

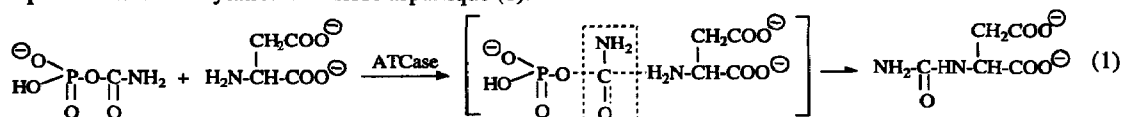
Synthèse de précurseurs d'analogues d'états de transition de réactions enzymatiques de transcarbamylation

C. Grison*, F. Charbonnier, Ph. Coutrot

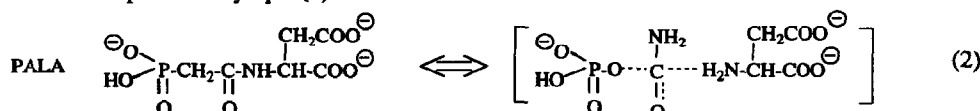
Institut Nancéien de Chimie Moléculaire, Laboratoire de Chimie Organique II, associé au CNRS, Université de Nancy I, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract : A one pot synthesis in five steps of immediate precursors of new transition state analogues of enzymatic transcarbamylation reactions, N-[(phosphinylmethyl)phosphonate]-L-aspartate and N-[(phosphinylmethyl)phosphonate]-L-ornithine is described.

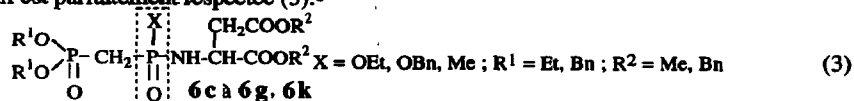
Il est connu qu'un antimétabolite peptidophosphorylé inhibiteur de l'Aspartate Transcarbamylase (ATCase), le N-phosphono-acétylaspartate (PALA), possède une efficacité anti-tumorale étonnante.¹ Son mécanisme d'action est maintenant connu ; il inhibe la première étape de la biosynthèse des nucléotides pyrimidiques qui repose sur la carbamylation de l'acide aspartique (1).²



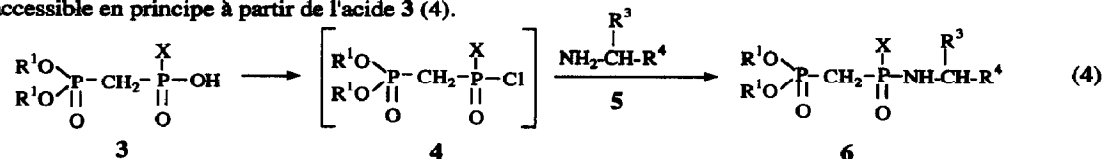
La forte activité inhibitrice du PALA observée *in vitro* est due à l'analogie structurale qu'il possède avec l'état de transition du complexe catalytique (2).³



Néanmoins, les tentatives d'applications cliniques du PALA se sont heurtées à des difficultés pharmacodynamiques semblant être dues à une pénétration insuffisante de certaines membranes biologiques.⁴ Le degré d'hydrophilie qui est en relation directe avec le degré d'ionisation étant un facteur interférant directement avec le mode de transport, différents auteurs ont synthétisé des analogues du PALA à polarité variable dans le but de faciliter leur pénétration. Cependant, dans chaque cas décrit, ces analogues du PALA ont montré une baisse d'affinité importante pour l'ATCase, *in vitro*, vraisemblablement dues à des modifications structurales non isostères.⁵ Nous décrivons ici une voie d'accès générale à des phosphonophosphoramides **6**, dont certains, **6c** à **6g**, **6k**, sont des précurseurs immédiats d'analogues du PALA de polarité variable mais beaucoup plus proches de l'état de transition de la réaction enzymatique que les analogues actuellement connus, et où la structure tétraédrique du centre réactif est parfaitement respectée (3).⁶

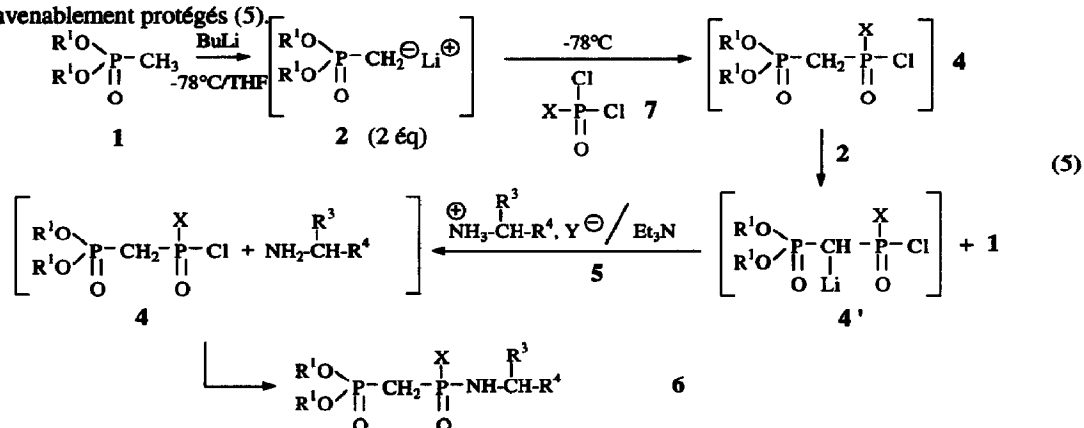


L'étape clé de la synthèse de ces précurseurs d'inhibiteurs possibles de l'ATCase, **6c** à **6g**, **6k**, et d'une manière plus générale des phosphonophosphoramides **6** repose sur l'introduction d'un motif dialkyl (phosphinylméthyl) phosphonate sur un partenaire aminé convenablement protégé **5**, via le dérivé chloré **4** accessible en principe à partir de l'acide **3** (4).



Cependant un couplage peptidique avec un acide phosphonique est en général plus délicat à réaliser qu'un couplage peptidique classique.⁷ La méthode d'activation du motif acide phosphonique la plus fréquemment utilisée est le passage au chlorure d'acide phosphonique correspondant⁸ dont la préparation s'est révélée impossible avec les acides **3**.

Conscients d'une part de la difficulté de préparation des chlorures d'acide **4** par les méthodes traditionnelles à partir de **3**, et d'autre part de l'intérêt que représentent ces intermédiaires **4** pour accéder à ces nouveaux précurseurs d'analogues du PALA, nous avons contourné cette difficulté en envisageant une stratégie nouvelle basée sur la préparation des chlorures d'acide **4** à partir de dérivés phosphorés dichlorés au départ, facilement accessibles, et leur couplage direct, *in situ*, et sans qu'il soit nécessaire de les isoler, avec des acides aminés convenablement protégés (**5**).



La méthode repose sur la phosphorylation d'un carbanion α -lithio méthylphosphonate, **2**,⁹ réalisée ici pour la première fois avec le dichlorophosphate d'éthyle **7** (X = EtO), le dichlorophosphate de benzyle **7** (X = BnO) ou avec le dichlorure méthylphosphonique **7** (X = Me). La différence de réactivité à basse température entre les deux atomes de chlore de **7** est suffisante pour écarter tout risque de double substitution. Ainsi, l'addition sur **7** du réactif carbanionique **2** conduit à l'obtention du composé **4** à -78°C . Ce dernier se trouve immédiatement déprotoné en **4'** suite à un échange hydrogène-métal rapide entre **4** et **2**. Il est donc nécessaire d'utiliser un excès de carbanion α -lithié **2** (2 équivalents) pour obtenir **4'** en quantité satisfaisante. A ce stade de la réaction, l'addition du mélange du partenaire aminé **5** sous sa forme commerciale de chlorhydrate (Y=Cl) ou de tosylate (Y=TsO) et de triéthylamine neutralise le milieu réactionnel en libérant, d'une part, le partenaire aminé sous sa

forme neutre et d'autre part, le chlorure d'acide 4. La réaction de couplage a alors lieu et fournit les phosphonophosphoramides 6. Après traitement à l'eau, le mélange réactionnel renferme donc deux espèces phosphorées, le phosphonate 1 utilisé en excès et le phosphonophosphoramide attendu 6. L'espèce 1 est éliminée par simple évaporation sous vide. Le phosphonophosphoramide brut 6 est alors obtenu pur.¹⁰ Les résultats présentés dans le tableau illustrent l'efficacité de la méthode qui, soulignons le, sont obtenus après cinq étapes réactionnelles ayant lieu dans le même réacteur.

Tableau

$$\begin{array}{c} \text{R}^1\text{O} \\ \diagup \\ \text{P} \\ \diagdown \\ \text{R}^1\text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{X} \\ | \\ \text{P} \\ | \\ \text{O} \end{array} - \text{NH} - \text{CH} - \text{R}^4 \quad \text{6}$$

$$\begin{array}{c} \text{R}^3 \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{R}^4 \end{array}$$

	R ¹	X	R ³	R ⁴	Rdt % <i>a,b</i>
6a	Et	EtO	iPr	COOMe	83
6b	Et	EtO	iPr	COOBn	90
6c	Et	EtO	CH ₂ COOMe	COOMe	98
6d	Et	EtO	CH ₂ COOBn	COOBn	98
6e	Et	BnO	CH ₂ COOBn	COOBn	81
6g	Bn	BnO	CH ₂ COOBn	COOBn	0
6h	Et	EtO	H	(CH ₂) ₂ CH $\begin{cases} \text{COOBn} \\ \text{NHZ} \end{cases}$	95
6i	Et	EtO	Bn	COOMe	80
6j	Et	Me	iPr	COOBn	77
6k	Et	Me	CH ₂ COOBn	COOBn	83
6l	Et	Me	H	(CH ₂) ₂ CH $\begin{cases} \text{COOBn} \\ \text{NHZ} \end{cases}$	86
6m	Et	Me	Bn	COOBn	84

a Rendements en produits bruts. *b* Structures en accord avec les données RMN ¹H et ³¹P (Bruker AC 250) et IR

La réaction est parfaitement univoque et donne d'excellents rendements. Dans les cas où X=Me, la diminution de l'électrophilie de l'atome de phosphore de 4 ralentit la réaction de couplage et nécessite une prolongation de la durée de la réaction pour atteindre des rendements satisfaisants. Dans le cas où R¹=Bn, la phosphorylation du carbanion lithié 2 échoue ; l'autocondensation du carbanion 2 étant en effet plus rapide que sa réaction sur le dichlorophosphate de benzyle 7 (X = BnO).

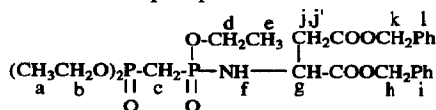
Dans chaque cas les phosphonophosphoramides 6 sont obtenus sous la forme d'un mélange des deux diastéréomères RL et SL (50/50). La réaction de couplage ne semble donc pas être soumise à une induction asymétrique. Les diastéréomères se distinguent facilement en RMN ³¹P par des déplacements chimiques nettement différents (excepté dans les cas de 6h et 6l) et donnent chacun quatre signaux (spectre de type AB où les couplages P-P sont observés). Les diastéréomères des phosphonophosphoramides 6h et 6l, qui représentent des précurseurs d'analogues de l'état de transition de l'ornithine transcarbamylase,¹¹ donnent au contraire des déplacements chimiques très voisins en RMN ³¹P pour chaque système AB.

En résumé la méthode présentée est très efficace pour la préparation des α -aminoacides modifiés **6** présentant un motif dialkyl (phosphinylméthyl)phosphonate du côté N-terminal. La grande ressemblance de certains de ces composés, après déprotection complète, avec les états de transition des réactions de transcarbamylation de l'aspartate ou de l'ornithine transcarbamylyase devrait en faire des inhibiteurs des plus performants de ce type de réaction. Il faut noter cependant que les premières tentatives de déprotection se traduisent par des réactions de coupure des liaisons C-P ou P-N en proportion importante (Me_3SiBr ou NaOH), et ne sont donc pas encore satisfaisantes. C'est pourquoi le phosphonophosphoramidate **6g** a été recherché, malheureusement sans succès. L'étude de nouvelles conditions de déblocage est en cours.

Au-delà de l'accès très efficace aux phosphonophosphoramidates **6** la méthode est aussi susceptible d'être étendue à l'introduction d'un motif diphosphonique sur toute une variété de composés comportant une fonction amine, alcool, thiol, acide, ... Elle doit également pouvoir être appliquée à la préparation directe d'analogues diphosphoniques de pyrophosphates nucléotidiques. Tous ces développements sont en cours et seront prochainement publiés.

Références et notes

1. Johnson, R.K.; Inouye, T.; Goldin, A.; Stark, G.R., *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2720-2725.
2. Collins, K.D.; Stark, G.R., *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 6599-6605.
3. Zanotti, G.; Monaco, H.L.; Foote, J., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7900-7904.
4. Courtland White, J.; Hines, L.H., *Cancer Res.* **1984**, *44*, 507-513.
5. a) Kafarski, P.; Lejczak, B.; Mastalerz, P.; Dus, D.; Radzikowski, C., *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1555-1558; b) Lindell, S.D.; Turner, R.M., *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5381-5384.
6. Coutrot, Ph.; Grison, C.; Gérardin-Charbonnier, C., *The tenth French Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry*, 13-16 sept. **1993**, Le Bischenberg, France, communication par poster.
7. a) Natchev, I.A., *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1239-1248; b) Vo-Quang, Y.; Gravey, A.M.; Simonneau, R.; Vo-Quang, L.; Lacoste, A.M.; Le Goffic, F., *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6167-6170.
8. Jacobsen, N.E.; Bartlett, P.A., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 654-657.
9. a) Biller, S.A.; Forster, C., *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6645-6658; b) Teulade, M.P.; Savignac, Ph.; Aboujaoude, E.E.; Lietge, S.; Collignon, N., *J. Organometal. Chem.* **1986**, *304*, 283-295.
10. Mode opératoire type: A une solution de 7,9 mmoles de $n\text{BuLi}$ (1,4 M, hexane) diluées dans 10 ml de THF, on additionne goutte à goutte en agitant à -78°C une solution de 7,9 mmoles de méthylphosphonate de diéthyle **1** dans 10 ml de THF. Après 30 mn d'agitation à -78°C le mélange réactionnel est transvasé goutte à goutte sous N_2 sur 3,9 mmoles de dichlorophosphate d'éthyle diluées dans 10 ml de THF et refroidies à -78°C . Le mélange est agité pendant 3 h à -78°C puis 3,9 mmoles de tosylate de l'acide aspartique **5d** mélangées à 3,9 mmoles de Et_3N dans 10 ml de THF sont introduites à -78°C . Après 1 h à -78°C le mélange réactionnel laiteux est ramené progressivement en 1 h 30 à température ambiante avant d'être traité par 10 ml d'eau. Après décantation et extractions par CH_2Cl_2 (3x15 ml) les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et évaporées d'abord à l'évaporateur rotatif puis sous un vide de 10^{-2} mm Hg à 30°C jusqu'à disparition complète en RMN ^{31}P du phosphonate **1**. On recueille ainsi un résidu brut de 2,16 g de **6d** (Rdt 98 %).



- RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm): a, e: 1,05-1,29 (m, 9 H) ; c: 2,19-2,48 (m, 2 H) ; j: 2,86 (dd, 1 H, $^3\text{J}_{\text{Hj-Hg}}$ 4,5 Hz, $^2\text{J}_{\text{Hj-Hj}}$ 16 Hz) ; j': 3,03 (dd, 1 H, $^3\text{J}_{\text{Hj'-Hg}}$ 4,5 Hz, $^2\text{J}_{\text{Hj'-Hj}}$ 16 Hz) ; b, d: 3,80-4,13 (m, 6 H) ; g: 4,25-4,45 (m, 1 H) ; h, k: 5,00 (s, 2 H) ; 5,02 (s, 2 H) ; i, l: 7,20 (s, 5 H) ; 7,22 (s, 5 H)
- RMN ^{31}P (CDCl_3) δ (ppm): 1^{er} diastéréomère: 18,81 (d, 1 P, $^2\text{J}_{\text{P-P}}$ 7 Hz) ; 21,18 (d, 1 P, $^2\text{J}_{\text{P-P}}$ 7 Hz) ; 2^{ème} diastéréomère: 18,44 (d, 1 P, $^2\text{J}_{\text{P-P}}$ 7 Hz) ; 19,10 (d, 1 P, $^2\text{J}_{\text{P-P}}$ 7 Hz).
11. Alewood, P.F.; Johns, R.B.; Hoogenraad, N.J.; Sutherland, T., *Synthesis* **1984**, 403-404.

(Received in France 25 April 1994; accepted 27 May 1994)