



HAL
open science

Préparation de prodrogues d'inhibiteurs de kinase : synthèse de phosphoramidates

Pierre Guery

► **To cite this version:**

Pierre Guery. Préparation de prodrogues d'inhibiteurs de kinase: synthèse de phosphoramidates. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02118503

HAL Id: dumas-02118503

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02118503>

Submitted on 3 May 2019

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

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



THESE

Pour obtenir le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Préparation de prodrogues d'inhibiteurs de kinase :
synthèse de phosphoramidates**

**Présentée par
Pierre GUERY**

**Soutenue publiquement le 15 Mars 2019
devant le jury composé de**

Mr Patrick DALLEMAGNE	Professeur en chimie médicinale / UFR des sciences pharmaceutiques / Caen	Président du jury
Mr Christophe ROCHAIS	Professeur en chimie organique / UFR des sciences pharmaceutiques / Caen	Directeur de thèse
Mme Nassima OUMATA	Docteur en chimie organique / Paris V	Examineur

Thèse dirigée par Pr. Christophe Rochais



Mise à jour le 10/12/2018

LISTE DES ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD

Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative et Directrice administrative adjointe

Madame Sarah CHEMTOB

Madame Alexandra HOUARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel

Physiologie, Pharmacologie

BUREAU Ronan

Biophysique, Chémoinformatique

COLLOT Valérie

Pharmacognosie

DALLEMAGNE Patrick

Chimie médicinale

DAUPHIN François

Physiologie, Pharmacologie

DELEPEE Raphaël

Chimie analytique

FABIS Frédéric

Chimie organique

FRERET Thomas

Physiologie, Pharmacologie

GARON David

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

GAUDUCHON Pascal Eméritat jusqu'au 31/08/2019

Biologie cellulaire

GIARD Jean-Christophe

Bactériologie, Virologie

MALZERT-FREON Aurélie

Pharmacie galénique

RAULT Sylvain Eméritat jusqu'au 31/08/2019

Chimie thérapeutique

ROCHAIS Christophe

Chimie organique

SCHUMANN-BARD Pascale

Physiologie, Pharmacologie

SICHEL François

Toxicologie

SOPKOVA Jana

Biophysique, Drug design

VOISIN-CHIRET Anne-Sophie

Chimie médicinale



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR

Biochimie, Toxicologie

BOUET Valentine – HDR

Physiologie, Pharmacologie

CAILLY Thomas – HDR

Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe – HDR

Biologie cellulaire et moléculaire,

Biochimie, Cancérologie

DHALLUIN Anne

Bactériologie, Virologie, Immunologie

ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR

Parasitologie, Mycologie médicale

GROO Anne-Claire

Pharmacie galénique

KIEFFER Charline

Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier)

Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine

Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre – HDR

Santé publique

LECHEVREL Mathilde – HDR

Toxicologie

LEGER Marianne

Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban – HDR

Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique

Parasitologie, Mycologie médicale,

Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni

Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima

Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah

Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie – HDR

Education thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme

Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe

Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc

Chimie analytique

VILLEDIEU Marie

des cancers

Biologie et thérapies innovantes

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie

Anglais



PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume

Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick

Pharmacie officinale

RICHARD Estelle

Pharmacie officinale

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements :

J'exprime tout d'abord mes sincères remerciements au Professeur Hervé Galons pour m'avoir accueilli, encadré et conseillé pour mes travaux de recherche aboutissant à cette thèse. Je tiens également à le remercier pour sa disponibilité, ses encouragements et sa gentillesse.

Je remercie tout particulièrement Mademoiselle le Professeur Nassima Oumata pour sa confiance et son investissement sans faille dans ce travail. Je resterai très reconnaissant du calme et de la patience dont elle a fait preuve lorsque je l'accablais de mes questions quotidiennement.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Christophe Rochais, professeur à la faculté des sciences pharmaceutiques de Caen, pour avoir accepté d'être directeur de cette thèse d'exercice : sa disponibilité et ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Patrick Dallemagne, professeur lui aussi à la faculté des sciences pharmaceutiques de Caen, de me faire l'honneur de présider le jury.

Je remercie profondément mon collègue de laboratoire et ami, Monsieur Antoine Tunas, pour son savoir-faire et sa bonne humeur pendant ces travaux.

Enfin, je remercie ma famille et mes proches qui m'ont soutenu et donc, quelque part, qui ont participé à cette thèse.

Table des matières

Abréviations :.....	7
1. Introduction :.....	10
A. Le rein :.....	11
1) Anatomie :.....	12
2) Physiologie :.....	12
B. La polykystose rénale :.....	17
1) La polykystose rénale autosomique dominante :.....	19
2) Prise en charge :.....	24
3) Avancées et pistes thérapeutiques :.....	26
C. Les protéines kinases :.....	30
1) Généralités :.....	30
2) Les kinases dépendantes des cyclines :.....	33
3) Les inhibiteurs de protéines kinases :.....	35
4) Les inhibiteurs de CDKs :.....	39
D. Prodrug (pro-médicament).....	49
1) Définition :.....	49
2) Objectifs des prodrugs :.....	49
3) Prodrugs type phosphoramidates :.....	52
2. Résultats personnels :.....	54
A. Synthèses des principes actifs :.....	54
1) Etape 1 : la benzylolation en position 6 :.....	54
2) Etape 2 : l'alkylation de la position 9 :.....	55
3) Etape 3 : l'amination en position 2 :.....	56
B. Synthèses des phosphoramidates :.....	57
C. Synthèse des prodrogues :.....	58
3. Discussion :.....	61
A. Synthèse de la (R)-Roscovitine :.....	61
B. Les prodrugs phosphoramidates et diastéréoisomérisation :.....	62
4. Evaluation biologique des prodrugs :.....	64
A. L'évaluation biologique primaire (test kinase et test cellulaire) :.....	64
1) Test kinase :.....	64
2) Test cellulaire :.....	65
B. L'évaluation biologique secondaire (pharmacocinétique) :.....	65
5. Conclusion :.....	66

6. Partie expérimentale :	67
A. Conditions générales :	67
B. Protocoles expérimentaux :	68

Abréviations :

A

AcOEt : acétate d'éthyle

ADMETox : absorption distribution
métabolisme élimination toxicité

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine di-phosphate

AMPc : adénosine mono-phosphate
cyclique

ARA II : antagoniste aux récepteurs
de l'angiotensine II

ATP : adénosine tri-phosphate

AVC : accident vasculaire cérébrale

C

CCM : chromatographie sur couche
mince

CDCl₃ : chloroforme deutéré

CDKs : kinases dépendantes de
cyclines

CMV : cytomégalovirus

D

d : doublet

DCM : dichlorométhane

DEPT : distortionless enhanced
polarization transfer

DFG : débit de filtration glomérulaire

DMSO : diméthylsulfoxyde

E

EPO : érythropoïétine

Et₂O : éther diéthylique

G

GIST : gastro intestinal stromal tumor

H

HAD : hormone anti-diurétique

HBA : hydrogen binding acceptor

HBD : hydrogen binding donor

HPV : human papilloma virus

HSV : herpes simplex virus

HTLV : human T-lymphotropic virus

I

IC₅₀ : concentration inhibitrice 50

IEC : inhibiteur de l'enzyme de

conversion

IRT : insuffisance rénale terminale

iPr : isopropyle

J

JCK : juvenile cystic kidney

L

LMC : leucémie myéloïde chronique

M

m : multiplet

MDCK : Madin-Darby canine kidney

MW : molecular weight

mTOR : mechanistic target of rapamycin

N

n-BuOH : n-butanol

NB : nota bene

NMI : N-Méthylimidazole

P

PDGF : platelet derived growth factor

PKRAD : polykystose rénale autosomique

dominante

ppm : partie par million

R

RCPGs : récepteurs couplés aux
protéines G

Rdt : rendement

RMN : résonance magnétique
nucléaire

S

s : singulet

SCF : stem cell factor

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SRAA : système

rénine-angiotensine-aldostérone

T

t : triplet

TA : température ambiante

TEA : triéthylamine

THF : tétrahydrofurane

V

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

1. Introduction :

La polykystose rénale est une pathologie génétique relativement fréquente : elle atteint une personne sur 6500. Cette maladie évolutive se traduit par l'apparition et la croissance de kystes dans les reins dans un premier temps puis parfois dans le foie. La dégradation de la fonction rénale qui s'ensuit nécessite souvent la mise sous dialyse et éventuellement une greffe de reins pour les patients.

A ce jour, il n'existe aucune thérapeutique efficace. Un produit, le Tolvaptan (ou Jinark®), est entré récemment sur le marché mais il présente d'importants effets secondaires. De nombreux essais cliniques sont encore conduits sur cette pathologie mais sans réels succès.

Deux inhibiteurs de kinases, la (*R*)-Roscovitine et le (*S*)-CR8, ont démontré une nette activité aussi bien dans des tests cellulaires que dans des modèles animaux de polykystose rénale. Ces deux molécules diminuent largement le développement des kystes rénaux ce qui permet d'en stabiliser le fonctionnement.

L'activité sur une cible biologique isolée, dans un modèle cellulaire ou animal ne sont pas des éléments suffisants pour obtenir une activité chez l'Homme et ainsi que la molécule puisse constituer un candidat médicament.

Les paramètres pharmacocinétiques tels que la biodisponibilité, le temps de demi-vie, la stabilité vis-à-vis des enzymes du métabolisme et l'exposition de l'organe cible sont des éléments essentiels qui conditionnent l'efficacité d'une molécule active.

Ainsi, le (*S*)-CR8 de par sa faible solubilité induit une toxicité digestive. Sa biodisponibilité et sa durée de vie sont limitées ; ces caractéristiques sont donc à améliorer.

L'objectif de ce travail a été d'explorer une approche de type prodrug (promédicament) de molécules actives, en vue d'une utilisation dans le cadre de la polykystose rénale. Le terme général de « prodrug » est utilisé pour des approches variées. Dans ce cadre, des phosphoroamidates seront préparée à partir de la (*R*)-Roscovitine et du (*S*)-CR8. (Fig.1) Ces deux molécules sont des inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines.

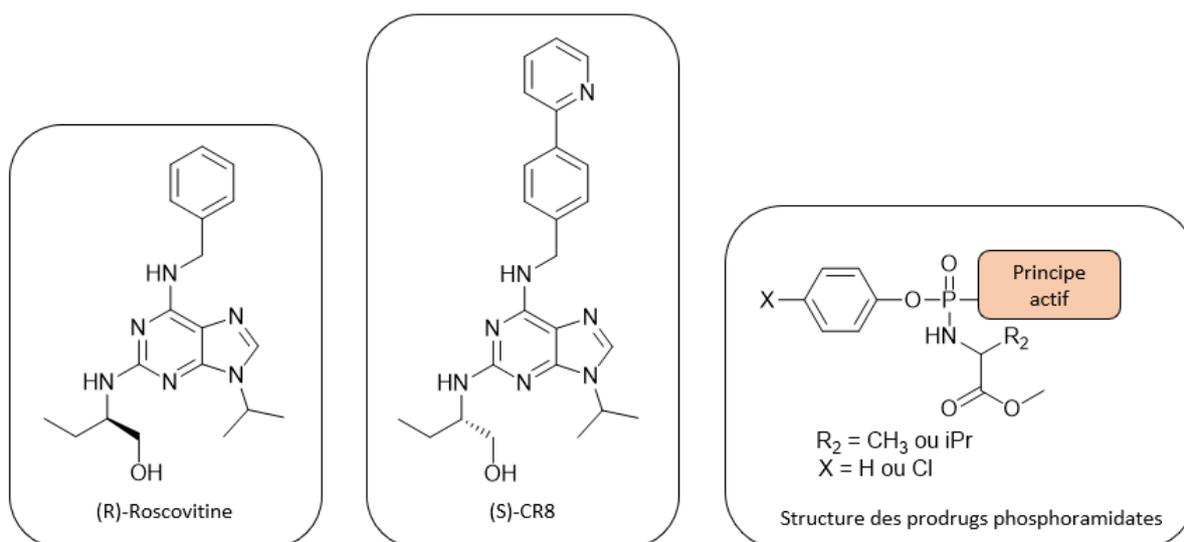


Figure 1: Structures de la (*R*)-Roscovitine, du (*S*)-CR8 et structure générale des phosphoramidates.

Cette thèse est divisée en quatre parties principales :

- La première partie présentera des éléments sur le rein ainsi que sur la mise en place et la prise en charge de la polykystose rénale. Les protéines kinases seront ensuite abordées, et plus particulièrement les protéines kinases dépendantes de cycline ainsi que certains de leurs inhibiteurs : la (*R*)-Roscovitine et le (*S*)-CR8. Enfin nous évoquerons la stratégie dites de « prodrug » à travers divers exemples avant de préciser celle qui a été utilisée au cours de ces travaux : les phosphoramidates.
- Dans la seconde partie, les inhibiteurs de kinases seront synthétisés et les prodrugs de type phosphoramidates seront préparées à partir de ces mêmes inhibiteurs de kinases.
- Puis dans un troisième temps, nous discuterons de ces résultats avant de conclure
- Enfin la partie expérimentale sera détaillée.

A. Le rein :

Les reins sont les organes touchés en premier et principalement par la PKRAD. En voici quelques notions.

1) Anatomie :

Les reins sont des organes situés de part et d'autre de la colonne vertébrale, dans la région lombaire.

Un rein humain mesure en moyenne 12 cm de longueur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. Chaque rein pèse en moyenne entre 120 à 150 grammes.

Son volume est en moyenne de 200 mL pour un homme et 150 mL pour une femme².

2) Physiologie :

Le rôle majeur des reins est de filtrer le sang, de réabsorber les substances utiles et d'éliminer les déchets dans les urines : le sang provenant de l'artère rénale est filtré, déchargé de ses déchets dans le rein puis repart via la veine rénale (Fig. 2). Les déchets ainsi récupérés sont éliminés dans l'urine, qui emprunte l'uretère pour être stockée dans la vessie³.

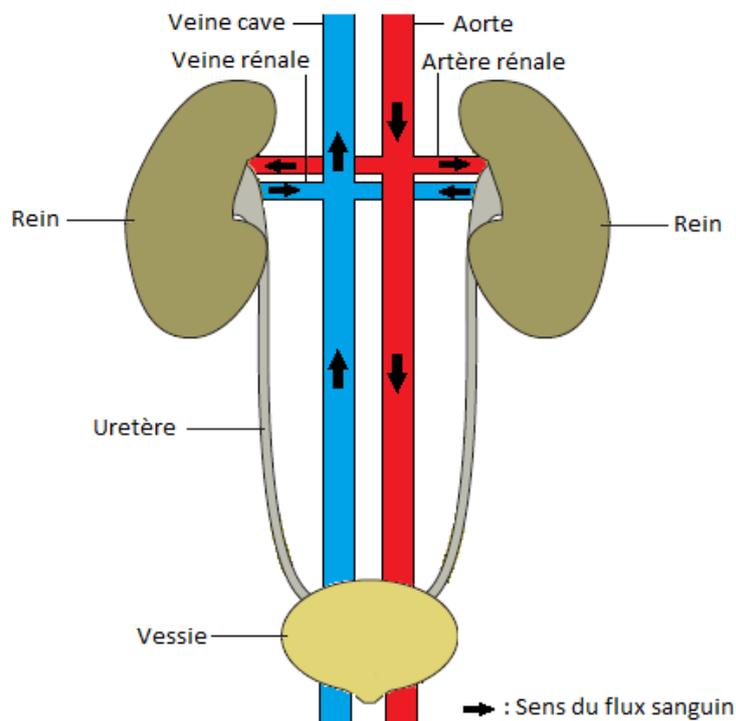


Figure 2 : schéma des reins.

Environ 180 litres de sang sont filtrés par jour, et 99 % de ce volume est réabsorbé pour émettre finalement environ 1,5 à 2 litres d'urine quotidiennement.

Au niveau interne, le rein présente deux parties : la zone corticale ainsi que la zone médullaire.

Les pyramides de Malpighi présentes entre ces deux parties contiennent les néphrons. Ces pyramides rejoignent en leurs bases les calices (=réceptacle pour le recueil de l'urine émise) qui une fois fusionnés forment le bassinnet puis l'uretère (Fig. 3).

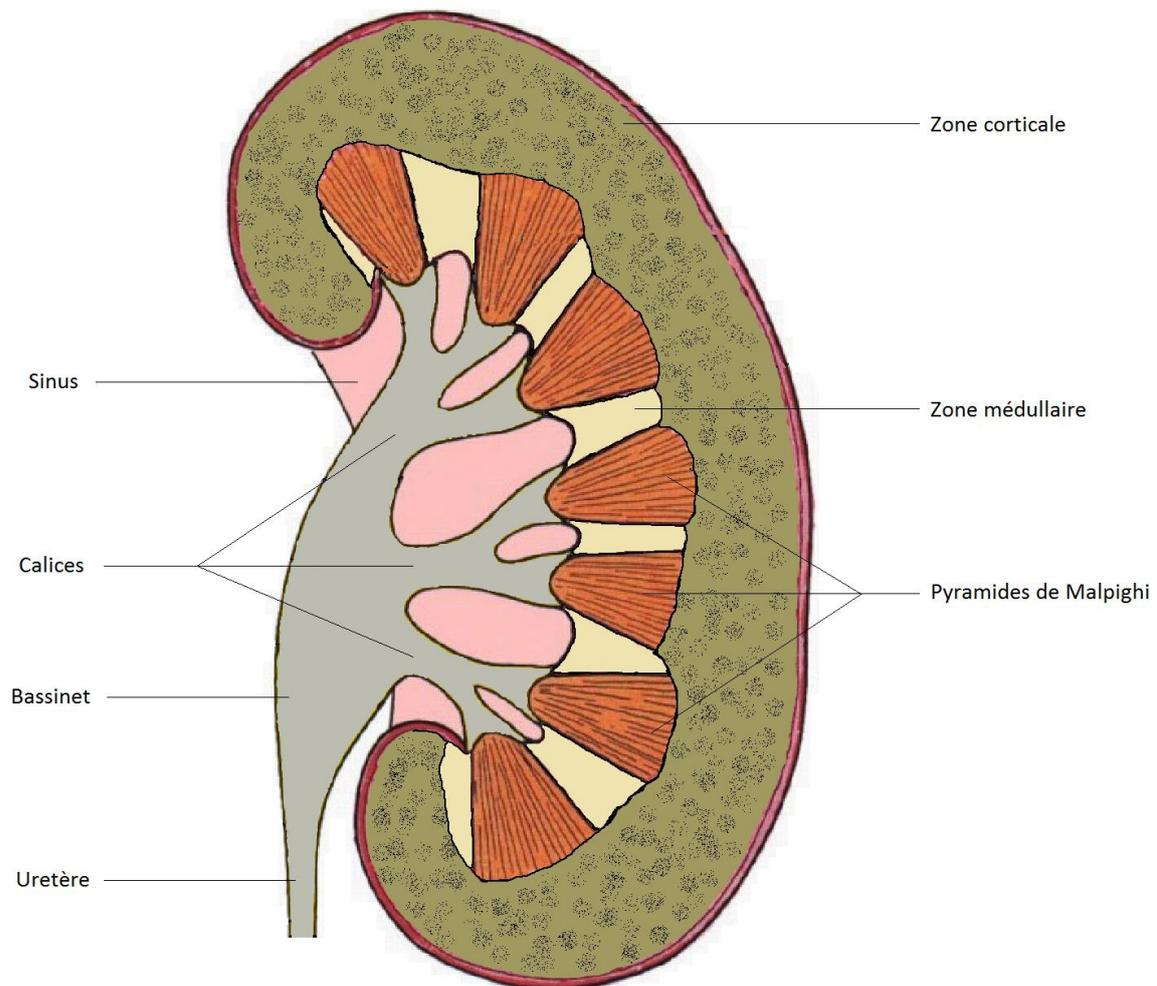


Figure 3 : schéma de la coupe d'un rein.

La zone corticale contient des pelotons de vaisseaux appelés glomérules pour permettre la filtration du sang tandis que la zone médullaire contient de petits tubes appelés néphrons (dans les pyramides de Malpighi) qui permettent la formation d'urine à partir du sang arrivant de l'artère rénale (Fig. 4).

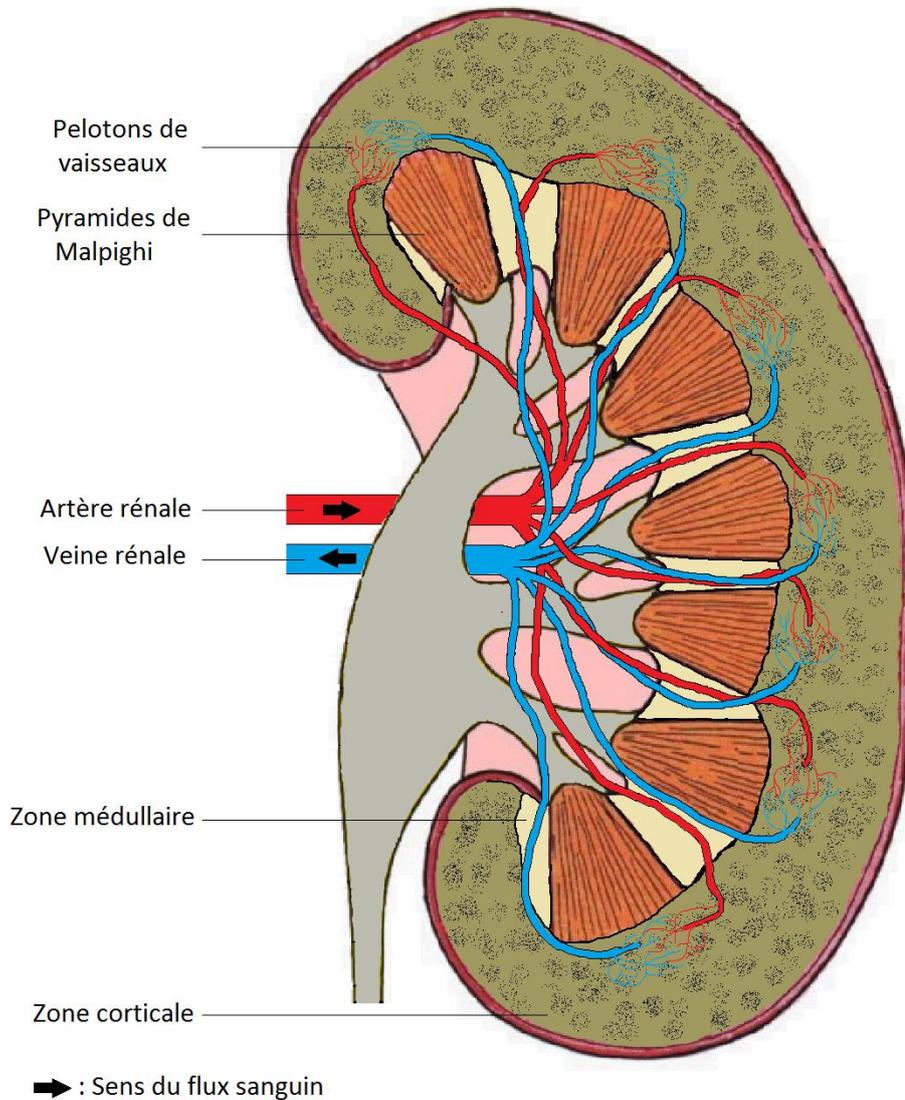


Figure 4 : schéma de l'irrigation rénale.

Chaque rein est constitué de néphrons qui en sont les unités fonctionnelles (Fig. 5).
On en compte environ un million par rein.

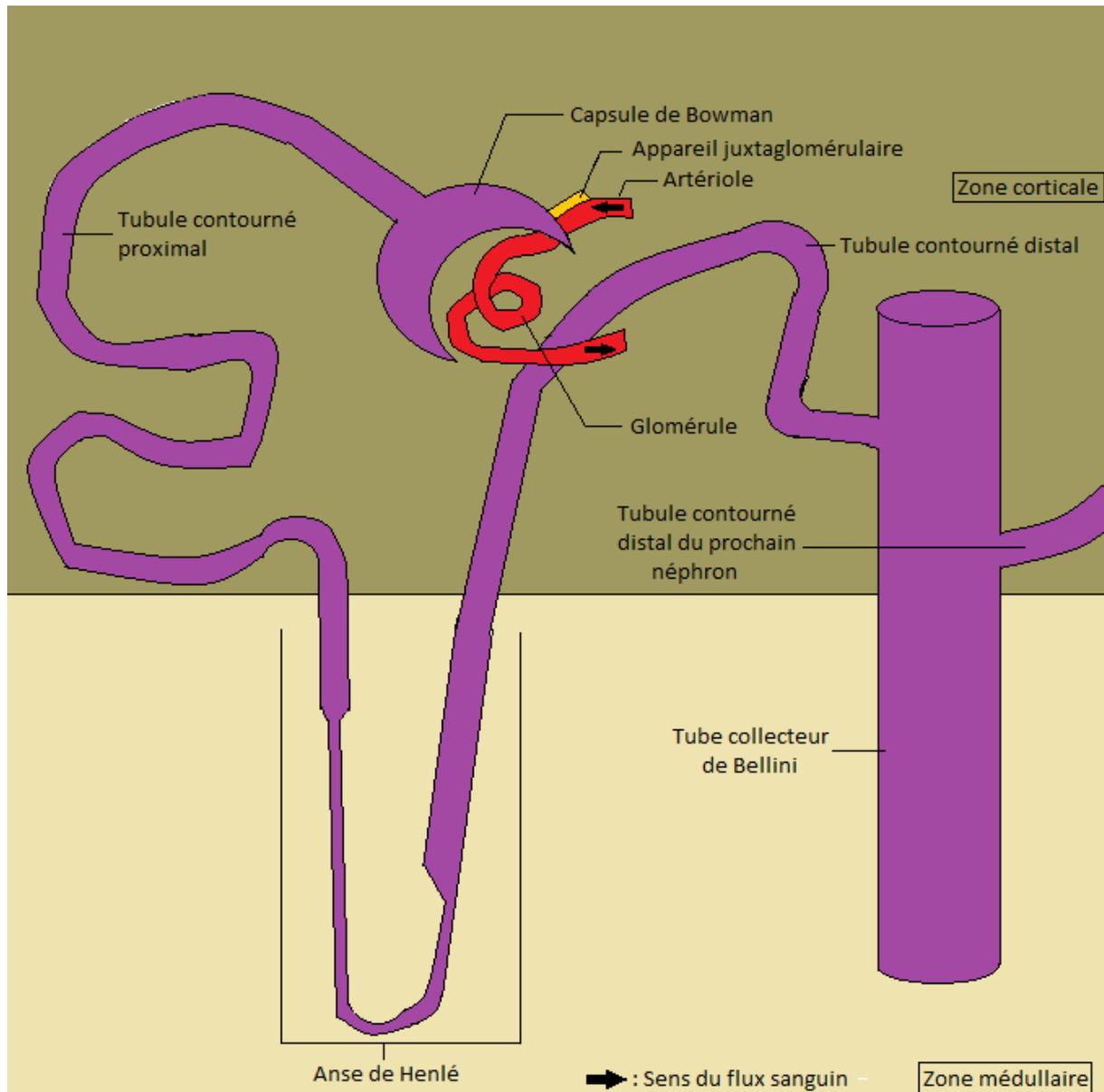


Figure 5 : Schéma d'un néphron.

Ce néphron est composé de deux parties :

- Le corpuscule rénal (ou corpuscule de Malpighi) : il est formé du glomérule (composante vasculaire) qui est le capillaire apportant le sang vers le néphron ainsi que de la capsule de Bowman (composante épithéliale) qui permet la filtration et la formation de l'urine primitive. Cette structure est caractérisée par le débit de filtration glomérulaire (= DFG, en mL/min).

- Le système tubulaire : on y retrouve le tubule contourné proximal, l'anse de Henlé et le tubule contourné distal. Cet ensemble permet par un système de réabsorption / sécrétion la formation de l'urine définitive récoltée dans le tube collecteur de Bellini (ne faisant pas partie du néphron).

Le rein a donc un rôle dans l'équilibre hydrique de l'organisme, en émettant plus ou moins d'urine en fonction des entrées d'eau quotidiennes.

Le rein assure aussi un rôle de contrôle de l'équilibre électrolytique en conservant ou éliminant différents minéraux toujours en fonction des entrées de ces derniers.

Enfin, le rein joue un rôle dans la sécrétion d'hormones ⁴ :

- Erythropoïétine (= EPO) : Synthétisée par le rein, cette hormone glycoprotéique permet de stimuler la production des hématies au niveau de la moelle osseuse.
- Calcitriol (Fig. 6) : C'est la forme hormonale active de la vitamine D. Elle permet de stimuler l'absorption de calcium et de phosphate au niveau du tube digestif, limite l'élimination du calcium par le rein en le réabsorbant et libère du calcium des os pour permettre la minéralisation osseuse et favoriser le turn-over osseux.

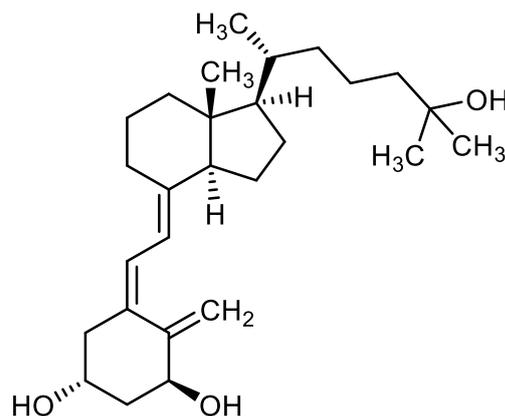


Figure 6 : structure du calcitriol.

- Rénine : Enzyme (angiotensinogenase) synthétisée par l'appareil juxtaglomérulaire quand la pression artérielle est à la baisse dans l'artériole afférente (et donc dans l'artère rénale), la rénine permet de réguler cette tension artérielle à la hausse (Fig. 7).

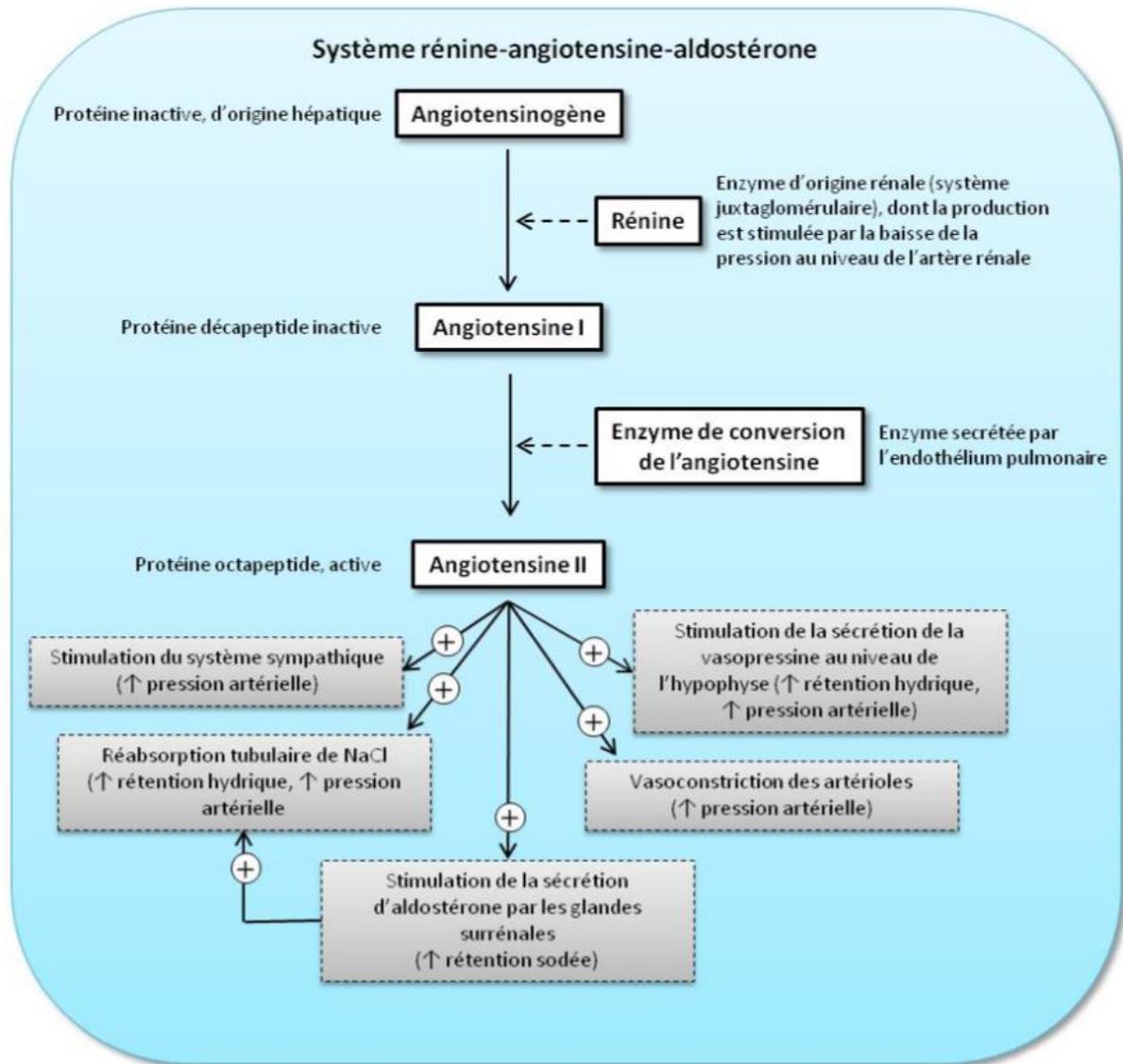


Figure 7 : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (=SRAA) ⁵.

B. La polykystose rénale :

La polykystose rénale est la plus fréquente des maladies génétiques ⁶, plus que d'autres maladies bien connues du public.

Elle consiste en l'apparition lente et progressive de kystes au sein du rein (puis sur d'autres organes comme le foie), qui en grossissant dégradent le rein et ses fonctions jusqu'à l'insuffisance rénale.

La polykystose rénale, maladie héréditaire, existe sous deux formes :

- La polykystose rénale autosomique dominante (=PKRAD) : c'est la forme la plus fréquente des polykystoses ; elle se transmet de génération en génération indépendamment du sexe : l'enfant à naître à 50% de chances d'être atteint.

La transmission autosomique signifie que l'allèle muté se trouve sur un des 22 chromosomes non sexuels du génome. Le caractère dominant implique que la présence de l'allèle muté engendre la pathologie (Fig. 8).

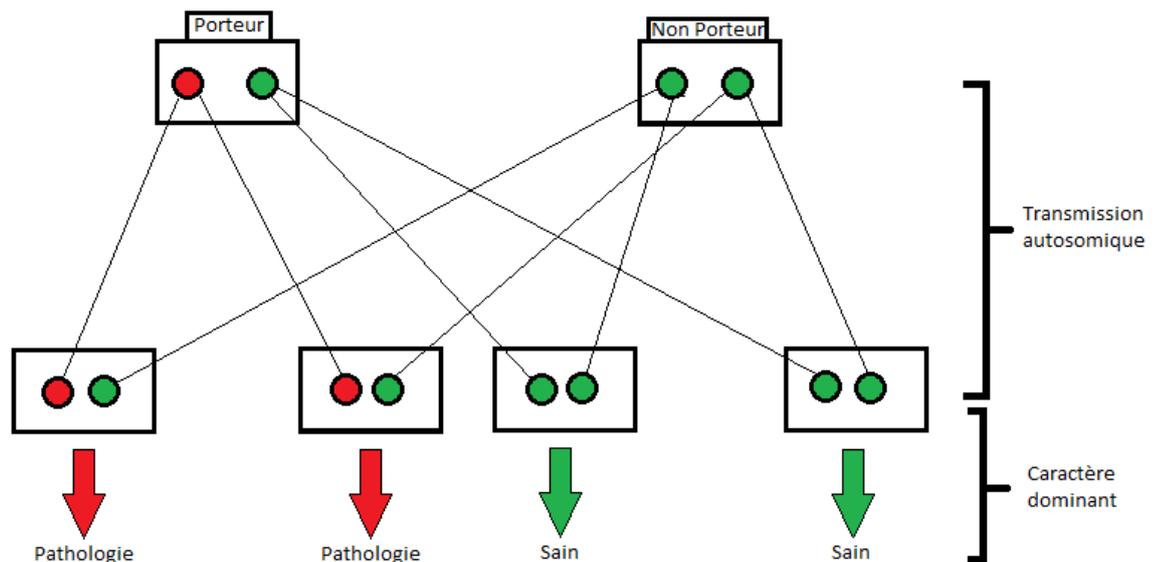


Figure 8 : Transmission autosomique dominante.

Elle se manifeste à l'âge adulte et elle est responsable d'environ 8% des insuffisances rénales terminales en France ⁷.

- La polykystose rénale autosomique récessive : c'est la forme la plus rare (nécessité d'avoir deux porteurs sains au minimum pour que la pathologie s'exprime) et la plus grave.

Le caractère récessif implique que seule la présence de deux allèles mutés engendre la pathologie (homozygotie) : cela nécessite donc que les deux parents doivent être porteurs de l'allèle muté (Fig. 9).

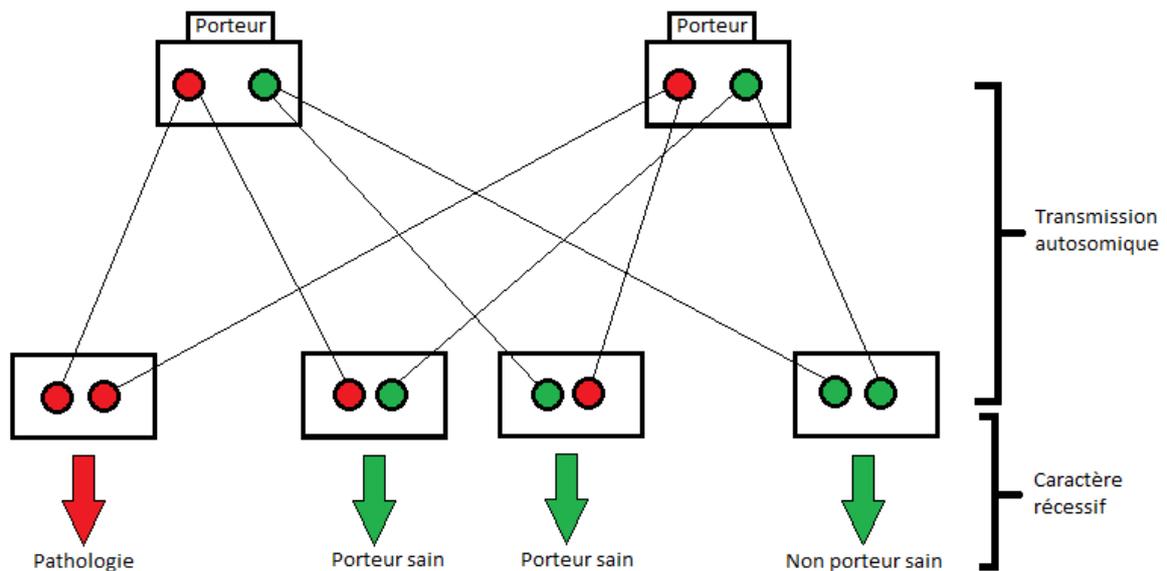


Figure 9 : Transmission autosomique récessive.

Elle affecte les enfants en bas âge (environ $1/40000^3$) avec bien souvent des conséquences mortelles à court terme.

Dans le cadre de mes travaux chez ManRos Therapeutics, nous avons cherché à développer différentes molécules contre la polykystose rénale autosomique.

1) La polykystose rénale autosomique dominante :

- *Origine génétique :*

Comme dit précédemment, la PKRAD est la plus fréquente des maladies génétiques à l'âge adulte : elle touche environ 1 personne sur 800⁷.

Cette maladie génétique peut toucher deux gènes :

- Le gène PKD1 (85% des cas) situé sur le chromosome 16 et codant pour la Polycystine-1
- Le gène PKD2 (15% des cas) situé sur le chromosome 4 et codant pour la Polycystine-2

Les fonctions de ces deux protéines sont encore floues :

- La Polycystine-1 s'apparente à un mécano-récepteur.
- La Polycystine-2 présente une homologie avec un canal calcique.

Ces deux protéines sont présentes au niveau du cil primaire des cellules tubulaires rénales ⁶ (Fig. 10).



Figure 10 : cellules tubulaires rénales et leurs cils primaires ⁸.

Le cil primaire des cellules rénales est non motile et fait office de capteur de signaux extracellulaires : il baigne dans le flux urinaire (Fig. 11).

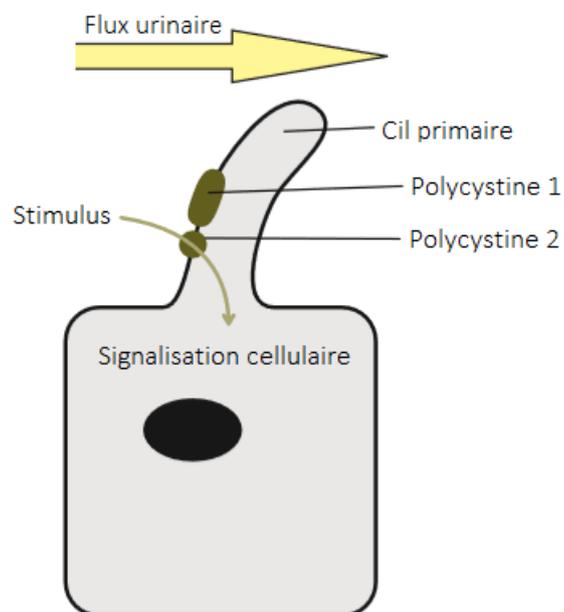


Figure 11 : Schéma de la cellule tubulaire rénale et du cil primaire ³.

Ces protéines agissent en tandem (Fig. 12) : leurs extrémités sont en contact au niveau de la membrane des cellules tubulaires, ce qui pourrait expliquer la similarité entre PKD1 et PKD2 au niveau de l'expression clinique.

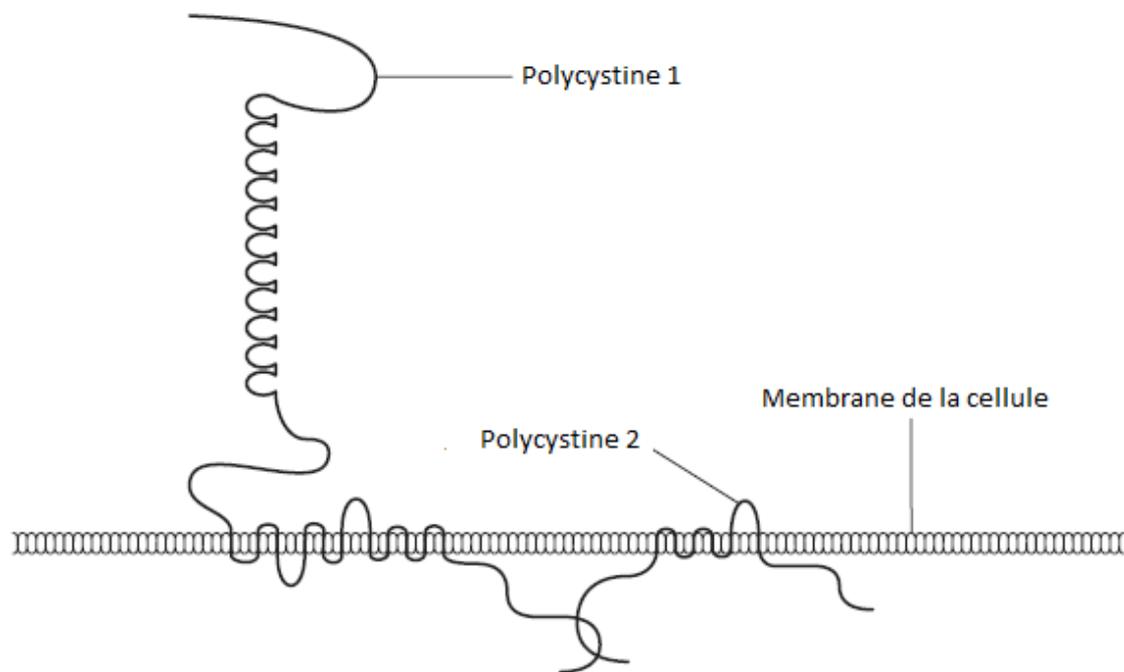


Figure 12 : Schéma des polycystines ³.

- *Expression clinique :*

C'est au niveau du rein et particulièrement du néphron que dans le cadre de la PKRAD on retrouve un développement kystique.

Chaque kyste est une cavité liquidienne bordée d'un épithélium dérivé des cellules tubulaires rénales. La croissance des kystes est liée à la prolifération de ces cellules ainsi qu'à leurs sécrétions ⁹.

Initialement de petites tailles et peu nombreux, ces derniers grossissent et se multiplient au fur et à mesure des années empêchant le bon fonctionnement des reins entre autres. Cette multiplication des kystes entraîne aussi une fibrose qui participe à la mal-fonction rénale (Fig. 13).

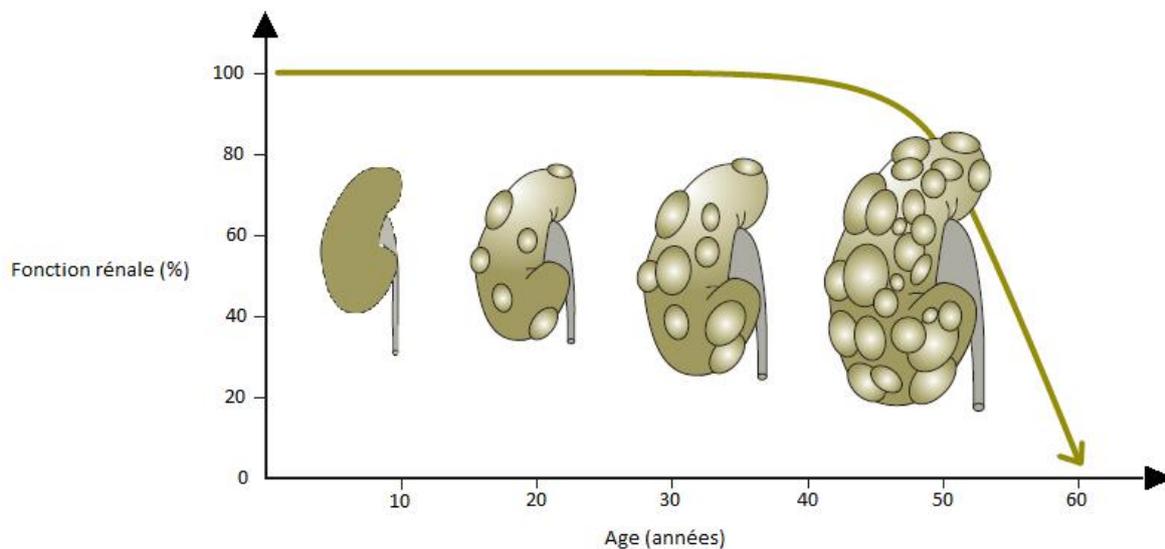


Figure 13 : Evolution de la fonction rénale en fonction de l'âge atteints de PKRAD ³.

La PKRAD est une maladie systémique et à ce titre, les manifestations cliniques sont multiples.

➤ **Manifestations kystiques :**

- **Kystes rénaux :** ils ont une évolution lente, progressive et bilatérale. La sévérité des symptômes rénaux est fonction du volume kystique.

Ils peuvent engendrer des douleurs (liées à la distension de la capsule rénale, à une hémorragie intra-kystique, à une migration lithiasique ou à une infection kystique) et/ou des hématuries macroscopiques (=visibles à l'œil nu).

L'installation des kystes détruit le parenchyme rénal sain ce qui entraîne une insuffisance rénale, complication la plus sévère de la PKRAD (Tab. 1). Le débit de filtration glomérulaire diminue d'approximativement 5 mL/min/an. (Rappel : DFG normal = 120 mL/min).

Age	Familles PKD1	Familles PKD2
< 40 ans	10 %	2 %
50 ans	40 %	10 %
60 ans	80 %	25 %
70 ans	95 %	60 %

Tableau 1 : Probabilité cumulée d'insuffisance rénale terminale ⁹.

- Kystes hépatiques : ces kystes apparaissent chez 70 % des malades et leur apparition est secondaire aux kystes rénaux. Ces kystes hépatiques sont en général asymptomatiques, la principale complication étant l'infection. Leur présence provoque une hépatomégalie qui peut compresser les organes aux alentours mais il n'y a pas d'insuffisance hépatique.
- Autres localisations kystiques : tous les organes solides intra-abdominaux peuvent présenter des kystes qui restent la plupart du temps asymptomatiques. Environ 30 % des patients présentent des kystes pancréatiques et 10 % des kystes arachnoïdiens.

➤ **Manifestations non kystiques :**

- Hypertension artérielle : elle est secondaire à une modification de vascularisation rénale liée à la présence des kystes, ce qui engendre une stimulation du SRAA. Elle apparaît plus précocement que l'insuffisance rénale (à environ 40 ans) ; elle en est d'ailleurs un facteur de progression.
- Anévrismes cérébraux : c'est une complication qui touche 10 % des patients atteints de PKRAD.
- Atteinte cardiaque : elle se déclare chez 20 % des malades et se manifeste sous différentes formes : insuffisance mitrale, insuffisance aortique, prolapsus valvulaire mitral ou encore hypertrophie ventriculaire gauche.
- Hernie inguinale : elle est plus fréquente que pour la population générale.

Quoiqu'il arrive, l'évolution de la maladie est dépendante de la protéine mutée puisque l'âge moyen de l'insuffisance rénale terminale (=IRT) varie en fonction du gène touché (Tab. 2).

	PKD1	PKD2
Fréquence	85 %	15 %
Chromosome	16	4
Protéine mutée	Polycystine-1	Polycystine-2
Age moyen de l'IRT	54 ans	69 ans

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différentes caractéristiques présentes lors des mutations dans le cadre de la PKRAD ⁹.

2) Prise en charge :

La PKRAD est un problème de santé publique : on estime que des 10 % des IRT en sont dues.

La prise en charge de cette pathologie se fait en fonction de la progression de la maladie, particulièrement en fonction de l'insuffisance rénale et de sa gravité (Tab. 3)

9.

Débit de filtration glomérulaire (mL / min)	Fonction rénale	Stade
>90	Normale	1
60-89	Insuffisance rénale légère	2
30-59	Insuffisance rénale modérée	3
15-29	Insuffisance rénale sévère	4
<15	IRT	5

Tableau 3 : Etat de la fonction rénale en fonction du DFG ⁹.

- *Avant le stade d'insuffisance rénale terminale :*

- *Prise en charge non-spécifique :*

Pour éviter les lithiases et infections, l'apport important de boissons est recommandé (environ 2 litres / jour).

Un contrôle tensionnel doit être mis en place : la tension doit être maintenue aux alentours de 130 / 80 mm Hg. Un traitement de l'hypertension artérielle (par inhibiteurs de l'enzyme de conversion (=IEC), ou par antagonistes aux récepteurs de l'Angiotensine II (=ARAII)) peut être mis en place si ces valeurs de sont pas respectées.

Un contrôle des troubles hydro-électrolytiques doit aussi être réalisé.

- *Prise en charge spécifique : le Tolvaptan (Jinark®) :*

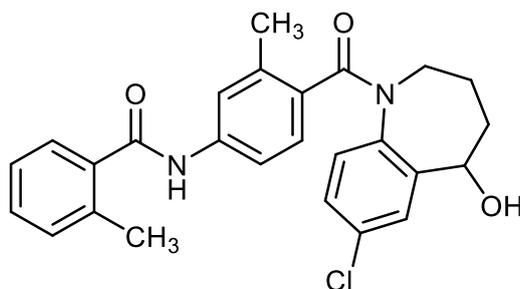


Figure 14 : structure du Tolvaptan.

Le Tolvaptan (Fig. 14) est un antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine (ou Hormone Anti-Diurétique (=HAD)) présent sur le marché depuis le 2 décembre 2015 ¹⁰. C'est un aquarétique, il permet d'augmenter l'excrétion d'eau sans augmenter l'excrétion d'autres éléments minéraux. Il inhibe la production rénale d'adénosine monophosphate cyclique (=AMPC) intracellulaire, la prolifération de cellules bordantes et la sécrétion de fluide kystique.

Il est utilisé dans la PKRAD pour diminuer la taille des reins et surtout diminuer la vitesse d'évolution de la maladie d'environ 30% ⁹.

Ce traitement peut être instauré sur une population de patients répondant à différents critères ¹¹ :

- Débit de filtration glomérulaire > 30 mL / min (N = 120 mL / min)
- Néphromégalie associée à un risque de perte de fonction rénale, *i.e.* volume > 600 mL (N= 150-200 mL) ou longueur > 16,7 cm (N= 12 cm).
- Signes d'évolution rapide de la maladie, *i.e.* soit manifestations cliniques (de type douleurs rénales, ou hémorragie ou infection ou hématuries macroscopiques), soit diminution du débit de filtration glomérulaire de 5 mL / min / an ¹⁰.

- *Au stade de l'insuffisance rénale terminale* :

Lorsque la PKRAD progresse et que l'insuffisance rénale s'installe, deux options peuvent être envisagées : la dialyse ou la transplantation rénale.

La transplantation rénale reste la meilleure solution pour recouvrer une vie autonome et évite le passage par la dialyse. Si cette transplantation n'est pas ou plus possible

(ex.: insuffisance cardiaque, antécédents de cancer, ...), c'est la dialyse qui est choisie. Elle est également mise en place pour les patients en attente d'une transplantation rénale.

➤ **La dialyse :**

C'est une technique d'épuration qui permet l'élimination des déchets de l'organisme ainsi que de l'eau. Il existe deux techniques de dialyse possibles : l'hémodialyse ou la dialyse péritonéale.

- L'hémodialyse consiste en la dérivation du sang vers un filtre d'épuration grâce à un automate de dialyse.
- La dialyse péritonéale utilise les propriétés naturelles de filtre du péritoine ; après injection d'un liquide au niveau du péritoine, le contact entre le liquide et la surface du péritoine va permettre d'attirer les déchets de l'organisme. Le liquide est ensuite extrait.

➤ **La transplantation rénale :**

Ce traitement efficace de la polykystose rénale permet de recouvrir une vie quasi normale et autonome. Elle se réalise soit à partir d'un rein sain d'une personne décédée (cas le plus fréquent), soit à partir d'un rein sain d'une personne vivante qui en fait don. Les contraintes sont liées au traitement antirejet.

3) Avancées et pistes thérapeutiques :

Comme cela se produit pour toutes les pathologies, les connaissances sur la PKRAD ont considérablement avancées au cours des quarante dernières années. Une étape majeure a été franchie lors de l'identification des polycystines 1 et 2.

Ces deux protéines codées par les PKD1 et PKD2 prennent principalement place au niveau du cil primaire de la cellule tubulaire rénale. Ce cil est lui en contact avec le flux urinaire et semble jouer un rôle très important dans la mise en place de la PKRAD.

En temps normal, le cil permet de transformer un signal mécanique (le flux urinaire) en un signal biochimique (un afflux de calcium). Ainsi, grâce aux mouvements urinaires, le cil et plus particulièrement les polycystines permettent l'entrée d'un courant calcique au sein de la cellule tubulaire (Fig. 15).

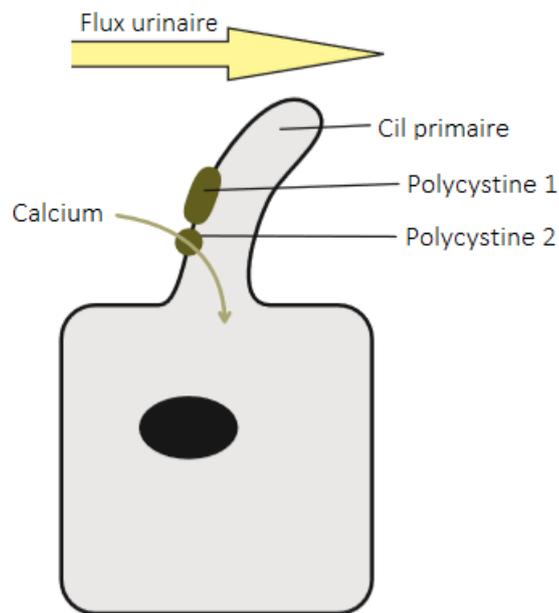


Figure 15 : Schéma de l'entrée calcique dans la cellule tubulaire rénale ³.

En effet, la polycystine 2 est un pore calcique (qui permet cet afflux) ; la polycystine 1 qui est un mécano-récepteur sensible au flux urinaire, semble transmettre un signal à la polycystine 2 pour exacerber cette entrée de calcium.

Dans le cas de la PKRAD, le taux de polycystine chute, et l'entrée calcique s'en voit diminuée : la cellule tubulaire tend à se multiplier et ce de manière incontrôlée.

Par conséquent, deux types de traitement peuvent être à priori envisagés.

- Thérapie directe : rétablir le bon fonctionnement des cils par thérapie génique serait le traitement optimal, mais cela reste pour le moment impossible.
- Thérapie indirecte : le traitement de la cause de la maladie (mutations de PKD1 et PKD2) n'étant pour le moment pas accessible, c'est les conséquences qui sont visées par la recherche et plus particulièrement la prolifération incontrôlée de cellules tubulaires rénales.

- *Les inhibiteurs de la voie mTOR (=mechanistic Target Of Rapamycine) :*

La protéine mTOR est une enzyme de la famille des sérine / thréonine kinase. Elle intervient dans les voies de signalisation au sein de la cellule et permet entre autres la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire.

Elle-même est contrôlée par différents facteurs dont les polycystines ; ainsi, quand l'activité ciliaire est normale, la protéine kinase est inhibée (ou n'a en tout cas pas d'activité décelable).

A l'inverse, il a été mis en évidence que la protéine mTOR possède une activité anormale dans le cas de la PKRAD. C'est donc pourquoi des inhibiteurs de cette protéine ont été testés : le sirolimus (Fig. 16) et l'évérolimus (Fig. 17).

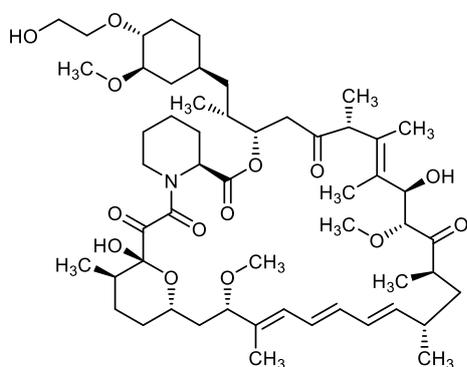


Figure 16 : Structure du sirolimus.

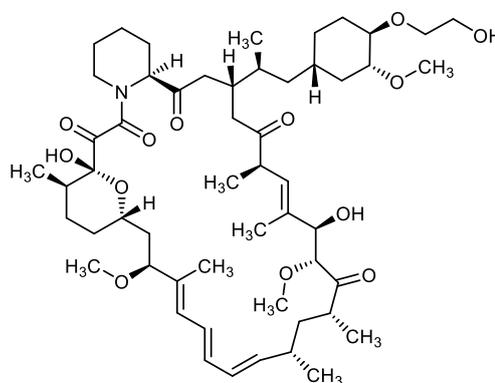


Figure 17 : Structure de l'évérolimus.

Ces deux molécules sont utilisées en temps normal dans le cadre de la prévention du rejet de greffe (car immunosuppressives) ou contre la prolifération cellulaire dans certains types de cancers (sein, rein). Testées sur des modèles animaux de polykystose, elles ont permis de freiner la croissance des kystes et l'évolution de l'insuffisance rénale.

Les essais ont par conséquent été conduit chez l'homme mais les résultats se sont avérés peu encourageants : la croissance kystique n'est que très faiblement enrailée dans le cas du sirolimus (Rapamune®) et pour l'évérolimus (Certican®), la croissance kystique est non significativement freinée en plus de l'apparition d'effets secondaires (aphtes, oedèmes, infections). De plus, les inhibiteurs de la voie mTOR ont un effet anticicatrisant par inhibition de l'angiogénèse ce qui est délétère lors de l'éclatement des kystes ³.

- *Les inhibiteurs de l'AMPc :*

L'AMPc (Fig. 18) est un second messager qui agit en tant qu'intermédiaire de différentes hormones ou neurotransmetteurs : elle agit entre l'entrée de calcium et le déclenchement de la multiplication cellulaire.

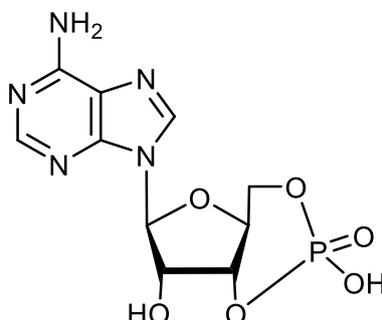


Figure 18 : Structure de l'AMPc.

Il a donc été imaginé de diminuer la quantité d'AMPc cellulaire ; pour cela, on peut agir sur les voies de deux hormones distinctes :

- La vasopressine : c'est une hormone qui permet la réabsorption hydrique au niveau du rein entraînant une concentration des urines pour conserver l'eau quand celle-ci va être amenée à manquer. Cette hormone a aussi pour conséquence de stimuler la synthèse d'AMPc intracellulaire en se fixant à ses récepteurs V2 au niveau rénal.

Par conséquent, antagoniser les récepteurs V2 de la vasopressine s'est avéré être une piste pour tenter d'éviter la prolifération cellulaire. C'est le cas du Tolvaptan ¹¹ (Fig. 14).

- La somatostatine : cette hormone qui est inhibitrice de l'hormone de croissance a entre autres effets la capacité de freiner la fabrication d'AMPc après fixation à son récepteur (famille des récepteurs couplés aux protéines G ou RCPGs).

En utilisant des analogues de la somatostatine, on peut diminuer la quantité d'AMPc intracellulaire.

L'octréotide (Fig. 19) qui est un octapeptide de synthèse est un analogue de la somatostatine utilisé pour inhiber la sécrétion pathologique de l'hormone de croissance (acromégalie, tumeurs endocrines, ...) ¹². Cette molécule a

Ainsi, à partir d'un ou de plusieurs substrats de base, les enzymes ont la capacité de diminuer l'énergie d'activation d'une réaction pour obtenir un ou des produits de cette réaction. La structure de l'enzyme est retrouvée inchangée à la suite de ce processus (Fig. 20).

Actives à faible concentration, les enzymes sont vitales à l'organisme car elles permettent la réalisation de réactions qui en leur absence nécessiteraient des temps de réaction prolongés.

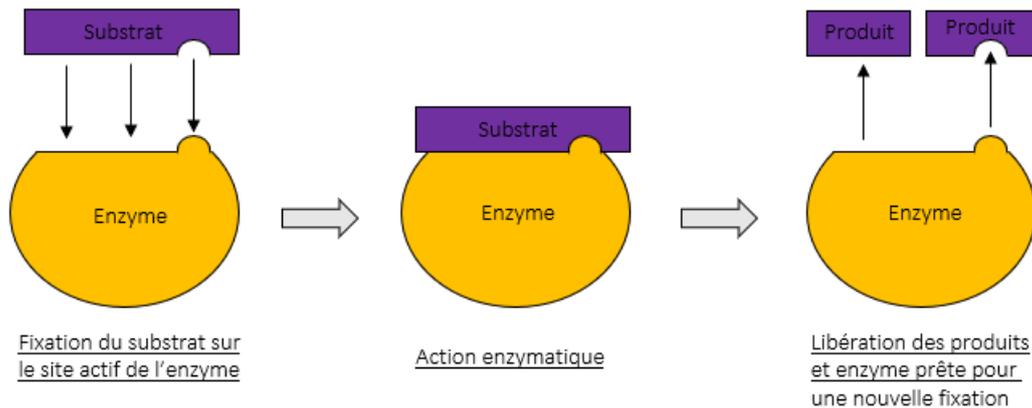


Figure 20 : Schéma de l'action d'une enzyme.

Dans le cas des protéines kinases, ce sont des enzymes capables de catalyser le transfert d'un groupement phosphate de l'adénosine tri-phosphate (=ATP) sur des substrats protéiques relarguant en parallèle l'adénosine di-phosphate (=ADP) (Fig. 21).

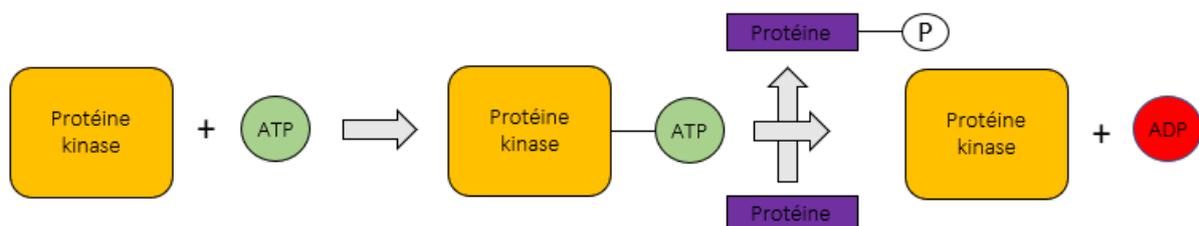


Figure 21 : Schéma de l'action des protéines kinases.

Cette phosphorylation peut avoir lieu au niveau des résidus Sérine, Thréonine et Tyrosine des protéines cibles du fait de la présence d'un -OH libre sur ces derniers (Fig. 22). Les protéines kinases sont réparties en deux groupes :

- Tyrosine kinases.
- Sérine / Thréonine kinases.

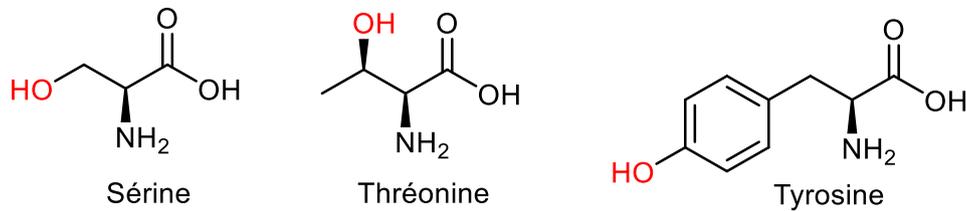


Figure 22 : Structure des résidus phosphorylables par les protéines kinases.

La phosphorylation des substrats est un mécanisme post-traductionnel connu permettant de modifier la structure de ces substrats ce qui modifie par la suite leurs fonctions.

Il existe 518 kinases humaines classées sous forme de kinome (Fig. 23) en fonction de leur homologie de structures ¹⁵.

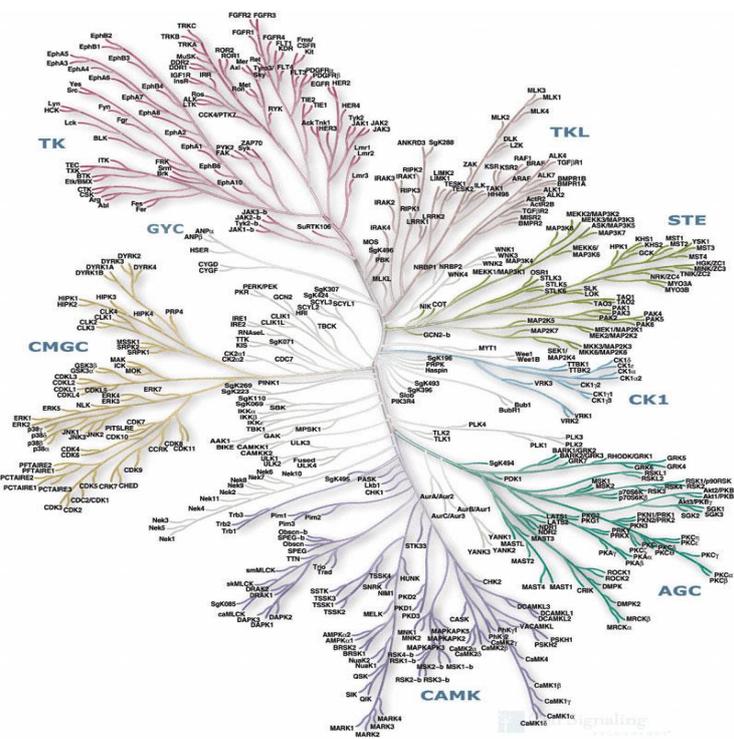


Figure 23 : Le kinome ¹⁵.

Parmi les différentes familles de kinase, on retrouve les kinases dépendantes des cycline (=CDKs) qui ont été particulièrement travaillées en raison de leurs rôles dans les pathologies prolifératives.

2) Les kinases dépendantes des cyclines :

Depuis leurs découvertes en 1987 par Paul Nurse, Leland H. Hartwell, et Sir Tim Hunt (nobellisés en 2001) ¹⁶, l'intérêt pour les kinases dépendantes des cyclines n'a fait que grandir.

Ces enzymes possèdent différentes caractéristiques (Fig. 24) :

- Elles exercent leur rôle de phosphorylation seulement sur les résidus Sérine et Thréonine de leurs substrats cibles.
- Elles nécessitent l'association d'une sous-unité régulatrice généralement appelée cycline pour exercer leur activité enzymatique.

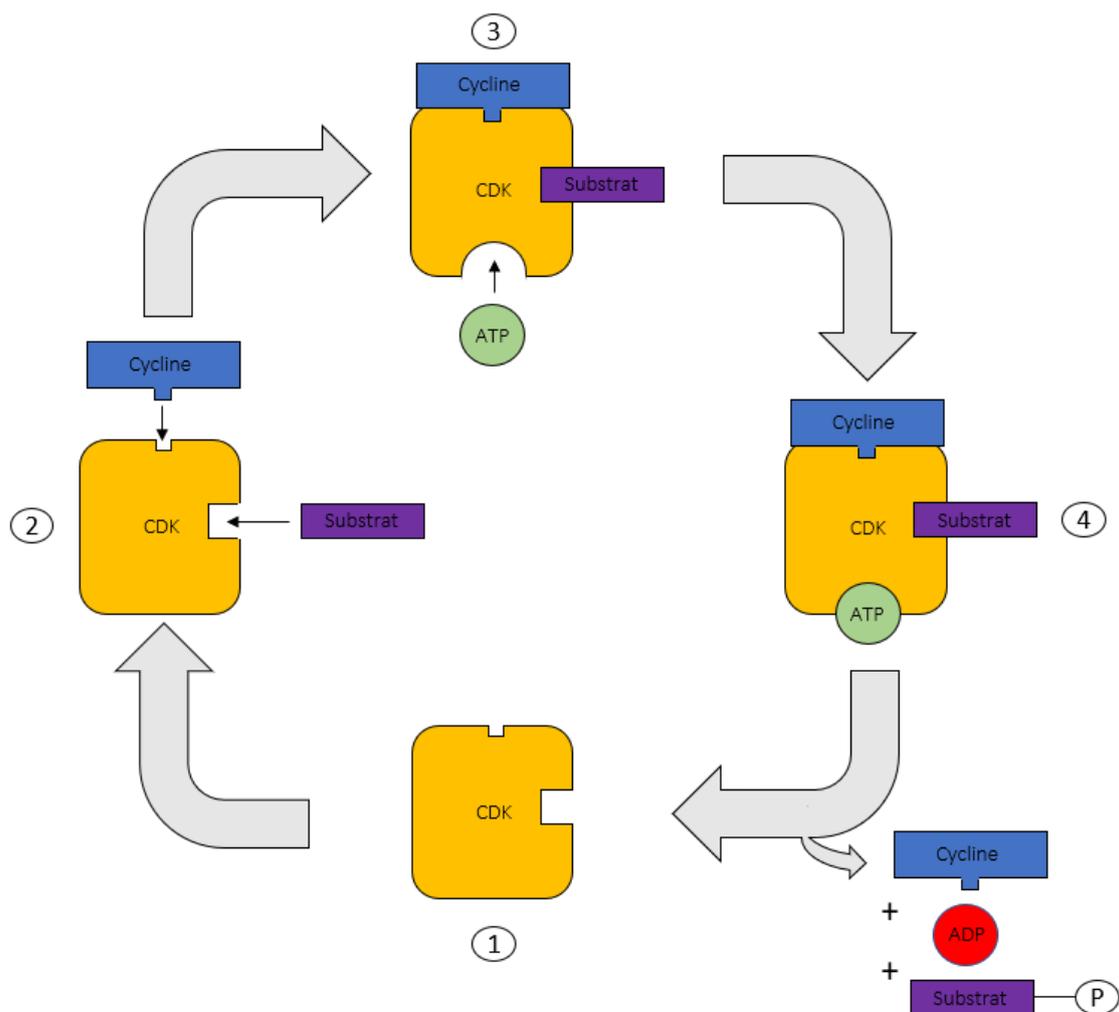


Figure 24 : Mécanisme d'action simplifié des CDKs.

Après formation du complexe cycline-CDK, le site catalytique permettant la fixation de l'ATP est accessible : la phosphorylation est ensuite réalisée.

Les CDKs sont des protéines kinases fondamentales pour la régulation du vivant : la phosphorylation ainsi induite est considérée comme l'un des principaux mécanismes utilisés par la cellule pour réguler ses activités.

Au cours de la multiplication cellulaire par exemple, chaque étape est régulée par la présence d'un ou plusieurs complexe(s) CDK(s) formé(s) (Fig. 25).

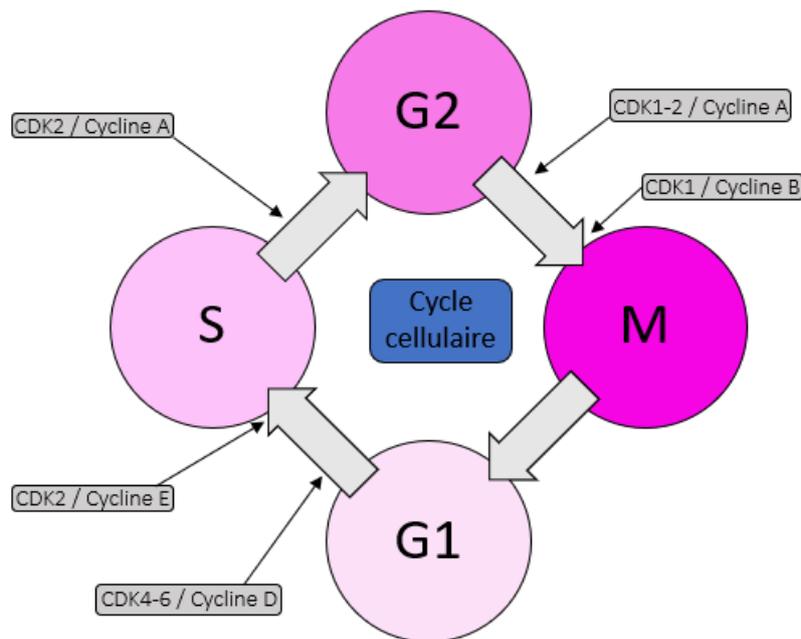


Figure 25 : Schéma simplifié du cycle cellulaire et de l'implication des kinases dépendantes des cyclines.

Depuis leurs découvertes, il a été prouvé que le dysfonctionnement des CDKs est à l'origine de nombreux processus pathologiques prolifératifs (Fig. 26) ou non comme certains cancers ¹⁷, la polyarthrite rhumatoïde, certaines maladies cardiovasculaires, dans différentes maladies prolifératives rénales ¹⁸ ou encore certains désordres neurologiques liés à la dégénérescence comme la maladie de Parkinson ou celle d'Alzheimer ¹⁹.

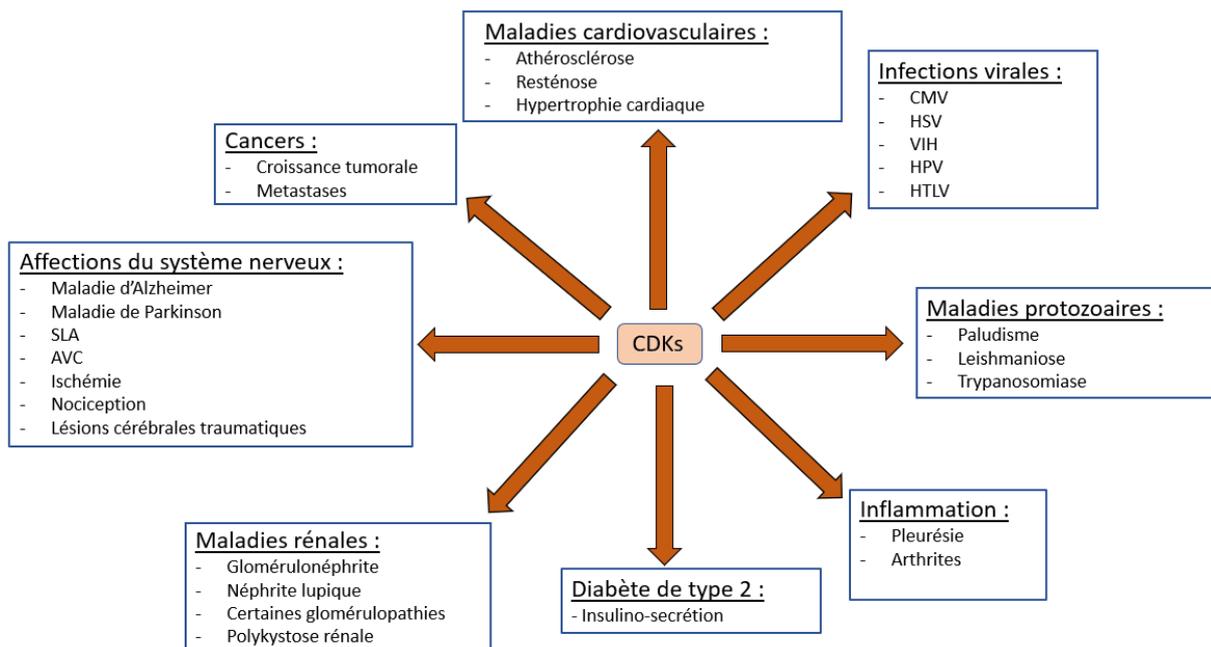


Figure 26 : Implications pathologiques des CDKs.

On peut s'apercevoir que les CDKs sont impliquées dans plusieurs maladies rénales dont la polykystose rénale : dérégées, elles contribuent à la prolifération cellulaire anormale responsable de la mise en place des kystes.

C'est sur ces cibles que des inhibiteurs ont été développés chez ManRos Therapeutics.

3) Les inhibiteurs de protéines kinases :

- *Généralités :*

Depuis la mise en évidence de l'implication des protéines kinase dans de nombreuses pathologies, les recherches se sont orientées pour tenter d'obtenir d'éventuels inhibiteurs.

- *L'imatinib et son mésylate (Fig. 27) :*

Découvert et commercialisé (en 2001 aux Etats-Unis et 2002 en France) par Novartis, l'Imatinib (ou Glivec®) est historiquement le premier inhibiteur de kinase utilisé en thérapeutique.

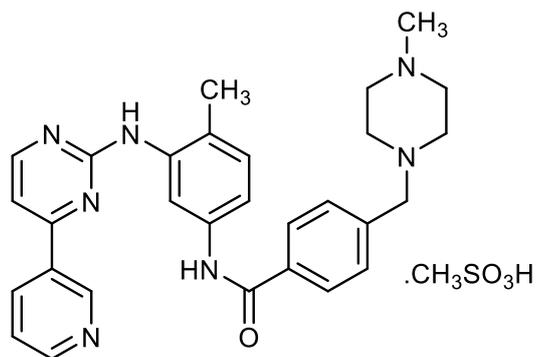


Figure 27 : Structure de mésylate d'Imatinib.

Cette molécule innovante (particulièrement dans le domaine de l'oncologie) a permis de prouver l'intérêt d'agir sur les protéines kinases. Plus largement, le STI 571 (ou Imatinib) a contribué à la compréhension de mécanismes moléculaires prenant part dans de nombreux cancers ²⁰. Ce premier inhibiteur agit sur une protéine exprimée à partir du chromosome Philadelphie.

- Chromosome Philadelphie :

C'est la mise en évidence du chromosome Philadelphie ²¹ en tant que marqueur de la Leucémie Myéloïde Chronique (=LMC) qui va être le point le plus important pour la recherche de l'Imatinib.

Ainsi, le chromosome Philadelphie se définit comme étant une translocation réciproque (=échange de matériel génétique) entre les chromosomes 9 (=Abl) et 22 (=Bcr) entraînant la fusion entre les gènes Bcr et Abl (Fig. 28). Le gène chimérique obtenu (gène Bcr-Abl) permet l'expression d'une protéine Bcr-Abl qui est une tyrosine kinase et dont l'activité est augmentée par rapport à la normale. Cette tyrosine kinase active d'elle-même, entraîne une augmentation de la vitesse de division cellulaire ainsi qu'une inhibition des systèmes de réparation de l'ADN (=acide désoxyribonucléique). La protéine de fusion à activité tyrosine kinase est donc vectrice d'anomalies génétiques et forcément de cancers.

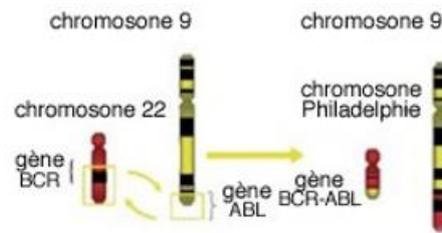


Figure 28 : Translocation t(9 ;22) et formation du chromosome Philadelphie.

- Mécanisme d'action de l'Imatinib :

L'Imatinib est une molécule inhibitrice de tyrosine kinase, et plus spécifiquement de la protéine Bcr-Abl ²². Le Glivec® entre en compétition avec l'ATP sur le site de fixation de cette protéine kinase permettant ainsi d'éviter la phosphorylation aberrante de résidus tyrosine.

- Indications :

L'Imatinib inhibe sélectivement la prolifération et induit l'apoptose dans les lignées cellulaires Bcr-Abl positives de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (95% des LMC sont chromosome Philadelphie positives) ou encore de leucémie aigue lymphoblastique chromosome Philadelphie positives.

Cette molécule est également utilisée dans d'autres affections malignes comme les tumeurs stromales gastro-intestinales (=GIST) ou les syndromes myéloprolifératifs car elle est capable d'inhiber les récepteurs du Stem Cell Factor (=SCF) ou ceux du Platelet-Derived Growth Factor (=PDGF) ²³.

- Résistances :

L'utilisation de l'Imatinib a engendré l'apparition de résistances par deux mécanismes identifiés ²⁴ : l'amplification du gène Bcr-Abl et la mutation du domaine catalytique de la protéine exprimée à partir de Bcr-Abl. Le Nilotinib a été développé dans ce but.

L'apparition de ces phénomènes de résistances acquises a donc obligé le développement d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase pour obtenir à nouveaux des résultats favorables ²⁵ dans le cadre de LMC, de GIST ou plus largement de pathologies mettant en jeu une suractivation de la protéine Bcr-Abl.

- *Successeurs de l'Imatinib :*

Pour pallier ces phénomènes de résistance, des successeurs de l'Imatinib ont donc été synthétisés.

- *Le Sunitinib (ou Sutent®) ²⁶ (Fig. 29) :*

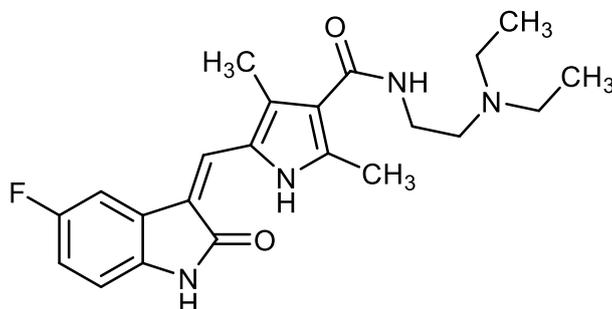


Figure 29 : Structure du Sunitinib

Cette molécule commercialisée par Pfizer est utilisée en France contre les GIST résistantes à l'Imatinib mésylate, ainsi que contre les cancers rénaux métastatiques ou les tumeurs neuroendocrines du pancréas. Des essais cliniques sont conduits sur le Sunitinib pour d'autres indications comme le cancer du poumon, de la thyroïde ou encore du sein.

- *Le Nilotinib (ou Tasigna®) ²⁷ (Fig. 30) :*

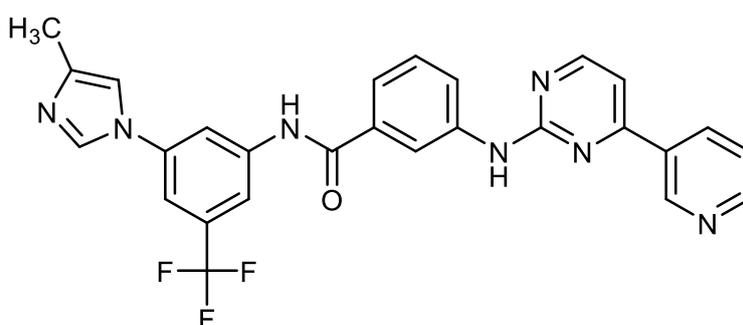


Figure 30 : Structure du Nilotinib.

Commercialisé par Novartis, le Nilotinib est indiqué dans le cas de LMC à chromosome Philadelphie positive en phase chronique ou accélérée ou résistante à l'Imatinib.

➤ Le Dasatinib (ou Sprycel®) ²⁸ (Fig. 31) :

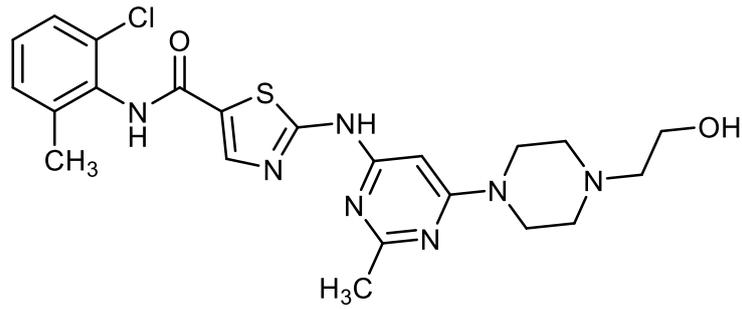


Figure 31 : Structure du Dasatinib.

Conçu par le laboratoire Bristol-Mayer-Squibb, le Dasatinib est utilisé dans le cas de LMC nouvellement diagnostiquée ou résistante à l'Imatinib.

La découverte de l'Imatinib a été le point de départ des thérapies anti-cancéreuses basées sur l'inhibition des kinases. Plusieurs kinases sont susceptibles de constituer dans le futur des cibles pour le développement d'un médicament.

4) Les inhibiteurs de CDKs :

• *Le Seliciclib :*

➤ *Structure :*

Découvert en 1997 ²⁹, le Seliciclib (ou (*R*)-Roscovitine) est une purine tri-substituée en position 2, 6 et 9 (Fig. 32).

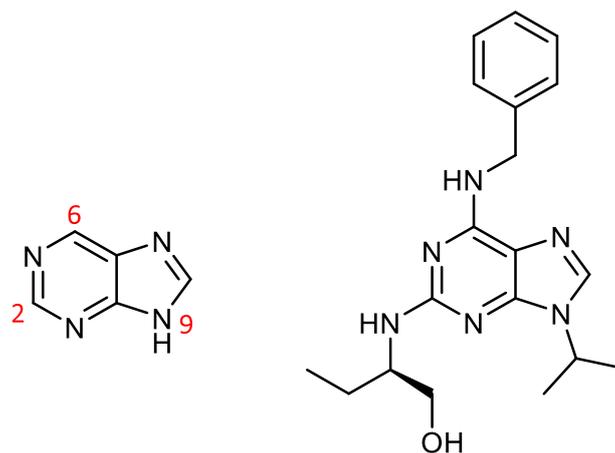


Figure 32 : Structure de la purine (à gauche) et la (*R*)-Roscovitine (à droite).

Le squelette des purines est une des formes chimiques les plus répandues au sein du vivant (ATP, AMPc, ...) (Fig. 33).

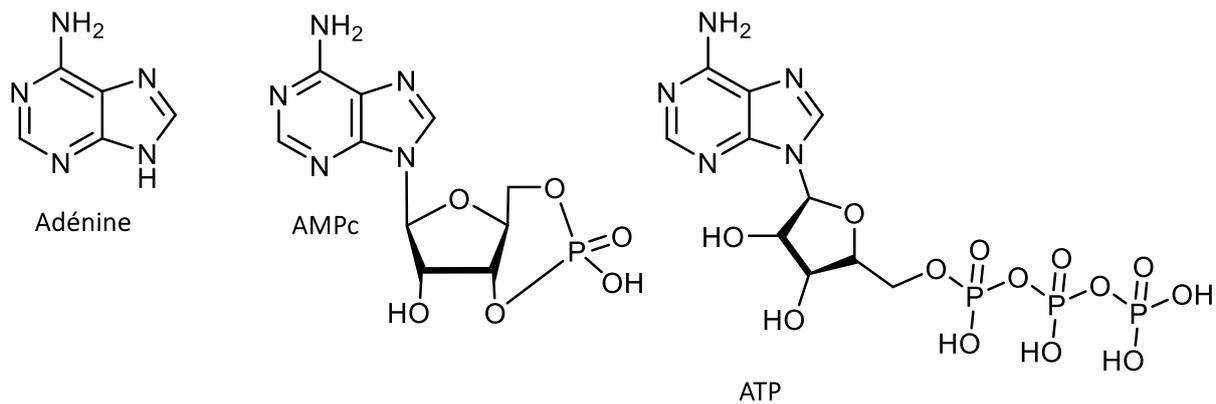


Figure 33 : Exemple de purines ayant des rôles biologiques. (on rappelle que les acides phosphoriques sont ionisés à pH physiologique).

➤ **Découverte ³⁰ :**

Plusieurs étapes ont été nécessaires dans la conception de la (*R*)-Roscovitine. C'est grâce à la mesure de la concentration inhibitrice 50 (=IC₅₀) envers la CDK1 ³¹ que la synthèse a pu être orientée (Fig. 34).

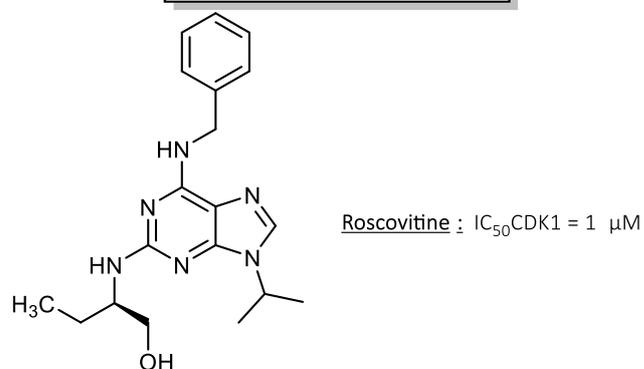
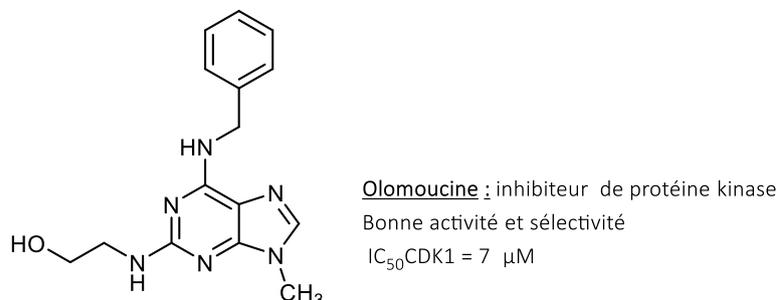
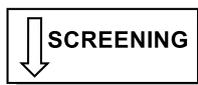
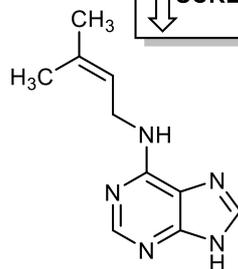
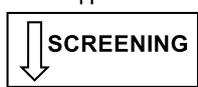
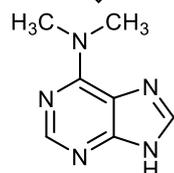
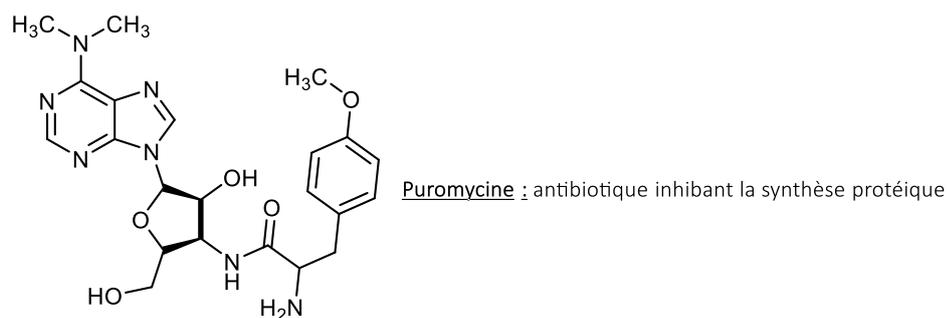


Figure 34 : Cheminement de la découverte de la Roscovitine.

➤ Propriétés physicochimiques :

La (*R*)-Roscovitine, de formule chimique $C_{19}H_{26}N_6O$, se présente sous forme de poudre blanche.

Cette molécule dont le pKa est de 4,4 à 25°C³², obéit à la règle des 5 de Lipinski³³ :

- MW = 354,45 g.mol⁻¹ (< 500 g.mol⁻¹).
- log P = 2,75 (2 < log P < 5) avec P étant le coefficient de partage octanol-eau de la molécule.
- 3 « Hydrogen Binding Donor » (< 5 HBD).
- 4 « Hydrogen Binding Acceptor » (< 10 HBA).

Les règles de Lipinski permettent d'apprécier l'absorption d'une molécule et à fortiori sa biodisponibilité ; en effet, si une structure ne satisfait pas à ces valeurs, alors on peut prédire que son absorption (et donc sa biodisponibilité) seront modérées et inadéquates à une potentielle administration autres qu'intra-veineuse. Par ailleurs, une molécule satisfaisant toutes les valeurs fixées par ces règles n'aura nécessairement pas une bonne absorption.

La biodisponibilité représente la fraction de principe actif qui atteint la circulation générale sous forme inchangée et la vitesse à laquelle il l'atteint après une administration d'une dose par voie extra-vasculaire.

➤ Mécanisme d'action :

La (*R*)-Roscovitine est un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines³⁴.

Après formation du complexe CDK-cycline, la (*R*)-Roscovitine se fixe sur le site de liaison à la place de l'ATP empêchant ainsi la phosphorylation du substrat cible : c'est donc un inhibiteur compétitif (Fig. 35).

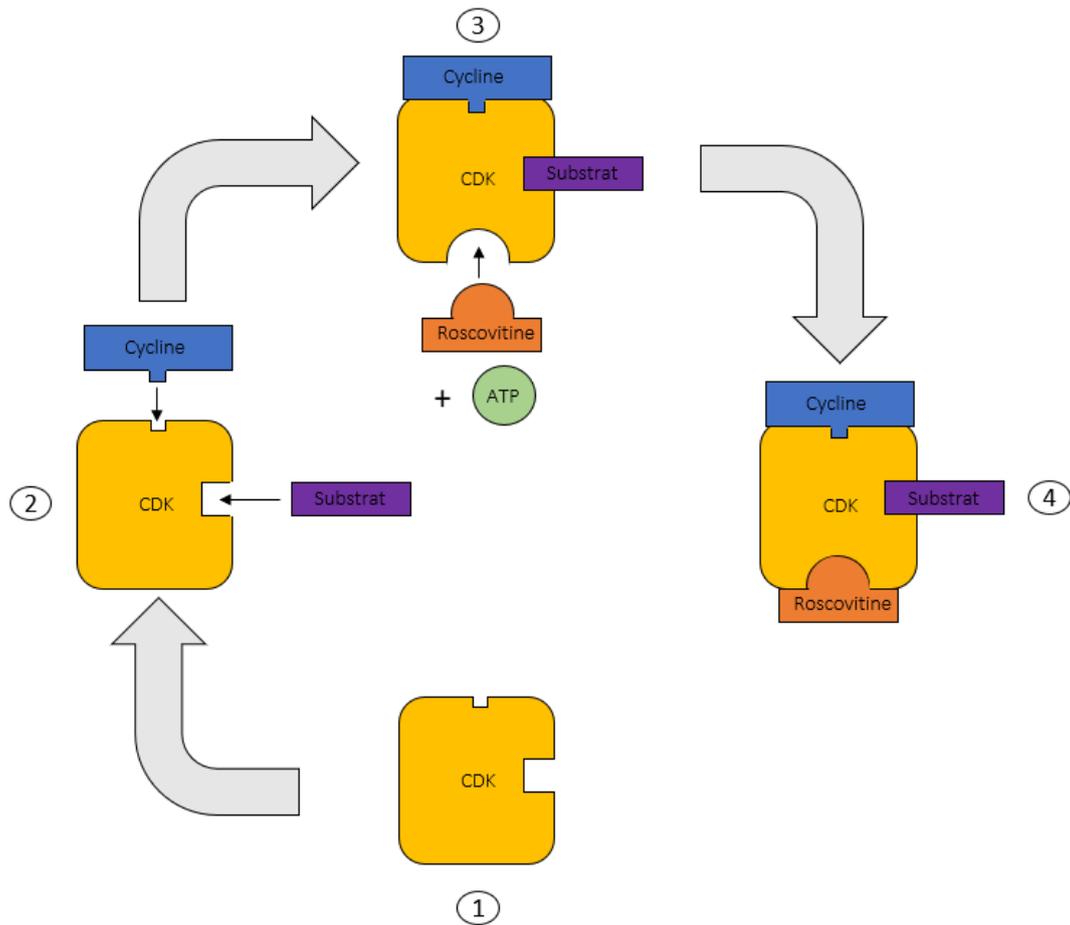


Figure 35 : Schéma simplifié de la fixation de la (*R*)-Roscovitine sur le complexe CDK-cycline.

Cette compétition de fixation a lieu au niveau de la région charnière de la kinase, appelée aussi « hinge region »³⁵ (Fig. 36).

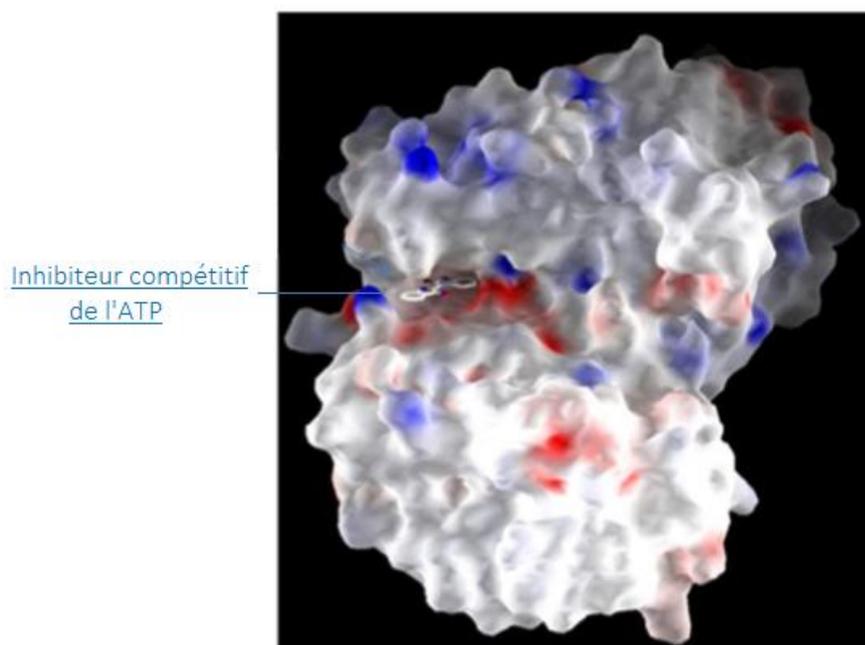


Figure 36 : Représentation de la fixation de la Roscovitine dans la « hinge region » de la kinase.

La (*R*)-Roscovitine inhibitrice des CDKs agit de manière sélective sur CDKs 1, 2, 5, 7 et 9 ³⁶.

➤ **Activité :**

La (*R*)-Roscovitine opère sur différentes voies de signalisation ³⁷ :

- diminution du facteur de survie (Mcl-1) ainsi qu'une augmentation du facteur proapoptotique (protéine p53).

- modulation des facteurs de transcription E2F (ce sont des facteurs qui régulent le cycle cellulaire, ils peuvent être activateurs ou inhibiteurs) dans le but d'arrêter la prolifération et d'engendrer l'apoptose.

- inhibition des voies de réparation de l'ADN.

• **Le (*S*)-CR8 :**

➤ **Structure :**

Synthétisé en 2008 ³⁸, le (*S*)-CR8 est un analogue de la (*R*)-Roscovitine (Fig. 37).

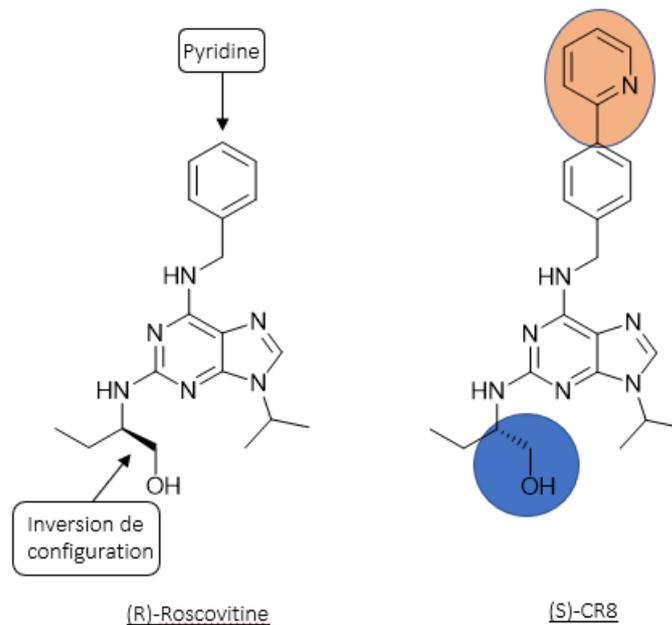


Figure 37 : Structures de la (*R*)-Roscovitine et du (*S*)-CR8.

Sa structure diffère de celle de la (*R*)-Roscovitine en deux points : la présence d'une structure biarylique en position 6 et la configuration de l'aminoalcool qui est (*S*).

➤ **Propriétés physicochimiques :**

Le (S)-CR8 de formule chimique $C_{24}H_{29}N_7O$ se présente elle aussi sous forme de poudre blanche.

Cette molécule obéit à la règle de 5 de Lipinski :

- MW = 431,53 g.mol⁻¹ (< 500 g.mol⁻¹).
- log P = 3,51 (2 < log P < 5).
- 3 HBD (< 5 HBD).
- 5 HBA (< 10 HBA).

➤ **Mécanisme d'action :**

Au même titre que la Roscovitine, le CR8 est un inhibiteur de CDKs compétitif de l'ATP ; il est sélectif des CDKs 1, 2, 5, 7 et 9.

Les deux molécules ont des sélectivités proches (Fig. 38).

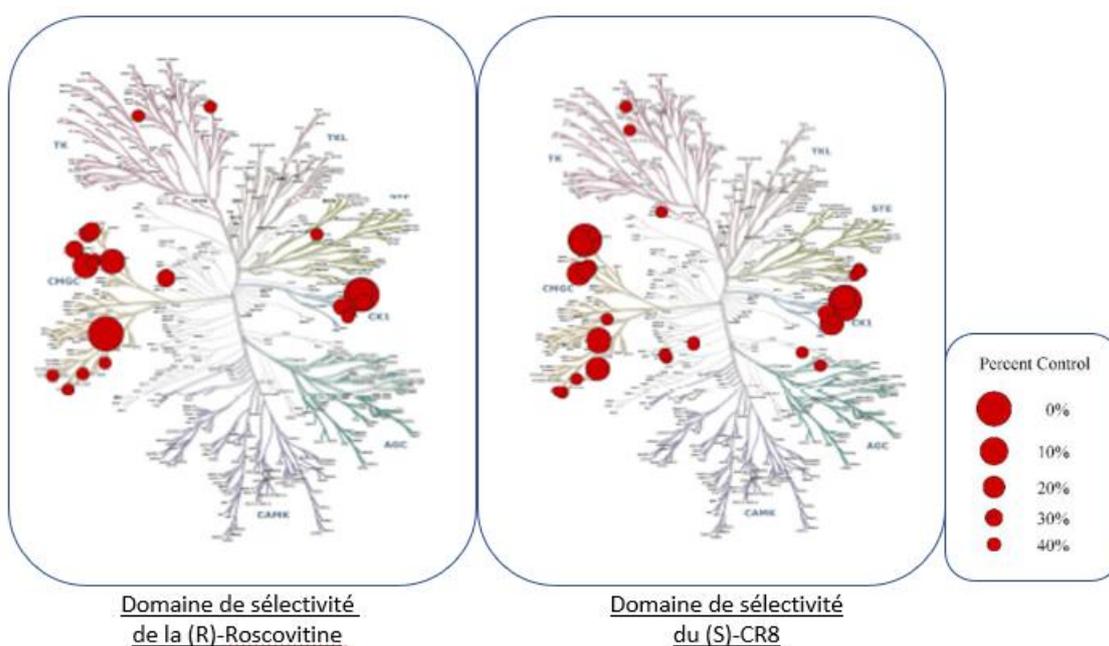


Figure 38 : Comparaison des domaines de sélectivité entre la (R)-Roscovitine et le (S)-CR8.

Le (S)-CR8 inhibe plus fortement les CDKs que la (R)-Roscovitine ³⁹ (Tab. 4).

	CDK1	CDK2	CDK5	CDK9
(R)-Roscovitine IC ₅₀ (µM)	0,33	0,21	0,28	0,23
(S)-CR8 IC ₅₀ (µM)	0,15	0,08	0,12	0,11

Tableau 4 : Inhibitions comparées de la (R)-Roscovitine et du (S)-CR8.

➤ **Activités :**

Le (S)-CR8 présente les mêmes effets que la (R)-Roscovitine ; il est capable d'induire la mort cellulaire (sur différentes souches) avec une affinité 50 à 100 fois supérieure à celle de la (R)-Roscovitine (Tab. 5).

	HT22	HEK 293	MDCK	Pkd1 -/-	Pkd1 +/+
(R)-Roscovitine IC ₅₀ (µM)	> 50	26,99	8,45	46,52	42,32
(S)-CR8 IC ₅₀ (µM)	0,31	0,15	0,32	0,3	0,23

Tableau 5 : Comparaison des IC₅₀ (µM) de la (R)-Roscovitine et du (S)-CR8.

La (R)-Roscovitine et son dérivé le (S)-CR8 semblent donc être capables de limiter la prolifération cellulaire et pourraient donc limiter le développement des kystes dans le cadre de la PKD.

- *Effets des deux molécules dans le cadre de la PKD :*

La (R)-Roscovitine et le (S)-CR8 ont dans un premier temps été testés *in vitro* sur des lignées cellulaires MDCK ¹ (=Madine-Darby Canine Kidney) qui sont des cellules d'épithélium rénal de chien développant des kystes de manière spontanée (Fig. 39).

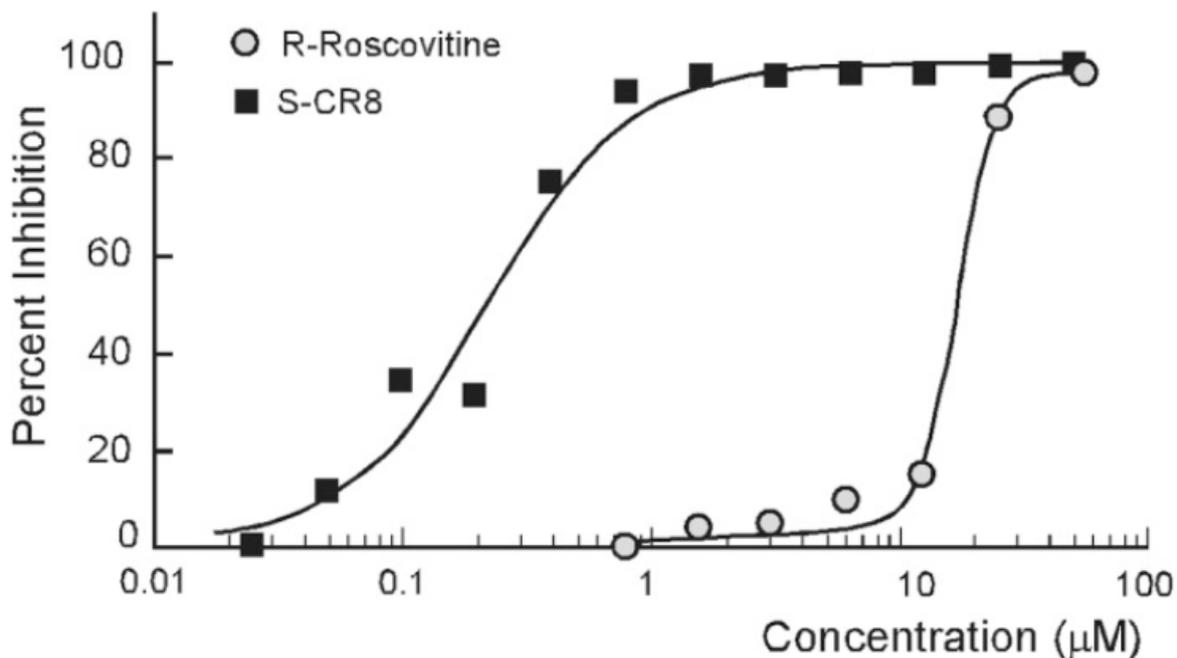


Figure 39 : Représentation de l'inhibition de la prolifération des cellules MDCK par la (*R*)-Roscovitine et le (*S*)-CR8.

On peut observer que la (*R*)-Roscovitine inhibe bien la prolifération des cellules MDCK (*in vitro*) ; le (*S*)-CR8 possède le même effet et ce de manière plus puissante que la (*R*)-Roscovitine.

Ces deux produits ont par la suite été testés avec succès sur un modèle *in vivo* murin ¹ (souris JCK = Juvenile Cystic Kidney) de cette pathologie (Fig. 40). Ces souris mutées développent des kystes après traitement au tamoxifène.

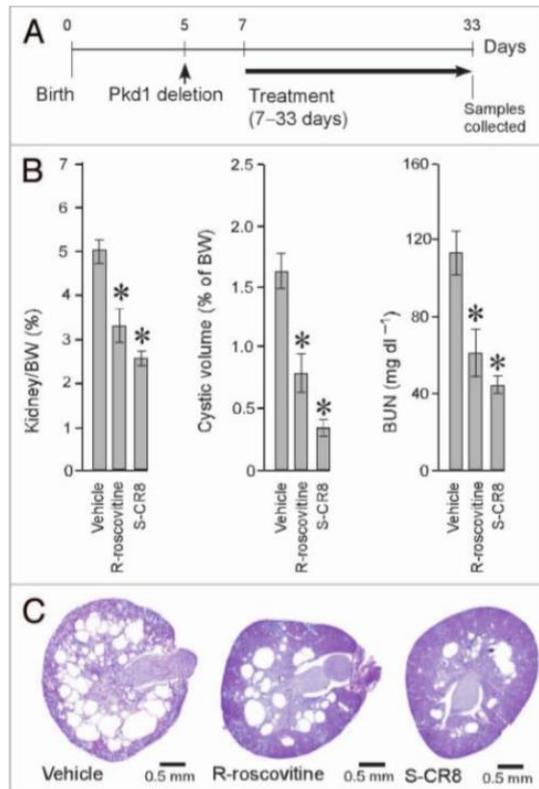


Figure 40 : **A** représente la chronologie du test (induction de la délétion responsable de la Pkd par le tamoxifène puis traitement de la pathologie chez des souris) ; **B** représente l'effet du véhicule seul (témoin négatif), de la (*R*)-Roscovitine et du (*S*)-CR8 sur respectivement le ratio poids des reins / poids du corps, le volume kystique et enfin l'urémie (reflète l'activité rénale). **C** présente les photos de coupes sagittales de reins traités par le contrôle, la (*R*)-Roscovitine et le (*S*)-CR8.

Que ce soit à nouveau pour la (*R*)-Roscovitine ou pour le (*S*)-CR8, les résultats montrent un effet de ces deux molécules sur le développement kystique et ces conséquences dans le sens d'une diminution, et diminution encore plus forte pour le (*S*)-CR8.

Les cellules de l'épithélium rénal des souris JCK ont par ailleurs été étudiées en microscopie électronique avec et sans traitement par les deux molécules ⁴⁰ (Fig. 41). C'est la longueur des cils présents à la surface des cellules qui a particulièrement été observée.

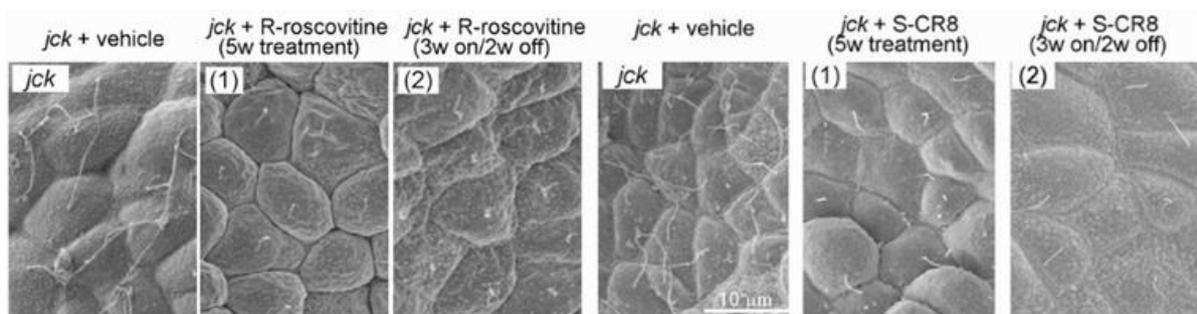


Figure 41 : Comparaison de la longueur des cils sur la surface des cellules épithéliales rénales de souris JCK avant et après traitement par à gauche la (*R*)-Roscovitine et à droite le (*S*)-CR8.

Ces cils sont dans le cas d'un non-traitement anormalement long. Cette longueur semble être régulée par l'utilisation de la (R)-Roscovitine et du (S)-CR8.

Les deux molécules ont un effet sur le développement kystique : elles semblent être de bons candidats médicaments pour la PKRAD.

Cependant même si pharmacodynamiquement, il semblerait bel et bien que les molécules ont un intérêt dans la PKRAD, il n'en est pas moins qu'un candidat médicament doit posséder les caractéristiques pharmacocinétiques adéquates.

- *Pharmacocinétiques des deux molécules :*

Dans le cadre d'un éventuel traitement de la PKRAD, il est souhaitable que l'inhibition de la croissance des kystes soit la plus continue possible. Une bonne distribution rénale et une stabilité métabolique suffisante sont donc a priori requises pour limiter le nombre de prises quotidiennes.

Les études pharmacocinétiques chez le rat ont révélées une distribution rénale limitée pour ces molécules et elles possèdent des demi-vies relativement courtes : 2h pour la (R)-Roscovitine et 2.5h pour le (S)-CR8.

C'est donc à partir de ce constat qu'une stratégie de prodrug a été imaginée.

D. Prodrug (pro-médicament).

1) Définition :

Une prodrug est une substance pharmacologique peu ou pas active, mais qui après administration subit une transformation biologique (en général enzymatique) pour libérer le principe actif.

On utilise cette stratégie de prodrug pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques du principe actif (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination, Toxicité (=ADMETox)).

2) Objectifs des prodrugs :

On peut utiliser les prodrugs pour de nombreuses raisons :

- *Augmenter la biodisponibilité (Absorption)*

La biodisponibilité représente la fraction de la dose de médicament qui va arriver dans le compartiment sanguin sous forme inchangée et la vitesse avec laquelle cette fraction l'atteint. Elle est vitale pour un principe actif qui doit traverser la barrière intestinale avant d'atteindre sa cible. La biodisponibilité est dépendante des propriétés physicochimiques du médicament, ainsi que des propriétés des milieux qu'il traverse.

Beaucoup de stratégies peuvent être mises en place pour améliorer la biodisponibilité. Quelques exemples.

Un groupement ionisable à un pH donné peut être masqué par un non ionisable au même pH pour diminuer la polarité du médicament et augmenter sa biodisponibilité. (Ex : Candoxatrilate ⁴¹ (Fig. 42)).

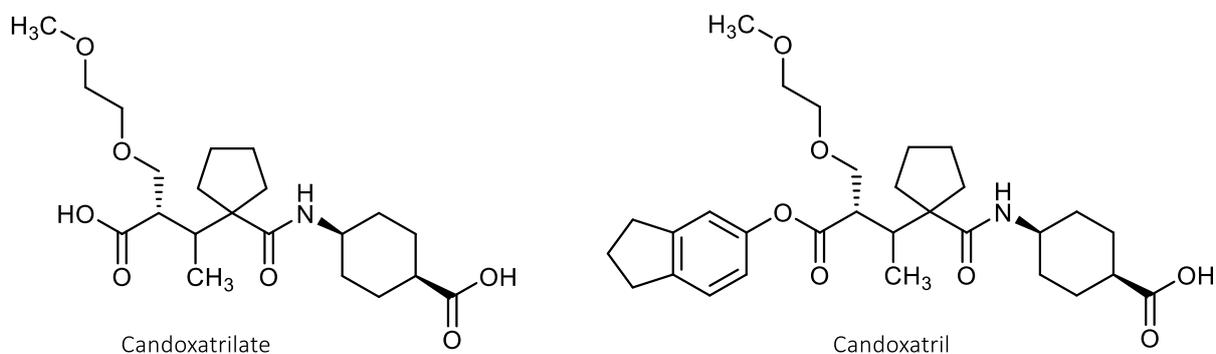


Figure 42 : Le Candoxatrilate et sa prodrug.

Un médicament peut être substitué par un acide aminé essentiel de l'organisme afin d'emprunter les transporteurs affiliés à cet acide aminé et par conséquent augmenter sa biodisponibilité. (Ex : Valaciclovir ⁴² (Fig. 43) ; La fonction ester est ensuite clivée au niveau sanguin par des estérases).

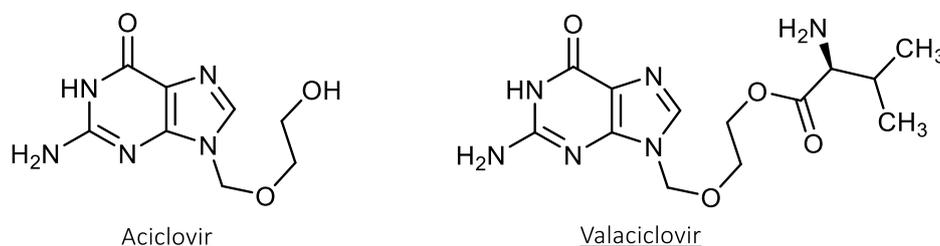


Figure 43 : L'Aciclovir et sa prodrug.

- *Augmenter la stabilité métabolique (Métabolisme) :*

La protection des composés contre leur propre dégradation peut être aussi intéressante. En effet, moins vite les principes actifs seront dégradés, et plus longtemps ils pourront exercer leur effet.

Un groupement déstabilisant pour le principe actif en milieu aqueux peut être remplacé par un groupement transporteur pour améliorer la biodisponibilité du composé avant

libération de ce principe actif par action enzymatique au niveau circulatoire (Ex : transformation de l'Ampicilline en Pivampicilline ⁴³ (Fig. 44)).

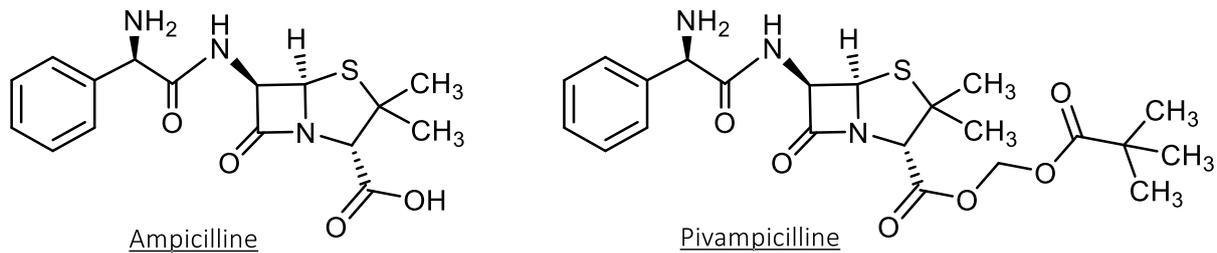


Figure 44 : L'Ampicilline et sa prodrug.

- *Améliorer le ciblage de tissus ou organe cible (Distribution) :*

Des stratégies de ciblage ont été mises au point pour permettre un apport facilité des principes actifs sur leur cible.

Dans le cadre de traitements par anticancéreux, un groupement folate peut être greffé sur une molécule possédant une activité cytotoxique : les cellules cancéreuses proliférant beaucoup plus rapidement que les cellules normales et sur-exprimant les récepteurs à l'acide folique, leurs besoins se voient grandement augmentés pour assurer la synthèse en bases nucléiques ; l'activité cytotoxique du principe actif y est donc directement apportée par le groupement folate. Le principe actif est libéré par action enzymatique.

(Ex : Doxorubicine ⁴⁴ (Fig. 45) ; NB : c'est le glutathion et ses enzymes qui va libérer le principe actif).

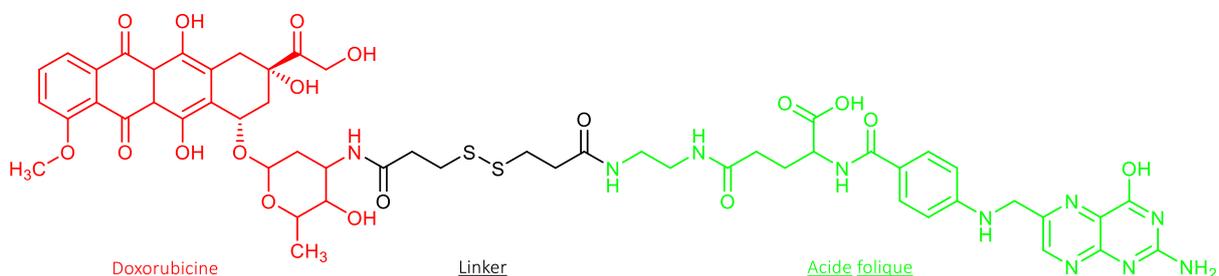


Figure 45 : La prodrug de la Doxorubicine.

La biotine, coenzyme importante dans le métabolisme de toutes cellules, est pour les mêmes raisons que l'acide folique utilisée pour cibler des cellules. Le principe actif est

aussi libéré après action enzymatique. (Ex : taxoïdes et biotine ⁴⁵ ; NB : le glutathion et ses enzymes libèrent le principe actif).

L'utilisation de stratégies dites prodrug est aussi appliquée pour d'autres raisons comme masquer une toxicité (Ex : L-Lysine Diazépam ⁴⁶ ou Cyclophosphamide ⁴⁷), augmenter la durée d'action (Ex : Décanoate de fluphénazine ⁴⁸), éviter les problèmes de formulation (Ex : Méthénamine ⁴⁹) ou encore s'affranchir de propriétés organoleptiques désagréables (Ex : Clindamycine ⁴⁹).

3) Prodrugs type phosphoramidates :

Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces composés (R)-Roscovitine et (S)-CR8), nous avons utilisé les dérivés phosphoroamidates ⁵⁰ (Fig. 46)

:

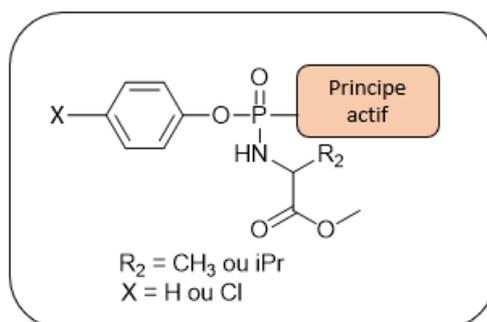


Figure 46 : Structure générale des prodrugs phosphoramidates

La chaîne latérale présente sur le phosphoroamidate est un acide aminé ; l'alanine (R₂ = CH₃) et la valine (R₂ = iPr) ont été utilisées dans le cadre de mon travail.

Dans la littérature, ces acides aminés ont fait l'objet de recherches en association avec les phosphoroamidates et ont démontré une amélioration de la distribution de leurs produits actifs ^{50, 51, 52}.

Par ailleurs, nous avons choisi les acides aminés naturels de la série L (configuration absolue S) et qui ont donc la possibilité d'être reconnu par les enzymes et transporteurs de l'organisme.

Une fois le produit présent dans le compartiment sanguin, la prodrug va subir l'effet du métabolisme (Fig. 47).

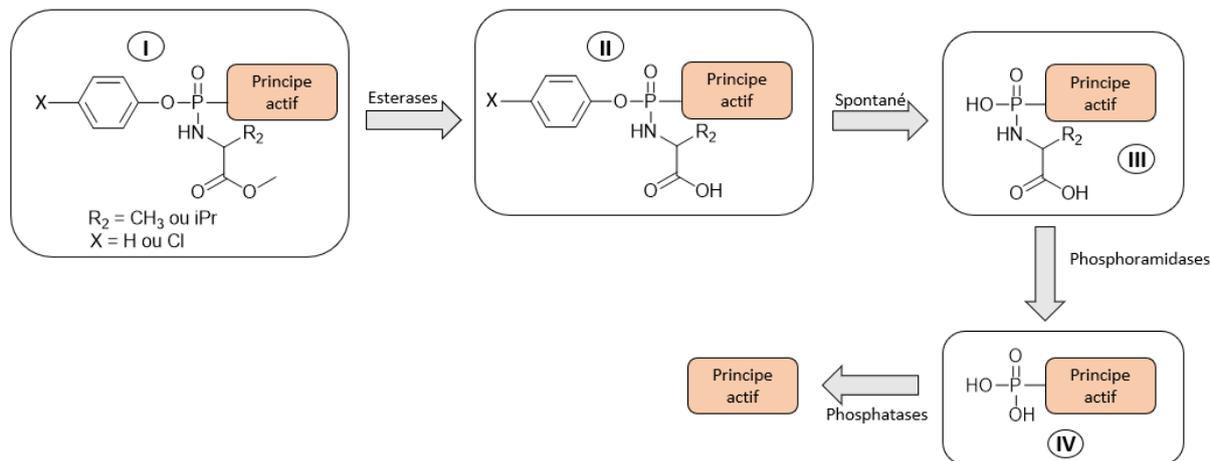


Figure 47 : Schéma du métabolisme des phosphoramidates.

Dans un premier temps, ce sont les estérases circulantes qui vont attaquer l'ester **I** pour permettre de libérer **II** sous forme d'acide carboxylique. S'ensuit de manière spontanée un départ du groupement phénoxy du phosphore pour laisser place au composé **III**.

Dans un second temps, c'est grâce à l'action de phosphoramidases sur **III** que l'acide aminé présent sur l'atome de phosphore va être retiré. Il est primordial que celui-ci soit reconnu par l'enzyme. L'issue de cette réaction est le produit **IV**.

Finalement, grâce à l'action de phosphatases, le principe actif est libéré.

Cette stratégie a été envisagée pour nos produits pour différentes raisons :

- Structurale : la fonction libre OH de la (*R*)-Roscovitine nous permet d'envisager d'accrocher le motif phosphoroamide afin d'obtenir notre prodrug. Le même process sera transposé au (*S*)-CR8.
- Augmenter la biodisponibilité : D'après la littérature, les molécules décrites sont plus lipophiles. Appliqué à nos molécules, cela peut permettre une meilleure absorption et par conséquent une meilleure biodisponibilité.
- Améliorer la résistance métabolique : les phosphoroamidates sont des structures capables de résister à des milieux de tous types, *i.e.* neutres, basiques ou acides. De plus, comme expliqué précédemment, le métabolisme du principe actif sous forme de prodrug phosphoroamide nécessite trois étapes enzymatiques avant même de pouvoir métaboliser le principe actif lui-même. Il est donc clair que la résistance métabolique en sera augmentée.

2. Résultats personnels :

A. Synthèses des principes actifs :

Ces synthèses s'effectuent en trois étapes (Fig. 48) :

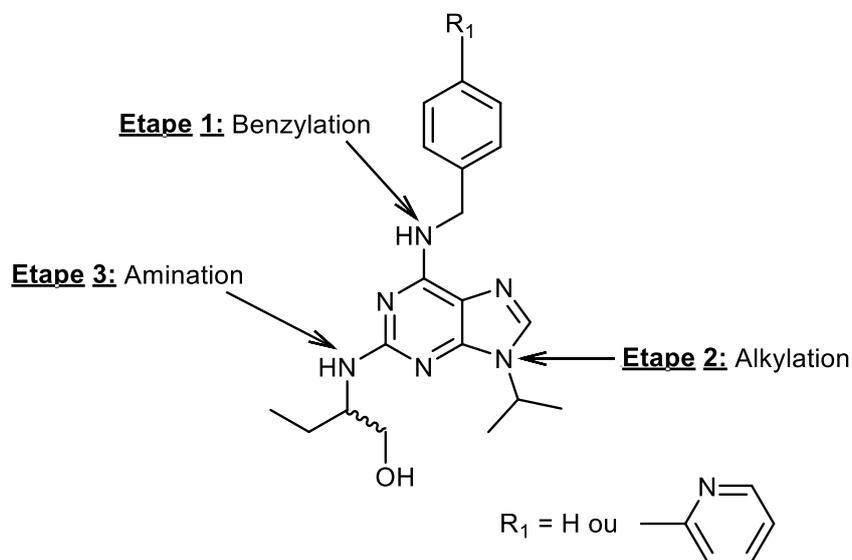


Figure 48 : Schéma des étapes de synthèse des principes actifs.

Schéma de rétrosynthèse (Fig. 49) :

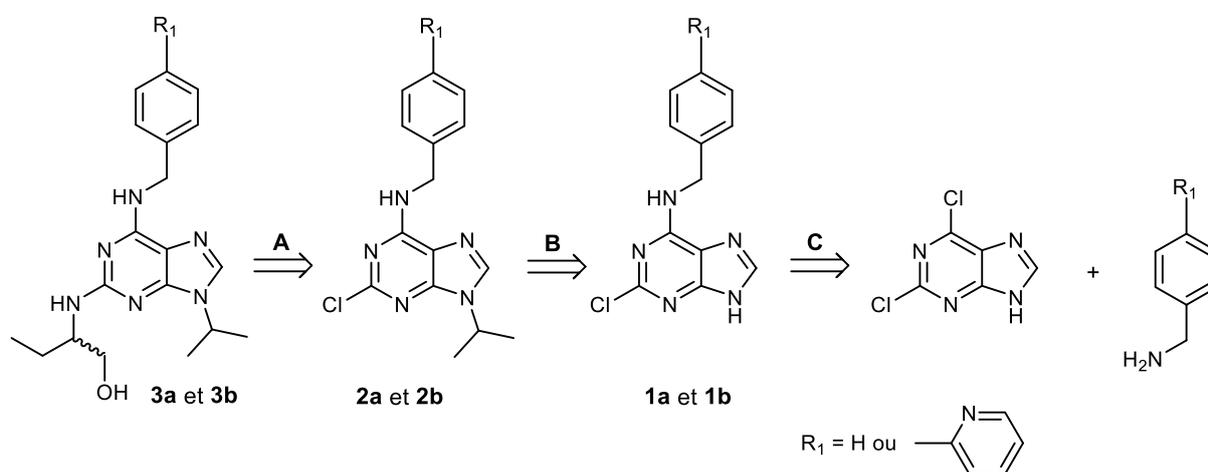


Figure 49 : schéma de rétrosynthèse de la (R)-Roscovitine et du (S)-CR8

1) Etape 1 : la benzylation en position 6 :

On obtient les produits **1a** et **1b** par substitution nucléophile aromatique de la 2,6-dichloropurine.

MECANISME (Fig. 50) :

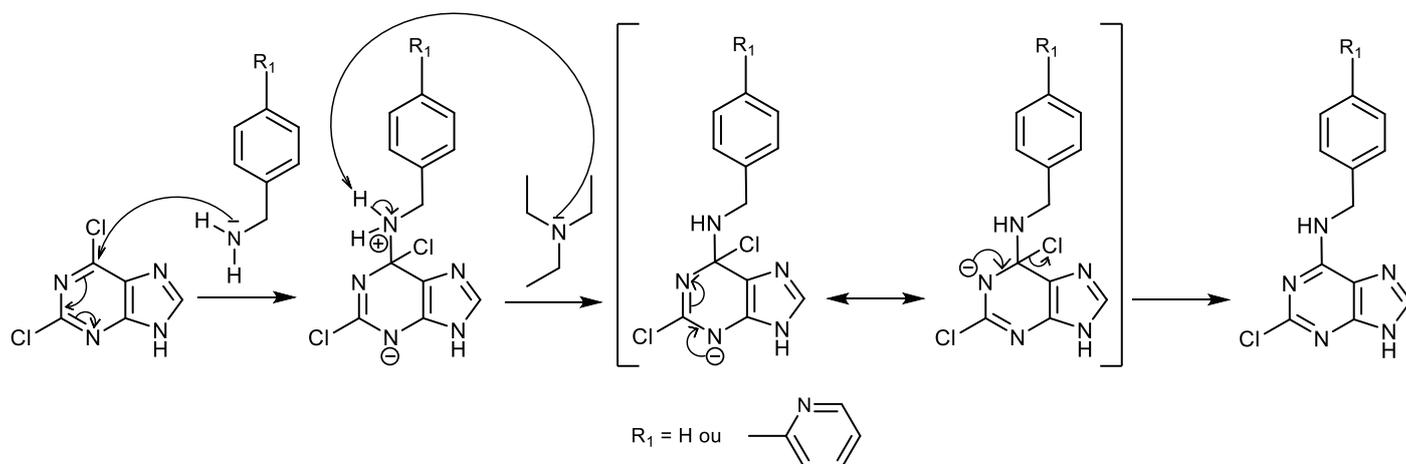


Figure 50 : mécanisme de la benzylation en position 6.

On obtient les produits **1a** et **1b** (Fig. 51) :

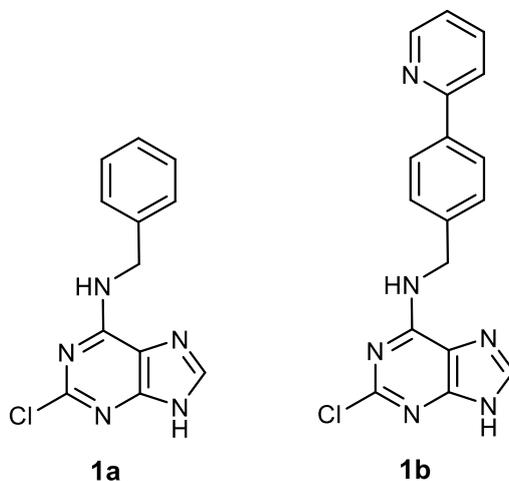


Figure 51 : structures des produits **1a** et **1b**.

2) Etape 2 : l'alkylation de la position 9 :

L'alkylation de la position 9 des produits **1a** et **1b** permet respectivement l'obtention des produits **2a** et **2b**.

MECANISME (Fig. 52) :

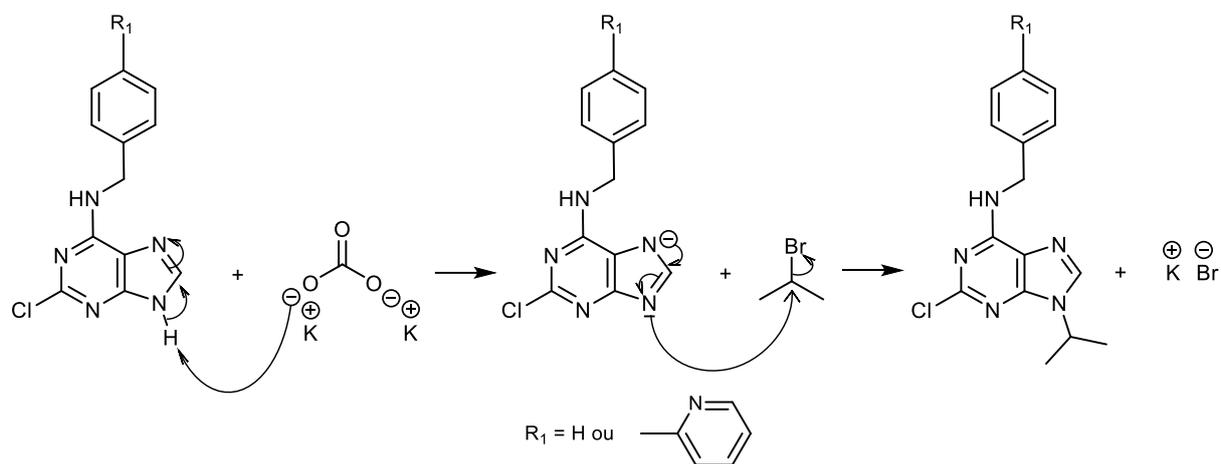


Figure 52 : mécanisme de l'alkylation en position 9.

On obtient les produits **2a** et **2b** (Fig. 53) :

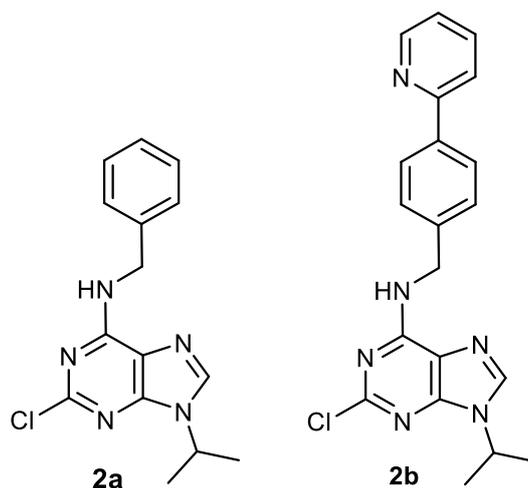


Figure 53 : structures des produits **2a** et **2b**.

3) Etape 3 : l'amination en position 2 :

Et enfin, la (*R*)-Roscovitine (**3a**) et le (*S*)-CR8 (**3b**) sont obtenus par substitution nucléophile aromatique en position 2 sur respectivement **2a** et **2b**.

MECANISME (Fig. 54) :

Schéma de rétrosynthèse (Fig. 56) :

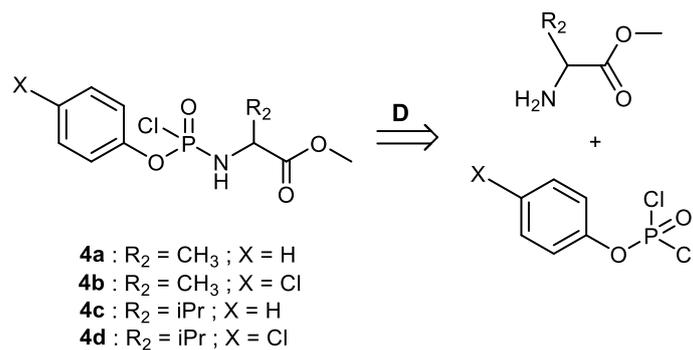


Figure 56 : réactifs et conditions (D) TEA, -78°C.

Le mécanisme de cette réaction est de type addition-élimination nucléophile.

MECANISME (Fig. 57) :

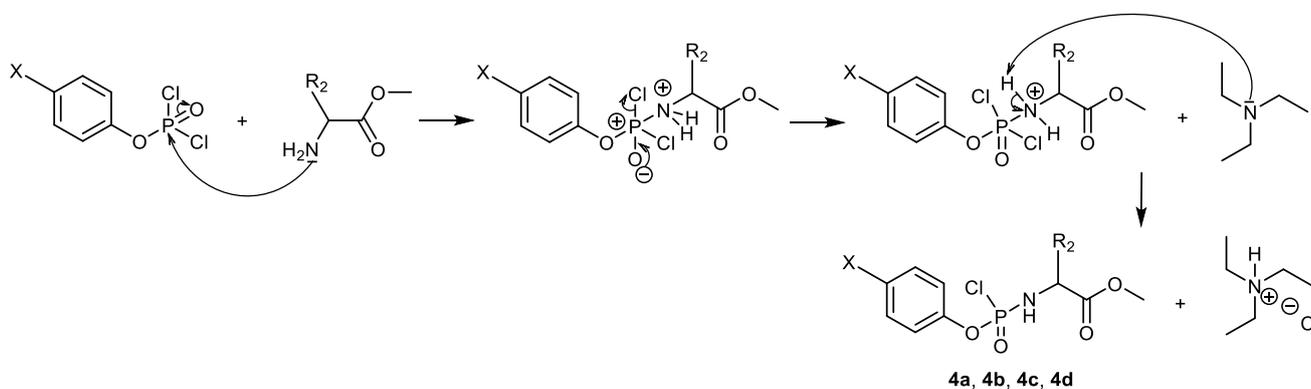


Figure 57 : mécanisme de la formation de phosphoramidates.

Cette réaction permet d'obtenir **4a**, **4b**, **4c** et **4d** (Fig. 58) :

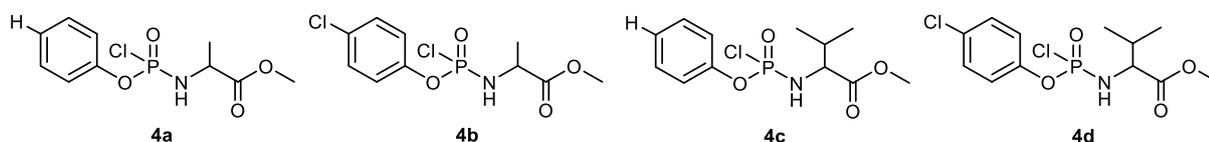


Figure 58 : structures des produits **4a**, **4b**, **4c**, et **4d**.

C. Synthèse des prodrogues :

L'obtention des prodrugs de (*R*)-Roscovitine et (*S*)-CR8 est possible par condensation des phosphoramidates **4a**, **4b**, **4c** et **4d** sur l'OH libre de ces deux produits. C'est une réaction qui se fait en une seule étape.

Schéma de rétrosynthèse (Fig. 59) :

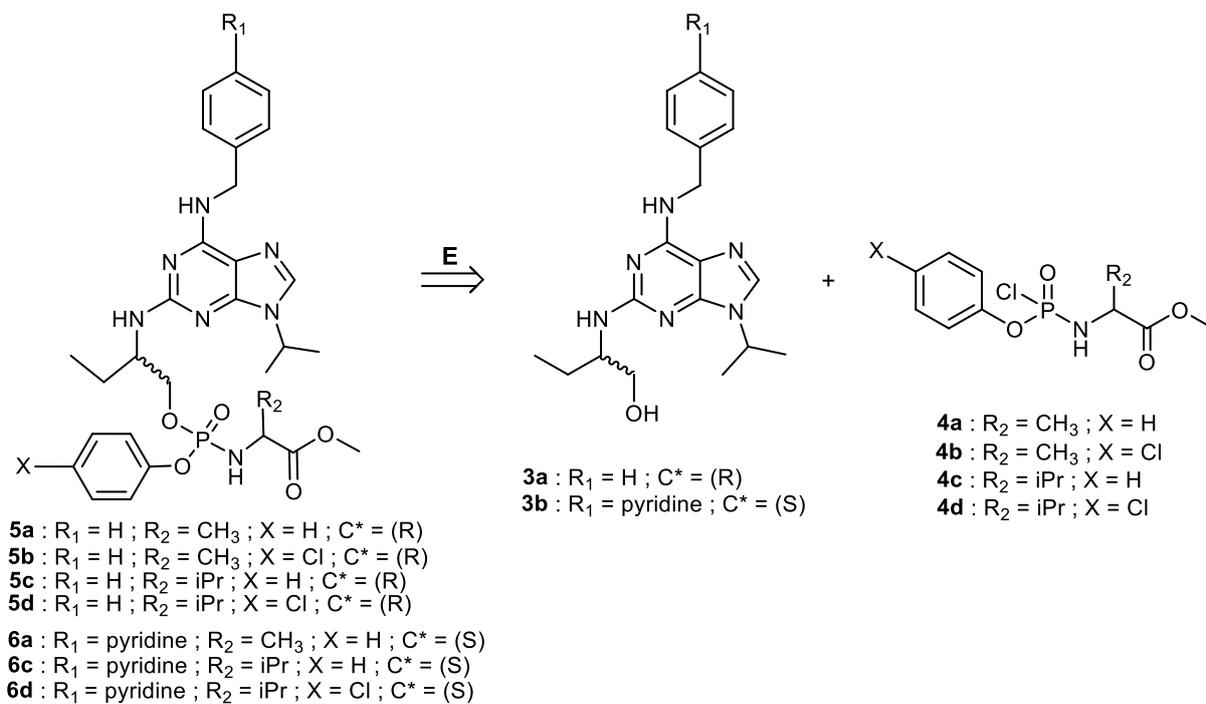


Figure 59 : réactifs et conditions (E) THF anhydre, NMI, -78°C .

MECANISME (Fig. 60) :

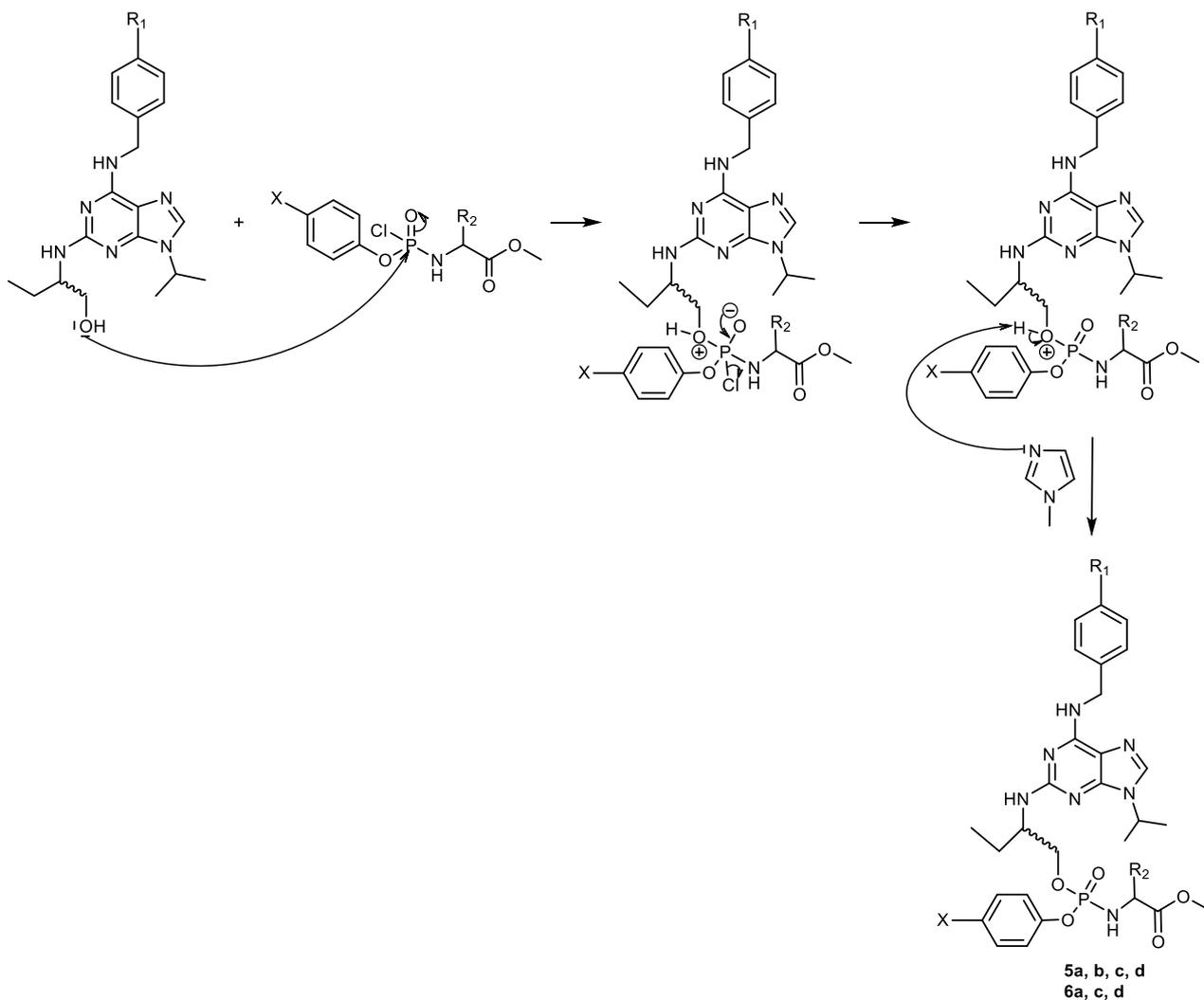
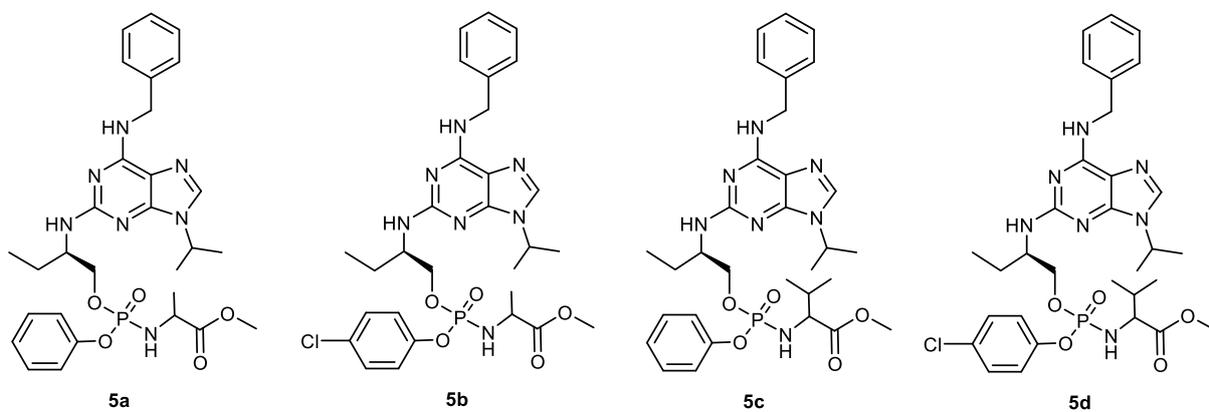


Figure 60 : mécanisme de condensation des prodrogues.

Les produits **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6a**, **6c** et **6d** sont finalement obtenus.

BILAN (Fig. 61) :



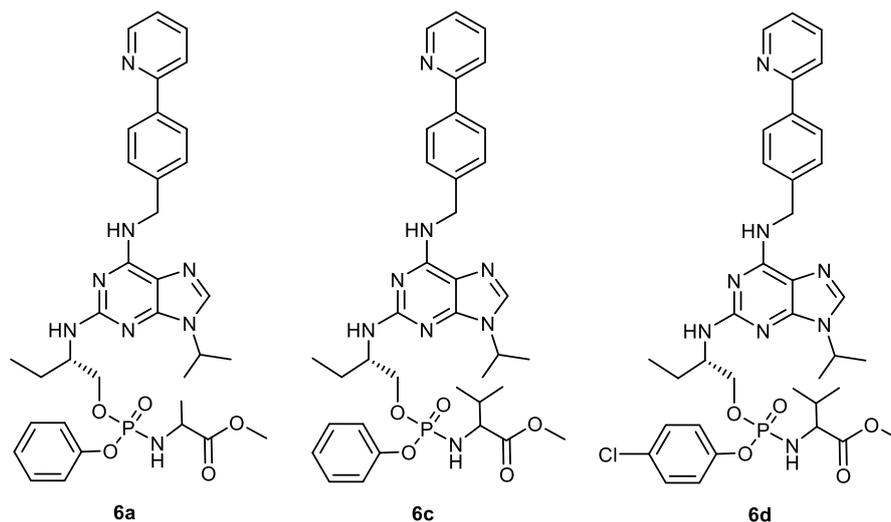


Figure 61 : structures des produits **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6a**, **6c** et **6d**.

3. Discussion :

A. Synthèse de la (*R*)-Roscovitine :

Cette synthèse est obtenue en trois étapes. Chaque étape permet d'obtenir un produit isolé par cristallisation.

La benzylation en position 6 est effectuée en premier lieu (et non pas l'alkylation) car si l'alkylation est la première étape, alors on a compétition entre la position 7 et la position 9 et donc perte de matière (Fig. 62).

L'encombrement stérique de la benzylamine empêche cette alkylation en position 7.

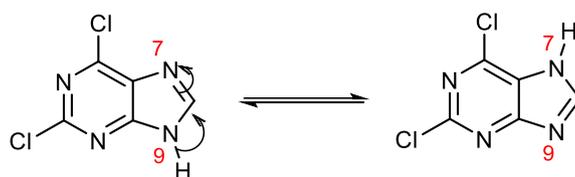
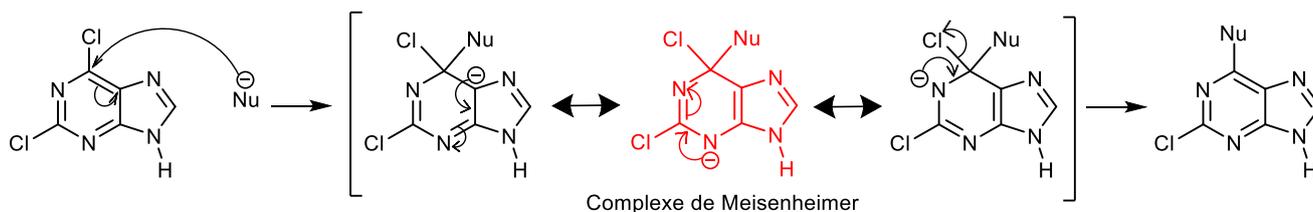


Figure 62 : Formes tautomères de la purine.

Cette substitution nucléophile se fait exclusivement en position 6 car le complexe de Meisenheimer est le plus stable (Fig. 63).

Explication :

Substitution en position 6 :



Substitution en position 2 :

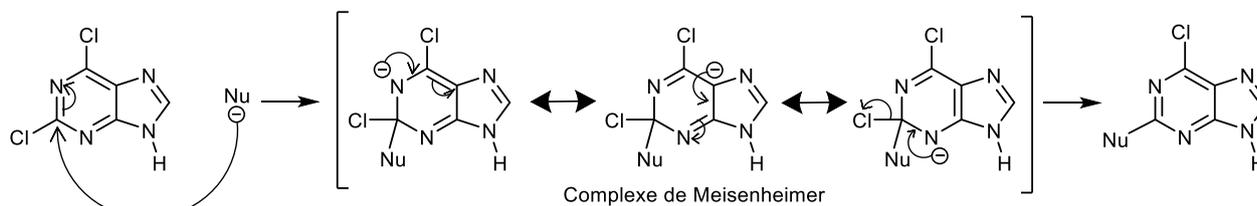
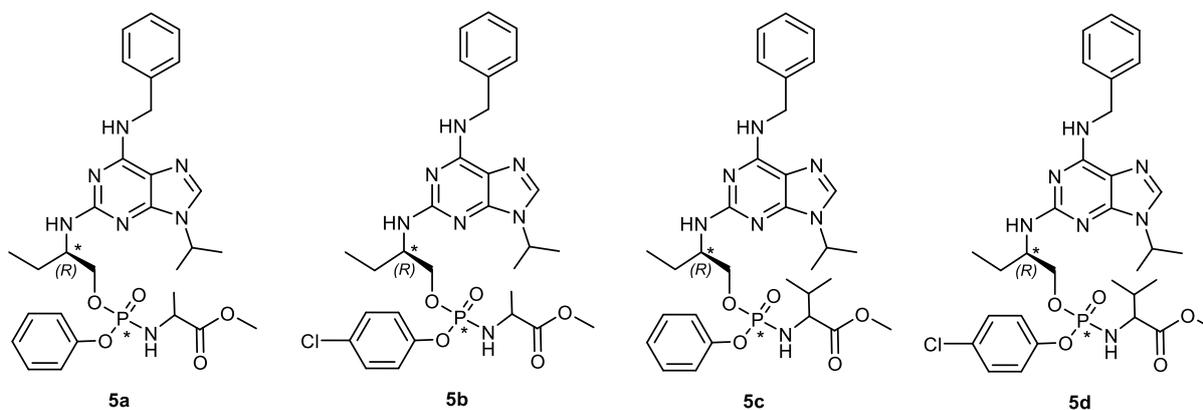


Figure 63 : Comparaison de la stabilité des intermédiaires lors de la substitution nucléophile aromatique.

L'intermédiaire du complexe de Meisenheimer est le plus stable car on passe par une entité où les doubles liaisons de la pyrimidine sont parallèles ce qui stabilise la charge négative du complexe par rapport au complexe de Meisenheimer en position 2.

B. Les prodrugs phosphoramidates et diastéréoisomérie :

Les composés **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6a**, **6c** et **6d** obtenus possèdent un atome de phosphore asymétrique car porteur de quatre groupements différents. De plus, la (*R*)-Roscovitine et le (*S*)-CR8 possèdent eux un atome de carbone asymétrique au niveau de l'aminoalcool terminal (Fig. 64).



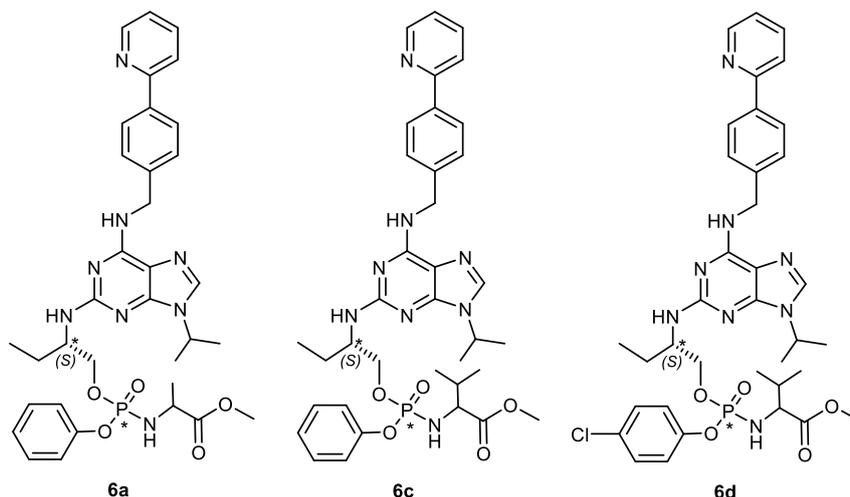


Figure 64 : Structures des prodrugs **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **6a**, **6c**, et **6d**.

Les produits 5 et 6 présentent des centres chiraux. Le problème est donc relativement complexe en terme de stéréochimie. On peut se demander si la chiralité du phosphore joue un rôle dans la cinétique de libération du principe actif.

La question est donc de savoir s'il faut séparer les composés finaux pour en évaluer l'activité biologique et si oui, comment cela est possible.

Dans la littérature, la séparation est faisable par chromatographie sur colonne en phase inverse ⁵⁰. Suite à cette séparation, la mesure de l'activité des diastéréoisomères présente sensiblement les mêmes résultats.

Ceci est par ailleurs expliqué par la conversion liée au métabolisme ⁵⁰ : le principe actif est libéré par actions enzymatiques successives visant seulement la partie phosphoramidate. Il en résulte globalement une cinétique de libération comparable du principe actif.

L'asymétrie due à la présence de l'atome de phosphore n'est donc pas un paramètre à prendre en compte en terme d'activité, puisque ce groupement de type phosphoramidate n'est là que pour diriger et protéger le principe actif jusqu'à atteinte de sa cible.

On peut cependant considérer que si un tel prodrug devait être développé comme médicament, il ne serait vraisemblablement pas possible de développer un mélange ; seulement un énantiomère ne pourrait être présent dans le médicament.

Une alternative à ce problème de chiralité lié à l'atome de phosphore serait d'utiliser des motifs phosphorodiamidates symétriques ⁵³ (Fig. 65). De telles molécules ne comportent pas de chiralité au niveau de l'atome de phosphore.

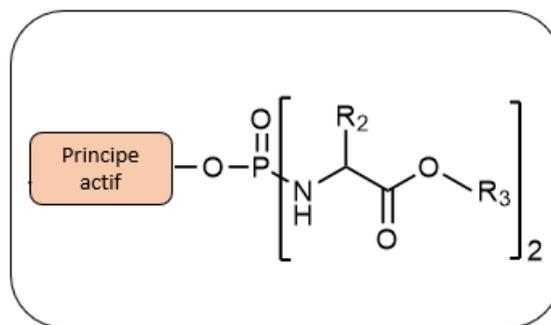


Figure 65 : Structure des phosphorodiamidates symétriques.

Les résultats de cette étude semblent être plus mitigés, puisque certains principes actifs voient leur activité augmenter ou diminuer en fonction des tests réalisés.

4. Evaluation biologique des prodrugs :

A. L'évaluation biologique primaire (test kinase et test cellulaire) :

1) Test kinase :

Les résultats biologiques primaires ont démontrés une activité des prodrugs inférieure à celle des inhibiteurs de kinase seuls, chose importante pour des prodrugs qui ne doivent montrer de l'activité qu'une fois le métabolite libéré.

IC ₅₀ (µM)	CDK1	CDK2	CDK5	CDK9
(R)-Roscovitine	0,33	0,21	0,28	0,23
5a	0,63	0,58	18	>10
5b	>10	>10	>10	>10
5c	>10	>10	>10	>10
5d	>10	>10	>10	>10

Tableau 6 : résultats des tests kinase pour la (R)-Roscovitine, et les produits **5a**, **5b**, **5c**, **5d**.

En ce qui concerne les dérivés de la (R)-Roscovitine (Tab. 6), mis à part le **5a**, les dérivés présentent des IC₅₀ supérieures à 10 µM, c'est-à-dire supérieures aux limites de quantification du test. Les molécules ne sont donc pas actives sur les kinases ce qui permet d'affirmer que le dérivé phosphoramidate ajouté bloque l'activité de l'inhibiteur. En ce qui concerne le **5a**, les résultats sont moins nets car le dérivé présente une activité sur les CDK1 et CDK2 ; ces activités restent inférieures à celles relevées pour la (R)-Roscovitine.

IC ₅₀ (µM)	CDK1	CDK2	CDK5	CDK9
(S)-CR8	0,15	0,08	0,12	0,11
6a	0,63	0,38	>10	>10
6b	>10	3.2	>10	>10
6d	0,06	0,2	0,06	0,7

Tableau 7 : résultats des tests kinase pour le (S)-CR8 et les produits **6a**, **6c**, **6d**.

Pour les dérivés du (S)-CR8 (Tab. 7), les résultats sont plus complexes. Le **6b** répond bien aux attentes que l'on pourrait avoir d'une prodrug tandis que **6a** et **6c** eux expriment des activités variables sur les CDKs.

2) Test cellulaire :

IC ₅₀ (µM)	HEK293
(R)-Roscovitine	26,93
5a	inactif
5b	19,81
5c	24,17
5d	46,26

Tableau 8 : résultats des tests cellulaires pour la (R)-Roscovitine et les produits **5a**, **5b**, **5c**, **5d**.

En ce qui concerne les prodrugs de (R)-Roscovitine (Tab. 8), seul le dérivé **5a** présente une inactivité sur les cellules HEK293 (attendu puisque la structure de la prodrug diffère de celle de l'inhibiteur de kinase). Les processus induisant la mort de ces cellules peuvent être divers et variés et expliquer les valeurs pour les dérivés **5b**, **5c** et **5d** reste difficile sans tests complémentaires.

IC ₅₀ (µM)	HEK293
(S)-CR8	0,15
6a	inactif
6b	inactif
6c	<1

Tableau 9 : résultats des tests cellulaires pour le (S)-CR8 et les produits **6a**, **6c**, **6d**.

Pour les dérivés du (S)-CR8 (Tab. 9), le **6a** et le **6b** sont inactifs tandis que le **6c** lui exprime une activité dans ce test (bien que moindre par rapport à celle du (S)-CR8). Encore une fois, sans tests complémentaires, il est prématuré de se risquer à une explication quant à cette activité.

B. L'évaluation biologique secondaire (pharmacocinétique) :

Compte tenu des résultats biologiques primaires, les dérivés présentant des inactivités dans les tests ont été envoyés en test biologique secondaire. Les résultats obtenus ne sont que très peu probants. Il s'est avéré après vérification que les produits initialement conservés à -5°C, sans encombre, et dans des piluliers anti-UV se dégradent rapidement une fois à température ambiante

Le seul résultat de ce test est donc que les prodrugs sont relativement peu stables à température ambiante.

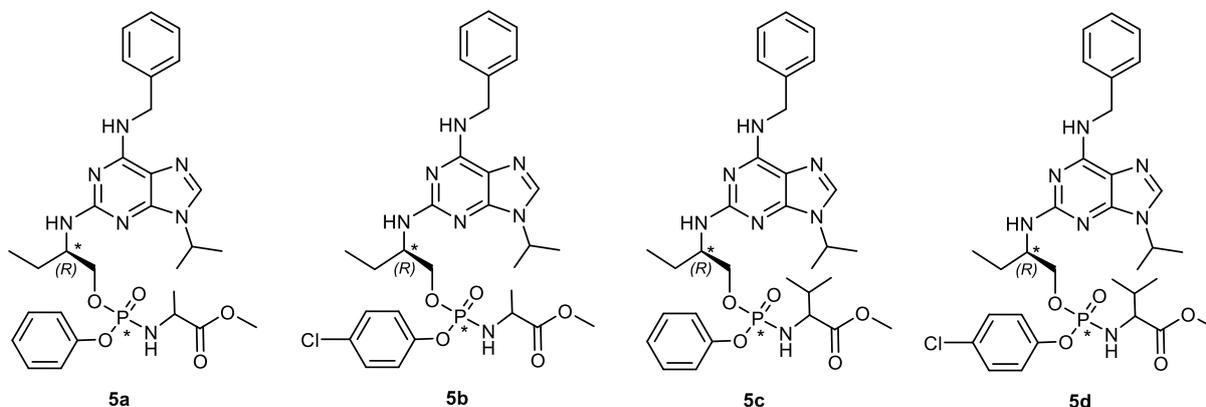
5. Conclusion :

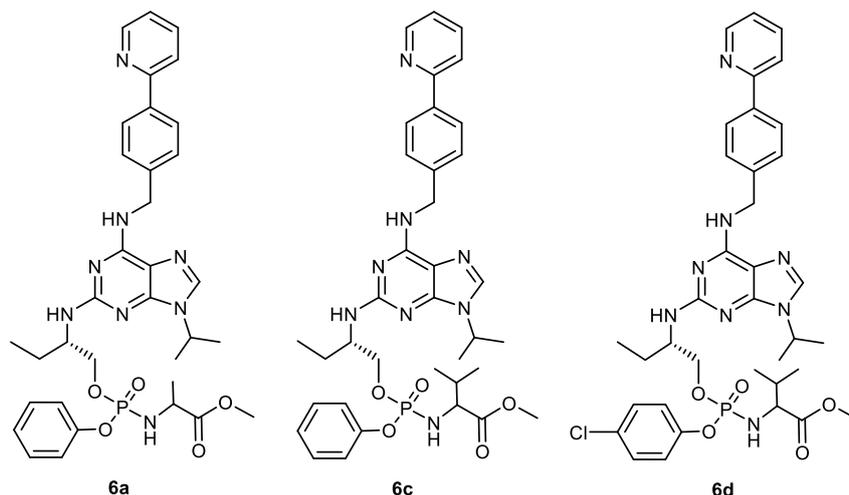
Dans ce travail de thèse, il s'agissait d'explorer l'application des prodrugs à l'optimisation de la biodisponibilité d'inhibiteurs de kinases.

Dans un premier temps, les inhibiteurs de kinases ont dû être synthétisés en grande quantité. Ainsi, l'introduction par substitution nucléophile du motif aminobenzyle en position 6 sur la dichloropurine à la première étape permet par la suite l'isolation d'intermédiaires (alkylation en position 9) et de produits finaux (amination en position 2) en grande quantité et par cristallisation. Nous avons ainsi repris des méthodologies fréquemment mises en œuvre chez ManRos Therapeutics.

Dans un second temps, c'est sur la synthèse des dérivés phosphoramidates que nous avons dû nous pencher. La synthèse à proprement parlé n'a pas posé de problèmes particuliers ; c'est la purification des dérivés qui a cependant été problématique. Ainsi, comme décrit dans la littérature, la purification est souvent réalisée par colonne chromatographique sur gel de silice. Pour nos dérivés, les produits retrouvés après purification ne l'étaient qu'en faibles quantités et présentaient des rendements trop faibles pour pouvoir correctement continuer. Nous avons donc optimisé les étapes de purification pour permettre l'obtention des dérivés purs, sans colonne chromatographique et en rendements satisfaisants pour les greffer ensuite sur les inhibiteurs de kinase.

Le premier objectif de cette thèse a donc pu être mené avec succès avec l'obtention de quatre prodrugs de (*R*)-Roscovitine (**5a**, **5b**, **5c**, **5d**) et de trois prodrugs de (*S*)-CR8 (**6a**, **6b**, **6c**).





Dans un second temps, les tests biologiques ont montré la complexité de ces systèmes. Certaines des prodrogues étaient inactives sur les kinases et cellules tandis que d'autres conservent une activité sur certaines kinases et pas d'autres.

Enfin, l'étude pharmacocinétique a montré que les prodrogues préparées étaient peu stables en solution à température ambiante. Les structures qui ont inspiré ce travail sont formés de phénols et non d'alcools comme dans le cas présent. Il conviendrait donc de reprendre cette étude en explorant en détail les éléments qui pourraient influencer cette stabilité.

6. Partie expérimentale :

A. Conditions générales :

- **Réactifs et solvants** : Tous les solvants et réactifs utilisés sont issus des sociétés Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Fluorochem et VWR.
- **RMN** : Les différents spectres RMN ont été enregistrés avec un appareil Bruker Ultrashield plus de 400MHz. Le chloroforme deutéré et le diméthylsulfoxyde-d6 sont les solvants utilisés pour solubiliser les produits. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par millions et les constantes de couplages en Hertz. Les solvants incomplètement deutérés constituent la référence interne.
- **Chromatographies** : Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de silice TFC 60 F₂₅₄.
Les chromatographies sur colonne ont été réalisées à partir de silice Carlo Erba Reagents 60A.
- **Points de fusion** : Les points de fusion ont été déterminés sur banc de Köfler.

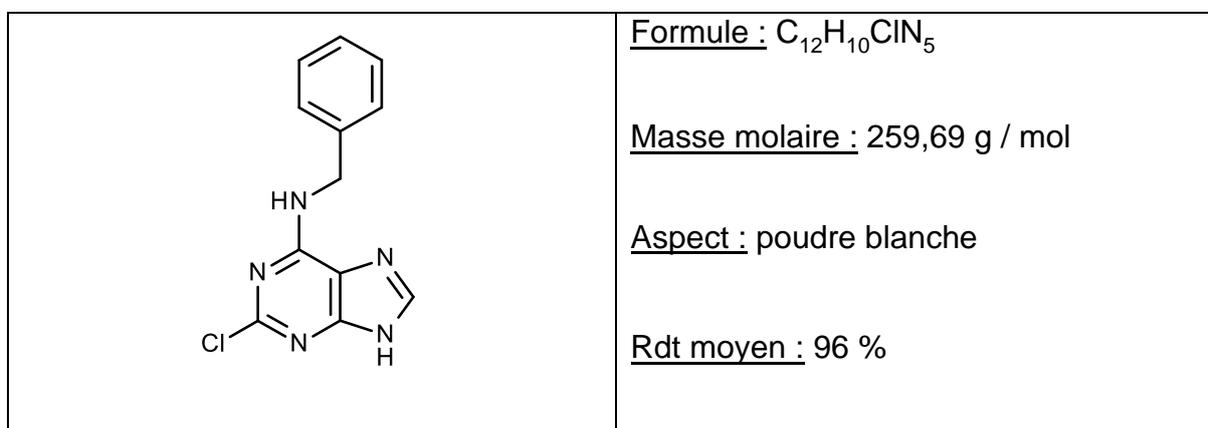
B. Protocoles expérimentaux :

SYNTHÈSE DES INHIBITEURS DE KINASE :

PROTOCOLE A : amino-benzylation :

On dissout la **2,6-dichloro-9H-purine** (5 g, 26 mmol) dans le n-BuOH (40mL). A cette solution, on ajoute la benzylamine (4,33 mL, 39,7 mmol) ainsi que la TEA (14,5 mL, 104 mmol). Le mélange est chauffé au reflux du n-BuOH pendant 3 heures. Par filtration sous vide puis rinçage au n-BuOH froid (2 x 10 mL), le produit **1** est récupéré sous forme de poudre blanche (6,46 g, Rdt = 97%).

N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.63 (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, CH₂-NH); 7.23-7.33 (m, 5H, H_{phenyl}); 8.13 (s, 1H, H-8); 8.74 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 43,19; 126,86; 127,39; 128,31; 139,30; 152,59.

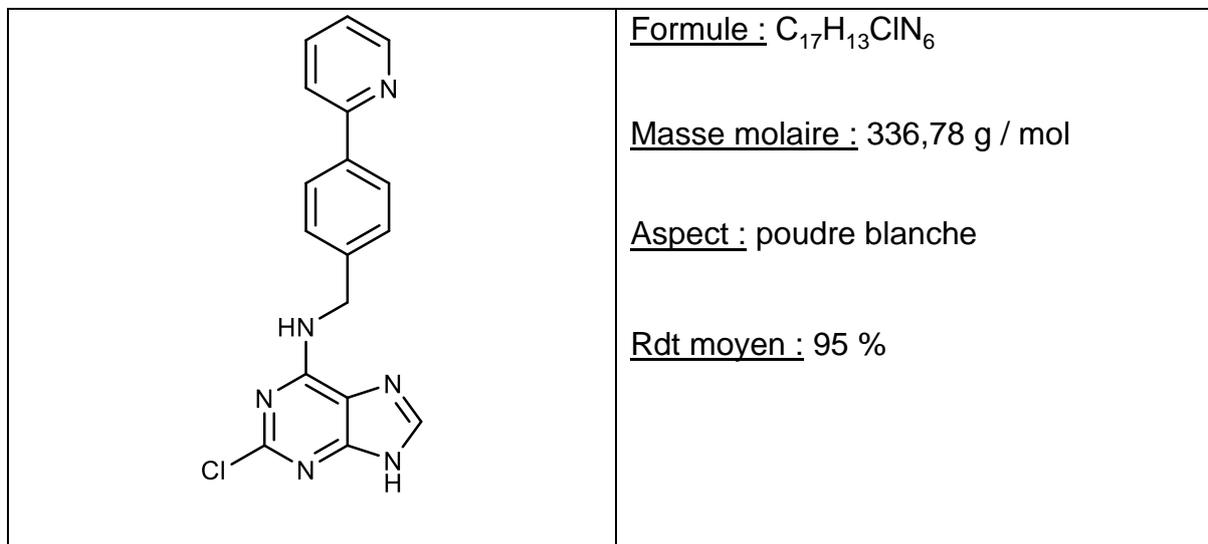
RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 42.92 (CH₂); 126.61; 127.142; 128.06.

On applique à nouveau le protocole A pour :

- 5 g de **2,6-dichloro-9H-purine** : Rdt = 92 %
- 15 g de **2,6-dichloro-9H-purine** : Rdt = 98 %
- 15 g de **2,6-dichloro-9H-purine** : Rdt = 96 %
- 15 g de **2,6-dichloro-9H-purine** : Rdt = 97 %

On applique le [protocole A](#) pour 4,62 g (0,0024 mol) de **2,6-dichloro-9H-purine** et 11,4 g (0,036 mol) de **(4-(pyridin-2-yl)phenyl)methanamine**.

2-chloro-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-9H-purin-6-amine.



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.70 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz, CH₂-NH); 7.31-7.34 (m, 1H, H_{pyridyl}); 7.45 (d, 2H, *J* = 8Hz, H_{phenyl}); 7.87 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H_{pyridyl}); 7.92 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H_{pyridyl}); 8.03 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{phenyl}); 8.16 (s, 1H, H-8); 8.64 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H_{pyridyl}).

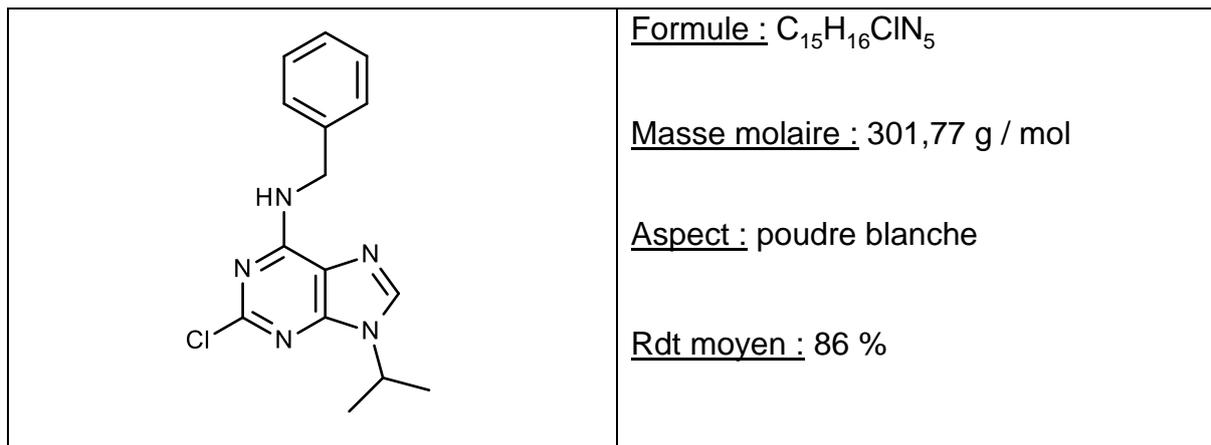
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 42.94, 120.09, 122.48, 126.51, 127.72, 137.19, 137.37, 149.50, 155.82.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 42.71 (CH₂), 119.83, 122.23, 126.26, 127.47, 136.94.

PROTOCOLE B : Alkylation :

On dissout le composé **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** (4 g, 15,4 mmol) dans le DMSO (30mL) à une température de 18 °C. A cette solution, on ajoute le K₂CO₃ (8,5 g, 61,6 mmol) puis goutte à goutte le 2-bromopropane (7,2 mL, 77 mmol) et on laisse sous agitation pendant 2 heures. La réaction est suivie par CCM dans un mélange 1 / 1 cyclohexane / AcOEt. On ajoute de l'eau (150 mL) pour solubiliser le DMSO et le K₂CO₃ restants. Après extraction à l'AcOEt, le produit **2** est isolé par rinçage à l'Et₂O (3,87 g, Rdt = 83 %).

N-benzyl-2-chloro-9-isopropyl-purin-6-amine



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.49 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, CH-(CH₃)₂); 4.66 (m, 2H, CH₂-NH); 4.66 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 7.22-7.34 (m, 5H, H_{phenyl}); 8.29 (s, 1H, H-8); 8.824 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 22,12; 43,08; 46,72; 126,80; 127,30 ; 128,28 ; 139,36 ; 149,38 ; 152,72 ; 154,91.

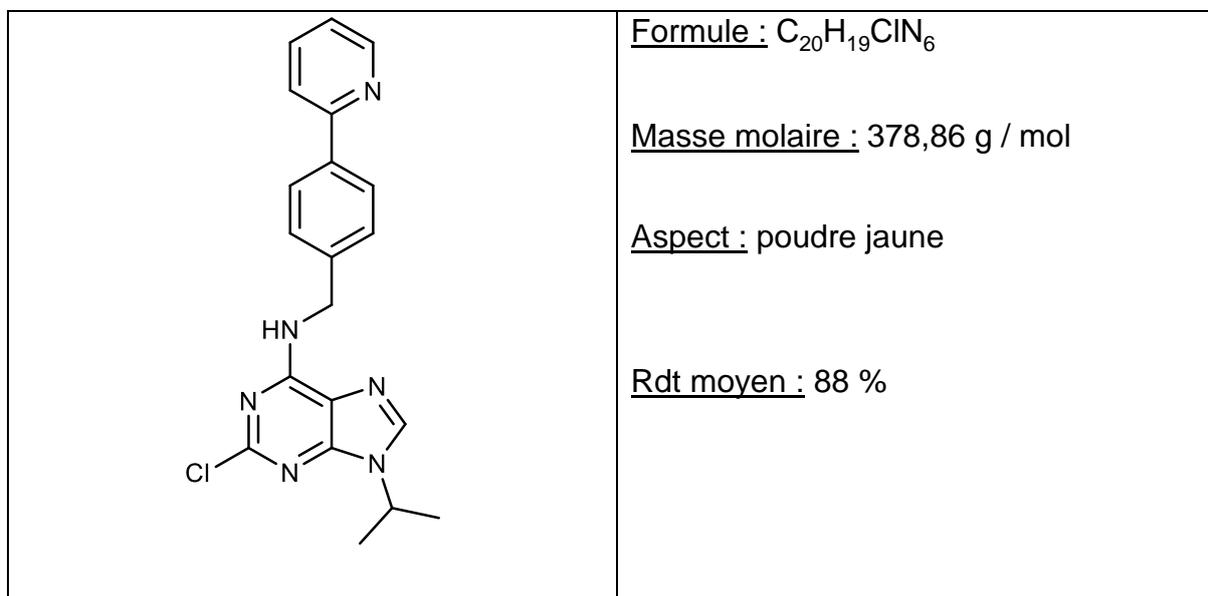
RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 21.90; 42.83 (CH₂); 46.47; 126.55 ; 127.05 ; 128.03 ; 139.19.

On applique à nouveau le [protocole B](#) pour :

- 4 g de **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** : Rdt = 80 %
- 4 g de **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** : Rdt = 85 %
- 4 g de **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** : Rdt = 88 %
- 50 g de **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** : Rdt = 83 %
- 10 g de **N-benzyl-2-chloro-9H-purin-6-amine** : Rdt = 94 %

On applique le [protocole B](#) pour 8,09 g (0,024 mol) de **2-chloro-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-9H-purin-6-amine**.

2-chloro-9-isopropyl-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl)-9H-purin-6-amine



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.49 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz, CH(CH₃)₂); 4.67 (m, 3H, CH₂-NH, CH-(CH₃)₂); 7.29-7.32 (m, 1H, H_{pyridyl}); 7.45 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{phenyl}); 7.82-7.91 (m, 2H, H_{pyridyl}); 8.02 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{phenyl}); 8.3 (s, 1H, H-8); 8.63 (d, 1H, *J* = 4Hz, H_{pyridyl}); 8.88 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 22.11, 42.90, 46.74, 118.49, 120.06, 122.44, 126.48, 127.65, 137.16, 137.33, 139.48, 140.31, 149.48, 152.76, 154.93, 155.83.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 21.88, 42.65 (CH₂), 46.50, 119.81, 122.20, 126.23, 127.40, 136.91, 139.23.

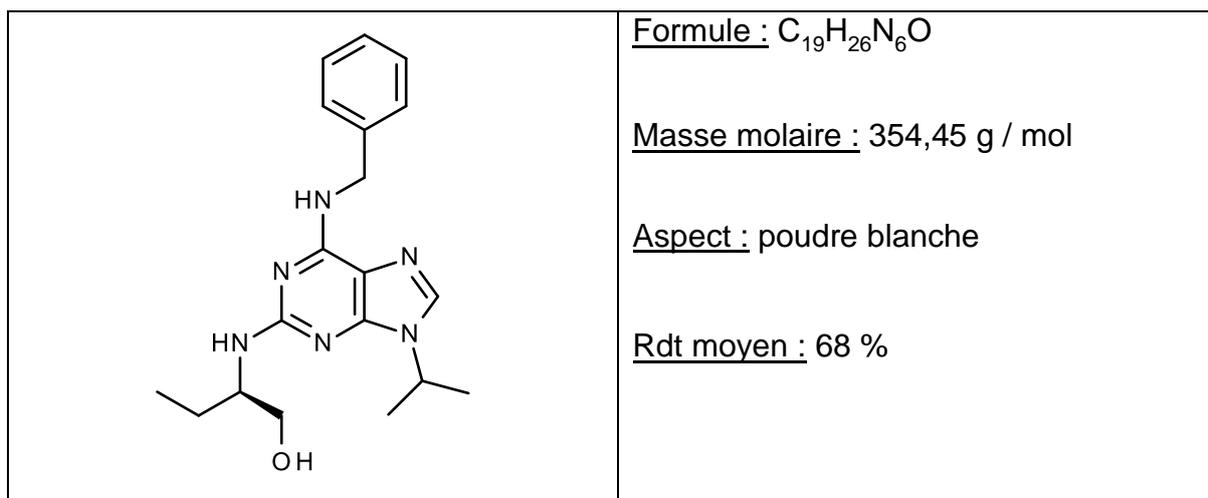
PROTOCOLE C : Amination :

On met en réaction la molécule **N-benzyl-2-chloro-9-isopropyl-purin-6-amine** (1 g, 3,31 mmol) avec le (2R)-2-aminobutan-1-ol (2,49 mL, 26,5 mmol) dans un tube en pyrex sous agitation et à une température de 160°C pendant 8 heures. Le suivi de la réaction est effectué par CCM dans l'AcOEt 100%.

Après extraction à l'AcOEt, le produit **3** (0,709 g, Rdt = 61 %) est obtenu par cristallisation dans l'Et₂O.

(2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-purin-2-yl]amino]butan-1-ol : (R)-

Roscovitine



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ ppm: 0.827 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃); 1.45 (m, 6H, CH-(CH₃)₂); 1.52 (m, 2H, CH₂-CH₃); 3.43 (m, 1H, CH₂-OH); 3.46 (m, 1H, CH₂-OH); 3.78 (m, 1H, CH-NH); 4.55 (m, 3H, CH₂NH, CH-(CH₃)₂); 7.17-735 (m, 5H, H_{phenyl}); 7.77 (s, 1H, H-8).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆): δ 10,69; 22,03; 22,12; 23,88; 45,61; 54,06; 63,06; 113,62; 126,43; 127,36; 128,05; 135,00; 140,80; 154,47; 159,01.

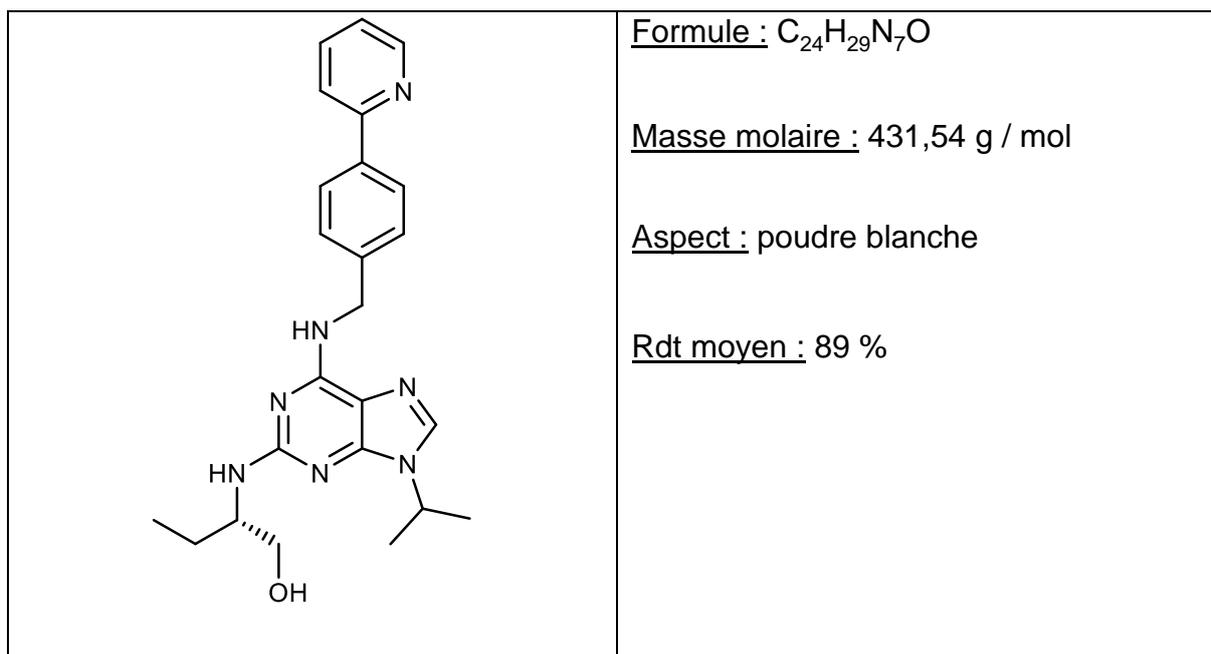
RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 10.44; 21.17 (CH₂); 23.64 (CH₂); 45.38; 53.81; 62.81(CH₂); 126.18 ; 127.10 ; 127.80 ; 134.74.

On applique à nouveau le [protocole C](#) pour :

- 2 g de **N-benzyl-2-chloro-9-isopropyl-purin-6-amine** : Rdt = 64 %
- 2 g de **N-benzyl-2-chloro-9-isopropyl-purin-6-amine** : Rdt = 70 %
- 2 g de **N-benzyl-2-chloro-9-isopropyl-purin-6-amine** : Rdt = 70 %

On applique à nouveau le [protocole C](#) pour 4g (0,010 mol) de **2-chloro-9-isopropyl-N-(4-(pyridin-2-yl)benzyl) 9H-purin-6-amine** et 7.9 mL (0,084 mol) de (2S)-2-aminobutan-1-ol.

(S)-2-((9-isopropyl-6-((4-(pyridin-2-yl)benzyl)amino)-9H-purin-2-yl)amino)butan-1-ol



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.83 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃-CH₂,); 1.44 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, CH-(CH₃)₂); 1.60 (m, 2H, CH₃-CH₂); 3.48 (m, 1H, CH₂-OH); 3.35(m, 1H, CH₂-OH); 3.79-3.81 (m, 1H, CHNH); 4.59 (m, 3H, NH-CH₂, CH-(CH₃)₂); 5.87 (bs, 1H, NHCH₂); 7.31 (m, 1H, H_{pyridyl}); 7.46 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{phenyl}); 7.77 (s, 1H, H-8); 7.79-7.83 (m, 2H, H_{pyridyl}); 8.00 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{phenyl},); 8.63 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, H_{pyridyl}).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 10.70, 22.03, 22.12, 23.89, 45.65, 54.08, 63.07, 120.02, 122.37, 127.71, 135.05, 136.98, 137.15, 141.83, 149.47, 155.97, 159.03.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 10.46, 21.77 (CH₂), 23.65 (CH₂), 45.41, 53.83, 62.81 (CH₂), 119.76, 122.12, 127.45, 134.79, 136.91.

SYNTHESE DES PHOSPHORAMIDATES :

PROCOLE D : Phosphoramidation :

On dissout le **chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-Alanine** (2,73 g, 19,6 mmol) dans 100 mL de DCM, sous agitation et sous atmosphère d'azote.

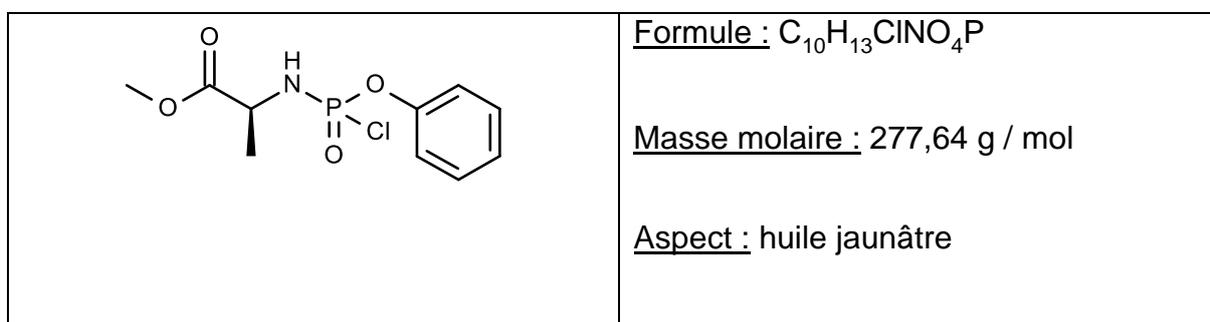
Le mélange est refroidi à -78 °C à l'aide d'un bain d'acétone et de carboglace. A cette température, on ajoute la **phenyl phosphorodichloridate** (2,91 mL, 19,6 mmol) suivie de la TEA (5,46 mL, 39,2 mmol).

La solution est maintenue à -78°C pendant une heure, avant de revenir à TA.

Arrêt de la réaction par évaporation du DCM, on reprend l'huile formée dans de l'Et₂O pour faire précipiter les sels qui seront séparés du produit par filtration sous vide sur fritté.

Le filtrat est évaporé à pression réduite pour obtenir la **methyl (2S)-2-[[chloro(phenoxy)phosphoryl]amino]propanoate (Ala Phosphorochloridate)**.

Methyl (2S)-2-[[chloro(phenoxy)phosphoryl]amino]propanoate : Ala Phosphorochloridate



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.18 (d, 3H, CH₃-CH); 3.55 (s, 3H, O-CH₃); 3.77 (m, 1H, CH-NH); 7.11-7.17 (m, 3H, H_{phenyl}); 7.23-7.39 (m, 2H, H_{phenyl}).

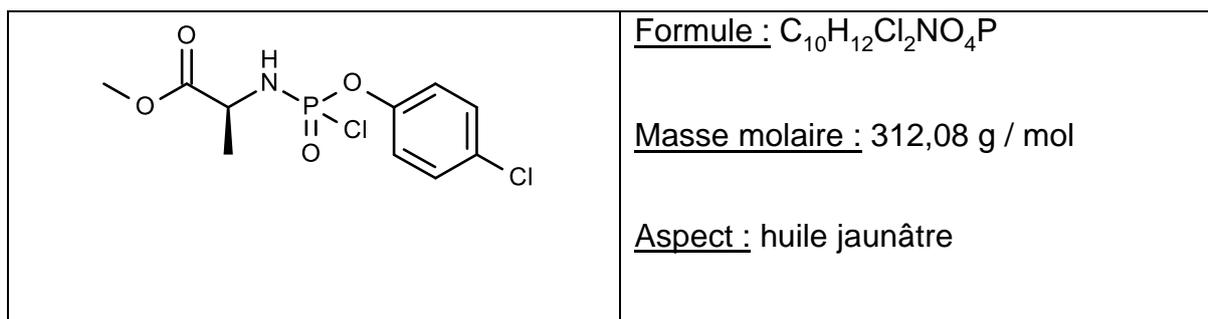
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 15.23 ; 51.90 ; 52.62 ; 120.53 ; 120.2 ; 123.94 ; 129.50 ; 129.72 ; 129.76 ; 173.27.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 15.44; 51.58 ; 52.37 ; 119.90 ; 119.95 ; 123.70 ; 129.25.

On applique le [protocole D](#) pour :

- 2,5 g de chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-Alanine et 2,91 mL de 4-Chlorophenyl phosphorodichloridate.

**Methyl (2S)-2-[[chloro-(4-chlorophenoxy)phosphoryl]amino]propanoate : Ala
Chloro Phosphorochloridate**



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.24 (m, 3H, CH₃-CH); 3.57 (m, 3H, O-CH₃); 3.88 (m, 1H, CH-NH); 7.17-7.26 (m, 2H, H_{phenyl}); 7.37-7.44 (m, 2H, H_{phenyl}).

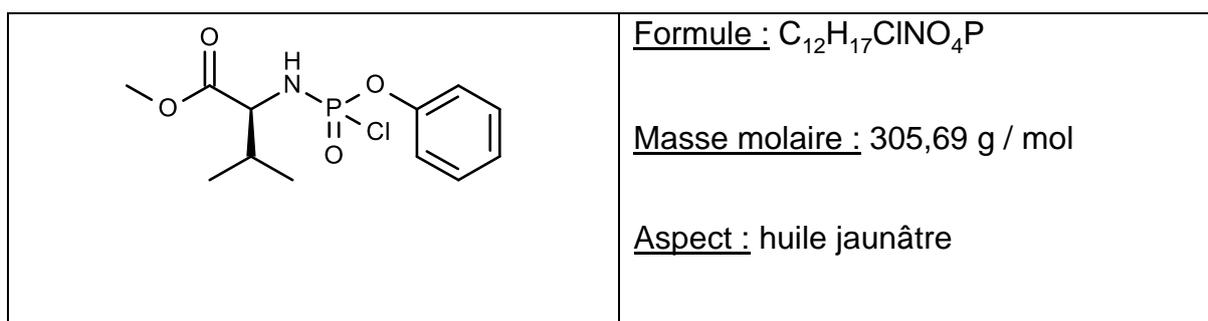
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 15; 51.79 ; 52.6 ; 122.22 ; 122.27 ; 127.84 ; 129.19 ; 129.28 ; 129.658 ; 174.05.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 15.43; 51.59 ; 52.54 ; 121.97 ; 122.01 ; 128.48 ; 128.94 ; 129.03 ; 129.40.

On applique le [protocole D](#) pour :

- 2,5 g de chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-Valine et 2,22 mL de phenyl phosphorodichloridate.

**Methyl (2S)-2-[[chloro(phenoxy)phosphoryl]amino]-3-methyl-butanoate : Val
Phosphorochloridate**



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.93-0.97 (dd, 6H, J= 6.8 Hz, CH(CH₃)₂); 2.16 (m, 1H, CH₃-CH-CH₃); 3.54 (m, 1H, CH-NH); 3.75 (s, 3H, O-CH₃); 3.88 (s, 1H, NH); 7.08-7.31 (m, 5H, H_{phenyl}).

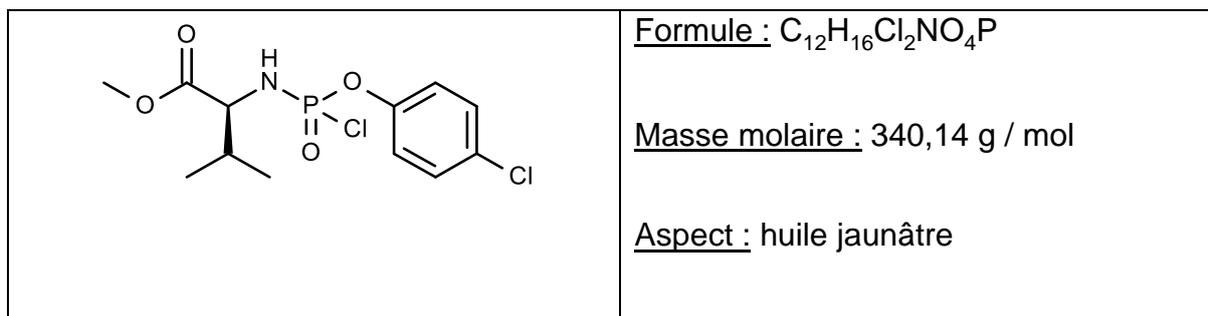
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 17.58; 18.37; 29.36; 52.63; 57.28; 120.17; 120.22 ; 123.79 ; 129.32 ; 129.41 ; 129.50 ; 169.33.

RMN DEPT (DMSO- d_6): δ 17.33; 18.12 ; 29.11 ; 52.38 ; 57.02 ; 119.92 ; 119.97 ; 123.54 ; 129.07.

On applique le [protocole D](#) pour :

- 2,51 g de **chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-Valine** et 2,44 mL de **4-Chlorophenyl phosphorodichloridate**.

Methyl (2S)-2-[[chloro-(4-chlorophenoxy)phosphoryl]amino]-3-methylbutanoate : Val Chloro Phosphorochloridate



RMN¹H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.78-0.81 (dd, 6H, J = 6.8 Hz, CH(CH₃)₂); 1.86 (m, 1H, CH₃-CH-CH₃); 3.52 (s, 3H, O-CH₃); 3.56 (m, 1H, CH-NH); 7.15-7.39 (m, 4H, H_{phenyl}).

RMN¹³C (DMSO- d_6): δ 17.21; 18.81; 30.72; 52.47; 63.59 ; 121.89 ; 121.94 ; 127.73 ; 129.15 ; 129.30 ; 129.58 ; 172.29.

RMN DEPT (DMSO- d_6): δ 16.96; 18.57; 30.47; 52.23 ; 63.34 ; 121.64 ; 121.69 ; 122.00 ; 129.06.

SYNTHESE DES PRODRUGS :

PROTOCOLE E : Couplage :

On dissout la molécule (**R**)-Roscovitine (0,5 g, 1,41 mmol) dans 30 mL de THF. On ajoute **Ala Phosphorochloridate** (1,17 g, 4,23 mmol) puis le milieu est placé sous azote.

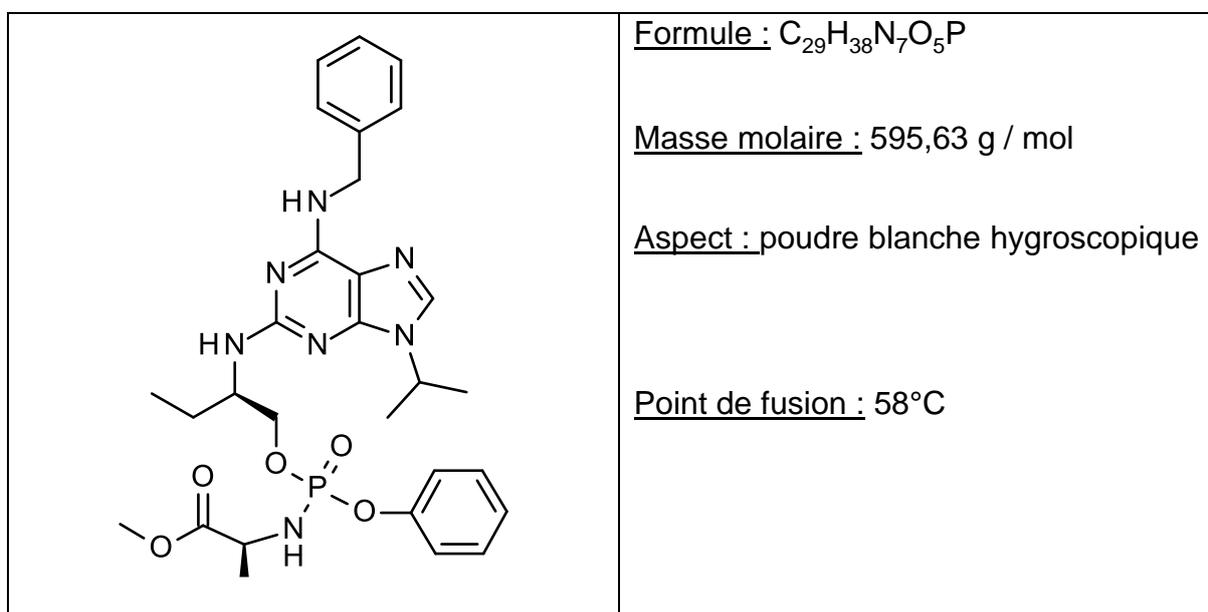
Le mélange est refroidi à -78 °C à l'aide d'un bain d'acétone et de carboglace. A cette température, on ajoute le NMI (0,56 mL, 7,05 mmol).

La solution est maintenue à -78°C pendant 15 minutes puis on laisse revenir à TA pendant 16 à 18 heures.

Arrêt par évaporation du THF, extraction du milieu réactionnel par le DCM avec ajout de 20 mL HCl (0.5M) pour neutraliser le NMI excédent.

Le produit **Rosco Ala H** (0,28 g, Rdt = 33 %) est obtenu par cristallisation dans un mélange d'Et₂O et de THF.

Methyl (2S)-2-[[[(2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-purin-2-yl]amino]butoxy]-phenoxy]-phosphoryl]amino]propanoate : Rosco Ala H



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.82 (t, 3H, CH₃-CH₂-CH); 1.21 (m, 3H, (CH₃)-CH-NH); 1.45 (s, 6H, CH₃)₂-CH); 1.58 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 3.45 (m, 3H, OCH₃); 3.61-3.84 (m, 1H, CH-NH-P); 3.61-3.84 (m, 2H, CH₂-O-P); 4.03 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.62 (s, 1H, CH-(CH₃)₂); 4.62 (m, 2H, CH₂-NH); 7.13-7.35 (m, 10H, H_{phenyl}); 7.77 (s, 1H, H-8).

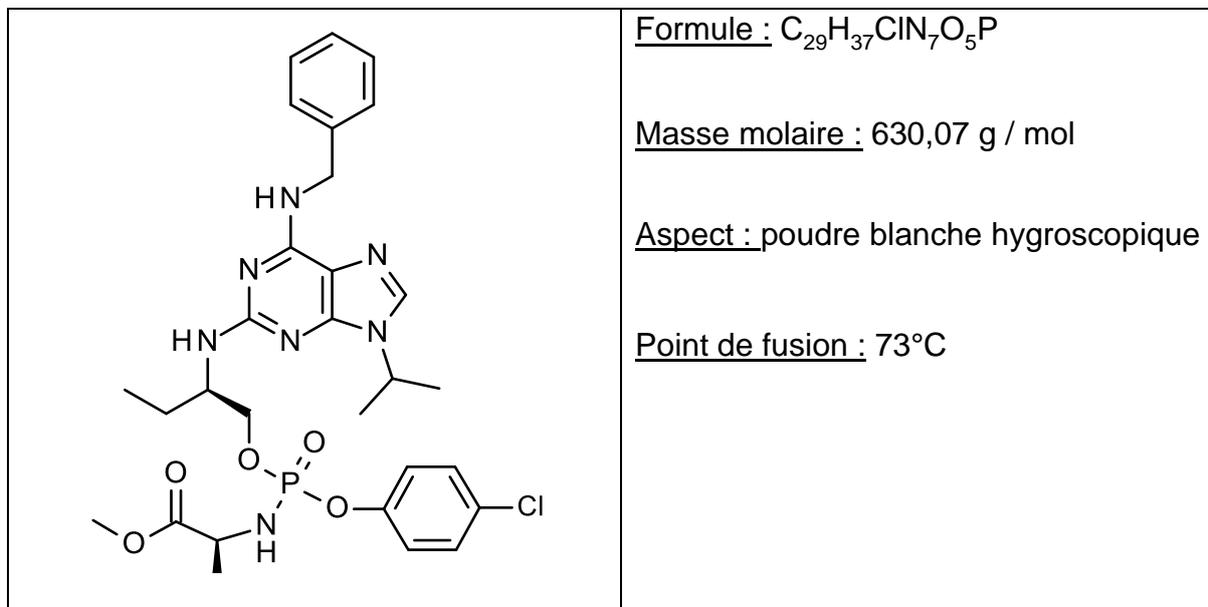
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 10.69 ; 22.03 ; 22.12 ; 23.88 ; 45.64 ; 51.77 ; 54.05 ; 63.05 ; 126.43 ; 127.36 ; 128.05 ; 128.42 ; 129.47 ; 135.00 ; 159.00.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 10.44 ; 21.77(CH₂); 23.63 (CH₂) ; 45.37 ; 50.99 ; 51.51 ; 53.81 ; 62.80 (CH₂) ; 119.92 ; 126.18 ; 127.10 ; 127.80 ; 128.17 ; 129.22 ; 134.73.

On applique le [protocole E](#) pour :

- 1 g de **(R)-Roscovitine** et 2,47 g de **Ala Chloro Phosphorochloridate** pour obtenir 0,876 g de **Rosco Ala Cl** (Rdt = 49 %).

Methyl 2-[[[(2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-purin-2-yl]amino]butoxy]-(4-chlorophenoxy)phosphoryl]amino]propanoate : Rosco Ala Cl



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.83 (s, 3H, CH₃-CH₂-CH); 1.18 (t, 3H, CH₃-CH-NH); 1.43 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz, (CH₃)₂-CH); 1.55 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 3.53 (m, 3H, OCH₃); 3.74 (m, 1H, CH-NH-P); 3.74 (m, 2H, CH₂-O-P); 3.74 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.56 (m, 1H, N-CH-(CH₃)₂); 4.56 (m, 2H, CH₂-NH); 7.11-7.38 (m, 9H, H_{phenyl}); 7.80 (s, 1H, H₈).

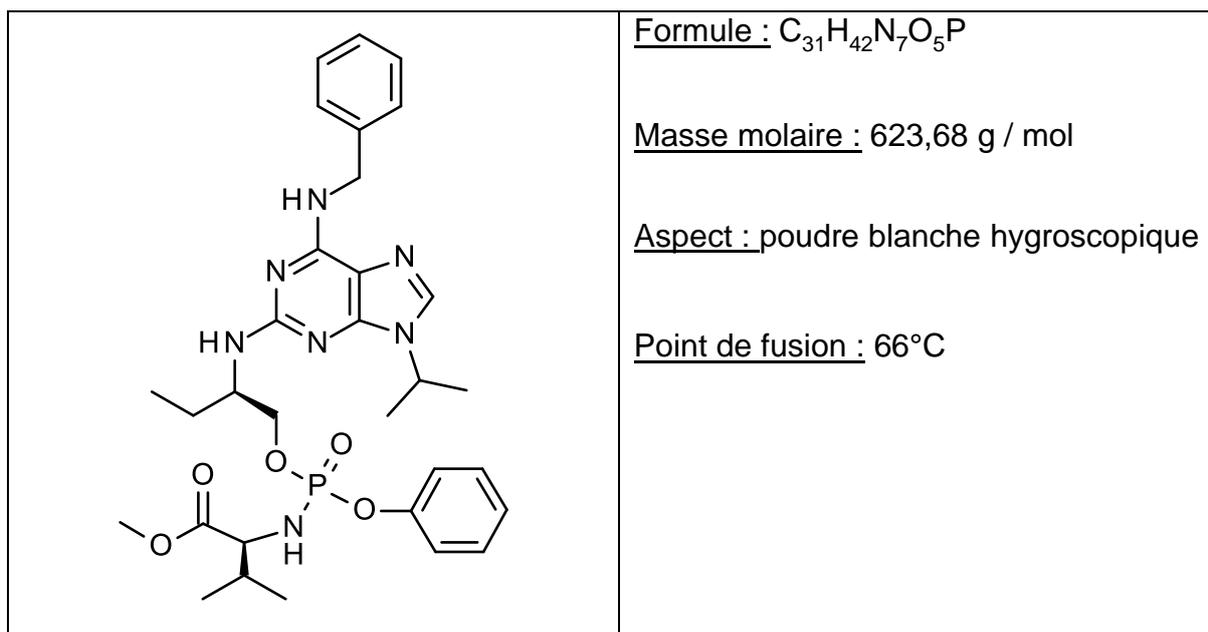
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 11.31 ; 21.60 ; 21.65 ; 22.43 ; 23.09; 28.69 ; 44.98 ; 46.92 ; 51.93 ; 52.63 ; 60.46 ; 112.44 ; 121.86 ; 121.91 ; 127.61 ; 128.39 ; 128.53 ; 128.63 ; 128.83 ; 128.91 ; 136.53 ; 138.11 ; 147.28 ; 154.30 ; 156.62 ; 176.03.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 11.87 ; 21.54(CH₂) ; 23.15(CH₂) ; 24.32.38 ; 46.80 ; 51.42 ; 52.39 ; 60.45(CH₂) ; 121.57 ; 121.62 ; 121.72 ; 127.43 ; 127.81 ; 128.17 ; 128.33 ; 128.49 ; 128.66 ; 128.71 ; 128.85 ; 136.39.

On applique le [protocole E](#) pour :

- 1 g de **(R)-Roscovitine** et 2,89 g de **Val Phosphorochloridate** pour obtenir 1,223 g de **Rosco Val H** (Rdt = 69 %).

Methyl (2S)-2-[[[(2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-purin-2-yl]amino]butoxy]-phenoxy-phosphoryl]amino]-3-methyl-butanoate : Rosco Val H



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.80 (m, 3H, CH₃-CH₂-CH); 0.80 (m, 6H, (CH₃)₂-CH-CH); 1.49 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, (CH₃)₂-CH-N); 1.90 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 1.98 (s, 1H, CH-CH-(CH₃)₂); 3.57 (m, 3H, OCH₃); 3.69 (m, 2H, NH-CH-P); 4.04 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.11 (s, 2H, CH₂-O-P); 4.50 (s, 1H, NCH-(CH₃)₂); 4.95 (m, 2H, CH₂-NH); 7.04-7.3 (m, 10H, H_{phenyl}); 7.50 (s, 1H, H-8).

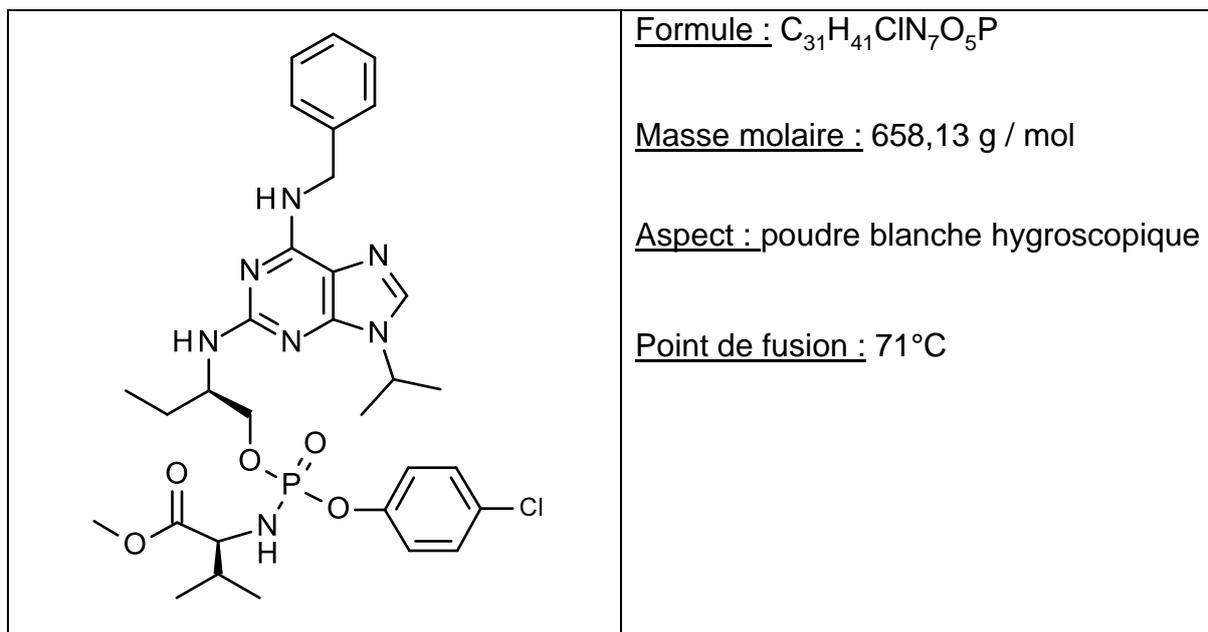
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 17.85 ; 18.06 ; 18.32 ; 18.90 ; 22.48 ; 22.60 ; 29.83 ; 31.01 ; 47.03 ; 51.56 ; 60.56 ; 112.58 ; 120.40 ; 120.45 ; 120.80 ; 123.51 ; 127.63 ; 128.04 ; 128.39 ; 128.49 ; 128.93 ; 128.98 ; 129.38 ; 126.68 ; 151.85 ; 152.51.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 17.64; 17.88 ; 18.13 ; 18.72 ; 22.30 ; 22.42 ; 29.63; 32.45(CH₂) ; 44.86 (CH₂) ; 46.84 ; 51.37 ; 52.38 ; 60.39(CH₂); 120.62 ; 122.23 ; 123.32 ; 127.44 ; 127.85 ; 128.20 ; 128.31 ; 128.74 ; 128.79 ; 128.91 ; 136.49.

On applique le [protocole E](#) pour :

- 1 g de (**R**)-Roscovitine et 3,2 g de Val Chloro Phosphorochloridate pour obtenir 1,75 g de Rosco Val Cl (Rdt = 99 %).

**Methyl (2S)-2-[[[(2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-isopropyl-purin-2-yl]amino]butoxy]-
(4-chlorophenoxy)phosphoryl]amino]-3-methyl-butanoate : Rosco Val Cl**



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.76 (m, 6H, (CH₃)₂-CH-CH-NH); 1.16 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃-CH₂-CH); 1.43(d, 6H, *J* = 6.8 Hz, (CH₃)₂-CH-N); 1.79 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 3.47 (s, 3H, O-CH₃); 3.54 (d, 2H, *J* = 6 Hz, CH₂-O-P); 3.99 (m, 1H, CH-NH-P); 3.99 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.55 (m, 1H, N-CH-(CH₃)₂); 4.58 (m, 2H, CH₂-NH); 7.08-7.34 (m, 9H, H_{phenyl}); 7.80 (s, 1H, H-8).

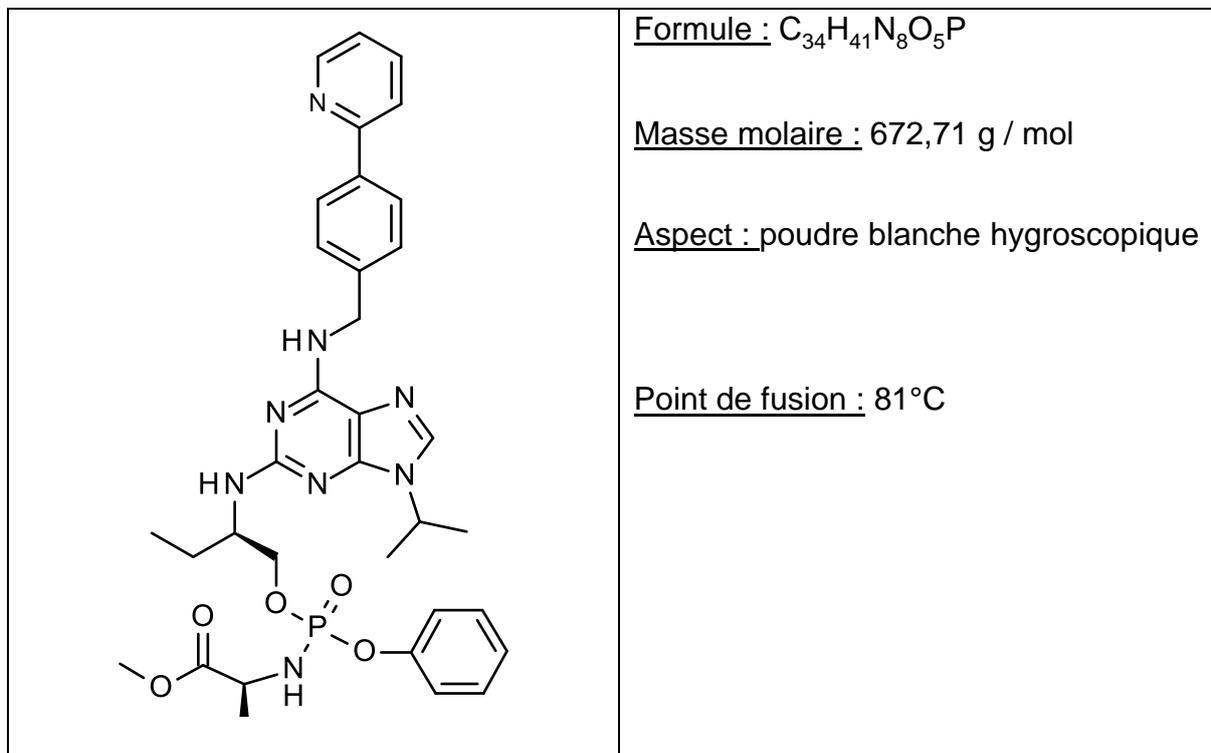
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 18.08 ; 18.98 ; 22.42 ; 22.66 ; 29.84 ; 31.45 ; 32.58 ; 32.64 ; 47.01 ; 51.61 ; 60.66 ; 121.77 ; 121.82 ; 121.94 ; 127.63 ; 128.02 ; 128.37 ; 128.54 ; 128.70 ; 128.86 ; 129.05 ; 136.59 ; 151.82.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 17.87 ; 18.78 ; 22.22 ; 22.46 ; 29.64; 32.38(CH₂) ; 32.44 ; 46.80 ; 51.42 ; 51.99 ; 52.39 ; 60.45(CH₂) ; 121.57 ; 121.62 ; 121.72 ; 127.43 ; 127.81 ; 128.17 ; 128.33 ; 128.49 ; 128.66 ; 128.71 ; 128.85 ; 136.39.

On applique le [protocole E](#) pour :

- 0,5 g de **(S)-CR8** et 0.96 g de **Ala Phosphorochloridate** pour obtenir 0,132 g de **CR8 Ala H** (Rdt = 17 %).

Methyl (2S)-2-[[[(2R)-2-[[9-isopropyl-6-[[4-(2-pyridyl)phenyl]methylamino]purin-2-yl]amino]butoxy]-phenoxy-phosphoryl]amino]propanoate : CR8 Ala H



RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.83 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃-CH₂-CH,); 1.11 (d, 3H, CH₃-CH); 1.45 (d, 6H, *J* = 5.6 Hz, (CH₃)₂-CH,); 1.58 (d, 2H, *J* = 6Hz, CH₃-CH₂-CH,); 3.56 (m, 3H, O-CH₃); 3.91 (m, 1H, CH-NH); 3.91 (m, 2H, CH-CH₂-O); 4.59 (m, 2H, CH₂-NH); 4.59 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 7.09-8.01 (m, 13H, H_{phenyl}, H_{pyridyl}); 8.63 (s, 1H, H-8).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ .10.23 ; 22.04; 22.12; 23.88 ; 49.70, 51.29. 61.50; 120.02 ; 120.18 ; 122.38 ; 126.28 ; 127.71 ; 129.44 ; 137.16 ; 149.47.

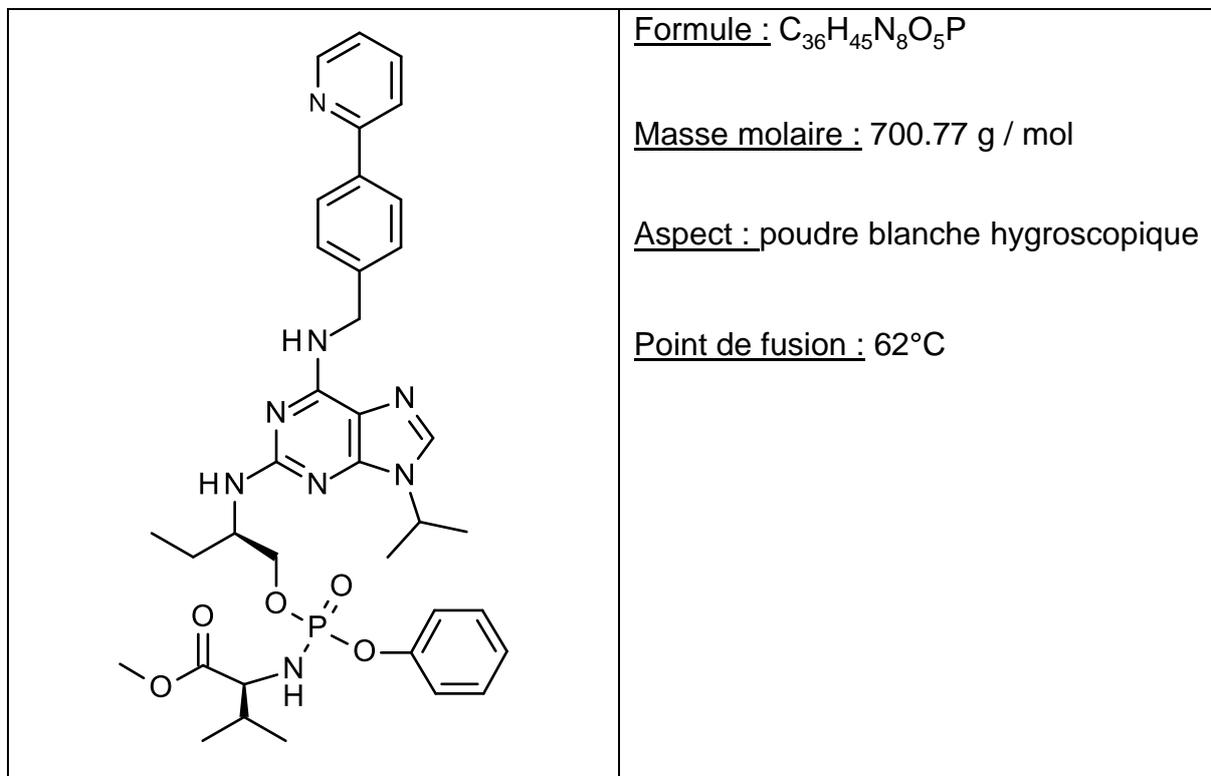
RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 10.30; 10.45, 22;10(CH₂); 49.48(CH₂) ; 50,02; 51.49 ; 62.79 (CH₂) ; 119.75 ; 119.92 ; 122.12 ; 124.09 ; 126.02 ; 127.45 ; 129.18 ; 136.92.

On applique le [protocole E](#) pour :

- 1 g de **(S)-CR8** et 2,12 g de **Val Phosphorochloridate** pour obtenir 0,49 g de **CR8 Val H** (Rdt = 30 %).

Methyl (2S)-2-[[[(2R)-2-[[9-isopropyl-6-[[4-(2-pyridyl)phenyl]methylamino]purin-2-yl]amino]butoxy]-phenoxy-phosphoryl]amino]-3-methyl-butanoate : CR8 Val

H



RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 0.75 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃-CH₂-CH₂); 0.80 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, (CH₃)₂-CH-CH₂); 1.40 (s, 6H, (CH₃)₂-CH-NH); 1.53 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₃-CH₂-CH₂); 3.50 (s, 3H, O-CH₃); 3.76 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, CH₂-O); 3.92 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.57 (m, 2H, CH₂-NH); 4.56 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 7.08-7.99 (m, 13H, H_{phenyl}, H_{pyridyl}); 8.61 (d, 1h, *J* = 4.3 Hz, H-8).

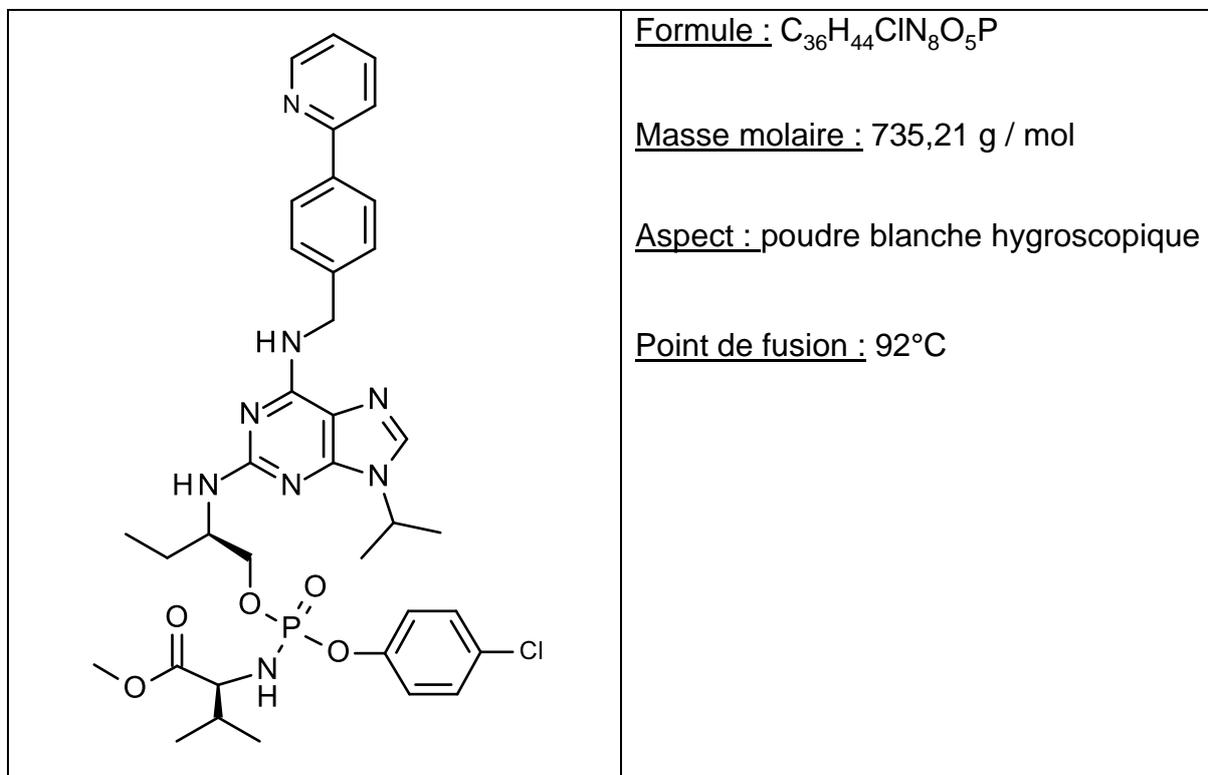
RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ 17.62 ; 18.45 ; 22.18 ; 23.58 ; 52.30 ; 57.45 ; 63.10 ; 120.08 ; 126.35 ; 128.51 ; 128.81 ; 137.28 ; 150.49.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ 17.68 ; 18.50(CH₂); 21.68; 24.02 (CH₂) ; 29.28; 33.14(CH₂) ; 52.31 ; 53.86 ; 57.00 ; 67.27 (CH₂) ; 119.77 ; 121.40 ; 121.59 ; 122.14 ; 126.08 ; 127.30 ; 128.58 ; 128.68 ; 136.80

On applique le [protocole E](#) pour :

- 0,25 g de **(S)-CR8** et 0,591 g de **Val Chloro Phosphorochloridate** pour obtenir 0,027 g de **CR8 Val H** (Rdt = 6 %).

Methyl (2S)-2-[[[(4-chlorophenoxy)-[(2R)-2-[[9-isopropyl-6-[[4-(2-pyridyl)phenyl]methylamino]purin-2-yl]amino]butoxy]phosphoryl]amino]-3-methyl-butanoate : CR8 Val Cl



RMN¹H (DMSO-*d*₆): δ 0.77 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, CH₃-CH₂-CH); 0.81 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz, (CH₃)₂-CH-CH); 1.45 (s, 6H, (CH₃)₂-CH-NH); 1.58 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₃-CH₂-CH); 3.52 (s, 3H, O-CH₃); 3.78 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, CH₂-O,); 3.95 (m, 1H, CH-CH₂-O); 4.59 (m, 2H, CH₂-NH); 4.59 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 7.10-8.01 (m, 12H, H_{phenyl}, H_{pyridyl}); 8.63 (d, 1h, *J* = 4.4 Hz, H-8).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆): δ; 17.58 ; 18.25 ; 22.11 ; 23.86 ; 52.56 ; 57.25 ; 63.00 ; 120.04 ; 126.30 ; 127.72 ; 128.51 ; 128.81 ; 137.17 ; 149.49.

RMN DEPT (DMSO-*d*₆): δ; 17.32 (CH₂) ; 18.00(CH₂) ; 21.89 ; 23.62 (CH₂) ; 29.17 ; 52.31 ; 53.86 ; 57.00 ; 62.74 (CH₂) ; 119.77 ; 121.40 ; 121.59 ; 122.14 ; 126.04 ; 127.47 ; 128.25 ; 128.55 ; 136.92.

BIBLIOGRAPHIE :

[1] **CDK inhibitors R-roscovitine and S-CR8 effectively block renal and hepatic cystogenesis in an orthologous model of ADPKD.** Bukanov N.O., Moreno S.E., Natoli T.A., Rogers K. A., Smith L. A., Ledbetter S. R., Oumata N., Galons H., Meijer L. , Ibraghimov-Beskrovnya O; *Cell Cycle*, **2012**, 11:21, 4040-4046.

[2] **Normal Values for Renal Length and Volume as Measured by Magnetic Resonance Imaging.** Cheong B., Muthupillai R., Rubin M. F., Flamm S. D. ; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **2007**, 2:38-45.

[3] Büchler M., Chauveau D., Ferec C., Gagnadoux M.F., Genin E., Heidet L., Joly D., Levy M., Pirson Y., Torra R. ; **La polykystose rénale dominante autosomique** [online]. 3^{ème} éd. : AIRG-France ; 2017. Available from WorldWide

Web : <http://www.sfndt.org/sn/PDF/eublic/asso/AIRG/livrets/PKD.pdf>

[4] Association Polykystose France (page consultée le 11/02/2018). Connaître la polykystose, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.polykystose.org/la-polykystose/connaitre-la-polykystose/>

[5] Département de médecine, service de néphrologie (page consultée le 24/03/2018). Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, [PDF en ligne]. Adresse URL : <http://www.chuv.ch/nephrologie/nep-systeme-renine-angiotensine-aldosterone.pdf>

[6] Cochat, P. ; Université de Lyon. (Page consultée le 17/02/2018). Site du CHU de Lyon, [PDF en ligne]. Adresse URL : http://www.chulyon.fr/web/attached_file/Polykystose.pdf?ComponentId=kmelia16&attachmentId=19789

[7] Association Polykystose France (page consultée le 11/02/2018). Le diagnostic de PKD, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.polykystose.org/la-medecine/le-diagnostic-de-pkd/>

[8] Antignac, C. ; Université Paris Descartes. (page consultée le 13/02/2017). Site de l'INSERM, [PDF en ligne]. Adresse URL : <http://docplayer.fr/19958809-Role-des-cils-dans-la-formation-des-kystes-renaux-et-hepatiques.html>

- [9] Moulin B., Peraldi M.N. . Polykystose rénale. Ellipses, éditeur. Réussir l'ECN, 7^{ème} édition ; 2016. P. 267-277.
- [10] Haute Autorité de Santé. (page consultée le 20/02/2018). JINARC (tolvaptan), antagoniste de la vasopressine, [en ligne]. Adresse URL : https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2589169/fr/jinarc-tolvaptan-antagoniste-de-la-vasopressine
- [11] Vidal. (page consultée le 20/02/2018). JINARC (tolvaptan) : premier médicament dans la prise en charge de la PKRAD, [en ligne]. Adresse URL : https://www.vidal.fr/actualites/19730/jinarc_tolvaptan_premier_medicament_dans_la_prise_en_charge_de_la_pkrad/
- [12] Vidal. (page consultée le 20/02/2018). Octréotide, [en ligne]. Adresse URL : <https://www.vidal.fr/substances/7008/octreotide/>
- [13] **Marcus wins chemistry Nobel. Two biochemists take medicine prize.** Baum R., Borman S. ; *Chem. Eng. News*, **1992**, 70, 6-7.
- [14] Payen A, Persoz JF ; **Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels**, Annales de chimie et de physique, 2^e série, t.53, 1833, p. 73-92, [en ligne]. Adresse URL : https://books.google.be/books?id=Q9I3AAAAMAAJ&pg=PA274&hl=fr&source=gbs_s_elected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false
- [15] **The protein kinase complement of the human genome.** Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., *Science*, **2002**, 298, 1912–34.
- [16] Nobel prize. (page consultée le 20/02/2018). The nobel prize in physiology or medicine 2001, [en ligne]. Adresse URL : https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/
- [17] **The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** Vermeulen, K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. ; *Cell Cycle*, **2003**, 36 :131-49.
- [18] **Therapeutics in Renal Disease : The Road Ahead for Antiproliferative Targets.** Nelson P.J., Shank S.J.. ; *Nephron Exp. Nephrol.*, **2006**, 1 : e6-15.
- [19] **Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease ?** Tsai L.H., Lee M.S., Cruz J. ; *Biochim. Biophys. Acta.*, **2004**, 1697 :137-42.

- [20] **Imatinib : preuve de validité d'un nouveau concept en oncologie moléculaire.** Blay J.Y., Le Cesne A. ; *Le cancer : nouvelles données, nouvelles stratégies, nouveaux espoirs.* ; 18 mars 2004, 8:24, p. 53-58, [en ligne]. Adresse URL : <http://institut-servier.com/sites/default/files/publications/le-cancer-nouvelles-donnees.pdf>
- [21] **A minute chromosom in human chronic granulocytic leukemia.** Nowell P.C. ; Hungerford D. ; *Science*, 142, 1960, p.1497.
- [22] **Pharmacology of Imatinib (sti571).** Buchdunger E., O'Reilly, T., Wood J. ; *Eur. J. Cancer*, 2002, 38(suppl5), s 28-36.
- [23] **STI571 : a New Treatment Modality on CML ?** Zimmermann J., Furet P., Buchdunger E. ; *Anticancer Agents, chapter 15*, 2001, pp 245-259.
- [24] **La résistance à l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique : Etude des mécanismes moléculaires.** Pocaly, M. ; Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux 2, 2007, 1486.
- [25] **Résistance à l'imatinib mésylate par mutation Bcr-Abl au cours de la leucémie myéloïde chronique. Quelle stratégie adopter ?** Nicolini F.E., Ducastelle S., Corm S. ; *Hématologie*, 2007, 13, 457-464.
- [26] **Sunitinib maleate.** Atkins M., Jones C.A., Kirkpatrick P. ; *Nature reviews Drug Discovery* 5, 2006, 279-280.
- [27] **Nilotinib : a novel, selective tyrosine kinase inhibitor.** Blay J.Y., Von Mehren M. ; *Semin. Oncol.*, 2011, 38, 467.
- [28] **Dasatinib.** Kantarjian H., Jabbour E., Grimley J., Kirkpatrick P. ; *Nature reviews Drug Discovery* 5, 2006, 717-718.
- [29] **Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5.** Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P., Blow J.J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P. ; *Eur. J. Med. chem.*, 1997, 243 : 527-36.
- [30] **Roscovitine and others purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials.** Meijer L., Raymond E. ; *Acc. Chem. Res.*, June 2003, 36(6) :417-25.

[31] Baguley B.C., Kerr D.J. ; **Anticancer Drug Development** [online]. Edition 1 [London, United Kingdom] : Academic Press, 17 November 2001. Available from WorldWide.

<https://books.google.fr/books?id=Alnc8kyh8U4C&pg=PA19&lpg=PA19&dq=6+dimethylaminopurine+ic50&source=bl&ots=wvEV3s8JtS&sig=tdwEg#v=onepage&q=6%20dimethylaminopurine%20ic50&f=false>

[32] **Preclinical studies of Roscovitine**, Vita et al., 2005, [en ligne]. Adresse URL : <https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/37807/thesis.pdf?sequence=1>

[33] **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings**. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. ; *Advanced drug delivery reviews, Issue 23*, **1997**, 3-25.

[34] **Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors : synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds**. Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. ; *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 408-412.

[35] **Tyrosine kinase inhibitors : from rational design to clinical trials**. Traxler P., Bold G., Buchdunger E., Caravatti G., Furet P., Manley P., O'Reilly T., Wood J., Zimmermann J. ; *Med. Res. Rev.*, **2001**, *21* : 499-512.

[36] **Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase**. Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S.P., Tang L., Jiang T., Liang D.C., Galons H., Dierick J.F., Pinna L.A., Meggio F., Totzke F., Schächtele C., Lerman A.S., Carnero A., Wan Y., Gray N., Meijer L. ; *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280* : 31208-19.

[37] **Seliciclib in malignancies**. Aldoss I.T., Tashi T., Ganti A.K. ; *Expert Opinion on Investigational Drugs, volume 18, issue 2* ; **2009**.

[38] **Roscovitine-derived, dual specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1**. Oumata N., Bettayeb K., Ferandin Y., Demange L., Lopez-Giral A., Goddard M.L., Myrianthopoulos V., Mikros E., Flajolet M., Greengard P., Meijer L., Galons H. ; *J. Med. Chem.*, **2008**, *51* : 5229-42.

[39] **CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases.** Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J.A., Galons H., Meijer L. ; *Oncogene*, **2008**, *27*, 5797-5807.

[40] **Reduction of ciliary length through pharmacologic or genetic inhibition of CDK5 attenuates polycystic kidney disease in a model of nephro nophthisis.** Husson H., Moreno S., Smith L.A., Smith M.M., Russo R.J., Pitstick R., Sergeev M., Ledbetter S.R., Bukanov N.O., Lane M., Zhang K., Billot K., Carlson G., Shah J., Meijer L., Beier D.R., Ibraghimov-Beskrovnaya O. ; *Human Molecular Genetics*, *Volume 25, Issue 11*, **2016**, 2245-2255.

[41] **The therapeutic Potential of Candoxatril, a Neutral Endopeptidase Inhibitor, in Humans.** Mc Dowell G., Nicholls D.P. ; *Cardiovascular Drug Review*, *Volume 18, Issue 4*, **2000**, 259-270.

[42] **Valaciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in herpesvirus infection.** Perry C.M., Faulds D. ; *Drugs*, **1996**, *52* : 754-72.

[43] **Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs bacampicillin and pivampicillin in man.** Ehrnebo M., Sten-Ove N., Boréus L.O. ; *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, *Volume 7, Issue 5*, **1979**, 429-51.

[44] **Cell-specific, activatable, and theranostic prodrug for dual-targeted cancer imaging and therapy.** Santra S., Kaittanis C., Santiesteban O.J., Perez J.M. ; *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133* : 16680-8.

[45] **Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release.** Chen S., Zhao X., Chen J., Chen J., Kuznetsova L., Wong S.S., Ojima I. ; *Bioconjug. Chem.*, **2010**, *21* : 979-87.

[46] Smith D.A. ; **Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional Groups : Impact of the Building Blocks of Medicinal Chemistry in ADMET** [online]. Edition 1 [Cambridge, United Kingdom] : Royal Society of Chemistry, 2010. Available from WorldWide. Web : <https://books.google.fr/books?id=Z7PmWUe0wmAC&pg=PA203&lpg=PA203&dq=diazepam+prodrug+metabolism&source=bl&ots=Xgk18Jp2Fg&sig=RQ#v=onepage&q=diazepam%20prodrug%20metabolism&f=false>

[47] **Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide : identification of cytochrome P450 2B enzyme and site-specific mutants with improved enzyme kinetics.** Chen C.S., Lin J.T., Goss K.A., He Y.A., Halpert J.R., Waxman D.J. ; *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *65* : 1278-85.

[48] **Studies on the mechanism of absorption of depot neuroleptics : fluphenazinedecanoate in sesame oil.** Luo J.P., Hubbard J.W., Midha K.K. ; *Pharm. Res.*, **1997**, *14* : 1079-84.

[49] Silverman R.B., Holladay M.W. ; **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.** [online]. Edition 3 [San Diego, United States of America] : Elsevier Inc., 2014. Available from WorldWide. Web : <https://books.google.fr/books?id=yAbUAgAAQBAJ&pg=PA435&dq=clindamycin+palmitate+prodrug&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjztGG19TMAhUsCsA#v=onepage&q=clindamycin%20palmitate%20prodrug&f=false>

[50] **Application of Phosphoramidate Pronucleotide Technology to Abcavir Leads to a Significant Enhancement of Antiviral Potency.** McGuigan C., Harris S.A., Daluge S.M., Gudmundsson K.S., McLean E.W., Burnette T.C., Marr H., Hazen R., Condreay L.D., Johnson L., De Clerq E., Balzarini J. ; *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 3504-3515.

[51] **Phosphoramidate ProTides of the Anticancer Agent FUDR Successfully Deliver the Preformed Bioactive Monophosphate in Cells and Confer Advantage over the Parent Nucleoside.** McGuigan C., Murziani P., Slusarczyk M., Gonczy B., Vande Voorde J., Liekens S., Balzarini J. ; *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 7247-7258.

[52] Application of ProTide Technology to Gemcitabine : A Successful Approach to Overcome the Key Cancer Resistance Mechanisms Leads to a New Agent (NUC1031) in Clinical Development. Slusarczyk M., Huerta Lopez M., Balzarini J., Mason M., Jiang W.G., Blagden S., Thompson E., Ghazaly E., McGuigan C. ; *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 1531-1542.

[53] Design, synthesis and biological evaluation of phosphorodiamidate prodrugs of antiviral and anticancer nucleosides. McGuigan C., Bourdin C., Derudas M., Hamon N., Hinsinger L., Kandil S., Madela K., Meneghesso S., Pertusati F., Serpi M., Slusarczyk M., Chamberlain S., Kolykhalov A., Vernachio J., Vanpouille C., Introini A., Margolis L., Balzarini J. ; *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *70* : 326-340.



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

PREPARATIONS DE PRODRUGUES D'INHIBITEURS DE KINASE : SYNTHÈSE DE PHOSPHORAMIDATES

Résumé

La polykystose rénale est la plus fréquente des maladies génétiques (mutation des gènes PKD1 et PKD2). Ces mutations entraînent la formation de kystes rénaux. La formation de kystes rénaux cause l'augmentation du volume des reins ; il en résulte une diminution des fonctions rénales et la mise en place dans 2/3 des cas d'une insuffisance rénale.

Les seuls traitements actuels sont la dialyse rénale ou la greffe qui sont lourds pour l'individu et coûteux pour les organismes en charge de la santé.

L'objectif de cette thèse est donc de développer des traitements innovants de cette pathologie. Il s'agit d'inhibiteurs de kinases dépendantes de cycline (CDK). Deux molécules de cette famille ont révélées des activités intéressantes sur la polykystose rénale. Cependant, elles présentent des biodisponibilités insuffisantes pour envisager de les utiliser en tant que traitement. C'est pourquoi nous avons tenté d'en synthétiser des prodrogues pour ensuite en évaluer les paramètres pharmacologiques.

TITLE

PREPARATION OF PRODRUGS OF KINASE INHIBITORS : PHOSPHORAMIDATES' SYNTHESIS

Summary

Polycystic kidney disease is the most common genetic disease (PKD1's mutation or PKD2's mutation). These mutations create kidney's cysts. The kidney's cysts growth increases kidney's volume ; that fact leads to a decreasing in the kidney's functions and finally a renal failure in 2/3 of the cases.

Nowadays, the only treatments consist in kidney dialysis or transplantation which are invasive for patients and expensive for health's organisms.

The thesis' aim is to develop innovative treatments for this disease. We'll work on kinase dependant inhibitors (CDKi). Two molecules of this family are showing interesting activities against polycystic kidney disease. However, because of low bioavailabilities, they can't be used as treatment. That's why we tried to synthetise prodrugs in order to evaluate pharmacologic parameters.

Mots-clés

Kinase, Kinase dépendantes de cycline, Polykystose rénale