

This article was downloaded by:
On: 29 January 2011
Access details: Access Details: Free Access
Publisher Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713618290>

SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE GLUCOSE-6 PHOSPHATE, INHIBITEURS POTENTIELS D'sHEXOKINASE

Isabelle Riviere-Alric^a; Michèle Willson^a; Jacques Perie^a

^a Groupe de Chimie Organique Biologique, U.R.A au C.N.R.S. 454 et 470, Bbt. IIR1, Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex

To cite this Article Riviere-Alric, Isabelle , Willson, Michèle and Perie, Jacques(1991) 'SYNTHÈSE D'ANALOGUES DE GLUCOSE-6 PHOSPHATE, INHIBITEURS POTENTIELS D'sHEXOKINASE', Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 56: 1, 71 — 80

To link to this Article: DOI: 10.1080/10426509108038068

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10426509108038068>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

SYNTÈSE D'ANALOGUES DE GLUCOSE-6 PHOSPHATE, INHIBITEURS POTENTIELS D'HEXOKINASE

ISABELLE RIVIERE-ALRIC, MICHÈLE WILLSON et JACQUES PERIE

*Groupe de Chimie Organique Biologique, U.R.A au C.N.R.S.
454 et 470, Bât. IIRI, Université Paul Sabatier
118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex*

(Received June 6, 1990; in final form July 19, 1990)

Des analogues de glucose-6-phosphate porteurs en position 6 d'un groupement ester, thio-ester, thio-phosphate, thio-phosphoroamidate ou phosphonate, ont été synthétisés à partir de chlorophosphites ou par réaction d'Arbuzov. Dans les cas autres que phosphonate, les possibilités de migration d'un groupe OH à un autre du glucose ont été considérées. Aucun réarrangement n'est observé lors du déblocage des groupements protecteurs en milieu fortement basique, ni lors d'un traitement acide nécessaire à la purification. Les tests d'inhibition montrent que les meilleurs résultats sont obtenus avec des structures de type thiophosphoroamidate.

Analogues of glucose-6-phosphate bearing at position 6, an ester group, thio-ester, thio-phosphate, thio-phosphoro-amidate or phosphonate were synthesized starting from chlorophosphite or by Arbuzov type reaction. For groups other than phosphonate, possible migrations from an OH group to another on glucose have been considered. In no case such a migration is observed particularly during work-up in either strongly basic or in acidic conditions required for purification. Inhibition tests indicate that the best results are obtained with thio-phosphoroamidates.

Key words: Glucose-6-phosphate analogues; thio-phosphoroamidate; phosphoryl group migration; enzyme inhibitor.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux anti-parasitaires, nous avons été amenés à considérer comme voie possible l'inhibition de la glycolyse, métabolisme essentiel d'un parasite majeur le trypanosome^{1,2}; on sait en effet que ce parasite est responsable de nombreuses maladies humaines et animales dont la maladie du sommeil.³

Lorsqu'il est dans la phase sanguine de son cycle biologique, le parasite n'a que le glucose comme seule source d'énergie de sorte que le blocage de ce métabolisme constitue une cible potentielle importante.^{4,5} Cette voie paraît d'autant plus prometteuse qu'ont été mises en évidence un certain nombre de différences entre la glycolyse du parasite et celle du mammifère hôte. De plus l'insuffisance des médicaments actuellement disponibles liée à leur toxicité, aux effets secondaires qu'ils provoquent et aux chimio-résistances que développe le trypanosome⁶ justifient la recherche de solutions nouvelles.

Le travail présenté ici concerne la synthèse d'inhibiteurs de la première enzyme de la cascade de la glycolyse, l'hexokinase, choisie en raison de son importance puisqu'elle contrôle à la fois la production d'énergie et l'accès à la voie des pentoses donc à la biosynthèse des acides nucléiques.⁷ Cette enzyme catalyse la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate selon la réaction:



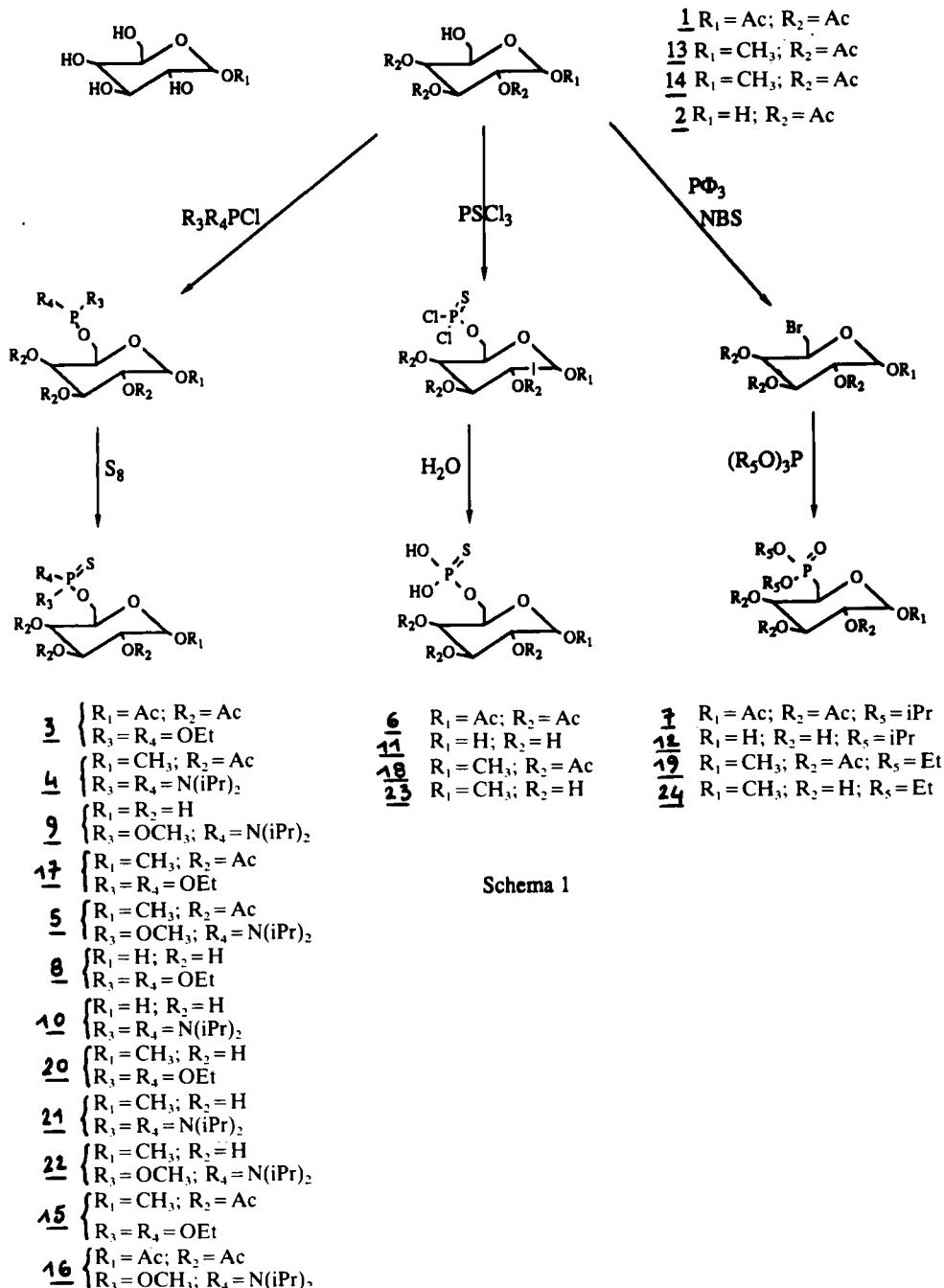
Il est connu que cette réaction peut être inhibée par des analogues de glucose tels que la glucosamine⁸ ou le 2-C-hydroxyméthyl glucose,⁹ l'affinité de ces inhibiteurs pour l'enzyme étant cependant peu élevée. Par contre, il n'est pas décrit d'inhibiteurs analogues du produit formé le glucose-6-phosphate, inhibiteurs qui doivent également être considérés puisqu'il est connu que le glucose-6-phosphate a une affinité appréciable pour le site actif de l'hexokinase.¹⁰ Sur cette base, a été entreprise la synthèse d'un certain nombre d'analogues du glucose-6-phosphate, analogues porteurs en position 6 de différents groupements: ester phosphorique, groupement thio-phosphate, ester thio-phosphorique, thio-phosphoro-amide et phosphonate. On sait en effet que le remplacement d'un groupement phosphate par un groupement thio-phosphate ou thio-ester a conduit au développement d'inhibiteurs d'enzymes mettant en jeu comme dans le cas de l'hexokinase un transfert de groupement phosphoryle.^{11,12,13} D'autre part, il est connu qu'un certain nombre de phosphonates analogues de substrats se comportent également comme inhibiteurs d'enzymes.¹⁴ Le présent travail décrit la synthèse de ces analogues et donne les résultats préliminaires des tests effectués sur l'hexokinase.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des réactions étudiées est donné dans le Schéma I. Leur particularité est liée au fait que la phosphorylation sélective sur la position 6 du glucose, nécessite que les autres groupements hydroxyle soient protégés puis déprotégés dans des conditions compatibles avec la stabilité du groupement phosphoré fixé à la position 6. En particulier les possibilités de migration du groupement ester phosphorique ou thio-phosphorique de la position 6 aux positions 1 ou 3, toutes deux de stéréochimie favorable à cette migration, sont à considérer. Ce type de migration bien connue dans le cas de polyols¹⁵ a également été observée dans le traitement en milieu acide de dérivés phosphorylés du glucose.¹⁶ Par ailleurs ces diverses réactions de phosphorylation étaient réalisées successivement sur le glucose puis sur le méthyl glucopyranose. Cela permettait de réaliser deux classes d'inhibiteurs dont une de molécules pouvant exister sous forme ouverte et donc susceptibles d'être inhibiteurs d'autres enzymes de la cascade glycolytique en particulier l'aldolase.⁴ Du point de vue de la réactivité chimique, cela pouvait offrir deux situations différentes puisque dans le second cas la réduction de mobilité conformationnelle du fait de l'absence de forme ouverte et aussi de groupement hydroxyle en position 1 devait limiter les possibilités d'éventuels réarrangements.

Etape 1

Le blocage des groupements hydroxyles en position 1, 2, 3 et 4 est réalisé par des méthodes classiques décrites dans la littérature.¹⁷ Deux groupements protecteurs étaient utilisés: groupement benzyle dont la déprotection est réalisée par hydrogénolyse dans le cas des produits non soufrés, et groupement acétyle dont la protection est réalisée par traitement au méthylate de sodium.

*Etape 2*

La réaction d'un chlorure de dialkyl-thiophosphate sur le glucose protégé en présence de pyridine et pendant plusieurs jours à 40° ne conduit à aucun produit de phosphorylation même en cas d'addition de 4-diméthyl-aminopyridine. Par contre

la même réaction réalisée avec le tri-chlorure de thio-phosphoryle conduit au produit attendu, intermédiaire dont l'hydrolyse basique conduit au 6-thiophosphate β -D-glucopyranose protégé **6**. Pour les autres composés, la phosphorylation était réalisée par les chloro-phosphites correspondants à la fois plus réactifs et moins encombrés que leurs analogues chlorophosphates ou chlorothiophosphates. La réaction sur **1** de dialkylchlorophosphite puis de soufre sur l'intermédiaire (caractérisé par son déplacement chimique en RMN du phosphore) permet de réaliser la synthèse du thio-phosphoester correspondant **3** dans des conditions douces.

La réaction du même composé **1** avec le chloro-méthyl-N-diisopropyl phosphite ou le chloro-di-N isopropyl phosphite, réactifs préparés selon des méthodes décrites^{18,19} permet d'obtenir les dérivés thio-phosphoro-amides correspondants **4** et **5** également dans des conditions douces.

Enfin la réaction d'un trialkyl-phosphite sur le 6-deoxybromoglucose protégé **2** dans les conditions de la réaction d'Arbuzov permet d'obtenir avec un rendement très satisfaisant, le phosphonate **7** correspondant.

Etape 3

La déprotection des groupements acétyl en position 1,2,3 et 4 est réalisée à température ambiante par action du méthylate de sodium dans le méthanol anhydre sur le produit de phosphorylation de **1**. Après réaction et neutralisation du milieu par une résine acide, le brut est purifié par chromatographie sur silice. Au cours de ces deux étapes, une éventuelle migration du groupement fixé en position 6 soit à la position 1 soit à la position 3 était à envisager, cette migration pouvant être facilitée par la libération de groupements alcoolates lors du déblocage et être d'autre part catalysée par les acides lors de la purification.

Ainsi dans le cas des composés les plus aptes à donner ce type de réaction en raison du caractère électrophile plus élevé de l'atome de phosphore (composés **3** et **5**), la structure du produit était contrôlée par résonance magnétique nucléaire du phosphore et du carbone 13. Dans le cas du composé **5** par exemple, la multiplicité du signal observé en ^{31}P indique un couplage avec un nombre pair de protons ($J = 12.2 \text{ Hz}$). L'analyse en résonance ^{13}C , indique pour l'atome de carbone en position 6 découpé du proton, un doublet dû au couplage avec l'atome de phosphore porté par ce même atome de carbone ($J = 6 \text{ Hz}$). Aucun réarrangement du type de celui envisagé n'est donc observé. La séquence des réactions décrites permet donc bien d'obtenir des analogues de glucose-6 phosphate substitués sur la seule position 6.

Les mêmes réactions réalisées à partir du méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl α -D-glucopyranoside **13** ont permis d'accéder à une seconde série de dérivés (**15** à **24**) analogues de ceux de la première série.

Tests d'Inhibition de l'Hexokinase

Le principe de ces tests repose sur la mesure du taux d'inhibition par un composé donné de la réaction de phosphorylation du glucose, réaction elle-même suivie par l'oxydation enzymatique du glucose-6-phosphate obtenu, en 6-phospho-gluconate. Cette seconde réaction nécessite un équivalent de NAD^+ dont la consommation

TABLEAU I
Test d'inhibition de l'hexokinase (HK) par des analogues du glucose-6-phosphate

Composé OH	8	9	10	11	12
HK levure	—	—	3/55	—	—
HK trypanosome	3/25	3/35	3/27	non mesurable	3/40
Composé OMe	20	21	22	23	24
HK levure	—	—	—	—	—
HK trypanosome	3/24	0.2/40	—	—	—

—: inhibition faible ou nulle à la concentration de 3 mM

est suivie en spectroscopie UV. Le détail de ces déterminations est décrit dans un article à paraître.²⁰ Deux enzymes de sources différentes ont été utilisées: hexokinase de levure disponible dans le commerce, et hexokinase de trypanosome dont l'extraction et la purification ont été décrites,²¹ ceci afin de mettre en évidence une éventuelle sélectivité des produits étudiés. Les valeurs du Tableau I donnent les résultats obtenus. Ces valeurs sont exprimées sous forme de fraction, le numérateur correspondant à la concentration utilisée, le dénominateur à l'activité enzymatique résiduelle. Ainsi le rapport 3/25 correspond à 75% d'inhibition de l'enzyme pour une concentration de 3 mM en inhibiteur. Les deux résultats majeurs qui se dégagent de cette étude sont les suivants:

—dans les cas où les deux mesures ont pu être effectuées, l'hexokinase de trypanosome se montre plus sensible à l'action de l'inhibiteur que l'enzyme de levure. Ceci ne correspond pas à une dégradation de l'enzyme puisqu'il a été vérifié qu'une activité normale peut être rétablie après élimination de l'inhibiteur par dialyse;

—parmi les deux séries de molécules étudiées, les composés de type thio-phosphoro-amidate **9** et **21** sont ceux donnant à la fois la meilleure sélectivité et également la meilleure activité sur l'enzyme du trypanosome. Le mode d'action de cet inhibiteur ainsi que les raisons de cette sélectivité font l'objet d'une étude en cours.²⁰

Le but du présent travail était de présenter les problèmes spécifiques posés par la phosphorylation de polyols tels que les oses et de décrire la synthèse d'un certain nombre d'inhibiteurs potentiels originaux.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les solvants employés sont préalablement séchés, distillés et conservés à l'abri de toute trace d'humidité. Toutes les opérations sont effectuées sous atmosphère inerte (azote ou argon).

Les points de fusion sont mesurés sur appareil Buchi.

Les spectres IR sont réalisés sur appareil Perkin-Elmer modèle 1610 IR à Transformée de Fourier. Les spectres de RMN proton et phosphore sont effectués sur appareil Bruker 90 MHz FT. Les déplacements chimiques sont exprimés en p.p.m.

Les produits de départ glucose, méthyl α -D-glucopyranoside, thioclorure de phosphore, chlorodiéthyl-phosphite et tri-isopropyl-phosphite, sont des produits Aldrich.

Synthèse du 1,2,3,4-tétra-O-acetyl-6-diéthyl-thiophosphate-β-D-glucopyranoside 3. A 660 mg (4.2 mM) de chlorodiéthylphosphite dans 10 ml d'éther anhydre, à -10 °C, sous courant d'argon et sous agitation, on ajoute goutte à goutte une solution de 1.4 g (4 mM) de 1²² et 600 mg (6 mM) de triéthylamine dans 20 ml d'éther anhydre. Après la fin de l'addition le mélange est agité durant 4 h à température ambiante. On ajoute 160 mg (0.62 mM) de soufre et le mélange est encore agité 12 h à température ambiante. Après avoir éliminé le chlorhydrate de triéthylamine par filtration, le filtrat est lavé à l'eau (2 × 15 ml), séché sur sulfate de sodium anhydre puis évaporé à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (30 g) élue par du dichlorométhane. On obtient 900 mg (45%) de 3, huile jaune pâle.

R_F (dichlorométhane): 0.39; νfilm 2970 (C—H), 1750 (C=O), 1020 (P—O—C), 835 (P=S) cm⁻¹; r.m.n. ¹H (CDCl₃): δ 1.3 (*t*, 6H, CH₃), 2.05, 2.10, 2.13, 2.18 (4s, 12H, COCH₃), 3.83–4.40 (*m*, 7H, H-5, 6 et CH₂), 5.1–5.3 (*m*, 3H, H-2,3,4) 5.76 (*d*, 1H, J_{1,2} = 8 Hz, H-1); r.m.n. ³¹P (CDCl₃): δ 68.5.

Synthèse du 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-O-Methyl-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate-β-D-glucopyranoside 4. 4 est préparé à partir de 1g (2.85 mM) de 1, 0.56 g (3 mM) de chloro-méthyl-N-disisopropyl-phosphite¹⁸ et 0.115 g (0.45 mM) de soufre en utilisant le même procédé que pour le composé 3. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (30 g) élue par du dichlorométhane. On obtient 900 mg (58%) de 4, huile jaune pâle.

R_F (dichlorométhane): 0.38; νfilm 2960 (C—H), 1750 (C=O), 1030 (P—O—C), 800 (P=S) cm⁻¹; r.m.n. ¹H (CDCl₃): δ 1.10 (*d*, 12H, CH₃), 1.84, 1.87, 1.89, 1.93 (4s, 12H, COCH₃), 3.43–3.60 (*m*, 5H, OCH₃ et CH isopropyl), 3.67–3.89 (*m*, 3H, H-5, 6), 4.86–5.09 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.56 (*d*, 1H, J_{1,2} = 8.2 Hz, H-1); r.m.n. ³¹P (CDCl₃) δ 74.81, 73.3.

Synthèse du 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-di-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate-β-D-glucopyranoside 5. 5 est préparé à partir de 800 mg (2.3 mM) de 1, 700 mg (2.6 mM) de chloro-di-N-(diisopropyl)-phosphite¹⁹ et 108 mg (0.42 mM) de soufre, en utilisant le même procédé que pour le composé 3 ou 4. Le produit brut est cristallisé dans l'éthanol. On obtient 600 mg (43%) de 5, solide blanc.

R_F (dichlorométhane): 0.69; νKBr 2960 (C—H), 1750 (C=O), 1040 (C—O—P), 820 (P=S) cm⁻¹; r.m.n. ¹H (CDCl₃) δ : 1.16–1.33 (*m*, 24H, CH₃), 2.06, 2.10, 2.13 (*s*, 12H, COCH₃), 3.2–4.3 (*m*, 7H, H-5, 6, CH isopropyl), 4.75–5.3 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.75 (*d*, 1H, J_{1,2} = 8 Hz, H-1); r.m.n. ³¹P (CDCl₃) δ 72.4.

Synthèse du 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-thiophosphate-β-D glucopyranoside 6. A 1.21 g (7.15 mM) de thiophosphoryl chloride dans 20 ml d'éther anhydre, à -10 °C sous courant d'argon et sous agitation, on ajoute goutte à goutte une solution de 1g (2.86 mM) de 1 et 580 mg (5.72 mM) de triéthylamine dans 10 ml d'éther anhydre. On laisse revenir à température ambiante, le mélange est agité durant 15 h. On ajoute goutte à goutte 800 mg d'hydroxyde de sodium dans 6 ml d'eau. Le mélange hétérogène est agité durant 3 h à température ambiante. On sépare les deux phases, la phase aqueuse est acidifiée jusqu'à un pH de 1 puis extraite au dichlorométhane (3 × 10 ml). Ces phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporées à sec. Le résidu est cristallisé dans un mélange dichlorométhane éthanol (70–30). On obtient 650 mg (51%) de 6, solide blanc.

R_F (éthanol, acide acétique, eau, 9-1-1): 0.67; νKBr 3150 (O—H), 2960 (C—H), 1758 (C=O), 823 (P=S) cm⁻¹; r.m.n. ¹H (CDCl₃) δ: 1.97, 2.00, 2.13 (*s*, 12H, COCH₃), 3.9–4.2 (*m*, 3H, H-5, 6), 5.00–5.15 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.73 (*d*, 1H, J_{1,2} = 8 Hz, H-1); r.m.n. ³¹P (CDCl₃) δ: 55.3.

Synthèse du 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-desoxy-6-di-isopropylphosphonate-β-D-glucopyranoside 7. Un mélange de 1g (2.34 mM) de 2²³ et de 2.43 g (11.7 mM) de triisopropyl phosphite est chauffé à reflux durant 6 h. Le bromure d'isopropyle est éliminé par un courant d'argon au fur et à mesure qu'il se forme. L'excès de phosphite est éliminé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (40 g) élue par du dichlorométhane. On obtient 970 mg (83%) de 7, huile jaune-pâle.

R_F (dichlorométhane): 0.73; ν film 2981, 2927 (C—H), 1762 (C=O), 1219 (P=O), 1006 (P—O—C) cm^{-1} ;

r.m.n. ^1H (CDCl_3) δ : 1.35 (*d*, 12H, *J* 7Hz, CH_3), 2.06–2.13 (*m*, 14H, H-6, COCH_3), 4.4–5.6 (*m*, 6H, H-2,3,4,5, CH isopropyl), 5.8 (*d*, 1H, *J*_{1,2} = 8 Hz, H-1);

r.m.n. ^{31}P (CDCl_3) δ : 24.0.

Synthèse du 6-diéthyl-thiophosphate-D-glucose 8. A une solution de 500 mg (1 mM) de **3** dans 5 ml de méthanol anhydre, on ajoute 1 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (15 g) éluée par un mélange dichlorométhane-éthanol (85–15). On obtient 300 mg (90%) de **8**, huile jaune-pâle.

R_F (dichlorométhane-éthanol, 85–15): 0.36; ν film 3400 (O—H), 2983, 2934, 2906 (C—H), 817 (P=S) cm^{-1} ;

Analyse calculée pour $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{PS}$: C, 36.14; H, 6.32; trouvée C, 36.19; H, 6.76.

Synthèse du 6-O-méthyl-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate-D-glucose 9. A une solution de 700 mg (1.3 mM) de **4** dans 7 ml de méthanol anhydre, on ajoute 1.4 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (15 g) éluée par un mélange dichlorométhane-éthanol (80–20). On obtient 420 mg (86%) de **9**, huile jaune-pâle.

R_F (dichlorométhane, éthanol 80–20): 0.69; Spectre de masse DCI/NH_3 : MH^+ , 373; $\text{MH}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$, 356; ν film 3368 (O—H), 2972, 2943 (C—H), 1010 (P—O—C), 801 (P=S) cm^{-1} ;

Analyse calculée pour $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{NO}_7\text{PS}$: C, 41.82; N, 3.75; H, 7.50; trouvée C, 41.50; M, 3.46; H, 7.68.

Synthèse du 6-di-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate-D-glucose 10. A une solution de 500 mg (0.82 mM) de **5** dans 5 ml de méthanol anhydre, on ajoute 1 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'Amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (12 g) éluée par un mélange dichlorométhane-éthanol (85–15). On obtient 280 mg (77%) de **10**, huile jaune-pâle.

R_F (dichlorométhane, éthanol 85–15): 0.4; ν film 3368 (O—H), 2969, 2933 (C—H), 1004 (P—O—C), 824 (P=S) cm^{-1} ;

Analyse calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$ 0.5 H_2O : C, 47.89; H, 8.86; N, 6.21; trouvée C, 47.92; H, 8.71, N, 6.21.

Synthèse du 6-thiophosphate de sodium-D-glucose 11. A 400 mg (0.9 mM) de **6** dans 2 ml de méthanol anhydre, on ajoute 5 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre); on agite à température ambiante durant 15 min. Le produit précipité est filtré. On obtient 190 mg (66%) de **11**, solide gris-jaune.

R_F (acétate d'éthyle, acide acétique, méthanol, eau 4-4-4-2): 0.39; ν film 3384 (O—H), 1016 (C—O—P), 7.96 (P=S);

r.m.n. ^{31}P δ 45.31;

Analyse calculée pour $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{Na}_2\text{O}_8\text{PS}$, 3 H_2O : C, 19.25; H, 4.54; trouvée C, 19.31; H, 4.43.

Synthèse du 6-desoxy-6-(diisopropyl)-phosphonate-D-glucose 12. A une solution de 300 mg (0.6 mM) de **7** dans 3 ml de méthanol anhydre, on ajoute 0.6 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre) on agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'Amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange dichlorométhane-éthanol (80–20). On obtient 150 mg (76%) de **12**, huile jaune.

R_F (dichlorométhane, éthanol 80–20): 0.31; ν film 3338 (OH), 2981, 2927 (C—H), 1219 (P=O), 1006 (P—O—C);

Analyse calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{P}$: C, 43.9; H, 7.6; trouvée C, 43.73; H, 7.67.

Synthèse du méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-diéthyl-thiophosphate α -D-glucopyranoside 15. **15** est préparé à partir de 1.65 g (5.15 mM) de **13**,²⁴ 850 mg (5.40 mM) de chloro-diéthylphosphite et 206 mg (0.80 mM) de soufre, en utilisant le même procédé que pour le composé **3**. Le produit brut est purifié par

chromatographie sur colonne de silice (50 g) éluée par du dichlorométhane. On obtient 1.1 g (45%) de **15**, solide blanc.

R_F : 93 °C; R_f (dichlorométhane): 0.4; ν KBr: 2970 (C—H), 1750 (C=C), 1025 (P—O—C), 835 (P=S);

r.m.n. ^1H (CDCl_3): δ 1.3 (*t*, 6H, CH_3), 2, 2.06, 2.10 (*s*, 9H, COCH_3), 3.4 (*s*, 3H, O— CH_3); 3.83–4.40 (*m*, 7H, H-5,6, CH_2 éthyl), 4.75–5.20 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.4 (*d*, 1H, $J_{1,2} = 10$ Hz, H-1).

r.m.n. ^{31}P (CDCl_3) δ 68.32.

Synthèse du méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-méthyl-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate- α -D-glucopyranoside 16. **16** est préparé à partir de 1.7 g (5.3 mM) de **13**, 1.1 g (5.6 mM) de chloro-méthyl-N-(diisopropyl)-phosphite et 214 mg (0.83 mM) de soufre, en utilisant le même procédé que pour le composé **3**. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (50 g) éluée par du dichlorométhane). On obtient 1.3 g (48%) de **17**, huile jaune-pâle.

R_F (dichlorométhane): 0.44; ν film: 2980 (C—H), 1750 (C=O), 1030 (P—O—C), 800 (P=S) cm^{-1} ;

r.m.n. ^1H (CDCl_3): δ 1.26 (*d*, 12H, CH_3), 2.03, 2.06, 2.10 (*s*, 9H, COCH_3), 3.43 (*s*, 3H, C—O— CH_3), 3.45–4.23 (*m*, 8H, H-5,6, P—O— CH_3 , CH isopropyl), 4.75–5.20 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.4 (*d*, 1H, $J_{1,2} = 10$ Hz, H-1)

r.m.n. ^{31}P : δ 73.14, 73.99.

Synthèse du méthyl-2-3-4-tri-O-acétyl-6-di-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate- α -D-glucopyranoside 17. **17** est préparé à partir de 1g (3.12 mM) de **13**, 890 mg (3.3 mM) de chloro-di-N-(diisopropyl)-phosphite et 145 mg (0.56 mM) de soufre, en utilisant le même procédé que pour le composé **2**. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (35 g) éluée par du dichlorométhane. On obtient 850 mg (47%) de **16**, huile jaune pâle.

ν film: 2980 (C—H), 1750 (C=O), 1040 (C—O—P), 820 (P=S) cm^{-1} ;

r.m.n. ^1H : 1.3 (*m*, 24H, CH_3), 2.0, 2.06 (*s*, 9H, COCH_3), 3.46 (*s*, 3H, O— CH_3), 3.47–4.30 (*m*, 7H, H-5,6, CH isopropyl), 4.6–5.2 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5.43 (*d*, 1H, $J_{1,2} = 8$ Hz, H-1).

Synthèse du méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-thiophosphate- α -D-glucopyranoside 18. **18** est préparé à partir de 920 mg (2.86 mM) de **13** et 1210 mg (7.15 mM) de thiophosphoryl chloride, en utilisant le même procédé que pour le composé **6**. Le produit brut est cristallisé dans un mélange dichlorométhane-éthanol (70–30). On obtient 540 mg (45%) de **18**, solide blanc.

R_F (éthanol, acide acétique 95–5): 0.51; ν KBr 3150 (OH), 2980 (C—H), 1750 (C=O), 820 (P=S);

r.m.n. ^{31}P (CDCl_3): δ 54.82.

Synthèse du méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-6-desoxy-6-diéthylphosphonate- α -D-glucopyranoside 19. **19** est préparé à partir de 1.3 g (3.25 mM) de **14²⁵** et 2.5 g (15 mM) de triéthyl phosphite, en utilisant le même procédé que pour le composé **7**. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (40 g) éluée par un mélange dichlorométhane-éthanol (95–5). On obtient 1.15 g (77%) de **19**, huile jaune.

R_F (dichlorométhane-éthanol 90–10): 0.6; ν KBr: 2990 (C—H), 1750 (C=O), 1230 (P=O), 1020 (P—C) cm^{-1} ;

r.m.n. ^1H : δ 1.36 (*t*, 6H, CH_3), 2.0–2.10 (*m*, 11H, H-6, COCH_3), 3.53 (*s*, 3H, O— CH_3), 3.83–4.43 (*m*, 5H, H—S, CH_2), 4.66–5.03 (*m*, 3H, H-2,3,4), 5–4 (*d*, 1H, $J_{1,2} = 9$ Hz, H-1);

r.m.n. ^{31}P : δ 25, 78.

Synthèse du méthyl-6-di-éthyl thiophosphate- α -D-glucopyranoside 20. A une solution de 400 mg (0.85 mM) de **15** dans 4 ml de méthanol anhydre, on ajoute 0.8 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'Amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (15 g) élué sur un mélange dichlorométhane-éthanol (95–5). On obtient 250 mg (85%) de **20**, huile jaune pâle.

R_F (dichlorométhane, éthanol 90–10): 0.52; Spectre de masse DCI/NH₃: MH^+ , 347; MNH_4^+ , 364; ν film: 3392 (OH), 2985, 2910 (C—H), 1028 (P—O—C), 817 (P=S);

Analyse calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{PS}$: C, 38.15; H, 6.64 trouvée C, 37.99; H, 6.67.

Synthèse du méthyl-6-di-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate- α -D-glucopyranoside 21. A une solution de 500 mg (0.86 mM) de **17** dans 5 ml de méthanol anhydre, on ajoute 1 ml d'une solution de

méthylate de sodium 0.22 M. (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (12 g) élue par un mélange dichlorométhane-éthanol (85–15). On obtient 310 mg (79%) de **21**, solide blanc.

P_f : 154 °C; R_F (dichlorométhane-éthanol, 85–15): 0.59; ν KBr: 3400 (OH), 2967, 2932 (C—H), 1004 (P—O—C), 826 (P=S) cm^{-1} ;

r.m.n. ^{31}P : δ 71.32; analyse calculée pour $C_{19}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{PS}$: C, 50.00; H, 8.99; N, 6.14; trouvée C, 48.81; H, 8.94, N, 5.93.

Synthèse du méthyl-6-O-méthyl-N-(diisopropyl)-thiophosphoramidate- α -D-glucopyranoside 22. A une solution de 700 mg (1.36 mM) de **16** dans 7 ml dde méthanol anhydre, on ajoute 1.4 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'amberlite IR 120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (15 g) élue par un mélange dichlorométhane-éthanol (90–10). On obtient 400 mg (76%) de **22**, solide blanc.

P_f : 117 °C; R_F (dichlorométhane-éthanol, 90–10): 0.37; ν KBr: 3391 (O—H), 2972, 2942 (C—H), 1011 (P—O—C), 802 (P=S) cm^{-1} ;

Analyse calculée pour $C_{14}\text{H}_{30}\text{NO}_7\text{PS}$: C, 43.41; H, 7.75; N, 3.61; trouvée c, 43.56; H, 7.72; N, 3.47.

Synthèse du méthyl-6-thiophosphate de sodium- α -D-glucopyranoside 23. A 400 mg (0.96 mM) de **18** dans 2 ml de méthanol anhydre, on ajoute 5 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 N (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. Le produit précipité est séparé par filtration. On obtient 220 mg (69%), de **23** poudre gris-jaune.

R_F (acétate d'éthyle, acide acétique, méthanol, eau, 4-4-4-2): 0.55; ν KBr: 3425 (OH) 1017 (P—O—C), 803 (P=S) cm^{-1}

r.m.n. ^{31}P : δ 43.1;

Analyse calculée pour $C_7\text{H}_{13}\text{O}_8\text{Na}_2\text{PS}$, 1.5 H_2O : C, 23.27; H, 4.43; trouvée C, 23.40; H, 4.79.

Synthèse du méthyl-6-desoxy-6-di-éthyl-phosphonate- α -D glucopyranoside 24. A une solution de 500 mg (1.09 mM) de **19** dans 5 ml de méthanol anhydre, on ajoute 1 ml d'une solution de méthylate de sodium 0.22 M (50 mg de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre). On agite à température ambiante durant 15 min. On neutralise par de l'amberlite IR-120 (H^+). On évapore à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (15 g) élue par un mélange dichlorométhane-éthanol (75–25). On obtient 300 mg (87%) de **24**, huile jaune pâle.

R_f (dichlorométhane-éthanol, 70–30): 0.65; Spectre de masse DCI/NH₃; MH^+ , 315; ν film: 3400 (O—H), 2983, 2914 (C—H), 1214 (P=O) cm^{-1} .

RÉFÉRENCES

1. F. R. Opperdoes, R. K. Wierenga, M. E. M. Noble, W. G. S. Hol, M. Willson, D. A. Kuntz, M. Callens and J. Perie, in UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, vol. 131, N. Agabian et T. Cerami, Eds.; Alan R. Liss, New-York, 1989.
2. D. Betbeder, A. Klaebe, J. Perie, T. Baltz, *Eur. J. Med. Chem.* sous presse.
3. W. J. Ross, in "Burger's Medicinal Chemistry" (6ème Ed., New-York, Part II, chap. 20, 1979).
4. F. R. Opperdoes, in Parasitology, a global perspective, (K. S. Warren et J. S. Bowers, Ed.; Springer-Verlag, Heidelberg, 1983).
5. C. C. Wang, *J. of Med. Chem.*, **27**, 1 (1984).
6. R. E. Howells, *Parasitology*, **90**, 687 (1985).
7. D. E. Metzler, *Biochemistry*, The chemical reactions of living cells, (Academic Press, New-York 1977).
8. S. Otienko, A. K. Bhargava, E. A. Barnard, A. H. Ramel, *Biochemistry*, **14**, 2403 (1975).
9. A. Sols, G. de la Fuente, C. Villar-Palasi, C. Asencio, *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 92 (1958).
10. G. de la Fuente, R. Lagunas, A. Sols, *Eur. Biochem.*, **16**, 226 (1970).
11. A. Cohn, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 236 (1982).
12. D. W. Hutchinson, S. Masson, *IRCS Med. Sci.*, **14**, 176 (1986).
13. F. Eckstein, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **22**, 423 (1983).
14. R. Engel, *Chem. Rev.*, **77**, 349 (1977).
15. S. L. Buchwald, D. H. Plura, J. R. Knowles, *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 845 (1982).
16. P. Szabo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 919 (1989).

17. T. W. Greene, *Protective groups in organic synthesis*, (J. Wiley, New-York, 1981).
18. L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, **24**, 245 (1983).
19. A. Baceiredo, Thèse Université Paul Sabatier, no. 1157 (1984).
20. I. Riviere, M. Willson, M. Callens, J. Perie, F. Opperdoes, à paraître.
21. O. Misset, F. Opperdoes, *Eur. J. Biochem.*, **144**, 475 (1984).
22. E. A. Talley, *Methods in carbohydrate chemistry*, (Ed. R. L. Whistler, New-York, 1962), vol. II, p. 337.
23. B. S. Griffin, A. Burger, *J. Org. Chem.*, **21**, 2236 (1956).
24. D. Horton, J. H. Lauterback, *J. Org. Chem.*, **34**, 86 (1969).
25. S. Hanessian, M. M. Ponpidon, P. Lavallee, *Carbohydrate Res.*, **24**, 45 (1972).