soient surtout connues pour être des groupements masquants des phosphates, nous souhaitons appliquer cette stratégie à des inhibiteurs phosphonate de la DXR. C'est dans ce contexte que nous avons choisi de synthétiser des prodrogues de type *cycloSaligényles* d'inhibiteurs phosphates et phosphonates de la DXR (Figure 59-A). Ces différents composés seront testés *in vivo* sur des cultures d'*E. coli* et de *M. smegmatis* afin d'évaluer leur capacité à empêcher la croissance bactérienne.

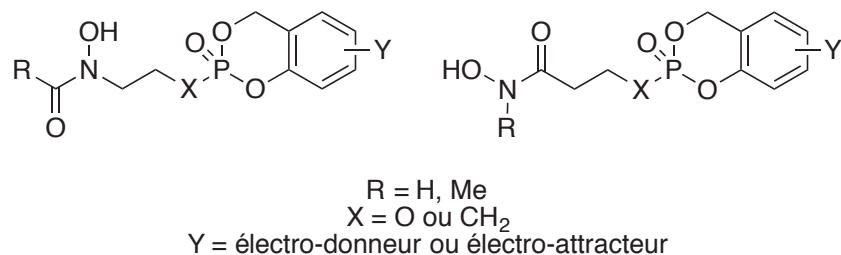


Figure 59-A : Prodrogues *cycloSaligényles* d'inhibiteurs phosphates et phosphonates de la DXR.

Dans un second temps, nous avons choisi de synthétiser des prodrogues de type arylphosphoramidate des inhibiteurs phosphates de la DXR (Figure 59-B). Nous avons choisi cette stratégie, car (i) ces prodrogues ont également été utilisées pour masquer des groupements phosphate (ii) la première enzyme impliquée dans le mécanisme de libération est une carboxyestérase, enzyme présente en grande quantité chez les mycobactéries et (iii) un sous-produit de dégradation est un acide-aminé naturel. Dans cette optique, la synthèse de ces composés puis leurs évaluations à inhiber la croissance des cultures de *M. smegmatis* et *E. coli* a été réalisée.

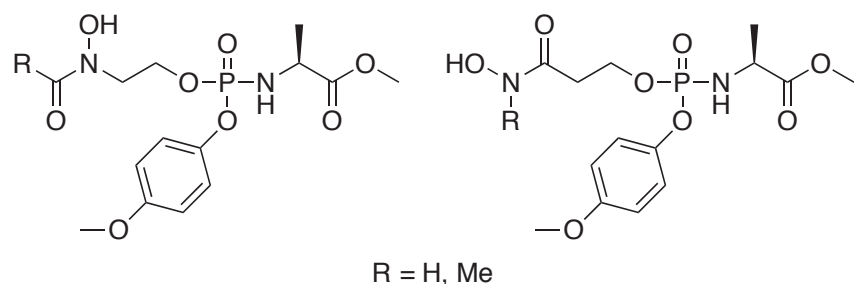


Figure 59-B : Prodrogue arylphosphoramidate d'inhibiteurs phosphates de la DXR.

- (1) Shinnick, T. M.; Good, R. C. Mycobacterial Taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, *13*, 884–901.
- (2) Daffé, M.; Draper, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to Their Pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **1998**, *39*, 131–203.
- (3) Kremer, L.; Besra, G. S.; Brennan, P. J.; Baulard, A. R. Le Lipoarabinomannane : Structure et Fonctions D'un Glycolipide Impliqué Dans La Pathogénie Tuberculeuse. *Médecine Sci.* **1999**, *15*, 842–850.
- (4) Azuma, I.; Thomas, D.; Adam, A.; Ghuysen, J.; Bonaly, R.; Petit, J.; Lederer, E. Occurrence of *N*-Glucosylmuramic Acid in Bacterial Cell Walls. *Biochim Biophys Acta* **1970**, *20*, 444–451.
- (5) Chatterjee, D. The Mycobacterial Cell Wall: Structure, Biosynthesis and Sites of Drug Action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 579–588.
- (6) Lederer, E. Cell Walls of Mycobacteria and Related Organisms, Chemistry and Immunostimulant Properties. *Mol Cell Biochem* **1975**, *7*, 87–104.
- (7) Denis, F.; Perrone, C. *Mycobacterium Tuberculosis et Mycobactéries Atypiques*; Elsevier: Paris, 2004.
- (8) McNeil, M.; Daffé, M.; Brennan, P. J. Evidence for the Nature of the Link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial Cell Walls. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18200–18206.
- (9) McNeil, M.; Daffé, M.; Brennan, P. J. Location of the Mycolyl Ester Substituents in the Cell Walls of Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13217–13223.
- (10) Barry, C.; Lee, R.; Mduli, K.; Sampson, A.; Schroeder, B.; Slayden, R.; Yuan, Y. Mycolic Acids: Structure, Bioynthesis and Physiological Functions. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37* (2/3), 143–179.
- (11) Brennan, P. Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2003**, *83*, 91–97.
- (12) Goren, M. B. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, Strain H37Rv. I Purification and Properties. *Biochim Biophys Acta* **1970**, *210*, 116–126.
- (13) Goren, B. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, Strain H37Rv. II. Structural Studies. *Biochim Biophys Acta* **1970**, *210*, 127–138.
- (14) Goren, M. B.; Brokl, O.; Das, B. C. Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: The Structure of the Principal Sulfatide (SL-I). *Biochemistry* **1976**, *15*, 2728–2735.
- (15) Goren, M. B.; D'Arcy Hart, P.; Young, M. R.; Armstrong, J. A. Prevention of Phagosome-Lysosome Fusion in Cultured Macrophages by Sulfatides of

- Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1976**, 73, 2510–2514.
- (16) Vercellone, A.; Nigou, J.; Puzo, G. Relationships between the Structure and the Roles of Lipoarabinomannans and Related Glycoconjugates in Tuberculosis Pathogenesis. *Front. Biosci.* **1998**, 3, e149–e163.
 - (17) Chatterjee, D.; Lowell, K.; Mcneil, M. R.; Brennans, P. J.; Brennans, J. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6234–6239.
 - (18) Brennan, P. J.; Nikaido, H. The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 29–63.
 - (19) Doherty, L. G.; Ratledge, C. Identification of a 29 kDa Protein in the Envelope of *Mycobacterium smegmatis* as a Putative Ferri-Exochelin Receptor. *Microbiology* **1996**, 142, 1521–1530.
 - (20) OMS | Tuberculose <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/> (accessed Feb 9, 2016).
 - (21) Russell, D. G.; Cardona, P.-J.; Kim, M.-J.; Allain, S.; Altare, F. Foamy Macrophages and the Progression of the Human Tuberculosis Granuloma. *Nat. Immunol.* **2009**, 10, 943–948.
 - (22) Russell, D. G. Who Puts the Tubercle in Tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 39–47.
 - (23) Peyron, P.; Vaubourgeix, J.; Poquet, Y.; Levillain, F.; Botanch, C.; Bardou, F.; Daffe, M.; Emile, J. F.; Marchou, B.; Cardona, P. J.; De Chastellier, C.; Altare, F. Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* Persistence. *PLoS Pathog.* **2008**, 4, 1–14.
 - (24) MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS - Agent de la Tuberculose [http://www.inrs.fr/eficatt/eficatt.nsf/\(allDocParRef\)/FCTUBERCULOSE?OpenDocument](http://www.inrs.fr/eficatt/eficatt.nsf/(allDocParRef)/FCTUBERCULOSE?OpenDocument) (accessed Feb 9, 2016).
 - (25) Lagrange, P. H. Vaccination Antituberculeuse Par Le BCG : Historique D'une Découverte et de Ses Controverses. *Medecine-science* **1998**, 14, 314–319.
 - (26) Billy, C.; Lévy-Bruhl, D. Vaccin BCG et Place de L'intradermoréaction En 2006. *La Rev. Médecine Interne* **2007**, 28, 151–160.
 - (27) Heym, B.; Chinet, T. Méthodes Diagnostiques de L'infection Tuberculeuse En 2007: Intradermoréaction à La Tuberculine Ou Interféron- γ . *La Rev. Médecine Interne* **2007**, 28, 147–150.
 - (28) Steichen, O.; Ranque, B. L'intradermoréaction à La Tuberculine et Les Dosages d'IFN-

- γ Dans Le Diagnostic étiologique Des Granulomatoses Systémiques. *La Rev. Médecine Interne* **2008**, 29, 682–683.
- (29) Zhang, Y.; Yew, W. Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **2009**, 13, 1320–1330.
 - (30) Koumba Yoya, G. Synthèse D'analogues Cinnamiques : Inhibiteurs Potentiels Contre *Mycobacterium tuberculosis*, 2010.
 - (31) Da Silva, P. E. A.; Palomino, J. C. Molecular Basis and Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Classical and New Drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, 66, 1417–1430.
 - (32) Telenti, A.; Imboden, P.; Marchesi, F.; Matter, L.; Schopfer, K.; Bodmer, T.; Lowrie, D.; Colston, M. J.; Cole, S. Detection of Rifampicin-Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **1993**, 341, 647–651.
 - (33) Zhang, Y.; Mitchison, D. The Curious Characteristics of Pyrazinamide: A Review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, 7, 6–21.
 - (34) Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. Mode of Action of Pyrazinamide: Disruption of *Mycobacterium tuberculosis* Membrane Transport and Energetics by Pyrazinoic Acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 52, 790–795.
 - (35) Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J. S.; Barry, C. E.; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **2011**, 333, 1630–1632.
 - (36) Takayama, K.; Kilburn, J. O. Inhibition of Synthesis of Arabinogalactan by Ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, 33, 1493–1499.
 - (37) Mikusová, K.; Slayden, R. A.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Biogenesis of the Mycobacterial Cell Wall and the Site of Action of Ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2484–2489.
 - (38) Jr, W. R. J.; Telenti, A.; Musser, J. M.; Sreevatsan, S.; Stockbauer, K. E.; Pan, X. I.; Kreiswirth, B. N.; Moghazeh, S. L.; Jacobs, W. R.; Telenti, A. Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : Critical Role of *embB* Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1677–1681.
 - (39) Telenti, A.; Philipp, W. J.; Sreevatsan, S.; Bernasconi, C.; Stockbauer, K. E.; Wiele, B.; Musser, J. M.; Jacobs, W. R. The *Emb* Operon, a Gene Cluster of *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Resistance to Ethambutol. *Nat. Med.* **1997**, 3, 567–570.
 - (40) Bloom, B. R.; Murray, C. J. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science*. **1992**, 257, 1055–1064.

- (41) Okamoto, S.; Tamaru, A.; Nakajima, C.; Nishimura, K.; Tanaka, Y.; Tokuyama, S.; Suzuki, Y.; Ochi, K. Loss of a Conserved 7-Methylguanosine Modification in 16S rRNA Confers Low-Level Streptomycin Resistance in Bacteria. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1096–1106.
- (42) Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Shinnick, T. M. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3192–3197.
- (43) Maus, C. E.; Plikaytis, B. B.; Thomas, M.; Shinnick, T. M. Mutation of *tlyA* Confers Capreomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 571–577.
- (44) Hooper, D. C. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **2000**, *31 Suppl 2*, S24–S28.
- (45) Vannelli, T. A.; Dykman, A.; Ortiz De Montellano, P. R. The Antituberculosis Drug Ethionamide Is Activated by a Flavoprotein Monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12824–12829.
- (46) Wallach, O. Zur Kenntniss Der Terpene Und ätherischen Oele. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *238*, 78–89.
- (47) Ruzicka, L. The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia* **1953**, *9*, 357–367.
- (48) Ruzicka, L. History of the Isoprene Rule. *Proc. Chem. Soc* **1959**, 341–360.
- (49) Schramek, N.; Wang, H.; Römisch-Margl, W.; Keil, B.; Radykewicz, T.; Winzenhörlein, B.; Beerhues, L.; Bacher, A.; Rohdich, F.; Gershenzon, J.; Liu, B.; Eisenreich, W. Artemisinin Biosynthesis in Growing Plants of *Artemisia Annua*. A ¹³CO Study. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 179–187.
- (50) Ogura, K.; Koyama, T. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1263–1276.
- (51) Clifford, K.; Cornforth, J. W.; Mallaby, R.; Phillips, G. T. Stereochemistry of Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **1971**, No. 24, 1599.
- (52) Ramos-Valdivia, A. C.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. Isopentenyl Diphosphate Isomerase: A Core Enzyme in Isoprenoid Biosynthesis. A Review of Its Biochemistry and Function. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 591–603.
- (53) Bloch, K. Sterol Molecule: Structure, Biosynthesis, and Function. *Steroids* **1992**, *57*, 378–383.

- (54) Porter, J. W.; Qureshi, N. Conversion of Acetyl-Coenzyme A to Isopentenyl Pyrophosphate. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds*; Porter, J. W., Spurgeon, S. L., Eds.; New-York, 1981; pp 47–94.
- (55) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria: A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517–524.
- (56) Porter, J. W.; Spurgeon, S. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. In *Biosynthesis of isoprenoid compounds*; 1983; pp 1–46.
- (57) Boucher, Y.; Doolittle, W. F. The Role of Lateral Gene Transfer in the Evolution of Isoprenoid Biosynthesis Pathways. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 703–716.
- (58) Rohmer, M. The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565–574.
- (59) Rohmer, M. Mevalonate-Independent Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis. Elucidation and Distribution. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 375–388.
- (60) Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Türbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science*. **1999**, *285*, 1573–1576.
- (61) Seto, H.; Watanabe, H.; Furihata, K. Simultaneous Operation of the Mevalonate and Non-Mevalonate Pathways in the Biosynthesis of Isopentenyl Diphosphate in *Streptomyces Aeriouvifer*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7979–7982.
- (62) Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. Biosynthesis of Isoprenoids in Higher Plant Chloroplasts Proceeds via a Mevalonate-Independent Pathway. *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 271–274.
- (63) Disch, A.; Hemmerlin, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Mevalonate-Derived Isopentenyl Diphosphate Is the Biosynthetic Precursor of Ubiquinone Prenyl Side Chain in Tobacco BY-2 Cells. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 615–621.
- (64) Schwarz, M. K. Terpen-Biosynthese in Ginkgo Biloba: Eine überraschende Geschichte, 1994.
- (65) Bloch, K.; Rittenberg, D. The Biological Formation of Cholesterol from Acetic Acid. *J. Biol. Chem* **1942**, *143*, 297.
- (66) Flesch, G.; Rohmer, M. Prokaryotic Hopanoids: The Biosynthesis of the Bacteriohopane Skeleton. Formation of Isoprenic Units from Two Distinct Acetate

- Pools and a Novel Type of Carbon/carbon Linkage between a Triterpene and D-Ribose. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *175*, 405–411.
- (67) Rohmer, M. A Mevalonate-Independent Route to Isopentenyl Diphosphate. In *Comprehensive Natural Product Chemistry. Isoprenoids including steroids and carotenoids*; Cane, D. E., Ed.; Oxford, 1999; Vol. 2, pp 45–68.
- (68) Rohmer, M.; Seemann, M.; Horbach, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564–2566.
- (69) Schwarz, M.; Arigoni, D. Ginkgolide Biosynthesis. In *Comprehensive Natural Product Chemistry. Isoprenoids including steroids and carotenoids*; Cane, D. E., Ed.; Oxford, 1999; pp 367–400.
- (70) Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, T.; Grolle, S.; de Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Identification of a Thiamin-Dependent Synthase in *Escherichia coli* Required for the Formation of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Precursor to Isoprenoids, Thiamin, and Pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 12857–12862.
- (71) Lois, L. M.; Campos, N.; Putra, S. R.; Danielsen, K.; Rohmer, M.; Boronat, A. Cloning and Characterization of a Gene from *Escherichia coli* Encoding a Transketolase-like Enzyme That Catalyzes the Synthesis of D-1-Deoxyxylulose 5-Phosphate, a Common Precursor for Isoprenoid, Thiamin, and Pyridoxol Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 2105–2110.
- (72) Croteau, R.; Gershenzon, J. Genetics Control of Monoterpene Biosynthesis in Mints (*Mentha* : Lamiaceae). In *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*; Ellis, B. E., Kuroki, G. W., Stafford, H. A., Eds.; New-York, 1994; pp 193–229.
- (73) Querol, J.; Rodríguez-Concepción, M.; Boronat, A.; Imperial, S. Essential Role of Residue H49 for Activity of *Escherichia coli* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase, the Enzyme Catalyzing the First Step of the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway for Isoprenoid Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 155–160.
- (74) David, S.; Estramareix, B.; Fischer, J.; Thérisod, M. The Biosynthesis of Thiamine. Synthese of [1,1,1,5-²H₄]-1-Deoxy-D-*Threo*-2-Pentulose and Incorporation of This Sugar in Biosynthesis of Thiazole by *Escherichia coli* Cells. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 2131.

- (75) Cane, D. E.; Du, S.; Robinson, J. K.; Hsiung, Y.; Spenser, I. D. Biosynthesis of Vitamin B6 : Enzymatic Conversion of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate to Pyridoxol Phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7722–7723.
- (76) Mao, J.; Eoh, H.; He, R.; Wang, Y.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Crick, D. C.; Kozikowski, A. P. Structure-Activity Relationships of Compounds Targeting *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5320–5323.
- (77) Smith, J. M.; Vierling, R. J.; Meyers, C. F. Selective Inhibition of *E. coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase by Acetylphosphonates. *Med Chem Comm* **2012**, *3*, 65–67.
- (78) Hayashi, D.; Kato, N.; Kuzuyama, T.; Sato, Y.; Ohkanda, J. Antimicrobial *N*-(2-Chlorobenzyl)-Substituted Hydroxamate Is an Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Synthase. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5535–5537.
- (79) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Catalyzing the Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate in an Alternative Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9879–9884.
- (80) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Takagi, M.; Seto, H. Characterization of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, an Enzyme Involved in Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis, and Identification of Its Catalytic Amino Acid Residues. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19928–19932.
- (81) Hoeffler, J. F.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway. Mechanistic Investigations of the 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4446–4457.
- (82) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 5-Phosphate Reductoisomerase , a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509–4512.
- (83) Fox, D. T.; Poulter, C. D. Mechanistic Studies with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8360–8368.
- (84) Fox, D. T.; Poulter, C. D. Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphoric Acid Analogues as Alternate Substrates for Methylerythritol Phosphate Synthase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1978–1985.

- (85) Munos, J. W.; Pu, X.; Mansoorabadi, S. O.; Kim, H. J.; Liu, H. A Secondary Kinetic Isotope Effect Study of the 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase-Catalyzed Reaction: Evidence for a Retroaldol-Aldol Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2048–2049.
- (86) Wong, U.; Cox, R. J. The Chemical Mechanism of D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 4926–4929.
- (87) Arigoni, D.; Giner, J.-L.; Sagner, S.; Wungsintaweeikul, J.; Zenk, M. H.; Kis, K.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Stereochemical Course of the Reduction Step in the Formation of 2-C-Methylerythritol from the Terpene Precursor 1-Deoxyxylulose in Higher Plants. *Chem. Commun.* **1999**, No. 12, 1127–1128.
- (88) Proteau, P. J.; Woo, Y. H.; Williamson, R. T.; Phaosiri, C. Stereochemistry of the Reduction Step Mediated by Recombinant 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Isomeroreductase. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 921–923.
- (89) Proteau, P. J. Biosynthesis of Phytol in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470: Utilization of the Non-Mevalonate Pathway. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 841–843.
- (90) Radykewicz, T.; Rohdich, F.; Wungsintaweeikul, J.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H.; Arigoni, D. Biosynthesis of Terpenoids: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Escherichia coli* Is a Class B Dehydrogenase. *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 157–160.
- (91) Henriksson, L. M.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T. The 1.9 Å Resolution Structure of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a Potential Drug Target. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 807–813.
- (92) Henriksson, L. M.; Unge, T.; Carlsson, J.; Aqvist, J.; Mowbray, S. L.; Jones, T. A. Structures of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Provide New Insights into Catalysis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905–19916.
- (93) Ricagno, S.; Grolle, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase from *Zymomonas mobilis* at 1.9 Å Resolution. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2004**, *1698*, 37–44.
- (94) Reuter, K.; Sanderbrand, S.; Jomaa, H.; Wiesner, J.; Steinbrecher, I.; Beck, E.; Hintz, M.; Klebe, G.; Stubbs, M. T. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate

- Reductoisomerase, a Crucial Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 5378–5384.
- (95) Yajima, S.; Nonaka, T.; Kuzuyama, T.; Seto, H.; Ohsawa, K. Crystal Structure of 1-Desoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Complexed with Cofactors : Implications of a Flexible Loop Movement upon Substrate Binding. *J. Biochem* **2002**, 131, 313–317.
- (96) Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase (IspC). Implications for the Catalytic Mechanism and Anti-Malaria Drug Development. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 18401–18407.
- (97) Mac Sweeney, A.; Lange, R.; Fernandes, R. P. M.; Schulz, H.; Dale, G. E.; Douangamath, A.; Proteau, P. J.; Oefner, C. The Crystal Structure of *E. coli* 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase in a Ternary Complex with the Antimalarial Compound Fosmidomycin and NADPH Reveals a Tight-Binding Closed Enzyme Conformation. *J. Mol. Biol.* **2005**, 345, 115–127.
- (98) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. I. FR-900098, Isolation and Characterization. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 13–17.
- (99) Okuhara, M.; Kuroda, Y.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. III. Isolation and Characterization of FR-31564, FR-32863 and FR-33289. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 24–28.
- (100) Kuroda, Y.; Okuhara, M.; Goto, T.; Okamoto, M.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. Studies on New Phosphonic Acid Antibiotics. IV. Structure Determination of FR-33289, FR-31564 and FR-32863. *J Antibiot* **1980**, 33, 29–35.
- (101) Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7913–7916.
- (102) Shigi, Y. Inhibition of Bacterial Isoprenoid Synthesis by Fosmidomycin, a Phosphonic Acid-Containing Antibiotic. *J Antimicrob Chemother* **1989**, 24, 131–145.
- (103) Borrmann, S.; Issifou, S.; Esser, G.; Adegnika, A. a; Ramharter, M.; Matsiegui, P.-B.; Oyakhirome, S.; Mawili-Mboumba, D. P.; Missinou, M. a; Kun, J. F. J.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. Fosmidomycin-Clindamycin for the Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis. Dis.* **2004**, 190, 1534–1540.
- (104) Katayama, N.; Tsubotani, S.; Nozaki, Y.; Harada, S.; Ono, H. Fosfadecin and

- Fosfocytocin, New Nucleotide Antibiotics Produced by Bacteria. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 238–246.
- (105) Haemers, T.; Wiesner, J.; Giessmann, D.; Verbruggen, T.; Hillaert, U.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Link, A.; Schlitzer, M.; Van Calenbergh, S. Synthesis of β - γ -Oxa Isosteres of Fosmidomycin and FR900098 as Antimalarial Candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3361–3371.
- (106) Kojo, H.; Shigi, Y.; Nishida, M. FR-31564, A New Phosphonic Acid Antibiotic: bacterial Resistance and Membrane Permeability. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 44–48.
- (107) Brown, A. C.; Parish, T. DXR Is Essential in *Mycobacterium tuberculosis* and Fosmidomycin Resistance Is due to a Lack of Uptake. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 78–86.
- (108) Fujisaki, S.; Ohnuma, S. ichi; Horiuchi, T.; Takahashi, I.; Tsukui, S.; Nishimura, Y.; Nishino, T.; Kitabatake, M.; Inokuchi, H. Cloning of a Gene from *Escherichia coli* That Confers Resistance to Fosmidomycin as a Consequence of Amplification. *Gene* **1996**, *175*, 83–87.
- (109) Messiaen, A. S.; Verbruggen, T.; Declerck, C.; Ortmann, R.; Schlitzer, M.; Nelis, H.; Van Calenbergh, S.; Coenye, T. Resistance of the Burkholderia Cepacia Complex to Fosmidomycin and Fosmidomycin Derivatives. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *38*, 261–264.
- (110) Phaosiri, C.; Proteau, P. J. Substrate Analogs for the Investigation of Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Inhibition: Synthesis and Evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5309–5312.
- (111) Wong, A.; Munos, J. W.; Devasthali, V.; Johnson, K. A.; Liu, H. Study of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase: Synthesis and Evaluation of Fluorinated Substrate Analogues. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3625–3628.
- (112) Walker, J. R.; Poulter, C. D. Synthesis and Evaluation of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Analogues as Chelation-Based Inhibitors of Methylerythritol Phosphate Synthase. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9955–9959.
- (113) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (114) Mercklé, L.; De Andrés-Gomez, A.; Dick, B.; Cox, R. J.; Godfrey, C. R. A. A Fragment-Based Approach to Understanding Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-

- Phosphate Reductoisomerase. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1866–1874.
- (115) Andaloussi, M.; Lindh, M.; Björkelid, C.; Suresh, S.; Wieckowska, A.; Iyer, H.; Karlén, A.; Larhed, M. Substitution of the Phosphonic Acid and Hydroxamic Acid Functionalities of the DXR Inhibitor FR900098: An Attempt to Improve the Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5403–5407.
- (116) Deng, L.; Sundriyal, S.; Rubio, V.; Shi, Z. Z.; Song, Y. Coordination Chemistry Based Approach to Lipophilic Inhibitors of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 6539–6542.
- (117) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Modifications around the Hydroxamic Acid Chelating Group of Fosmidomycin, an Inhibitor of the Metalloenzyme 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase (DXR). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6563–6567.
- (118) Deng, L.; Endo, K.; Kato, M.; Cheng, G.; Yajima, S.; Song, Y. Structures of 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase/Lipophilic Phosphonate Complexes. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 165–170.
- (119) Deng, L.; Diao, J.; Chen, P.; Pujari, V.; Yao, Y.; Cheng, G.; Crick, D. C.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. Inhibition of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase by Lipophilic Phosphonates: SAR, QSAR, and Crystallographic Studies. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4721–4734.
- (120) Giessmann, D.; Heidler, P.; Haemers, T.; Van Calenbergh, S.; Reichenberg, A.; Jomaa, H.; Weidemeyer, C.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Link, A. Towards New Antimalarial Drugs: Synthesis of Non-Hydrolyzable Phosphate Mimics as Feed for a Predictive QSAR Study on 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Reductoisomerase Inhibitors. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5, 643–656.
- (121) Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase. *J. Org. Chem* **2010**, 75, 3203–3207.
- (122) Jackson, E. R.; San Jose, G.; Brothers, R. C.; Edelstein, E. K.; Sheldon, Z.; Haymond, A.; Johny, C.; Boshoff, H. I.; Couch, R. D.; Dowd, C. S. The Effect of Chain Length and Unsaturation on Mtb DXR Inhibition and Antitubercular Killing Activity of FR900098 Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 24, 649–653.
- (123) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate

- Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375–2385.
- (124) Verbruggen, T.; Cos, P.; Maes, L.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Evaluation of α -Halogenated Analogues of 3-(acetylhydroxyamino)propylphosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5342–5346.
- (125) Haemers, T.; Wiesner, J.; Van Poecke, S.; Goeman, J.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of α -Substituted Fosmidomycin Analogues as Highly Potent *Plasmodium falciparum* Growth Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1888–1891.
- (126) Andaloussi, M.; Henriksson, L. M.; Wie, A.; Lindh, M.; Bj, C.; Larsson, A. M.; Suresh, S.; Iyer, H.; Srinivasa, B. R.; Bergfors, T.; Unge, T.; Mowbray, S. L.; Larhed, M.; Jones, T. A.; Karl, A. Design, Synthesis, and X-Ray Crystallographic Studies of α -Aryl Substituted Fosmidomycin Analogues as Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4964–4976.
- (127) Devreux, V.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Rozenski, J.; Van der Eycken, J.; Van Calenbergh, S. Divergent Strategy for the Synthesis of α -Aryl-Substituted Fosmidomycin Analogues. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3783–3789.
- (128) Xue, J.; Diao, J.; Cai, G.; Deng, L.; Zheng, B.; Yao, Y.; Song, Y. Antimalarial and Structural Studies of Pyridine-Containing Inhibitors of 1-Deoxyxylulose-5-Phosphate Reductoisomerase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 278–282.
- (129) Verbruggen, T.; Vandurm, P.; Pouyez, J.; Maes, L.; Wouters, J.; Van Calenbergh, S. α -Heteroatom Derivatized Analogues of 3-(acetylhydroxyamino)propyl Phosphonic Acid (FR900098) as Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 376–380.
- (130) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Gräwert, T.; Groll, M.; Rohdich, F.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Fischer, M.; Maes, L.; Kurz, T. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Highly Active Reverse Analogues of the Antimalarial Drug Candidate Fosmidomycin. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1673–1676.
- (131) Behrendt, C. T.; Kunfermann, A.; Illarionova, V.; Matheeussen, A.; Pein, M. K.; Gr, T.; Kaiser, J.; Bacher, A.; Eisenreich, W.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Maes, L.; Groll, M.; Kurz, T. Reverse Fosmidomycin Derivatives against the Antimalarial Drug Target IspC (DXR). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6796–6802.
- (132) Brücher, K.; Illarionov, B.; Held, J.; Tschan, S.; Kunfermann, A.; Pein, M. K.; Bacher, A.; Gräwert, T.; Maes, L.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. α -Substituted β -Oxa

- Isosteres of Fosmidomycin: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6566–6575.
- (133) Kunfermann, A.; Lienau, C.; Illarionov, B.; Held, J.; Gräwert, T.; Behrendt, C. T.; Werner, P.; Hähn, S.; Eisenreich, W.; Riederer, U.; Mordmüller, B.; Bacher, A.; Fischer, M.; Groll, M.; Kurz, T. IspC as Target for Antiinfective Drug Discovery: Synthesis, Enantiomeric Separation, and Structural Biology of Fosmidomycin Thia Isosters. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8151–8162.
- (134) Konzuch, S.; Umeda, T.; Held, J.; Hähn, S.; Brücher, K.; Lienau, C.; Behrendt, C. T.; Gräwert, T.; Bacher, A.; Illarionov, B.; Fischer, M.; Mordmüller, B.; Tanaka, N.; Kurz, T. Binding Modes of Reverse Fosmidomycin Analogs toward the Antimalarial Target IspC. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8827–8838.
- (135) Haemers, T.; Wiesner, J.; Busson, R.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis of α -Aryl-Substituted and Conformationally Restricted Fosmidomycin Analogues as Promising Antimalarials. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 3856–3863.
- (136) Devreux, V.; Wiesner, J.; Goeman, J. L.; Van der Eycken, J.; Jomaa, H.; Van Calenbergh, S. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl Analogues of Fosmidomycin as Potent Plasmodium Falciparum Growth Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2656–2660.
- (137) Perruchon, J.; Ortmann, R.; Altenkämper, M.; Silber, K.; Wiesner, J.; Jomaa, H.; Klebe, G.; Schlitzer, M. Studies Addressing the Importance of Charge in the Binding of Fosmidomycin-like Molecules to Deoxyxylulosephosphate Reductoisomerase. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1232–1241.
- (138) Gadakh, B.; Pouyez, J.; Wouters, J.; Venkatesham, A.; Cos, P.; Van Aerschot, A. *N*-Acylated Sulfonamide Congeners of Fosmidomycin Lack Any Inhibitory Activity against DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1577–1579.
- (139) Nguyen-Trung, A. T.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Synthesis of Tetrazole Analogues of Phosphonohydroxamic Acids: An Attempt to Improve the Inhibitory Activity against the DXR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1643–1647.
- (140) Albert, A. Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421–422.
- (141) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129–1143.
- (142) Huttunen, K. M.; Raunio, H.; Rautio, J. Prodrugs - from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 750–771.
- (143) Jornada, D.; dos Santos Fernandes, G.; Chiba, D.; de Melo, T.; dos Santos, J.; Chung,

- M. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules* **2016**, *21*, 42–73.
- (144) He, G.; Krise, J. P.; Oliyai, R. Prodrugs of Phosphonates, Phosphinates, and Phosphates. In *Prodrugs : challenges and Rewards*; Springer: New-York, 2007; pp 223–264.
- (145) Hecker, S. J.; Erion, M. D. Prodrugs of Phosphates and Phosphonates. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328–2345.
- (146) Pradere, U.; Garnier-amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154–9218.
- (147) 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(pivaloylmoethyl) 9-(2-Phos-Phonylmethoxyethyl)adenine. *Antiviral Res.* **1992**, *19*, 267–273.
- (148) Serafinowska, H. T.; Ashton, R. J.; Bailey, S.; Harnden, M. R.; Jackson, S. M.; Sutton, D. Synthesis and *in vivo* Evaluation of Prodrugs of 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethoxy]adenine. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1372–1379.
- (149) Brass, E. P. Pivalate-Generating Prodrugs and Carnitine Homeostasis in Man. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 589–598.
- (150) Srinivas, R. V.; Robbins, B. L.; Connelly, M. C.; Gong, Y.; Bischofberger, N.; Fridland, A. Metabolism and *in vitro* Antiretroviral Activities of Bis(Pivaloyloxymethyl) Prodrugs of Acyclic Nucleoside Phosphonates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 2247–2250.
- (151) Choi, J. R.; Cho, D. G.; Roh, K. Y.; Hwang, J. T.; Ahn, S.; Jang, H. S.; Cho, W. Y.; Kim, K. W.; Cho, Y. G.; Kim, J.; Kim, Y. Z. A Novel Class of Phosphonate Nucleosides. 9-[(1-Phosphonomethoxycyclopropyl)methyl]guanine as a Potent and Selective Anti-HBV Agent. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2864–2869.
- (152) Srinivas, R. V.; Fridland, A. Antiviral Activities of 9-(*R*)-2-Phosphonomethoxypropyl Adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against Various Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1484–1487.
- (153) Périgaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J. L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J. L. Rational Design for Cytosolic Delivery of Nucleoside Monophosphates : “SATE” and “DTE” as Enzyme-Labile Transient Phosphate Protecting Groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521–2526.

- (154) Puech, F.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Aubertin, A. M.; Kirn, A.; Imbach, J. L. Intracellular Delivery of Nucleoside Monophosphates through a Reductase-Mediated Activation Process. *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155–174.
- (155) Benzaria, S.; Pélicano, H.; Johnson, R.; Maury, G.; Imbach, J. L.; Aubertin, A. M.; Obert, G.; Gosselin, G. Synthesis, *in vitro* Antiviral Evaluation, and Stability Studies of bis(S-Acyl-2-Thioethyl) Ester Derivatives of 9-[2- (phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA) as Potential PMEA Prodrugs with Improved Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4958–4965.
- (156) Erion, M. D.; Poelje, P. D. Van; Mackenna, D. A; Colby, T. J.; Montag, A. C.; Fujitaki, J. M.; Linemeyer, D. L.; Bullough, D. A. Liver-Targeted Drug Delivery Using HepDirect Prodrugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 554–560.
- (157) Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M. A.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Potency of Michael Reaction Acceptors as Inducers of Enzymes That Protect against Carcinogenesis Depends on Their Reactivity with Sulfhydryl Groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3404–3409.
- (158) Reddy, K. R.; Matelich, M. C.; Ugarkar, B. G.; Gómez-Galeno, J. E.; DaRe, J.; Ollis, K.; Sun, Z.; Craigo, W.; Colby, T. J.; Fujitaki, J. M.; Boyer, S. H.; Van Poelje, P. D.; Erion, M. D. Pradefovir: A Prodrug That Targets Adefovir to the Liver for the Treatment of Hepatitis B. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 666–676.
- (159) Boyer, S. H.; Sun, Z.; Jiang, H.; Esterbrook, J.; Gómez-Galeno, J. E.; Craigo, W.; Reddy, K. R.; Ugarkar, B. G.; MacKenna, D. A; Erion, M. D. Synthesis and Characterization of a Novel Liver-Targeted Prodrug of Cytosine-1- β -D-Arabinofuranoside Monophosphate for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7711–7720.
- (160) Meier, C. 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-Benzodioxaphosphinin-2oxides- A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72.
- (161) Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. Diaryl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *in vivo* Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833–835.
- (162) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Acyloxyalkyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *in vivo* Anti-Malarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2163–2166.

- (163) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Alkoxy carbonyloxyethyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *in vivo* Antimalarial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, *338*, 305–314.
- (164) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative Assessment of Antimalarial Activity In Vitro by a Semiautomated Microdilution Technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.
- (165) Kurz, T.; Schlüter, K.; Kaula, U.; Bergmann, B.; Walter, R. D.; Geffken, D. Synthesis and Antimalarial Activity of Chain Substituted Pivaloyloxymethyl Ester Analogues of Fosmidomycin and FR900098. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5121–5135.
- (166) Schlüter, K.; Walter, R. D.; Bergmann, B.; Kurz, T. Arylmethyl Substituted Derivatives of Fosmidomycin: Synthesis and Antimalarial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1385–1397.
- (167) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285.
- (168) Brücher, K.; Gräwert, T.; Konzuch, S.; Held, J.; Lienau, C.; Behrendt, C.; Illarionov, B.; Maes, L.; Bacher, A.; Wittlin, S.; Mordmüller, B.; Fischer, M.; Kurz, T. Prodrugs of Reverse Fosmidomycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2025–2035.

Chapitre I : Synthèse de prodrogues de type *cyclo*Saligényle d'inhibiteurs phosphonates et phosphates de la DXR

Introduction - Les prodrogues *cycloSaligényles*

Depuis plusieurs années, la conception d'agents antiviraux et anticancéreux s'est surtout portée sur la synthèse d'analogues de nucléosides et de nucléotides.¹ Le mode d'action de ces mimes est généralement le même, à savoir l'inhibition de l'ADN polymérase.^{2,3} Afin d'engendrer ces inhibiteurs, les nucléosides doivent être convertis intracellulairement en 5'-mono, 5'-di et finalement en 5'-triphosphate de nucléosides. La première phosphorylation est réalisée par une kinase qui est souvent l'étape limitante dans les cellules humaines car celle-ci est spécifique. Généralement, l'administration du nucléoside monophosphorylé ou nucléotide permet de contourner le problème de la première phosphorylation. Cependant ces nucléosides monophosphates sont des molécules très polaires, ce qui limite leur pénétration par diffusion passive au travers de la membrane cellulaire. De plus, l'hydrolyse du phosphate par des phosphatases non spécifiques conduit à l'inactivation de la molécule. Une solution proposée serait de masquer de façon temporaire la forte polarité du phosphate avec un groupement lipophile, ce qui devrait permettre la pénétration de l'agent au sein de la cellule. La libération du nucléotide permet alors de s'affranchir de la première phosphorylation (étape limitante). On parle d'approche pronucléotide (Figure 60).⁴

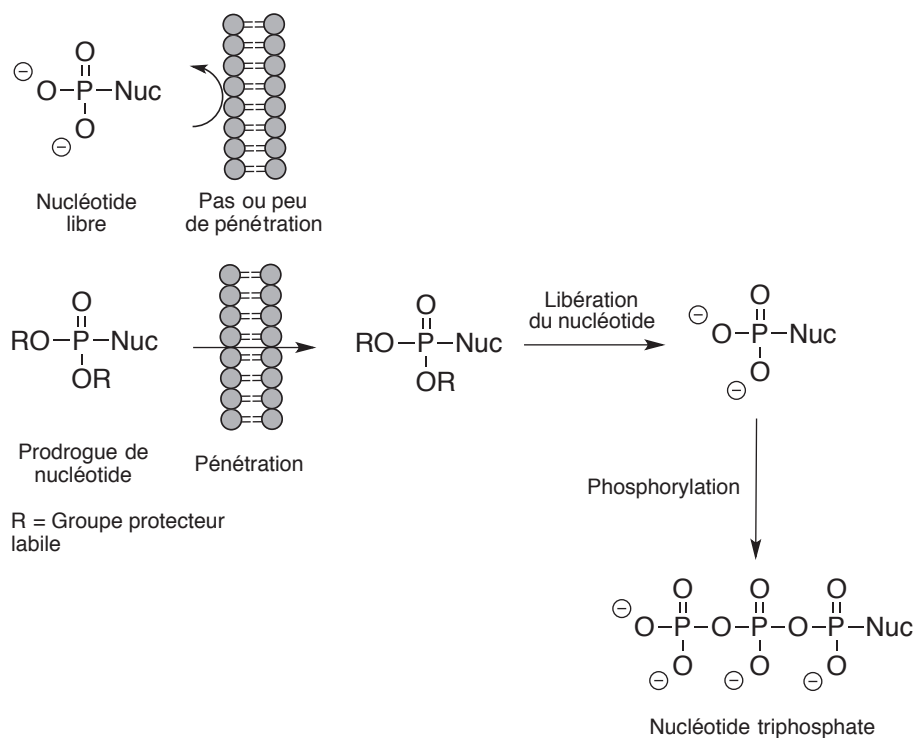


Figure 60 : Approche pronucléotide.
(Pradere, U. *et al. Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 9154-9218).

Dans le but d'améliorer la biodisponibilité de ce type de composés, de nombreux groupes se sont intéressés à la synthèse de prodrogues de nucléotides. Des prodrogues de type aryloxyalkylester, SATE, DTE ou encore HepDirect (cf. Introduction générale p 52) ont permis d'améliorer les propriétés antivirales de ces composés par rapport à celles des composés parents⁵. Cependant, avec ce type de prodrogue, une réaction enzymatique est nécessaire pour libérer le nucléotide.

Des recherches sur des prodrogues s'affranchissant d'une étape catalysée par une enzyme ont été réalisées. Les triesters de phosphate bis(phényle) de d4T **125a** ou bis(benzyle) de d4T **126a** ont été synthétisés mais le nucléotide d4TMP n'a pas pu être obtenu (Figure 61).⁶ En effet, la première étape d'hydrolyse se produit pour former le diester de phosphate **125b** et **126b**, mais la seconde hydrolyse n'a pas lieu. La substitution du cycle aromatique par des groupements accepteurs ou donneurs a une influence sur la vitesse de la réaction. De manière intéressante, cette influence est différente selon les triesters : dans le cas du bis(phényle) **125a** : la substitution par un groupement accepteur va accélérer la réaction d'hydrolyse alors que dans le cas du bis(benzyle) **126a** c'est un groupement donneur qui augmentera la vitesse de la réaction.^{7,8}

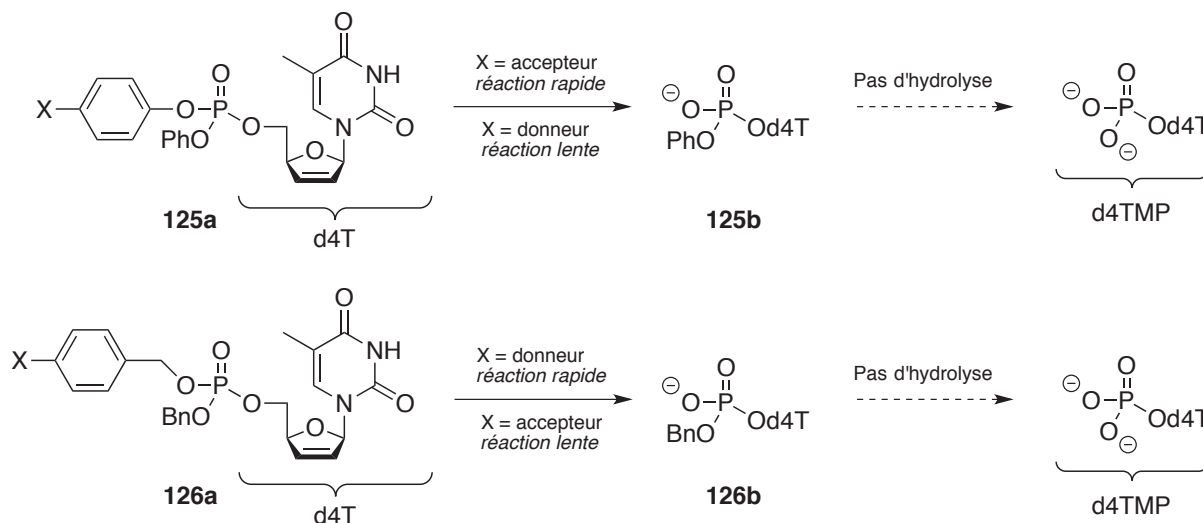


Figure 61 : Hydrolyse des triesters de phosphate bis(phényle) **125a** et bis(benzyle) **126a**.

La combinaison de ces deux types de liaisons au sein d'un cycle a permis de développer la prodrogue *cycloSaligényle*, où la libération du nucléotide est uniquement régie par le pH.^{9,10} Le principe de cette prodrogue est fondé sur l'utilisation de l'alcool salicylique ou saligénol **129** qui masque la fonction phosphate du nucléoside monophosphate. Cette

stratégie a été appliquée et s'est montrée efficace sur des antiviraux comme la 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT), la 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxythymidine (d4T) et l'acyclovir.

I. Mécanisme de libération de la prodrogue

Le mécanisme de libération de cette prodrogue triester de *cycloSal*-d4TMP **127** repose sur la différence de stabilité entre un ester phénolique de phosphate et un ester benzylique de phosphate (Figure 62). L'ester phénolique de phosphate est plus labile que l'ester benzylique de phosphate, ce qui favorise la formation du diester de phosphate **128**. C'est pourquoi, l'addition d'une molécule d'eau sur le triester de phosphate **127** suivie de la rupture de la liaison P-O de l'ester phénolique conduit au diester de phosphate **128**. (Figure 62 – Etape A). La rupture spontanée de la liaison C-O, via un carbocation, permet de libérer le saligénol **129** et le nucléotide (Figure 62 – Etape B). Cet intermédiaire carbocationique est favorisé par la présence du groupement hydroxyle, qui est de nature électro-donneur, car il stabilise le carbocation par effet-mésomère.

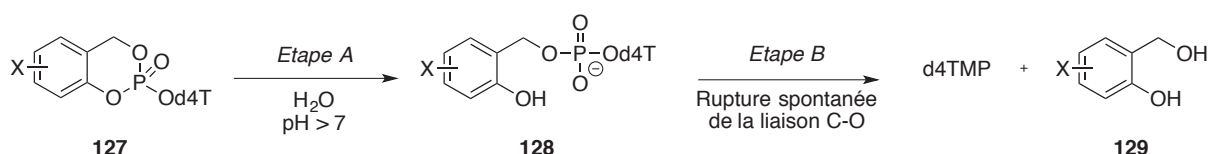


Figure 62 : Mécanisme de libération du triester de *cycloSal*-d4TMP **127**.

Ainsi la vitesse de libération de la prodrogue peut être modulée par la substitution de la position *ortho* et/ou *para* par rapport à l'ester phénolique de phosphate. En effet, la substitution du saligénol **129** avec un groupement électro-attracteur comme un nitro ou un halogène aura pour conséquence d'accélérer cette étape. A l'inverse cette étape sera ralentie si le cycle aromatique est substitué avec un groupement électro-donneur comme un méthyle.^{11,10} La formation du carbocation est thermodynamiquement favorisée lorsque le méthylène du saligénol **129** est substitué par un groupe alkyle.

Une des points importants dans la conception de prodrogue est que le sous-produit libéré ne soit pas ou peu toxique. Balzarini *et al.* ont évalué l'activité antivirale et la

cytotoxicité du saligénol **129**. Ce dernier ne présente aucune activité antivirale et s'est révélé ne pas être cytotoxique.¹²

I. Synthèses des dérivés d'acide salicyliques et des prodrogues *cycloSaligényles*

Bien que certains dérivés d'alcool salicylique soient commerciaux, dans certains cas il est nécessaire de les synthétiser. Un grand nombre de diols peuvent être obtenus par différents types de réactions (Figure 63) :

- la réduction d'aldéhyde, d'acide salicylique ou d'ester avec du NaBH_4 ou du LiAlH_4 .
- l'*ortho*-formylation d'un phénol selon les méthodes décrites par Casiraghi¹³ et Rieche,¹⁴ suivie de la réduction de l'aldéhyde.
- l'hydroxyméthylation d'un phénol avec du formaldéhyde selon la méthode de Nagata¹⁵ ou en milieu basique aqueux.¹⁶

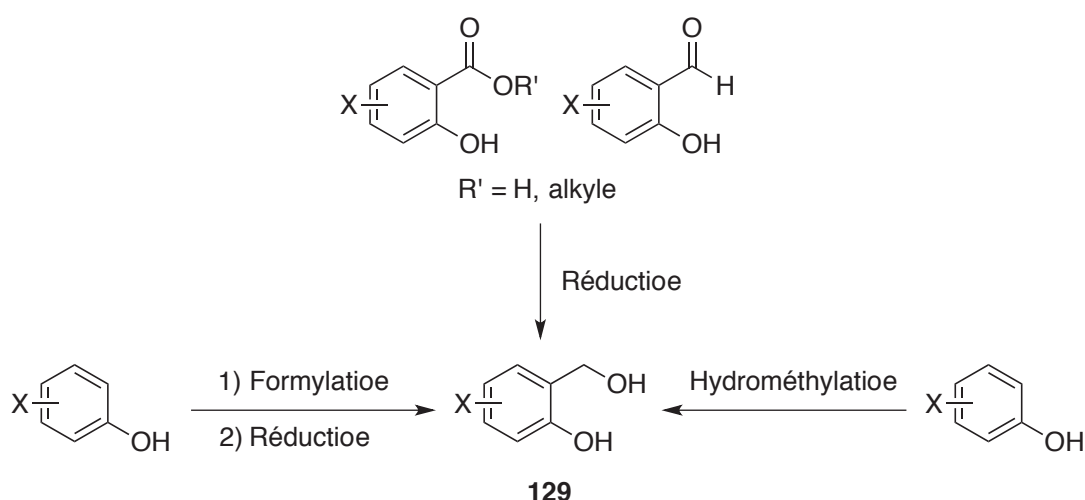


Figure 63 : Différentes méthodes synthétiques pour l'obtention de dérivés du saligénol **129**.

Une fois les dérivés de saligénol obtenus, l'introduction du groupement phosphate sur l'hydroxyle primaire en C-5' d'un nucléoside peut être réalisée en utilisant soit la chimie du phosphore (III) soit la chimie du phosphore (V) (Figure 64). Le saligénol **129** réagit avec le trichlorure de phosphore (PCl_3) pour donner le chlorophosphite cyclique **130**. Ce composé est directement mis en réaction avec un nucléoside (par exemple le d4T) en présence d'une base

non nucléophile pour conduire au triester de phosphite. Ce dernier est ensuite oxydé en phosphore (V) avec du hydroperoxyde de *t*-butyle (TBHP) pour conduire au *cyclo*Saligényle souhaité **131a**.¹⁰ Afin de diminuer la réactivité du composé **130**, la synthèse d'un intermédiaire moins réactif a été mise au point. Le composé **130** en présence de diisopropylamine permet d'obtenir le phosphoramidite **132**. Le couplage avec le nucléoside s'effectue dans de l'acétonitrile en présence de chlorure de pyridinium ou de triflate d'imidazolium. L'oxydation du phosphore (III) en phosphore (V) est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, permettant l'obtention du *cyclo*Saligényle **131a**.^{17,18} Pour éviter l'étape d'oxydation du phosphore, il est possible de faire réagir directement du trichlorure de phosphoryle (POCl₃) sur du saligénol **129** permettant d'accéder au composé **133**. Une réaction d'addition élimination du nucléoside sur le dichlorophosphoryle **133** réalisée en milieu basique permet l'obtention du composé **131a** (Figure 64).¹⁹

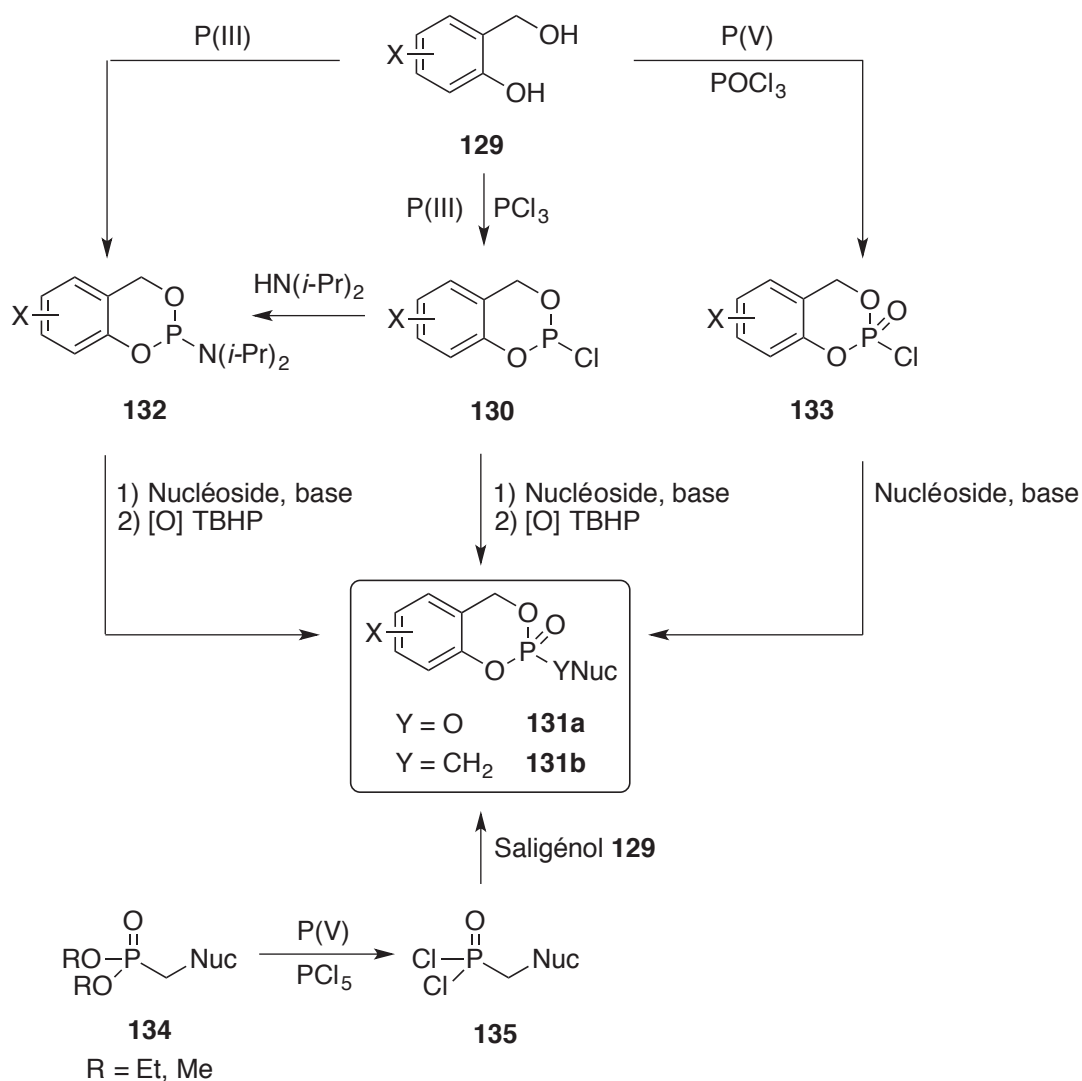


Figure 64 : Synthèse du *cyclo*Saligényle phosphate **131a** ou phosphonate **131b** via la chimie du P(III) et P(V).

Si l'introduction d'un motif phosphate peut se faire selon différentes manières, l'introduction du *cycloSaligényle* sur un groupement phosphonate se fait uniquement en utilisant la chimie du phosphore (V). Le diester de phosphonate **134** est traité avec du pentachlorure de phosphore (PCl₅) afin d'obtenir le dichlorophosphonyle **135** qui après réaction avec le saligénol **129** et purification permet d'isoler le composé souhaité **131b** (Figure 64).²⁰

Au fil des années, des modifications ont été apportées afin d'améliorer les propriétés du groupement *cycloSaligényle*. Trois générations de prodrogues ont été mises au point. Elles sont décrites dans la section suivante.

III. Les *cycloSaligényles* dans la littérature

1. Première génération de *cycloSaligényle* phosphate

Les premiers travaux portent sur la synthèse de prodrogues de type *cycloSal*-d4TMP, qui permettent d'augmenter la biodisponibilité de la molécule et surtout de libérer le d4TMP dans la cellule afin d'éviter l'étape limitante qu'est la première phosphorylation du d4T par une kinase.

En 1997, Meier *et al.* décrivent la synthèse de composés *cycloSal*-d4TMP où le cycle aromatique est substitué par des groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs. L'activité antivirale de ces composés a été évaluée par leur capacité à inhiber la réplication des virus VIH-1 et VIH-2 dans des lymphocytes T humains à division rapide (cellule CEM/O) et également dans des cellules CEM déficitaires en thymidine kinase, l'enzyme permettant la phosphorylation du d4T (CEM/TK⁻). Les composés substitués par un groupement électro-attracteur ont des concentrations efficaces médianes (EC₅₀) semblables à celle du d4T. Ces résultats peuvent facilement être expliqués, car ces molécules ont des temps de demi-vie très courts, ce qui implique que la libération du d4TMP se produit en dehors de la cellule. Le *cycloSal*-d4TMP non substitué **136a** et le 5-Me-*cycloSal*-d4TMP **136b** ont permis d'améliorer l'activité antivirale sur les cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et par le VIH-2. Cette amélioration est plus significative sur les cellules CEM/TK⁻ infectées par le VIH-2. En effet, les deux molécules **136a** et **136b** ont des EC₅₀ respectives de 0,35 µg/mL et 0,45 µg/mL

contre 45 $\mu\text{g/mL}$ pour le d4T, confirmant ainsi que le d4TMP est bien libéré dans la cellule (Figure 65).¹⁰

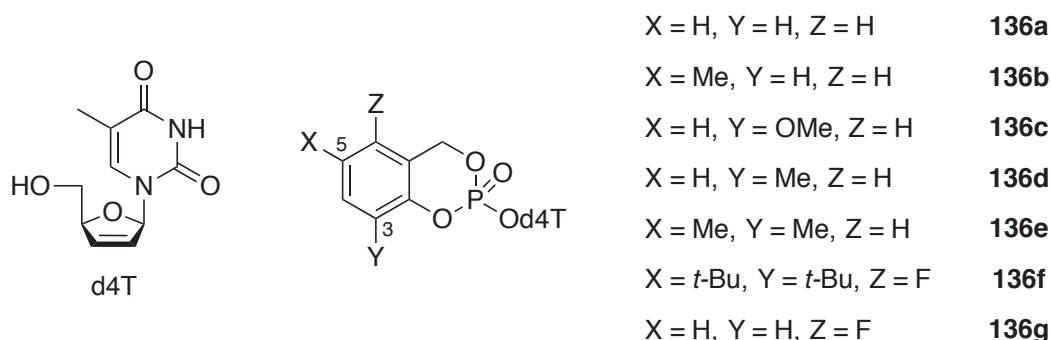


Figure 65 : Prodrogues triesters de phosphate *cycloSal*-d4TMP **136a** à **136g**.

En 1998, Meier *et al.* continuent leurs investigations sur les *cycloSal*-d4TMP portant différents groupements électro-donneurs en position C-3 du cycle aromatique. Les composés **136c**, **136d** et **136e** ont montré une meilleure activité antivirale que le composé parent (Figure 65). Par exemple, comparé au d4T, le composé **136d** permet d'améliorer de 160 fois l'activité antivirale sur des cellules CEM/TK⁻ infectées par le VIH-2.¹² Ils ont également étudié l'influence de la configuration absolue de l'atome de phosphore (*R_P* et *S_P*) sur l'activité inhibitrice de ces trois molécules **136c-e**. Ils ont constaté que le diastéréoisomère *R_P* a une meilleure activité antivirale que le diastéréoisomère *S_P*. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce résultat : soit (i) il y a une différence de comportement des deux diastéréoisomères pendant l'hydrolyse, soit (ii) la pénétration au sein de la cellule serait dépendante de la configuration absolue du phosphotriester cyclique. Les composés **136f** et **136g** (Figure 65) ont montré une activité antivirale très satisfaisante sur des cellules CEM/TK⁻ infectées avec le VIH-2, avec des EC₅₀ respectives de 0,60 μM et 0,85 μM contre 33,3 μM pour le d4T.²¹

En 2002, Ducho *et al.* ont publié la synthèse d'un *cycloSal*-d4TMP substitué avec un aryle **137** et des naphthyl-*cycloSal*-d4TMP **138** et **139** (Figure 66). Les EC₅₀ de ces trois composés varient de 0,08 μM à 0,13 μM contre 0,36 μM pour le d4T sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1. De plus sur les CEM/TK⁻, ces trois composés ont une activité antivirale 35 fois supérieure à celle du composé parent, le d4T.²²

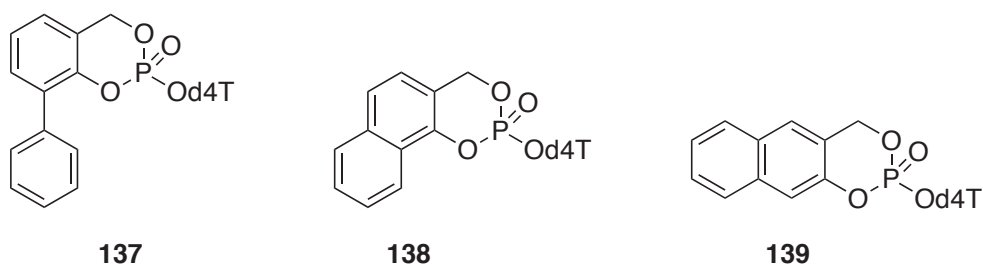


Figure 66 : Prodrogues 3-Ph-*cycloSal*-d4TMP **137** et benzo-annulène *cycloSal*-d4TMP **138** – **139**.

Parallèlement à ces travaux sur le d4T et le d4TMP, des études ont été réalisées sur la 2',3'-didésoxyadénosine (ddA) et la 2',3'-didésoxy-2',3'-didéshydroadénosine (d4A). Dans le but d'augmenter l'activité antivirale de ces composés, ils ont été synthétisés sous forme de *cycloSal*-ddAMP **140a-c** et *cycloSal*-d4AMP **141a-c** (Figure 67). Les activités antivirales ont été évaluées sur les mêmes cellules que précédemment et dans les mêmes conditions. Les molécules **140a-c** se sont 90 à 170 fois plus actives que le ddA sur les cellules CEM/O infectées par le VIH-1 alors que les molécules **141a-c** sont 140 à 1200 fois plus actives que le d4A sur ces mêmes cellules infectées avec le VIH-2.²³ D'autres essais ont été réalisés, comme par exemple l'introduction d'un atome de fluor en position 2' du ribose. Cette modification n'a pas permis d'améliorer l'activité antivirale par rapport au ddA.²⁴

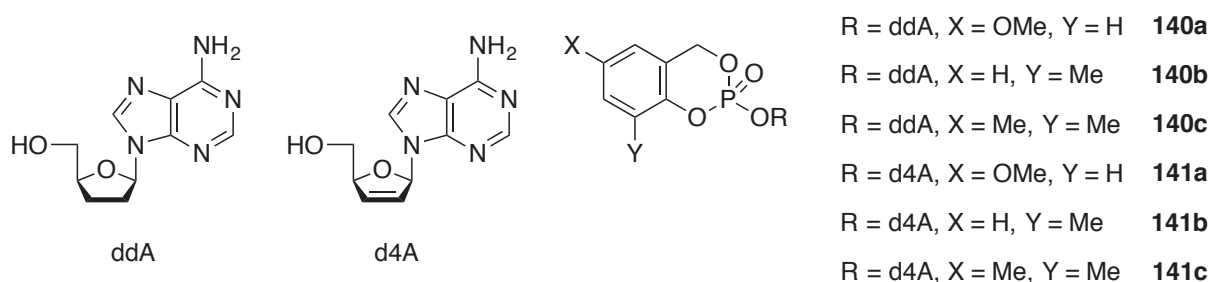


Figure 67 : Prodrogues *cycloSal*-ddAMP **140** et *cycloSal*-d4AMP **141**.

Des prodrogues de type *cycloSaligényle* du 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT) ont également été synthétisées et leurs activités antivirales ont été évaluées sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 ou VIH-2. Les pronucléotides de type *cycloSal*-AZTMP portant différents substituants, ont montré des efficacités comparable à celle du composé parent, l'AZT. Par exemple, les composés **142a** et **142b** possèdent des EC₅₀ respectives de 5

et 6 nM sur des CEM/O infectées par le VIH-1 alors que l’AZT a une EC_{50} de 6 nM dans les mêmes conditions (Figure 68).²⁵

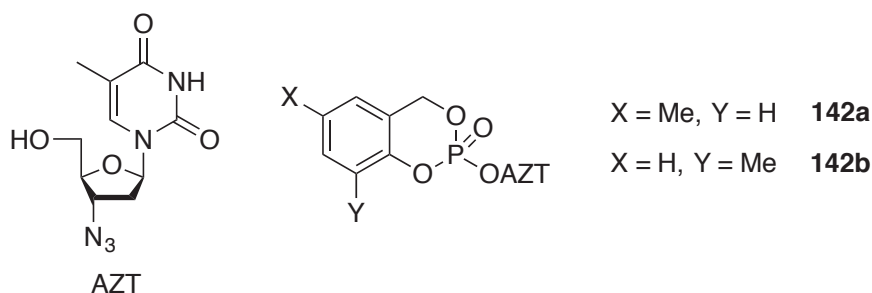


Figure 68 : Prodrogues *cycloSal*-AZTMP **142**.

2. Synthèse diastéréosélective de prodrogue de type *cycloSaligényle*

Toutes les molécules décrites dans les paragraphes précédents sont sous forme d'un mélange de diastéréoisomères. La séparation de ce mélange est cependant complexe et s'avère être très compliquée quand elle est possible. En 2011, Meier *et al.* ont rapporté la première voie synthétique diastéréosélective de *cycloSal*-pronucléotide. Leur stratégie repose sur l'utilisation d'une copule chirale qui est introduite par réaction avec le POCl_3 suivi d'une estérification avec de l'alcool salicylique **129** (Figure 69). A ce stade les deux *cycloSal*-phosphoramidates diastéréoisomères peuvent être séparés par chromatographie ou par recristallisation. La substitution nucléophile de la copule chirale par le nucléoside permet d'obtenir le *cycloSal*-pronucléotide de manière diastéréosélective. Leur première étude s'est portée sur la synthèse des *cycloSal*-phosphoramidates **144** synthétisés à partir du (*S*)-4-isopropylthiazolidine-2 thione **143**. Le *cycloSal*-phosphoramidate est obtenu sous forme d'un mélange de diastéréoisomères (*R_P*)-**144** et (*S_P*)-**144** qui peuvent être séparés par des méthodes usuelles de purification. Le diastéréoisomère (*R_P*)-**144** réagit avec le 3'-OAc-dT en présence de chlorure de *t*-butylmagnésium, via une réaction de type $\text{SN}_2\text{-P}$, pour conduire à la prodrogue de monophosphate (*S_P*)-**145a** diastéroisomériquement pure.

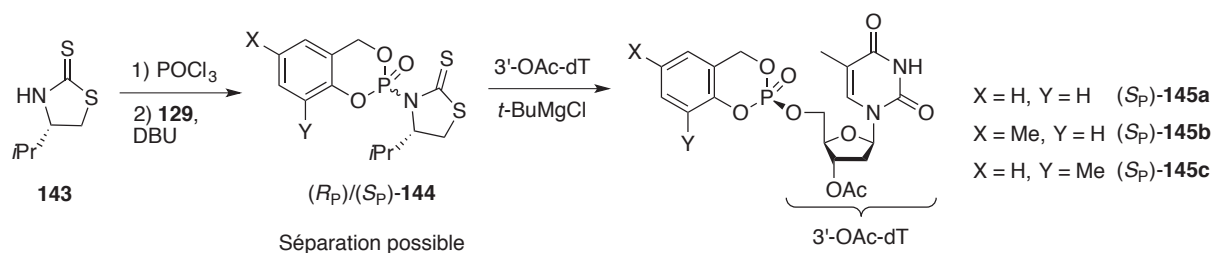


Figure 69 : Schéma réactionnel pour obtenir les prodrogues (*S_P*)-*cycloSal*-3'-OAc-dT **145a-c**.

Cette même séquence a été appliquée pour la synthèse du 5-Me-*cycloSal*-(3'-OAc)-dTMP **145b** qui a été obtenu avec un rendement de 45 % et un excès diastéroisomérique supérieur à 95 %. Malheureusement, cette méthode n'a pas permis l'obtention du composé 3-Me-*cycloSal*-(3'-OAc)-dTMP **145c**.²⁶ Afin d'obtenir les prodrogues 3-Me-*cycloSal*- ou 5-Me-*cycloSal*- des nucléosides d4T ou AZT de manière diastéréosélective Morales *et al.* ont synthétisé différentes copules chirales **146a-e** (Figure 70-A).¹⁹ Seules les copules **146a** et **146e** permettent d'accéder aux *cycloSal*-phosphoramidates **147a** et **147e** diastéréomériquement pur après purification. Les composés (*S_P*)-**147a** et (*R_P*)-**147e** étant plus stables que leur congénères (*R_P*)-**147a** et (*S_P*)-**147e**, ils ont été engagés dans l'étape de couplage avec le d4T ou l'AZT afin d'obtenir des composés 3-Me-*cycloSal*-d4TMP **148** et des composés 3-Me-*cycloSal*-AZTMP **149** diastéréoisomériquement purs (Figure 70-B).

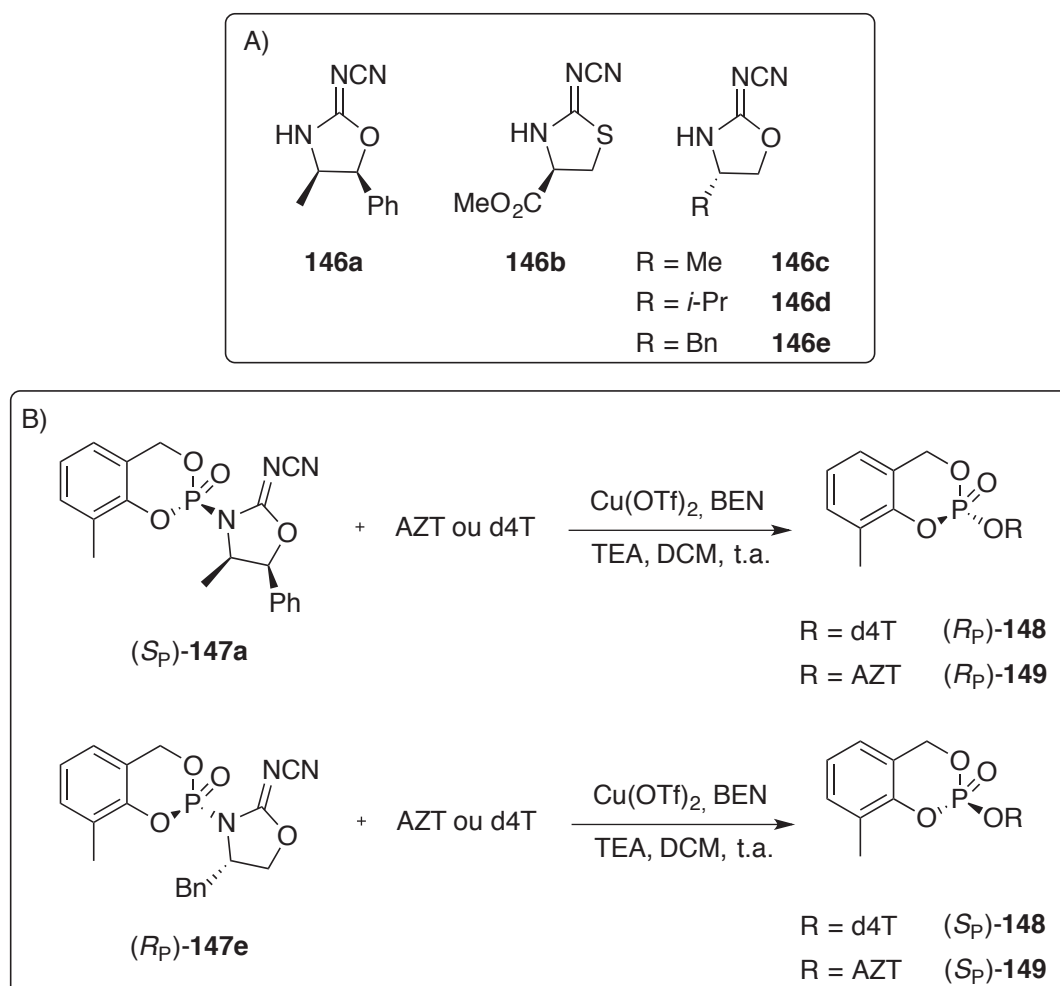


Figure 70 : A) Copules chirales **146** et B) Synthèses diastéréosélectives des composés **148** et **149**.

Pour les prodrogues de l'AZT **149**, quel que soit le diastéréoisomère il n'est pas observé d'augmentation de l'activité antivirale comparée à celle de l'AZT, sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et VIH-2. Par contre, elles possèdent une meilleure activité que l'AZT sur les cellules CEM déficiente en thymidine kinase (CEM/TK⁻). Les prodrogues du d4T, les diastéréoisomères (*R*_P)-**148** et (*S*_P)-**148** présentent une meilleure activité que le d4T sur les trois différentes souches. La meilleure EC₅₀ est observée avec le diastéréoisomère (*R*_P)-**148** (EC₅₀ = 0,08 µM vs EC₅₀ = 0,42 µM pour (*S*_P)-**148** sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1.¹⁹

3. Première génération de cycloSaligényle phosphonate

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, afin d'augmenter l'activité antivirale de la 9-(2-phosphonoéthoxyéthyl)adénine (PMEA ou adéfovir) plusieurs synthèses de ce composé sous forme de prodrogue ont été réalisées. En 2005, Balzarini *et al.* ont publié la synthèse des cycloSal-PMEA **150a-d** (Figure 71), puis leurs activités antivirales ont été évaluées sur des cellules CEM/O infectées par le virus VIH-1 et VIH-2.²⁰ Les composés **150a** et **150b** présentent une très faible stabilité chimique, car en milieu légèrement basique (pH = 7,3) leurs temps de demi-vie respectifs sont de 0,09 h et 0,56 h, ce qui en fait des composés trop labiles pour être utilisés comme prodrogue. La substitution du cycle aromatique du cycloSaligényle avec un ou deux *t*-butyles permet cependant d'augmenter leur stabilité avec des temps de demi-vie respectifs de 4 h et 3 h pour **150c** et **150d**. Dans les mêmes conditions, le cycloSal-d4TMP **136a** a un temps de demi-vie de 4,4 h,¹⁰ faisant des dérivés de triesters de cycloSaligényle des composés plus stables que les composés diesters de cycloSaligényle. Cette faible stabilité des molécules **150** serait due au fait que l'électrophilie de l'atome de phosphore est plus élevée dans un phosphonate que dans un phosphate.²⁷ Pour pallier à l'instabilité des molécules **150**, une nouvelle classe de prodrogue a été synthétisée. Il s'agit du cycloAmb-PMEA **151** qui est dérivé du 2-amino benzylalcool (Figure 71). Comme précédemment, différentes substitutions du cycle aromatique ont été réalisées pour conduire aux molécules **151a-c**. La molécule 3-Me-cycloAmb-PMEA **151c** s'avère être plus stable en milieu faiblement basique que son analogue 3-Me-cycloSal-PMEA **150b**.²⁰ L'activité antivirale des composés **150** et **151** a été comparée à celle du PMEA. Ce dernier est actif envers les deux virus VIH-1 et VIH-2 avec des EC₅₀ de 10 µM alors que les molécules **150c-d** ont des EC₅₀ de 3 et 5 µM. Pour comparer l'efficacité des prodrogues **150c-d**, le composé

Bis(POM)-PMEA **89** a également été testé (cf Introduction générale Figure 44 p.55). Ses EC_{50} sont de 0,18 μ M (VIH-1) et 0,075 μ M (VIH-2), ce qui en fait une molécule plus active que ses analogues *cycloSal*-PMEA **150**. Les molécules **151** ont des EC_{50} comprises entre 20-56 μ M sur les deux souches, ce qui en fait des molécules moins actives que le PMEA. Cette faible activité antivirale est due à la libération lente du PMEA dans le milieu, il semblerait que le motif *cycloAmb* soit trop stable pour être utilisé dans une stratégie prodrogue.²⁰

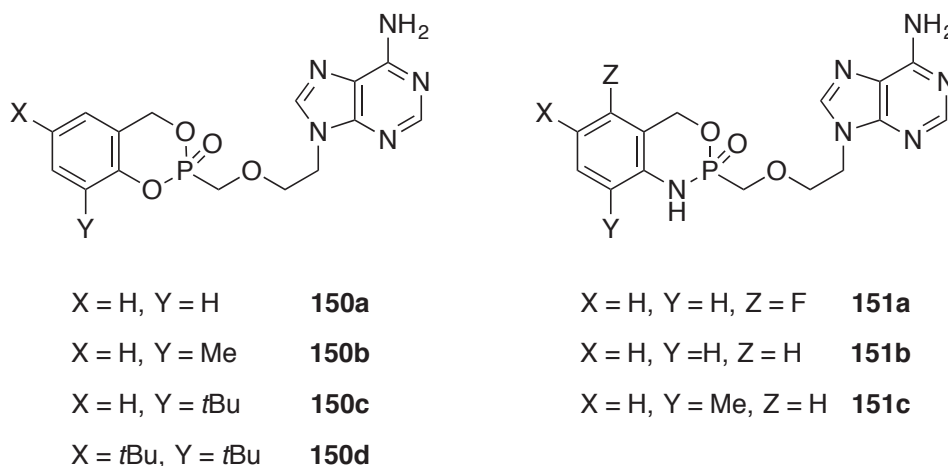


Figure 71 : Prodrogues *cycloSal*-PMEA **150** et *cycloAmb*-PMEA **151**.

4. Deuxième génération de *cycloSaligényle* phosphate

La première génération de prodrogues de *cycloSaligényle* a des activités antivirales intéressantes, notamment avec des dérivés de nucléosides tels que le d4T ou le ddA. Leur caractère lipophile permet une meilleure pénétration et le mécanisme de libération procédant uniquement par hydrolyse chimique ont pour conséquence la formation d'un équilibre de concentration de part et d'autre de la membrane. De plus, pour qu'il y ait une bonne activité antivirale, il est nécessaire d'avoir une forte concentration intracellulaire de pronucléotide, qui libérera une forte concentration de nucléotide. Il faut dans un premier temps la rendre encore plus lipophile, ce qui va améliorer sa pénétration (prodrogue-X – Figure 72). Puis dans un second temps, une molécule plus polaire va être libérée après une réaction enzymatique (Prodrogue-Y – Figure 72). La diffusion de la molécule à travers la membrane est alors empêchée, ce qui implique une accumulation du produit au sein de la cellule. La dernière étape permet de libérer le nucléotide avec une forte concentration pour ainsi améliorer l'activité antivirale. Pour ce faire, Balzarini *et al.* ont greffé sur le cycle aromatique du

cycloSaligényle un ester hydrolysable par une estérase.²⁸ Un ester est cependant un groupement électro-attracteur, ce qui a pour conséquence de diminuer la stabilité du *cycloSaligényle*. Pour pallier à ce problème, les auteurs ont décidé d'introduire un groupement éthylène entre le cycle aromatique et l'ester.

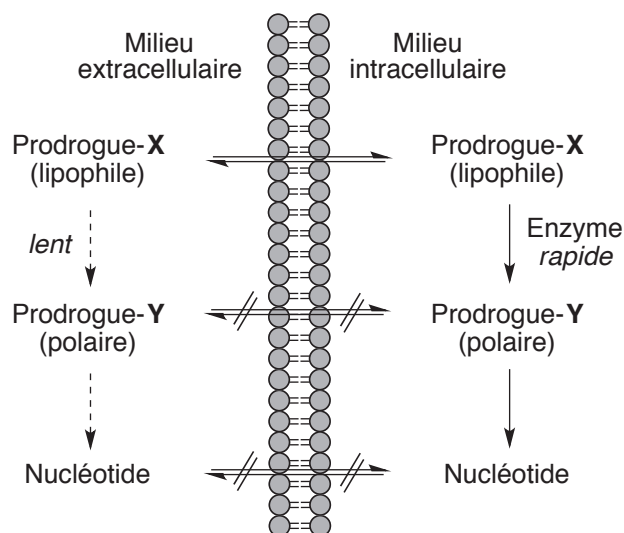


Figure 72 : Mécanisme d'action des prodrogues *cycloSaligényles* de deuxième génération (Meier *et al.* *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 197-206).

Leur première investigation porte sur la synthèse d'esters de *cycloSal*-d4TMP **152a-c** et d'acide carboxylique **153** attachés en position C-3 du cycle aromatique et séparés par un lien espaceur éthylène (Figure 73). La stabilité chimique de ces trois molécules a été évaluée dans un tampon phosphate (pH = 7,3) et dans un extrait cellulaire. Elles se sont montrées aussi stables que la molécule 3-Me-*cycloSal*-d4TMP **136d**, ce qui confirme que l'espaceur éthylénique permet de supprimer les effets électroniques apportés par l'ester sur la vitesse d'hydrolyse du triester de phosphate. Les composés **152a-c** ont également été testés sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et VIH-2 et sur des cellules mutantes déficitaires en thymidine kinase (CEM/TK⁻) infectées par le VIH-2. Les molécules des séries **152** et **153** sont aussi actives sur les trois types de cellules que le d4T, sauf pour la molécule **153** qui est inactive sur les cellules mutantes ce qui serait dû à son incapacité à traverser la membrane.²⁹ Bien que les EC₅₀ soient équivalentes à la molécule **136b**, l'introduction d'un ester d'alkyle n'a pas permis d'améliorer l'activité antivirale de ces molécules. Une explication serait que l'étape régie par l'estérase n'aurait pas lieu, et l'intermédiaire polaire ne serait donc pas formé (Prodrogue-Y – Figure 72), ce qui a pour conséquence de ne pas augmenter la concentration de la molécule désirée au sein de la cellule. Par la suite Balzarini *et al.* ont élaboré des esters

plus sophistiqués en introduisant un groupement masquant de carboxylate, tel un groupement acétoxyméthyle (AM) **154a**, pivaloxyméthyle (POM) **154b** ou encore isopropyloxycarbonyloxyméthyle (POC) **154c** (Figure 73).²⁸ Les tests de stabilité à l'hydrolyse ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment. Des résultats similaires aux esters d'alkyles **152** ont été obtenus ce qui signifie que le groupement espaceur est de taille suffisante pour ne pas induire une influence sur le temps de demi-vie. Par la suite des tests avec des extraits de cellules CEM et de foie ont été réalisés, prouvant qu'il y a bien hydrolyse par une estérase du groupement acyle.¹¹ Enfin, l'activité antivirale des composés **154** a été évaluée sur les mêmes cellules que précédemment, là encore l'introduction d'esters sophistiqués ne permet pas d'augmenter de manière significative les activités de ces molécules. Le remplacement d'un groupement alkyles ou acyles par différents acides aminés ne permet pas d'améliorer de manière significative les activités antivirales de ces molécules.³⁰

Bien que ces composés présentent une activité antivirale similaire à celles des composés de première génération, ils induisent néanmoins un retard pour la libération de la substance active. A pH physiologique le composé **153**, chargé sous forme de carboxylate, possède une grande stabilité chimique^{28,29} Pour pallier ce problème, une troisième génération de prodrogues a été développée.

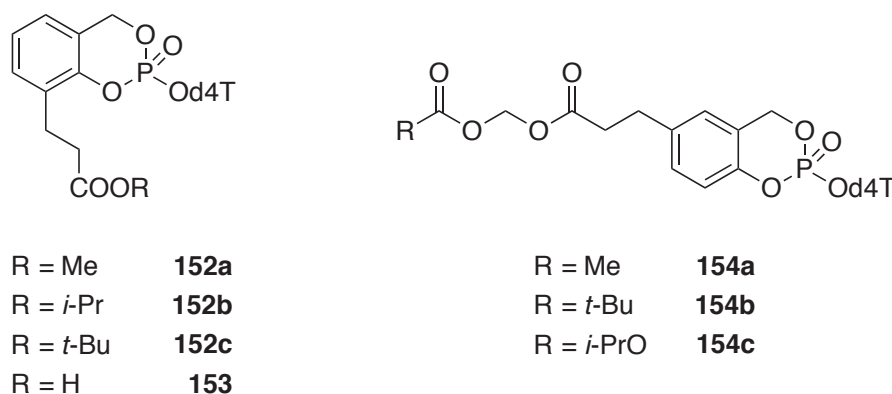


Figure 73 : Prodrogues de deuxième génération *cycloSal*-d4TMP **152**, **153** et **154**.

5. Troisième génération de *cycloSaligényle*

La troisième génération de prodrogues *cycloSaligényles* repose sur le même principe que celui développé précédemment. Dans cette approche, le cycle est directement substitué par un groupement électro-donneur ou un groupement ayant un faible pouvoir électro-

attracteur. Ce groupement est transformé en un fort accepteur après la transformation chimique intracellulaire. Cet accepteur a pour conséquence de diminuer la stabilité chimique de l'intermédiaire et rapidement induire l'ouverture du *cycloSaligényle* en phosphodiester chargé (molécule similaire à **128**), qui ne peut diffuser à travers la membrane et qui sera ainsi piégé au sein de la cellule.

Le substituant choisi pour cette approche est un dicarboxylate d'alkyle géminale **155** qui libérera un dérivé **156** hautement polaire lors de la première étape intracellulaire, catalysée dans ce cas par une (carboxy)estérase (Figure 74).³¹ Le groupe formyle formé va considérablement diminuer la stabilité du *cycloSal*-triesther **156** avec un temps de demi-vie équivalent à celui du composé 5-nitro-*cycloSal*-d4TMP ($t_{1/2} = 0,15$ h dans du tampon phosphate à pH = 7,3).¹²

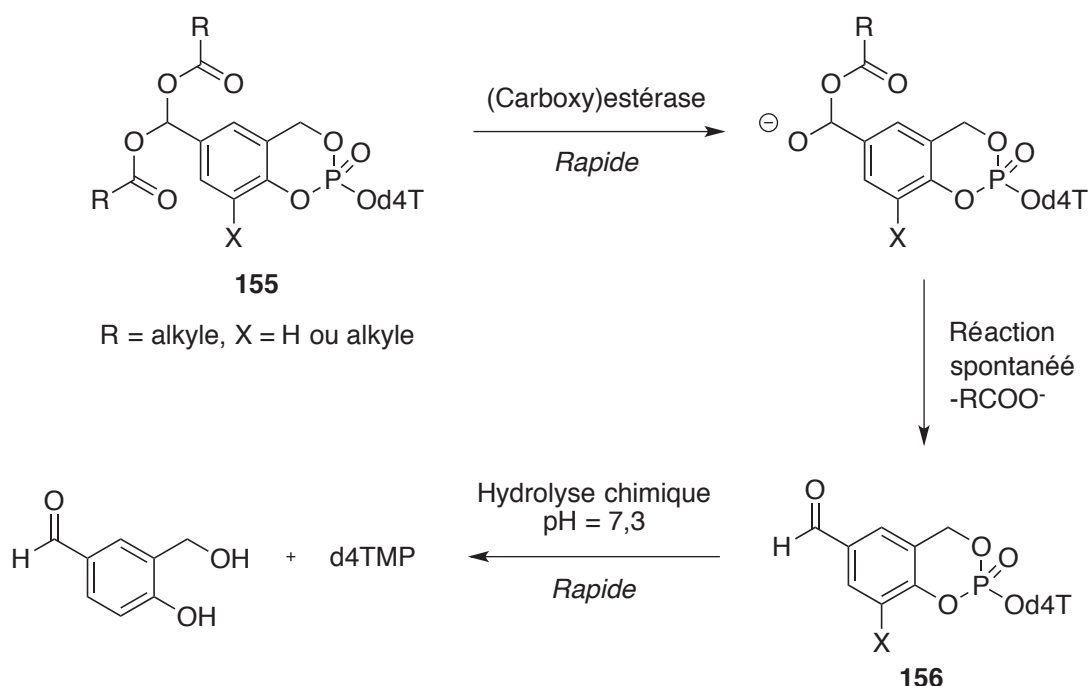


Figure 74 : Mécanisme de libération de la prodrogue *cycloSal*-d4TMP de troisième génération.

Dans une étude parue en 2007, les prodrogues 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMP **157a-c** ainsi que leurs intermédiaires 5-CHO-*cycloSal*-d4TMP **158a-c** (Figure 75) ont été synthétisés et évalués sur des cellules CEM/O infectées par le virus VIH-1 et VIH-2 ainsi que sur des cellules mutantes déficitaires en thymidine kinase (CEM/TK⁻) infectées par le VIH-2.³¹ Dans un extrait cellulaire de cellules CEM/O, le groupement acyle des composés **157** est enzymatiquement coupé pour libérer les composés **158**. La cinétique de cette réaction est très

rapide, avec des temps de demi-vie compris entre 0,08 h et 0,12 h. De plus, cette cinétique est indépendante des autres substituants sur le cycle aromatique.

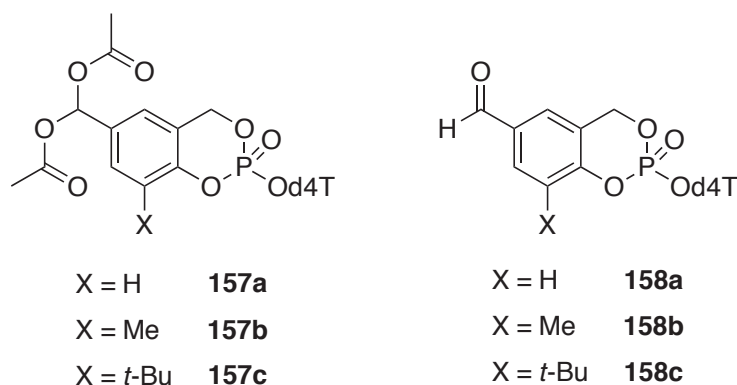


Figure 75 : Prodrogues 5-di-AM-*cycloSal*-d4TMP **157** et 5-CHO-*cycloSal*-d4TMP **158**.

Les EC₅₀ sur les cellules infectées par le VIH-1 et VIH-2 des composés **157** et **158** sont équivalentes à celle de la molécule parente, le d4T. Cependant il y a une amélioration de l'activité antivirale sur les cellules mutantes avec, par exemple, une EC₅₀ de 3,0 µM pour **157c** contre 47,5 µM pour le d4T.³¹ Dans cette étude l'activité antivirale des *cycloSaligényles* de troisième génération a été comparée aux activités des *cycloSaligényles* de deuxième génération. Les molécules issues de la troisième génération ont une activité antivirale 2 fois plus faible que leurs analogues de la deuxième génération. Une étude parue en 2008 s'intéresse à la synthèse et à l'évaluation des prodrogues de troisième génération en tenant compte de la configuration absolue de l'atome de phosphore. L'activité antivirale des deux diastéréoisomères du composé **157c** a été évaluée, montrant que le diastéréoisomère de configuration absolue (*S_P*) est le plus actif sur les cellules CEM/TK- infectées par le VIH-2.³²

La synthèse de motif « bis-*cycloSal* triester » induisant la libération de deux molécules actives pour une molécule de prodrogue administrée a été envisagée

6. Les bis-*cycloSal*-pronucléotides

En 2007, le groupe de Meier explore la synthèse de pronucléotides dimériques **159** portant un groupement masquant pour deux molécules actives (Figure 76).³³ Dans un tampon phosphate à pH = 7,3, les deux bis-*cycloSal*-d4TMP **159a** et **159b** sont plus stables (*t*_{1/2} = 8,2 h et *t*_{1/2} = 12 h respectivement) que la prodrogue parent *cycloSal*-d4TMP **136a** (*t*_{1/2} = 4,4 h).

L'activité antivirale a été évaluée sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et VIH-2, les composés **159a** et **159b** ont des EC_{50} similaires à celle du composé parent, le d4T. Sur les cellules CEM/TK⁻ infectées par le VIH-2, les bis-*cycloSal*-d4TP sont cependant environ 25 fois plus actifs que la molécule parente.³³ Par la suite, des composés similaires ont été synthétisés : les deux motifs *cycloSaligényles* y sont liés via une liaison 5,5' **160** et non plus 3,3' comme c'était le cas pour les prodrogues **159** (Figure 76). Ces trois composés **160** sont moins stables que les composés **159**. Par exemple le composé **160a** a un temps de demi-vie de 1,7 h dans un tampon phosphate (pH = 7,3) alors que dans les mêmes conditions le composé **159a** a un temps de demi-vie de 8,2 h. L'activité antivirale des composés **160** a été évaluée selon le même protocole que celui utilisé précédemment. Pour les cellules CEM/O infectées par VIH-1 ou VIH-2, les molécules **160** ont une activité comparable aux molécules **159** mais sont moins actives sur les cellules CEM/TK⁻. La molécule **160b** fait exception, car sa EC_{50} est de 0,85 μ M sur les CEM/TK⁻ alors que les EC_{50} des composés **159** sont comprises entre 1,60 et 2,33 μ M sur ces mêmes cellules.³⁴

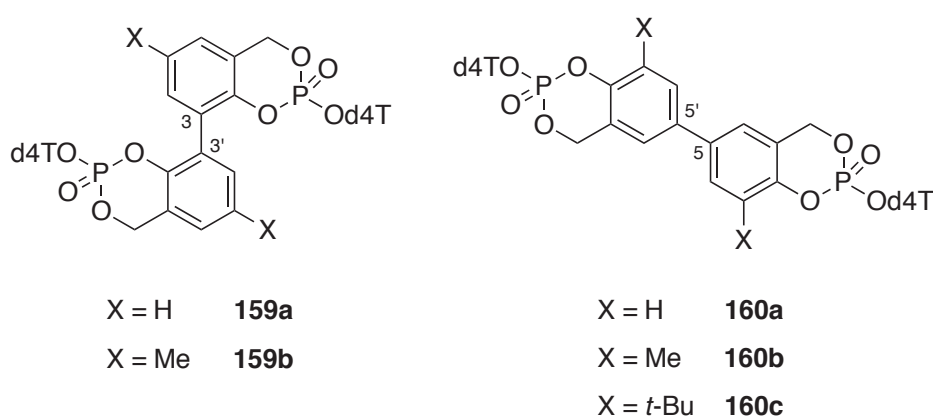


Figure 76 : Prodrogues bis-*cycloSal*-d4TMP **159** et **160**

Dans le cadre du traitement des maladies virales ou cancéreuses, les synthèses de prodrogues de nucléosides comme le d4T, l'AZT ou l'acyclovir ont été réalisées. Plusieurs prodrogues de type *cycloSaligényles* ont été synthétisées et leurs activités antivirales ont été évaluées sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 ou VIH-2 ainsi que sur des cellules CEM déficitaires en thymidine kinase (CEM/TK⁻). Dans de nombreux cas, ces prodrogues ont une activité supérieure à celles des nucléosides parents, car elles permettent (i) d'améliorer la pénétration de ce dernier au sein de la cellule et (ii) d'éviter la première étape de

phosphorylation du nucléoside en nucléotide monophosphate qui est l'étape limitante dans le processus d'activation.

Comme mentionné dans l'introduction (cf. « Prodrogue d'inhibiteurs de la DXR » p.62), certaines prodrogues de nucléosides ont été appliquées aux inhibiteurs de la DXR, mais aucune prodrogue de type *cycloSaligényle* n'a été synthétisée. Nous avons choisi ces prodrogues pour deux raisons. Premièrement, elles permettent de masquer un groupement phosphate et phosphonate, groupement nécessaire pour la conception d'un bon inhibiteur de la DXR, et deuxièmement aucune enzyme n'est impliquée dans le mécanisme de libération de la substance active.

Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse de prodrogues de type *cycloSaligényle* pour des inhibiteurs phosphates et phosphonates de la DXR.

- (1) De Clercq, E. Strategies in the Design of Antiviral Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13–25.
- (2) Balzarini, J. Metabolism and Mechanism of Antiretroviral Action of Purine and Pyrimidine Derivatives. *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113–126.
- (3) Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; St Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S. 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent That Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/lymphadenopathy-Associated Virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 7096–7100.
- (4) Meier, C. Pro-Nucleotides - Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates. *Synlett* **1998**, *1998*, 233–242.
- (5) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; Mcintee, E. J. Pronucleotides : Toward the *in vivo* Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417–451.
- (6) Meier, C.; Balzarini, J.; Meerbach, A. The *cycloSal*-Nucleotide Delivery System. In *Cancer Drug Discovery and Development : Deoxynucleoside Analogs in Cancer Therapy*; Peters, G. J., Ed.; Totowa, 2006; pp 353–401.
- (7) Farrow, S. N.; Jones, a S.; Kumar, A.; Walker, R. T.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis and Biological Properties of Novel Phosphotriesters: A New Approach to the Introduction of Biologically Active Nucleotides into Cells. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1400–1406.
- (8) Engels, J.; Schlaeger, E. J. Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate Benzyl Triesters. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- (9) Meier, C. 2-Nucleos-5'-O-yl-4*H*-1,3,2-Benzodioxaphosphinin-2oxides- A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72.
- (10) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'- Didehydrothymidine (d4T) - A New Pro-Nucleotide Approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99–104.
- (11) Meier, C. *cycloSal* Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery — Chemistry Meets Biology. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1081–1102.
- (12) Meier, C.; Lorey, M.; Clercq, E. De; Balzarini, J. *cycloSal*-2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and Antiviral

- Evaluation of a New d4TMP Delivery System. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417–1427.
- (13) Casiraghi, G.; Casnati, G.; Puglia, G.; Sartori, G.; Terenghi, G. Selective Reactions between Phenols and Formaldehyde. A Novel Route to Salicylaldehydes. *Chem. Soc., Perkin Trans I* **1980**, 1862–1865.
- (14) Gross, H.; Rieche, H.; Matthey, G. Neue Verfahren Zur Darstellung von Phenolaldehyden. *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 308–313.
- (15) Nagata, W.; Okada, K.; Aoki, T. Ortho-Specific α -Hydroxyalkylation of Phenols with Aldehydes. An Efficient Synthesis of Salgenol Derivatives. *Synthesis*. **1979**, 365–368.
- (16) Kwang, H. N.; Gutsche, C. D. Calixarenes. 8. Short, Stepwise Synthesis of *p*-phenylcalix[4]arene and *p*-Phenyl-*p*-*tert*-butylcalix[4]arene and Derived Products. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2713–2719.
- (17) Mugnier, F.; Meier, C. Phosphoramidite Chemistry for Synthesis of *cycloSal*-pro-Nucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **1999**, *18*, 941–942.
- (18) Kortylewicz, Z. P.; Kimura, Y.; Inoue, K.; Mack, E.; Baranowska-kortylewicz, J. Radiolabeled *cycloSaligenyl* Monophosphate of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine, 5-Iodo-3'-Fluoro-2',3'-Dideoxyuridine, and 3'-Fluorothymidine for Molecular Radiotherapy of Cancer : Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2649–2671.
- (19) Rios Morales, E. H.; Balzarini, J.; Meier, C. Diastereoselective Synthesis of *cycloSaligenyl*-Nucleosyl-Phosphotriesters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649–1659.
- (20) Meier, C.; Görbig, U.; Müller, C.; Balzarini, J. *cycloSal*-PMEA and *cycloAmb*-PMEA : Potentially New Phosphonate Prodrugs Based on the *cycloSal*-Pronucleotide Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8079–8086.
- (21) Ducho, C.; Wendicke, S.; Görbig, U.; Balzarini, J.; Meier, C. 3,5-di-(*tert*-Butyl)-6-fluoro-*cycloSal*-d4TMP -A Pronucleotide with a Considerably Improved Masking Group. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 4786–4791.
- (22) Ducho, C.; Balzarini, J.; Naesens, L.; Clercq, E. De; Meier, C. Aryl-Substituted and Benzo-Annulated *cycloSal* -Deriva- Monophosphate – Correlation of Structure , Hydrolysis Properties and Anti-HIV Activity. *Antivir. Chem. Chemother.* **2002**, *13*, 129–141.
- (23) Meier, C.; Knispel, T.; Clercq, E. De; Balzarini, J. *cycloSal* -Pronucleotides of 2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydroadenosine : Synthesis and Antiviral Evaluation of a Highly Efficient Nucleotide Delivery System. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604–1614.
- (24) Meier, C.; Knispel, T.; Marquez, V. E.; Siddiqui, M. A.; Clercq, E. De; Balzarini, J.

- cycloSal*-Pronucleotides of 2'-Fluoro-Ara and 2'-Fluoro-Ribo-2',3'-Dideoxyadenosine as a Strategy to Bypass a Metabolic Blockade. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1615–1624.
- (25) Meier, C.; Clercq, E. De; Balzarini, J. Nucleotide Delivery from *cycloSaligenyl*-3'-Azido-3'-Deoxythymidine Monophosphates (*cycloSal*-AZTMP). *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 837–846.
- (26) Morales, E. H. R.; Román, C. A.; Thomann, J. O.; Meier, C. Linear Synthesis of Chiral *cycloSal* -Pronucleotides. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 4397–4408.
- (27) Cox, J. R.; Ramsay, B. Mechanisms of Nucleophilic Substitution in Phosphate Esters. *Chem. Rev.* **1964**, 64, 317–352.
- (28) Meier, C.; Ducho, C.; Jessen, H.; Vukadinović-Tenter, D.; Balzarini, J. Second-Generation *cycloSal* -d4TMP Pronucleotides Bearing Esterase-Cleavable Sites — The “trapping” Concept. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 197–206.
- (29) Meier, C.; Ruppel, M. F. H.; Vukadinović, D.; Balzarini, J. Second Generation of *cycloSal* -Pronucleotides with Esterase-cleavable Sites: The “lock-in”-concept. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2004**, 23, 89–115.
- (30) Jessen, H. J.; Balzarini, J.; Meier, C. Intracellular Trapping of *cycloSal*-Pronucleotides : Modification of Prodrugs with Amino Acid. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6592–6598.
- (31) Gisch, N.; Balzarini, J.; Meier, C. Enzymatically Activated *cycloSal*-d4T-Monophosphates : The Third Generation of *cycloSal*-Pronucleotides. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1658–1667.
- (32) Gisch, N.; Balzarini, J.; Meier, C. Studies on Enzyme-Cleavable Dialkoxymethyl-*cycloSaligenyl*-2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidine Monophosphates. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6752–6760.
- (33) Ducho, C.; Görbig, U.; Jessel, S.; Gisch, N.; Balzarini, J.; Meier, C. Bis-*cycloSal*-d4T-Monophosphates : Drugs That Deliver Two Molecules of Bioactive Nucleotides. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1335–1346.
- (34) Gisch, N.; Balzarini, J.; Meier, C. Doubly Loaded *cycloSaligenyl*-Pronucleotides – 5,5'-Bis-(*cycloSaligenyl*-2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidine Monophosphates). *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3464–3473.

Partie 1 : Prodrogues de type *cycloSaligényles* d'inhibiteurs phosphonates de la DXR

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la synthèse de prodrogues de type *cycloSaligényle* d'inhibiteurs naturels et synthétiques de la DXR. Les composés **161a-b** sont respectivement les prodrogues de la fosmidomycine **28** et FR-900098 **29** et les composés **162a-b** sont les prodrogues des acides phosphonohydroxamiques **42** et **43** (Figure 77).

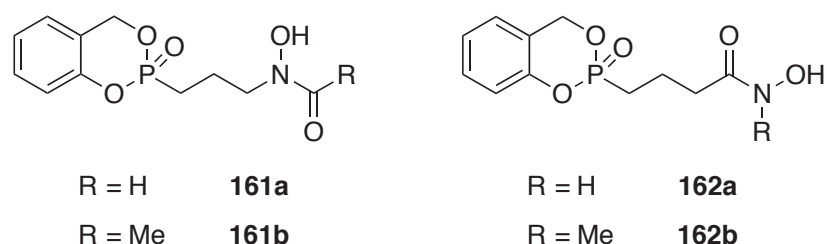


Figure 77 : Prodrogues *cycloSaligényles* d'inhibiteurs de la DXR.

I. Synthèse des prodrogues **161a-b** et **162a-b**

1. Mise au point de l'étape clé de la synthèse

Pour la synthèse des prodrogues *cycloSaligényles* phosphonates **161** et **162**, l'étape clé est l'introduction du groupement masquant. Deux stratégies de synthèse peuvent être envisagées, l'introduction peut se faire soit (i) via une réaction addition-élimination du saligénol sur le dichlorophosphonyle (Voie A - Figure 78) soit (ii) via un couplage entre le saligénol et l'acide phosphonique (Voie B - Figure 78).

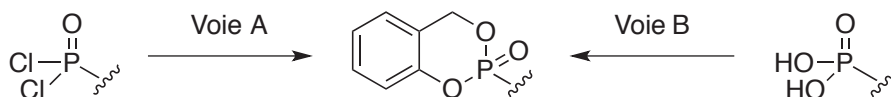


Figure 78 : Deux voies de synthèses envisagées pour l'introduction du motif *cycloSaligényle*.

La stratégie de ces deux méthodes est fondée sur l'utilisation du méthylphosphonate de diéthyle **163**, un phosphonate protégé par deux groupements éthyles comme ce sera le cas dans la synthèse des composés **161** et **162**.

a. Synthèse via le dichlorophosphonyle

Le dichlorophosphonyle **165** peut être obtenu soit par chloration directe du composé **163** soit par déprotection des éthyles suivie de la chloration de l'acide phosphonique **164**. Enfin dans une dernière étape, l'addition-élimination du saligénol sur l'intermédiaire réactif **165** permet d'obtenir le composé **166** (Figure 79).

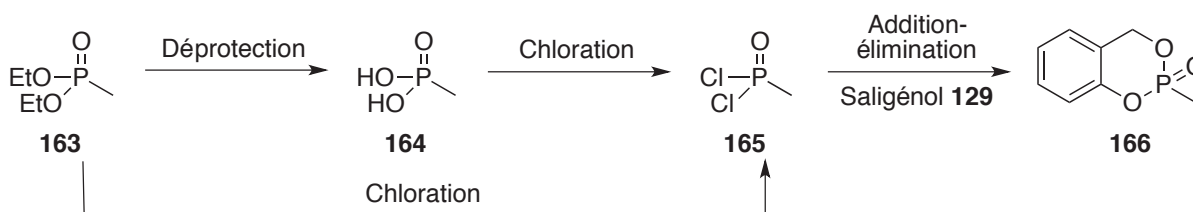


Figure 79 : Deux voies synthétiques pour l'obtention du dichlorophosphonyle **165**.

Meier. *et al*, ont décrit la synthèse d'une prodrogue *cycloSal*-PMEA, où la molécule active est un phosphonate. La méthode développée a été appliquée pour l'obtention de la molécule **166**.¹ Le produit commercial **163** est préalablement traité avec du bromotriméthylsilane (TMSBr) dans du dichlorométhane (DCM), puis la chloration de **164** est réalisée avec du pentachlorure de phosphore (PCl₅). Enfin la réaction addition-élimination du saligénol **129** sur l'intermédiaire **165** est réalisée dans du DCM en présence d'une base non nucléophile, comme de la triéthylamine (TEA) (Figure 80, Tableau 2 – Entrée 1).

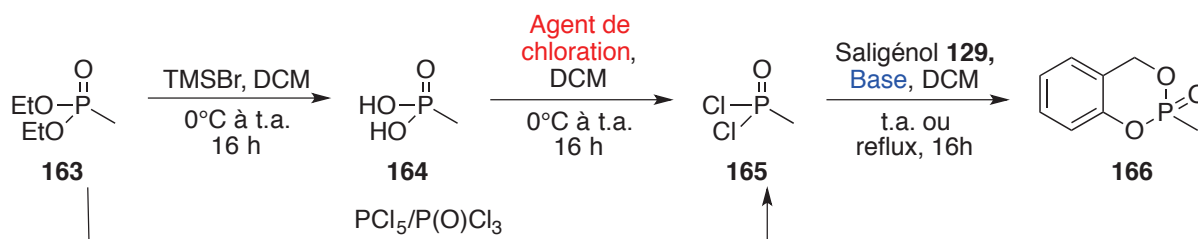


Figure 80 : Synthèse du composé **166** à partir du composé commercial **163**.

Entrée	TMSBr (Equiv.)	Agent de chloration	Base	T°C	166
1	2,5	PCl ₅	TEA	t.a.	-
2	2,5	PCl ₅	TEA	reflux	-
3	2,5	PCl ₅	K ₂ CO ₃	t.a.	-
4	2,5	PCl ₅	DBU	t.a.	5%
5	2,5	(COCl) ₂ , DMF (cat)	DBU	t.a.	-
6	2,5	SOCl ₂ , Pyridine	DBU	t.a.	-
7	-	PCl ₅ /POCl ₃	DBU	t.a.	-

Tableau 2 : Différentes conditions réactionnelles testées pour l'obtention de 166

Cette méthode n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité **166**. Cette même procédure a été réalisée en chauffant le milieu réactionnel dans la dernière étape. Là encore il n'y a pas formation du produit (Tableau 2 – Entrée 2). Par la suite, nous avons décidé de varier la nature de la base en utilisant soit une base minérale, le carbonate de potassium (K₂CO₃) (Tableau 2 – Entrée 3), soit une base encombrée, le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) (Tableau 2 – Entrée 4). Dans ce dernier cas, le composé **166** a été obtenu avec un très faible rendement de 5 %. Le très faible rendement de la réaction peut être dû soit à l'absence de déprotection des éthyles soit à l'absence de formation de intermédiaire dichlorophosphonyl **165**. Pour répondre à ces questions, d'autres agents de chloration ont été utilisés pour l'obtention de **165**. Nous avons choisi d'utiliser du chlorure d'oxalyle (COCl)₂ avec du DMF en quantité catalytique² et du chlorure de thionyle (SOCl₂) en association avec la pyridine (Tableau 2 – Entrées 5 et 6).^{3,4} Ces deux méthodes n'ont pas permis d'obtenir le composé souhaité **166**. Afin de s'affranchir de l'étape de déprotection, nous avons suivi la méthode décrite par Saignac *et al.* où un composé similaire au dichlorophosphonyl **165** est synthétisé à partir de leurs analogues phosphonates **163**.⁵ Pour ce faire, le composé **163** est traité avec du PCl₅ et du POCl₃ sans solvant pendant 24 h. L'intermédiaire **165** ainsi formé est traité avec du saligénol **129** en présence de DBU (Figure 80, Tableau 2 – Entrée 7). Malheureusement cette méthode n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité.

Différentes conditions réactionnelles ont été testées afin d'obtenir le composé **166**. Cependant il n'a été obtenu que dans une seule condition (Tableau 2 – Entrée 4) et avec un

très faible rendement. Afin de vérifier la stabilité de l'acide hydroxamique dans les conditions drastiques de chloration avec du PCl_5 , nous avons mis en réaction le composé **167**, préalablement synthétisé, en présence de cet agent de chloration. Dans ces conditions nous observons la dégradation de l'acide rétro-hydroxamique. (Figure 81).



Figure 81 : Test réalisé pour évaluer la robustesse l'acide hydroxamique **167**.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes intéressés à la synthèse du **166** via un couplage du saligénol sur l'acide phosphonique (Figure 78 – Voie B)

b. Synthèse via un acide phosphonique

Les agents de couplage de type carbodiimide sont surtout utilisés dans la synthèse peptidique pour la formation de la liaison amide entre deux acides aminés.^{6,7,8,9} Peu d'exemples de formation d'esters phosphoriques sont décrits en utilisant de tels agents de couplage.^{10,11,12}

Plusieurs tests ont été effectués. Dans un premier temps, l'acide méthylphosphonique **164** a été traité avec du saligénol **129** et du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Figure 82, Tableau 3 – Entrée 1).¹² Cependant la purification de ce produit s'est avérée très difficile, car la dicyclohexylurée formée durant la réaction n'a pu être séparée du produit **166**. Afin d'éviter ce problème de purification, l'agent de couplage précédent a été remplacé par du diisopropylcarbodiimide (DIC) (Tableau 3 – Entrée 2). Le produit désiré a été obtenu avec un rendement très modeste de 26 %.

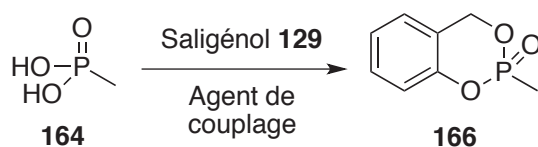


Figure 82 : Schéma réactionnel pour le couplage de type peptidique entre l'acide phosphonique **164** et le saligénol **129**..

Entrée	Agent de couplage	Solvant	Rendement
1	DCC	THF	Difficultés lors de la purification
2	DIC	THF	26 %
3	EDC.HCl / DMAP	DCM	5 %
4	CDI	THF	-

Tableau 3 : Différentes conditions réactionnelles testées pour la réaction de couplage acide phosphonique/saligénol

Un agent de couplage dont l'urée formée est soluble dans l'eau a également été testé : il s'agit du chlorhydrate de (*N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC.HCl). Ce réactif a été testé en association avec de la diméthylaminopyridine (DMAP) selon la méthode décrite par le groupe de Kingston.¹³ Dans ce cas, le produit a été obtenu avec un mauvais rendement de 5 % (Tableau 3 – Entrée 3). Un dernier test a été effectué en utilisant un réactif de la famille des imidazoliums. Malheureusement, le réactif choisi, le *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI), n'a pas permis d'obtenir, dans les conditions réactionnelles standard, le composé souhaité **166** (Tableau 3 – Entrée 4).¹⁴

Etude spectroscopique de la molécule 166

L'analyse spectroscopique du composé **166** obtenu avec le DIC montre clairement la présence des deux protons benzyliques diastéréotopes due à l'atome de phosphore chiral. Les deux protons Ha et Hb apparaissent à 5,09 ppm et 5,42 ppm sous la forme de deux doublets de doublets (dd) avec une constante de couplage géminale de $^2J = 13,7$ Hz. Les constantes de couplage $^3J(^{31}\text{P}-^1\text{H})$ ne sont pas les mêmes : pour le signal à 5,09 ppm, la constante $^3J_{\text{PH}}$ est de 17,6 Hz alors que pour le signal du proton le plus déblindé à 5,42 ppm la valeur de la constante $^3J_{\text{PH}}$ est de 9,6 Hz (Figure 83).

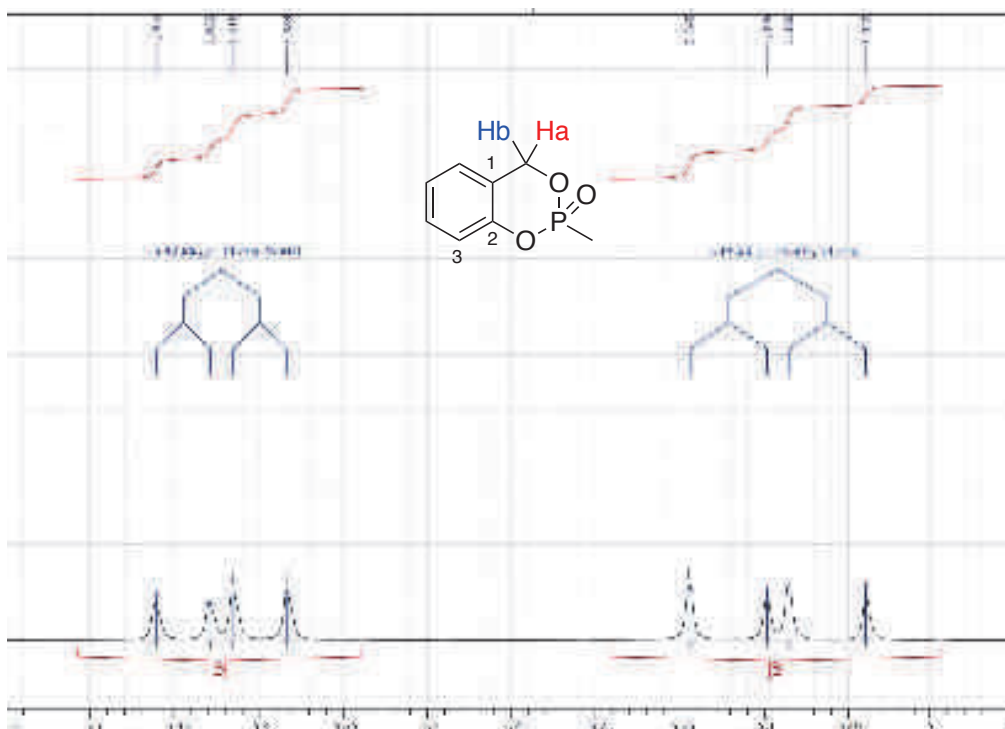


Figure 83 : Agrandissement du spectre RMN ^1H sur les protons diastérotopes de la molécule **166**.

La RMN du ^{13}C a également permis de confirmer la formation du produit formé **166**. En effet, le carbone benzylique et le carbone aromatique C-2 sont couplés à l'atome de phosphore avec une constante 2J . De plus, les carbones aromatiques C-1 et C-3 sont couplés avec une constante 3J à l'atome de phosphore (Tableau 4). Les couplages des carbones C-1, C-2 et C-3 avec le phosphore permettent d'attester que la formation du cycle à six chaînons du produit **166** a bien eu lieu.

Carbone	Déplacement chimique (δ ppm)	Multiplicité	Constante de couplage ^{13}C - ^{31}P
CH_2	66,0	Doublet	$^2J = 6,6$ Hz
C-3	118,9	Doublet	$^3J = 6,9$ Hz
C-1	122,5	Doublet	$^3J = 9,4$ Hz
C-2	149,8	Doublet	$^2J = 6,6$ Hz

Tableau 4 : Déplacements chimiques, multiplicités et constantes de couplage de certains carbones de la molécule **166**.

Le couplage de l'acide phosphonique avec le saligénol a permis d'obtenir la molécule avec un rendement sur deux étapes très modeste de 26 %. Il convient donc maintenant de s'assurer que cette méthode de couplage soit compatible avec l'étape préalable de déprotection des éthyloxy du phosphonate réalisée avec du TMSBr. Pour ce faire, la molécule **163** a préalablement été traitée avec du TMSBr pour conduire à l'acide phosphonique **164**. Le traitement de ce dernier dans les conditions mises au point précédemment permet d'isoler le composé **166**, avec un rendement de 36 % sur deux étapes (Figure 84).

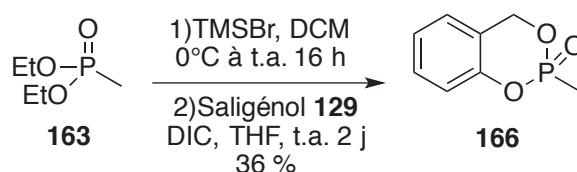
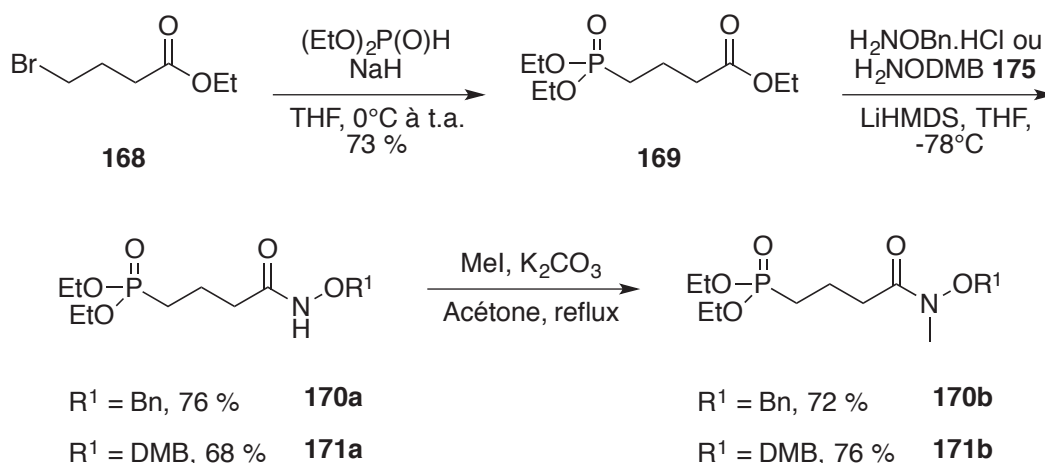


Figure 84 : Schéma réactionnel pour la synthèse de **166**.

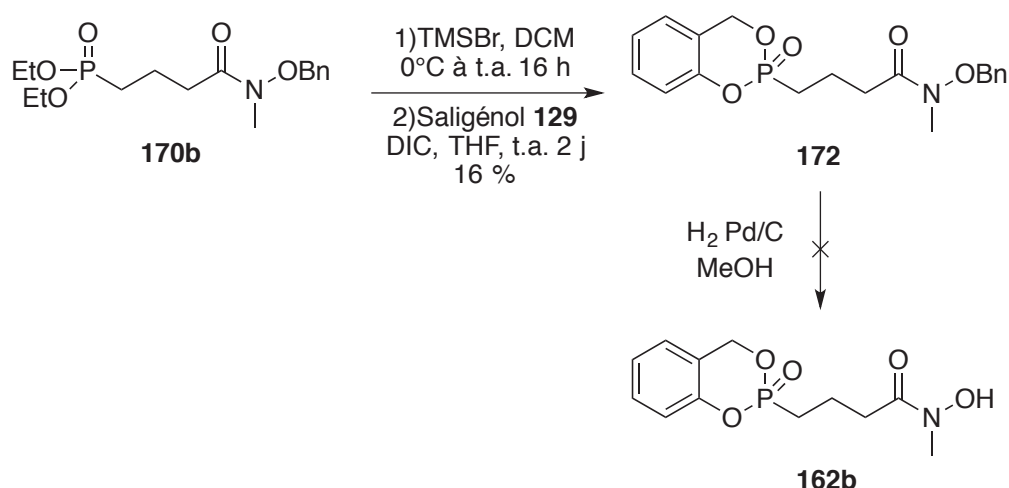
Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'appliquer cette méthode à la synthèse des molécules **161** et **162**, prodrogues d'inhibiteurs phosphonates de la DXR.

2. Application de la méthode pour la synthèse des composés **161a-b** et **162a-b**

La synthèse des précurseurs de prodrogue **170** et **171** a été réalisée selon les conditions mises au point au laboratoire.¹⁵ La première étape est l'introduction du groupement phosphonate. La réaction entre l'anion du diéthylphosphite, formé *in situ*, et le 4-bromobutyrate d'éthyle commercial **168** permet d'obtenir le composé **169** avec un rendement de 73 % (Figure 85). L'introduction de l'hydroxylamine est réalisée avec du chlorhydrate de benzyloxyamine ($\text{H}_2\text{NOBn.HCl}$) en présence de LiHMDS dans du THF et permet d'obtenir le composé **170a** avec un bon rendement de 76 %. Sur une partie de ce produit, nous avons réalisé la méthylation de l'atome d'azote en faisant réagir de l'iodure de méthyle en présence d'une base minérale, K_2CO_3 , dans de l'acétone à reflux pendant une nuit, permettant d'accéder au produit *N*-méthylé **170b** (Figure 85).

Figure 85 : Synthèse des intermédiaires **170** et **171**.

L'introduction du motif *cyclo*Saligényle est réalisée avec la méthode mise au point et décrite précédemment. Les éthyles sont déprotégés avec du TMSBr, puis l'acide phosphonique résultant est couplé avec le saligénol **129** en présence de DIC. Le composé **172** est obtenu avec un rendement de 16 % sur deux étapes. Un test de déprotection du groupement benzyle a été réalisé par hydrogénolyse catalysée au palladium. Malheureusement le produit final **162b** n'a pu être obtenu (Figure 86). En effet, il semblerait que le groupement benzyle soit un groupement protecteur trop robuste pour être utilisé dans une stratégie *cyclo*Saligényle, impliquant également la déprotection du groupement masquant du phosphonate.

Figure 86 : Synthèse des composés **172** et **162b**.

Ruda *et al.* ont décrit la synthèse d'une hydroxylamine protégée avec un groupement 2,4-diméthoxybenzyle **175** (H₂NODMB) compatible avec une synthèse comprenant un groupement *cycloSaligényle*.¹⁶ Ce composé **175** est obtenu à partir de l'alcool 2,4-diméthoxybenzyle **173** qui, par une réaction de type Mitsunobu, permet d'isoler après recristallisation, le phtalimide **174**. La réaction d'addition-élimination avec de la *N*-méthylhydrazine sur ce phtalimide permet l'obtention sans purification du composé **175** (Figure 87).

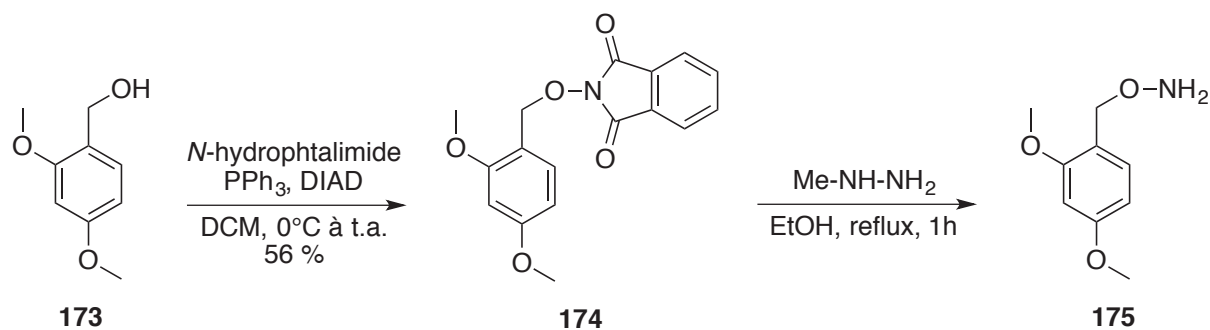


Figure 87 : Synthèse de la 2,4-diméthoxybenzylhydroxylamine **175**.

Les composés **171a** et **171b** ont été synthétisés selon la méthode décrite précédemment (Figure 84). Malheureusement, le couplage entre l'acide phosphonique et le saligénol **129** n'a pas permis l'introduction du motif *cycloSaligényle* et d'obtenir, par conséquence, la molécule **176**. En effet, lors de la synthèse il n'y a pas consommation du saligénol **129** (Figure 88). Nous avons donc entrepris de tester d'autres agents de couplage de type phosphonium (PyBOP) et un sel d'uronium (HBTU). Là encore, la formation du produit **176** n'a pas été observée.

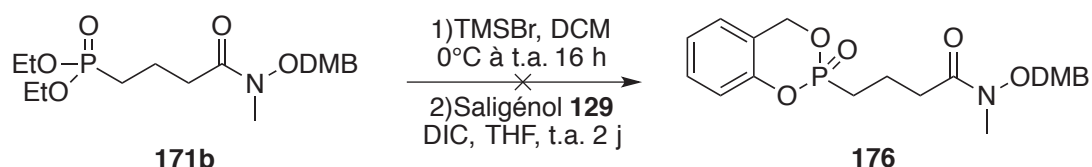


Figure 88 : Tentative de synthèse du composé **176**.

Etudes spectroscopiques de l'acide hydroxamique

Après l'introduction de l'hydroxamate, les spectres RMN du proton sont complexes et montrent la présence de plusieurs signaux. En effet, les protons du groupe méthylène en α du

carbonyle donnent deux signaux larges à des déplacements chimiques différents pour les composés de type acide hydroxamique. En effet, il a été décrit dans la littérature que les acides hydroxamiques *N*-substitués, *N*- et *O*-substitués ou non substitués peuvent être présents en solution sous la forme de conformères *Z* et *E* provenant de la rotation restreinte autour de la liaison C-N (Figure 89).^{17,18} De plus, la proportion relative des composés dépend de facteurs stériques et structuraux (taille des substituants) mais également de la nature du solvant utilisé.^{19,20}

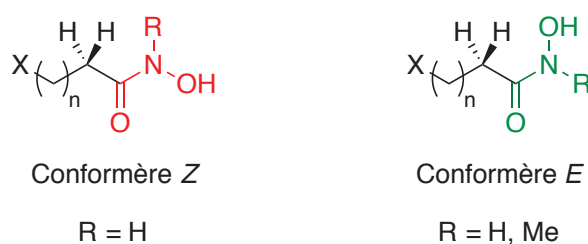


Figure 89 : Conformations *Z* et *E* de l'acide hydroxamique.

Brown *et al*, ont étudié le comportement d'un acide hydroxamique dans le chloroforme deutérié. Ils ont montré que les protons en α du carbonyle (RMN du ^1H) et que le carbonyle (RMN ^{13}C), sont plus déblindés pour le conformère *E* que pour le conformère *Z*.¹⁹ Lorsque l'acide hydroxamique possède un groupement *N*-H libre, la conformation *Z* est majoritaire en solution alors que lorsque l'acide hydroxamique est *N*-méthylé, c'est la conformation *E* qui est majoritaire en solution. En effet, cette conformation *E* minimise la gêne stérique entre les protons en α du carbonyle et les protons du groupement *N*-Me. Il est cependant à noter que ces études ont été réalisées pour des composés *N*-hydroxylés alors que dans notre cas les composés sont dans la majorité des cas des hydroxamates benzylés, ce qui pourra avoir une incidence sur les déplacements chimiques des protons et carbones mais également sur les proportions relatives des deux conformères. Pour chaque composé synthétisé présentant un acide hydroxamique nous avons déterminé le pourcentage relatif de chaque conformère présent en solution par spectroscopie RMN.

Après l'introduction de l'hydroxamate, les spectres RMN du ^1H réalisés dans le CDCl_3 , montrent que les protons en α du carbonyle de l'hydroxamate des composés **170a** et **171a** donnent deux signaux larges à des déplacements chimiques $\delta = 2,21\text{-}2,24$ et $2,47\text{-}2,49$ ppm correspondant respectivement au conformères *Z* et *E* de l'hydroxamate. (Tableau 5 –

Entrée 1 et 2). Pour le carbonyle, deux signaux devraient être observé en RMN du ^{13}C . Or pour les composés **170a** et **171a** un seul signal résonnant à 170 ppm est observé correspondant au conformère *Z* selon la littérature.¹⁹

Entrées	Composés	$\delta(\text{CH}_2)$ en α du CO en ppm (<i>Z/E</i>)	$\delta(\text{NCH}_3)$ en ppm	$\delta(\text{CO})$ en ppm	Conformères <i>Z/E</i> (%)
1	170a	2,24/2,47	-	170,1	80/20
2	171a	2,21/2,49	-	169,9	70/30
3	170b	2,48	3,19	174,4	0/100
4	171b	2,50	3,20	174,3	0/100

Tableau 5 : Conformères *Z/E* observés pour les hydroxamates **170a-b** et **171a-b** en RMN du ^1H et ^{13}C dans le CDCl_3 .

Au contraire, pour les analogues *N*-méthylés **170b** et **171b** seul le conformère *E* est visible en spectroscopie RMN. Les signaux correspondant aux protons en α du carbonyle apparaissent sous forme d'un triplet à 2,48 et 2,50 ppm respectivement. En RMN du ^{13}C et pour ces deux molécules, le carbonyle résonne à 174 ppm, déplacement chimique qui, selon la littérature, correspond au conformère *E* (Tableau 5 – Entrée 3 et 4).¹⁹ Comme évoqué précédemment, ce conformère *E* permet de minimiser la gêne stérique entre les protons en α du carbonyle et les protons du groupement *N*-Me. Les résultats obtenus pour les composés *N*-H libres (**170a** et **171a**) et les composés *N*-méthylés (**170b** et **171b**) sont en accord avec les expériences recensées dans la littérature.¹⁷⁻²⁰

II. Conclusion

La synthèse des prodrogues cycloSaligényles phosphonate **162** s'est avérée plus compliquée que prévu. Au vu des résultats de la synthèse pour les composés **162**, la synthèse des composés **161** n'a pas été envisagée. Aucune des quatre molécules visées n'a pu être obtenue et testée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats (i) l'acide hydroxamique, bien que protégé, est très réactif vis à vis d'agent de chloration comme le PCl_5 (ii) le 2,4-diméthoxybenzyle (DMB), groupement protecteur compatible avec la stratégie

cycloSaligényle, est labile ce qui ne permet pas son utilisation dans cette stratégie de synthèse. Afin de pallier ces problèmes, il faudrait soit changer de groupement protecteur de l'acide hydroxamique, soit changer de groupement protecteur du phosphonate (OEt). Le choix des deux groupements devra cependant être en accord avec la stratégie *cycloSaligényle*.

- (1) Meier, C.; Görbig, U.; Müller, C.; Balzarini, J. *cycloSal*-PMEA and *cycloAmb*-PMEA : Potentially New Phosphonate Prodrugs Based on the *cycloSal*-Pronucleotide Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8079–8086.
- (2) Mundy, J. L.; Harrison, J. M.; Watts, P.; Timperley, C. M. Isotopically Labelled Phosphorus Compounds : Some Deuterated Methyl and Ethyl Derivatives. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **2006**, *181*, 1847–1857.
- (3) Bergstrom, D. E.; Shum, P. W. Synthesis and Characterization of a New Fluorine Substituted Nonionic Dinucleoside Phosphonate Analogue. *J. Org. Chem.* **1988**, *17*, 3953–3958.
- (4) Maier, L. Organic Phosphorus Compounds 90. A Convenient, One-Step Synthesis of Alkyl- and Arylphosphonyl Dichlorides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **1990**, *47*, 465–470.
- (5) Patois, C.; Berté-Verrando, S.; Savignac, P. Easy Preparation of Alkylphosphonyl Dichloride. *Bull. Soc. Chim. Fr* **1993**, *130*, 485–487.
- (6) Lerner, A. B.; Lee, T. E. H. H.; Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
- (7) Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- (8) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- (9) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation : Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- (10) Weber, P.; Fonvielle, M.; Therisod, M. New Facile Synthesis of Phosphoglycolohydroxamic Acid and Other Phosphoglycolic Acid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9047–9049.
- (11) Smith, M.; Moffatt, J. G.; Khorana, H. G. Carbodiimides VIII. Observation on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6204–6212.
- (12) Earle, M. J.; Abdur-Rashid, A.; Priestley, N. D. Large Scale Synthesis of Cyclodiphospho-D-Glycerate. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5697–5700.
- (13) Qi, J.; Blanden, A. R.; Bane, S.; Kingston, D. G. I. Design, Synthesis and Biological Evaluation of a Simplified Fluorescently Labeled Discodermolide as a Molecular Probe to Study the Binding of Discodermolide to Tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5247–5254.

- (14) Paul, R.; Anderson, G. W. *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent1. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596–4600.
- (15) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 277–285.
- (16) Ruda, G. F.; Alibu, V. P.; Mitsos, C.; Bidet, O.; Kaiser, M.; Brun, R.; Barrett, M. P.; Gilbert, I. H. Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Prodrugs of 4-Phospho-D-Erythronohydroxamic Acid, an Inhibitor of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *ChemMedChem* **2007**, 2, 1169–1180.
- (17) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Girmay, B. *Cis-Trans* Isomerism in Monoalkylhydroxamic Acids by ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, 26, 970–973.
- (18) Brown, D. A.; Coogan, R. A.; Fitzpatrick, N. J.; Glass, W. K.; Abukshima, D. E.; Shield, L.; Ahlgrén, M.; Smolander, K.; Pakkanen, T. T.; Pakkanen, Tapani, A.; Peräkylä, M. Conformational Behaviour of Hydroxamic Acid : *ab initio* and Structural Studies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 2673–2679.
- (19) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Mohammed, S. A. ^1H and ^{13}C NMR Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 40–45.
- (20) Kakkar, R.; Grover, R.; Chadha, P. Conformational Behavior of Some Hydroxamic Acids. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2200–2206.

Partie 2 : Synthèse de la fosfoxacine et de ses analogues – Evaluation et comparaison avec leurs analogues phosphonates

I. La fosfoxacine

Au début des années 1990, Katayama *et al.* ont isolé la fosfoxacine **30** de *Pseudomonas fluorescens* PK-52. Cet antibiotique naturel s'est montré avoir de bons pouvoirs inhibiteurs sur la croissance de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas caviae* avec des CMI comprises entre 0,1 et 1,56 µg/mL.¹ De plus, ils ont montré que cet inhibiteur induisait la formation de sphéroplastes chez les bactéries Gram-négative dans un milieu hypertonique, suggérant que la fosfoxacine inhibait la biosynthèse de la paroi cellulaire. Ce n'est qu'en 2006 que le groupe de Proteau synthétise la fosfoxacine **30** et son analogue méthylé **177** et évalue leurs pouvoirs inhibiteurs sur la DXR de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC6803. Ces deux molécules **30** ($K_i = 19$ nM) et **177** ($K_i = 2$ nM) ont des constantes d'inhibition respectives (K_i) 3 et 29 fois plus faibles que celle de la fosmidomycine ($K_i = 57$ nM), ce qui en fait de très bons inhibiteurs.² Il semblerait que la présence du phosphate contribue aux faibles valeurs de K_i . Ce groupement est cependant hydrolysable par des phosphatases ce qui conduirait à l'inactivation de l'antibiotique.

Aucune étude sur les DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis* n'a été reportée dans la littérature. C'est pourquoi, nous nous proposons de synthétiser les composés **30** et **177** ainsi que les analogues phosphates où la pince chélatante est un acide hydroxamique **178a** (N-H) et **178b** (N-méthylé) (Figure 90).

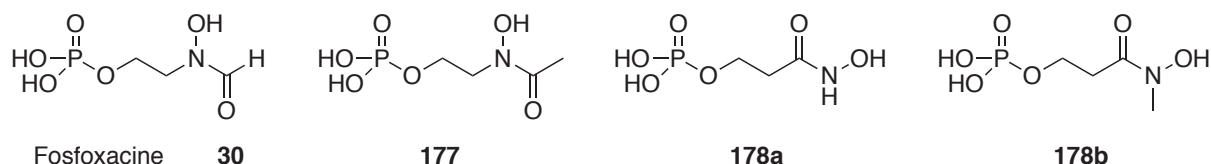


Figure 90 : Fosfoxacine **30**, son analogue méthylé **177** et inhibiteurs synthétiques **178a-b**.

II. Synthèse de la fosfoxacine et de ses analogues

1. Synthèse des acides rétro-hydroxamiques phosphates **30** et **177**

La synthèse de la fosfoxacine **30** et de son analogue méthylé **177** a été effectuée selon les méthodes décrites par l'équipe de Proteau.² La monoprotection en milieu basique de l'éthylène glycol commercial **179** permet d'obtenir l'alcool monoprotégé **180** (Figure 91).

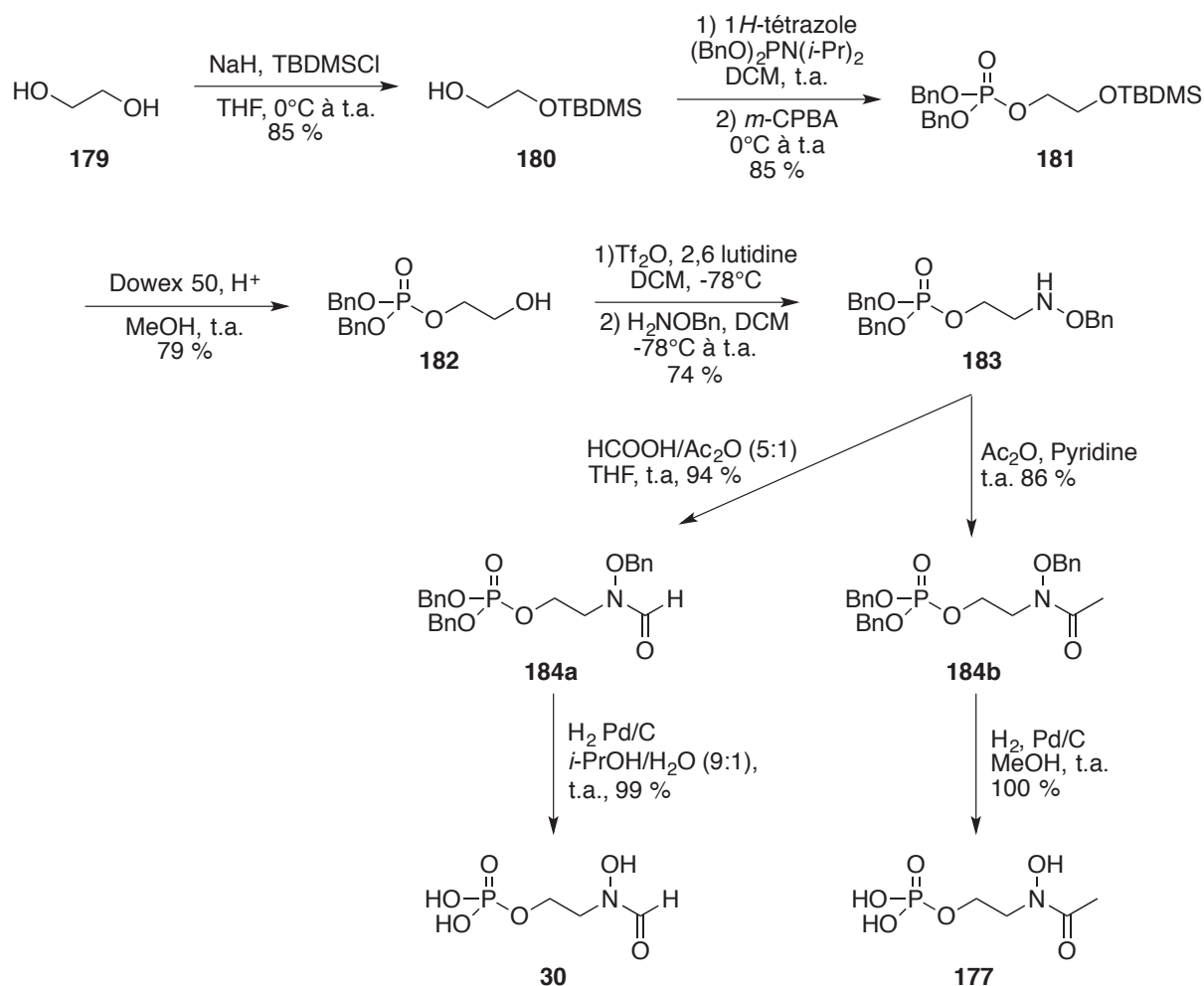


Figure 91 : Synthèse des composés **30** et **177**.

Le groupement phosphate est introduit avec du *N,N*-diisopropylphosphoramidite de dibenzyle en présence de 1*H*-tétrazole. L'oxydation du phosphore (III) en phosphore (V) a été réalisée en remplaçant l'hydropéroxyde de *t*-butyle par de l'acide *m*éta-chloroperbenzoïque

(*m*-CPBA) pour conduire à l'intermédiaire **181** avec un rendement de 85 %. La déprotection de l'éther silylé est effectuée avec une résine Dowex 50Wx8-100 dans du méthanol afin d'obtenir l'alcool primaire **182**. L'activation de l'alcool est effectuée avec de l'anhydride triflique en présence de 2,6-lutidine. La substitution nucléophile de ce triflate est ensuite réalisée *in situ* avec de la *O*-benzylhydroxylamine pour obtenir l'hydroxylamine protégée **183** avec un rendement de 74 % (Figure 91). L'introduction de la pince rétro-hydroxamate *N*-formylée se fait par réaction du composé **183** en présence d'acide formique et d'anhydride acétique pour obtenir le composé **184a** avec un rendement de 94 %. La pince rétro-hydroxamate portant le groupement *N*-acétyl est également introduite à partir de l'hydroxylamine **183** mais en utilisant de l'anhydride acétique en présence de pyridine. Le composé *N*-acétylé **184b** est obtenu avec un rendement de 86 %. La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection des groupements benzyles portés par le phosphate et l'hydroxamate. L'hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif des composés **184a** et **184b** permet l'obtention des composés **30** et **177** de manière quantitative (Figure 91). Les composés **30** et **177** ont été synthétisés avec des rendements globaux respectifs de 36 % et 39 %.

Etude spectroscopique des acides rétro-hydroxamiques

Comme décrit dans la Partie I de ce Chapitre, l'introduction d'un acide hydroxamique rend les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C complexes. Dans le cas de cette synthèse, ce n'est pas un acide hydroxamique mais un acide rétro-hydroxamique qui est présent, ce qui nous laisse penser que les deux conformères *Z* et *E* seront également présents en solution (Figure 92 - **A** et **B**).

Pour le composé **184a**, l'étude des spectres RMN du ^1H et du ^{13}C laisse supposer que les deux conformères *Z* et *E* sont présents en solution avec des proportions respectives de 30 et 70 %. Selon la littérature, pour les acides hydroxamiques le méthylène en α du carbonyl a un déplacement chimique plus élevé pour le conformère *E* que pour le conformère *Z*.^{3,4} Par analogie avec ces observations, il est envisageable, qu'en RMN du ^1H , le déplacement chimique du méthylène en α de l'azote de l'acide rétro-hydroxamique se comporte de la même façon. Tenant compte de cette hypothèse, le CH_2 en α de l'azote du conformère *Z* résonnerait à 3,36 ppm alors que celui du conformère *E* aurait un déplacement chimique à

3,77 ppm (Tableau 6 –Entrée 1). Pour le groupement formyle (CHO) deux signaux larges à 7,86 ppm et 8,18 ppm correspondraient aux conformères *Z* et *E* respectivement. En RMN du ^{13}C , le carbonyle le plus déblindé (164,1 ppm) pourrait être attribué au conformère *E* alors que le signal à 159,1 ppm correspondrait au conformère *Z*. Dans le cas du composé *N*-acétylé (**184b**), seul le conformère *E* serait présent en solution, car le déplacement chimique du CH_2 en α de l'azote est très déblindé ainsi que le signal du carbonyle en RMN du ^{13}C (Tableau 6 – Entrée 2).

Entrée	Composés/ Solvant	$\delta(\text{CH}_2)$ en α du de N en ppm (<i>Z/E/Autre</i> forme)	CHO ou CH_3 en ppm (<i>Z/E/Autre</i> forme)	CHO ou CO en ppm (<i>Z/E/Autre</i> forme)	Conformère <i>Z/E/Autre</i> forme (%)
1	184a / CDCl_3	3,36/3,77/-	7,86/8,18/-	159,1/164,1/-	30/70/0
2	184b / CDCl_3	-/3,83/-	-/2,05/-	-/173,5/-	0/100/0
3	30 / D_2O	3,49/3,77/3,72	8,16/8,29/7,90	164,4/165,6/160,5	20/10/70
4	177 / D_2O	-/3,83/3,80	-/2,09/2,08	-/174,6/170,5	0/70/30

Tableau 6 : Proportions des différents conformères observés en RMN du ^1H et ^{13}C pour les molécules **184a** (*N*-H), **184b** (*N*-Me), **30** et **177**.

Dans le cas des molécules totalement déprotégées **30** et **177**, les spectres RMN sont encore plus complexes. En effet, il semblerait qu'une troisième forme soit présente en solution, car trois signaux à différents déplacements chimiques sont présents pour les protons du CH_2 en α de l'azote et pour celui du groupement formyle. Pour les protons du méthylène en α de l'azote, le signal le plus déblindé correspondrait au conformère *E* et le moins déblindé à celui de la conformation *Z*.⁵ Pour le groupement formyle, le comportement semblerait être différent : le conformère *E* résonnerait à champ plus faible que la nouvelle espèce. Au vu de ces observations, il semblerait que la fosfoxacine **30** soit présente sous forme de trois conformères en solution, avec une nouvelle conformation présente à 70 % (Tableau 6 – Entrée 3). Dans le cas du composé **177**, seul deux conformères sont présents en solution. Au vu des déplacements chimiques, il semblerait que dans ce cas la conformation *E* soit majoritaire (70 %) et que la nouvelle conformation soit présente à 30 % (Tableau 6 –Entrée 4). Dans ce cas, il n'y aurait pas formation du conformère *Z*. Le signal à 3,80 ppm pourrait

être attribué à la nouvelle forme présente en solution. A ce stade de nos investigations, il n'a pas été possible d'identifier avec certitude ce nouveau conformère. Nous proposons comme hypothèse qu'après déprotection des groupements benzyles, les hydroxyles libres résultant pourraient former soit une liaison hydrogène intermoléculaire *via* une molécule d'eau conduisant à la formation d'un cycle à huit chaînons (**C**), soit une liaison hydrogène intramoléculaire entre le *N*-OH et un oxygène du phosphate formant un cycle à six chaînons (**D**) (Figure 92 – **C** à **D**). Si le cycle à six était présent en solution, les protons de la chaîne carbonée ne seraient plus équivalents, ce qui se traduirait en RMN du ^1H par l'apparition de signaux supplémentaires. Or une telle observation n'a pas été faite, c'est pourquoi à ce stade de nos recherches, nous pensons que la forme à huit chaînons serait plus favorisée. Des analyses supplémentaires par spectroscopie RMN ou par d'autres moyens spectroscopiques devraient être envisagées afin d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

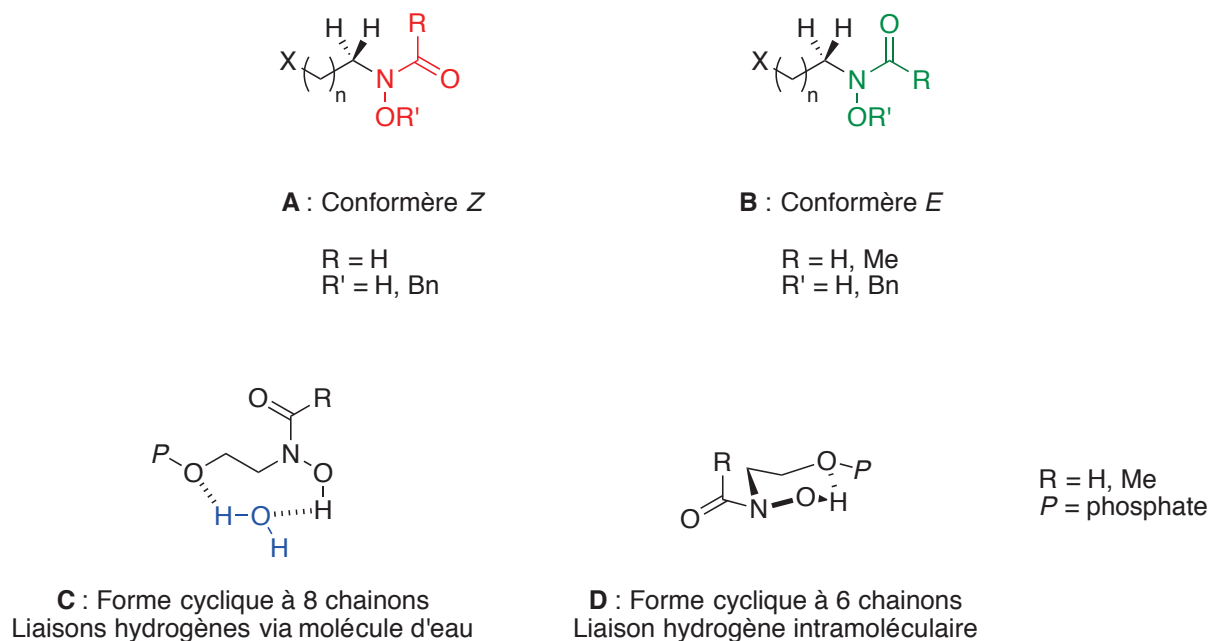


Figure 92 : Les différents conformères d'un acide rétro-hydroxamique (**A** et **B**) et les formes hypothétiques formées après déprotection (**C** à **D**)

2. Synthèse des acides hydroxamiques phosphates 178a et 178b

La β -propiolactone commerciale **185** est traitée avec du chlorhydrate de *O*-benzylhydroxylamine et un large excès de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS) selon la méthode mise au point par Gissot *et al.*⁶ Un équivalent permet la déprotonation du chlorhydrate, un deuxième équivalent permet la formation de l'anion de l'hydroxylamine, un troisième équivalent sert à déprotoner le proton acide de l'hydroxamate formé. Dans le cas d'un ester énolisable ou d'une lactone un quatrième équivalent doit être ajouté afin de déprotoner le proton énolisable en α du carbonyle. Lors de cette étape de formation de l'acide hydroxamique **186a**, un sous-produit correspondant à l'éther de triméthylsilyle de l'alcool primaire est observé. Le brut réactionnel est directement traité avec du fluorure de tétrabutylammonium trihydraté (TBAF.3(H₂O)) dans du THF afin d'obtenir le composé **186a** avec un rendement de 80 % sur deux étapes (Figure 93).

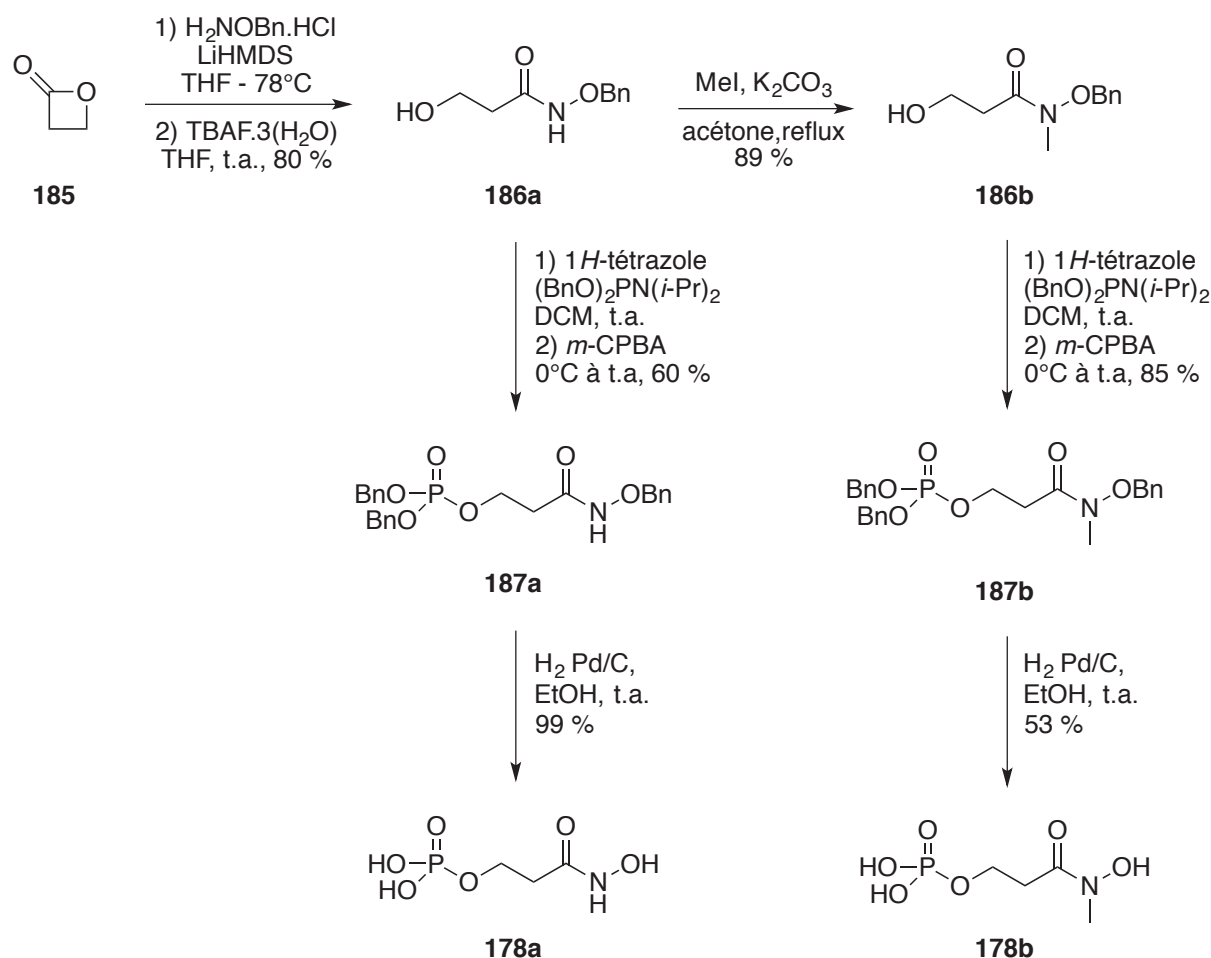
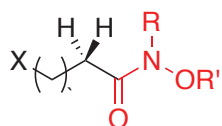


Figure 93 : Synthèse des composés **178a-b**.

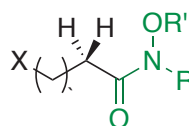
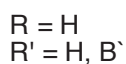
La méthylation sélective de l'acide hydroxamique par rapport à l'alcool primaire est effectuée avec du carbonate de potassium, de l'iodométhane dans de l'acétone à reflux. Le produit *N*-méthylé **186b** a été obtenu avec un bon rendement de 89 %.⁷ La phosphorylation des composés **186a-b** est réalisée dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour obtenir la molécule **181** (Figure 91) permettant d'accéder aux composés **187a-b** avec des rendements respectifs de 60 % et 85 %. L'hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif des molécules protégées **187a-b** permet l'obtention des molécules **178a-b** (Figure 93). De façon surprenante, la réaction est quantitative pour la molécule **178a** alors que pour le composé **178b** l'hydrogénolyse a un rendement moyen de 53 %. Nous n'avons pas cherché à optimiser cette étape, car une faible quantité de produit (5 mg) est suffisante pour réaliser les tests biologiques. Les produits phosphorylés **178a-b** ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs de 48 % et 32 %.

Etude spectroscopique des acides hydroxamiques

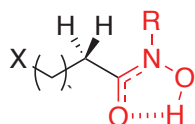
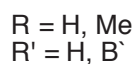
Comme vu lors dans la Partie 1 (cf. « Partie 1 – Synthèse de prodrogues de type cycloSaligényle d'inhibiteur phosphonate de la DXR » p.106), l'introduction d'un acide hydroxamique rend les spectres de RMN complexes. En effet, les acides hydroxamiques sont présents en solution sous la forme de deux conformères *Z* et *E* issus de la rotation restreinte de la liaison C-N (Figure 94 – **A** et **B**).



A : Co` formère *Z*

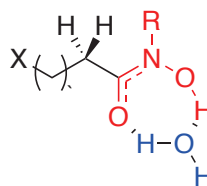


B : Co` formère *E*



C : Co` formère *Z*

Liaiso` hydrogè` e i` tramoléculaire



D : Co` formère *Z*

Liaiso` hydrogè` e avec H₂O

Figure 94 : Les différentes conformations d'un acide hydroxamique.

Le signal du conformère *E* sort à champ plus faible que celui du conformère *Z* ($\delta_{(E)} > \delta_{(Z)}$).^{3,4} De plus, lorsque l'acide hydroxamique est sous forme *N*-H, le conformère *Z* est majoritaire, lorsqu'il est *N*-méthylé c'est le conformère *E* qui est majoritaire.

Dans le cas de la synthèse des molécules **178a-b**, l'acide hydroxamique est introduit lors de la première étape de synthèse. C'est pourquoi, tous les intermédiaires réactionnels sont présents en solution sous la forme de deux conformères *Z* et *E*. Les spectres RMN du ¹H des composés **186a** et **187a** montrent la présence de deux signaux larges pour méthylène en α du carbonyle (Tableau 7 – Entrée 1 et 2). Pour le composé **186a**, le signal à $\delta = 2,32$ ppm correspond au conformère *Z* alors que celui à $\delta = 2,50$ ppm correspond au conformère *E*. Le méthylène du benzyle, groupement protecteur de l'acide hydroxamique, ressent également cette rotation restreinte autour de la liaison C-N. En effet, ce méthylène résonne sous la forme de deux singulets larges à des déplacements chimiques de 4,83 et 4,94 ppm. Dans ce cas, le signal le plus déblindé correspond au conformère *Z*. Enfin, le proton porté par l'azote de l'acide hydroxamique sort également sous la forme de deux signaux larges à 7,87 et 8,31 ppm. Dans ce cas aussi, le signal le plus déblindé correspond au conformère *Z*. En RMN du ¹³C, le carbone en α du carbonyle et le carbone benzylique sortent sous la forme de deux signaux, correspondant également au deux conformères. Pour le composé **178a**, molécule totalement déprotégée, il n'y a plus coexistence des deux conformères en solution, mais d'un seul. En RMN du ¹H et ¹³C, la présence d'un seul conformère est observable avec des déplacements chimiques proches de 2,40 ppm pour le CH₂ en α du carbonyle et d'environ 170 ppm pour le carbonyle (Tableau 7 – Entrée 3). Ces valeurs correspondent à celles attendues pour le conformère *Z*. Cette conformation serait majoritairement favorisée car (i) il peut y avoir formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydroxyle et l'oxygène du carbonyle (Figure 94 – C) (ii) la faible gêne stérique entre le *N*-H et le méthylène en α du carbonyle et (iii) la possibilité de former une liaison hydrogène avec une molécule d'eau (Figure 94 – D).

Entrées	Composés/ Solvant	$\delta(\text{CH}_2)$ en α du CO en ppm (Z/E)	$\delta(\text{NR})$ en ppm (Z/E)	$\delta(\text{CH}_2\text{Ph})$ du NR(OBn) en ppm (Z/E)	$\delta(\text{CO})$ en ppm	Conformères Z/E (%)
1	186a /CDCl ₃	2,33/2,50	8,31/7,87	4,94/4,83	170,2	70/30
2	187a /CDCl ₃	2,32/2,70	8,34/7,72	4,86	167,5	80/20
3	178a /MeOD	2,45	-	4,21	169,8	100/0
4	186b /CDCl ₃	2,62	3,22	4,84	174,8	0/100
5	187b /CDCl ₃	2,73	3,18	4,78	171,6	0/100
6	178b /MeOD	2,87	3,21	4,23	172,8	0/100

Tableau 7 : Proportions des différents conformères observés en RMN du ¹H et ¹³C pour les molécules **186**, **187** et **178** (a = N-H et b = N-méthylé).

Dans le cas des composés N-méthylés, le conformère *E* semble être majoritaire pour les molécules **186b**, **187b**, et **178b** (Tableau 7 – Entrées 4 à 6). Pour ces trois composés, les protons en α du carbonyle apparaissent sous la forme d'un triplet en spectroscopie RMN du ¹H. De plus, ils résonnent à champ faible indiquant qu'il s'agirait du conformère *E*. Pour le composé **178b**, totalement déprotégé, ce n'est pas le conformère *Z* qui est majoritaire comme dans le cas du composé **178a** mais le conformère *E*. Une des explications pourrait être que la stabilisation apportée par les liaisons hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires de la conformation *Z* ne permette pas de compenser les effets occasionnés par la gêne stérique entre le N-CH₃ et le CH₂ en α du carbonyle (Figure 94 – C et D).

III. Détermination des propriétés inhibitrices

La DXR, seconde enzyme de la voie du MEP, transforme le DXP **16** en MEP **17**. La première étape est un réarrangement intramoléculaire de type rétro-aldolisation/aldolisation nécessitant un cation divalent pour former un aldéhyde non isolable **23**. La seconde étape est la réduction de cet aldéhyde par le NADPH.^{8,9} (Figure 18, cf. Introduction générale p.33).

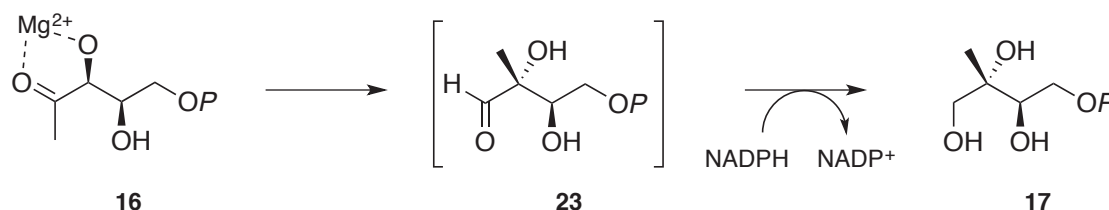


Figure 18 : Réaction catalysée par la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase (DXR).

L'oxydation du NADPH en NADP^+ permet le suivi de la réaction enzymatique par spectroscopie UV/Visible. En effet, la partie nicotinamide réduite du NADPH absorbe à une longueur d'onde de 340 nm alors que la forme oxydée du nicotinamide n'absorbe pas à cette longueur d'onde. Par cette méthode, la vitesse de la réaction enzymatique peut être déterminée en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm. Les composés synthétisés, s'ils se comportent comme des inhibiteurs de la DXR, vont se fixer dans le site actif de l'enzyme et ainsi induire une diminution de la vitesse de transformation du DXP **16** en MEP **17**. L'activité inhibitrice pourra donc être déterminée par comparaison des vitesses de réaction enzymatique en présence ou en absence du composé à tester. Par cette méthode, la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) peut être déterminée. Elle correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour diminuer de 50 % l'activité de l'enzyme. L' IC_{50} dépend des conditions expérimentales utilisées (concentration en substrat utilisée, pré-incubation ou non de l'inhibiteur avec la DXR) lors de la mesure de l'activité enzymatique. La comparaison des valeurs d' IC_{50} mesurées ne peut se faire que pour des tests réalisés dans les mêmes conditions opératoires.

La vitesse de transformation du DXP **16** en MEP **17** a été mesurée en absence (V_0) et en présence d'inhibiteur à des concentrations différentes (V_i). Pour chaque concentration en inhibiteur, un pourcentage d'activité résiduelle est calculé, qui est le rapport entre la vitesse de

réaction en présence d'inhibiteur et la vitesse de réaction en absence d'inhibiteur multiplié par 100 ($\% = V_i/V_0 \times 100$). L' IC_{50} peut alors être déterminée en traçant le pourcentage d'activité en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur.

Les différents analogues phosphates **30**, **177** et **178a-b** ont été testés sur des recombinants His-tagged de la DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis*.^{10,11} Pour notre étude d'inhibition, la DXR a été incubée pendant 2 min en présence de NADPH et de l'inhibiteur avant de démarrer la réaction enzymatique par addition du DXP. En effet, nous supposons que ces composés sont, comme la fosmidomycine, des inhibiteurs de type slow-binding.¹² C'est pourquoi la pré-incubation de l'enzyme avec les molécules à tester en présence de NADPH a été réalisée. Par ailleurs, la fosmidomycine **28**, dont l' IC_{50} est d'environ 50 nM, est utilisée comme témoin positif.

Les tests enzymatiques pour déterminer les propriétés inhibitrices des inhibiteurs potentiels **30**, **177** et **178a-b** ont été effectués par le Dr. Denis Tritsch, et les IC_{50} obtenues ont été comparées à celles des inhibiteurs naturels **28** et **29** ainsi qu'à celle des acides phosphonohydroxamiques **42** et **43** (Figure 95).

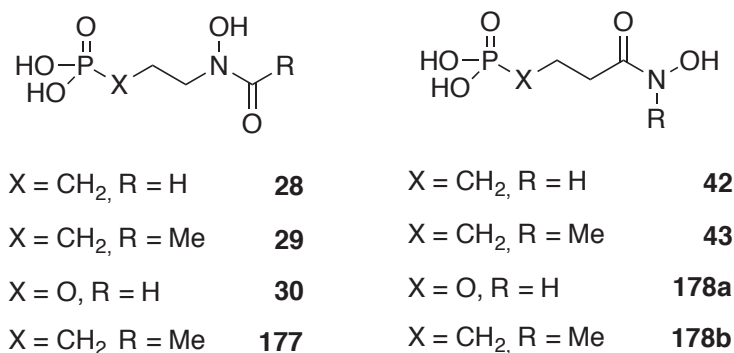


Figure 95 : Inhibiteurs naturels et synthétiques phosphonates ou phosphates testés sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis*.

L'analogue méthylé de la fosfoxacine **177** et le dérivé **178b** ont des IC_{50} comparables à celle de la fosmidomycine **28** sur la DXR d'*E. coli*, faisant de ces deux composés de bons inhibiteurs. Ils sont cependant 12 et 20 fois moins actifs (IC_{50} = 46 nM et 77 nM) que le FR-900098 **29** (IC_{50} = 4 nM), un autre inhibiteur naturel de la DXR (Tableau 8). La fosfoxacine **30** (IC_{50} = 342 nM) et le composé *N*-H **178a** (IC_{50} = 2600 nM) sont de moins bons inhibiteurs que la fosmidomycine **28** et le FR-900098 **29** sur la DXR d'*E. coli*. Ces résultats ne sont pas

tout à fait en accord avec les travaux de l'équipe de Proteau, qui ont évalué que la fosfoxacine **30** et son analogue méthylé **177** avaient des K_i respectifs de 19 nM et 2 nM sur la DXR de *Synechocystis* sp. PCC6803 contre une K_i de 57 nM pour la fosmidomycine.²

Composés	DXR <i>E. coli</i> IC ₅₀ (nM)	DXR <i>M. smegmatis</i> IC ₅₀ (nM)
Fosmidomycine 28	42	510*
FR-900098 29	4	320*
42	170	1480*
43	48	410*
Fosfoxacine 30	342	2100
177	77	279
178a	2600	9200
178b	46	233

Tableau 8 : IC₅₀ obtenues sur la DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis* pour les différents inhibiteurs naturels et synthétiques. * voir référence¹¹

Bien que les tests soient effectués sur la même enzyme, cette dernière provient de bactéries différentes, ce qui a pour conséquence d'impliquer des différences structurales au niveau du site actif de l'enzyme. Ces modifications structurales bien que mineures peuvent avoir une influence sur la stabilisation du complexe enzyme-inhibiteur. La DXR de *M. smegmatis* et d'*E. coli* ont, par exemple, des affinités très différentes pour la fosmidomycine et ses analogues. Sur la DXR de *M. smegmatis*, la même tendance a été observée que sur la DXR d'*E. coli*. Les composés **177** et **178b** sont toutefois de meilleurs inhibiteurs que les molécules **29** et **43**, car leurs IC₅₀ sont respectivement de 279 nM et 233 nM contre des IC₅₀ de 320 nM pour le FR-900098 **29** et 410 nM pour **43**.¹¹ Comme précédemment, la fosfoxacine **30** et l'analogue *N*-H **178a** sont de moins bons inhibiteurs que le composé de référence.

Les résultats obtenus pour les molécules **177** et **178b** sont très encourageants, montrant que les dérivés phosphates sont capables d'inhiber les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Par la suite, les composés **30**, **177** et **178** ont été testés *in vivo* sur des souches d'*E. coli* avec la méthode de diffusion en milieu gélosé. Le test effectué est fondé sur la méthode de diffusion. Ce test consiste à déposer une quantité définie d'inhibiteur sur un disque de

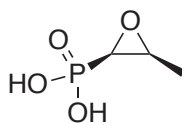
papier ou antibiogramme en présence d'une culture de bactéries dans une boîte de Petri. L'inhibition de la division cellulaire se traduit par l'apparition d'une zone circulaire dépourvue de bactéries et dont le diamètre traduit le pouvoir inhibiteur du composé testé. Plus le diamètre est grand, plus l'inhibiteur est efficace. L'efficacité de l'inhibition est comparée à celle induite par leurs homologues en série phosphonate la fosmidomycine **28**, le FR-900098 **29**, et les acides phosphonohydroxamique **42** et **43** précédemment synthétisés au laboratoire.¹⁰ Les résultats sont obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C (Figure 96 - A - Tableau 9).

Composés	Quantité (nanomoles)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Composés	Quantité (nanomoles)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
28	2	34	30	160	24
29	2	32	177	100	27
42	400	12	178a	400	<10
43	80	30	178b	160	20

Tableau 9 : Diamètres d'inhibition obtenus sur des cultures d'*E. coli* pour les différents inhibiteurs.

Bien qu'il soit nécessaire d'avoir une quantité en inhibiteur supérieure à celle des molécules de référence **28** et **29**, certains composés comme **43**, **30**, **177** et **178b** sont capables d'inhiber la croissance d'*E. coli* prouvant que ces molécules peuvent pénétrer au sein de la bactérie. L'efficacité moindre pour inhiber la croissance d'*E. coli* peut s'expliquer par une incorporation plus lente des inhibiteurs phosphates par rapport aux inhibiteurs phosphonates. Le composé **43** qui inhibe la DXR d'*E. coli* avec une IC₅₀ comparable à celle de la fosmidomycine est beaucoup moins efficace pour inhiber la croissance bactérienne.¹⁰ De plus, les inhibiteurs phosphates sont susceptibles d'être hydrolysés par les phosphatases non spécifiques localisées au niveau de la membrane plasmique et peuvent ainsi être inactivés lors de la traversée de la paroi bactérienne. Cette hypothèse peut expliquer pourquoi de fortes quantités en inhibiteur phosphate sont nécessaires pour conduire à une inhibition de la croissance bactérienne. Chez *E. coli*, la fosmidomycine est prise en charge par les transporteurs du glycérol 3-phosphate (GlpT) et/ou glucose 6-phosphate (UhpT).^{13,14,15} Ces deux transporteurs permettent la pénétration intracellulaire de nutriments essentiels mais également celle d'un antibiotique hydrophile, la fosfomycine **188** impliquée dans l'inhibition

de la pyruvyl-transférase responsable de la première étape de la biosynthèse du peptidoglycane.¹⁶



Fosfomycine **188**

Au niveau des disques d'inhibitions des molécules **177** et **178a-b**, il y a la présence de clones résistants comme c'est le cas avec les deux inhibiteurs naturels **28** et **29** (Figure 96 - **A** - points blancs persistants au niveau de la zone d'inhibition). Une des causes de la résistance à la fosmidomycine et à la fosfomycine est la modification des transporteurs GlpT et UhpT due à une mutation génétique les rendant inopérants. Une souche résistante à la fosmidomycine (FosR) a été isolée et caractérisée. La séquence des deux gènes GlpT et UhpT a révélé qu'ils étaient bien mutés et que les transporteurs ne sont pas fonctionnels. La sensibilité de cette souche aux différents inhibiteurs a été déterminée (Figure 96 – **B**). Seul le composé **43** reste capable d'inhiber, certes à un degré moindre, la croissance d'*E. coli* suggérant que cet inhibiteur pénètre également par un autre transporteur dans la bactérie. Les autres inhibiteurs et donc les quatre molécules phosphates **30**, **177** et **178a-b** n'ont pas permis d'empêcher la croissance des souches résistantes d'*E. coli*. Au vu de ces résultats, il semblerait que les quatre molécules phosphates utilisent les transporteurs GlpT et/ou UhpT pour pénétrer dans la bactérie.

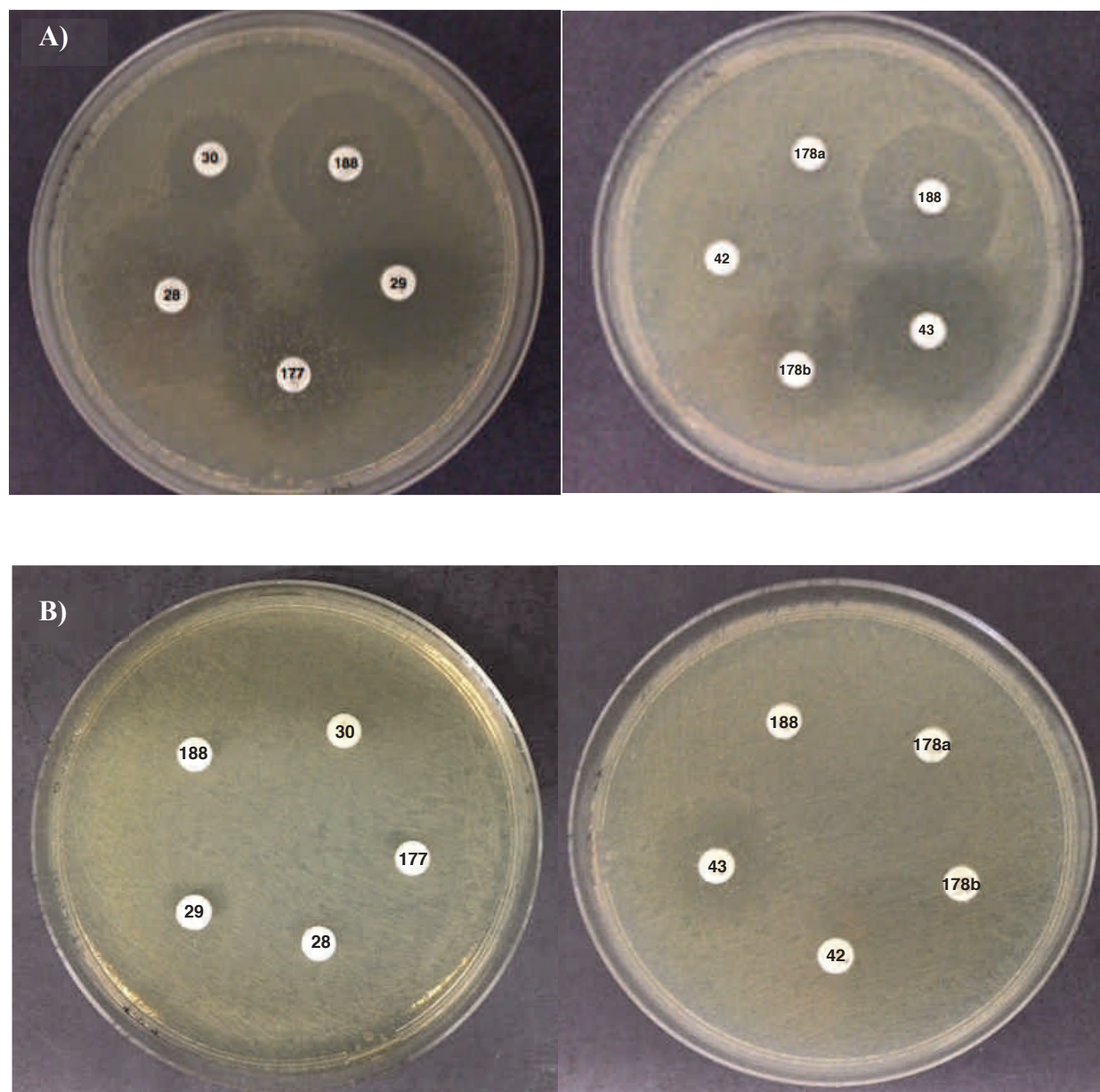


Figure 96 : A) Inhibition de la croissance d'*E. coli* par la fosmidomycine **28** et ses analogues naturels et synthétiques.
 B) Diamètre d'inhibition des clones d'*E. coli* résistants (FosR) avec la fosmidomycine et ses analogues naturels et synthétiques (Diamètre d'inhibition pour **43** : 18 mm)

Les tests d'inhibition *in vitro* sur la DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis* mais également les tests *in vivo* sur des cultures d'*E. coli* nous encouragent à poursuivre nos investigations bien que ces molécules n'ont aucun effet sur la croissance de *M. smegmatis*. En effet, les mycobactéries ont une paroi très lipophile ce qui empêche la diffusion passive de molécules polaires. De plus, les mycobactéries sont connues pour être des bactéries ayant très peu de porines ou de transporteurs. Des études ont montré que ces mycobactéries ne possèdent pas

les transporteurs GlpT et UhpT nécessaires à l'incorporation des inhibiteurs de la DXR. Afin de pallier ces problèmes de biodisponibilité, la synthèse de prodrogues des inhibiteurs **30**, **177** et **178a-b** nous semble être un bon moyen de favoriser leur diffusion passive à travers la paroi et la membrane plasmique de ces bactéries. De plus, la synthèse de prodrogues semble également être un bon moyen de masquer le groupement phosphate vis à vis des phosphatases localisées dans la membrane plasmique des bactéries. Contrairement à *M. smegmatis*, *E. coli* est connue pour avoir une faible activité estérasique dans son cytoplasme, c'est pourquoi le choix d'une prodrogue dont le mécanisme de libération est uniquement régi par le pH semble être judicieux.

IV. Conclusion

Dans cette partie, nous avons décrit la synthèse d'un inhibiteur naturel, la fosfoxacine **30** de son analogue méthylé **177** et de deux inhibiteurs inédits de type phosphates **178a** et **178b**. Ces composés ont été obtenus avec des rendements globaux compris entre 32 et 48 %. Ces molécules ont ensuite été testées *in vitro* sur les DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis*. Les composés **177** et **178b** sont de bons candidats car ils ont des IC₅₀ comparables à celles obtenues par la fosmidomycine **28** sur les DXR de ces deux souches. Ces dérivés ont également été testés *in vivo* sur des cultures d'*E. coli*. Les composés phosphates **30**, **177** et **178b** sont capables d'inhiber la croissance des bactéries sur milieu gélosé donc de traverser la paroi bactérienne grâce à deux transporteurs. Ces composés sont inefficaces chez *M. smegmatis*. Cela pourrait être dû à l'absence des transporteurs. Pour pallier aux problèmes de biodisponibilité de ces molécules polaires et ainsi augmenter leurs pénétrations au sein de la bactérie, la synthèse de ces composés sous forme de prodrogues masquant le groupement phosphate est envisagée. Nous avons choisi une prodrogue de type cycloSaligényle, connue pour être un groupe masquant le monophosphate d'un nucléoside. La synthèse et la détermination des propriétés inhibitrices des prodrogues des inhibiteurs **30**, **177** et **178a-b** sont décrites dans la section suivante (cf. Chapitre I – Partie 3 p.138).

- (1) Katayama, N.; Tsubotani, S.; Nozaki, Y.; Harada, S.; Ono, H. Fosfadecin and Fosfocytocin, New Nucleotide Antibiotics Produced by Bacteria. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 238–246.
- (2) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375–2385.
- (3) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Girmay, B. *Cis-Trans* Isomerism in Monoalkylhydroxamic Acids by ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 970–973.
- (4) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Mohammed, S. A. ^1H and ^{13}C NMR Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 40–45.
- (5) Kolasa, T. The Conformational Behaviour of Hydroxamic Acids. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1753–1754.
- (6) Gissot, A.; Volonterio, A.; Zanda, M. One-Step Synthesis of *O*-Benzyl Hydroxamates from Unactivated Aliphatic and Aromatic Esters. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6925–6928.
- (7) Sharma, S. K.; Miller, M. J.; Payne, S. M. Spermaxatin and Spermaxatol: New Synthetic Spermidine-Based Siderophore Analogues. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 357–367.
- (8) Kuzuyama, T.; Takahashi, S.; Watanabe, H.; Seto, H. Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate from 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4509–4512.
- (9) Takahashi, S.; Kuzuyama, T.; Watanabe, H.; Seto, H. A 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Catalysing the Formation of 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate in an Alternative Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9879–9884.
- (10) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (11) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285.

- (12) Koppisch, A. T.; Fox, D. T.; Blagg, B. S. J.; Poulter, C. D. *E. coli* MEP Synthase: Steady-State Kinetic Analysis and Substrate Binding. *Biochemistry* **2002**, *41*, 236–243.
- (13) Mine, Y.; Kamimura, T.; Nonoyama, S.; Nishida, M.; Goto, S.; Kuwahara, S. *In vitro* and *in vivo* Antibacterial Activities of FR-31564, a New Phosphonic Acid Antibiotic. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 36–43.
- (14) Sakamoto, Y.; Furukawa, S.; Ogihara, H.; Yamasaki, M. Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (cya) Mutants of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 2030–2033.
- (15) Winkler, H. H. Distribution of an Inducible Hexose-Phosphate Transport-System among Various Bacteria. *J. Bacteriol.* **1973**, *116*, 1079–1081.
- (16) Tsuruoka, T.; Yamada, Y. Characterization of Spontaneous Fosfomycin (phosphonomycin)-Resistant Cells of *Escherichia coli* B *in vitro*. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 906–911.

Partie 3 : Prodrogues de type *cycloSaligényle* d'inhibiteurs phosphates de la DXR.

I. Test de stabilité du *cycloSaligényle* phosphate à différents pH

La prodrogue de type *cycloSaligényle* a la particularité de ne pas faire appel à une ou plusieurs enzymes pour le mécanisme de libération de la substance active. La substitution du cycle aromatique en position C-3 ou C-5 par différents groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs a pour conséquence de diminuer ou d'augmenter la vitesse de réaction de ce mécanisme (Figure 97).¹

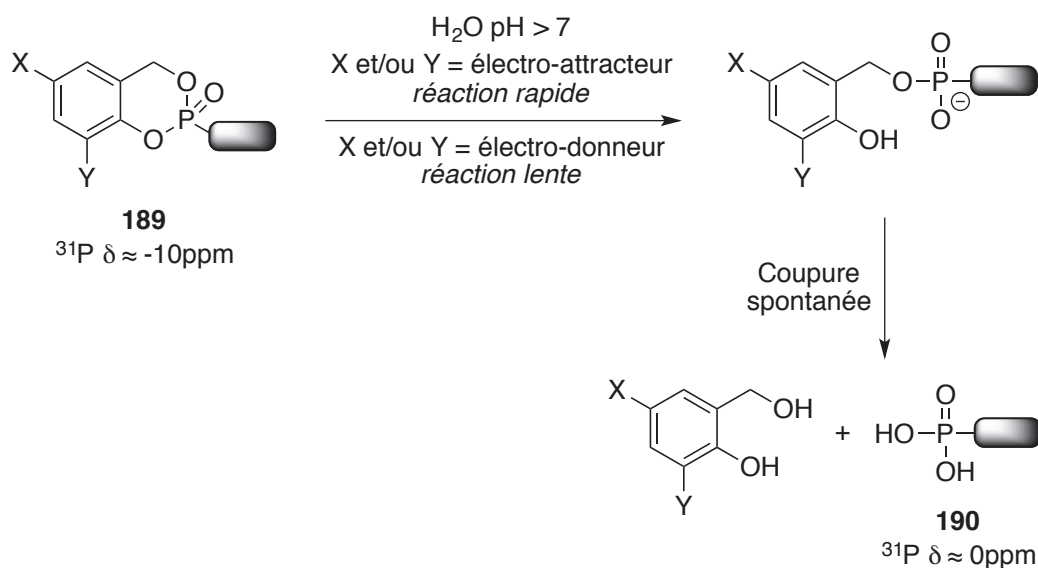


Figure 97 : Mécanisme général de libération de la prodrogue *cycloSaligényle*.

Cette vitesse de réaction, et par conséquent la stabilité chimique du *cycloSaligényle*, peut être suivie par RMN du ^{31}P à différents pH. En effet, le phosphore est un noyau très sensible à son environnement chimique ce qui se traduit par une différence de déplacement chimique en RMN. C'est pourquoi il est judicieux de penser que le phosphore de la prodrogue **189** ne résonnera pas à la même fréquence que le phosphore du produit totalement libéré **190**. Pour ce faire nous nous proposons de faire un suivi de la stabilité de ce type de prodrogue par

RMN du ^{31}P sur des *cycloSaligényles* substitués soit par des groupements électro-donneurs soit par des groupements électro-attracteurs dans différents tampons phosphates (pH = 6, 7 et 8). Différentes mesures seront effectuées à différents temps. L'analyse des spectres RMN permettra de déduire la proportion des molécules de type **189** et **190** à différents temps. Un graphique représentant la proportion de chaque prodrogue à différents pH en fonction du temps sera tracée. La lecture graphique du temps où 50 % de la prodrogue est consommée nous permettra d'estimer de manière quantitative le temps de demi-vie de chaque prodrogue pour les différents pH.

Pour cette étude, nous avons synthétisé les molécules modèles **191a-d** ainsi que le composé **192**, produit de libération lors de l'hydrolyse du *cycloSaligényle* (Figure 98). Contrairement au saligénol **129** les dérivés d'alcool salicylique **194b-d** ne sont pas commerciaux. Les acides carboxyliques correspondants sont préalablement réduits avec du tétrahydruroaluminate de lithium (LiAlH_4) dans du THF afin d'obtenir les alcools **194b-d** avec des rendements compris entre 71 et 88 % (Figure 98).

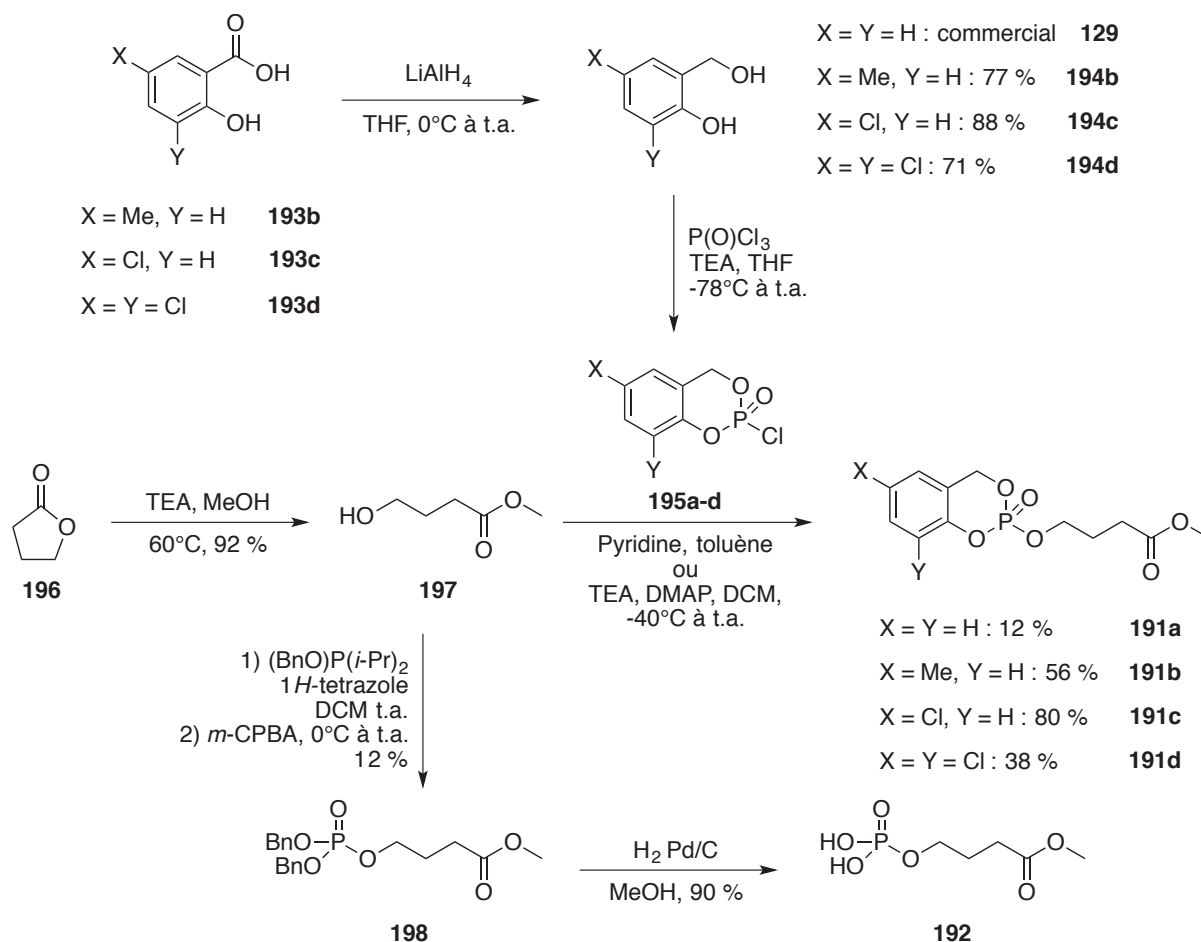


Figure 98 : Synthèse des prodrogues **191a-d** et du composé phosphate **192**.

Les *cycloSaligényl*phosphochloridates **195a-d** sont formés par réaction des composés **129** et **194b-d** avec du POCl₃ en présence de triéthylamine (TEA).² Les bruts réactionnels ne sont pas purifiés et directement engagés dans la réaction d'addition-élimination avec le 4-hydroxybutanoate de méthyle **197** obtenu par ouverture de la γ -butyrolactone commerciale **196** par le méthanol.³ Les réactions d'addition-élimination de l'alcool primaire **197** sur les *cycloSalphosphochloridates* **195a-b** ont été réalisées dans un mélange pyridine/toluène, comme décrit dans la littérature (Figure 98).⁴ Les composés **191a** et **191b** ont été obtenus avec de modestes rendements de 12 % et 56 %, ce qui peut s'expliquer par le fait que les composés **195a-b** n'étaient pas très solubles dans le toluène comme indiqué dans la publication. Une méthode alternative utilisant de la TEA, de la *N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP) dans du DCM a été développée au laboratoire, permettant d'accéder aux composés **191c-d** avec des rendements respectifs de 80 % et 38 %. Pour la molécule **191d**, le faible rendement peut s'expliquer par le fait que le composé se dégrade lors de la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Parallèlement, la synthèse du composé sans groupement *cycloSaligényle* **192** a également été réalisée, car cette molécule est libérée lors de l'étape d'ouverture des prodrogues. La phosphorylation du composé **197** avec le *N,N*-diisopropylphosphoramidite de dibenzyle en présence de 1*H*-tétrazole dans du DCM suivie de l'oxydation avec du *m*-CPBA a permis d'accéder au phosphate protégé **198**. La déprotection par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon actif permet finalement d'obtenir le phosphate libre **192** avec un rendement de 90 % (Figure 98). Nous n'avons toutefois pas cherché à optimiser les synthèses des composés **191a-d** et **192**, car une faible quantité de produit est nécessaire pour l'analyse de ces composés par spectroscopie de RMN.

Avant d'envisager les tests de stabilité des composés **191a-d**, nous avons procédé à l'analyse spectroscopique par RMN du ³¹P du composé **192** dans différentes solutions tampons (pH = 6, 7 et 8). Ces trois valeurs nous permettront d'évaluer le déplacement chimique de la molécule libérée lors de l'étude de stabilité des composés **191a-d**. Différents échantillons de **192** dans différents tampons phosphates ont été préparés à une concentration de 6 mM dans un mélange CD₃OD/H₂O/tampon phosphate. Les déplacements chimiques de ce composé à différents pH sont récapitulés dans le Tableau 10 – Entrée 1.

Entrées	Composés	Concentration en prodrogue	RMN du ^{31}P δ (ppm) pH = 6	RMN du ^{31}P δ (ppm) pH = 7	RMN du ^{31}P δ (ppm) pH = 8
1	192	6 mM	1,61	0,65	1,56
2	191a	7 mM	-7,76	-7,76	7,76
3	191b	10 mM	-7,62	-7,62	-7,62
4	191c	10 mM	-9,87	-8,37	-8,39
5	191d	10 mM	-8,86	-8,85	-8,84

Tableau 10 : Déplacements chimiques des prodrogues **191a-d** et du composé phosphate **192** en RMN du ^{31}P à différents pH et à $t = 0$.

L'étude de la stabilité des prodrogues **191a-d** et l'estimation du temps de demi-vie ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. Chaque molécule est solubilisée dans un mélange $\text{CD}_3\text{OD}/\text{H}_2\text{O}$ et dans du tampon phosphate à différents pH afin d'obtenir une concentration finale en prodrogue de 10 mM environ. Les différents échantillons sont ensuite incubés à 37 °C. Des mesures spectroscopiques ont été effectuées à différents temps (t). A $t = 0$, le profil des spectres RMN de tous les échantillons est le même, laissant apparaître deux signaux : un correspondant au tampon phosphate ($\delta = 0\text{-}2$ ppm) et un autre correspondant aux prodrogues **191a-d** ($\delta = -7$ à -10 ppm) (Tableau 10 – Entrées 2 à 5). Au fil du temps et pour chaque composé, l'intensité du signal correspondant à la prodrogue diminue alors que celui du composé **192** augmente, prouvant que le composé **192** est bien libéré (Figure 99 – Exemple pour la molécule **191a**).

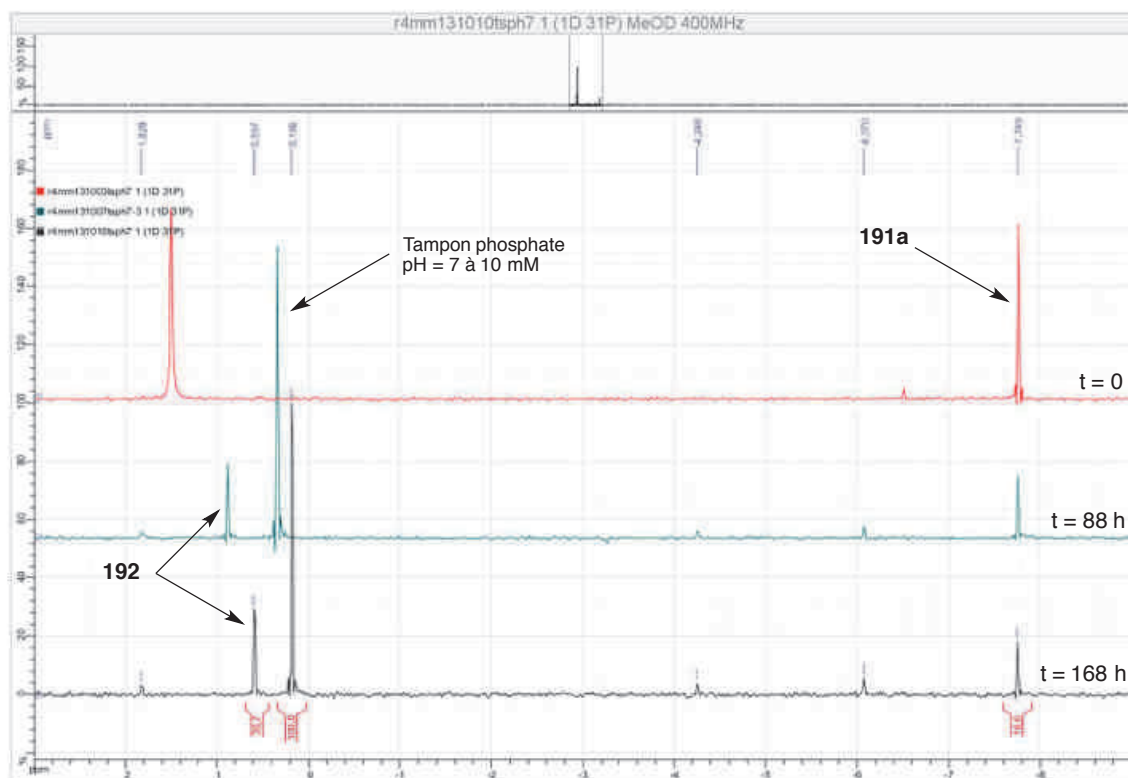


Figure 99 : Agrandissement du spectre RMN du ^{31}P de la molécule **191a** à pH = 7 à différents temps

L'hydrolyse de la molécule **191a** (6 mM) dans un tampon phosphate (10 mM) à pH = 7 est suivie par RMN du ^{31}P et réalisée. L'échantillon est incubé à 37°C.

L'analyse de l'ensemble des spectres RMN a permis de déterminer les proportions en prodrogue **191a-d** et en phosphate **192** à différents temps. Pour ce faire nous avons supposé que la quantité en tampon phosphate ne variait au cours du fonction du temps. Pour chaque composé incubé à différent pH, un graphique de la proportion de chaque molécule en fonction du temps a été tracé. Par lecture graphique nous avons pu déterminer de façon quantitative le temps de demi-vie des molécules **191a-d** dans différentes conditions (Tableau 11). Les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des composés **191a-c** à pH = 6 n'ont pas pu être déterminés car la libération du phosphate **192** est trop longue (supérieur à 7 jours). Pour le *cyclo*Saligényle non substitué **191a** les $t_{1/2}$ à pH = 7 et 8 sont respectivement de 71 h et 26 h, montrant que la molécule est moins stable à pH basique, ce qui est en accord avec la littérature.⁵ Lorsque le *cyclo*Saligényle est substitué par un groupement méthyle **191b**, les $t_{1/2}$ augmentent par rapport à ceux de la molécule **191a**. Le groupement méthyle enrichit la densité électronique du noyau aromatique

par effet inductif donneur, ce qui a pour conséquence de ne pas favoriser la rupture de l'ester phénolique de phosphate.

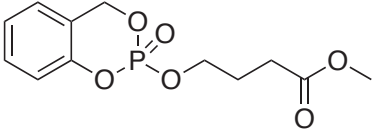
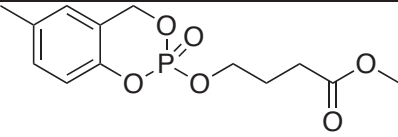
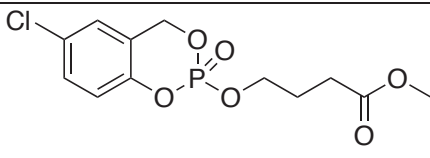
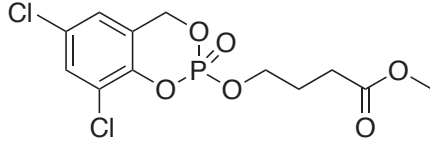
Composés	$t_{(1/2)}$ pH = 6	$t_{(1/2)}$ pH = 7	$t_{(1/2)}$ pH = 8
 191a	> 7 j	71 h	26 h
 191b	> 7 j	> 7 j	66 h
 191c	> 7 j	34 h	12 h
 191d	14,5 h	6,5 h	1,5 h

Tableau 11 : Temps de demi-vie des molécules **191a-d** à différents pH.

Au contraire, la substitution du cycle aromatique par un ou deux atomes de chlore (**191c-d**) diminue de façon considérable les temps de demi-vie. A un pH de 7, l'hydrolyse de la molécule **191c** est deux fois plus rapide que celle de **191a**. Dans ces mêmes conditions, celle de **191d** est onze fois plus rapide que celle de **191a**. Cette diminution des temps de demi-vie peut être expliquée par la nature électro-attractrice des atomes de chlore. En effet, ces halogènes appauvrissent le noyau aromatique ce qui favorise la rupture de la liaison P-O

de l'ester phénolique de phosphate, car la charge résultante sera délocalisée sur le cycle aromatique.

Les tests de stabilité effectués sur les quatre molécules modèles sont en accord avec les résultats de la littérature.^{5,6} En effet, la libération du phosphate libre est uniquement régie par le pH, car aucune enzyme n'intervient dans la libération. Plus le pH est élevé plus la réaction est rapide. Le pH n'est cependant pas le seul facteur influençant la vitesse de libération, car la substitution du cycle aromatique par des groupements aux effets électroniques opposés module également l'étape d'hydrolyse chimique.

Nous allons maintenant entreprendre la synthèse de prodrogues de type cycloSaligényle des inhibiteurs phosphates **30**, **177**, **178a** et **178b** de la DXR (cf. Chapitre I – Partie 2 p.120). Nous allons évaluer leurs capacités à inhiber la croissance des souches d'*E. coli* et *M. smegmatis* et voir si la vitesse de libération a une incidence sur l'activité inhibitrice des molécules. En effet, si la vitesse de libération est trop rapide, la substance active sera libérée dans le milieu extracellulaire et sa pénétration par diffusion passive sera empêchée. Au contraire si la vitesse de libération est trop lente, la diffusion passive de la prodrogue à travers la membrane sera possible, mais le produit d'hydrolyse et/ou la prodrogue elle-même pourront être inactivés au sein de la bactérie. Il est donc important que la vitesse de libération ne soit ni trop lente ni trop rapide, afin de permettre la pénétration de la prodrogue dans la cellule tout en évitant la dégradation de l'inhibiteur libéré.

II. Synthèse des prodrogues de type *cycloSaligényle* d'inhibiteurs phosphates de la DXR

Les composés **30**, **177** et **178a-b** ont été synthétisés et testés sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis* ainsi qu'*in vivo* sur des cultures de ces deux souches (cf. Chapitre I – Partie 2 p. 120). Les candidats **30**, **177** et **178b** sont capables d'inhiber la croissance d'*E. coli* en milieu gélosé, cependant ces molécules portent un groupement phosphate qui diminue leur biodisponibilité. C'est pourquoi la synthèse de prodrogues de type *cycloSaligényle* de ces composés a été envisagée et décrite dans cette section. Les molécules **199** et **200** sont les prodrogues *cycloSaligényle* des molécules **30** et **177** alors que les molécules **201** et **202** sont les prodrogues des molécules **178a-b** (Figure 100).

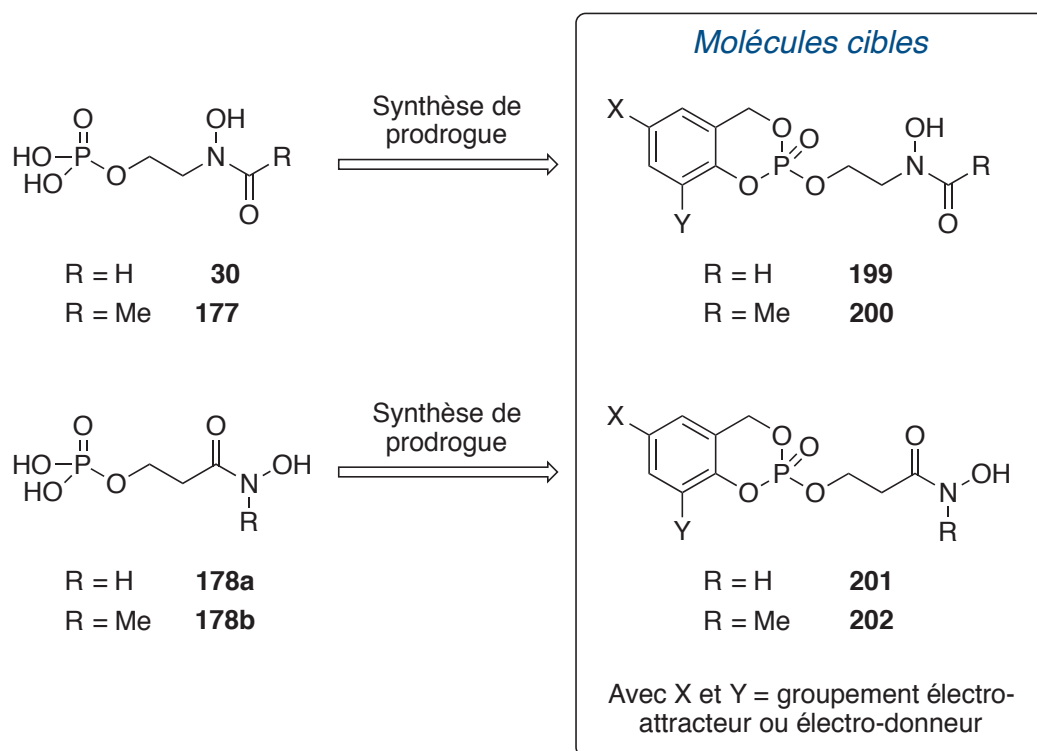


Figure 100 : Molécules cibles **199**, **200**, **201** et **202**.

1. Schémas rétrosynthétiques pour la synthèse des composés **199-200** et **201-202**

Les molécules cibles **199** et **200** pourraient être obtenues par déprotection sélective d'un groupement protecteur de l'acide rétro-hydroxamique convenablement choisi (Figure 101). Ces précurseurs **A** pourraient être obtenus par une réaction d'addition-élimination des alcools primaires **B** sur différents *cyclo*Salphosphochloridates **C**. Ces chlorures de phosphate peuvent être synthétisés à partir de différents dérivés d'alcool salicylique **D**, eux-mêmes obtenus par réduction de dérivés commerciaux d'acide salicylique **E**. Parallèlement, la synthèse des synthons **B** comprenant les motifs acides rétro-hydroxamiques *N*-acétylés ou *N*-formylés sera effectuée. L'introduction du motif acide rétro-hydroxamique pourrait être réalisée en deux temps : la substitution nucléophile d'une hydroxylamine convenablement protégée sur un dérivé d'éthylène glycol permettrait l'obtention de l'intermédiaire **F**, puis son acétylation ou sa formylation permettrait d'accéder aux synthons **B** (Figure 101).

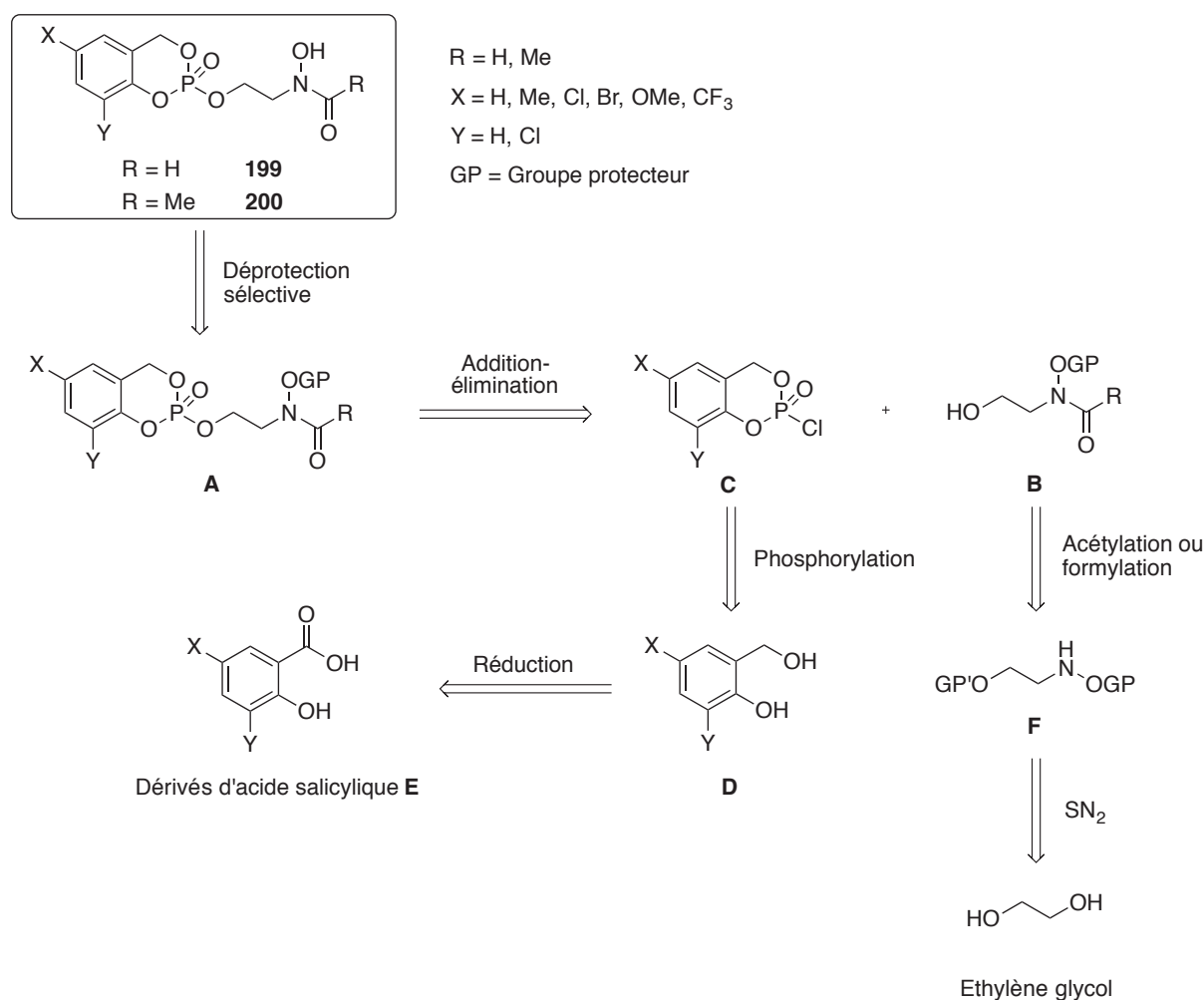


Figure 101 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention des molécules cibles **199** et **200**.

Les prodrogues **201** et **202** pourraient être obtenues de la même manière que les molécules **199** et **200**. Les intermédiaires **G**, précurseurs des prodrogues **201** et **202**, pourraient être obtenus par une réaction d'addition-élimination des intermédiaires **H** sur des dérivés de *cyclo*Salphosphochloridates **C**, qui seraient obtenus comme précédemment (Figure 102). La différence par rapport à la synthèse des composés **199** et **200** réside essentiellement dans la synthèse des intermédiaires **H**. Dans ce cas, ce n'est plus un acide rétro-hydroxamique mais un acide hydroxamique qui est nécessaire à l'élaboration des composés cibles. L'introduction de ce motif hydroxamate pourrait être effectuée par une réaction d'addition-élimination d'une hydroxylamine convenablement protégée sur la β -propiolactone commerciale afin d'obtenir les synthons **H** (*N*-H ou *N*-méthylé) (Figure 102).

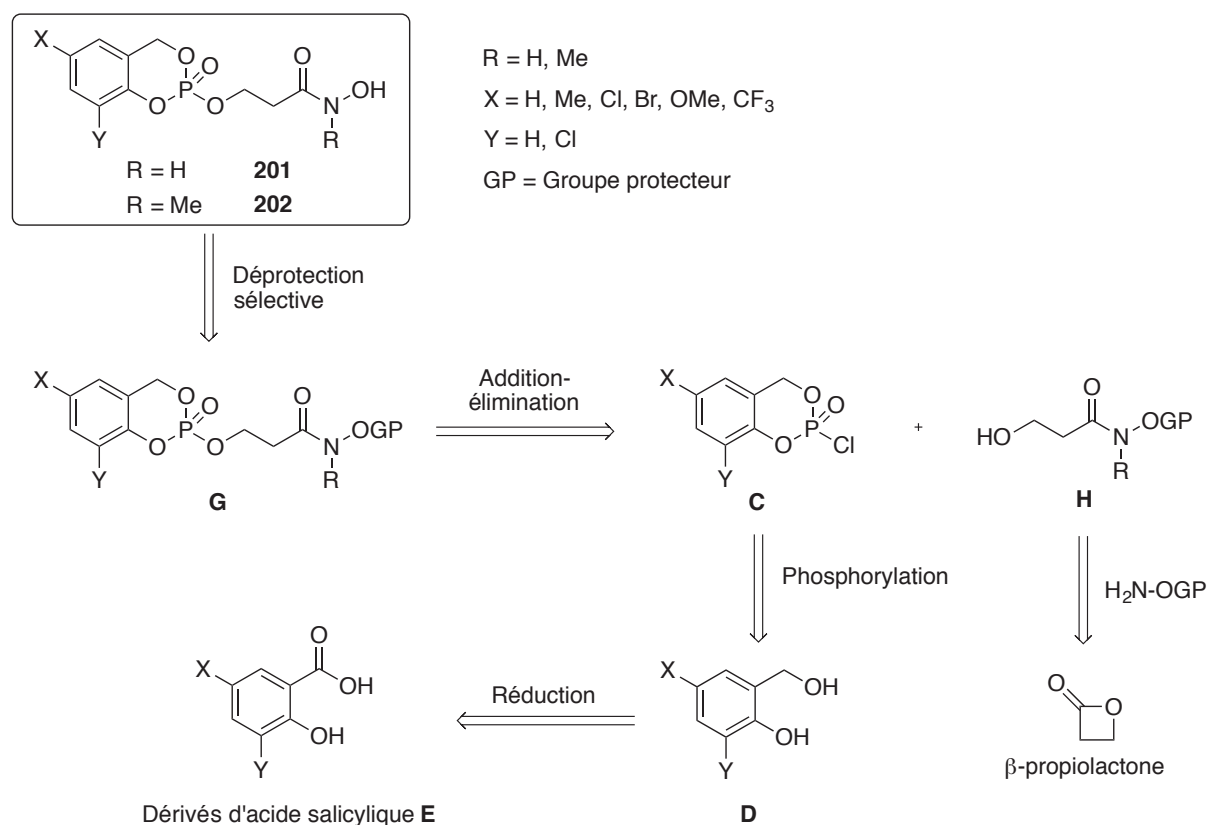


Figure 102 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention des molécules cibles **201** et **202**

2. Synthèse des intermédiaires de type B et H

Le choix du groupement protecteur est primordial dans la synthèse de prodrogues *cyclo*Saligényle. En effet, nous avons vu lors de la synthèse des prodrogues phosphonates (cf.

Chapitre I – Partie 1 p.106) que le groupement protecteur ne pouvait pas être un groupement de type benzyle car ce dernier est trop stable et Ruda *et al.* ont donc décrit la synthèse d'une hydroxylamine protégée par un groupement 2,4-diméthoxybenzyle **175** (H₂NODMB – Figure 87 p.114).⁷ Ce type de groupement est compatible avec une synthèse comprenant un *cycloSaligényle*, car sa déprotection peut être réalisée avec une solution de TFA à 2 ou 3 % dans du DCM.

Dans un premier temps, la substitution nucléophile de l'hydroxylamine **175** sur un dérivé halogéné protégé **204a**,⁸ obtenu à partir du 2-chloroéthanol **203**, a été réalisée dans les conditions décrites par Fonvielle *et al.* à savoir dans l'éthanol à reflux (Figure 103, Tableau 12 – Entrée 1).⁹ Ces conditions n'ont pas permis l'obtention de l'hydroxylamine attendue **205**, car lors de la réaction il n'y a pas consommation du produit de départ. Ce résultat étant peut être dû au choix de l'halogène, nous avons décidé de remplacer le chlore par un iode, meilleur groupement partant. Une réaction de Finkelstein sur le composé **204a** permet d'obtenir le composé **204b** sans purification (Figure 103).^{10,11} La RMN du ¹H ne nous a pas permis d'affirmer que le produit **204b** a été obtenu, car les déplacements chimiques des protons en alpha du chlorure et de l'iodure sont quasiment identiques. En revanche, une différence de déplacement chimique entre le carbone en alpha d'un chlore ou d'un iode. ($\delta(\text{CH}_2\text{Cl}) = 45,4$ ppm vs $\delta(\text{CH}_2\text{I}) = 7,10$ ppm) est observée en RMN du ¹³C. La substitution nucléophile du composé iodé **204b** avec l'hydroxylamine **175** a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, mais à nouveau le produit désiré **205** n'a pas été formé (Tableau 12 – Entrée 2). Toutefois, en faisant réagir le composé iodé avec l'hydroxylamine **175** en présence d'une base dans du DMF à 60 °C il est possible d'obtenir le composé **205** mais avec un très mauvais rendement de 8 % (Tableau 12 – Entrée 3).¹²

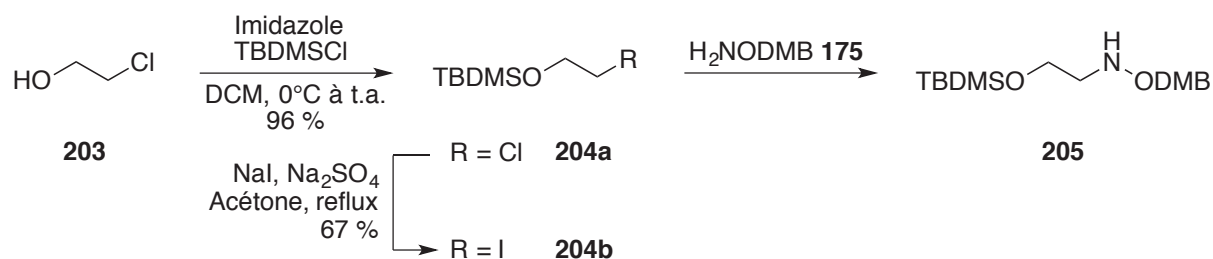


Figure 103 : Essais réalisés pour l'obtention du composé **205**.
 (Les conditions réactionnelles pour l'obtention de **205** sont exposées dans le Tableau 12 p.150).

Les halogènes ne sont pas d'assez bons groupements partants pour ce type de synthèse, nous avons donc choisi d'activer la fonction alcool par un groupement tosylate. L'alcool monoprotégé **180** est obtenu à partir de l'éthylène glycol **179** en présence d'hydruure de sodium et de chlorure de *t*-butyldiméthylsilyle. Son activation avec du chlorure de tosyloyle, en présence de triéthylamine et de DMAP permet d'isoler le produit **206** avec un rendement de 77 % après purification (Figure 104).¹³

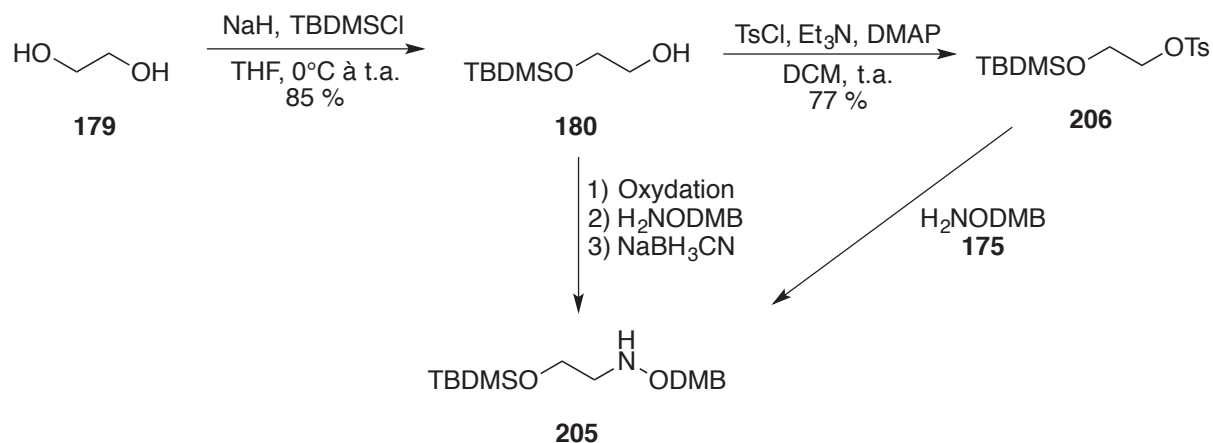


Figure 104 : Essais réalisés pour l'obtention de **205** *via* un tosylate ou *via* une amination réductrice. (Les conditions réactionnelles pour l'obtention de **205** sont exposées dans le Tableau 12 p.150).

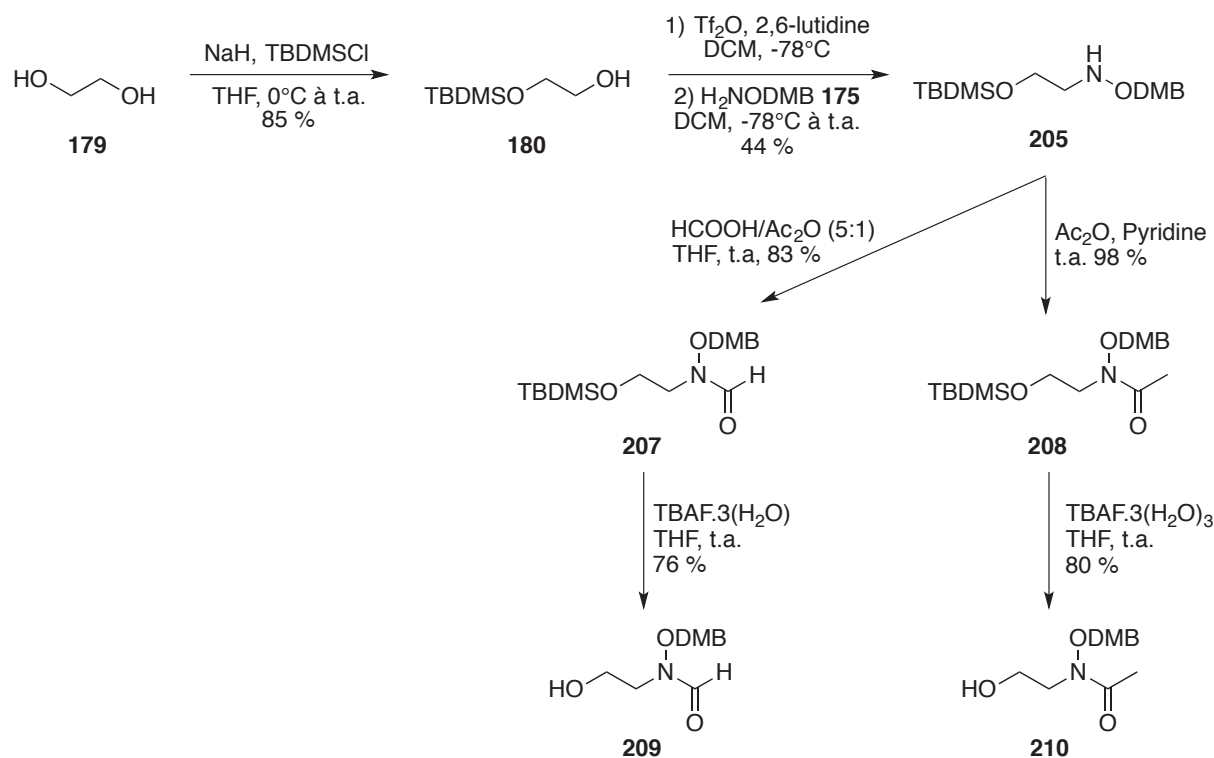
Plusieurs essais dans différentes conditions ont été réalisés afin d'obtenir l'hydroxylamine **205**. La substitution nucléophile a été entreprise dans les mêmes conditions que celles exposées précédemment soit dans de l'éthanol à reflux (Figure 104, Tableau 12 – Entrée 4) soit dans du DMF à 60 °C en présence d'une base (Tableau 12 – Entrée 5). Ces deux conditions opératoires ont permis d'isoler l'hydroxylamine **205** avec des rendements respectifs de 31 et 38 %. Lorsque cette réaction est effectuée dans du THF au lieu de la DMF, il n'a pas été possible d'améliorer le rendement de la réaction (Tableau 12 – Entrée 6).¹⁴ Enfin Woo *et al.* ont décrit la synthèse d'une hydroxylamine dérivée de l'éthylène glycol. Cette méthode a été appliquée sur l'alcool primaire **180** qui est préalablement activé en triflate avec de l'anhydride triflique en présence de 2,6-lutidine. L'ajout de l'hydroxylamine **175** permet d'obtenir le produit désiré **205** avec un modeste rendement de 44 % (Figure 105, Tableau 12 – Entrée 7).¹⁵ Lors de cette étape, un produit secondaire se forme : il s'agit de l'hydroxylamine doublement substituée par l'éthylène glycol protégé. Afin d'améliorer le rendement de cette étape, nous avons changé de stratégie de synthèse. En effet, le composé **205** peut également

être obtenu *via* une amination réductrice. L'oxydation du composé **180** en aldéhyde (via une réaction de Swern¹⁶ ou en utilisant du TEMPO/BAIB¹⁷) suivie de l'addition de l'hydroxylamine **175** permet de former l'oxime qui est directement réduit en hydroxylamine avec du cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN)¹⁸ (Figure 104). L'amination réductrice n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité **205**.

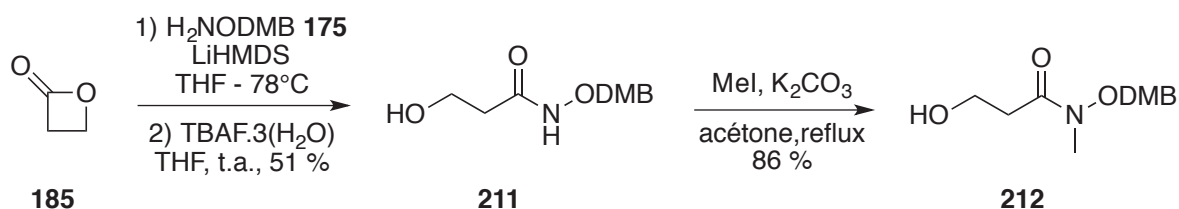
Entrées	Groupe partant	Base	Solvant	T °C	205 (Rendement)
1	Cl	-	EtOH	78 °C	-
2	I	-	EtOH	78 °C	-
3	I	K ₂ CO ₃	DMF	60 °C	8 %
4	Ts	-	EtOH	78 °C	31 %
5	Ts	K ₂ CO ₃	DMF	60 °C	38 %
6	Ts	K ₂ CO ₃	THF	66 °C	15 %
7	Tf	2,6-lutidine	DCM	-78 °C	44 %

Tableau 12 : Différentes conditions réactionnelles de la substitution nucléophile pour l'obtention du produit **205**.

Le composé **205** obtenu par la méthode mise par Woo, à savoir par l'activation de l'alcool **180** par un triflate suivie de la substitution nucléophile avec l'hydroxylamine **175** (Figure 105). Cette hydroxylamine protégée **205** a été formylée et acétylée permettant d'accéder aux composés **207** et **208** avec des rendements respectifs de 83 et 98 %. Enfin, la déprotection de l'éther silylé est réalisée avec du fluorure de tétrabutylammonium trihydraté dans du THF pour obtenir les alcools primaires **209** et **210** (Figure 105). Cette voie de synthèse a permis l'obtention des deux synthons **209** et **210**, précurseurs des prodrogues **199** et **200**.

Figure 105 : Schéma réactionnel pour la synthèse des synthons **209** et **210**.

Une synthèse différente a été mise au point pour obtenir les intermédiaires **H** de type acide hydroxamique (Figure 102). L'ouverture de la β -propiolactone est réalisée par une réaction d'addition-élimination de l'anion de l'hydroxylamine **175** obtenu avec du LiHMDS (Figure 106).¹⁹ Lors de cette réaction, ce n'est pas l'alcool primaire qui se forme majoritairement mais l'équivalent silylé. Le brut réactionnel est traité avec du TBAF.3(H₂O) dans du THF pour conduire au produit **211** avec un rendement de 51 % sur deux étapes. La méthylation sélective de l'hydroxylamine est effectuée avec de l'iodométhane en présence de K₂CO₃ dans de l'acétone à reflux. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, le composé *N*-méthylé **212** a été obtenu avec un bon rendement de 86 %.²⁰ Cette synthèse en trois étapes, nous permet d'accéder aux synthons **211** et **212**, composés essentiels pour la synthèse des prodrogues **201** et **202**.

Figure 106 : Schéma réactionnel pour la synthèse des synthons **211** et **212**.

3. Synthèse des différents dérivés d'alcool salicylique

Les dérivés *cyclo*Salphosphochloridates (**C** – Figures 101 et 102) sont obtenus par phosphorylation des alcools salicyliques correspondants. Contrairement à l'alcool salicylique **129**, les autres composés **194b-h** ne sont pas commerciaux. C'est pourquoi une étape de réduction des acides carboxyliques est préalablement requise. La réduction des composés **193b-d** en alcools **194b-d** a été décrite dans la section précédente (cf. Figure 98). Le dérivé bromé **194e** est obtenu avec 74 % de rendement par réduction de l'acide carboxylique **193e** correspondant avec du LiAlH_4 dans le THF (Figure 107).

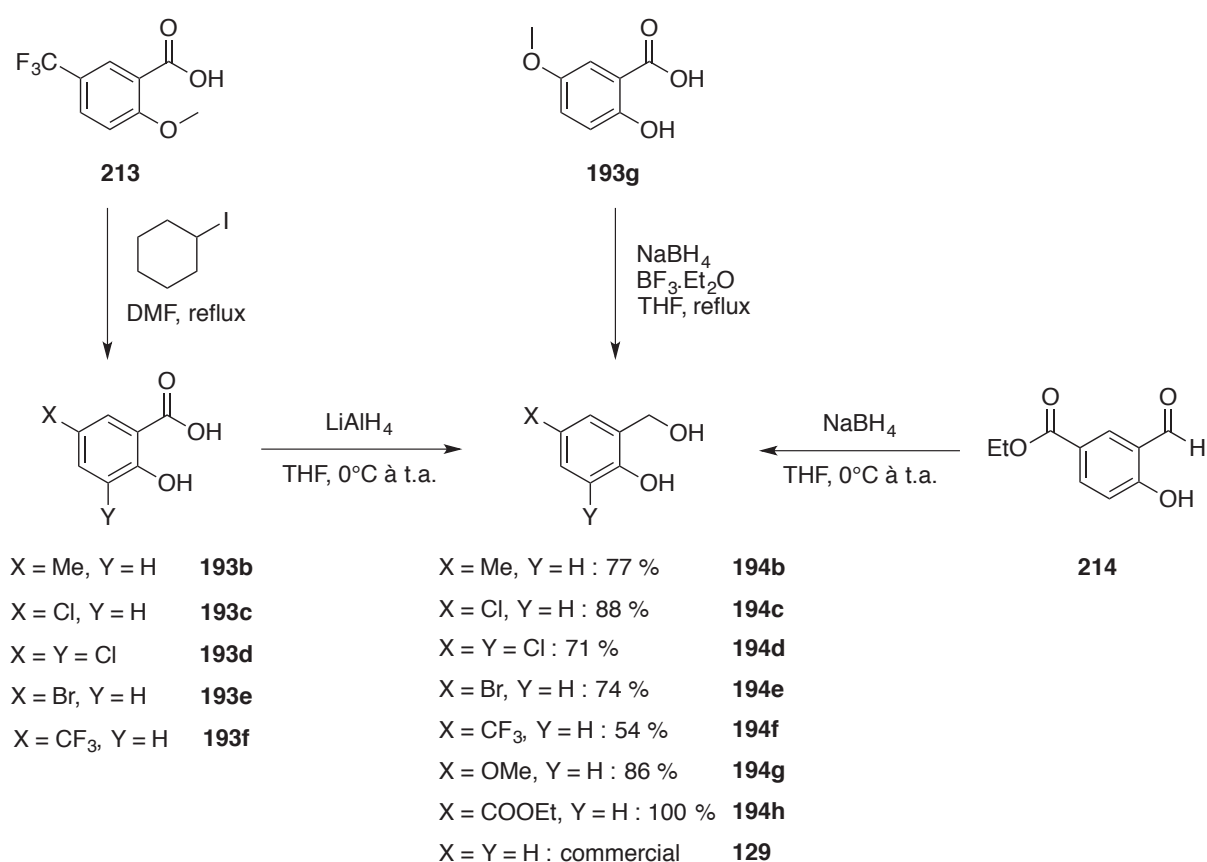


Figure 107 : Synthèses des dérivés d'alcools salicyliques **194**.

Avec cette méthode générale de réduction, le composé **194g** a été obtenu avec un très modeste rendement de 28 %. Un autre essai utilisant du borane complexé avec du THF ($\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$) a été réalisé. Là encore l'alcool désiré **194g** a été isolé avec un rendement de 26 %. ²¹ Une autre méthode de réduction, décrite par Wang *et al.* permet l'obtention du composé **194g** avec un rendement de 86 %, par réduction de l'acide carboxylique **193g** avec du tétraborohydrure de sodium (NaBH_4) assisté par du trifluorure de bore complexé à de l'éther

($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$).²² Le dérivé d'alcool salicylique substitué par un groupement trifluorométhyle (CF_3) **194f**, est obtenu en deux étapes (Figure 107). Le précurseur commercial **213** est préalablement traité avec de l'iodocyclohexane dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF) à reflux pendant 4 h pour donner le phénol **193f**.²³ Le brut réactionnel n'est pas purifié et est directement réduit avec un excès de LiAlH_4 dans le THF afin d'obtenir le produit **194f** avec un rendement de 54 % sur deux étapes. La synthèse d'un alcool salicylique portant un ester peut être intéressante. En effet cet ester pourrait permettre la fonctionnalisation du cycle aromatique pour de futures recherches. Pour ce faire, l'aldéhyde commercial **214** est réduit avec du NaBH_4 dans du THF pour donner sans purification l'alcool correspondant **194h** (Figure 107).²⁴

4. Synthèse des dérivés cycloSalphosphochloridates

Une fois les alcools salicyliques synthétisés, il est possible d'envisager la synthèse des *cycloSalphosphochloridates* (C – Figures 101 et 102). Pour ce faire, une solution de POCl_3 dans du THF à -78°C est traitée avec une solution d'alcool salicylique **129** ou **194b-h** en présence de triéthylamine (TEA) dans du THF. La filtration du chlorhydrate de triéthylamine sous argon suivie de l'évaporation du THF permet d'obtenir les composés **195a-g** (Figure 108).²

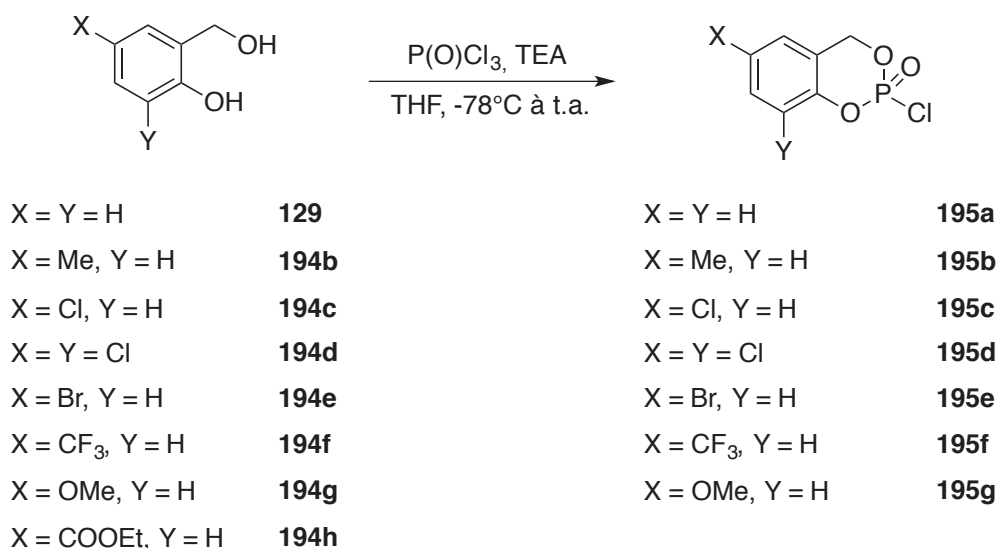


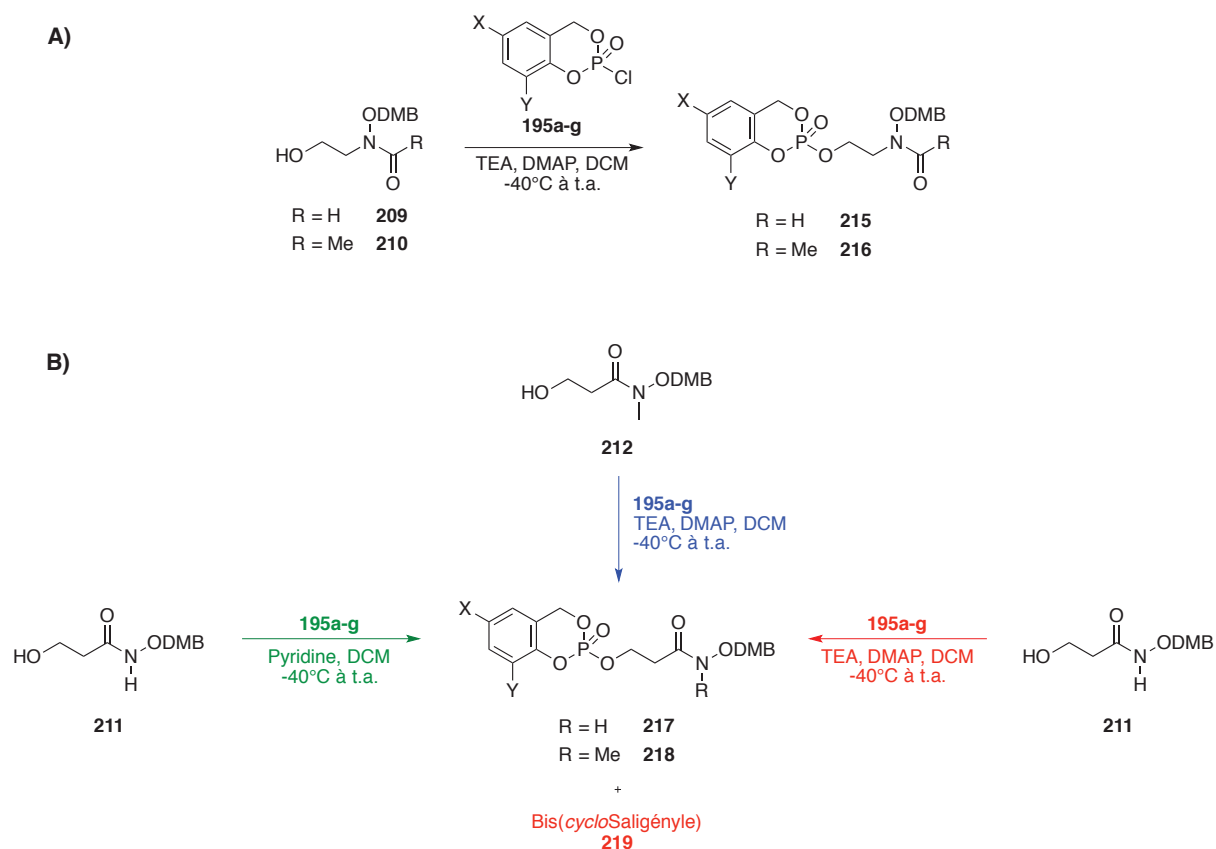
Figure 108 : Synthèse des *cycloSalphosphochloridates* **195a-h**.

Le produit **195h** n'a pu être obtenu. En effet, les signaux correspondant au groupement éthyle de l'ester n'apparaissent plus en RMN du ^1H , suggérant la dégradation du produit par POCl_3 . Pour les composés **195a-g**, les bruts réactionnels ne sont pas purifiés en raison de leur instabilité. Ils ont néanmoins pu être caractérisés par RMN du ^1H et du ^{31}P . Ces intermédiaires réactionnels **195a-g** ont directement été engagés dans l'étape de condensation avec les alcools **209** à **212**.

5. Etape clé : réaction d'addition-élimination des alcools **209-212** sur les *cycloSalphosphochloridates* **195a-g**

Cette étape d'addition-élimination des différents alcools primaires des composés **209** à **212** sur les bruts réactionnels des molécules **195a-g** est l'étape clé de cette synthèse car elle permet d'aboutir aux précurseurs protégés des prodrogues (Intermédiaires **A** et **G** – Figures 101 et 102). Les conditions opératoires pour l'étape clé correspondent à celle mises au point lors de la synthèse des molécules utilisées pour les tests de stabilités. Cette étape d'addition-élimination est réalisée dans du DCM à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ en présence de TEA et de DMAP en quantité catalytique, lequel sert d'activateur de la réaction. (Figure 109).

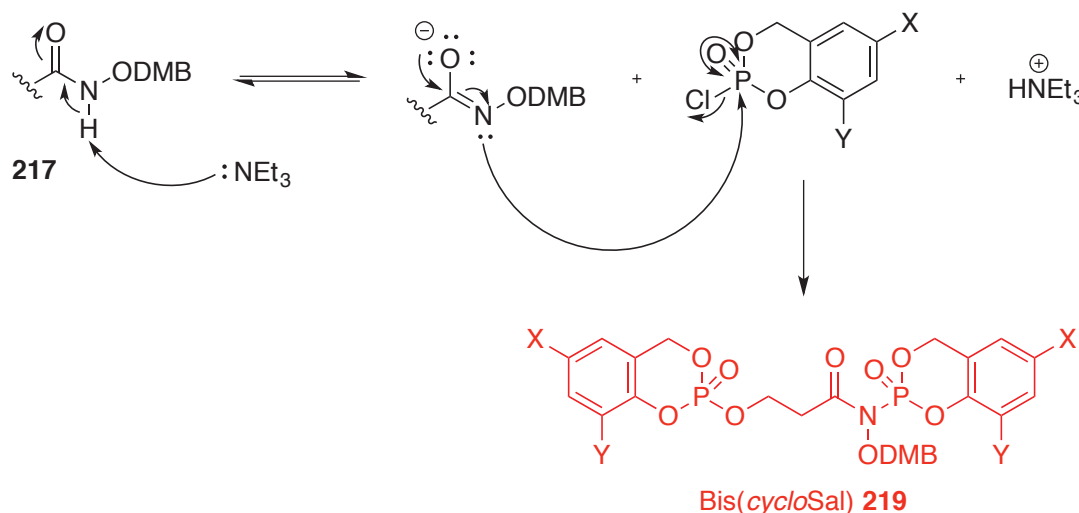
Les acides rétro-hydroxamiques **209** ($\text{R} = \text{H}$) et **210** ($\text{R} = \text{Me}$) traités dans ces conditions permettent l'obtention des composés **215a-g** ($\text{R} = \text{H}$) et **216a-g** ($\text{R} = \text{Me}$) avec des rendements compris entre 12 et 73 % (Figure 109 – **A**). La molécule **216d** est obtenue avec un faible rendement de 12 %, ce qui peut être expliqué par l'instabilité de ce type de molécule où le cycle aromatique est doublement substitué par des atomes de chlore. Lorsque l'acide hydroxamique **212** (*N*-Me) est traité dans ces mêmes conditions, les précurseurs des prodrogues **218a-g** sont obtenus avec des rendements compris entre 43 % et 86 % (Figure 109 – **B** – Flèche bleue). Ici encore le composé où le motif *cycloSaligényle* est substitué par deux atomes de chlore est obtenu avec un moins bon rendement. Par contre, si la molécule **211** (*N*-H) est traitée dans ces conditions, à savoir TEA en association avec de la DMAP (Figure 109 – **B** - Flèche rouge), nous observons à côté de la formation des produits attendus **217a-g** la formation d'un produit secondaire issu de la condensation de motif *cycloSaligényle* avec le groupement *N*-H de l'acide hydroxamique **219**. Afin d'obtenir uniquement les composés **217a-g**, une méthode alternative a été développée mettant en jeu une base plus faible que la triéthylamine, la pyridine dans le DCM à $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 109 – **B** – Flèche verte).



Composés	R	X	Y	Rendement	Composés	R	X	Y	Rendement
215a	H	H	H	66 %	217a	H	H	H	65 %
215b	H	Me	H	46 %	217b	H	Me	H	43 %
215c	H	Cl	H	51 %	217c	H	Cl	H	29 %
215d	H	Cl	Cl	49 %	217d	H	Cl	Cl	10 %
215e	H	Br	H	37 %	217e	H	Br	H	11 %
215f	H	CF ₃	H	52 %	217f	H	CF ₃	H	13 %
215g	H	OMe	H	64 %	217g	H	OMe	H	18 %
216a	Me	H	H	73 %	218a	Me	H	H	76 %
216b	Me	Me	H	36 %	218b	Me	Me	H	75 %
216c	Me	Cl	H	56 %	218c	Me	Cl	H	86 %
216d	Me	Cl	Cl	12 %	218d	Me	Cl	Cl	43 %
216e	Me	Br	H	51 %	218e	Me	Br	H	74 %
216f	Me	CF ₃	H	52 %	218f	Me	CF ₃	H	53 %
216g	Me	OMe	H	56 %	218g	Me	OMe	H	61 %

Figure 109 : Schémas réactionnels pour l'obtention des composés **215** à **219**.

Cette méthode permet d'isoler uniquement les composés **217a-g** et ainsi d'éviter la formation des Bis(*cycloSal*) **219a-g**. Au vu des rendements compris entre 11 et 65 %, cette méthode semble cependant moins efficace que la méthode faisant intervenir de la triéthylamine en association avec la DMAP. La formation des composés **219a-g** peut facilement être expliquée. En effet, le $pK_{a(NH/N^-)}$ de l'acide hydroxamique est d'environ 9, la triéthylamine, présente en excès, est donc une base assez forte pour déprotoner l'hydrogène de cet acide et ainsi générer l'anion hydroxamate. Ce dernier peut alors réagir sur les dérivés *cycloSalphosphochloridates* **195a-g** pour conduire à la formation des composés Bis(*cycloSaligényles*) **219a-g** (Figure 110). Six composés de type Bis(*cycloSal*) **219a-g** ont été isolés après purification et caractérisés par spectroscopie RMN. A l'exception des composés **219c** et **219e** qui ont été obtenus de façon majoritaire par rapport aux composés **217c** et **217e**, tous les composés ont été obtenus avec de modestes rendements compris entre 12 et 38 %. Le composé **219d**, doublement substitué par des atomes de chlore, n'a pu être isolé, ce dernier se dégradant lors de la purification sur colonne chromatographique.



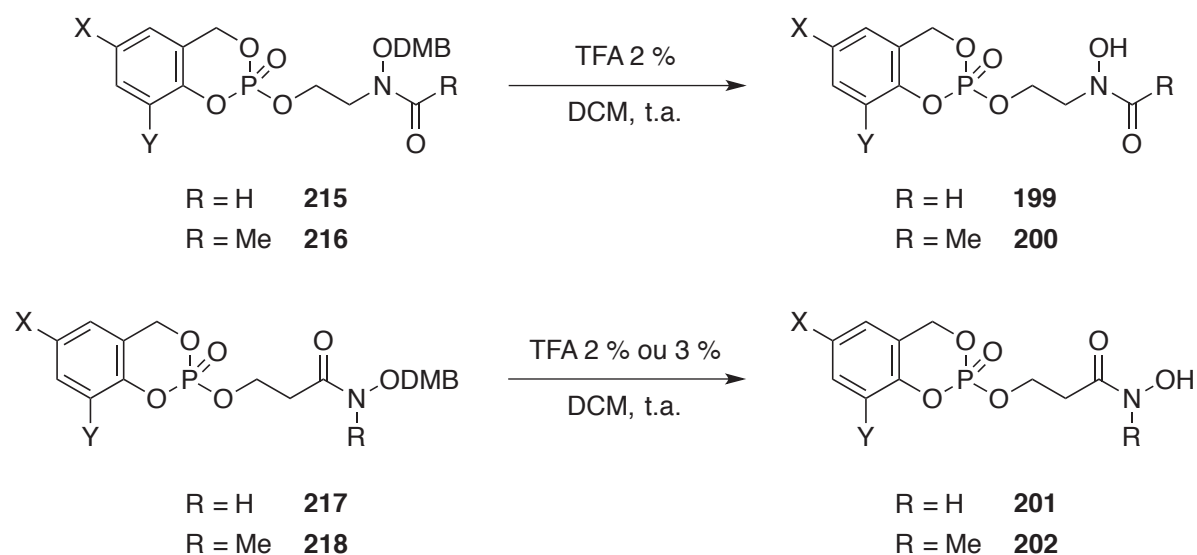
Composés	X	Y	Rendement	Composés	X	Y	Rendement
219a	H	H	20 %	219e	Br	H	74 %
219b	Me	H	38 %	219f	CF ₃	H	15 %
219c	Cl	H	84 %	219g	OMe	H	12 %
219d	Cl	Cl	Dégradation				

Figure 110 : Mécanisme pour obtenir les molécules Bis(*cycloSal*) **219a-g**.

Il est à noter que nous n'avons pas cherché à améliorer les rendements de cette étape de façon optimale, car une faible quantité de produit est nécessaire pour entreprendre les tests biologiques.

6. Etape finale : déprotection sélective

La dernière étape de cette voie de synthèse consiste en la déprotection du groupement protecteur de l'acide hydroxamique afin d'obtenir les prodrogues **199** à **202**. Pour ce faire, ces composés sont traités avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 2 % ou 3 % dans le DCM (Figure 111).^{7,25}



Composés	R	X	Y	Rendement	Composés	R	X	Y	Rendement
199a	H	H	H	80 %	201a	H	H	H	60 %
199c	H	Cl	H	73 %	201c	H	Cl	H	81 %
199d	H	Cl	Cl	Dégradation	201d	H	Cl	Cl	Dégradation
200a	Me	H	H	84 %	202a	Me	H	H	80 %
200c	Me	Cl	H	68 %	202b	Me	Me	H	83 %
					202c	Me	Cl	H	44 %
					202d	Me	Cl	Cl	Dégradation
					202f	Me	CF ₃	H	80 %

Figure 111 : Rendements de l'étape de déprotection finale pour l'obtention des prodrogues *cycloSaligényles* **199** à **202**.

Dix molécules ont été obtenues avec des rendements compris entre 44 % et 84 %. La purification de ces composés n'est pas nécessaire, car lors de la déprotection il y a formation d'un polymère qui précipite dans le méthanol.²⁵ Après filtration et évaporation du méthanol, les composés désirés sont obtenus. Toutes les molécules **215** à **218** n'ont pas pu être déprotégées et caractérisées. En effet, certaines molécules sous forme protégées s'avèrent être instables et certaines molécules ont été obtenues en trop faible quantité, ne permettant pas la déprotection. Seules les dix molécules (**199** à **202**) ont été testées *in vivo* sur des souches d'*E. coli* et *M. smegmatis*. (cf. Tests biologiques p.165).

Un test de déprotection du Bis(5-Cl-*cycloSal*) **219c** a été réalisé dans une solution de TFA à 2 % dans le DCM. Malheureusement, le produit désiré n'a pu être isolé. En effet en RMN du ³¹P, les deux signaux à environ -20 ppm correspondant aux signaux du phosphoramidate ne sont plus présents, indiquant qu'il s'est dégradé lors de la réaction. C'est pourquoi, les autres molécules de type Bis(*cycloSal*) **219** n'ont pas été déprotégées et ont été testées sous forme protégée.

III. Etude spectroscopique des conformations des acides rétro-hydroxamique et hydroxamique

Lors de la tentative de synthèse des prodrogues *cycloSaligényles* d'inhibiteurs phosphonates (Chapitre I – Partie I) ainsi que des inhibiteurs phosphates de la DXR (Chapitre I – Partie II), nous avons observé que les molécules de type acide hydroxamique ou rétro-hydroxamique peuvent être présentes en solution sous la forme d'un mélange de deux conformères *Z* et *E* dus à la rotation restreinte autour de la liaison C-N (Chapitre I – Partie 1 p.106).²⁶⁻²⁹

1. Molécules comprenant un acide rétro-hydroxamique **207** à **210** et **215a-g**, **216a-g**, **199** et **200**

Lors de la synthèse des prodrogues de la fosfoxacine **30** et de son analogue méthylé **177**, la pince rétro-hydroxamique est introduite après la formylation ou l'acétylation. En solution, ce type de molécules sont présentes sous forme d'un mélange de deux conformères

Z et *E*, résultant de la rotation restreinte entre la liaison C-N (Figure 92 p.124).³⁰ Dans le cas d'un acide rétro-hydroxamique *N*-acétylé, le conformère *E* est favorisé.

Pour les composés *N*-formylés **207** et **209**, un mélange des deux conformères est présent en solution. Les signaux du méthylène du groupement protecteur diméthoxybenzyle (OCH₂DMP) et celui du groupement formyle (CHO) résonnent sous la forme de singulets larges dédoublés correspondant au deux conformères *Z* et *E*. Selon la littérature, le signal du groupement formyle du conformère *E* est plus déblindé que celui du conformère *Z*. Par contre, pour le CH₂ du groupement protecteur, ce sera le signal correspondant au conformère *Z* qui est le plus déblindé. Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que pour les molécules **207** et **209**, le conformère *E* est présent en solution à hauteur de 70 % (Tableau 13 – Entrées 1 et 2). Il n'est pas possible d'évaluer les proportions des différents conformères avec les signaux du CH₂ en α de l'azote en RMN du ¹H, car ils résonnent au même déplacement chimique que les méthoxy du groupement ODMB. Par contre, en RMN du ¹³C, ce méthylène présente deux signaux résonnant à 47,4-48,7 ppm et 51,8-53,5 ppm. Le signal le plus déblindé correspond au conformère *Z* (minoritaire) et le moins déblindé au conformère *E* (majoritaire).

Dans le cas des composés **208** et **210**, correspondant aux molécules *N*-acétylées, seul un conformère est présent en solution. Le déplacement chimique du singulet à 4,83 ppm est similaire à celui du conformère *E* pour les molécules **207** et **209**. De plus, en RMN du ¹³C, il n'y a plus deux mais un seul signal pour le CH₂ en α de l'azote. Son déplacement chimique à 49 ppm pour **208** et 50 ppm pour **210** laisse également supposer que seul le conformère *E* est présent en solution (Tableau 13 – Entrées 3 et 4). Ce résultat est en accord avec les observations faites par Kosala et également avec les résultats observés lors de la synthèse du composé **184b** où seul le conformère *E* était présent en solution (Chapitre I – Partie 2).³⁰

Après l'introduction du motif cycloSaligényle, ces observations sont toujours valables. En effet pour les molécules *N*-formylées **215a-g**, les deux conformères *Z* et *E* sont présents en solution dans des proportions respectives de 20 :80 (Tableau 13 – Entrées 5 à 11). Dans le cas des molécules *N*-acétylées **216a-g**, seul le conformère *E* est présent en solution. Pour ces molécules, en RMN du ¹H, le CH₂ en α de l'azote est maintenant bien défini. En effet ce dernier résonne sous la forme d'un triplet à un déplacement chimique compris entre 3,92 et 4,41 ppm (Tableau 13 – Entrées 12 à 18).

Entrées	Composés	¹ H : δ(CH ₂) en α (Z/E)	¹ H : δ(CH ₂) du OCH ₂ DMP en ppm (Z/E)	¹ H : δ(CHO) ou δ(COCH ₃) en ppm (Z/E)	¹³ C : δ(CH ₂) en α de l'azote en ppm (Z/E)	¹³ C : δ(CHO) ou δ(COCH ₃) en ppm (Z/E)	Proportion (%) (Z/E)
1	207	-	4.96/4.86	7.92/8.19	51.8/47.4	-	30/70
2	209	-	5.02/4.87	7.96/8.22	53.5/48.7	164.2	30/70
3	208	-	-/4.83	-/2.83	-/49.1	166.6	0/100
4	210	-	-/4.83	-/2.13	-/50.4	174.2	0/100
5	215a	-	4.96/4.80	7.87/8.06	44.6	163.7	20/80
6	215b	-	4.97/4.80	7.86/8.07	44.7	163.8	20/80
7	215c	-	4.96/4.80	7.89/8.07	44.6	163.7	20/80
8	215d	-	4.94/4.80	7.91/8.06	44.4	163.7	20/80
9	215e	-	4.95/4.80	7.89/8.06	44.5	163.7	20/80
10	215f	-	4.96/4.80	7.90/8.06	44.5	163.7	20/80
11	215g	-	4.95/4.78	7.84/8.07	44.7	163.7	20/80
12	216a	-/3.98	-/4.76	-/1.99	-/46.1	173.4	0/100
13	216b	-/3.92	-/4.76	-/2.00	-/46.2	173.5	0/100
14	216c	-/3.94	-/4.76	-/1.99	-/45.9	173.4	0/100
15	216d	-/4.34	-/4.76	-/2.02	-/45.8	173.4	0/100
16	216e	-/3.93	-/4.75	-/2.00	-/45.9	173.4	0/100
17	216f	-/4.41	-/4.75	-/1.97	-/44.8	173.3	0/100
18	216g	-/3.92	-/4.75	-/2.00	-/46.1	173.5	0/100

Tableau 13 : Proportions dans du CDCl₃ des différents conformères observés en RMN du ¹H et du ¹³C pour les composés **207** à **210**, **215a-g** et **216a-g**.

Lorsque les molécules sont déprotégées, il y a apparition d'une troisième conformation. En effet, pour les protons du CH₂ en α de l'azote et pour le celui du groupe formyle trois signaux sont observés en RMN du ¹H ainsi qu'en RMN du ¹³C. Par exemple, pour la molécule **199a**, nous observons trois signaux à 3,58, 3,78 et 3,86 ppm pour le CH₂ en α de l'azote et trois singulets à 7,86, 7,91 et 8,19 ppm pour le groupement formyle (Tableau 14 – Entrée 1). Par comparaison avec les résultats obtenus pour la fosfoxacine **30** et avec les analyses réalisées par Kosala, le CH₂ en α de l'azote le signal le plus déblindé pourrait être attribué au conformère *E* (δ = 3,86 ppm), le moins déblindé au conformère *Z* (δ = 3,58 ppm) et celui à 3,78 ppm à une nouvelle forme. Le comportement du groupement formyle ne serait pas le même : le signal du conformère *E* serait toujours le plus déblindé (δ = 8,19 ppm), celui de la nouvelle forme serait maintenant le moins déblindé (δ = 7,86 ppm) alors que celui du conformère *Z* aurait un déplacement chimique intermédiaire (δ = 7,91 ppm). Si ces hypothèses sont correctes, la nouvelle forme serait majoritaire à 60 % et les formes *Z* et *E* seraient présentes à hauteur de 20 % chacune. Pour la molécule **199c**, trois conformères sont également présents en solution avec le conformère *E* majoritaire (40 %) alors que le conformère *Z* et la nouvelle forme seraient présents à hauteur de 30 % chacun. (Tableau 14 – Entrée 2). Pour les composés *N*-acétylés, les déplacements chimiques de la molécule **200a** sont en faveur du conformère *E*. En RMN du ¹H, seul un signal très déblindé à 3,88 ppm est observée pour le CH₂ en α de l'azote. Par contre en RMN du ¹³C, deux signaux sont présents pour le CH₂ en α de l'azote (δ = 48,9 et 51,8 ppm) ainsi que pour le carbonyle (δ = 172,3 et 174,7 ppm). Par comparaison avec les molécules **216a-g**, les signaux les plus intenses à 48,9 ppm et 174,7 ppm correspondraient au conformère *E*, alors que ceux à 51,8 ppm et 172,3 ppm correspondraient soit au conformère *Z* soit à la nouvelle conformation (Tableau 14 – Entrée 3).

Entrées	Composés	¹ H : δ(CH ₂) en α de l'azote en ppm (Z/E/Autre)	¹ H : δ(CHO) ou δ(COCH ₃) en ppm (Z/E/Autre)	¹³ C : δ(CH ₂) en α de l'azote en ppm (Z/E/Autre)	¹³ C : δ(CHO) ou δ(COCH ₃) en ppm (Z/E/Autre)	Proportion (%) (Z/E/Autre)
1	199a	3.58/3.86/3.78	7.91/8.19/7.86	51.9/47.8/51.6	164.9/160.4	2/2/6
2	199c	3.58/3.89/3.81	8.00/8.54/7.93	-/46.4/-	-/164.7/-	3/4/3
3	200a	-/3.88/-	-/1.99/-	48.9/51.8	172.3/174.7	n.d.

Tableau 14 : Proportions dans le CD₃OD des différents conformères observés en RMN du ¹H et ¹³C pour les molécules finales **199** et **200**.

L'hydroxyle libre porté par l'azote peut favoriser la formation de ces différents conformères. La conformation *Z* pourrait être favorisée par une liaison hydrogène intramoléculaire, intermoléculaire *via* une molécule d'eau ou encore par la formation d'un dimère (Figure 112 – **A**, **B** et **C**). La troisième conformation n'apparaît que lorsque l'hydroxyle est déprotégé, ce qui implique qu'il participe à la formation de cette nouvelle forme. Elle pourrait être issue de la formation d'un cycle à huit chaînons par formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre l'hydroxyle et l'oxygène de la fonction phosphate *via* une molécule d'eau (Figure 112 – **D**). Mais cette forme pourrait également provenir d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydroxyle et la fonction phosphate, ce qui formerait un cycle à six chaînons thermodynamiquement plus favorable (Figure 112 – **E**). Si ce cycle à six était présent en solution, les protons de la chaîne carbonée ne seraient plus équivalents impliquant leur dédoublement en RMN du ^1H . Or nous n'avons pas observé un tel comportement. C'est pourquoi à ce stade de nos investigations, le cycle à huit chaînons est la conformation qui semble être favorisée. En effet, ce dernier est plus flexible, ce qui permet la libre rotation des liaisons C-C et ainsi rend les protons équivalents. A ce stade les études réalisées ne nous permettent pas d'identifier avec certitude cette troisième forme présente en solution après déprotection. Des études supplémentaires en RMN du ^1H et ^{13}C et également des études infrarouge permettraient de pouvoir d'identifier et d'attribuer les différentes conformations.

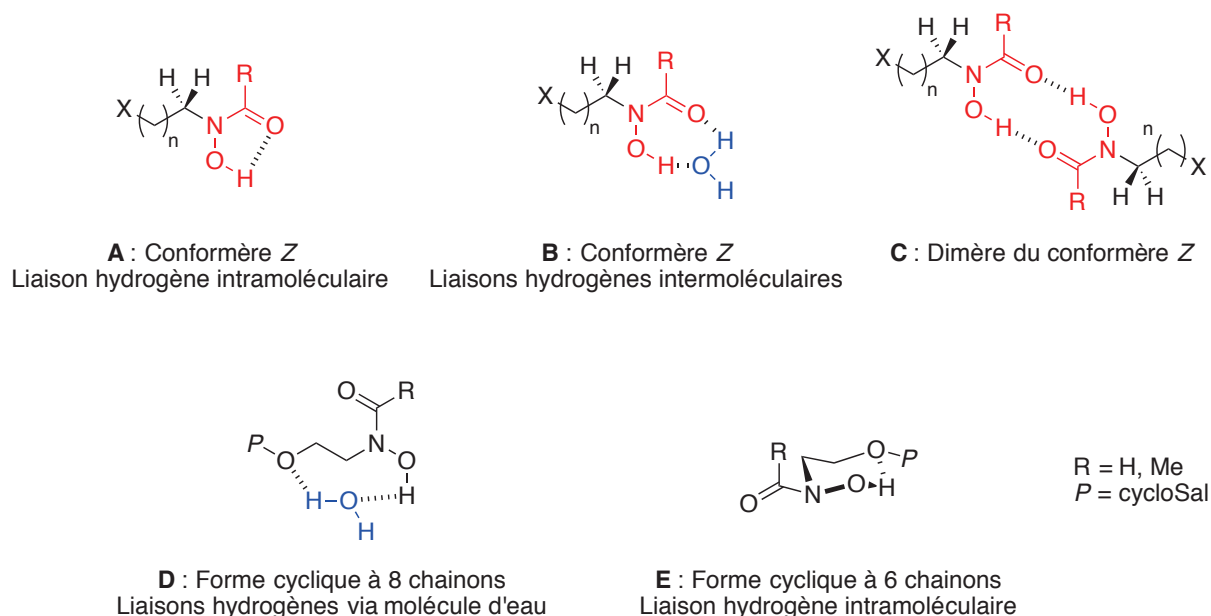


Figure 112 : Les différentes conformations hypothétiques de l'acide rétro-hydroxamique déprotégé.

2. Molécules comprenant un acide hydroxamique **211**, **212**, **217a-g**, **218a-g**, **201** et **202**

Les composés comprenant un acide hydroxamique sont également présents en solution sous la forme de deux conformères *Z* et *E* (Figure 94 **A** et **B** p.126). Leurs proportions respectives sont non seulement fonction du solvant mais également des facteurs stériques des substituants de la molécule. Brown *et al.* ont décrit ces différences de comportement dans diverses publications. Généralement, lorsque l'acide hydroxamique est *N*-H libre les deux conformères *Z* et *E* sont présents, alors que lorsqu'il est *N*-méthylé seul le conformère *E* persiste en solution.

Pour les molécules **211** et **217a-g** ce comportement est en accord avec la littérature : dans tous les cas le conformère *Z* est présent à hauteur de 60 % alors que le conformère *E* est présent à 40 % (Tableau 15 – Entrées 1 et 3 à 9). Dans le cas des composés *N*-méthylés (**212** et **218a-g**) seul le conformère *E* est présent (Tableau 15 – Entrées 2 et 10 à 16). En effet, lorsque ce type de molécules adoptent la conformation *Z*, une importante gêne stérique est présente entre les hydrogènes en α du carbonyle et ceux du méthyle porté par l'azote, ce qui a pour conséquence de défavoriser la conformation *Z* en faveur de la conformation *E*.

Entrée	Composés	¹ H : δ(CH ₂ CO) en ppm (Z/E)	¹ H : δ(CH ₂) du OCH ₂ DMP en ppm (Z/E)	¹ H : δ(NH) ou δ(NCH ₃) en ppm (Z/E)	¹³ C : δ(CH ₂ CO) en ppm (Z/E)	¹³ C : δ(CH ₂) du OCH ₂ DMP en ppm (Z/E)	¹³ C : δ(CO) en ppm (Z/E)	Proportion (%) (Z/E)
1	211	2.30/2.63	4.91/4.80	8.56/8.16	35.7/33.7	73.4/74.6	170.0/176.8	60/40
2	212	-2.63	-4.80	3.23	-34.0	-71.1	-174.7	0/100
3	217a	2.48/2.83	4.85/4.77	8.35/7.88	34.6/32.5	73.5/74.9	166.7/173.3	60/40
4	217b	2.47/2.83	4.83/4.75	8.32/7.85	34.9/32.5	73.5/75.0	166.7/173.3	60/40
5	217c	2.49/2.83	4.86/4.78	8.29/7.84	34.5/32.5	73.5/75.0	166.7/173.3	60/40
6	217d	2.50/2.83	4.84/4.77	8.64/8.14	34.3/32.4	73.5/74.9	166.5/173.2	60/40
7	217e	2.48/2.81	4.85/4.76	8.63/8.11	34.4/32.4	73.5/74.6	166.7/173.3	60/40
8	217f	2.48/2.81	4.84/4.76	8.28/7.83	34.5/32.4	73.6/75.0	166.5/173.2	60/40
9	217g	2.49/2.84	4.85/4.77	8.40/7.91	34.7/32.8	73.5/75.0	166.8/173.4	60/40
10	218a	-2.85	-4.77	3.18	-32.9	-71.3	-171.2	0/100
11	218b	-2.86	-4.77	3.18	-33.0	-71.3	-171.2	0/100
12	218c	-2.85	-4.77	3.18	-32.9	-71.3	-171.2	0/100
13	218d	-2.87	-4.78	3.19	-32.7	-71.2	-171.2	0/100
14	218e	-2.84	-4.77	3.18	-32.9	-71.3	-171.1	0/100
15	218f	-2.84	-4.77	3.18	-32.9	-71.3	-171.0	0/100
16	218g	-2.86	4.80/4.77	3.23/3.18	-32.8	-71.1	-171.1	20/80

Tableau 15 : Proportions dans du CDCl₃ des différents conformères présents en RMN du ¹H et ¹³C pour les molécules **211**, **212**, **217a-g** et **218a-g**

Pour les molécules déprotégées **201** et **202**, en solution on observe également la présence de deux conformères *Z* et *E*. Pour les composés *N*-H, le conformère *Z* est présent entre 60 et 100 % (Tableau 16 – Entrées 1 à 2). Contrairement aux molécules protégées (**218a-g**) présentes uniquement sous la forme du conformère *E*, les molécules déprotégées **202** sont présentes sous forme de deux conformères *Z* et *E* dans des proportions respectives 30 :70 (Tableau 16 – Entrées 3 à 6). Bien que le conformère *E* soit majoritaire, la formation de liaisons hydrogène intramoléculaire ou intermoléculaire *via* une molécule d'eau peut favoriser la formation du conformère *Z* (Figure 94 **C** et **D** p.126). Cette hypothèse pourrait expliquer la formation du conformère *Z* bien que ce dernier ne soit pas favorisé pour les molécules *N*-méthylées.

Entrées	Composés/Solvant	¹ H : δ(CH ₂ CO) en ppm (<i>Z/E</i>)	¹ H : δ(NCH ₃) en ppm (<i>Z/E</i>)	¹³ C : δ(CH ₂ CO) en ppm (<i>Z/E</i>)	Proportion (%) (<i>Z/E</i>)
1	201a /MeOD	2.48/-		34.8/-	100/0
2	201c /CDCl ₃	2.61/2.93		29.9	60/40
3	202a / CDCl ₃	2.76/2.91	3.33/3.24	29.9/33.3	30/70
4	202b / CDCl ₃	2.77/2.98	3.30/3.26	29.9/33.3	30/70
5	202c / CDCl ₃	2.80/3.02	3.37/3.29	29.9/33.3	30/70
6	202f / CDCl ₃	2.79/2.99	3.36/3.26	29.9/33.3	40/60

Tableau 16 : Proportions des différents conformères observés en RMN du ¹H et ¹³C pour les molécules finales **201** et **202**.

IV. Evaluation du pouvoir inhibiteurs des prodrogues

Les propriétés inhibitrices des différentes prodrogues ont été évaluées sur deux souches de bactéries non pathogènes disponibles au laboratoire, *E. coli* et *M. smegmatis* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par l'apparition d'une zone circulaire autour de la pastille imprégnée de la substance à analyser. Le diamètre de la zone d'inhibition dépend de la sensibilité de la bactérie au composé. Plus la zone d'inhibition est grande, plus grande est la sensibilité de la souche bactérienne.

L'efficacité des prodrogues (800 nanomoles) est comparée à celle de la fosmidomycine **28** (10 nanomoles) pour les cultures d'*E. coli* et à celle de l'isoniazide (30 nanomoles) pour les cultures de *M. smegmatis*, ces deux molécules servant de témoins positifs.

Les prodrogues **199** à **202** ont été testées sur une culture d'*E. coli*. Après 24 h d'incubation à 37 °C, les composés **199c** et **200c** induisent une inhibition de la croissance bactérienne avec des disques d'inhibition respectifs de 8 mm et 23 mm. Cette inhibition semble être due à la dégradation de la prodrogue avec libération des composés parents **30** et **177**. En effet, ces deux composés **199c** et **200c** induisent une inhibition minimale de la DXR d'*E. coli*, nous prouvant que les molécules parentes sont présentes et semblent provenir de la dégradation des produits. Les molécules parentes pénètrent dans les bactéries par l'intermédiaire des transporteurs du glycérol 3-phosphate (GlpT) et/ou du glucose 6-phosphate (UhpT). Il est fort improbable que les prodrogues utilisent ces transporteurs pour pénétrer dans les cellules bactériennes et par conséquent la diffusion par voie passive serait privilégiée. Or cette série de molécules n'inhibe pas la croissance d'*E. coli*, ce qui peut être dû à l'incapacité de ces molécules à traverser la paroi bactérienne et la membrane plasmique par diffusion. Le noyau aromatique du groupement cycloSaligényle doit apporter une certaine rigidité et cette propriété pourrait empêcher la pénétration ou du moins la ralentir fortement. D'autres hypothèses pourraient expliquer ces résultats. En admettant que la pénétration de la prodrogue au sein de la bactérie ait eu lieu, la molécule active doit encore être libérée. Si cette libération est trop lente, l'inhibiteur est présent en trop faible quantité pour permettre l'inhibition de la DXR. De plus, l'inhibiteur phosphate peut également être dégradé par diverses enzymes intracellulaires, en particulier par les phosphatases, ou encore être rejeté par les pompes d'efflux dans le milieu extracellulaire. *E. coli* étant une bactérie à croissance rapide, tout événement ralentissant la libération des inhibiteurs parents dans les cellules bactériennes devrait augmenter la résistance de la bactérie à ces prodrogues.

En ce qui concerne la croissance de *Mycobacterium smegmatis* nous avons noté que l'inhibition par l'isoniazide dépend de la quantité de bactéries déposée sur le milieu gélosé. Nous avons essayé de standardiser les essais en déposant environ la même quantité de bactéries, mais les mesures de turbidité à 600 nm ne se révèlent pas très fiables du fait que le milieu contienne du carbonate de calcium insoluble et que les bactéries ont tendance à s'agglomérer pour former des agrégats pouvant fausser les mesures de densité optique. Ainsi pour chaque boîte nous avons ajouté de l'isoniazide, cet antibiotique servant de référence

« interne », un diamètre de la zone d'inhibition d'environ 30 mm étant la valeur optimale choisie pour une quantité de 30 nanomoles déposés sur la pastille. Après 24 h d'incubation à 30 °C, les composés **199c**, **201c** et **202c** inhibent la croissance de la bactérie. Ces composés sont bien moins actifs que l'antibiotique de référence, l'isoniazide, car une quantité 27 fois supérieure à ce dernier est nécessaire pour induire une inhibition 3,5 fois moins efficace (Tableau 17). Dans ce cas, la diffusion de la prodrogue ne peut être assurée que par diffusion passive, car les mycobactéries ne possèdent pas les transporteurs GlpT et UhpT.³¹ Nous pouvons donc admettre que les composés pénètrent la cellule, mais qu'une trop faible quantité de molécules actives atteignent la DXR. Dans le paragraphe « Test de stabilité », nous avons vu qu'à un pH de 7 les *cycloSaligényles* non substitués avaient un temps de demi-vie plus élevé que ceux des prodrogues substituées par un groupement électro-attracteur. Ici nous voyons que la vitesse de libération de la substance active a une influence sur le pouvoir inhibiteur. Dans le cas des molécules **199a** à **202a** la libération de la substance active doit se produire trop lentement, induisant une faible quantité d'inhibiteur au sein de la cellule, ce qui a pour conséquence l'absence d'inhibition de la croissance bactérienne. Par contre, les composés **199c**, **201c** et **202c** (série 5-Cl-*cycloSal*) inhibent la croissance de cette bactérie, ce qui nous montre l'influence de la vitesse de libération sur l'inhibition. L'absence ou la faible inhibition induite par ces composés pourrait également être expliquée par (i) la dégradation de la prodrogue ou du composé actif par diverses enzymes ou par (ii) l'expulsion de l'inhibiteur en dehors de la bactérie par des pompes à efflux.

Entrée	Composés	Quantité (nanomoles)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
1	Isoniazide	30	30-35
2	199a	800	-
3	200a	800	-
4	201a	800	-
5	202a	800	-
6	202b	800	-
7	199c	800	8
8	200c	800	-
9	201c	800	10
10	202c	800	8
11	202f	800	-

Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sur des cultures de *M. smegmatis* en boîtes de Pétri pour les différentes prodrogues **199-202**.

Soupçonnant que ces molécules soient incapables de traverser la paroi bactérienne parce qu'elles ne sont pas assez lipophiles, nous avons testé les molécules **215-218** où le groupement hydroxamate est protégé par le groupe DMB. L'ensemble de ces composés ne permet pas d'inhiber la croissance d'*E. coli* (données non présentées), alors que certains composés inhibent la croissance de *M. smegmatis* (Tableau 18).

Entrées		Composés	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) pour 800 nanomoles de prodrogues	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) pour 30 nanomoles d'isoniazide
1	X = Y = H	215a	19	33
2		216a		
3		217a	-	31
4		218a	26	
5	X = Me Y = H	215b	-	28
6		216b	-	
7		217b	-	
8		218b	-	
9	X = Cl Y = H	215c	25	36
10		216c	22	
11		217c	-	35
12		218c	33	
13	X = Y = Cl	215d	11	35
14		216d	12	
15		217d	-	
16		218d	16	
17	X = Br Y = H	215e	20	42
18		216e	21	
19		217e	8	
20		218e	31	
21	X = CF ₃ Y = H	215f	19	24
22		216f	17	
23		217f	-	
24		218f	25	
25	X = OMe Y = H	215g	-	27
26		216g	-	
27		217g	-	
28		218g	-	

Tableau 18 : Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne obtenus sur des cultures de *M. smegmatis* sur boîtes de Petri pour les composés protégés avec le DMB (**215** à **218**).

Il semblerait que la présence du groupement DMB améliore grandement la capacité de ces molécules à inhiber la croissance de *M. smegmatis*. En effet, certaines prodrogues où le cycle aromatique n'est pas substitué **215a** et **218a** permettent d'inhiber la croissance de cette bactérie avec des diamètres d'inhibition respectifs de 19 mm et 26 mm (Tableau 18 – Entrées 1 à 4). La présence du groupement protecteur DMB semble avoir une incidence sur les propriétés inhibitrices car ces deux molécules permettent l'inhibition de la croissance de la mycobactérie alors que leurs analogues déprotégés **199a** et **202a** ne le permettaient pas. C'est pourquoi nous pensons que la présence d'un tel groupement permet d'augmenter la lipophilie de l'acide hydroxamique ce qui favoriserait la pénétration de ces composés au sein de la bactérie. Les prodrogues dont le noyau benzylique du groupe cycloSaligényle est substitué par un méthyle (**215-218/b** – Tableau 18 – Entrées 5 à 8) ou par un méthoxy (**215-218/g** – Tableau 18 – Entrées 25 à 28) restent inactives malgré la présence du DMB. Ce n'est probablement pas un problème de diffusion à travers la paroi bactérienne mais plutôt de libération du phosphate. En effet, ces composés sont substitués par des groupements électro-donneurs, ce qui ralentit, comme nous l'avons décrit dans la partie consacrée aux tests de stabilité, la vitesse de libération de la substance active. Ceci pourrait avoir pour conséquence que la concentration en inhibiteur soit trop faible pour inhiber la DXR et ainsi empêcher la croissance bactérienne. Les prodrogues **217a,c-f**, dont l'hydrolyse donnent la molécule **178a** ne sont pas actives (une petite inhibition a été observée pour **217e** mais il faut noter que dans ce cas la zone d'inhibition induite par l'isoniazide est de 42 mm). Ce phénomène peut aisément s'expliquer par le fait que la molécule **178a** est la moins efficace pour inhiber la DXR de *M. smegmatis* ($IC_{50} = 9,2 \mu M$ – cf. Chapitre I – Partie 2 p.120). S'il n'est pas évident de comparer les différents types de prodrogues entre elles du fait des différences notées pour les zones d'inhibition induite par l'isoniazide, la présence d'un groupe électro-attracteur ne semble pas améliorer d'une manière conséquente le pouvoir inhibiteur. Les meilleurs diamètres de zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenus pour les composés substitués par un halogène (**215** à **218/d-e** – Tableau 18 – Entrées 13 à 20) ou un groupe trifluorométhyle (**215** à **218/f** – Tableau 18 – Entrées 21 à 24). Une très faible inhibition a été observée avec les prodrogues dont le noyau est substitué par 2 atomes de chlore (**215**, **216**, **218/d** – Tableau 18 – Entrées 13 à 16) mais ce sont aussi les molécules les plus instables avec des temps de demi-vie court à un pH de 7 ($t_{1/2} = 6,5$ h). C'est pourquoi la libération de la substance active pourrait se produire dans le milieu extracellulaire et ainsi diminuer la concentration d'inhibiteur intracellulaire. Par contre pour un type de prodrogue donné, c'est toujours celle qui donne l'inhibiteur **178b** qui est la plus efficace. Ces observations sont en

accord avec celles faites dans la Partie 2, car la substance active relarguée est le composé **178b** qui a une IC_{50} de 233 nM sur la DXR de *M. smegmatis*. Le composé **177** s'est également révélé être efficace pour inhiber la DXR de cette mycobactérie ($IC_{50} = 279$ nM), pourtant les prodrogues libérant le composé **177** sont bien moins efficaces pour inhiber la croissance bactérienne. Une explication pertinente ne permet pas rationaliser ces résultats, soit les prodrogues pénètrent moins bien, soit la libération du phosphate est plus lente ou bien encore la coupure du groupe DMB est moins efficace.

Les composés Bis(*cycloSaligényles*) **219a-g** ont également été testés sur les souches d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Comme précédemment, aucun composé n'a pu empêcher la croissance d'*E. coli*. Par contre, les trois composés 5-Cl-Bis(*cycloSal*) **219c**, 5-Br-Bis(*cycloSal*) **219e** et 5-CF₃-Bis(*cycloSal*) **219f** ont permis d'inhiber la croissance de la mycobactérie (Tableau 19 – Entrées 3 à 5). Le composé **219c** est nettement le plus actif avec un diamètre de zone d'inhibition de 31 mm. Cette fois-ci, nous pouvons noter que la présence d'un groupe électro-attracteur sur le noyau benzylique a un effet bénéfique. En effet, les autres prodrogues testées (**219a** avec X = H, **219b** X = Me et **219g** X = OMe) sont incapables d'inhiber la croissance de *M. smegmatis*.

Entrées	Composés	Diamètres de la zone d'inhibition (mm) pour 800 nanomoles de prodrogues 219	Diamètres de la zone d'inhibition (mm) pour 30 nanomoles d'isoniazide
1	219a	-	35
2	219b	-	35
3	219c	31	35
4	219e	10	35
5	219f	8	24
6	219g	-	24

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne obtenus sur des cultures *M. smegmatis* sur boîtes de Petri pour les composés Bis(*cycloSal*) **219a-g**.

Ces résultats sont surprenants car la déprotection totale de ces composés devrait donner finalement l'inhibiteur **178a**, le moins actif sur la DXR et d'autant plus que les prodrogues monosubstituées **217a,c-f** sont inefficaces. Nous pouvons postuler une meilleure incorporation des bis(*cycloSal*) par rapport aux mono(*cycloSal*), une libération plus rapide ou

bien une déprotection partielle pour obtenir un composé qui inhibe plus efficacement la DXR ou bien bloque une autre enzyme d'une voie métabolique importante de la bactérie.

Une quarantaine de molécules ont été testées sur deux souches de bactéries disponibles au laboratoire. Bien que l'ensemble des molécules testées ne permettent pas d'inhiber la croissance d'*E. coli*, quelques composés ont montré des résultats intéressants sur *M. smegmatis*, notamment les prodrogues portant encore le groupement protecteur DMB. A ce stade de nos investigations, deux questions se sont posées : (i) le groupement protecteur DMB est-il hydrolysé ou pris en charge par une enzyme afin de libérer *in situ* les inhibiteurs **30**, **177**, **178a-b** ou (ii) ces inhibiteur phosphate où la pince chélatante est protégée sont-ils des inhibiteurs de l'enzyme (Figure 113) ? Pour tenter de répondre à cette dernière question, il a été nécessaire de synthétiser des analogues d'inhibiteur où la pince chélatante est protégée par un groupement DMB. L'évaluation du pouvoir inhibiteur de ces molécules sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis* a ensuite été réalisée.

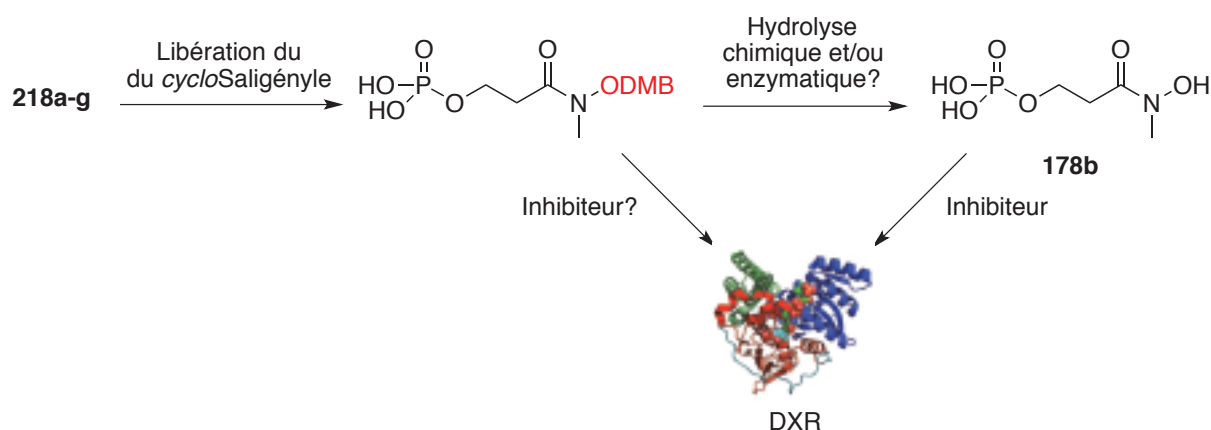


Figure 113 : Modes d'action hypothétiques que pourraient avoir les molécules **218a-g** sur *M. smegmatis*.

V. Synthèse des composés **220** et **221**.

Dans le but de comprendre pourquoi les molécules avec le groupement 2,4-diméthoxybenzyle **215-218** obtiennent de meilleurs pouvoirs inhibiteurs *in vivo* que leurs analogues déprotégés **199-202**, nous avons synthétisé les composés phosphonates **220a-b** et phosphates **222a-b** (Figure 114). Ces quatre composés ont été testés *in vitro* sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis* afin de déterminer leur pouvoir inhibiteur. Si ces molécules ont des IC₅₀

d'un ordre de grandeur du micromolaire, cela pourrait signifier que ces molécules sont des inhibiteurs de la DXR. A l'inverse, si les IC_{50} sont nettement supérieures (100 à 1000 fois) aux IC_{50} des molécules parentes, elles ne peuvent pas être considérées comme inhibant la croissance bactérienne par inhibition de la DXR, impliquant la présence d'un autre mécanisme pour la libération de l'inhibiteur au sein de la cellule.

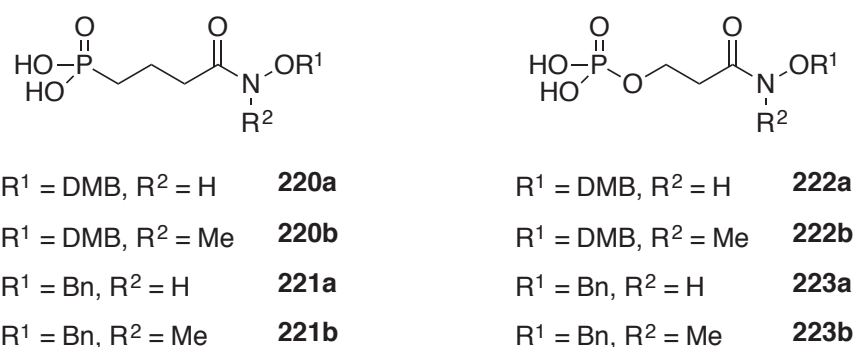
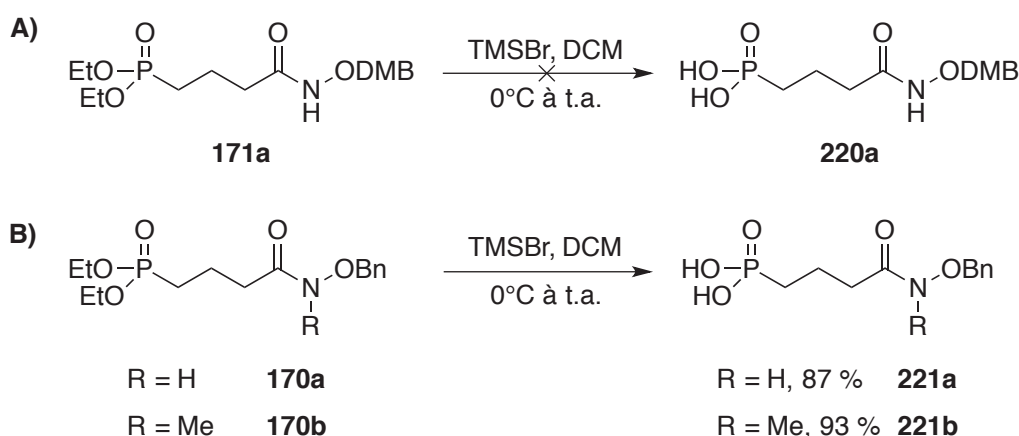


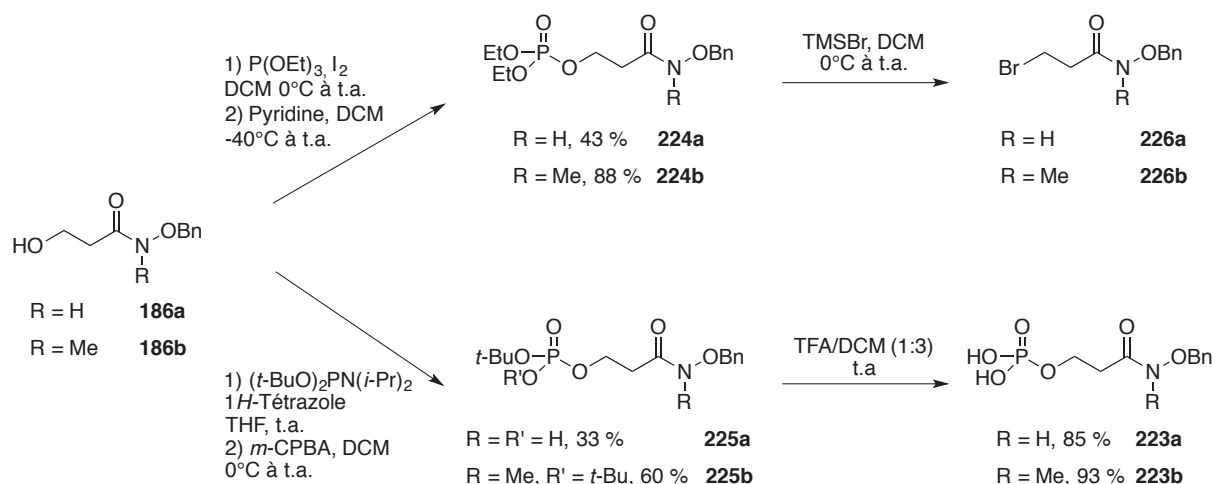
Figure 114 : Molécules cibles pour l'évaluation des propriétés inhibitrices **220** à **223**.

Afin d'obtenir les composés **220a-b** en série phosphonate nous avons entrepris de faire un test de déprotection des éthylenes sur la molécule **171a** avec du TMSBr dans du DCM (Figure 115 -A). Malheureusement, nous n'avons pu obtenir le composé désiré. En effet, l'analyse du brut réactionnel par spectroscopie RMN confirme l'obtention du produit totalement déprotégé, soit le composé **42**. Le TMSBr déprotège les éthylenes du phosphonate mais également le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzyle. Les éthylenes d'un groupement phosphonate peuvent être déprotégés en milieu aqueux acide à reflux.³² Or la présence du groupement ODMB ne permet pas d'appliquer cette méthode, car ce groupement protecteur est labile en milieu acide. A ce stade, il convient de changer le groupement protecteur trop labile pour un traitement avec du TMSBr ou en milieu acide. Nous avons choisi de synthétiser les molécules **221a-b** et **223a-b**, où le groupement protecteur de l'acide hydroxamique est un benzyle qui est compatible avec un traitement au TMSBr.³³ La synthèse des molécules **222a-b** n'a alors pas été envisagée.

L'obtention des deux composés phosphonate **221a-b** est réalisée par déprotection des éthylenes en traitant les molécules **170a** et **170b**, précédemment synthétisées (cf. Chapitre I – Partie 1 p.106), avec du TMSBr dans du DCM (Figure 115 – B).

Figure 115 : Déprotection des éthylenes sur les molécules **171a** et **170a-b**.

Pour synthétiser les composés **223a-b** nous avons choisi d'utiliser la méthode décrite par Ghilagaber *et al* et qui consiste en la synthèse d'un dérivé de diéthyle phosphate et sa déprotection avec du TMSBr.³⁴ La phosphorylation est réalisée en présence de triéthylphosphite et de diiode pour former *in situ* l'iodure de diéthylphosphoryle, qui est mis à réagir avec les alcools primaires **186a** et **186b** en présence de pyridine pour conduire aux composés phosphorylés **224a** et **224b** avec des rendements respectifs de 43 % et 88 % (Figure 116). La déprotection des groupements éthylenes est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, soit en présence de TMSBr dans du DCM. Malheureusement, les produits obtenus ne sont pas les produits désirés **223a** et **223b** mais les produits issus de la substitution du phosphate par le brome **226a-b**.

Figure 116 : Synthèse des composés **224a-b**, **225a-b** et **223a-b**.

Afin de remédier à ce problème, nous avons choisi de remplacer les éthyles par des *t*-butyles, car ces derniers peuvent être déprotégés en milieu acide en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA).³⁵ Là encore, l'utilisation du DMB comme groupe protecteur ne peut être envisagée, car ce dernier est déprotégé dans ces conditions. C'est pourquoi nous avons utilisé les molécules **186a-b** où un benzyle est utilisé comme groupe protecteur de l'acide hydroxamique. La phosphorylation des alcools primaires **186a-b** est effectuée avec du *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*t*-butyle en présence de 1*H*-tétrazole dans du DCM. L'oxydation du phosphore (III) en phosphore (V) est réalisée avec du *m*-CPBA. Le mono phosphate de *t*-butyle **225a** a été obtenu lors de l'étape de phosphorylation (Figure 116). L'agent oxydant utilisé, le *m*-CPBA, a une pureté de 77 % (Sigma-Aldrich). L'acide 3-chlorobenzoïque présent a pu favoriser la déprotection d'un des *t*-butyles et ainsi conduire au composé **225a**. La relative polarité de ce composé a rendu l'étape de purification compliquée, ce qui explique le faible rendement obtenu (33%). Pour la synthèse du composé **225b**, le *m*-CPBA a préalablement été purifié par lavage avec une solution tampon phosphate à pH de 7,2, puis utilisé pour l'oxydation du phosphore (III).³⁶ Dans ce cas le phosphate de di-*t*-butyle a été obtenu après purification avec un rendement de 60 % (Figure 116). La déprotection des groupes *t*-butyle est réalisée dans un mélange TFA/DCM (1 :3) et permet d'obtenir les composés **223a-b** avec des rendements respectifs de 85 et 93 %.

Les molécules **221a-b** et **223a-b** ont été testées *in vitro* sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Aucun de ces quatre composés ne présente des propriétés inhibitrices (Tableau 20).

Composés	Pourcentage d'inhibition de la DXR de <i>M. smegmatis</i> à 100 μ M.	IC ₅₀ (μ M) sur la DXR d' <i>E. coli</i>
221a	10 %	157
221b	10 %	178
223a	10 %	3000
223b	10 %	174

Tableau 20 : Pourcentage d'inhibition et IC₅₀ obtenus sur les souche de *M. smegmatis* et *E. coli*.

Ces composés ont également été testés *in vivo* sur des cultures d'*E. coli* et *M. smegmatis* en milieu gélosé. De façon peu surprenante, aucune molécule ne permet d'inhiber la croissance de ces deux bactéries. En effet, la présence du groupement phosphate libre limite très fortement la diffusion par voie passive au travers la membrane plasmique des bactéries de telles molécules.

Suite aux tests d'inhibitions réalisées avec des prodrogues *cycloSaligényles* **215** à **218**, nous nous étions posés deux questions, à savoir : (i) est-ce que les composés de type **221a-b** et **223a-b** sont des inhibiteurs de la DXR ou (ii) le groupement protecteur de l'acide hydroxamique (DMB) est-il hydrolysé par une enzyme (Figure 113) ? La synthèse et l'évaluation des propriétés inhibitrices *in vitro* et *in vivo* des dérivés phosphate **221a-b** et **223a-b** permet d'affirmer que de tels composés ne sont pas des inhibiteurs de la DXR. Au vu de ces résultats, il semblerait que le groupement 2,4-diméthoxybenzyle des prodrogues **215** à **218** soit coupé intracellulairement soit *via* un processus chimique soit *via* un processus enzymatique.

VI. Conclusion

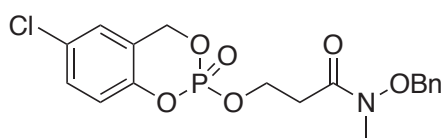
Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à la synthèse de prodrogues *cycloSaligényles* d'inhibiteurs phosphonates et phosphates de la DXR ainsi qu'à l'évaluation de leurs propriétés inhibitrices.

Nous avons commencé notre investigation par la conception de prodrogues *cycloSaligényle* d'inhibiteurs phosphonates de la DXR **161a-b** et **162a-b**. Deux voies de synthèse ont été envisagées pour l'introduction du motif *cycloSaligényle*, mais aucune de ces deux voies n'a permis l'obtention des composés **161a-b** et **162a-b**. Leurs évaluations biologiques n'ont donc pas pu être effectuées.

Parallèlement, nous nous avons entrepris la synthèse de dérivés phosphates de la fosmidomycine comme la fosfoxacine **30** et les composés **177** et **178a-b**. Bien que la fosfoxacine et son analogue méthylé soient connus, ils n'avaient jamais été testés sur les DXR d'*E. coli* et de *M. smegmatis*. Les composés **30**, **178a** et **178b** ont obtenu des résultats similaires à ceux induits par la fosmidomycine et le FR-900098.

La présence d'un groupement phosphate diminue cependant considérablement la biodisponibilité de ces produits, en particulier chez les mycobactéries. C'est pourquoi, nous avons choisi de synthétiser ces composés sous forme de prodrogues de type *cycloSaligényle*.

Une quarantaine de prodrogues d'inhibiteurs phosphates a été synthétisée et testée sur les souches disponibles au laboratoire. Une quinzaine de molécules empêchent la croissance de *M. smegmatis*. Pour les meilleurs candidats, il ne s'agit pas d'une prodrogue, mais d'une double prodrogue car l'acide hydroxamique reste protégé par le 2,4-diméthoxybenzyle. Ce dernier a semble-t-il facilité la pénétration des molécules dans la cellule par diffusion passive, puis une enzyme ou une hydrolyse chimique a permis la libération de l'inhibiteur. Les prodrogues de type Bis(*cycloSaligényle*) ont permis d'améliorer le pouvoir inhibiteur de la molécule parente **178a**, qui est le moins bon inhibiteur de la DXR de *M. smegmatis*. Il semblerait que là encore le présence du groupement DMB combinée à la présence d'une double prodrogue augmente la lipophilie de la molécule et ainsi sa pénétration. Lors des séances de Travaux Pratique, des étudiants ont synthétisés une molécule de type 5-Cl-(*cycloSal*) ou l'acide hydroxamique est protégé par un groupement benzyle. Ce composé a été testé sur des cultures de *M. smegmatis* et a permis d'empêcher la croissance de la mycobactérie (diamètre d'inhibition 42 mm à 800 nanomoles contre un diamètre d'inhibition de 32 mm pour l'isoniazide à 30 nanomoles). Ce résultat très encourageant nous pousse à continuer nos investigations dans la synthèse de prodrogues *cycloSaligényles* protégées par un benzyle plus robuste qu'un DMB. Malheureusement l'ensemble des candidats n'inhibe pas la croissance d'*E. coli*.



Molécule synthétisée par les étudiants en TP

Dans le but d'améliorer les propriétés inhibitrices de tels composés, des prodrogues *cycloSaligényle* de seconde génération (cf. Chapitre I – Introduction p.85) pourraient être synthétisés. En effet, ce type de composé permet d'augmenter la concentration intracellulaire de prodrogues en favorisant son internalisation tout en empêchant son externalisation. Ainsi, une importante concentration intracellulaire de prodrogue engendrerait une importante concentration d'inhibiteur, ce qui pourrait augmenter les propriétés inhibitrices de ces molécules.

- (1) Meier, C. 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-Benzodioxaphosphinin-2-oxides- A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–72.
- (2) Rios Morales, E. H.; Balzarini, J.; Meier, C. Diastereoselective Synthesis of cycloSaligenyl-Nucleosyl-Phosphotriesters. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1649–1659.
- (3) Allegretti, P. a; Ferreira, E. M. Generation of α,β -Unsaturated Platinum Carbenes from Homopropargylic Alcohols: Rearrangements to Polysubstituted Furans. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5924–5927.
- (4) Ludek, O. R.; Krämer, T.; Balzarini, J.; Meier, C. Divergent Synthesis and Biological Evaluation of Carbocyclic α -, Iso- and 3'-Epi-Nucleosides Ans Their Lipophilic Nucleotide Prodrugs. *Synthesis*. **2006**, *8*, 1313–1324.
- (5) Meier, C.; Lorey, M.; Clercq, E. De; Balzarini, J. cycloSal-2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidine Monophosphate (cycloSal-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417–1427.
- (6) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'- Didehydrothymidine (d4T) - A New Pro-Nucleotide Approach1-. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99–104.
- (7) Ruda, G. F.; Alibu, V. P.; Mitsos, C.; Bidet, O.; Kaiser, M.; Brun, R.; Barrett, M. P.; Gilbert, I. H. Synthesis and Biological Evaluation of Phosphate Prodrugs of 4-Phospho-D-Erythronohydroxamic Acid, an Inhibitor of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1169–1180.
- (8) Zink, C. N.; Kim, H.; Fishbein, J. C. Synthesis and Aqueous Chemistry of Alpha-Acetoxy-N-Nitrosomorpholine : Reactive Intermediates and Products. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 202–209.
- (9) Fonvielle, M.; Coinçon, M.; Daher, R.; Desbenoit, N.; Kosieradzka, K.; Barilone, N.; Gicquel, B.; Sygusch, J.; Jackson, M.; Therisod, M. Synthesis and Biochemical Evaluation of Selective Inhibitors of Class II Fructose Bisphosphate Aldolases: Towards New Synthetic Antibiotics. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14*, 8521–8529.
- (10) Baughman, T. W.; Sworen, J. C.; Wagener, K. B. The Facile Preparation of Alkenyl Metathesis Synthons. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943–10948.
- (11) Petroski, R. J. Improved Preparation of Halopropyl Bridged Carboxylic Ortho Esters. *Org. Commun.* **2008**, *1*, 48–53.
- (12) Huang, F.-C.; Shoupe, T. S.; Lin, C. J.; Lee, T. D. Y.; Chan, W.; Tan, J.; Schnapper, M.; Suh, J. T.; Gordon, R. J.; Sonnino, P. A.; Sutherland, C. A.; Inwegen, R. G. Van;

- Coutts, S. M. Differential Effects of a Series of Hydroxamic Acid Derivatives on 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase from Neutrophils and 12-Lipoxygenase from Platelets and Their *in vivo* Effects on Inflammation and Anaphylaxis. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1836–1842.
- (13) Wang, L.; Prabhudas, B.; Clive, D. L. J. Formation of Carbocycles by Intramolecular Conjugate Displacement: Scope and Mechanistic Insights. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6003–6012.
- (14) Lin, D. W.; Masuda, T.; Biskup, M. B.; Nelson, J. D.; Baran, P. S. Synthesis-Guided Structure Revision of the Sarcodonin, Sarcoviolin, and Hydrellin Natural Product Family. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1013–1030.
- (15) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 2375–2385.
- (16) Smith, A. B.; Wan, Z. Total Synthesis of the Ansamycin Antibiotic (+)-Thiazinotrienomycin E. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3738–3753.
- (17) Mico, A. De; Margarita, R.; Parlanti, L.; Vescovi, A.; Piancatelli, G.; Sapienza, L. A Versatile and Highly Selective Hypervalent Iodine (III)/ Alcohols to Carbonyl Compounds. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6974–6977.
- (18) Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Alkoxy-carbonyloxyethyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved *in vivo* Antimalarial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 305–314.
- (19) Gissot, A.; Volonterio, A.; Zanda, M. One-Step Synthesis of *O*-Benzyl Hydroxamates from Unactivated Aliphatic and Aromatic Esters. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 6925–6928.
- (20) Sharma, S. K.; Miller, M. J.; Payne, S. M. Spermaxatin and Spermaxatol: New Synthetic Spermidine-Based Siderophore Analogues. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 357–367.
- (21) Johnsson, R.; Mani, K.; Cheng, F.; Ellervik, U. Regioselective Reductive Openings of Acetals; Mechanistic Details and Synthesis of Fluorescently Labeled Compounds. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3444–3451.
- (22) Wang, P.; Hu, H.; Wang, Y. Application of Excited State Meta-Effect in Photolabile Protecting Group Design. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2831–2833.
- (23) Zuo, L.; Yao, S.; Wang, W.; Duan, W. An Efficient Method for Demethylation of Aryl Methyl Ethers. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 4054–4056.
- (24) Mamidi, N.; Borah, R.; Sinha, N.; Jana, C.; Manna, D. Effects of Ortho Substituent

- Groups of Protocatechualdehyde Derivatives on Binding to the C1 Domain of Novel Protein Kinase C. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10684–10692.
- (25) Barlaam, B.; Hamon, A.; Maudet, M. New Hydroxylamines for the Synthesis of Hydroxamic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7865–7868.
- (26) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Girmay, B. Cis-Trans Isomerism in Monoalkylhydroxamic Acids by ^1H , ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 970–973.
- (27) Brown, D. A.; Glass, W. K.; Mageswarant, R.; Mohammed, S. A. ^1H and ^{13}C NMR Studies of Isomerism in Hydroxamic Acids. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 40–45.
- (28) Brown, D. A.; Coogan, R. A.; Fitzpatrick, N. J.; Glass, W. K.; Abukshima, D. E.; Shield, L.; Ahlgrén, M.; Smolander, K.; Pakkanen, T. T.; Pakkanen, Tapani, A.; Peräkylä, M. Conformational Behaviour of Hydroxamic Acid : *Ab Initio* and Structural Studies. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 2673–2679.
- (29) Kakkar, R.; Grover, R.; Chadha, P. Conformational Behavior of Some Hydroxamic Acids. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2200–2206.
- (30) Kolasa, T. The Conformational Behaviour of Hydroxamic Acids. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 1753–1754.
- (31) Brown, A. C.; Parish, T. DXR Is Essential in *Mycobacterium tuberculosis* and Fosmidomycin Resistance Is due to a Lack of Uptake. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 78–86.
- (32) Witteck, J. T.; Malova, P.; Peck, S. C.; Cicchillo, R. M.; Hammerschmidt, F.; van der Donk, W. On the Stereochemistry of 2-Hydroxyethylphosphonate Dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4236–4239.
- (33) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285.
- (34) Ghilagaber, S.; Hunter, W. N.; Marquez, R. Enantioselective Synthesis of C3 Fluoro-MEP. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 97–102.
- (35) Sprung, I.; Carmès, L.; Watt, G. M.; Flitsch, S. L. Synthesis of Novel Acceptor Substrates for the Dolichyl Phosphate Mannose Synthase from Yeast. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 319–332.
- (36) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier.; Burlington, 2003

Chapitre II : Synthèse de prodrogues de type aryl phosphoramidate d'inhibiteurs phosphates de la DXR

I. Introduction

Les prodrogues de type aryl phosphoramidate ont été mises au point par McGuigan *et al.* au début des années 1990. Tout comme les prodrogues de type *cyclo*Saligényles, c'est une approche pronucléotide pour la conception de nouveaux antiviraux et anticancéreux.¹ Ces derniers sont souvent des dérivés de nucléosides qui agissent sur l'ADN polymérase.^{2,3} Afin que ces composés soient actifs, les nucléosides doivent préalablement être convertis en 5'-triphosphates *via* trois étapes de phosphorylation successives. La première phosphorylation est l'étape cruciale car elle est réalisée par une kinase très spécifique vis-à-vis du substrat. Elle s'avère donc être l'étape limitante dans le processus d'activation du nucléoside. Pour pallier ce problème de phosphorylation, plusieurs groupes ont mis au point la synthèse de prodrogues de nucléotides. Après pénétration par voie passive et activation enzymatique de la prodrogue, le 5'-monophosphate de nucléoside est libéré, permettant ainsi de s'affranchir de la première étape de phosphorylation et ainsi d'augmenter les propriétés antivirales et anticancéreuses des composés.

Les prodrogues de type aryl phosphoramidate sont composées (i) d'un groupement phényle qui peut ou non être substitué et (ii) d'un acide aminé, généralement de série L (Figure 117). La présence de ces deux substituants différents sur l'atome de phosphore entraîne la formation d'un centre stéréogène. De plus, la présence d'un acide aminé chiral a pour conséquence l'obtention de deux diastéréoisomères qui sont généralement difficilement séparables.

Le mécanisme de libération de la prodrogue se produit en plusieurs étapes (Figure 117). La première étape est régie par une estérase permettant la libération du carboxylate **227**. Bien que l'estérase ne soit pas clairement identifiée, des études ont permis de mettre en évidence qu'une estérase présente dans le foie de cochon réalise la réaction d'hydrolyse.^{4,5} Dans la deuxième étape, le carboxylate **227** réagit par une réaction d'addition-élimination sur le phosphore pour former un cycle à cinq chaînons **228** avec libération de phénol. Cet intermédiaire **228** est très instable et n'a pu être isolé car il s'hydrolyse rapidement en phosphoramidate **229**.⁶ L'étape finale est la coupure enzymatique du lien phosphoramidate pour libérer le nucléotide et l'acide aminé.

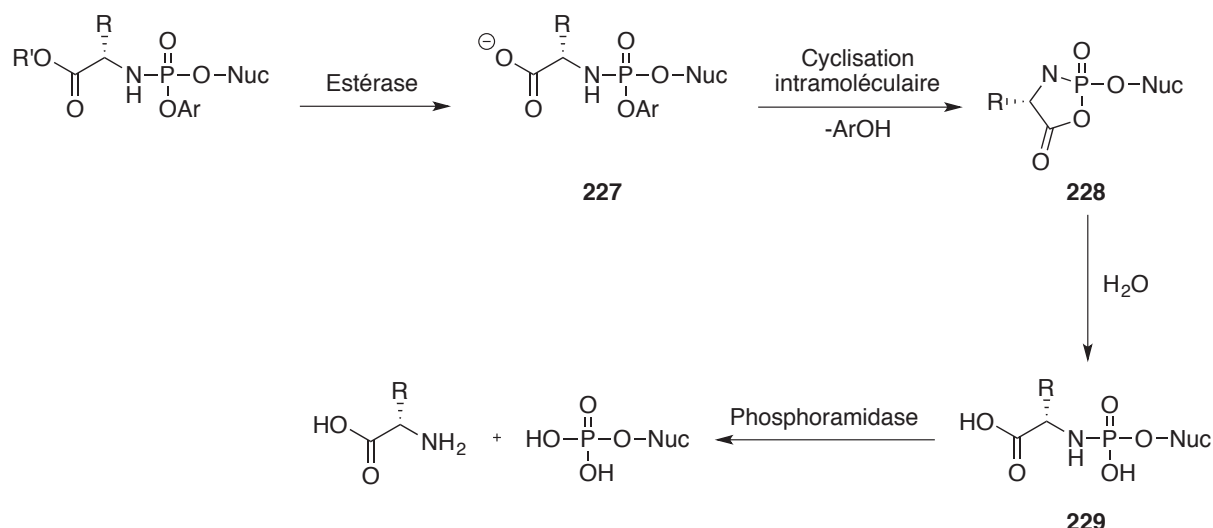


Figure 117 : Etapes du mécanisme de libération à partir d'une prodrogue aryl phosphoramidate.

Sur ce type de molécule, trois sites peuvent être modifiés (i) la chaîne latérale de l'acide aminé (ii) l'ester et (iii) le cycle aromatique par la substitution de groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs. Afin d'évaluer si des modifications au niveau de ces trois sites ont un impact sur l'activité antivirale de ces composés, l'équipe de McGuigan a entrepris de faire différentes modifications sur une prodrogue aryl phosphoramidate du d4T (2',3'-didésoxy-2',3'-didéshydro thymidine), un nucléoside connu pour avoir une activité anti-VIH.

Dans un premier temps, ils ont entrepris de synthétiser des prodrogues aryl phosphoramidates du d4T en faisant varier la nature des acides aminés. Pour ce faire, ils ont choisi des acides aminés à chaîne latérale aliphatique (alanine, glycine, valine), aromatique (phénylalanine), soufrée (méthionine, méthylcystéine), polaire (méthylaspartate et méthylglutamate) et un acide aminé non naturel, la diméthylglycine (Figure 118). L'activité antivirale de ces onze composés a été évaluée sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et VIH-2 et sur des cellules mutantes déficitaires en thymidine kinase CEM/TK⁻ infectées par le VIH-2 et comparée avec le d4T. Les composés **230a** et **231** présentent des propriétés antivirales intéressantes sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1. Les EC₅₀ sont respectivement de 0,085 µM et 0,29 µM contre une EC₅₀ de 0,36 µM pour le d4T. Cette même tendance est observée sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-2. Les autres composés **230b-j** n'ont pas une meilleure activité antivirale que le composé parent sur les deux types de virus. Sur les cellules mutantes CEM/TK⁻, toutes les prodrogues ont une

meilleure activité que le d4T (EC_{50} de 25 μM). Dans ce cas également, les meilleurs candidats sont les composés **230a** et **231**.^{7,8}

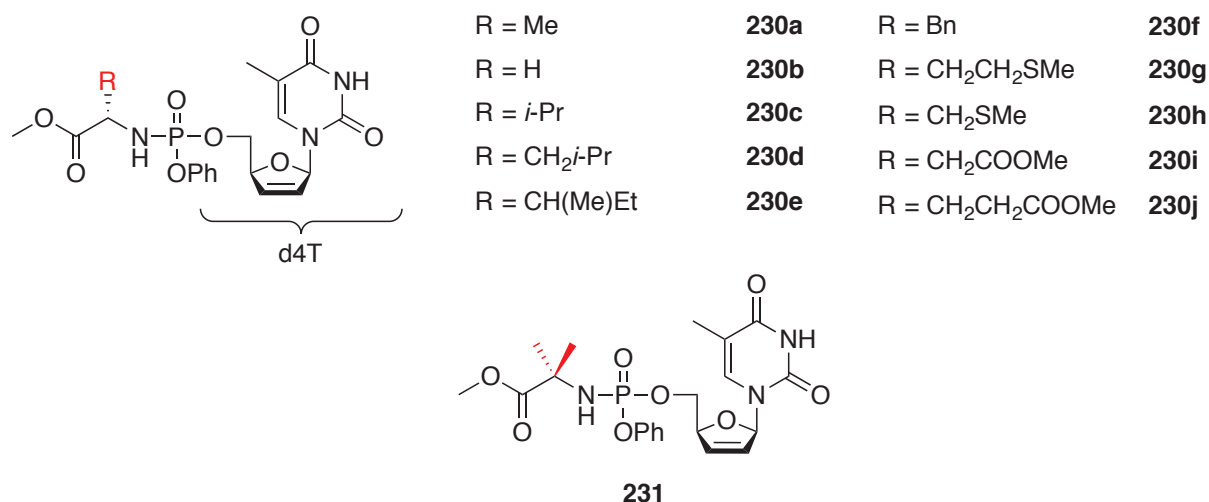


Figure 118 : Les différents acides aminés utilisés pour la conception de prodrogues de type aryl phosphoramidates du d4T.

Cette étude permet de mettre en évidence l'importance du choix de la chaîne latérale de l'acide aminé. En effet, si cette dernière est absente (glycine) ou trop volumineuse il y a une diminution des propriétés antivirales. De plus, la nature de ces chaînes latérales est également importante, car les acides aminés polaires n'ont pas permis d'avoir une bonne activité antivirale. Les auteurs supposent qu'une poche hydrophobe de petite taille doit être présente dans les sites actifs des enzymes entrant en jeu dans le mécanisme de libération, faisant ainsi de l'alanine ou de la diméthylglycine de meilleurs substrats.

Dans un deuxième temps, des dérivés du d4T où la nature du groupement ester est modifiée, ont été synthétisés et évalués sur les mêmes cellules que précédemment (Figure 119). Le composé de référence, le **230a** a une EC_{50} de 0,074 μM sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1. La substitution du méthyle par un éthyle **232a** n'a aucune incidence sur l'activité antivirale. Par contre l'introduction d'un groupement volumineux, comme un *t*-butyle **232b** diminue considérablement l'activité antivirale de la molécule (EC_{50} = 0,85 μM). De façon surprenante, l'activité est améliorée par un facteur deux avec un groupement cyclique **232c** et par un facteur trois avec des groupements aromatiques de type phényle **232d** ou benzyle **232e** (EC_{50} = 0,025 μM et 0,016 μM).⁹ Dans le cas de l'AZT, un autre nucléoside aux propriétés antivirales, l'introduction d'un groupement phényle (EC_{50} = 0,055 μM) ne

permet pas d'améliorer l'activité antivirale par rapport au nucléoside parent ($EC_{50} = 0,005 \mu M$).¹⁰ Dans ce cas également, le phényle pourrait être un mauvais substrat pour l'estérase impliquée dans le processus d'activation de l'aryl phosphoramidate.

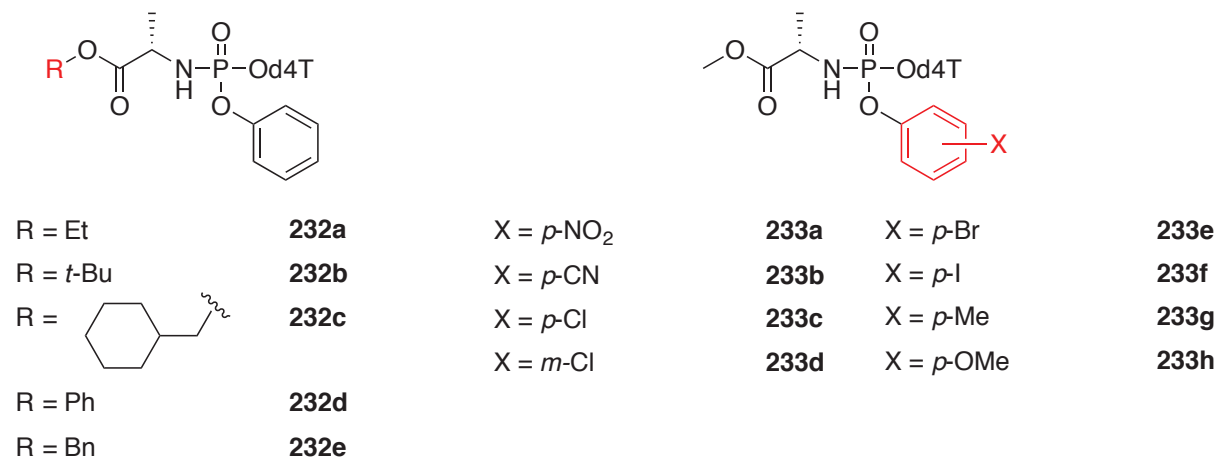


Figure 119 : Modifications de l'ester **232a-e** et différentes substitutions du cycle aromatique **233a-h** pour une prodrogue de type aryl phosphoramidate de d4T.

Dans un troisième temps, l'équipe de McGuigan s'est intéressée à l'influence de la substitution du cycle aromatique par des groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs sur la stabilité chimique et les propriétés antivirales (Figure 119). Dans ce cas encore les composés sont comparés au d4T ou au composé **230a**. Dans une étude parue à la fin des années 1990, McGuigan *et al* ont étudié l'influence de la substitution par différents groupements en position *para* du cycle aromatique. Lorsque le cycle est substitué par des groupements fortement électro-attracteurs, comme un nitro **233a** ou un cyano **233b**, l'activité antivirale de ces composés diminue d'un facteur deux sur les cellules CEM/O infectées par le VIH-1 et de trois sur celles infectées par le VIH-2. Un groupement électro-attracteur modéré, tel un atome de chlore **233c**, permet d'augmenter de manière considérable l'activité antivirale du composé ($EC_{50} = 0,005 \mu M$) contre une EC_{50} de $0,075 \mu M$ pour **230a**.¹¹ Par la suite, ils ont étudié l'influence de la nature de l'halogène et de la position de celui-ci sur le cycle aromatique. Si le chlore est en position *meta* **233d**, l'activité antivirale sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 est diminuée d'un facteur cinq ($EC_{50} = 0,025 \mu M$) par rapport au composé **233c**. Les composés *p*-bromo **233e** et *p*-iodo **233f** ont obtenu des propriétés antivirales très encourageantes bien que leurs EC_{50} soient deux fois plus faibles que celle du composé *p*-chloro **233c**.¹² La présence d'un groupement électro-donneur, comme un méthyle **233g** ou un méthoxy **233h** permet d'améliorer l'activité antivirale d'un facteur deux par

rapport au composé **230a**. Les coefficients de partage de certaines molécules ont également été évalués. Il en ressort que les molécules **233c** (*p*-Cl) et **233g** (*p*-Me) sont plus lipophiles que les molécules **233a** (*p*-NO₂) et **233b** (*p*-CN). Une corrélation entre l'activité et la lipophilie a été établie et a permis de montrer que les composés les plus lipophiles entraînaient une meilleure activité. La pénétration de la membrane par diffusion passive serait alors favorisée pour les composés portant des groupements lipophiles.

Cette stratégie pronucléotide de type aryl phosphoramidate a également été appliquée pour d'autres dérivés de nucléosides comme par exemple la 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxyadénosine (d4A)¹³, la 2',3'-didésoxyadénosine (ddA)¹³ ou encore la 3'-azido-3'-désoxythymidine (AZT).^{14,15}

Ce type de prodrogues a également été appliqué à des dérivés de 4'-azido ribonucléoside, notamment pour la 4'-azidouridine **234**, qui ne présente aucune activité antivirale (EC₅₀ > 100 μM) sur un réplicon du virus de l'hépatite C. Ses pronucléotides **235a-c** ont permis d'augmenter l'activité antivirale de ce composé avec des EC₅₀ comprises entre 0,22 à 0,63 μM (Figure 120).¹⁶ Cette amélioration de l'activité antivirale est sans doute due à une meilleure pénétration du composé dans la cellule. De plus, la libération du ribonucléotide permet également d'éviter la première étape de phosphorylation, qui est l'étape limitante du processus.

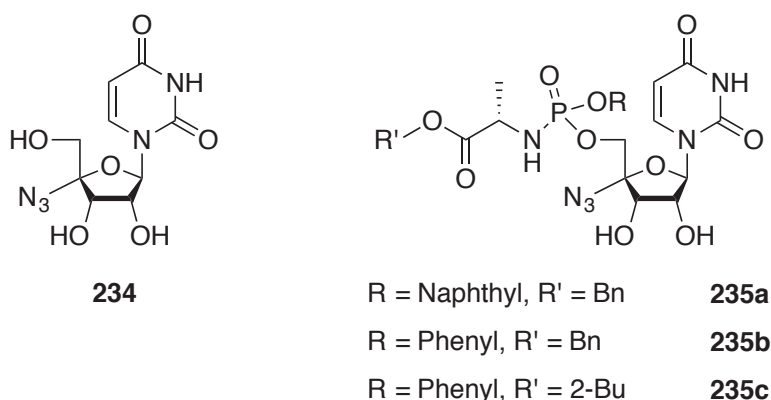


Figure 120 : Pronucléotides **234** à **235a-c**.

L'utilisation de ce type de prodrogue ne s'applique pas uniquement à des dérivés phosphates. Ballatore *et al.* ont décrit la synthèse de prodrogues phosphonamidates du PMPA et PMEPA qui sont des dérivés de nucléoside phosphonate. Des prodrogues de type BisPOC-PMPA et BisPOM-PMEPA ont déjà été rapportées dans la littérature (cf. Introduction générale

p.52)^{17,18} Plusieurs composés ont été synthétisés, évalués sur des cellules CEM/O infectées par le VIH-1 ou le VIH-2 et comparés aux composés parents le PMPA et le PMEA. Les molécules **236a-b**, composées d'un ester méthylique d'alanine et d'un phénol, sont 50 à 70 fois plus actives que les composés parents sur les deux souches étudiées (Figure 121). Dans ce cas également, la L-alanine semble être l'acide aminé apportant les meilleurs résultats, alors que le *p*-chlorophénol diminue les propriétés antivirales des composés.¹⁹

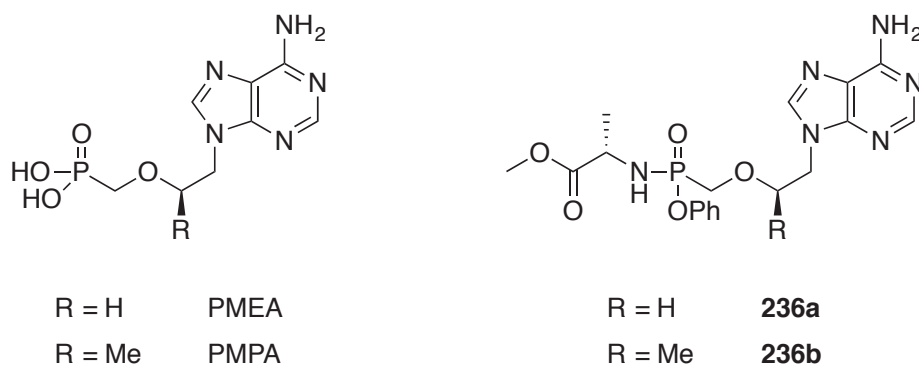


Figure 121 : Antiviraux PMEA et PMPA ainsi que leurs dérivés aryl phosphoramidates **236a-b**.

La glucosamine **237** est utilisée dans la prévention et le traitement de l'arthrose (Figure 122). Bien que différents mécanismes d'action de la glucosamine soient envisagés, il semblerait que le métabolite 6-phosphate y soit impliqué.²⁰ La présence du phosphate limite l'utilisation d'une telle molécule car elle présente une faible biodisponibilité. C'est pourquoi l'équipe de McGuigan s'est intéressée à la synthèse de prodrogues de type aryl phosphoramidates de *N*-acétyl-glucosamine **238** (Figure 122).²¹ L'efficacité de ces composés a été évaluée sur un modèle *in vitro* permettant de mesurer la réduction du taux de GAG (glycosaminoglycane, synthétisée à partir de la glucosamine) libéré dans le milieu de culture. Dans cette étude la glucosamine a une activité protectrice à 10 mM mais s'avère être toxique à cette concentration. En diminuant la concentration d'un facteur 10 ou 100, la glucosamine n'est plus toxique mais ne présente plus d'activité protectrice. Le *N*-acétyl-glucosamine phosphoramidate **238a** est plus efficace que la glucosamine à 10 mM, malheureusement aux concentrations de 1 mM et 0,1 mM il n'a aucune efficacité. Les composés **238b-d** ont permis la réduction du taux de GAG (74 % à 31 % respectivement) à une concentration de 1 mM avec une faible toxicité. La molécule **238d**, qui a une activité modérée à 1 mM, est le

composé qui permet d'obtenir une meilleure réduction du taux de GAG libérée (26 %) à 0,1 mM.²¹

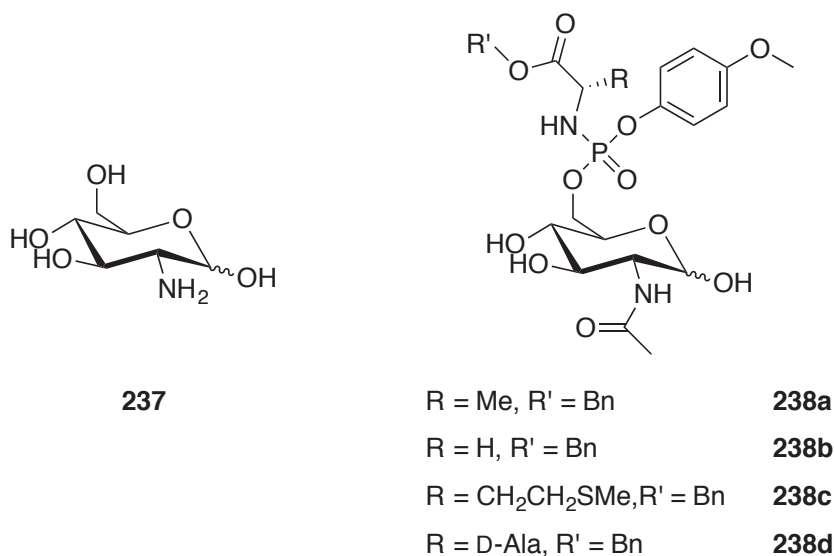


Figure 122 : La glucosamine **237** et les prodrogues aryl phosphoramidate **238a-d**.

Nous avons vu que dans le cas des dérivés de nucléoside, les prodrogues les plus actives étaient composées (i) d'un groupement aryl substitué pas un groupement faiblement électro-attracteur et (ii) d'une *O*-benzyl-L-alanine. Dans le cas des prodrogues de glucosamine, la présence d'un groupement phénol diminue la stabilité des molécules. C'est pourquoi, ces dernières ont été synthétisées avec un groupement *p*-méthoxyphényle. Contrairement aux nucléosides où les meilleurs résultats ont été obtenus avec la L-alanine, ici les acides aminés présentant les meilleurs résultats sont la glycine **238b** et la D-alanine **238d**. La différence de structure de la molécule active (nucléoside *versus* glucosamine) ainsi que la différence de nature des cibles permettent d'expliquer les variations structurales au niveau des prodrogues.

Pour notre étude nous avons choisi de synthétiser des prodrogues de type aryl phosphoramidate des inhibiteurs phosphates **30**, **177** et **178a-b** de la DXR (Figure 123). Ce type de prodrogue n'a jamais été décrit pour la synthèse d'agents antituberculeux. Le choix des substituants de la prodrogue est donc un challenge. Nous avons choisi comme acide aminé la *O*-méthyl-L-alanine qui est un acide aminé couramment utilisé dans la synthèse d'aryl phosphoramidate. Pour des raisons de stabilité chimique, nous avons choisi d'utiliser un *p*-méthoxyphénol afin d'éviter la dégradation des molécules. Au vu des résultats obtenus

sur des cultures d'*E. coli* et *M. smegmatis* avec ce type de prodrogues, nous pourrions par la suite choisir de modifier (i) la chaîne latérale de l'acide aminé (ii) le groupement ester de l'acide aminé ou (iii) la substitution du groupement phényle.

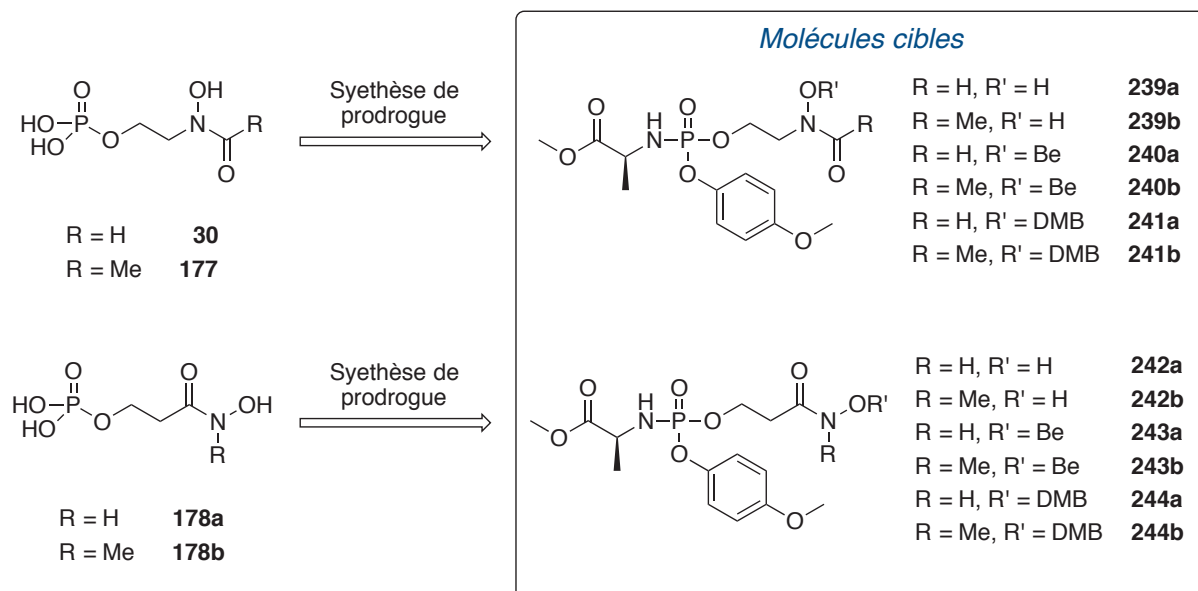


Figure 123 : Prodrogues de type aryl phosphoramidate d'inhibiteurs phosphates de la DXR (**239a-b** à **244a-b**).

II. Synthèse des composés **239a-b** et **240a-b**.

1. Schéma rétrosynthétique

Les molécules cibles **239a-b** et **242a-b** pourraient être obtenues par déprotection des hydroxamates protégés de type **A** et **E** (Figure 124). Ces derniers seraient synthétisés par une réaction d'addition-élimination des synthons de type **B** et **D** (dont la stratégie de synthèse a été évoquée dans la Chapitre I – Partie 3 p.138) sur le chloro arylphosphoramidate **C**. La réaction du *p*-méthoxyphénol avec le trichlorure de phosphore (POCl_3) suivie de l'addition de l'alanine estérifiée permettrait d'obtenir ce synthon **C** (Figure 124). Contrairement aux prodrogues de type *cyclo*Saligényles où le groupe protecteur ne pouvait être un benzyle, dans l'approche phosphoramidate ce dernier semble convenir pour l'obtention des molécules **239a-b** et **242a-b**. Néanmoins, au vu des résultats obtenus pour les prodrogues *cyclo*Saligényles, nous avons également choisi d'évaluer le pouvoir inhibiteur des composés où l'hydroxamate est protégé avec un benzyle **240a-b** et **243a-b** ou avec un diméthoxybenzyle (DMB, **241a-b** et

244a-b) (Figure 123). Pour ce faire, les intermédiaires de type **B** et **D** seront synthétisés avec ces deux groupes protecteurs.

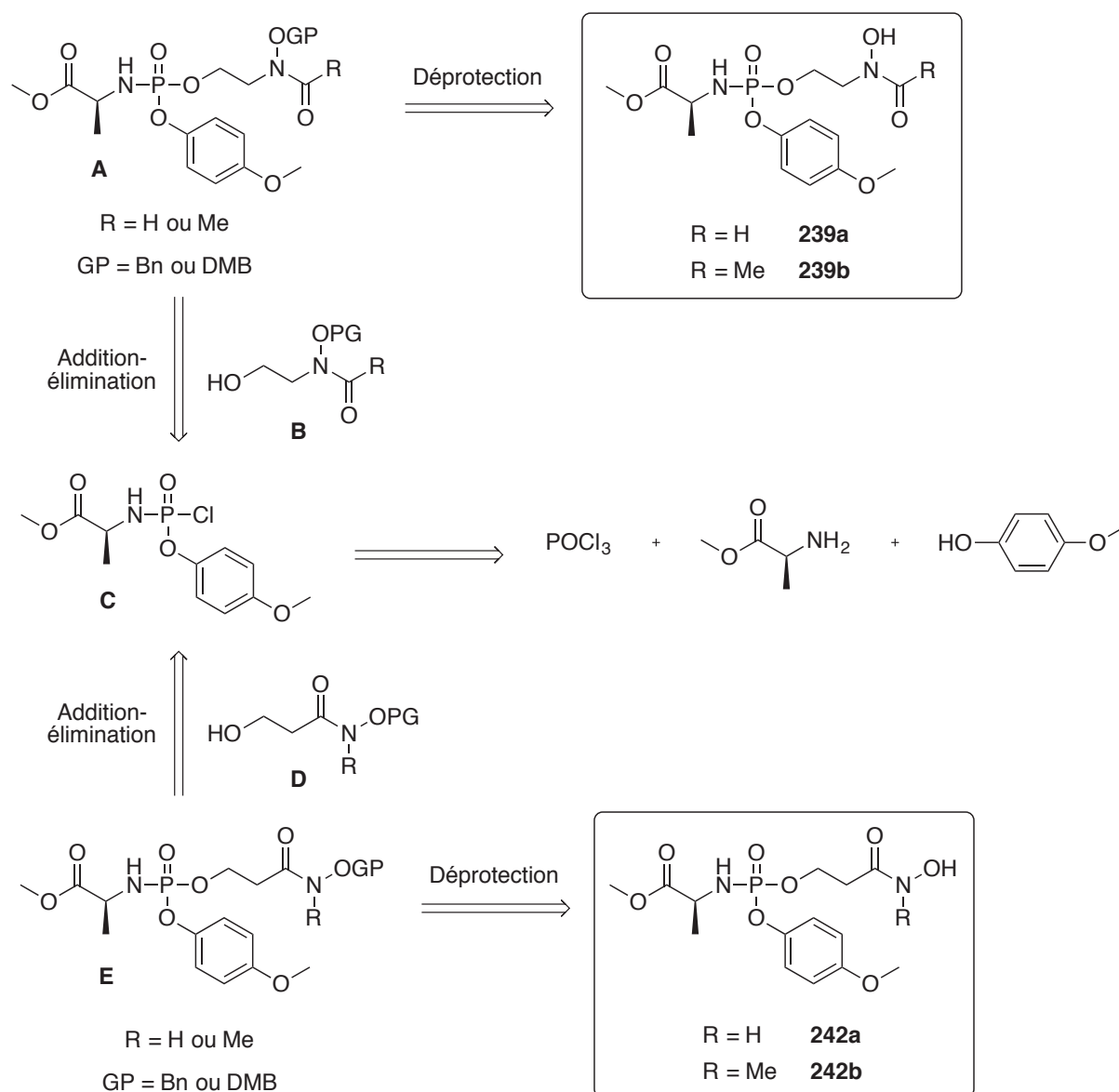


Figure 124 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention des composés **239a-b** et **242a-b**.

2. Synthèse des intermédiaires réactionnels de type B et D

La synthèse des intermédiaires de type **B** (*N*-formylé **209** et *N*-acétylé **210**) où l'acide rétro-hydroxamique est protégé avec le groupement un DMB a déjà été décrite pour la conception des prodrogues *cyclo*Saligényles (Chapitre I – Partie 2 – Figure 105 p.151). Ces

deux composés permettront l'obtention des prodrogues protégées **241a-b** (Figure 123). Le même schéma réactionnel a été utilisé pour la synthèse de ces intermédiaires **B** protégés par un benzyle, qui nous permettront d'accéder aux prodrogues **239a-b** et **240a-b** (Figure 123). L'activation en triflate de l'alcool monoprotégé **180** suivie de la substitution nucléophile de la *O*-benzylhydroxylamine permet d'isoler après purification le composé **245** avec un rendement de 65 %. La formylation ou l'acétylation de cet intermédiaire **245** permet d'obtenir, sans purification, les composés **246a-b**. La déprotection de l'éther silylé est réalisée avec du TBAF.3(H₂O) dans du THF afin d'isoler après purification les composés **247a-b** avec des rendements respectifs sur deux étapes de 82 % et 93 % (Figure 125).

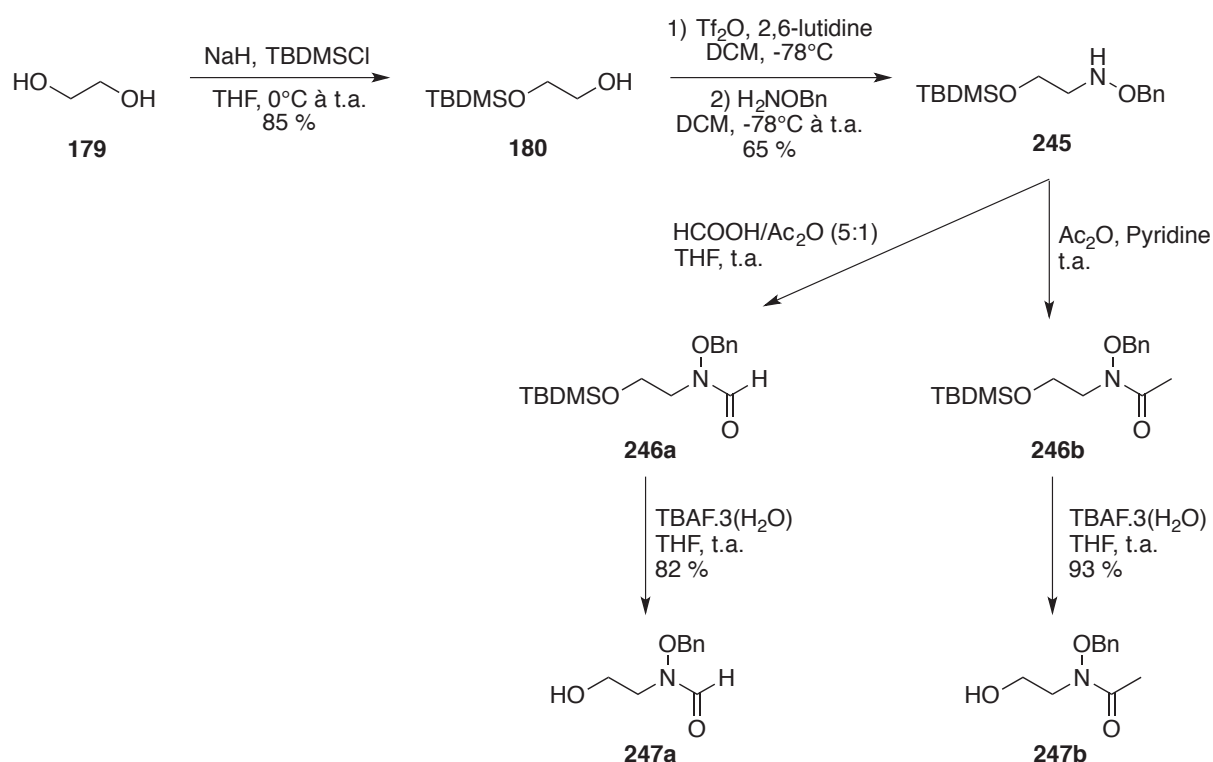


Figure 125 : Schéma réactionnel pour la synthèse des synthons **247a-b**.

Les prodrogues possédant un acide hydroxamique seront obtenues à partir des intermédiaires réactionnels de type **D** (Figure 124). La synthèse des molécules protégées par un benzyle **186a-b** a été décrite dans le Chapitre I – Partie 2 (Figure 93 p.125), ces intermédiaires nous permettront l'obtention des composés **242a-b** et **243a-b**. Les molécules protégées par un DMB **244a-b** seront, quant à elle, obtenues à partir des intermédiaires réactionnels **211** et **212** (Figure 106 p.151).

3. Synthèse de l'intermédiaire réactionnel de type C

La méthode décrite par Ruda *et al.* a été utilisée pour la synthèse de l'intermédiaire réactionnel de type C (Figures 124 et 126).²² Le dichlorophosphoryle **249** est obtenu par réaction du *p*-méthoxyphénol commercial **248** avec du POCl₃ en présence de TEA dans de l'éther. En raison de la sensibilité de cette molécule, elle n'a pas été purifiée et a été directement engagé avec le chlorhydrate de l'ester méthylique de L-alanine afin d'obtenir le chloro aryl phosphoramidate **250**. L'avancement de la réaction a été suivi par spectroscopie RMN du ³¹P, car les phosphores des deux molécules **249** et **250** ne résonnent pas au même déplacement chimique. Après filtration du chlorure de triéthylammonium sous argon, le brut réactionnel a directement été engagé dans l'étape suivante.

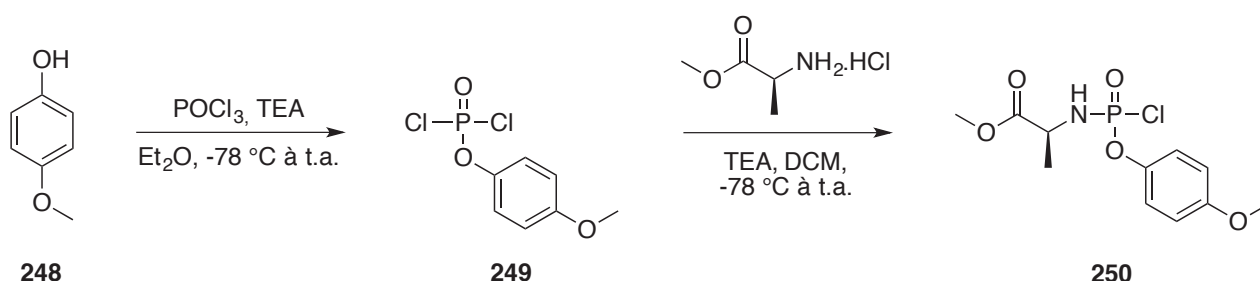
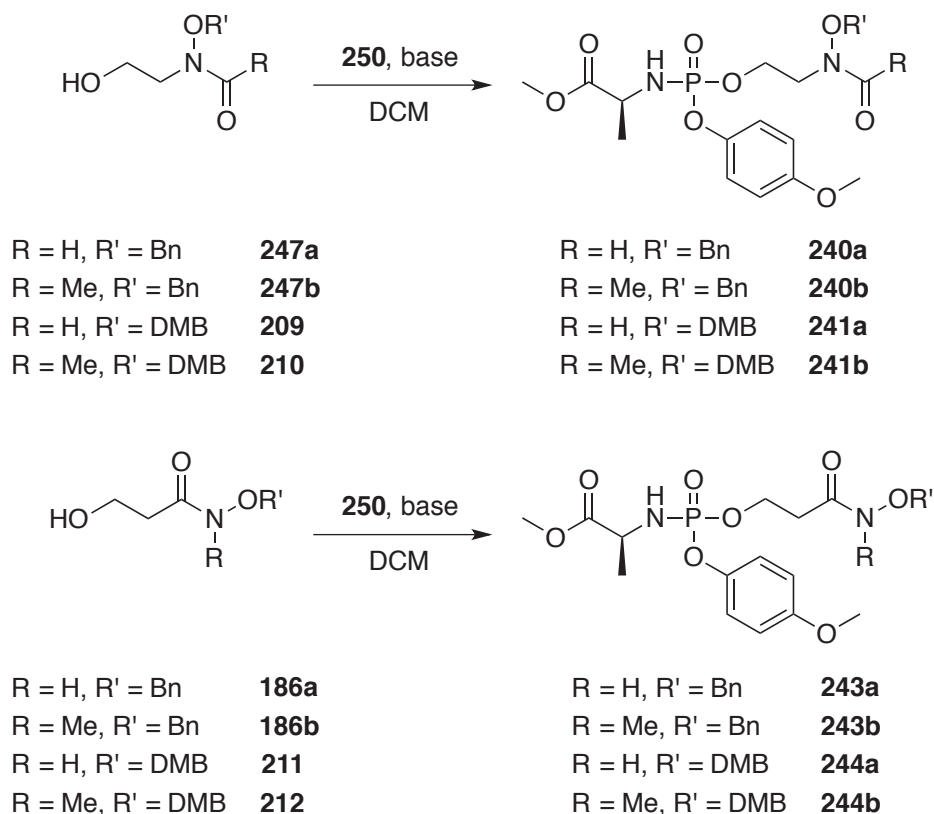


Figure 126 : Synthèse du synthon chloro aryl phosphoramidate **250**.

4. Réaction d'addition élimination : obtention des composés **240a-b**, **241a-b**, **243a-b** et **244a-b**

La réaction d'addition-élimination entre l'alcool primaire de type **B** et **D** et le chloro aryl phosphoramidate **250** est l'étape clé de cette voie de synthèse (Figure 127). Dans la synthèse de pronucléotide, la méthode communément utilisée pour ce type de réaction fait intervenir du *N*-méthylimidazole (NMI) dans du DCM à -78 °C (Méthode A).²² Ces conditions réactionnelles ont été appliquées aux alcools primaires **247a-b** afin d'obtenir les phosphoramidates **240a-b** avec de modestes rendements de l'ordre de 40 % (Tableau 21 – Entrées 1 et 2). Pour améliorer le rendement de la réaction, nous avons essayé d'appliquer les mêmes conditions réactionnelles que celles utilisées pour la synthèse des prodrogues *cyclo*Saligényles, à savoir l'association de TEA avec de la DMAP dans du DCM (Méthode B) ou de la pyridine dans du DCM (Méthode C). La méthode B a été appliquée pour l'obtention

des molécules **241a-b**, **243b** et **244b**. Malheureusement, ces conditions réactionnelles n'ont pas permis d'améliorer les rendements de la réaction (Tableau 21 – Entrées 3, 4, 6 et 8).



Entrées	Produit de départ	Méthodes	Base	Température	Produit final (Rendement)
1	247a	A	NMI	-78 °C	240a (40 %)
2	247b	A	NMI	-78 °C	240b (41 %)
3	209	B	TEA/DMAP	-40 °C	241a (55 %)
4	210	B	TEA/DMAP	-40 °C	241b (31 %)
5	186a	C	Pyridine	-40 °C	243a (47 %)
6	186b	B	TEA/DMAP	-40 °C	243b (48 %)
7	211	C	Pyridine	-40 °C	244a (31 %)
8	212	B	TEA/DMAP	-40 °C	244b (33 %)

Figure 127 et Tableau 21 : Schéma réactionnel et conditions réactionnelles pour la synthèse des prodrogues de type aryl phosphoramidate.

Les acides hydroxamiques *N*-H **243a** et **244a** ne peuvent pas être obtenus à partir de la méthode B. En effet, nous avons vu que cette méthode permettait la formation d'un produit secondaire de type Bis(prodrogue). Or de faibles quantités de produit ont été engagées durant cette synthèse, la formation de cette bis(prodrogue) était donc à éviter. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la méthode C permettant de former uniquement les composés désirés, soit les molécules **243a** et **244a** (Tableau 20 – Entrées 5 et 7). L'ensemble de ces huit composés a été obtenu en tant qu'un mélange de diastéréoisomères dans des proportions 50 :50. Malheureusement leur séparation par chromatographie sur colonne de silice n'a pas été possible. La RMN du ^1H et du ^{13}C ne permet pas caractériser les deux diastéréoisomères. En RMN du ^{31}P , deux signaux résonnant à environ 3 ppm correspondent aux deux diastéréoisomères.

Les modestes rendements de ces réactions peuvent aussi s'expliquer par le fait que plusieurs purifications ont été nécessaires afin d'obtenir le composé pur. En effet, un sous-produit éluant au même rapport frontal que nos produits attendus a compliqué les purifications. Seules les fractions pures ont été récoltées et les mélanges ont à nouveau été purifiés. La spectrométrie de masse nous a permis d'identifier ce sous-produit en analysant une fraction mixte. Il semblerait que ce sous-produit **251** soit issu de l'addition-élimination de deux molécules d'alanine sur le dichlorophosphoryle **249** (Figure 128). La séparation de ce produit **251** a surtout été compliquée dans le cas des molécules **240a-b**. Ces dernières n'ont pas pu être obtenues pures bien que de multiples essais de purification aient été effectués. Ces composés sont contaminés par le sous-produit **251**. La spectroscopie RMN du ^{31}P permet de mettre en évidence la présence d'un mélange 50 :50 des composés **240a** ou **240b** et du sous-produit **251**. Les mélanges **240a-251** et **240b-251** n'ont pas été engagés dans l'étape de déprotection finale et le pouvoir inhibiteur de ces mélanges sera évalué.

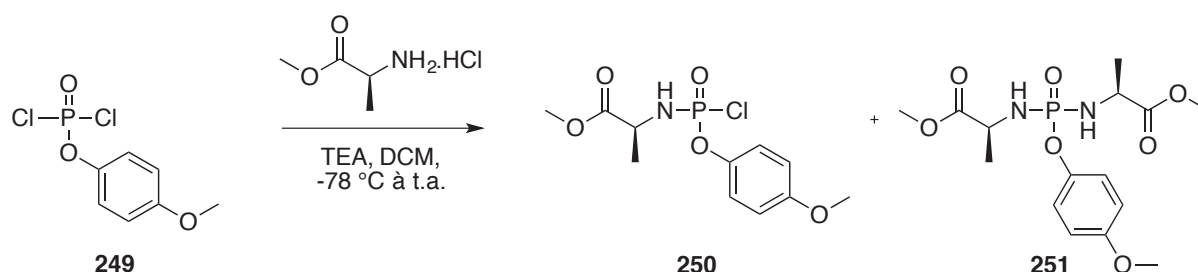


Figure 128 : Formation du sous-produit **251** lors de la formation de **250** à partir de **249**.

5. Déprotection finale

Seules les molécules **243a-b** ont été engagées dans la dernière étape de déprotection qui est une hydrogénolyse catalysée par du palladium sur charbon actif afin d'obtenir les prodrogues aryl phosphoramidates **242a-b** sans purification avec des rendements respectifs de 77 % et 92 % (Figure 129).

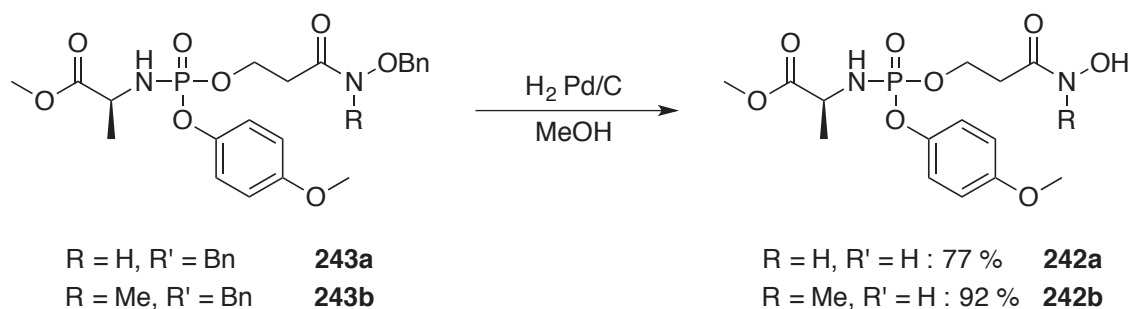


Figure 129 : Déprotection du benzyle des acides hydroxamiques **243a-b**.

A l'exception des composés **239a-b**, toutes les molécules d'intérêt ont été synthétisées avec des rendements globaux variant de 9 % à 22 % (Figure 130). Les rendements globaux des composés **240a-b** ne peuvent être déterminés car ces molécules n'ont pu être séparées du composé **251**. Le pouvoir inhibiteur de ces molécules est évalué sur des cultures de deux souches disponibles au laboratoire, *E. coli* et *M. smegmatis*.

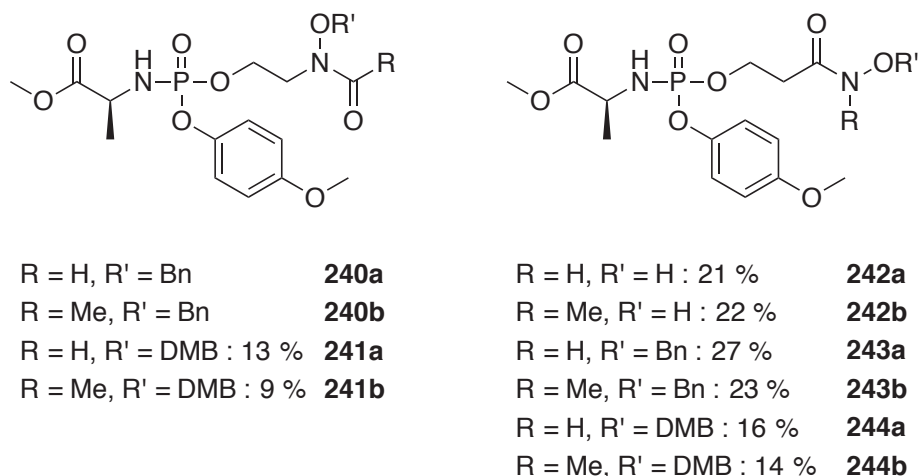


Figure 130 : Rendements globaux des prodrogues de type aryl phosphoramidate **240a-b** à **244a-b**.

III. Evaluation du pouvoir inhibiteur des molécules **240a-b** à **244a-b**

La détermination des propriétés inhibitrices des prodrogues aryl phosphoramidates a été évaluée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les prodrogues *cycloSaligényles* (cf. Chapitre I – Partie 3 p.138). Aucune inhibition de croissance des souches d'*E. coli* et de *M. smegmatis* n'a pu être observée avec prodrogues **240a-b** à **244a-b**. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats : (i) absence de pénétration des prodrogues au sein de la bactérie en raison de leur trop grande polarité (ii) absence des enzymes impliquées dans le mécanisme de libération des substances actives (iii) trop faible quantité d'inhibiteur libérée au sein de la cellule ou (iv) dégradation de l'inhibiteur ou expulsion de ce dernier en dehors de la cellule.

Afin de répondre à la deuxième hypothèse, à savoir l'absence d'enzymes impliquées dans le mécanisme de libération des substances actives, nous nous sommes proposés de suivre le mécanisme de libération par spectroscopie RMN du ^{31}P . En effet, l'atome de phosphore est très sensible à son environnement chimique. C'est pourquoi, il est judicieux de penser que le déplacement chimique sera différent pour tous les intermédiaires intervenant dans le processus de libération (Figure 117).

Dans un premier temps, la stabilité de la molécule **242b** a été évaluée par spectroscopie RMN. La molécule a été solubilisée dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, puis un spectre RMN a été effectué laissant apparaître deux signaux à 4,98 ppm et 4,94 ppm correspondant aux deux diastéréoisomères. Cette expérience de RMN nous permet d'avoir un témoin de la réaction. Pour être dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes du tampon triéthanolamine (pH = 7,5) a été ajouté pour avoir une concentration finale de 50 mM, puis le pH a été ajusté à 7. Un spectre RMN a ensuite été réalisé où un seul signal à 3,06 ppm est observé, laissant supposer que la molécule **242b** n'est pas stable et se dégrade dans ces conditions de pH. Une autre expérience a été réalisée où la molécule **242b** a tout d'abord été solubilisée dans un tampon triéthanolamine et du D_2O afin d'avoir une concentration finale en prodrogue de 3 mM. L'extrait brut d'*E. coli* a par la suite été ajouté à cet échantillon. La première mesure spectroscopique par RMN du ^{31}P a été réalisée juste après l'ajout et à différents temps afin de suivre l'évolution de la réaction. Au bout de 4 h d'incubation, un seul

signal à 3,06 ppm est présent alors que les deux signaux des deux diastéréoisomères (4,98 et 4,94 ppm) ont disparu. Par comparaison à l'expérience précédente, le produit se dégraderait dans les conditions de pH de la manipulation. Il semblerait donc qu'*E. coli* ne possède pas d'enzyme capable de transformer le produit de dégradation afin de libérer le composé de type **227** (Figure 117). Cette même expérience a été réalisée avec un extrait brut de *M. smegmatis*. Dans ce cas, les deux signaux des diastéréoisomères à 4,98 et 4,94 ppm évoluent pour conduire à un composé dont le signal du phosphore résonne à 3,06 ppm. Après 18 h, ce dernier évolue vers un composé dont le phosphore résonne à -0,74 ppm. A ce stade de nos recherches, nous n'avons pas été capables d'identifier la nature des produits dont les signaux résonnent à 3,06 ppm et -0,74 ppm. Nous pouvons toutefois conclure, que chez *M. smegmatis* il existe une activité susceptible de modifier le produit de dégradation résonnant à 3,06 ppm.

Pour la libération de la substance active, la dernière étape fait intervenir une « phosphoramidase ». Afin d'évaluer si les deux souches de bactéries possèdent une telle enzyme et que cette dernière puissent libérer la substance active, nous nous proposons de réaliser les mêmes expériences que pour l'identification d'une activité estérasique dans les extraits bruts bactériens. Pour ce faire, il a été nécessaire de synthétiser le composé **252** (similaire à la molécule **229**) qui est le substrat de la phosphoramidase. Pour ce faire, l'hydrogénolyse du composé **243b** catalysée au dioxyde de platine (PtO_2) dans de l'éthanol a permis d'obtenir le composé désiré sans purification (Figure 131).²³

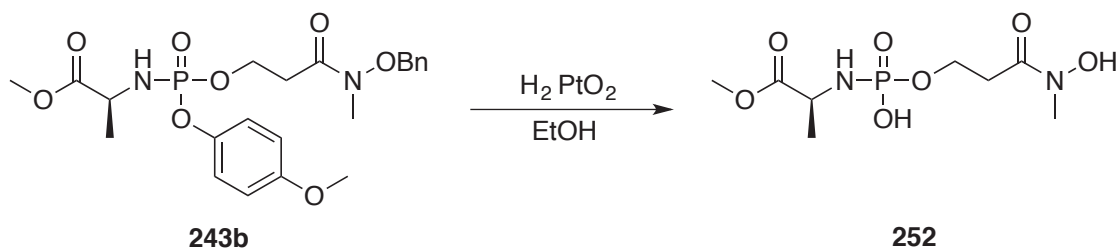


Figure 131 : Schéma réactionnel pour l'obtention de la molécule **252**.

Ce dernier a été soumis aux enzymes présentes dans les extraits bruts d'*E. coli* et *M. smegmatis* dans un mélange de tampon triéthanolamine, du D_2O afin d'obtenir une concentration finale en prodrogue de 3 mM. Un suivi par RMN du ^{31}P a été réalisé sur les deux échantillons pendant 48 h. Après ces deux jours et pour les deux bactéries étudiées, la molécule **252** est toujours présente en solution. Il semblerait donc que les deux bactéries

étudiées ne possèdent pas la phosphoramidase requise pour libérer la substance active **178b** et l'alanine.

IV. Conclusion

Dix prodrogues de type *O*-méthyl-L-alanine-*p*-méthoxy phosphoramidate d'inhibiteurs phosphates de la DXR ont été synthétisées avec des rendements globaux compris entre 9 % et 22 %. Leurs propriétés inhibitrices ont été évaluées sur des cultures d'*E. coli* et *M. smegmatis* par la méthode de diffusion sur milieu gélosé dans des boîtes de Petri. Malheureusement aucune de ces dix molécules n'a pu empêcher la croissance de ces deux bactéries.

Dans un premier temps, nous avons supposé que ces molécules n'étaient pas assez lipophiles pour franchir la paroi bactérienne. Le fait de laisser la protection sur la fonction hydroxamate (ODMB et benzyle) n'a pas permis d'inhiber la croissance des deux souches bactériennes. Pour augmenter davantage la lipophilie, nous pouvons envisager de remplacer l'ester méthylque par un ester benzylique. Par ailleurs, des études complémentaires du devenir de la molécule **242b** par RMN du ^{31}P dans un tampon triéthanolamine a montré que ce composé n'était pas stable à un pH de 7. En effet, un produit de dégradation résonnant à environ 3 ppm apparaît au cours du temps, composé qui n'a pas été caractérisé. Puis cette même expérience a été réalisée avec des extraits bruts d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Si avec l'extrait brut d'*E. coli* nous n'observons pas d'évolution du signal à 3 ppm, avec *M. smegmatis* nous observons la formation d'un nouveau composé résonnant à -0,74 ppm. Des études récentes effectuées avec la carboxypeptidase Y (travaux réalisés par Dr Denis Tritsch) suggèrent qu'une estérase est impliquée dans l'évolution du signal à 3 ppm. Par la suite, en incubant le produit **252** avec les extraits bruts bactériens, composé intermédiaire résultant de l'action de l'estérase, nous n'observons pas de formation de l'inhibiteur parent **178b**, ce qui semble indiquer que les deux extraits bruts ne contiennent pas d'activité « phosphoramidase » capable d'hydrolyser le composé **252**. Dans le cas de la prodrogue **242b**, son incapacité à inhiber la croissance bactérienne peut tout d'abord s'expliquer par la dégradation de ce composé à un pH de 7. Celle-ci est liée à la présence du groupement hydroxamate car les composés protégés **243b** et **244b** sont stables à ce pH. Contrairement à *E. coli*, *M. smegmatis* possède une activité estérasique importante et pourrait avoir une estérase susceptible de réaliser la première étape d'hydrolyse. Des études préliminaires avec les composés **243b** et

244b semblent le confirmer. Par contre nos résultats avec le composé **252** laissent penser que la deuxième étape d'activation ne peut avoir lieu, ce qui suggère que même si l'on envisage une pénétration de ce type de prodrogue dans les bactéries, leur « pool enzymatique » ne permettrait pas de libérer l'inhibiteur parent.

- (1) De Clercq, E. Strategies in the Design of Antiviral Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13–25.
- (2) Balzarini, J. Metabolism and Mechanism of Antiretroviral Action of Purine and Pyrimidine Derivatives. *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113–126.
- (3) Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; St Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S. 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (BW A509U): An Antiviral Agent That Inhibits the Infectivity and Cytopathic Effect of Human T-Lymphotropic Virus Type III/lymphadenopathy-Associated Virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 7096–7100.
- (4) Valette, G.; Pompon, A.; Girardet, J. L.; Cappellacci, L.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; La Colla, P.; Loi, a G.; Périgaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Decomposition Pathways and *in vitro* HIV Inhibitory Effects of isoddA Pronucleotides: Toward a Rational Approach for Intracellular Delivery of Nucleoside 5'-Monophosphates. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1981–1990.
- (5) Siccardi, D.; Gumbleton, M.; Omid, Y.; McGuigan, C. Stereospecific Chemical and Enzymatic Stability of Phosphoramidate Triester Prodrugs of d4T *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *22*, 25–31.
- (6) Balzarini, J.; Karlsson, A.; Aquaro, S.; Perno, C. F.; Cahard, D.; Naesens, L.; De Clercq, E.; McGuigan, C. Mechanism of Anti-HIV Action of Masked Alaninyl d4T-MP Derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 7295–7299.
- (7) McGuigan, C.; Tsang, H. W.; Cahard, D.; Turner, K.; Velazquez, S.; Salgado, A.; Bidois, L.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Phosphoramidate Derivatives of d4T as Inhibitors of HIV: The Effect of Amino Acid Variation. *Antiviral Res.* **1997**, *35*, 195–204.
- (8) 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.* **1996**, *39*, 1748–1753.
- (9) Knaggs, M. H.; McGuigan, C.; Harris, S. A.; Heshmati, P.; Cahard, D.; Gilbert, I. H.; Balzarini, J. A QSAR Study Investigating the Effect of L-Alanine Ester Variation on the Anti-HIV Activity of Some Phosphoramidate Derivatives of d4T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2075–2078.
- (10) McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Phosphoramidate Derivatives of d4T with Improved Anti-HIV Efficacy Retain Full

- Activity in Thymidine Kinase-Deficient Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1183–1186.
- (11) Siddiqui, A.; Ballatore, C.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. The Presence of Substituents on the Aryl Moiety of the Aryl Phosphoramidate Derivative of d4T Enhances Anti-HIV Efficacy in Cell Culture: A Structure-Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 393–399.
 - (12) Siddiqui, A. Q.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Zuccotto, F.; Gilbert, I. H.; De Clercq, E.; Balzarini, J. 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.* **1999**, *42*, 4122–4128.
 - (13) Balzarini, J.; Kruining, J.; Wedgwood, O.; Pannecouque, C.; Aquaro, S.; Perno, C. F.; Naesens, L.; Witvrouw, M.; Heijtkink, R.; De Clercq, E.; McGuigan, C. Conversion of 2',3'-Dideoxyadenosine (ddA) and 2',3'-Didehydro-2',3'- Dideoxyadenosine (d4A) to Their Corresponding Aryloxyphosphoramidate Derivatives Markedly Potentiates Their Activity against Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus. *FEBS Lett.* **1997**, *410*, 324–328.
 - (14) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Aryl Phosphate Derivates of AZT Inhibit HIV Replication in Cells Where the Nucleoside Is Poorly Active. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 701–704.
 - (15) 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.* **1993**, *36*, 1048–1052.
 - (16) Perrone, P.; Luoni, G. M.; Kelleher, M. R.; Daverio, F.; Angell, A.; Mulready, S.; Congiatu, C.; Rajyaguru, S.; Martin, J. A.; Levêque, V.; Le Pogam, S.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, D. B.; McGuigan, C. Application of the Phosphoramidate ProTide Approach to 4'- Azidouridine Confers Sub-Micromolar Potency versus Hepatitis C Virus on an Inactive Nucleoside. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1840–1849.
 - (17) 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(pivaloylmoethyl) 9-(2-Phos- Phenylmethoxyethyl)adenine. *Antiviral Res.* **1992**, *19*, 267–273.
 - (18) Srinivas, R. V.; Fridland, A. Antiviral Activities of 9-R-2-Phosphonomethoxypropyl Adenine (PMPA) and bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA against Various Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1484–1487.

- (19) Ballatore, C.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Synthesis and Evaluation of Novel Amidate Prodrugs of PMEA and PMPA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1053–1056.
- (20) Sutton, L.; Rapport, L.; Lockwood, B. Glucosamine : Con or Cure ? *Nutrition* **2002**, *18*, 534–536.
- (21) McGuigan, C.; Serpi, M.; Bibbo, R.; Roberts, H.; Hughes, C.; Caterson, B.; Gibert, A. T.; Verson, C. R. A. Phosphate Prodrugs Derived from *N*-Acetylglucosamine Have Enhanced Chondroprotective Activity in Explant Cultures and Represent a New Lead in Antiosteoarthritis Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5807–5812.
- (22) Ruda, G. F.; Wong, P. E.; Alibu, V. P.; Norval, S.; Read, K. D.; Barrett, M. P.; Gilbert, I. H. Aryl Phosphoramidates of 5-Phospho Erythronohydroxamic Acid, a New Class of Potent Trypanocidal Compounds. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6071–6078.
- (23) Yuan, W.; Berman, R. J.; Gelb, M. H. Synthesis and Evaluation of Phospholipid Analogues as Inhibitors of Cobra Venom Phospholipase A2. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 8071–8081.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la conception de nouveaux antituberculeux utilisant comme cible la biosynthèse des isoprénoïdes selon la voie du MEP. Cette voie de biosynthèse comporte plusieurs enzymes. Nos études portent sur la synthèse d'inhibiteurs de la deuxième enzyme de la voie du MEP, la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate reducto-isomérase (DXR). A ce jour, plusieurs inhibiteurs de type phosphonate comme la fosmidomycine et le FR-900098 ont de bons pouvoirs inhibiteurs sur les DXR de différentes espèces. La fosfoxacine, l'analogue phosphate de la fosmidomycine possède également un bon pouvoir inhibiteur sur la DXR de *Synechocystis* sp. Toutefois que ce soit les dérivés phosphonates et phosphates, ces composés présentent des problèmes de biodisponibilité qui sont dus à la présence d'un groupement polaire. Pour contourner ces problèmes de biodisponibilité et ainsi améliorer la pénétration des molécules au sein des bactéries, nous nous sommes intéressés à la synthèse de prodrogues d'inhibiteurs phosphonates et phosphates de la DXR.

La première partie de ce travail a été consacrée à la synthèse de prodrogues de type *cyclo*Saligényle d'inhibiteurs phosphonates de la DXR. Malgré plusieurs tentatives de synthèse, aucune prodrogue n'a pu être synthétisée et testée sur des cultures de bactéries. En effet, l'étape de couplage s'est avérée être peu reproductible et devrait encore être optimisée.

Nous nous sommes intéressés, par la suite, à la synthèse d'analogues de la fosfoxacine et à leurs évaluations sur les DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Deux composés inhibent efficacement les DXR de ces deux bactéries avec des IC₅₀ comparables à celles de la fosmidomycine et de son analogue phosphonohydroxamate. Ces composés sont également capables d'inhiber la croissance d'*E. coli* sur milieu gélosé. Afin d'améliorer la pénétration intracellulaire de ces composés au sein de la bactérie, nous avons cependant choisi de synthétiser ces composés sous forme de prodrogues de type *cyclo*Saligényle d'inhibiteurs phosphates.

Les prodrogues totalement déprotégées n'ont pas permis d'inhiber la croissance d'*E. coli* et de *M. smegmatis*, une mycobactérie non pathogène. Par contre, des résultats encourageants ont été obtenus pour certains composés où la fonction hydroxamate est toujours protégée par un groupement diméthoxybenzyle. Bien que ces composés n'inhibent pas la croissance d'*E. coli*, certains composés où le *cyclo*Saligényle est substitué par des groupements électro-attracteurs inhibent la croissance de *M. smegmatis*. La croissance de

cette mycobactérie a également été empêchée par des composés de type bis(*cyclo*Saligényles). Ces bis-prodrogues libèrent normalement l'inhibiteur le moins actif sur la DXR. Ces résultats surprenant laissent penser (i) que cette bis-prodrogue pénètre davantage à l'intérieur de la bactérie induisant une plus grande concentration d'inhibiteur ou (ii) que ce type de composé inhibe une autre voie métabolique importante de la bactérie ou (iii) qu'un seul des deux motifs *cyclo*Saligényles soit dégradé libérant une molécule inédite. Pour répondre à cette dernière question le suivi de l'évolution de ce type de composé en milieu tamponné (pH = 7) puis dans un extrait brut mycobactérien permettrait de montrer si le composé parent se forme durant la libération. Puis la synthèse d'un composé possédant un phosphate libre et l'acide hydroxamique protégé avec un *cyclo*Saligényle pourrait également être envisagé. Les tests d'inhibition sur la DXR d'*E. coli* et *M. smegmatis* permettraient d'évaluer son pouvoir inhibiteur.

Des résultats intéressants ont également été obtenus avec une molécule une prodrogue *cyclo*Saligényle où la fonction hydroxamate est protégée par un groupement benzyle. La synthèse de prodrogues *cyclo*Saligényles d'inhibiteurs phosphates protégées par un benzyle pourrait être envisagée pour de futures recherches.

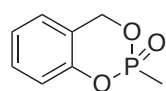
De plus, certains de ces composés sont en cours d'évaluation sur des souches de *Plasmodium falciparum* et *Mycobacterium tuberculosis* afin de tester leurs pouvoirs inhibiteurs. En effet, comme *M. tuberculosis* se multiplie beaucoup plus lentement que *M. smegmatis*, nous pourrions nous attendre à des différences de pouvoir inhibiteur des prodrogues.

Un autre axe de recherche à développer serait la conception de « mutual » prodrogues, composés qui une fois métabolisés, libèrent deux ou plusieurs substances actives au sein de la cellule. Cette stratégie permet d'augmenter l'efficacité des agents thérapeutiques. Ces deux composés peuvent soit avoir la même cible ou des cibles différentes. Dans le cadre de ces recherches et plus particulièrement le développement de nouveaux antituberculeux nous pourrions envisager de synthétiser une molécule libérant soit deux inhibiteurs de la DXR, soit un composé libérant un inhibiteur de la DXR et un antituberculeux connu (isoniazide, acide *p*-aminosalicylique...).

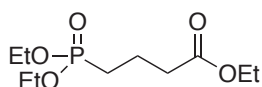
Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un autre type de prodrogues, les arylphosphoramidates. Tout comme les *cycloSaligényles*, ce type de prodrogues n'a jamais été appliqué à la synthèse d'agents antimicrobiens. Ces prodrogues contrairement aux prodrogues à motif *cycloSaligényle* nécessitent une activation réalisée par deux enzymes : une carboxyestérase et une phosphoramidase. L'ensemble des composés synthétisés n'a pas permis d'inhiber la croissance d'*E. coli* et *M. smegmatis*. Des études complémentaires laissent supposer que, même si ces prodrogues pénètrent dans les bactéries, leur « pool enzymatique » (notamment l'absence de phosphoramidase) ne permet pas d'obtenir la molécule active.

Partie expérimentale

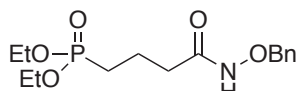
Molécules synthétisées :



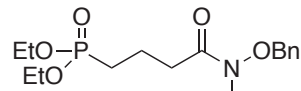
166



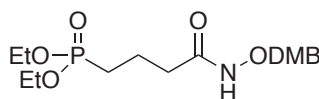
169



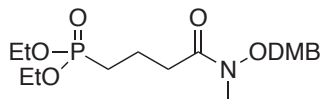
170a



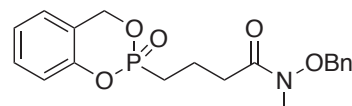
170b



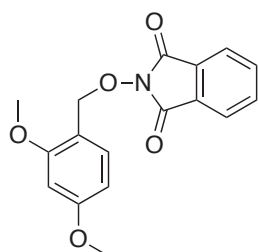
171a



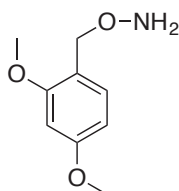
171b



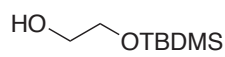
172



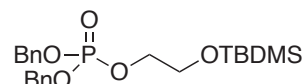
174



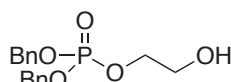
175



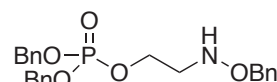
180



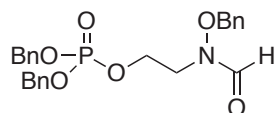
181



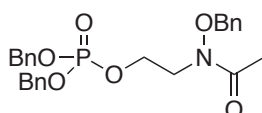
182



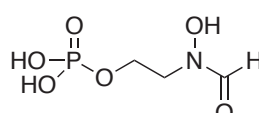
183



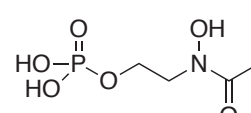
184a



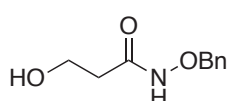
184b



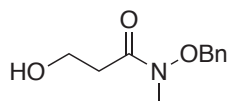
30



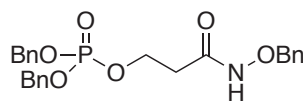
177



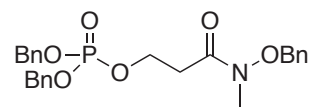
186a



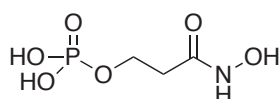
186b



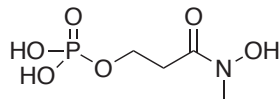
187a



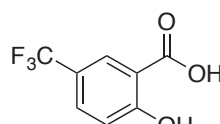
187b



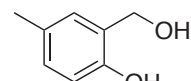
178a



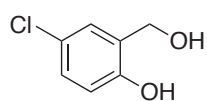
178b



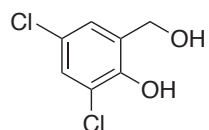
193f



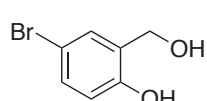
194b



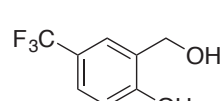
194c



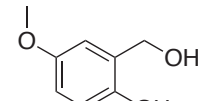
194d



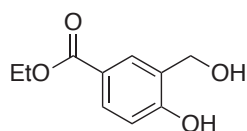
194e



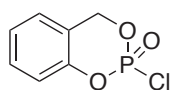
194f



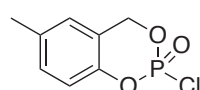
194g



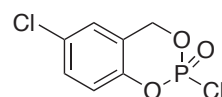
194h



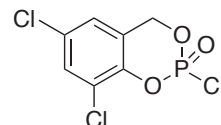
195a



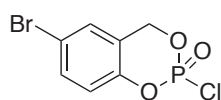
195b



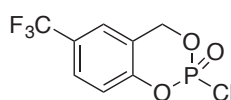
195c



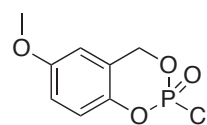
195d



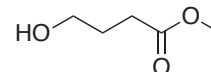
195e



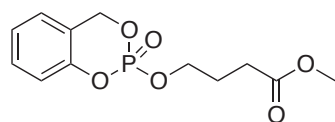
195f



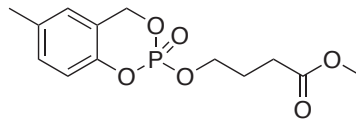
195g



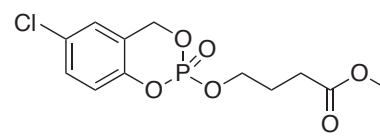
197



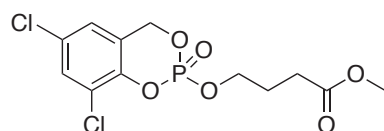
191a



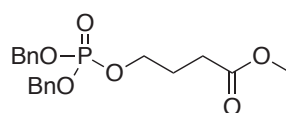
191b



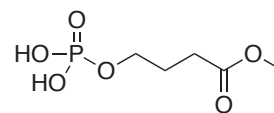
191c



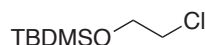
191d



198



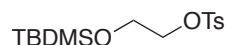
192



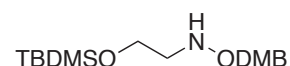
204a



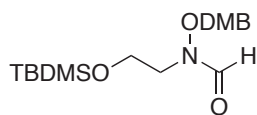
204b



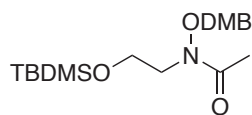
206



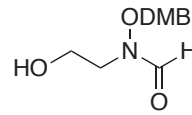
205



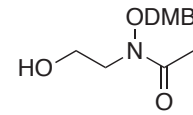
207



208

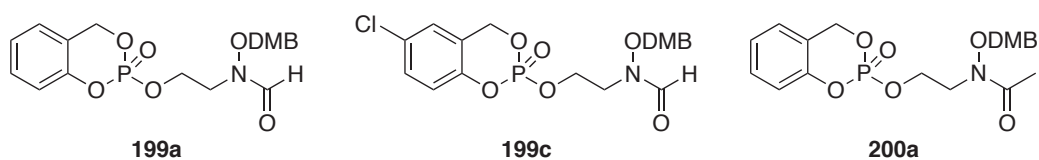
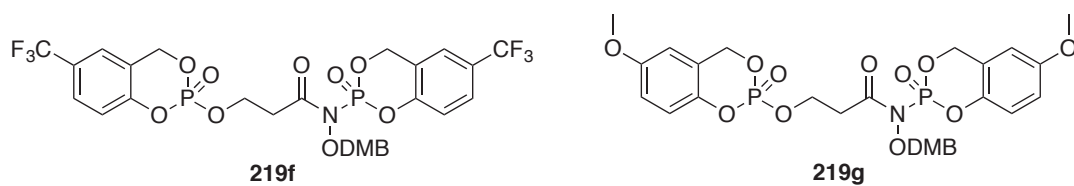
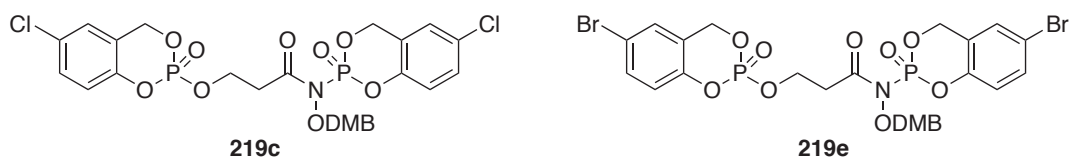
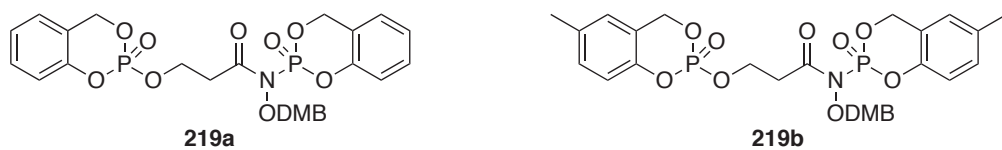
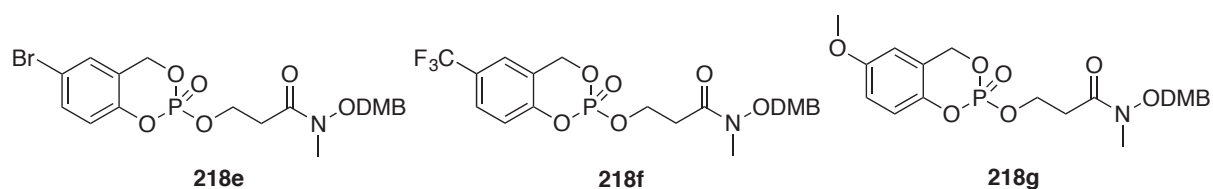
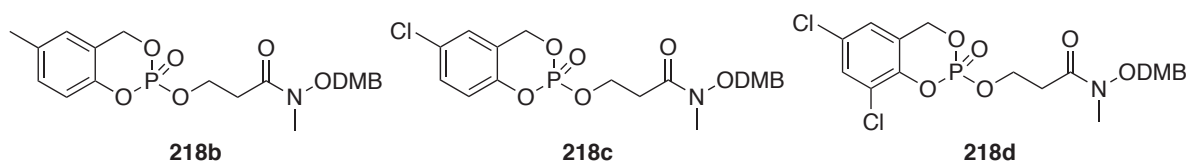
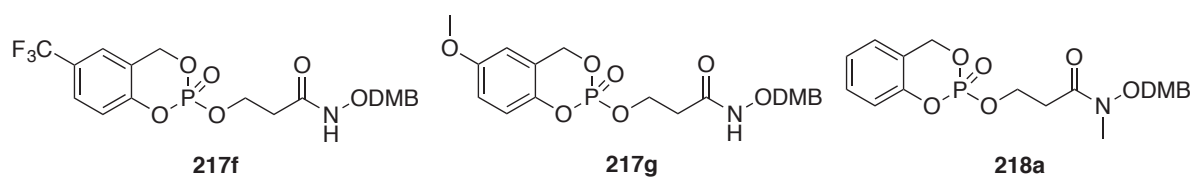


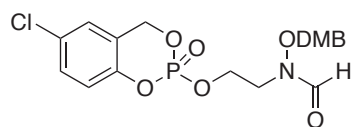
209



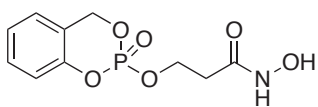
210



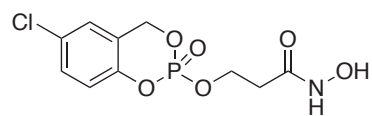




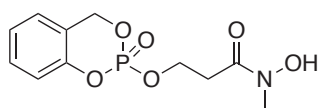
200c



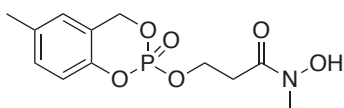
201a



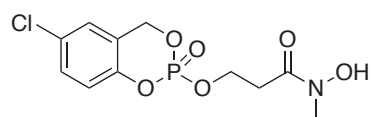
201c



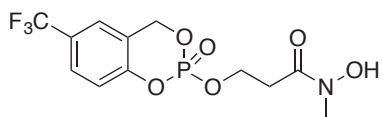
202a



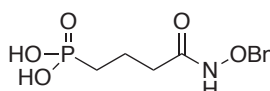
202b



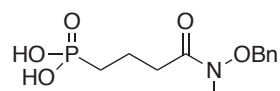
202c



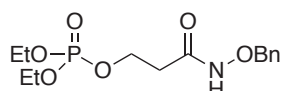
202f



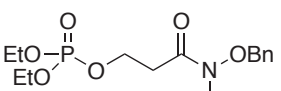
221a



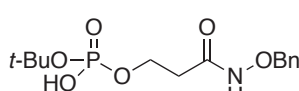
221b



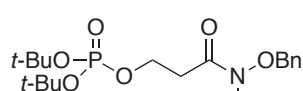
224a



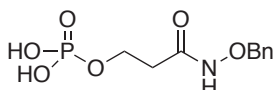
224b



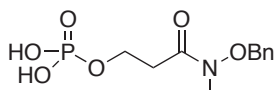
225a



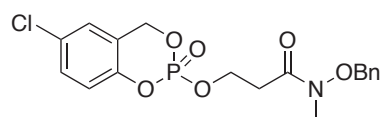
225b



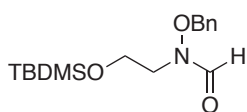
223a



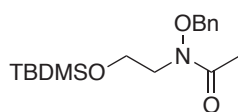
223b



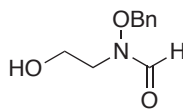
Molécule TP



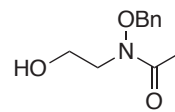
246a



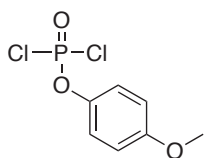
246b



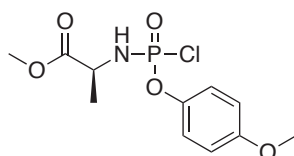
247a



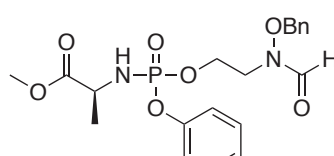
247b



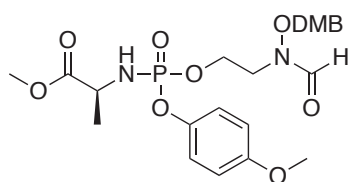
249



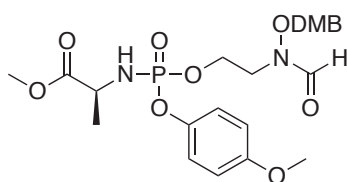
250



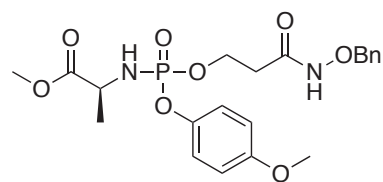
240a



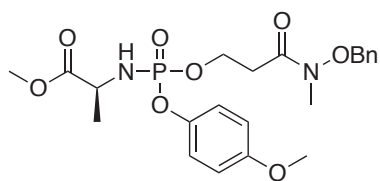
241a



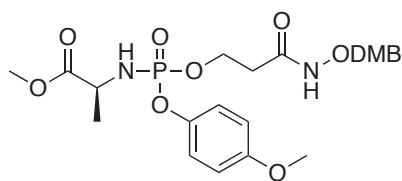
241b



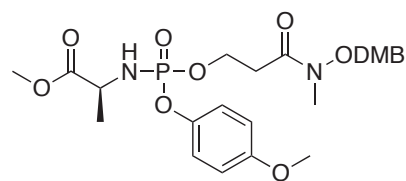
243a



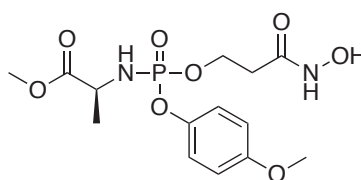
243b



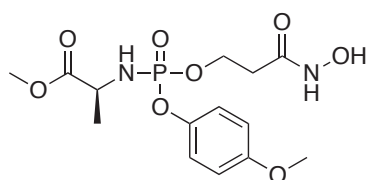
244a



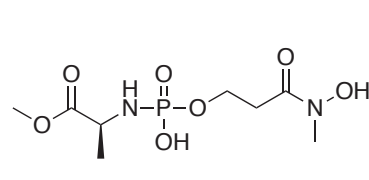
244b



242a



242b



252

General methods

All non-aqueous reactions were run in dry solvents under an argon atmosphere. Commercial grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich or Acros Organics and used without further purification. Petroleum ether 40-60 °C (Sigma-Aldrich) was used for purification.

Flash chromatography was performed on silica gel 60 230–400 mesh with the solvent system as indicated. Automated flash chromatography was performed on a Combiflash® Rf™ (Serlabo Technologies) or on a Puriflash® 215 (Interchim).

TLC plates were revealed under UV light (254 nm) and/or by spraying with an ethanolic solution of phosphomolybdic acid (20%) or an ethanolic solution of potassium permanganate followed by heating.

The NMR spectra were recorded on a BRUKER Avance 300 (^1H -NMR: 300 MHz; ^{13}C -NMR, 75.5 MHz; ^{31}P -NMR 121.5 MHz; ^{19}F -NMR 282.4 MHz) or a BRUKER Avance 400 (^1H -NMR: 400 MHz; ^{13}C -NMR, 100.6 MHz; ^{31}P -NMR 162 MHz) or a BRUKER Avance 500 (^1H -NMR: 500 MHz; ^{13}C -NMR, 125.8 MHz). ^1H -NMR experiments were performed in CDCl_3 , D_2O , CD_3OD in CDCl_3 with CHCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), DHO ($\delta = 4.79$ ppm), CD_2HOD ($\delta = 3.31$ ppm) as internal references. ^{13}C -NMR experiments were performed in CDCl_3 with CDCl_3 ($\delta = 77.23$ ppm), CD_2HOD ($\delta = 49.0$ ppm) as internal references. For ^{31}P -NMR reference, the spectrometer had an external reference, corresponding to 80 % phosphoric acid in D_2O ($\delta = 0$ ppm). The chemical shifts (δ) are expressed in ppm. s, d, t, q, or bs are abbreviations for multiplicity correspond to singlet, doublet, triplet and quadruplet or broad singlet. J-couplings are exposed in Hz.

Most of the hydroxamate are present as two *Z* and *E* conformers in equilibrium. If only one signal is described, it is common to all conformers. The evaluation of the relative amount of the conformers was made by integration of the CH_2CO or CH_2N or OCH_2DMB proton signals.

Negative or positive-mode electrospray MS were performed on a Bruker Daltonics microTOF spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray (ESI) interface. Calibration was performed using a solution of 10 mM sodium formate. Sample solutions were introduced into the spectrometer source with a syringe pump (Harvard type 55 1111: Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) with a flow rate of $5\ \mu\text{L min}^{-1}$.

A/ General procedure to obtained protected hydroxamic acid

A stirred suspension of *O*-protected hydroxylamine (1.5 equiv) in dry THF (4.5 mL/mmol) at -78 °C was treated with 1 M solution of LiHMDS (5 equiv). After 1 h a solution of ester (1 equiv) in a minimum of THF was added. The resulting solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was cooled at -78 °C then was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl, warmed to room temperature, and extracted several time with EtOAc. The collect organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness under reduced pressure.

B/ General procedure to methylate protected hydroxamic acid

To a solution of *N*-H hydroxamic acid (1equiv), anhydrous K₂CO₃ (2 equiv) in anhydrous acetone (10.5 mL/mmol) was added iodomethane (5 equiv). The resulting mixture was refluxed overnight. The mixture was filtered and acetone was removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in ether. The organic layer was washed with water and then aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with EtOAc. The organic layers were collected, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated.

C/ General procedure to *N*-formylate a hydroxylamine

A solution of formic acid (50 equiv) and acetic anhydride (10 equiv) was stirred at room temperature during 30 min. The solution was then cooled to 0 °C and a solution of protected hydroxylamine (1 equiv) in THF was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C during 10 min, allowed to warm up at room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was diluted with EtOAc and the organic layer was washed twice with water and twice with a 0.1 M aqueous solution of KOH. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness.

D/ General procedures to phosphorylate an alcohol

Method 1. To a solution of alcohol (1 equiv) in dry DCM (48 mL/mmol) were successively added 1*H*-tetrazole (C = 0.45 M, 2 equiv) and the dibenzyl *N,N*-diisopropylphosphoramidite (1.8 equiv). After total consumption of the starting material (TLC), the reaction mixture was cooled to 0°C and then treated with 3-chloroperbenzoic acid (2.2 equiv), which was slowly added as a solid. The reaction mixture was warmed up to room temperature and stirred overnight. DCM was added and the organic layer was washed with a 10 % aqueous solution of Na₂S₂O₅, a saturated aqueous solution of NaHCO₃, and brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure.

Method 2. Iodine (1.1 equiv) was added to a solution of triethyl phosphite (1.1 equiv) in dry DCM (2.5 mL/mmol) at 0 °C. The reaction was stirred for 20 min at 0 °C and then for 1 h at room temperature. This phosphorylation agent was slowly added to a solution of alcohol (1 equiv) and pyridine (4 equiv) in dry DCM (13 mL/mmol) at -40 °C. The reaction was allowed to warm up to room temperature and stirred for 2 h. The mixture was washed with a 3 % solution of KHSO₄, a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure.

Method 3. To a stirred solution of alcohol (1 equiv) in anhydrous THF (16 mL/mmol) were successively added 1*H*-tetrazole (4.2 equiv) and di-*t*-butylisopropylphosphoramidite (2.2 equiv). The reaction mixture was stirred for 2 h while a white solid was formed. A solution of *m*-chloroperoxybenzoic acid (3.5 equiv of 99 % *m*-CPBA purified according to the method described Armarego)¹ was added, the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. DCM was added and organic layer was washed with a 10 % aqueous solution of Na₂S₂O₅. The aqueous layer was

extracted twice with DCM and the combined organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO_3 and brine. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure.

E/ General procedure for catalytic hydrogenolysis

The protected alcohol (1 equiv), palladium on charcoal (10 % mol) in absolute ethanol or methanol (22 mL/mmol) was hydrogenolyzed at room temperature and at atmospheric pressure under an atmosphere of H_2 . After the total consumption of starting material (TLC) the catalyst was removed by filtration over celite and the reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure.

F/ General procedure for reduction of carboxylic acid to alcohol

To a solution of carboxylic acid **193b-f** (1equiv.) in dry THF (9 mL/mmol) at 0 °C was treated with a 1 M solution of LiAlH_4 in THF (1.2 mL/mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was quenched by addition of water. The solvent was evaporated under reduced pressure and diethyl ether was added. The organic layer was washed with a 10 % aqueous solution of HCl. The aqueous layer was then saturated with NaCl and washed several time with diethyl ether. The organic layers were collected, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness under reduced pressure.

G/ General procedure for the synthesis of *cyclo*Salphosphochloridate

A solution of the alcohol **129** or **194b-h** (1 equiv.) and triethylamine (2.1 equiv.) in THF (1.9 mL/mmol) was added dropwise to a stirred solution of $\text{P}(\text{O})\text{Cl}_3$ (1.1 equiv) in THF (1.4 mL/mmol) at -78 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The triethylammonium chloride was filtered and solvent was removed under reduced pressure. The crude product was not purified by flash chromatography due to the reactivity of product.

H/ General procedure for the synthesis of *cyclo*Salphosphotriester

The alcohol (1 eq.) was dissolved in anhydrous pyridine (2.8 mL/mmol). The mixture was cooled to -40 °C and the *cyclo*Salphosphochloridate **195a-g** (2 eq.) in toluene (1.1 mL/mmol) was added dropwise. The reaction was stirred to -40 °C for 30 min and warmed up to room temperature overnight. The pyridine was evaporated under reduced pressure.

I/ General procedure for the synthesis of *cyclo*Salphosphotriester

To a solution of alcohol (1 equiv), triethylamine (1.1 equiv.), DMAP (0.5 equiv.) in dry DCM (3 mL/mmol) was treated with a solution of *cyclo*Salphosphochloridate **195a-g** (3 equiv.) in DCM (0.80 mL/mmol) at -40 °C. The resulting mixture was warmed up to room temperature and stirred overnight. A saturated aqueous solution of NH_4Cl was added and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layers were collected, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and solvents were removed under reduced pressure.

J/ General procedure to *N*-acetylate a hydroxylamine

To a solution of *N*-H hydroxylamine (1 equiv) in acetic anhydride (4 mL/mmol) was added dropwise pyridine (3 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure.

K/ General procedure for the deprotection of alcohols

The silyl ether (1 equiv) in THF (15 mL/mmol) was treated with tetra-*N*-butylammonium fluoride (2 equiv). The reaction mixture was monitored by TLC (EtOAc). The THF was removed under reduced pressure.

L/ General procedure for deprotection of dimethoxybenzyle

The protected product (1 equiv) was stirred at room temperature in a solution at 2 % or 3 % of TFA in DCM (2 equiv). The reaction was monitored by TLC (EtOAc). The dichloromethane was removed under reduced pressure and the mixture is suspended in a minimum of anhydrous methanol, filtered and evaporated under reduced pressure.

M/ General procedure to deprotect di-ethylester phosphonates

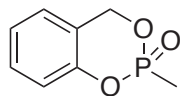
To a cooled solution of phosphonate (1 equiv) in DCM (3 mL/ mmol) was added dropwise bromotrimethylsilane (10 equiv). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then warmed up to room temperature overnight. The solvent was removed under reduce pressure, water was added and stirred for 10 min and then evaporated to dryness.

N/ General procedure to deprotect di-*t*-butylester phosphates

The protected phosphate (1 equiv) was treated with a solution of trifluoroacetic acid (TFA)/DCM (1:3 v/v). The reaction mixture was monitoring by TLC. Toluene was added and the mixture was evaporated under reduced pressure to give the desired product.

O/ General procedure for the synthesis of aryl phosphoramidate

To a solution of alcohol (1 equiv), **250** (2.3 equiv) in dry DCM (18 mL/mmol) was added at -78 °C *N*-methyl imidazole (5 equiv). The mixture was warmed up at room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was monitored by TLC and ³¹P NMR and quenched with MeOH. The organic layer was washed with 0.5 M aqueous solution of HCl and the aqueous layer was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure.

Different procedures for the synthesis of 2-Methyl-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (166)

Method 1. To a solution of methylphosphonic acid **164** (0.54 mmol, 52 mg) in dry THF (10 mL) were successively introduced 2-hydroxybenzyl alcohol **129** (0.54 mmol, 67 mg) and DIC (1.29 mmol, 0.20 mL). The reaction was monitored by TLC. After completion, water (10 mL) was added, and the aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (2 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by automated flash chromatography (DCM → DCM/MeOH, 97:3) to give the desired product **166** as colorless oil (26 mg, 26 %).

Method 2. To a cooled solution of diethyl methylphosphonate **163** (1.7 mmol, 0.25 mL) in DCM (5 mL) was added dropwise bromotrimethylsilane (8.5 mmol, 1.2 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then allowed to warm up to room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure, water (5 mL) was added and stirred for 10 min and then evaporated to dryness. The orange solid was dissolved in THF (30 mL) then 2-hydroxybenzyl alcohol **129** (1.7 mmol, 224 mg) and DIC (3.4 mmol, 0.53 mL) were added to the reaction and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water (30 mL) was added and the aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (EtOAc). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by automated flash chromatography (DCM → DCM/MeOH, 95:5) to yield the desired product **166** as a colorless oil (105 mg, 36 %).

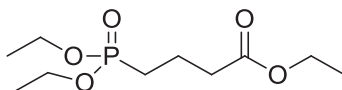
R_f = 0.53 (DCM/MeOH 97:3)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.68 (3H, d, ²J_{P-H} = 18.0 Hz, CH₃), 5.09 (1H, dd, ²J_{H-H} = 13.7 Hz, ³J_{P-H} = 17.6 Hz, CH₂), 5.42 (1H, dd, ²J_{H-H} = 13.7 Hz, ³J_{P-H} = 9.6 Hz, CH₂), 7.04-7.13 (3H, m, CH_{Ar}), 7.29-7.35 (1H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125,8 MHz, CDCl₃): 11.1 (d, ¹J_{P-C} = 141.0 Hz, CH₃), 66.0 (d, ²J_{P-C} = 6.9 Hz, CH₂), 118.9 (d, ³J_{P-C} = 6.6 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.5 (d, ³J_{P-C} = 9.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.2 (CH_{Ar}), 125.8 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 149.8 (d, ²J_{P-C} = 7.2 Hz, C_{Ar}OP).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 25.4

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₈H₉PO₃Na [M+Na]⁺ 207.0182, found 207.0173.

Ethyl 4-(diethoxyphosphoryl)butanoate (169)

To a solution of diethylphosphite (4 g, 29 mmol) in THF (120 mL) was added sodium hydride (876 mg, 37 mmol) at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 20 min at room temperature. The ethylbromobutyrate **168** was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 48 h. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (50 mL) and extracted several times with EtOAc (3 x 30 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 7:3 → MeOH/EtOAc, 1:9) to give a colorless oil (1.60 g, 73 %).

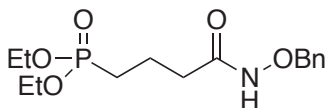
R_f = 0.56 (EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.23 (3H, t, ³J = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.30 (6H, t, ³J = 7.2 Hz, POCH₂CH₃), 1.73-1.92 (4H, m, PCH₂CH₂), 2.39 (2H, t, ³J = 7.3 Hz, CH₂CO), 4.02-4.14 (6H, m, OCH₂CH₃ and POCH₂CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 14.3 (OCH₂CH₃), 16.5 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 18.2 (d, ²J_{C-P} = 4.8 Hz, PCH₂CH₂), 25.0 (d, ¹J_{C-P} = 141.8 Hz, PCH₂CH₂), 34.5 (d, ³J_{C-P} = 16.2 Hz, CH₂CO), 60.5 (OCH₂CH₃), 61.5 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, POCH₂CH₃), 172.8 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 31.1

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₀H₂₁NaO₅P [M+Na]⁺ 275.11, found 275.11.

Diethyl (4-((benzyloxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonate (170a)

The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170a** from ester **169** (1.34 g, 5.3 mmol) and *O*-benzylhydroxylamine hydrochloride. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **170a** as a yellow oil (1.32 g, 76 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E* in a 80:20 ratio respectively.

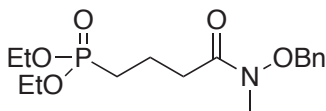
R_f = 0.16 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.30 (6H, t, ³J = 7.0 Hz, OCH₂CH₃), 1.72-1.80 (2H, m, CH₂CH₂P), 1.88-2.00 (2H, m, CH₂CH₂P), 2.24 (8/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.47 (2/10 of 2H, bs, CH₂CO), 4.00-4.12 (4H, m, OCH₂CH₃), 4.90 (2H, bs, OCH₂Ph), 7.35-7.39 (5H, m, CH_{Ar}), 7.91 (2/10 of 1H, bs, NH); 9.08 (8/10 of 1H, bs, NH).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 16.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, POCH_2CH_3), 18.7 (PCH_2CH_2), 23.9 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.6$ Hz, PCH_2CH_2), 32.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 10.2$ Hz, CH_2CO), 61.9 (POCH_2CH_3), 78.1 (OCH_2Ph), 128.6 (CHAr), 129.1 (CHAr), 132.5 (CAr), 170.1 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): 31.3

Diethyl (4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonate (170b)



The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **170b** from hydroxamic acid **170a** (625 mg, 2.1 mmol). The crude product was purified by flash chromatography ($\text{EtOAc} \rightarrow \text{MeOH/EtOAc}$, 5:95) to give **170b** as a yellow oil (517 mg, 72 %) and as the sole *E* conformer.

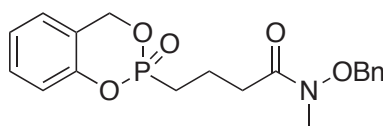
$R_f = 0.48$ (EtOAc/MeOH , 95:5).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): 1.29 (6H, t, $^3J = 7.0$ Hz, OCH_2CH_3), 1.70-1.80 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 1.83-1.94 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{P}$), 2.48 (2H, t, $^3J = 7.2$ Hz, CH_2CO), 3.19 (3H, s, NCH_3), 4.02-4.13 (4H, m, OCH_2CH_3), 4.82 (2H, bs, OCH_2Ph), 7.37 (5H, s, CHAr).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 16.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, POCH_2CH_3), 17.8 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, PCH_2CH_2), 25.2 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 141.2$ Hz, PCH_2CH_2), 32.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 15.6$ Hz, CH_2CO), 33.6 (NCH_3), 61.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, POCH_2CH_3), 76.4 (OCH_2Ph), 128.9 (CHAr), 129.2 (CHAr), 129.5 (CHAr), 134.6 (CAr), 174.4 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): 31.6.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-methyl-4-(2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)butanamide (172)**



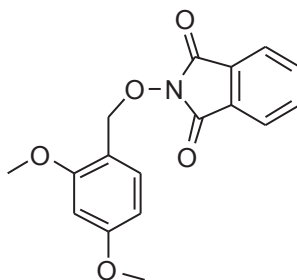
To a cooled solution of **170b** (0.17 mmol, 57 mg) in DCM (0.5 mL) was added dropwise bromotrimethylsilane (1.9 mmol, 0.25 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h and then was allowed to warm up to room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure, water (0.5 mL) was added and stirred for 10 min and then evaporated to dryness. The orange solid was dissolved in THF (3 mL), 2-hydroxybenzyl alcohol **129** (0.17 mmol, 21 mg) and DIC (0.34 mmol, 53 μL) were successively added to the reaction and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water (3 mL) was added and the aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with ethyl acetate (EtOAc). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by automated flash chromatography ($\text{EtOAc/petroleum ether}$, 6:4 $\rightarrow$ EtOAc) to yield the desired product as a colorless oil (10 mg, 16 %).

$R_f = 0.45$ (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.90-2.02 (4H, m, CH₂CH₂P), 2.51 (2H, t, ³J = 6.6 Hz, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 4.82 (2H, bs, OCH₂Ph), 5.09 (1H, dd, ²J_{H-H} = 14.0 Hz, ³J_{P-H} = 17.5 Hz, ArCH₂OP), 5.42 (1H, dd, ²J_{H-H} = 13.8 Hz, ³J_{P-H} = 9.1 Hz, ArCH₂OP), 7.02-7.12 (3H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.30 (1H, t, ³J = 6.7 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.36-7.40 (5H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 17.4 (d, ²J_{C-P} = 4.3 Hz, PCH₂CH₂), 24.9 (d, ¹J_{C-P} = 137.3 Hz, PCH₂CH₂), 32.1 (d, ³J_{C-P} = 15.1 Hz, CH₂CO), 33.6 (NCH₃), 66.0 (d, ²J_{C-P} = 6.7 Hz, ArCH₂OP), 76.4 (OCH₂Ph), 118.8 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.6 (d, ³J_{C-P} = 9.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 125.9 (CH_{Ar(cycloSal)}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar(cycloSal)}), 134.5 (C_{Ar}), 150.0 (d, ²J_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}OP), 174.1 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 27.0. *N*-(2,4-Dimethoxybenzyloxy)phtalimide (**174**)



N-hydroxyphtalimide (5.00 g, 29.6 mmol) and 2,4-dimethoxybenzyl alcohol **173** (4.96 g, 30.4 mmol) were stirred in dichloromethane (220 mL) at 0 °C. Triphenyl phosphine (12.2 g, 46.5 mmol) was added followed by diisopropylazodicarboxylate (9.0 mL, 45.7 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 24 h. The dichloromethane was removed under reduce pressure and the resulting oil was recrystallized in boiling ethanol (200 mL) to give colorless crystals (6.32 g, 68 %).

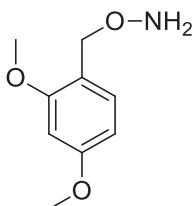
R_f = 0.55 (EtOAc/petroleum ether, 3:7).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 5.21 (2H, s, CH₂), 6.39-6.44 (2H, m, Ar-H), 7.31 (1H, d, ³J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.70-7.79 (4H, m, Ar-H).

¹³C-NMR (75.5MHz, CDCl₃): 55.4 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 74.5 (CH₂), 98.6 – 134.3 (CH_{Ar} and C_{Ar}), 160.1 (H₃CO-C_{Ar}), 162.4 (H₃CO-C_{Ar}), 163.7 (C=O).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₇H₁₅NO₅Na [M+Na]⁺ 336.08, found 336.08.

O-(2,4-Dimethoxybenzyl)hydroxylamine (**175**)



N-(2,4-dimethoxybenzyloxy)phtalimide **174** (3 g, 9.6 mmol) was stirred in refluxing ethanol (100 mL). *N*-methylhydrazine was added and the resulting mixture was stirred at reflux during 1 h. The

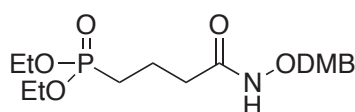
ethanol was removed under reduced pressure and the ether was added. The mixture was stirred during 30 min. The solid was filtered and the solvent was removed to give oil (1.93 g) slightly contaminated by phthalimide.

R_f = 0.52 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 4.66 (2H, s, CH₂), 5.38 (2H, bs, NH₂), 6.44 – 6.46 (2H, m, Ar-H), 7.22 (1H, d, ³J = 8.8 Hz, Ar-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 55.5 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 73.1 (CH₂), 98.8-131.8 (CH_{Ar} and C_{Ar}), 159.3 (H₃CO-C_{Ar}), 161.3 (H₃CO-C_{Ar}).

Diethyl (4-(((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonate (171a)



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **171a** from ester **169** (608 mg, 2.4 mmol) and *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (835 mg, 4.9 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **171a** as a yellow oil (633 mg, 68 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E* in a 70:30 ratio respectively.

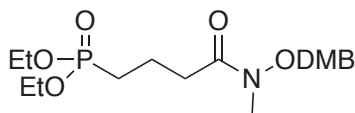
R_f = 0.13 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.30 (6H, t, ³J = 6.8 Hz, OCH₂CH₃); 1.72-1.81 (2H, m, CH₂CH₂P); 1.87-1.99 (2H, m, CH₂CH₂P); 2.21 (7/10 of 2H, bs, CH₂CO); 2.49 (3/10 of 2H, bs, CH₂CO); 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 4.02-4.14 (4H, m, OCH₂CH₃), 4.78 (3/10 of 2H, bs, OCH₂Ar); 4.90 (7/10 of 10H, bs, OCH₂Ar); 6.45 (2H, m, CH_{Ar}); 7.24 (1H, m, CH_{Ar}); 7.87 (3/10 of 1H, bs, NH); 8.80 (7/10 of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 16.6 (d, ³J_{C-P} = 6.0 Hz, POCH₂CH₃), 18.9 (PCH₂CH₂), 24.2 (d, ¹J_{C-P} = 141.8 Hz, PCH₂CH₂), 34.5 (d, ³J_{C-P} = 10.3 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 60.8 (POCH₂CH₃), 61.8 (POCH₂CH₃), 73.3 (OCH₂DMP), 74.0 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}), 101.3 (CH_{Ar}), 116.3 (C_{Ar}), 132.8 (CH_{Ar}), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 161.8 (C_{Ar}OCH₃), 169.9 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 31.3.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₇H₂₈NaO₇PN [M+Na]⁺ 412.15, found 412.15.

Diethyl 4-(((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)(methyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonate (171b)

The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **171b** from hydroxamic acid **171a** (625 mg, 2.1 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc → MeOH/EtOAc 5:95) to give **170b** as a yellow oil (517 mg, 72 %) and as the sole *E* conformer.

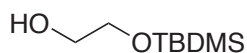
R_f = 0.28 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.30 (6H, t, ³*J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃); 1.70-1.78 (2H, m, CH₂CH₂P); 1.84-1.91 (2H, m, CH₂CH₂P); 2.50 (2H, t, ³*J* = 6.8 Hz, CH₂CO); 3.20 (3H, s, NCH₃); 3.81 (3H, s, OCH₃); 3.83 (3H, s, OCH₃); 4.03-4.12 (4H, m, OCH₂CH₃); 4.78 (2H, s, OCH₂Ar); 6.47 (2H, m, CH_{Ar}); 7.18 (1H, d, ³*J* = 8.8 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 16.5 (d, ³*J*_{C-P} = 7.1 Hz, OCH₂CH₃); 17.8 (d, ²*J*_{C-P} = 4.1 Hz, CH₂CH₂P); 25.3 (d, ¹*J*_{C-P} = 141.9 Hz, CH₂CH₂P); 32.3 (d, ³*J*_{C-P} = 16.4 Hz, CH₂CO); 33.4 (NCH₃); 55.6 (OCH₃); 71.0 (OCH₂CH₃); 98.8 (CH_{Ar}); 104.4 (CH_{Ar}); 115.4 (C_{Ar}); 132.8 (CH_{Ar}); 159.6 (C_{Ar}OCH₃); 162.2 (C_{Ar}OCH₃); 174.3 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 31.6.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₈H₃₀NaO₇PN [M+Na]⁺ 426.16, found 426.16.

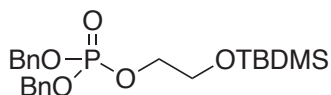
2-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethan-1-ol (180)

Sodium hydride (475 mg, 18.2 mmol) was suspended in THF (36 mL). The resulting mixture was cooled to 0°C, the diol **179** (1 mL, 17.7 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h. A solution of *t*-butyldimethylsilyl chloride (2.74 g, 18.0 mmol) in THF (8 mL) was added over a period of 10 min. The resulting mixture was stirred for 4 h at room temperature. A saturated aqueous solution of NaHCO₃ (40 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (2 x 40 mL). The aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with EtOAc (2 x 40 mL). The collected organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and solvents were removed under reduced pressure. The crude was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 2:8) to give the compound **180** as a colorless oil (2.48g, 80 %).

R_f = 0.25 (EtOAc/petroleum ether, 1:9).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.08 (6H, s, Si-CH₃), 0.91 (9H, s, Si-*t*-Bu), 1.99 (1H, bs, OH), 3.62-3.65 (2H, m, CH₂OTBDMS), 3.70-3.73 (2H, m, CH₂OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): -5.1 (Si-CH₃), 18.5 (C_{4°} of *t*-Bu), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 63.9 (CH₂OTBDMS), 64.3 (CH₂OH).

Dibenzyl 2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl) phosphate (181)

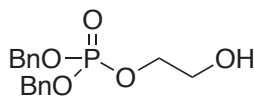
Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² Except for the oxidation step which was accomplished with *m*-CPBA. A colorless oil was obtained (1.45 g, 85 %) from alcohol **180** (540 mg, 3.06 mmol) and after purification by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 25:75 → EtOAc/petroleum ether, 5:5).

R_f = 0.54 (EtOAc/cyclohexane, 1:3).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.05 (6H, s, Si-CH₃), 0.88 (9H, s, Si-*t*Bu), 3.76 (2H, td, ³*J* = 5.2 Hz, ⁴*J*_{P-H} = 0.7 Hz, CH₂OTBDMS), 4.04 (2H, td, ³*J* = 5.1 Hz, ³*J*_{P-H} = 6.9 Hz CH₂OP(O)(OBn)₂), 5.04 (2H, d, ³*J*_{P-H} = 2.8 Hz, OCH₂Ph), 5.06 (2H, d, ³*J*_{P-H} = 2.8 Hz, OCH₂Ph), 7.35 (10H, s, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): -5.1 (Si-CH₃), 18.5 (C_{4°} of *t*Bu), 26.0 (CH₃ of *t*Bu), 62.3 (d, ³*J*_{P-C} = 7.9 Hz, CH₂OTBDMS), 68.9 (d, ²*J*_{P-C} = 5.9 Hz, CH₂OP(O)(OBn)₂), 69.4 (d, ²*J*_{P-C} = 5.5 Hz, OCH₂Ph), 127.6 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 136.1 (d, ³*J*_{P-C} = 7.0 Hz, C_{Ar}).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -0.67.

Dibenzyl (2-hydroxyethyl) phosphate (182)

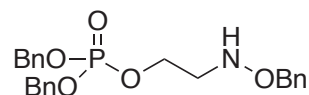
Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² A colorless oil was obtained (767 mg, 79 %) from phosphorylated product **181** (1.30 g, 3.0 mmol) and after purification by flash chromatography (EtOAc).

R_f = 0.63 (EtOAc).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.50 (1H, bs, OH), 3.74 (2H, bt, ³*J* = 4.0 Hz, CH₂OH), 4.07-4.10 (2H, td, ³*J* = 4.5 Hz, ³*J*_{P-H} = 9.1 Hz CH₂OP(O)(OBn)₂), 5.04 (2H, dd, ²*J* = 11.9 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.5 Hz, OCH₂Ph), 5.08 (2H, dd, ²*J* = 11.9 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.5 Hz, OCH₂Ph), 7.36 (10H, s, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 62.3 (d, ³*J*_{P-C} = 5.1 Hz, CH₂OH), 69.8 (d, ²*J*_{P-C} = 5.6 Hz, OCH₂Ph), 70.1 (d, ²*J*_{P-C} = 5.6 Hz, CH₂OP(O)(OBn)₂), 128.3 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 136.1 (d, ³*J*_{P-C} = 6.6 Hz, C_{Ar}).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 0.15.

Dibenzyl (2-((benzyloxy)amino)ethyl) phosphate (183)

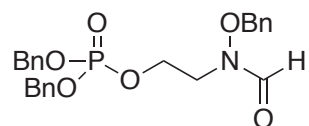
Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² A colorless oil was obtained (210 mg, 74 %) from alcohol **182** (214 mg, 0.66 mmol) and after purification by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 5:5 → EtOAc/ cyclohexane, 7:3).

R_f = 0.53 (EtOAc/cyclohexane, 5:5).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.07 (2H, td, ³*J* = 5.1 Hz, ⁴*J*_{P-H} = 1.1 Hz, CH₂NHOBn), 4.15 (2H, td, ³*J* = 5.2 Hz, ³*J*_{P-H} = 7.0 Hz CH₂OP(O)(OBn)₂), 4.67 (2H, s, OCH₂Ph), 5.02 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.2 Hz, OCH₂Ph), 5.06 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.2 Hz, OCH₂Ph), 7.28-7.33 (15H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 51.9 (d, ³*J*_{P-C} = 7.2 Hz, CH₂NHOBn), 64.5 (d, ²*J*_{P-C} = 5.9 Hz, CH₂OP(O)(OBn)₂), 69.6 (d, ²*J*_{P-C} = 5.5 Hz, POCH₂Ph), 76.3 (OCH₂Ph), 128.1 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.6 (d, ³*J* = 5.2 Hz, CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 136.0 (d, ³*J*_{P-C} = 6.6 Hz, C_{Ar} of POBn), 137.9 (C_{Ar} of NHOBn).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -0.45.

Dibenzyl (2-(N-(benzyloxy)formamido)ethyl) phosphate (184a)

The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **184a** from protected hydroxylamine **183** (84 mg, 0.20 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 9:1) to give **184a** as a yellow oil (86 mg, 94 %).

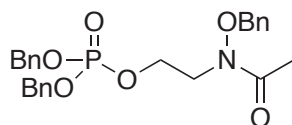
R_f = 0.73 (EtOAc/petroleum ether, 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.36 (3/10 of 2H, bs, NCH₂), 3.77 (7/10 of 2H, bs, NCH₂), 4.04 (3/10 of 2H, bs, CH₂OP(O)(OBn)₂), 4.14 (7/10 of 2H, bs, CH₂OP(O)(OBn)₂), 4.81-5.03 (6H, m, OCH₂Ph and POCH₂Ph), 7.33-7.36 (15H, m, CH_{Ar}), 7.86 (3/10 of 1H, bs, CHO), 8.18 (7/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 45.5 (d, ³*J*_{P-C} = 5.2 Hz, NCH₂), 49.4 (NCH₂), 62.6 (CH₂OP(O)(OBn)₂), 63.4 (CH₂OP(O)(OBn)₂), 69.7 (POCH₂Ph), 78.4 (OCH₂Ph), 128.2 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 159.1 (CHO), 164.1 (CHO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -0.88.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₄H₂₆NO₆PNa [M+Na]⁺ 478.1390, found 478.1386.

Dibenzyl (2-(*N*-(benzyloxy)acetamido)ethyl) phosphate (184b)

Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² A colorless oil was obtained (69 mg, 86 %) from protected hydroxylamine **183** (72 mg, 0.17 mmol) and without purification.

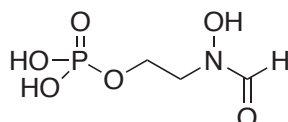
R_f = 0.49 (EtOAc/cyclohexane, 2:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.05 (3H, s, NCOCH₃), 3.83 (2H, bt, CH₂N), 4.16 (2H, td, ³*J* = 5.5 Hz, ³*J*_{P-H} = 7.3 Hz, CH₂OP(O)(OBn)₂), 4.80 (2H, s, OCH₂Ph), 5.00 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.2 Hz, OCH₂Ph), 5.03 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.2 Hz, OCH₂Ph), 7.30-7.37 (15H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.7 (CH₃CO), 47.1 (CH₂NHOBn), 63.9 (d, ²*J*_{P-C} = 5.2 Hz, CH₂OP(O)(OBn)₂), 69.6 (d, ²*J*_{P-C} = 5.5 Hz, POCH₂Ph), 77.0 (OCH₂Ph), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{Ar} of NHOBn), 135.9.0 (d, ³*J*_{P-C} = 6.9 Hz, C_{Ar} of POBn), 173.5 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -1.07.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₅H₂₈NO₆PNa [M+Na]⁺ 492.1546, found 492.1554.

2-(*N*-Hydroxyformamido)ethyl dihydrogen phosphate (30)

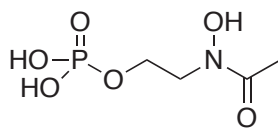
Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² Methanol was replaced by a mixture of *i*-PrOH/H₂O (9:1). A colorless oil was obtained (13 mg, 99 %) from product **184a** (27 mg, 60 μmol) and without purification.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): 3.49 (2/10 of 2H, t, ³*J* = 4.9 Hz, NCH₂), 3.72 (7/10 of 2H, t, ³*J* = 4.7 Hz, NCH₂), 3.77 (1/10 of 2H, t, ³*J* = 5.2 Hz, NCH₂), 4.02-4.06 (7/10 of 2H, m, CH₂OP), 4.14-4.16 (3/10 of 2H, m, CH₂OP), 7.91 (7/10 of 1H, s, CHO), 8.16 (2/10 of 1H, s, CHO), 8.30 (1/10 of 1H, s, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, D₂O): 47.0 (d, ³*J*_{P-C} = 7.3 Hz, NCH₂), 51.1 (NCH₂), 51.2 (NCH₂), 58.1 (d, ²*J*_{P-C} = 4.4 Hz, CH₂OP), 60.7 (d, ²*J*_{P-C} = 4.9 Hz, CH₂OP), 61.1 (d, ²*J*_{P-C} = 5.1 Hz, CH₂OP), 160.5 (CHO), 164.5 (CHO), 165.6 (CHO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, D₂O): 0.21, 0.39, 0.50.

HRMS (EI)⁻: *m/z* calculated for C₃H₇NO₆P [M-H]⁻ 184.0005, found 184.0012.

2-(*N*-Hydroxyacetamido)ethyl dihydrogen phosphate (177)

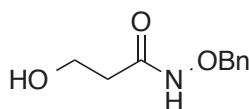
Compound was synthesized according to the method described by Woo *et al.*² A colorless oil was obtained (12 mg, 100 %) from product **184b** (26 mg, 56 μ mol) and without purification.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): 2.08 (3/10 of 3H, bs, NCOCH₃), 2.09 (7/10 of 3H, bs, NCOCH₃), 3.80 (7/10 of 2H, t, ³J_{P-H} = 5.2 Hz, NCH₂), 3.83 (3/10 of 2H, t, ³J_{P-H} = 4.7 Hz, NCH₂), 4.02-4.07 (2H, m, CH₂OP).

¹³C-NMR (125.8 MHz, D₂O): 19.3 (NCOCH₃), 19.7 (NCOCH₃), 48.1 (d, ³J_{P-C} = 7.2 Hz, NCH₂), 51.9 (d, ³J_{P-C} = 7.5 Hz, NCH₂), 61.5 (d, ²J_{P-C} = 4.8 Hz, CH₂OP), 61.7 (d, ²J_{P-C} = 4.9 Hz, CH₂OP), 170.5 (NCOCH₃), 174.6 (NCOCH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, D₂O): 0.19, 0.31, 0.52.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₄H₉NO₆P [M-H]⁺ 198.0186, found 198.0186.

***N*-(Benzyloxy)-3-hydroxypropanamide (186a)**

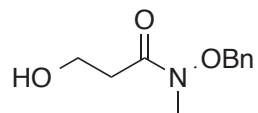
The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **170a** from β -propiolactone **185** (1 mL, 16 mmol) and *O*-benzylhydroxylamine hydrochloride. The crude product was dissolved in THF and treated with TBAF.(H₂O)₃ (1.5 equiv). After total consumption of starting material, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc $\rightarrow$ EtOAc:MeOH, 90:10) to give the product **186a** (1.83 g, 58 %) as a white solid and a mixture of two conformers *Z* and *E* in a 70:30 ratio respectively.

R_f = 0.19 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.33 (7/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.50 (3/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.63 (7/10 of 1H, bs, OH), 2.81 (3/10 of 1H, bs, OH), 3.86 (2H, td, ³J = 5.5 Hz, ³J = 5.5 Hz, CH₂OH), 4.83 (3/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 4.94 (7/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 7.39 (5H, s, CH_{Ar}), 7.87 (3/10 of 1H, bs, NH), 8.31 (7/10 of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 34.0 (CH₂CO), 35.7 (CH₂CO), 58.1 (CH₂OH), 58.7 (CH₂OH), 78.5 (OCH₂Ph), 79.7 (OCH₂Ph), 128.9 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 135.3 (C_{Ar}), 170.2 (CO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₀H₁₃NO₃Na [M+Na]⁺ 218.08, found 218.08.

***N*-(Benzyloxy)-3-hydroxy-*N*-methylpropanamide (186b)**

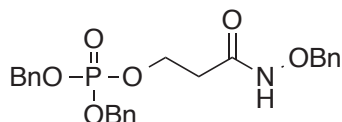
The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **186b** from hydroxamic acid **186a** (552 mg, 2.83 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 7:3 → EtOAc) to give **186b** as a yellow oil (480 mg, 81 %) as a sole *E* conformer

R_f = 0.43 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.62 (2H, t, ³*J* = 5.2 Hz, CH₂CO), 3.05 (1H, t, ³*J* = 6.0 Hz, OH), 3.22 (3H, s, NCH₃), 3.82 (2H, td, ³*J* = 5.6 Hz, ³*J* = 5.5 Hz CH₂OH), 4.84 (2H, s, OCH₂Ph), 7.38 (5H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 33.4 (NCH₃), 34.4 (CH₂CO), 58.5 (CH₂OH), 76.5 (OCH₂Ph), 128.9 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}), 174.8 (CO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₁H₁₅NO₃Na [M+Na]⁺ 232.09, found 232.09.

Dibenzyl (3-((benzyloxy)amino)-3-oxopropyl) phosphate (187a)

The general procedure **D (Method 1)** was applied to synthesize the compound **187a** from alcohol **186a** (320 mg, 1.66 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 9:1 → EtOAc) to give **187a** as a colorless oil (450 mg, 60 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E* in a 80:20 ratio respectively.

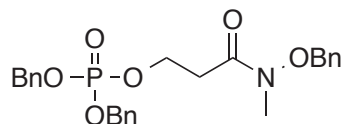
R_f = 0.43 (EtOAc/petroleum ether, 9:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.32 (8/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.70 (2/10 of 2H, bs, , CH₂CO), 4.25 (2H, bs, POCH₂), 4.86 (2H, bs, OCH₂Ph), 4.95-5.06 (4H, m, POCH₂Ph) 7.33-7.35 (15H, m, CH_{Ar}), 7.72 (2/10 of 1H, bs, NH), 8.34 (8/10 of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 34.7 (CH₂CO), 62.9 (POCH₂), 63.9 (POCH₂), 69.5 (POCH₂Ph), 69.7 (POCH₂Ph), 78.4 (OCH₂Ph), 79.6 (OCH₂Ph), 128.3 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 167.5 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -1.07, -1.13.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₄H₂₆NPO₆Na [M+Na]⁺ 478.1390, found 478.1339.

Dibenzyl 3-((benzyloxy)(methyl)amino)-3-oxopropyl) phosphate (187b)

The general procedure **D (Method 1)** was applied to synthesize the compound **187b** from alcohol **186b** (349 mg, 1.67 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc/petroleum ether, 8:2) to give **187b** as a colorless oil (666 mg, 85 %) and as a sole conformer *E*.

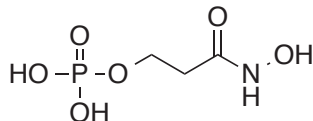
R_f = 0.35 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.73 (2H, t, ³*J* = 6.6 Hz, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 4.31 (2H, td, ³*J* = 6.7 Hz, ²*J* = 6.7 Hz, POCH₂), 4.78 (2H, s, OCH₂Ph), 5.02 (2H, dd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J*_{P-H} = 7.9 Hz, POCH₂Ph), 5.06 (2H, dd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J*_{P-H} = 7.9 Hz, POCH₂Ph), 7.31-7.38 (15H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 33.1 (d, ³*J* = 6.5 Hz, CH₂CO), 33.6 (NCH₃), 63.5 (d, ²*J* = 5.3 Hz, POCH₂), 69.4 (d, ²*J* = 5.3 Hz, POCH₂Ph), 76.6 (OCH₂Ph), 128.2 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 136.0 (d, ³*J* = 7.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 171.6 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -1,18.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₅H₂₈NPO₆Na [M+Na]⁺ 492.1546 found 492.1522.

3-(Hydroxyamino)-3-oxopropyl dihydrogen phosphate (178a)

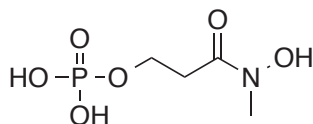
The general procedure **E** was applied to synthesize the compound **178a** from alcohol **187a** (48 mg, 105 μmol) in ethanol. The product **178a** was obtained without purification as a colorless oil (19 mg, 99 %) and as a sole conformer *Z*.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): 2.45 (2H, t, ³*J* = 5.7 Hz, CH₂CO), 4.21 (2H, td, ³*J* = 5.9 Hz, ²*J* = 5.9 Hz, POCH₂).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CD₃OD): 35.2 (d, ³*J* = 7.8 Hz, CH₂CO), 63.6 (d, ²*J* = 4.2 Hz, POCH₂), 169.8 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CD₃OD): 0.0.

HRMS (EI)⁻: *m/z* calculated for C₃H₇NPO₆ [M-H]⁻ 184.0005, found 184.0011.

3-(Hydroxy(methyl)amino)-3-oxopropyl dihydrogen phosphate (178b)

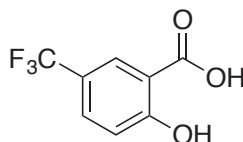
The general procedure **E** was applied to synthesize the compound **178b** from alcohol **187b** (39 mg, 86 μ mol) in ethanol. The product **178b** was obtained without purification as a colorless oil (11.5 mg, 53 %) and as a sole conformer *E*.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): 2.87 (2H, t, $^3J = 6.2$ Hz, CH_2CO), 3.21 (3H, s, NCH_3), 4.23 (2H, td, $^3J = 6.2$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, POCH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, CD_3OD): 34.4 (d, $^3J = 7.0$ Hz, CH_2CO), 36.3 (NCH_3), 63.5 (d, $^2J = 5.2$ Hz, POCH_2), 172.8 (CO).

$^{31}\text{P-NMR}$ (121.5 MHz, CD_3OD): 0.24.

HRMS (EI) $^-$: m/z calculated for $\text{C}_4\text{H}_9\text{NPO}_6$ $[\text{M-H}]^-$ 198.0162, found 198.0169.

2-Hydroxy-5-(trifluoromethyl)benzoic acid (193f)

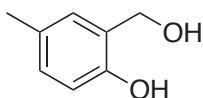
Iodocyclohexane (5 mL, 45.4 mmol) was added to a solution of 2-(methoxy)-5-(trifluoromethyl)benzoic acid **213** (1 g, 4.54 mmol) in DMF (5 mL). The mixture was refluxed for 4 h then the DMF was evaporated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in DCM (40 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2 x 50 mL). The aqueous layer was acidified with a 10 % HCl solution until a pH = 2 was obtained. The aqueous layer was then extracted with DCM (3 x 70 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product (1.95 g) was not purified and directly reduced with LiAlH_4 .

$R_f = 0.68$ (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz - CD_3OD): 7.05 (1H, d, $^3J = 8.6$ Hz, CH_{Ar}), 7.74 (1H, dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, CH_{Ar}), 8.13 (1H, d, $^4J = 2.0$ Hz, CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz - CD_3OD): 114.3 (C_{Ar}), 119.5 (CH_{Ar}), 122.5 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32.9$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CF}_3$), 125.6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 269.4$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CF}_3$), 129.1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4.0$ Hz, CH_{Ar}), 133.1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.0$ Hz, CH_{Ar}), 165.9 (C_{Ar}), 172.6 (CO).

$^{19}\text{F-NMR}$ (282.4 MHz - CD_3OD): -64.4.

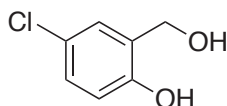
2-(Hydroxymethyl)-4-methylphenol (194b)

The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **194b** from alcohol **193b** (1.0 g, 6.57 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 35:65 → EtOAc/petroleum ether, 75 :25) to give **194b** as a colorless solid (695 mg, 77 %).

R_f = 0.57 (EtOAc/petroleum ether, 3:7).

¹H-NMR (500 MHz – CDCl₃): 2.45 (3H, s, CH₃), 5.01 (2H, d, ⁴*J* = 4.7 Hz, OCH₂Ph), 6.98 (1H, d, ³*J* = 8.0 Hz, CH_{Ar}), 7.04 (1H, s, CH_{Ar}), 7.20 (1H, bdd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 20.6 (CH₃), 64.9 (OCH₂Ph), 116.5 (CH_{Ar}), 124.6 (C_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 129.5 (C_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 153.9 (C_{Ar}OH).

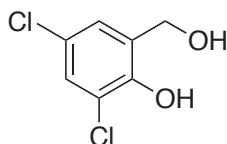
4-Chloro-2-(hydroxymethyl)phenol (194c)

The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **194c** from alcohol **193c** (1.0 g, 5.79 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 20:80 → EtOAc/petroleum ether, 30:70) to give **194c** as a colorless solid (1.32 g, 88 %).

R_f = 0.43 (EtOAc/petroleum ether, 2:8).

¹H-NMR (500 MHz – CDCl₃): 4.83 (2H, s, OCH₂Ph), 6.82 (1H, d, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}), 7.02 (1H, d, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}), 7.20 (1H, dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 2.6 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 64.4 (OCH₂Ph), 118.2 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{Ar}), 126.1 (C_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 154.9 (C_{Ar}OH).

2,4-Dichloro-6-(hydroxymethyl)phenol (194d)

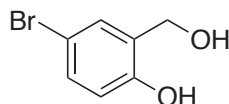
The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **194d** from alcohol **193d** (2.20 g, 10.6 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 20:80) to give **194d** as a colorless solid (1.45 g, 71 %).

R_f = 0.53 (EtOAc/petroleum ether, 2:8).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz – CDCl_3): 4.77 (2H, s, OCH_2Ph), 7.12 (1H, d, $^4J = 2.4$ Hz, CH_{Ar}), 7.28 (1H, d, $^4J = 2.4$ Hz, CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz – CDCl_3): 62.4 (OCH_2Ph), 121.2 (C_{Ar}), 125.4 (C_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 149.1 (C_{ArOH}).

4-Bromo-2-(hydroxymethyl)phenol (**194e**)



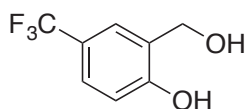
The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **194e** from alcohol **193e** (1.76 g, 8.10 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 20:80 → EtOAc/petroleum ether, 40:60) to give **194e** as a colorless solid (1.21 g, 74 %).

$R_f = 0.47$ (EtOAc/petroleum ether, 2:8).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz - CD_3OD): 4.60 (2H, s, OCH_2Ph), 6.68 (1H, d, $^3J = 8.6$ Hz, CH_{Ar}), 7.18 (1H, dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz, CH_{Ar}), 7.40 (1H, d, $^4J = 2.5$ Hz, CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz - CD_3OD): 60.3 (OCH_2Ph), 112.2 (C_{Ar}), 117.6 (CH_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 131.8 (CH_{Ar}), 155.4 (C_{ArOH}).

2-(Hydroxymethyl)-4-(trifluoromethyl)phenol (**194f**)



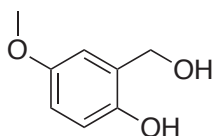
The general procedure **F** was applied to synthesize the compound **194f** from alcohol **193f** (935 mg, 4.54 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 20:80 → EtOAc/petroleum ether, 40:60) to give **194f** as a colorless solid (473 mg, 54 %).

$R_f = 0.47$ (EtOAc/petroleum ether, 2:8).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz - CDCl_3): 4.94 (2H, s, OCH_2Ph), 6.96 (1H, d, $^3J = 8.5$ Hz, CH_{Ar}), 7.30 (1H, s, CH_{Ar}), 7.47 (1H, dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, CH_{Ar}), 7.80 (1H, d, C_{ArOH}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz - CDCl_3): 64.7 (OCH_2Ph), 117.2 (CH_{Ar}), 122.5 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33.1$ Hz, C_{ArCF_3}), 124.6 (C_{Ar}), 125.1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.3$ Hz, CH_{Ar}), 127.0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, CH_{Ar}), 159.3 (C_{Ar}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (282.4 MHz – CDCl_3): -62.5.

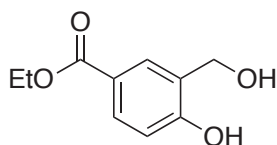
2-(Hydroxymethyl)-4-methoxyphenol (194g)

To a solution of 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid **193g** (3 g, 17.8 mmol), NaBH₄ (1.55, 41 mmol) in THF (47 mL) was added a solution of BF₃-Et₂O (3.3 mL, 26.7 mmol) in THF (12 mL) and refluxed overnight. The reaction mixture was cooled, poured into H₂O (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by automated chromatography (petroleum ether → EtOAc/petroleum ether, 5:5) to give a colorless solid (2.18 g, 86 %).

R_f = 0.38 (EtOAc/petroleum ether, 3:7)

¹H-NMR (500 MHz - CDCl₃): 3.75 (3H, s, OCH₃), 4.81 (2H, s, OCH₂Ph), 6.61 (1H, d, ⁴J = 2.9 Hz, CH_{Ar}), 6.76 (1H, dd, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, CH_{Ar}), 6.81 (1H, d, ³J = 8.7 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz - CDCl₃): 56.0 (OCH₃), 64.9 (OCH₂Ph), 113.6 (CH_{Ar}), 114.6 (CH_{Ar}), 117.4 (CH_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 150.0 (C_{Ar}), 153.3 (C_{Ar}).

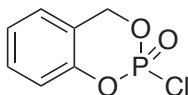
Ethyl 4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)benzoate (194h)

To a stirred solution of ethyl 3-formyl-4-hydroxybenzoate **214** (712 mg, 3.67 mmol) in THF (22 mL) was added NaBH₄ (272 mg, 7.2 mmol) portion-wise at 0 °C over 5 min and warmed at room temperature. The reaction was monitored by TLC, after consumption of starting material the mixture was cooled to 0 °C. The reaction mixture was quenched with a 10 % aqueous solution of HCl (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 40 mL), then aqueous layer was saturated with NaCl and reextracted with EtOAc (3 x 40 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness under reduced pressure. The alcohol **194h** (765 mg, 99 %) was obtained without purification.

R_f = 0.51 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (400 MHz - CD₃OD): 1.36 (3H, t, ³J = 7.1 Hz, CH₃), 4.31 (2H, q, ³J = 7.1 Hz, OCH₂), 4.66 (2H, s, OCH₂Ph), 6.82 (1H, d, ³J = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 7.79 (1H, dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, CH_{Ar}), 8.01 (1H, d, ⁴J = 2.1 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz - CD₃OD): 14.8 (CH₃), 60.5 (OCH₂), 61.8 (OCH₂), 115.6 (CH_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 160.9 (C_{Ar}), 168.5 (CO).

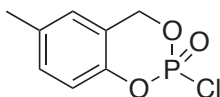
2-Chloro-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195a)

The product was obtained as a colorless oil according to general procedure **G**.

R_f = 0.91 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 5.44-5.53 (2H, m, OCH₂Ph), 7.11 (2H, dd, ³*J* = 7.9 Hz, ³*J* = 7.9 Hz, CH_{Ar}), 7.23 (1H, dd, ³*J* = 7.9 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, CH_{Ar}), 7.37 (1H, dd, ³*J* = 7.9 Hz, ³*J* = 7.9 Hz, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -6.03.

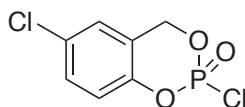
2-Chloro-6-methyl-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195b)

The product was obtained as a slightly yellow oil according to general procedure **G**.

R_f = 0.93 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 2.34 (3H, s, CH₃), 5.39-5.48 (2H, m, OCH₂Ph), 6.91 (1H, s, CH_{Ar}), 6.98 (1H, d, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}), 7.15 (1H, d, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -5.84.

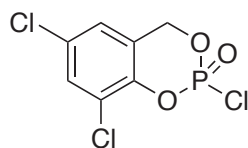
2,6-Dichloro-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195c)

The product was obtained as a colorless oil according to general procedure **G**.

R_f = 0.88 (EtOAc/petroleum ether, 3:7).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 5.40-5.50 (2H, m, OCH₂Ph), 6.91 (1H, d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar}), 7.13 (1H, d, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}), 7.33-7.36 (1H, m, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -6.66.

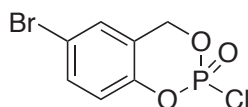
2,6,8-Trichloro-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195d)

The product was obtained as an yellow oil according to general procedure **G**.

R_f = 0.33 (EtOAc/petroleum ether, 15:85).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 5.41-5.49 (2H, m, OCH₂Ph), 7.05 (1H, m, CH_{Ar}), 7.46 (1H, s, CH_{Ar}).

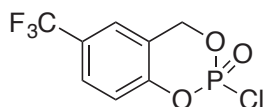
³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -6.81.

6-Bromo-2-chloro-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195e)

The product was obtained as an yellow oil according to general procedure **G**.

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 5.38-5.54 (2H, m, OCH₂Ph), 7.00 (1H, d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar}), 7.27-7.28 (1H, s, CH_{Ar}), 7.46-7.50 (1H, m, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -6.48.

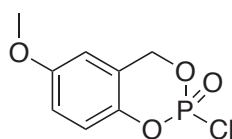
2-Chloro-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195f)

The product was obtained as an yellow oil according to general procedure **G**.

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 5.49-5.58 (2H, m, OCH₂Ph), 7.24 (1H, d, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}), 7.43 (1H, s, CH_{Ar}), 7.66 (1H, d, ³*J* = 8.2 Hz, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -6.99.

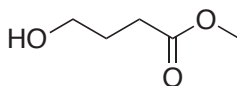
¹⁹F-NMR (282.4 MHz – CDCl₃): -63.4.

2-Chloro-6-methoxy-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinine 2-oxide (195g)

The product was obtained as an yellow oil according to general procedure **G**.

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 5.40-5.50 (2H, m, OCH₂Ph), 6.60 (1H, d, ⁴*J* = 3.3 Hz, CH_{Ar}), 6.87-6.89 (1H, m, CH_{Ar}), 7.03 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -5.87.

Methyl-4-hydroxybutanoate (197)

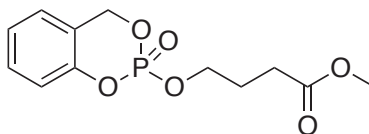
To a suspension of γ -butyrolactone (900 mg, 10.5 mmol) in methanol (55 mL) was added triethylamine (8.8 ml, 63.4 mmol). The reaction mixture was warmed up to 60 °C and stirred for 15 h. The solvents were removed under reduced pressure to give a colorless oil (1.14 g, 92 %), which was used for the next step without further purification.

R_f = 0.68 (EtOAc/petroleum ether, 2:1).

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 1.83-1.92 (2H, m, CH₂), 2.44 (2H, t, ³*J* = 7.1 Hz, CH₂CO), 3.65-3.69 (5H, m, OCH₃ and CH₂OH).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 27.8 (CH₂), 30.9 (CH₂CO), 51.7 (OCH₃), 62.2 (CH₂OH), 174.6 (CO).

MS (EI)⁺ : *m/z* calculated for C₅H₁₀O₃Na [M+Na]⁺ 141.05, found 141.05.

Methyl 4-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)butanoate (191a)

The general procedure **H** was applied to synthesize compound **191a** from alcohol **197** (171 mg, 1.40 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (DCM) to give **191a** as a colorless oil (50 mg, 12 %).

R_f = 0.50 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

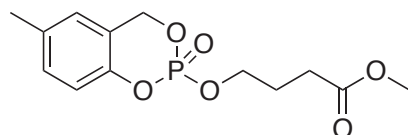
¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 2.00-2.05 (2H, m, CH₂), 2.41 (2H, t, ³*J* = 7.3 Hz, CH₂CO), 3.65 (3H, s, OCH₃), 4.20-4.28 (2H, m, CH₂OP), 5.33-5.38 (2H, m, ArCH₂OP), 7.04-7.16 (3H, m, CH_{Ar}), 7.32 (1H, t, ³*J* = 7.6 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 25.7 (d, ³*J* = 6.6 Hz, CH₂), 30.1 (CH₂CO), 51.9 (OCH₃), 67.9 (d, ²*J* = 5.7 Hz, CH₂OP), 68.7 (d, ²*J* = 7.0 Hz, CH₂OP), 118.9 (d, ³*J* = 6.6 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.8 (d, ³*J* = 10.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.5 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 150.4 (d, ²*J* = 7.1 Hz, C_{Ar}OP), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -9.52.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₂H₁₅O₆PNa [M+Na]⁺ 309.05, found 309.05.

Methyl 4-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)butanoate (191b)



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **191b** from alcohol **197** (110 mg, 0.93 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 8:4) to give **191b** as a colorless oil (156 mg, 56 %).

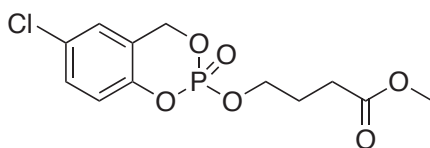
R_f = 0.49 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 1.97-2.06 (2H, m, CH₂), 2.31 (3H, s, CH₃), 2.41 (2H, t, ³*J* = 7.5 Hz, CH₂CO), 3.65 (3H, s, OCH₃), 4.19-4.26 (2H, m, CH₂OP), 5.28-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 6.87 (1H, s, CH_{Ar}), 6.93 (1H, t, ³*J* = 8.2 Hz, CH_{Ar}), 7.11 (1H, t, ³*J* = 8.2 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75.5 MHz – CDCl₃): 20.9 (CH₃), 25.8 (d, ³*J* = 7.2 Hz, CH₂), 30.1 (CH₂CO), 51.9 (OCH₃), 67.8 (d, ²*J* = 5.9 Hz, CH₂OP), 68.8 (d, ²*J* = 6.7 Hz, CH₂OP), 118.6 (d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.4 (d, ³*J* = 9.9 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.7 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}CH₃), 148.2 (d, ²*J* = 6.5 Hz, C_{Ar}OP), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -9.10.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₃H₁₇O₆PNa [M+Na]⁺ 323.07, found 323.07.

Methyl 4-((6-chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)butanoate (191c)

The general procedure **I** was applied to synthesize compound **191c** from alcohol **197** (164 mg, 1.39 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 3:7) to give **191c** as a colorless oil (361 mg, 80 %).

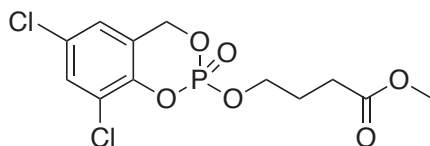
R_f = 0.52 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 2.00-2.07 (2H, m, CH₂), 2.41 (2H, t, ³*J* = 7.2 Hz, CH₂CO), 3.65 (3H, s, OCH₃), 4.23-4.27 (2H, m, CH₂OP), 5.29-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 7.00 (1H, d, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}), 7.08 (1H, t, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}), 7.27-7.29 (1H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 25.7 (d, ³*J* = 6.5 Hz, CH₂), 30.0 (CH₂CO), 51.9 (OCH₃), 68.1 (d, ²*J* = 6.9 Hz, CH₂OP), 120.3 (d, ³*J* = 9.3 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.3 (d, ³*J* = 9.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.5 (CH_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}Cl), 130.0 (CH_{Ar}), 148.9 (d, ²*J* = 6.8 Hz, C_{Ar}OP), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -9.98.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₂H₁₄ClO₆PNa [M+Na]⁺ 343.01, found 343.01.

Methyl 4-((6,8-dichloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)butanoate (191d)

The general procedure **I** was applied to synthesize compound **191d** from alcohol **197** (110 mg, 0.93 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc) to give **191c** as a colorless oil (124 mg, 38 %).

R_f = 0.56 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

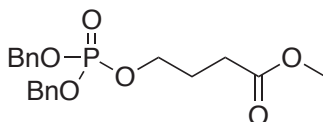
¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 2.02-2.08 (2H, m, CH₂), 2.42 (2H, t, ³*J* = 7.3 Hz, CH₂CO), 3.66 (3H, s, OCH₃), 4.24-4.31 (2H, m, CH₂OP), 5.24-5.38 (2H, m, ArCH₂OP), 7.01 (1H, d, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}), 7.41 (1H, bs, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 25.6 (d, ³*J* = 6.6 Hz, CH₂), 29.9 (CH₂CO), 52.0 (OCH₃), 68.0 (d, ²*J* = 6.9 Hz, CH₂OP), 68.6 (d, ²*J* = 6.1 Hz, CH₂OP), 123.6 (d, ³*J* = 9.9 Hz, ClC_{Ar}C_{Ar}OP), 123.9 (CH_{Ar}), 124.9 (d, ³*J* = 8.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 129.6 (C_{Ar}Cl), 130.30 (CH_{Ar}), 145.2 (d, ²*J* = 5.9 Hz, C_{Ar}OP), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz – CDCl₃): -9.89.

MS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{12}H_{13}Cl_2O_6PNa$ $[M+Na]^+$ 376.97, found 376.97.

Methyl 4-((bis(benzyloxy)phosphoryl)oxy)butanoate (198)



The general procedure **D (Method 1)** was applied to synthesize compound **198** from alcohol **197** (100 mg, 0.85 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5) to give **198** as a colorless oil (40 mg, 12 %).

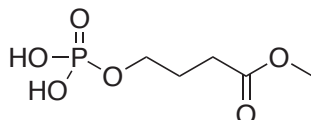
R_f = 0.3 (EtOAc/petroleum ether, 5:5).

¹H-NMR (400 MHz – CDCl₃): 1.87-1.96 (2H, m, CH₂), 2.25 (2H, t, ³*J* = 7.3 Hz, CH₂CO), 3.65 (3H, s, OCH₃), 3.91 (2H, dt, ³*J* = 6.5 Hz, ³*J* = 6.5 Hz, CH₂OP), 5.01 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.5 Hz, OCH₂Ph), 5.06 (2H, dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.5 Hz, OCH₂Ph), 7.35 (10H, s, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): 25.6 (d, ³*J* = 7.5 Hz, CH₂), 30.1 (CH₂CO), 51.9 (OCH₃), 66.9 (d, ²*J* = 6.1 Hz, CH₂OP), 69.5 (d, ²*J* = 5.5 Hz, CH₂OP), 128.2 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 136.0 (d, ³*J* = 6.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 173.4 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CDCl₃): -0.88.

Methyl 4-(phosphonooxy)butanoate (192)

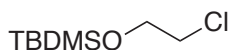


The general procedure **E** was applied to synthesize compound **192** from alcohol **198** (36 mg, 0.10 mmol) in methanol. The product **192** was obtained without purification as a colorless oil (18 mg, 90 %).

¹H-NMR (400 MHz - CD₃OD): 1.92-1.99 (2H, m, CH₂), 2.46 (2H, t, ³*J* = 7.3 Hz, CH₂CO), 3.67 (3H, s, OCH₃), 4.00 (2H, dt, ³*J* = 6.4 Hz, ³*J* = 6.4 Hz, CH₂OP).

³¹P-NMR (162.0 MHz – CD₃OD): -0.06.

***t*-Butyl(2-chloroethoxy)dimethylsilane (204a)**



Imidazole (1.27 g, 18.6 mmol) was added to a cold solution (0°C) of 2-chloroethanol (1.25 mL, 18.6 mmol) in DCM (30 mL). The solution was stirred 10 min and *t*-butyldimethylsilyl chloride (2.80 g, 18.6 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 1 h and then at room temperature overnight. The solution was diluted with DCM (30 mL) and washed with water (3 x 50 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired product **204a** (3.46 g, 96 %) without purification.

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 0.09 (6H, s, SiCH₃), 0.91 (9H, s, *t*-Bu), 3.54 (2H, t, ³*J* = 6.2 Hz, CH₂Cl), 3.85 (2H, s, ³*J* = 6.2 Hz, OCH₂).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): -5.1 (SiCH₃), 18.6 (C_{4°} of *t*-Bu), 26.0 (CH₃ of *t*-Bu), 45.4 (CH₂Cl), 63.9 (OCH₂).

***t*-Butyl(2-iodoethoxy)dimethylsilane (204b)**

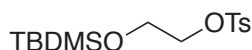


To a solution of **204a** (1.07 g, 5.1 mmol) in anhydrous acetone (10 mL) were successively added Na₂SO₄ (2 g, 14 mmol) and sodium iodide (1.62 g, 10.2 mmol). The reaction mixture was refluxed for 3 days. Diethyl ether (15 mL) was added and the precipitate was filtered. The organic layer was washed with water (20 mL) and then with a solution of 10 % aqueous solution of Na₂S₂O₃ (20 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure to give a colorless oil **204b** (978 mg, 67 %) without purification.

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 0.09 (6H, s, SiCH₃), 0.91 (9H, s, *t*-Bu), 3.20 (2H, t, ³*J* = 7.0 Hz, CH₂I), 3.83 (2H, s, ³*J* = 6.9 Hz, OCH₂).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): -5.20 (SiCH₃), 7.10 (CH₂I), 18.4 (C_{4°} of *t*-Bu), 25.9 (CH₃ of *t*-Bu), 64.3 (OCH₂).

2-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (206)

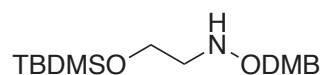


TsCl (2.41 g, 12.6 mmol) and TEA (1.8 mL, 12.4 mmol) were successively added to a solution of **180** (2.00 g, 11.3 mmol) and DMAP (320 mg, 2.61 mmol) in DCM (40 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and then poured in water (35 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 30 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether → petroleum ether/EtOAc, 97:3) to give the desired product **206** (2.87 g, 77 %) as a colorless oil.

R_f = 0.71 (EtOAc/petroleum ether, 5:95).

¹H-NMR (300 MHz – CDCl₃): 0.02 (6H, s, SiCH₃), 0.84 (9H, s, *t*-Bu), 2.44 (3H, s, ArCH₃), 3.79 (2H, t, ³*J* = 5.1 Hz, OCH₂), 4.06 (2H, s, ³*J* = 5.2 Hz, OCH₂), 7.33 (2H, t, ³*J* = 8.0 Hz, CH_{Ar}), 7.79 (2H, t, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz – CDCl₃): -5.2 (SiCH₃), 18.4 (C_{4°} of *t*-Bu), 21.8 (ArCH₃), 25.9 (CH₃ of *t*-Bu), 61.1 (OCH₂), 71.3 (OCH₂), 128.2 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 133.3 (C_{Ar}), 144.9 (C_{Ar}).

Different procedures to synthesize compound (205)

Method 1. A mixture of *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (165 mg, 0.90 mmol), iodine compound **204b** (216 mg, 0.75 mmol), K₂CO₃ (218 mg, 1.6 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) was heated at 60 °C for 3 days. The solid was filtered off and DMF was removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in DCM (20 mL) and successively washed with a saturated solution of NH₄Cl (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by automated flash chromatography (petroleum ether → petroleum ether/EtOAc, 85:15) to give the product **205** (21 mg, 8 %) as a colorless oil.

Method 2. A solution of *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (175 mg, 0.96 mmol) and activated alcohol **206** in anhydrous ethanol (5 mL) was refluxed for 48 h. The mixture was evaporated to dryness then EtOAc (10 mL) was added and the organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The desired product **205** (47 mg, 31 %) was obtained after purification by flash chromatography (petroleum ether → petroleum ether/EtOAc, 9:1).

Method 3. A mixture of *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (189 mg, 1.03 mmol), activated alcohol **206** (293 mg, 0.89 mmol), K₂CO₃ (260 mg, 1.90 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) was heated at 60 °C for 3 days. The solid was filtered off and DMF was removed under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in DCM (20 mL) and washed with a saturated solution of NH₄Cl (20 mL) and water (20 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by automated flash chromatography (petroleum ether → petroleum ether/EtOAc, 9:1) to give the desired product **205** (116 mg, 38 %) as a colorless oil.

Method 4 . A mixture of *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (396 mg, 2.16 mmol), activated alcohol **206** (225 mg, 1.28 mmol), K₂CO₃ (314 mg, 2.26 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was refluxed for 48 h. Water (5 mL) was added and extracted with diethyl ether (10 mL). The aqueous layer was saturated with NaCl and reextracted with diethyl ether (2 x 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (petroleum ether → petroleum ether/EtOAc, 9:1) to give the product **205** (65 mg, 15 %) as a colorless oil.

Method 5. To a solution of **180** (500 mg, 2.8 mmol) in DCM (35 mL) was added 2,6-lutidine (0.40 mL, 3.4 mmol). The solution was cooled down to -78 °C and the trifluoromethanesulfonic anhydride (470 µL, 2.8 mmol) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at -78 °C for 1 h, and *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175** (770 mg, 4.2 mmol) in DCM (20 mL) was added dropwise. The solution was stirred at -78 °C for 1 h, warmed up to room temperature and stirred for another 2 h. The reaction mixture was diluted with DCM (30 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (60 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (60 mL), water (60 mL) and brine (60 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvents were removed under reduced pressure to give a pale yellow oil. The crude was purified by flash chromatography (petroleum ether → EtOAc/petroleum ether, 15:85) to give the product **205** as a colorless oil (424 mg, 44 %).

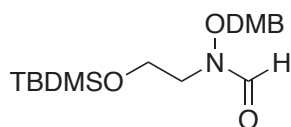
R_f = 0.46 (EtOAc/petroleum ether, 1:9).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.04 (6H, s, Si-CH₃), 0.87 (9H, s, *t*Bu), 3.03 (2H, t, ³*J* = 5.3 Hz, CH₂N), 3.73 (2H, t, ³*J* = 5.3 Hz, CH₂OTBDMS), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 4.70 (2H, s, OCH₂DMP), 6.45-6.48 (2H, m, CH_{Ar}), 7.23 (1H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.5 (C₄[°] of *t*Bu), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 53.9 (CH₂N), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 59.6 (CH₂OTBDMS), 70.1 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}), 104.0 (CH_{Ar}), 118.6 (C_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}OCH₃), 161.1 (C_{Ar}OCH₃).

MS (EI)⁺ : *m/z* calculated for C₁₇H₃₁NO₄SiNa [M+Na]⁺ 364.19 found 364.19.

***N*-(2-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)formamide (207)**



The general procedure **C** was applied to synthesize the compound **207** from protected hydroxylamine **205** (200 mg, 0.59 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 2:8) to give **207** as a colorless oil (180 mg, 83%) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 30:70 ratio.

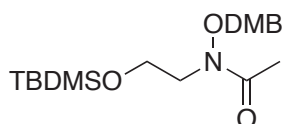
R_f = 0.43 (EtOAc/petroleum ether, 2:8).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.06 (6H, s, Si-CH₃), 0.88 (9H, s, *t*Bu), 3.44-3.83 (10H, m, OCH₂CH₂N and OCH₃), 4.86 (7/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.96 (3/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 6.45-6.47 (2H, m, CH_{Ar}), 7.17 (1H, d, ²*J* = 7.0 Hz, CH_{Ar}), 7.92 (3/10H of 1H, bs, CHO), 8.19 (7/10H of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.5 (C₄[°] of *t*Bu), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 47.4 (CH₂N), 51.8 (CH₂N), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 58.8 (CH₂OTBDMS), 59.3 (CH₂OTBDMS), 71.4 (OCH₂DMP), 72.9 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 115.4 (C_{Ar}), 133.0 (CH_{Ar}), 159.0 (CHO), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.2 (C_{Ar}OCH₃), 163.6 (CHO).

MS (EI)⁺ : *m/z* calculated for C₁₈H₃₁NO₅SiNa [M+Na]⁺ 392.19, found 392.18.

***N*-(2-((*t*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)acetamide (208)**



The general procedure **J** was applied to synthesize the compound **208** from protected hydroxylamine **205** (116 mg, 0.34 mmol). The product **208** was obtained without purification as a colorless oil (128 mg, 98 %) and as the sole *E* conformer

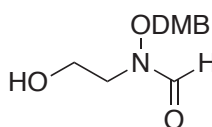
R_f = 0.29 (EtOAc/petroleum ether, 1:9).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.05 (6H, s, Si-CH₃), 0.88 (9H, s, *t*Bu), 2.83 (3H, s, COCH₃) 3.78-3.83 (10H, m, OCH₂CH₂N and OCH₃), 4.83 (2H, s, OCH₂DMP), 6.45-6.48 (2H, m, CH_{Ar}), 7.17 (1H, d, ²*J* = 9.0 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.5 (C_{4°} of *t*Bu), 22.4 (COCH₃), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 49.1 (CH₂N), 55.5 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 59.6 (CH₂OTBDMS), 71.4 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 115.7 (C_{Ar}), 132.7 (CH_{Ar}), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 162.1 (C_{Ar}OCH₃), 166.6 (COCH₃).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₃₃NO₅SiNa [M+Na]⁺ 406.20, found 406.20.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-hydroxyethyl)formamide (209)**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **209** from protected alcohol **207** (200 mg, 0.59 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **209** as a colorless oil (97 mg, 76 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 30:70 ratio.

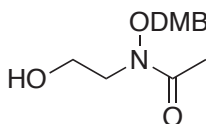
R_f = 0.37 (EtOAc).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.70 (1H, bs, OH), 3.42-3.84 (10H, m, OCH₂CH₂N and OCH₃), 4.87 (7/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.02 (3/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 6.45-6.47 (2H, m, CH_{Ar}), 7.17 (1H, d, ²*J* = 8.1 Hz, CH_{Ar}), 7.96 (3/10H of 1H, bs, CHO), 8.22 (7/10H of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 48.7 (CH₂N), 53.5 (CH₂N), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 60.8 (CH₂OH), 71.5 (OCH₂DMP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}), 104.6 (CH_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 132.2 (CH_{Ar}), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 164.2 (CHO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₂H₁₇NO₅Na [M+Na]⁺ 278.0999, found 278.0980.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-hydroxyethyl)acetamide (210)**



The general procedure **K** was applied to synthesize the compound **210** from protected alcohol **208** (200 mg, 0.59 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **210** as a colorless oil (133 mg, 80 %) and as the sole *E* conformer.

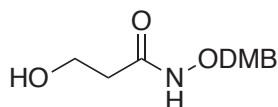
R_f = 0.48 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.13 (3H, s, COCH₃) 3.80-3.84 (10H, m, OCH₂CH₂N and OCH₃), 4.83 (2H, s, OCH₂DMP), 6.46-6.49 (2H, m, CH_{Ar}), 7.19 (1H, d, ²*J* = 9.0 Hz, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): 20.4 (COCH_3), 50.4 (CH_2N), 55.6 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 61.8 (CH_2OH), 71.9 (OCH_2DMP), 98.9 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 115.1 (C_{Ar}), 133.0 (CH_{Ar}), 159.7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 162.4 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 174.2 (COCH_3).

MS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 292.12, found 292.12.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-hydroxypropanamide (211)**



The general procedure **A** was applied to synthesize the compound **211** from β -propiolactone **185** (0.70 mL, 11.1 mmol) and *O*-(2,4-dimethoxybenzyl)hydroxylamine **175**. The crude product was dissolved in THF and treated with $\text{TBAF} \cdot (\text{H}_2\text{O})_3$ (1.5 equiv). After total consumption of the starting material, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography ($\text{EtOAc} \rightarrow \text{EtOAc}/\text{MeOH}$, 90:10) to give the product **211** (1.45 g, 51 %) as a colorless solid and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

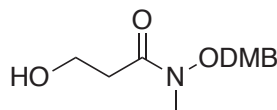
R_f = 0.24 (EtOAc).

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 2.30 (6/10H of 2H, bs, CH_2CO), 2.63 (4/10H of 2H, bs, CH_2CO), 2.91 (1H, bs, OH), 3.79-3.84 (8H, m, OCH_3 and CH_2OH), 4.80 (4/10H of 2H, bs, OCH_2DMP), 4.91 (6/10H of 2H, bs, OCH_2DMP), 6.44-6.48 (2H, m, CH_{Ar}), 7.22 (1H, m, CH_{Ar}), 8.16 (4/10 of 1H, bs, NH), 8.58 (6/10 of 1H, bs, NH).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): 33.5 (CH_2CO), 35.6 (CH_2CO), 55.5 (OCH_3), 55.6 (OCH_3), 58.1 (CH_2OH), 58.6 (CH_2OH), 73.2 (OCH_2DMP), 74.6 (OCH_2DMP), 98.6 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 114.9 (C_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 132.8 (CH_{Ar}), 159.5 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 161.8 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 162.3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 169.8 (CO), 176.6 (CO).

MS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 278.10, found 278.10.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-hydroxy-N-methylpropanamide (212)**



The general procedure **B** was applied to synthesize the compound **212** from hydroxamic acid **212** (267 mg, 1.05 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography ($\text{EtOAc}/\text{petroleum ether}$, 7:3 $\rightarrow$ EtOAc) to give **212** as a yellow oil (243 mg, 86 %) as a sole *E* conformer.

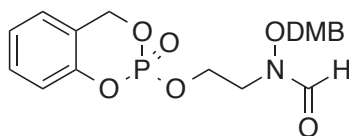
R_f = 0.44 ($\text{EtOAc}/\text{petroleum ether}$, 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.63 (2H, t, ³*J* = 5.6 Hz, CH₂CO), 3.23 (4H, ds, NCH₃ and OH), 3.79-3.84 (8H, m, OCH₃ and CH₂OH), 4.80 (2H, s, OCH₂DMP), 6.46-6.48 (2H, m, CH_{Ar}), 7.18 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 33.1 (NCH₃), 34.0 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 58.8 (CH₂OH), 71.1 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 115.1 (C_{Ar}), 132.9 (CH_{Ar}), , 159.67 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 174.7 (CO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₃H₁₉NO₅Na [M+Na]⁺ 292.12, found 292.12.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)formamide (215a)**



The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **215a** from alcohol **209** (172 mg, 0.67 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **215a** as a colorless oil (187 mg, 66 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.49 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

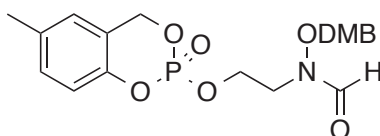
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.57- 3.95 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.38 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.96 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.25-5.39 (2H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.45 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 7.03 (2H, t, ³*J* = 8.2 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.11 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)) and CH_{Ar}(DMB)), 7.28 (1H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.87 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.06 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.6 (d, ³*J*_{CP} = 7.0 Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.9 (d, ²*J*_{CP} = 4.4 Hz, POCH₂), 69.0 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 114.9 (C_{Ar}(DMB)), 118.9 (d, ³*J*_{CP} = 8.7 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.7 (d, ³*J*_{CP} = 8.7 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.5 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 133.1 (CH_{Ar}(DMB)), 150.1 (d, ²*J*_{CP} = 6.6 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.7 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9,89.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₂NO₈PNa [M+Na]⁺ 446.10, found 446.09.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)formamide (215b)**



The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **215b** from alcohol **209** (61 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether,

6:4 → EtOAc) to give **215b** as a colorless oil (30 mg, 46 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.35 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

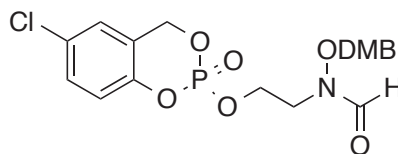
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.30 (3H, s, CH₃Ar), 3.78- 3.88 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.35-4.38 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.97 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.20-5.31 (2H, m, ArCH₂OP), 6.42-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.83 (1H, bs, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.90 (1H, d, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.07 (1H, d, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.12-7.15 (1H, m, CH_{Ar}(DMB)), 7.86 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.07 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.9 (CH₃Ar), 44.7 (d, ³*J*_{CP} = 5.8 Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.9 (POCH₂), 69.1 (d, ²*J*_{C-P} = 7.0 Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.5 (CH_{Ar}(DMB)), 114.9 (C_{Ar}(DMB)), 118.7 (d, ³*J*_{C-P} = 7.9 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.3 (d, ³*J*_{C-P} = 8.9 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 130.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 133.1 (CH_{Ar}(DMB)), 134.2 (C_{Ar}CH₃), 148.1 (C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.8 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.7.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₈PNa [M+Na]⁺ 460.1132, found 460.1116.

***N*-(2-(((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-(2,4-dimethoxybenzyl)oxy)formamide (215c)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **215c** from alcohol **209** (169 mg, 0.66 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **215c** as a colorless oil (155 mg, 51 %) as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.51 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

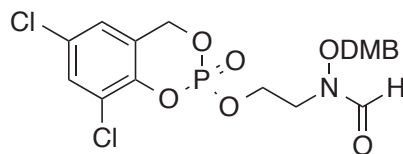
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.82- 3.88 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.39 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.96 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.18-5.34 (2H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.94 (1H, d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.03 (1H, s, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.12 (1H, d, ³*J* = 6.9 Hz, CH_{Ar}(DMB)), 7.25 (1H, d, ³*J* = 8.8 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.89 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.07 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.6 (d, ³*J*_{CP} = 6.0 Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.2 (POCH₂), 68.5 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.5 (CH_{Ar}(DMB)), 114.9 (C_{Ar}(DMB)), 120.4 (d, ³*J*_{CP} = 9.5 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.1 (d, ³*J*_{CP} = 10.2 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.7 (C_{Ar}Cl), 129.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 133.1 (CH_{Ar}(DMB)), 147.7 (d, ²*J*_{CP} = 6.4 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.7 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.4

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for C₁₉H₂₁ClNO₈PNa [M+Na]⁺ 480.0556, found 480.0556.

***N*-(2-(((6,8-Dichloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)formamide (215d)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **215d** from alcohol **209** (185 mg, 0.73 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **215d** as a colorless oil (177 mg, 49 %) as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.51 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

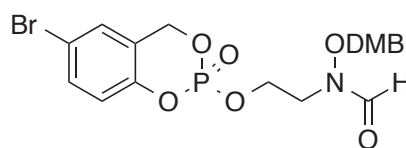
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.82- 3.90 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.41 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.94 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.19-5.34 (2H, m, ArCH₂OP), 6.46 (2H, bs, CH_{Ar(DMB)}), 6.94 (1H, bs, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.14 (1H, m, CH_{Ar(DMB)}), 7.35 (1H, bs, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.91 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.06 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.4 (d, ³J_{CP} = 6.0 Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.5 (POCH₂), 68.4 (d, ²J_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar(DMB)}), 104.5 (CH_{Ar(DMB)}), 114.8 (C_{Ar(DMB)}), 123.4 (d, ³J_{CP} = 9.5 Hz, ClC_{Ar}C_{Ar}OP), 123.7 (CH_{Ar(cycloSal)}), 124.9 (C_{ArCH₂OP}), 129.6 (C_{ArCl}), 130.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 133.1 (CH_{Ar(DMB)}), 145.0 (C_{ArOP}), 159.7 (C_{ArOCH₃}), 162.4 (C_{ArOCH₃}), 163.7 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.9

MS (EI)⁺: m/z calculated for C₁₉H₂₀Cl₂NO₈PNa [M+Na]⁺ 514.02, found 514.02.

***N*-(2-(((6-Bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)formamide (215e)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **215e** from alcohol **209** (60 mg, 0.24 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc/petroleum ether, 7:3) to give **215e** as a colorless oil (44 mg, 37 %) as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.57 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.76-3.95 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.38 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.95 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.22 (1H, dd, ²J = 14.7 Hz, ³J_{P-H} =

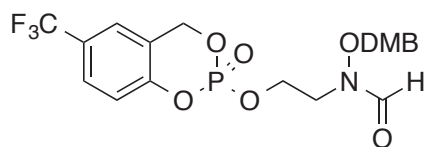
18.3 Hz, ArCH₂OP), 5.31 (1H, dd, $^2J = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 8.0$ Hz, ArCH₂OP), 6.44-6.46 (2H, m, CH_{Ar(DMB)}), 6.89 (1H, d, $^3J = 8.7$ Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.11-7.17 (2H, m, CH_{Ar(DMB)} and CH_{Ar(cycloSal)}), 7.38 (1H, d, $^3J = 8.7$ Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.89 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.06 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.9$ Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.1 (POCH₂), 64.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.5$ Hz, POCH₂), 68.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar(DMB)}), 104.5 (CH_{Ar(DMB)}), 114.8 (C_{Ar(DMB)}), 117.0 (C_{Ar(Br)}), 120.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 8.6$ Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.4$ Hz, C_{Ar}CH₂OP), 128.3 (CH_{Ar(cycloSal)}), 132.8 (CH_{Ar(cycloSal)}), 133.1 (CH_{Ar(DMB)}), 149.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.7 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.5.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₁BrNO₈PNa [M+Na]⁺ 524.0080, found 524.0138.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)formamide (215f)**



The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **215f** from alcohol **209** (96 mg, 0.38 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **215f** as a colorless oil (98 mg, 52 %) as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

R_f = 0.50 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

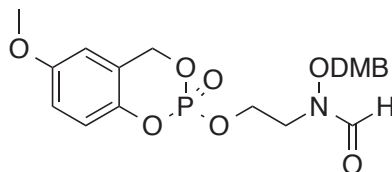
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.76-3.94 (8H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.42 (2H, bs, POCH₂), 4.80 (8/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.96 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.31 (1H, dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 18.6$ Hz, ArCH₂OP), 5.40 (1H, dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 8.7$ Hz, ArCH₂OP), 6.44-6.46 (2H, m, CH_{Ar(DMB)}), 7.10-7.13 (2H, m, CH_{Ar(DMB)} and CH_{Ar(cycloSal)}), 7.33 (1H, bs, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.55 (1H, d, $^3J = 8.6$ Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.90 (2/10 of 1H, bs, CHO), 8.06 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.5 (NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.4 (POCH₂), 68.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar(DMB)}), 104.5 (CH_{Ar(DMB)}), 114.8 (C_{Ar(DMB)}), 119.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.4$ Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.1$ Hz, C_{Ar}CH₂OP), 123.1 (CH_{Ar(cycloSal)}), 127.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 133.1 (CH_{Ar(DMB)}), 152.6 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 163.7 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.7.

¹⁹F-NMR (282.4 MHz, CDCl₃): -63.2.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₁F₃NO₈PNa [M+Na]⁺ 514.0849, found 514.0876.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-(((6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)formamide (215g)**

The general procedure **I** was applied to synthesize compound **215g** from alcohol **209** (96 mg, 0.38 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc) to give **215g** as a colorless oil (110 mg, 64 %) as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio.

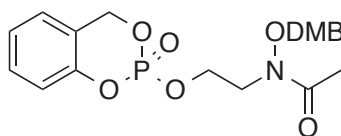
R_f = 0.28 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 3.54- 3.89 (11H, m, NCH₂ and OCH₃), 4.34 (2H, bs, POCH₂), 4.78 (8/10H of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.95 (2/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.20-5.32 (2H, m, ArCH₂OP), 6.41-6.43 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.51 (1H, s, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.78 (1H, d, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.92 (1H, d, ³*J* = 9.2 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.10 (1H, m, CH_{Ar}(DMB)), 7.84 (2/10H of 1H, bs, CHO), 8.04 (8/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 44.7 (d, ³*J*_{CP} = 6.5 Hz, NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 63.9 (POCH₂), 69.1 (d, ²*J*_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.5 (CH_{Ar}(DMB)), 110.1 (CH_{Ar}(cycloSal)), 114.9 (C_{Ar}(DMB)), 115.2 (CH_{Ar}(cycloSal)), 119.8 (d, ³*J*_{C-P} = 8.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.3 (C_{Ar}CH₂OP), 133.1 (CH_{Ar}(DMB)), 143.9 (d, ²*J*_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}OP), 156.2 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.8 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.4.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₉PNa [M+Na]⁺ 476.1081, found 476.1109.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)acetamide (216a)**

The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216a** from alcohol **210** (190 mg, 0.71 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **216a** as a colorless oil (227 mg, 73 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.47 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.99 (3H, s, CH₃CO), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.89-3.98 (2H, m, NCH₂), 4.34-4.41 (2H, m, POCH₂), 4.76 (2H, s, OCH₂DMP), 5.23-5.38 (2H, m,

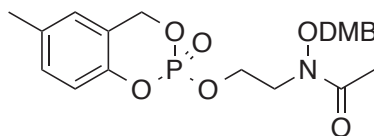
ArCH₂OP), 6.43-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 7.01 (2H, t, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.10 (1H, t, ³*J* = 7.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)) 7.16 (1H, d, ³*J* = 8.1 Hz, CH_{Ar}(DMB)), 7.27 (1H, m, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.2 (CH₃CO), 46.1 (NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.4 (d, ²*J*_{CP} = 5.5 Hz, POCH₂), 68.9 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 71.6 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 115.1 (C_{Ar}(DMB)), 119.0 (d, ³*J*_{CP} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.7 (d, ³*J*_{CP} = 10.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9 (CH_{Ar}(DMB)), 150.3 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 173.4 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.90.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₈PNa [M+Na]⁺ 460.11, found 460.11.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)acetamide (216b)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216b** from alcohol **210** (200 mg, 0.78 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc) to give **216b** as a colorless oil (17 mg, 36 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.33 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

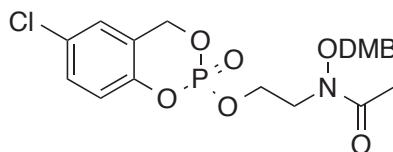
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.00 (3H, s, CH₃CO), 2.29 (3H, s, CH₃Ar), 3.82 (OCH₃), 3.83 (OCH₃), 3.87- 3.97 (2H, m, NCH₂), 4.30-4.42 (2H, m, POCH₂), 4.76 (2H, s, OCH₂DMP), 5.18-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.81 (1H, bs, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.89 (1H, d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.05 (1H, d, ³*J* = 7.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.15 (1H, d, ³*J* = 7.9 Hz, CH_{Ar}(DMB)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.1 (CH₃CO), 20.8 (CH₃Ar), 46.2 (NCH₂), 55.5 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 64.4 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂), 69.0 (d, ²*J*_{C-P} = 7.0 Hz, ArCH₂OP), 71.6 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}(DMB)), 104.3 (CH_{Ar}(DMB)), 115.1 (C_{Ar}(DMB)), 118.6 (d, ³*J*_{C-P} = 9.3 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.3 (d, ³*J*_{C-P} = 9.5 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.6 (CH_{Ar}(cycloSal)), 130.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9 (CH_{Ar}(DMB)), 134.1 (C_{Ar}CH₃), 148.1 (d, ²*J*_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}OP), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 162.2 (C_{Ar}OCH₃), 173.5 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.7.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₁H₂₆NO₈PNa [M+Na]⁺ 474.1288, found 474.1247.

***N*-(2-(((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)acetamide (216c)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216c** from alcohol **210** (180 mg, 0.67 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **216c** as a colorless oil (178 mg, 56 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.40 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

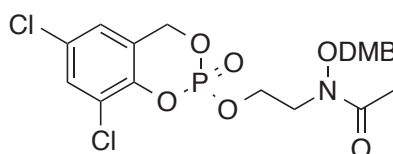
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.00 (3H, s, CH₃CO), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.91-3.96 (2H, m, NCH₂), 4.35-4.42 (2H, m, POCH₂), 4.76 (2H, s, OCH₂DMP), 5.16-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 6.44-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.93 (1H, d, ³*J* = 8.1 Hz CH_{Ar}(cycloSal)), 7.00 (1H, d, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.15 (1H, d, ³*J* = 8.0 Hz, CH_{Ar}(DMB)) 7.22 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.2 (CH₃CO), 45.9 (NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.7 (d, ²*J*_{CP} = 5.6 Hz, POCH₂), 68.4 (d, ²*J*_{CP} = 7.2 Hz, ArCH₂OP), 71.7 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 115.1 (C_{Ar}(DMB)), 120.4 (d, ³*J*_{CP} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.3 (d, ³*J*_{CP} = 9.9 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.6 (C_{Ar}Cl), 129.8 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9 (CH_{Ar}(DMB)), 148.8 (d, ²*J*_{CP} = 7.0 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 173.4 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.4.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₃ClNO₈PNa [M+Na]⁺ 494.0683, found 494.0683.

***N*-(2-(((6,8-Dichloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)acetamide (216d)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216d** from alcohol **210** (214 mg, 0.79 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (DCM/MeOH, 98:2) to give **216d** as a colorless oil (15mg, 12 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.32 (DCM/MeOH, 98:2).

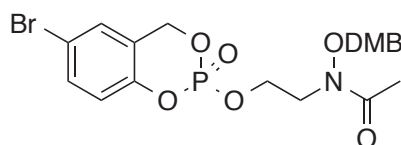
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.02 (3H, s, CH₃CO), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.27-4.45 (2H, m, NCH₂), 4.35-4.42 (2H, m, POCH₂), 4.76 (2H, s, OCH₂DMP), 5.17-5.32 (2H, m, ArCH₂OP), 6.44-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.92 (1H, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.15 (1H, d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar}(DMB)) 7.35 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 20.1 (CH_3CO), 45.8 (NCH_2), 55.6 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 65.1 (POCH_2), 68.3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7.0$ Hz, ArCH_2OP), 71.7 (OCH_2DMP), 98.7 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 104.4 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 115.1 ($\text{C}_{\text{Ar(DMB)}}$), 123.4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 9.5$ Hz, $\text{ClC}_{\text{Ar}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{OP}$), 123.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 124.9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 8.7$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{OP}$), 129.5 (C_{ArCl}), 130.2 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 132.9 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 145.1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 5.9$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OP}$), 159.7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 162.4 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 173.4 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): -10.7.

MS (EI^+): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{NO}_8\text{PNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 528.04, found 528.03.

***N*-(2-((6-Bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)acetamide (216e)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216e** from alcohol **210** (60 mg, 0.22 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc /petroleum ether, 5:5) to give **216e** as a colorless oil (58 mg, 51 %) and as the sole *E* conformer.

$R_f = 0.42$ (EtOAc /petroleum ether, 7:3).

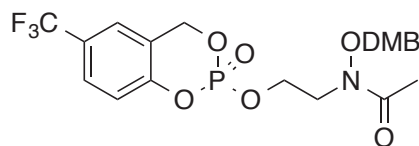
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 2.00 (3H, s, CH_3CO), 3.82 (3H, s, OCH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.87-3.99 (2H, m, NCH_2), 4.33-4.43 (2H, m, POCH_2), 4.75 (2H, s, OCH_2DMP), 5.20 (1H, dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 19.1$ Hz, ArCH_2OP), 5.30 (1H, dd, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 8.0$ Hz, ArCH_2OP), 6.44-6.47 (2H, m, $\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 6.87 (1H, d, $^3J = 8.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 7.14-7.17 (2H, m, $\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$ and $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 7.37 (1H, d, $^3J = 9.3$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 20.1 (CH_3CO), 45.9 (NCH_2), 55.6 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 64.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.7$ Hz, POCH_2), 68.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, ArCH_2OP), 71.7 (OCH_2DMP), 98.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 104.4 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 115.0 ($\text{C}_{\text{Ar(DMB)}}$), 116.9 (C_{ArBr}), 120.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.0$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{OP}$), 122.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 10.1$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{OP}$), 128.3 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 132.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 132.9 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMB)}}$), 149.4 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{OP}$), 159.7 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 162.3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{OCH}_3$), 173.4 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CDCl_3): -10.3.

HRMS (EI^+): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{BrNO}_8\text{P}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 516.0417, found 516.0411.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)acetamide (216f)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216f** from alcohol **210** (98 mg, 0.36 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc) to give **216f** as a colorless oil (73 mg, 52 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.42 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.97 (3H, s, CH₃CO), 3.81 (6H, s, OCH₃), 3.88-3.99 (2H, m, NCH₂), 4.38-4.45 (2H, m, POCH₂), 4.75 (2H, bs, OCH₂DMP), 5.28 (1H, dd, ²*J* = 14.2 Hz, ³*J*_{P-H} = 18.7 Hz, ArCH₂OP), 5.38 (1H, dd, ²*J* = 14.3 Hz, ³*J*_{P-H} = 7.5 Hz, ArCH₂OP), 6.44-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 7.08 (1H, d, ³*J* = 8.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.15 (1H, d, ³*J* = 7.9 Hz, CH_{Ar}(DMB)), 7.30 (1H, bs, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.54 (1H, d, ³*J* = 8.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

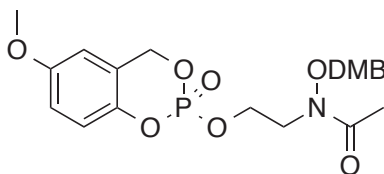
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.1 (CH₃CO), 44.8 (NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.8 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂), 68.5 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 71.7 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 115.0 (C_{Ar}(DMB)), 119.6 (d, ³*J*_{C-P} = 9.4 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.4 (d, ³*J*_{C-P} = 9.9 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 123.9 (q, ³*J*_{C-F} = 2.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 125.8 (q, ¹*J*_{C-F} = 273.4 Hz, C_{Ar}CF₃), 126.7 (q, ²*J*_{C-F} = 32.9 Hz, C_{Ar}CF₃), 127.2 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9 (CH_{Ar}(DMB)), 152.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 173.3 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.5

¹⁹F-NMR (282.4 MHz, CDCl₃): -63.2

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₁H₂₃F₃NO₈PNa [M+Na]⁺ 528.1006, found 528.1001.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-((6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)acetamide (216g)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **216g** from alcohol **210** (92 mg, 0.36 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc) to give **216g** as a colorless oil (94 mg, 56 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.27 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

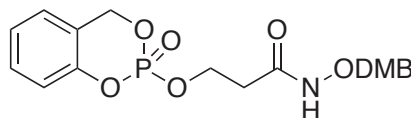
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.00 (3H, s, CH₃CO), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 3.88-3.97 (2H, m, NCH₂), 4.31-4.41 (2H, bs, POCH₂), 4.75 (2H, bs, OCH₂DMP), 5.19-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.52 (1H, d, ⁴*J* = 2.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.79 (1H, dd, ³*J* = 8.9 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.92 (1H, d, ³*J* = 9.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.16 (1H, d, ³*J* = 8.1 Hz, CH_{Ar}(DMB)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.2 (CH₃CO), 46.1 (NCH₂), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 64.4 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂), 69.0 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH₂OP), 71.7 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 110.1 (CH_{Ar}(cycloSal)), 115.1 (CH_{Ar}(cycloSal)), 119.8 (d, ³*J*_{C-P} = 8.8 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.1 (d, ³*J*_{C-P} = 9.4 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 132.9 (CH_{Ar}(DMB)), 144.0 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, C_{Ar}OP), 156.1 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 173.5 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.7

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₁H₂₆NO₉PNa [M+Na]⁺ 490.1237, found 490.1250.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (217a)**



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217a** from alcohol **211** (153 mg, 0.60 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 8:2) to give **217a** as a colorless oil (205 mg, 65 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.38 (EtOAc/cyclohexane, 9:1).

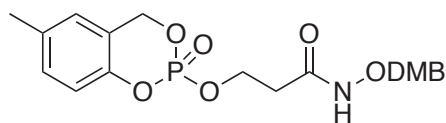
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.48 (6/10H of 2H, bs, CH₂CO), 2.83 (4/10H of 2H, bs, CH₂CO), 3.81 (6H, s, OCH₃), 4.40-4.49 (2H, m, POCH₂), 4.77 (4/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.85 (6/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.34 (2H, m, ArCH₂OP), 6.45 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.05 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.11 (1H, pseudo-t, ³*J* = 7.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.17 (1H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.29 (1H, pseudo-t, ³*J* = 7.8 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.88 (4/10H of 1H, bs, NH), 8.35 (6/10H of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.5 (d, ³*J*_{C-P} = 5.9 Hz, CH₂CO), 34.6 (d, ³*J*_{C-P} = 5.1 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.6 (POCH₂), 64.4 (POCH₂), 68.8 (ArCH₂OP), 68.9 (ArCH₂OP), 73.5 (OCH₂DMP), 74.9 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.2 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 114.9 (C_{Ar}(DMP)), 115.9 (C_{Ar}(DMP)), 118.9 (d, ³*J*_{C-P} = 9.0 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.7 (C_{Ar}CH₂OP), 124.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 124.6 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.5 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.9 (CH_{Ar}(DMP)), 130.0 (CH_{Ar}(DMP)), 132.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 133.1 (CH_{Ar}(cycloSal)), 150.2 (C_{Ar}OP), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 161.9 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 166.7 (CO), 173. (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.8, -9.9.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₂NO₈PNa [M+Na]⁺ 446.10, found 446.10.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-(((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (217b)**



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217b** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 7:3 → EtOAc) to give **217b** as a colorless oil (146 mg, 43 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.36 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

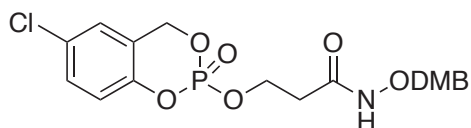
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.26 (3H, s, CH₃Ar), 2.42-2.51 (6/10 of 2H, m, CH₂CO), 2.80-2.86 (4/10 of 2H, CH₂CO), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 4.39-4.45 (2H, m, POCH₂), 4.75 (4/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 4.80-4.85 (6/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.21-5.31 (2H, m, ArCH₂OP), 6.42-6.44 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.82 (1H, s, CH_{Ar(cycloSal)}), 6.90 (1H, d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.05 (1H, d, ³*J* = 8.5 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.13-7.17 (1H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.85 (4/10H of 1H, bs, NH), 8.32 (6/10H of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.9 (CH₃Ar), 32.5 (CH₂CO), 34.7 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 63.6 (POCH₂), 64.3 (POCH₂), 68.9 (d, ²*J*_{C-P} = 5.3 Hz ArCH₂OP), 69.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.5 Hz ArCH₂OP), 73.5 (OCH₂DMP), 75.0 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 116.0 (C_{Ar}(DMP)), 118.6 (d, ³*J*_{C-P} = 8.8 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.3 (C_{Ar}CH₂OP), 125.7 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.4 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.5 (CH_{Ar(cycloSal)}), 132.9 (CH_{Ar}(DMP)), 133.1 (CH_{Ar}(DMP)), 134.3 (C_{Ar}CH₃), 148.0 (C_{Ar}OP), 148.2 (C_{Ar}OP), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 162.0 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 166.8 (C_{Ar}OCH₃), 171.4 (CO), 173.4 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.3, -9.5.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₈PNa [M+Na]⁺ 460.1132, found 460.1166.

3-(((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)propanamide (217c)



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217c** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc) to give **217c** as a colorless oil (103 mg, 29 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.34 (EtOAc).

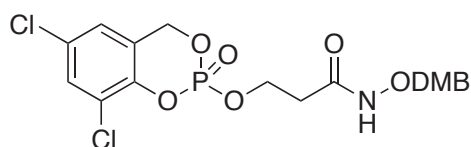
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.49 (6/10 of 2H, m, CH₂CO), 2.83 (4/10 of 2H, CH₂CO), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.42-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.78 (4/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 4.86 (6/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.22-5.38 (2H, m, ArCH₂OP), 6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.98 (1H, pseudo-d, ³J = 8.7 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.05 (1H, t, ³J = 2.1 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.18 (1H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.24 (1H, bs, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.84 (4/10H of 1H, bs, NH), 8.29 (4/10H of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.5 (CH₂CO), 34.5 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 63.8 (POCH₂), 64.6 (POCH₂), 68.3 (ArCH₂OP), 73.6 (OCH₂DMP), 75.0 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 114.9 (C_{Ar}(DMP)), 115.9 (C_{Ar}(DMP)), 120.3 (d, ³J_{C-P} = 9.4 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.2 (C_{Ar}CH₂OP), 125.5 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.3 (CH_{Ar(cycloSal)}), 132.9 (CH_{Ar}(DMP)), 148.7 (C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 166.6 (C_{Ar}OCH₃), 173.3 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.3, -10.4.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₁ClNO₈PNa [M+Na]⁺ 480.0586, found 480.0600.

3-((6,8-Dichloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)propanamide (217d)



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217d** from alcohol **211** (250 mg, 0.98 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 9:1) to give **217d** as a colorless oil (49 mg, 10 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.47 (EtOAc/cyclohexane, 9:1).

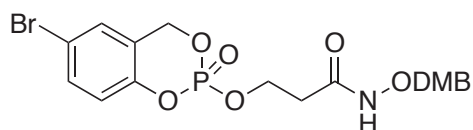
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.50 (6/10 of 2H, m, CH₂CO), 2.83 (4/10 of 2H, CH₂CO), 3.81-3.83 (6H, m, OCH₃), 4.42-4.55 (2H, m, POCH₂), 4.77 (4/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 4.84 (6/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.23-5.37 (2H, m, ArCH₂OP), 6.44 (2H, pseudo-s, CH_{Ar}(DMP)), 6.97 (1H, s, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.17 (1H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.37 (1H, s, CH_{Ar}(DMP)), 8.14 (4/10H of 1H, bs, NH), 8.64 (6/10H of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.4 (CH₂CO), 34.3 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.2 (POCH₂), 65.0 (POCH₂), 68.1 (ArCH₂OP), 68.2 (ArCH₂OP), 73.5 (OCH₂DMP), 74.9 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 114.9 (C_{Ar}(DMP)), 115.9 (C_{Ar}(DMP)), 123.5 (ClC_{Ar}C_{Ar}OP), 123.9 (CH_{Ar(cycloSal)}), 124.0 (CH_{Ar(cycloSal)}), 124.8 (C_{Ar}CH₂OP), 129.5 (C_{Ar}Cl), 129.8 (C_{Ar}Cl), 130.3 (CH_{Ar(cycloSal)}), 132.9 (CH_{Ar}(DMP)), 133.1 (CH_{Ar}(DMP)), 144.9 (C_{Ar}OP), 145.1 (C_{Ar}OP), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 161.9 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 166.5 (CO), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.3, -10.4.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₁Cl₂NO₈PNa [M+Na]⁺ 492.04, found 492.04.

3-((6-Bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)propanamide (217e)



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217e** from alcohol **211** (139 mg, 0.54 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 6:4 → EtOAc) to give **217e** as a colorless oil (29 mg, 11 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.37 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

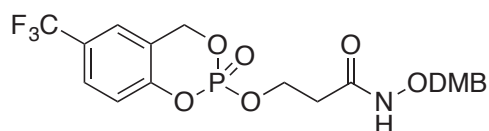
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.48 (6/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.81 (4/10 of 2H, bs, CH₂CO), 3.81 (6H, s, OCH₃), 4.37-4.54 (2H, m, POCH₂), 4.76 (4/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.85 (6/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 5.24 (1H, dd, ²*J* = 14.5 Hz, ³*J*_{P-H} = 18.0 Hz, ArCH₂OP), 5.34 (1H, dd, ²*J* = 14.3 Hz, ³*J*_{P-H} = 9.5 Hz, ArCH₂OP), 6.43-6.45 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.92 (1H, d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.11-7.19 (2H, m, CH_{Ar}(DMP) and CH_{Ar}(cycloSal)), 7.39 (1H, d, ³*J* = 8.2 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)). 8.11 (4/10 of AH, bs, NH), 8.63 (6/10 of 1H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.4 (CH₂CO), 34.4 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.8 (POCH₂), 64.7 (POCH₂), 68.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, ArCH₂OP), 68.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.3 Hz, ArCH₂OP), 73.5 (OCH₂DMP), 74.6 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 114.9 (C_{Ar}(DMP)), 116.0 (C_{Ar}(DMP)), 116.9 (C_{Ar}Br), 117.1 (C_{Ar}Br), 120.6 (d, ³*J*_{C-P} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.5 (d, ³*J*_{C-P} = 9.5 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 122.7 (d, ³*J*_{C-P} = 10.3 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 128.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 128.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9-133.1 (CH_{Ar}(cycloSal) and CH_{Ar}(DMP)), 149.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.4 Hz, C_{Ar}OP), 149.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.4 Hz, C_{Ar}OP), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 161.9 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 166.6 (CO), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.1, -10.2.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₉H₂₂BrNO₈PNa [M+Na]⁺ 502.0261, found 502.0331.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-((2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (217f)**



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217f** from alcohol **211** (152 mg, 0.60 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 3:7 → EtOAc) to give **217f** as a colorless oil (38 mg, 13 %) and as a mixture of the two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.33 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.47-2.49 (6/10 of 2H, m, CH₂CO), 2.76-2.88 (4/10 of 2H, m, CH₂CO), 3.80 (6H, s, OCH₃), 4.42-4.54 (2H, m, POCH₂), 4.76 (4/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.84 (6/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.27-5.43 (2H, m, ArCH₂OP), 6.24-6.44 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.13-7.16 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)) and CH_{Ar}(DMP)), 7.33 (1H, s, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.55 (1H, d, ³J = 6.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.83 (4/10 of 1H, bs, NH), 8.28 (6/10 of 1H, bs, NH).

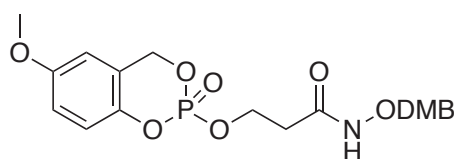
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.5 (CH₂CO), 34.5 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 64.0 (POCH₂), 64.7 (POCH₂), 68.3-68.5 (ArCH₂OP), 73.6 (OCH₂DMP), 75.0 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 104.5 (CH_{Ar}(DMP)), 114.9 (C_{Ar}(DMP)), 115.2 (C_{Ar}(DMP)), 119.6 (d, ³J_{C-P} = 9.5 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.4 (C_{Ar}CH₂OP), 123.2 (CH_{Ar}(cycloSal)), 127.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.9 (CH_{Ar}(DMP)), 133.1 (CH_{Ar}(DMP)), 152.7 (C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.0 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 166.5 (C_{Ar}OCH₃), 171.4 (CO), 173.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.4, -10.5.

¹⁹F-NMR (282.4 MHz, CDCl₃): -63.2, -63.3.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₂NO₈P [M+H]⁺ 492.1030, found 492.1011.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-((6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (217g)**



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **217g** from alcohol **211** (175 mg, 0.69 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 3:7 → EtOAc) to give **217g** as a colorless oil (49 mg, 18 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.46 (EtOAc).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.48-2.49 (6/10 of 2H, m, CH₂CO), 2.82-2.86 (4/10 of 2H, m, CH₂CO), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 4.40-4.47 (2H, m, POCH₂), 4.77 (4/10 of 2H, bs, OCH₂DMP), 4.85 (6/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.21-5.33 (2H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.55 (1H, d, ⁴J = 2.8 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.80 (1H, dd, ³J = 9.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 6.96 (1H, d, ³J = 8.9 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.15-7.20 (1H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.91 (4/10 of 1H, bs, NH), 8.40 (6/10 of 1H, bs, NH).

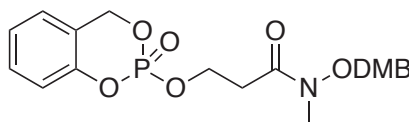
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.8 (CH₂CO), 34.7 (CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 63.6 (POCH₂), 64.4 (POCH₂), 68.8-69.0 (ArCH₂OP), 73.5 (OCH₂DMP), 75.0 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 110.2 (CH_{Ar}(cycloSal)), 115.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 116.0 (C_{Ar}(DMP)), 119.7 (d, ³J_{C-P} = 8.8 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.3-121.5 (C_{Ar}CH₂OP), 132.9-133.1 (CH_{Ar}(DMP)), 143.8-144.0

(C_{Ar}OP), 156.1 (C_{Ar}OCH₃), 156.3 (C_{Ar}OCH₃), 159.6 (C_{Ar}OCH₃), 162.0 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 166.8 (CO), 171.1 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.3, -9.5.

HRMS (EI): *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₉PNa [M+Na]⁺ 476.1081, found 476.1102.

N-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methyl-3-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (**218a**)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218a** from alcohol **212** (153 mg, 0.57 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **218a** as a colorless oil (148 mg, 76 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.25 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

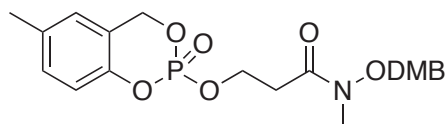
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.79-2.92 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.39-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.77 (2H, s, OCH₂DMP), 5.27-5.42 (2H, m, ArCH₂OP), 6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 7.02-7.06 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.11 (1H, t, ³*J* = 7.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.17 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.28 (1H, t, ³*J* = 7.6 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 32.9 (d, ³*J*_{C-P} = 7.0 Hz, CH₂CO), 33.3 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.4 (d, ²*J*_{C-P} = 5.3 Hz, POCH₂), 66.7 (d, ²*J*_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH₂OP), 71.3 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 115.0 (C_{Ar}(DMP)), 118.9 (d, ³*J*_{C-P} = 9.0 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.9 (d, ³*J*_{C-P} = 9.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.3 ((CH_{Ar}(cycloSal)), 129.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.8 (CH_{Ar}(DMP)), 150.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 171.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.5.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₄NO₈PNa [M+Na]⁺ 460.11, found 460.11.

N-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methyl-3-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (**218b**)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218b** from alcohol **212** (150 mg, 0.56 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 5:5 → EtOAc) to give **218b** as a colorless oil (190 mg, 75 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.47 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

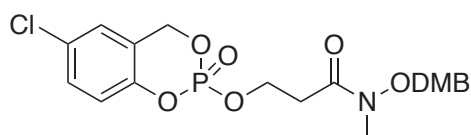
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.30 (3H, s, CH₃Ar), 2.79-2.92 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.37-4.50 (2H, m, POCH₂), 4.77 (2H, s, OCH₂DMP), 5.23-5.379 (2H, m, ArCH₂OP), 6.45-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.87 (1H, bs, CH_{Ar}(*cycloSal*)), 6.91 (1H, d, ³J = 8.5 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.07 (1H, d, ³J = 8.0 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.18 (1H, d, ³J = 8.9 Hz, CH_{Ar}(*cycloSal*)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.9 (CH₃Ar), 33.0 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CO), 33.3 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.4 (d, ²J_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂), 68.8 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, ArCH₂OP), 71.3 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.4 (CH_{Ar}(DMP)), 115.0 (C_{Ar}(DMP)), 118.6 (d, ³J_{C-P} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.5 (d, ³J_{C-P} = 9.6 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.7 (CH_{Ar}(*cycloSal*)), 130.3 (CH_{Ar}(*cycloSal*)), 133.0 (CH_{Ar}(DMP)), 134.0 (C_{Ar}CH₃), 148.3 (d, ²J_{C-P} = 6.4 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 171.2 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.3.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for C₂₁H₂₇NO₈P [M+H]⁺ 452.1469, found 452.1508.

3-((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methylpropanamide (218c)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218c** from alcohol **212** (195 mg, 0.72 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 9:1) to give **218c** as a colorless oil (292 mg, 86 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.51 (EtOAc/cyclohexane, 9:1).

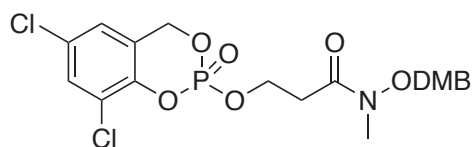
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.78-2.90 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 4.39-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.77 (2H, s, OCH₂DMP), 5.21-5.39 (2H, m, ArCH₂OP), 6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.97 (1H, d, ³J = 8.9 Hz, CH_{Ar}(*cyclo*Sal)), 7.05 (1H, t, ³J = 2.4 Hz, CH_{Ar}(*cyclo*Sal)), 7.17 (1H, d, ³J = 8.6 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.24 (1H, bs, CH_{Ar}(*cyclo*Sal)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): 32.9 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, CH₂CO), 33.3 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.4 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, POCH₂), 68.1 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH₂OP), 71.3 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMP)), 104.5 (CH_{Ar}(DMP)), 115.0 (C_{Ar}(DMP)), 118.9 (d, ³J_{C-P} = 9.0 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.3 (d, ³J_{C-P} = 9.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.4 (CH_{Ar}(*cycloSal*)), 129.5 (C_{Ar}Cl), 129.9 (CH_{Ar}(*cycloSal*)), 133.0 (CH_{Ar}(DMP)), 148.5 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, C_{Ar}OP), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 171.1 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.0.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₃ClNO₈PNa [M+Na]⁺ 494.0742, found 494.0626.

3-((6,8-Dichloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methylpropanamide (218d)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218d** from alcohol **212** (241 mg, 0.89 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **218d** as a colorless oil (175 mg, 43 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.40 (EtOAc/petroleum ether, 8:2).

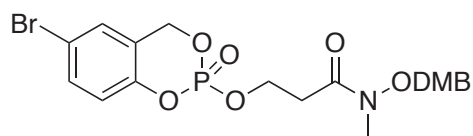
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.84-2.89 (2H, m, CH₂CO), 3.19 (3H, s, NCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.85 (3H, s, OCH₃), 4.41-4.62 (2H, m, POCH₂), 4.78 (2H, s, OCH₂DMP), 5.22-5.39 (2H, m, ArCH₂OP), 6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.97 (1H, d, ³*J* = 2.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.20 (1H, t, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.38 (1H, bs, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.7 (d, ³*J*_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CO), 33.1 (NCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 64.7 (d, ²*J*_{C-P} = 5.5 Hz, POCH₂), 67.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 71.2 (OCH₂DMP), 98.6 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 114.7 (C_{Ar}(DMP)), 123.4 (d, ³*J*_{C-P} = 9.5 Hz, ClC_{Ar}C_{Ar}OP), 123.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 124.7 (d, ³*J*_{C-P} = 8.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 129.3 (C_{Ar}Cl), 130.0 (CH_{Ar}(cycloSal)), 132.8 (CH_{Ar}(DMP)), 145.1 (d, ²*J*_{C-P} = 5.9 Hz, C_{Ar}OP), 159.5 (C_{Ar}OCH₃), 162.2 (C_{Ar}OCH₃), 171.2 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.5.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₀H₂₂Cl₂NO₈PNa [M+Na]⁺ 528.04, found 528.04.

3-((6-Bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methylpropanamide (218e)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218e** from alcohol **212** (150 mg, 0.56 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 5:5 → EtOAc) to give **218e** as a colorless oil (215 mg, 74 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.47 (EtOAc/cyclohexane, 7:3).

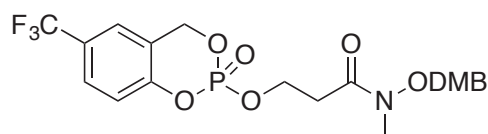
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.76-2.91 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.38-4.52 (2H, m, POCH₂), 4.77 (2H, s, OCH₂DMP), 5.24 (1H, dd, ²*J* = 14.2 Hz, ³*J*_{P-H} = 17.9 Hz, ArCH₂OP), 5.36 (1H, dd, ²*J* = 14.1 Hz, ³*J*_{P-H} = 8.7 Hz, ArCH₂OP), 6.45-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.91 (1H, d, ³*J* = 8.8 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.16-7.20 (2H, m, CH_{Ar}(DMP) and CH_{Ar}(cycloSal)), 7.38 (1H, d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 32.9 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, CH_2CO), 33.3 (NCH_3), 55.6 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 64.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.2$ Hz, POCH_2), 68.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.9$ Hz, ArCH_2OP), 71.3 (OCH_2DMP), 98.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 104.5 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 114.9 ($\text{C}_{\text{Ar(DMP)}}$), 116.8 (C_{ArBr}), 120.7 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.2$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArC}_{\text{Ar}}\text{OP}}$), 122.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.8$ Hz, $\text{C}_{\text{ArCH}_2\text{OP}}$), 128.3 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 132.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 133.0 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 149.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C_{ArOP}), 159.7 ($\text{C}_{\text{ArOCH}_3}$), 162.3 ($\text{C}_{\text{ArOCH}_3}$), 171.1 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): -10.3.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrNO}_8\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 538.0237, found 538.0255.

3-((6-((Difluoro- λ^3 -methyl)- λ^2 -fluoranyl)-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-methylpropanamide (218f)



The general procedure **I** was applied to synthesize the compound **218f** from alcohol **212** (150 mg, 0.56 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/cyclohexane , 5 : 5 $\rightarrow$ EtOAc) to give **218f** as a colorless oil 149 mg, 53 %) and as the sole *E* conformer.

$R_f = 0.44$ (EtOAc/cyclohexane , 7:3).

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 2.78-2.91 (2H, m, CH_2CO), 3.18 (3H, s, NCH_3), 3.82 (3H, s, OCH_3), 3.84 (3H, s, OCH_3), 4.41-4.54 (2H, m, POCH_2), 4.77 (2H, s, OCH_2DMP), 5.33 (1H, dd, $^2J = 14.4$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 18.5$ Hz, ArCH_2OP), 5.45 (1H, dd, $^2J = 14.3$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 8.4$ Hz, ArCH_2OP), 6.45-6.47 (2H, m, $\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 7.14 (1H, d, $^3J = 8.7$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 7.17 (1H, d, $^3J = 8.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 7.35 (1H, s, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 7.57 (1H, d, $^3J = 8.4$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$).

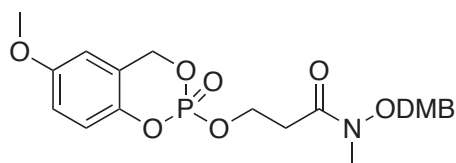
^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 32.9 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, CH_2CO), 33.3 (NCH_3), 55.6 (OCH_3), 55.7 (OCH_3), 64.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, POCH_2), 68.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, ArCH_2OP), 71.3 (OCH_2DMP), 98.8 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 104.7 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 114.9 ($\text{C}_{\text{Ar(DMP)}}$), 119.6 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.3$ Hz, $\text{CH}_{\text{ArC}_{\text{Ar}}\text{OP}}$), 121.5 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 9.7$ Hz, $\text{C}_{\text{ArCH}_2\text{OP}}$), 123.1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 123.7 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271.1$ Hz, C_{ArCF_3}), 126.8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33$ Hz, C_{ArCF_3}), 127.2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar(cycloSal)}}$), 133.0 ($\text{CH}_{\text{Ar(DMP)}}$), 152.9 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.4$ Hz, C_{ArOP}), 159.7 ($\text{C}_{\text{ArOCH}_3}$), 162.4 ($\text{C}_{\text{ArOCH}_3}$), 171.1 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CDCl_3): -10.3.

^{19}F -NMR (282.4 MHz, CDCl_3): -63.2.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_8\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 528.1006, found 528.1005.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-3-((6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-methylpropanamide (218g)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **218g** from alcohol **212** (150 mg, 0.56 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc) to give **218g** as a colorless oil (160 mg, 61 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.5 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

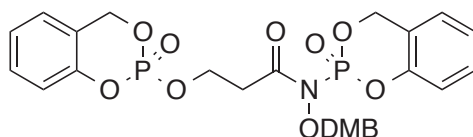
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.79-2.92 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (8/10 of 3H, s, NCH₃), 3.23 (2/10 of 3H, s, NCH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.37-4.50 (2H, m, POCH₂), 4.77 (8/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 4.80 (2/10 of 2H, s, OCH₂DMP), 5.23-5.37 (2H, m, ArCH₂OP), 6.45-6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.55 (1H, d, ⁴*J* = 2.8 Hz CH_{Ar}(cycloSal)), 6.80 (1H, dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 1.9 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.95 (1H, d, ³*J* = 8.9 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.18 (1H, d, ³*J* = 8.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.8 (d, ³*J*_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CO), 33.1 (NCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 64.4 (d, ²*J*_{C-P} = 5.4 Hz, POCH₂), 68.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, ArCH₂OP), 71.1 (OCH₂DMP), 98.6 (CH_{Ar}(DMP)), 104.3 (CH_{Ar}(DMP)), 110.1 (CH_{Ar}(cycloSal)), 114.8 (C_{Ar}(DMP)), 114.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 119.6 (d, ³*J*_{C-P} = 9.2 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.4 (d, ³*J*_{C-P} = 9.6 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 132.8 (CH_{Ar}(DMP)), 143.9 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, C_{Ar}OP), 155.9 (C_{Ar}OCH₃), 159.5 (C_{Ar}OCH₃), 162.1 (C_{Ar}OCH₃), 171.1 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.3.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₁H₂₆NO₉PNa [M+Na]⁺ 490.1237, found 490.1277.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (219a)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217a** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol) a byproduct **219a** was obtained. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc) to give **219a** as a colorless oil (90 mg, 20 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.38 (EtOAc/cyclohexane, 5:5).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.88 (2H, t, ³*J* = 6.3 Hz, CH₂CO), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 4.37-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.90-4.97 (2H, m, OCH₂DMP), 5.11-5.27 (2H, m, ArCH₂OP),

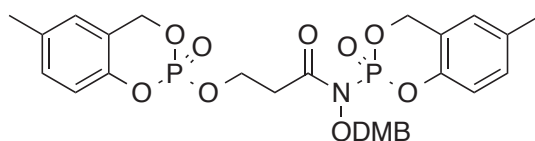
5.33-5.38 (1H, m, ArCH₂OP), 5.44-5.50 (1H, m, ArCH₂OP) 6.42-6.44 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.88 (5/10 of 1H, d, ³J = 8.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.90 (5/10 of 1H, d, ³J = 8.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.96 (1H, d, ³J = 7.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.03 (2H, t, ³J = 7.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.10 (2H, t, ³J = 7.5 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.17 (1H, dd, ³J = 8.9 Hz, ⁴J_{P-H} = 2.0 Hz, CH_{Ar}(DMP)), 7.28 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.9 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.7 (POCH₂), 68.9 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 69.3 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 69.4 (d, ²J_{C-P} = 7.3 Hz, ArCH₂OP), 71.8 (OCH₂DMP), 98.5 (CH_{Ar}(DMP)), 104.1 (CH_{Ar}(DMP)), 117.6 (C_{Ar}(DMP)), 118.9 (d, ³J_{C-P} = 8.5 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 119.0 (d, ³J_{C-P} = 8.8 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.5 (d, ³J_{C-P} = 10.2 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 120.8 (d, ³J_{C-P} = 9.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 124.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.9 (CH_{Ar}(cycloSal)), 131.6 (CH_{Ar}(DMP)), 143.0 (d, ²J_{C-P} = 9.5 Hz, C_{Ar}OP), 143.1 (d, ²J_{C-P} = 9.7 Hz, C_{Ar}OP), 150.1 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}OP), 150.3 (d, ²J_{C-P} = 7.6 Hz, C_{Ar}OP), 159.0 (C_{Ar}OCH₃), 161.3 (C_{Ar}OCH₃), 171.4 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.6, -9.7, -18.7

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₆H₂₇NO₁₁P₂Na [M+Na]⁺ 614.0952, found 614.0951.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (219b)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217b** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol) a byproduct **219b** was obtained. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc) to give **219b** as a colorless oil 92 mg, 38 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.72 (EtOAc/ petroleum ether, 7:3).

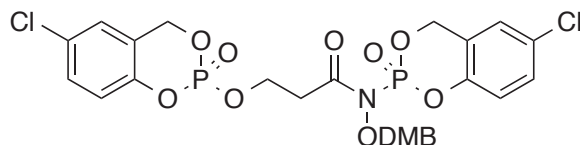
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.27 (6H, s, CH₃Ar), 2.83 (2H, t, ³J = 6.2 Hz, CH₂CO), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃), 4.33-4.46 (2H, m, POCH₂), 4.88-4.94 (2H, m, OCH₂DMP), 5.05-5.21 (2H, m, ArCH₂OP), 5.29 (1H, d, ²J = 13.9 Hz, ³J_{C-P} = 8.1 Hz, ArCH₂OP), 5.38-5.44 (1H, m, ArCH₂OP) 6.40-6.42 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.72-6.79 (3H, m, CH_{Ar}), 6.88 (5/10 of 1H, d, ³J = 6.0 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.90 (5/10 of 1H, d, ³J = 6.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.00-7.05 (2H, m, CH_{Ar}), 7.14 (5/10 of 1H, d, ³J = 7.9 Hz, CH_{Ar}), 7.15 (5/10 of 1H, d, ³J = 7.9 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.8 (CH₃Ar), 20.9 (CH₃Ar), 32.9 (d, ³J_{C-P} = 6.7 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.6 (POCH₂), 68.9 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 69.4 (d, ²J_{C-P} = 7.3 Hz, ArCH₂OP), 69.5 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 71.8 (OCH₂DMP), 98.5 (CH_{Ar}(DMP)), 104.1 (CH_{Ar}(DMP)), 117.6 (C_{Ar}(DMP)), 118.6 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.0 (d, ³J_{C-P} = 10.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 120.4 (d, ³J_{C-P} = 10.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.5 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 130.4 (CH_{Ar}(cycloSal)), 131.5 (CH_{Ar}(DMP)), 134.0 (C_{Ar}CH₃), 134.4 (C_{Ar}CH₃), 143.1 (d, ²J_{C-P} = 9.2 Hz, C_{Ar}OP), 143.2 (d, ²J_{C-P} = 9.7 Hz, C_{Ar}OP), 147.9 (d, ²J_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}OP), 148.2 (d, ²J_{C-P} = 5.7 Hz, C_{Ar}OP), 158.9 (C_{Ar}OCH₃), 161.2 (C_{Ar}OCH₃), 171.4 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.4, -9.5, -18.5.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₈H₃₁NO₁₁P₂Na [M+Na]⁺ 642.1265, found 642.1335.

***N*-(6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((6-chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)propanamide (219c)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217c** from alcohol **211** (212 mg, 0.78 mmol) a byproduct **219c** was obtained. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc) to give **219c** as a colorless oil (24 mg, 84 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.83 (EtOAc).

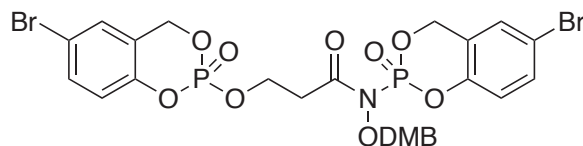
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.88 (2H, t, ³*J* = 6.3 Hz, CH₂CO), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.35-4.54 (2H, m, POCH₂), 4.87-4.97 (2H, m, OCH₂DMP), 5.03-5.23 (2H, m, ArCH₂OP), 5.27-5.34 (1H, m, ArCH₂OP), 5.38-5.46 (1H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.79 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 6.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.82 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 6.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.92-7.02 (3H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.14 (1H, dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.19-7.22 (2H, m, CH_{Ar})

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.7 (d, ³*J*_{C-P} = 7.0 Hz, CH₂CO), 55.4 (OCH₃), 55.5 (OCH₃), 63.7 (d, ²*J*_{C-P} = 4.1 Hz, POCH₂), 63.7 (d, ²*J*_{C-P} = 4.6 Hz, POCH₂), 68.0 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 68.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 68.6 (d, ²*J*_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 68.7 (d, ²*J*_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 71.8 (OCH₂DMP), 98.4 (CH_{Ar}(DMP)), 103.9 (CH_{Ar}(DMP)), 117.0 (C_{Ar}(DMP)), 120.1 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.2 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.7 (d, ³*J*_{C-P} = 9.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 122.1 (d, ³*J*_{C-P} = 9.0 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.0 (CH_{Ar}(cycloSal)), 125.2 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.4 (C_{Ar}Cl), 129.5 (C_{Ar}Cl), 129.7 (CH_{Ar}(cycloSal)), 129.8 (CH_{Ar}(cycloSal)), 131.5 (CH_{Ar}(DMP)), 131.6 (CH_{Ar}(DMP)), 142.6 (d, ²*J*_{C-P} = 9.5 Hz, C_{Ar}OP), 142.7 (d, ²*J*_{C-P} = 10.1 Hz, C_{Ar}OP), 148.3 (d, ²*J*_{C-P} = 7.8 Hz, C_{Ar}OP), 148.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.0 Hz, C_{Ar}OP), 158.9 (C_{Ar}OCH₃), 161.3 (C_{Ar}OCH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.1, -10.2, -19.4, -19.5.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₆H₂₅Cl₂NO₁₁P₂Na [M+Na]⁺ 682.0172, found 682.0168.

***N*-(6-Bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((6-bromo-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)propanamide (**219e**)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217e** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol) a byproduct **219e** was obtained. The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc/petroleum ether, 7:3) to give **219e** as a colorless oil (432 mg, 74 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.34 (EtOAc/ petroleum ether, 5:5).

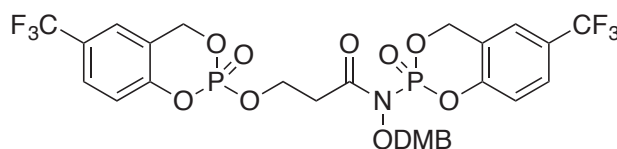
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.87 (2H, t, ³*J* = 6.1 Hz, CH₂CO), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.83 (3H, s, OCH₃), 4.37-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.88-4.96 (2H, m, OCH₂DMP), 5.04-5.22 (2H, m, ArCH₂OP), 5.28-5.33 (1H, m, ArCH₂OP), 5.38-5.45 (1H, m, ArCH₂OP), 6.43-6.46 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.73 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.75 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 8.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.90 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 8.1 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 6.92 (5/10 of 1H, d, ³*J* = 8.3 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)) 7.08-7.18 (3H, m, CH_{Ar}(cycloSal) and CH_{Ar}(DMP)), 7.34-7.41 (2H, m, CH_{Ar})

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.8 (d, ³*J*_{C-P} = 6.4 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 63.8 (d, ²*J*_{C-P} = 4.7 Hz, POCH₂), 63.9 (d, ²*J*_{C-P} = 4.2 Hz, POCH₂), 68.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, ArCH₂OP), 68.2 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, ArCH₂OP), 68.7 (d, ²*J*_{C-P} = 7.3 Hz, ArCH₂OP), 68.8 (d, ²*J*_{C-P} = 7.6 Hz, ArCH₂OP), 71.9 (OCH₂DMP), 98.6 (CH_{Ar}(DMP)), 104.1 (CH_{Ar}(DMP)), 116.9 (C_{Ar}(DMP)), 117.0 (C_{Ar}(DMP)), 117.2 (C_{Ar}Br), 117.3 (C_{Ar}Br), 120.6 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.7 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.3 (d, ³*J*_{C-P} = 9.2 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 122.7 (d, ³*J*_{C-P} = 9.9 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 128.1 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 131.7 (CH_{Ar}), 131.8 (CH_{Ar}), 132.8 (CH_{Ar}), 142.8 (d, ²*J*_{C-P} = 9.7 Hz, C_{Ar}OP), 142.9 (d, ²*J*_{C-P} = 9.7 Hz, C_{Ar}OP), 149.1 (d, ²*J*_{C-P} = 7.2 Hz, C_{Ar}OP), 149.4 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, C_{Ar}OP), 149.5 (d, ²*J*_{C-P} = 6.7 Hz, C_{Ar}OP), 159.1 (C_{Ar}OCH₃), 161.4 (C_{Ar}OCH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.4, -10.5, -19.7, -19.8.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₆H₂₆Br₂NO₁₁P₂ [M+H]⁺ 749.9324, found 749.9361.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (**219f**)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217f** from alcohol **211** (152 mg, 0.60 mmol) a byproduct **219f** was obtained. The crude product was purified by automated flash

chromatography (EtOAc/petroleum ether, 5:5 → EtOAc/petroleum ether, 7:3) to give **219e** as a colorless oil (59 mg, 15 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.90 (EtOAc/ petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.90 (2H, t, ³J = 6.2 Hz, CH₂CO), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.82 (3H, s, OCH₃), 4.20-4.55 (2H, m, POCH₂), 4.88-4.95 (2H, m, OCH₂DMP), 5.13-5.31 (2H, m, ArCH₂OP), 5.39 (1H, d, ²J = 14.5 Hz, ³J = 7.7 Hz, ArCH₂OP), 5.47-5.54 (1H, m, ArCH₂OP), 6.41-6.50 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.93-6.97 (1H, m, CH_{Ar}), 7.13-7.16 (1H, m, CH_{Ar}), 7.23 (1H, s, CH_{Ar}), 7.28-7.35 (2H, m, CH_{Ar}), 7.45-7.58 (2H, m, CH_{Ar}).

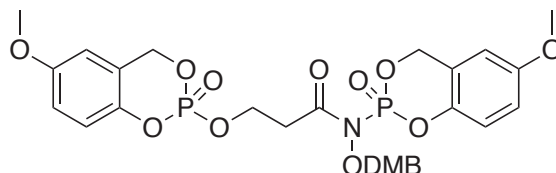
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.9 (d, ³J_{C-P} = 8.0 Hz, CH₂CO), 55.5 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.1 (d, ²J_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂), 68.4 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 69.0 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, ArCH₂OP), 72.0 (OCH₂DMP), 98.6 (CH_{Ar}(DMP)), 104.1 (CH_{Ar}(DMP)), 117.1 (C_{Ar}(DMP)), 119.6 (d, ³J_{C-P} = 3.7 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 119.7 (d, ³J_{C-P} = 3.9 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.0 (d, ³J_{C-P} = 10.4 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 121.4 (d, ³J_{C-P} = 10.4 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 122.8 (CH_{Ar}), 123.1 (CH_{Ar}), 127. (CH_{Ar}), 131.9 (CH_{Ar}(DMP)), 159.1(C_{Ar}OCH₃), 161.5 (C_{Ar}OCH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -10.4, -10.5, -19.7, -19.8.

¹⁹F-NMR (282.4 MHz, CDCl₃): -63.15, -63.16, -63.20, -63.21.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₈H₂₅F₆NO₁₁P₂Na [M+Na]⁺ 750.0699, found 750.0650.

***N*-((2,4-Dimethoxybenzyl)oxy)-*N*-(6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)-3-((6-methoxy-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (219g)**



When general procedure **I** was applied to synthesize compound **217g** from alcohol **211** (175 mg, 0.69 mmol) a byproduct **219g** was obtained. The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petrouleum ether, 3:7 → EtOAc) to give **219e** as a colorless oil (45 mg, 12 %) and as a mixture of two diastereoisomers.

R_f = 0.60 (EtOAc/ petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 2.86 (2H, t, ³J = 6.3 Hz, CH₂CO), 3.75 (6H, s, OCH₃), 3.78 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 4.32-4.49 (2H, m, POCH₂), 4.89-4.98 (2H, m, OCH₂DMP), 5.05-5.20 (2H, m, ArCH₂OP), 5.24-3.34 (1H, m, ArCH₂OP), 5.38-5.46 (1H, m, ArCH₂OP), 6.41-6.45 (3H, m, CH_{Ar}(DMP) and CH_{Ar}), 6.52 (5/10 of 1H, s, CH_{Ar}), 6.53 (5/10 of 1H, s, CH_{Ar}), 6.74-6.84 (3H, m, CH_{Ar}), 6.93-6.98 (1H, m, CH_{Ar}), 7.16 (1H, dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, CH_{Ar}).

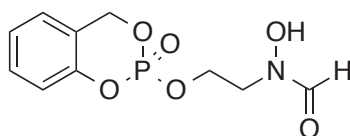
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.9 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, CH₂CO), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.9 (OCH₃), 63.6 (POCH₂), 63.7 (POCH₂), 68.8 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 69.4 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz,

ArCH₂OP), 69.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.8 Hz, ArCH₂OP), 71.8 (OCH₂DMP), 98.5 (CH_{Ar}(DMP)), 104.1 (CH_{Ar}(DMP)), 110.1 (CH_{Ar}), 110.2 (CH_{Ar}), 115.0 (CH_{Ar}), 115.1 (CH_{Ar}), 117.6 (C_{Ar}(DMP)), 119.7 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 119.8 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.1 (d, $^3J_{C-P}$ = 9.4 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 121.4 (d, $^3J_{C-P}$ = 9.4 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 131.5 (CH_{Ar}(DMP)), 143.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 9.6 Hz, C_{Ar}OP), 143.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 9.6 Hz, C_{Ar}OP), 143.7 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.3 Hz, C_{Ar}OP), 144.0 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.7 Hz, C_{Ar}OP), 156.1 (C_{Ar}OCH₃), 156.3 (C_{Ar}OCH₃), 158.9 (C_{Ar}OCH₃), 161.2 (C_{Ar}OCH₃), 171.4 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CDCl₃): -9.4, -9.5, -18.5.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for C₂₈H₃₁NO₁₃P₂Na [M+Na]⁺ 674.1163, found 674.1134.

***N*-Hydroxy-*N*-(2-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)formamide (199a)**



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **199a** from *cycloSal* **215a** (93 mg, 0.22 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **199a** was obtained without purification as an orange oil (48 mg, 80 %) and as a mixture of the three *Z*, *E* and another conformers in a 20:20:60 ratio respectively.

R_f = 0.33 (EtOAc).

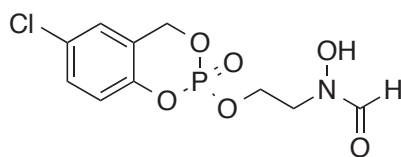
^1H -NMR (500 MHz, CD₃OD): 3.57-3.61 (2/10 of 2H, m, NCH₂), 3.76-3.80 (6/10 of 2H, m, NCH₂), 3.85-3.89 (2/10 of 2H, m, NCH₂), 4.35-4.42 (8/10 of 2H, m, POCH₂), 4.48-4.59 (2/10H of 2H, bs, POCH₂), 5.39-5.56 (2H, m, ArCH₂OP), 7.11 (1H, m, CH_{Ar}(*cycloSal*)), 7.22 (2H, m, CH_{Ar}(*cycloSal*)), 7.38 (1H, m, CH_{Ar}(*cycloSal*)), 7.86 (6/10 of 1H, bs, CHO), 7.91 (2/10 of 1H, bs, CHO), 8.19 (2/10 of 1H, bs, CHO).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CD₃OD): 47.8 (d, $^3J_{CP}$ = 6.9 Hz, NCH₂), 51.6 (d, $^3J_{CP}$ = 7.2 Hz, NCH₂), 52.0 (d, $^3J_{CP}$ = 8.1 Hz, NCH₂), 62.4 (d, $^2J_{CP}$ = 4.8 Hz, POCH₂), 64.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.6 Hz, POCH₂), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 5.6 Hz, POCH₂), 70.3 (ArCH₂OP), 70.4 (ArCH₂OP), 70.5 (ArCH₂OP), 119.6 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 119.7 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 119.8 (CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.3 (C_{Ar}CH₂OP), 122.4 (C_{Ar}CH₂OP), 122.5 (C_{Ar}CH₂OP), 125.9 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 131.2 (CH_{Ar}), 131.4 (CH_{Ar}), 151.3 (d, $^2J_{CP}$ = 6.8 Hz, C_{Ar}OP), 166.3 (CHO), 164.9 (CHO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CD₃OD): -10.4 ; -10.5 ; -10.6.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for C₁₀H₁₂NO₆PNa [M+Na]⁺ 296.0294, found 296.0304.

***N*-(2-((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-hydroxyformamide (199c)**



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **199c** from *cycloSal* **215c** (77 mg, 0.17 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **199c** was obtained without purification as an orange oil (38 mg, 73 %) and as a mixture of the three *Z*, *E* and another conformers in a 30:40:30 ratio respectively.

R_f = 0.33 (EtOAc).

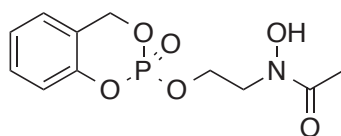
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.58 (3/10 of 2H, bs, NCH₂), 3.81 (3/10 of 2H, bs, NCH₂), 3.91 (4/10 of 2H, m, NCH₂), 4.41-4.50 (8/10 of 2H, m, POCH₂), 4.58-4.63 (2/10 of 2H, m, POCH₂), 5.30-5.42 (2H, m, ArCH₂OP), 7.03 (1H, m, CH_{Ar}), 7.10 (1H, d, ⁴*J* = 2.2 Hz, CH_{Ar}), 7.31 (1H, d, ³*J* = 8.6 Hz, CH_{Ar}), 7.93 (3/10 of 1H, bs, CHO), 8.07 (1/10 of 1H, bs, CHO), 8.54 (4/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz CDCl₃): 46.4 (NCH₂), 63.2 (d, ²*J* = 6.0 Hz, POCH₂), 64.2 (d, ²*J* = 6.6 Hz, POCH₂), 68.6 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 68.7 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 69.0 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 120.5 (d, ³*J*_{CP} = 9.2 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.0 (d, ³*J*_{CP} = 10.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.4 (d, ⁴*J* = 14.2 Hz CH_{Ar(cycloSal)}), 130.4 (CH_{Ar(cycloSal)}), 148.5 (C_{Ar}OP), 164.8 (CHO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -6.71, -9.07, -9.63.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₀H₁₂ClNO₆PNa [M+Na]⁺ 308.0043, found 308.0085.

***N*-Hydroxy-*N*-(2-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)acetamide (200a)**



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **200a** from *cycloSal* **216a** (73 mg, 0.17 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **200a** was obtained without purification as an orange oil (41 mg, 84 %).

R_f = 0.35 (EtOAc).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.99 (3H, s, CH₃CO), 3.83-3.94 (2H, m, CH₂N), 4.35-4.40 (2H, m, POCH₂), 5.39-5.51 (2H, m, ArCH₂OP), 7.10 (1H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.22 (2H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.37 (1H, t, ³*J* = 7.6 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}).

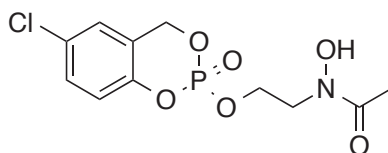
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.3 (CH₃CO), 48.9 (d, ³*J* = 6.9 Hz, NCH₂), 65.6 (d, ²*J* = 6.9 Hz, POCH₂), 70.4 (d, ²*J*_{CP} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 119.7 (d, ³*J*_{CP} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.4 (d, ³*J*_{CP} = 9.9

Hz, $C_{Ar}CH_2OP$), 124.2 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 151.3 (d, $^2J_{CP}$ = 6.8 Hz, $C_{Ar}OP$), 172.3 (CO), 174.7 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$): -8.9, -10.5.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $C_{11}H_{14}NO_6PNa$ $[M+Na]^+$ 310.0451, found 310.0441.

N-(2-(((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)ethyl)-*N*-hydroxyacetamide (200c)



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **200c** from *cycloSal* **216c** (71 mg, 0.15 mmol) 2 % TFA in DCM. The product **200c** was obtained without purification as an orange oil (33 mg, 68 %).

R_f = 0.43 (EtOAc).

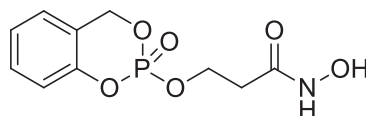
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 2.12-2.28 (3H, s, CH_3CO), 3.58 (3/10 of 2H, bs, NCH_2), 3.93-4.01 (2H, m, NCH_2), 4.41-4.48 (2H, m, $POCH_2$), 5.30-5.34 (2H, m, $ArCH_2OP$), 7.03 (1H, d, 3J = 8.7 Hz CH_{Ar}), 7.10 (1H, d, 4J = 2.2 Hz, CH_{Ar}), 7.31 (1H, d, 3J = 8.1 Hz, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, $CDCl_3$): 20.6 (CH_3CO), 20.7 (CH_3CO), 47.2 (NCH_2), 65.2 (d, 2J = 6.9 Hz, $POCH_2$), 68.7 (d, $^2J_{CP}$ = 6.9 Hz, $ArCH_2OP$), 120.2 (d, $^3J_{CP}$ = 8.0 Hz, $CH_{Ar}C_{Ar}OP$), 120.5 (d, $^3J_{CP}$ = 8.2 Hz, $CH_{Ar}C_{Ar}OP$), 122.7 ($C_{Ar}CH_2OP$), 125.4 ($CH_{Ar(cycloSal)}$), 125.5 ($CH_{Ar(cycloSal)}$), 128.7 ($C_{Ar}Cl$), 129.5 ($CH_{Ar(cycloSal)}$), 130.4 ($CH_{Ar(cycloSal)}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$): -6.71.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $C_{11}H_{14}ClNO_6PNa$ $[M+Na]^+$ 322.0242, found 322.0202.

N-Hydroxy-3-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (201a)



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **201a** from *cycloSal* **217a** (80 mg, 0.19 mmol) and 3 % TFA in DCM. The crude product was purified by purification by preparative TLC (MeOH/EtOAc, 5:95 v/v) to give **201a** as a colorless oil (31 mg, 60 %) and as a sole *Z* conformer.

R_f = 0.39 (EtOAc/methanol, 95:5).

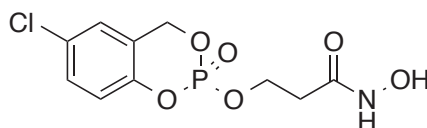
1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): 2.49 (2H, m, CH_2CO), 4.37-4.51 (2H, m, $POCH_2$), 5.38-5.48 ($ArCH_2OP$), 7.10 (1H, pseudo-d, 3J = 7.9 Hz, $CH_{Ar(cycloSal)}$), 7.17-7.23 (2H, m, $CH_{Ar(cycloSal)}$), 7.37 (1H, pseudo-t, 3J = 7.6 Hz, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CD₃OD): 34.8 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, CH₂CO), 65.9 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, POCH₂), 70.2 (d, ²J_{C-P} = 6.9 Hz, ArCH₂OP), 119.5 (d, ³J_{C-P} = 9.0 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.4 (d, ³J_{C-P} = 9.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.9 (CH_{Ar(cycloSal)}), 127.1 (CH_{Ar(cycloSal)}), 131.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 151.3 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, C_{Ar}OP), 169.0 (CO).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD): -9.3.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₀H₁₂NO₆PNa [M+Na]⁺ 296.0294, found 296.0266.

3-((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-hydroxypropanamide (201c)



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **201c** from *cycloSal* **217c** (93 mg, 0.20 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **201c** was obtained without purification as a colorless oil (50 mg, 81 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 60:40 ratio.

R_f = 0.18 (EtOAc).

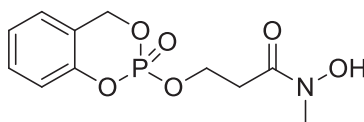
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.61 (6/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.93 (4/10 of 2H, bs, CH₂CO), 4.42-4.47 (2H, m, POCH₂), 5.24-5.35 (2H, m, ArCH₂OP), 6.97 (1H, pseudo-d, ³J = 8.4 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.05 (1H, pseudo-s, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.24 (1H, pseudo-s, CH_{Ar(cycloSal)}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 29.9 (CH₂CO), 64.9 (POCH₂), 68.5 (d, ²J_{C-P} = 6.5 Hz, ArCH₂OP), 123.5 (d, ³J_{C-P} = 9.4 Hz, ClC_{Ar}C_{Ar}OP), 124.1 (CH_{Ar(cycloSal)}), 124.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 124.5 (C_{Ar}CH₂OP), 125.6 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.0 (C_{Ar}Cl), 130.3 (CH_{Ar(cycloSal)}), 148.5 (d, ²J_{C-P} = 5.2 Hz, C_{Ar}OP).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.3.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₁H₁₂ClNO₆P [M+H]⁺ 308.0085, found 308.0110.

***N*-Hydroxy-*N*-methyl-3-((2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (202a)**



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **202a** from *cycloSal* **218a** (20 mg, 0.05 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **202a** was obtained without purification as a colorless oil (11 mg, 80 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 30:70 ratio.

R_f = 0.30 (EtOAc).

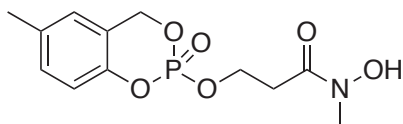
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2.76 (30/100H of 2H, bs, CH₂CO), 2.87-3.06 (70/100H of 2H, m, CH₂CO), 3.24 (70/100H of 3H, s, NCH₃), 3.33 (30/100H of 3H, s, NCH₃), 4.43-4.53 (2H, m, POCH₂), 5.30-5.44 (2H, m, ArCH₂OP), 6.84 (1H, bs, OH), 7.05-7.09 (2H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.15 (1H, t, ³J = 7.6 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.32 (1H, t, ³J = 7.8 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.3 (CH₂CO), 33.3 (CH₂CO), 36.3 (NCH₃), 64.4 (POCH₂), 65.3 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, POCH₂), 69.0 (d, ²J_{C-P} = 6.8 Hz, ArCH₂OP), 118.9 (d, ³J_{C-P} = 9.1 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.6 (d, ³J_{C-P} = 10.1 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 124.8 (CH_{Ar(cycloSal)}), 125.6 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 150.0 (d, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C_{Ar}OP), 170.4 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.7.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₁H₁₄NO₆PNa [M+Na]⁺ 310.043, found 310.043.

***N*-Hydroxy-*N*-methyl-3-((6-methyl-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (202b)**



The general procedure **L** was applied to synthesize the compound **202b** from *cycloSal* **218b** (20 mg, 44 μmol) in 2 % TFA in DCM. The product **202b** was obtained without purification as a colorless oil (11 mg, 83 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 30:70 ratio respectively.

R_f = 0.24 (EtOAc).

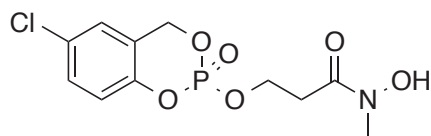
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.31 (3H, s, CH₃), 2.77-3.07 (3H, m, CH₂CO and OH), 3.26 (7/10 of 3H, s, NCH₃), 3.34 (3/10 of 3H, s, NCH₃), 4.47 (2H, bs, POCH₂), 5.27-5.39 (2H, m, ArCH₂OP), 6.86 (1H, s, CH_{Ar(cycloSal)}), 6.93-6.96 (1H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.10 (1H, d, ³J = 8.3 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.9 (CH₃), 33.3 (CH₂CO), 36.2 (NCH₃), 65.6 (d, ²J_{C-P} = 6.4 Hz, POCH₂), 69.3 (d, ²J_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 118.6 (d, ³J_{C-P} = 8.9 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 120.1 (d, ³J_{C-P} = 9.7 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.8 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.6 (CH_{Ar(cycloSal)}), 134.6 (C_{Ar}CH₃), 147.8 (d, ²J_{C-P} = 7.1 Hz, C_{Ar}OP).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -9.2.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₂H₁₆NO₆P [M+H]⁺ 302.0788, found 302.077.

3-((6-Chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-hydroxy-*N*-methylpropanamide (202c)



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **202c** from *cycloSal* **218c** (87 mg, 0.18 mmol) and 2 % TFA in DCM. The product **202c** was obtained without purification as a colorless oil (25 mg, 44 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 30:70 ratio.

R_f = 0.31 (EtOAc).

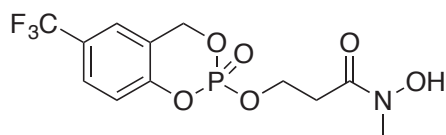
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.80 (3/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.94-3.09 (7/10 of 2H, bs, CH₂CO), 3.29 (7/10 of 3H, bs, NCH₃), 3.37 (3/10 of 3H, bs, NCH₃), 4.51 (2H, bs, POCH₂), 5.28-5.41 (2H, m, ArCH₂OP), 7.02 (1H, pseudo-d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.09 (1H, pseudo-d, ³*J* = 2.3 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.30 (1H, pseudo-d, ³*J* = 8.7 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 29.9 (CH₂CO), 32.3 (CH₂CO), 36.2 (NCH₃), 36.4 (NCH₃), 64.5 (POCH₂), 65.6 (d, ²*J*_{C-P} = 5.3 Hz, POCH₂), 68.4 (ArCH₂OP), 68.6 (d, ²*J*_{C-P} = 6.1 Hz, ArCH₂OP), 120.3 (d, ³*J*_{C-P} = 8.8 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.9 (C_{Ar}CH₂OP), 125.5 (CH_{Ar(cycloSal)}), 130.3 (CH_{Ar(cycloSal)}), 148.5 (C_{Ar}OP).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): -10.2.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₁H₁₃ClNO₆PNa [M+Na]⁺ 344.0061, found 344.0030.

***N*-Hydroxy-*N*-methyl-3-((2-oxido-6-(trifluoromethyl)-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)propanamide (202f)**



The general procedure **L** was applied to synthesize compound **202f** from *cycloSal* **218f** (20 mg, 40 μmol) and 2 % TFA in DCM. The product **202f** was obtained without purification as a colorless oil (11 mg, 80 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 40:60 ratio.

R_f = 0.57 (EtOAc).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.77-3.06 (3H, m, CH₂CO and OH), 3.26 (6/10 of 3H, s, NCH₃), 3.36 (4/10 of 3H, s, NCH₃), 4.63 (2H, m, POCH₂), 5.35-5.49 (2H, m, ArCH₂OP), 7.16-7.20 (1H, m, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.38 (1H, s, CH_{Ar(cycloSal)}), 7.61 (1H, d, ³*J* = 8.5 Hz, CH_{Ar(cycloSal)}).

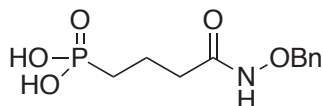
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 31.9 (CH₂CO), 33.3 (CH₂CO), 36.0 (NCH₃), 36.3 (NCH₃), 64.5 (POCH₂), 65.8 (d, ²*J*_{C-P} = 6.2 Hz, POCH₂), 68.7 (d, ²*J*_{C-P} = 7.0 Hz, ArCH₂OP), 119.7 (d, ³*J*_{C-P} = 9.2 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 121.2 (d, ³*J*_{C-P} = 9.8 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 123.2 (CH_{Ar(cycloSal)}), 127.5 (CH_{Ar(cycloSal)}), 152.4 (d, ²*J*_{C-P} = 7.3 Hz, C_{Ar}OP), 170.3 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): -10.3.

^{19}F -NMR (282.4 MHz, CDCl_3): -63.3.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 378.0325, found 378.0331.

(4-((Benzyloxy)amino)-4-oxobutyl)phosphonic acid (221a)



The general procedure **M** was applied to synthesize compound **221a** from diethylphosphonate **170a** (34 mg, 103 μmol). The product **221a** was obtained without purification as a yellow oil (24 mg, 87 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 50:50 ratio.

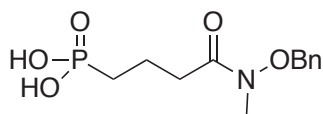
^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): 1.67-1.78 (2H, m, PCH_2CH_2), 1.86-1.93 (2H, m, PCH_2CH_2), 2.17 (5/10 of 2H, t, $^3J = 7.4$ Hz, CH_2CO), 2.46 (5/10 of 2H, t, $^3J = 7.3$ Hz, CH_2CO), 4.84 (5/10 of 2H, bs, OCH_2Ph), 5.03 (5/10 of 2H, bs, OCH_2Ph), 7.32-7.44 (5H, m, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): 19.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 4.2$ Hz, PCH_2CH_2), 20.4 (PCH_2CH_2), 27.4 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 140.5$ Hz, PCH_2CH_2), 27.5 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 138.6$ Hz, PCH_2CH_2), 34.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 16.3$ Hz CH_2CO), 35.2 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 16.3$ Hz CH_2CO), 78.3 (OCH_2Ph), 79.2 (OCH_2Ph), 129.7 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 172.1 (CO), 175.2 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CD_3OD): 27.6, 27.8.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 274.0839, found 274.0843.

(4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutyl)phosphonic acid (221b)



The general procedure **M** was applied to synthesize compound **221b** from diethylphosphonate **170b** (37 mg, 108 μmol). The product **221b** was obtained without purification as a yellow oil (29 mg, 93 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 70:30 ratio.

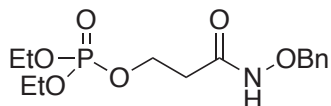
^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): 1.67-1.89 (4H, m, PCH_2CH_2), 2.46 (7/10 of 2H, d, $^3J = 6.9$ Hz, CH_2CO), 2.54 (3/10 of 2H, t, $^3J = 6.9$ Hz, CH_2CO), 3.05 (3/10 of 3H, s, NCH_3), 3.31 (7/10 of 3H, s, NCH_3), 4.99 (7/10 of 2H, bs, OCH_2Ph), 5.17 (3/10 of 2H, bs, OCH_2Ph) 7.51-7.53 (5H, m, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): 17.5 (PCH_2CH_2), 17.8 (PCH_2CH_2), 25.6 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 134.8$ Hz, PCH_2CH_2), 25.7 (d, $^1J_{\text{C-P}} = 134.8$ Hz, PCH_2CH_2), 31.8 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 16.8$ Hz CH_2CO), 32.9 (NCH_3), 34.0 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 17.5$ Hz CH_2CO), 35.2 (NCH_3), 75.8 (OCH_2Ph), 76.1 (OCH_2Ph), 128.9 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 132.3 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 175.7 (CO), 177.7 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CD_3OD): 30.4, 30.5.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 288.0995, found 288.0993.

3-((Benzyloxy)amino)-3-oxopropyl diethyl phosphate (224a)



The general procedure **D (Method 2)** was applied to synthesize compound **224a** from alcohol **186a** (108 mg, 0.65 mmol). The crude product was purified by automated chromatography (EtOAc/petroleum ether, 8:2 $\rightarrow$ EtOAc/MeOH, 95:5) to give **224a** as a colorless oil (158 mg, 43 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformer in a 70/30 ratio.

R_f = 0.20 (EtOAc/petroleum ether, 8:2).

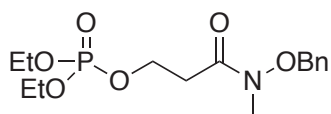
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 1.32 (6H, td, $^3J = 7.1$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 2.46 (7/10 of 2H, bs, CH_2CO), 2.77 (3/10 of 2H, bs, CH_2CO), 4.03-4.13 (4H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 4.26-4.33 (2H, m, POCH_2), 4.91 (2H, s, OCH_2Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}), 8.08 (3/10 of 1H, bs, NH), 9.03 (7/10 of 1H, bs, NH).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 32.8 (CH_2CO), 34.9 (CH_2CO), 62.6 (POCH_2), 63.6 (POCH_2), 64.3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 78.4 (OCH_2Ph), 79.7 (OCH_2Ph), 128.7 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 135.5 (C_{Ar}), 167.6 (CO).

^{31}P -NMR (121.5, CDCl_3): -1.21.

MS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NPO}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 354.11, found 354.10.

3-((Benzyloxy)(methyl)amino)-3-oxopropyl diethyl phosphate (224b)



The general procedure **D (Method 2)** was applied to synthesize compound **224b** from alcohol **186b** (88 mg, 0.53 mmol). The crude product was purified by automated chromatography (EtOAc/petroleum ether, 8:2 $\rightarrow$ EtOAc/MeOH, 95:5) to give **224b** as a colorless oil (377 mg, 88 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.20 (EtOAc/petroleum ether, 8:2).

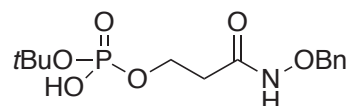
^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 1.20 (6H, td, $^3J = 7.1$ Hz, $^4J = 0.7$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 2.66 (2H, t, $^3J = 6.6$ Hz, CH_2CO), 3.08 (3H, s, NCH_3), 3.93-4.03 (4H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 4.15-4.22 (2H, m, POCH_2), 4.72 (2H, s, OCH_2Ph), 7.26 (5H, s, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 16.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 33.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 6.5$ Hz, CH_2CO), 33.6 (NCH_3), 63.2 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.2$ Hz, POCH_2), 64.0 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 76.6 (OCH_2Ph), 79.7 (OCH_2Ph), 129.0 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 171.7 (CO).

^{31}P -NMR (121.5, CDCl_3): -0.97.

MS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NPO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346.14, found 346.15.

3-((Benzyloxy)amino)-3-oxopropyl *tert*-butyl hydrogen phosphate (225a)



The general procedure **D** (Method 3) was applied to synthesize compound **225a** from alcohol **186a** (104 mg, 0.53 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 6:4 $\rightarrow$ EtOAc) to give **225a** as a colorless oil (58 mg, 33 %) and as a mixture of two conformers *Z* and *E* in a 70:30 ratio.

$R_f = 0.27$ (EtOAc).

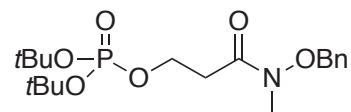
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 1.51 (9H, s, *t*BuO), 2.46 (7/10 of 2H, bs, CH_2CO), 2.76 (3/10 of 2H, bs, CH_2CO), 4.24-4.35 (2H, m, POCH_2), 4.84 (3/10 of 2H, bs, OCH_2Ph), 4.92 (7/10 of 2H, bs, OCH_2Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}), 8.55 (2/10 of 2H, bs, NH), 8.84 (8/10 of 1H, bs, NH).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 30.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.4$ Hz, *t*BuO), 32.8 (CH_2CO), 34.9 (CH_2CO), 61.4 (POCH_2), 78.3 (OCH_2Ph), 84.5 (C_4° of *Ot*Bu), 128.6 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 167.4 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CDCl_3): 3.07.

MS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 330.11, found 330.11.

3-((Benzyloxy)(methyl)amino)-3-oxopropyl di-*tert*-butyl phosphate (225b)



The general procedure **D** (Method 3) was applied to synthesize compound **225b** from alcohol **186b** (80 mg, 0.38 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 6:4 $\rightarrow$ EtOAc) to give **225b** as a colorless oil (92 mg, 60 %) and as the sole conformer *E*.

$R_f = 0.46$ (EtOAc).

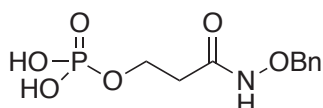
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 1.47 (9H, s, *t*BuO), 2.79 (2H, t, $^3J = 6.6$ Hz, CH_2CO), 3.20 (3H, s, NCH_3), 4.23 (2H, td, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{P-H}} = 7.0$ Hz, POCH_2), 4.85 (2H, bs, OCH_2Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3): 30.4 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 4.3$ Hz, $t\text{BuO}$), 33.3 (d, $^3J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, CH_2CO), 33.6 (NCH_3), 62.7 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 6.0$ Hz, POCH_2), 76.6 (OCH_2Ph), 82.5 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 7.3$ Hz, C_4° of OtBu), 128.9 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 172.1 (CO).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3): -10.2.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 424.1859, found 424.1816.

3-((Benzyloxy)amino)-3-oxopropyl dihydrogen phosphate (**223a**)



The general procedure **N** was applied to synthesize compound **223a** from protected phosphate **225a** (10 mg, 30 μmol). The product **223a** was obtained without purification as a colorless oil (7 mg, 85 %).

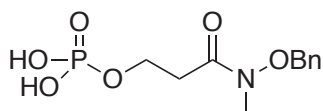
^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): 2.42 (2H, t, $^3J = 5.2$ Hz, CH_2CO), 4.19-4.26 (2H, m, POCH_2), 4.84 (2H, s, OCH_2Ph), 7.34-7.44 (5H, s, CH_{Ar}), 7.89 (1H, bs, NH).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): 35.3 (CH_2CO), 61.9 (POCH_2), 79.2 (OCH_2Ph), 129.6 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 169.7 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CD_3OD): 6.14.

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 298.0451, found 298.0424.

3-((Benzyloxy)(methyl)amino)-3-oxopropyl dihydrogen phosphate (**223b**)



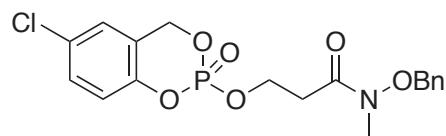
The general procedure **N** was applied to synthesize the compound **223b** from *cycloSal* **225b** (20 mg, 50 μmol). The product **223b** was obtained without purification as a colorless oil (12 mg, 93 %).

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): 2.80 (2H, t, $^3J = 6.3$ Hz, CH_2CO), 3.23 (3H, s, NCH_3), 4.19-4.23 (2H, m, POCH_2), 4.98 (OCH_2Ph not visible: within water signal), 7.38-7.46 (5H, s, CH_{Ar}).

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CD_3OD): 33.5 (NCH_3), 34.1 (CH_2CO), 63.3 (d, $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, POCH_2), 77.4 (OCH_2Ph), 129.7 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 173.6 (CO).

^{31}P -NMR (121.5 MHz, CD_3OD): 0.07

HRMS (EI) $^+$: m/z calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_6\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 312.0607, found 312.0590.

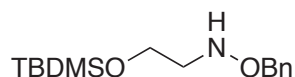
***N*-(Benzyloxy)-3-((6-chloro-2-oxido-4*H*-benzo[*d*][1,3,2]dioxaphosphinin-2-yl)oxy)-*N*-methylpropanamide**

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.73-2.85 (2H, m, CH₂CO), 3.18 (3H, s, NCH₃), 4.41-4.53 (2H, m, POCH₂), 4.81 (2H, s, OCH₂Bn), 5.23-5.38 (2H, m, ArCH₂OP), 6.47 (2H, m, CH_{Ar}(DMP)), 6.98-6.99 (2H, m, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.05-7.07 (1H, t, ³*J* = 2.4 Hz, CH_{Ar}(cycloSal)), 7.35-39 (5H, 5 CH_{Ar}(Bn))

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 32.9 (CH₂CO), 33.5 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 64.1 (d, ²*J*_{C-P} = 5.1 Hz, POCH₂), 68.1 (d, ²*J*_{C-P} = 6.6 Hz, ArCH₂OP), 76.4 (OCH₂Bn), 120.2 (d, ³*J*_{C-P} = 9.3 Hz, CH_{Ar}C_{Ar}OP), 122.1 (d, ³*J*_{C-P} = 9.6 Hz, C_{Ar}CH₂OP), 125.3 (CH_{Ar}(cycloSal)), 128.5 (C_{Ar}Cl), 128.8 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 134.0 (C_{Ar}), 148.7 (C_{Ar}OP), 171.1 (CO).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃) : -10.0

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₈H₂₀ClNO₆P [M+H]⁺ 412.0711, found 412.0691.

***O*-Benzyl-*N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)hydroxylamine (245)**

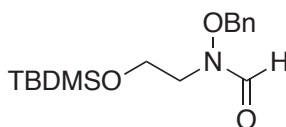
To a solution of **180** (424 mg, 2.40 mmol) in DCM (76 mL) was added 2,6-lutidine (0.45 mL, 3.90 mmol). The solution was cooled down at -78 °C, and trifluoromethane sulfonic anhydride (450 μL, 2.70 mmol) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at -78 °C for 1 h, and *O*-benzylhydroxylamine (625 mg, 5.07 mmol) in DCM (6 mL) was added dropwise. The solution was stirred at -78 °C for 1 h, warmed up to room temperature and stirred for another 2 h. The reaction mixture was diluted with DCM (30 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NH₄Cl (100 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (100 mL), water (100 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvents were removed under reduced pressure to give a pale yellow oil. The crude was purified by flash chromatography (petroleum ether → EtOAc/petroleum ether, 5:95) to give the product **245** as a colorless oil (438 mg, 65 %).

R_f = 0.5 (EtOAc/petroleum ether, 1:9).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.04 (5H, s, Si-CH₃), 0.88 (9H, s, *t*Bu), 3.02 (2H, t, ³*J* = 5.2 Hz, CH₂N), 3.74 (2H, t, ³*J* = 5.1 Hz, CH₂OTBDMS), 4.72 (2H, s, OCH₂Ph), 7.29-7.37 (5H, m, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.5 (C_{4°} of *t*Bu), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 54.1 (CH₂N), 59.5 (CH₂OTBDMS), 75.9 (OCH₂Ph), 127.9 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₅H₂₈NO₂Si [M+H]⁺ 282.19, found 282.19.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)formamide (246a)**

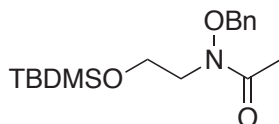
The general procedure **C** was applied to synthesize compound **246a** from protected hydroxylamine **245** (410 mg, 1.46 mmol). The product **246a** was obtained without purification as a colorless oil (390 mg) and as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 40:60 ratio.

R_f = 0.61 (EtOAc/petroleum ether, 1:9).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0.05 (5H, s, Si-CH₃), 0.88 (9H, s, *t*Bu), 3.30 (4/10 of 2H, bs, CH₂N), 3.69 (6/10 of 2H, bs, CH₂N), 3.79 (4/10 of 2H, bs, CH₂OTBDMS), 4.33 (6/10 of 2H, bs, CH₂OTBDMS), 4.89 (6/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 4.98 (4/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 7.37 (5H, bs, CH_{Ar}), 7.95 (4/10 of 1H, bs, CHO), 8.22 (6/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.4 (C_{4°} of *t*Bu), 26.0 (CH₃ of *t*Bu), 48.1 (CH₂N), 52.1 (CH₂N), 58.6 (CH₂OTBDMS), 59.4 (CH₂OTBDMS), 76.7 (OCH₂Ph), 78.1 (OCH₂Ph), 128.7 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 159.5 (CHO), 163.9 (CHO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₆H₂₇NO₃SiNa [M+Na]⁺ 332.17, found 332.16.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)acetamide (246b)**

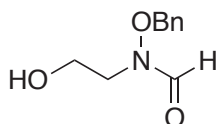
The general procedure **J** was applied to synthesize compound **246b** from protected hydroxylamine **245** (298mg, 1.06 mmol). The product **246b** was obtained without purification as a colorless oil (311 mg) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.59 (EtOAc/petroleum ether 1:9).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.06 (5H, s, Si-CH₃), 0.89 (9H, s, *t*Bu), 2.09 (3H, s, COCH₃), 3.75-3.79 (4H, m, OCH₂CH₂N), 4.88 (2H, s, OCH₂Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): -5.2 (Si-CH₃), 18.5 (C_{4°} of *t*Bu), 20.7 (COCH₃), 26.1 (CH₃ of *t*Bu), 49.7 (CH₂N), 59.8 (CH₂OTBDMS), 76.7 (OCH₂Ph), 78.1 (OCH₂Ph), 128.9 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 173.1 (COCH₃).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₇H₃₀NO₃Si [M+H]⁺ 324.20, found 324.20.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(2-hydroxyethyl)formamide (247a)**

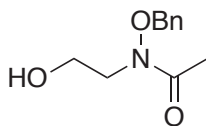
The general procedure **K** was applied to synthesize compound **247a** from protected alcohol **246a** (376 mg, 1.21 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **247a** as a colorless oil (224 mg, 82 %) and as a mixture of two *Z* and *E* conformers in a 30:70.

R_f = 0.51 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 3.70-3.80 (4H, m, OCH₂CH₂N), 4.90 (2H, bs, OCH₂Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}), 7.99 (3/10 of 2H, bs, NH), 8.25 (7/10 of 2H, bs, NH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 48.8 (CH₂N), 53.7 (CH₂N), 58.3 (CH₂OH), 60.1 (CH₂OH), 76.6 (OCH₂Ph), 78.3 (OCH₂Ph), 128.7 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 159.7 (CHO), 164.5 (CHO).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₀H₁₃NO₃K [M+K]⁺ 234.05, found 234.05.

***N*-(Benzyloxy)-*N*-(2-hydroxyethyl)acetamide (247b)**

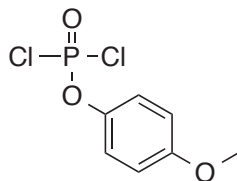
The general procedure **K** was applied to synthesize compound **247b** from protected alcohol **246b** (311 mg, 0.81 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc) to give **247b** as a colorless oil (147 mg, 93 %) and as the sole *E* conformer.

R_f = 0.25 (EtOAc/petroleum ether, 7:3).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 2.13 (3H, s, COCH₃), 3.81 (4H, s, OCH₂CH₂N), 4.87 (2H, s, OCH₂Ph), 7.38 (5H, s, CH_{Ar}).

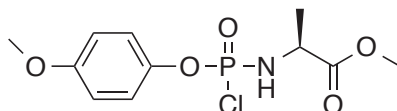
¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): (COCH₃), 50.8 (CH₂N), 61.3 (CH₂OH), 77.1 (OCH₂Ph), 129.0 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}), 174.3 (COCH₃).

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₁H₁₆NO₃ [M+H]⁺ 210.11, found 210.11.

(4-Methoxy)phenyl phosphorodichloridate (249)

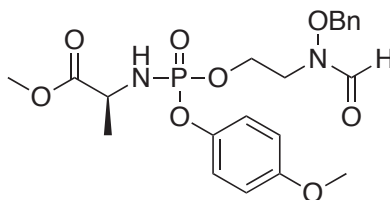
To a solution of phosphorus oxychloride (0.75 mL, 8 mmol) and 4-methoxyphenol **248** (1.00 g, 8 mmol) in dry diethyl ether (30 mL) was added at -78 °C triethylamine (1.12 mL, 8 mmol). The resulting mixture was warm up to room temperature and stirred overnight. The reaction was monitored by ^{31}P NMR. The triethylammonium chloride was filtered under argon and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil was used for the next step without further purification.

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): 4.43.

(4-Methoxy)phenyl (methoxy-L-alaninyl)phosphorochloridate (250)

The (4-methoxy)phenyl phosphorodichloridate **249** was dissolved in dry DCM (31 mL) and the L-alanine methyl ester hydrochloride (1.07 g, 7.65 mmol) was added. The suspension was cooled down to -78 °C and triethylamine (2.4 mL, 16.9 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at -78 °C for 15 min and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure, and the residue was poured into Et_2O (30 mL) and the triethylammonium chloride was filtered off. The filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure to give a yellow oil, which was used for the next step without further purification.

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3): 8.25, 8.59.

Methyl ((2-(N-(benzyloxy)formamido)ethoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (240a)

The general procedure **O** was applied to synthesize compound **240a** from alcohol **247a** (222 mg, 1.14 mmol). A purification by flash chromatography gave a mixture (213 mg) of the desired compound **240a** and a byproduct **251*** in a 50:50 ratio respectively, which was determined by NMR spectroscopy. The product **240a** was obtained as a mixture of two diastereoisomers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.35 (EtOAc /petroleum ether, 3:7).

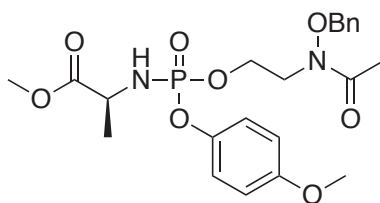
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.31-1.38 (6/9 of 9H, m, NCHCH₃*, 3/9 of 9H, m, NCHCH₃), 3.45 (2H, m, NCH₂), 3.68-3.76 (9/15 of 15H, m, OCH₃*, 6/15 of 15H, m, OCH₃), 3.98-4.07 (2/3 of 3H, m, NCHCH₃*, 1/3 of 3H, m, NCHCH₃), 4.14 (4/10 of 2H, bs, POCH₂), 4.23 (6/10 of 2H, bs, POCH₂), 4.67 (4/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 4.81 (6/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 6.77-6.82 (1/2 of 2H, m, CH_{Ar}*, 1/2 of 2H, m, CH_{Ar}), 7.07-7.12 (1/2 of 2H, m, CH_{Ar}*, 1/2 of 2H, m, CH_{Ar}), 7.37 (5H, m, CH_{Ar}(Bn)), 7.81-7.85 (4/10 of 1H, bs, CHO), 8.19-8.21 (6/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.1-21.4 (NCHCH₃* and NCHCH₃), 45.3 (NCH₂), 46.5 (NCH₂), 49.9-50.4 (NCHCH₃* and NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃* and CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃* and ArOCH₃), 61.9 (POCH₂), 62.5 (POCH₂), 76.9 (OCH₂Ph), 78.4 (OCH₂Ph), 114.7 (CH_{Ar}(PMP)), 121.3 (CH_{Ar}(PMP)), 128.8 (CH_{Ar}(Bn)), 129.0 (CH_{Ar}(Bn)), 129.4 (CH_{Ar}(Bn)), 129.5 (CH_{Ar}(Bn)), 129.7 (CH_{Ar}(Bn)), 134.3 (C_{Ar}), 144.5 (C_{Ar}), 156.5 (C_{Ar}OCH₃), 164.1 (CHO), 164.2 (CHO), 173.7 (CH₃CO), 174.1 (CO₂CH₃), 174.3 (CO₂CH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 3.06, 3.29, 8.10*.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₁H₂₇N₂O₈PNa [M+Na]⁺ 489.1397, found 489.1376.

Methyl ((2-(*N*-(benzyloxy)acetamido)ethoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninate (240b**)**



The general procedure **O** was applied to synthesize compound **240b** from protected alcohol **247b** (277 mg, 1.32mmol). Several purifications by flash chromatography and preparative TLC gave a mixture (31 mg) of the desired compound **240b** and a byproduct **251*** in a 50:50 ratio respectively, which was determined by NMR spectroscopy. The product **240b** was obtained as a mixture of two diastereoisomers in a 60:40 ratio.

R_f = 0.38 (EtOAc/petroleum ether, 3:7).

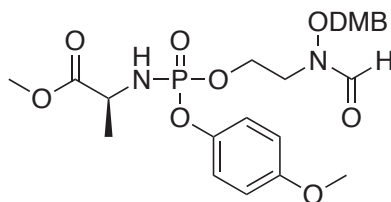
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.37 (2/3 of 9H, m, NCHCH₃*, 2/3 of 9H, m, NCHCH₃), 2.07 (6/10 of 2H, bs, CH₃CO), 2.08 (4/10 of 2H, bs, CH₃CO), 3.41-3.46 (2H, m, NCH₂), 3.68-3.76 (9/15 of 15H, m, OCH₃*, 6/15 of 15 H, m, OCH₃*) 3.98-4.07 (2/3 of 1H, m, NCHCH₃*, 1/3 of 1H, m, NCHCH₃), 4.21-4.29 (2H, m, POCH₂), 4.79 (4/10 of 2H, s, OCH₂Ph), 4.81 (6/10 of 2H, s, OCH₂Ph), 6.77-6.82 (1/2 of 2H, m, CH_{Ar}*, 1/2 of 2H, m, CH_{Ar}), 7.07-7.12 (1/2 of 2H, m, CH_{Ar}*, 1/2 of 2H, m, CH_{Ar}), 7.37 (5H, m, CH_{Ar}(Bn)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.6 (CH₃CO), 21.1-21.4 (NCHCH₃* and NCHCH₃), 46.5 (NCH₂), 46.7 (NCH₂), 49.9-50.4 (NCHCH₃* and NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃* and CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃* and ArOCH₃), 62.9 (POCH₂), 76.9 (OCH₂Ph), 114.6-114.7 (CH_{Ar}(PMP)), 121.3-121.4 (CH_{Ar}(PMP)), 128.9 (CH_{Ar}(Bn)), 129.2 (CH_{Ar}(Bn)), 129.5 (CH_{Ar}(Bn)), 129.9 (CH_{Ar}(Bn)), 144.2-144.5 (C_{Ar}), 156.5 (C_{Ar}OCH₃), 173.7 (CH₃CO), 174.1 (d, ³J_{C-P} = 6.8 Hz, CO₂CH₃), 174.3 (d, ³J_{C-P} = 7.1 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 3.05, 3.30, 8.09*.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{22}H_{30}N_2O_8P$ $[M+H]^+$ 481.1734, found 481.1762.

Methyl-((2-(*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)formamido)ethoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninate (241a)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **241a** from alcohol **209** (86 mg, 0.34 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 6:4 → EtOAc/MeOH, 95:5) to give **241a** as a colorless oil (98 mg, 55 %) and as a mixture of two diastereoisomers in 60:40 ratio.

R_f = 0.40 (EtOAc).

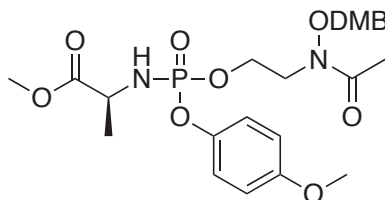
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.35 (3H, m, NCHCH₃), 3.49-3.84 (14H, m, OCH₃ and NCH₂), 3.99-4.06 (1H, m, NCHCH₃), 4.17-4.31 (2H, m, POCH₂), 4.81 (6/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 4.97 (4/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 6.44-6.45 (CH_{Ar(DMB)}), 6.79-6.81 (2H, m, CH_{Ar}), 7.08-7.15 (3H, m, CH_{Ar}), 7.83 (4/10 of 1H, bs, CHO), 8.18 (6/10 of 1H, bs, CHO).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.2 (NCHCH₃), 21.3 (NCHCH₃), 44.7 (NCH₂), 50.3 (NCHCH₃), 50.4 (NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 62.3 (POCH₂), 73.2 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar(DMB)}), 104.3 (CH_{Ar(DMB)}), 114.7 (CH_{Ar(PMP)}), 121.3 (CH_{Ar(PMP)}), 133.2 (CH_{Ar(DMB)}), 144.4 (C_{Ar}), 156.7 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.4 (C_{Ar}OCH₃), 163.8 (CHO), 163.9 (CHO), 174.1 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, CO₂CH₃), 174.4 (d, ³J_{C-P} = 7.3 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 3.05, 3.28.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{23}H_{31}N_2O_{10}PNa$ $[M+Na]^+$ 549.1609, found 549.1640.

Methyl ((2-(*N*-((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)acetamido)ethoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninate (241b)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **241b** from alcohol **210** (71 mg, 0.26 mmol). The crude product was purified by automated flash chromatography (EtOAc/petroleum ether, 6:4 → EtOAc/MeOH, 95:5) to give **241b** as a colorless oil (43 mg, 31 %) and as a mixture of two diastereoisomers in 50:50 ratio.

R_f = 0.34 (EtOAc).

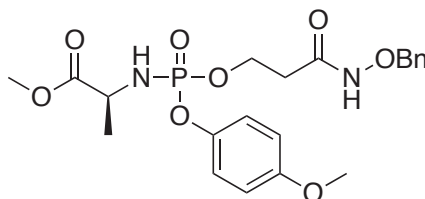
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.33 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.9 Hz, NCHCH₃), 1.37 (5/10 of 3H, d, ³J = 7.2 Hz, NCHCH₃), 2.06 (5/10 of 3H, bs, CH₃CO), 2.08 (5/10 of 3H, bs, CH₃CO), 3.67-3.904 (14H, m, OCH₃ and NCH₂), 3.99-4.02 (1H, m, NCHCH₃), 4.21-4.27 (2H, m, POCH₂), 4.75 (5/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 4.76 (5/10 of 2H, bs, OCH₂Ph), 6.42-6.43 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.76 (2H, m, CH_{Ar}), 7.05-7.10 (2H, m, CH_{Ar}), 7.16 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.4 (CH₃CO), 21.2 (d, ³J_{C-P} = 4.6 Hz, NCHCH₃), 21.3 (d, ³J_{C-P} = 5.3 Hz, NCHCH₃), 45.9 (NCH₂), 46.1 (NCH₂), 50.3 (NCHCH₃), 50.4 (NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃), 52.7 (CO₂CH₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 62.8 (POCH₂), 62.9 (POCH₂), 71.5 (OCH₂DMP), 71.6 (OCH₂DMP), 98.7 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 114.6 (CH_{Ar}(PMP)), 114.7 (CH_{Ar}(PMP)), 115.2 (C_{Ar}), 121.4 (d, ³J_{C-P} = 4.5 Hz, CH_{Ar}(PMP)), 121.5 (d, ³J_{C-P} = 4.4 Hz, CH_{Ar}(PMP)), 133.3 (CH_{Ar}(DMB)), 144.5 (C_{Ar}), 144.6 (C_{Ar}), 156.7 (C_{Ar}OCH₃), 159.7 (C_{Ar}OCH₃), 162.3 (C_{Ar}OCH₃), 173.5 (CH₃CO), 173.7 (CH₃CO), 174.1 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, CO₂CH₃), 174.4 (d, ³J_{C-P} = 7.0 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): 3.05, 3.32.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₄H₃₄N₂O₁₀P [M+H]⁺ 541.1946, found 541.1925.

***N*-(Benzyloxy)-3-hydroxypropanamide -3-[(4-methoxy)phenyl (methoxyalaninyl) phosphoramidate] (243a)**



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **243a** from alcohol **186a** (200 mg, 1.02 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 9:1) to give **243a** as a colourless oil (222 mg, 47 %) and as a mixture of two diastereoisomers in a 50:50 ratio and two conformers *Z* and *E* in a 80:20 ratio.

R_f = 0.28 (EtOAc/petroleum ether, 8:2).

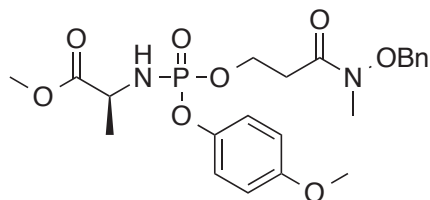
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.31 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.8 Hz, NCHCH₃), 1.35 (5/10 of 3H, d, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, NCHCH₃), 2.42 (8/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.70 (2/10 of 2H, bs, CH₂CO), 3.52 (5/10 of 1H, m, NH), 3.67-3.73 (6H, m, OCH₃), 3.79 (5/10 of 1H, m, NH), 3.91-4.03 (1H, m, NCHCH₃), 4.28-4.38 (2H, m, POCH₂), 4.85-4.91 (2H, s, OCH₂Ph), 6.78-6.80 (2H, m, CH_{Ar}), 7.06-7.09 (2H, m, CH_{Ar}), 7.33-7.36 (5H, m, CH_{Ar}(Bn)), 9.24 (5/10 of 1H, bs, N(*H*)OBn), 9.37 (5/10 of 1H, bs, N(*H*)OBn).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.1 (NCHCH₃), 35.2 (CH₂CO), 35.8 (CH₂CO), 50.3 (NCHCH₃), 50.5 (NCHCH₃), 52.8 (CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃), 63.4 (POCH₂), 63.6 (POCH₂), 78.4 (OCH₂Ph), 78.5 (OCH₂Ph), 114.8 (CH_{Ar}(PMP)), 121.2-121.4 (CH_{Ar}(PMP)), 128.8-129.0 (CH_{Ar}(Bn)), 129.3-129.4 (CH_{Ar}(Bn)), 135.4-135.7 (C_{Ar}(Bn)), 144.2 (C_{Ar}OP), 156.9 (C_{Ar}OCH₃), 167.8 (CONH), 174.2 (d, ³J_{C-P} = 6.8 Hz, CO₂CH₃), 174.5 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.68, 2.99.

MS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{21}H_{27}N_2O_8PNa$ $[M+Na]^+$ 489.14, found 489.14.

***N*-(Benzyloxy)-3-hydroxy-*N*-methylpropanamide-3-[(4-methoxy)phenyl (methoxyalaninyl) phosphoramidate] (243b)**



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **243b** from alcohol **186b** (194 mg, 0.93 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 9:1) to give **243b** as a colorless oil (213 mg, 48 %) and as a mixture of two diastereoisomers in a 50:50 ratio.

R_f = 0.23 (EtOAc/petroleum ether, 6:4).

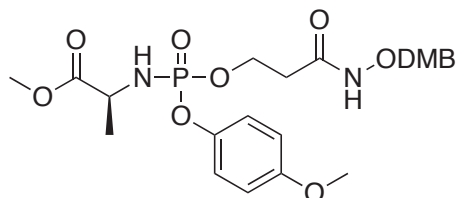
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (5/10 of 3H, d, 3J = 7.0 Hz, NCHCH₃), 1.39 (5/10 of 3H, d, 3J = 7.1 Hz, NCHCH₃), 2.66-2.88 (2H, m, CH₂CO), 3.19 (5/10 of 3H, s, NCH₃), 3.20 (5/10 of 3H, s, NCH₃), 3.70-3.72 (3H, m, OCH₃), 3.75 (3H, m, OCH₃), 4.00-4.08 (1H, m, NCHCH₃), 4.31-4.39 (8/10 of 2H, m, POCH₂), 4.42-4.48 (2/10 of 2H, m, POCH₂), 4.76-4.81 (2H, m, OCH₂Ph), 6.79-6.81 (2H, m, CH_{Ar}), 7.09-7.014 (2H, m, CH_{Ar}), 7.34-7.39 (5H, m, CH_{Ar}(Bn)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.3 (NCHCH₃), 33.2 (CH₂CO), 33.6 (NCH₃), 50.3 (NCHCH₃), 50.4 (NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃), 62.9 (POCH₂), 76.6 (OCH₂Ph), 114.7 (CH_{Ar}(PMP)), 121.4-121.5 (CH_{Ar}(PMP)), 128.9 (CH_{Ar}(Bn)), 129.3 (CH_{Ar}(Bn)), 129.5 (CH_{Ar}(Bn)), 134.4 (C_{Ar}(Bn)), 144.5-144.6 (C_{Ar}OP), 156.6 (C_{Ar}O CH₃), 171.8 (d, $^4J_{C-P}$ = 9.4 Hz, CONCH₃), 174.2 (d, $^3J_{C-P}$ = 7.4 Hz, CO₂CH₃), 174.3 (d, $^3J_{C-P}$ = 7.7 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.75, 2.92.

MS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{22}H_{29}N_2O_8PNa$ $[M+Na]^+$ 503.16, found 503.16.

Methyl ((3-(((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)amino)-3-oxopropoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-*L*-alaninate (244a)



The general procedure **H** was applied to synthesize compound **244a** from alcohol **211** (200 mg, 0.78 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 9:1) to give **244a** as a colorless oil (127 mg, 31 %) and as a mixture of two diastereoisomers in a 50:50 ratio.

R_f = 0.32 (EtOAc/cyclohexane, 9:1).

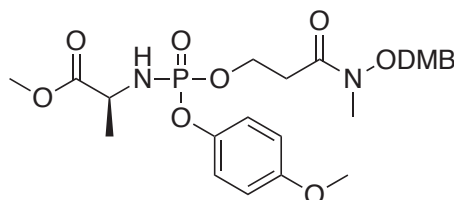
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.33 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.7 Hz, NCHCH₃), 1.37 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.8 Hz, NCHCH₃), 2.31-2.44 (2H, m, CH₂CO), 3.38-3.51 (5/10 of 1H, m, NH), 3.69-3.71 (3H, m, OCH₃), 3.74-3.75 (3H, m, OCH₃), 3.80-3.85 (6H, m, OCH₃), 3.93-4.05 (1H, m, NCHCH₃), 4.31-4.40 (2H, m, POCH₂), 4.78-4.92 (2H, s, OCH₂DMP), 6.43-6.49 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.79-6.82 (2H, m, CH_{Ar}), 7.08-7.24 (3H, m, CH_{Ar}(Bn)), 8.60 (5/10 of 1H, bs, N(H)ODMP), 9.37 (5/10 of 1H, bs, N(H)ODMP).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.1 (NCHCH₃), 32.5 (CH₂CO), 35.0 (CH₂CO), 50.3 (NCHCH₃), 50.5 (NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃), 52.8 (CO₂CH₃), 55.6 (ArOCH₃), 55.7 (ArOCH₃), 63.3 (POCH₂), 63.6 (POCH₂), 73.3 (OCH₂DMP), 74.9 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.2 (CH_{Ar}(DMB)), 104.3 (CH_{Ar}(DMB)), 114.8 (CH_{Ar}(PMP)), 116.2 (C_{Ar}(DMB)), 116.3 (C_{Ar}(DMB)), 121.3 (CH_{Ar}(PMP)), 132.8 (CH_{Ar}(DMB)), 133.0 (CH_{Ar}(DMB)), 144.3 (C_{Ar}OP), 156.8 (C_{Ar}O CH₃), 159.7 (C_{Ar}(DMB)OCH₃), 161.8 (C_{Ar}(DMB)OCH₃), 167.4 (CONH), 174.2 (CO₂CH₃), 174.6 (CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.94, 3.24.

MS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₂₃H₃₂N₂O₁₀P [M+H]⁺ 527.18, found 527.17.

Methyl ((3-(((2,4-dimethoxybenzyl)oxy)(methyl)amino)-3-oxopropoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (244b)



The general procedure **I** was applied to synthesize compound **244b** from alcohol **212** (200 mg, 0.74 mmol). The crude product was purified by flash chromatography (EtOAc/cyclohexane, 8:2) to give **244b** as a colorless oil (130 mg, 33 %) and as a mixture of two diastereoisomers in a 50:50 ratio.

R_f = 0.28 (EtOAc/cyclohexane, 8:2).

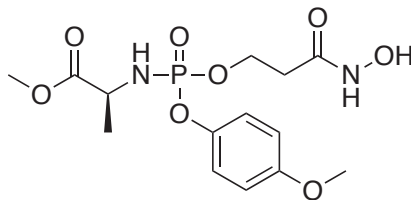
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.35 (3H, dd, ³J = 7.1 Hz, NCHCH₃), 1.39 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.9 Hz, NCHCH₃), 2.68-2.95 (2H, m, CH₂CO), 3.21 (5/10 of 3H, s, NCH₃), 3.22 (5/10 of 3H, s, NCH₃), 3.69-3.70 (3H, m, OCH₃), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.81-3.82 (6H, m, OCH₃), 3.97-4.03 (1H, m, NCHCH₃), 4.27-4.51 (2H, m, POCH₂), 4.72-4.80 (2H, m, OCH₂DMP), 6.44-6.48 (2H, m, CH_{Ar}(DMB)), 6.78-6.81 (2H, m, CH_{Ar}), 7.08-7.14 (2H, m, CH_{Ar}), 7.18 (1H, d, ³J = 9.0 Hz, CH_{Ar}(DMB)).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 21.2 (NCHCH₃), 32.9 (CH₂CO), 33.3 (NCH₃), 50.3 (d, ²J = 9.9 Hz, NCHCH₃), 52.6 (CO₂CH₃), 55.6 (ArOCH₃), 55.7 (ArOCH₃), 55.8 (ArOCH₃), 62.9 (POCH₂), 71.3 (OCH₂DMP), 98.8 (CH_{Ar}(DMB)), 104.4 (CH_{Ar}(DMB)), 114.8 (CH_{Ar}(PMP)), 115.1 (C_{Ar}(DMB)), 121.3-121.5 (CH_{Ar}(PMP)), 133.0 (CH_{Ar}(DMB)), 144.6-144.7 (C_{Ar}OP), 156.6 (C_{Ar}O CH₃), 159.7 (C_{Ar}(DMB)OCH₃), 162.3 (C_{Ar}(DMB)OCH₃), 171.7 (d, ⁴J_{C-P} = 10.7 Hz, CONCH₃), 174.2 (d, ³J_{C-P} = 7.5 Hz, CO₂CH₃), 174.3 (d, ³J_{C-P} = 7.8 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.98, 3.15.

MS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{24}H_{34}N_2O_{10}PNa$ $[M+Na]^+$ 541.20, found 541.20.

Methyl ((3-(hydroxyamino)-3-oxopropoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (242a)



The general procedure **E** was applied to synthesize compound **242a** from alcohol **243a** (29 mg, 62 μ mol) in methanol. The product **242a** was obtained without purification as a colorless oil (18 mg, 77 %) and as a mixture of two diastereoisomers in a 55:45 ratio.

R_f = 0.58 (EtOAc).

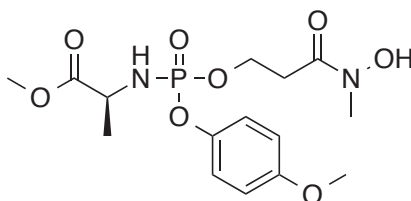
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.33 (3H, m, NCHCH₃), 2.52 (2H, bs, CH₂CO), 3.68-3.70 (3H, m, OCH₃), 3.74 (3H, m, OCH₃), 3.92-4.00 (1H, m, NCHCH₃), 4.30-4.35 (2H, m, POCH₂), 6.79-6.82 (2H, m, CH_{Ar}), 7.06-7.09 (2H, m, CH_{Ar}), 10.0 (1H, bs, N(H)OH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.7 (NCHCH₃), 32.3 (CH₂CO), 36.0 (NCH₃), 50.3 (NCHCH₃), 50.5 (NCHCH₃), 52.7 (CO₂CH₃), 52.8 (CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃), 63.5 (POCH₂), 114.7 (CH_{Ar}(PMP)), 114.8 (CH_{Ar}(PMP)), 121.2 (CH_{Ar}(PMP)), 121.3 (CH_{Ar}(PMP)), 121.4 (CH_{Ar}(PMP)), 121.5 (CH_{Ar}(PMP)), 144.1 (C_{Ar}OP), 156.8 (C_{Ar}OCH₃), 167.8 (CONCH₃), 167.9 (CONCH₃), 174.6 (d, ³J = 5.6 Hz, CO₂CH₃), 174.8 (d, ³J = 6.6 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.90, 3.38.

HRMS (EI)⁺: m/z calculated for $C_{14}H_{21}N_2O_8PNa$ $[M+Na]^+$ 399.0928, found 399.0918.

Methyl ((3-(hydroxy(methyl)amino)-3-oxopropoxy)(4-methoxyphenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (242b)



The general procedure **E** was applied to synthesize compound **242b** from alcohol **243b** (23 mg, 48 μ mol) in methanol. The product **242b** was obtained without purification as a colorless oil (18 mg, 96%) and as a mixture of two diastereoisomers in a 50:50 ratio and of two *Z* and *E* conformers in a 20:80 ratio respectively.

R_f = 0.51 (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.35 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.9 Hz, NCHCH₃), 1.39 (5/10 of 3H, d, ³J = 6.4 Hz, NCHCH₃), 2.70 (2/10 of 2H, bs, CH₂CO), 2.92 (8/10 of 2H, bs, CH₂CO), 3.18 (8/10 of 2H, s, NCH₃), 3.29 (2/10 of 2H, s, NCH₃), 3.71 (5/10 of 3H, s, OCH₃), 3.72 (5/10 of 3H, s, OCH₃), 3.78 (3H,

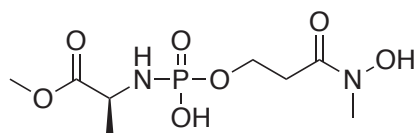
m, OCH₃), 3.98 (1H, m, NCHCH₃), 4.37-4.45 (2H, m, POCH₂), 6.82 (2H, dd, ⁴*J* = 8.9 Hz, ³*J* = 1.4 Hz CH_{Ar}), 7.07-7.10 (2H, m, CH_{Ar}), 9.16 (1H, bs, N(CH₃)OH).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CDCl₃): 20.0 (NCHCH₃), 32.2 (CH₂CO), 33.3 (CH₂CO), 36.0 (NCH₃), 50.3 (d, ²*J* = 8.6 Hz, NCHCH₃), 52.8 (pd, ⁵*J* = 3.4 Hz CO₂CH₃), 55.8 (ArOCH₃), 62.9 (POCH₂), 64.5 (POCH₂), 114.8 (CH_{Ar}(PMP)), 121.2 (CH_{Ar}(PMP)), 121.3 (CH_{Ar}(PMP)), 121.4 (CH_{Ar}(PMP)), 121.5 (CH_{Ar}(PMP)), 144.1 (C_{Ar}OP), 156.9 (C_{Ar}OCH₃), 170.5 (CONCH₃), 170.6 (CONCH₃), 174.1 (d, ³*J* = 7.3 Hz, CO₂CH₃), 174.2 (d, ³*J* = 7.8 Hz, CO₂CH₃).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃): 2.86, 3.11.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₁₅H₂₃N₂O₈PNa [M+Na]⁺ 413.1084, found 413.1048.

Methyl (hydroxy(3-(hydroxy(methyl)amino)-3-oxopropoxy)phosphoryl)-L-alaninate (252)



The protected alcohol (17 mg, 35 μmol), platinum oxide (8 mg, 35 μmol) in ethanol (2 mL) was hydrogenolyzed at room temperature and at atmospheric pressure under an atmosphere of H₂. After the total consumption of starting material (TLC), the catalyst was removed by filtration over celite and the reaction mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. A mixture of **252** and of an unidentified product was obtained (12 mg) in 50:50 ratio respectively, which was determined by NMR spectroscopy.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): 1.54 (3H, d, ³*J* = 6.8 Hz, NCHCH₃), 2.81 (2H, t, ³*J* = 6.5 Hz CH₂CO), 3.20 (3H, s, NCH₃), 3.70 (1H, m, NCHCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 4.06-4.14 (2H, m, POCH₂).

¹³C-NMR (125.8 MHz, CD₃OD): 17.0 (d, ³*J*_{C-P} = 7.0 Hz, NCHCH₃), 34.6 (d, ³*J*_{C-P} = 6.5 Hz, CH₂CO), 36.3 (NCH₃), 49.9 (NCHCH₃), 53.8 (CO₂CH₃), 62.5 (d, ²*J*_{C-P} = 5.6 Hz, POCH₂), 62.9 (d, ²*J*_{C-P} = 5.1 Hz, POCH₂), 171.6 (CO), 174.3 (CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CD₃OD): 0.64.

HRMS (EI)⁺: *m/z* calculated for C₈H₁₇N₂O₇P [M+H]⁺ 285.0846, found 285.0844.

Biochemical general procedures

Purification of the DXRs from *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis*

The DXRs were overexpressed and purified as His-tagged enzymes as described by Kuntz *et al.*³ and Ponaire *et al.*⁴

Determination of the enzymatic activity³

The DXR enzymatic activity was determined at 37 °C in 50 mM Tris/HCl buffer, (pH 7.5) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM DTT. The concentrations of NADPH and DXP were 0.15 and 0.5 mM respectively. Initial rates were measured by following the decrease of the absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH into NADP⁺ (Uvikon 933; Kontron Instruments). The reaction was initiated by adding the His tagged DXR (2.25 µg). The protein concentration was determined by the method of Bradford, with BSA as the standard.⁵

DXR Inhibition assay

The IC₅₀ concentrations were determined for each compound. The enzymatic reaction was initiated by adding DXP after pre-incubation of the enzyme with the inhibitor in the presence of NADPH for 2 min at 37 °C. Assays were performed in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5) containing 3 mM MgCl₂ and 2 mM DTT. The concentrations of NADPH and DXP were 0.15 and 0.5 mM respectively. The reaction medium contained the tested inhibitor at various concentrations, depending on the inhibitor. Overall we used concentrations leading to inhibitions between 20 to 80% of the initial rate to determine the IC₅₀ values.

Microorganisms and culture conditions

Escherichia coli XL1 Blue and an *Escherichia coli* fosmidomycin resistant strain were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium with agitation. Solid medium contained in addition 1.5% agar.

Mycobacterium smegmatis DSM43756 (ATCC 19420) was obtained from the Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany). Bacteria were grown aerobically at 30°C in a liquid medium containing 0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.2% CaCO₃ and 0.4% D-glucose.⁶ They were plated on Petri dishes containing 1.6% agar in addition to the medium.

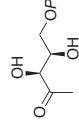
Antimicrobial activity of prodrugs

The antimicrobial activity against *M. smegmatis* and *E. coli* were determined using the paper disc diffusion method. Plates (10 cm-diameter) were inoculated with bacteria in exponential phase. A culture of *Mycobacterium smegmatis* was diluted to McFarland standard 0.5 (OD₆₀₀ ~ 0.132). The OD was measured against a blank containing the growth medium to take in account the turbidity due to the presence of CaCO₃ in suspension in it; dishes were inoculated with 150 µL of the suspension. A culture of *Escherichia coli* in exponential phase was fivefold diluted and 150 µL of the suspension were used to inoculate the dishes.

Prodrugs, not soluble in water, were dissolved at a concentration of 100 mM in DMSO. Fosmidomycin and isoniazid were used as positive controls for *E. coli* and *M. smegmatis* respectively. They were dissolved in water at a 5 mM concentration and filter-sterilized. Paper discs (Durieux no. 268, diameter 6 mm) were impregnated with the prodrug solutions (8 µL), fosmidomycin (2 µL) or isoniazid (6 µL) and placed on Petri dishes. Growth inhibition was examined after 24 h incubation at 37°C for *E. coli*, after 48 h incubation at 30°C for the mycobacteria.

- (1) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier.; Burlington, 2003.
- (2) Woo, Y.-H.; Fernandes, R. P. M.; Proteau, P. J. Evaluation of Fosmidomycin Analogs as Inhibitors of the *Synechocystis* sp. PCC6803 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2375–2385.
- (3) Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Hemmerlin, A.; Willem, A.; Bach, T. J.; Rohmer, M. Isoprenoid Biosynthesis as a Target for Antibacterial and Antiparasitic Drugs: Phosphonohydroxamic Acids as Inhibitors of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase. *Biochem. J.* **2005**, *386*, 127–135.
- (4) Ponaire, S.; Zinglé, C.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. Growth Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by Prodrugs of Deoxyxylulose Phosphate Reducto-Isomerase Inhibitors, Promising Anti-Mycobacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 277–285.
- (5) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (6) Rosa Putra, S.; Disch, A.; Bravo, J. M.; Rohmer, M. Distribution of Mevalonate and Glyceraldehyde 3-Phosphate/pyruvate Routes for Isoprenoid Biosynthesis in Some Gram-Negative Bacteria and Mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *164*, 169–175.

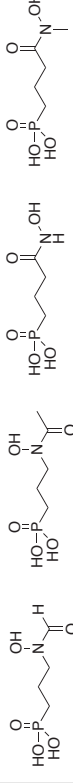
Substrat/Produit DXR



DXP : 16

MEP : 17

Inhibiteurs **phosphonates** et **phosphates** de la DXR

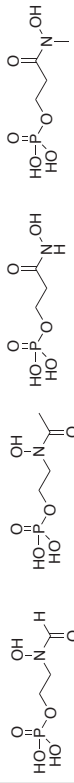


Fosmidomycine : 28

FR-900098 : 29

42

43



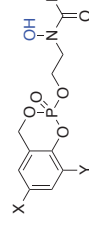
Fosfoxacine : 30

177

178a

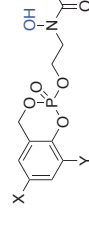
178b

Chapitre I : Prodrogues cycloSaligényles



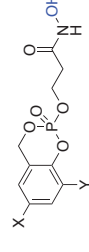
X = Y = H : 199a

X = Cl, Y = H : 199c



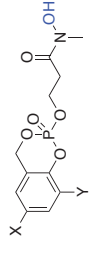
X = Y = H : 200a

X = Cl, Y = H : 200c



X = Y = H : 201a

X = Cl, Y = H : 201c

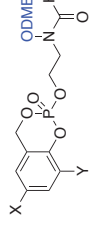


X = Y = H : 202a

X = Me, Y = H : 202b

X = Cl, Y = H : 202c

X = CF₃, Y = H : 202f



X = Y = H : 215a

X = Me, Y = H : 215b

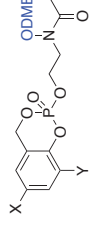
X = Cl, Y = H : 215c

X = Y = Cl : 215d

X = Br, Y = H : 215e

X = CF₃, Y = H : 215f

X = OMel, Y = H : 215g



X = Y = H : 216a

X = Me, Y = H : 216b

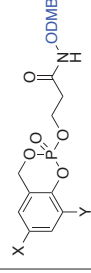
X = Cl, Y = H : 216c

X = Y = Cl : 216d

X = Br, Y = H : 216e

X = CF₃, Y = H : 216f

X = OMel, Y = H : 216g



X = Y = H : 217a

X = Me, Y = H : 217b

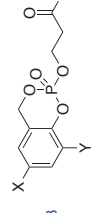
X = Cl, Y = H : 217c

X = Y = Cl : 217d

X = Br, Y = H : 217e

X = CF₃, Y = H : 217f

X = OMel, Y = H : 217g



X = Y = H : 218a

X = Me, Y = H : 218b

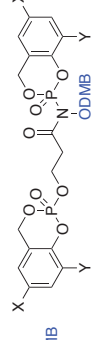
X = Cl, Y = H : 218c

X = Y = Cl : 218d

X = Br, Y = H : 218e

X = CF₃, Y = H : 218f

X = OMel, Y = H : 218g



X = Y = H : 219a

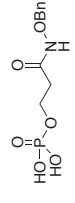
X = Me, Y = H : 219b

X = Cl, Y = H : 219c

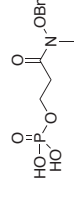
X = Br, Y = H : 219e

X = CF₃, Y = H : 219f

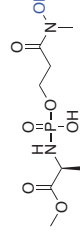
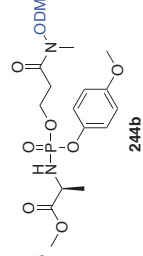
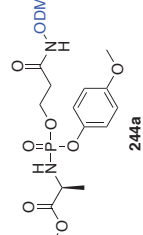
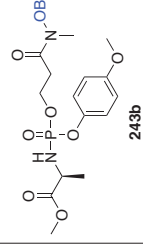
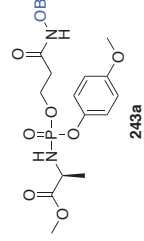
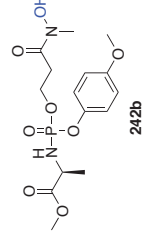
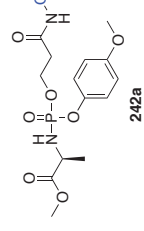
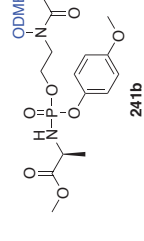
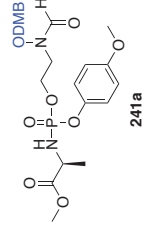
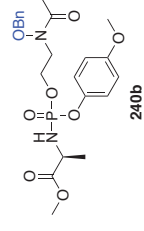
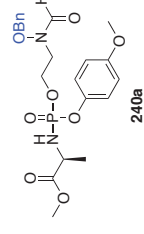
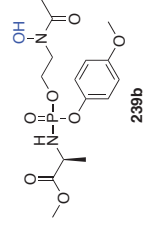
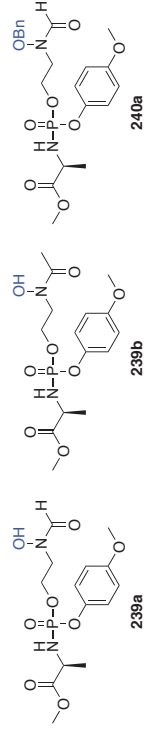
X = OMel, Y = H : 219g



223a



223b





Mathilde MUNIER



Synthèses de prodrogues d'inhibiteurs de la 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase (DXR) : des agents antituberculeux potentiels

Résumé

De nos jours la tuberculose est une des maladies les plus meurtrières au monde. Un problème majeur est que l'agent pathogène responsable de cette maladie (*Mycobacterium tuberculosis*) a développé des mécanismes de résistances envers les médicaments actuels. Il devient donc urgent de trouver d'autres cibles pour développer de nouveaux antituberculeux. La biosynthèse des isoprénoides pourrait en être une. Les précurseurs biologiques de tous les isoprénoides sont l'IPP et le DMAPP qui sont synthétisés selon deux voies. La voie du mévalonate, présente chez l'Homme et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) laquelle est présente chez *M. tuberculosis* et absente chez l'homme. La fosmidomycine et la fosfoxacine, deux inhibiteurs de la désoxyxylulose phosphate réductoisomérase (DXR), deuxième enzyme de la voie du MEP ne permet pas d'inhiber la croissance de la mycobactérie. Cela est dû à l'absence de pénétration de ces composés polaires au sein de la bactérie. Pour pallier à ces problèmes de biodisponibilité, nous avons synthétisé des prodrogues lipophiles de type *cyclo*Saligényle et arylphosphoramidate d'inhibiteurs de la DXR. Certains composés sont inhibent la croissance d'une mycobactérie non-pathogène, *Mycobacterium smegmatis*.

Mots clés : biosynthèse des isoprénoides, inhibition de la DXR, fosmidomycine, synthèse de prodrogues

Résumé en anglais

Today, tuberculosis is one of most murderous infectious diseases in the world. This disease is caused by the mycobacterium : *Mycobacterium tuberculosis* which is becoming more and more resistant towards antitubercular drugs. Therefore, it is urgent to find inovative targets for the development of new antitubercular drugs. The biosynthesis of isoprenoids represents such a target. The biological precursors of all isoprenoids are IPP and DMAPP which are synthesized via two pathways the mevalonate pathway, which is present in human and the methylerythritol phosphate (MEP) pathway which is present in *M. tuberculosis*. but absent in human. Fosmidomycin and fosfoxacine, two natural inhibitors of the deoxyxylulose phosphate reductoisomerase (DXR), the second enzyme of MEP pathway, but they do not affect the growth of *Mycobacterium tuberculosis* cells, due to a lack of uptake of the polar drugs by the bacteria. To overcome this absence of the mycobacterial cell watll crossing of these compounds, we synthesized lipophilic *cyclo*Saligenyl and arylphosphoramidate prodrugs of DXR inhibitors. Some compounds inhibit the growth of *Mycobacterium smegmatis*, a non-pathogenic model of mycobacterium.

Key words : isoprenoids biosynthesis, inhibition of DXR, fosmidomycin, synthesis of prodrugs