

THÈSE DE DOCTORAT UNIVERSITÉ DE PARIS

École doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

Spécialité : Chimie Organique

Présentée par
David CLEMENT

Pour obtenir le grade de
Docteur de Université de Paris

**Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de NAD kinase,
cible bactérienne pour le développement d'antibiotiques.**

Sous la direction du Dr Sylvie POCHET

Unité de Chimie et Biocatalyse - CNRS UMR3523

Soutenue le 18 février 2021

Devant le Jury composé de :

Pr Dominique Guianvarc'h	Université Paris-Saclay	Rapporteure
Dr Sylvain Roland	Sorbonne Université	Rapporteur
Pr Luigi Agrofoglio	Université d'Orléans	Examinateur
Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu	Université de Paris	Examinatrice
Dr Sylvie Pochet	Institut Pasteur, Paris	Directrice de thèse

LISTE DES ÉLÉMENTS SOUS DROITS

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse
faute d'en détenir les droits

Document à intégrer dans la version partielle de la thèse

Articles, chapitres, entretiens cliniques...

Titre du document	N° (si numéroté)	Page(s) dans la thèse
From Substrate to Fragments to Inhibitor Active <i>In Vivo</i> against <i>Staphylococcus aureus</i>	Annexe n°1	345

**THÈSE DE DOCTORAT
UNIVERSITÉ DE PARIS**

École doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie et Imageries

Spécialité : Chimie Organique

Présentée par
David CLEMENT

Pour obtenir le grade de
Docteur de Université de Paris

**Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de NAD kinase,
cible bactérienne pour le développement d'antibiotiques.**

Sous la direction du Dr Sylvie POCHET

Unité de Chimie et Biocatalyse - CNRS UMR3523

Soutenue le 18 février 2021

Devant le Jury composé de :

Pr Dominique Guianvarc'h	Université Paris-Saclay	Rapporteuse
Dr Sylvain Roland	Sorbonne Université	Rapporteur
Pr Luigi Agrofoglio	Université d'Orléans	Examinateur
Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu	Université de Paris	Examinatrice
Dr Sylvie Pochet	Institut Pasteur, Paris	Directrice de thèse

Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de NAD kinase, cible bactérienne pour le développement d'antibiotiques.

David CLEMENT

Unité de Chimie et Biocatalyse, UMR CNRS 3523

Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux 75015 Paris

Il est estimé qu'environ sept cent mille individus meurent chaque année suite à une infection par des bactéries multi-résistantes (BMR). D'ici 2050, si aucune action n'est entreprise, ce chiffre pourrait atteindre dix millions de morts annuelles. Parmi les différentes actions permettant de lutter contre la propagation des BMR figure l'identification de nouvelles cibles pour le développement d'agents antibactériens. Les NAD kinases (NADK) sont les enzymes responsables de la synthèse *de novo* de NADP⁺, cofacteur essentiel impliqué dans de nombreux processus biologiques. Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis l'obtention d'une première série de mimes de NAD⁺, inhibiteurs actifs *in vitro* sur enzyme purifiée et sur cultures bactériennes de *Staphylococcus aureus* (Sa). Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de ce projet.

Dans les deux premiers chapitres de ce mémoire, nous décrivons la conception, la synthèse et l'évaluation d'outils chimiques permettant la validation et la localisation de la cible. A cette fin, nous avons identifié les éléments structuraux permettant la fonctionnalisation des inhibiteurs précédemment conçus tout en conservant une bonne affinité pour la NADK. Ainsi, l'introduction d'une amine a permis de greffer ces analogues sur support solide afin d'en évaluer la sélectivité par chromatographie d'affinité. Par ailleurs, l'introduction d'une fonction alcyne a permis l'obtention d'une sonde fluorescente afin de localiser l'inhibiteur *in cellulo* par microscopie de fluorescence. Dans un troisième chapitre, nous décrivons nos efforts pour améliorer les paramètres physico-chimiques des inhibiteurs de NADK et gagner en efficacité. Enfin, dans une dernière partie, nous présentons la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une nouvelle famille d'inhibiteurs, dérivés macrocycliques de la famille précédente.

L'ensemble de ces travaux ont permis d'une part, la préparation d'outils chimiques pour la validation et localisation de la cible et d'autre part, l'obtention de molécules plus actives *in vitro*.

Antibiotique, Diadénosine, Macrocycles, NAD kinase, Nucléoside, Outil chimique, *Staphylococcus aureus*,

Design, synthesis and evaluation of inhibitors targeting bacterial NAD kinase for the development of new antibiotics.

David CLEMENT

*Unité de Chimie et Biocatalyse, UMR CNRS 3523
Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux 75015 Paris*

It is estimated that around seven hundred thousand people die every year due to antimicrobial resistance (AMR). If no action is undertaken, in 2050, this number will have skyrocketed to ten million annual death. Among the actions undertaken to fight against AMR, figures the identification of new metabolic targets for the development of antimicrobials. NAD kinases (NADK) are ubiquitous enzymes involved in the *de novo* synthesis of NADP⁺, an essential cofactor in numerous biological processes. Previous work undertaken by the laboratory has allowed the identification of a first series of NAD⁺ mimics showing inhibitory activity *in vitro* on both purified enzyme and bacterial cultures of *Staphylococcus aureus* (Sa).

The first two chapters of this manuscript describes the design, synthesis and evaluation of chemical tools allowing the validation and localisation of the target. To this end, we identified structural elements of our previous inhibitors that could be modified without causing major impact on their inhibitory potency toward the target. This knowledge allowed us to synthesise molecules modified by an aminoalkyl chain to be grafted on solid support, in order to evaluate their selectivity towards NADK by affinity chromatography. We also introduced a clickable alkyne function to perform fluorescence assays in order to localise the modified compound *in cellulo*. In the third chapter, we describe the work made to improve the physico-chemical parameters of inhibitors to increase their activity. In the last chapter, we report the synthesis and *in vitro* evaluation of macrocyclic compounds as a new family of inhibitors.

This work allowed on one hand the preparation of chemical tools to validate and localise the target and, on the other hand, the synthesis of new molecules showing *in vitro* activity.

Antibiotics, Chemical tools, Diadenosine, Macrocycles, NAD kinase, Nucleoside, *Staphylococcus aureus*,

Production scientifique et activité d'encadrement

Production scientifique et activité d'encadrement

Activité d'encadrement

Dylan Coelho : M1 Frontiers in Chemistry, Université Paris Descartes (Avril-Juillet 2018), participation à la synthèse de diadénosines modifiées en position 6-N ou 5'-A (Chapitre II).

Tara Delpech : M2 Frontiers in Chemistry, Université Paris Descartes (Février-Juillet 2018), participation à la synthèse d'analogues macrocycliques d'inhibiteurs de NAD kinase (Chapitre V).

Publications

Muriel Gelin, Julie Paoletti, Marie-Anne Nahori, Valérie Huteau, Clarisse Leseigneur, Grégory Jouvion, Laurence Dugué, David Clément, Jean-Luc Pons, Liliane Assairi, Sylvie Pochet, Gilles Labesse, and Olivier Dussurget; "From Substrate to Fragments to Inhibitor Active In Vivo against *Staphylococcus aureus*" *ACS Infectious Diseases* **2020** 6 (3), 422-435. (DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00368)

Clément, D.A.; Leseigneur, C.; Gelin, M.; Coelho, D.; Huteau, V.; Lionne, C.; Labesse, G.; Dussurget, O.; Pochet, S. "New Chemical Probe Targeting Bacterial NAD Kinase" *Molecules* **2020**, 25, 4893. (DOI : 10.3390/molecules25214893)

Communications orales

David Clément "Inhibitors of NAD Kinase as new antibacterial agents". Décembre 2019, Journées du département de biologie structurale et chimie.

David Clément "Inhibitors of NAD Kinase as new antibacterial agents". Octobre 2019, Journées de l'école doctorale MTCl, Paris, France.

Poster

David Clément, Valérie Huteau, Dylan Coelho, Sylvie Pochet, "NADK inhibitors as new antibacterial agents", Octobre 2018, Journées du département de biologie structurale et chimie.

David Clément, Muriel Gelin, Julie Paoletti, Marie-Anne Nahori, Valérie Huteau, Clarisse Leseigneur, Gilles Labesse, Olivier Dussurget, Sylvie Pochet, "NADK inhibitors as new antibacterial agents", Juillet 2019, Congrès de l'IUPAC à Paris.

Table des matières

Table des matières

Remerciements	19
Abréviations et acronymes	25
1 Introduction	31
1.1 Les maladies infectieuses	33
1.1.1 Les micro-organismes	33
1.1.2 Les axes thérapeutiques	34
1.1.3 Phénomène de résistance	40
1.1.4 État des lieux	43
1.2 L'importance du NAD ⁺ et NADP ⁺	45
1.2.1 Définition et rôle	45
1.2.2 Place dans le métabolisme eucaryote	47
1.2.3 Place dans le métabolisme procaryote	50
1.2.4 Voie de biosynthèse du NADP ⁺	51
1.2.5 Phosphorylation du NAD ⁺ : l'importance de la NAD Kinase	54
1.3 Travaux antérieurs : la NADK en tant que cible	60
1.3.1 Approche par fragments	60
1.3.2 Obtention des premiers cristaux	60
1.3.3 Nouveaux composés	61
1.3.4 Optimisation du TGA, obtention de NKI-1	62
1.4 Conclusion et objectifs de mes travaux de thèse.	63
2 Synthèse d'outils moléculaires en vue de chromatographies d'affinité	65
2.1 Généralités sur la chromatographie d'affinité	67
2.2 Stratégie générale	70
2.3 Fonctionnalisation en position 6 de l'adénine du site N	74
2.4 Fonctionnalisation de la position centrale	81
2.4.1 Substitution nucléophile par déplacement de tosyle	82

2.4.2	Amination réductrice	85
2.4.3	Synthèse d'amine secondaire <i>via</i> la stratégie de nosylation	90
2.5	Fonctionnalisation en position 5' de l'adénosine du site A	93
2.5.1	Préparation d'amides en position 5'	94
2.5.2	Préparation de sulfonamides en position 5'	97
2.6	Sélection des candidats à greffer sur support solide	100
2.6.1	Mesure de constante d'inhibition	100
2.6.2	Etudes cristallographiques par diffraction aux rayons X	102
2.6.3	Évaluation des composés modifiés en N^6	103
2.6.4	Évaluation des composés modifiés en position 5'-OH	104
2.6.5	Évaluation du composé modifié en position centrale	105
2.7	Utilisation des candidats sélectionnés	105
2.7.1	Immobilisation des candidats sur support solide	105
2.7.2	Préparation des extraits bactériens	106
2.7.3	Chromatographie d'affinité et résultats	107
2.8	Conclusion et perspectives	111
	Experimental section	113
3	Synthèse d'outils moléculaires en vue d'expériences de fluorescence <i>in vitro</i>	155
3.1	Généralités à propos des méthodes de marquage	157
3.2	Utilisation d'une coumarine en tant que fluorescent	162
3.2.1	Synthèse d'une sonde de type azidocoumarine	163
3.2.2	Introduction de groupement alcyne en position centrale	167
3.2.3	Synthèse de la diadénosine 72	171
3.2.4	Essais de fluorescence <i>in bacterio</i>	176
3.3	Utilisation de l'Alexa Fluor 555 en tant que fluorescent	178
3.4	Conclusion du chapitre	179
	Experimental section	181
4	Synthèse d'analogues linéaires de NKI-1	201
4.1	Introduction	203
4.2	Modification des fonctions	205
4.2.1	Introduction d'une fonction guanidinium	206
4.2.2	Modifications de la position centrale	209
4.2.3	Remplacement du ribose par un benzyle	213
4.2.4	Modifications sur la position 5' du site A	218
4.3	Conclusion du chapitre	225

Experimental section	227
5 Synthèse d'analogues macrocycliques de NKI-1	251
5.1 Du composé linéaire au macrocycle	253
5.2 Optimisation de la synthèse du précurseur 48	255
5.2.1 Stratégie passant par un groupement phthalimide en position 5' . .	256
5.2.2 Optimisation - phosphotriester	257
5.3 Macrocyces de type sulfonamide	258
5.3.1 Macrocycle 120	258
5.3.2 Étude de la réactivité du 5' sulfonamide	260
5.3.3 Macrocycle 121	264
5.4 Macrocyces de type amide	266
5.4.1 Macrocycle de type "amide central" 143	267
5.4.2 Macrocycle de type "amine centrale" 150 , déconnection 5'	271
5.4.3 Macrocycle de type "amine centrale" 150 , déconnection centrale .	273
5.4.4 Autres macrocyces de la famille "amine centrale"	275
5.5 Macrocycle de type urée	278
5.5.1 Synthèse d'urées	280
5.5.2 Synthèse du macrocycle 179	282
5.6 Résultats biochimiques et biologiques	283
5.7 Conclusion du chapitre	284
Experimental section	287
Conclusion et perspectives	325
Annexe I	345
Annexe II	349

Remerciements

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut Pasteur au sein de l'unité de Chimie et Biocatalyse (CNRS UMR 3523). Il a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche sous le nom de projet "ANAKIN" Anti-NAd-KINase (ANR-11-EMMA-0019).

Je souhaite adresser mes remerciements sincères au Pr Dominique Guianvarc'h, de l'Université Paris-Saclay, ainsi qu'au Dr Sylvain Roland, de Sorbonne Université, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je tiens à remercier également le Pr Luigi Agrofoglio, de l'Université d'Orléans, ainsi que la Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu, de l'Université de Paris, pour leurs participations en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier Dr Sylvie Pochet, directrice de l'unité, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse. Je souhaite lui témoigner toute ma gratitude pour m'avoir accordé sa confiance sur ce projet, ses conseils le long de ces trois années ainsi que sa grande aide dans la relecture de ce manuscrit. Merci beaucoup Sylvie de m'avoir donné cette grande opportunité de travailler avec vous et merci encore pour la grande patience que vous avez eu à mon égard.

Mes remerciements vont aussi à nos collaborateurs du Centre de Biologie Structurale de Montpellier (CBS). Un grand merci à Gilles Labesse et Muriel Gelin pour toutes les explications qu'ils m'ont donné à propos des expériences de cristallographies menées au CBS. Merci aussi Muriel de ta grande disponibilité (et patience !) lorsque je te sollicitais à la dernière minute, catastrophé, te demandant des images de structure des composés testés. Je souhaiterais aussi remercier Corinne Lionne, porteuse du projet ANR, pour ses explications sur les méthodes de biochimie employées par le consortium. Merci d'avoir répondu avec gentillesse et justesse à toutes mes interrogations, même aux heures les plus tardives !

J'aimerais aussi remercier nos collaborateurs de l'unité Yersinia de l'Institut Pasteur avec qui j'ai travaillé durant ces trois années. Tous mes remerciements à Olivier Dussurget pour sa bienveillance et pédagogie concernant la biologie que je ne maîtrisais pas. Je souhaite également remercier Clarisse Leseigneur, étudiante en thèse avec qui j'ai partagé de nombreuses heures à discuter de notre sujet commun, et tant d'autres choses encore. Merci Clarisse d'avoir répondu à toutes mes questions et de m'avoir expliqué les techniques auxquelles tu as recours. Et puis aussi, évidemment, tous mes remerciements pour avoir fait les nombreuses figures que je te demandais et de m'avoir fourni toutes les données biologiques nécessaires à la rédaction de ce manuscrit. Et de manière générale, merci pour ta bonne humeur intarissable, nous avons collaboré un total de deux ans et ça a été un réel plaisir de partager ce temps avec toi.

Je tiens aussi à remercier Valérie Huteau ma collègue de laboratoire dont la patience n'a d'égale que la gentillesse. Merci Valérie d'avoir relu et corrigé ce manuscrit et de m'avoir prêté main forte durant toute ma thèse. Nous avons partagé bientôt quatre années ensemble, depuis mon arrivée en stage de M2 jusqu'à aujourd'hui, et ce fut quatre années inoubliables durant lesquelles ton soutien moral et ton amitié m'ont permis de garder le sourire.

Je voudrais également remercier Dylan Coelho et Tara Delpech, deux étudiants en Master avec qui j'ai partagé mon sujet le temps d'un stage. Vous avez tous les deux été volontaires, curieux et avez fait preuve d'un grand enthousiasme, une combinaison de qualité décapantes qui feront de vous, j'en suis certain, d'excellents chercheurs.

Un grand merci à Frédéric Bonhomme pour la réalisation des spectres de masse de mes composés et pour les nombreux échanges que nous avons eu. Nous ne partageons certes pas les mêmes goûts cinématographiques mais ça n'a rien enlevé du plaisir que j'ai eu à te côtoyer durant mon passage à Pasteur.

Mes pensées vont aussi à Samy Leprevost et à Nitipol « Ken » Srimongkolpithak, deux chimistes qui ont été de passage au laboratoire durant presque une année. Samy, cela a été un grand plaisir de t'avoir à nos côtés durant ton alternance et d'avoir ri et plaisanté (*excellent*) ensemble. Ken, thank you for your kindness and perpetual cheerfulness that enlightened my days during the second year of my PhD. I am very happy to have shared a lot of good moments the three of us together, at the lab and elsewhere (at the pizzeria and the Futuroscope!).

Je voudrais exprimer de grands remerciements à Marion Bouchet et Olimpia Pitirillo, deux rayons de soleils qui ont contribué à illuminer mon séjour à Pasteur. Marion, ça a été un grand bonheur pour moi de te côtoyer tous les jours, de rire ensemble et de discuter de tout et de rien. Olimpia, il tuo sorriso e la tua gentilezza hanno illuminato le mie giornate a Pasteur. Spero che ci rivedremo molto presto! Thanks to the both of you for being there when I was down and cheering me up when I needed it. For me, whether it was at the "Cercles de la Forme", at Pasteur or elsewhere, every second we spent together were worth it.

J'aimerais aussi adresser des remerciements à Johan Cornil pour m'avoir prêté conseil à de nombreuses reprises autant en terme manipulateur que rédactionnel. J'ai beaucoup apprécié tous les échanges que nous avons eus autour de la chimie, des jeux de société/vidéo ainsi que nos discussions en général. Et bien entendu, merci de m'avoir initié aux escapegame, un divertissement auquel nous avons tous pris goût à l'étage!

Je tiens aussi à remercier Glwadys Gagnot et Louis-Antoine Barel, deux étudiants en thèse de un an mes aînés. Glwadys, ça a été un vrai bonheur pour moi de passer du temps à discuter de chimie avec toi mais aussi de nos centres d'intérêts communs. Louis-

Antoine, j'ai beaucoup apprécié tous les moments que nous avons passés ensemble que ce soit au cours d'escape game, de soirées jeux de société ou sur différentes plates-formes vidéoludiques !

J'aimerais également adresser un petit mot à l'exubérante Christelle Ganneau et la discrète Aurélie Descamps, mes deux voisines du laboratoire d'en face. Ça a toujours été un plaisir pour moi de venir, un peu à l'improviste parfois, discuter avec vous ! Christelle, ta bonne humeur n'a cessé d'être revigorante tout au long de ma thèse et Aurélie ton sourire et ta gentillesse ont toujours été des plus agréables !

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude envers Yves Janin, Marc Lavigne, Debashis Dhara et Laetitia Hinry, les "travailleurs du soir". Les conversations et discussions que nous avons eu, souvent à des heures tardives, ont été des bouffées d'oxygène lors de la rédaction de ce manuscrit. Il a été extrêmement agréable pour moi de partager ces moments de convivialité à Pasteur avec vous avant ou après mon dîner !

De manière plus générale, j'aimerais adresser ma reconnaissance à tous les membres de l'unité de Chimie et Biocatalyse et de l'unité de Chimie et Biomolécules pour m'avoir supporté, échangé avec moi et avoir contribué à mon intégration au sein de l'étage. Merci Sophie, Laurence, Sylvie, Françoise, Yves-Marie, Marielle et Catherine, occupants des laboratoires voisins, d'avoir eu la patience de supporter mes vocalises durant tout ce temps ! De grands remerciement aussi à Hélène, Olivier, Patrick et Antoine, biochimistes exilés au bout du couloir, m'ayant toujours prêté main forte lorsque j'avais des questions qui sortaient de mon domaine d'expertise. Un grand merci aussi à Marie-Ange qui m'a guidé dans les méandres de l'administration Pasteurienne avec patience et gentillesse ! Merci de la bienveillance dont vous avez tous fait preuve à mon égard, mon séjour à Pasteur n'aurait pas été le même sans vous.

Je voudrais aussi remercier les chimistes du bâtiment Lwoff avec qui j'ai partagé de nombreux moments à discuter de choses et d'autres lors de passages dans leur laboratoire ou autour d'une table d'un bar après le travail. Merci Marie et Fabienne qui ont toujours eu la porte ouverte et l'oreille attentive lorsque je leur parlais de mes déboires. Je voudrais également te remercier Marie, de m'avoir aiguillé lorsque j'avais des doutes concernant les procédures à suivre pour déposer et soutenir, cela a été d'une grande aide morale pour moi. Merci également à Ludovic, Corentin, Diane et Emilie à qui j'ai moins souvent rendu visite mais dont les conversations ont toujours été enrichissantes !

Je voudrais également adresser un mot à, Dariusz Czernecki et Pierre Lê-bury deux comparses doctorants avec qui j'ai passé d'excellents moments, que ce soit le 14 Juillet ou à l'occasion de quelques déjeuners. J'ai été ravi de faire votre connaissance et d'avoir pu passer du temps avec vous ces dernières années, j'ai hâte que l'on puisse se revoir, au plus tôt j'espère !

J'aimerais aussi remercier Christine Tran (aka : choisine) de m'avoir transmis sa

passion pour la chimie organique lorsque j'étais encore un étudiant de Licence. Quand j'y pense Christine, sans toi je n'aurais peut-être pas suivi cette voie et ne serais peut-être pas là où je suis aujourd'hui. Un de tes padawan devient chevalier Jedi à son tour !

Une petite mention aussi pour Maya Guillaumont, qui m'a convaincu, au plus grand dam de ma directrice de thèse, de rédiger ce manuscrit en LaTeX. Tu as soutenu ta thèse quelques mois avant moi Maya et tu m'as permis d'entrevoir le déroulé des événements. Merci beaucoup à la fois pour tes précieux conseils et pour ton amitié.

J'aimerais aussi adresser mes remerciements à mes amis de Jussieu, Lucile, Ludivine, Marine et Guillaume. Les moments que nous avons passé ensemble à Paris, à Pau ou à Mulhouse ont été revigorants. J'ai hâte qu'on puisse repartir à nouveau tous les cinq ensemble !

Je voudrais aussi mentionner les frères Gibert, Sébastien et Virgile. Les moments que nous avons passé ensemble lorsque je n'étais pas à Pasteur m'ont permis de me changer les idées et ont été précieux pour moi. Merci également à Clara dont la présence à toujours été la bienvenue et avec qui j'ai eu de très bonnes "discussions de MJ". Une mention également à João Pedro (allu ?) avec qui j'ai passé de nombreuses heures à discuter de ma vie de thésard et qui a toujours été présent pour moi lorsque j'avais besoin de parler.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je n'adressais pas une pensée à mes trois colocataires, Quentin, Charles et ma soeur Marianne. En plus d'avoir été d'un grand soutien au quotidien, vous m'avez fourni une aide précieuse en relisant ce manuscrit et en vérifiant que je n'avais pas oublié de proton ou de carbone dans mes spectres RMN (tout chimiste mesurera avec justesse l'ampleur de la tâche). Vous avez tous les trois (quatre en comptant Mathilde !) contribué à une excellente ambiance à la maison qui m'a permis de souffler lorsque je n'étais pas au travail.

Enfin j'aimerais remercier les autres membres de ma famille. Vous m'avez tous posé, à un moment ou à un autre, des questions qui m'ont permis de mesurer l'intérêt que vous portiez à moi et à mon sujet. Un remerciement spécial à ma mère qui m'a toujours encouragé et dont le seul souci a toujours été de me savoir heureux. Un autre remerciement spécial à mon père sans qui, au final, je n'aurais probablement jamais développé de passion pour les sciences. Plus que quiconque vous avez tous les deux contribué à ce que je suis aujourd'hui et pour rien au monde je voudrais qu'il en aille différemment.

Mon dernier remerciement va à Augustin Hervouet. Je ne sais pas si tu mesures avec justesse l'importance que tu as eu à mes yeux lors de cette épreuve. Tu as fait montre d'une grande attention vis-à-vis de moi et d'une patience intarissable. Même si il y a eu des hauts et des bas, ta présence dans ma vie, à de nombreux moments difficiles, m'a permis de garder le moral et confiance en moi. Un chapitre de ma vie se termine aujourd'hui. De tout mon coeur j'aimerais qu'on écrive le prochain ensemble.

Abréviations et acronymes

Abréviations et acronymes

A

Ac	acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
ADP	adénosine diphosphate
AF-555	Alexa Fluor 555
APTS	acide <i>paratoluènesulfonique</i>
ATP	adénosine triphosphate

B

BHI	brain hearth infusion (milieu de culture)
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
Bn	benzyle
Bn-I	position ipso
Bn-O	position ortho
Bn-M	position méta
Bn-P	position para
Bz	benzoyle

C

CCM	chromatographie sur couche mince
CLHP	chromatographie liquide à haute pression
CL/SM	chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse

D

Da	dalton
DCE	1,2 Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DEAD	l'azodicarboxylate de diéthyle
DMAP	4-(diméthylamino)pyridine
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMP	Periodinane de Dess-Martin
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DIEA	N, N-diisopropyléthylamine

E

<i>Ec</i>	<i>escherichia coli</i>
Equiv.	équivalents
Et	Ethyle

F

Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FBDD	(ang.) Fragment Based Drug Design

H

h	heure
His	Histidine
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>

I

IMPDH	inosine monophosphate déshydrogénase
-------	--------------------------------------

K

Kcat	constante catalytique
Ki	constante d'inhibition
Km	constante de Michaelis

L

<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
-----------	-------------------------------

M

M	molaire (mol.L^{-1})
Me	Méthyle
min	minute
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

N

NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADK	Nicotinamide adénine dinucléotide kinase
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAM	acide N-acétyl muramique
NAG	N-acétyl-glucosamine
NBS	N-Bromosuccinimide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NKI-1	composé obtenu suite aux travaux antérieurs (décrit page 62)
Ns	Nosyle

P

PEG	Polyéthylène glycol
Ph	phényle
Pht	Phtalimide
PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

R

RMN	résonnance magnétique nucléaire
Rt	temps de rétention

S

<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Sc</i>	<i>saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodécylsulfate de sodium
S _N Ar	substitution nucléophile aromatique

T

t.a.	température ambiante
TBS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TEAA	acétate de triéthylammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	triméthylsilyle
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Ts	Tosyle

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les maladies infectieuses

1.1.1 Les micro-organismes

Généralités

Depuis son origine, l'espèce humaine a évolué dans un environnement dans lequel prospèrent à la fois macro et micro-organismes. Ces derniers, aussi appelés microbes, sont considérés comme les formes de vie les plus élémentaires et sont les premières à s'être développées sur Terre. Bien que ceux-ci soient capables de se développer de façon indépendante, il existe une grande variété de micro-organismes pouvant interagir avec un hôte multicellulaire.¹

Certains micro-organismes sont dits commensaux : ils tirent partie du milieu stable et nutritif formé par l'hôte pour se développer sans pour autant lui nuire. Ce type de relation résulte en la présence de plusieurs espèces bactériennes dans l'organisme, le plus souvent dans le tractus gastro-intestinal, formant une partie du microbiote.¹

Dans certaines situations, ce rapport peut être mutuellement bénéfique conduisant à une relation dite mutualiste. L'hôte fournit une partie des nutriments nécessaire au développement du microbe qui, en retour, produit de petites molécules régulatrices ou assure des fonctions immunitaires.¹ Il a notamment été montré que cette relation symbiotique entre l'hôte et certaines bactéries était responsable de la régulation de maladies comme le diabète ou l'obésité.²

Enfin, d'autres micro-organismes sont qualifiés de pathogènes et peuvent nuire à l'organisme dans lequel ils se développent.

Familles de micro-organismes pathogènes

Tout micro-organisme pathogène ne provoque pas nécessairement de maux. Certains d'entre eux, comme *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), peuvent se développer dans un hôte sans provoquer d'infection³. Ce type de microbe est qualifié de pathogène opportuniste : il fait souvent partie du microbiote de l'hôte et ce n'est que dans le cas de l'affaiblissement de celui-ci (plaies ouvertes, immunodépression, ...) qu'il peut acquérir un pouvoir pathogène.

D'autres espèces sont qualifiées de pathogènes obligatoires : leur développement et transmission ne peuvent se faire qu'à travers leur hôte par le biais de développement de maladie. C'est le cas du bacille de Koch, ou *Mycobacterium tuberculosis*, agent responsable

1. Relman, D. A. ; Falkow, S. in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Bennett, J. E., Dolin, R. *et al.*, éd. ; W.B. Saunders : Philadelphia, 2015, 1-10.e2.

2. Tremaroli, V. ; Bäckhed, F. *Nature* **2012**, *489*, 242-249.

3. Al-Mebairik, N. F. ; El-Kersh, T. A. *et al. Reviews in Medical Microbiology* **2016**, *27*.

de la tuberculose. Cette mycobactérie possède une première phase, asymptomatique, durant laquelle elle se développe dans son hôte. La seconde phase consiste en l'apparition de symptômes parmi lesquels la toux permet à la bactérie de se propager d'un hôte à l'autre et de poursuivre son développement.^{4,5}

Deux autres familles de pathogènes existent. On distingue premièrement les pathogènes zoonotiques, transmis d'une espèce à l'autre, et dont le plus connu est sans doute *Yersinia pestis*, une bactérie Gram(-) responsable de la peste. On distingue en second lieu les pathogènes dits environnementaux, tels que *Clostridium tetani*, responsable du tétanos.

Il est important de noter que le terme pathogène n'est pas restreint aux bactéries mais peut s'appliquer à d'autres organismes tels que les virus, champignons ou parasites par exemple. Cependant, nous ne développerons pas sur ces classes d'organismes dans le présent manuscrit.

1.1.2 Les axes thérapeutiques

Depuis toujours, l'humanité cherche à combattre, sans nécessairement le savoir, des organismes pathogènes de toute nature. De nos jours, plusieurs types de thérapies existent permettant de prévenir ou combattre les infections bactériennes.

Les vaccins

La vaccination est une des principales méthodes de prévention de maladies virales ou bactériennes. Les premières méthodes vaccinales à proprement parler ont été mises au point en 1796 par Edward Jenner dans le but de lutter contre la variole.⁶ Ses travaux ont permis le lancement, en 1967 d'une campagne de vaccination mondiale contre la variole qui aboutit, le 8 Mai 1980, par une déclaration de l'OMS annonçant l'éradication de la maladie.

Si plusieurs types de vaccinations existent le principe fondamental reste le même : préparer le système immunitaire de l'organisme pour lui permettre d'avoir une réponse immunitaire protectrice contre le pathogène cible. En cas d'infection, un organisme vacciné sera en mesure d'avoir une réponse immunitaire adéquate, prévenant le développement de la maladie.

4. Tuberculosis fact sheet, [who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis).

5. Behr, M. A.; Edelstein, P. H. *et al. BMJ* **2018**, *362*, DOI : 10.1136/bmj.k2738.

6. Riedel, S. *Baylor University Medical Center Proceedings* **2005**, *18*, 21-25.

La phagothérapie

La phagothérapie repose sur l'utilisation de parasites viraux ayant une activité contre certains pathogènes. Ce phénomène a été étudié activement par le microbiologiste Félix d'Herelle qui découvre en 1910 ce qu'il nomme "bactériophage", soit mangeur de bactérie. C'est en 1917 qu'il présente les résultats de ses découvertes à l'Académie des sciences et en 1919 qu'il teste sa thérapie sur des enfants affectés de dysenterie à l'hôpital des enfants malades de Paris. Le développement des bactériophages continue dans les années qui suivirent, notamment en URSS, mais fut ralenti par l'avènement des antibiotiques estimés plus efficaces.^{7,8}

Les bactériocines

Une autre approche consiste en l'emploi de bactériocines, des peptides sécrétés par de nombreuses espèces bactériennes dans le but d'en éliminer d'autres. Ceux-ci sont des composés à spectre étroit majoritairement utilisé, à l'heure actuelle, dans l'industrie agroalimentaire pour préserver les aliments (Notamment contre *L. monocytogenes*). Cependant, dans le contexte de résistance bactérienne croissante, ils ont un regain d'intérêt thérapeutique.^{9,10}

Les antibiotiques

La dernière approche qui sera mentionnée concernant les axes thérapeutiques est l'emploi d'antibiotiques, molécules à propriétés anti-microbiennes. Il est considéré que l'ère moderne des antibiotiques commence en 1928 avec la découverte de la pénicilline-G par Sir Alexander Flemming. Depuis lors, le développement et la commercialisation des antibiotiques ont révolutionné le monde de la médecine sauvant de nombreuses vies. Les antibiotiques peuvent être classés de nombreuses façons, nous ferons ici une description rapide des principaux agents utilisés en les classant par mécanisme d'action.

7. Zhabiz, G. ; Omar, B. *et al. The Journal of Infection in Developing Countries* **2014**, 8, DOI : 10.3855/jidc.3573.

8. Chanishvili, N. in *Advances in Virus Research*, Łobocka, M., Szybalski, W., éd. ; Academic Press : 2012, p. 3-40.

9. Bechinger, B. ; Gorr, S. U. *Journal of Dental Research* **2016**, 96, 254-260.

10. Lohans, C. T. ; Vederas, J. C. *International Journal of Microbiology* **2012**, 2012, 386410.

Synthèse et stabilité membranaire

La membrane cytoplasmique d'une bactérie sert d'interface entre le cytoplasme d'une cellule et son environnement. Sa composition est variable et dépend généralement de la famille de bactéries considérée. Ainsi l'enveloppe de bactéries Gram(+) est composée d'une bicouche lipidique et d'une épaisse couche de peptidoglycane, un maillage complexe de polymères osidiques réticulés entre eux par le biais de pentapeptides. Les bactéries Gram(-), elles, possèdent une enveloppe constituée de deux bicouches lipidiques, l'une interne et l'autre externe, entre lesquelles existent un fin peptidoglycane.¹¹ L'assemblage du peptidoglycane est la cible de plusieurs antibiotiques. Ceux-ci peuvent agir sur la biosynthèse des dimères le constituant ou sur son assemblage à l'extérieur de la cellule.

La synthèse du dimère constituant le peptidoglycane a lieu en milieu intracellulaire. Celui-ci est composé d'une molécule d'acide-*N*-acétylmuramique (MurNAc ou NAM) possédant une chaîne pentapeptide en position 5' et d'une *N*-acétyl-glucosamine (NAG). Le processus de biosynthèse de ce dimère est la cible de deux antibiotiques. La cyclosérine¹² inhibe l'alanine racémase, enzyme impliquée dans la synthèse du pentapeptide (Figure 1.1). La fosfomycine^{13,14} agit plus en amont en inhibant l'enzyme MurA responsable de la formation de NAM.

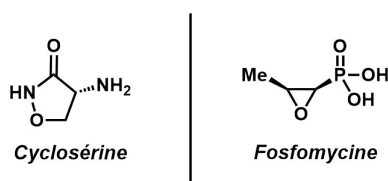


Figure 1.1 – La cyclosérine et la fosfomycine, antibactériens ciblant la biosynthèse du dimère NAM-NAG

La pénicilline-G,¹⁵ mentionnée précédemment, est un antibiotique de la famille des "bêta-lactamines" empêchant un bon assemblage du peptidoglycane externe (Figure 1.2). Elle inhibe la transpeptidase, enzyme responsable de la réticulation de celui-ci, empêchant la création de liens solides entre les pentapeptides des différents brins de polymère. La vancomycine^{16,17} est un autre antibiotique ciblant le même mécanisme selon un mode d'action différent : plutôt que d'inhiber directement une enzyme, elle se fixe aux sites de réticulation contrariant l'action de la transpeptidase et menant *in fine* au même résultat.

11. Silhavy, T. J.; Kahne, D. *et al. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, 2.

12. Noda, M.; Kawahara, Y. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 46143-46152.

13. Christensen, B. G.; Leanza, W. J. *et al. Science* **1969**, 166, 123.

14. Hendlin, D.; Stapley, E. O. *et al. Science* **1969**, 166, 122.

15. Fleming, A. *British journal of experimental pathology* **1929**, 10, 226-236.

16. D.C., J.; P.E., R., *Vancomycin*; Antibiotics, t. 1; Springer, Berlin, Heidelberg : 1967.

17. Reynolds, P. E. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **1989**, 8, 943-950.

La bacitracine^{18,19} est un autre composé agissant à l'extérieur de la cellule empêchant le recyclage du transporteur du dimère NAM-NAG.

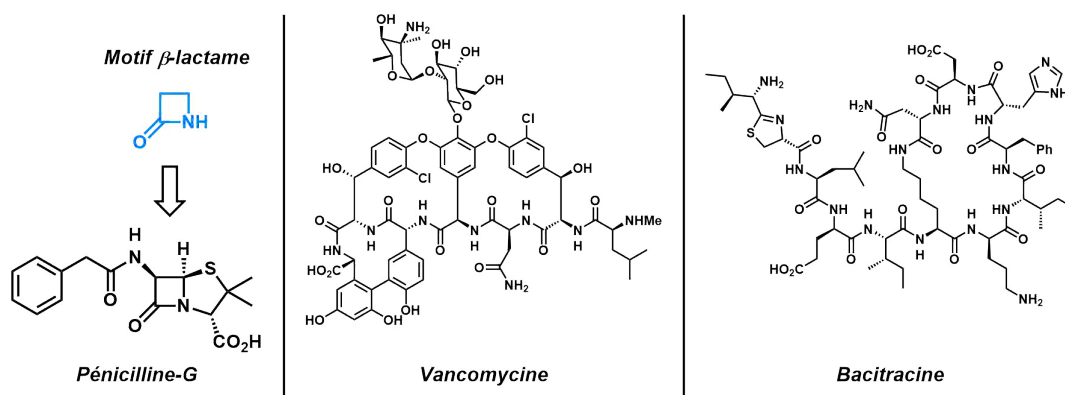


Figure 1.2 – Exemple d'agents antibactériens ciblant la synthèse du peptidoglycane

Enfin, d'autres antibiotiques, comme la daptomycine²⁰ ou les polymyxines^{21,22} ont des mécanismes d'action totalement différents (Figure 1.3). Ils perméabilisent la membrane conduisant à une instabilité structurale et à la mort du pathogène.

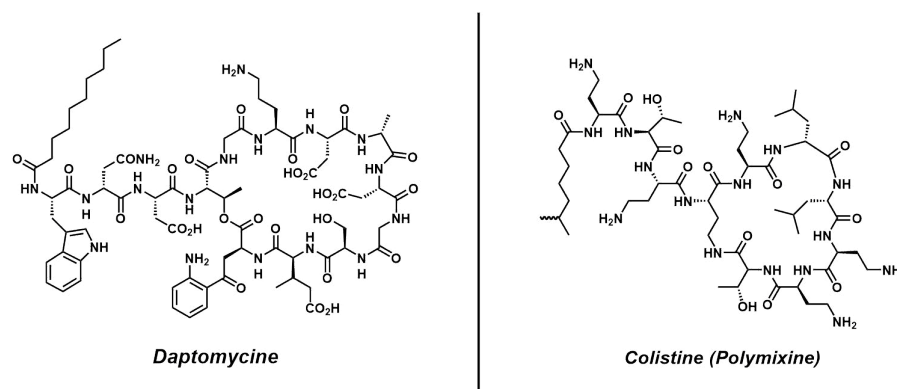


Figure 1.3 – Exemple d'agents antibactériens déstabilisant l'intégrité membranaire du pathogène ciblé

Synthèse de protéines

La synthèse de protéines est assurée, entre autres, par le ribosome. Cet organelle est constitué de deux sous-unités (30S et 50S chez les procaryotes) et permet la lecture

18. Stone, K. J.; Strominger, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, 3223-3227.

19. Mascher, T.; Margulis, N. G. *et al. Molecular Microbiology* **2003**, 50, 1591-1604.

20. Steenbergen, J. N.; Alder, J. *et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, 55, 283-288.

21. Velkov, T.; Roberts, K. D. *et al. Future Microbiology* **2013**, 8, 711-724.

22. Falagas, M. E.; Kasiakou, S. K. *et al. Clinical Infectious Diseases* **2005**, 40, 1333-1341.

d'un ARN messager (ARNm) pour le traduire en polypeptide. Celui-ci se forme *via* la peptidyl transférase par assemblage d'acides aminés véhiculés par des ARN de transfert (ARNt) complémentaires à l'ARNm. Le polypeptide linéaire acquiert ensuite une structure tridimensionnelle, après une étape de maturation, devenant une protéine.

De nombreux antibiotiques ciblent ce mécanisme agissant sur l'une ou l'autre des deux sous-unités du ribosome. Les aminoglycosides²³ ainsi que les tétracyclines²⁴ interagissent avec la sous-unité 30S empêchant respectivement l'initiation de la traduction et l'entrée des ARNt dans le ribosome (Figure 1.4).

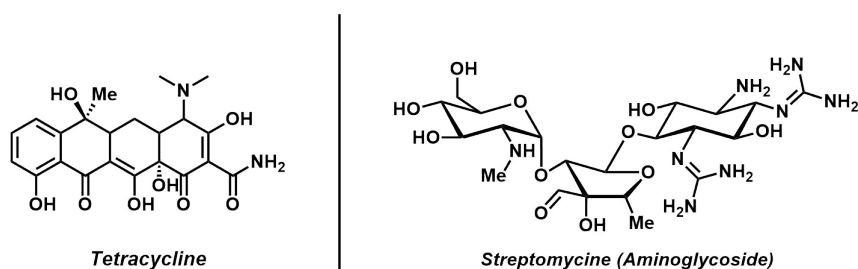


Figure 1.4 – Exemple d'agents antibactériens ciblant la sous-unité 30S du ribosome

Les oxazolidinones sont une famille d'antibiotiques ciblant un des sites de la sous-unité 50S empêchant, elles aussi, l'initiation de la traduction (Figure 1.5). Quatre autres familles d'antibiotiques agissent autour de la peptidyl transférase, les phénicolés l'inhibant directement et les trois autres (lincosamides, macrolides et streptogramines) ciblant des sites à proximité de celle-ci.

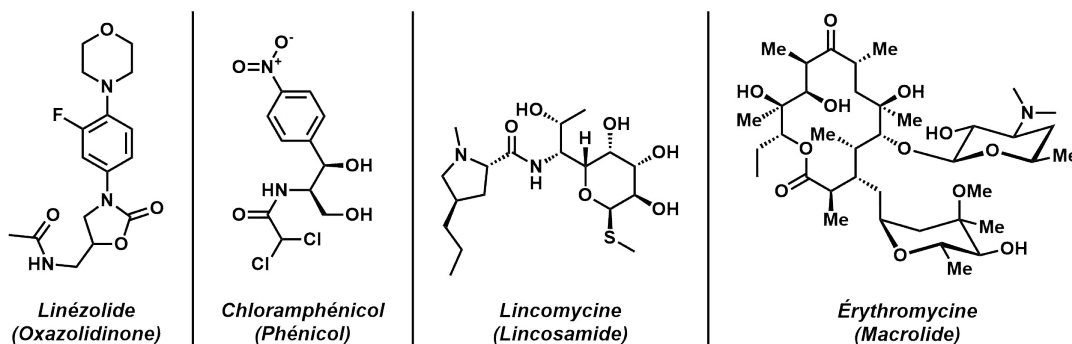


Figure 1.5 – Exemple d'agents antibactériens ciblant la sous-unité 50S du ribosome

Synthèse d'ADN

Plusieurs mécanismes cellulaires assurent la réparation, la réplication et la traduction de l'ADN. Certains éléments de cette machinerie complexe sont la cible de quelques agents antibactériens (Figure 1.6).

23. Garneau-Tsodikova, S.; Labby, K. J. *MedChemComm* **2016**, 7, 11-27.

24. Chopra, I.; Roberts, M. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, 65, 232.

Le métronidazole^{25,26} est un antibiotique actif sous forme réduite dans les organismes anaérobies (la présence de dioxygène le réoxydant). Il acquiert alors une nature radicalaire et oxyde les adénosines et thymidines de l'ADN de l'organisme ciblé.

Les rifamycines²⁷ ciblent l'ARN polymérase des organismes procaryotes. Elles n'inhibent pas l'activité catalytique de l'enzyme mais obstruent le canal de sortie de l'ARNm empêchant *in fine* sa production.

Les quinolones²⁸ sont une troisième famille d'antibiotiques ciblant trois enzymes clefs dans la régulation du surenroulement de l'ADN lors de sa réplication : l'ADN gyrase ainsi que les topoisomérases II et IV²⁸.

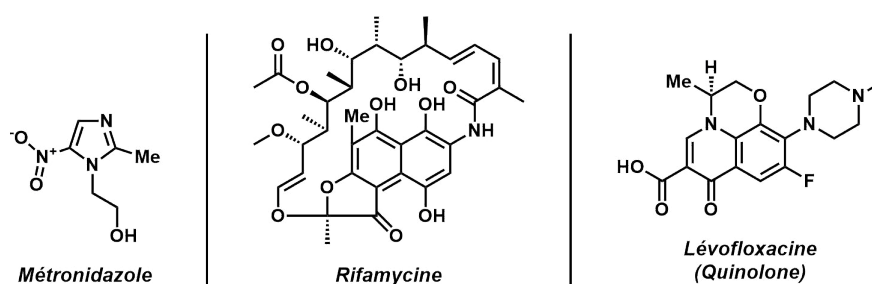


Figure 1.6 – Exemple d'agents antibactériens ciblant la machinerie génétique

Voies métaboliques

La dernière cible classiquement exploitée par les antibiotiques est la voie de biosynthèse de l'acide folique, une vitamine impliquée dans de nombreuses voies métaboliques.²⁹

Les antibiotiques de type sulfamidés interfèrent avec la dihydroptéroate synthase (Figure 1.7), première enzyme de cette voie de biosynthèse, agissant par inhibition compétitive avec son substrat. Le triméthoprime³⁰ est aussi un inhibiteur compétitif, agissant sur la dihydrofolate réductase, dernière enzyme de cette voie.

25. Tocher, J. H. ; Edwards, D. I. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **1992**, 22, 661-663.

26. Mikata, Y. ; Kishigami, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, 9, 2141-2144.

27. Campbell, E. A. ; Korzheva, N. *et al. Cell* **2001**, 104, 901-912.

28. Pham, T. D. M. ; Ziora, Z. M. *et al. MedChemComm* **2019**, 10, 1719-1739.

29. Rossi, M. ; Amaretti, A. *et al. Nutrients* **2011**, 3, DOI : 10.3390/nu3010118.

30. Gleckman, R. ; Blagg, N. *et al. Pharmacotherapy : The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **1981**, 1, 14-19.

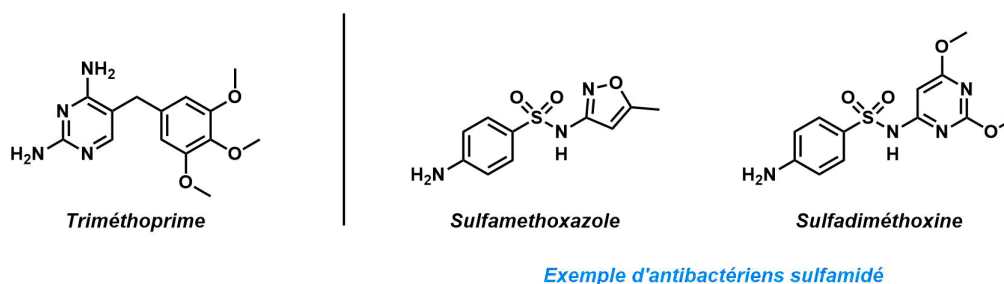


Figure 1.7 – Exemple d'agents antibactériens ciblant la voie de biosynthèse de l'acide folique

1.1.3 Phénomène de résistance

La découverte des antibiotiques, suivie de leur développement fulgurant durant les années 1950 à 1970, a malheureusement laissé penser que le temps où les micro-organismes pathogènes représentaient une menace était révolu. Déjà décrit en 1945 par Sir Alexander Flemming à l'occasion de son discours pour le prix Nobel,³¹ le phénomène de résistance aux antibiotiques consiste en l'adaptation d'un micro-organisme à un agent auquel il est exposé.³²

Il est nécessaire de distinguer les phénomènes de résistance et de persistance. La persistance d'une bactérie est due à son état de dormance au moment du traitement par un agent anti-bactérien. Le pathogène étant inactif métaboliquement à ce moment là il survit au traitement mais n'acquiert pas de résistance subséquente.³³

Facteurs inductifs

Il existe deux catégories principales de résistance d'un pathogène vis-à-vis d'un anti-bactérien : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique est considérée intrinsèque au micro-organisme étudié si toutes ses souches ont une concentration minimale d'inhibition (CMI) au dessus d'une valeur préalablement définie.³⁴ Les gènes de résistance sont présents et exprimés de façon constitutive par la cellule. Ce type de résistance est indépendant de la pression de sélection appliquée par l'usage clinique d'antibiotique car il l'antécède largement.^{35,36} Si les gènes de résistance sont présents dans l'organisme mais ne sont exprimés qu'en présence de l'antibiotique cible cette résistance naturelle est alors qualifiée d'induite.³⁴

31. Sir Alexander, F. *Nobel lecture, Physiology or Medicine* **1945**.

32. Martinez, J. L. *Drug Discovery Today : Technologies* **2014**, 11, 33-39.

33. Wood, T. K. ; Knabel, S. J. *et al. Applied and Environmental Microbiology* **2013**, 79, 7116.

34. Reygaert, W. C. *AIMS microbiology* **2018**, 4, 482-501.

35. D'Costa, V. M. ; King, C. E. *et al. Nature* **2011**, 477, 457-461.

36. Bhullar, K. ; Waglechner, N. *et al. PLOS ONE* **2012**, 7, e34953.

Enfin, l'acquisition temporaire ou permanente de gènes de résistance par une souche pathogène peut se faire par transfert horizontal de gènes d'une espèce à une autre. Ce type de résistance est alors qualifiée d'acquise car elle n'est pas présente de façon naturelle dans l'organisme qui l'obtient.³⁴

Mécanismes de résistance

Il existe quatre mécanismes principaux permettant à une bactérie de résister à un antibiotique.

Le premier mécanisme majeur de résistance consiste en la limitation de l'entrée d'un antibiotique dans le milieu intracellulaire. Pour ce faire, les différentes familles de bactéries assemblent, en plus de leur bicouche lipidique, des structures externes permettant une moins bonne perméabilité. Les bactéries Gram(+) ont un épais peptidoglycane à leur surface là où les bactéries Gram(-) ont une seconde bicouche lipidique qualifiée de membrane externe. Celle-ci est généralement moins perméable que le peptidoglycane, rendant les bactéries Gram(-) moins sensibles aux anti-bactériens.³⁷

Un second mécanisme de résistance consiste en l'expression de canaux transmembranaires qualifiés de "pompes à efflux" responsables de l'export de composés toxiques pour la bactérie. Celles-ci peuvent être spécifiques d'un substrat, ou à large spectre. C'est ce type de mécanisme sur lequel repose la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à plusieurs familles d'antibiotiques.³⁷

Un autre mécanisme de résistance est la modification de la cible de l'anti-bactérien, généralement par l'acquisition de gènes de résistance conduisant à des changements structuraux de celle-ci. Par exemple, l'acquisition de gènes *van* par une bactérie conduit à une modification structurale du peptidoglycane et, *in fine*, à une perte d'affinité de la vancomycine pour sa cible.³⁸

L'inactivation d'un antibiotique est le quatrième mécanisme de résistance d'un micro-organisme vis-à-vis des agents anti-bactériens. La première stratégie employée est l'expression d'une enzyme par la bactérie assurant la dégradation du principe actif. C'est le cas des bêta-lactamases, capables d'hydrolyser des composés comme la pénicilline par exemple.³⁹ La seconde stratégie d'inactivation consiste en la modification de l'antibiotique par la bactérie, généralement via des réactions de phosphorylation, acétylation ou

37. Cox, G. ; Wright, G. D. *International Journal of Medical Microbiology* **2013**, 303, 287-292.

38. Beceiro, A. ; Tomás, M. *et al. Clinical Microbiology Reviews* **2013**, 26, 185.

39. Bush, K. ; Bradford, P. A. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2016**, 6.

adénylation.⁴⁰⁻⁴²

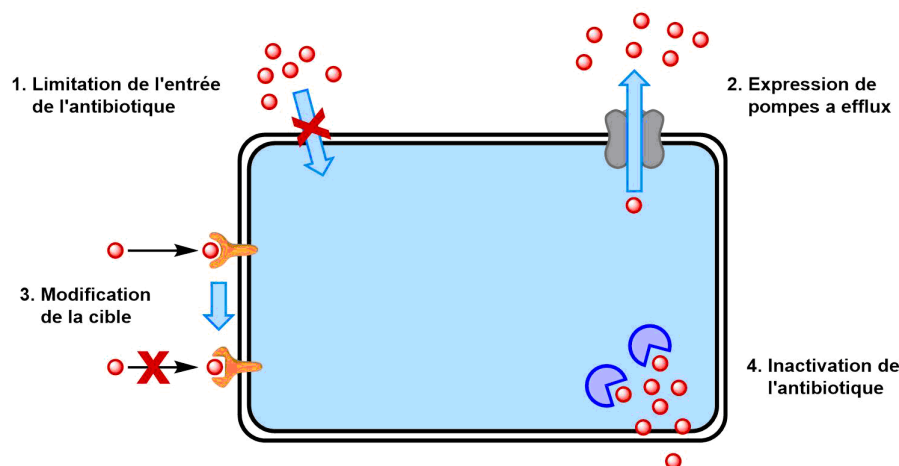


Schéma 1.1 – BMR aujourd’hui et demain

L'apparition de résistance dans des bactéries auparavant susceptibles repose sur l'un des trois derniers mécanismes. Pour les contourner, il est possible de modifier les composés actifs ou de faire des multi-thérapies. Enfin, il est possible de développer de nouveaux principes actifs ciblant des mécanismes bactériens encore non exploités. Cette dernière approche est particulièrement séduisante. En effet, si un mécanisme cellulaire n'est pas visé par un composé actif, cela signifie que la résistance du pathogène pour celui-ci n'existe pas encore.

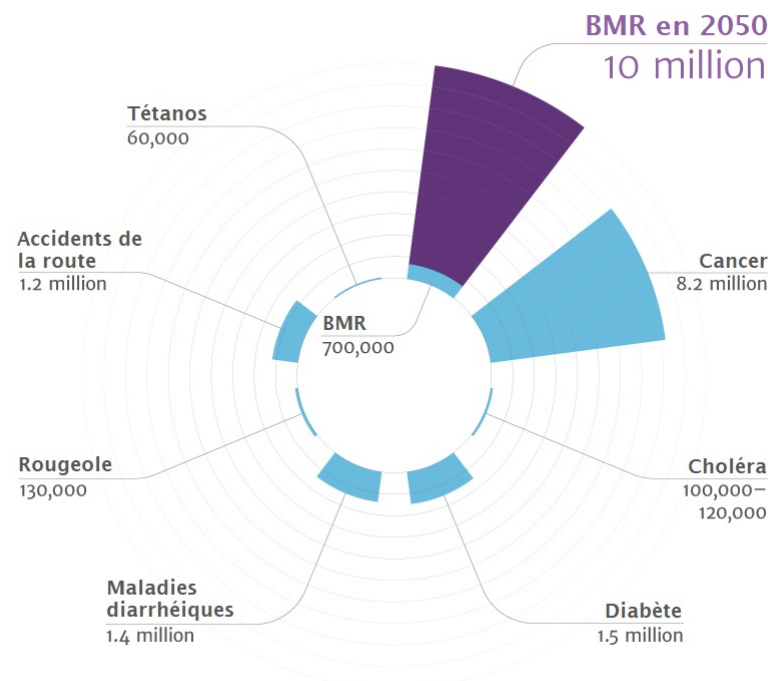
40. Ramirez, M. S. ; Tolmasky, M. E. *Drug Resistance Updates* **2010**, *13*, 151-171.

41. Robicsek, A. ; Strahilevitz, J. *et al. Nature Medicine* **2006**, *12*, 83-88.

42. Schwarz, S. ; Kehrenberg, C. *et al. FEMS Microbiology Reviews* **2004**, *28*, 519-542.

1.1.4 État des lieux

En juillet 2014, le premier ministre du Royaume-Uni commissionne un rapport devant couvrir les aspects sanitaires, économiques et sociaux du rapide développement des bactéries multi-résistantes. Ce rapport estime que 700 000 personnes décèdent chaque année suite à une infection multi-résistante. Il prévoit aussi que d'ici 2050, si rien n'est fait, ce chiffre aura augmenté jusqu'à atteindre une valeur de 10 millions de morts par an, soit plus que le nombre de morts causés par tous les types de cancer actuellement. Parmi les nombreuses recommandations préconisées par ce rapport, figure la nécessité de développer de nouveaux traitements antibiotiques.⁴³



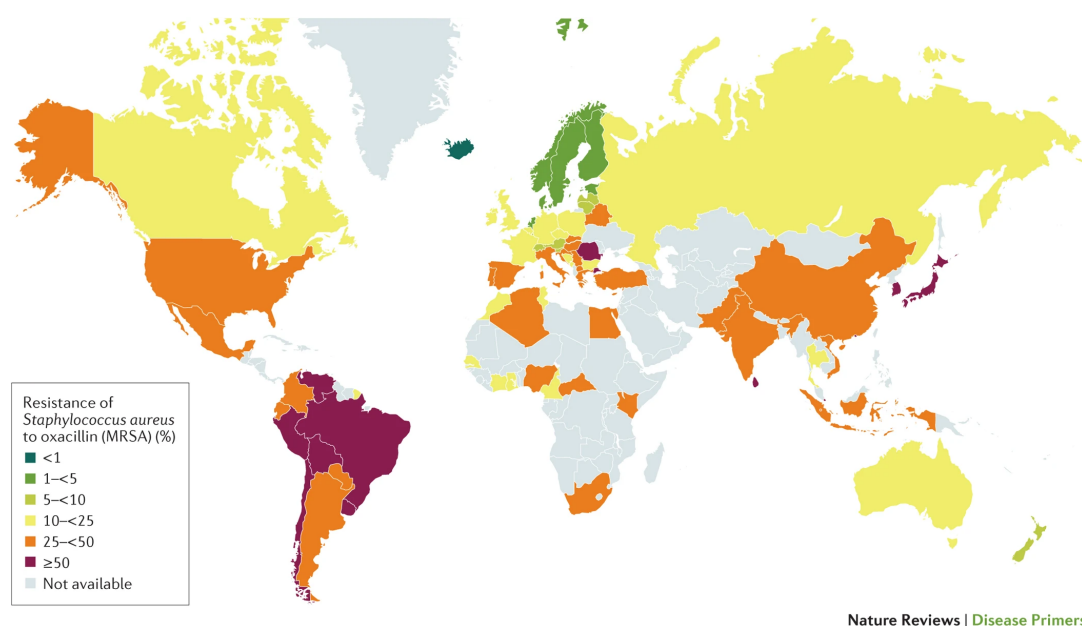
Données récupérées et traduites du "Review on Antimicrobial Resistance"

Schéma 1.2 – Bactéries multi-résistantes (BMR) aujourd'hui et demain

En 2017, l'OMS publie une liste de bactéries pathogènes pour lesquelles il est urgent de développer un nouveau traitement. Parmi celles-ci figure *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). La figure ci-après (Schéma 1.3) illustre la prévalence mondiale de celui-ci.⁴⁴

43. O'Neill, J. ; Resistance, R. o. A., *Tackling Drug-resistant Infections Globally : Final Report and Recommendations*; Review on Antimicrobial Resistance : 2016.

44. Lee, A. S. ; de Lencastre, H. *et al. Nature Reviews Disease Primers* **2018**, 4, 18033.



Lee, A., de Lencastre, H., Garau, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033 **2018** |

NB : faire preuve de prudence lors de la comparaison de données entre les pays

Schéma 1.3 – Occurrence d’infection de *S. aureus* résistant à la méticilline dans le monde en 2018 (en pourcentage d’isolats)

Ce contexte souligne la nécessité du développement de nouveaux traitements ciblant des mécanismes bactériens n’étant pas encore exploités par les traitements proposés à l’heure actuelle.⁴⁵⁻⁴⁷

Comme mentionné précédemment, la plupart des agents anti-bactériens ciblent des mécanismes similaires qu’il s’agisse de la synthèse du peptidoglycane, de l’inhibition de la synthèse des protéines ou de l’interférence avec la machinerie génétique du pathogène cible. Peu d’agents ciblent la production de vitamines ou de cofacteurs qui sont, pourtant, au centre du métabolisme. C’est dans ce contexte que le consortium s’est intéressé à la voie de synthèse d’un cofacteur clef : le NADP⁺.

45. El-Sayed, M. T. ; Zoraghi, R. et al. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, 31, 1666-1671.

46. Srivastava, A. ; Singh, B. N. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, 59, 2169.

47. Roland, S. ; Jolival, C. et al. *Chemistry – A European Journal* **2011**, 17, 1442-1446.

1.2 L'importance du NAD^+ et NADP^+

Dans la suite de cette introduction, nous développerons autour des cofacteurs et coenzymes avant de nous pencher sur le NAD^+ et NADP^+ . En premier lieu nous exposerons leur place dans le métabolisme puis discuterons de leur voie de biosynthèse. Enfin, nous présenterons l'importance de la NAD kinase (NADK), dernière enzyme dans la biosynthèse du NADP^+ , et son potentiel pour le développement de nouveaux agents antibactériens.

1.2.1 Définition et rôle

Généralités sur le cofacteurs

Un cofacteur est une molécule organique, ou un ion métallique, nécessaire à l'activité catalytique d'une enzyme. Parmi eux, on distingue les groupements prosthétiques, tels que les hèmes, liés fermement à la protéine, et les coenzymes, tels que le NAD^+ , n'intervenant dans la réaction enzymatique qu'au moment de l'activité catalytique.⁴⁸ Ceux-ci sont des éléments clefs du métabolisme car ils garantissent des fonctions ne pouvant pas être assurées par les acides aminés constitutifs des enzymes.

Certains coenzymes assurent des fonctions rédox (NAD^+/NADH), servent de puits à électrons (phosphate de pyridoxal) ou de générateurs de radicaux (adénosylcobalamine). D'autres assurent substitution ou addition de matière dans différentes voies de catabolisme et biosynthèse (acétyl-CoA ou tétrahydrofolate).⁴⁹

Il est possible de tirer parti de l'importance métabolique des coenzymes pour le développement de traitements médicamenteux. En effet, un composé empêchant leur biosynthèse ou régénération pourrait s'avérer cytostatique voire même cytotoxique. En médecine la voie des folates a été exploitée avec le développement du triméthoprim, ³⁰ composé actif contre les procaryotes³⁰ ou du methotrexate, agent utilisé chez l'homme en chimiothérapie.⁵⁰ Ces molécules inhibent la dihydrofolate reductase (DHFR) empêchant la synthèse de tétrahydrofolate, coenzyme impliqué, entre autres, dans la production de thymine, une base nucléique cruciale lors de la division cellulaire.

Cependant, la plupart des autres coenzymes sont peu exploités et leur voies de biosynthèse font donc des cibles de choix dans le cadre de développement de nouveaux traitements médicamenteux.

48. Nagel, B. ; Dellweg, H. *et al. Pure and Applied Chemistry* **1992**, *64*, 143-168.

49. Broderick, J. B. in *eLS*, 2001.

50. Koźmiński, P. ; Halik, P. K. *et al. International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, DOI : 10.3390/ijms21103483.

Généralités sur le NAD^+ et le NADP^+ .

En 1904, le biochimiste britannique Sir Arthur Harden suggère l'existence d'une petite molécule, alors appelée "cozymase", essentielle au processus de fermentation des levures.⁵¹ Quelques années plus tard, Hans von Euler-Chelpin en établit la structure,⁵² déterminant qu'il s'agit d'un dinucléotide, combinaison d'adénosine monophosphate (AMP) et de nicotinamide mononucléotide (NAMN). Puis, Otto H. Warburg distingue le NAD^+ du NADP^+ et décrit les mécanismes de transfert électronique dont sont capables ces deux coenzymes.⁵³

La structure et la fonction de ces cofacteurs sont aujourd'hui clairement établies.⁵⁴ Comme décrit par Euler, le NAD^+ est un dinucléotide composé d'un nicotinamide et d'une adénosine reliés en position 5' l'un de l'autre par un lien pyrophosphate. Le NADP^+ , lui, est le pendant phosphorylé en position 2' de l'adénosine du NAD^+ .

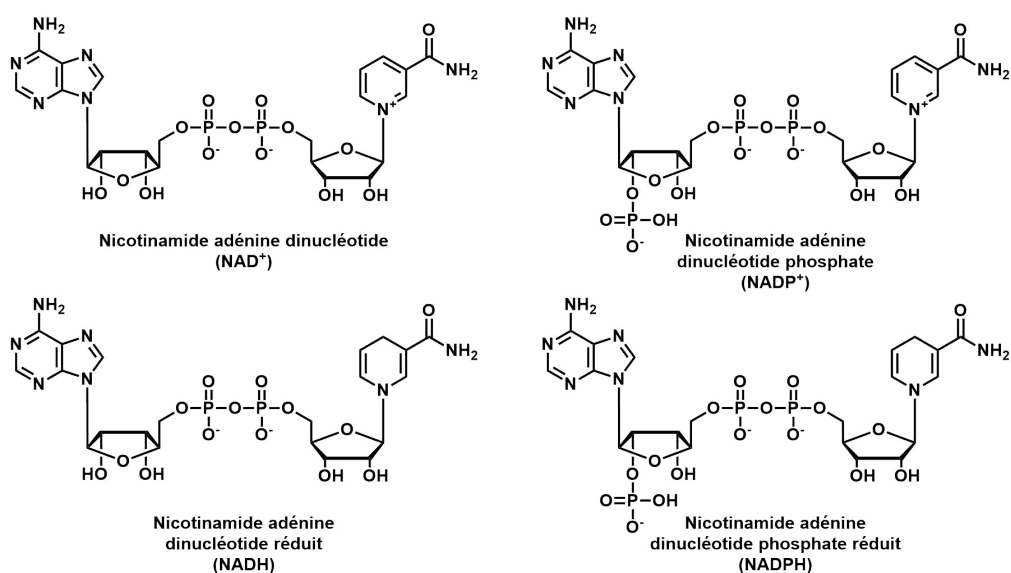


Schéma 1.4 - Les couples NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

Ces coenzymes possèdent tout deux une forme réduite formant les deux couples NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ assurant de nombreuses fonctions d'oxydoréduction de la cellule.⁵⁵ Les principales voies métaboliques nécessitant ces deux couples seront décrites ci-après, en développant en premier le métabolisme eucaryote, mieux connu, puis le métabolisme procaryote en soulignant les différences entre les deux.

51. Harden, A. ; Young, W. J. *et al. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **1906**, 78, 369-375.

52. von Euler, H. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* **1936**, 38, 1-30.

53. Warburg, O. ; Christian, W. *Helvetica Chimica Acta* **1936**, 19, E79-E88.

54. Berger, F. ; Ramirez-Hernández, M. H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2004**, 29, 111-118.

55. Cantó, C. ; Menzies, K. J. *et al. Cell Metabolism* **2015**, 22, 31-53.

1.2.2 Place dans le métabolisme eucaryote

Le couple NAD^+/NADH

Chez les eucaryotes, le couple NAD^+/NADH est principalement impliqué dans le catabolisme des acides gras ainsi que dans le métabolisme de l'énergie avec la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire.⁵⁶

Qu'il s'agisse de leur biosynthèse (Cf. page 49) ou de leur dégradation, le métabolisme des acides gras se fait de façon itérative par ajout ou retrait de deux unités de carbone. Celles-ci proviennent du malonyl-CoA dans le cas de la lipogénèse ou de l'acétyl-CoA dans le cas de la bêta-oxydation. Par souci de brièveté, le métabolisme des acides gras à longueur de chaîne impaire ou des acides gras insaturés ne sera pas couvert ici, bien qu'il nécessite aussi du NAD^+ (dégradation) ou du NADPH (biosynthèse).

A l'occasion de son catabolisme, un acide gras est engagé dans une série de réactions enzymatiques appelées "l'hélice de Lynen" dont chaque tour est responsable du retrait de deux carbones du substrat jusqu'à sa dégradation totale. Parmi les enzymes sollicitées par cette voie métabolique figure la L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (3-HCD), enzyme dont l'activité catalytique nécessite la réduction de NAD^+ en NADH . Ainsi, chaque itération de l'hélice de Lynen, exception faite de la dernière, génère une molécule de NADH .

Chez les eucaryotes, le métabolisme énergétique aérobie repose principalement sur la production cytosolique de pyruvate par glycolyse. Celui-ci est ensuite acheminé à la mitochondrie où il est converti en acétyl-CoA, alimentant le cycle de Krebs et conduisant ultimement à la formation d'ATP.

La première source de pyruvate cytosolique est la glycolyse, voie métabolique permettant la conversion de glucose en deux molécules de pyruvate *via* une série de neuf transformations. Parmi celles-ci figure l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate (G-3-P) catalysée par la G-3-P déshydrogénase (GAPDH), une enzyme NAD^+ dépendante.

Dans la mitochondrie, le NAD^+ est un coenzyme essentiel. Il permet non seulement la conversion du pyruvate en acétyl-CoA mais est aussi nécessaire aux réactions catalysées par plusieurs enzymes du cycle de Krebs. Ces réactions vont toutes permettre la génération de NADH dont l'oxydation subséquente, par la chaîne respiratoire, permettra la génération d'ATP nécessaire au bon fonctionnement de la cellule.

Les processus énergétiques anaérobies proviennent de la fermentation, c'est à dire de la conversion du glucose en pyruvate puis en acide lactique ou en éthanol en fonction de l'organisme considéré. Les enzymes responsables de la fermentation convertissent le NADH en NAD^+ au fur et à mesure que le processus s'opère.

56. Xiao, W. ; Wang, R.-S. *et al. Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, 28, 251-272.

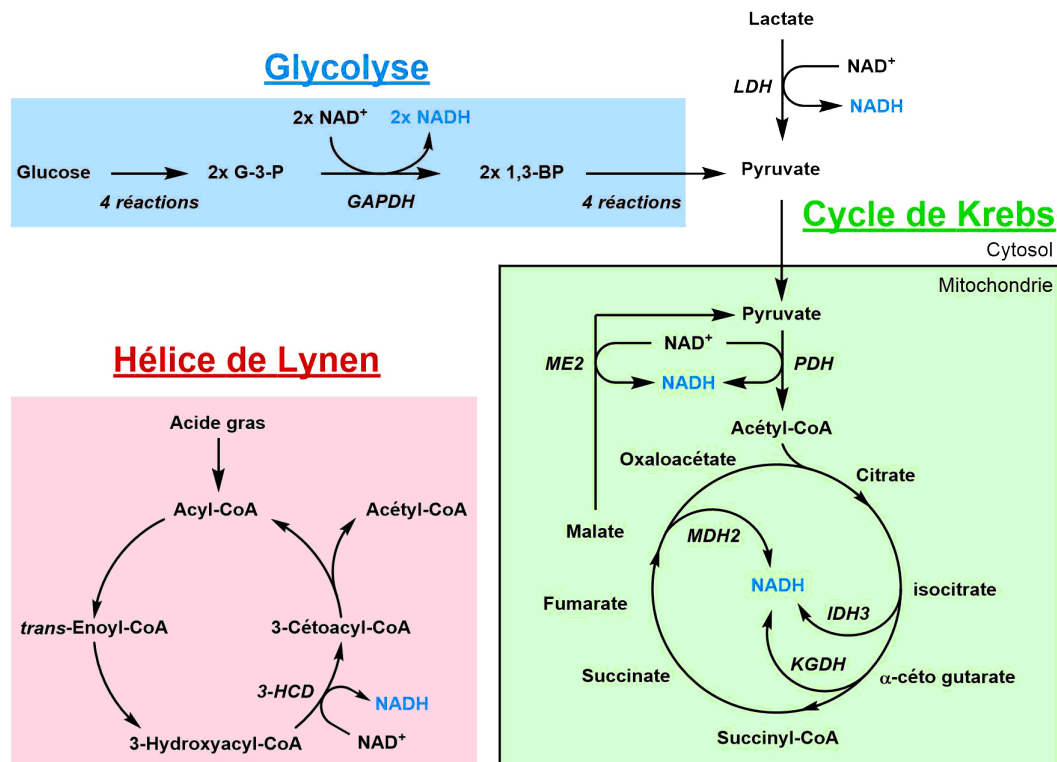


Schéma 1.5 – Principales voies métaboliques générant du NADH à partir de NAD^+ chez les organismes Eucaryotes.

Le couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

Chez les eucaryotes, le couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ est principalement impliqué dans la voie des pentoses phosphates, la synthèse d'acides nucléiques, la biosynthèse des acides gras et la défense contre le stress oxydant.⁵⁶

La voie des pentoses phosphates est subdivisée en deux voies. La première voie, qualifiée de voie oxydative, permet la génération de ribulose-5-phosphate (Ru-5-P) à partir de glucose-6-phosphate par une série de trois réactions enzymatiques générant deux molécules de NADPH à partir du NADP^+ (Schéma 1.6). La seconde voie, qualifiée de voie non oxydative (non représentée), est une myriade de réactions permettant l'inter-conversion des oses pour permettre à la cellule de synthétiser des sucres de trois à sept carbones en fonction de ses besoins. La voie principalement sollicitée est la première, conduisant à la synthèse de ribose-5-phosphate.

La voie des pentoses phosphates est coordonnée avec la glycolyse permettant à la cellule d'assurer la production de différents composés en fonction de ses besoins. Ainsi en fonction de son état la cellule sera capable de réguler ses productions en ribose-5-phosphate, NADPH, pyruvate et ATP .

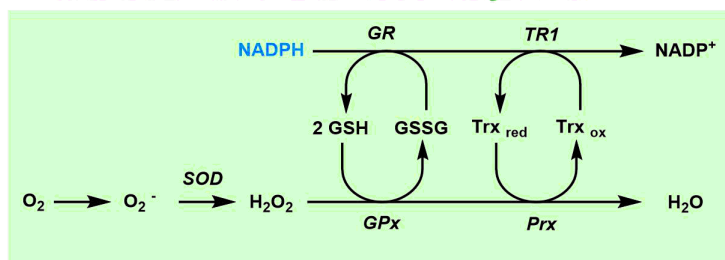
Le ribose-5-phosphate obtenu à l'occasion de la voie des pentoses phosphates, lui, peut ensuite être converti en pyrophosphate de phosphoribosyle (PRPP) pour être pris en charge par les enzymes des voies de biosynthèse des acides nucléiques. Ultimement, ces réactions métaboliques permettent l'obtention des quatre bases ribonucléiques diphosphate (UDP, CDP, GDP et ADP). Celles-ci peuvent ensuite être converties en bases déoxyribonucléiques correspondantes, exception faite de l'UDP qui est convertie en TDP au préalable. Cette réaction est catalysée par la ribonucléotide réductase (RNR), et nécessite l'oxydation concomitante de NADPH en NADP^+ .

La seconde voie majeure de biosynthèse dans laquelle est impliquée le NADPH est la voie de biosynthèse des acides gras. A l'instar de leur dégradation (Cf. page 47) les acides gras sont synthétisés par addition itérative de deux unités de carbone par un complexe enzymatique appelé l'acide gras synthase (AGS). Celui-ci est constitué d'un site central, sur lequel ont lieu les réactions de réduction, et d'un site périphérique sur lequel a lieu l'addition d'acétyle. Parmi les domaines catalytiques de ce complexe, figurent deux réductases qui consomment chacune une molécule de NADPH afin d'assurer leur fonction. Ainsi, chaque cycle d'acide gras synthase permet l'addition de deux unités de carbone, *via* le malonyl-CoA, jusqu'à la formation de l'acide gras final.

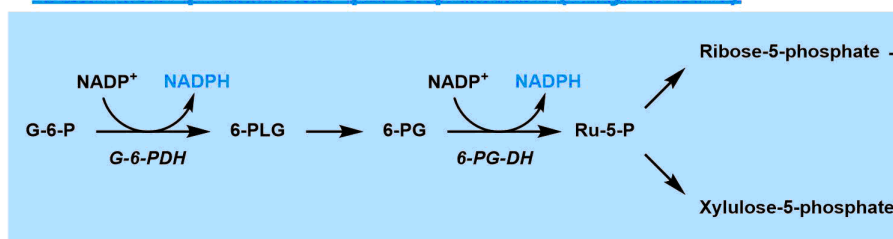
Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont des espèces radicalaires très réactives générées à partir du dioxygène de notre environnement. Dans les organismes vivants, il s'agit le plus souvent d'anions superoxyde O_2^- générés spontanément par certains mécanismes cellulaires. Ceux-ci sont responsables du stress oxydatif et, si ils ne sont pas neutralisés, peuvent endommager les constituants fondamentaux de la cellule.

Trois enzymes sont responsables de leur détoxification : la métalloenzyme superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la peroxyrédoxine (Prx). Leur activité est respectivement responsable de la génération de glutathion oxydé (GSSG) et de thiorédoxine oxydée (Trx_{ox}). Le NADPH est garant de la régénération de ces espèces sous forme réduite, GSH et Trx_{red} , restituant leur pouvoir détoxifiant. Cette propriété du NADPH lui confère un rôle fondamental dans la régulation du stress oxydatif.

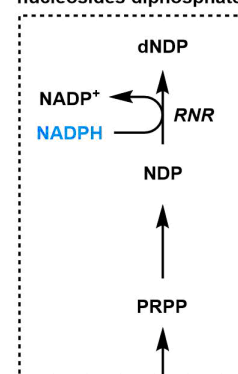
Défense contre le stress oxydant



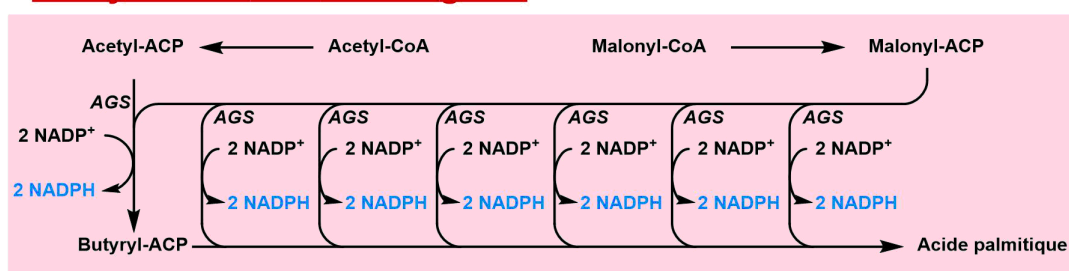
Voie des pentoses phosphates (oxydative)



Synthèse de nucléosides diphosphate



Biosynthèse des acides gras*



* le schéma présenté illustre la synthèse de l'acide palmitique

Schéma 1.6 – Principales voies métaboliques générant du NADPH à partir de NADP⁺ chez les organismes eucaryotes.

1.2.3 Place dans le métabolisme procaryote

Chez les organismes procaryotes, le rôle des couples NAD⁺/NADH ainsi que NADP⁺/NADPH est fondamentalement identique.⁵⁷ Ils sont tout deux impliqués dans le métabolisme de l'énergie,⁵⁸ des acides gras,⁵⁹ des pentoses phosphates⁵⁷ et de la régulation du stress oxydant.^{60,61}

57. Spaans, S.; Weusthuis, R. *et al. Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, DOI : 10.3389/fmicb.2015.00742.

58. Ward, B. in *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Tang, Y.-W., Sussman, M. *et al.*, éd.; Academic Press : Boston, 2015, p. 201-233.

59. Sohlenkamp, C.; Geiger, O. *FEMS Microbiology Reviews* **2016**, *40*, 133-159.

60. Singh, R.; Mailloux, R. J. *et al. Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, 6665.

61. Giro, M.; Carrillo, N. *et al. Microbiology* **2006**, *152*, 1119-1128.

1.2.4 Voie de biosynthèse du NADP^+

Chez les mammifères, la synthèse de NADP^+ se fait par phosphorylation du NAD^+ . La biosynthèse de ce dernier se fait à partir de deux intermédiaires : l'acide nicotinique mononucléotide (ANMN) et le nicotinamide mononucléotide (NAMN). Ceux-ci sont eux même obtenus par trois voies métaboliques. La voie *de novo* ainsi que la voie de Preiss-Handler permettent de synthétiser l'ANMN tandis que des voies dites "de sauvetage" permettent l'obtention du NAMN.

Dans un premier temps nous développerons autour de ces trois voies chez les mammifères puis on présentera les différences qui existent avec les cellules procaryotes. Enfin nous présenterons une enzyme clef du métabolisme : la NAD^+ kinase.

Voie de novo

Chez les mamifères, le métabolisme de biosynthèse de novo du NAD^+ a comme point de départ un acide aminé essentiel (chez l'Homme) : le tryptophane. Cette voie permet la formation d'acide quinolinique transformé ensuite en acide nicotinique mononucléotide (ANMN).⁶²

La première étape consiste en la conversion du L-tryptophane en N-formylkynurénine (non représentée sur le schéma) par l'action indépendante de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou de la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO). Le produit de réaction enzymatique est ensuite déformylé en L-kynurénine par la kynurénine formamidase (KFase) puis est oxydé en L-3-hydroxy kynurénine par la kynurénine-3-hydroxylase (K3H). Après cela, la molécule est convertie en acide 3-hydroxyanthranilique par la kynuréninase (Kyase) suite à quoi l'action de la 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (3HAO) permet l'ouverture du cycle formant ainsi l'acide 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde (ACMS). A cette étape, deux avènements sont possibles pour ce produit instable. En premier lieu, il peut subir une cyclisation spontanée en acide quinolinique, produit qui sera ensuite nécessaire au reste de la voie de biosynthèse du NAD. L'autre alternative est sa prise en charge par la 2-amino-3-carboxymuconique-6-semialdéhyde décarboxylase (ACMSD) pour être converti en acide picolinique permettant la régulation de la concentration intracellulaire en acide quinolinique et, par extension, de la biosynthèse de NAD. Enfin, la quinolinate phosphoribosyltransférase (QPRT) catalyse la formation l'acide nicotinique mononucléotide (ANMN) par transfert et décarboxylation de l'acide quinolinique sur une molécule de phosphorybosylepyrophosphate (PRPP). D'après les calculs de Rozenberg et Lee⁶³ il est probable que la décarboxylation de l'acide quinolinique aie lieu après l'étape de *N*-glycosylation.

62. Magni, G. ; Amici, A. *et al. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **2004**, 61, 19-34.

63. Rozenberg, A. ; Lee, J. K. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, 9314-9319.

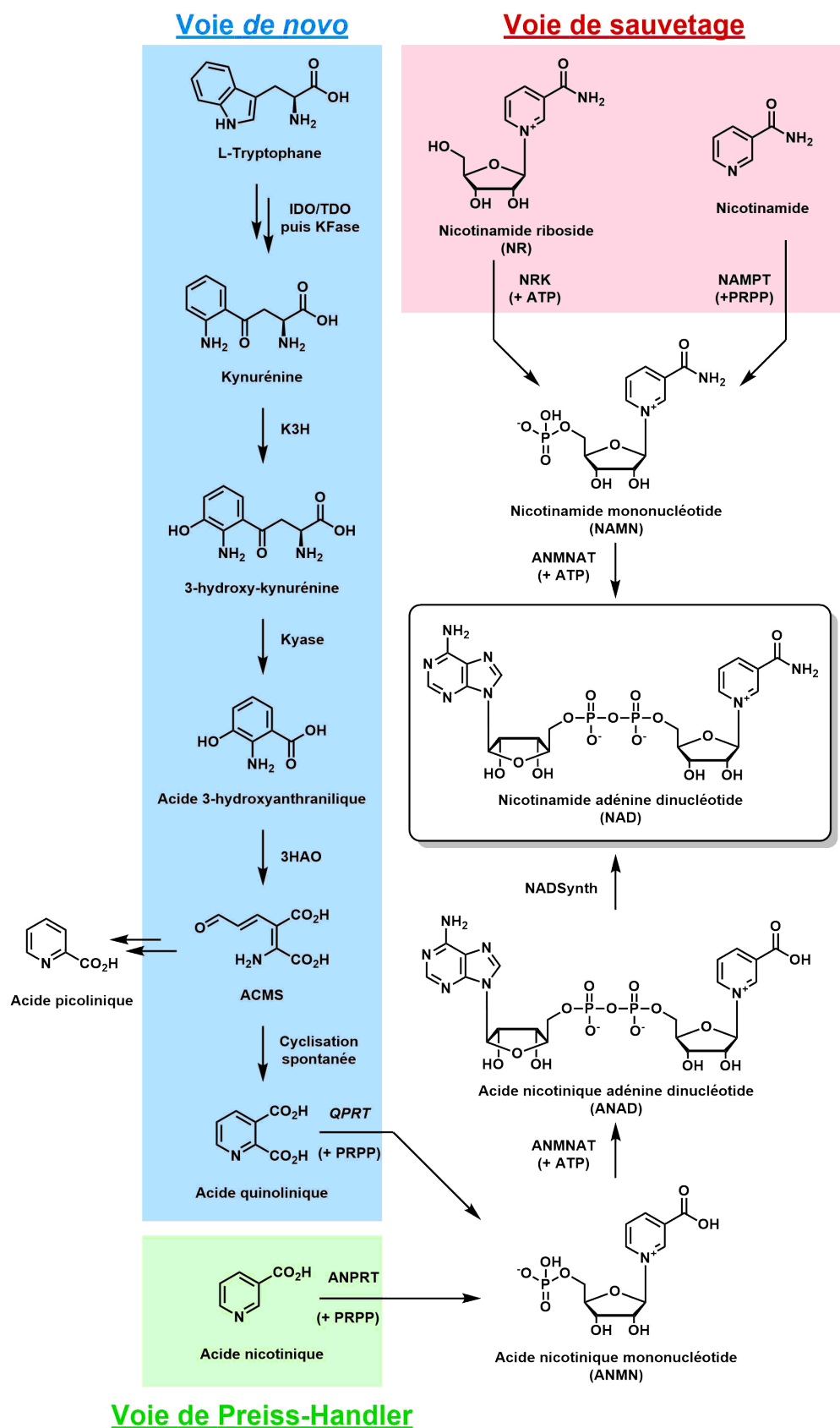


Schéma 1.7 – Trois voies de synthèse du NAD⁺ chez les mammifères

Voie de Preiss-Handler et conversion de l'ANMN en NAD

En 1958, suite à l'étude d'érythrocytes humains, Preiss et Handler ont mis en évidence une seconde voie de formation d'ANMN reposant sur l'acide nicotinique phosphoribosyltransférase (ANPRT). A l'instar de la QPRT, cette enzyme catalyse une réaction de transfert sur le PRPP utilisant l'acide nicotinique comme substrat à la place de l'acide quinolinique.

L'ANMN adénylyltransférase (ANMNAT) permet ensuite de créer un lien pyrophosphate entre le phosphate en position 5' de l'ANMN et une molécule d'ATP, libérant un pyrophosphate inorganique (PPi). L'acide nicotinique adénine dinucléotide (ANAD) ainsi formé est ensuite converti en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) par conversion de l'acide nicotinique en nicotinamide par la NAD^+ synthétase (NADSynth).

Voie de sauvetage

Chez les mammifères, deux autres précurseurs permettent la synthèse de NAD. Le nicotinamide, produit de dégradation du NAD^+ par plusieurs familles d'enzymes, et le nicotinamide riboside (NR) peuvent être recyclés en une nouvelle molécule de NAD^+ via ces voies de sauvetage. La première enzyme permettant cela est la nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPRT) qui catalyse la *N*-glycosylation de nicotinamide sur une molécule de PRPP, formant ainsi le nicotinamide mononucléotide (NAMN). La seconde enzyme est la nicotinamide riboside kinase (NRK) qui permet de phosphoryler l'alcool en position 5' du NR en utilisant une molécule d'ATP.

La formation d'un lien pyrophosphate entre une molécule d'ATP et le NAMN est catalysée par l'ANMNAT, la même adénylyltransférase responsable de la formation de l'ANAD, Formant ainsi une molécule de NAD^+ .

Différences eucaryotes/procaryotes

Pour les procaryotes, l'acide quinolinique généré par la voie *de novo* provient du métabolisme de l'aspartate et non du tryptophane. Contrairement aux eucaryotes, les bactéries ne sont pas capables d'utiliser le nicotinamide pour former le nicotinamide mononucléotide. Elles transforment plutôt le nicotinamide en acide nicotinique afin de s'en servir dans la voie de Priess-Handler.

1.2.5 Phosphorylation du NAD^+ : l'importance de la NAD Kinase

Généralités sur la NADK

C'est en 1937 que l'activité phosphorylante de la NAD kinase été détectée pour la première fois par le chimiste suédois Ragnar Vestin.⁶⁴ Suite à ces travaux, le médecin américain Arthur Kornberg parvient à l'isoler en 1950 à partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Il détermine alors que c'est l'alcool en position en 2' de l'adénosine du dinucléoside qui subit la phosphorylation, convertissant le NAD⁺ en NADP⁺ en présence d'ATP et d'un cation divalent (Mg²⁺ ou Mn²⁺, Schéma 1.8).^{65,66}

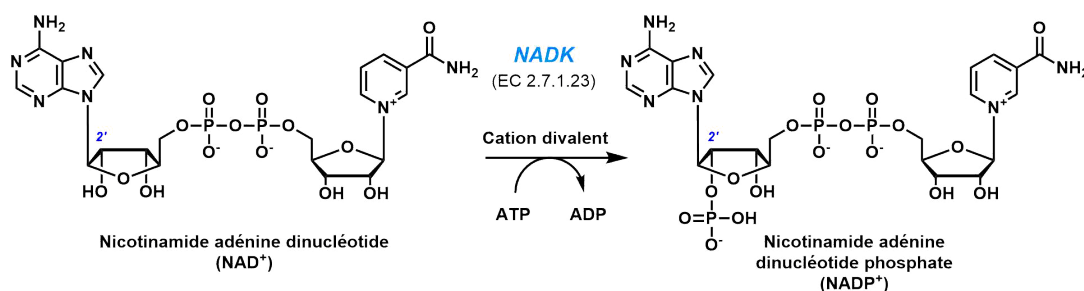


Schéma 1.8 – La NADK, seule enzyme capable de convertir le NAD^+ en NADP^+

La NADK a été clonée pour la première fois chez *M. tuberculosis* et *M. flavus* en 2001 par Kawai *et al.*⁶⁷ permettant l'identification rapide d'orthologues chez de nombreuses espèces différentes. Ces enzymes sont, le plus souvent, des protéines d'une taille de 260 à 320 acides aminés sous forme dimérique ou tétramérique. En 2002, Labesse *et al.*⁶⁸ ont déterminé qu'elles font partie d'une superfamille de kinases regroupant les 6-phosphofructokinases, les diacylglycérine kinases, les sphingosine kinases et les NAD kinases.

Donneurs de phosphate

L'activité catalytique de la NADK nécessite la présence d'un donneur de groupement phosphate. Si la NADK humaine est strictement ATP dépendante,⁶⁹ certaines NADK bactériennes (*M. tuberculosis*, *M. flavus* ou *E. coli* par exemple) peuvent s'accommoder de plusieurs sources. En effet, il a été montré que la réaction pouvait être catalysée en

64. Vestin, R. *Naturwissenschaften* **1937**, 25, 667-668.

65. Kornberg, A. *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *182*, 805-813.

66. Kornberg, A.; Pricer, W. E. *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *186*, 557-567.

67. Kawai, S.; Mori, S. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *276*, 57-63.

68. Labesse, G.; Douguet, D. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 273-275.

69. Giulio, M.; Giuseppe, O. *et al. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 739-746.

présence de différentes nucléotides triphosphates (ATP, CTP, GTP, UTP ...).⁶⁹⁻⁷² Dans une publication de 2008, Kawai *et al.*⁷³ ont aussi montré que le polyphosphate inorganique pouvait servir d'agent phosphorylant dans cette réaction.

Nature du cation divalent

La NADK requiert un ion divalent pour son activité catalytique. A l'occasion de leur publication de 2001, Lerner *et al.*^{74,75} décrivent que la NADK humaine présente une faible spécificité pour celui-ci, s'accommodant de Mg²⁺, de Zn²⁺, de Mn²⁺, de Co²⁺ ou de Ca²⁺. La comparaison des données enzymologiques de plusieurs NADKs permet d'étendre cette observation aux NADKs en général.

Caractérisation du site actif de l'enzyme

La première structure cristallographique d'une NAD kinase, sous forme *apo* (à savoir en l'absence de substrat), a été publiée en 2004 par Garavaglia *et al.*⁷⁶ chez *M. tuberculosis*. L'année suivante, un article de Liu *et al.*⁷⁷ présente une structure de la NADK d'*Archaeoglobus fulgidus* en complexe avec l'ATP, le NAD ou le NADP. Par la suite, d'autres structures de l'holoenzyme (en complexe avec un ligand) ont été résolues chez *M. tuberculosis*⁷⁸ et *L. monocytogenes*.⁷⁹ Ces données ont permis de caractériser le site actif de la NADK : celui-ci est composé de deux sous-sites, qui s'accommodent d'un des deux nucléosides formant le NAD⁺. Le sous-site accueillant le *N*-ribosylnicotinamide est ainsi distingué du sous-site accommodant l'adénosine (Figure 1.8). Dans la suite de ce manuscrit, ces deux sous-sites seront respectivement nommés "site N" et "site A".

70. Chung, A. E. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 1182-1186.

71. Chung, A. E. in *Methods in Enzymology*; Academic Press : **1971**, p. 149-156.

72. Apps, D. K. *European Journal of Biochemistry* **1971**, *19*, 301-308.

73. Kawai, S.; Murata, K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2008**, *72*, 919-930.

74. Lerner, F.; Niere, M. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *288*, 69-74.

75. Chang, A.; Ebeling, C. *et al. Nucleic acids research* **2004**, *32*, 431-433.

76. Garavaglia, S.; Raffaelli, N. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 40980-40986.

77. Liu, J.; Lou, Y. *et al. Journal of Molecular Biology* **2005**, *354*, 289-303.

78. Mori, S.; Yamasaki, M. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *327*, 500-508.

79. Poncet-Montange, G.; Assairi, L. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33925-33934.

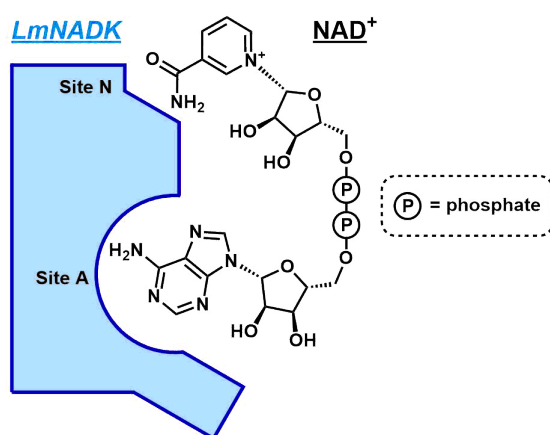


Figure 1.8 – Représentation schématique d'un monomère de *LmNADK1* avec une molécule de substrat, le NAD^+ , au sein de son site actif.

Mécanisme présumé

Bien que le mécanisme d'action exact n'ait pas été encore déterminé, un mécanisme putatif a été proposé en 2007 par Labesse *et al.*⁷⁹ (Schéma 1.9). Dans un premier temps, une molécule de NAD^+ , substrat de l'enzyme, rentre dans le site actif (adénosine dans le site A et nicotinamide dans le site N) afin de former le complexe $\text{NAD}^+/\text{NADK II}$. Parmi les interactions clefs entre l'enzyme et son substrat figure l'interaction entre l'acide aspartique 45 et l'hydroxyle en position 2' de l'adénosine du NAD^+ . Dans un second temps, un cation métallique divalent (Mg^{2+} sur la figure) permet le rapprochement entre le NAD^+ et une molécule d'ATP pour former le complexe **III**. Suite à cela, l'acide aspartique 45 provoque l'abstraction du proton de l'alcool en position 2' de l'adénosine permettant la phosphorylation exclusive de cette position et conduisant à la formation du complexe **IV**. Enfin, le NADP^+ quitte le site actif de l'enzyme conduisant à nouveau à l'apoenzyme **I**.

Essentialité de la NAD kinase chez les eucaryotes

Comme mentionné précédemment, la NAD kinase est la seule enzyme capable d'assurer la production *de novo* de NADP^+ . L'activité de la NADK est donc essentielle pour le maintien d'un pool suffisamment élevé de ce coenzyme afin qu'il puisse continuer d'assurer les fonctions métaboliques lui étant associées.

Saccharomyces cerevisiae (*Sc*) possède trois isoformes différents de NADK. En 2005, Outten *et al.*⁸⁰ ont réalisé des expériences d'inactivation génétique (*knock-out* ou KO) montrant que l'inactivation d'une de ces NADK augmentait grandement la sensibilité de la levure vis-à-vis du stress oxydatif. Par la suite, Shianna *et al.*⁸¹ ont montré qu'un

80. Outten, C. E. ; Falk, R. L. *et al. Biochemical Journal* **2005**, 388, 93-101.

81. Shianna, K. V. ; Marchuk, D. A. *et al. Mitochondrion* **2006**, 6, 99-106.

double KO de deux *ScNADK* était létal. L'introduction d'un gène codant pour la NADK humaine (*HsNADK*) dans ce double KO permet de restaurer la levure dans son état normal permettant de conclure que la NADK est une enzyme essentielle chez *S. cerevisiae*.

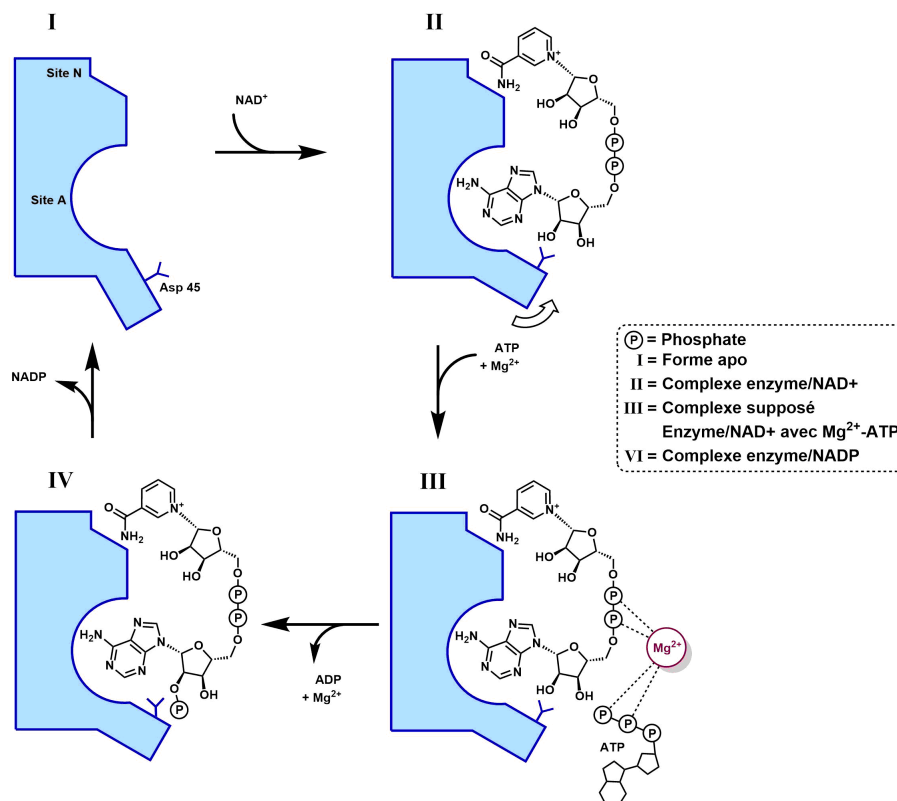


Schéma 1.9 – Mécanisme supposé de phosphorylation du NAD^+ par la NADK sur l'alcool en position 2' de l'adénosine⁷⁹

La souris de laboratoire, *Mus musculus* (*Mm*), possède deux isoformes différents de NADK, la première est cytosolique et la seconde est mitochondriale. A l'instar de *S. cerevisiae*, le KO d'un seul de ces deux isoformes conduit à des signes métaboliques caractéristiques d'une déficience en NADK : la souris développe des problèmes dans la bêta oxydation des acides gras et une plus grande sensibilité au stress oxydatif.⁸² D'après Shianna *et al.*⁸¹ (travaux non publiés) une létalité au stade embryonnaire est observée lorsque le double KO est fait, montrant aussi que l'enzyme est essentielle chez *Mus musculus*.

L'Homme (*Homo sapiens*) possède aussi deux NADK, l'une cytosolique et l'autre mitochondriale. Une étude a montré qu'une mutation de la *HsNADK2* (l'isoforme mitochondriale) conduit à de graves déficiences de diénol-CoA réductase accompagnée d'hyperlysinémie, et ultimement au décès du patient.⁸³ Lorsque la *HsNADK1* est sous-

82. Zhang, K. ; Kim, H. *et al. Gastroenterology* **2018**, 154, 224-237.

83. Houten, S. M. ; Denis, S. *et al. Human Molecular Genetics* **2014**, 23, 5009-5016.

exprimée sur la lignée cellulaire humaine HEK293, on constate une hausse de la sensibilité au stress oxydatif.⁸⁴ Ces données permettent aussi de penser que la NADK est essentielle chez l'homme.

Essentialité de la NAD kinase chez les procaryotes

Les organismes procaryotes possèdent en général qu'un seul isoforme de NAD⁺ kinase.⁸⁵ Comme pour les eucaryotes, son activité est intimement liée au stress oxydatif généré par son environnement⁶⁰ : lors de la sous expression de l'enzyme la sensibilité au stress oxydatif de l'organisme concerné se retrouve exacerbée. Enfin elle a été démontrée essentielle pour la survie de plusieurs pathogènes Gram(+) (*B. subtilis*⁸⁶ ou *S. aureus*⁸⁷), Gram(-) (*E. coli*⁸⁸ ou *S. enterica*⁸⁵) ou du genre mycobacterium (*M. tuberculosis*⁸⁹).

Différences entre les NADK eucaryotes et procaryotes.

Les NAD⁺ kinases sont donc des enzymes qui sont essentielles à la fois pour les organismes eucaryotes et procaryotes. Dans le vivant, leur séquence est relativement bien conservée, à quelques exceptions près que nous couvrirons dans cette section.

D'après Pollak *et al.*, la spécificité de la NAD kinase vis-à-vis du NAD⁺ serait liée à la présence d'un résidu arginine (R) en position 312 de la séquence (Cf. Figure 1.9, en couleur).⁹⁰ Cette responsabilité du résidu n'est pas surprenante au vu de sa proximité avec le motif de reconnaissance du NAD⁺.⁹¹ Lorsque ce résidu est substitué par un acide aminé polaire non chargé ou une glycine, la kinase acquiert une certaine flexibilité de substrat et deviendrait capable de catalyser la phosphorylation de NADH en NADPH.⁹²

Dans le cas des bactéries Gram(-) *S. enterica* ou *E. coli* une spécificité de la NADK pour le NAD⁺ a été montré.⁷³ Cette spécificité pourrait correspondre avec la présence du résidu arginine à proximité. Bien que cela n'a pas été montré, on peut penser que cette spécificité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat soit conservée par d'autres pathogènes de famille Gram(+) possédant également ce résidu tels que *S. aureus* ou *L. monocytogenes*. Il a été montré que l'enzyme humaine est capable de phosphoryler le NADH en NADP, indice de sa flexibilité.

84. Pollak, N. ; Niere, M. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33562-33571.

85. Grose, J. H. ; Joss, L. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 7601.

86. Kobayashi, K. ; Ehrlich, S. D. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 4678.

87. Gelin, M. ; Paoletti, J. *et al. ACS Infectious Diseases* **2020**, *6*, 422-435.

88. Gerdes, S. Y. ; Scholle, M. D. *et al. Journal of Bacteriology* **2002**, *184*, 4555.

89. Sasseti, C. M. ; Boyd, D. H. *et al. Molecular Microbiology* **2003**, *48*, 77-84.

90. Pollak, N. ; Dölle, C. *et al. The Biochemical journal* **2007**, *402*, 205-218.

91. Raffaelli, N. ; Finaurini, L. *et al. Biochemistry* **2004**, *43*, 7610-7617.

92. Mori, S. ; Kawai, S. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 24104-24112.

Il est envisageable de tirer parti de cette spécificité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat pour concevoir des inhibiteurs qui sont plus affins de celle-ci. On peut penser qu'un inhibiteur ayant une forte affinité pour une enzyme rigide aurait une moins bonne affinité pour une enzyme flexible.

Protein Sequences	
Species/Abbrv	
1. H. sapiens NADK1	YQVLNEVV IDRGPS SYLSNV D VYLDGHL ITTV GG GVIVS TP TG STAY AAAAGASMIHPNVPAI
2. H. sapiens NADK2	VRALNEVF IGESLSSRASYYEISVDDGPWEK K SSGLNLCTGTGSKAWSFNINRVATQAVEDVL
3. S. cerevisiae NADK UTR1	HHILNEVT IDRGSP PFLSML ELYG D G S L M T V A AD GLIAATPTG STAY SLSAGGSLVCPTVNAI
4. S. cerevisiae NADK YEF1	HHVLNEVT IDRGPA PCLSLLELYG N D S L M T K V GD GLIVATPTG STAY SLSAGGSLISPSVNAI
5. S. cerevisiae NADK POS5	-HAMNDIFLHRGN S PHLTNLDIFIDGEFLTRT AD GVALATPTG STAY SLSAGGSI V S P L V P A I
6. M. tuberculosis NADK	-WALNEVSLEKGPRLGV LGV VVEIDGRPVSAF CD GVLVSTPTG STAY AFSAGGPVLWPDLEAI
7. E. Coli NADK	-TAINEVVLHPGKVAHMI E F E V Y I D E I F A F S Q R S D G L I I S T P T G STAY SLSAGGPILTPSLDAI
8. S. enterica NADK	-TAINEVVLHPGKVAHMI E F E V Y I D E I F A F S Q R S D G L I I S T P T G STAY SLSAGGPILTPSLDAI
9. S. aureus NADK	YLALNEATMKTE-NGSTLVVDVNLRGKHFERFR GD GLCVSTPSG STAY NKALGGALIHPSLEAM
10. L. monocytogenes NADK1	YLALNESTVKS--SGGPFVVDVINDIHFERFR GD GLCMSTPSG STAY NKSLGGALMHPSIEAM
11. L. monocytogenes NADK2	FYVLNEFNIRSS-IIRTLTMDLYINDSHFETFR GD GMVIS TP TG STAY NKSVNGSIVDPLLPSP

Figure 1.9 – Alignement de séquences de NAD⁺ kinases de différents organismes, l'acide aminé clef pour la flexibilité de substrat surligné. En rouge le motif de reconnaissance du NAD.

Les NADK des bactéries Gram(+) possèdent aussi une caractéristique structurale qui les distingue des autres NADK. En effet, celles-ci présentent une boucle non loin du domaine C-terminal induite par le motif 188-NnrvfR-193.⁷⁹

Enfin, l'activité de la NAD kinase n'est pas la même en fonction du type cellulaire étudié. En effet, celle-ci possède une activité de 13,2 µmol/min/mg chez la bactérie gram(-) *E. coli*⁹² et 18,26 µmol/min/mg chez la bactérie Gram(+) *M. flavus*.⁹² Chez *H. sapiens* l'activité de cette enzyme, dans les mêmes conditions (milieu LB), est deux fois moins élevée avec une valeur de 6,7 µmol/min/mg.⁷⁴

Toutes ces différences de caractéristiques entre les NADK eucaryotes (et a fortiori, de *H. sapiens*) et les NADK de pathogènes Gram(+) laissent penser qu'il est possible de concevoir et synthétiser des inhibiteurs qui seraient sélectifs des kinases bactériennes. D'après Pankiewicz *et al.*⁹³, il est possible de concevoir des molécules de liant au site NAD spécifique d'une classe d'enzyme. De plus, des inhibiteurs nanomolaires spécifiques de l'IMPDH humaine ont déjà été décrits.^{94,95} C'est dans cette optique que le laboratoire s'est penché sur l'étude des NAD⁺ kinases afin de concevoir des inhibiteurs qui leur sont sélectifs.

93. Felczak, K.; Pankiewicz, K. W. *Current Medicinal Chemistry* **2011**, *18*, 1891-1908.

94. Felczak, K.; Chen, L. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 1594-1605.

95. Chen, L.; Gao, G. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5743-5751.

1.3 Travaux antérieurs : la NADK en tant que cible

1.3.1 Approche par fragments

Le "*fragment based drug desing*" (FBDD où approche par fragments) est une méthode de conception de médicament reposant sur le criblage expérimental de petites molécules, par opposition au criblage traditionnel de composés complexes.⁹⁶ L'objectif de cette approche est la détection d'interactions clefs entre la cible étudiée et des fragments moléculaires "simples" suivie de leur assemblage pour obtenir un composé biologiquement actif.

D'un point de vue historique, les fragments criblés ont été définis sous un ensemble de règles appelés "règle de trois" (par analogie à la "règle de cinq" de C. Lipinski).⁹⁷ Ainsi, un candidat fragment doit posséder un poids moléculaire inférieur à 300 Da, un nombre de fonctions accepteuse ou donneuse de liaisons hydrogène ≤ 3 et un $\log P \leq 3$.

Néanmoins, cette approche souffre d'une difficulté particulière. De par leur petite taille, les fragments testés ont souvent une faible affinité pour leur cible. Il est donc nécessaire d'employer une méthode biophysique comme la cristallographie aux rayons X permettant de détecter cette faible affinité.^{98,99}

La diffraction aux rayons X de cristaux de protéine, ayant été trempés dans une solution contenant des fragments, permet de visualiser les interactions formées entre ceux-ci et la protéine. Ces données permettent ensuite d'envisager la synthèse de nouveaux fragments réactifs et de former *in situ* des molécules complexes possédant une plus grande affinité.

1.3.2 Obtention des premiers cristaux

LmNADK1 a été choisie comme enzyme modèle de bactéries Gram(+). Le premier objectif a été l'obtention de cristaux de l'enzyme modèle. Plusieurs conditions ont été testées et celles qui ont été retenues sont des conditions de co-cristallisation de *LmNADK1* avec une petite molécule : la *S*-acétyl-5'-thioadénosine (**TAA**). Ces cristaux ont révélé la présence de deux molécules de **TAA** par monomère d'enzyme. Une expérience de soaking subséquente a permis de déplacer ces petites molécules par une molécule de NAD^+ , révélant que les deux emplacements occupés étaient le site NAD de la NADK.⁷⁹

De façon inattendue, une dimérisation *in crystallo* du **TAA** a parfois été observée, formant la 5'-*S*-(5'-thioadénosinyl)-5'-thioadénosine, nommée ensuite di-thioadénosine ou

96. Erlanson, D. A. ; Fesik, S. W. *et al. Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, 15, 605-619.

97. Congreve, M. ; Carr, R. *et al. Drug Discovery Today* **2003**, 8, 876-877.

98. Hartshorn, M. J. ; Murray, C. W. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 403-413.

99. Thomas, S. E. ; Collins, P. *et al. Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2019**, 377, 20180422.

DTA (Figure 1.10). Après superposition des structures enzyme/NAD⁺ et enzyme/**DTA**, il s'est avéré que chaque adénosine du dimère occupait un des deux sous-sites. Il a donc été clair que le sous-site A, comme le sous-site, N pouvait s'accommoder d'une adénosine. C'est à partir de cette observation que des inhibiteurs de type "diadénosines" ont été conçus.

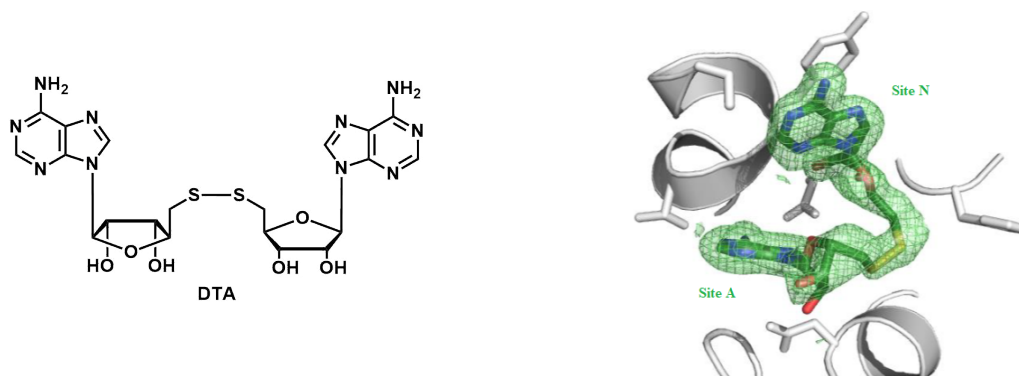


Figure 1.10 – Complexe cristal/ligand entre *LmNADK* et le **DTA**

1.3.3 Nouveaux composés

Une première série de fragments, principalement composés de dérivés de l'adénine et adénosine, a été synthétisée et testée par trempage ou co-cristallisation avec *LmNADK1*. Cette première phase de sélection a permis de proposer la synthèse d'une librairie de plus de 200 nouveaux fragments réactifs et d'envisager la formation *in crystallo* de nouvelles molécules plus complexes (Figure 1.11).

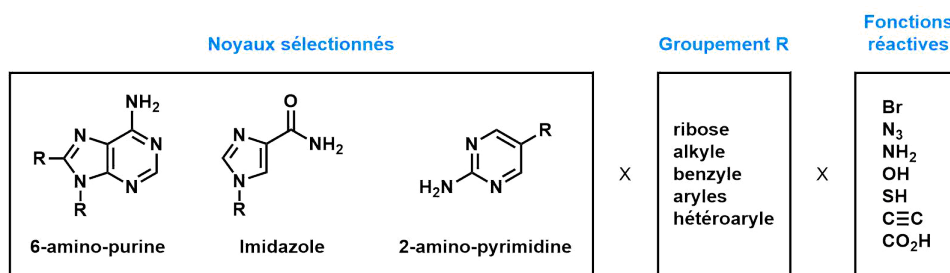


Figure 1.11 – Librairie de fragments synthétisés

Au cours de ce processus de sélection de fragments par cristallographie, une réaction de couplage *in crystallo* a eu lieu entre l'amine en position 5' d'un dérivé de l'adénosine et l'acide carboxylique en position 8 d'un autre dérivé (Figure 1.12). Celle-ci a conduit à la formation du composé "TGA" occupant pleinement le site NAD de l'enzyme.¹⁰⁰

100. Gelin, M.; Poncet-Montange, G. *et al. Structure* **2012**, *20*, 1107-1117.

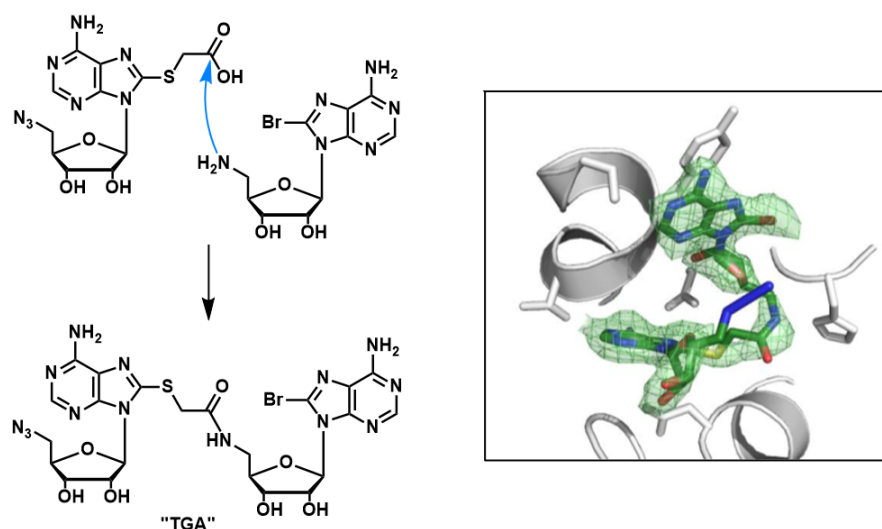


Figure 1.12 – Réaction *in crystallo* conduisant à l'inhibiteur "TGA"

1.3.4 Optimisation du TGA, obtention de NKI-1

Dans un effort d'optimisation des propriétés inhibitrices, plusieurs analogues de la diadénosine **TGA** ont été synthétisés. Ceux-ci présentent des variations sur le bras espaceur, la substitution du ribose ou possédant des modifications sur les purines. Parmi la vingtaine de composés obtenus et testés, le meilleur est le composé "**NKI-1**", une diadénosine dont le bras espaceur est un éther propargylique rigide (Figure 1.13).

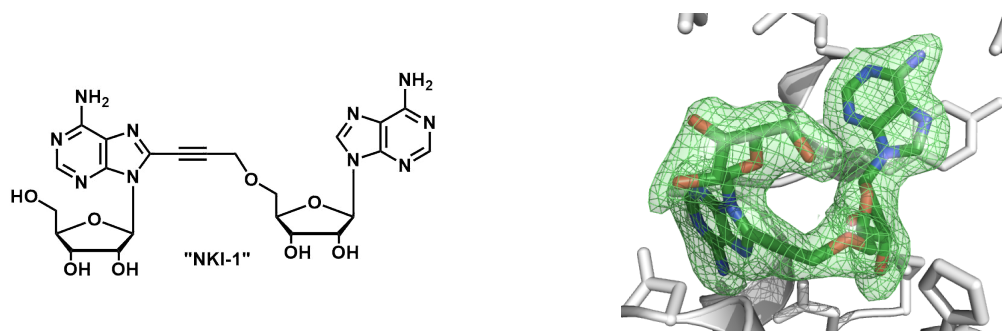


Figure 1.13 – Composé **NKI1** "NAD killer 1"

Les tests *in vitro* ont permis de déterminer les propriétés inhibitrices de ce composé avec un $K_i = 17,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$ et d'estimer une inhibition de croissance bactérienne de 45% (cultures de *S. aureus* traitées à 0,01 $\mu\text{g/mL}$).

Il est important de noter que si la NADK de *S. aureus* a pu être surexprimée dans *E. coli* et purifiée (L. Assairi, Institut Curie), l'enzyme n'est pas très stable dans le temps (phénomène d'aggrégation) empêchant la résolution de sa structure 3D par cristallographie ou par RMN (G. Labesse, CBS). Les constantes d'inhibition des composés synthétisés ont pu être mesurées sur SaNADK (L. Assairi) et se sont révélées être du même ordre de grandeur que celles mesurées sur LmNADK. Pour les composés synthétisés au cours de ce

travail, seuls les Ki sur LmNADK ont été déterminés (C. Lionne, CBS).

L'activité de **NKI-1** a été évaluée *in vivo* sur modèle murin d'infection à *S. aureus* (modèle pyélonéphrite) montrant une diminution significative de la charge bactérienne après traitement.⁸⁷

1.4 Conclusion et objectifs de mes travaux de thèse.

La résistance aux agents antibactériens est un phénomène naturel d'adaptation des micro-organismes aux traitements auxquels ils sont soumis. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules ciblant des mécanismes bactériens non exploités. Parmi ceux-ci figurent l'activité du NADP⁺, cofacteur essentiel à plusieurs voies métaboliques et à la résistance au stress oxydatif. C'est dans ce cadre que la NAD kinase, seule enzyme responsable de la synthèse *de novo* de NADP a été sélectionnée comme cible prometteuse.

En combinant synthèse chimique, cristallographie aux rayons X et approche par fragments (FBDD), les travaux antérieurs du laboratoire ont permis une meilleure caractérisation du site NAD de la cible. Une série d'inhibiteurs ayant une affinité pour celui-ci ont ainsi été obtenus dont l'un d'entre eux s'est montré prometteur lors de tests *in vitro* sur culture de *S. aureus* et *in vivo* sur modèle murin d'infection.^{87,100,101}

C'est dans la poursuite de ces travaux que s'inscrit mon projet de thèse "Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de NAD kinase, cible bactérienne pour le développement d'antibiotiques."

Le NAD⁺ fait partie des cofacteurs centraux du métabolisme. Les inhibiteurs de NADK précédemment obtenus étant des analogues structuraux de celui-ci, il n'est pas à exclure que nos inhibiteurs aient une affinité pour d'autres enzymes à NAD⁺. Le deuxième chapitre traitera ainsi de la conception et préparation d'outils moléculaires permettant d'identifier les autres protéines affines, ou "*off-targets*". Nous présenterons l'approche de chromatographie d'affinité que nous avons suivie ainsi que les résultats obtenus.

Le troisième chapitre sera consacré à la description de la synthèse d'autres outils moléculaires destinés à des expériences de microscopie de fluorescence. Nous présenterons également les résultats des expériences de co-localisation composé/*S.aureus* réalisées.

A l'occasion du quatrième chapitre, nous aborderons la synthèse de nouveaux compo-

101. Paoletti, J.; Assairi, L. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 1041-1056.

sés, analogues de **NKI-1**, ainsi que l'impact des modifications apportées sur leur affinité vis-à-vis de *Lm*NADK et leur effet sur la croissance de *S. aureus*. Le but étant d'identifier des modifications efficaces permettant d'augmenter l'affinité et l'activité des diadénosines.

Enfin, nous avons envisagé de contraindre la structure des inhibiteurs afin d'être le plus sélectif possible. Dans le cinquième chapitre nous présenterons la synthèse et les propriétés de ces composés de type macrocyclique.

La majorité des composés décrits dans ce manuscrit ont une structure commune de type diadénosine dérivés de **NKI-1** (Figure 1.14). Chaque partie de ce biligand modèle a été nommée en fonction du sous-site qu'elle occupe dans site actif de la NADK. Ainsi, la partie portant le propargyle en position 5', se trouvant dans le site accommodant le nicotinamide du NAD^+ , sera nommée "partie N". L'autre adénosine, se trouvant dans la poche accueillant l'adénine du NAD^+ , sera nommée "partie A". Tous les biligands présentés au cours de ce manuscrit auront une nomenclature qui en découle.

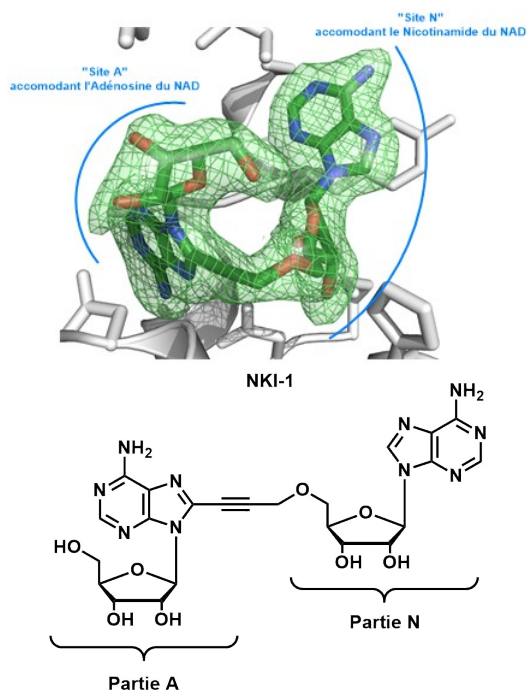


Figure 1.14 – Positionnement de NKI-1 dans le site actif de *Lm*NADK1

Chapitre 2

Synthèse d'outils moléculaires en vue de chromatographies d'affinité

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer la sélectivité du composé **NKI-1** retenu à l'occasion des travaux préliminaires.⁸⁷ Pour ce faire nous avons choisi une approche faisant appel à la chromatographie d'affinité permettant d'identifier et de caractériser les protéines qui seraient affines pour l'inhibiteur.

2.1 Généralités sur la chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie liquide permettant de séparer des composés en fonction de leur affinité pour un ligand immobilisé sur une phase stationnaire. Le concept d'immobilisation de ligand sur support solide, dans le but d'isoler des cibles biologiques, remonte au début du 20^e siècle.¹⁰² Cependant, ce n'est qu'en 1968 que le terme "chromatographie d'affinité" a été employé pour la première par Cuatrecasas, Wilchek et Anfinsen.¹⁰³ A cette occasion, ils immobilisèrent un inhibiteur de nucléase sur agarose afin de purifier un lysat bactérien brut de *S. aureus* dans le but d'en isoler la nucléase pure. Cette méthode est aujourd'hui largement employée à des fins de purifications de protéine mais également à des fins d'étude et de caractérisation d'interactions biologiques.¹⁰²

Les billes d'agarose sont la phase stationnaire la plus classiquement utilisée pour la chromatographie d'affinité. Celles-ci présentent à la fois une bonne stabilité dans une large gamme de pH et une faible spécificité vis-à-vis de nombreux agents biologiques.¹⁰²

La méthode d'immobilisation la plus fréquente consiste en la création d'un lien covalent entre la phase stationnaire activée (portant un groupement réactif) et le ligand souhaité. Parmi les groupements réactifs habituels figure le groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pouvant réagir rapidement avec une amine conduisant à la formation d'un amide, liant le composé d'intérêt de façon covalente au support (Figure 2.1).¹⁰⁴

102. Rodriguez, E. L. ; Poddar, S. *et al. Journal of Chromatography B* **2020**, 1157, 122332.

103. Cuatrecasas, P. ; Wilchek, M. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **1968**, 61, 636.

104. Kim, H. S. ; Kye, Y. S. *et al. Journal of Chromatography A* **2004**, 1049, 51-61.

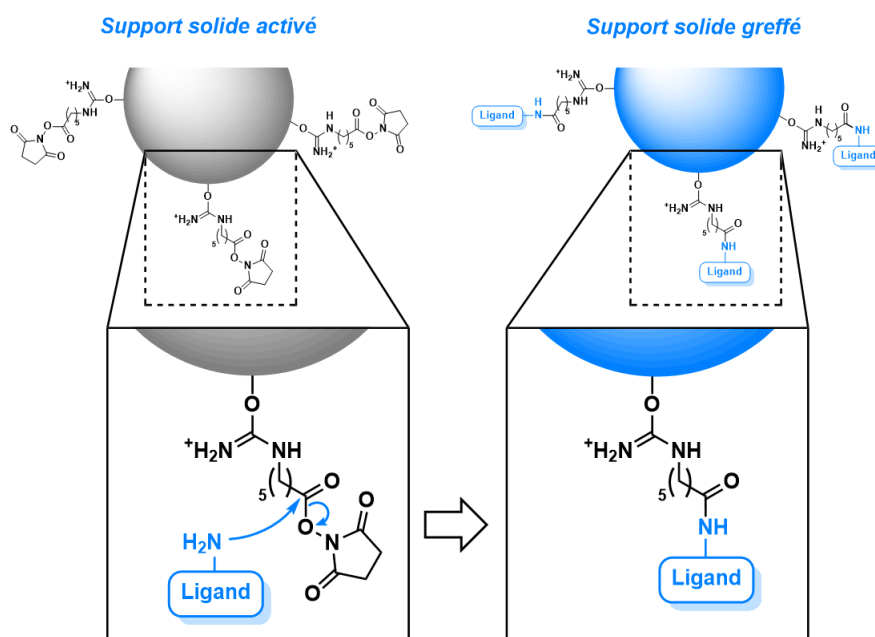


Figure 2.1 – Fonctionnalisation d'une bille de Sépharose par un ligand portant une fonction amine

Nous avons donc sélectionné comme phase stationnaire des billes d'agarose fonctionnalisées par un ester de *N*-hydroxysuccinimide (NHS-Sepharose), celles-ci étant couramment utilisées et commercialement disponibles.

Afin de pouvoir immobiliser **NKI-1** sur le support solide activé, il est nécessaire de synthétiser des analogues possédant une amine primaire en bout d'une chaîne aliphatique. La longueur de cette chaîne doit être choisie avec soin. En effet, si la chaîne est trop courte, le ligand sera trop proche de la volumineuse bille de sépharose, induisant un encombrement stérique trop important pour permettre des interactions protéine/ligand favorables. Si la chaîne est trop longue, il est possible de créer des interactions aspécifiques entre celle-ci et d'autres protéines du lysat bactérien.

Afin de sélectionner une chaîne d'une longueur optimale, nous nous sommes inspirés de la NAD-sépharose commerciale (NAD Separopore 4B-CL[®], commercialisée par BioWorld) ayant déjà été utilisée pour purifier des protéines avec succès.¹⁰⁵ La chaîne séparant le NAD⁺ de la bille de sépharose est d'une longueur totale de 8 atomes. Comme l'illustre la figure 2.1, la distance entre une bille de NHS-sépharose et l'amine primaire du ligand immobilisé est également de 8 atomes. Il est donc nécessaire que la taille de la chaîne aminoalkyle introduite soit courte.

Il est aussi important que la modification apportée à **NKI-1** ait le moins d'impact possible sur l'affinité de l'analogue vis-à-vis de *Lm*NADK. D'après les données cristallographiques, trois positions de l'inhibiteur **NKI-1** ne semblent pas impliquées dans

105. Gunarti, D. R. ; Rahmi, H. *et al.* *HAYATI Journal of Biosciences* **2013**, *20*, 1-6.

des interactions protéine/ligand et peuvent potentiellement être modifiées sans nuire à l'affinité entre l'inhibiteur et sa cible (Schéma 2.1). Nous avons donc synthétisé différents analogues portant systématiquement une chaîne aminoalkyle sur une de ces trois positions.

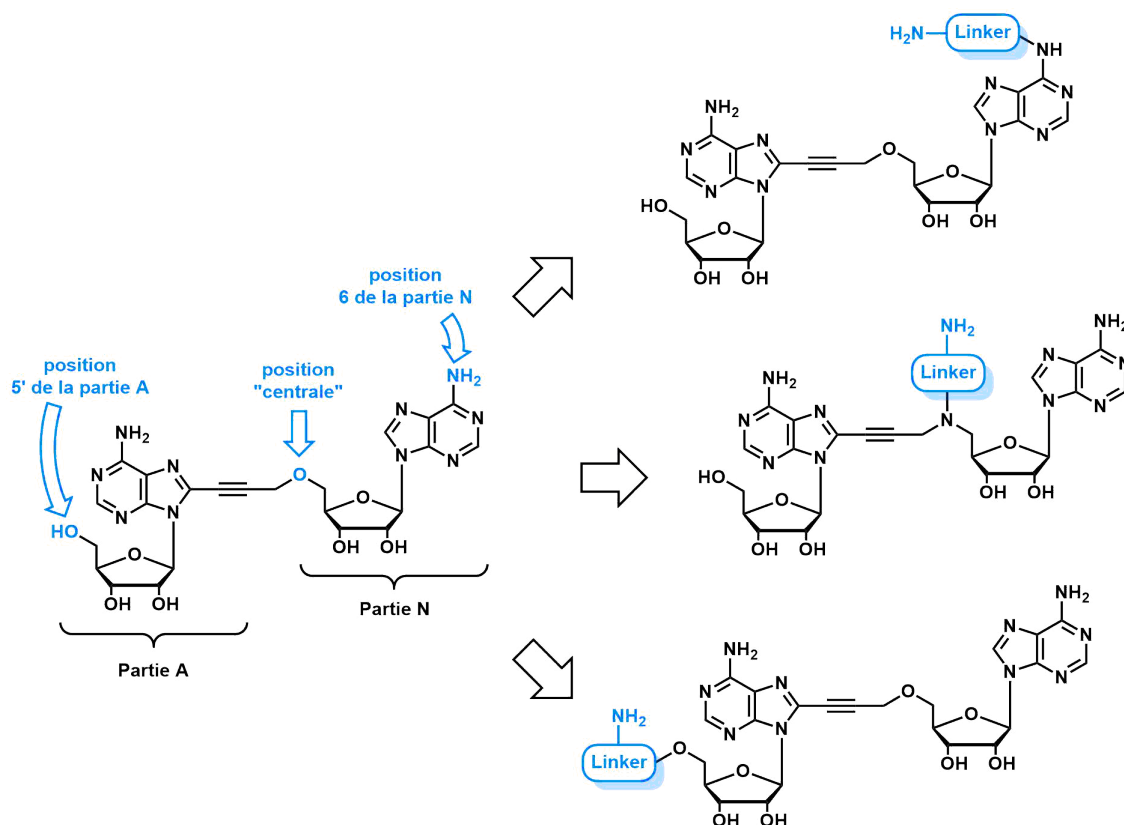


Schéma 2.1 – Familles d'inhibiteurs envisagées

Dans un premier temps, les analogues de NKI-1 seront synthétisés et leur affinité (K_i) vis-à-vis de *Lm*NADK sera mesurée. Ils seront ensuite immobilisés sur support solide activé, formant la phase stationnaire de la chromatographie d'affinité. Ensuite, nous procéderons à une étape de validation du support en réalisant des chromatographies d'affinité avec des lysats de *E. coli* sur-exprimant *Sa*NADK. Si la protéine de *S. aureus* est bien retenue, nous pourrons alors passer à l'étape suivante d'utilisation d'extraits bactériens de *S. aureus* pour déterminer quelles sont les protéines "off target" de **NKI-1**.

2.2 Stratégie générale

La synthèse habituellement suivie pour préparer des mimes de NAD^+ , comme le composé **NKI-1**, repose sur un couplage de Sonogashira entre deux dérivés d'adénosines : l'une bromée en position 8 de la base nucléique (Schéma 2.2, Bloc A) et l'autre propargylée en position 5' du ribose (Bloc N).^{87,106} Cette nomenclature sera utilisée dans la partie expérimentale pour la description des spectres RMN.

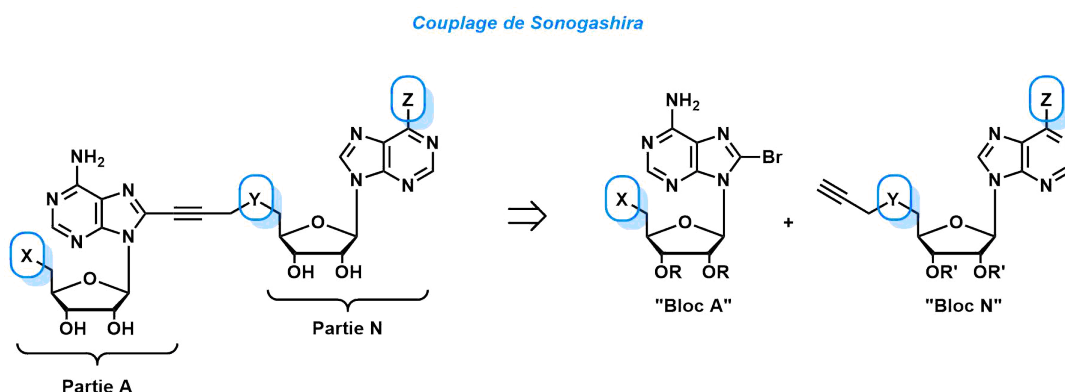


Schéma 2.2 – Etape clef de la rétrosynthèse générale : couplage de Sonogashira

Le couplage de Sonogashira est un couplage palladié permettant de faire réagir un alcyne vrai et un dérivé halogéné (ou un triflate) en présence de $\text{Pd}(0)$ et de $\text{Cu}(I)$ formant ainsi l'alcyne disubstitué. Cette réaction relativement prisée en chimie organique est utilisée en laboratoire pour la synthèse de plusieurs produits naturels¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, de "building blocs"¹¹⁰ et dans l'industrie pharmaceutique pour le développement de composés actifs à l'échelle semi-pilote.^{111,112}

Si les réactions de couplage palladié entre alcyne et dérivé halogéné étaient déjà étudiées par Heck¹¹³ et Cassar¹¹⁴, c'est Kenkichi Sonogashira qui a perfectionné ce type de réaction en y ajoutant une quantité catalytique d'iodure de cuivre (Schéma 2.3).¹¹⁵

-
106. Clément, D. A. ; Leseigneur, C. *et al. Molecules* **2020**, *25*, 4893.
 107. Paterson, I. ; Davies, R. D. M. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 603-607.
 108. Bock, M. ; Dehn, R. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 9134-9137.
 109. Toyota, M. ; Komori, C. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 7110-7113.
 110. Shchetnikov, G. T. ; Zotova, M. A. *et al. European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010*, 1587-1592.
 111. Andresen, B. M. ; Couturier, M. *et al. Organic Process Research & Development* **2004**, *8*, 643-650.
 112. Pu, Y.-M. ; Grieme, T. *et al. Organic Process Research & Development* **2005**, *9*, 45-50.
 113. Dieck, H. A. ; Heck, F. R. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, *93*, 259-263.
 114. Cassar, L. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, *93*, 253-257.
 115. Sonogashira, K. ; Tohda, Y. *et al. Tetrahedron Letters* **1975**, *16*, 4467-4470.

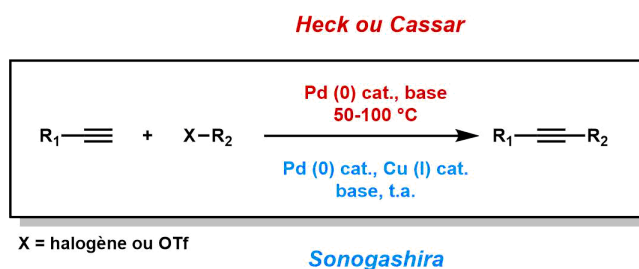


Schéma 2.3 – Couplage palladié entre un alcyne vrai et un dérivé halogéné

En effet, une réaction entre le cuivre (I) et l'alcyne conduit à la formation d'un acétylure de cuivre, augmentant sa réactivité et permettant d'opérer à température ambiante (plutôt qu'à 100 °C). Aujourd'hui, le couplage de Sonogashira est habituellement réalisé en conditions homogènes utilisant un léger excès de base aminée ainsi qu'une quantité catalytique de sel de cuivre (I) et de palladium complexé avec des phosphines.^{116,117}

Le mécanisme réactionnel présumé de ce couplage consiste en deux cycles catalytiques concomitants (Schéma 2.4). Le cycle du cuivre permet d'activer l'alcyne tandis que le cycle du palladium active le dérivé halogéné avant de former le produit final. Le cuivre sert d'acide de Lewis, formant le complexe π -Cu-alcyne **A**, abaissant le pKa du proton de l'alcyne permettant sa déprotonation par une amine (la triéthylamine sur le schéma). L'acétylure de cuivre généré **B** subit ensuite une étape de transmétallation avec l'intermédiaire **C**, produit d'addition oxydante du dérivé halogéné sur le catalyseur Pd(0). Le complexe palladié résultant **D** s'isomérise en complexe **E** puis s'en suit une élimination réductrice conduisant à l'obtention du produit de couplage **F**.

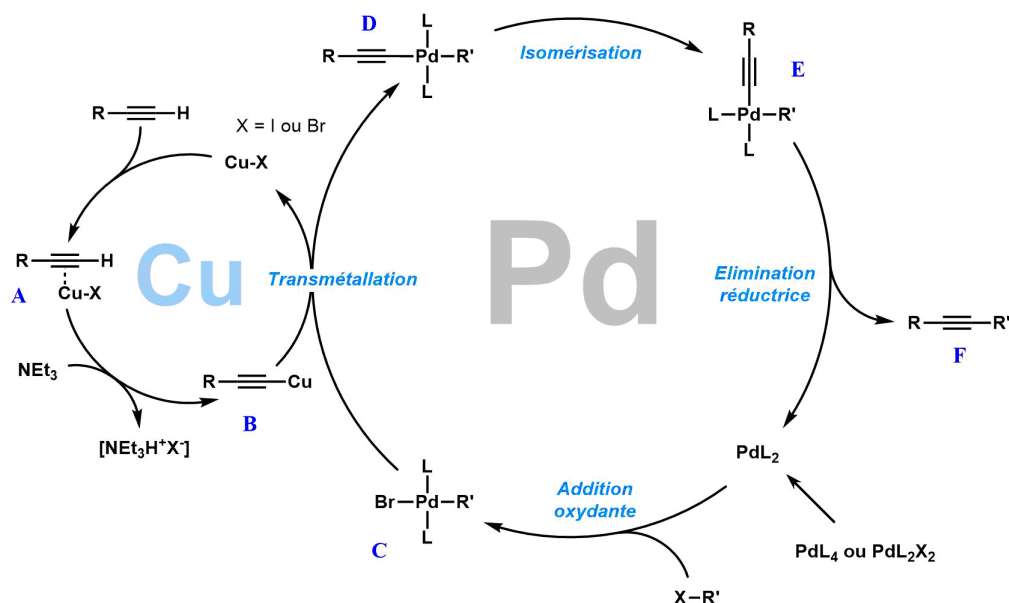


Schéma 2.4 – Mécanisme du couplage de Sonogashira

116. Chinchilla, R. ; Nájera, C. *Chemical Reviews* **2007**, 107, 874-922.117. Negishi, E.-i. ; Anastasia, L. *Chemical Reviews* **2003**, 103, 1979-2018.

L'espèce active du catalyseur palladié est à l'état d'oxydation 0 de formule générale PdL_2 où L est un ligand de type phosphine. Celle-ci peut être générée à partir de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, un complexe à l'état d'oxydation II, qui se fait réduire *in situ* par l'acétylure de cuivre selon le mécanisme suivant (Schéma 2.5).

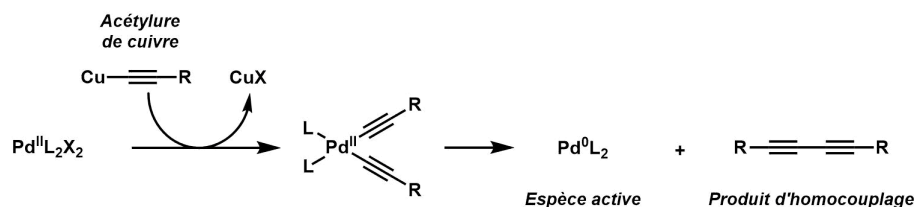


Schéma 2.5 – Conversion du Pd(II) en Pd(0) via deux équivalents d'acétylure de cuivre

Il est aussi possible d'utiliser des réactifs Pd(0) commerciaux tel que le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (ou "tétrakis") permettant de s'affranchir de l'étape d'activation du catalyseur.

La principale limitation de cette réaction est la formation de produit d'homocouplage de l'alcyne si le palladium se retrouve oxydé en Pd(II). Cela arrive le plus souvent lorsque des traces d'oxygène sont présentes dans le milieu réactionnel.

Appliqué à la chimie des nucléosides, le couplage de Sonogashira a permis la synthèse de nombreux composés modifiés à différentes positions.¹¹⁸ Ainsi, plusieurs groupes ont synthétisé des pyrimidines ou purines modifiées portant un ribose^{119,120} ou un 2'-désoxy-ribose¹²¹⁻¹²³ (Schéma 2.6). L'introduction d'un groupement alcyne vrai en position 1' du ribose a aussi permis la création de C-nucléosides par réaction avec la 5-iodocytosine¹²⁴ ou avec des halogènes aromatiques.^{125,126} Des fluorophores¹²⁷ et chromophores¹²⁸ ont aussi été introduits à cette position.

118. Agrofoglio, L. A. ; Gillaizeau, I. *et al. Chemical Reviews* **2003**, 103, 1875-1916.

119. Matsuda, A. ; Shinozaki, M. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 241-252.

120. Crisp, G. T. ; Gore, J. *Tetrahedron* **1997**, 53, 1523-1544.

121. Robins, M. J. ; Barr, P. J. *The Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48, 1854-1862.

122. Sagi, G. ; Otvos, L. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37, 1307-1311.

123. Seela, F. ; Zulauf, M. *et al. Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 910-927.

124. Heinrich, D. ; Wagner, T. *et al. Organic Letters* **2007**, 9, 5311-5314.

125. Adamo, M. F. A. ; Pergoli, R. *et al. Tetrahedron* **2010**, 66, 9242-9251.

126. Bobula, T. ; Hocek, M. *et al. Tetrahedron* **2010**, 66, 530-536.

127. Chiba, J. ; Takeshima, S. *et al. Chemistry – A European Journal* **2007**, 13, 8124-8130.

128. Fujimoto, K. ; Aizawa, S. *et al. Chemistry – A European Journal* **2010**, 16, 2401-2406.

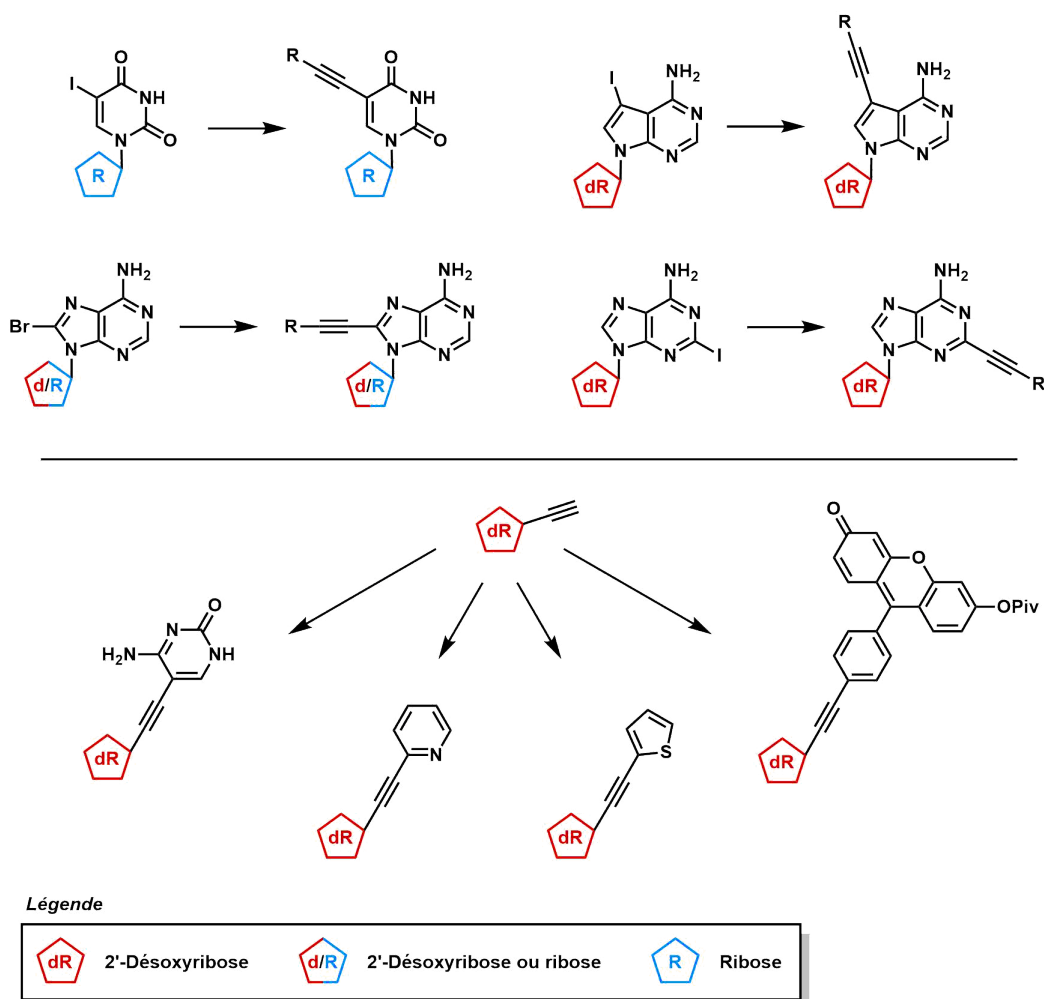


Schéma 2.6 – Exemple de modifications apportées aux bases nucléiques par couplage de Sonogashira

Au laboratoire, nous appliquons des conditions relativement communes, utilisant le palladium tétrakis et l'iodure de cuivre comme système catalytique. Le couplage de Sonogashira permet ainsi de former les composés souhaités par réaction entre un dérivé bromé (Bloc A) et un alcyne (Bloc N). Cette méthode permet d'accéder facilement à une grande diversité de diadénosines par couplage de différents blocs entre eux.

Je tiens à préciser que certaines réactions ont été réalisées par Dylan Coelho, stagiaire de Master 1 sous mon encadrement. Dans ce chapitre, les rendements marqués d'une dague (†) représentent les réactions menées par celui-ci.

2.3 Fonctionnalisation en position 6 de l'adénine du site N

Les premiers analogues que nous avons synthétisé sont des composés portant des chaînes aminoalkyles en position 6 de l'adénine du site N (Schéma 2.7). D'un point de vue rétrosynthétique, l'obtention de cette série repose sur un couplage de Sonogashira entre la 8-bromoadénosine per-*O*-acétylée **3** et différents nucléosides propargylés en position 5' (**4** ou **5**). Ceux-ci peuvent être obtenus par deux voies de synthèse différentes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-*N*-ribosyl-6-chloropurine (**9**).

La première (Schéma 2.7, voie A), consiste en la propargylation de la fonction alcool en position 5' du composé **9**, suivie de la substitution nucléophile du chlore en position 6 par une diamine protégée. Cette méthode présente l'avantage de passer par la molécule **6**, bloc commun aux composés **4** et **5**. La seconde (Schéma 2.7, voie B) consiste en la substitution nucléophile du chlore en position 6 du composé **9** suivie de la propargylation de l'alcool correspondant en position 5'.

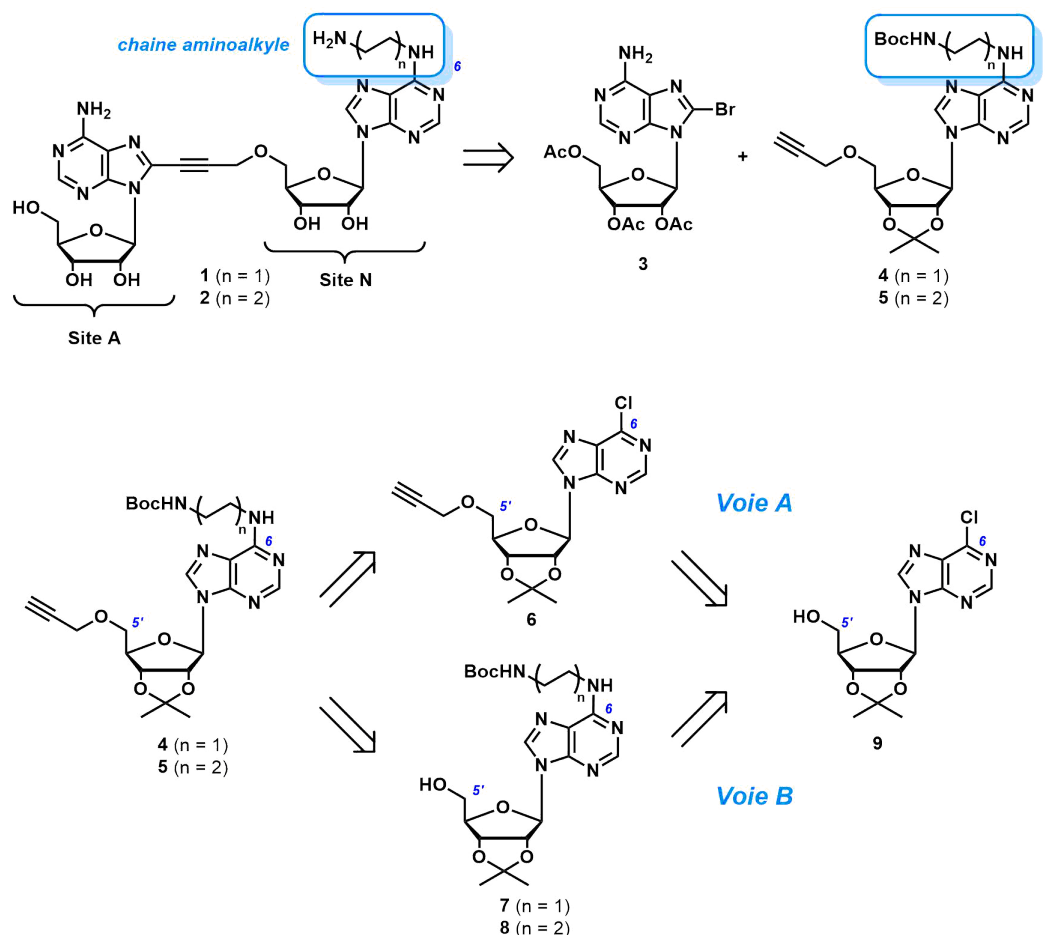
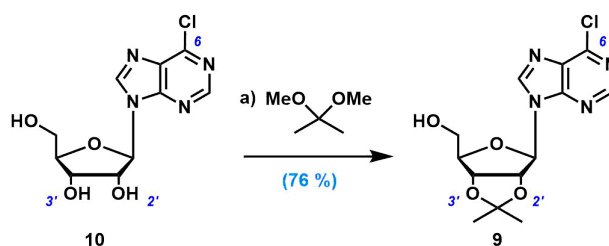


Schéma 2.7 – Rétrosynthèse envisagée de diadénosines alcynes **1** et **2**

La première étape, commune aux deux voies, consiste en la protection sélective des fonctions alcools en position 2' et 3' de la *N*-ribosyl-6-chloropurine (**10**). Notre choix s'est porté sur l'introduction d'un groupement isopropylidène, sélectif les diols vicinaux, afin de protéger les alcools en position 2' et 3' en une seule étape (Schéma 2.8).¹²⁹ L'introduction de ce groupement protecteur s'est faite à température ambiante par réaction du nucléoside **10** avec le 2,2-*di*-méthoxypropane dans l'acétone en catalyse acide. Ces conditions nous ont permis d'obtenir le composé 2',3'-protégé **9** avec un rendement de 76 %, comparable aux rendements décrits dans la littérature (allant de 70 % à 90 %).¹³⁰⁻¹³²



a) 2,2-Diméthoxypropane (2,0 équiv.), acide *para*-toluène sulfonique (0,046 équiv.), acétone, t.a., 16 h, 76 %.

Schéma 2.8 – Protection des alcools en position 2' et 3' de la *N*-ribosyl-6-chloropurine

Nous avons ensuite suivi la première voie et avons tenté de propargyler l'alcool primaire du composé **9** afin d'obtenir l'alcyne **6** en suivant les protocoles classiques de la littérature (Schéma 2.9).¹³³⁻¹³⁵ Pour ce faire, nous avons ajouté un léger excès d'hydrure de sodium (1,2 équivalents) à une solution à 0 °C du composé **9** dans le DMF. Cependant, après 1,5 heures à froid, l'ajout de bromure de propargyle n'a pas permis d'obtenir le composé souhaité **6**. Nous avons à la place obtenus le trimère **11**. Sa formation est due à la substitution nucléophile du chlore en position 6 d'une molécule de **9** par l'alcoolate d'une autre.

129. Theodora W., G.; Peter G. M., W. in *Protective groups in organic synthesis, Third edition*; J. Wiley. : **1999**, p. 207-215.

130. Errico, S.; Oliviero, G. *et al. Molecules* **2012**, *17*, DOI : 10.3390/molecules171113036.

131. Mathew, S. C.; Ghosh, N. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 6736-6739.

132. Chen, J.-B.; Liu, E. M. *et al. ChemMedChem* **2011**, *6*, 1390-1400.

133. Jawalekar, A. M.; Meeuwenoord, N. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 287-290.

134. Poppe, L.; Rétey, J. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1993**, *76*, 2367-2383.

135. Matthews, A. J.; Bhardwaj, P. K. *et al. Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 2273-2295.

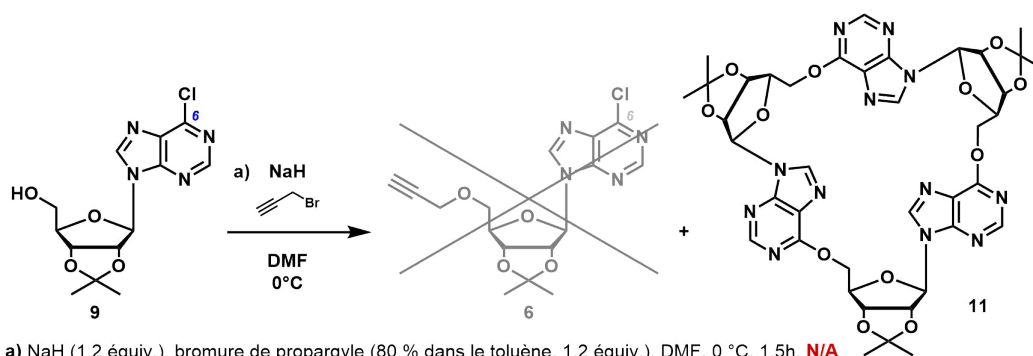
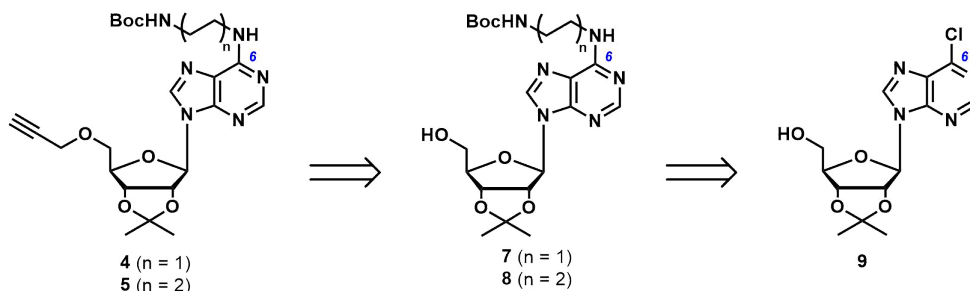


Schéma 2.9 – Obtention inattendue du trimère 11

La réduction du temps d'attente entre la formation de l'alcoolate et l'ajout du bromure de propargyle ou l'emploi d'un autre solvant (THF) n'ont pas non plus permis l'obtention du composé **6**. Dans un dernier essai, nous avons refroidi une suspension d'hydruure de sodium et de bromure de propargyle dans le THF. La lente addition d'une solution de composé **9** n'a pas non plus permis l'obtention du composé désiré, conduisant à la formation du trimère **11**.

En parallèle, nous avons tenté la seconde approche consistant en la substitution du chlore en position 6 du produit de départ **9** (Schéma 2.10) par une diamine protégée (**12** ou **13**). Parmi les groupements protecteurs classiques d'amines notre choix s'est porté sur le *tert*-butoxycarbonyl (Boc), un carbamate sensible aux conditions acides dont les produits de déprotection sont volatils.

Schéma 2.10 – Seconde voie suivie pour obtenir les composés **4** et **5**

Les diamines monoprotégées **12** et **13** ont été synthétisées selon les protocoles déjà décrits,¹³⁶ en faisant réagir un équivalent de dicarbonate de di-*tert*-butyl (Boc₂O) avec un large excès de diamine libre correspondante en condition très diluée (0,04 M dans le DCM). Après 16 heures de réaction, nous avons pu isoler les diamines monoprotégées **12** et **13** avec des rendements respectifs de 78 % et quantitatif.

136. Morrell, A. ; Placzek, M. S. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 2040-2048.

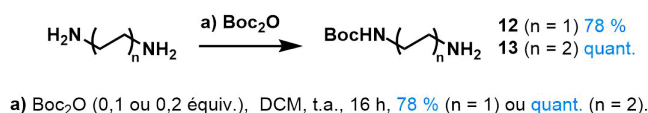
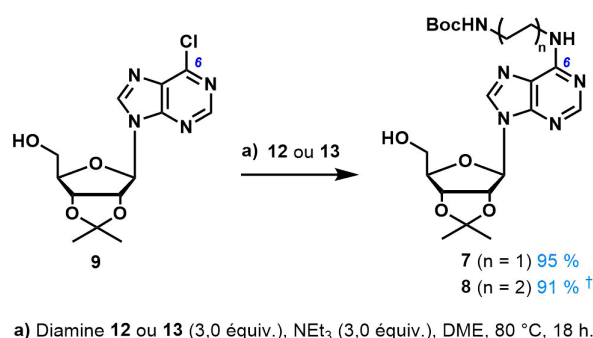
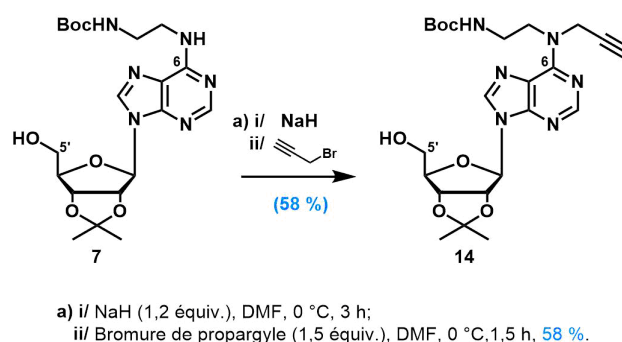


Schéma 2.11 – Monoprotection de l'éthylène ou butylène diamine par un groupement Boc

La substitution nucléophile aromatique (S_NAr) a ensuite été faite à 80 °C dans le DME en faisant réagir 3 équivalents de diamine mono-protégée (**12** ou **13**) avec le chlore en position 6 du composé **9** (Schéma 2.12). Le produit de départ était entièrement consommé après seize heures de réaction, permettant d'obtenir les produits **7** et **8** avec des rendements respectifs de 95 % et 91 %.

Schéma 2.12 – Synthèse de **7** ou **8** par substitution du chlore de la purine **9**

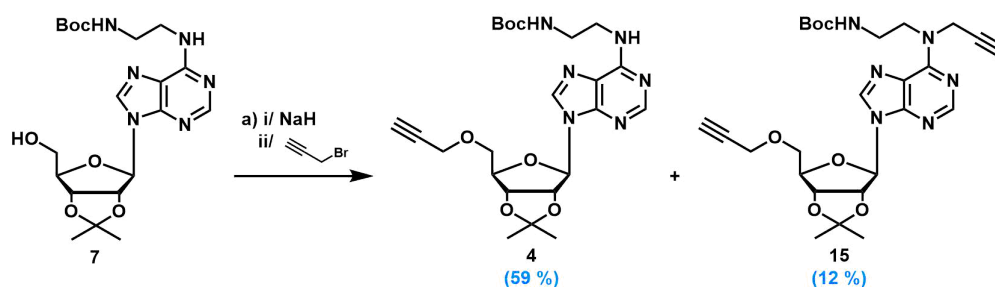
Le premier essai de propargylation de l'alcool en position 5' a été fait sur le composé **7** en utilisant un léger excès d'hydruure de sodium (Schéma 2.13). Malheureusement, dans ces conditions, le groupement propargyle a été additionné sur l'amine en position 6 du composé conduisant à l'obtention du sous-produit **14** avec un rendement de 58 % (Schéma 2.13).

Schéma 2.13 – Propargylation involontaire de l'amine exocyclique de l'analogue **7**

Ce résultat s'explique par la déprotonation de l'amine exocyclique par l'hydruure, exacerbant son pouvoir nucléophile et conduisant à sa propargylation. Cette hypothèse s'est retrouvée renforcée par une publication de Stewart R. et Harris M. qui estiment le pK_a de l'amine exocyclique de l'adénosine à une valeur de 16,7 dans le diméthylsulfoxyde

(DMSO).¹³⁷ Il devient ainsi plausible que celui-ci soit inférieur au pKa de la fonction alcool en position 5'. Dans les conditions réactionnelles employées, l'addition de 1,2 équivalents d'hydrure de sodium conduirait donc à la déprotonation presque exclusive de l'amine exocyclique suivie de sa propargylation menant à la formation du composé **14**.

Afin de propargyler la position 5', le nombre d'équivalents d'hydrure de sodium utilisé a donc été augmenté dans le but de déprotoner les deux positions. Ainsi, la charge négative de l'amine exocyclique, délocalisable dans la base purique, serait moins réactive que l'alcoolate, plus basique, conduisant à la formation du produit désiré **4** (Schéma 2.14). Ainsi, une solution à 0 °C de composé **7** dans le THF a été traitée avec 2,1 équivalents d'hydrure de sodium durant 30 minutes avant d'ajouter 1,0 équivalent de bromure de propargyle. Ces nouvelles conditions nous ont permis d'obtenir le produit souhaité **4** avec un rendement de 59 % ainsi que le produit de dipropargylation **15** avec un rendement de 12 %. Ces conditions optimisées ont également été appliquées au composé **8** (décrit Schéma 2.12) conduisant à l'obtention du dérivé propargylé **5** avec un rendement de 68 % ainsi que le produit de dipropargylation avec un rendement de 7 %.



a) i/ NaH (2,1 équiv.) THF, 0 °C, 3 h,
ii/ Bromure de propargyle (1,0 équiv.), 4 °C, 24 h, 59 %.

Schéma 2.14 – Propargylation de l'alcool en position 5' de l'analogue **7**

L'étape suivante consiste en le couplage de Sonogashira entre les alcynes **4** ou **5** et la 8-bromoadénosine peracétylée **3** (Schéma 2.15). Comme mentionné précédemment, le Pd(0), espèce catalytique de cette réaction, s'oxyde en Pd (II) au contact du dioxygène présent dans l'air. En présence de sels de cuivre (I), celui-ci se réduit à nouveau en Pd(0) consommant deux équivalents d'alcyne vrai pour former le sous-produit d'homocouplage.^{116,138} Il est donc crucial de manipuler en atmosphère inerte (argon) afin d'éviter toute trace de dioxygène conduisant à la conversion de l'alcyne à faire réagir en sous-produit non désiré.

137. Stewart, R. ; Harris, M. G. *Canadian Journal of Chemistry* **1977**, 55, 3807-3814.

138. Sonogashira, K. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653, 46-49.

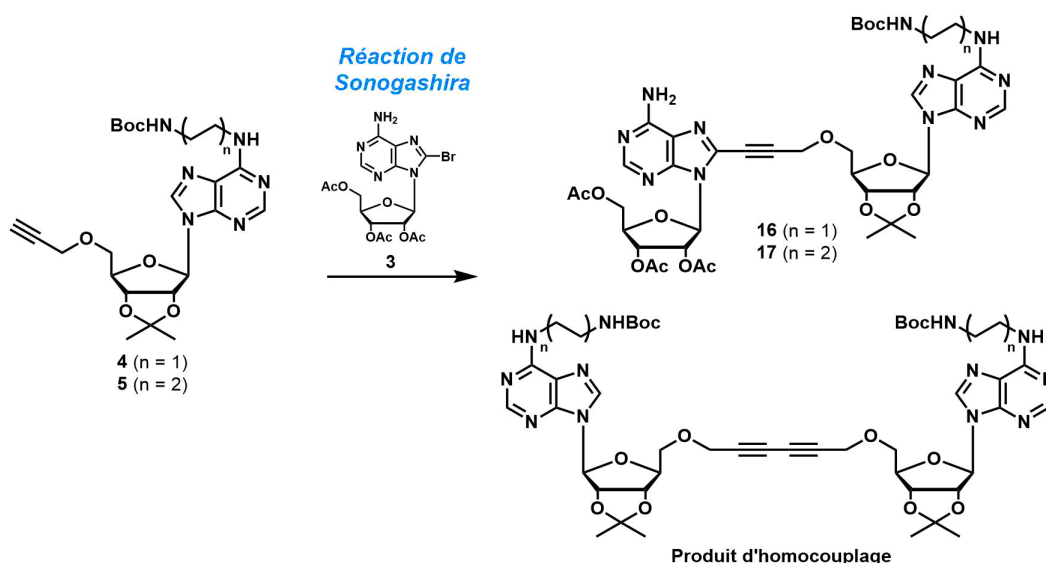
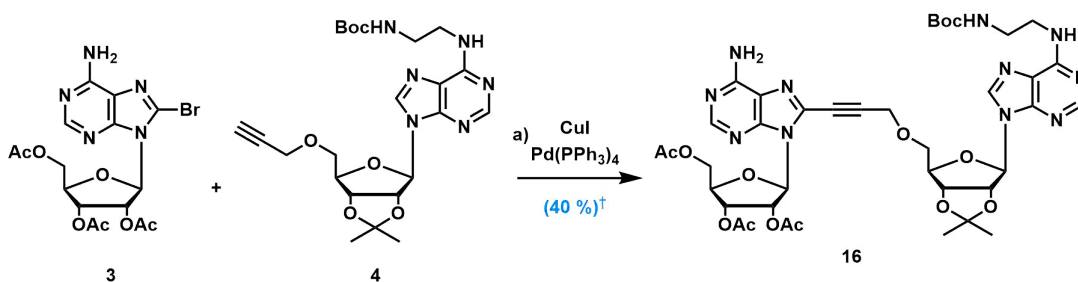


Schéma 2.15 – Couplage de Sonogashira entre les alcynes **4** ou **5** et le dérivé bromé **3** conduisant aux produits désirés **16** ou **17** ainsi que le produit d'homocouplage de l'alcyne

Dans un premier temps, nous avons préparé une solution de dérivé bromé **3**, d'un léger excès alcyne **4** (1,5 équivalents.) et de triéthylamine dans le THF (Schéma 2.16). Celle-ci a été dégazée plusieurs fois à l'argon afin d'éliminer toute trace d'air du montage. Le $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et l'iodure de cuivre ont ensuite été ajoutés avant de dégazer une seconde fois le montage à l'argon. Après cela, le milieu a été chauffé à 60 °C durant 5 heures, un suivi CCM régulier permettant d'estimer le taux d'avancement de la réaction. Une fois la totalité de l'alcyne consommé, le milieu a été concentré à sec puis purifié afin d'isoler la diadénosine **16** avec un rendement de 40 %. Ce rendement modeste s'explique par la formation du sous-produit d'homocouplage, à hauteur de 20 % dans cette expérience.



a) Dérivé bromé **3** (1,0 équiv.), alcyne **4** (1,5 équiv.), NEt_3 (3,0 équiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%), CuI (10 mol%), THF, 60 °C, 5 h, 40 %.

Schéma 2.16 – Formation de la diadénosine **16** couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **3** et l'alcyne **4**

Il est possible de faire d'autres additions d'alcyne afin de pousser la réaction et de consommer la totalité du dérivé bromé. Dans le cas de la synthèse de la diadénosine **16**, nous avons été limités par notre stock d'alcyne **4** et n'avons donc pas pu faire de second ajout. De manière générale dans ce manuscrit, les alcynes vrais synthétisés étant précieux, nous avons préféré limiter les ajouts supplémentaires conduisant parfois à des rendements

modestes. Une autre stratégie a aussi été adoptée dans laquelle nous manipulons avec un excès de dérivé bromé et un défaut d'alcyne.

Les étapes de déprotection finale de la diadénosine **16** consistent en un premier traitement basique, *via* une solution d'ammoniaque 28 %, servant à retirer les groupements acétyl (Schéma 2.17). Un second traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau) a ensuite permis de retirer le groupement isopropylidène et le groupement Boc permettant d'obtenir le composé **1** avec un rendement de 42 % après CLHP.

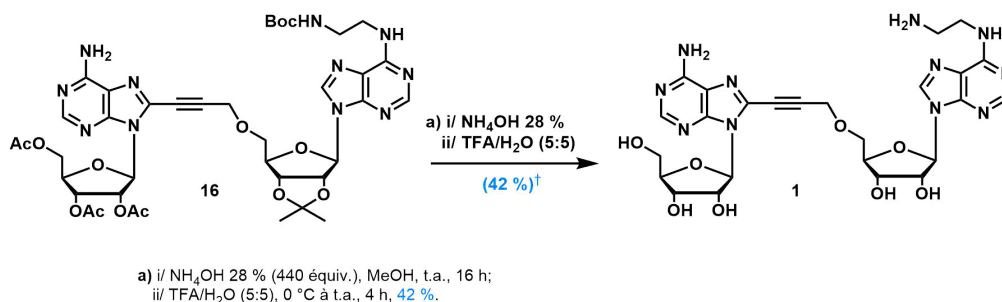


Schéma 2.17 – Déprotection de la diadénosine **16** par traitement basique puis acide

Dans un second temps, nous avons répété ces étapes de couplage de Sonogashira et déprotection dans le but de former la diadénosine **2** (Schéma 2.18). L'étape de couplage a permis d'obtenir le produit souhaité avec un rendement de 34 % ainsi que le sous-produit d'homocouplage à hauteur de 51 %. La déprotection finale a permis d'obtenir la diadénosine **2** avec un rendement de 50 % après purification CLHP.

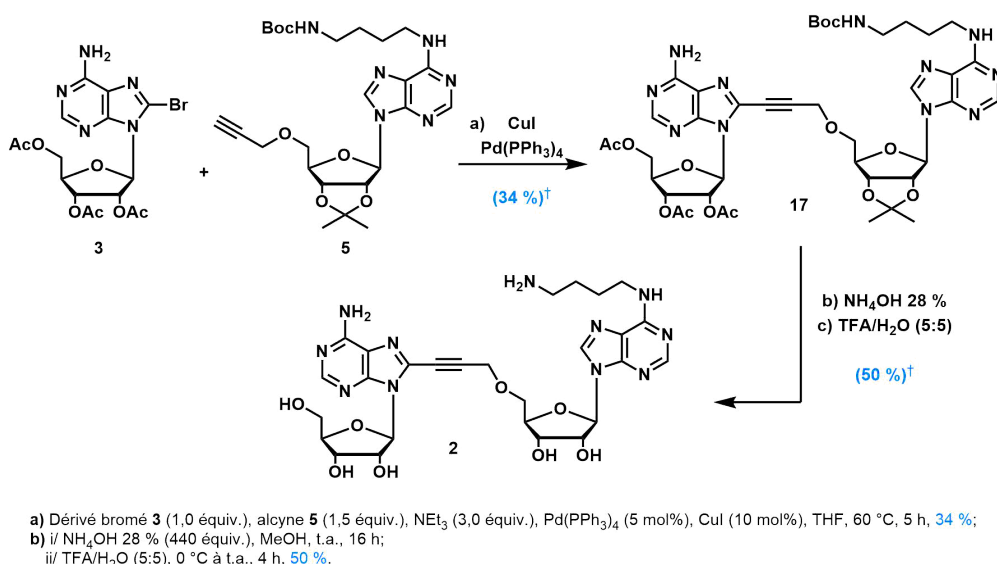


Schéma 2.18 – Formation de la diadénosine **17** par couplage de Sonogashira suivi de sa déprotection

Ces voies de synthèse ont permis l'obtention des diadénosines **1** et **2** avec un rendement global respectif de 7,2 % et 8 % en six étapes à partir de la *N*-ribosyl-6-chloropurine (**10**).

2.4 Fonctionnalisation de la position centrale

La seconde famille d'analogues sur laquelle nous avons travaillé sont des composés portant des chaînes aminoalkyles en position centrale (Schéma 2.19). Nous avons opté pour le remplacement du lien éther propargylique par un lien amine propargylique afin de créer un centre tertiaire capable de porter un groupe aminoalkyle. D'un point de vue rétrosynthétique, l'obtention de cette série repose sur un couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **3** et une adénosine portant un groupement propargylamine en position 5'.

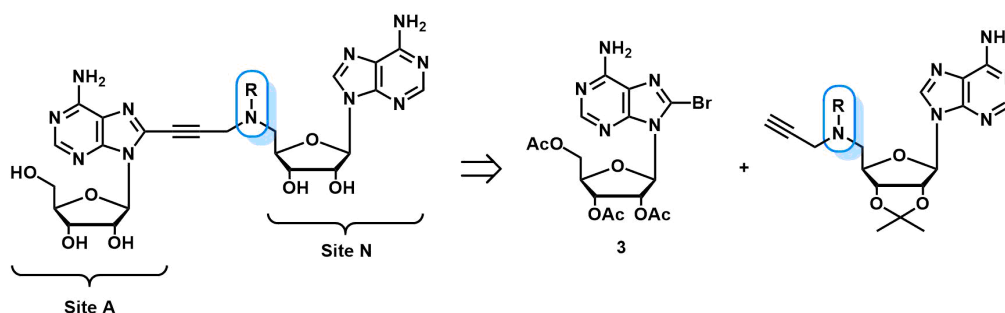


Schéma 2.19 – Rétrosynthèse envisagée des analogues modifiés en position centrale

Nous avons envisagé trois stratégies de synthèse afin d'obtenir l'amine tertiaire souhaitée (Schéma 2.20). Toutes ont comme point de départ la 2',3'-O-isopropylidène-adénosine (**19**). La première consiste en la conversion de l'alcool 5' en groupe nucléofuge (tosyle) qui est ensuite substitué par des amines primaires ou secondaires. La seconde repose sur des réactions d'aminations réductrices entre l'aldéhyde, issu de l'oxydation de l'alcool en position 5', et une amine primaire ou secondaire. Enfin, la troisième passe par l'utilisation du groupement protecteur 2-nitrobenzène sulfonamide (aussi appelé nosyle) permettant des monoalkylations successives.

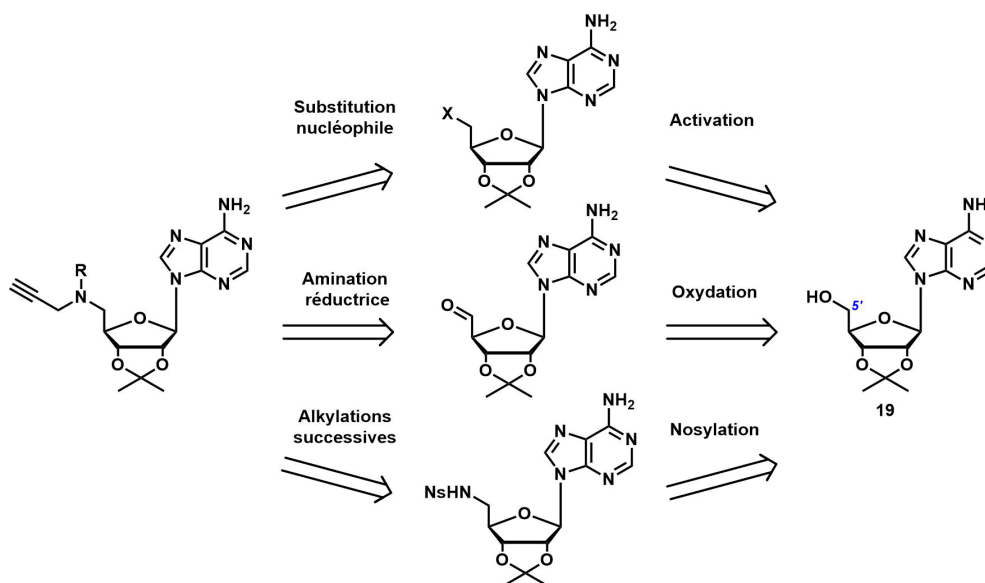
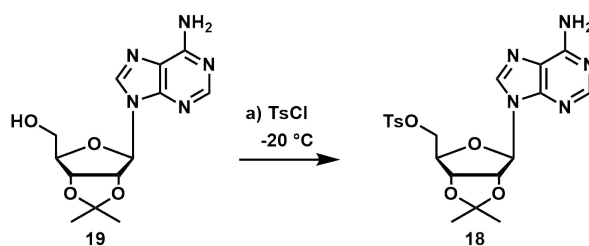


Schéma 2.20 – Résumé des trois stratégies rétrosynthétiques envisagées

2.4.1 Substitution nucléophile par déplacement de tosylo

Nous nous sommes d'abord intéressés à la tosylation de l'alcool **19** suivie de sa substitution par un nucléophile. Cette méthode est largement décrite dans la littérature afin de former des thioéthers,^{139,140} phosphates,^{141,142} azides,^{143,144} amines primaires^{145,146} (ou secondaires¹³⁹) en position 5' de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine.

La synthèse de la 5'-*O*-tosyl-2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**18**) a été réalisée selon une méthode classique en faisant réagir l'adénosine protégée **19** avec du chlorure de tosylo dans la pyridine à -20 °C (Schéma 2.21).¹⁴⁷ Cette basse température est nécessaire pour améliorer la sélectivité de la tosylation vis-à-vis de la fonction alcool primaire du composé **19**, plutôt que de son amine exocyclique. En contrepartie, la durée nécessaire à la conversion totale du nucléoside de départ est d'au moins 48 h, durée bien supérieure à celle d'une tosylation dans des conditions plus classiques. Cependant, cette méthode permet l'obtention du produit de *O*-tosylation **18** ne nécessitant qu'une extraction avant de pouvoir être réengagé dans l'étape suivante.



a) Chlorure de 4-toluènesulfonyle (1,2 équiv.), pyridine, -20 °C, 48 h;

Schéma 2.21 – Tosylation de l'alcool en position 5' du composé **19**

Dans des publications respectives, Davis¹⁴⁵ et Minnick¹⁴⁶ font réagir l'adénosine tosylée **18** en solution dans des amines primaires pures à température ambiante durant trois jours (Schéma 2.22). Ces conditions leur permettent d'obtenir l'amine secondaire, issue de la substitution nucléophile entre le groupement tosylo et le solvant employé, avec des rendements allant de 65 à 80 %.

139. Pankaskie, M. ; Abdel-Monem, M. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **1980**, *23*, 121-127.

140. Shi, G. ; Shaw, G. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 4303-4309.

141. Dixit, V. M. ; Poulter, C. D. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 4055-4058.

142. Bhattarai, S. ; Freundlieb, M. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 6248-6263.

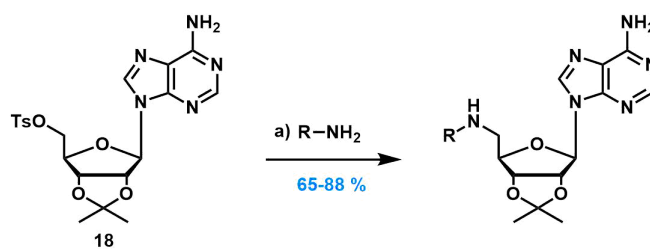
143. Stout, M. G. ; Robins, M. J. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1969**, *12*, 658-662.

144. Kvasnyuk, E. I. ; Kulak, T. I. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1995**, *78*, 1777-1784.

145. Davis, M. ; Dudman, N. P. B. *et al. Australian Journal of Chemistry* **1983**, *36*, 1623-1627.

146. Minnick, A. A. ; Kenyon, G. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 4952-4961.

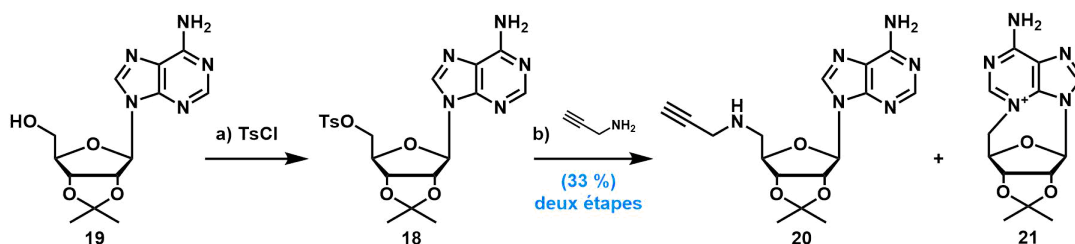
147. Sakami, W. in *Biochemical preparations, Volume 6*; J. Wiley. : 1958; chap. 8.



a) R-NH₂ (solvant), t.a., 3 j, 65-88 %

Schéma 2.22 – Préparation d'amines secondaires en position 5' selon Davis et Minnick

Inspirés de ces travaux, nous avons tenté la même approche en dissolvant l'adénosine tosylée **18** dans la propargylamine pure. Désirant accélérer la réaction, nous avons chauffé le milieu à 35 °C durant 16 heures (Schéma 2.23). Le suivi CCM de la réaction montre l'apparition de plusieurs tâches (non isolées). La purification du brut nous permet d'isoler le composé souhaité **20** avec un rendement de 33 % en deux étapes à partir du tosylo. Il est probable que le léger échauffement du milieu ai causé une réaction intramoléculaire la base purique sur la position 5' du nucléoside, formant le cyclonucléoside **21** (non isolé).



a) TsCl (1,2 équiv.), pyridine, -20 °C, 48 h;

b) Propargylamine (20 équiv.), pas de solvant, 35 °C, 16 h, 33 % (deux étapes).

Schéma 2.23 – Préparation du composé propargylé **20** à partir du produit **19**

Nous avons ensuite tenté d'alkyler l'amine secondaire **20** par réaction avec la *N*-Boc-3-bromopropylamine (**23**). Ce composé a été préalablement préparé par protection de l'amine du bromohydrate de 3-bromopropylamine (**22**) selon un protocole de la littérature (Schéma 2.24).¹⁴⁸

Nous avons mis le dérivé d'adénosine **20** en solution dans le DMF et avons ajouté 1,5 équivalents de dérivé halogéné et 3,0 équivalents de DIEA, une base organique aminée. Après 2 heures à température ambiante le suivi CL/SM indiquait un taux de conversion nul. Nous avons donc chauffé le milieu à 50 °C ce qui a permis de voir du produit apparaître. Après 16 heures supplémentaires, le taux de conversion n'étant que de 15 %, nous avons ajouté 3 équivalents de DIEA et 1,5 équivalents de dérivé bromé **23** supplémentaires. Après 7 jours à 50 °C, le taux de conversion atteint un pallier (58 %) nous conduisant

148. Donnier-Maréchal, M.; Carato, P. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *138*, 964-978.

à arrêter la réaction. Faute de stocks nous n'avons pas pu ajouter d'avantage de dérivé bromé **23**. Le traitement et la purification de la réaction ont ensuite permis d'obtenir le composé désiré **24** avec un rendement de 48 %.

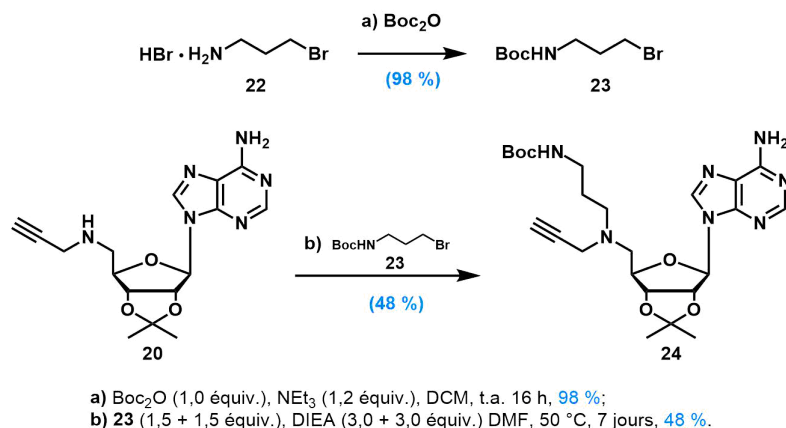
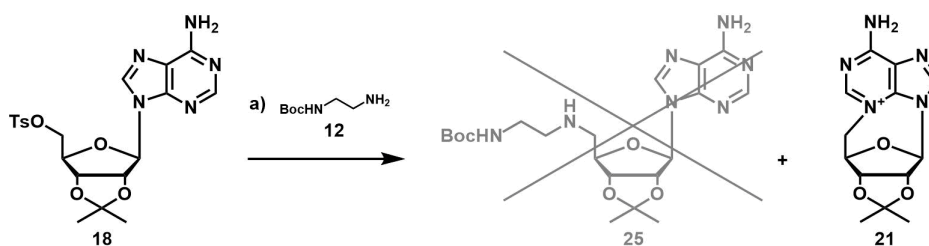


Schéma 2.24 – Obtention de **23** par protection de l'amine **22** suivi de l'alkylation de l'amine secondaire **20**

Il est ainsi possible d'obtenir l'amine tertiaire **24** avec un rendement global de 22 % en trois étapes à partir de la 2',3'-O-isopropylidène-adénosine (**19**). Les très longs temps de réaction sont la principale limitation de cette voie de synthèse. Dix jours sont en effet nécessaires pour obtenir l'intermédiaire **24** à partir du produit de départ commercial **19**.

Dans un second temps, nous avons inversé les étapes afin d'introduire la chaîne aminoalkyle en position 5' avant l'étape de propargylation. Pour ce faire, nous avons fait des réactions de substitution à partir du dérivé tosylé en position 5' **18** en utilisant la *N*-Boc-éthylènediamine **12** en tant que nucléophile (Schéma 2.25). Malheureusement, malgré l'utilisation d'un large excès d'amine **12** (20,0 équivalents), le chauffage du milieu réactionnel (de 30 °C à 100 °C) et l'utilisation de différents solvants (DMF ou THF), nous n'avons jamais réussi à former le composé souhaité **25**. En effet, dans ces conditions le cyclonucléoside **21** se forme de façon majoritaire. Celui-ci a systématiquement été identifié lors du suivi CL/SM de la réaction mais n'a jamais été isolé.



a) *N*-Boc-éthylènediamine (20,0 équiv.), DMF ou THF, 30 °C à 100 °C, 16 h, formation de **21**.

Schéma 2.25 – Tentative de formation de l'amine secondaire **25** par déplacement de tosylé.

Afin d'obtenir l'amine secondaire désirée **24** avec de meilleurs rendements et de façon plus rapide, d'autres voies de synthèse ont été explorées et sont présentées ci-après.

2.4.2 Amination réductrice

Les aminations réductrices sont une catégorie de réaction pouvant être exploitées afin d'introduire des amines en position 5' de l'adénosine. La méthode la plus classique consiste en la réaction entre un aldéhyde¹⁴⁹⁻¹⁵¹ ou une imine¹⁵² avec l'amine primaire en position 5' du composé **26** (Schéma 2.26). L'iminium généré est ensuite réduit *in situ* afin de former une amine secondaire. Les rendements décrits pour ce type de réaction sont très variables (entre 23 et 73 % pour la réaction avec l'aldéhyde et 14 et 22 % pour la réaction avec l'imine).

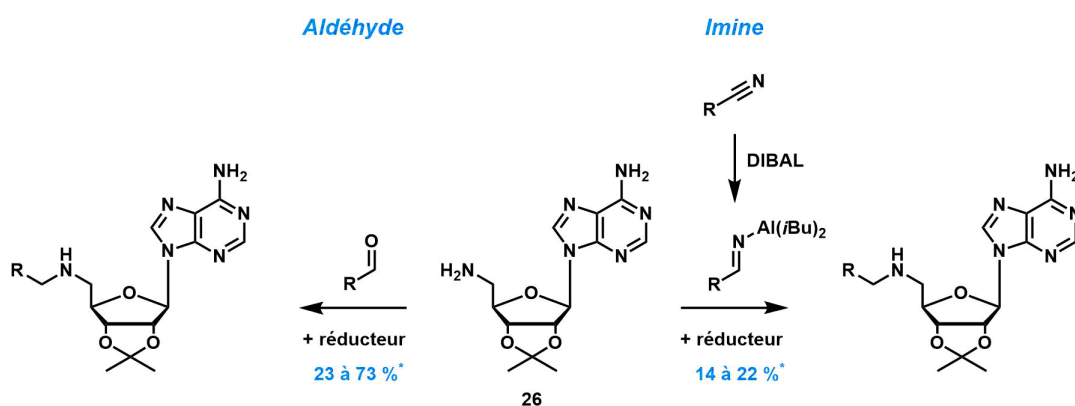


Schéma 2.26 – Amination réductrice sur une amine en position 5'

L'amine secondaire générée est ensuite convertie en amine tertiaire, soit par alkylation à l'aide d'un dérivé halogéné,^{151,152} soit par une seconde amination réductrice, avec des rendements variables compris entre 35 et 89 % (Schéma 2.27).^{149,150}

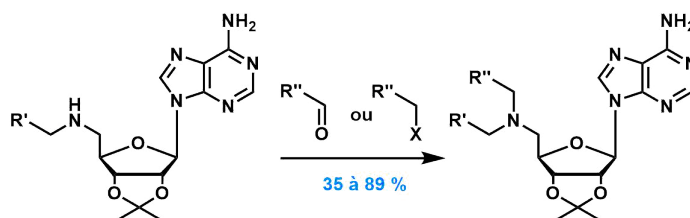


Schéma 2.27 – Addition de carbonyle ou de dérivé halogéné sur une amine en position 5'

149. Hobley, G.; McKelvie, J. C. *et al. Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22*, 3079-3082.

150. Dowden, J.; Pike, R. A. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 7814-7821.

151. Zhang, G.; Richardson, S. L. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13*, 4149-4154.

152. Mori, S.; Iwase, K. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 8158-8166.

L'application d'une "stratégie inverse", consistant en l'oxydation en aldéhyde de l'alcool 5' du composé **19** puis de l'addition d'une amine secondaire, pourrait conduire à des amines tertiaires en une seule étape (Schéma 2.28). Cette voie originale, très peu décrite dans la littérature, a été utilisée pour introduire des amines primaires aromatiques¹⁵³ ou créer des amines tertiaires par aminations réductrices successives.¹⁵⁴

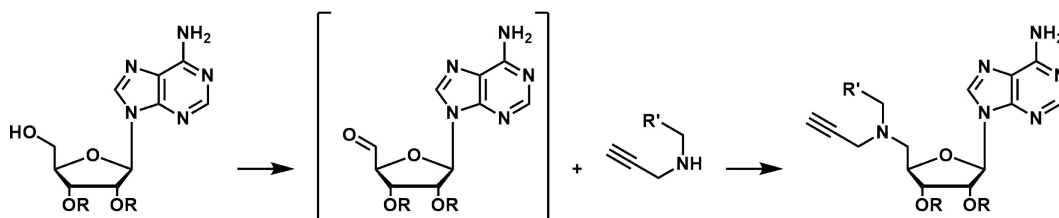
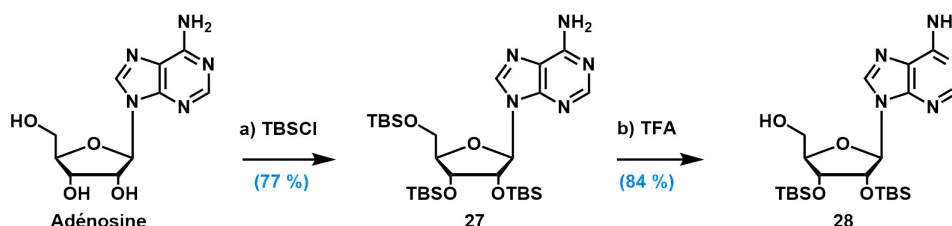


Schéma 2.28 – Oxydation de l'alcool 5' en aldéhyde suivie de l'addition d'une amine

Inspirés des travaux d'Atdjian *et al.*,¹⁵⁴ nous avons travaillé avec la 2',3'-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyladénosine (**28**). Celle-ci a été obtenue avec un rendement de 65 % en deux étapes par persilylation des fonctions alcools de l'adénosine, formant le composé **27**, suivie d'une déprotection sélective de l'alcool primaire par hydrolyse acide dans un mélange H₂O/TFA/THF (2:2:6) à 0 °C (Schéma 2.29).¹⁵⁵



a) TBSCl (4,5 équiv.), imidazole (6,0 équiv.), DMF, t.a., 48 h, 77 %;
b) TFA/H₂O/THF (2:2:6), 0 °C, 4 h, 84 %;

Schéma 2.29 – Obtention de l'adénosine protégée **28** par persilylation de l'adénosine suivie de la déprotection de l'éther silylé en position 5'

Un premier essai d'amination réductrice a ensuite été réalisé sur l'alcool primaire de l'adénosine protégée **28** (Schéma 2.30). Cette réaction commence par l'ajout de 1,2 équivalents de periodinane de Dess-Martin (DMP) à une solution de dérivé d'adénosine **28** dans le DCM.¹⁵⁴ La conversion étant incomplète après 4 heures, une seconde addition d'agent oxydant (0,6 équivalent) a été faite. Après 16 heures supplémentaires, un suivi CCM a permis d'estimer l'oxydation de l'alcool comme totale. Une filtration sur célite, suivie de l'évaporation des solvants, permet de récupérer l'aldéhyde qui est ensuite repris dans le méthanol. L'ajout d'un léger excès d'amine désirée et de quantité stoechiométrique

153. Gibbons, G.; Showalter, H. *et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2015**, 34, 348-60.

154. Atdjian, C.; Iannazzo, L. *et al. European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 4411-4425.

155. Zhu, X.-F.; Williams, H. J. *et al. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 2305-2306.

d'acide acétique et d'agent réducteur (NaBH_3CN) permet la formation de l'iminium suivi de sa réduction. Nous avons ainsi obtenu le composé souhaité **29** avec un rendement de 25 %, inférieur au rendement de la voie de synthèse passant par le déplacement d'un groupement tosyloxy (Cf. page 83).

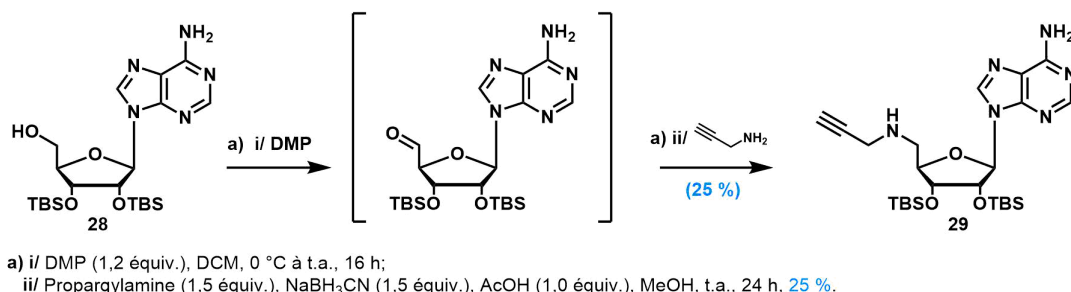


Schéma 2.30 – Silylation des alcools en position 2' et 3' de l'adénosine suivie de la formation de **29** par amination réductrice

Nous avons ensuite appliqué le même protocole réactionnel en employant une amine secondaire plutôt que la propargylamine. A cette fin, nous avons suivi des protocoles de la littérature afin de préparer l'amine secondaire **30**, produit de la monoalkylation de la propargylamine par le dérivé bromé **23** (Schéma 2.31).¹⁵⁶ Entre nos mains, le moins bon rendement obtenu (65 % contre 88 % décrit) s'explique par la formation du produit de di-alkylation **31** (à hauteur de 10 % dans notre cas).

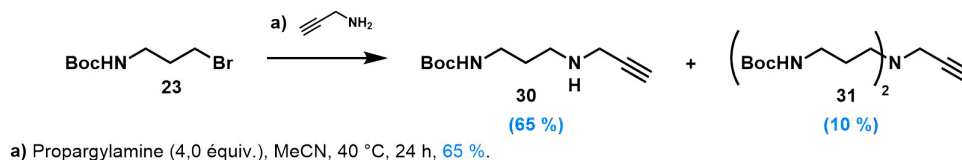
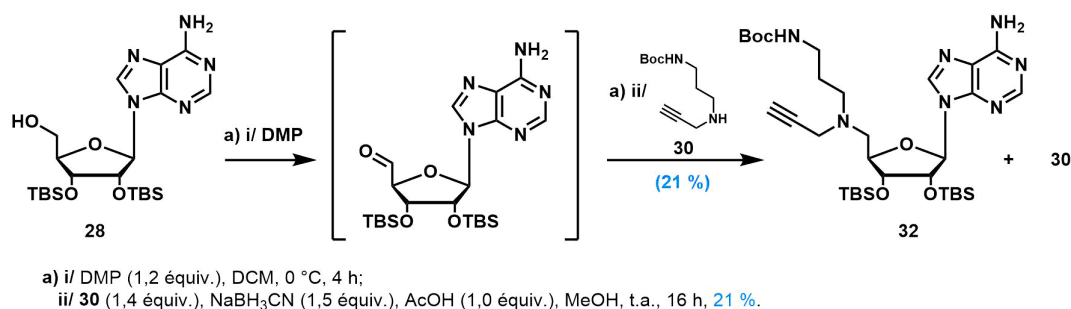


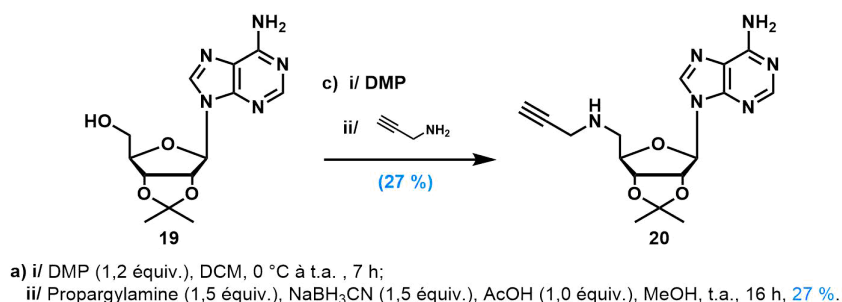
Schéma 2.31 – Préparation de l'alcyne **30** à partir du dérivé bromé **29**

La réaction d'amination réductrice a ensuite permis d'obtenir l'amine tertiaire désirée **32** contaminée par l'amine secondaire **30** (Schéma 2.32). Nous ne sommes pas parvenu à éliminer cette amine secondaire, malgré les purifications successives, et avons estimé le rendement à 21 % par analyse RMN. L'étape suivante étant le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **32** et le dérivé bromé **3**, il n'était pas envisageable d'engager ce mélange d'alcynes (**30** et **32**) dans la réaction.

156. Choi Eun, J. ; Kim, E. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53, 1346-1350.

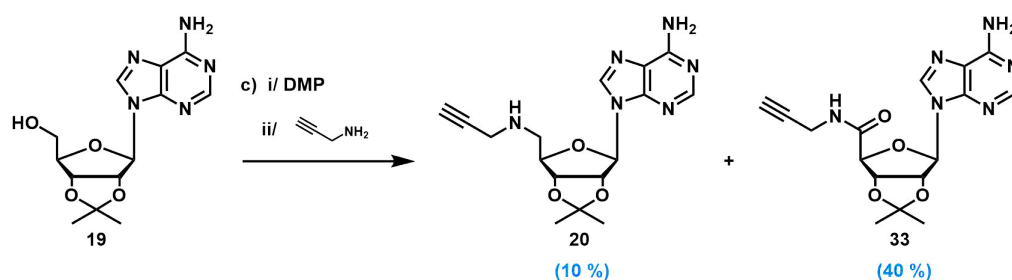
Schéma 2.32 – Essai d'amination réductrice entre l'aldéhyde issu du composé **28** et l'amine **30**

Dans l'espoir de changer la polarité du produit d'arrivée et de parvenir à séparer le produit du réactif, nous avons opté pour un groupement protecteur différent remplaçant les groupements *tert*-butyldiméthylsilyle par un groupement isopropylidène. Un premier essai d'amination réductrice a été réalisé sur l'adénosine protégée **19** en utilisant la propargylamine (Schéma 2.33). A cette occasion, nous avons remarqué que l'alcool en position 5' du nucléoside **19** s'oxydait plus lentement que celui du composé **28** (suivi par CCM). Après sept heures de réaction, malgré le taux de conversion incomplet, l'aldéhyde a été converti en iminium puis réduit, permettant d'isoler le produit désiré avec un rendement de 27 %.

Schéma 2.33 – Obtention du produit **20** à partir du composé **19**

Avant d'appliquer ces conditions avec l'amine secondaire **30**, nous avons préféré optimiser la réaction en utilisant la propargylamine comme réactif. Nous avons augmenté le nombre d'équivalents de DMP (1,8 équivalents au lieu de 1,2), l'ajoutant par portion jusqu'à l'oxydation totale de l'alcool (Schéma 2.34). Nous avons également changé d'agent réducteur pour la deuxième étape en remplaçant le NaBH₃CN par du triacétoxyborohydrure de sodium (NaBH(OAc)₃). D'après la littérature,¹⁵⁷ ce réactif moins toxique permet de se passer de l'ajout d'acide acétique lors d'une amination réductrice avec un aldéhyde. De plus, le solvant employé dans ces conditions est le 1,2-dichloroéthane (DCE) plutôt que le méthanol, un solvant moins hygroscopique. Dans ces conditions, nous avons pu isoler le produit **20** avec un faible rendement de 10 % ainsi que l'amide **33**, produit secondaire formé à hauteur de 40 %.

157. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, 3849-3862.



a) i/ DMP (1,8 équiv.), DCM, 0 °C à t.a., 5 h;
 ii/ Propargylamine (1,5 équiv.), NaBH(OAc)₃ (1,5 équiv.), DCM, t.a., 16 h, 10 %.

Schéma 2.34 – Obtention du produit secondaire **33** à partir du composé **19**

La formation de ce produit secondaire s'expliquerait par la présence de DMP résiduel de l'étape d'oxydation, habituellement détruit par le méthanol de la seconde étape. Ici, nous avons utilisés un plus grand nombre d'équivalents de Dess-Martin et avons remplacés le méthanol, solvant de la seconde étape, par du DCE. On suppose donc que l'excès de Dess-Martin oxyderait l'hémiaminal intermédiaire formé lors de la première addition de la propargylamine sur l'aldéhyde (Schéma 2.35).

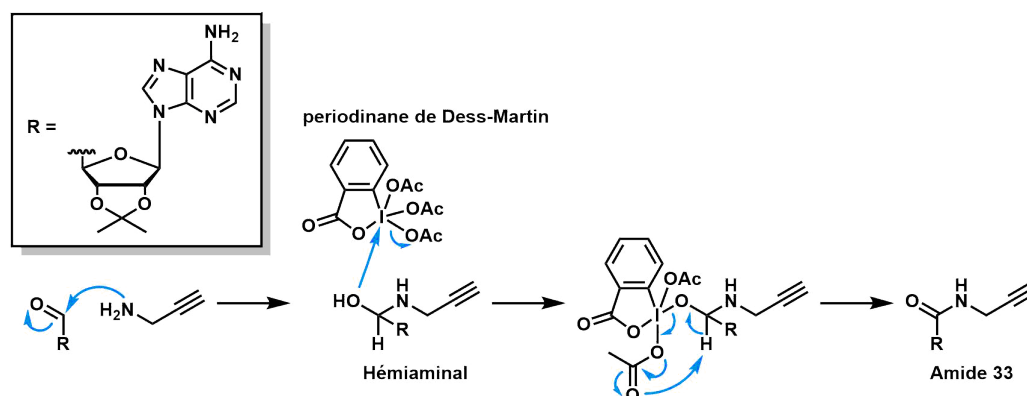


Schéma 2.35 – Mécanisme présumé de la formation de l'amide **33**

D'autres conditions ont été tentées pour améliorer le rendement en composé **20**. La quantité de DMP a été diminuée et le méthanol a été utilisé à nouveau pour la dernière étape. Malgré ces essais, nous n'avons pas été capables d'obtenir l'amine secondaire **20** avec un rendement supérieur à 27 %.

Compte tenu de ces rendements faibles que nous avons obtenus avec cette stratégie "inverse", nous n'avons envisagés une troisième approche, via la stratégie de nosylation, pour introduire un groupement aminoalkyle en position centrale.

2.4.3 Synthèse d'amine secondaire *via* la stratégie de nosylation

Développée par Fukuyama T. en 1995,^{158,159} cette stratégie dite de nosylation repose sur l'emploi du groupement 2-nitrobenzène sulfonamide pour convertir une amine primaire en sulfonamide correspondant. Ce groupement protecteur, à la fois résistant en milieu acide ou basique, permet à l'amine de conserver un pouvoir nucléophile suffisamment grand pour permettre son alkylation ultérieure par des dérivés halogénés.¹⁶⁰ Les conditions de Mitsunobu sont aussi applicables aux amines nosylées, le sulfonamide diminuant suffisamment le pKa de l'amine nosylée pour lui permettre de réagir dans ces conditions. Enfin, la déprotection de ce groupement se fait généralement *via* l'utilisation de thiophénol en conditions basiques par la formation d'un complexe de Meisenheimer (Schéma 2.36).

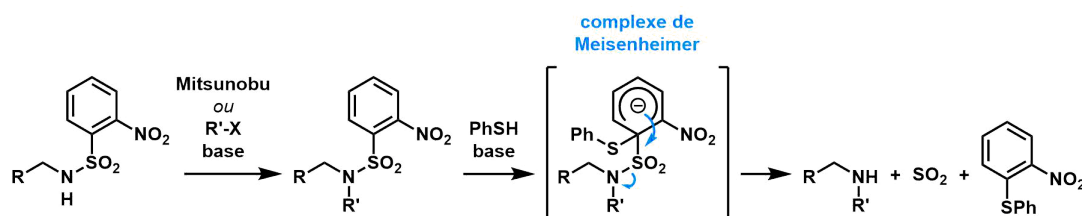


Schéma 2.36 – Utilisation et déprotection du groupement Nosyle

Cette stratégie a été appliquée en série adénosine par Halby *et al.*¹⁶¹ pour la préparation d'une amine primaire nosylée en position 5' suivie de sa mono-alkylation. Inspirés de cette stratégie, nous avons commencé par synthétiser la 5'-amino-5'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine selon la méthode de Kolb *et al.*¹⁶² (Schéma 2.37). La première étape consiste en la substitution de l'alcool en position 5' de l'adénosine protégée **19** par un groupement phtalimide dans les conditions de Mitsunobu. Cette réaction permet l'introduction du précurseur d'amine en position 5' avec un rendement de 82 %. Le groupement phtalimide du composé **34** est ensuite déprotégé par réaction avec de l'hydrate d'hydrazine à chaud conduisant à l'obtention du composé souhaité **26** avec un rendement de 90 %. Cette étape de déprotection ne nécessite pas de purification par chromatographie, une série d'extractions en condition basique (pH = 10) suffit à isoler le produit désiré pur.

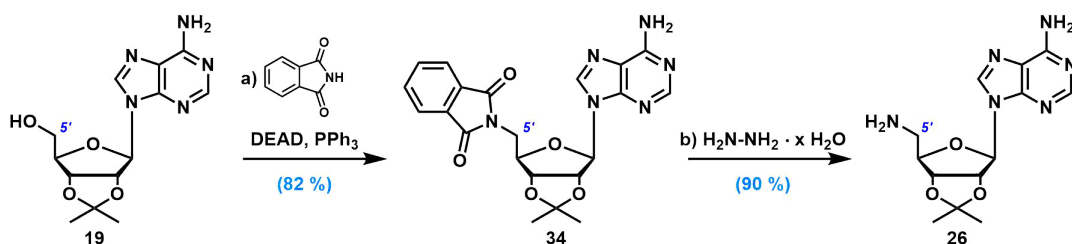
158. Fukuyama, T. ; Jow, C.-K. *et al. Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 6373-6374.

159. Kan, T. ; Fukuyama, T. *Chemical Communications* **2004**, 353-359.

160. Marvin, C. C. in *Comprehensive Organic Synthesis II (Second Edition)*, Knochel, P., éd. ; Elsevier : Amsterdam, 2014, p. 49-50.

161. Halby, L. ; Marechal, N. *et al. Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* **2018**, 373, 20170072.

162. Kolb, M. ; Danzin, C. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, 25, 550-556.



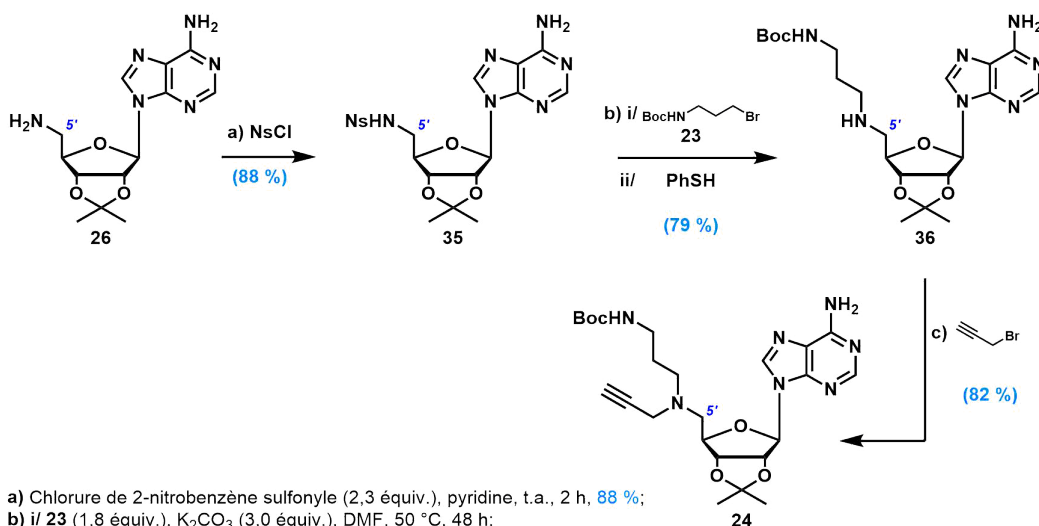
a) Phthalimide (1,03 équiv.), PPh₃ (1,0 équiv.), azodicarboxylate de diéthyle (1,0 équiv.), THF, t.a., 16 h, 82 %;
b) Hydrate d'hydrazine (16,0 équiv.), éthanol, 80 °C, 1 h, 90 %.

Schéma 2.37 – Synthèse de l'amine **26** selon la méthode de Kolb

Le groupement nosyle a ensuite été introduit sur l'amine en position 5' du composé **26** via le chlorure de sulfonyle correspondant (Schéma 2.38) permettant d'obtenir le produit de nosylation **35** avec un rendement de 88 %.

Celui-ci a par la suite été alkylé en milieu basique par réaction avec 1,8 équivalents de *N*-Boc-3-bromopropylamine (**23**). Malgré le chauffage à 50 °C, 48 h sont nécessaires pour que la conversion soit totale. En effet, cette réaction est une S_N2, sensible à l'encombrement stérique induit à la fois par la base purique et par le volumineux groupement nosyle. La déprotection du groupement sulfonamide se fait ensuite par l'ajout de thiophénol dans le milieu réactionnel. Ces conditions "one pot"¹⁶¹ permettent d'obtenir, après purification, le composé **36** avec un rendement de 79 % à partir de l'amine nosylée **35**.

Enfin, l'amine secondaire du composé **36** a été propargylée par réaction avec un excès de bromure de propargyle conduisant à l'amine tertiaire **24** avec un rendement de 82 % (Schéma 2.38).



a) Chlorure de 2-nitrobenzène sulfonyle (2,3 équiv.), pyridine, t.a., 2 h, 88 %;
b) i/ **23** (1,8 équiv.), K₂CO₃ (3,0 équiv.), DMF, 50 °C, 48 h;
ii/ PhSH (2,0 équiv.), DMF, t.a., 18 h, 79 %;
c) Bromure de propargyle (80 % dans le toluène, 5,5 équiv.), DIEA (6,0 équiv.), DMF, t.a., 2 h, 82 %.

Schéma 2.38 – Application de la stratégie nosyle à la synthèse de l'alcyne **24**

La stratégie nosyle, bien qu'efficace, possède quelques inconvénients. Premièrement, elle requiert cinq étapes de synthèse à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**19**) là où le déplacement de tosyloxy en nécessite deux et l'amination réductrice qu'une seule. Deuxièmement, celle-ci emploie des réactifs déplaisants à manipuler tels que l'hydrazine (toxique et explosive) ou le thiophénol (malodorant). Cependant, elle permet d'obtenir avec des produits purs avec de bons rendements globaux (39 % en cinq étapes).

Une fois l'alcyne **24** obtenu, il a été engagé dans un couplage de Sonogashira avec le dérivé bromé **3** (Schéma 2.39) dans les mêmes conditions que précédemment décrites. Nous avons ainsi obtenus la diadénosine **37** avec un rendement de 63 % ainsi que le produit d'homocouplage de l'alcyne à hauteur de 26 % de l'alcyne engagé. Les groupements protecteurs ont ensuite été retirés par traitement à l'ammoniaque 28 % suivi d'un traitement acide avec un mélange H₂O/TFA (5:5) permettant d'obtenir la diadénosine déprotégée **38** avec un rendement de 61 % après purification CLHP.

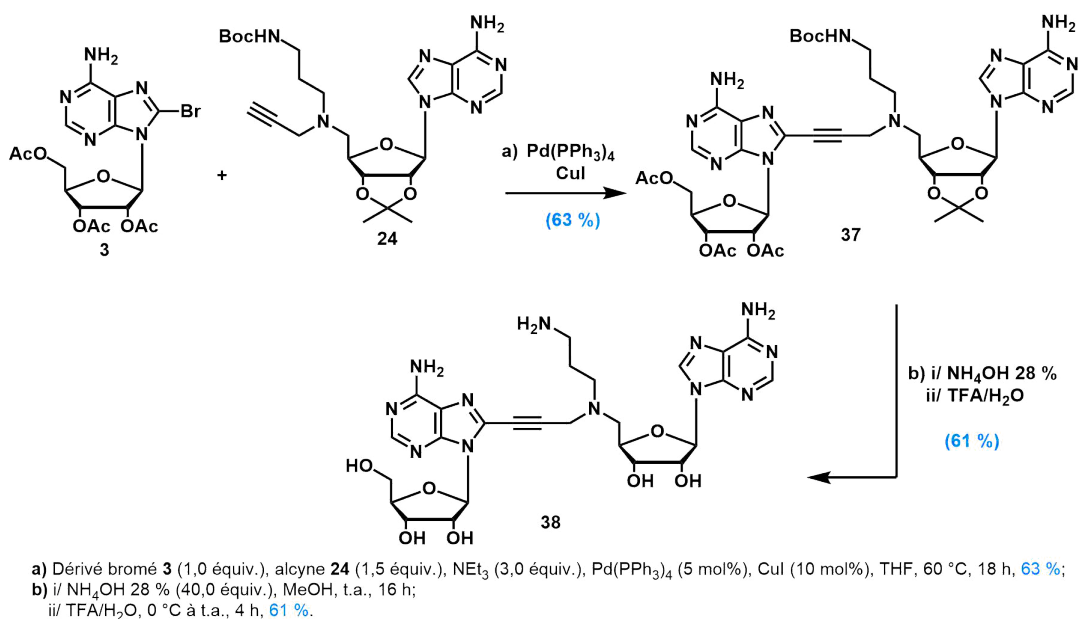


Schéma 2.39 – Couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **3** et l'alcyne **24** suivi de la déprotection de la diadénosine formée

Cette voie de synthèse a permis l'obtention de la diadénosine **38** avec un rendement global de 16 % en sept étapes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine **19**.

2.5 Fonctionnalisation en position 5' de l'adénosine du site A

La troisième position sur laquelle nous avons travaillé est la position 5' de l'adénosine du site A. A l'instar des diadénosines précédemment décrites, l'étape clef de ces synthèses repose sur un couplage de Sonogashira, cette fois-ci entre le composé propargylé **39** et différents dérivés de la 8-bromo-adénosine portant des chaînes aminoalkyles en position 5' (Schéma 2.40).

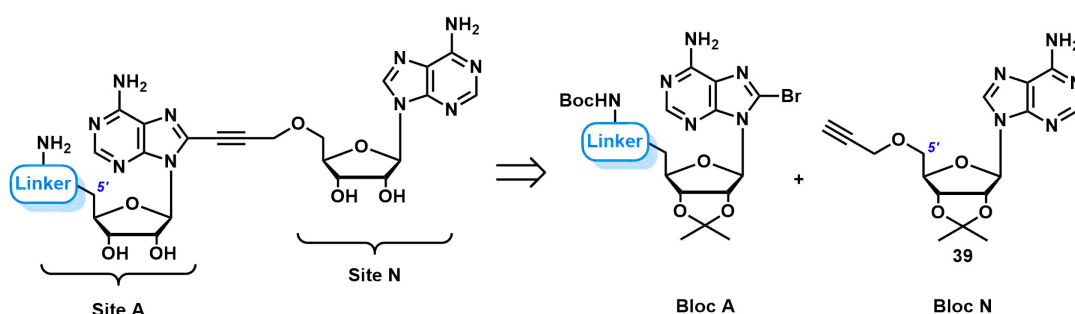
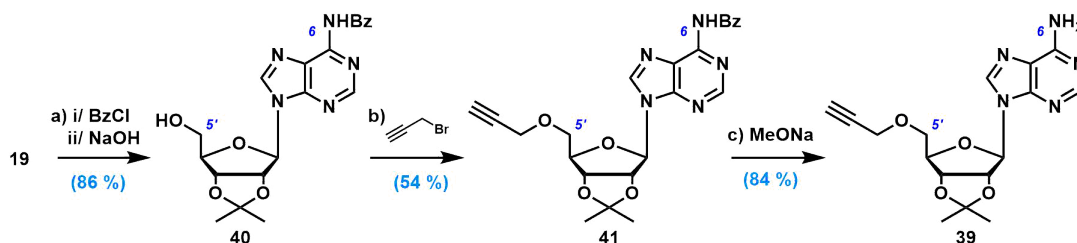


Schéma 2.40 – Rétrosynthèse envisagée des analogues modifiés en position 5' du site A

Au laboratoire, l'obtention du composé **39** se fait selon une synthèse en quatre étapes à partir de l'adénosine protégée **19** (Schéma 2.41).⁸⁷ La première consiste en la préparation du composé monobenzoylé **40** par perbenzoylation de **19** suivie d'une déprotection basique (NaOH 1 M) des groupements les plus labiles permettant d'obtenir le composé **40** avec un rendement de 86 %. Cette protection est nécessaire afin d'éviter la propargylation de l'amine exocyclique à l'étape suivante. L'alcool en position 5' du composé **40** est ensuite déprotoné *via* un traitement par l'hydruire de sodium, puis propargylé par l'ajout de bromure de propargyle. Ces conditions réactionnelles permettent l'obtention du composé **41** avec un rendement de 54 %. Le groupement benzoyle en N⁶ de la base purique est ensuite éliminé *via* l'utilisation de méthanolate de sodium, permettant d'obtenir le dérivé propargylé **39** avec un rendement de 84 %.



- a) i/ Chlorure de benzoyle (5,0 équiv.), pyridine, 0 °C à t.a., 2 h,
 ii/ NaOH 1 M (4,5 équiv.), pyridine, t.a., 30 min, **86 %**;
 b) NaH (4,4 équiv.), bromure de propargyle (80 % dans le toluène, 2,5 équiv.), DMF, 0 °C, 18 h, **54 %**;
 c) MeONa 4,4 M (2,2 équiv.), MeOH, t.a., 5 h, **84 %**.

Schéma 2.41 – Synthèse du dérivé propargylé **39** à partir du composé **19**.

Pour introduire une chaîne aminoalkyle en position 5' du bloc A, il serait possible de convertir la fonction alcool primaire du composé **19** en éther ou ester. Cependant, comme l'illustre la synthèse du composé **39** (Schéma 2.41) ainsi que la préparation des composés **1** et **2** (Cf. page 80), la formation d'éther à cette position est délicate compte tenu de la compétition entre l'alcool en position 5' et l'amine exocyclique de la purine. Concernant les esters, ceux-ci n'ont pas une très bonne stabilité chimique et métabolique, notamment vis-à-vis d'estérases tendant à les dégrader.¹⁶³ Par conséquent, nous avons préféré travailler à partir de l'amine en position 5' du composé **26** afin de créer des fonctions amide et sulfonamide, plus robustes et plus faciles d'accès (Schéma 2.42).

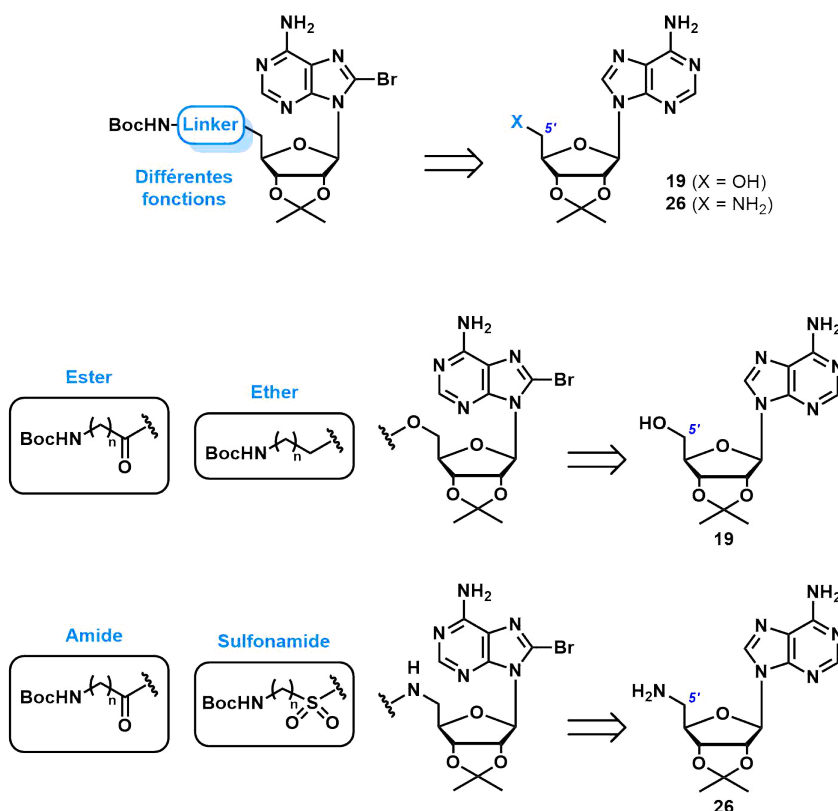


Schéma 2.42 – Fonctions envisagées en vue de l'introduction d'une chaîne aminoalkyle

2.5.1 Préparation d'amides en position 5'

Plusieurs méthodes existent pour synthétiser des amides, une des plus courantes repose sur un couplage de type "peptidique" entre une amine et un acide carboxylique. Au cours de ce type de réaction, l'acide carboxylique est activé afin de pouvoir subir une substitution nucléophile de l'amine désirée. Parmi les activateurs les plus courants, on retrouve les carbodiimides utilisés seuls (comme que le DCC),¹⁶⁴ ou en présence d'un

163. Ren, L.; Lin, Z. *et al. Applied Microbiology and Biotechnology* **2018**, *102*, 1085-1096.

164. Manfredini, S.; Solaroli, N. *et al. Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2003**, *14*, 183-194.

additif (DIC avec HOBt),⁹⁴ les sels de phosphoniums (comme le PyBOP)^{101,165}, ou bien les sels d'uronium commerciaux tel que l'HBTU.¹⁶⁶ Au laboratoire, nous avons privilégié l'emploi de PyBOP, un sel de phosphonium commercial, donnant de bons rendements sur petite échelle.^{101,106}

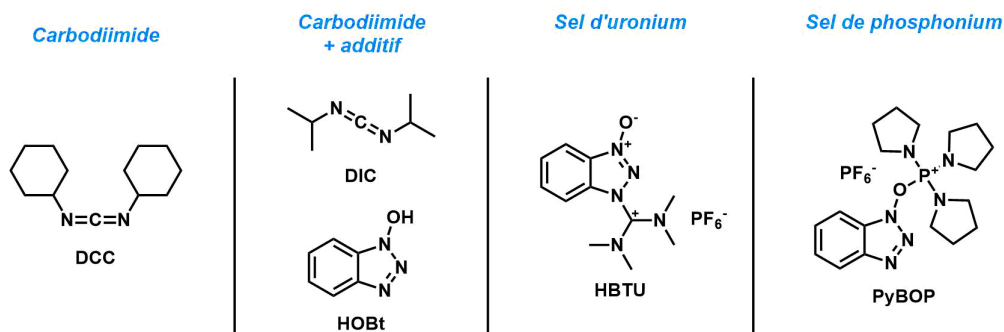
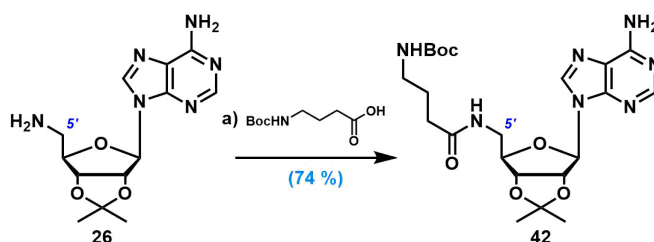


Figure 2.2 – Réactifs habituellement utilisés pour les couplages de type peptidique

En premier lieu, l'amide est formé par activation en conditions basiques de l'acide γ -*N*-Boc-aminobutyrique commercial *via* le PyBOP, suivie d'une substitution nucléophile par l'amine primaire en position 5' du composé **26**. Cette réaction permet l'obtention de l'amide **42** avec un rendement de 74 % (Schéma 2.43).



a) Acide γ -*N*-Boc-aminobutyrique (1,0 équiv.), PyBOP (1,0 équiv.), DIEA (2,0 équiv.), DMF, t.a., 1 h, 74 %.

Schéma 2.43 – Synthèse de l'amide **42** par couplage peptidique entre **26** et l'acide γ -*N*-Boc-aminobutyrique

Deux protocoles ont ensuite été tentés afin d'introduire un brome en position 8 de l'adénosine. Dans un premier temps, le composé **42** a été traité avec du *N*-bromo-succinimide (NBS)¹⁶⁷, une source d'ions bromonium (Schéma 2.44). Malgré les 4,5 équivalents de réactif ajoutés, le taux de conversion de **42** en **43** n'a pas été total, nous permettant d'isoler le produit souhaité qu'avec un rendement de 31 %.

Dans un second temps, la bromation de la position 8 du composé **42** a été faite *via* l'utilisation d'un léger excès de dibrome dans un mélange de 1,4-dioxane et de tampon

165. Joce, C.; White, R. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 278-284.

166. Zhang, Y.; Jumppanen, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 1588-1597.

167. Srivastava, P. C.; Nagpal, K. L. *Experientia* **1970**, *26*, 220-220.

acétate 0,5 M à un pH de 5,3 (Schéma 2.44).¹⁶⁸ Le maintien du pH est crucial pour éviter que l'acide bromhydrique généré ne provoque une dépurination du ribose ou la perte du groupement isopropylidène. La réaction s'est révélée être totale en quatre heures permettant l'obtention du produit souhaité **43** avec un rendement légèrement inférieur à la littérature (69 % contre 79 à 99 % décrit pour des dérivés d'adénosine).^{168,169}

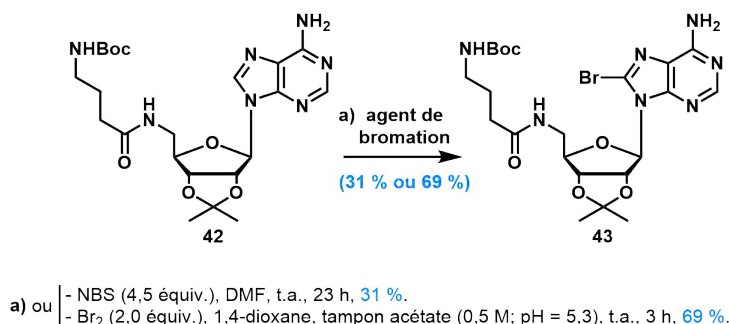


Schéma 2.44 – Bromation de la base purique du composé **42**.

La diadénosine **44** est ensuite formée avec un rendement de 25 % par couplage de Sonogashira entre l'alcyne **39** et le dérivé bromé **43** (Schéma 2.45). Le faible rendement de cette réaction s'explique par la formation du produit d'homocouplage de l'alcyne (44 %). Le traitement acide de **44** avec une solution de TFA (50 % dans l'eau) permet ensuite d'éliminer les groupements protecteurs en une étape conduisant à l'obtention du composé **45** avec un rendement de 45 % après purification CLHP.

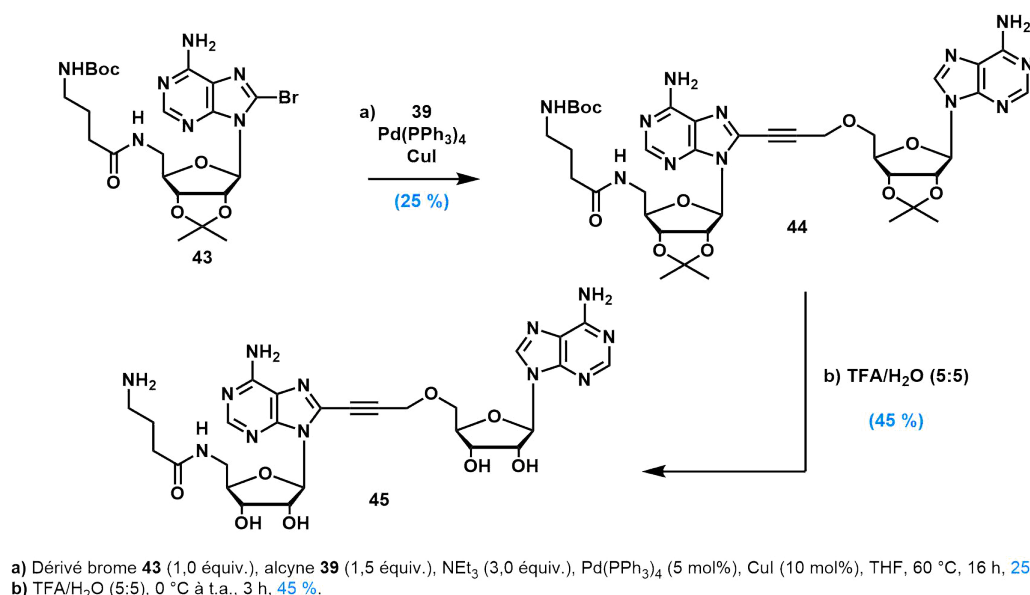


Schéma 2.45 – Couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **43** et l'alcyne **39** suivi de la déprotection de la diadénosine formée.

168. Comstock, L. R. ; Rajski, S. R. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 1425-1428.

169. Moreau, C. ; Kirchberger, T. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 10079-10102.

2.5.2 Préparation de sulfonamides en position 5'

Concernant l'obtention de sulfonamides, une des méthodes la plus décrite dans la littérature consiste en la réaction entre une 5'-amino-adénosine protégée et un chlorure de sulfonyle.¹⁷⁰⁻¹⁷²

Dans notre cas, nous avons choisi d'appliquer cette stratégie en faisant réagir l'amine en position 5' du composé **48** avec le chlorure de 2-phthalimido-éthanesulfonyl commercial (Schéma 2.46). Le couplage de Sonogashira du composé **47** obtenu avec l'alcyne **39**, suivi de la déprotection des groupements isopropylidène et phthalimide, conduirait à l'obtention du composé souhaité **46**.

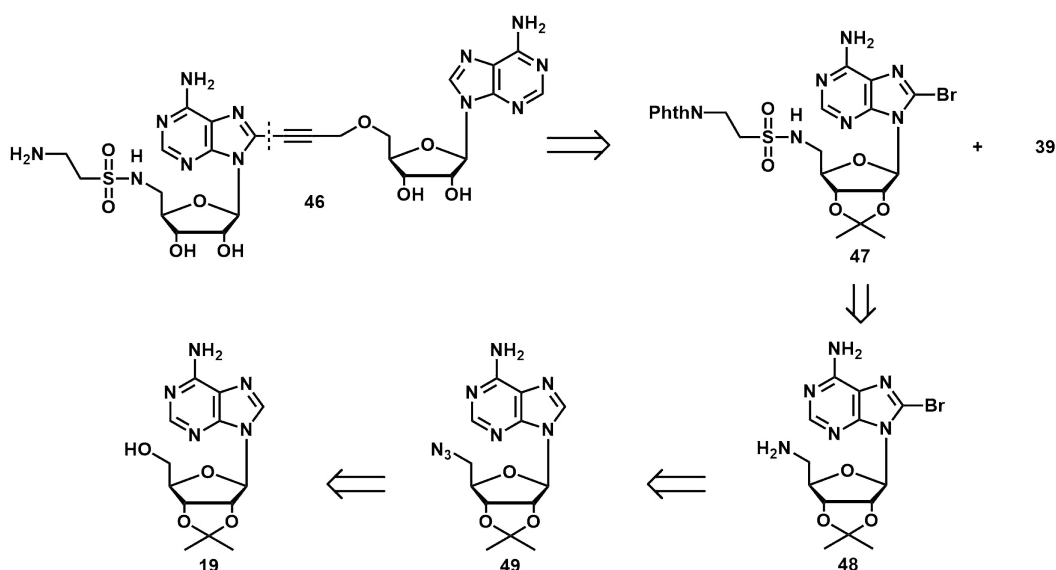


Schéma 2.46 – Rétrosynthèse envisagée de la diadénosine **46**.

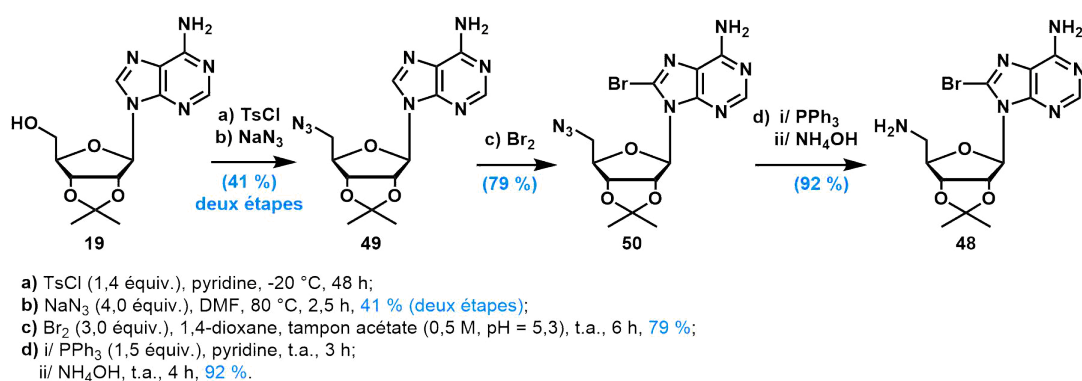
La méthode habituellement suivie pour obtenir le dérivé bromé **48** est une synthèse en quatre étapes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**19**) (Schéma 2.47).¹⁰¹ La première consiste en la tosylation de son alcool en position 5' suivie de son déplacement à chaud par un anion azoture pour obtenir le composé **49**. Le modeste rendement de cette réaction (41 % en deux étapes) a pour cause la formation bien documentée du cyclonucléoside **21** dans les conditions de substitution.¹⁷³ La bromation de la position 8 de la base est ensuite faite *via* l'utilisation de dibrome en milieu tamponné permettant d'isoler le produit **50** avec un rendement de 79 %. Enfin, l'azide **49** est converti en amine par réduction de Staudinger pour obtenir **48** avec un excellent rendement de 92 %.¹⁰¹

170. Homma, H.; Watanabe, Y. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35*, 2881-2890.

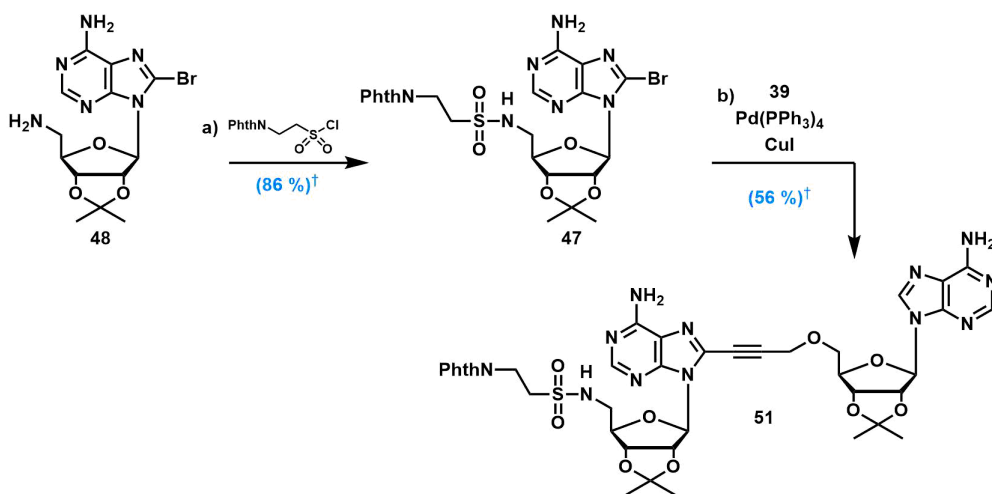
171. Qiao, C.; Wilson, D. J. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6350-6351.

172. Moukha-chafiq, O.; Reynolds, R. C. *ACS Combinatorial Science* **2013**, *15*, 147-152.

173. Mieczkowski, A.; Roy, V. *et al. Chemical Reviews* **2010**, *110*, 1828-1856.

Schéma 2.47 – Synthèse du composé **48** selon la méthode classique du laboratoire.

La réaction entre l'amine primaire en position 5' du composé **48** et le chlorure de 2-phthalimido-éthanesulfonyl a permis d'obtenir le dérivé *N*-sulfamidé **47** avec un rendement de 86 %. Le couplage de Sonogashira entre celui-ci et l'alcyne **39** a ensuite permis l'obtention de la diadénosine protégée **51** avec un rendement de 56 % (Schéma 2.48). Il est à noter qu'une partie de l'alcyne (25 %) a été consommée, formant le produit secondaire d'homocouplage.

Schéma 2.48 – Préparation du sulfonamide **47** suivie d'un couplage de Sonogashira avec l'alcyne **39** pour obtenir la diadénosine **51**

Les premières tentatives de déprotection du phthalimide **51** ont été réalisées selon les conditions usuelles de la littérature par traitement à température ambiante avec un excès d'hydrate d'hydrazine (10 équivalents) afin de libérer une amine primaire (Schéma 2.49).¹⁴¹ Cependant une mono addition de l'hydrazine au niveau de l'alcyne a conduit à la formation exclusive d'un produit non désiré (non isolé, les essais ont été suivis par analyse CL/SM). Ce type d'addition a été décrite entre des 1,3-diynes et

l'hydrazine mais nécessite habituellement une température élevée (60-180 °C).^{174,175} Il est cependant probable que, dans notre cas, l'alcyne accepteur soit suffisamment électrophile pour permettre cette addition. La diminution de la quantité d'hydrazine, en passant de 10 équivalents à 2 équivalents, n'a pas permis d'empêcher ce phénomène conduisant, au mieux, à une ouverture incomplète du groupement protecteur (Schéma 2.49).

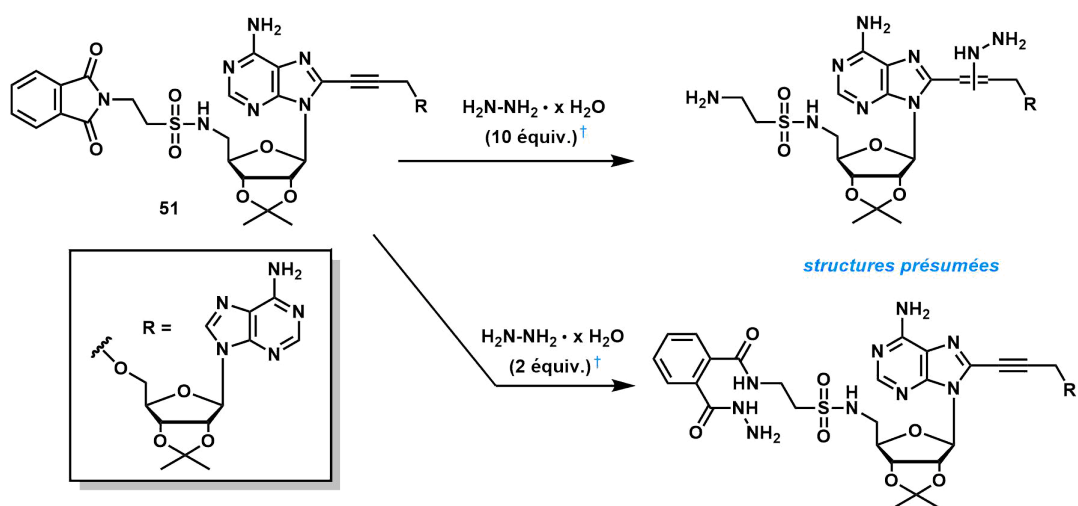


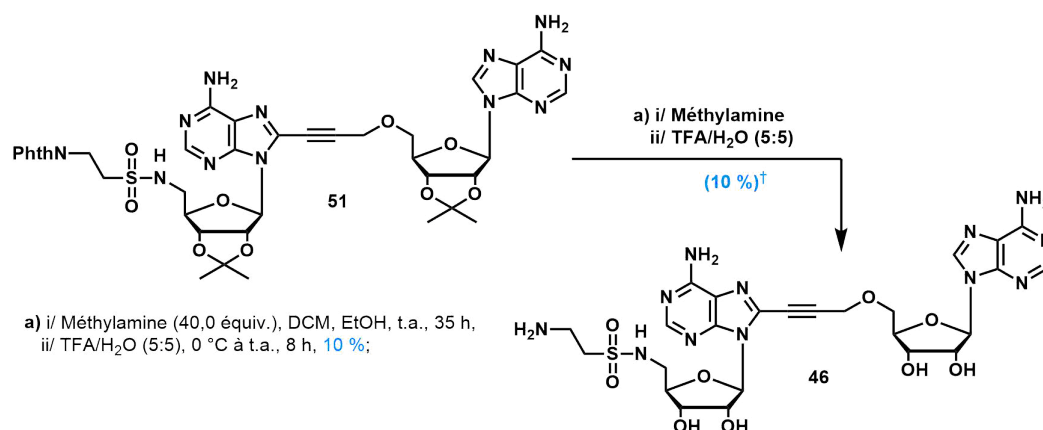
Schéma 2.49 – Premières tentatives de déprotection du phthalimide du composé **51**

Dans leurs travaux sur la cathécol-*O*-méthyltrasferase, Lerner *et al.*¹⁷⁶ ont synthétisé des analogues d'adénosines portant en position 5' une chaîne propylène se terminant par un phthalimide. Ils décrivent l'utilisation de méthylamine à 33 % dans l'éthanol comme solvant de réaction afin de déprotéger le groupement phthalimide, l'hydrazine conduisant à de moins bons rendements. Inspirés de ces travaux, nous avons adapté ce mode opératoire en utilisant 20 équivalents de méthylamine (Schéma 2.50). Ces conditions conduisent uniquement à la formation du produit d'ouverture partielle du phthalimide. Les quantités de méthylamine ont donc été doublées, passant de 20 équivalents à 40. Après 35 heures de réaction, une analyse CL/SM indique la consommation totale du produit de départ ainsi que la formation du produit désiré et de nombreux sous-produits (dont le produit d'addition de la méthylamine sur l'alcyne). Le brut a ensuite été concentré à sec avant d'être traité en milieu acide avec un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (5:5) afin d'hydrolyser les groupements isopropylidène. Ces conditions ont permis l'obtention du produit désiré **46** avec un rendement de 10 % après purification CLHP.

174. Beauchemin, A. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, 11, 7039-7050.

175. Wang, L. ; Yu, X. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 1693-1698.

176. Lerner, C. ; Masjost, B. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 42-49.

Schéma 2.50 – Seconde condition de déprotection de la diadénosine **51**

Ces stratégies de synthèse ont permis l'obtention des diadénosines **45** et **46** avec un rendement global respectif de 4,2 % en six étapes et 1,4 % en sept étapes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine **19**.

2.6 Sélection des candidats à greffer sur support solide

Les cinq dérivés de **NKI-1** ainsi synthétisés ont été évalués par nos collaborateurs afin de sélectionner les meilleurs candidats à greffer sur support solide. Cette sélection repose sur deux critères principaux, une conservation du pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la cible et une structure favorable.

2.6.1 Mesure de constante d'inhibition

Premièrement, l'affinité de la molécule testée vis-à-vis de la cible doit être conservée. Ce paramètre s'évalue par détermination de la constante d'inhibition (K_i) du composé pour la NADK modèle (ici *Lm*NADK). De manière générale, un faible K_i traduit un bon pouvoir inhibiteur d'une molécule pour une enzyme. Cette valeur est déterminée par une série d'expériences de cinétique enzymatique au cours desquelles l'évolution de la concentration en produit de réaction est mesurée en fonction du temps. Cette évolution est déterminée par mesure d'absorption à une longueur d'onde donnée en appliquant la loi de Beer-Lambert.

Le NAD⁺, substrat de la NAD kinase, et le NADP⁺, produit de la réaction, ont un spectre d'absorption similaire rendant la détermination de la concentration en NADP⁺ impossible par cette mesure (Schéma 2.51, spectres d'absorption). Ce problème est contourné par couplage de l'activité de la NADK à l'activité d'une autre enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, Schéma 2.51, réactions enzymatiques couplées). L'activité catalytique de celle-ci conduit à la conversion de NADP⁺ en NADPH, cofacteur ayant un spectre d'absorption différent. La vitesse de la réaction catalysée

par la G6PDH étant largement supérieure à celle catalysée par la NADK il est possible d'assimiler la quantité de NADPH du milieu à celle du NAD^+ consommé.

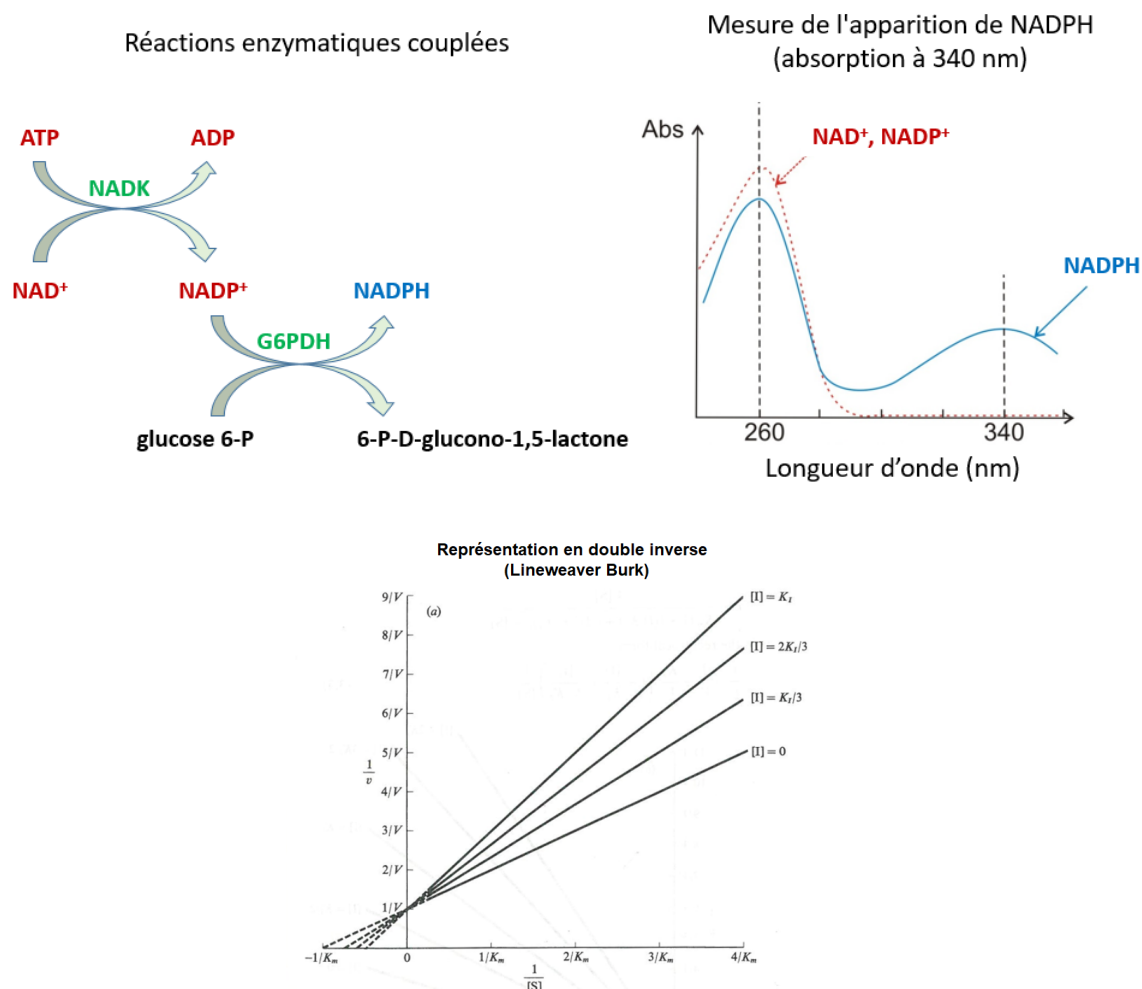


Schéma 2.51 – Principe du système enzymatique couplé à la G6PDH

L'évolution de la concentration de produit, dans notre cas le NADPH, en fonction du temps est déterminée à plusieurs concentrations de substrat (NAD^+) et d'inhibiteur. Ces données permettent le tracé de courbes (représentation de Lineweaver-Burk) dont la lecture graphique permet la détermination plusieurs paramètres cinétiques de l'enzyme. Ainsi, en l'absence d'inhibiteur la constante catalytique ($k_{cat.}$) et la constante de Michaelis (K_m) de la NADK peuvent être déterminées. Ces deux paramètres sont ensuite utilisés dans l'interprétation des courbes tracées à concentration donnée d'inhibiteur permettant de mesurer le K_i de celui-ci. L'ensemble des expériences de détermination de K_i des composés synthétisés ont été réalisées par l'équipe du Dr. Corinne Lionne au Centre de Biologie Structurale (CBS) de Montpellier.

2.6.2 Etudes cristallographiques par diffraction aux rayons X

Deuxièmement, il est nécessaire de vérifier l'influence du bras aminoalkyle introduit sur le positionnement de l'analogue au sein du site NAD^+ de l'enzyme modèle (*LmNADK*). Dans ce but, des expériences de cristallographie ont été réalisées afin de vérifier que la modification apportée n'est pas impliquée dans des interactions protéine/ligand et qu'elle pointe vers l'extérieur du site NAD^+ .

Afin de réaliser ces analyses il est nécessaire d'avoir des cristaux de la protéine souhaitée. Pour ce faire, 1 μL d'une solution de protéine pure (9 mg/mL dans l'eau) est mélangé avec 1 μL de tampon salin (30 mM NaBr, 220 mM citrate de potassium, glycérol 6 %, polyéthylène glycol 400 15 %, pH 5,0). Ce mélange forme une goutte dite "de cristallogénèse" qui est ensuite suspendue au-dessus d'un réservoir de tampon salin (500 μL , même tampon sans protéine).

S'en suit une période où un équilibre se forme entre la goutte et le réservoir permettant un échange de solvant par voie gazeuse provoquant un appauvrissement en eau de la goutte de cristallogénèse. La concentration en protéine de la goutte augmente donc conduisant à une phase de nucléation puis de croissance des cristaux. Ces conditions permettent, en général, l'obtention de cristaux de protéine en un laps de temps varié (un jour à plusieurs semaines).

Dans le cas de *LmNADK*, ces conditions ne sont pas suffisantes, il est nécessaire d'ajouter une petite molécule, la 5'-désoxy-5'-méthylthio-adénosine (MTA), dans la goutte de cristallogénèse afin que la protéine forme des cristaux. Cette étape, dite de co-cristallisation, permet l'obtention de cristaux de *LmNADK* en un à sept jours.

Les cristaux formés sont ensuite prélevés de la goutte de cristallogénèse et sont transférés dans une seconde goutte de tampon salin dite "de cristallisation". Celle-ci est à concentration 10 mM de l'inhibiteur à évaluer et permet un déplacement doux du MTA par celui-ci. Cette étape dure 5 à 20 minutes, après quoi les cristaux sont congelés dans l'azote liquide. Ils sont ensuite soumis à des expériences de diffraction aux rayons X sur synchrotron permettant d'obtenir des données correspondantes aux densités électroniques des cristaux. Celles-ci sont affinées puis visualisées par modélisation informatique permettant l'obtention d'images du composé souhaité dans le cristal.

Les données produites par ce type d'analyses ne sont pas le reflet exact de la structure *in vivo* du ligand dans la protéine. Néanmoins, elles permettent de se faire une idée des interactions clés entre le composé testé et certains acides aminés de la protéine étudiée. L'ensemble des expériences de cristallographie des composés synthétisés a été réalisé par Dr. Gilles Labesse et Dr. Muriel Gelin au Centre de Biologie Structurale (CBS) de Montpellier.

2.6.3 Évaluation des composés modifiés en N^6

Les modifications en position N^6 du site N conduisent à une forte diminution du pouvoir inhibiteur des diadénosines **1** (K_i de $347 \pm 122 \mu\text{M}$) et **2** (K_i de $52 \pm 6 \mu\text{M}$) en comparaison à **NKI-1** (K_i de $17,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$, Figure 2.3).

Alors que le composé **2** n'a malheureusement pas conduit à la formation de complexe cristal/ligand, la diadénosine **1** a pu co-cristalliser dans le site NAD de *Lm*NADK conduisant à un cristal pouvant être étudié (Figure 2.3, diadénosine). Les données cristallographiques indiquent une rotation de l'adénine N^6 -alkylée dans le site actif de l'enzyme passant d'une conformation *syn* (dans le cas de **NKI-1**) à une conformation *anti*. Ce retournement de l'adénosine a peu d'impact sur l'empilement entre la tyrosine 163 et le noyau imidazole de l'adénine. Cependant, les interactions de Van der Waals entre la chaîne et les résidus voisins empêchent la formation de liaisons hydrogène entre l'azote N^6 et l'asparagine 150.¹⁰⁶ Cette orientation de la purine dans le site N explique la diminution de l'affinité des ligands N^6 -alkylés pour leur cible se traduisant par des K_i plus élevés.

L'ensemble de ces données nous a conduit à écarter les candidats N^6 -alkylés dans le processus de sélection de molécules à greffer sur support solide.

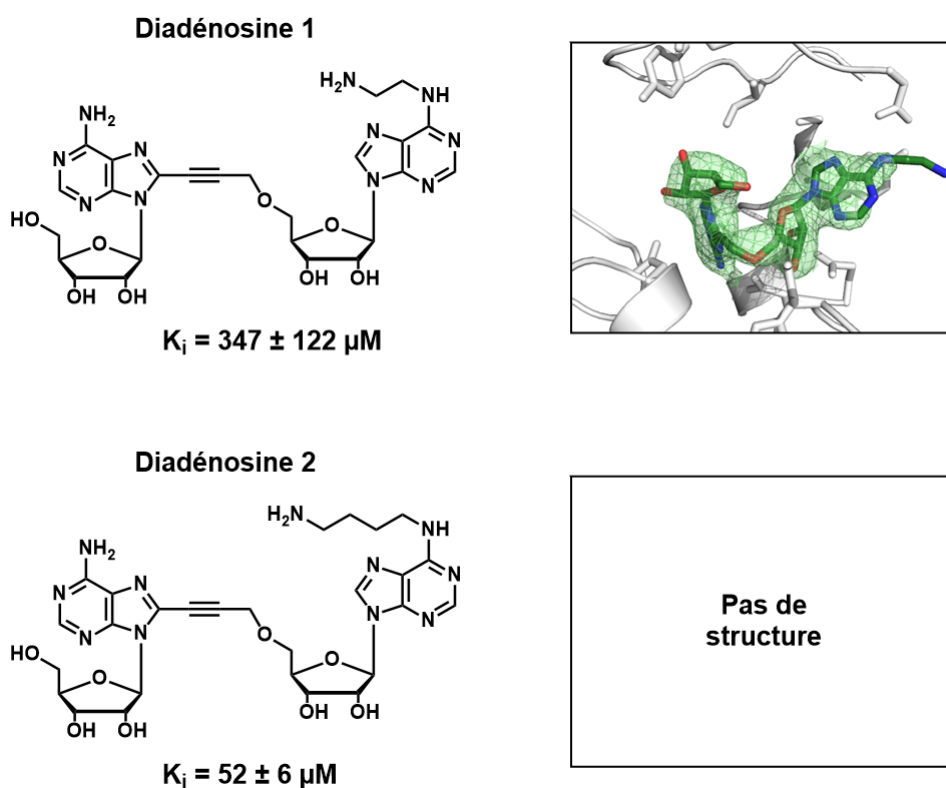


Figure 2.3 – Évaluation des diadénosines **1** et **2**

2.6.4 Évaluation des composés modifiés en position 5'-OH

L'introduction d'un bras amide en position 5' de la diadénosine **45** conduit à un K_i du même ordre de grandeur que l'inhibiteur non modifié en position 5' **NKI-1** (respectivement $24,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ et $17,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$). De plus, le composé **45** co-cristallise dans le site NAD^+ de l'enzyme en présentant des interactions similaires à celles observées entre **NKI-1** et *Lm*NADK. Enfin, la chaîne aminoalkyle de la molécule **45** pointe vers l'extérieur du site NAD et la faible densité électronique observée traduit sa flexibilité. Un greffage de ce composé sur support solide serait donc à envisager, tous les paramètres requis étant validés.

L'introduction d'un bras sulfonamide en position 5' de la diadénosine **46** conduit à un K_i plus bas que l'inhibiteur non modifié en position 5' **NKI-1** ($6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ contre $17,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$ pour **NKI-1**). Les expériences de co-cristallisation ont permis d'obtenir des complexes enzyme/ligand avec le composé **46**. Malheureusement, la chaîne aminoalkyle ne pointant pas vers l'extérieur du site NAD, un greffage de ce composé sur support solide n'est donc pas envisageable.

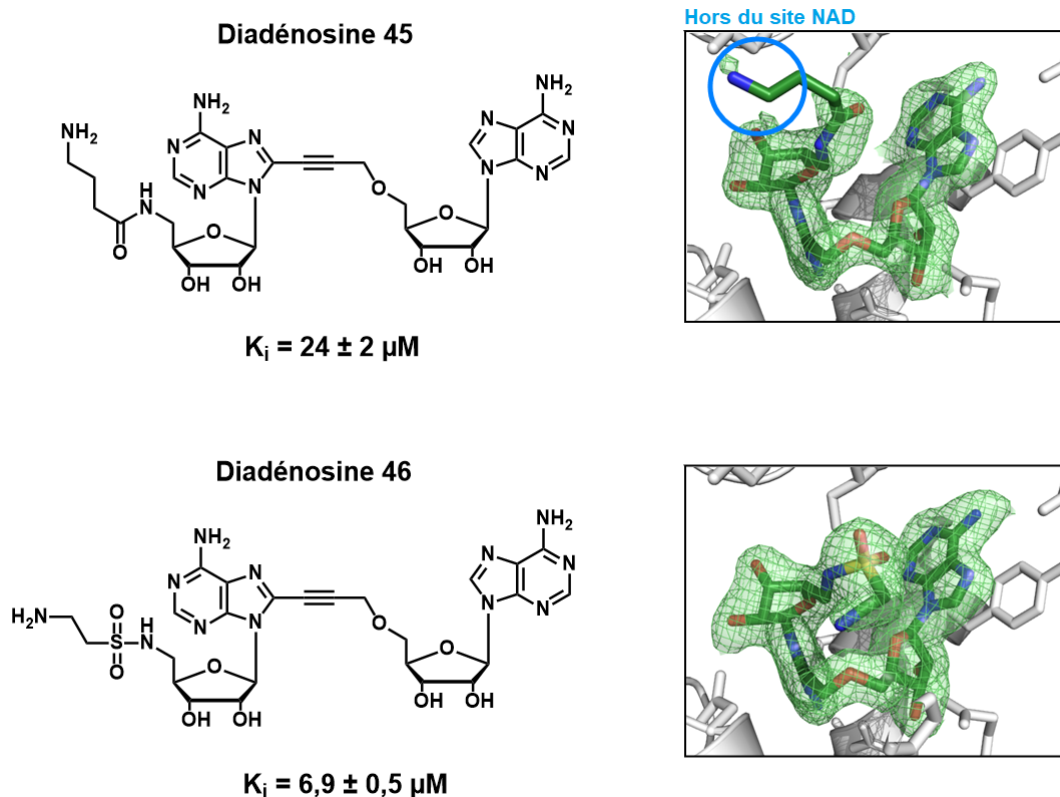
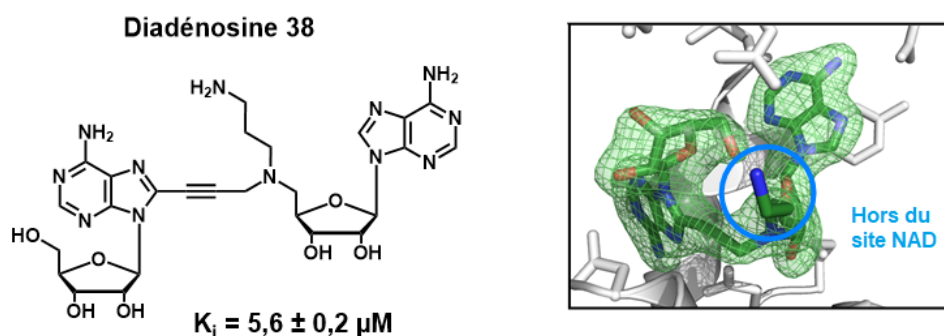


Figure 2.4 – Évaluation des diadénosines **45** et **46**



Les diadénosines sélectionnées (**38** et **45**) ont été greffées sur un support solide. Comme mentionné précédemment (Cf. page 68) notre choix de support s'est porté sur une résine commerciale constituée de billes de Sépharose fonctionnalisées par des esters de *N*-hydroxysuccinimide (NHS. Act Sepharose 4 fast flow[®]). Le protocole suivi afin de mener cette réaction à bien, succinctement décrit ci-après, est un protocole standard¹⁷⁷ présenté en détail dans la partie expérimentale de ce chapitre (Cf. page 117).

D'après les protocoles fournis par le fabricant, le taux de greffage recommandé est de 50 %. La densité d'ester activé étant estimée à 20 $\mu\text{mol/mL}$ de résine, nous avons fait réagir 10 μmol du composé à greffer pour 1 mL de support.

A un volume de sépharose est ajouté une solution aqueuse légèrement basique (pH = 8,5) de diadénosine. Cela permet de créer un lien amide entre la fonction amine du composé à greffer et l'ester activé du support solide (Schéma 2.52). Le taux de greffage est déterminé par dosage UV du ligand résiduel en solution *via* la loi de Beer-Lambert. La réaction est estimée terminée lorsqu'un taux de greffage d'au moins 90 % est atteint.

177. in *Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules*; G. E. Helthcare : **2016**, p. 80-83.

généralement après 16 heures à 4 °C. Les esters activés n'ayant pas réagi sont ensuite bloqués par traitement de la résine avec un tampon contenant de l'éthanolamine (0,5 M). Le support solide est ensuite lavé par un tampon acide acétique/acétate de sodium 0,1 M (pH = 4,0) avant d'être stocké dans un tampon neutre (pH = 7,4). Nous avons également préparés une colonne dite contrôle avec une NAD-Sépharose commerciale (NAD Separopore 4B-CL[®], commercialisée par BioWorld).

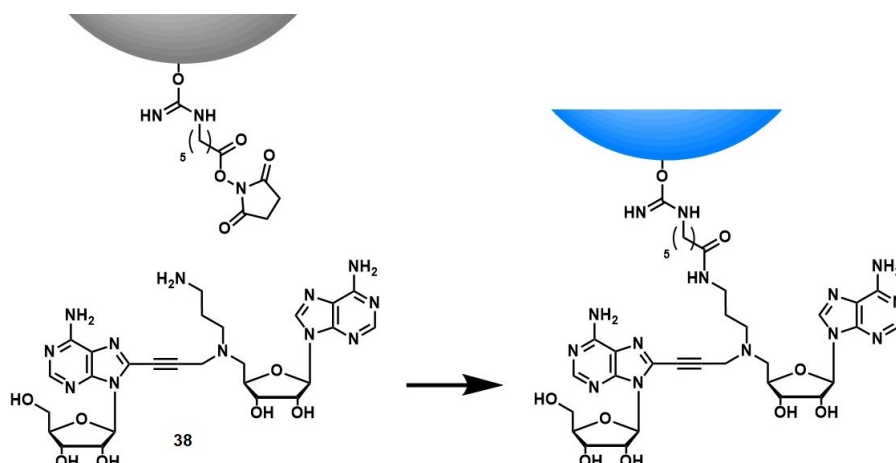


Schéma 2.52 – Couplage du composé **38** à une bille de NHS-Sépharose

Les colonnes d'affinité sont ensuite préparées par dépôt de 200 μ L de Sépharose fonctionnalisée, ou de NAD-Sépharose, dans des colonnes vides. Trois colonnes de chaque support sont systématiquement préparées de la sorte, permettant de mener à bien les chromatographies d'affinité. Les colonnes contenant la Sépharose greffée avec le composé **38** seront nommées "colonnes **38**" dans la suite de ce manuscrit. Cette nomenclature ira de même pour la Sépharose greffée avec le composé **45** et la NAD-Sépharose.

2.7.2 Préparation des extraits bactériens

Les extraits bactériens utilisés pour les expériences de chromatographie d'affinité ont été préparés par Clarisse Leseigneur, étudiante en thèse dans l'unité *Yersinia* de l'Institut Pasteur. La souche BL21(DE3) de *Escherichia coli* a été transformée avec le plasmide pLA19.3.4. Celui-ci permet de surexprimer la NAD kinase de *Staphylococcus aureus* portant une étiquette polyhistidine en C-terminal (*Sa*NADK-His).¹⁰⁰ Ces bactéries transformées ont ensuite été cultivées durant 16 heures à 37 °C en milieu BHI puis en milieu auto-inducteur (milieu ZYM)¹⁷⁸ permettant la surexpression de *Sa*NADK-His. Une autre population bactérienne, n'ayant pas été cultivée en milieu auto-inducteur servant ainsi de témoin négatif, a aussi été préparée. Après 5 heures d'incubation à 37 °C, le milieu de culture a été remplacé par le tampon de stockage des colonnes (Tris 50 mM, pH

178. Chen, Y. W., *Structural Genomics: General Applications*; Methods in Molecular Biology ; Humana Press Incorporated : 2014.

= 7,4). Les bactéries ont été lysées par sonication puis des extraits bruts de protéines ont été faits par prélèvement du surnageant après centrifugation du lysat. La concentration en protéines du milieu a été dosée par fluorescence (Qubit) puis amenée à une concentration de 1 mg/mL.

2.7.3 Chromatographie d'affinité et résultats

L'ensemble des expériences réalisées dans cette section ont été réalisées par Clarisse Leseigneur, j'ai seulement participé aux expériences de chromatographie d'affinité.

Un volume de 200 μ L de lysat bactérien est déposé sur chacune des colonnes. La première fraction éluée, ou "*flow trough*", correspond au volume mort de la colonne déplacé par l'ajout du lysat. Après une heure d'incubation afin de maximiser les interactions protéines/ligand immobilisé, le support solide est lavé trois fois avec 200 μ L de tampon de stockage (Tris, 0,5 M, pH = 7,4). Ce procédé permet d'entraîner les protéines les moins affines pour les ligands immobilisés. Trois éluions successives avec 200 μ L de tampon acide (glycine 0,2 M, pH = 2,5) permettent d'éluer les protéines affines.

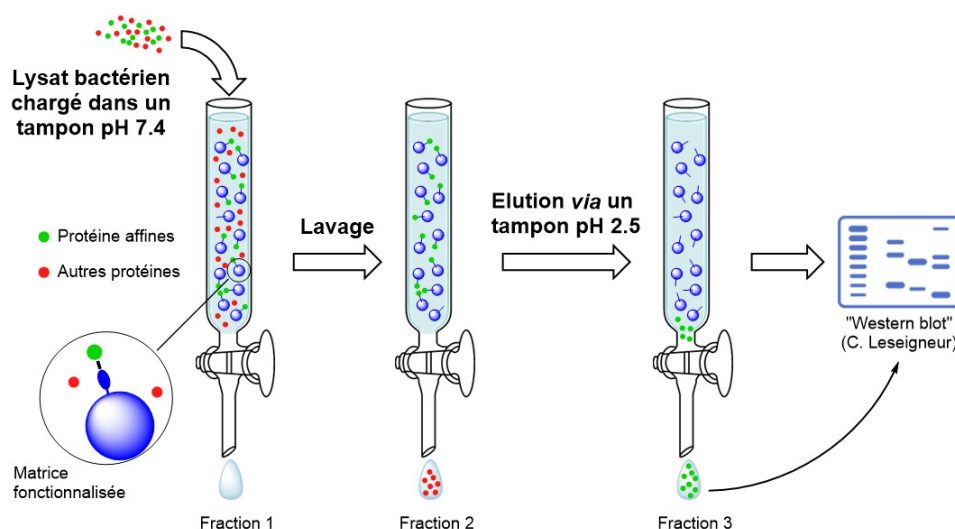


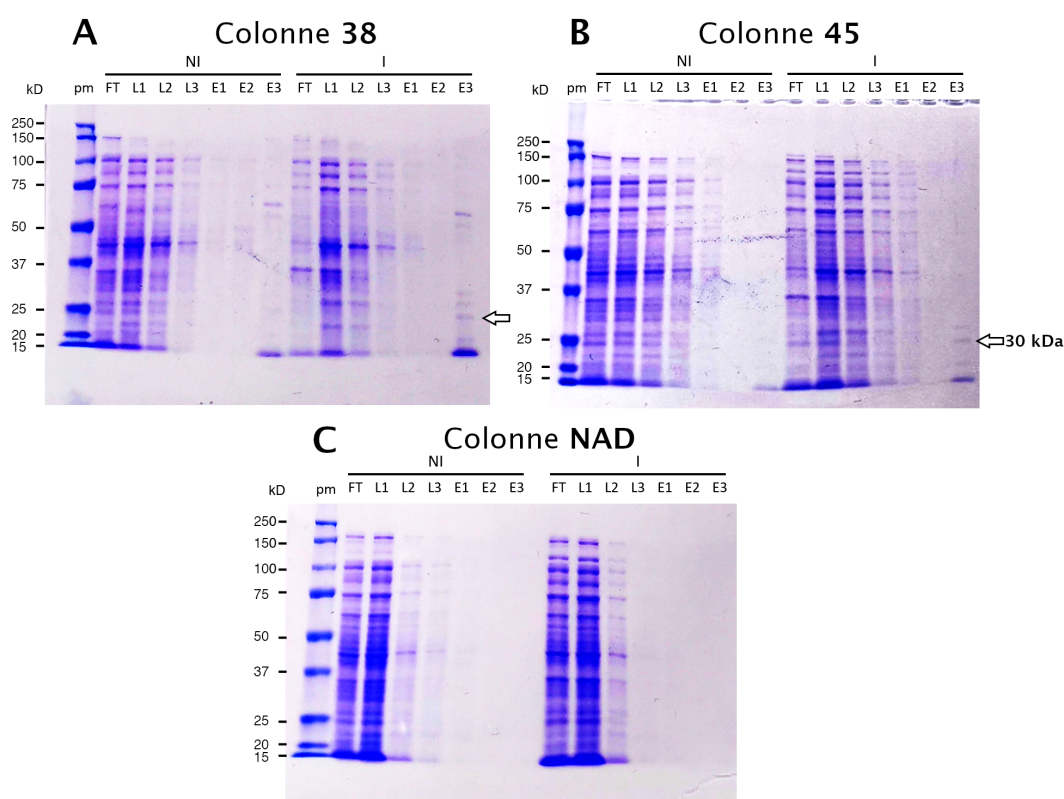
Figure 2.6 – Principe d'une colonne d'affinité

Un échantillon de 30 μ L de chaque fraction collectée est ensuite traité durant 5 minutes à 95 °C avec 10 μ L de tampon de Laemmli 4x (pH = 6.8) et 4 μ L β -mercaptoéthanol de façon à dénaturer les protéines. Dans ces conditions, le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures des protéines déstabilisant leur structure tertiaire. Le dodécylsulfate de sodium (SDS) présent dans le tampon de Laemmli linéarise les protéines et leur confère une charge globale négative, facilitant leur solvatation et permettant leur migration sur gel de polyacrylamide. Enfin, le glycérol du tampon alourdit l'échantillon, augmentant sa densité et facilitant son dépôt dans les puits du gel.

Une fois les protéines dénaturées, chaque fraction est déposée sur gel de polyacrylamide. L'application d'un courant électrique au gel permet la migration des différentes

protéines du dépôt, les séparant en fonction de leur poids moléculaire. Le gel est ensuite coloré au bleu de coomassie afin de visualiser les protéines.

L'analyse des différentes fractions éluées de la colonne 39 (Figure 2.7, gel A) indique que la majorité des protéines sont éliminées dans le *flow trough* (FT) et les lavages (L1-L3). Les conditions d'élution acide (E1-E3) semblent être bonnes car nous arrivons à détecter des protéines de la bonne taille (30 kDa) dans la troisième fraction (E3). Les conditions inductives (I sur la figure) montrent l'apparition de plusieurs bandes de différents poids moléculaires. L'une d'entre elles migre à une valeur proche de 30 kDa, la masse d'un monomère de *Sa*NADK (pour rappel, la *Sa*NADK est une enzyme homotétramérique d'une masse totale de 120 kDa).



Légende pm : poids moléculaire, FT : *flow trough*, L1-3 : lavage, E1-3 : élution, NI : fractions issues de bactéries cultivées en milieu non-inducteur, I : fractions issues de bactéries cultivées en milieu inducteur.

Figure 2.7 – Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des fractions issues des colonnes 38, 45 et "NAD", coloré au bleu de coomassie

Le second gel obtenu (Figure 2.7, gel B), issu de la chromatographie d'affinité utilisant la colonne 45, présente un profil d'élution similaire. Moins de protéines semblent être retenues par le support fonctionnalisé et le gel présente, lui aussi, une bande migrant à une valeur proche de 30 kDa que l'on ne retrouve pas dans les éluions du lysat non induit (NI).

Le gel obtenu avec les fractions issues de la chromatographie utilisant la NAD-Sépharose révèle l'absence de protéines retenues par la colonne (Cf. Figure 2.7, gel C). Cela confirme que les protéines éluées, au cours des deux chromatographies précédentes, sont affines pour le composé greffé et non pour la Sépharose.

Afin de s'assurer que les bandes ayant une masse de 30 kDa correspondent bien à la SaNADK, une expérience de détection plus spécifique a été faite. Les gels ont donc été réalisés une seconde fois, les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène, en vue d'un buvardage de western ou *western blot*.

Mis au point en 1977,¹⁷⁹ le *western blot* est une technique permettant de détecter une protéine spécifique dans un échantillon. Celle-ci repose sur l'utilisation successive de deux anticorps différents. Dans un premier temps, la membrane est traitée avec une solution d'anticorps primaire, affins de la cible. Après lavage de la membrane, un second traitement est réalisé, utilisant une solution d'anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire cette fois. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase* ou HRP), capable d'émettre un signal lumineux (à 428 nm) dans des conditions spécifiques, le plus souvent en présence de luminol en condition oxydante.¹⁸⁰

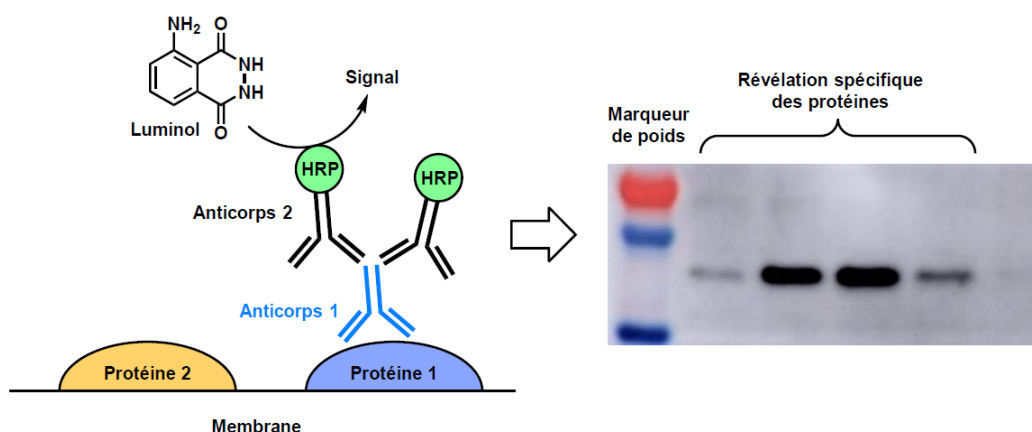


Figure 2.8 – Principe d'une *western blot*

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé un anti-corps spécifique de l'étiquette polyhistidine introduite en position C-terminale de SaNADK. Ce motif n'étant pas présent naturellement dans les protéines, l'apparition de signaux artéfactuels est limitée. Pour ces expériences, nous n'avons déposé sur gel que les "fractions d'éluion", les fractions de lavage et de *flow trough* étant saturées en protéines.

Le *western blot* anti-His réalisé sur les éluats E1-E3 de la colonne **38** montre une absence de signal en conditions non inductives (Cf. Figure 2.9, colonne **38**), résultat

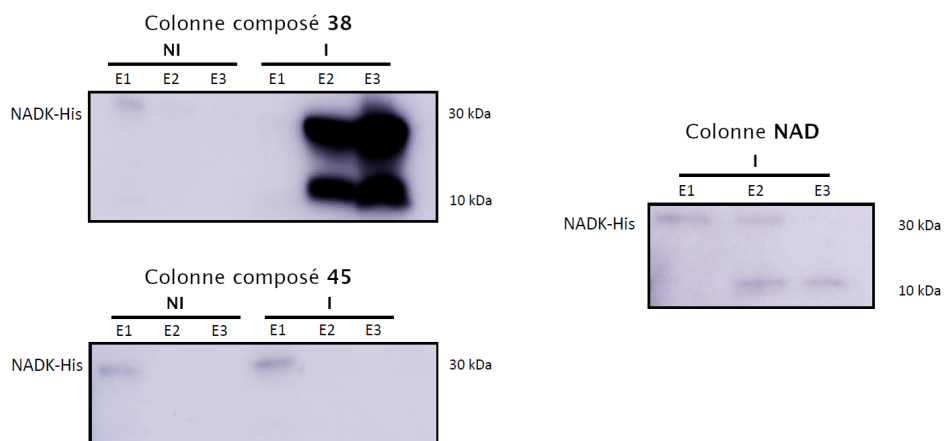
179. Burnette, W. N. in *Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols*, Kurien, B. T., Scofield, R. H., éd. ; Humana Press : Totowa, NJ, 2009, p. 5-8.

180. Mahmood, T. ; Yang, P.-C. *North American Journal of Medical Sciences* **2012**, 4, 429-434.

attendu car la production de *Sa*NADK-His n'est pas induite. Les conditions inductives montrent deux bandes intenses dans les deux dernières fractions d'élution. La première bande, à 30 kDa correspondrait au monomère *Sa*NADK-His tandis que le second, à 10 kDa, serait probablement un produit de dégradation de l'enzyme étiquetée. L'absence de signal dans l'éluat E1 indique que l'excédant de *Sa*NADK-His a bien été éliminé lors des lavages, et permet de conclure que la *Sa*NADK-His est bien retenue par affinité aux colonnes **38**.

Le *western blot* anti-His réalisé avec les éluions des colonnes **45** (Cf. Figure 2.9, colonne **45**), ne montre qu'un signal faible dans la première fraction d'élution quelque soit le monde d'induction. Dans ces conditions, il n'est pas possible de déterminer si ce signal est dû à une affinité ou aux étapes de lavage insuffisantes. Cependant, l'absence du signal intense observé avec la colonne précédente laisse penser que la *Sa*NADK-His n'est pas retenue par affinité aux colonnes **45**.

Le *western blot* anti-His réalisé sur les éluions de la colonne NAD-Sépharose (Cf. Figure 2.9, colonne NAD) présente un très faible signal dans les fractions E1 et E2. La présence de ce signal dans la seconde fraction, en plus de la première, est un indicateur d'une affinité, faible mais existante, de la *Sa*NADK-His pour le NAD⁺. Ces résultats sont attendus, le NAD⁺ étant le substrat de l'enzyme il est normal qu'il y ait une certaine affinité entre les deux.



Légende E1-3 : élution, NI : fractions issues de bactéries cultivées en milieu non-inducteur, I : fractions issues de bactéries cultivées en milieu inducteur.

Figure 2.9 – Western blot des fractions d'élution issues des colonnes **38**, **41** et "NAD"

Ces résultats nous permettent de confirmer que le candidat optimal afin de réaliser des chromatographies d'affinité ciblant la *Sa*NADK est le composé **38**.

2.8 Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre nous avons cherché à déterminer les positions modifiables de l'inhibiteur **NKI-1** afin de produire des outils moléculaires permettant de réaliser des chromatographies d'affinité.

A cette fin, nous avons mis au point des voies de synthèse permettant de préparer des composés modifiés à trois positions différentes et avons exploité ce savoir-faire synthétique pour produire cinq analogues de **NKI-1**. La mesure de leurs affinités vis-à-vis de l'enzyme modèle *Lm*NADK (K_i) ainsi que leur positionnement dans le site NAD de l'enzyme (cristallographie aux RX) ont permis de guider notre choix et de sélectionner deux candidats à greffer sur support solide (composés **38** et **45**).

Les expériences de chromatographie d'affinité suivies de la détection des protéine éluées (coloration au bleu de Coomassie et de *western blot*) ont permis une première validation d'un support (composé **38** ancré sur sépharose).

L'étape suivante serait de répéter ces expériences de chromatographie d'affinité en utilisant des lysats de bactéries ayant surexprimé *Sa*NADK non étiquetée, suivies de détection par *western blot* en utilisant des anticorps anti-*Sa*NADK. Il est aussi envisagé de réaliser une autre expérience en utilisant des extraits bactériens de *S. aureus*, plutôt que *E. coli* surexprimant la protéine d'intérêt. Nous pourrions ainsi mener une étude protéomique des fractions d'élution et identifier les autres protéines du pathogène affines pour l'inhibiteur.

Experimental section

Biology

The biological assays were made by Clarisse Leseigneur, PhD student in *Yersinia* unit at the institut Pasteur of Paris. The following protocols were retranscribed and adapted from published papers by the consortium.⁸⁷

Bacterial growth measurement

Overnight *S. aureus* cultures in BHI at 37 °C were diluted 1:100 into BHI broth. For antibiotic activity assay, the culture medium was supplemented with 25% PBS/10% DMSO, the desired diadenosine in 25% PBS/10% DMSO or 10 µg/mL levofloxacin. Inhibitors were tested at 4 concentrations: 10, 1, 0.1 or 0.01 µg/mL. Cultures were then incubated in 96-well plates, with shaking at 200 rpm at 37 °C. Growth was monitored with a microplate reader (Glomax Discover, Promega) during six hours. Experiments were performed at least three times.

Biochemistry

The biochemical assays were made by Dr. Corinne Lionne and her team at the Centre de Biochimie Structurale (CBS) of Montpellier. The following protocols were retranscribed and adapted from published papers by the consortium.^{87,106}

LmNADK1 overexpression and purification

Histagged *LmNADK1* was expressed and purified on cobaltbased IMAC resins (Clontech) as previously published.¹⁰⁰ The NAD kinase activity was determined by measuring the absorbance at 340 nm to follow the formation of reduced NADP produced by a coupling enzyme (Glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast). This enzyme and its substrate were purchased from Sigma-Aldrich.

Ki determination

The activity was measured at 30 °C in 50 mM Bis-Tris pH 7.0, 2 mM sodium citrate, 1 mM MgCl₂. Reaction mixtures contained 0–2 mM NAD⁺, 4 mM MgATP, 5 mM Glucose 6-phosphate, 1 U/mL Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 0.1 µM *LmNADK1*. Steady state rate constants (k_{ss}) were calculated by fitting the initial (first 500–1000 s) linear part of the NADP production time courses per NADK. Inhibitors were tested at 4 concentrations: 0, 10, 25 or 50 µM and K_i values were determined using the competitive inhibition equation, $k_{ss} = k_{cat} \times \text{NAD} / (\text{KM} \times (1 + [\text{inhibitor}] / \text{K}_i) + \text{NAD})$, with GraFit software (v 7.0.3).

Crystallography

The biological assays were made by Dr. Muriel Gelin at the Centre de Biochimie Structurale (CBS) of Montpellier. The following protocols were retranscribed and adapted from published papers by the consortium.⁸⁷

Crystallization

A dedicated crystallization kit (24-conditions) was set up to ensure reproducibility from one protein sample to another. Crystals were grown by mixing 1 μ L of the protein solution concentrated at 9 mg/mL and complexed with *S*-methyl-5'-thio adenosine (**MTA**) with an equal volume of crystallization buffer (30 mM sodium bromide, 220 mM potassium citrate, pH 4.8-5.1, glycerol 6%, 15-16% w/v polyethylene glycol 400), equilibrated over 0.5 mL of the same buffer. The complexes with bound ligands were solved using crystals in the orthorhombic form. After growing them in the presence of **MTA**, crystals were soaked with a 10 mM concentration of the desired ligand in a pre-equilibrate hanging-drop.

Crystallographic Studies

X-ray structure determinations were performed using molecular replacement. Refinement was performed using Phenix.¹⁸¹ As in the case of the monoclinic form, some side chains and several short segments of the protein (mainly loops 69-TGHL-72, 110-GIGKK-114 and less frequently 129-SGGP-132) were not clearly visible in most electron density maps or showed alternating configurations. Similarly, the last residue and/or the affinity-tag could not be modeled in most protein-ligand complexes. Figures of ligands and corresponding electronic density were generated using PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

181. Adams, P. D.; Afonine, P. V. *et al. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, *66*, 213-221.

Affinity Chromatography

General protocol for resin washing

A washing cycle consists in 3 washes. Each wash consists in a 5 minutes incubation of the resin with 2 volumes of the corresponding buffer (here, 2.0 mL) on a stirring wheel followed by 2 min 1000 rpm centrifugation and removal of the supernatant.

Four buffers were prepared to perform the experiment :

- Coupling buffer (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH = 8.5)
- Quenching buffer (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl, pH = 8,.)
- Acetate buffer (0.1 M acetate, 0.5 M, NaCl, pH = 4.0)
- Storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.4) - Elution buffer (0.2 M glycine, pH = 2.5)

Preparation of the resin

Isopropanol from 1.0 mL of NHS-Activated Sepharose[®] 4-Fast Flow was removed by one washing cycle using 1 mM HCl solution. The media was then equilibrated by performing one washing cycle using coupling buffer (0.9 mL, 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3).

Coupling protocol

The amino-functionalized ligands **39** or **46** were coupled to the commercially available NHS-Activated Sepharose[®] 4-Fast Flow following procedures provided by the supplier (GE Healthcare). Briefly, the ligand dissolved in DMSO (0.5 mL at 100 mM) was added dropwise to the coupling buffer (0.9 mL). The resulting ligand solution (1.4 mL at 7.1 mM) was added to the resin stored in minimal coupling buffer (1 mL, 20 μmol). After incubation at 4 °C overnight, the supernatant was removed. The total amount of immobilized ligand (**39** or **46**) was determined by monitoring at 260 nm the ligand amount recovered after the coupling step. The loading charge was estimated at 9 μmol/mL (90 % yield).

Washing and deactivation

In order to deactivate any reactive functions, the following protocol was applied : One washing cycle using quenching buffer (0.5 M ethanolamine, 0.5 M NaCl, pH 8.3) followed by one washing cycle using acetate buffer (0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH = 4) and one washing cycle using quenching buffer. The resin was then incubated one hour in 2 volumes of quenching buffer (here, 2.0 mL) on a stirring wheel. Medium

was centrifuged at 1000 rpm and supernatant was removed before performing additional washing cycles. One using acetate buffer followed by one using quenching buffer followed by a last one using acetate buffer. The media was then equilibrated by performing a washing cycle using storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.4). before being stored at 4 °C.

Protein extracts

Overnight culture of *E. coli* BL21(DE3) pLysS expressing *Sa*NADK-His was diluted 1:100 in 100 mL of autoinduction ZYM media (DOI 10.1007/978-1-62703-691-7_2) with 100 µg/mL carbenicillin and grown for 5h at 200 rpm. Bacteria were collected by centrifugation for 20 min at 6.000 g at 4 °C and sonicated in 5 mL of Tris-HCL (50 mM, pH 7.4) by alternating 10 cycles of 30 sec sonication, 1 min rest on ice. The protein extracts were centrifugated for 20 min at 10.000 g at 4 °C, and the amount of proteins were quantified using the Qubit Protein Assay kit (Invitrogen).

Affinity chromatography

Chromatography was carried out at room temperature in miniature columns (diameter, 0.2 mL bed volume). Columns were equilibrated with the binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) before loading the crude cellular extracts. The crude cellular extract from *E. coli* (one column volume) was applied to the resin and allowed to preincubate for 60 min. The column was washed with binding buffer (three column volumes), followed by elution buffer (20 mM glycine pH 3.0, one column volumes) and elution buffer (200 mM glycine pH 3.0, two column volumes). Fractions were mixed by Laemmli buffer (Biorad) and 10% 2-mercaptoethanol (Biorad), then denaturated for 5 min at 95 °C. Samples were separated onto 4-20% MiniPROTEAN TGX Stain-Free Precast Gel (Biorad) in TGS buffer and transferred on activated polyvinylidene fluoride membranes in Western Blot Transfer Buffer (Pierce). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in 5% blotto (R250 rabbit polyclonal anti-*Sa*NADK antibodies, 1:1000; rabbit anti-His (MA533032, Invitrogen), 1:2500). Membranes were then incubated with 1:2500 goat antirabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies (ab205718, Abcam). Blots were revealed using the SuperSignal West Femto kit (Thermo Scientific).

Chemistry

Commercially available reagents and solvents, unless otherwise stated, were used without purification. Anhydrous reactions were carried out under an argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on TLC plates pre-coated with silica gel 60 F254. Compounds were visualized with UV light (254 nm) and by spraying with a mixture of ethanol/anisaldehyde/sulfuric acid/acetic acid (90/5/4/1), followed by heating. Reactions were also monitored using an HPLC system (Agilent 1100 equipped with a C18 reverse phase column) coupled to a mass spectrometer (ESI source). Unless otherwise stated, flash chromatography was performed with silica gel 60 (230–400 mesh). HPLC purification was carried out on an Agilent system (1100 Series) equipped with a diode array detector using a C18 reverse phase column (Kromasil, 5 μm , 100 $\text{\AA}$, 150 $\times$ 10 mm) and a linear gradient of acetonitrile in 10 mM triethylammonium acetate (TEAA) buffer over 15 or 20 min at a flow rate of 4 mL/min. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 at 400.13 MHz and 100.62 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent signals. Coupling constants (J values) are reported in Hz. The complete assignment of ^1H and ^{13}C signals was performed by analysis of the correlated homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY and heteronuclear $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC spectra. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Q-ToF Micro mass spectrometer under electrospray ionization (ESI) using 0.1% formic acid in acetonitrile/water in positive ion mode. Retention time (tR) and gradient are specified.

Argon atmosphere was systematically made using the following protocol : The experimental setup was sealed before attaching it to a vacuum source in order to remove the air. After five minutes, the vacuum source was replaced by an argon source. If the reaction is very air-sensitive, several cycles of degassing were made.

Unless otherwise stated, argon atmosphere was made in the setup by connecting

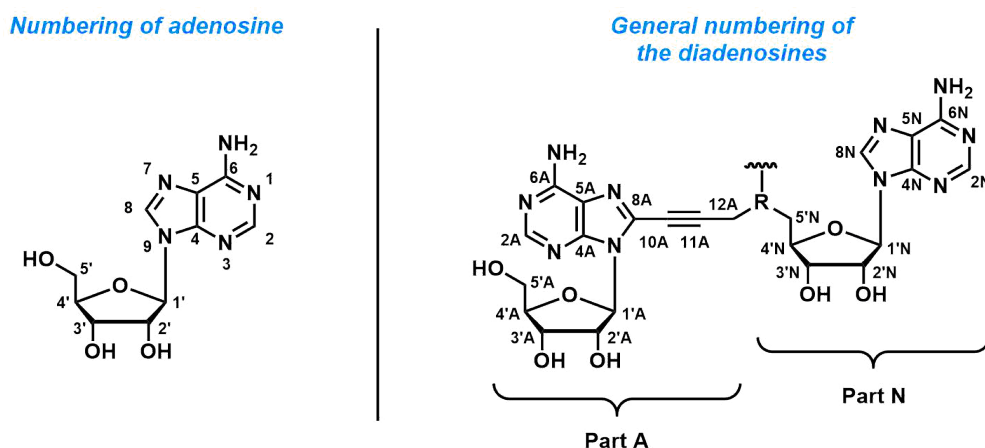
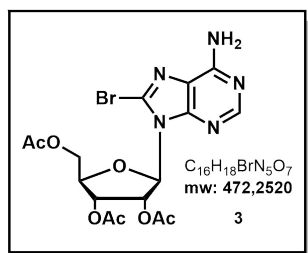


Figure 2.10 – General numbering of adenosine and diadenosines

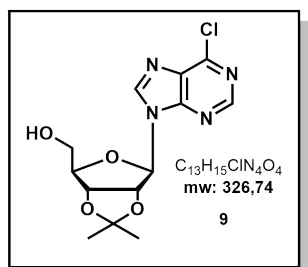
2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-8-bromo adenosine (3)

A solution of 8-bromo adenosine (1.04 g, 3.0 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (30.0 mL) was brought to 0 °C before adding Ac_2O (0.94 mL, 9.9 mmol, 3.3 equiv.) dropwise. After 18 hours at 4 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO_2 , 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield the peracetylated compound **3** (1.16 g, 82%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.06 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.12 (s, 3H, CH_3 OAc), 2.17 (s, 3H, CH_3 OAc), 4.35 (dd, $J_{5',4'} = 5.8$ Hz, $J_{5',5''} = 11.6$ Hz, 1H, H-5'), 4.41 (ddd, $J_{4',3'} = 5.8$ Hz, $J_{4',5'} = 3.5$ Hz, $J_{4',5''} = 5.6$ Hz, 1H, H-4'), 4.53 (dd, $J_{5'',4'} = 3.3$ Hz, $J_{5'',5'} = 11.6$ Hz, 1H, H-5''), 5.74 (brs, 2H, NH_2 -6), 5.96 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-3'), 6.12 (dd, $J_{1',2'} = 4.3$ Hz, 1H, H-1'), 6.38 (dd, $J_{2',1'} = 4.3$ Hz, $J_{2',3'} = 6.0$ Hz, 1H, H-2'), 8.33 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 20.4 (CH_3 OAc), 20.5 (CH_3 OAc), 20.6 (CH_3 OAc), 63.0 (C-5'), 70.5 (C-3'), 72.1 (C-2'), 80.2 (C-4'), 88.7 (C-1'), 120.3 (C-5), 127.2 (C-8), 150.8 (C-4), 153.2 (C-2), 154.3 (C-6), 169.4 (Cq OAc), 169.5 (Cq OAc), 170.5 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{16}H_{18}^{79}BrN_5O_7+H]^+$ 472.0468 found 472.0462.

2',3'-*O*-isopropylidene-6-chloropurine riboside (9)

To a solution of 6-chloropurine-ribose (2.87 g, 10.0 mmol, 1.0 equiv.) in acetone (50 mL) was added 2,2-dimethoxypropane (2.46 mL, 20.0 mmol, 2.0 equiv.) followed by PTSA (80.0 mg, 0.046 mmol, 0.046 equiv.). After 18h at room temperature volatiles were removed before adding Na_2CO_3 (1 M, 50 mL). The aqueous layer was extracted three times with DCM (3x 50 mL). The combined organic layers were

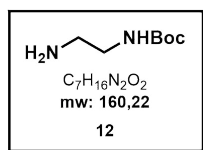
dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (100 g, SiO_2 , 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield **9** (2.47 g, 76 %) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.40 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.67 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.83 (ddd, $J_{5',4'} = 9.9$ Hz, $J_{5',5''} = 12.5$ Hz, $J_{5',OH5'} = 9.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.99 (ddd, $J_{5'',4'} = 1.9$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.5$ Hz, $J_{5'',OH5'} = 2.5$ Hz, 1H, H-5''), 4.55-4.57 (m, 1H, H-4'), 4.90 (dd, $JOH5',5'' = 9.9$ Hz, $JOH5',5'' = 2.5$ Hz, 1H, OH-5'), 5.12 (dd, $J_{3',2'} = 5.9$ Hz, $H3',4' = 1.5$ Hz, 1H, H-3'), 5.22 (dd, $J_{2'-1'} = 4.5$ Hz, $J_{2'-3'} = 5.9$ Hz, 1H, H-2'), 6.03 (d, $J_{1',2'} = 4.5$ Hz, 1H, H-1'), 8.30 (s, 1H, H-8), 8.77 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.2 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 63.2 (C-5'), 81.5 (C-3'), 83.4 (C-2'), 86.5 (C-4'), 93.9 (C-1'), 114.5 (Cq isop.), 133.1 (C-5), 144.7 (C-8), 150.5 (C-4), 151.7 (C-2), 152.2 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4+\text{Na}]^+$ 349.0680 found 349.0682.

***N*-Boc-1,2-ethanediamine (**12**)**



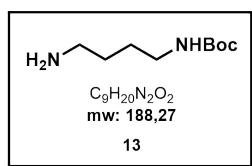
To a solution of ethylenediamine (11.2 mL, 167 mmol, 10 equiv.) in dichloromethane (50 mL) was added a solution of Boc_2O (6.1 g, 16.8 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (420 mL) under a very slow dropwise. After 72 hours at room temperature, volatiles were removed before adding aqueous Na_2CO_3 (2 M, 300 mL) and extracting twice with DCM (2x 300 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to yield compound **12** (4.73 g, 78%) as a thick oil which was used without further purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.20 (br s, 2H, NH_2), 1.46 (s, 9H, CH_3 Boc), 2.81 (t, J = 5.9 Hz, 2H, H-2), 3.18 (q, J = 5.9 Hz, 2H, H-1), 4.89 (br s, 1H, NHBoc).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 28.4 (3C, CH_3 Boc), 41.9 (C-2), 43.5 (C-1), 79.2 (Cq *t*Bu), 156.2 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2+\text{H}]^+$ 161.1285 found 161.1282.

***N*-Boc-1,4-butanediamine (**13**)**



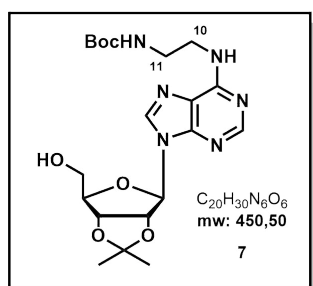
To a solution of 1,4-diaminobutane (15.1 mL, 150 mmol, 1.0 equiv.) in dichloromethane (45 mL) was added a solution of Boc_2O (10.9 g, 30 mmol, 0.2 equiv.) in DCM (375 mL) under a very slow dropwise. After 48 hours at room temperature, volatiles were removed before adding water (400 mL) and extracting twice with DCM (4x 400 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (100 g, SiO_2 , 0 to 1.5% methanol in dichloromethane) to yield **13** (5.65 g, quant.) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.42 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.44-1.54 (m, 4H, H-3 and H-4), 1.77 (br s, 2H, NH_2), 2.81 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H-2), 3.08-3.14 (br q, J = 5.9 Hz, 2H, H-1), 4.89 (br s, 1H, NHBoc).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 27.4 (C-3), 28.4 (3C, CH_3 Boc), 30.57 (C-4), 40.4 (C-1), 41.6 (C-2), 79.0 (Cq *t*Bu), 156.0 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2+\text{H}]^+$ 189.1598 found

N^6 -(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (7**)**



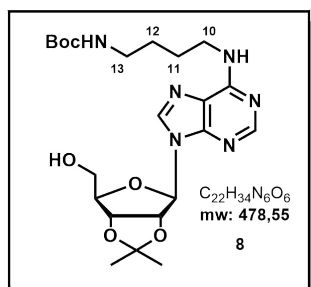
To a solution of **9** (1.30 g, 4.0 mmol, 1.0 equiv.) in DME (20 mL) was added NEt_3 (2.79 mL, 12.0 mmol, 3.0 equiv.), followed by a solution of **12** (3.20 g, 12.0 mmol, 3.0 equiv.) in DME (20 mL). After 18 hours at 80 °C, volatiles were removed and the residue was dissolved in DCM (80 mL). The organic layer was washed once with water (80 mL) and once with brine (80 mL) before being dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by

flash column chromatography (75 g SiO_2 , 1 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **7** (1.87 g, 95%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.40 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.44 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.66 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.41-3.48 (m, 2H, H-11), 3.76-3.84 (m, 3H, H-10 and H-5'), 3.99 (dd, $J_{5'',4'} = 1.4$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.53-4.56 (m, 1H, H-4'), 5.09 (br s, 1H, NHBoc), 5.13 (dd, $J_{3',2'} = 5.8$ Hz, $J_{3',4'} = 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.21 (pt, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-2'), 5.87 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-1'), 6.40-6.90 (br s, 2H, NH-6 and OH-5'), 7.84 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.3 (CH_3 isop.), 27.7 (CH_3 isop.), 28.3 (3C, CH_3 Boc), 40.7 (C-10 and C-11), 63.4 (C-5'), 79.6 (Cq *t*Bu), 81.7 (C-3'), 83.1 (C-2'), 85.2 (C-4'), 94.3 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 121.4 (C-5), 139.8 (C-8), 147.6 (C-4), 152.9 (C-2), 155.4 (C-6), 156.0 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6+\text{H}]^+$ 451.2305, found 451.2293.

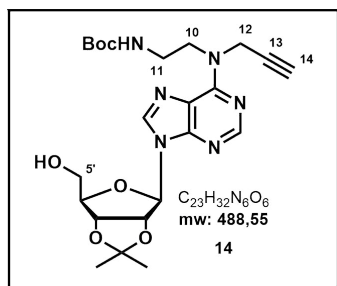
***N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (**8**)**

To a solution of (**9**) (0.98 g, 3.0 mmol, 1.0 equiv.) in DME (15 mL) was added NEt₃ (1.25 mL, 9.0 mmol, 3.0 equiv.), followed by a solution of (**13**) (1.69 g, 9.0 mmol, 3.0 equiv.) in DME (15 mL). After 18 hours at 80 °C, volatiles were removed and the residue was dissolved in DCM (80 mL). The organic layer was washed with water (80 mL) and brine (80 mL) before being dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography (50 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **8** (1.31 g, 91%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.61 (quint, $J_{12,11} = J_{12,13} = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-12), 1.66 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.74 (quint, $J_{11,12} = J_{11,10} = 7.0$ Hz, 2H, H-11), 3.19 (br q, 2H, H-13), 3.68 (br s, 2H, H-10), 3.80 (br d, $J_{5',5''} = 12.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.99 (dd, $J_{5'',4'} = 1.3$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.54-4.56 (m, 1H, H-4'), 4.78 (br s, 1H, NHBoc), 5.13 (dd, $J_{3',2'} = 5.9$ Hz, $J_{3',4'} = 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.22 (pt, $J_{2',3'} = 5.8$ Hz, 1H, H-2'), 5.86 (d, $J_{1',2'} = 4.8$ Hz, 1H, H-1'), 6.04 (br s, 1H, OH-5'), 6.67 (br s, 1H, NH-6), 7.79 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.3 (CH₃ isop.), 27.0 (C-12), 27.2 (C-11), 27.7 (CH₃ isop.), 28.4 (3C, CH₃ Boc), 40.2 (C-10 and C-13), 63.4 (C-5'), 79.2 (Cq *t*Bu), 81.7 (C-3'), 83.1 (C-2'), 86.1 (C-4'), 94.4 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 121.3 (C-5), 139.5 (C-8), 147.3 (C-4), 152.7 (C-2), 155.3 (C-6), 156.0 (Cq carbamate).

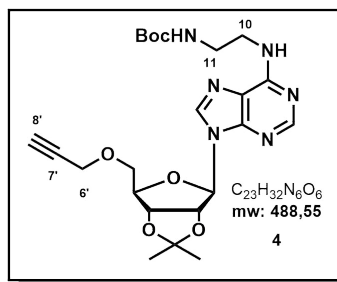
HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₂H₃₄N₆O₆+H]⁺ 479.2618, found 479.2614.

N⁶-propargyl-N⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (14)

A suspension of sodium hydride (60% in oil, 26 mg, 0.65 mmol, 1.3 equiv.) in anhydrous DMF (5 mL) was brought to 0 °C before adding a solution of **7** (225 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (3 mL). After 1 hour at 0 °C, propargyl bromide (80% in toluene, 83 μ L, 0.7 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise. After 48 hours at 4 °C, the reaction was quenched by adding AcOH (40 μ L) and stirring an additional hour at 4 °C. Volatiles were then removed and the residue was dissolved in AcOEt (20 mL). The organic layer was washed twice with water (2x 30 mL) dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (15 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield N-propargylated compound **14** (139 mg, 58%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.38 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.65 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.27 (t, $J_{14,12}$ = 2.2 Hz, 1H, CH-14), 3.50-3.56 (m, 2H, CH₂-11), 3.75-3.83 (m, 1H, H-5'), 3.94-4.00 (m, 1H, H-5''), 4.16-4.34 (m, 2H, CH₂-10), 4.52-4.54 (m, 1H, H-4'), 4.74-4.95 (m, 2H, CH₂-12), 5.12 (dd, $J_{3',2'}$ = 5.8 Hz, $J_{3',4'}$ = 1.2 Hz, 1H, H-3'), 5.21 (br s, 1H, NH-11), 5.24 (dd, $J_{2',1'}$ = 5.0 Hz, $J_{2',3'}$ = 5.8 Hz, 1H, H-2'), 5.85 (d, $J_{1',2'}$ = 5.0 Hz, 1H, H-1'), 6.55-6.49 (m, 1H, OH-5'), 7.81 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.2 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 28.3 (3C, CH₃ Boc), 38.2 (CH₂-12), 39.1 (CH₂-11), 47.9 (CH₂-10), 63.5 (C-5'), 72.0 (CH-14), 79.2 (Cq *t*Bu), 79.5 (CH₂-13), 81.7 (C-3'), 82.7 (C-2'), 86.1 (C-4'), 94.3 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 121.5 (C-5), 138.9 (C-8), 149.4 (C-4), 151.8 (C-2), 154.5 (C-6), 156.1 (Cq carbamate).

N⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-(2-propyn-1-yl)adenosine (4)

A suspension of sodium hydride (60% in oil, 0.10 g, 2.5 mmol, 2.1 equiv.) in anhydrous THF (12 mL) was brought to 0 °C before adding a solution of **7** (559 mg, 1.2 mmol, 1.0 equiv.) in THF (12 mL). After 1 hour at 0 °C, propargyl bromide (80% in toluene, 134 μ L, 1.2 mmol, 1.0 equiv.) was added dropwise. After 24 hours at 4 °C, the reaction was quenched by adding AcOH (145 μ L) and stirring an additional hour at 4 °C. Volatiles were then removed and the residue was dissolved in AcOEt (50 mL). The organic layer was washed twice with water (2x 60 mL) dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified

by flash column chromatography (30 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **4** (346 mg, 59%) as a white foam along with the *N*-propargylated compound **15** (77 mg, 12%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.64 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.44 (t, $J_{8',6'} = 2.3$ Hz, 1H, H-8'), 3.44 (br q, $J_{10,11} = 5.6$ Hz, 2H, CH₂-11), 3.73 (dd, $J_{5',4'} = 4.8$ Hz, $J_{5',5''} = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.78 (dd, $J_{5'',4'} = 3.9$ Hz, $J_{5'',5'} = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 3.78-3.85 (m, 2H, CH₂-10), 4.14 (d, $J_{6',8'} = 2.3$ Hz, 2H, CH₂-6'), 4.49-4.53 (m, 1H, H-4'), 5.03 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.7$ Hz, 1H, H-3'), 5.17 (br s, 1H, NHBoc), 5.34 (dd, $J_{2',1'} = 2.3$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.19 (d, $J_{1',2'} = 2.4$ Hz, 1H, H-1'), 6.33 (br s, 1H, NH-6), 8.01 (s, 1H, H-8), 8.39 (s, 1H, H-2).

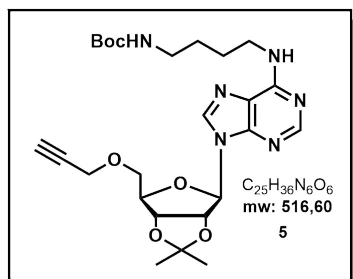
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.4 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₃ isop.), 28.4 (3C, CH₃ Boc), 40.9 (C-10 and C-11), 58.6 (C-6'), 69.9 (C-5'), 75.2 (C-8'), 78.8 (C-7'), 79.4 (Cq *t*Bu), 81.9 (C-3'), 84.8 (C-2'), 85.7 (C-4'), 91.2 (C-1'), 114.2 (Cq isop.), 120.2 (C-5), 138.9 (C-8), 148.9 (C-4), 152.9 (C-2), 154.9 (C-6), 156.3 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₃H₃₂N₆O₆+H]⁺ 489.2462 found 489.2463.

N⁶-propargyl-N⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-(2-propyn-1-yl)adenosine (15**)**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.39 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.63 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.25 (t, $J_{14,12} = 2.4$ Hz, 1H, CH-14), 2.44 (t, $J_{8',6'} = 2.2$ Hz, 1H, CH-8'), 3.50-3.56 (m, 2H, CH₂-11), 3.75-3.83 (m, 1H, H-5'), 3.74 (dd, $J_{5',4'} = 4.8$ Hz, $J_{5',5''} = 10.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.78 (dd, $J_{5'',4'} = 4.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 10.2$ Hz, 1H, H-5''), 4.14-4.16 (m, 2H, CH₂-6'), 4.20-4.27 (m, 2H, CH₂-10), 4.48-4.52 (m, 1H, H-4'), 4.80-4.93 (m, 2H, CH₂-12), 5.02 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 3.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.30 (dd, $J_{2',1'} = 2.3$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 5.32 (br s, 1H, NH-11), 6.20 (d, $J_{1',2'} = 2.3$ Hz, 1H, H-1'), 7.99 (s, 1H, H-8), 8.40 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.4 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₃ isop.), 28.3 (3C, CH₃ Boc), 38.0 (CH₂-12), 39.2 (CH₂-11), 47.7 (CH₂-10), 58.6 (CH₂-6'), 69.8 (C-5'), 71.8 (CH-14), 75.3 (CH-8'), 78.8 (C-7'), 79.0 (Cq *t*Bu), 79.9 (CH-13), 81.8 (C-3'), 84.8 (C-2'), 85.7 (C-4'), 91.1 (C-1'), 114.2 (Cq isop.), 120.4 (C-5), 137.9 (C-8), 150.5 (C-4), 152.5 (C-2), 154.1 (C-6), 156.1 (Cq carbamate).

***N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-(2-propynyl)adenosine (**5**)**

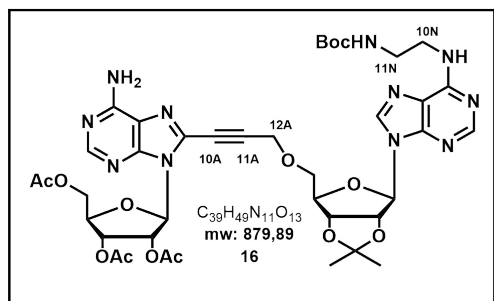
A suspension of sodium hydride (60% in oil, 168 mg, 4.2 mmol, 2.1 equiv.) in anhydrous THF (20 mL) was brought to 0 °C before adding a solution of **8** (957 mg, 2.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (20 mL). After 1 hour at 0 °C, propargyl bromide (80% in toluene, 220 μ L, 2.0 mmol, 1.0 equiv.) was added dropwise. After 24 hours at 4 °C, the reaction was quenched by adding AcOH (240 μ L) and stirring an additional hour at 4 °C. Volatiles were then removed and the residue was dissolved in AcOEt (80 mL). The organic layer was washed twice with water (2x 80 mL) dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (70 g SiO₂, 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **5** (700 mg, 68%) as a white foam along with the *N*-propargylated compound (80 mg, 7%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.36 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.41 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.51-1.63 (m, 2H, CH₂-12), 1.59 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.69 (quint., J = 7.0 Hz, 2H, H-11), 2.42 (t, $J_{8',6'}$ = 2.3 Hz, 1H, H-8'), 3.14 (br q, 2H, H-13), 3.60-3.66 (br s, 2H, H-10), 3.69 (dd, $J_{5',4'}$ = 4.9 Hz, $J_{5',5''}$ = 10.3 Hz, 1H, H-5'), 3.74 (dd, $J_{5'',4'}$ = 4.0 Hz, $J_{5'',5'}$ = 10.3 Hz, 1H, H-5''), 4.10 (d, $J_{6',8'}$ = 2.3 Hz, 2H, H-6'), 4.44-4.49 (m, 1H, H-4'), 4.99 (dd, $J_{3',2'}$ = 6.2 Hz, $J_{3',4'}$ = 2.7 Hz, 1H, H-3'), 5.32 (dd, $J_{2',1'}$ = 2.3 Hz, $J_{2',3'}$ = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 6.05 (br s, 1H, NH-6), 6.15 (d, $J_{1',2'}$ = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 7.94 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.3 (CH₃ isop.), 27.1 (CH₃ isop.), 27.1 (C-11 and C-12), 28.4 (3C, CH₃ Boc), 40.1 (C-10 and C-13), 58.5 (C-6'), 69.8 (C-5'), 75.3 (C-8'), 78.8 (C-7'), 79.0 (Cq *t*Bu), 81.9 (C-3'), 84.7 (C-2'), 85.7 (C-4'), 91.1 (C-1'), 114.2 (Cq isop.), 120.1 (C-5), 138.7 (C-8), 148.7 (C-4), 153.2 (C-2), 154.9 (C-6), 156.0 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₅H₃₆N₆O₆+H]⁺ 517.2775, found 517.2780.

2',3',5'-tri-*O*-acetyl-8-[3-(*N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-adenosinyl)prop-1-yn-1-yl]adenosine (16**)**



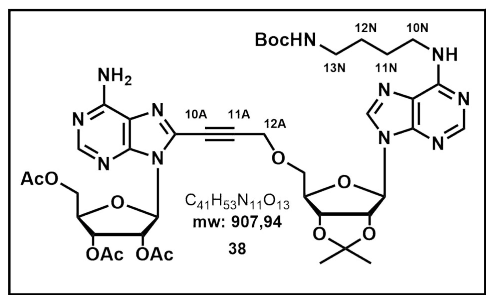
To a solution of bromo derivative **3** (198 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **4** (307 mg, 0.63 mmol, 1.5 equiv.) in THF (13 mL) was added NEt₃ (176 μ L, 1.26 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (8 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (24 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon

degassing. After 5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (31 g SiO₂, 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **16** (148 mg, 40%) as well as the homocoupling product (63 mg, 20% of the starting alkyne) both as pale yellow foams.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.43 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.64 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.05 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.10 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.14 (s, 3H, CH₃ OAc), 3.39-3.47 (m, 2H, H-11N), 3.77 (br s, 2H, H-10N), 3.84 (dd, $J_{5'N,4'N} = 5.1$ Hz, $J_{5'N,4'N} = 10.2$ Hz, 1H, H-5'N), 3.92 (dd 1H, $J_{5''N,4'N} = 4.0$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 10.2$ Hz, H-5''N), 4.32 (dd, $J_{5'N,4'N} = 6.0$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 11.8$ Hz, 1H, H-5'A), 4.41 (td, $J_{4'A,3'A} = J_{4'A,5'A} = 6.0$ Hz, $J_{4'A,5''A} = 3.8$ Hz, 1H, H-4'A), 4.47 (br s, 2H, CH₂-12A), 4.50-4.55 (m, 2H, H-4'N and H-5''A), 5.07 (dd, $J_{3'N,4'N} = 3.0$ Hz, $J_{3'N,2'N} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'N), 5.23 (br s, 1H, NHBoc), 5.35-5.41 (br, 1H, H-2'N), 5.96 (t, $J_{3'A,2'A} = J_{3'A,2'N} = 6.1$ Hz, 1H, H-3'A), 6.19 (d, $J_{1'N,2'N} = 2.2$ Hz, 1H, H-1'N), 6.22 (d, $J_{1'A,2'A} = 4.2$ Hz, 1H, H-1'A), 6.24 (br s, 2H, NH₂), 6.30 (dd, $J_{2'A,1'A} = 4.2$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 6.1$ Hz, 1H, H-2'A), 6.46 (br s, 1H, NH-6N), 8.02 (s, 1H, H-8N), 8.37 (s, 1H, H-2A), 8.42 (s, 1H, H-2N).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.4 (CH₃ OAc), 20.5 (CH₃ OAc), 20.6 (CH₃ OAc), 25.4 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₃ isop.), 28.4 (3C, CH₃ Boc), 40.7 (C-10N and C-11N), 59.0 (C-12A), 63.1 (C-5'A), 70.5 (C-5'N), 70.5 (C-3'A), 72.5 (C-2'A), 76.7 (C-10A), 79.5 (Cq *t*Bu), 79.9 (C-4'A), 81.8 (C-3'N), 84.7 (C-2'N), 85.7 (C-4'N), 87.4 (C-1'A), 91.1 (C-1'N), 91.8 (C-11A), 114.4 (Cq isop.), 119.8 (C-5A), 120.2 (C-5N), 133.3 (C-8A), 138.9 (C-8N), 148.9 (C-4N), 149.5 (C-4A), 153.2 (C-2N), 154.3 (C-2A), 155.0 (C-6N), 155.5 (C-6A), 156.3 (Cq carbamate), 169.4 (Cq OAc), 169.5 (Cq OAc), 170.6 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₃₉H₄₉N₁₁O₁₃+H]⁺ 880.3589, found 880.3582.

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-8-[3-(*N*⁶-(4-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-adenosinyl)prop-1-yn-1-yl]adenosine (17)

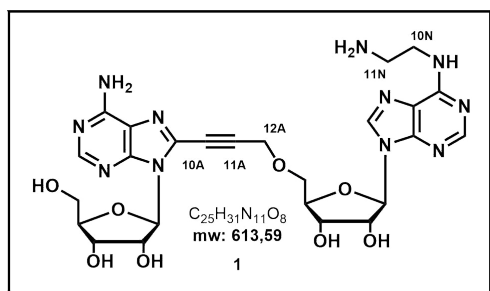
To a solution of bromo derivative **3** (184 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **5** (206 mg, 0.40 mmol, 1.5 equiv.) in THF (8.0 mL) was added NEt₃ (112 μ L, 0.8 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (5 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon

degassing. After 5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 1 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **17** (82 mg, 34%) along with homocoupling product (106 mg, 51% of the starting alkyne) both as pale yellow foams.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.41 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.46 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.56-1.66 (m, 2H, CH₂-12N), 1.64 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.67-1.79 (m, 2H, H-11N), 2.05 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.10 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.15 (s, 3H, CH₃ OAc), 3.15-3.25 (m, 2H, H-13N), 3.60-3.70 (m, 2H, H-10N), 3.85 (dd, $J_{5'N,4'N} = 5.2$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.1$ Hz, 1H, H-5'N), 3.92 (dd, $J_{5''N,4'N} = 4.2$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 10.1$ Hz, 1H, H-5''N), 4.33 (dd, 1H, $J_{5'A,4'A} = 6.0$ Hz, $J_{5'A,5''A} = 11.8$ Hz, H-5'A), 4.36 (td, $J_{4'A,3'A} = 3.7$ Hz, $J_{4'A,5'A} = J_{4'A,5''A} = 6.0$ Hz, 1H, H-4'A), 4.48 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H, CH₂ 12A), 4.50-4.55 (m, 2H, H-4'N and H-5'A), 5.10 (dd, $J_{3'N,2'N} = 6.2$ Hz, $J_{3'N,4'N} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'N), 5.41 (dd, $J_{2'N,1'N} = 2.2$ Hz, $J_{2'N,3'N} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'N), 5.93 (br, 2H, NH₂), 5.96 (pt, 1H, $J_{3'A,2'A} = J_{3'A,4'A} = 6.0$ Hz, H-3'A), 6.18 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-1'N), 6.23 (d, 1H, $J_{1'A,2'A} = 4.2$ Hz, H-1'A), 6.30 (dd, $J_{2'A,1'A} = 4.2$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 6.0$ Hz, 1H, H-2'A), 7.96 (s, 1H, H-8N), 8.39 (s, 1H, H-2A), 8.43 (s, 1H, H-2N).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.4 (CH₃ OAc), 20.5 (CH₃ OAc), 20.7 (CH₃ OAc), 25.4 (CH₃ isop.), 27.0 (C-12N), 27.2 (CH₃ isop.), 27.3 (C-11N), 28.4 (3C, CH₃ Boc), 40.0 (C-10N and C-13N), 59.1 (C-12A), 63.1 (C-5'A), 70.5 (C-3'A), 70.6 (C-5'N), 72.5 (C-2'A), 75.6 (C-10A), 79.2 (Cq *t*Bu), 79.9 (C-4'A), 81.9 (C-3'N), 84.6 (C-2'N), 85.8 (C-4'N), 87.4 (C-1'A), 91.1 (C-1'N), 91.9 (C-11A), 114.4 (Cq isop.), 118.1 (C-5A), 119.8 (C-5N), 133.4 (C-8A), 138.7 (C-8N), 148.9 (C-4N), 149.4 (C-4A), 153.4 (C-2N), 154.3 (C-2A), 154.7 (C-6N), 155.4 (C-6A), 156.1 (Cq carbamate), 169.4 (Cq OAc), 169.5 (Cq OAc), 170.6 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₄₁H₅₃N₁₁O₁₃+H]⁺ 908.3803 found 908.4268.

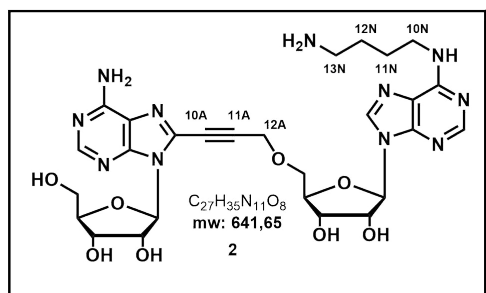
8-[3-(*N*⁶-(2-aminoethyl)-5'-*O*-adenosinyl)prop-1-yn-1-yl]adenosine (**1**)

To a solution of **16** (46 mg, 0.03 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (5.0 mL), was added NH₄OH (28%, 1.0 mL, 13.3 mmol, 440 equiv.). After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (70% in water, 1.0 mL). After 2 hours at room temperature, the reaction was diluted with ice cold water (10 mL) and was lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC (0-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 20 min, *t_R* = 13.3 min) to yield fully deprotected compound **1** (12.5 mg, 42%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.84 (t, *J*_{11N,10N} = 6.2 Hz, 2H, H-11N), 3.50 (br, 2H, H-10N), 3.54 (d, *J*_{5'N,4'A} = 4.2 Hz, *J*_{5'A,5''A} = 12.2 Hz, 1H, H-5'A), 3.68 (d, *J*_{5''A,4'A} = 3.9 Hz, *J*_{5''A,5'A} = 12.2 Hz, 1H, H-5''A), 3.76 (dd, *J*_{5'N,4'N} = 5.5 Hz, *J*_{5'N,4'N} = 10.6 Hz, 1H, H-5'N), 3.85 (dd, *J*_{5''N,4'N} = 3.6 Hz, *J*_{5''N,5'N} = 10.6 Hz, 1H, H-5''N), 3.97-4.02 (m, 1H, H-4'A), 4.08-4.13 (m, 1H, H-4'N), 4.19-4.23 (m, 2H, H-3'A and H-3'N), 4.60 (s, 2H, CH₂-12A), 4.63 (t, 1H, *J*_{2'N,1'N} = *J*_{2'N,3'N} = 5.2 Hz, H-2'N), 5.01 (dd, *J*_{2'A,1'A} = 6.6 Hz, *J*_{2'A,3'A} = 5.3 Hz, 1H, H-2'A), 5.93 (d, 1H, *J*_{1'N,2'N} = 5.1 Hz, H-1'N), 5.95 (d, *J*_{1'A,2'A} = 6.6 Hz, 1H, H-1'A), 7.63 (br s, 2H, NH₂), 7.73 (br s, 2H, NH₂), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 40.9 (C-10N and C-11N), 58.8 (C-12A), 62.6 (C-5'A), 70.7 (C-5'N), 71.0 (C-3'N), 71.4 (C-3'A), 72.1 (C-2'A), 73.7 (C-2'N), 75.5 (C-10A), 83.3 (C-4'N), 87.2 (C-4'A), 88.0 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 92.6 (C-11A), 119.8 (C-5A and C-5N), 133.5 (C-8A), 139.8 (C-8N), 148.9 (C-4A and C-4N), 153.1 (C-2A), 153.9 (C-2N), 156.6 (C-6A and C-6N).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₅H₃₁N₁₁O₈+H]⁺ 614.2435, found 614.2433.

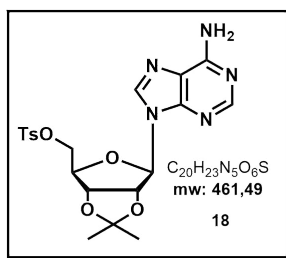
8-[3-(*N*⁶-(4-Aminobutyl)-5'-*O*-adenosinyl)prop-1-yn-1-yl]adenosine (**2**)

To a solution of **17** (63 mg, 0.07 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (10.0 mL), was added NH_4OH (28%, 2.0 mL, 26.6 mmol, 440 equiv.). After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (70% in water, 2.0 mL). After 2 hours at room temperature, the reaction was diluted with ice cold water (10 mL) and was lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC (0-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 20 min, t_R = 8.7 min) to yield fully deprotected compound **2** (22.6 mg, 50%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 1.48-1.56 (m, 2H, H-11N), 1.58-1.66 (m, 2H, CH_2 -12N), 2.73 (t, $J_{10\text{N},11\text{N}}$, 2H, H-10N), 3.50 (br, 2H, H-13N), 3.54 (dd, $J_{5'\text{A},4'\text{A}} = 4.2$ Hz, $J_{5'\text{A},5''\text{A}} = 12.1$ Hz, 1H, H-5'A), 3.69 (dd, $J_{5''\text{A},4'\text{A}} = 3.9$ Hz, $J_{5''\text{A},5'\text{A}} = 12.2$ Hz, 1H, H-5''A), 3.76 (dd, $J_{5'\text{N},4'\text{N}} = 5.5$ Hz, $J_{5'\text{N},5''\text{N}} = 10.5$ Hz, 1H, H-5'N), 3.85 (dd, $J_{5''\text{N},4'\text{N}} = 3.8$ Hz, $J_{5''\text{N},5'\text{N}} = 10.5$ Hz, 1H, H-5''N), 3.98-4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.08-4.13 (m, 1H, H-4'N), 4.19-4.23 (m, 2H, H-3'A and H-3'N), 4.60 (s, 2H, CH_2 -12A), 4.63 (pt, $J_{2'\text{N},1'\text{N}} = J_{2'\text{N},3'\text{N}} = 5.3$ Hz, 1H, H-2'N), 5.00 (dd, $J_{2'\text{A},1'\text{A}} = 6.7$ Hz, $J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 5.3$ Hz, 1H, H-2'A), 5.93 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-1'N), 5.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-1'A), 7.63 (br s, 2H, NH_2), 7.79 (br s, 2H, NH_2), 8.17 (s, 1H, C-2N), 8.23 (s, 1H, C-2A), 8.32 (s, 1H, C-8N).

¹³C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 25.8 (C-11N), 26.5 (C-12N), 39.4 (C-10N and C-13N), 58.7 (C-12A), 62.5 (C-5'A), 70.7 (C-5'N), 71.3 (C-3'N), 71.3 (C-3'A), 72.1 (C-2'A), 73.6 (C-2'N), 75.5 (C-10A), 83.3 (C-4'N), 85.1 (C-4'A), 87.8 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 92.7 (C-11A), 119.7 (C-5A and C-5N), 133.7 (C-8A), 139.6 (C-8N), 148.8 (C-4A and C-4N), 153.2 (C-2A), 153.9 (C-2N), 156.4 (C-6A and C-6N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_{11}\text{O}_8 + \text{H}]^+$ 642.2748, found 642.2748.

5'-O-Tosyl-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (18)

A solution of 2',3'-O-isopropylidene adenosine (10.0 g, 32.5 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (100 mL) was cooled down to 0 °C before adding a solution of tosyl chloride (7.44 g, 39.0 mmol, 1.2 equiv.) in pyridine (15 mL) dropwise. After 48 hours at -20 °C, the reaction was quenched with water (10 mL) and slowly allowed back to room temperature. The crude was diluted with water (500 mL) and extracted with AcOEt (1x 200 mL). The organic layer was then washed once with water (1x 125 mL), twice with a 5% H_2SO_4 solution (2x 200 mL) and three times with brine (3x 125 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to yield the tosylated compound **18** (13.53 g) as a yellow foam which was used without further purification.

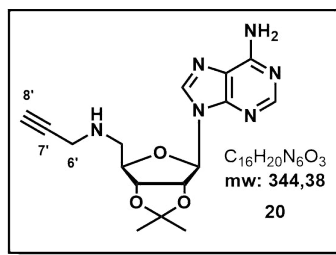
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.38 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.61 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.41 (s, 3H, CH_3 Ts), 4.25 (dd, $J_{5',4'} = 6.0$ Hz, $J_{5',5''} = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 4.31 (dd, $J_{5'',4'} = 4.4$ Hz, $J_{5'',5'} = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.48-4.52 (m, 1H, H-4'), 5.07 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.36 (dd, $J_{2',1'} = 2.2$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.74 (br s, 2H, NH_2 -6), 6.07 (d, $J_{1',2'} = 2.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, CH Ts-m), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, CH Ts-o), 7.85 (s, 1H, H-8), 8.25 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 21.6 (CH_3 -Ts), 25.3 (CH_3 isop.), 27.0 (CH_3 isop.), 69.1 (C-5'), 81.6 (C-3'), 84.2 (C-2'), 84.8 (C-4'), 91.0 (C-1'), 114.6 (Cq isop.), 120.2 (C-5), 127.8 (2C, Ts-O), 129.6 (C Ts-M), 132.3 (C Ts-I), 139.8 (C-8), 145.0 (2C, Ts-P), 149.0 (C-4), 153.0 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{20}H_{23}N_5O_6S+H]^+$ 462.1447 found 462.1448.

5'-deoxy-5'-propargylamino-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (20)

Procedure A : Starting from tosylated alcohol **18** (page 83)



A solution of **18** (2.3 g, 5.0 mmol, 1.0 equiv.) in propargylamine (5.9 mL, 20 equiv.) was stirred at 35 °C during 16 hours. Volatiles were then removed and the residue dissolved in DCM (150 mL) then washed once with water (50 mL). The aqueous layer was then extracted once using DCM (200 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. Because of TsOH tendency to co-elutes with the final compound, the residue had to be purified twice by column chromatography (first one 60 g SiO_2 0 to 4% methanol

in dichloromethane; second one 50 g SiO₂ 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **20** (555 mg, 33% in two steps from **20**) as a white foam.

Procedure B : Starting from alcohol **19** (page 88)

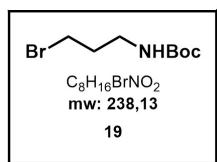
A solution of **19** (307 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.), in DCM (10.0 mL), was cooled down to 0 °C before adding DMP (508 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). After 7 hours at room temperature, the crude was filtered over a celite pad and the volatiles were removed *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous MeOH (5.0 mL) before adding propargylamine (96 µL, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) acetic acid (57 µL, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) and NaBH₃CN (94 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.). After 16 hours at room temperature, the reaction was diluted with AcOEt (30 mL), and washed with NaHCO₃ sat. (30 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO₂, 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **20** (93 mg, 27%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.73 (dd, J_{5',4'} = 6.0 Hz, J_{5'',5'} = 12.3 Hz, 1H, H-5'), 2.79 (dd, J_{5'',4'} = 5.7 Hz, J_{5'',5'} = 12.3 Hz, 1H, H-5''), 2.99 (t, J_{8',6'} = 2.3 Hz, 1H, CH-8'), 3.29-3.31 (m, 2H, CH₂-6'), 4.20-4.25 (m, 1H, H-4'), 4.97 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.44 (dd, J_{2',1'} = 3.2 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.06 (d, J_{1',2'} = 3.2 Hz, 1H, H-1'), 7.31 (s, 2H, NH₂-6), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.34 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 37.9 (CH₂-6'), 50.2 (C-5'), 74.0 (C-7'), 82.6 (C-2), 83.1 (C-3), 83.2 (CH-8), 85.2 (C-4'), 89.7 (C-1'), 113.7 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.4 (C-8), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₆H₂₀N₆O₃+Na]⁺ 345.1675 found 345.1682

N-Boc-3-bromopropylamine (23)



To a suspension of 3-bromopropylamine hydrobromide (3.29 g, 15.0 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (75 mL) was added NEt₃ (2.51 mL, 18.0 mmol, 1.2 equiv.) followed by di-*tert*-butyl dicarbonate (3.28 g, 15.0 mmol, 1.0 equiv.). After 18 hours at room temperature, the crude was washed twice with a 5% aqueous citric acid solution (2x 60 mL) and once with brine (50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to yield protected amine **23** (3.54 g, 98%) as a white solid that was used without further purification.

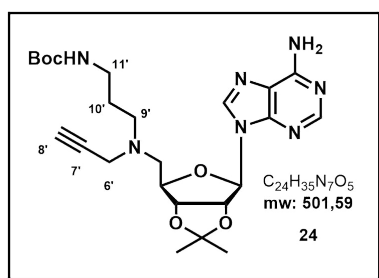
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 1.38 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.91 (quint. $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -2), 3.03 (td, $J_{1,2} = 6.6$ Hz, $J_{1,NH} = 5.8$ Hz, 2H, CH_2 -1), 3.51 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 -3), 6.88 (br t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 28.7 (3C, CH_3 Boc), 32.7 (C-3), 33.2 (C-2), 39.0 (C-1), 78.1 (Cq *t*Bu), 156.1 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_8\text{H}_{16}^{79}\text{BrNO}_2 + \text{Na}]^+$ 260.0262 found 260.0265.

5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-*N*-propargylamino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (24**)**

Procedure A : Starting from secondary amine **20** (page 83)



To a solution of **20** (172 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (5.0 mL), were added DIEA (261 μL , 1.5 mmol, 3.0 equiv.) and bromo derivative **23** (179 mg, 0.75 mmol, 1.5 equiv.). After 2h hours at 50 $^{\circ}\text{C}$, a second addition of DIEA (3.0 equiv.) and bromo derivative **23** (1.5 equiv.) was made. After six additional days at 50 $^{\circ}\text{C}$ volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO_2 , 3 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **20** (120 mg, 48%) as a white foam.

Procedure B : Starting from secondary amine **36** (page 91)

To a solution of **36** (596 mg, 1.3 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (13.0 mL), were added DIEA (1.35 mL, 7.7 mmol, 6.0 equiv.) and propargyl bromide (80% in toluene, 790 μL , 7.1 mmol, 5.5 equiv.). After 2 hours at room temperature, the reaction was diluted with AcOEt (100 mL) and washed twice with water (2x 50 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 3 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **24** (529 mg, 82%) as a white foam.

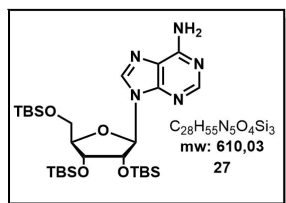
^1H NMR($\text{DMSO-}d_6$) δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.37 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.46 (quint., $J = 6.8$ Hz, 2H, H-7'), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-6'), 2.51-2.55 (m, 1H, H-5'), 2.67 (dd, $J_{5'',4'} = 7.6$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.1$ Hz, 1H, H-5''), 2.84-2.99 (m, 2H, H-8'), 3.01 (t, $J_{11',9'} = 2.2$ Hz, 1H, H-11'), 3.36 (dd, $J_{9',9''} = 17.5$ Hz, $J_{9',11'} = 2.2$ Hz, 2H, H-9'), 4.22 (td, $J_{4',3'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 6.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.99 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz,

$J_{3',4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.49 (dd, $J_{2',1'} = 2.4$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.14 (dd, $J_{1',2'} = 2.4$ Hz, 1H, H-1'), 6.72 (br, 1H, NH-8'), 7.30 (s, 2H, NH₂), 8.18 (s, 1H, H-8), 8.31 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.8 (C-7'), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 38.4 (C-8'), 42.4 (CH₂-9'), 51.5 (C-6'), 55.3 (C-5'), 76.0 (CH-11'), 77.8 (Cq *t*Bu), 79.2 (C-10'), 83.3 (C-3'), 83.4 (C-2'), 84.8 (C-4'), 89.7 (C-1'), 113.6 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.5 (C-8), 149.3 (C-4), 153.2 (C-2), 156.0 (Cq carbamate), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₄H₃₅N₇O₅+H]⁺ 502.2778 found 502.2770.

1',2',3'-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-adenosine (**27**)

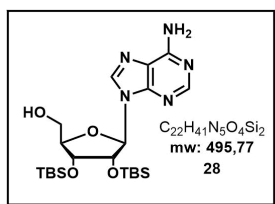


To a solution of TBSCl (2.64 g, 17.5 mmol, 3.5 equiv.) and imidazole (1.70 g, 25.0 mmol, 5.0 equiv.) in DMF (50 mL) was added adenosine (1.34 g, 5.0 mmol, 1.0 equiv.). After 16 hours at room temperature a second addition of TBSCl (1.0 equiv) and imidazole (1.0 equiv) was made. After an additional 24 hours at room temperature, the crude was diluted with DCM (100 mL) and washed twice with water (2x 100 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (120 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield the persilylated adenosine **27** (2.34 g, 77%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -0.2 (s, 3H, CH₃ TBS), -0.02 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.13 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.15 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.16 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.82 (s, 9H, *t*Bu TBS), 0.96 (s, 9H, *t*Bu TBS), 0.98 (s, 9H, *t*Bu TBS), 3.81 (dd, $J_{5',4'} = 2.8$ Hz, $J_{5',5''} = 11.2$ Hz, 1H, H-5'), 4.05 (dd, $J_{5'',4'} = 4.2$ Hz, $J_{5'',5'} = 11.2$ Hz, 1H, H-5''), 4.13-4.16 (m, 1H, H-4'), 4.34-4.35 (m, 1H, H-3'), 4.71-4.74 (m, 1H, H-2'), 5.73 (s, 2H, NH₂-6), 6.05 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H-1'), 8.17 (s, 1H, C-8), 8.36 (s, 1H, C-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (CH₃ TBS), -5.1 (2C, CH₃ TBS), -4.7 (CH₃ TBS), -4.41 (2C, CH₃ TBS), 17.9 (Cq *t*Bu), 18.1 (Cq *t*Bu), 18.5 (Cq *t*Bu), 25.7 (3C, CH₃ *t*Bu), 25.8 (3C, CH₃ *t*Bu), 26.1 (3C, CH₃ *t*Bu), 62.6 (C-5'), 72.0 (C-3'), 75.8 (C-2'), 85.5 (C-4'), 88.4 (C-1'), 120.1 (C-5), 139.8 (C-8), 150.0 (C-4), 152.7 (C-2), 155.3 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₈H₅₅N₅O₄Si₃+H]⁺ 610.3640 found 610.3651

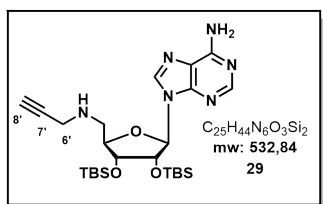
2',3'-Di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-adenosine (28)

A Solution of persilylated adenosine **27** (610 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (10 mL), was cooled down to 0 °C before adding TFA (50% in water, 7.66 mL, 50 mmol, 50 equiv.). After 4 hours at 0 °C the reaction was quenched by a slow addition of NaHCO₃ sat. solution (50 mL) followed by AcOEt (50 mL). The organic layer was then washed once with water (50 mL) and once with brine (50 mL) before being dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (50 g SiO₂, 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **28** (418 mg, 84%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -0.58 (s, 3H, CH₃ TBS), -0.12 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.13 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.15 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.77 (s, 9H, *t*Bu TBS), 0.97 (s, 9H, *t*Bu TBS), 3.68-3.76 (m, 1H, H-5'), 3.95 (dd, J_{5'',4'} = 1.6 Hz, J_{5'',5'} = 13.0 Hz, 1H, H-5''), 4.17-4.19 (m, 1H, H-4'), 4.35 (d app, J_{3',2'} = J_{3',4'} = 4.6 Hz, 1H, H-3'), 5.06 (dd, J_{2',1'} = 7.8 Hz, J_{2',3'} = 4.6 Hz, 1H, H-2'), 5.80 (d, J_{1',2'} = 5.8 Hz, 1H, H-1'), 5.95 (s, 2H, NH₂-6), 6.68 (br d, 1H, OH-5'), 7.85 (s, 1H, H-8), 8.35 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ -6.0 (CH₃ TBS), -4.7 (CH₃ TBS), -4.6 (2C, CH₃ TBS), 17.8 (Cq *t*Bu), 18.1 (Cq *t*Bu), 25.7 (3C, CH₃ *t*Bu), 25.8 (3C, CH₃ *t*Bu), 63.0 (C-5'), 73.9 (C-3'), 741 (C-2'), 89.6 (C-4'), 91.0 (C-1'), 121.4 (C-5), 141.2 (C-8), 148.7 (C-4), 152.3 (C-2), 156.0 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂+H]⁺ 496.2775 found 496.2785

5'-deoxy-5'-propargylamino-2',3'-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-adenosine (29)

A solution of **28** (248 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.), in DCM (5.0 mL), was cooled down to 0 °C before adding DMP (255 mg, 0.6 mmol, 1.2 equiv.). After 4 hours at room temperature, a second addition of DMP was made (0.6 equiv.). After 16 hours at room temperature, the crude was filtered over a celite pad and the volatiles were removed *in vacuo*. The residue was dissolved in anhydrous MeOH (2.5 mL) before adding propargylamine (48 μL, 0.75 mmol, 1.5 equiv.) acetic acid (29 μL, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) and NaBH₃CN (47 mg, 0.75 mmol, 1.0 equiv.). After 24 hours at room temperature, the reaction was diluted with AcOEt (15 mL), and washed with NaHCO₃ sat. (15 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* and the residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO₂, 0 to 10% methanol in dichloromethane) to

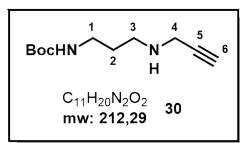
yield compound **29** (68 mg, 25%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -0.38 (s, 3H, CH₃ TBS), -0.06 (s, 3H, CH₃ TBS), 0.13 (s, 6H, 2x CH₃ TBS), 0.79 (s, 9H, CH₃ *t*Bu), 0.96 (s, 9H, CH₃ *t*Bu), 2.25 (t, J_{8',6'} = 2.4 Hz, 1H, H-8'), 2.95 (dd, J_{5',4'} = 5.6 Hz, J_{5',5''} = 12.4 Hz, 1H, H-5'), 3.11 (dd, J_{5'',4'} = 3.2 Hz, J_{5',5''} = 12.4 Hz, 1H, H-5''), 3.52 (ABq, J = 17.0 Hz, 2H, CH₂-6'), 4.25-4.29 (m, 1H, H-4'), 4.31 (dd, J_{3',2'} = 4.5 Hz, J_{3',4'} = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 5.05 (dd, J_{2',1'} = 6.4 Hz, J_{2',3'} = 4.5 Hz, 1H H-2'), 5.75 (s, 2H, NH₂-6), 5.83 (d, J_{1',2'} = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 7.91 (s, 1H, H-8), 8.37 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (CH₃ TBS), -4.6 (2C, CH₃ TBS), -4.4 (CH₃ TBS), 17.8 (Cq TMS), 18.1 (Cq TMS), 25.7 (3C, CH₃ *t*Bu TBS), 25.8 (3C, CH₃ *t*Bu TBS), 38.4 (CH₂-6'), 50.2 (C-5'), 771.3 (CH-8'), 73.7 (2C, C-2' and C-3'), 82.0 (C-7'), 85.7 (C-4'), 90.0 (C-1'), 120.9 (C-5), 140.8 (C-8), 149.6 (C-4), 152.8 (C-2), 155.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₅H₄₄N₆O₃Si₂+H]⁺ 533.3091 found 533.3098

N-(3-N-Boc-amino)propyl-N-propargylamine (**30**)

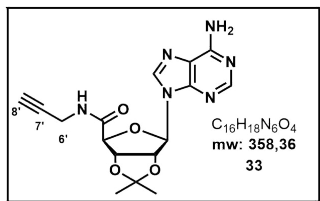


A solution of **23** (3.46 g, 14.5 mmol, 1.0 equiv.) in MeCN (58 mL) was heated to 40 °C before adding propargylamine (3.72 mL, 58.1 mmol, 4.0 equiv.). After 24 hours at 40 °C, volatiles were removed, the residue was dissolved in DCM (100 mL) and washed once with NaHCO₃ sat. solution (100 mL). The aqueous layer was then extracted twice with DCM (2x 100 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (100 g SiO₂, 5 to 7% methanol in dichloromethane) to yield compound **30** (1.99 g, 65%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.68 (quint. J_{2,3} = J_{2,1} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-2), 2.22 (t, J_{6,4} = 2.4 Hz, 1H, CH-6), 2.77 (t, J_{3,2} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-3), 3.20-3.26 (m, 2H, CH₂-1), 3.44 (d, J_{4,6} = 2.4 Hz, 2H, CH₂-4), 4.9 (s, 1H, NH-1).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 28.4 (3C, CH₃ Boc), 29.9 (CH₂-2), 38.1 (CH₂-4), 38.9 (CH₂-1), 46.2 (CH₂-3), 71.3 (CH-6), 82.1 (Cq-5), 156.0 (Cq *t*Bu). (Cq carbamate could not be found)

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₁H₂₀N₂O₂+H]⁺ 213.1603 found 213.1607

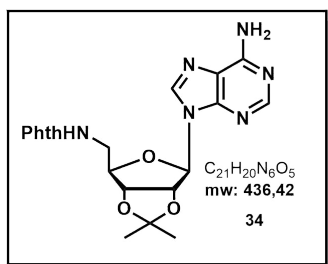
5'-deoxy-5'-propargylamino-5'-oxo-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (33)

To a solution of **19** (307 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.), in DCM (10.0 mL), was added 1.8 equiv. of DMP according to the following procedure : the solution is cooled down to 0 °C before adding 0.6 equiv of DMP (170 mg, 0.4 mmol). The reaction is then stirred 2 hours at room temperature before repeating the procedure. After the final addition, the reaction was stirred 1 hour before being filtered over a celite pad. Volatiles were removed *in vacuo* and the residue was dissolved in anhydrous DCE (5.0 mL) before adding propargylamine (96 μ L, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) and NaBH(OAc)₃ (318 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at room temperature, the reaction was diluted with H₂O (10 mL), and extracted with DCM (30 mL). NaHCO₃ sat. solution (10 mL) was added to the aqueous layer which was extracted a second time with DCM (60 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (21 g, SiO₂, 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **20** (34 mg, 10%) as a white foam along with the amide **33** (137 mg, 40%) as a white foam

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.95 (t, $J_{8',6'} = 2.5$ Hz, 1H, H-8'), 3.56-3.61 (m, 1H, H-6'), 3.71-3.77 (m, 1H, H-6''), 4.59 (d, $J_{8',6'} = 2.3$ Hz, 1H, H-4'), 5.30 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.34 (dd, $J_{2',1'} = 2.2$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.31 (d, $J_{1',2'} = 2.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.28 (s, 2H, NH₂-6), 8.13 (s, 1H, H-2), 8.29 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.6 (CH₃ isop.), 27.3 (CH₃ isop.), 28.2 (CH₂-6'), 73.2 (CH-8'), 80.8 (C-7'), 83.4 (C-2'), 83.6 (C-3'), 85.7 (C-4'), 90.1 (C-1'), 113.8 (Cq isop.), 119.5 (C-5), 140.6 (C-8), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 156.6 (C-6), 169.0 (C-5').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₆H₁₈N₆O₄+H]⁺ 359.1468 found 359.1461

5'-Deoxy-5'-phthalimido-2',3'-O-isopropylidene adenosine (34)

To a suspension of 2',3'-O-isopropylidene adenosine ¹ (6.15 g, 20.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (80 mL) was added PPh₃ (5.25 g, 20.0 mmol, 1.0 equiv.) followed by phthalimide (3.03 g, 20.6 mmol, 1.03 equiv.). DEAD (40% in toluene, 9.15 mL, 20.0 mmol, 1.0 equiv.) was then added dropwise and the resulting orange solution was stirred overnight at room temperature. The white precipitate was filtered and

1. Commercially available, CAS : 362-75-4

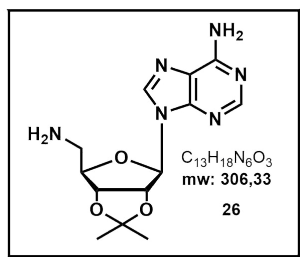
washed using Et₂O (2x 40 mL). Filtrate was concentrated *in vacuo* before being purified by flash column chromatography (40 g SiO₂, 5% methanol in dichloromethane, isocratic). The precipitate and the purified product were combined to yield compound **34** as white solid (7.11 g, 82%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.31 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.52 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.88 (dd, $J_{5',4'} = 6.4$ Hz, $J_{5',5''} = 14.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.93 (dd, $J_{5'',4'} = 5.6$ Hz, $J_{5'',5'} = 5.6$ Hz, 1H, H-5''), 4.39 (ddd, $J_{4',3'} = 3.8$ Hz, $J_{4',5'} = 5.6$ Hz, $J_{4',5''} = 6.2$ Hz, 1H, H-4'), 5.18 (dd, $J_{3',4'} = 3.8$ Hz, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J_{2',1'} = 1.9$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.19 (d, $J_{1',2'} = 1.9$ Hz, H-1'), 7.28 (br s, 2H, NH₂), 7.82 (br s, 4H, H-Phth), 7.88 (s, 1H, H-8), 8.28 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.8 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 39.8 (C-5'), 82.3 (C-3'), 83.9 (C-2'), 84.2 (C-4'), 89.2 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 123.5 (2C, CH Phth), 131.9 (2C, Cq Phth), 134.9 (2C, CH Phth), 140.8 (C-8), 149.1 (C-4), 152.9 (C-2), 156.5 (C-6), 168.2 (2C, CO Phth).

HRMS (ESI-TOF) : m/z calcd for [C₂₁H₂₀N₆O₅+H]⁺ 437.1573 found 437.1575.

5'-Deoxy-5'-amino-2',3'-O-isopropylidene adenosine (**26**)



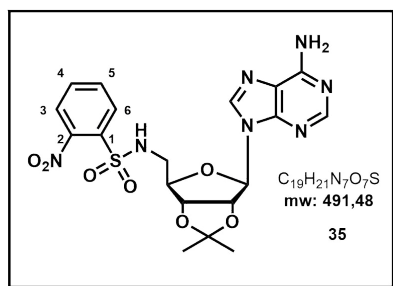
To a solution of **34** (3.35 g, 7.7 mmol, 1.0 equiv.) in absolute ethanol (77 mL) was added hydrazine hydrate (3.89 mL, 123.2 mmol, 16.0 equiv.) under vigorous stirring. After 1 hour at 80 °C, the thick precipitate was filtered and washed twice using EtOH (2x 40 mL). The filtrate was concentrated *in vacuo* before being dissolved in water (35 mL). The resulting solution was first acidified to pH = 4.0 using AcOH then basified to pH = 10.0 using an aqueous solution of aqueous NaOH (6 M) before being extracted with DCM (7x 150 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to yield deprotected amine **26** (2.13 g, 90%) as a white solid which was used without further purification.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.68 (dd, $J_{5',4'} = 5.8$ Hz, $J_{5',5''} = 13.2$ Hz, 1H, H-5'), 2.73 (dd, $J_{5'',4'} = 5.8$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.2$ Hz, 1H, H-5''), 4.09 (ddd, $J_{4',3'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 5.8$ Hz, $J_{4',5''} = 5.8$ Hz, 1H, H-4'), 4.98 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J_{2',1'} = 3.3$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.08 (d, $J_{1',2'} = 3.3$ Hz, 1H, H-1'), 7.31 (br s, 2H, NH₂-6), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.37 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 44.2 (C-5'), 82.0 (C-3'), 83.2 (C-2'), 87.5 (C-4'), 89.6 (C-1'), 113.6 (Cq isop.), 119.6 (C-5), 140.4 (C-8), 149.5 (C-4), 153.2 (C-2), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF) : m/z calcd for [C₁₃H₁₈N₆O₃+H]⁺ 307.1519 found 307.1522.

5'-Deoxy-5'-(2-nitrobenzenesulfonamido)2',3'-O-isopropylidene-adenosine (**35**)

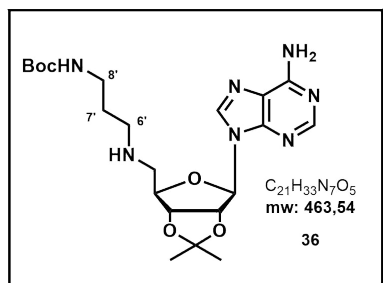


To a solution of **26** (2.30 g, 7.5 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (75 mL) was added 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (3.82 g, 17.25 mmol, 2.3 equiv.). After 2 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (240 g SiO₂, 3% methanol in dichloromethane, isocratic) to yield compound **35** (3.25 g, 88%) as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 1.29 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.52 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.19-3.33 (m, 2H, H-5' and H-5''), 4.24 (td, $J_{4',3'} = 2.9$ Hz, $J_{4',5'} = 5.7$ Hz, 1H, H-4'), 4.95 (dd, $J_{3',4'} = 2.9$ Hz, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.37 (dd, $J_{2',1'} = 2.9$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.12 (d, $J_{1',2'} = 2.9$ Hz, 1H, H-1'), 7.38 (s, 2H, NH₂-6), 7.72 (td, $J_{5Ns,3Ns} = 1.2$ Hz, $J_{5Ns,4Ns} = J_{5Ns,6Ns} = 7.7$ Hz, 1H, H-5Ns), 7.80 (td, $J_{4Ns,3Ns} = J_{4Ns,5Ns} = 7.7$ Hz, $J_{4Ns,6Ns} = 1.2$ Hz, 1H, H-4Ns), 7.86 (dd, $J_{6Ns,4Ns} = 1.4$ Hz, $J_{6Ns,5Ns} = 7.7$ Hz, 1H, H-6Ns), 7.92 (dd, $J_{3Ns,4Ns} = 7.7$ Hz, $J_{3Ns,5Ns} = 1.2$ Hz, 1H, H-3Ns), 8.13 (s, 1H, H-8), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.60 (br s, 1H, NH-5').

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 25.6 (CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 45.1 (C-5'), 82.0 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.7 (C-4'), 90.0 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 124.8 (C-3Ns), 129.9 (C-6Ns), 132.9 (C-5Ns), 133.0 (C-1Ns), 134.5 (C-4Ns), 140.6 (C-8), 148.0 (C-2Ns), 148.9 (C-4), 153.1 (C-2), 156.7 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₉H₂₁N₇O₇S+H]⁺ 492.1302 found 492.1302.

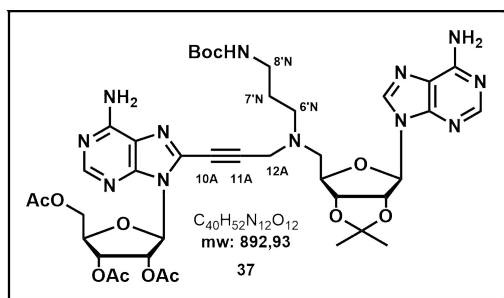
5'-(3-(*N*-Boc-amino)propanamino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (36)

To a solution of **35** (800 mg, 1.63 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (16 mL) was added K_2CO_3 (675 mg, 4.88 mmol, 3.0 equiv.) followed by compound **23** (465 mg, 1.95 mmol, 1.2 equiv.). After 24 hours at 50 °C a second addition of compound **23** (233 mg, 0.98 mmol, 0.6 equiv.) was made. After an additional 24 hours at 50 °C, thiophenol (355 μ L, 3.26 mmol, 2.0 equiv.) was added. After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (85 g SiO_2 70-230 mesh, 5 to 11% methanol in dichloromethane) to yield compound **36** (606 mg, 79%) as a white foam.

1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.36 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.48 (quint., $J = 6.8$ Hz, 2H, H-7'), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.46-2.51 (m, 2H, H-6'), 2.70 (dd, $J_{5',4'} = 5.9$ Hz, $J_{5',5''} = 12.0$ Hz, 2H, H-5' and H-5''), 2.93 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H, H-8'), 4.21 (td, $J_{4',3'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 5.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.97 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.09 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 6.75 (br, 1H, NH-9'), 7.30 (s, 2H, NH_2 -6), 8.16 (s, 1H, H-8), 8.35 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 28.7 (3C, CH_3 Boc), 30.1 (C-9'), 38.51 (C-8'), 47.3 (C-6'), 51.5 (C-5'), 77.8 (Cq *t*Bu), 82.7 (C-3'), 83.2 (C-2'), 85.3 (C-4'), 89.8 (C-1'), 113.7 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.4 (C-8), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 156.1 (Cq carbamate), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{21}H_{33}N_7O_5+H]^+$ 464.2621 found 464.2628.

5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-*N*-[3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (37)

To a solution of bromo derivative **3** (260 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **24** (414 mg, 0.82 mmol, 1.5 equiv.) in THF (16.5 mL) was added NEt_3 (230 μ L, 1.65 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (10 mg, 10 mol%) and $Pd(PPh_3)_4$ (32 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 4 hours at 60 °C a second addition of $Pd(PPh_3)_4$

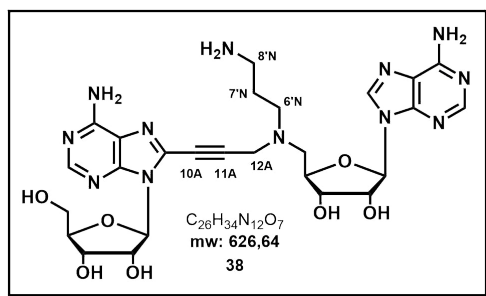
(32 mg, 5 mol%) was made. After 18 hours at 60 °C, crude was filtered over celite and volatiles were removed. The residue was purified by flash column chromatography (31 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield **37** (310 mg, 63%) as well as the homocoupling product (147 mg, 26% of the starting alkyne) both as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.55 (m, 5H, CH₃ isop and CH₂-7'N), 1.95 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.96 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.06 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.54 (m, 2H, H-6'N), 2.66 (dd, $J_{5'N,4'N}$ = 6.0 Hz, $J_{5'N,5''N}$ = 13.2 Hz, 1H, H-5'N), 2.82 (dd, $J_{5''N,4'N}$ = 8.0 Hz, $J_{5''N,5'N}$ = 13.2 Hz, 1H, H-5''N), 2.97 (m, 2H, H-8'N), 3.82 (ABq, J = 18.2 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.16 (dd, $J_{5'A,4'A}$ = 5.6 Hz, $J_{5'A,5''A}$ = 12.0 Hz), 4.31 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.41 (dd, $J_{5''A,4'A}$ = 3.7 Hz, $J_{5''A,5'A}$ = 12.0 Hz, 1H, H-5''A), 5.04 (dd, $J_{3'N,2'N}$ = 6.4 Hz, $J_{3'N,4'N}$ = 2.8 Hz, 1H, H-3'N), 5.51 (dd, $J_{2'N,1'N}$ = 2.5 Hz, $J_{2'N,3'N}$ = 6.4 Hz, 1H, H-2'N), 5.72 (t, $J_{3'A,2'A}$ = $J_{3'A,4'A}$ = 6.0 Hz, 1H, H-3'A), 6.11 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 4.5 Hz, 1H, H-1'A), 6.17 (d, $J_{1'N,2'N}$ = 2.5 Hz, 1H, H-1'N), 6.19 (dd, $J_{2'A,1'A}$ = 4.6 Hz, $J_{2'A,3'A}$ = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 6.77 (br t, $J_{NH8'N,8'}$ = 5.4 Hz, 1H, NH-8'N), 7.31 (br s, 2H, NH₂-6N), 7.57 (br s, 2H, NH₂-6A), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.19 (s, 1H, H-2N), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 20.5 (CH₃ OAc), 20.7 (CH₃ OAc), 20.8 (CH₃ OAc), 25.7 (CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.9 (C-7'N), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 38.3 (C-8'N), 43.2 (C-12A), 51.8 (C-6'N), 55.3 (C-5'N), 62.9 (C-5'A), 70.2 (C-3'A), 71.7 (C-2'A), 74.34 (C-10A), 77.9 (Cq *t*Bu), 79.7 (C-4'A), 83.3 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.3 (C-4'N), 87.3 (C-1'A), 89.7 (C-1'N), 93.2 (C-11A), 113.8 (Cq isop.), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 133.3 (C-8A), 140.5 (C-8N), 149.0 (C-4N), 149.3 (C-4A), 153.2 (C-2A), 154.3 (C-2N), 156.1 (Cq carbamate), 156.4 (C-6N), 156.6 (C-6A), 169.7 (Cq OAc), 169.8 (Cq OAc), 170.4 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₄₀H₅₂N₁₂O₁₂+H]⁺ 893.3906 found 893.3939.

5'-(*N*-(3-amino)propyl-*N*-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl])amino-5'-deoxy-adenosine (**38**)



To a solution of **37** (296 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (3.3 mL), was added NH₄OH (28%, 808 μ L, 13.3 mmol, 40 equiv.). After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (50% in water, 10 mL). After 4 hours at room temperature, ice cold water was added (50 mL) and the reaction mixture was lyophilised. The residue was purified by

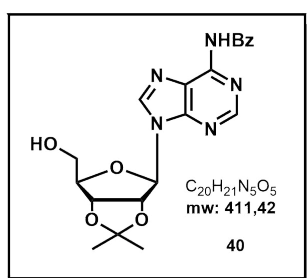
HPLC (0-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 10.8$ min) to yield fully deprotected compound **38** (125 mg, 61%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 1.65 (quint., $J_{7'N,6'N} = J_{7'N,8'N} = 6.8$ Hz, 2H, H-7'N), 2.65 (t, $J_{6'N,7'N} = 6.8$ Hz, 2H, H-6'N), 2.70 (t, $J_{8'N,7'N} = 6.8$ Hz, 2H, H-8'N), 2.80 (dd, $J_{5'N,4'N} = 4.8$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 13.7$ Hz, 1H, H-5'N), 2.90 (dd, $J_{5''N,4'N} = 6.8$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 13.7$ Hz, 1H, H-5''N), 3.53 (dd, $J_{5'A,4'A} = 4.0$ Hz, $J_{5'A,5''A} = 12.2$ Hz, 1H, H-5'A), 3.69 (dd, $J_{5''A,4'A} = 3.6$ Hz, $J_{5''A,5'A} = 12.2$ Hz, 1H, H-5''A), 3.80 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-12A}$), 3.99 (m, 1H, H-4'A), 4.06 (m, 1H, H-4'N), 4.15 (t app, $J_{3'N,2'N} = J_{3'N,4'N} = 5.0$ Hz, 1H, H-3'N), 4.21 (dd, $J_{3'A,2'A} = 5.1$ Hz, $J_{3'A,4'A} = 2.3$ Hz, 1H, H-3'A), 4.67 (t app, $J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.1$ Hz, 1H, H-2'N), 4.98 (dd, $J_{2'A,1'A} = 6.8$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 5.1$ Hz, 1H, H-2'A), 5.89 (d, $J_{1'N,2'N} = 5.3$ Hz, 1H, H-1'N), 6.00 (d, $J_{1'A,2'A} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (br s, 2H, $\text{NH}_2\text{-6N}$), 7.61 (br s, 2H, $\text{NH}_2\text{-6A}$), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.36 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 23.2 (C-7'N), 38.9 (C-8'N), 44.8 (C-12A), 51.8 (C-6'N), 56.2 (C-5'N), 62.7 (C-5'A), 71.5 (C-3'A), 72.2 (C-3'N and C-2'A), 73.1 (C-2'N), 74.8 (C-10A), 83.0 (C-4'N), 87.1 (C-4'A), 88.1 (C-1'N), 90.0 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 119.6 (C-5A and C-5N), 133.9 (C-8A), 140.2 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.6 (C-2A), 156.5 (C-6A and C-6N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_{12}\text{O}_7 + \text{H}]^+$ 627.2751 found 627.2731.

2',3'-*O*-Isopropylidene-*N*⁶-benzoyladenosine (**40**)



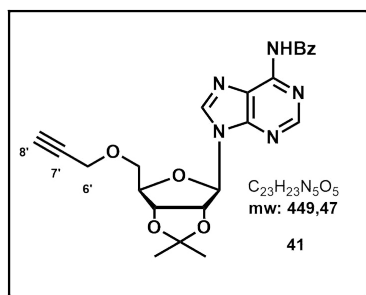
A solution of 2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (5.0 g, 16.3 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (160 mL) was cooled down to 0 °C before adding benzoyl chloride (9.39 mL, 81.5 mmol, 5.0 equiv.) dropwise. After 2 hours at room temperature, volatiles were removed before adding DCM (250 mL). The organic layer was washed once with NaHCO_3 sat. solution (200 mL) and twice with water (2x 80 mL) before being dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in pyridine (75 mL) before adding an aqueous solution of NaOH (1 M, 75 mL). After 30 min at room temperature, volatiles were removed before adding DCM (250 mL). The organic layer was washed once with NaHCO_3 sat. solution (200 mL) and twice with water (2x 80 mL) before being dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (300 g SiO_2 , 3% methanol in dichloromethane, isocratic) to yield **40** (5.74 g, 86%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1.36 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.58 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.52-3.62 (m, 2H, H-5' and H-5''), 4.28 (td, $J_{4',3'} = 6.1$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 2.5$ Hz, 1H, H-4'), 5.01 (dd, $J_{3',2'} = 6.1$ Hz, $J_{3',4'} = 2.5$ Hz, 1H, H-4'), 5.12 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, OH-5'), 5.42 (dd, $J_{2',1'} = 2.8$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.28 (d, $J_{1',2'} = 2.8$ Hz, 1H, H-1'), 7.53-7.59 (m, 2H, CH Bz-M), 7.63-7.68 (m, 1H, CH Bz-P), 8.03-8.08 (m, 2H, CH Bz-O), 8.68 (s, 1H, H-8), 8.78 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 62.0 (C-5'), 81.9 (C-3'), 84.0 (C-2'), 87.4 (C-4'), 90.3 (C-1'), 113.6 (Cq isop.), 126.2 (C-5), 128.9 (4C, CH Bz-M and CH Bz-O), 132.9 (CH Bz-P), 133.8 (C Bz-I), 143.6 (C-8), 150.9 (C-4), 152.2 (C-2), 152.3 (C-6), 166.1 (CO Bz).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5 + \text{H}]^+$ 412.1621 found 412.1671.

5'-O-Propargyl-2',3'-O-isopropylidene- N^6 -benzoyladenine (41)



A solution of **40** (2.05 g, 5.0 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (20 mL) was cooled down to 0 °C before adding NaH (60% in oil, 880 mg, 22 mmol, 4.4 equiv.). The mixture was stirred 1 hour before adding propargyl bromide (80% in toluene, 1.39 mL, 12.5 mmol, 2.5 equiv.). After 18 hours at 4 °C, the reaction was quenched by adding AcOH (1.5 mL) and stirring an additional hour at 4 °C. The crude was diluted with AcOEt (150 mL) and washed with water (1x 50 mL). The aqueous layer was then extracted once with AcOEt (80 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (100 g, SiO_2 , 0 to 1.5% methanol in dichloromethane) to yield **41** (1.21 g, 54%) as a white foam.

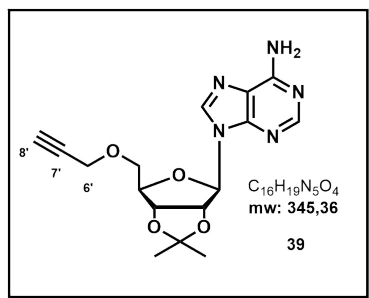
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.43 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.67 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.46 (t, $J_{8',6'} = 2.4$ Hz, 1H, H-8'), 3.76 (dd, $J_{5',4'} = 4.2$ Hz, $J_{5',5''} = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.82 (dd, $J_{5'',4'} = 3.4$ Hz, $J_{5'',5'} = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.14 (d, $J_{6',8'} = 2.4$ Hz, 2H, H-6'), 4.58-4.60 (m, 1H, H-4'), 5.04 (dd, $J_{3',2'} = 6.1$ Hz, $J_{3',4'} = 2.5$ Hz, 1H, H-3'), 5.35 (dd, $J_{2',1'} = 2.4$ Hz, $J_{2',3'} = 6.1$ Hz, 1H, H-2'), 6.31 (d, $J_{1',2'} = 2.4$ Hz, 1H, H-1'), 7.51-7.56 (m, 2H, CH Bz-m), 7.60-7.64 (m, 1H, CH Bz-p), 8.03-8.07 (m, 2H, CH Bz-o), 8.30 (s, 1H, H-8), 8.85 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.3 (CH_3 isop.), 27.18 (CH_3 isop.), 58.6 (C-6'), 69.8 (C-5'), 75.5 (C-8'), 78.6 (C-7'), 81.9 (C-3'), 85.0 (C-2'), 86.0 (C-4'), 91.7 (C-1'), 114.3 (Cq

isop.), 123.4 (C-5), 127.9 (2C, CH Bz-o), 128.8 (2C, CH Bz-m), 132.7 (2C, CH Bz-p), 133.7 (C Bz-i), 141.8 (C-8), 149.5 (C-6), 151.5 (C-4), 152.8 (C-2), 164.6 (CO Bz).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{23}H_{23}N_5O_5+H]^+$ 450.1777 found 450.1797.

5'-*O*-Propargyl-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (**39**)



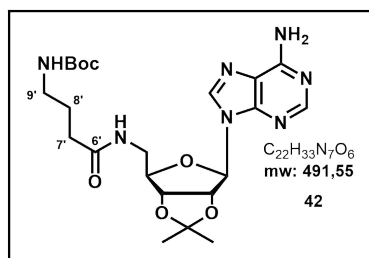
To a solution of **41** (982 mg, 2.18 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (22 mL) was added MeONa (4.4 M in MeOH, 1.1 mL, 4.8 mmol, 2.2 equiv.). After 5 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash chromatography (100 g, SiO₂, 0 to 1% methanol in dichloromethane) to yield **39** (630 mg, 84%) as a white power.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.65 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.45 (t, $J_{8',6'} = 2.4$ Hz, 1H, H-8'), 3.74 (dd, $J_{5',4'} = 4.7$ Hz, $J_{5',5''} = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.80 (dd, $J_{5'',4'} = 3.8$ Hz, $J_{5'',5'} = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.15 (d, $J_{6',8'} = 2.4$ Hz, 2H, H-6'), 4.51-4.54 (m, 1H, H-4'), 5.03 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 2.7$ Hz, 1H, H-3'), 5.35 (dd, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, $J_{2',1'} = 2.4$ Hz, 1H, H-2'), 5.82 (br s, 2H, NH₂-6), 6.21 (d, $J_{1',2'} = 2.4$ Hz, 1H, H-1'), 8.06 (s, 1H, H-8), 8.39 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.4 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₃ isop.), 58.6 (C-6'), 69.9 (C-5'), 75.2 (C-8'), 78.8 (C-7'), 81.9 (C-3'), 84.8 (C-2'), 85.8 (C-4'), 91.3 (C-1'), 144.3 (Cq isop.), 120.1 (C-5), 139.5 (C-8), 149.6 (C-4), 153.1 (C-2), 155.4 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{16}H_{19}N_5O_4+H]^+$ 346.1515 found 346.1515.

5'-[4-(*N*-Boc-amino)butylamido]-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (**42**)



To a solution of **26** (306 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10.0 mL) were added DIPEA (346 μ L, 2.0 mmol, 2.0 equiv.), PyBOP (520 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) and 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)butyric acid (203 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.). After 2 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **42** (365 mg, 74%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.36 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.54

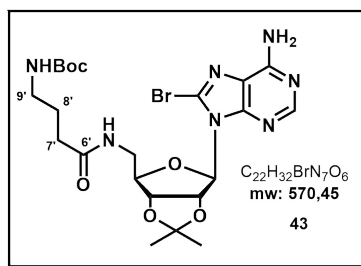
(s, 3H, CH₃ isop.), 1.59 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-8'), 2.09 (td, $J_{7',7''} = 2.4$ Hz, $J_{7',8'} = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-7'), 2.89 (br q, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-9'), 3.33 (t, $J_{5',4'} = 5.7$ Hz, 2H, H-5'5''), 4.17 (td, $J_{4',3'} = 3.2$ Hz, $J_{4',5'} = 5.7$ Hz, 1H, H-4'), 4.90 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.43 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.12 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 6.75 (br s, 1H, NHBoc), 7.34 (s, 2H, NH₂) 8.06 (br s, 1H, NH-amide), 8.19 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.7 (CH₃ isop.), 26.2 (C-8'), 27.5 (CH₃ isop.), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 33.1 (C-6'), 40.0 (C-9'), 41.2 (C-5'), 77.9 (Cq *t*Bu), 82.2 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.6 (C-4'), 89.6 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 140.5 (C-8), 149.3 (C-4), 153.2 (C-2), 156.0 (Cq carbamate), 156.7 (C-6), 172.7 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₂H₃₃N₇O₆+H]⁺ 492.2570 found 492.2582.

5'-[4-(*N*-Boc-amino)butylamido]-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-Bromo adenosine (**43**)

Procedure A : Bromine



To a solution of **42** (170 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (1.4 mL) and sodium acetate buffer (2.1 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (36 μ L, 0.69 mmol, 2.0 equiv.) dropwise. After 3 hours at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL). After full discoloration, AcOEt (80 mL) was added and the organic layer was washed with water (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO₂, 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **43** (135 mg, 69%) as a pale yellow foam.

Procedure B : NBS

To a solution of **42** (170 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (3.5 mL) was added NBS (186 mg, 1.05 mmol, 3.0 equiv.) over 4 hours. After 18 hours at room temperature, a second addition of NBS (93 mg, 0.53 mmol, 1.5 equiv.) was made over 3 hours. After an additional 2 hours at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL). After full discoloration, water (20 mL) was added and the aqueous layer was extracted twice with AcOEt (2x 80 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (12 g SiO₂, 0 to 4% methanol in

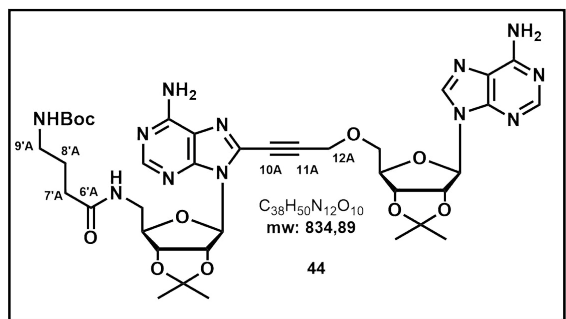
dichloromethane) to yield compound **43** (61 mg, 31%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.38 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.42 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.65 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.83-1.92 (m, 2H, H-8'), 2.32-2.40 (m, 2H, H-7'), 3.18-3.23 (m, 2H, H-9'), 3.37 (dt, $J_{5',4'} = 3.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 14.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.99 (ddd, $J_{5'',4'} = 4.0$ Hz, $J_{5'',NH} = 8.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 14.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.46 (q app, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4'), 4.86 (br s, 1H, NH Boc), 4.89 (dd, $J_{3',4'} = 2.6$ Hz, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J_{2',1'} = 4.2$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.09 (d, $J_{1',2'} = 4.2$ Hz, 1H, H-1'), 6.40 (b s, 2H, NH₂), 7.64 (b s, 1H, NH amide), 8.35 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 25.4 (CH₃ isop.), 26.0 (C-8'), 27.5 (CH₃ isop.), 28.5 (3C, CH₃ Boc), 33.5 (C-7'), 40.0 (C-9'), 40.9 (C-5'), 79.2 (Cq *t*Bu), 81.5 (C-3'), 82.2 (C-2'), 84.00 (C-4'), 92.0 (C-1'), 114.8 (Cq isop.), 120.5 (C-5), 127.8 (C-8), 150.2 (C-4), 151.6 (C-2), 154.0 (C-6), 156.2 (Cq carbamate), 173.0 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₂H₃₂⁷⁹BrN₇O₆+H]⁺ 570.1675 found 570.1683.

5'-O-[3-(5'-[4-(*N*-Boc-amino)butylamido]-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2',3'-O-isopropylidene adenosine (44**)**



To a solution of bromo derivative **43** (196 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **39** (178 mg, 0.51 mmol, 1.5 equiv.) in THF (4.0 mL) was added NEt₃ (144 μ L, 1.02 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (7 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (20 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes

argon degassing. After 3 hours at 60 °C a second addition of Pd(PPh₃)₄ (40 mg, 10 mol%) was made. After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (18 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield **44** (74 mg, 25%) as a pale orange foam. (92.5% purity, the contaminant is NEt₃HBr salts).

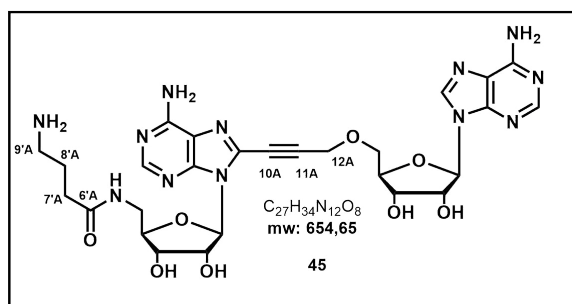
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.28 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.48 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.58 (quint., $J = 7.2$ Hz, 2H, H-8'A), 2.04-2.08 (m, 2H, H-7'A), 2.89 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-9'A), 3.30-3.40 (m, 2H, H-5'5''A), 3.72 (dd, $J_{5''N,4'N} = 5.0$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 10.3$ Hz, 1H, H-5'N), 3.80 (dd,

$J_{5'N,4'N} = 5.7$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.3$ Hz, 1H, H-5''N), 4.14-4.18 (m, 1H, H-4'A), 4.36-4.40 (m, 1H, H-4'N), 4.58 (s, 2H, CH₂-12A), 4.95 (dd, $J_{3'A,4'A} = 3.4$ Hz, $J_{3'A,2'A} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'A), 5.02 (dd, $J_{3'N,4'N} = 3.0$ Hz, $J_{3'N,2'N} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'N), 5.43 (dd, $J_{2'N,1'N} = 2.6$ Hz, $J_{2'N,3'N} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'N), 5.51 (dd, $J_{2'A,1'A} = 2.7$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'A), 6.11 (d, $J_{1'A,2'A} = 2.7$ Hz, 1H, H-1'A), 6.19 (d, $J_{1'N,2'N} = 2.6$ Hz, 1H, H-2'N), 6.73 (br s, 1H, NH Boc), 7.54 (br s, 2H, NH₂), 7.65 (br s, 2H, NH₂), 8.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, NH amide), 8.22 (s, 1H, H-2N), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.36 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.7 (2C, isop.), 26.1 (C-8'A), 27.5 (2C, CH₃ isop.), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 33.1 (C-7'A), 39.8 (C-9'A), 41.0 (C-5'A), 58.7 (C-12A), 70.3 (C-5'N), 75.5 (C-10A), 77.9 (Cq *t*Bu), 81.9 (C-3'N), 82.4 (C-3'A), 83.0 (C-2'A), 83.8 (C-2'N), 84.8 (C-4'N), 85.3 (C-4'A), 89.8 (2C, C-1'A, C-1'N), 92.8 (C-11A), 113.9 (Cq isop.), 114.0 (Cq isop.), 119.4 (2C, C-5A, C-5N), 132.6 (C-8A), 140.5 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.2 (C-4N), 152.2 (C-2A), 154.2 (C-2N), 155.8 (C-6N), 156.0 (C-6A), 156.4 (Cq carbamate), 172.6 (C-6'A).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₃₈H₅₀N₁₂O₁₀+H]⁺ 835.3851 found 835.3840.

5'-O-[3-(5'-[4-aminobutylamido]-5'-deoxy-adenosine-yl)prop-2-yn-1-yl]-adenosine (45)



Compound **44** (64 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in an ice cold solution of TFA (50% in water, 5.0 mL). After 3 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by HPLC (5-25% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 10.4$

min) to yield fully deprotected compound **45** (22.6 mg, 45%) as a white foam.

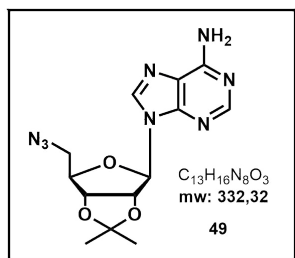
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.68 (quint., $J = 7.2$ Hz, 2H, H-8'A), 2.20 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-7'A), 2.65 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H-9'A), 3.38 (dt, $J_{5''A,4'A} = 4.8$ Hz, $J_{5''A,5'A} = 14.0$ Hz, 1H, H-5''A), 3.47 (dt, $J_{5'A,4'A} = 5.8$ Hz, $J_{5'A,5''A} = 14.0$ Hz, 1H, H-5'A), 3.77 (dd, $J_{5''N,4'N} = 5.6$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 10.6$ Hz, 1H, H-5''N), 3.85 (dd, $J_{5',4'N} = 3.7$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.6$ Hz, 1H, H-5'N), 3.98-4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.08-4.13 (m, 2H, H-3'A, H-4'N), 4.20 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-3'N), 4.61-4.63 (m, 3H, H-2'N and CH₂-12A), 5.01-5.04 (m, 1H, H-2'A), 5.92 (d, $J_{1'N,2'N} = 5.3$ Hz, 1H, H-1'N), 5.94 (d, $J_{1'A,2'A} = 6.4$ Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH₂), 7.62 (s, 2H, NH₂), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.27 (m, 1H, NH amide), 8.32 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 26.6 (C-8'A), 33.0 (C-7'A), 40.0 (C-9'A), 41.3 (C-5'A), 58.7 (C-12A), 70.8 (C-5'N), 71.0 (C-3'N), 71.7 (2C, C-3'A, C-2'A), 73.7 (C-2'N), 75.7 (C-10A), 83.3 (C-4'N), 84.6 (C-4'A), 88.0 (C-1'N), 89.7 (C-1'A), 92.6 (C-11A), 119.5 (C-5N), 119.8 (C-5A), 133.4 (C-8A), 139.8 (C-8N), 149.2 (C-4A), 150.0 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.2 (C-2A), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-6A), 172.4 (C-6'A).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_{12}\text{O}_8 + \text{H}]^+$ 655.2701 found 655.2708.

5'-Azido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (49)

Procedure A : Tosyl substitution



To a solution of **21** (5.15 g, 11.1 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (110 mL), was added sodium azide (2.90 g, 44.6 mmol, 4.0 equiv.). After 2 hours at 80 °C, the reaction was brought back to room temperature and the reaction was quenched with water (10 mL) before removing volatiles. The crude solid was then dissolved in AcOEt (300 mL) and the organic layer was washed twice with water (2x 100 mL) before being dried over

Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (50 g SiO_2 , 5% methanol in dichloromethane, isocratic) to yield **49** (1.50 g, 41% in two steps) as a white foam.

Procedure B : phosphotriester pathway (described in chapter 5 page 257)

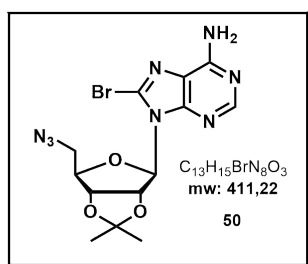
To a solution of **19** (307 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (10.0 mL) were added diphenyl phosphoryl azide (430 μL , 2.0 mmol, 2.0 equiv.) and DBU (450 μL , 3.0 mmol, 3.0 equiv.). After 3 hours at room temperature, NaN_3 (325 mg, 5.0 mmol, 5.0 equiv.), TBAI (37 mg, 0.1 mmol, 0.1 equiv.) and 15-crown-5 (20 μL , 0.1 mmol, 0.1 equiv.) were added. After three additional hours at 100 °C, water (40 mL) was added and the crude was extracted twice with AcOEt (2x 50 mL) before being dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (30 g SiO_2 , 2 to 6% methanol in dichloromethane) to yield **49** (283 mg, 85%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.63 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.57 (dd, $J_{5',4'} = 5.2$ Hz, $J_{5',5''} = 12.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.61 (dd, $J_{5'',4'} = 6.2$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.38-4.42 (m, 1H, H-4'), 5.08 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.4$ Hz, 1H, H-3'), 5.49 (dd, $J_{2',1'} = 2.2$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.97 (br s, 2H, NH_2 -6), 6.13 (d, $J_{1',2'} = 2.2$ Hz, 1H, H-1'), 7.93 (s, 1H, H-8), 8.37 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.3 (CH_3 isop.), 27.1 (CH_3 isop.), 52.3 (C-5'), 82.1 (C-3'), 84.1 (C-2'), 85.7 (C-4'), 90.7 (C-1'), 114.7 (Cq isop.), 120.3 (C-5), 139.9 (C-8), 149.3 (C-4), 153.2 (C-2), 155.7 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_3+\text{H}]^+$ 333.1424 found 333.1419.

5'-Azido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-Bromo adenosine (**50**)



Compound **49** (1.22 g, 3.67 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in 1,4-dioxane (35 mL) and sodium acetate buffer (20 mL, 0.5 M, pH = 5.3) before making two dropwise addition of bromine (567 μL , 11.0 mmol, 3.0 equiv.). 2.0 equiv. were added at $t = 0$ h and the last 1.0 equiv. was added at $t = 3$ h. At $t = 6$ h, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. After full discoloration, DCM (330 mL) was added and the organic layer was washed with brine (1x 90 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (80 g SiO_2 , 0 to 1% methanol in dichloromethane) to yield brominated compound **50** (1.20 g, 79%) as a light yellow foam.

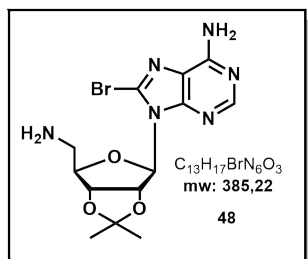
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.43 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.65 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.49 (dd, $J_{5',4'} = 5.7$ Hz, $J_{5',5''} = 12.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.55 (dd, $J_{5'',4'} = 7.2$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.37 (ddd, $J_{4',3'} = 3.7$ Hz, $J_{4',5'} = 5.7$ Hz, $J_{4',5''} = 7.2$ Hz, 1H, H-4'), 5.19 (dd, $J_{3',4'} = 3.7$ Hz, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.72 (dd, $J_{2',1'} = 1.8$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.73 (br s, 2H, NH_2 -6), 6.24 (dd, $J_{1',2'} = 1.8$ Hz, 1H, H-1'), 8.33 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.4 (CH_3 isop.), 27.1 (CH_3 isop.), 52.2 (C-5'), 82.4 (C-3'), 83.4 (C-2'), 86.5 (C-4'), 91.2 (C-1'), 114.6 (Cq isop.), 120.3 (C-5), 127.7 (C-8), 150.4 (C-4), 152.8 (C-2), 154.2 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}^{79}\text{BrN}_8\text{O}_3+\text{H}]^+$ 411.0529 found 411.0530.

5'-Amino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-Bromo adenosine (48)

Procedure A : Staudinger reduction



To a solution of **50** (822 mg, 2.0 mmol, 1.0 equiv.) in pyridine (20 mL) was added PPh_3 (664 mg, 3.0 mmol, 1.5 equiv.). After 3 hours at room temperature NH_4OH (28% in water, 20 mL) was added. After 4 additional hours at room temperature volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (15 g SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **48** (756 mg, 92%) as a

slightly blue foam.

Procedure B : Phthalimide deprotection (described in Chapter 5 page 256)

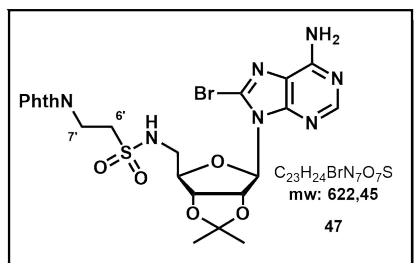
To a solution of **122** (4.2 g, 8.15 mmol, 1.0 equiv.), in EtOH (60 mL) was added hydrazine hydrate (4.1 mL, 160 mmol, 16 equiv.). after 2,5 hours at room temperature, the precipitate was filtered and washed with EtOH. Volatiles were removed before dissolving the solid residue in water (40 mL). The aqueous layer was extracted five times with DCM (5x 100 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (50 g, SiO_2 , 10 % methanol in dichloromethane, isocratic) to yield **48** (1.33 g, 42%) as a slightly blue foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.55 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.67 (dd, $J_{5',4'} = 6.2$ Hz, $J_{5',5''} = 13.2$ Hz, 1H, H-5'), 2.74 (dd, $J_{5'',4'} = 6.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.2$ Hz, 1H, H-5''), 4.09 (td app, $J_{4',3'} = 3.2$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.1$ Hz, 1H, H-4'), 5.06 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.1$ Hz, 1H, H-3'), 5.74 (dd, $J_{2',1'} = 2.8$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.00 (d, $J_{1',2'} = 2.8$ Hz, 1H, H-1'), 7.50 (br s, 2H, NH_2 -6), 8.15 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.6 (CH_3 isop.), 43.8 (C-5'), 82.1 (C-2'), 82.2 (C-3'), 87.9 (C-4'), 91.1 (C-5'), 113.7 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.8 (C-8), 150.5 (C-4), 153.4 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}^{79}\text{BrN}_6\text{O}_3 + \text{H}]^+$ 384.0625 found 385.0635.

5'-Deoxy-5'-(2-phthalimidoethyl)sulfonamido-2',3'-O-isopropylidene-8-Bromo adenosine (47)

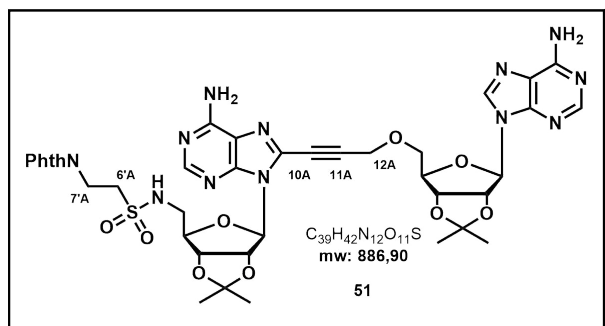


To a solution of **48** (385 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10 mL) was added NEt₃ (167 μ L, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). The solution was stirred 30 minutes at room temperature before adding 2-phthalimidoethanesulfonyl chloride (328 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv.). After 1 hour at room temperature, the reaction was quenched with water (10 mL) and the crude was extracted twice with DCM (2x 30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (30 g, SiO₂, 2 to 2.5% methanol in dichloromethane) to yield **47** (536 mg, 86%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.18-3.25 (m, 1H, H-5'), 3.29-3.36 (m, 3H, H-5'' and CH₂-6'), 3.87-3.90 (m, 2H, CH₂-7'), 4.26 (td, $J_{4',3'} = 3.0$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.9$ Hz, H-4'), 5.10 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H H-3'), 5.60 (dd, $J_{2',1'} = 2.5$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.03 (d, $J_{1',2'} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.54 (br s, 2H, NH₂-6), 7.77-7.80 (m, 1H, NH-5'), 7.82-7.87 (m, 4H, H-Phth), 8.12 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 32.7 (C-7'), 44.6 (C-5'), 49.0 (C-6'), 82.2 (C-3'), 82.9 (C-2'), 86.0 (C-4'), 91.4 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 123.5 (2C, CH Phth), 126.6 (C-8), 132.1 (2C, Cq Phth) 134.9 (2C, CH Phth), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6), 167.8 (2C, CO Phth).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₃H₂₄⁷⁹BrN₇O₇S+H]⁺ 622.0720 found 622.0714.

5'-O-[3-(5'-Deoxy-5'-(2-phthalimidoethyl)sulfonamido-2',3'-O-isopropylidene adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2',3'-O-isopropylidene adenosine (51)

To a solution of bromo derivative **47** (404 mg, 0.65 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **39** (335 mg, 0.97 mmol, 1.5 equiv.) in THF (20.0 mL) was added NEt_3 (271 μL , 1.95 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (13 mg, 10 mol%) and $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (37 mg, 5

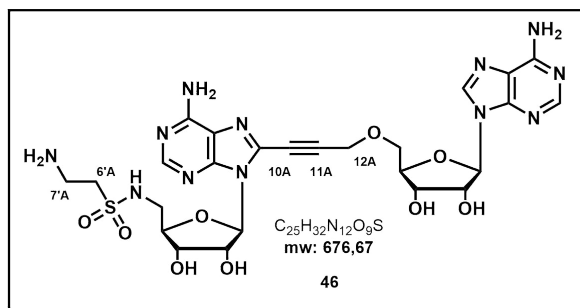
mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 18 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (30 g, SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **51** (322 mg, 56%) as a light yellow foam.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.37 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.42 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.61 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.65 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.43 (dt, $J_{6'A,6''A} = 14.0$ Hz, $J_{6'A,7'A} = 7.0$ Hz, 1H, H-6'A), 3.50 (dt, $J_{6''A,6'A} = 14.0$ Hz, $J_{6''A,7'A} = 7.0$ Hz, 1H, H-6''A), 3.54-3.63 (m, 2H, H-5'A), 3.84 (dd, $J_{5'N,4'N} = 4.6$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.2$ Hz, 1H, H-5'N), 3.94 (dd, $J_{5'N,4'N} = 3.3$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 10.2$ Hz, 1H, H-5''N), 4.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -7'A), 4.47 (ABq, $J = 16.5$, 2H, CH_2 -12A), 4.48-4.54 (m, 1H, H-4'A), 4.57-4.61 (m, 1H, H-4'N), 5.09 (dd, $J_{3'N,2'N} = 6.0$ Hz, $J_{3'N,4'N} = 2.4$ Hz, 1H, H-3'N), 5.17 (dd, $J_{3'A,2'A} = 2.2$ Hz, $J_{3'A,4'A} = 6.0$ Hz, 1H, H-3'A), 5.36-5.42 (m, 2H, H-2'A and H-2'N), 6.18 (d, $J_{1'A,2'A} = 4.0$ Hz, 1H, H-1'A), 6.23 (d, $J_{1'N,2'N} = 2.3$ Hz, 1H, H-1'N), 6.59 (s, 2H, NH_2 -6), 7.64-7.68 (m, 2H, CH Phth), 7.78-7.82 (m, 2H, CH Phth), 8.12 (s, 1H, H-8N), 8.32 (s, 1H, H-2N), 8.35 (s, 1H, H-2A).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.3 (CH_3 isop.), 25.4 (CH_3 isop.), 27.1 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 32.7 (C-7'A), 44.8 (C-5'A), 49.1 (C-6'A), 59.0 (C-12A), 70.7 (C-5'N), 75.1 (C-10A), 81.4 (C-3'A), 81.9 (C-3'N), 83.0 (C-2'N), 83.8 (C-4'A), 84.9 (C-2'A), 86.0 (C-4'N), 91.3 (C-1'A), 91.6 (C-1'N), 92.0 (C-11A), 114.2 (Cq isop.), 114.6 (Cq isop.), 119.7 (C-5A), 119.8 (C-5N), 123.4 (2C, CH Phth), 131.8 (2C, Cq Phth), 132.9 (C-8A), 134.1 (2C, CH Phth), 139.3 (C-8N), 148.2 (C-4A), 149.4 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.2 (C-2A), 155.8 (C-6N), 156.0 (C-6A), 167.7 (2C, CO Phth).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_{11}\text{S} + \text{H}]^+$ 887.2895 found 887.2892.

5'-O-[3-(5'-Deoxy-5'-(2-aminoethyl)sulfonamido-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-adenosine (46)



To a solution of **51** (188 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.) in EtOH (13 mL) and DCM (25 mL), was added methylamine (33% in ethanol, 1.05 mL, 8.84 mmol, 40 equiv.). After 35 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA

(50% in water, 2 mL). After 8 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by HPLC (8-15% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 20 min, $t_R = 14.2$ min) to yield fully deprotected compound **46** (12 mg, 10%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.84-2.89 (m, 2H, CH₂-7'A), 3.11 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-6'A), 3.24 (dd, $J_{5'A,4'A} = 4.7$ Hz, $J_{5'A,5''A} = 13.5$ Hz, 1H, H-5'A), 3.35 (dd, $J_{5''A,4'A} = 4.2$ Hz, $J_{5''A,5'A} = 13.5$ Hz, 1H, H-5''A), 3.77 (dd, $J_{5'N,4'N} = 5.5$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.6$ Hz, 1H, H-5'N), 3.86 (dd, $J_{5'N,4'N} = 3.7$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 10.6$ Hz, 1H, H-5''N), 4.08-4.13 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.19-4.24 (m, 2H, H-3'A and H-3'N), 4.61 (s, 2H, CH₂-12A), 4.63 (t, $J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'N), 5.02 (dd, $J_{2'A,1'A} = 6.8$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'A), 5.93 (d, $J_{1'N,2'N} = 5.2$ Hz, 1H, H-1'N), 5.96 (d, $J_{1'A,2'A} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH₂-6N), 7.67 (s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.32 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.1 (C-7'A), 45.0 (C-5'A), 54.6 (C-6'A), 58.8 (C-12A), 70.7 (C-5'N), 71.0 (C-3'N), 71.7 (C-3'A), 71.8 (C-2'A), 73.7 (C-2'N), 75.6 (C-10A), 83.3 (C-4'N), 84.8 (C-4'A), 88.0 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 92.7 (C-11A), 119.5 (C-5N), 119.8 (C-5A), 133.4 (C-8A), 139.9 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.2 (C-2N), 153.9 (C-2A), 156.5 (C-6N), 156.7 (C-6A).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_{12}\text{O}_9\text{S} + \text{H}]^+$ 677.2214 found 677.2362.

Chapitre 3

Synthèse d'outils moléculaires en vue d'expériences de fluorescence *in* *vitro*

Un autre objectif de mes travaux de thèse est de préciser la localisation intracellulaire de l'inhibiteur. Cela nous permettrait d'estimer si la pénétration cellulaire est bonne, en voyant si il y a une accumulation de celui-ci dans le cytoplasme et non au niveau de la membrane par exemple. Par ailleurs nous envisageons aussi de réaliser des expériences de co-localisation entre l'inhibiteur et la *Sa*NADK marquée afin de déterminer si l'analogue se situe bien au niveau de sa cible.

Nous présenterons brièvement trois techniques permettant d'avoir ce type d'informations : le radiomarquage, l'imagerie Raman et la fluorescence. Nous décrirons ensuite nos travaux sur le développement d'un outil fluorescent.

3.1 Généralités à propos des méthodes de marquage

La radioactivité est un phénomène pouvant être utilisé à des fins de dosage ou d'imagerie. Développée par Rosalyn S. Yalow *et al.* en 1960,¹⁸² la technique de dosage radio-immunologique (ou *radioimmunoassay*) repose sur la mesure de radioactivité d'un complexe entre un antigène radioactif et un anticorps spécifique.¹⁸³ Cette méthode permettait originellement de doser l'insuline humaine froide par mise en compétition avec un complexe entre l'insuline marquée à l'iode 131 et un anticorps anti-insuline. La mesure de l'insuline marquée déplacée permettait ainsi de mesurer le taux sanguin d'insuline du patient. Cette méthode a par la suite été généralisée pour le dosage de nombreuses hormones différentes.¹⁸³

Il est aussi possible d'utiliser la radioactivité à des fins d'imagerie en employant des méthodes telles que la tomographie par émission de positons (TEP ou *PET* en anglais). Cette technique permet d'imager *in vivo* des molécules marquées avec des isotopes radioactifs comme le fluor 18 ou le carbone 11. Parmi les composés couramment utilisés figure le 2-[F-18]fluoro-2-désoxy-D-glucose, un analogue fluoré du glucose (Figure 3.1).¹⁸⁴ Des méthodes de diagnostic de la maladie d'Alzheimer emploient aussi ce type d'imagerie en suivant d'autres traceurs radioactifs marqués au carbone 11, comme la nicotine ou le PIB (*Pittsburg compound B*).¹⁸⁵

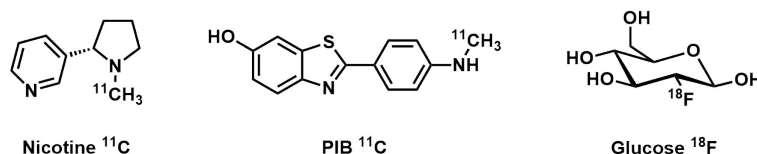


Figure 3.1 – Molécules pouvant être utilisées en tant que traceurs radioactifs

182. Yalow, R. S. ; Berson, S. A. *The Journal of Clinical Investigation* **1960**, *39*, 1157-1175.

183. Goldsmith, S. J. *Seminars in Nuclear Medicine* **1975**, *5*, 125-152.

184. Phelps, M. E. *Journal of Nuclear Medicine* **2000**, *41*, 661-681.

185. Nordberg, A. ; Rinne, J. O. *et al. Nature Reviews Neurology* **2010**, *6*, 78-87.

D'une sensibilité remarquable, cette méthode présente l'avantage de très peu modifier la structure des molécules à imager. Il est en effet possible de remplacer un atome de carbone d'un composé par l'isotope ^{11}C ou un atome d'hydrogène par un atome de fluor ^{18}F . L'obstacle majeur de cette méthode est l'accès synthétique des molécules marquées. En effet, il est crucial que la synthèse soit rapide, les isotopes radioactifs utilisés ayant parfois un court temps de demi-vie (20 minutes pour le ^{11}C et 110 minutes pour le ^{18}F). De plus, la manipulation d'isotopes radioactifs peut s'avérer dangereuse pour la santé et requiert de très grandes précautions.

L'imagerie Raman a été développée plus récemment et permet, entre autres, de visualiser des composés *in vivo*.^{186,187} Celle-ci repose sur la détection de plusieurs groupements chimiques, dont les alcynes¹⁸⁸ et les nitriles¹⁸⁹, ainsi que certaines liaisons comme les liaisons carbone-deutérium (Figure 3.2).^{190,191} L'absence de ces trois éléments structuraux dans les cellules élimine tout bruit de fond pour des expériences d'imagerie *in vivo*, rendant cette méthode de visualisation idéale. De nombreuses études ont exploité cette technique afin de visualiser de l'ADN,¹⁸⁸ des protéines,^{189,190} ou des acides gras deutérés.¹⁹¹

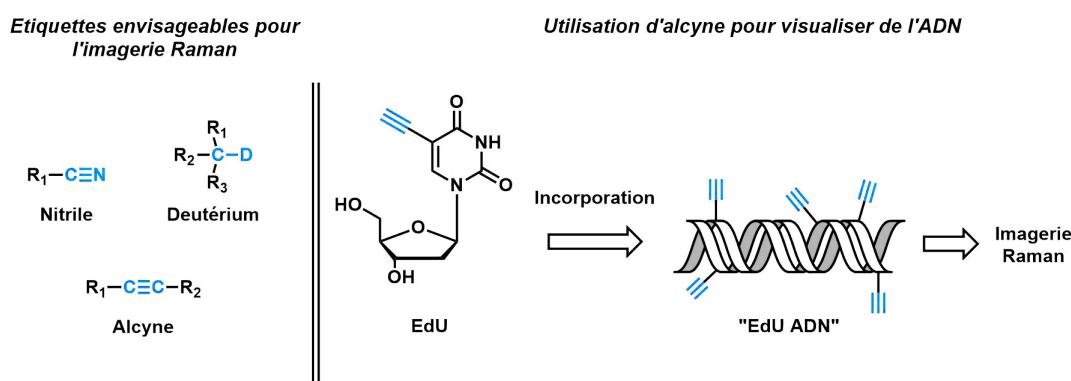


Figure 3.2 – Étiquettes pouvant être utilisées pour faire de l'imagerie Raman et applications à la visualisation de l'ADN

Les diadénosines synthétisées au laboratoire possédant toutes une fonction alkyne, l'imagerie Raman serait à privilégier. Malheureusement, nous n'avons pas eu accès aux appareillages permettant ce type d'expériences.

186. Shona Stewart, J. P. A. D. in *The Current State of Raman Imaging in Clinical Application*; McGraw-Hill Education : New York, 2010, p. 265-297.

187. Delhaye, M.; Dhamelincourt, P. *Journal of Raman Spectroscopy* **1975**, *3*, 33-43.

188. Yamakoshi, H.; Dodo, K. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 20681-20689.

189. Weeks, C. L.; Jo, H. *et al. Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, *43*, 1244-1249.

190. van Manen, H.-J.; Lenferink, A. *et al. Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 9576-9582.

191. Xie, X. S.; Yu, J. *et al. Science* **2006**, *312*, 228.

La microscopie de fluorescence, une technique de plus en plus répandue en biologie, permet la visualisation de cibles de natures différentes.¹⁹² Cette méthode repose sur l'emploi d'un fluorophore pouvant être lié de façon spécifique à la cible *via* l'utilisation de fonctions chimiques bioorthogonales (azide/alcyne par exemple) ou d'autres marqueurs d'affinité (anticorps). Ces fluorophores sont, le plus souvent, des molécules aromatiques très riches en électrons (Figure 3.3). Une fois lié, le fluorophore est irradié à une longueur d'onde spécifique conduisant à l'émission de photons d'une longueur d'onde d'énergie plus faible. Cette méthode a permis l'imagerie de nombreux composants cellulaires tels que des protéines,¹⁹³ les membranes,^{194,195} ou l'ADN.^{196,197}

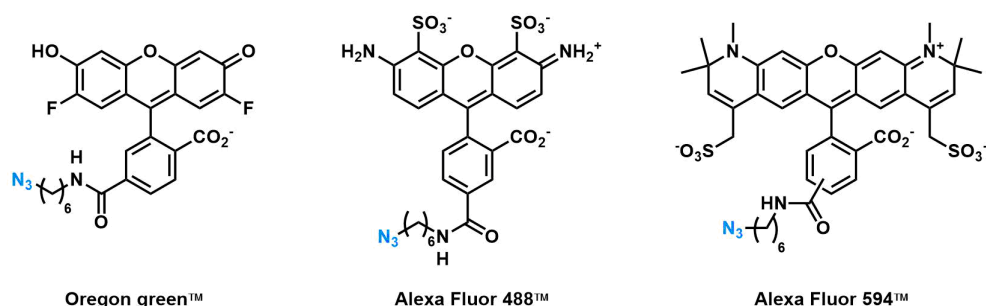


Figure 3.3 – Exemple de sondes fluorescentes commercialisées par Invitrogen® possédant des azides, fonction pouvant réagir *in vivo* avec des alcynes

Cette méthode requiert la modification de la structure chimique des composés à imager pouvant parfois conduire à une diminution de spécificité ou d'activité.

A l'occasion du second chapitre, il a été mis en évidence que la position centrale des diadénosines synthétisées au laboratoire pouvait être modifiée sans induire d'importants changements d'affinité. De plus, la modification introduite pointe vers l'extérieur du site NAD (Cf. page 119). Il est donc envisageable d'introduire un groupement fonctionnel compatible avec la chimie "click" à cette position là. Parmi les fonctions complémentaires pouvant être utilisées figurent les couples tétrazine/isonitrile,¹⁹⁸ alcyne/azide,¹⁹⁹

-
192. Yee, D. J. ; Balsanek, V. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 2282-2283.
 193. Beatty, K. E. ; Xie, F. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 14150-14151.
 194. Lesur, E. ; Baron, A. *et al. Chemical Communications* **2019**, 55, 13074-13077.
 195. Carvalho, P. H. P. R. ; Correa, J. R. *et al. Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2019**, 15, 2644-2654.
 196. Salic, A. ; Mitchison, T. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105, 2415.
 197. Zidovska, A. ; Weitz, D. A. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110, 15555.
 198. Stöckmann, H. ; Neves, A. A. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, 7303-7305.
 199. Meldal, M. ; Tornøe, C. W. *Chemical Reviews* **2008**, 108, 2952-3015.

phosphine/azide²⁰⁰ ou thiol/alcène.²⁰¹

De nombreux fluorophores, qu'ils soient commerciaux ou décrits dans la littérature possèdent une fonction azide, complémentaires d'une fonction alcyne. Cette grande diversité met à notre disposition un vaste panel de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission allant du bleu à l'infra-rouge. La fonction alcyne a donc paru adapté à notre propos, nous conduisant à envisager un analogue de la diadénosine **38** en remplaçant sa fonction amine par un alcyne vrai (Schéma 3.1).

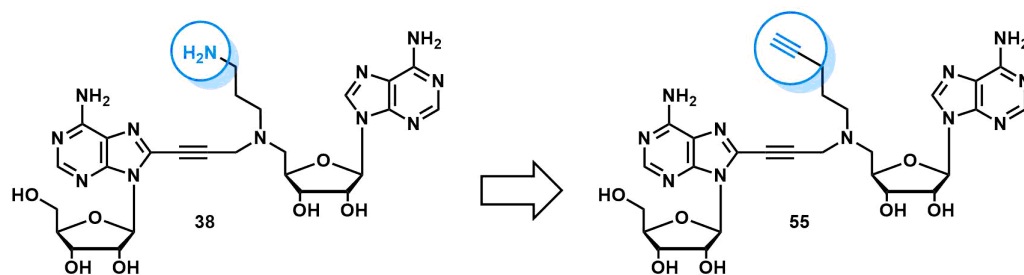


Schéma 3.1 – Modification proposée

Une des réaction les plus classique de couplage entre une fonction alcyne et azide est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Mise au point par Rolf Huisgen en 1963^{202,203} et améliorée par Meldal²⁰⁴ et Sharpless,²⁰⁵ celle-ci permet de faire réagir un alcyne vrai et un azide pour former un triazole (Schéma 3.2).

D'après Worrell *et al.*,²⁰⁶ la première étape consiste en la π -coordination d'un atome de cuivre (noté "a" sur le schéma) sur la liaison triple d'un alcyne vrai pour former le complexe **A**. Ceci a pour conséquence directe l'abaissement du pKa du proton éthynylique permettant le déplacement du cuivre π -coordonné (noté "a") par un second atome de cuivre (noté "b") conduisant à la formation de l'acétylure de cuivre **B**. L'azide s'additionne ensuite sur **B** pour former le complexe actif de cycloaddition **C**.²⁰⁷ A cette étape, l'azote en alpha du résidu R' (en rouge sur le schéma) serait capable d'échanger rapidement son lien de coordination avec le cuivre "a" ou "b".²⁰⁶ Cela rend l'élimination de l'un comme de l'autre équiprobable lors de l'étape suivante de fermeture du cycle et de formation du triazole **D**. Finalement, le déplacement du cuivre de l'intermédiaire **D** par un proton permet la formation du triazole **E**, produit de la réaction.

200. Saxon, E. ; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, 287, 2007.

201. Hoyle, C. E. ; Bowman, C. N. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 1540-1573.

202. Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, 2, 565-598.

203. Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, 2, 633-645.

204. Tornøe, C. W. ; Christensen, C. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 3057-3064.

205. Rostovtsev, V. V. ; Green, L. G. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 2596-2599.

206. Worrell, B. T. ; Malik, J. A. *et al. Science* **2013**, 340, 457.

207. Zhu, L. ; Brassard, C. J. *et al. The Chemical Record* **2016**, 16, 1501-1517.

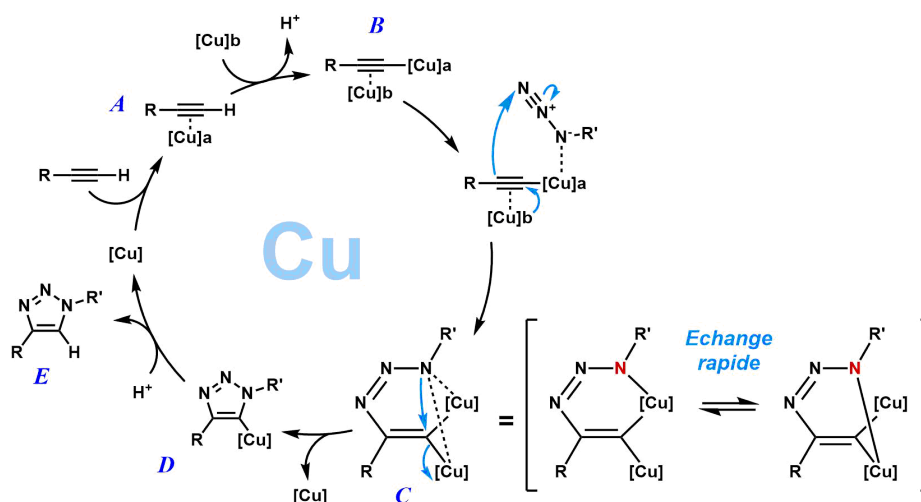


Schéma 3.2 – Mécanisme présumé de la cycloaddition de Huisgen

Outre le fait d'être orthogonales l'une envers l'autre, les fonctions alcyne et azide présentent l'avantage d'être absentes du système biologique étudié évitant toute réaction secondaire.

L'obstacle principal des conditions décrites précédemment est l'utilisation de cuivre, un élément cytotoxique. En effet, l'imagerie dynamique de systèmes vivants nécessite des réactions non toxiques pouvant avoir lieu rapidement en conditions physiologiques.²⁰⁸⁻²¹⁰ A cette fin, deux alternatives principales ont été développées. La première repose sur l'utilisation de cuivre coordonné avec des ligands de type tris(triazolylméthyl)amine (Schéma 3.3, ligand TBTA).^{211,212} En plus de stabiliser le cuivre au degré d'oxydation (I), accélérant la réaction, ils séquestrent le métal évitant tout dommage aux systèmes biologiques.²¹³ La seconde alternative, développée par Bertozzi *et al.*,²¹⁴ repose sur l'utilisation d'alcynes contraints sous forme de cyclooctynes (Schéma 3.3, cyclooctyne). L'énergie de tension exercée par le cycle sur l'alcyne augmenterait grandement sa réactivité permettant une réaction de cycloaddition avec un azide en l'absence de cuivre.

208. Kim, E. ; Koo, H. *Chemical Science* **2019**, *10*, 7835-7851.

209. Besanceney-Webler, C. ; Jiang, H. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 8051-8056.

210. Jewett, J. C. ; Bertozzi, C. R. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1272-1279.

211. Chan, T. R. ; Hilgraf, R. *et al. Organic Letters* **2004**, *6*, 2853-2855.

212. Soriano del Amo, D. ; Wang, W. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16893-16899.

213. Wu, P. ; Fokin, V. V. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7-17.

214. Jewett, J. C. ; Sletten, E. M. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3688-3690.

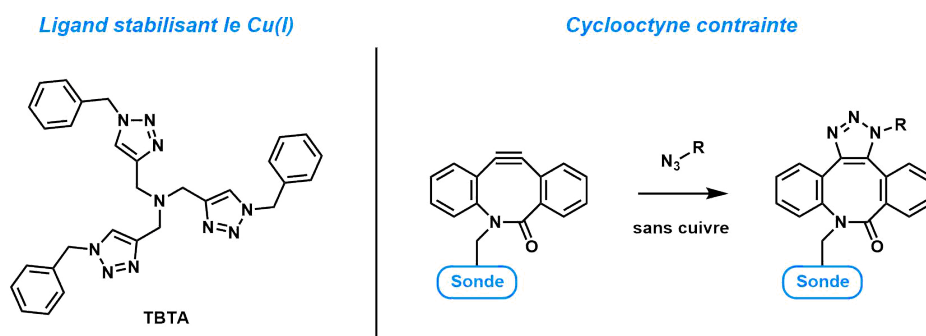


Schéma 3.3 – Alternatives au système Cuivre/acide ascorbique (CuAAC) classique

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié des bactéries fixées avec du paraformaldéhyde. Le système biologique n'étant pas vivant, nous avons opté pour l'utilisation du système catalytique CuAAC classique afin de coupler un "azide-fluorophore" avec la diadénosine **55** portant un alcyne vrai.

3.2 Utilisation d'une coumarine en tant que fluorescent

Les coumarines sont des molécules largement utilisées dans la littérature afin de marquer différents composés pour les suivre par fluorescence.^{193,215,216} Dans une publication récente, Ishizuka *et al.*²¹⁷ décrivent l'azido coumarine **56** comme fluorescente, lorsqu'elle est irradiée à 365 nm, seulement après la réaction de "click" avec un alcyne (Cf. Schéma 3.4). Cette propriété est précieuse car elle permet de minimiser le bruit de fond dû à la fluorescence du fluorophore non cliqué. Cette caractéristique est due à la formation du noyau triazole, à l'issue de la réaction, créant une plus grande délocalisation des électrons et exacerbant les propriétés de fluorescence du composé. Le microscope à notre disposition nous permettant d'irradier à 365 nm, nous avons naturellement choisi de synthétiser la 3-azido-7,6-*di*-hydroxycoumarine (**56**).

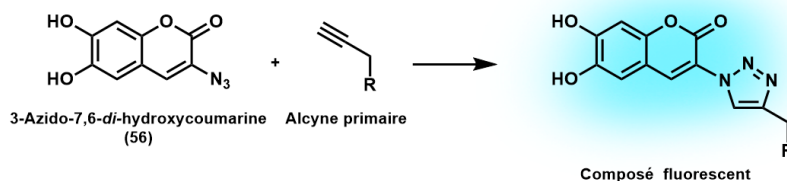


Schéma 3.4 – Réaction entre le pro-fluorophore et un alcyne vrai conduisant à la formation d'un composé fluorescent.

215. Signore, G. ; Nifosì, R. *et al.* *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 1276-1288.

216. Rajaganesh, R. ; Ravinder, P. *et al.* *Carbohydrate Research* **2011**, 346, 2327-2336.

217. Ishizuka, T. ; Liu, H. S. *et al.* *Scientific Reports* **2016**, 6, 33217.

%)²²¹⁻²²³

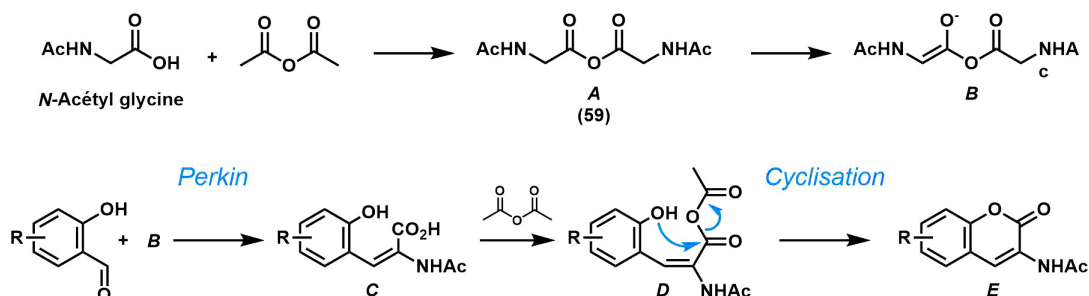


Schéma 3.7 – Application de la réaction de Perkin modifiée à la synthèse de la coumarine **E**

Nous avons appliqué cette méthode dans le but d'obtenir l'azidocoumarine **57**. Entre nos mains nous avons obtenu un mélange complexe de composés et non l'azidocoumarine désirée.

Une autre stratégie pour générer des 3-aminocoumarines, décrite par Costa *et al*, repose sur l'utilisation de sels de pyridiniums comme groupements protecteurs d'amines primaires (Schéma 3.8).²²⁴ La simplicité de mise en oeuvre de cette voie a attiré notre attention. En effet, l'utilisation de sels présente l'avantage majeur de s'affranchir de chromatographies, un lavage du solide formé étant suffisant afin d'isoler le composé souhaité, pur.

Cette seconde voie débute par une condensation de type Knoevenagel entre un aldéhyde aromatique **A** et le chlorure de 1-pyridinium de cyanométhyle (**B**). L'intermédiaire formé subit ensuite une cyclisation en composé **C** en une étape à partir du 2-di-hydroxybenzaldéhyde **A**.²²⁵ L'imino-pyrane **C** est ensuite converti en coumarine **D** puis le pyridinium est converti en amine **E** par traitement avec un excès de *N*-méthyl pipérazine par réaction de Zincke.

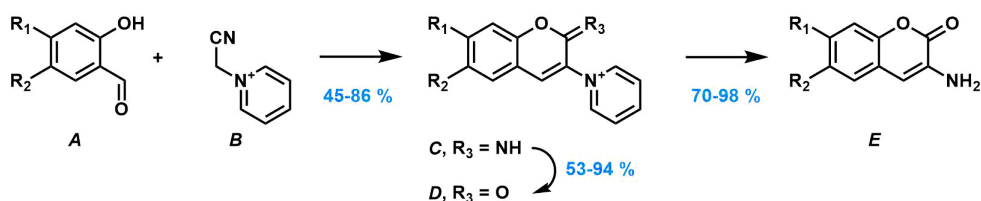


Schéma 3.8 – Synthèse de différentes 3-amino coumarines décrite par Costa *et al*.

Nous avons donc appliqué cette stratégie dans le but d'obtenir un des analogues

221. Kudale, A. A.; Kendall, J. *et al. Tetrahedron Letters* **2007**, 48, 5077-5080.

222. Austin, M. J.; Hearnshaw, S. J. *et al. MedChemComm* **2016**, 7, 1387-1391.

223. Morris, J. C.; McMurtrie, J. C. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 4964-4972.

224. Costa, M.; Rodrigues, A. I. *et al. Tetrahedron* **2014**, 70, 4869-4875.

225. Proença, M. F.; Costa, M. *Tetrahedron* **2010**, 66, 4542-4550.

décrits par Costa, l'aminocoumarine **64**. Celle-ci serait ensuite convertie en azidocoumarine par l'intermédiaire d'un diazonium comme décrit précédemment.

La première étape consiste en la synthèse du bromure de 1-pyridinium de cyano-méthyle (**60**) par réaction entre la pyridine et le bromoacétonitrile (Schéma 3.9). Le produit étant isolé sous forme de sel, sa purification consiste en un simple lavage à l'éther diéthylique glacé permettant de l'obtenir avec un rendement de 63 %. L'étape suivante est la condensation de Knoevengael à 0 °C de **60** sur le 2,5-*di*-hydroxybenzaldéhyde (**61**) commercial permettant d'isoler, après lavage du sel, l'iminopyrane **62** avec un rendement de 80 %, très proche de celui décrit dans la littérature pour ce composé (78 %).²²⁴ L'iminopyrane **62** est ensuite hydrolysé à chaud en milieu acide (HCl 12 N) permettant l'obtention de la coumarine **63** avec un rendement quantitatif.

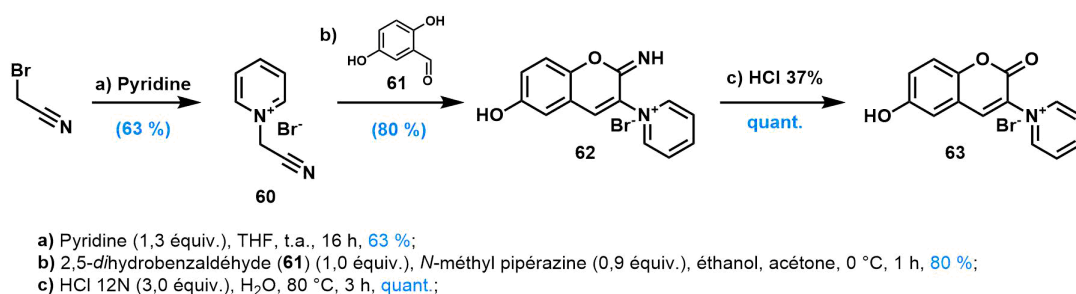


Schéma 3.9 – Obtention du sel de pyridinium **62** suivi de son hydrolyse en coumarine **63**

Le groupement pyridinium de **63** est ensuite converti en amine par réaction de Zincke^{224,226} en utilisant la *N*-méthyl pipérazine.

En 1903, Theodor Zincke décrit une réaction entre le chlorure de *N*-(2,4-dinitrophényl) pyridinium et l'aniline conduisant à la formation de chlorure de 1-phénylpyridinium et de 2,4-dinitroaniline (Schéma 3.10).²²⁷ Depuis lors, cette réaction a été généralisée et permet de synthétiser des dérivés de pyridinium à partir d'un "Sels de Zincke" et d'une amine.

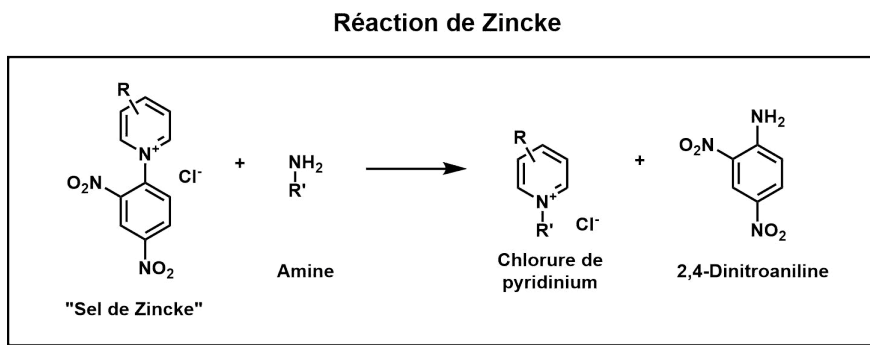


Schéma 3.10 – Réaction de Zincke

La première étape du mécanisme consiste en l'addition [1-2] de la *N*-méthyl pipérazine

226. Cheng, W.-C. ; Kurth, M. J. *Organic Preparations and Procedures International* **2002**, *34*, 585-608.

227. Zincke, T. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1904**, *330*, 361-374.

sur le pyridinium **63** conduisant à l'obtention de l'intermédiaire **A**. Après un équilibre acido-basique, le doublet non liant de l'amine tertiaire formée s'additionne une seconde fois entraînant l'ouverture du cycle à six atomes pour produire l'intermédiaire **B**. L'addition conjuguée d'une seconde molécule de *N*-méthyl pipérazine conduit à **C** qui, après équilibre acido-basique, permet la libération de l'amine souhaitée **64** ainsi qu'un sous-produit **D** (Schéma 3.11).

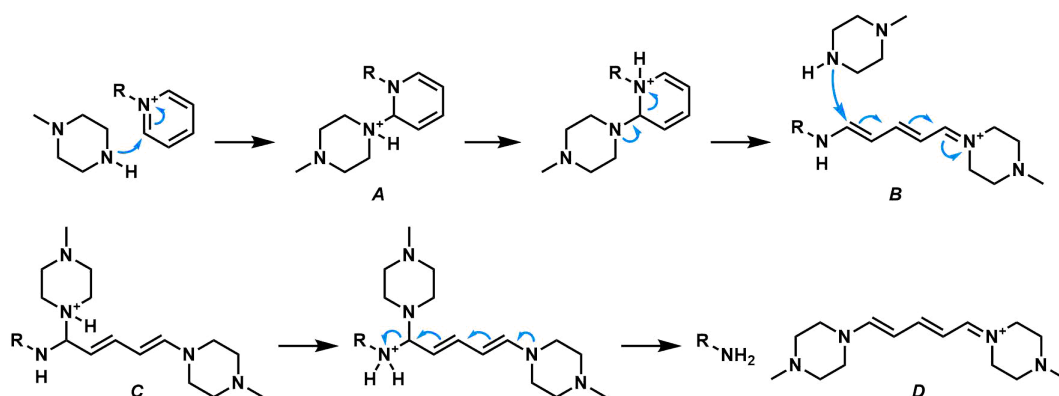
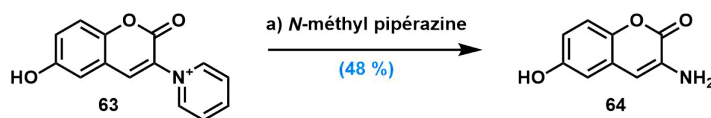


Schéma 3.11 – Mécanisme de la réaction de Zincke

Dans la stratégie développée par Costa *et al.*, cette réaction a été utilisée comme réaction de déprotection avec pour but d'isoler l'amine produite plutôt que le sel de pyridinium. Ces conditions nous ont permis d'obtenir de la 3-amino-6-hydroxycoumarine (**64**) souhaitée avec un rendement de 48 % contre 71 % décrit (Schéma 3.12).



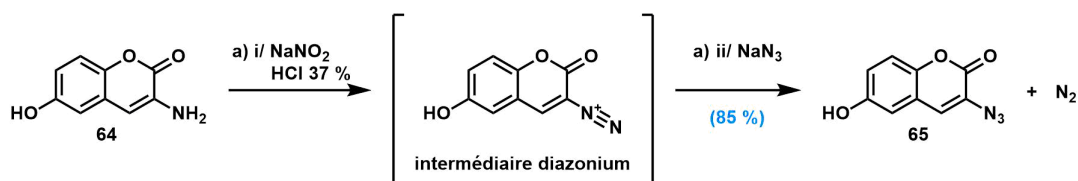
a) *N*-méthyl pipérazine (5,0 équiv.), acétone, t.a., 16 h, 48 %.

Schéma 3.12 – Conversion du groupement pyridinium du composé **63** en amine primaire

Nous avons ensuite appliqué des conditions classiques de la littérature afin de convertir l'aminocoumarine **64** en azidocoumarine **65** (Schéma 3.13).^{228,229} Pour ce faire, nous avons converti l'amine du composé **64** en diazonium par traitement avec un excès de nitrite de sodium en condition acide (HCl 12N). L'ion diazonium étant très instable, il est crucial de manipuler à froid dans des conditions anhydres afin de minimiser toutes réactions secondaires, comme son hydrolyse en alcool par exemple. L'ajout subséquent d'un excès d'azoture de sodium (12,5 équivalents) permet la conversion de l'intermédiaire en azide par substitution nucléophile. Nous avons ainsi obtenu la 3-azido-6-hydroxycoumarine (**65**) avec un rendement de 85 %.

228. Sivakumar, K. ; Xie, F. *et al. Organic Letters* **2004**, 6, 4603-4606.

229. Pinney, K. G. ; Mejia, M. P. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, 8, 2417-2425.



a) i/ HCl 12 N (20 équiv.), NaNO₂ (4,4 équiv.), acétone, H₂O, 0 °C, 30 min;
 ii/ NaN₃ (12,5 équiv.), 0 °C, 2 h, 85 %.

Schéma 3.13 – Formation de l'azidocoumarine **65** par transfert de diazo

3.2.2 Introduction de groupement alcyne en position centrale

Synthèse

Afin de pouvoir coupler l'azidocoumarine **65**, il convient de préparer le composé **55**, un analogue du composé **38** possédant un alcyne à la place de l'amine (Schéma 3.14). Pour ce faire, nous avons suivi la stratégie nosyle afin de préparer le composé **66** à partir de l'adénosine 5' nosylée **35**. La suite de la synthèse envisagée repose sur un couplage de Sonogashira entre l'alcyne propargylique du composé **66** et le dérivé bromé **3**. Il est donc nécessaire que l'alcyne en bout de chaîne propyle soit protégé de manière à ce qu'il ne réagisse pas lors du couplage palladié. Les deux principaux groupements utilisés pour protéger les alcynes vrais sont les éthers silylés et le groupement 2-hydroxypropyle.²³⁰ Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser le groupement triméthyl silyle (TMS), le précurseur **68** étant commercial.

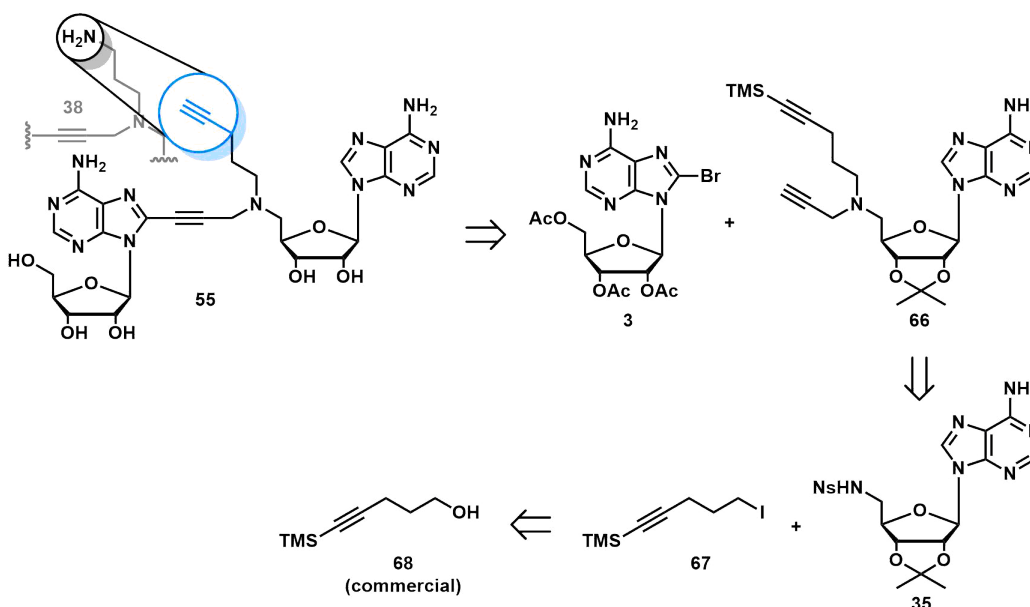


Schéma 3.14 – Rétrosynthèse envisagée du composé **55**

230. Peter G. M. Wuts, T. W. G. in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 2006, p. 927-933.

Inspirés des travaux de Bräse *et al.*²³¹, nous avons converti la fonction alcool du composé **68** en dérivé iodé **67**, par traitement à 0 °C avec un mélange de diiode et triphénylphosphine (Schéma 3.15). Ces deux réactifs forment *in situ* l'espèce active, un sel d'iodophosphonium, conduisant à conversion de l'hydroxyle en dérivé iodé. En suivant ces conditions, nous avons obtenu le dérivé **67** avec un rendement quantitatif.

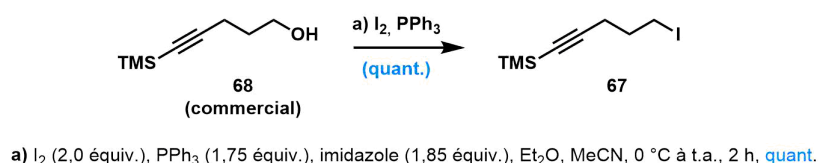


Schéma 3.15 – Conversion de l'alcool **68** en dérivé iodé **67**

L'étape suivante consiste en l'alkylation de l'adénosine 5'-nosylée **35** par le dérivé iodé **67** (Schéma 3.16). Pour ce faire, nous avons utilisé les conditions classiques en ajoutant 1,2 équivalents de dérivé iodé et 3,0 équivalents de base (K₂CO₃). Après 24 heures de réaction à 50 °C le taux de conversion du composé **35** en produit d'alkylation **69** était total. Le traitement subséquent du brut réactionnel par le thiophénol a permis d'obtenir le composé **70** avec un rendement de 88 %. Celui-ci a ensuite été propargylé *via* un excès de bromure de propargyle permettant de former l'amine tertiaire **66** avec un rendement de 82 %.

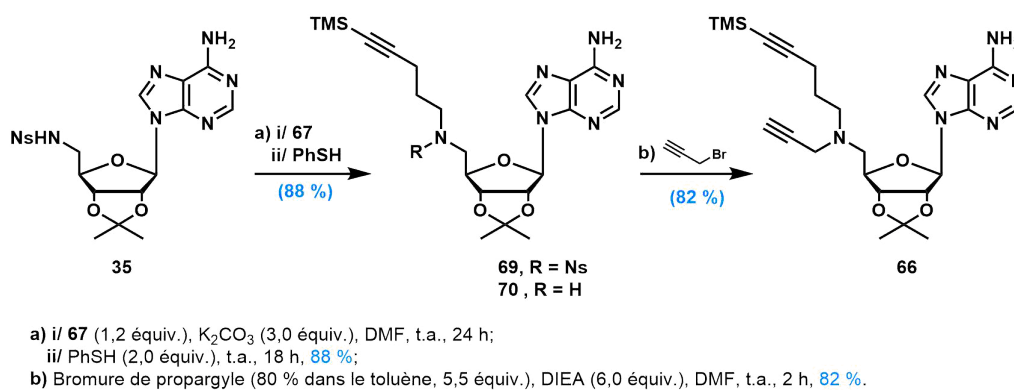


Schéma 3.16 – Application de la stratégie nosyle à la synthèse de **66**

Le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **66** et le dérivé bromé **3** a ensuite permis d'obtenir la diadénosine **71** avec un rendement de 71 % sans formation de produit d'homocouplage (Schéma 3.17). La déprotection subséquente des groupements acétyle et isopropylidène, par traitement basique puis acide, a permis d'isoler le composé déprotégé **55** avec un rendement de 46 % après purification CLHP.

231. Bräse, S.; Wortal, H. *et al. European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, 4167-4178.

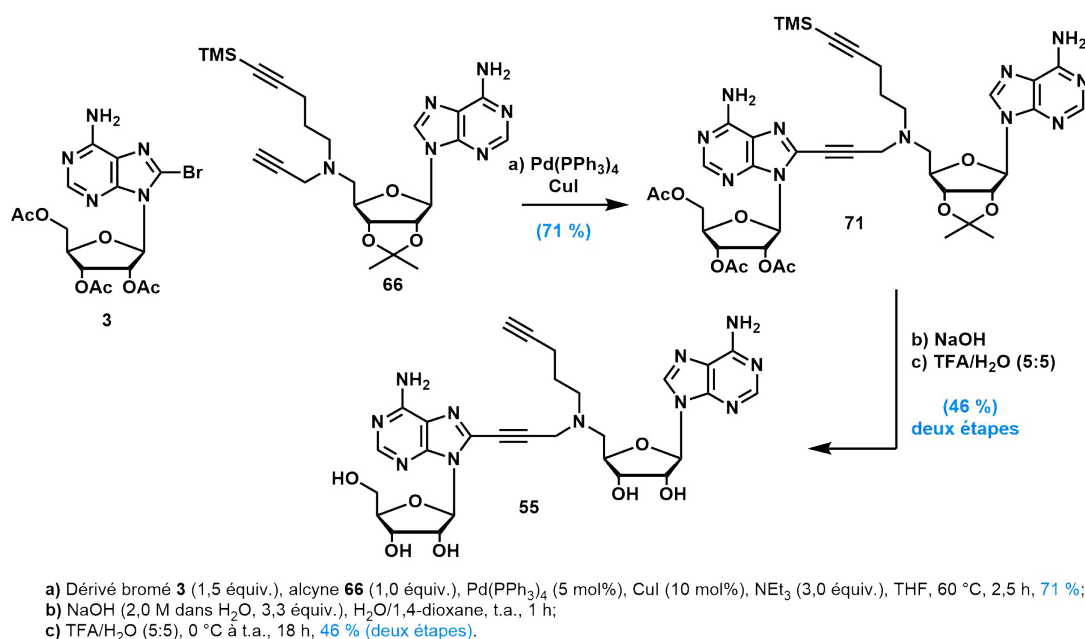


Schéma 3.17 – Couplage de Sonogashira et déprotection permettant d'obtenir F6

Evaluation du composé

A l'instar des cinq diadénosines (**1**, **2**, **38**, **45** et **46**) décrites dans le chapitre 2, la diadénosine **55** a été évaluée par nos collaborateurs afin de déterminer si elle était adaptée aux expériences de fluorescence. En plus de mesurer de son K_i vis-à-vis de *Lm*NADK et d'évaluer son positionnement dans le site NAD, le pouvoir inhibiteur de la diadénosine **55** sur culture bactérienne de *S. aureus* a été estimé.

Le composé étant destiné à des expériences sur bactéries, il est en effet nécessaire d'évaluer son activité *in vitro* sur le pathogène étudié. Ces mesures ont été réalisées par Clarisse Leseigneur, étudiante en thèse dans l'unité *Yersinia* de l'Institut Pasteur. Pour ce faire, la souche de laboratoire XEN-36 de *S. aureus* ont été cultivée en milieu nutritif (BHI) sur plaques 96 puits en présence d'une solution de l'inhibiteur à évaluer.

Celui-ci a été préalablement solubilisé dans un mélange de milieu de culture et de DMSO (9:1) afin d'obtenir quatre solutions stocks de concentrations différentes allant de 10 à 0,01 µg/mL. Les puits ont ensuite été chargés avec 90 µL de solution de l'inhibiteur aux différentes concentrations avant d'ajouter 10 µL de milieu de culture contenant *S. aureus*. Deux autres conditions ont également été réalisées dans lesquelles la solution d'inhibiteur est remplacée par du BHI (contrôle négatif) ou par une solution de levofloxacine, un antibiotique commercial (contrôle positif). Une mesure de la densité optique (DO) de chaque puits à une longueur d'onde de 600 nm a été prise chaque heure durant six heures. Celle-ci reflète directement la turbidité de la culture : une solution trouble, concentrée en bactéries, possède une densité optique élevée. Une DO basse traduit donc une faible

concentration bactérienne et une bonne efficacité du composé testé sur *S. aureus in vitro*.

Les expériences d'évaluation de la diadénosine **55** par nos collaborateurs ont permis de mesurer un K_i de $2,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (Schéma 3.18). Cette valeur est du même ordre de grandeur que le K_i de la diadénosine portant une chaîne aminopropyle en position centrale **38** ($5,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$). De plus le composé **55** se superpose à la diadénosine **38** dans le site NAD avec le groupement alcyne pointant vers l'extérieur du site. Enfin, le composé **55** présente une activité faible sur bactérie inhibant à 12 % la croissance de *S. aureus* à la concentration de $0,01 \mu\text{M}$.

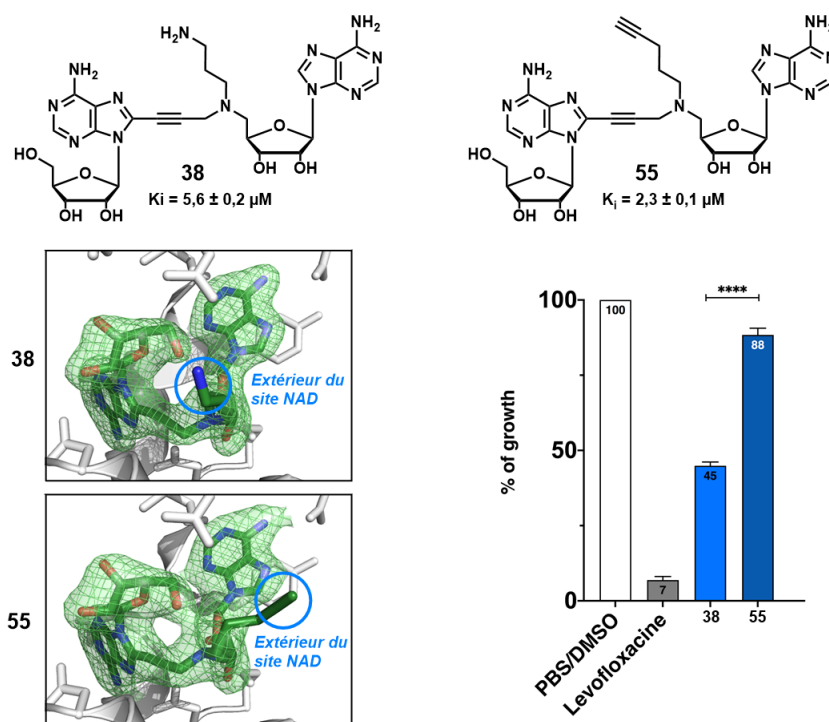


Schéma 3.18 – Propriétés du composé **55**

Bien que l'activité sur culture bactérienne de la diadénosine **55** soit faible, probablement en raison d'une mauvaise pénétration membranaire, nous avons choisi d'utiliser cette diadénosine pour réaliser les expériences de fluorescence.

Propriétés de la diadénosine greffée

La coumarine synthétisée **65** étant différente de la coumarine originellement envisagée **56**, il est nécessaire de déterminer les longueurs d'ondes optimales d'excitation et d'émission du produit de couplage par réaction de click. Nous avons donc fait réagir la fonction azide de l'azidocoumarine **65** avec la fonction alcyne de la diadénosine **72** en utilisant un système catalytique classique Cu(II)/ascorbate de sodium (Schéma 3.19).²⁰⁵ Le suivi CL/SM de la réaction a permis d'estimer un taux de conversion total après 16

heures de réaction. Malheureusement, le produit de couplage **72** est mal soluble dans les conditions de purification par colonne de silice ou par CLHP. Plusieurs lavages à l'eau ont été tentés afin d'enlever les sels de cuivre, mais les larges pics du spectre RMN obtenu indiquent que les lavages n'ont pas été suffisants. Par conséquent, nous n'avons pas pu déterminer de rendement pour cette réaction.

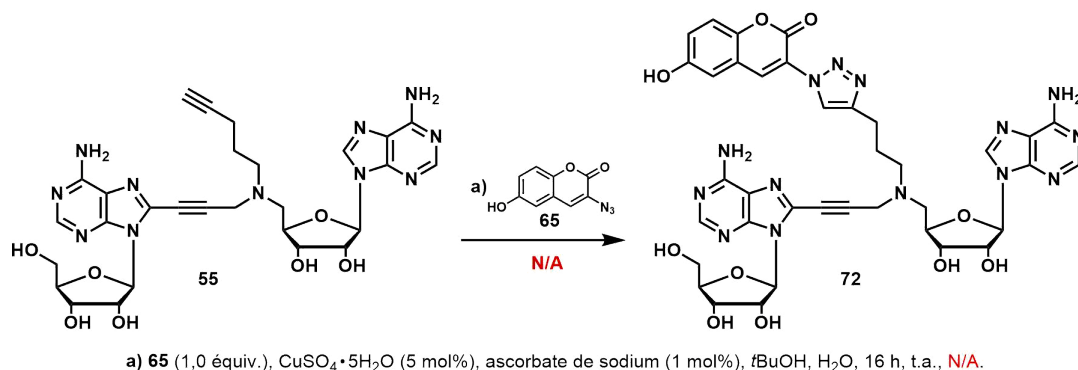


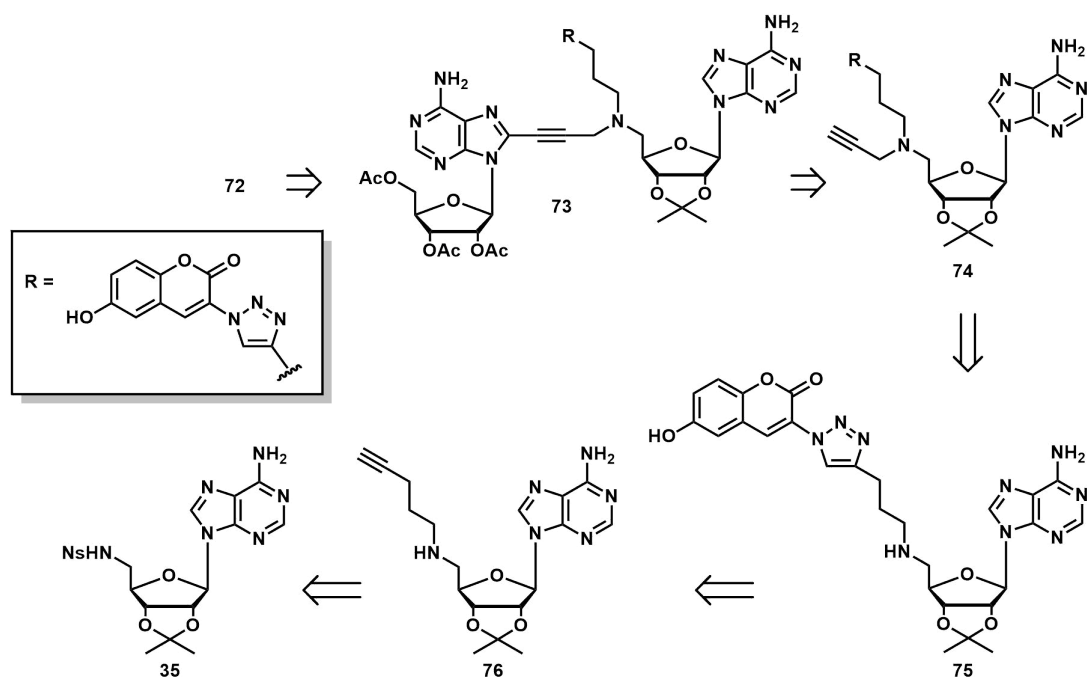
Schéma 3.19 – Réaction de click entre **55** et l'azidocoumarine **65**

Nous avons tenté de mesurer les paramètres d'absorption du composé brut mais avons obtenu un spectre peu exploitable, présentant de nombreux pics d'absorption et d'émission. Il a donc été nécessaire de revoir la synthèse en introduisant la coumarine avant la déprotection finale. Il est aussi indispensable que les réactifs ainsi que les produits de déprotection finale soient tous volatils afin de pouvoir les éliminer par simple lyophilisation.

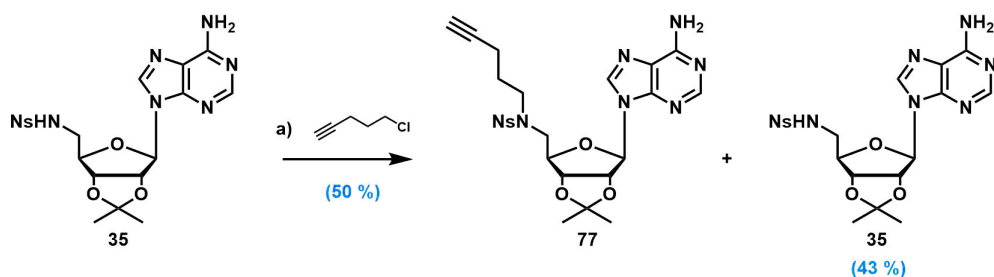
3.2.3 Synthèse de la diadénosine **72**

Première stratégie

Dans un premier temps, nous avons conservé les groupements protecteurs précédemment utilisés des fonctions alcools des adénosines (Schéma 3.20). Nous avons choisi d'introduire un alcyne vrai sur le composé nosylé **35** afin d'obtenir le composé **76**. Une cycloaddition (CuAAC) avec la coumarine **65** permettrait d'obtenir le composé **75** dont l'amine secondaire serait propargylée conduisant au composé **74**. Un couplage de Sonogashira entre celle-ci et le dérivé bromé **3**, suivi de réactions de déprotections, permettrait l'obtention du composé fluorescent souhaité **72**.

Schéma 3.20 – Nouvelle rétrosynthèse envisagée de **72**

La première étape de synthèse consiste en l'alkylation de l'adénosine 5'-nosylée **35** par le 5-chloro-1-pentyne commercial (Schéma 3.21). Nous avons commencé par utiliser les conditions classiques en ajoutant 1,5 équivalents de dérivé chloré et 3,0 équivalents de base (K_2CO_3). Après 24 heures de réaction à 50 °C, le taux de conversion semblant nul en CCM, un second ajout de dérivé chloré a été fait (1,5 équivalents). Après 48 heures additionnelles le taux de conversion semblait inchangé, toujours à 0 %. Nous avons donc traité la réaction et purifié le mélange réactionnel pensant récupérer l'adénosine 5'-nosylée **35** de départ. En réalité, dans nos conditions d'élution, le R_f du produit de départ **35** est identique au R_f du produit d'alkylation **77**. L'analyse RMN du produit de purification montre un mélange 55/45 entre le produit de départ (50 % de rendement) et le produit d'alkylation **77** (43 % de rendement).

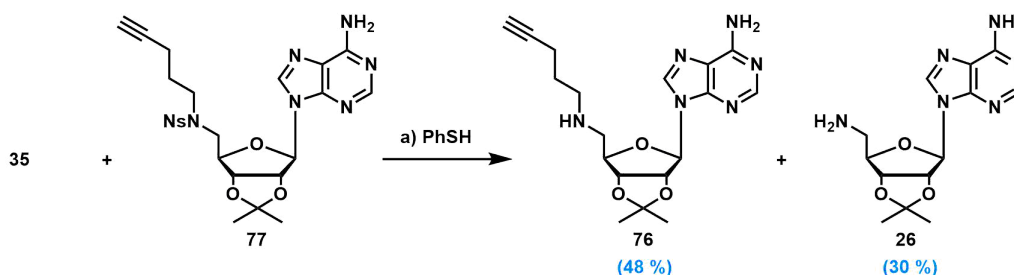


a) // 5-Chloro-1-pentyne (1,5 + 1,5 équiv.), K_2CO_3 (3,0 équiv.), DMF, 50 °C, 72 h, 50 %.

Schéma 3.21 – Obtention du mélange de produits **35** et **77**

Nous avons ensuite traité le mélange de composés **77** et **35** par le thiophénol en condition basique (K_2CO_3) afin de déprotéger le groupement nosyle (Schéma 3.22). Nous

avons ainsi pu séparer le composé **76** (rendement de 48 %) de l'amine **26** (rendement de 30 %)

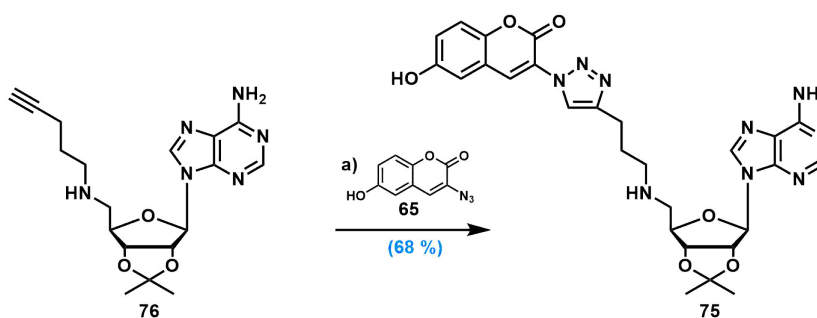


a) PhSH (2,0 équiv.), K₂CO₃ (2,0 équiv.), DMF, 50°C, 16 h, 48 %;

Schéma 3.22 – Obtention du mélange de produits **26** et **76**

Il est intéressant de noter que la vitesse de réaction d'alkylation de l'amine nosylée **35** est dépendante du caractère nucléofuge du dérivé halogéné utilisé. Lors de l'utilisation d'un dérivé chloré pour obtenir **77**, le taux de conversion est de 50 % après 48 heures, là où celui-ci est de 100 % lors de l'utilisation d'un dérivé bromé pour obtenir **36** (Cf. page 91). Le temps de réaction nécessaire passe à 24 heures lors de l'utilisation d'un dérivé iodé pour obtenir **69** (Cf. page 168).

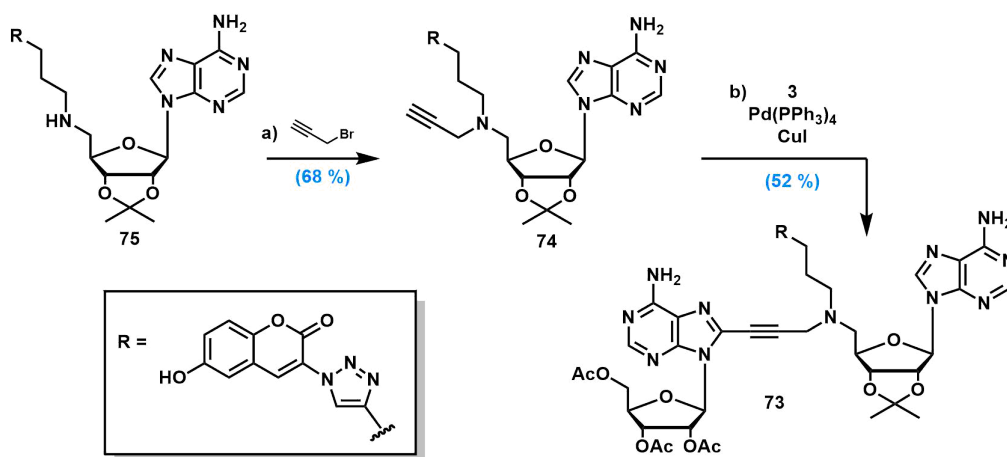
Le composé **75** a ensuite été obtenu, avec un rendement de 68 %, par réaction de cycloaddition (CuAAC) entre l'azidocoumarine **65** et l'alcyne vrai **76** (Schéma 3.23). Cette fois-ci, pour des raisons de solubilité, les solvants employés sont un mélange de THF/H₂O plutôt que le mélange *t*BuOH/H₂O utilisé pour la réaction entre la diadénosine **55** et la coumarine **65** (Cf. page 171).



b) **65** (1,2 équiv.), CuSO₄·5 H₂O (5 mol%), ascorbate de sodium (10 mol%), THF, H₂O, 7 h, 30 °C, 68 %.

Schéma 3.23 – Obtention du composé **75** par cycloaddition (CuAAC) entre le composé **76** et l'azidocoumarine **65**

La propargylation de **75** dans les conditions utilisées précédemment a permis d'obtenir l'alcyne vrai **74** avec un rendement de 68 % (Schéma 3.24). Celui-ci a ensuite réagi avec le dérivé bromé **3** par couplage de Sonogashira dans les conditions classiques, permettant d'obtenir le produit **73** avec un rendement de 52 % ainsi que 36 % de produit d'homocouplage.

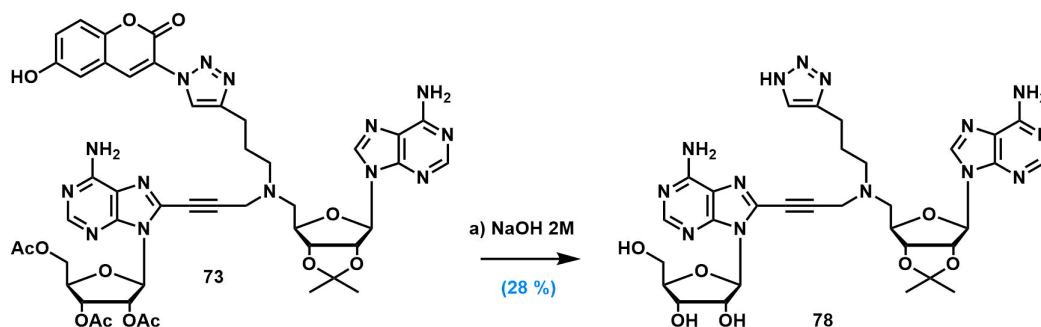


a) Bromure de propargyle (80 % dans le toluène, 5,5 équiv.), DIEA (6,0 équiv.), DMF, t.a., 1 h, **68 %**,

b) Dérivé bromé **3** (1,5 équiv.), alcyne **74** (1,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%), Cul (10 mol%), NEt₃ (3,0 équiv.) THF, 60 °C, 6 h, **52 %**.

Schéma 3.24 – Couplage de Sonogashira de l'alcyne **74** avec le dérivé bromé **3**

Nous avons ensuite déprotégé les groupements acétyle de la diadénosine **73** avec un léger excès (3,2 équivalents) d'une solution de soude 2 M (Schéma 3.25). Après deux heures de réaction à température ambiante, le suivi CL/SM indique qu'un des groupements acétyle était encore présent. Nous avons donc ajouté un équivalent de soude toutes les heures pendant quatre heures afin de forcer la réaction. Un suivi par CL/SM indiquait une lente déprotection de l'acétyle restant, ainsi que la formation d'un produit secondaire en très faible quantité (moins de 5 % après six heures). Cependant, après 48 heures supplémentaires à -20 °C, ce pic était majoritaire. Après lyophilisation, le brut réactionnel étant hydrosoluble, nous l'avons purifié par CLHP permettant d'isoler le produit désacétylé **78** ayant également perdu sa coumarine avec un rendement de 28 %.



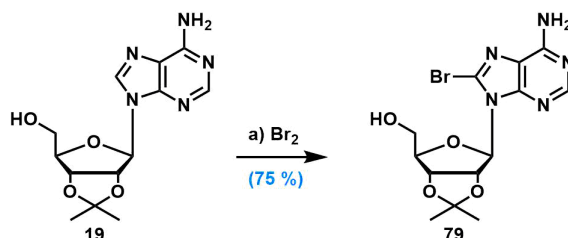
a) NaOH (2 M dans l'eau, 3,2 + 4,0 équiv.), H₂O, 1,4-dioxane, t.a., 6 h puis -20 °C, 48 h, **28%**.

Schéma 3.25 – Déprotection des acétates de **73** et rupture de la liaison triazole/coumarine

Seconde stratégie, déprotection acide

Le lien triazole formé après la cycloaddition (CuAAC) étant sensible aux conditions aqueuses basiques, nous avons opté pour l'emploi d'un groupement isopropylidène à la place des acétyles protégeant les alcools de l'adénosine du bloc A. Nous avons donc

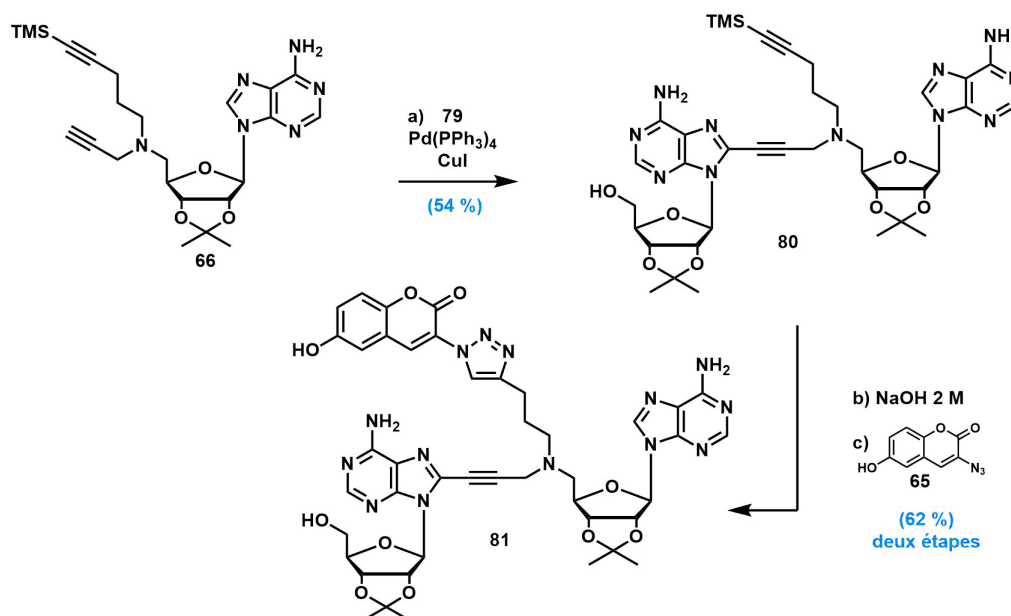
synthétisé le composé **79** avec un rendement de 75 % (Schéma 3.26) par bromation en position 8 de la purine du composé **19** *via* le dibrome en milieu tamponné.



a) Br_2 (2,0 équiv.), 1,4-dioxane, tampon acétate (0,5 M, pH = 5,3), t.a., 16 h, 75 %.

Schéma 3.26 – Bromation de la 2',3'-O-isopropylidèneadénosine (**19**)

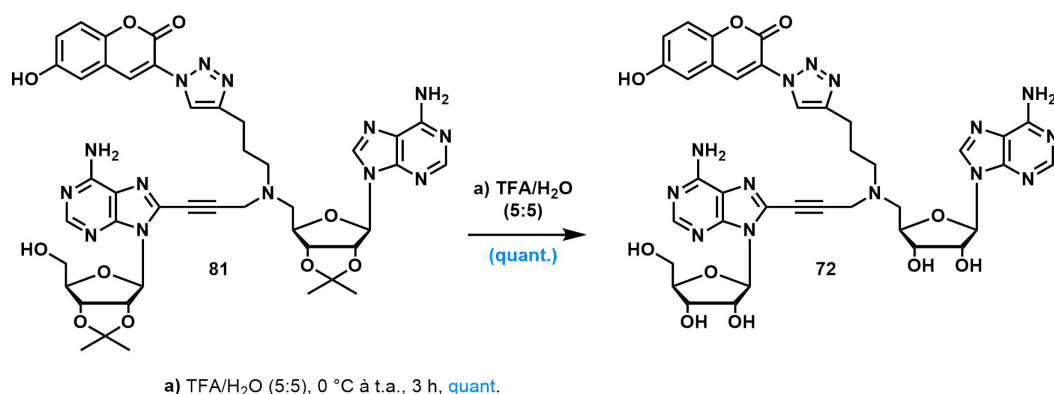
Un couplage de Sonogashira entre l'alcyne **66** et le dérivé bromé **79** a permis d'obtenir la diadénosine **80** avec un rendement de 54 % (Schéma 3.27). Le groupement TMS a ensuite été retiré par traitement basique. Puis l'azidocoumarine **65** a été cliquée sur l'alcyne vrai, conduisant à l'obtention de la diadénosine **81** avec un rendement de 62 % en deux étapes.



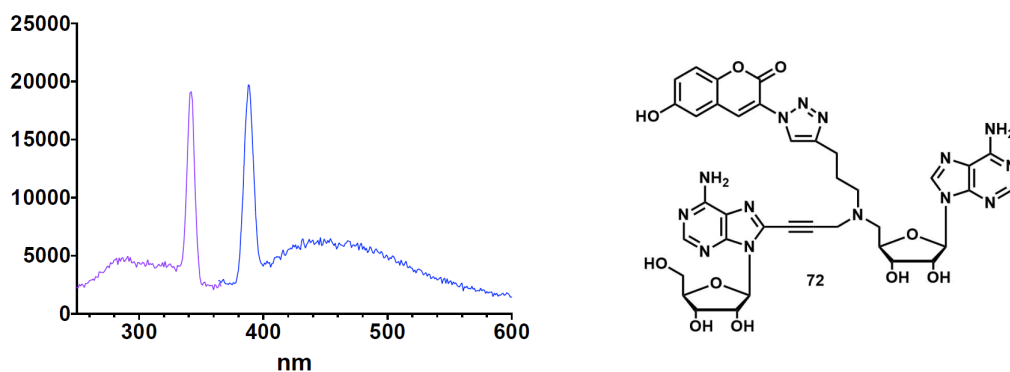
a) Halogène **79** (1,5 équiv.), alcyne **66** (1,0 équiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%), CuI (10 mol%), NEt_3 (3,0 équiv.), THF, 60 °C, 5 h, 54 %,
 b) NaOH (2,0 M dans H_2O , 1,8 équiv.), H_2O /1,4-dioxane, t.a., 2,5 h;
 c) **65** (1,2 équiv.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (5 mol%), ascorbate de sodium (10 mol%), THF, H_2O , 5 h, 35 °C., 62 %.

Schéma 3.27 – Couplage de Sonogashira et réaction de click conduisant à l'obtention du composé **81**

Enfin, un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau) a permis de retirer les groupements isopropylidènes avec succès (Schéma 3.28). Une série de lyophilisations a permis d'obtenir le composé **72** avec un rendement quasi quantitatif.

Schéma 3.28 – Déprotection de la diadénosine **81** en condition acide

Les paramètres de fluorescence du composé déprotégé **72** ont ensuite pu être déterminés. Celui-ci présente un pic d'excitation à 342 nm, ainsi qu'un pic d'émission à 388 nm, respectivement en mauve et en bleu sur la figure (Figure 3.4).

Figure 3.4 – Spectre de fluorescence du composé **72**

Afin d'avoir de bonnes images en microscopie de fluorescence, il est recommandé d'avoir un pic d'émission trois à quatre fois plus intense que le pic d'absorption. Par ailleurs, l'appareillage disponible sur le campus ne nous permet pas une irradiation à longueur d'onde d'excitation de cette coumarine. Cependant, des expériences de fluorescence ont été réalisés avec cette sonde en irradiant à 365 nm, longueur d'onde disponible sur le campus.

3.2.4 Essais de fluorescence *in bacterio*

Le première étape de l'expérience consiste en le traitement de cultures de *S. aureus* par la diadénosine **55**. Dans le cadre des expériences de fluorescence, nous avons sélectionné deux conditions de concentration : la concentration en inhibiteur la plus élevée (10 µg/mL) et la concentration en inhibiteur montrant le meilleur effet sur croissance bactérienne (0.01 µg/mL). Après six heures de culture, les bactéries sont fixées sur lamelle de verre par traitement avec une solution aqueuse à 0,3 % de paraformaldéhyde.

L'étape suivante consiste en la réaction de click entre l'inhibiteur **55**, portant une fonction alcyne, et le fluorescent **64**, portant une fonction azide. Pour ce faire, nous avons

adapté un protocole de la littérature en incubant les bactéries fixées avec une solution d'azidocoumarine **64** à 24 μM dans un tampon dit "de click" (Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5, CuSO_4 1 mM et acide ascorbique 50 mM).²¹⁷ Après 4 heures de réaction à 37 °C, une étape de lavage permet de retirer l'excès de coumarine n'ayant pas réagi, avant de procéder aux expériences de microscopie de fluorescence.

Des contrôles négatifs pour ces deux étapes ont systématiquement été réalisés, conduisant à l'obtention de six conditions. Celles-ci diffèrent par la concentration en diadénosine **55** (10 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ou 0 $\mu\text{g/mL}$) et par de la réalisation, ou non, de la réaction de click.

Les différents essais ont été visualisés au microscope de fluorescence. Pour chaque condition, deux images ont été prises : la première en contraste de phase, c'est à dire sans irradiation, et la seconde en irradiant à 365 nm. Une troisième image est ensuite produite par superposition des deux images précédentes par traitement informatique.

Dans un premier temps nous avons analysé les images des bactéries traitées avec la diadénosine **55** suivi de la réaction de click. Lorsqu'elles sont irradiées à 365 nm, on observe un signal lumineux colocalisant avec les bactéries qui pourrait être attribué au produit de click **72** (non représenté ici).

Dans un second temps, nous avons analysé le double témoin négatif à savoir les populations de *S. aureus* non traitées par l'inhibiteur **55** et n'ayant pas été mises en conditions de click. Malheureusement, un signal lumineux est aussi observé dans ces conditions, probablement dû à un phénomène d'auto-fluorescence des bactéries à cette longueur d'onde (Cf. Figure 3.5).

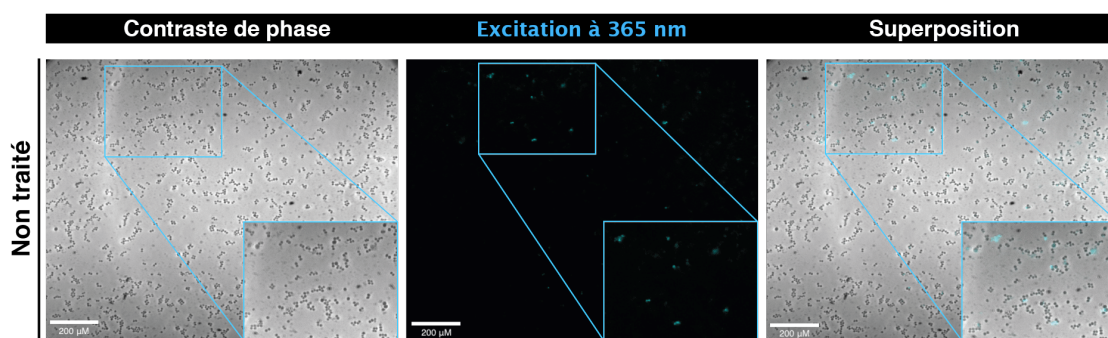


Figure 3.5 – Images de fluorescence de bactéries non traitées ou traitées (**55** à 10 $\mu\text{g/mL}$)

Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à la localisation de l'inhibiteur **55** dans la bactérie. Nous avons alors irradié les doubles témoins négatifs à plusieurs longueurs d'onde afin d'identifier celles qui ne provoqueraient pas d'auto-fluorescence de *S. aureus*. Parmi celles identifiées, nous avons retenu l'excitation à 550 nm pour une lecture comprise entre 560-670 nm.

3.3 Utilisation de l'Alexa Fluor 555 en tant que fluorescent

Compte tenu des propriétés d'auto fluorescence observées sur *S. aureus*, nous avons choisi d'employer un fluorophore commercial, l'AF555-Azide[®] de Jena Bioscience[®], décrit pour avoir un λ_{max} d'excitation à 555 nm et un λ_{max} d'émission à 572 nm. Celui-ci est présenté comme un analogue de l'Alexa Fluor 555[®] commercialisé par Invitrogen[®].

Dans la littérature plusieurs conditions de lecture de ce type de composé ont été décrites. Williard *et al.*²³² ont eu recours à l'Alexa Fluor 555 couplé à la phalloïdine, une toxine se liant aux filaments d'actine, afin de visualiser ces filaments dans des cellules cancéreuses humaines. Le fluorophore est visualisé par irradiation à 543 nm et lecture entre 565 et 615 nm.

Mitchison *et al.*^{196,197} ont décrit l'utilisation de ce fluorescent fonctionnalisé par un azide, afin de visualiser l'incorporation d'EdU, une base nucléique modifiée portant un alcyne terminal, dans l'ADN de cellules en prolifération. Après réaction de click, une irradiation à 491 nm permet une détection de celui-ci par lecture entre 500 et 575 nm (Schéma 3.29).

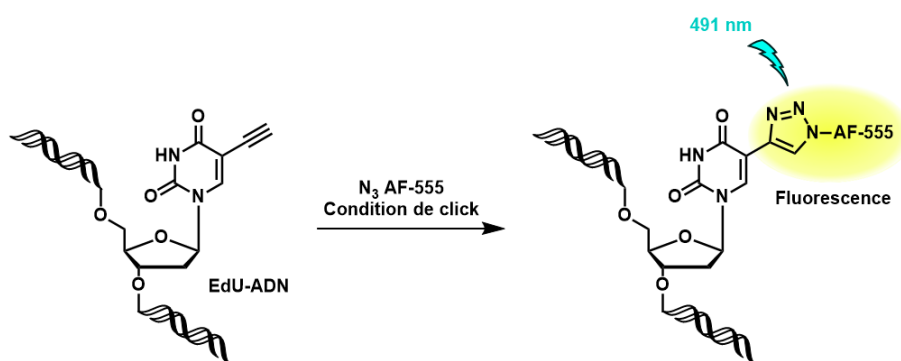


Schéma 3.29 – Principe de la visualisation de "l'EdU ADN" utilisé par Mitchison

Puisque nous cherchons aussi à visualiser une molécule portant une fonction alcyne, nous avons choisi d'appliquer les conditions de Mitchison *et al.* pour visualiser la diadénosine **55**.¹⁹⁶ Comme précédemment, les bactéries ont d'abord été cultivées en présence de l'inhibiteur avant d'être fixées sur lamelle (Cf. page 176). Après cela, elles ont été incubées avec une solution d'AF555-Azide[®] à 10 μM dans un tampon "de click" (Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5, CuSO₄ 1 mM et acide ascorbique 100 mM). Après 30 minutes de réaction à 37°C, l'étape de lavage permet de retirer l'excès de fluorophore n'ayant pas réagi avant de procéder aux expériences de microscopie de fluorescence. À l'instar des expériences menées avec l'azidocoumarine, des contrôles négatifs des deux étapes (traitement par **55** et click) ont systématiquement été réalisés.

Cette fois-ci le double témoin négatif n'a pas montré de signal de fluorescence

232. Willard, M. D.; Lajiness, M. E. *et al. Molecular Cancer Research* **2012**, 10, 739.

confirmant que ces paramètres d'excitation et d'émission sont plus adaptés aux bactéries étudiées (Figure 3.6, Non traité).

Nous avons ensuite visualisé les bactéries dont le traitement avec la diadénosine **55** a été suivi de la réaction de click. Lorsqu'elles sont irradiées à 550 nm, on observe un signal lumineux colocalisant avec les bactéries (Figure 3.6, Traité). L'absence d'auto fluorescence permet de conclure qu'il y a bien colocalisation entre l'inhibiteur **55** et les bactéries.

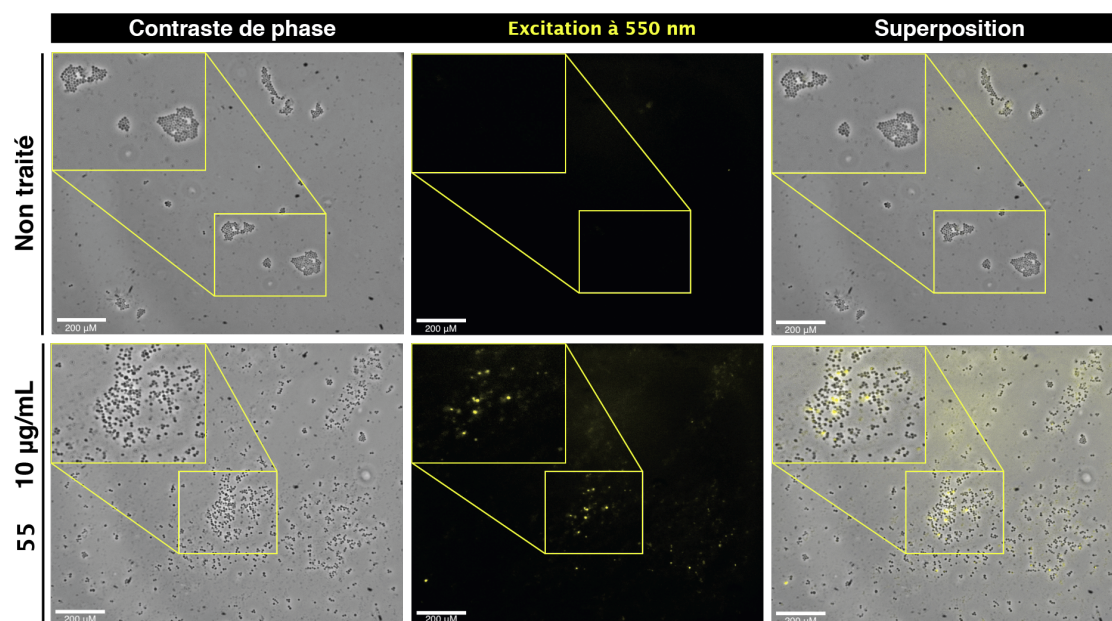


Figure 3.6 – Images de fluorescence de bactéries non traitées ou traitées (**55** à 10 µg/mL)

3.4 Conclusion du chapitre

Au cours du chapitre précédent, nous avons montré qu'une modification à la position centrale de la diadénosine **NKI-1** permet un greffage sur support solide sans conséquence néfaste sur l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible.

Au cours de ce chapitre nous avons tiré partie de cette propriété pour synthétiser un autre composé en vue d'expériences de fluorescence. En appliquant la stratégie nosyle nous avons synthétisé la diadénosine **55**, un analogue du composé **38** possédant un alcyne à la place de l'amine.

Nous avons aussi sélectionné une coumarine semblant prometteuse en tant que fluorophore. La première approche synthétique impliquait la construction du noyau coumarine par réaction de Perkin modifiée, suivie d'un transfert de diazo afin de préparer le composé souhaité **56**. N'ayant pas été en mesure de l'obtenir, nous avons opté pour la synthèse d'un autre analogue en utilisant une stratégie plus originale qui repose l'utilisation de sels de pyridiniums. Celle-ci nous a permis d'isoler l'azidocoumarine **64** avec succès.

L'étape suivante a été la synthèse chimique du produit de "click" entre l'azidocou-

marine **64** et l'alcyne **55** afin de déterminer ses paramètres de fluorescence. Plusieurs approches synthétiques ont été suivies nous permettant *in fine* d'obtenir le composé souhaité **72** et de déterminer un λ_{max} d'excitation à 342 nm et un λ_{max} d'émission à 388 nm. Une première expérience de fluorescence a été réalisée avec pour but d'estimer la colocalisation entre l'alcyne **55** et les bactéries. Malheureusement ce premier essai fut infructueux, la longueur d'onde d'excitation requise provoquant une autofluorescence des celles-ci.

Un autre fluorescent a donc été sélectionné de façon à ce que son excitation n'induisse pas ce phénomène d'autofluorescence. La manipulation a été reproduite conduisant, cette fois, à des données exploitables nous permettant de conclure que l'inhibiteur **55** colocalise bien avec les bactéries.

L'étape suivante serait de transposer ce savoir-faire à des expériences de microscopie de fluorescence à haute résolution. Celles-ci permettraient de déterminer la localisation cellulaire de l'alcyne **55**, nous informant s'il se trouve en milieu intracellulaire (dans le cytoplasme) ou à l'extérieur des bactéries (sur la membrane). L'expérience suivante serait la modification génétique de *Sa*NADK, la combinant avec un protéine fluorescente verte (GFP en anglais), pour en faire une protéine de fusion fluorescente. Cela permettrait de réaliser des expériences de colocalisation entre la diadénosine **55** et sa cible, qui confirmerait que la NADK est bien la cible principale de l'inhibiteur.

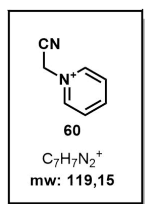
Il serait aussi intéressant de mettre au point des réactions biocompatibles en utilisant des ligands du cuivre (I), tels que le TBTA ou le BTES. Il est aussi envisageable de remplacer la fonction alcyne de la diadénosine par une fonction azide et d'y faire réagir un alcyne contraint, sous forme de cyclooctyne, en conditions exemptes de cuivre. Le développement de ces deux conditions permettrait, *in fine*, de faire des expériences d'imagerie dynamique.

Experimental section

Fluorescence microscopy

S. aureus strains were grown overnight in BHI at 37°C. Bacteria were diluted to an OD_{600nm} of 0.5 and allowed to grow for 6h at 37°C with 200 rpm in BHI with 25% PBS, supplemented when indicated with inhibitor **55**, on microscope slides in a 24 wells plate. Bacteria were fixed for 10 min with 4% Paraformaldehyde. After several washes, inhibitor **55** was labelled using Alexa 555 azide (REF) in click reaction buffer.¹⁹⁶

Slides were mounted using Fluoromount G mounting media. Phase-contrast and fluorescence visualization of the fixed bacteria were performed using a Zeiss Axiovert 200M microscope equipped with a Plan-Apochromat objective (100X/1.4 Oil Ph3; Zeiss). Image acquisition was done using a CCD Camera Coolsnap attached to the microscope and Metamorph v. 6 software (Molecular Devices). ImageJ software was used to analyze the images.

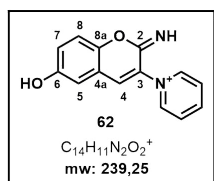
***N*-(Cyanomethyl)pyridinium (60)**

Bromoacetonitrile (1.39 mL, 20.0 mmol, 1.0 equiv.) was added to a solution of pyridine (2,10 mL, 26.0 mmol, 1.3 equiv.) in THF (20 mL). After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the solid residue was triturated twice with ice-cold diethyl ether (2x 20 mL). The solid was dried *in vacuo* to afford compound **60** (2,5 g, 63 %) as a beige solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.07 (s, 2H, CH₂), 8.26-8.31 (m, 2H, H-M), 8.73-8.78 (m, 1H, H-P), 9.21-9.25 (m, 2H, H-O).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 48.1 (CH₂), 114.7 (Cq nitrile), 129.0 (2C, CH-P), 145.9 (2, CH-O), 148.0 (CH-P).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₇H₇N₂]⁺ 119.0609 found 119.0606.

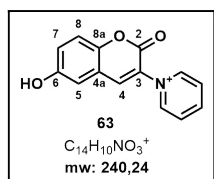
1-(2-Imino-6-hydroxy-chromene-3-yl)pyridinium bromide (62)

A suspension of **60** (223 mg, 1.12 mmol, 1.0 equiv.) and 2,5-dihydroxybenzaldehyde (154 mg, 1.12 mmol, 1.0 equiv.) in ethanol (450 µL) and acetone (1.34 mL) was cooled down to 0 °C before adding *N*-methyl piperazine (112 µL, 1.01 mmol, 0.9 equiv.). After 1 hour at room temperature, the solid was filtered and washed three times with ice cold acetone (3x 10 mL). The solid was then dried *in vacuo* to afford compound **62** (286 mg, 80 %) as a beige solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.00-7.07 (m, 2H, H-5 and H-7), 7.17 (d, J_{8,7} = 8.8 Hz, 1H, H-8), 8.17 (s, 1H, NH), 8.32-8.37 (m, 2H, CH-M), 8.80 (s, 1H, H-4), 8.80-8.86 (m, 1H, CH-O), 9.28-9.31 (m 2H, CH-O), 9.78 (s, 1H, OH-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 114.6 (C-5), 117.0 (C-8), 118.6 (C-7), 119.3 (C-8a), 124.6 (C-3), 128.5 (3C, CH-M and C-4), 146.7 (3C, CH-O and C4a), 148.6 (CH-P), 153.7 (C-6), 154.5 (C-2).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₄H₁₁N₂O₂]⁺ 239.0820 found 239.0829.

1-(6-Hydroxy-coumarin-3-yl)pyridinium bromide (63)

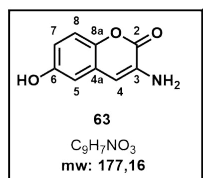
HCl (37 % in water, 280 μ L, 3.4 mmol, 3.8 equiv.) was added to a solution of **62** (286 mg, 0.9 mmol, 1.0 equiv) in water (5,6 mL). After 3 hours at 80 °C, the mixture was brought back to room temperature and the volatiles were removed *in vacuo*. The solid residue was triturated twice with ice-cold acetone (2x 10 mL) and was dried *in vacuo* to afford compound **63** (289 mg, quant. yield) as a dark brown solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.25 (d, J_{5,7} = 2.8 Hz, 1H, H-5), 7.30 (dd, J_{7,5} = 2.8 Hz, J_{7,8} = 9.0 Hz, 1H, H-7), 7.50 (d, J_{8,7} = 9.0 Hz, 1H, H-8), 8.37-8.42 (m 2H, CH-M), 8.77 (s, 1H, H-4), 8.85-8.91 (m, 1H, CH-P), 9.27-9.30 (m, 2H, CH-O), 10.29 (s, 1H, OH-6).

(400 MHz, DMSO-*d*₆)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 114.2 (C-5), 118.1 (C-8), 118.6 (C-8a), 123.0 (C-7), 128.4 (2C, CH-M), 129.5 (C-3), 141.3 (C-4), 146.4 (2C, CH-O), 147.0 (C-4a), 148.7 (CH-P), 155.3 (C-6), 157.0 (C-2).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₄H₁₀NO₃]⁺ 240.0661 found 240.0657.

3-Amino-6-hydroxycoumarin (64)

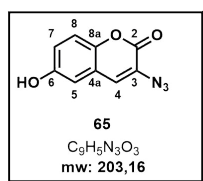
N-methyl piperazine (621 μ L, 5.6 mmol, 6.25 equiv) was added to a suspension of **63** (289) in acetone (28 mL). After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude was purified by flash column chromatography (30 g, SiO₂, 0 to 1% methanol in dichloromethane) to afford compound **64** (76.6 mg, 48%) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.60 (s, 2H, NH₂), 6.61 (s, 1H, H-4), 6.65 (dd, J_{7,5} = 2.8 Hz, J_{7,8} = 8.7 Hz, 1H, H-7), 6.71 (d, J_{5,7} = 2.8 Hz, 1H, H-5), 7.09 (d, J_{8,7} = 8.7 Hz, 1H, H-8), 9.36 (s, 1H, OH-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 108.2 (C-4), 109.7 (C-5), 113.7 (C-7), 116.6 (C-8), 122.8 (C-8a), 133.8 (C-3), 142.0 (C-4a), 154.4 (C-6), 159.2 (C-2).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₉H₇NO₃+H]⁺ 178.0504 found 178.0502.

3-Azido-6-hydroxycoumarin (65)



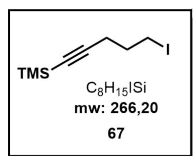
A solution of **64** (117 mg, 0.66 mmol, 1.0 equiv.) in acetone (8.0 mL) and water (8.0 mL) was cooled down to 0 °C before adding HCl (37 % in water, 1 mL, 18 equiv.). After 10 minutes at 0 °C, NaNO₂ (201 mg, 2.91 mmol, 4.4 equiv.) was added. After 30 additional minutes at 0 °C, NaN₃ (537 mg, 8.3 mmol, 12.5 equiv) was added. After 1,5 hours at room temperature, the crude was extracted twice with diethyl ether (2x 50 mL). Volatiles were removed and the crude was purified by flash column chromatography (20 g, SiO₂, 0 to 2% methanol in dichloromethane) to afford compound **65** (115 mg, 85%) as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.94-6.98 (m, 2H, H-5 and H-7), 7.25-7.29 (m, 1H, H-8), 7.59 (s, 1H, H-4), 9.74 (s, 1H, OH-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 112.4 (C-5), 117.3 (C-8), 119 .0 (C-7), 120.3 (C-8a), 126.0 (C-3), 127.1 (C-4), 144.8 (C-4a), 154.7 (C-6), 157.6 (C-2).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₉H₅N₃O₃-H]⁻ 202.0253 found 202.0250.

(5-Iodo-1-pentynyl)trimethylsilane (**67**)



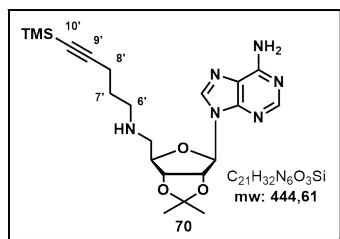
To a solution of 5-(trimethylsilyl)-4-pentyn-1-ol (363 μL, 2.0 mmol, 1.0 equiv) in Et₂O (4.0 mL) and MeCN (3.0 mL) were added triphenylphosphine (0.92 g, 3.5 mmol, 1.75 equiv) and imidazole (252 mg, 3.7 mmol, 1.85 equiv). The solution was cooled down to 0 °C before adding slowly iodine (1.02 g, 4.0 mmol, 2.0 equiv). After 2 hours at room temperature the reaction was diluted with Et₂O (50 mL) and washed with a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (50 mL). After full discoloration, the organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, dichloromethane) to yield iodinated compound **67** (352 mg, quantitative yield) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.17 (s, 9H, CH₃-TMS), 2.03 (quint., *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-2), 2.39 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-3), 3.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-H1).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 0.07 (3C, CH₃-TMS), 5.00 (C-1), 20.89 (C-3), 32.10 (C-2), 85.88 (C-4), 104.85 (C-5).

Compound does not ionise in HRMS (ESI-TOF) either in positive or negative mode.

5'-Deoxy-5'-(*N*-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl-amino)2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (70**)**

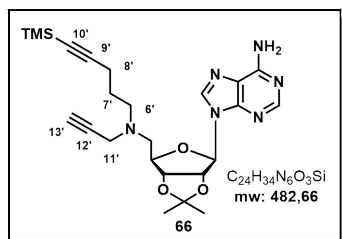


To a solution of **35** (491 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) in DMF (10 mL) was added K_2CO_3 (414 mg, 3.0 mmol, 3.0 equiv). The mixture was stirred for 10 minutes before addition of the iodo derivative **67** (319 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv). Upon consumption of the starting material, thiophenol (206 μ L, 2.0 mmol, 2.0 equiv) was added. After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO_2 , 0-6% methanol in dichloromethane) to yield compound **70** (392 mg, 88%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 1.03 (s, 9H, CH_3 -TMS), 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.53 (quint., $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -7'), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -8'), 2.54 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -9'), 2.67 (dd, $J_{5'',4'} = 6.2$ Hz, $J_{5'',5'} = 12.4$ Hz, 1H, H-5''), 2.74 (dd, $J_{5',4'} = 5.8$ Hz, $J_{5',5''} = 12.4$ Hz, 1H, H-5'), 4.20 (td app, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.0$ Hz, $J_{4',3'} = 2.8$ Hz, 1H, H-4'), 4.97 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.46 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.10 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 7.31 (brs, 2H, NH_2 -6), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.35 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 0.61 (3C, CH_3 -TMS), 17.36 (C-6'), 25.74 (CH_3 isop.), 27.53 (CH_3 isop.), 28.63 (C-7'), 48.49 (C-9'), 51.34 (C-5'), 82.66 (C-3'), 83.21 (C-2'), 84.64 (C-10'), 85.41 (C-4'), 89.73 (C-1'), 108.43 (C-9'), 113.67 (Cq isop.), 119.72 (C-5), 140.47 (C-8), 149.40 (C-4), 153.12 (C-2), 156.63 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{21}H_{32}N_6O_3Si + H]^+$ 445.2383 found 445.2383.

5'-Deoxy-5'-(N-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl-N-propargyl-amino)2',3'-O-isopropylidene-adenosine (66)

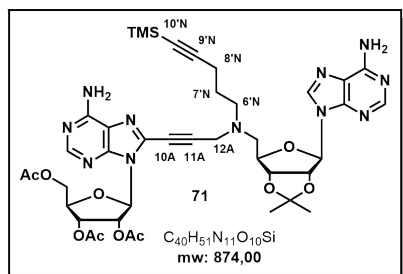
To a solution of **70** (105 mg, 0.24 mmol, 1.0 equiv) in DMF (2.4 mL) were added DIPEA (247 μ L, 1.42 mmol, 6.0 equiv) and propargyl bromide (80% in toluene, 145 μ L, 1.3 mmol, 5.5 equiv). After 2 hours at room temperature, the reaction was diluted with AcOEt (50 mL) and was washed twice with water (2x 20 mL) and once with brine (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO₂, 0-2% methanol in dichloromethane) to yield compound **66** (93 mg, 82%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.16 (s, 9H, CH₃-TMS), 1.14 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.63 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.67 (quint., J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-7'), 2.14 (t, $J_{13',11'}$ = 2.2 Hz, 1H, CH-13'), 2.27 (td, $J_{8',7'}$ = 7.1 Hz, $J_{8',8''}$ = 2.4 Hz, 2H, CH₂-8'), 2.65 (td, $J_{6',6''}$ = 1.4 Hz, $J_{6',7'}$ = 7.1 Hz, 2H, CH₂-6'), 2.82 (d, $J_{5',4'}$ = 6.8 Hz, 2H, H-5' and H-5''), 3.46 (d, $J_{11',13'}$ = 2.2 Hz, 2H, CH₂-11'), 4.43 (td, $J_{4',5'}$ = 6.8 Hz, $J_{4',3'}$ = 3.3 Hz, 1H, H-4'), 5.01 (dd, $J_{3',4'}$ = 3.3 Hz, $J_{3',2'}$ = 6.4 Hz, 1H, H-3'), 5.50 (dd, $J_{2',3'}$ = 6.4 Hz, $J_{2',1'}$ = 2.1 Hz, 1H, H-2'), 5.87 (brs, 2H, NH₂-6), 6.09 (d, $J_{1',2'}$ = 2.1 Hz, 1H, H-1'), 7.97 (1H, s, H-8), 8.38 (1H, s, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 0.12(3C, CH₃-TMS), 17.53 (C-8'), 25.39 (CH₃ isop.), 26.26 (C-7'), 27.12 (CH₃ isop.), 42.66 (C-11'), 53.15 (C-6'), 55.28 (C-5'), 73.44 (C-13'), 77.20 (C-12'), 83.28 (C-3'), 83.93 (C-2'), 85.00 (C-10'), 85.49 (C-4'), 91.11 (C-1'), 106.69 (C-9'), 114.42 (Cq isop.), 120.40 (C-5), 140.19 (C-8), 149.30 (C-4), 152.77 (C-2), 155.35 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₄H₃₄N₆O₃Si + H]⁺ 483.2540 found 483.2540.

5'-Deoxy-5'-(*N*-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl-*N*-[3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (71)

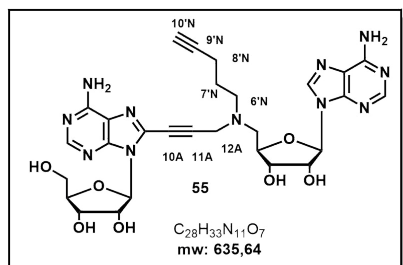


To a solution of alkyne **66** (201 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv) and bromo derivative **3** (259 mg, 0.63 mmol, 1.5 equiv) in THF (4.0 mL) was added triethylamine (174 μ L, 1.25 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (8 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (24 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 2.5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (30 g SiO₂, 0-5% methanol in dichloromethane) to yield **71** (323 mg, 71%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.10 (s, 9H, CH₃-TMS), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.01 (quint., *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-7'N), 1.95 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.97 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.07 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.25 (ABq, *J*_{8',7'} = 7.0 Hz, 2H, CH₂-8'N), 2.61 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-6'N), 2.67 (dd, *J*_{5'N,4'N} = 6.2 Hz, *J*_{5'N,5''N} = 13.1 Hz, 1H, H-5'N), 2.84 (dd, *J*_{5''N,4'N} = 7.8 Hz, *J*_{5''N,5'N} = 13.1 Hz, 1H, H-5''N), 3.81 (ABq, *J*_{12A',12A''} = 18.3 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.16 (dd, *J*_{5'A,4'A} = 5.6 Hz, *J*_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 4.28-4.33 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.41 (dd, *J*_{5''A,4'A} = 3.6 Hz, *J*_{5''A,5'A} = 12.0 Hz, 1H, H-5''A), 5.03 (dd, *J*_{3'N,4'N} = 2.9 Hz, *J*_{3'N,2'N} = 6.3 Hz, 1H, H-3'N), 5.51 (dd, *J*_{2'N,1'N} = 2.4 Hz, *J*_{2'N,3'N} = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-3'A), 6.12 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-1'A), 6.17-6.20 (m, 2H, H-1'N and H-2'A), 7.31 (brs, 2H, NH₂-6A), 7.57 (brs, 2H, NH₂-6N), 8.18 (s, 1H, H-2N), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.34 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.54 (3C, CH₃-TMS), 17.19 (C8'N), 20.50 (CH₃ OAc), 20.70 (CH₃ OAc), 20.85 (CH₃ OAc), 25.69 (CH₃ isop.), 26.46 (C-7'N), 27.44 (CH₃ isop.), 43.39 (C-12A), 50.05 (C-6'N), 55.55 (C-5'N), 62.89 (C-5'A), 70.25 (C-3'A), 71.71 (C-2'A), 74.27 (C-10A), 79.71 (C-4'A), 83.35 (C-3'N), 83.45 (C-2'N), 84.46 (C-4'N), 84.93 (C-10'N), 87.27 (C-1'A), 89.72 (C-1'N), 93.31 (C-11A), 108.11 (C-9'N), 113.74 (Cq isop.), 119.26 (C-5N), 119.73 (C-5A), 133.25 (C-8A), 140.64 (C-8N), 149.04 (C-4A), 149.20 (C-4N), 153.15 (C-2N), 154.34 (C-2A), 156.43 (C-6A), 156.63 (C-6N), 169.71 (Cq OAc), 169.79 (Cq OAc), 170.40 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₄₀H₅₁N₁₁O₁₀Si + H]⁺ 874.3662 found 874.3662.

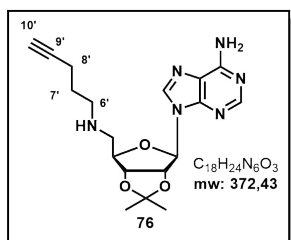
5'-Deoxy-5'-(pent-4-yn-1-yl-N-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-adenosine (55)

To a suspension of **71** (313 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv) in water (1.8 mL) and 1,4-dioxane (1.8 mL) was slowly added an aqueous solution of NaOH (2 M, 591 μ L, 1.18 mmol, 3.3 equiv). After 1 hour at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (50% in water, 2.0 mL). After 18 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (20-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 7.1 min) to yield fully deprotected compound **55** (104 mg, 45.6%) as a light pink powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.64 (q, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-7'N), 2.19 (tt, $J_{8'N,7'N}$ = 7.0 Hz, $J_{8'N,10'N}$ = 2.4 Hz, 2H, CH₂-8'N), 2.66 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-6'N), 2.72 (t, $J_{10'N,8'N}$ = 2.6 Hz, 1H, H-10'N), 2.81 (dd, $J_{5'N,4'N}$ = 6.8 Hz, $J_{5'N,5''N}$ = 13.7 Hz, 1H, H-5'N), 2.19 (dd, $J_{5''N,4'N}$ = 4.9 Hz, $J_{5''N,5'N}$ = 13.5 Hz, 1H, H-5''N), 3.53 (ddd, $J_{5'A,4'A}$ = 4.0 Hz, $J_{5'A,5''A}$ = 12.2 Hz, $J_{5'A,OH5'A}$ = 8.3 Hz, 1H, H-5'A), 3.68 (dt, $J_{5''A,4'A}$ = 3.5 Hz, $J_{5''A,5'A}$ = 12.2 Hz, $J_{J5''A,OH5'A}$ = 3.5 Hz, 1H, H-5''A), 3.80 (s, 2H, CH₂-12A), 3.97-4.0 (m, 1H, H-4'A), 4.01-4.05 (m, 1H, H-4'N), 4.14 (q, J = 5.0 Hz, 1H, H-3'N), 4.19-4.22 (m, 1H, H-3'A), 4.71 (q, J = 5.5 Hz, 1H, H-2'N), 5.00 (q, J = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 5.16 (d, $J_{JOH3'A,3'N}$ = 4.1 Hz, 1H, OH-3'A), 5.22 (d, $J_{JOH3'N,3'N}$ = 5.2 Hz, 1H, OH-3'N), 5.41 (dd, $J_{JOH2'A,2'N}$ = 6.2 Hz, 1H, OH-2'A), 5.46 (dd, $J_{JOH2'N,2'N}$ = 6.0 Hz, 1H, OH-2'N), 5.55 (dd, $J_{JOH5'A,5'A}$ = 3.4 Hz, $J_{JOH5'A,5'4A}$ = 8.4 Hz, 1H, OH-5'A), 5.89 (d, $J_{J1'N,2'N}$ = 5.5 Hz, 1H, H-1'N), 5.98 (d, $J_{J1'A,2'A}$ = 6.6 Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (brs, 2H, NH₂-6), 7.61 (brs, 2H, NH₂-6), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.35 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 15.95 (C-8'N), 26.65 (C-7'N), 43.81 (C-12A), 53.12 (C-6'N), 56.06 (C-5'N), 62.66 (C-5'A), 71.45 (C-3'A), 71.64 (C-10'N), 72.05 (C-2'A), 72.19 (C-3'N), 72.98 (C-2'N), 74.73 (C-10A), 83.12 (C-4'N), 84.81 (C-9'N), 87.04 (C-4'A), 88.05 (C-1'N), 89.96 (C-1'A), 92.96 (C-11A), 119.66 (C-5N and C-5A), 133.97 (C-8A), 140.31 (C-8N), 148.83 (C-4A), 149.90 (C-4N), 153.12 (C-2N), 153.66 (C-2A), 156.52 (C-6A and C-6N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₈H₃₃N₁₁O₇ + H]⁺ 636.2637 found 636.2929.

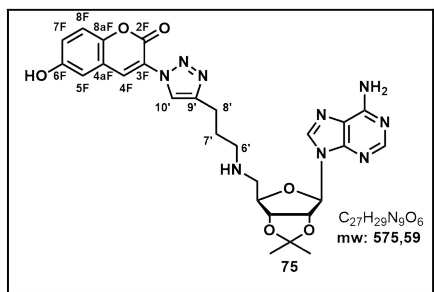
5'-Deoxy-5'-(pent-4-yn-1-yl)amino-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (76)

To a solution of **35** (651 mg, 1.33 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (16 mL) was added K_2CO_3 (549 mg, 4.0 mmol, 3.0 equiv.) followed by 5-chloro-1-pentyne (211 μ L, 2.0 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at 50°C a second addition of compound 5-chloro-1-pentyne (1.5 equiv.) was made. After an additional 48 hours at 50°C, thiophenol (272 μ L, 2.64 mmol, 2.0 equiv.) was added. After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (22 g SiO_2 , 3 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **F76** (236 mg, 48%) as a light pink foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.53 (quint., $J_{7',6'} = J_{7',8'} = 7.0$ Hz, 2H, H-7'), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.16 (td, $J_{8',7'} = 7.0$ Hz, $J_{8',10'} = 2.6$ Hz, 2H, H-8'), 2.53 (t, $J_{6',7'} = 6.9$ Hz, 2H, H-6'), 2.65 (dd, $J_{5',4'} = 6.2$ Hz, $J_{5',5''} = 12.4$ Hz, 1H, H-5'), 2.70 (t, $J_{10',8'} = 2.6$ Hz, 1H), 2.72 (dd, $J_{5',4'} = 5.9$ Hz, $J_{5',5''} = 12.4$ Hz, 1H), 4.20 (td, $J_{4',3'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5''} = 5.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.97 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3'4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.46 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.10 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 7.30 (s, 2H, NH_2 -6), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.35 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 16.0 (C-8'), 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 28.8 (C-7'), 48.6 (C-6'), 51.4 (C-5'), 71.5 (C-10'), 82.7 (C-3'), 83.2 (C-2'), 85.0 (C-11'), 85.5 (C-4'), 89.7 (C-1'), 113.7 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.4 (C-8), 149.4 (C-4), 153.1 (C-2), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI-TOF $^+$): m/z calcd for $[C_{18}H_{24}N_6O_3 + H^+]$ 373.1979, found 373.1983.

5'-Deoxy-5'-(3-(1-(7-hydroxy-coumarin-3-yl)-triazol-4-yl)-propylamino)-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (75)

To a solution of alkyne **76** (236 mg, 0.63 mmol, 1.0 equiv.) and azide **65** (154 mg, 0.76 mmol, 1.2 equiv.) in THF (3.2 mL) was added a solution of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (8 mg, 0.03 mmol, 0.05 equiv.) and sodium ascorbate (13 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) in water (3.2 mL). After 7 hours at 27°C the crude was diluted with water (50 mL) and extracted three times with AcOEt (3x 50 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (15 g, SiO_2 , 5 to 9% methanol in dichloromethane) to

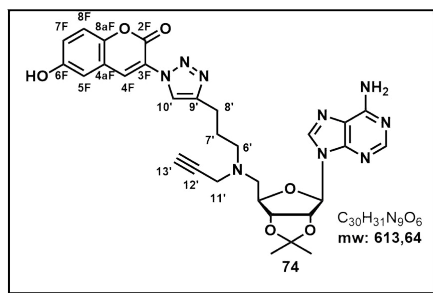
yield **75** (249 mg, 68%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.77 (quint., $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂-7'), 2.55-2.61 (m, 2H, CH₂-6'), 2.70-2.82 (m, 4H, CH₂-5' and CH₂-8'), 4.24 (td, $J_{4',3'} = 2.7$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.99 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.7$ Hz, 1H, H-3'), 5.74 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.11 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 7.14 (dd, $J_{7F,5F} = 2.8$ Hz, $J_{7F,8F} = 8.9$ Hz, 1H, H-7F), 7.24 (d, $J_{5F,7F} = 2.8$ Hz, 1H, H-5F), 7.29 (br s, 2H, NH₂-6), 7.38 (d, $J_{8F,7F} = 8.9$ Hz, 1H, H-8F), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.37 (s, 2H, H-8 and H-10'), 8.61 (s, 1H, H-4F).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 23.0 (CH₂-8'), 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 29.4 (CH₂-7'), 49.1 (CH₂-6'), 51.4 (C-5'), 82.7 (C-3'), 83.3 (C-2'), 85.4 (C-4'), 89.8 (C-1'), 113.7 (2C, CH-5F and C_q isop.), 117.6 (CH-8F), 119.3 (C-8aF), 119.7 (C-5), 121.3 (CH-7F), 123.3 (C-10'), 123.8 (C-3F), 135.1 (CH-4F), 140.4 (C-8), 146.3 (C-4aF), 147.5 (C-9'), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 154.9 (C-6F), 156.5 (C-6), 156.6 (C-2F).

HRMS (ESI-TOF⁺): m/z calcd for [C₂₇H₂₉N₉O₆ + H⁺] 576.2304, found 576.2314.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-*N*-(3-(1-(7-hydroxy-coumarin-3-yl)-triazol-4-yl)-propyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (74**)**



To a solution of **75** (204 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (3.5 mL), were added DIEA (370 μ L, 2.13 mmol, 6.0 equiv.) and propargyl bromide (80% in toluene, 217 μ L, 1.95 mmol, 5.5 equiv.). After 1 hour at room temperature, the reaction was diluted with water (35 mL) and extracted three times with AcOEt (3x 35 mL). The organic layer were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield compound **74** (164 mg, 68%) as a white foam.

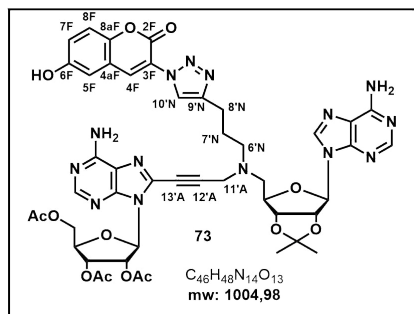
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.53 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.71-1.80 (m, 2H, CH₂-7'), 2.58 (dd, $J_{5',4'} = 6.5$ Hz, $J_{5',5''} = 13.2$ Hz, 1H, H-5'), 2.63-2.77 (m, 3H, H-5'' and CH₂-8'), 3.02 (t, $J_{13',11'} = 2.2$ Hz, 1H, H-13'), 3.40 (ABq, $J = 17.4$ Hz, 2H, CH₂-11'), 2.24 (td, $J_{4',3'} = 2.9$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.6$ Hz, 1H, H-4'), 5.00 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.50 (dd, $J_{2',1'} = 2.4$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.15 (d, 1H, $J_{1',2'} = 2.3$ Hz, 1H, H-1'), 7.13 (dd, $J_{7F,5F} = 2.8$ Hz, $J_{7F,8F} = 8.9$ Hz, 1H, H-7F), 7.28 (d, $J_{5F,7F} = 2.8$ Hz, 1H, H-5F), 7.28 (s, 2H, NH₂-6), 7.39 (d,

J8F,7F = 8.9 Hz, 1H, H-8F), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8), 8.37 (s, 1H, H-10'), 8.62 (s, 1H, H-4F), 9.90 (s, 1H, OH-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 22.9 (CH₂-8'), 25.7 (CH₃ isop.), 27.1 (CH₂-7'), 27.4 (CH₂ isop.), 42.6 (CH₂-12), 53.4 (CH₂-6'), 55.4 (C-5'), 76.0 (CH-13'), 79.3 (C-12'), 83.4 (2C, C-2' and C-3'), 84.8 (C-4'), 89.6 (C-1'), 113.7 (2C, Cq isop. and C-5F), 117.6 (C-8F), 119.3 (C-8aF), 119.7 (C-5), 121.3 (C-7F), 123.3 (C-10'), 123.8 (C-3F), 135.1 (C-4F), 140.5 (C-8), 146.3 (C-4aF), 147.5 (C-9'), 149.3 (C-4), 153.2 (C-2), 154.8 (C-6F), 156.5 (2C, C-6 and C-2F).

HRMS (ESI-TOF⁺): *m/z* calcd for [C₃₀H₃₁N₉O₆ + H⁺] 614.2459, found 614.2470.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-*N*-(3-(1-(7-hydroxy-coumarin-3-yl)-triazol-4-yl)-propyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (73)



To a solution of bromo derivative **3** (170 mg, 0.36 mmol, 1.5 equiv.) and alkyne **74** (147 mg, 0.24 mmol, 1.0 equiv.) in THF (2.4 mL) was added NEt₃ (100 μL, 0.72 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (5 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 6 hours at 60°C, the crude was filtered over celite and the volatiles were removed. The residue was purified by flash column chromatography (17 g SiO₂, 0 to 10% methanol in dichloromethane) to yield **73** (126 mg, 52%) as a pale yellow foam.

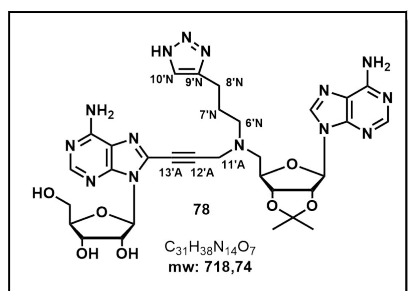
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.80-1.88 (m, 2H, CH₂-7'N), 1.94 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.96 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.05 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.61-2.66 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.69-2.81 (m, 3H, CH₂-8'N and H-5'N), 2.83-2.89 (m, 1H, H-5'N), 3.87 (ABq, J = 18.2 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.15 (dd, J_{5'A,4'A} = 5.6 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 4.28-4.35 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.40 (dd, J_{5'A,4'A} = 3.6 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 5.05 (dd, J_{3'N,2'N} = 6.3 Hz, J_{3'N,4'N} = 2.9 Hz, 1H, H-3'N), 5.52 (dd, J_{2'N,1'N} = 2.5 Hz, J_{2'N,3'N} = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.72 (t app, J_{3'A,2'A} = J_{3'A,4'A} = 6.0 Hz, 1H, H-3'A), 6.13 (d, J_{1'A,2'A} = 4.5 Hz, 1H, H-1'A), 6.17 (d, J_{1'N,2'N} = 4.5 Hz, 1H, H-1'N), 6.20 (dd, J_{2'A,1'A} = 4.5 Hz, J_{2'A,3'A} = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 7.13 (dd, J_{7F,5F} = 2.8 Hz, J_{7F,8F} = 9.0 Hz, 1H, H-7F), 7.24 (d, J_{5F,7F} = 2.8 Hz, 1H, H-5F), 7.29 (m, 2H, NH₂-6N), 7.38 (d, J_{8F,7F} = 9.0 Hz, 1H, H-8F), 7.56 (s, 2H, NH₂-6A), 8.16 (s, 1H, H-2N), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.35 (s, 1H, H-8N), 8.40 (s, 1H,

H-10'N), 8.61 (s, 1H, H-4F), 9.91 (s, 1H, OH-6F).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 20.5 (CH₃ OAc), 20.7 (CH₃ OAc), 20.8 (CH₃ OAc), 22.9 (CH₂-8'N), 25.7 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₂-7'N), 27.4 (CH₃ isop.), 43.3 (CH₂-12A), 53.6 (CH₂-6'N), 55.5 (C-5'N), 62.9 (C-5'A), 70.2 (C-3'A), 71.7 (C-2'A), 74.3 (C-10A), 76.7 (C-4'A), 83.3 (C-2'N), 83.4 (C-3'N), 84.4 (C-4'N), 87.3 (C-1'A), 89.6 (C-1'N), 93.3 (C-11A), 113.7 (CH-5F), 113.8 (Cq isop.), 117.6 (CH-8F), 119.2 (2C, C-5A and C-8aF), 119.7 (C-5N), 121.3 (CH-7F), 123.3 (CH-10'N), 123.8 (C-3F), 133.3 (C-8A), 135.0 (CH-4F), 140.6 (C-8N), 146.2 (C-4aF), 147.4 (C-9'N), 149.0 (C-4N), 149.2 (C-4A), 153.2 (C-2N), 154.3 (C-2A), 154.9 (C-6F), 156.4 (C-6A), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-2F), 169.7 (Cq OAc), 169.2 (Cq OAc), 170.4 (Cq OAc).

HRMS (ESI-TOF⁺): *m/z* calcd for [C₄₆H₄₈N₁₄O₁₃ + H⁺] 1005.3580, found 1005.3598.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-*N*-(3-(triazol-4-yl)-propyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (78)

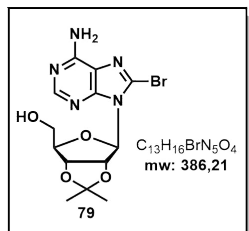


¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.71-1.80 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.55-2.60 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.62-2.74 (m, 3H, CH₂-8'N and H-5'N), 2.78-2.85 (m, 1H, H-5'N), 3.49-3.56 (m, 1H, H-5'A), 3.65-3.71 (m, 1H, H-5'A), 3.80 (ABq, *J* = 18.0 Hz, 2H, CH₂-12A), 3.97-4.00 (m, 1H, H-4'A), 4.19-4.23 (m, 1H, H-3'N), 4.27-4.32 (m, 1H, H-4'N), 4.97-5.03 (m, 2H, H-2'A and H-3'N), 5.15 (d,

JOH3'A,3'A = 4.0 Hz, 1H, OH-3'A), 5.41 (d, JOH2'A,2'A = 6.0 Hz, 1H, OH-2'A), 5.49 (dd, *J*_{2'N,1'N} = 2.5 Hz, *J*_{2'N,3'N} = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.54 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1H, OH-5'A), 5.96 (d, *J*_{1'A,2'A} = 6.7 Hz, 1H, H-1'A), 6.16 (d, *J*_{1'N,2'N} = 2.5 Hz, 1H, H-1'N), 7.30 (s, 2H, NH₂-6), 7.58 (s, 2H, NH₂-6), 8.15 (s, 1H, H-8N), 8.16 (s, 1H, H-8A), 8.17 (s, 1H, H-10'N), 8.34 (s, 1H, H-2N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 23.1 (CH₂-8'N), 25.7 (CH₃ isop.), 27.1 (CH₂-7'N), 27.5 (CH₃ isop.), 43.2 (CH₂-12A), 53.5 (CH₂-6'N), 55.0 (C-5'N), 62.7 (C-5'A), 71.2 (C-3'A), 71.5 (C-3'N), 75.0 (C-10A), 83.2 (C-2'A), 83.2 (C-2'N), 84.4 (C-4'N), 87.1 (C-4'A), 89.5 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 92.6 (C-11A), 113.8 (Cq isop.), 117.3 (C-5N), 119.8 (C-5A), 134.0 (C-10'N), 137.0 (C-8A), 140.2 (C-8N), 148.9 (C-4N), 149.3 (C-4A), 153.2 (C-2N), 153.7 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N). signal from C-9'N missing

HRMS (ESI-TOF⁺): *m/z* calcd for [C₃₁H₃₈N₁₇O₇ + H⁺] 719.31207 found 719.3105 .

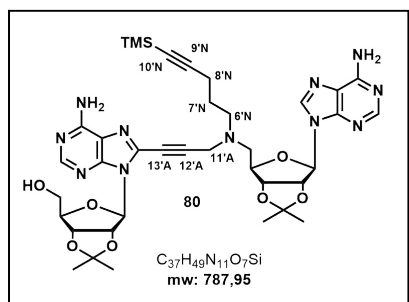
2',3'-O-Isopropylidene-8-bromoadenosine (79)

To a solution of **19** (692 mg, 2.0 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (20.0 mL) and sodium acetate buffer (12.0 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (206 μ L, 4.0 mmol, 2.0 equiv.) dropwise. After 1 hour at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (40 mL). After full discoloration, the aqueous layer was extracted three times using DCM (3x 100 mL). The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO_2 , 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **79** (663 mg, 75%) as a pale yellow foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.34 (s, 3H, CH_3 isop?), 1.56 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.43-3.48 (m, 1H, H-5'), 3.51-3.56 (m, 1H, H-5''), 4.17 (td, $J_{4',3'} = 3.0$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.8$ Hz, 1H, H-4'), 5.04 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.09-5.12 (m, 1H, OH-5'), 5.67 (dd, $J_{2',1'} = 2.7$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.03 (d, $J_{1',2'} = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.53 (s, 2H, NH_2 -6), 8.15 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.6 (CH_3 isop.), 62.0 (C-5'), 82.1 (C-3'), 82.4 (C-2'), 87.6 (C-4'), 91.5 (C-1'), 113.7 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.8 (C-8), 150.2 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{13}H_{16}^{79}BrN_5O_4+H]^+$ 386.0458 found 386.0440.

5'-Deoxy-5'-(N-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl)-N-[3-(2',3'-O-isopropylidene-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)2',3'-O-isopropylidene-adenosine (80)

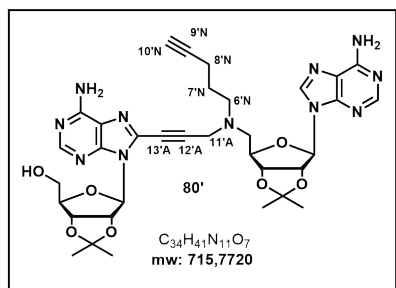
To a solution of bromo derivative **79** (315 mg, 0.75 mmol, 1.5 equiv.) and alkyne **66** (241 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in THF (5.0 mL) was added NEt_3 (209 μ L, 1.5 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (10 mg, 10 mol%) and $Pd(PPh_3)_4$ (29 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 5 hours at $65^\circ C$, the crude was filtered over celite and the volatiles were removed. The residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield **80** (231 mg, 54%) as a pale yellow foam.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.08 (s, 9H, CH_3 TMS), 1.28 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.34 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.45 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.55-1.61 (m, 2H, CH_2 -7'N), 2.17-2.28 (m, 2H, CH_2 -8'N), 2.59-2.62 (m, 2H, CH_2 -6'N), 2.65-2.70 (m, 1H, H-5'N), 2.83 (dd, $J_{5''\text{N},4'\text{N}} = 7.8$ Hz, $J_{5''\text{N},5'\text{N}} = 13.2$ Hz, 1H, H-5''N), 3.53-3.59 (m, 2H, H-5'A and H-5''A), 3.79 (ABq, $J = 18.3$ Hz, 2H, CH_2 -12A), 4.14 (td, $J_{4'\text{A},5'\text{A}} = J_{4'\text{A},5'\text{A}} = 5.4$ Hz, $J_{4'\text{A},3'\text{A}} = 2.9$ Hz, 1H, H-4'A), 4.29 (td, $J_{4'\text{N},5'\text{N}} = J_{4'\text{N},5''\text{N}} = 7.1$ Hz, $J_{4'\text{N},3'\text{N}} = 3.0$ Hz, 1H, H-4'N), 4.99 (dd, $J_{3'\text{A},2'\text{A}} = 6.2$ Hz, $J_{3'\text{A},4'\text{A}} = 2.9$ Hz, 1H, H-4'A), 5.01 (dd, $J_{3'\text{N},2'\text{N}} = 6.3$ Hz, $J_{3'\text{N},4'\text{N}} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'N), 5.22 (br s, 1H, OH-5'A), 5.49 (dd, $J_{2'\text{N},1'\text{N}} = 2.5$ Hz, $J_{2'\text{N},3'\text{N}} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'N), 5.53 (dd, $J_{2'\text{A},1'\text{A}} = 3.0$ Hz, $J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'A), 6.11 (d, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'A), 6.16 (d, $J_{1'\text{N},2'\text{N}} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'N), 7.28 (s, 2H, NH_2 -6), 7.54 (s, 2H, NH_2 -6), 8.16 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.33 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 0.5 (3C, CH_3 TMS), 17.2 (C-8'N), 25.7 (2C, CH_3 isop.), 26.4 (CH_2 -7'N), 27.4 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 43.4 (CH_2 -12A), 53.1 (CH_2 -6'N), 55.5 (62.0 (C-5'A), 74.5 (C-10A), 82.0 (C-3'A), 82.4 (C-2'A), 83.3 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.5 (C-4'N), 85.0 (C-10'N), 87.1 (C-4'A), 89.8 (C-1'N), 90.7 (C-1'A), 93.1 (C-11A), 108.1 (C-9'N), 113.8 (2C, Cq isop.), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 133.2 (C-8A), 140.7 (C-8N), 148.6 (C-4A), 149.2 (C-4N), 153.1 (C-2N), 154.1 (C-2A), 156.4 (C-6A), 156.6 (C-6N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{O}_7\text{Si}+\text{H}]^+$ 788.3658 found 788.3632.

5'-Deoxy-5'-(*N*-pent-4-yn-1-yl-*N*-[3-(2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (80'**)**



To a suspension of **80** (200 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of water (1.4 mL) and 1,4-dioxane (2.2 mL) was added NaOH (2M in water, 127 μ L, 0.25 mmol, 1.0 equiv.). After 1 hour at room temperature, a second addition of NaOH (0.8 equiv.) was made. After 40 minutes at room temperature, the crude was diluted with water (20 mL) and neutralised with AcOH before being extracted three times with DCM (3x 50 mL).

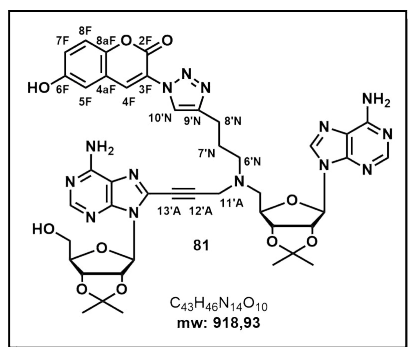
The organic layers were combined, washed once with brine (50 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to yield the primary alkyne **80'** as a white solid (180 mg, quant. yield) which was used without further purification.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.29 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.34 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.46 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.55 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.56-1.63 (m, 2H, CH_2 -7'N), 2.13-2.21 (m, 2H, CH_2 -8'N), 2.58-2.63 (m, 2H, CH_2 -6'N), 2.65-2.71 (m, 1H, H-5'N), 2.72 (t, $J_{10'N,8'N} = 2.6$ Hz, 1H, H-10'N), 2.82 (dd, $J_{5'N,4'N} = 7.6$ Hz, $J_{5'N,5'N} = 13.0$ Hz, 1H, H-5'N), 3.44-3.51 (m, 1H, H-5'A), 3.53-3.60 (m, 1H, H-5'A), 3.81 (ABq, $J = 18.1$ Hz, 2H, CH_2 -12A), 4.15 (td, $J_{4'A,5'A} = J_{4'A,5'A} = 5.4$ Hz, $J_{4'A,3'A} = 3.0$ Hz, 1H, H-4'A), 4.30 (td, $J_{4'N,5'N} = J_{4'N,5'N} = 6.8$ Hz, $J_{4'N,3'N} = 2.8$ Hz, 1H, H-4'N), 4.99 (dd, $J_{3'A,2'A} = 6.2$ Hz, $J_{3'A,4'A} = 3.0$ Hz, 1H, H-4'A), 5.02 (dd, $J_{3'N,2'N} = 6.3$ Hz, $J_{3'N,4'N} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'N), 5.17 (dd, $J = 5.3$ Hz, $J = 6.5$ Hz, 1H, OH-5'A), 5.51 (dd, $J_{2'N,1'N} = 2.5$ Hz, $J_{2'N,3'N} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'N), 5.55 (dd, $J_{2'A,1'A} = 3.0$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'A), 6.12 (d, $J_{1'A,2'A} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'A), 6.17 (d, $J_{1'N,2'N} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'N), 7.30 (s, 2H, NH_2 -6), 7.58 (s, 2H, NH_2 -6), 8.17 (s, 1H, H-2A), 8.18 (s, 1H, H-2N), 8.33 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 15.8 (C-8'N), 25.7 (2C, CH_3 isop.), 26.5 (CH_2 -7'N), 27.4 (CH_3 isop.), 27.6 (CH_3 isop.), 43.4 (CH_2 -12A), 53.3 (CH_2 -6'N), 55.4 (C-5'N), 62.0 (C-5'A), 71.7 (CH-10'N), 74.5 (C-10A), 82.0 (C-3'A), 82.5 (C-2'A), 83.3 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.4 (C-4'N), 84.6 (C-9'N), 87.2 (C-4'A), 89.7 (C-1'N), 90.7 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 113.8 (2C, Cq isop.), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 133.2 (C-8A), 140.6 (C-8N), 148.7 (C-4A), 149.2 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.1 (C-2A), 156.5 (C-6A), 156.6 (C-6N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{34}H_{41}N_{11}O_7+H]^+$ 716.3263 found 716.3231.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-*N*-(3-(1-(7-hydroxy-coumarin-3-yl)-triazol-4-yl)-propyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (81)



To a solution of alkyne **80'** (180 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) and azide **65** (61 mg, 0.30 mmol, 1.2 equiv.) in THF (1.3 mL) was added a solution of CuSO₄ 5H₂O (3 mg, 0.01 mmol, 0.05 equiv.) and sodium ascorbate (5 mg, 0.03 mmol, 0.1 equiv.) in water (1.3 mL). After 5 hours at 35°C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (25 g, SiO₂, 1 to 10% methanol in dichloromethane) to yield **81** (144 mg, 62%) as a pale yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.27 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.44 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.83 (quint, J7'N,5'N = J7'N,8'N = 7.3 Hz, 2H, CH₂-7'N), 2.63 (t, J6'N,7'N = 7.2 Hz, 2H, CH₂-6'N), 2.69-2.80 (m, 3H, CH₂-8'N and H-5'), 2.86 (dd, J5'N,4'N = 7.3 Hz, J5'N,5'N = 13.2 Hz, 1H, H-5'N), 3.46 (ddd, J5'A,4'A = 5.5 Hz, J5'A,OH5'A = 6.6 Hz, J5'A,5'A = 11.5 Hz, 1H, H-5'A), 3.53 (ddd, J5'A,4'A = 5.5 Hz, J5'A,OH5'A = 5.2 Hz, J5'A,5'A = 11.5 Hz, 1H, H-5'A), 3.86 (ABq, J = 18.2 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.15 (td, J4'A,3'A = 2.8 Hz, J4'A,5'A = J4'A,5'A = 5.5 Hz, 1H, H-4'A), 4.33 (td, J4'N,3'N = 2.9 Hz, H4'N,5'N = J4'N5'N = 6.9 Hz, 1H, H-4'N), 4.99, (dd, J3'A,2'A = 6.2 Hz, J3'A,4'A = 2.9 Hz, 1H, H-3'A), 5.04 (dd, J3'N,2'N = 6.2 Hz, J3'N,4'N = 2.9 Hz, 1H, H-3'N), 5.18 (dd, JOH5'A, H5'A = 6.6 Hz, JOH5', H5'A = 5.2 Hz, 1H, OH-5'A), 5.51 (dd, J2'N,1'N = 2.5 Hz, J2'N,3'N = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.54 (dd, J2'A,1'A = 3.1 Hz, J2'A,3'A = 6.2 Hz, 1H, H-2'A), 6.12 (d, J1'A,2'A = 3.1 Hz, 1H, H-1'A), 6.17 (d, J1'N,2'N = 2.5 Hz, 1H, H-1'N), 7.14 (dd, J7F,5F = 2.8 Hz, J7F,8F = 8.9 Hz, 1H, H-7F), 7.23 (d, J5F,7F = 2.8 Hz, 1H, H-5F), 7.28 (s, 2H, NH₂-6), 7.37 (d, J8F,7F = 8.9 Hz, 1H, H-8F), 7.56 (s, 2H, NH₂-6), 8.16 (br s, 2H, H-2N and H-2A), 8.34 (s, 1H, H-8N), 8.69 (s, 1H, H-10'N), 8.61 (s, 1H, H-4F), 9.91 (s, 1H, OH-6F).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22.9 (CH₂-8'N), 25.7 (2C, CH₃ isop.), 27.2 (CH₂-7'N), 27.4 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 43.3 (CH₂-12A), 53.8 (CH₂-6'N), 55.4 (C-5'N), 62.0 (C-5'A), 74.6 (C-10A), 82.0 (C-3'A), 82.4 (C-2'A), 83.3 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.4 (C-4'N), 47.2 (C-4'A), 89.7 (C-1'N), 90.7 (C-1'A), 93.1 (C-11A), 113.7 (Cq isop.), 113.8 (CH-5F), 117.6 (CH-8F), 119.3 (2C, CH-5A and C-8aF), 119.7 (C-5N), 121.3 (CH-7F), 123.3 (CH-10'N), 123.8 (C-3F), 133.2 (C-8A), 135.0 (CH-4F), 140.6 (C-8N), 146.2 (C-4aF), 147.4 (C-9'N), 148.6 (C-4A), 149.2 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.1 (C-2A), 154.9 (C-6F), 156.5 (2C, C-6A + C-6N), 156.6 (C-2F).

Compound **81** (20 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv.)

Chemical structure of compound 72, showing a complex molecule with multiple rings and functional groups. The structure is labeled with atom positions (e.g., 7F, 8aF, 2F, 4F, 3F, 6F, 5F, 4aF, 10'N, 9'N, 8'N, 7'N, 6'N, 13'A, 12'A, 11'A) and includes the molecular formula $C_{37}H_{38}N_{14}O_{10}$ and molecular weight $mw: 838,80$.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22,7 (CH₂-8'N), 25,3 (CH₂-7'N), 43,6 (CH₂-12A), 53,6 (CH₂-6'N), 56,0 (C-5'N), 62,5 (C-5'A), 71,4 (C-3'A), 72,3 (2C, C-2'A and C-3'N), 73,2 (C-2'N), 74,3 (C-10A), 81,2 (C-4'N), 87,2 (C-4'A), 88,8 (C-1'N), 90,2 (C-1'A), 93,1 (C-11A), 113,7 (CH-5F), 117,6 (CH-8F), 119,2 (2C, C-5A and C-8aF), 119,7 (C-5N), 119,8 (CH-7F), 121,4 (2C CH-10'N and C-3F), 132,0 (C-8A), 135,1 (CH-4F), 141,6 (C-8N), 146,2 (C-4aF), 146,8 (C-9'N), 148,8 (C-4A), 149,3 (C-4N), 150,1 (C-2N), 153,1 (C-2A), 154,2 (C-6N), 156,1 (C-6A), 156,5 (C-6F), 156,6 (C-2F).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_{14}\text{O}_{10}+\text{H}]^+$ 839.2968 found 839.2957.

Chapitre 4

Synthèse d'analogues linéaires de NKI-1

4.1 Introduction

A l'occasion de ce chapitre, je présenterai les travaux portant sur l'amélioration des paramètres physico-chimiques des inhibiteurs de NADK, analogues de **NKI-1**.

Au cours du deuxième chapitre, la description de cinq diadénosines fonctionnalisées a été faite (Figure 4.1). En plus de mesurer leur pouvoir inhibiteur sur l'enzyme purifiée *Lm*NADK (K_i), leur efficacité d'inhibition de croissance bactérienne a été évaluée.

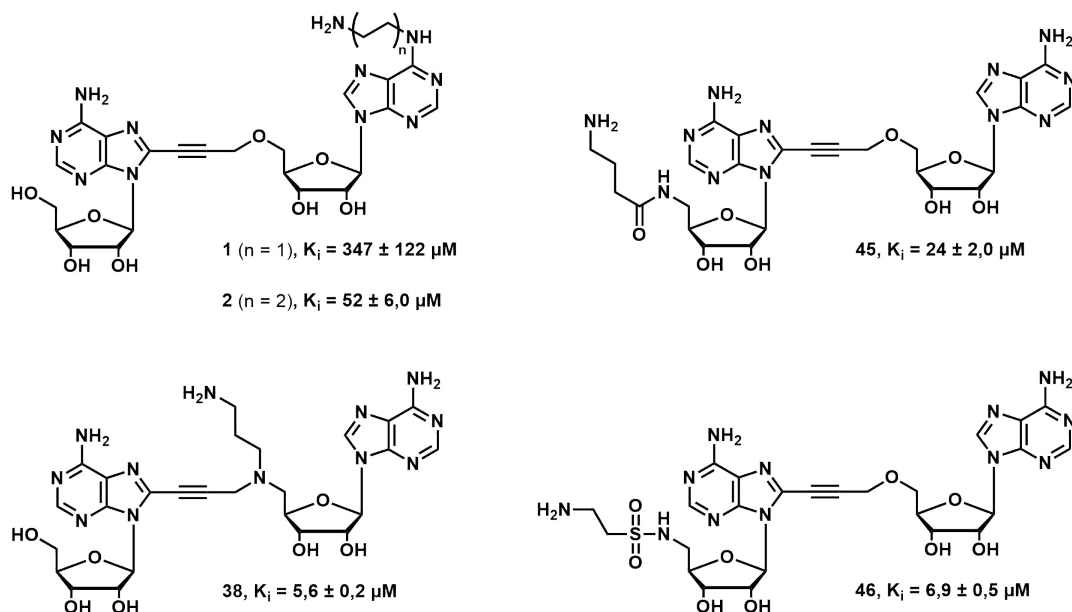


Figure 4.1 – Composés synthétisés à l'occasion du deuxième chapitre

La technique utilisée pour mesurer l'activité sur bactérie est la même que celle décrite au chapitre 3 (Cf. page 169). Celle-ci consiste en la mesure de la densité optique de cultures bactériennes traitées par l'inhibiteur testé à quatre concentrations différentes. Pour ces composés, la tendance observée est une meilleure efficacité d'inhibition de croissance à faible concentration ($0,01 \mu\text{g/mL}$). Tous les résultats présentés ci-après seront donc des inhibitions de croissance de cultures bactériennes à cette concentration.

A l'issue de ces tests, les diadénosines **38** et **45** se sont démarquées par leur meilleure efficacité d'inhibition de croissance bactérienne (Figure 4.2).

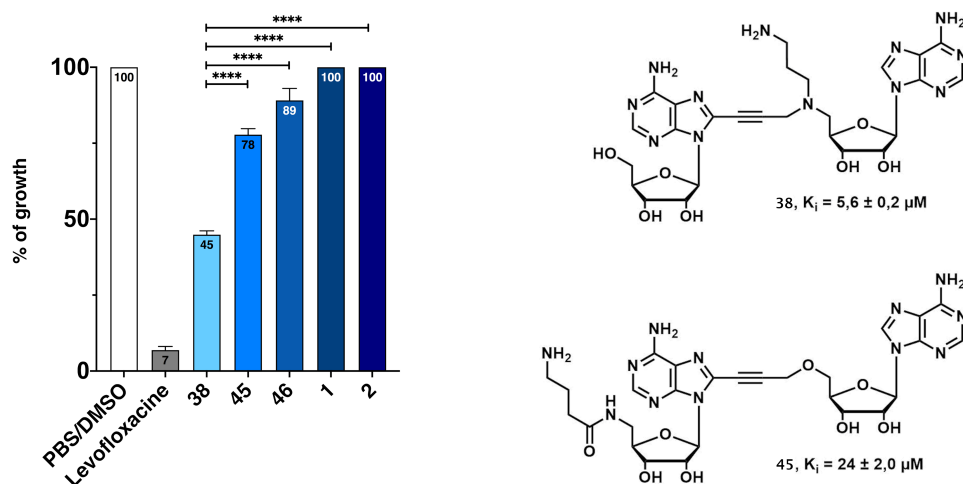


Figure 4.2 – Comparaison des propriétés des cinq diadénosines synthétisées au chapitre 2

Ces deux diadénosines ont été comparées à **NKI-1** en terme de pouvoir inhibiteur (K_i), d'activité sur culture bactérienne et hydrophilie relative (Figure 4.3).

Ce dernier paramètre a été évalué par CLHP sur colonne de phase inverse (silice greffée par des chaîne hydrocarbonée C18).²³³ Pour l'estimer, nous avons préparé une solution à 5 mM du composé à évaluer dans un mélange DMSO/H₂O (1:9) avant d'en injecter 2 µL sur CLHP. Chaque analyse consiste ensuite en l'enrichissement linéaire de la phase mobile (tampon acétate de triéthylammonium 10 mM, pH = 5,5) en acétonitrile (0 à 30 %) sur une durée de 20 minutes, suivi d'une purge à l'acétonitrile, pour une durée totale d'analyse de 25 minutes. La mesure du temps de rétention (R_t) de chaque molécule reflète leur hydrophilie : une valeur élevée de R_t correspondant à un composé hydrophobe.

Les deux diadénosines **38** et **45** ont une hydrophilie relative meilleure que **NKI-1** (Figure 4.3). Il est aussi à noter que l'activité antibactérienne *in vitro* de ces molécules suit le K_i des composés. Ils ont donc été sélectionnées pour le développement d'analogues plus efficaces.

233. Journal officiel de l'Union européenne 2016, L 54, p. 2.

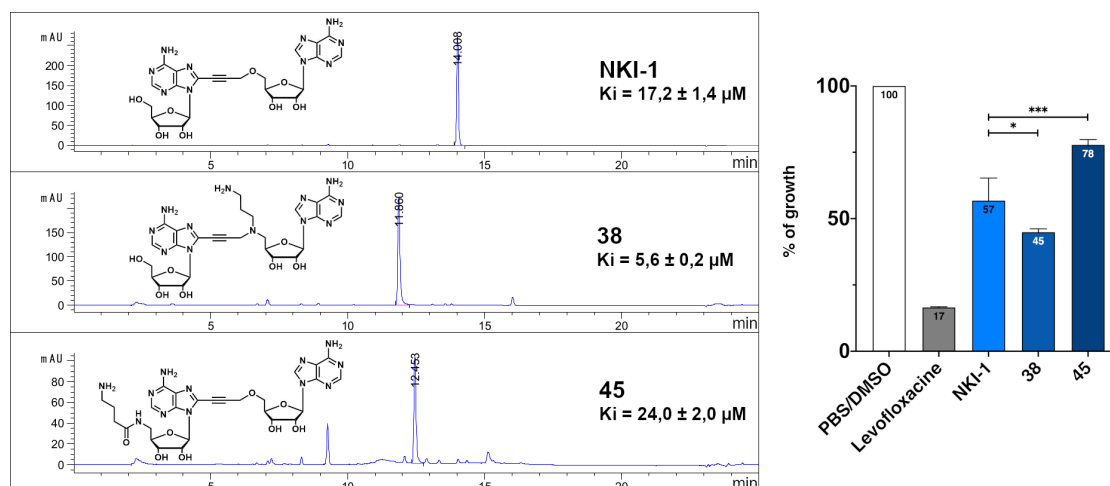


Figure 4.3 – Comparaison des propriétés des diadénosines NKI1, 38 et 45

Je tiens à préciser que certaines réactions présentées ici ont été réalisées par Valérie Huteau, technicienne du laboratoire. Dans ce chapitre, les rendements marqués d'une dague (†) représentent les réactions menées par celle-ci.

4.2 Modification des fonctions

La première modification apportée aux diadénosines **38** et **45** est la conversion de leur fonction amine primaire en fonction guanidinium avec pour objectif l'amélioration de leur pénétration membranaire.²³⁴ Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de modifications apportées sur le groupement *N*-propargylique en introduisant des groupements polaires ou apolaires.

Nous avons ensuite étudié l'influence du ribose présent dans le site A, en le remplaçant par un groupement benzyle ou en lui ajoutant des fonctionnalisations supplémentaires en position 5'.

L'impact de chaque modification apportée a été systématiquement évalué par mesure d'hydrophilie (CLHP), de constante d'inhibition (K_i) et activité sur culture bactérienne des analogues synthétisés. Il est important de noter que ces paramètres ne tiennent pas en compte d'autres facteurs tels que la pénétration membranaire ou la stabilité métabolique des inhibiteurs obtenus.

234. Andreev, K.; Bianchi, C. *et al. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 2492-2502.

4.2.1 Introduction d'une fonction guanidinium

Dans leurs travaux sur les peptides à propriétés antimicrobiennes, Andreev *et al.*²³⁴ décrivent que le remplacement de fonctions amine par des fonctions guanidinium permet une meilleure internalisation des composés guanylés et donc un accroissement de leur activité sur bactéries. Afin de tirer partie de cette propriété, nous avons envisagé la conversion de l'amine primaire des composés **38** et **45** par un groupement guanidinium (Figure 4.4).

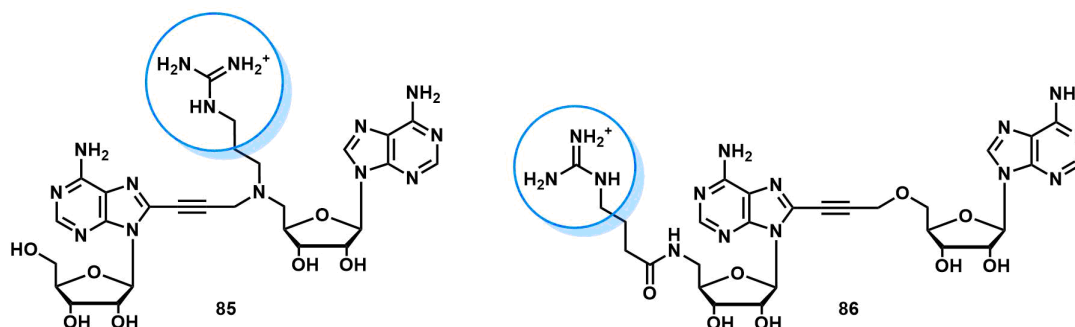
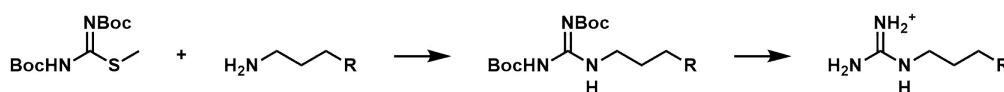


Figure 4.4 – Modifications proposées

Synthèse

Deux méthodes de synthèse ont été envisagées pour préparer ces analogues. La première consiste en la réaction entre l'amine primaire et la *N,N'*-di-Boc-*S*-méthylthiourée en milieu organique (Schéma 4.1, première voie).^{235,236} La déprotection acide des groupements Boc permettrait l'obtention du guanidinium souhaité. La seconde méthode consiste en l'introduction d'un guanidinium sur l'amine primaire via le chlorhydrate de 1-amidinopyrazole en solution aqueuse (Schéma 4.1, deuxième voie).²³⁷

Première méthode envisagée



Seconde méthode envisagée

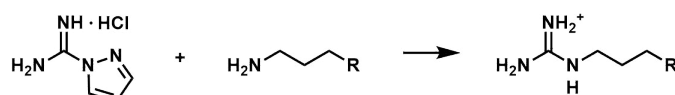


Schéma 4.1 – Méthodes de guanylation envisagées

235. Sarciaux, M. ; Pantel, L. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61, 7814-7826.

236. Neubert, B. J. ; Snider, B. B. *Organic Letters* **2003**, 5, 765-768.

237. Bernatowicz, M. S. ; Wu, Y. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 2497-2502.

Nous avons opté pour la seconde méthode, qui permet la fonctionnalisation en une étape des produits précédemment préparés (Schéma 4.2).

Le premier composé que nous avons guanylé est la diadénosine **38**. Celle-ci a été dissoute dans l'eau avant d'être traitée avec un équivalent de chlorhydrate de 1-amidinopyrazole et de Na_2CO_3 (Schéma 4.2). Après une heure à 30 °C la réaction a été estimée totale par suivi CL/SM et le produit **85** a été obtenu avec un rendement de 37 % après purification CLHP. Ces conditions, appliquées au composé **45**, ont permis d'isoler le composé **86** avec un rendement de 44 % après purification CLHP.

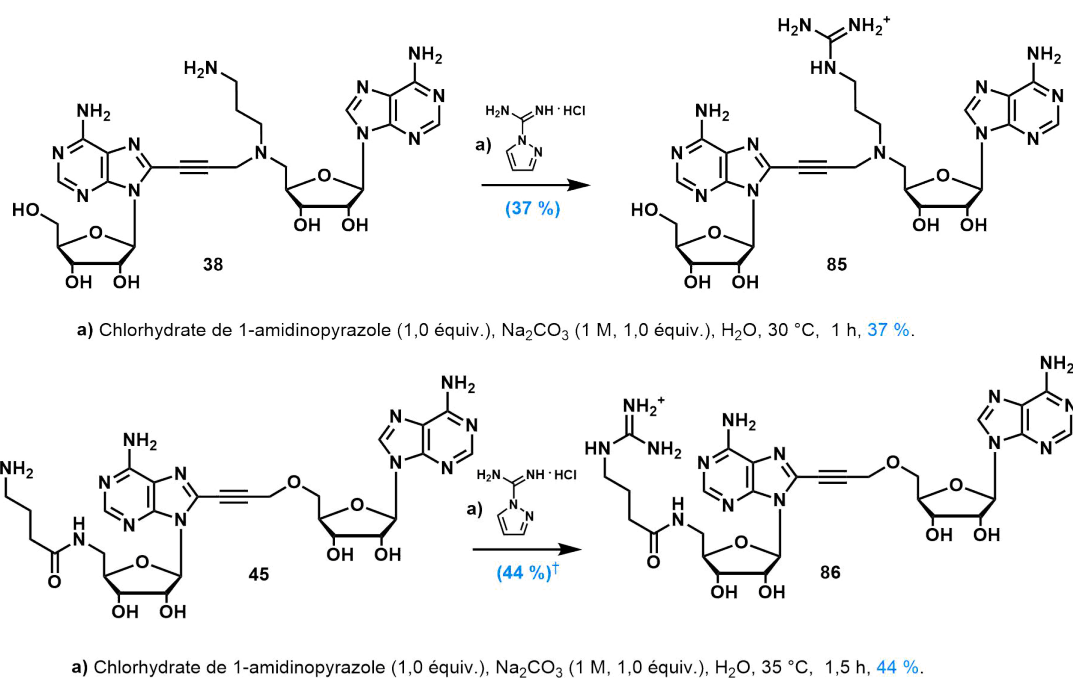


Schéma 4.2 – Guanylation des molécules **38** et **45**

Résultats biologiques

Les composés guanylés **85** et **86** ont ensuite été évalués par détermination de leur temps de rétention, mesure du K_i et activité sur bactérie. Les suivis CLHP indiquent que l'hydrophilie des dérivés **85** et **86** reste pratiquement inchangée par rapport aux amines correspondantes **38** et **45** (Figure 4.5, suivi CLHP). En revanche, les K_i se retrouvent améliorés d'un facteur deux ou cinq. Une étude cristallographique a révélé la création d'interactions entre la proline 132 du site NAD et la fonction guanidinium du composé **85**, expliquant l'amélioration de ce K_i (Figure 4.5, cadres A et B). Faute de temps cette même étude n'a pas encore été réalisée sur le composé **86**.

Malgré de meilleures constantes d'inhibition pour les composés guanylés sur l'enzyme modèle (*Lm*NADK), leur efficacité *in vitro* sur culture bactérienne est similaire aux amines correspondantes (Figure 4.5, histogramme).

4. Synthèse d'analogues linéaires de NKI-1

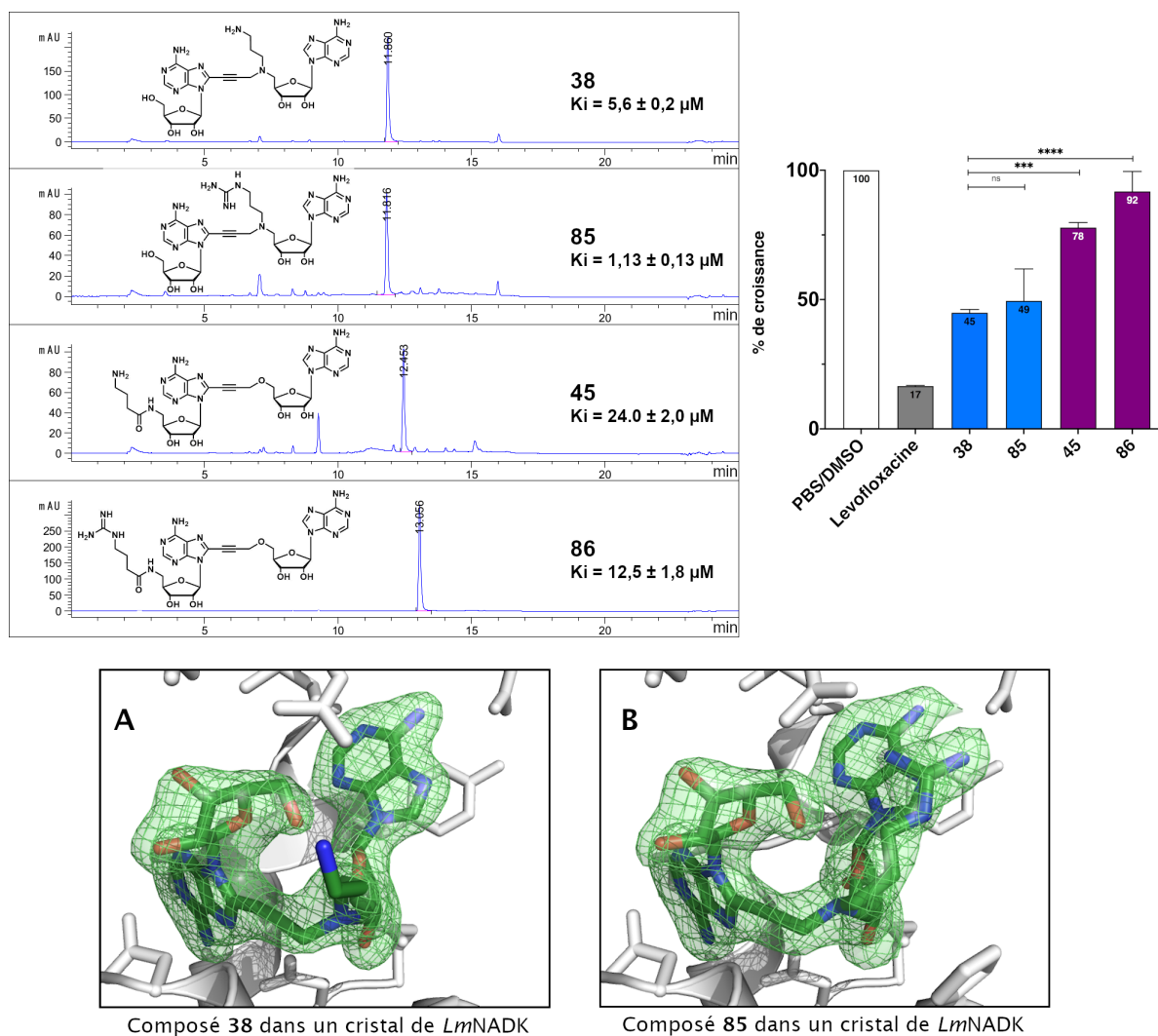


Figure 4.5 – Propriétés des composés guanylés 85 et 86

Les diadénosines modifiées en position centrale 38 et 85 présentant de meilleures propriétés d'inhibition *in vitro* que les dérivés 45 et 86, nous avons apporté d'autres modifications à cette position.

4.2.2 Modifications de la position centrale

Afin d'évaluer l'importance de la fonction amine primaire du composé **38**, nous avons choisi de la remplacer par une fonction alcool, une autre groupement polaire (Figure 4.6). En parallèle, nous avons également préparé un analogue portant un groupe isopropyle en lieu de la chaîne aminopropyle afin d'apprécier l'impact d'un groupement apolaire à cette position.

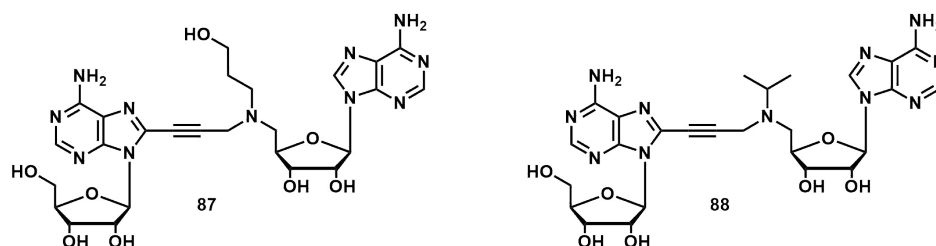


Figure 4.6 – Diadénosines envisagées

D'un point de vue rétrosynthétique, la stratégie nosyle^{158,159,161} a été appliquée pour obtenir les dérivés propargylés illustrés sur le schéma suivant (Schéma 4.3). Un couplage de Sonogashira avec la 8-bromoadénosine per-*O*-acétylée (**3**), suivi d'une déprotection des fonctions alcools, conduiront au dérivé de diadénosine souhaité.

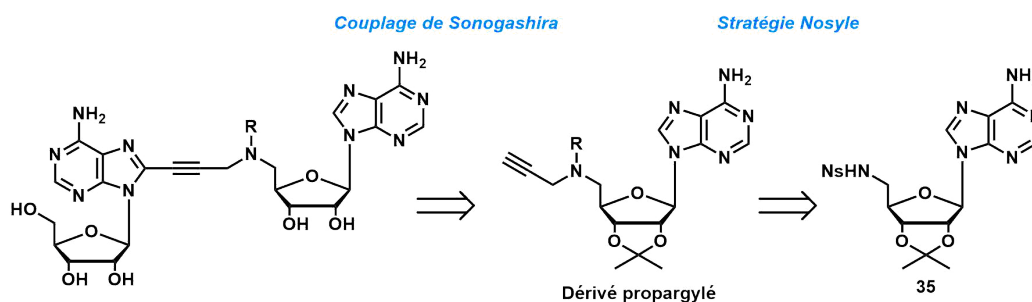
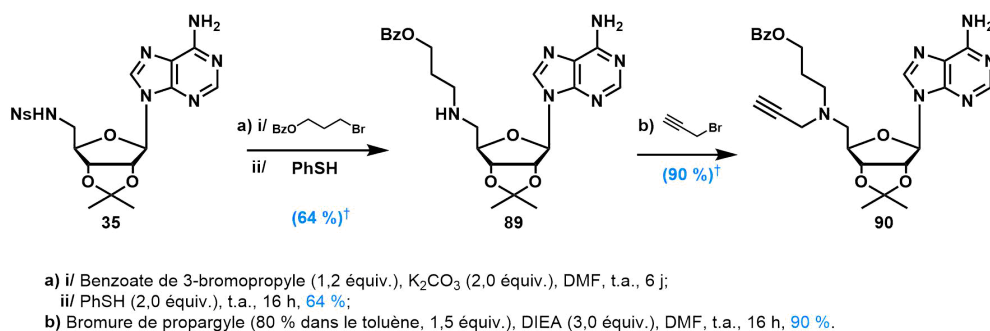


Schéma 4.3 – Rétrosynthèse proposée pour les diadénosines modifiées en position centrale

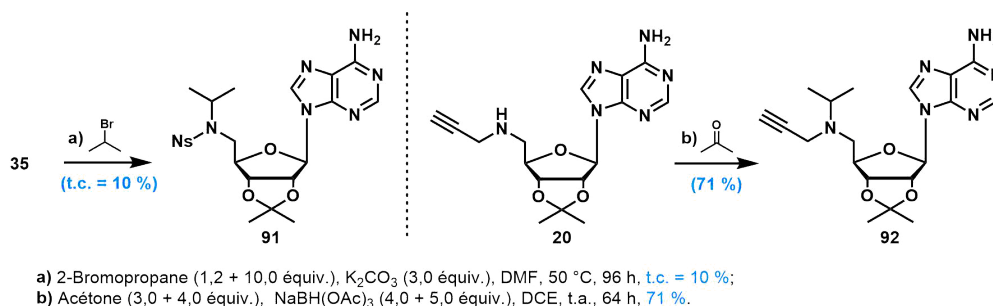
Synthèse des alcynes

L'introduction de la chaîne propanol s'est faite en milieu basique par réaction de *N*-alkylation de l'amine nosylée **35** avec un léger excès de benzoate de 3-bromopropyle (Schéma 4.4). L'intermédiaire (non représenté) est ensuite dénosylé *via* le thiophénol pour obtenir l'amine secondaire **89** avec un rendement de 64 %. Celle-ci est ensuite propargylée dans les conditions classiques permettant d'obtenir l'alcyne **90** avec un rendement de 90 %.

Schéma 4.4 – Préparation de l'alcyne **90**

L'introduction du groupement isopropyle a d'abord été entreprise en suivant la stratégie nosyle.^{158,159,161} Le composé **35** a été dissous dans le DMF (en présence de K_2CO_3) avant d'ajouter 1,2 équivalents de 2-bromopropane (Schéma 4.5, conditions a). Après 48 heures à 50 °C, le taux de conversion de la réaction estimé par analyse CL/SM était nul. Une seconde addition de 2-bromopropane (10 équivalents) a alors été faite et le milieu réactionnel a été laissé à 50 °C pendant 48 heures supplémentaires. Durant cette période, l'avancement de la réaction a légèrement évolué passant à un taux de conversion de 10 %. Cette faible réactivité peut s'expliquer par la proximité du point d'ébullition du 2-bromopropane (59 °C) et de la température du milieu réactionnel (50 °C). Dans ces conditions, une partie du réactif est probablement en phase gazeuse empêchant toute réaction avec le composé **35**.

En parallèle, nous avons tenté de synthétiser le composé **92** *via* une amination réductrice entre l'amine secondaire du composé **20** et l'acétone (Schéma 4.5, conditions b).²³⁸ Pour ce faire, le nucléoside a été dissous dans le DCE avant d'ajouter un excès d'acétone et de $NaBH(OAc)_3$. Le taux d'avancement de la réaction étant de 68 % après 48 heures (suivi CL/SM), une seconde addition d'acétone et d'agent réducteur a été faite. Une fois la réaction terminée, après 16 heures supplémentaires, le milieu a été neutralisé par du $NaHCO_3$ puis purifié permettant d'obtenir le composé **92** avec un rendement de 71 %.

Schéma 4.5 – Préparation de l'alcyne **92**

238. Chesworth, R. ; Kuntz Kevin, W. *et al.* Modulators of histone methyltransferase, and methods of use thereof, WO2012/82436 (A2), 2012.

Couplages de Sonogashira et déprotections

Les alcynes **90** et **92** ont ensuite été couplés avec la 8-bromadénosine per-*O*-acétylée **3**. Ces couplages de Sonogashira ont eu lieu dans les mêmes conditions réactionnelles que décrites précédemment.

Dans un premier temps, le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **90**, portant l'alcool protégé par un groupement benzoyle, et le dérivé bromé **3** a permis d'obtenir le produit de couplage **93** avec un rendement de 68 % (Schéma 4.6). L'étape de déprotection finale consiste en la saponification des fonctions esters avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Ces deux réactions successives ont permis d'obtenir le composé **87** avec un rendement de 71 % après purification CLHP.

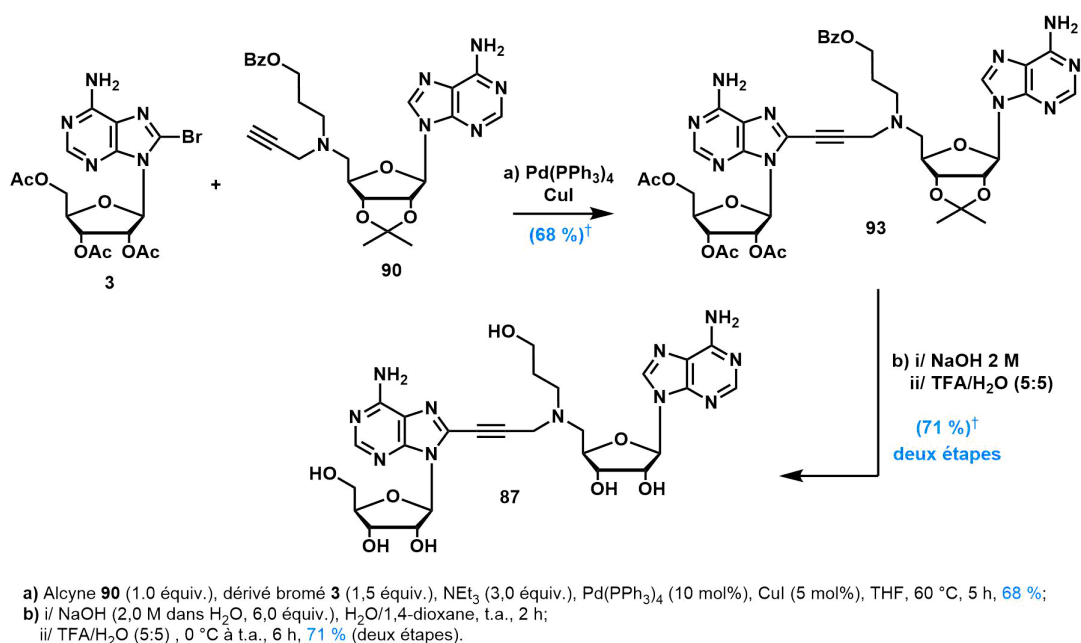
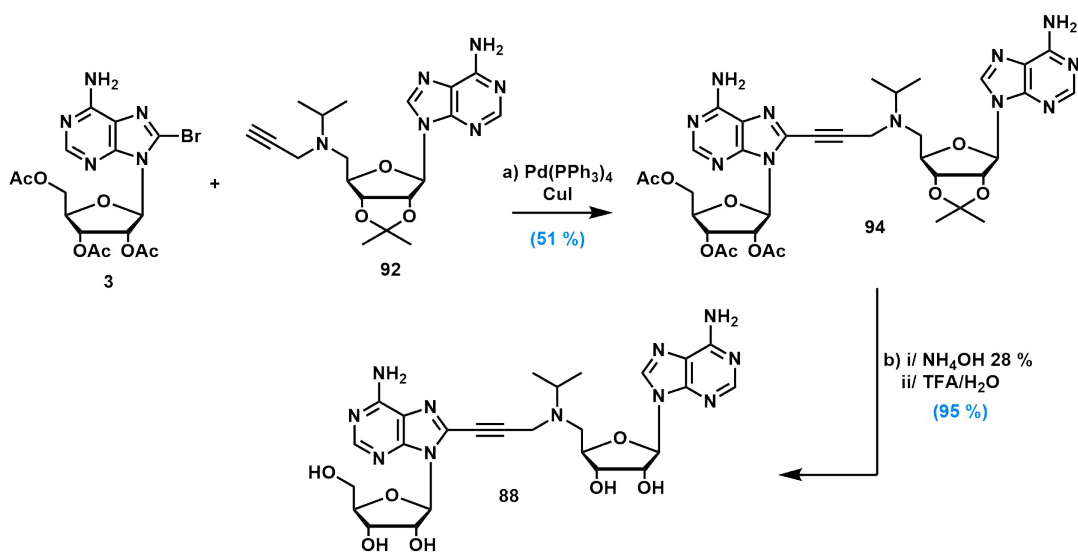


Schéma 4.6 – Couplage de Sonogashira entre **90** et **3** suivi de la déprotection de **93**

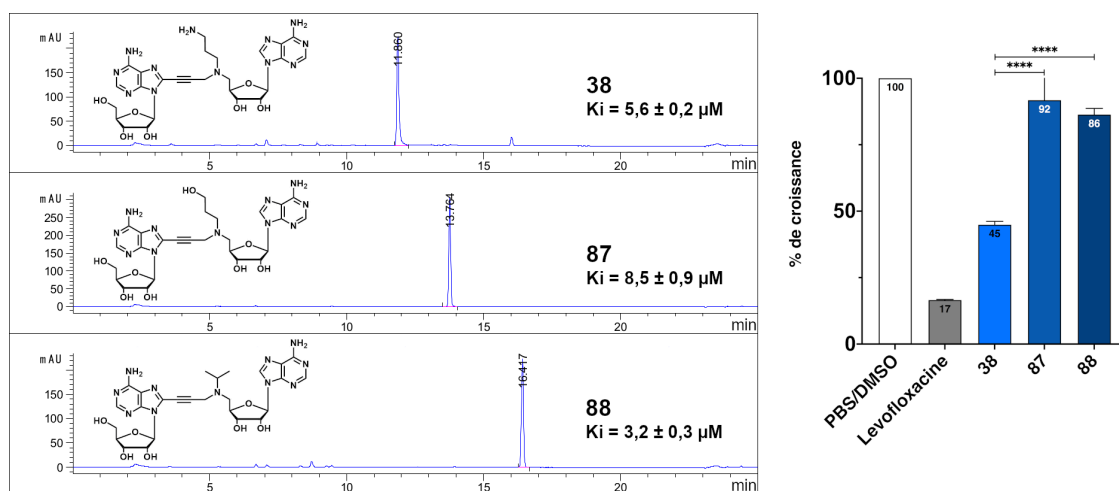
Dans un second temps, le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **92**, portant un groupement isopropyle, et le dérivé bromé **3** a été réalisé (Schéma 4.7). Au laboratoire, des travaux précédents ont montré que cet alcyne tend à s'homocoupler facilement, nous avons donc préféré travailler en défaut de dérivé bromé. Après trois heures à 60 °C, le suivi par CCM indiquait que la réaction n'était pas complète, nous avons donc agité 16 heures supplémentaires à température ambiante. La totalité de l'alcyne **92** ayant été consommée la réaction a été traitée puis purifiée permettant d'obtenir le produit de couplage **94** avec un rendement de 51 %.

L'étape de déprotection finale (traitement basique puis acide) permet l'obtention du composé **87** avec un rendement de 71 % après purification CLHP (Schéma 4.7).

Schéma 4.7 – Couplage de Sonogashira entre **92** et **3** suivi de la déprotection de **94** en **88**

Résultats biologiques

Les deux composés modifiés en position centrale **87** et **88** ont ensuite été soumis aux mêmes évaluations que précédemment décrites (CLHP, K_i et activité sur bactérie). Étant des analogues structuraux du composé **38** portant une chaîne aminopropyle en position centrale, ils ont été comparés à celui-ci. Les suivis CLHP indiquent que les analogues synthétisés ont un temps de rétention supérieur à la diadénosine **38**, traduisant une moins bonne hydrophilie (Figure 4.7, suivis CLHP). Concernant la constante d'inhibition, celle-ci est du même ordre de grandeur pour les trois composés. Cependant, l'activité des molécules **87** et **88** sur culture de *S. aureus* est faible (Figure 4.7, histogramme).

Figure 4.7 – Propriétés des diadénosines **87** et **88**

En conclusion, les deux analogues synthétisés sont peu actifs sur bactérie, malgré

leur K_i favorable vis-à-vis de l'enzyme modèle (*Lm*NADK). Une cause possible permettant d'expliquer ces résultats est la diminution de l'hydrophilie des composés. Il est aussi envisageable que la substitution de la fonction amine par un autre groupement diminue la pénétration membranaire des analogues **87** et **88**, conduisant la baisse d'activité observée sur culture de *S. aureus*.

4.2.3 Remplacement du ribose par un benzyle

Parmi les travaux préliminaires, à l'occasion de l'approche par fragments, il a été envisagé de remplacer le ribose présent dans le sous-site A par un groupement benzyle. A cette fin, la 9-benzyl-8-bromoadénine (**95**) a été synthétisée et soumise à des expériences de co-cristallisation avec différentes molécules dans des cristaux de *Lm*NADK (Figure 4.8). Parmi les structures produites figure l'expérience de co-cristallisation de **95** avec le dérivé **96**. La structure produite montrait une bonne superposition de ces ligands avec la structure de **NKI1** dans les mêmes conditions (Figure 4.8).

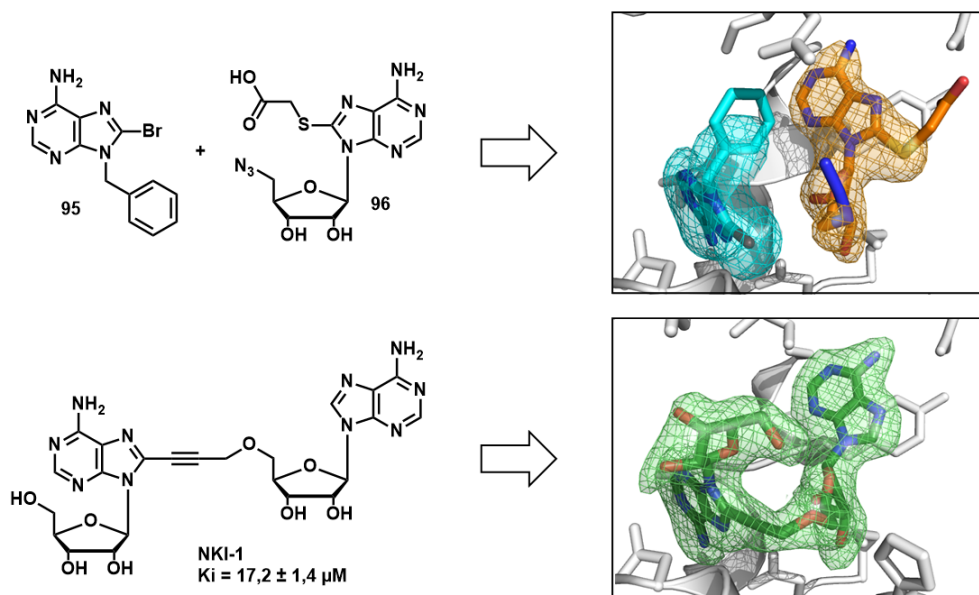


Figure 4.8 – Expériences de cocrystallisation avec **95**

Un premier analogue de **NKI-1**, portant un benzyle à la place du ribose du site A, a été synthétisé puis soumis à des expériences de co-cristallisation révélant des interactions favorables (Figure 4.9).

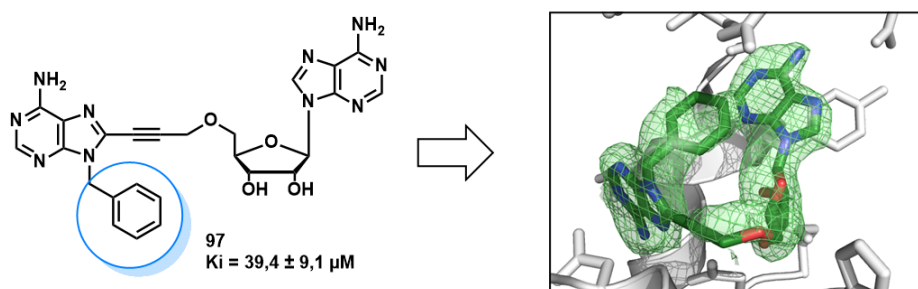


Figure 4.9 – Travaux préliminaires

Afin de poursuivre cette SAR et d'évaluer l'impact de modifications en position centrale sur un composé benzylé, nous avons préparé les composés **98** et **99**, analogues des diadénosines **38** et **88** décrites précédemment, (Figure 4.10).

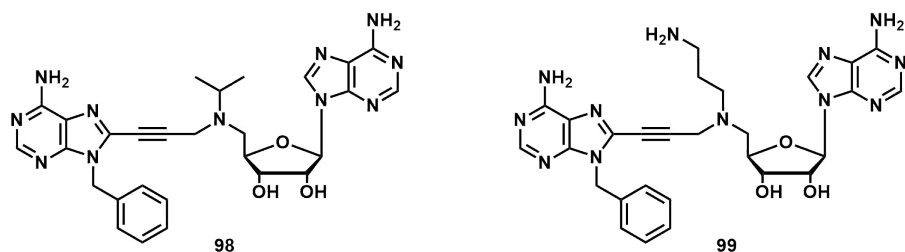
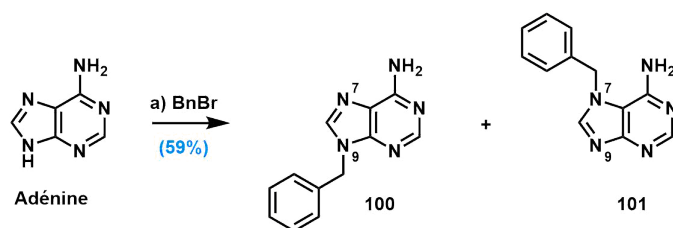


Figure 4.10 – Molécules envisagées

Synthèse du dérivé bromé

Afin d'obtenir les dérivés souhaités, il est nécessaire de synthétiser la 9-benzyl-8-bromoadénine (**95**). La première étape consiste en la *N*-benzylation de la position 9 de l'adénine (Schéma 4.8). Pour ce faire, celle-ci a été traitée en condition basique (K_2CO_3) avec un léger excès de bromure de benzyle pour conduire au composé **100** avec un rendement de 59 %. Ce faible rendement s'explique par la formation du composé **101**, isomère de position de **100**, produit de la benzylation de la position 7 de l'adénine.²³⁹



a) BnBr (1,2 équiv.), K_2CO_3 (1,2 équiv.), DMF, 0 °C à t.a., 4,5 h, 59 %;

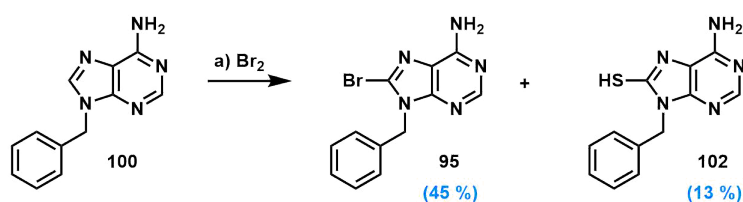
Schéma 4.8 – Benzylation de l'adénine

La bromation de la position 8 de l'adénine modifiée **100** a été ensuite réalisée en utilisant du dibrome dans les conditions classiques (Schéma 4.9, bilan réactionnel). A

239. Lambertucci, C.; Antonini, I. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 2812-2822.

l'occasion d'une première tentative, le dérivé bromé **95** a été obtenu avec un modeste rendement de 44 %. Celui-ci s'explique par la dégradation du produit lors du traitement de la réaction. En effet, le dibrome résiduel est détruit par l'ajout d'une solution saturée de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Lors de cette première manipulation, un trop large excès a été ajouté par mégarde conduisant à la formation du sel de Bunte^{240,241} en position 8 (Schéma 4.9, réaction secondaire). Son hydrolyse en milieu acide a ensuite conduit à la formation la 9-benzyl-8-thioadénine à hauteur de 13 %. Lorsque la réaction de bromation a été répétée, avec plus de précautions lors du traitement, nous avons obtenu le produit souhaité avec un rendement de 86 %.

Bilan réactionnel



a) Br_2 (2,0 équiv.), 1,4-dioxane, tampon acétate (0,5 M, pH = 5,3), t.a., 2,0 h, 45 %.

Réaction secondaire

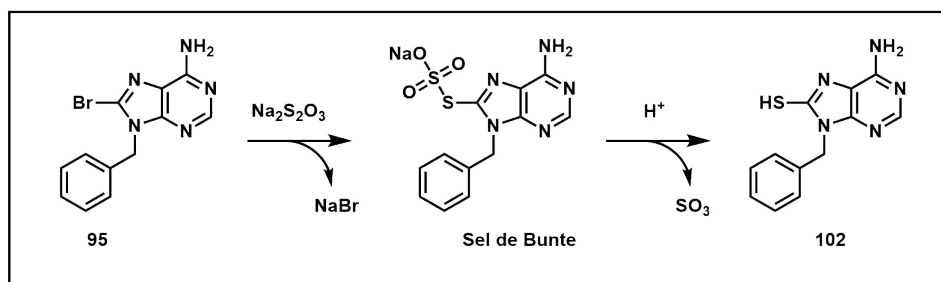


Schéma 4.9 – Bromation de la 9-benzyl adénine et formation du thiol

240. Distler, H. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1967**, 6, 544-553.

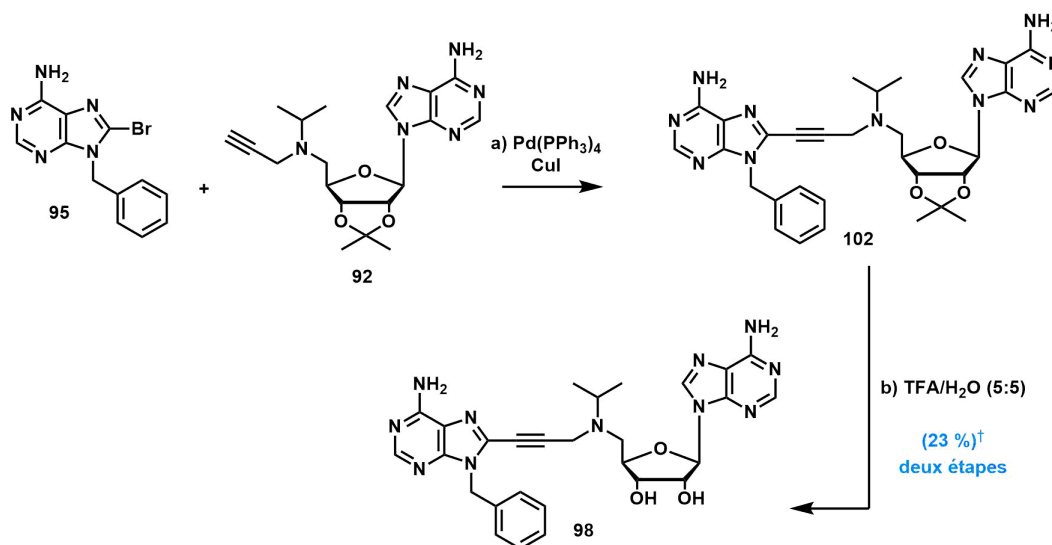
241. Bunte, H. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1874**, 7, 646-648.

Couplages de Sonogashira et déprotections

La 9-benzyl-8-bromoadénine (**95**) a ensuite été couplée avec l'alcyne **92** portant un groupement isopropyle ou l'alcyne **24** portant un groupement aminopropyle.

Dans un premier temps, nous avons fait le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **92** et le dérivé bromé **95**. Comme mentionné précédemment, l'alcyne **95** a tendance à s'homocoupler facilement, nous conduisant à travailler en défaut de dérivé bromé. Après 20 heures de réaction à 60 °C, la totalité de l'alcyne engagé avait réagi formant soit le produit de couplage **102** soit le produit d'homocouplage (non représenté sur le schéma). Le dérivé bromé **95** n'étant pas entièrement consommé, une seconde addition d'alcyne (0,6 équivalent) et de catalyseur palladié (5 mol %) a été faite. Après 16 heures supplémentaires à 60 °C, la purification du brut conduit à un mélange 50:50 des produits de couplage **102** et d'homocouplage, le rendement sera donc calculé en deux étapes après la déprotection.

L'étape de déprotection finale (Schéma 4.7) consiste en le traitement acide du mélange obtenu avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Cette réaction a permis d'obtenir la molécule déprotégée **98** avec un rendement de 23 % en deux étapes après purification CLHP.



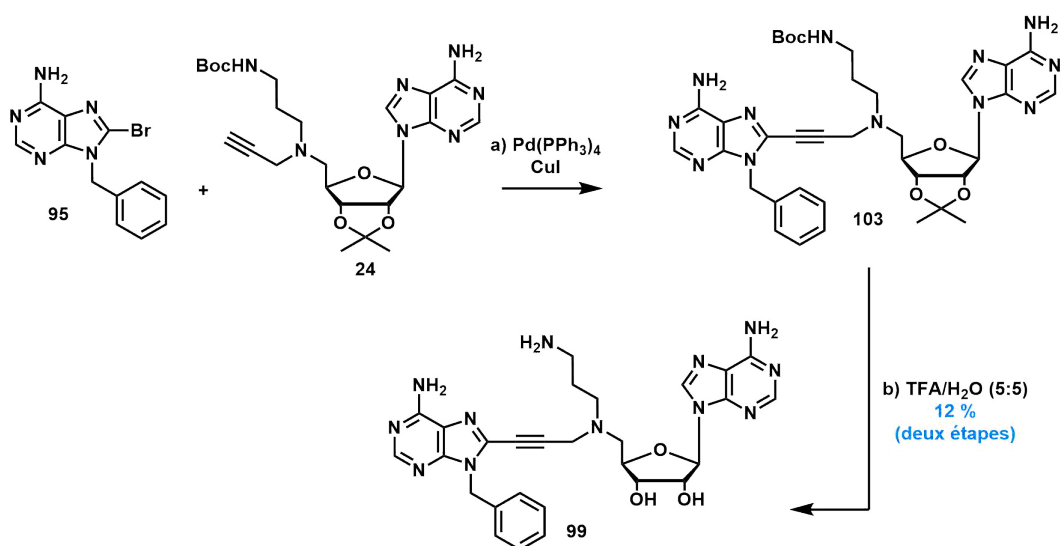
a) Dérivé bromé **95** (1,0 équiv.), alcyne **92** (1,5 + 0,6 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (10 + 5 mol%), Cul (5 mol%), NEt₃ (3,0 équiv.), THF, 60 °C, 36 h;
b) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 5 h, 23% (deux étapes).

Schéma 4.10 – Synthèse du composé **98**

Dans un second temps, nous avons fait le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **24** et la 9-benzyl-8-bromoadénine (**95**). Cette fois, nous avons opéré avec un excès de dérivé bromé (1,2 équivalents) par rapport à l'alcyne (Schéma 4.11). Dans ces conditions, la totalité de l'alcyne était consommé après cinq heures de réaction à 60 °C. Une fois encore, les produits de couplage **103** et d'homocouplage n'ont pas pu être séparés par

chromatographie de silice. Toutefois, l'analyse RMN du mélange a permis de déterminer que ces deux produits étaient en proportion 50:50.

L'étape de déprotection finale (Schéma 4.11) consiste en le traitement acide du composé **102** avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Cette réaction a permis d'obtenir la molécule déprotégée **99** avec un rendement de 12 % en deux étapes après purification CLHP.



- a) Dérivé bromé **95** (1,2 équiv.), alcyne **24** (1,0 équiv.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (10 mol%), CuI (5 mol%), NEt_3 (3,0 équiv.), THF, 60°C ;
 b) TFA/H₂O (5:5), 0°C à t.a., 5 h, 12 % (deux étapes).

Schéma 4.11 – Synthèse du composé **99**

Résultats biologiques

Les deux analogues benzylés **98** et **99** ont ensuite été soumis aux mêmes évaluations que précédemment décrites (CLHP, K_i et activité sur bactérie). Ceux-ci ont été respectivement comparés aux dérivés des diadénosines **88** et **38**, possédant un ribose à la place du benzyle (Figure 4.11).

De façon attendue, l'hydrophilie des analogues benzylés s'est retrouvée systématiquement diminuée. Les constantes d'inhibition mesurées sont aussi légèrement moins bonnes d'un facteur 2 ou 3. Enfin, l'activité du composé **99** sur culture bactérienne est minime. L'histogramme du composé **98** est noirci car celui-ci, étant insoluble dans les conditions de culture classiques (10 % DMSO dans BHI), n'a pas pu être testé.

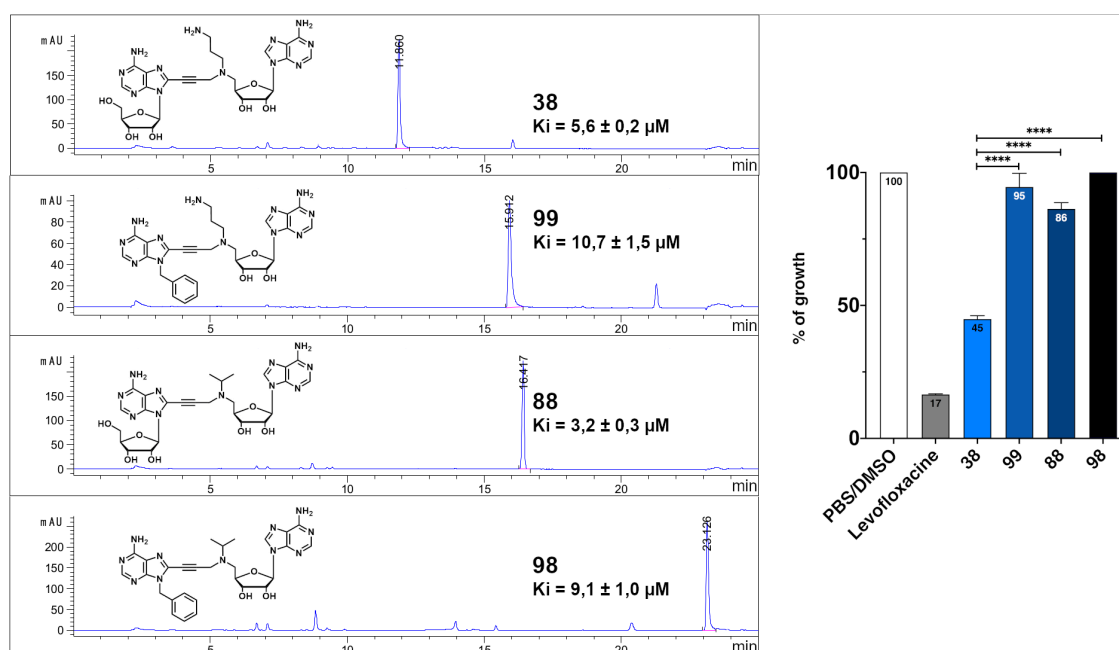


Figure 4.11 – Propriétés des diadénosines benzylées **98** et **99**

La faible activité des composés **98** et **99** sur la croissance de *S. aureus* est probablement due à leur faible hydrophilie conduisant à leur agrégation en milieu aqueux les empêchant, *in fine*, de franchir la paroi bactérienne.

Les composés **98** et **99** ont toutefois un meilleur K_i que l'analogue portant un lien *O*-propargyle **97**, synthétisé lors des travaux antérieurs ($39,4 \pm 9,1 \mu\text{M}$). Il serait donc envisageable de conserver un groupement benzyle substitué par différentes fonctions afin d'augmenter les propriétés physicochimiques de ces analogues et, peut-être, leur activité sur bactérie.

4.2.4 Modifications sur la position 5' du site A

Parmi les molécules précédemment synthétisées au laboratoire, plusieurs diadénosines modifiées en position 5' du ribose de la partie A ont été préparées et testées *in vitro* sur

enzyme purifiée (résultats non publiés). Deux d'entre elles (**104** et **105**) présentaient de bons K_i et ont récemment été évaluées sur culture bactérienne montrant un bon effet d'inhibition de croissance (Figure 4.12).

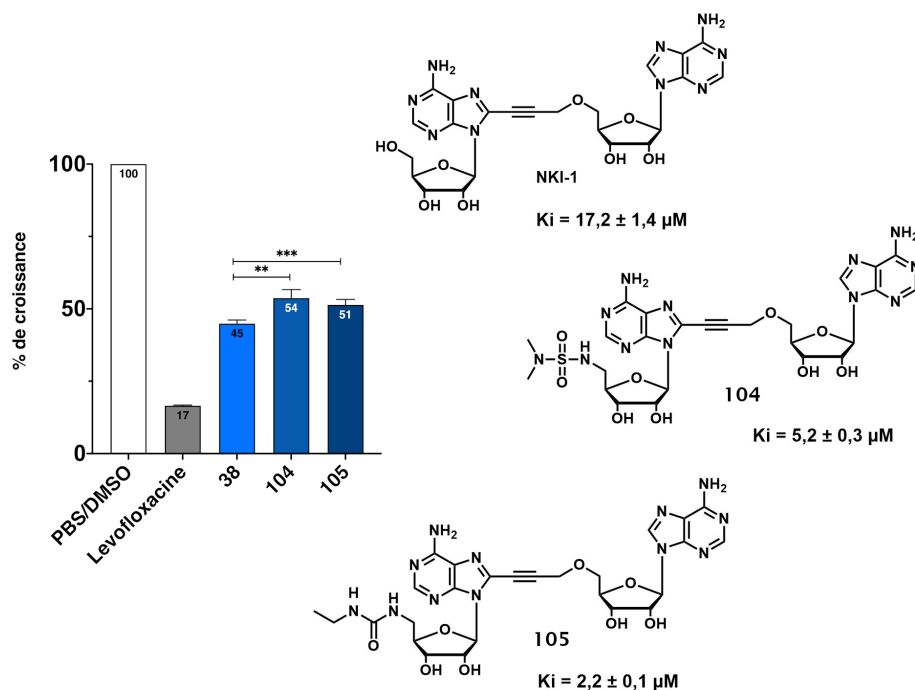


Figure 4.12 – Propriétés des diadénosines **104** et **105**

Espérant bénéficier d'un effet additif des modifications faites en position 5' et sur le lien propargylique, nous avons synthétisé des analogues du composé **38** portant des fonctions urée ou sulfonamide en position 5' du site A (Figure 4.13). Nous avons également préparé un autre dérivé d'urée dans l'espoir de créer des interactions de type π *stacking* avec des résidus aromatiques à proximité.

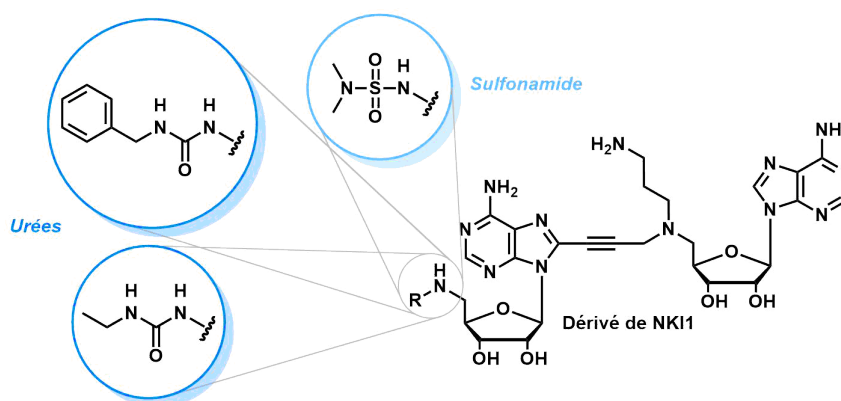


Figure 4.13 – Modifications du ribose envisagées

Afin de synthétiser ces composés, nous avons suivi la stratégie classique consistant en un couplage de Sonogashira entre l'alcyne portant une chaîne aminopropyle **24** et les 8-bromoadénosines modifiées en position 5' **106**, **107** ou **108** (Figure 4.14).

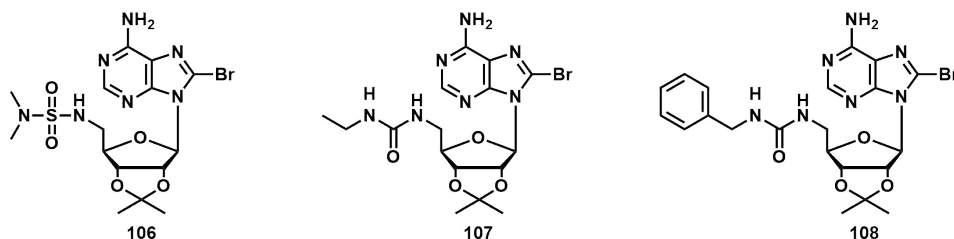
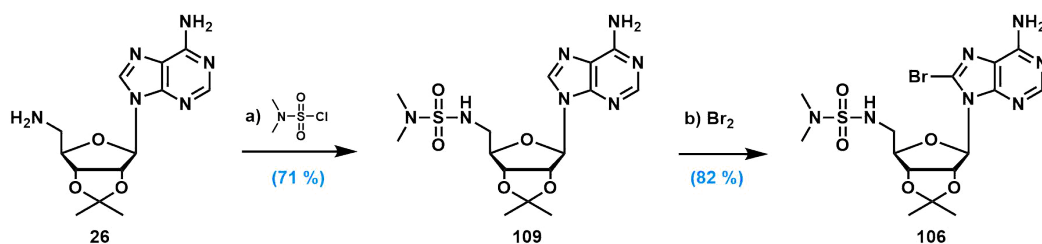


Figure 4.14 – Dérivés bromés que l'on souhaite préparer

Synthèse des dérivés bromés

Une des méthodes les plus fréquentes pour synthétiser des sulfonamides consiste à faire réagir un chlorure de sulfamoyle et une amine en présence d'une base. Les conditions les plus couramment utilisées sont l'utilisation de dichlorométhane comme solvant et de triéthylamine comme base.²⁴²⁻²⁴⁵ La littérature décrit aussi l'emploi d'autres solvants comme le DMF^{101,242} ou d'autres bases comme le NaH¹⁰¹ ou le Cs₂CO₃.¹⁷²

L'adéno adénosine **26** étant mal soluble dans le DCM, nous avons opté pour l'utilisation de DMF comme solvant avec la triéthylamine comme base. Ainsi, le traitement du composé **26** par un léger excès de chlorure de *N,N*-diméthylsulfamoyle commercial à température ambiante a permis d'obtenir le sulfonamide **109** avec un rendement de 71 %. Le composé **109** a ensuite été bromé en position 8 de la base nucléique par réaction avec du dibrome dans les conditions classiques permettant d'obtenir la molécule **106** avec un rendement de 82 %.



a) Chlorure de *N,N*-diméthylsulfamoyle (1,13 équiv.), NEt₃ (1,13 équiv.), DMF, t.a., 16 h **71 %**;
b) Br₂ (2,3 équiv.), 1,4-dioxane, tampon acétate (0,5 M, pH = 5,3), t.a., 2,5 h, **82 %**.

Schéma 4.12 – Synthèse du sulfonamide **106** à partir de l'amine **26**

En ce qui concerne la formation des urées, nous avons opté pour la réaction entre

242. Kastrinsky, D. B.; Sangodkar, J. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 6528-6534.
243. Li, J.; Lou, J. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *92*, 370-376.
244. Babin, V.; Tournier, B. B. *et al. Bioorganic Chemistry* **2020**, *96*, 103582.
245. Oh, C.-H.; Lee, S.-C. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38*, 841-850.

une amine et un isocyanate. La littérature décrit cette réaction comme étant rapide, habituellement une heure, et permettant souvent une conversion quasi totale de l'amine engagée en urée.²⁴⁶⁻²⁴⁹ Ainsi, le composé **26** a été dissous dans le DMF avant d'ajouter l'isocyanate d'éthyle ou de benzyle, commercialement disponibles, conduisant aux urées **110** et **111** avec des rendements supérieurs à 90 % (Tableau 4.1).

Les urées formées ont ensuite été bromées avec du dibrome dans les mêmes conditions que précédemment décrites, afin d'obtenir les dérivés **107** et **108** avec des rendements respectifs de 54 % et 79 %. Les résultats de ces deux synthèses sont résumés ci-après (Schéma 4.13 et Tableau 4.1).

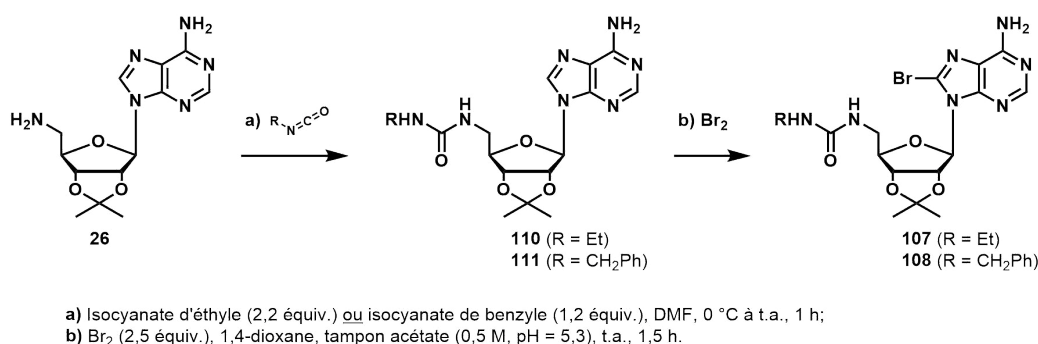


Schéma 4.13 – Synthèse des isocyanates **107** et **108** à partir de l'amine **26**

Formation de l'urée			Bromation	
Amine de départ	Urée formée	Rendement	Produit formé	Rendement
26	110	quant.	107	54 %
26	111	91 %	108	79 %

Tableau 4.1 – Tableau résumant les rendements des synthèses des composés **107** et **108**

Couplages et déprotections

L'alcyne portant une chaîne aminopropyle **24** a ensuite été engagé dans un couplage de Sonogashira avec le dérivé bromé **106**. Le couplage a été réalisé dans les conditions habituelles, avec un léger excès de dérivé bromé par rapport à l'alcyne (Schéma 4.14). Après 16 heures à 60 °C, le suivi de la réaction par CCM indiquait une conversion incomplète des réactifs en produit. Une seconde addition de catalyseur palladié (5 mol%) a permis la conversion totale de l'alcyne après 5 heures. Nous avons ainsi pu isoler le produit souhaité **112** avec un rendement de 69 %. Son traitement acide avec une solution

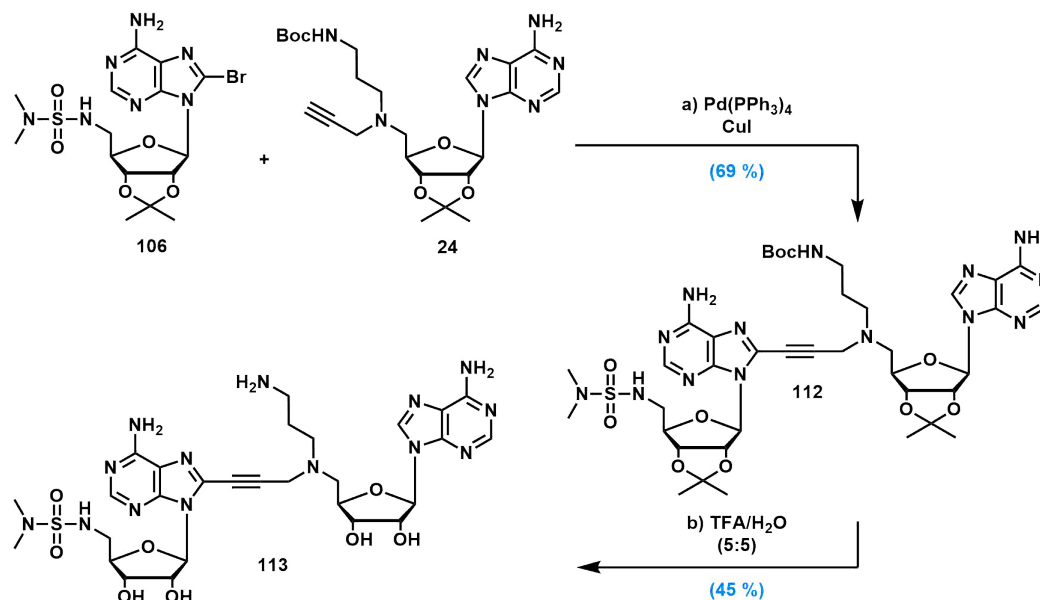
246. Cui, H.; Carrero-Lérida, J. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 10948-10957.

247. Vega-Pérez, J. M.; Perinán, I. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *58*, 591-612.

248. Landagaray, E.; Ettaoussi, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 986-996.

249. Burmistrov, V.; Morisseau, C. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2193-2197.

de TFA (50 % dans l'eau) a ensuite permis d'obtenir la molécule déprotégée **113** avec un rendement de 45 % après purification CLHP.

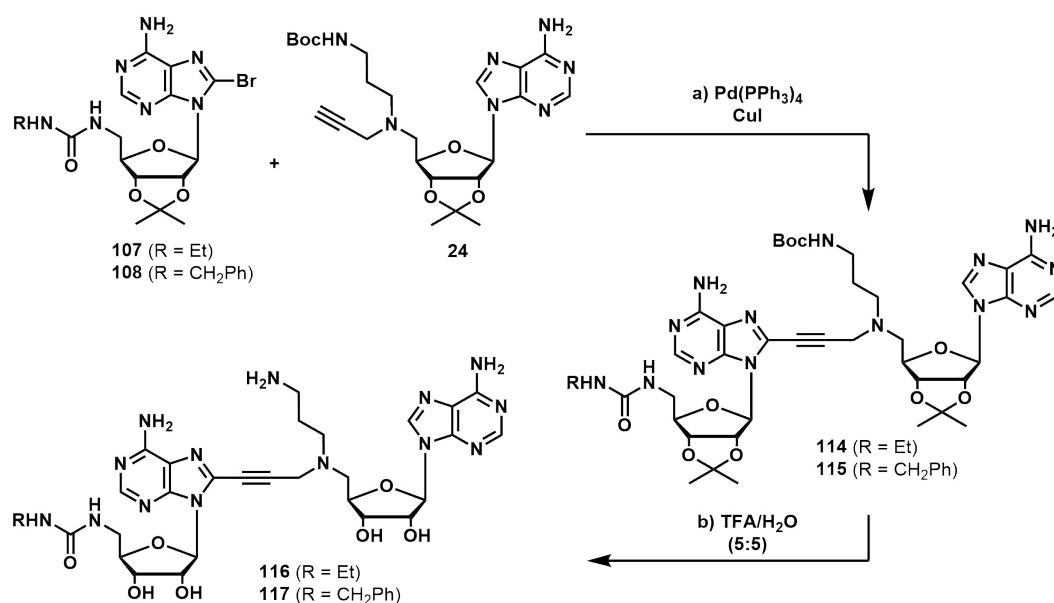


a) Dérivé bromé **106** (1,5 équiv.), alcyne **24** (1,0 équiv.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (10 mol%), CuI (5 mol%), NEt_3 (3.0 équiv.), THF, 60°C , 69 %;
 b) $\text{TFA/H}_2\text{O}$ (5:5), 0°C à t.a., 5 h, 45 %.

Schéma 4.14 – Obtention de la diadénosine **113** à partir du dérivé bromé **106** et de l'alcyne **24**

Les diadénosines **114** et **115** ont également été obtenues par couplage de Sonogashira dans les conditions habituelles entre les dérivés bromés **107** et **108**, décrits précédemment, et l'alcyne **24** (Schéma 4.15). Ainsi, l'alcyne portant une chaîne aminopropyle **24** a été engagé dans un couplage de Sonogashira avec le dérivé bromé **107** (Schéma 4.15). Après 16 heures à 60°C , cette réaction a permis d'isoler le produit souhaité **114** avec un rendement de 32 % s'expliquant par la formation du produit d'homocouplage à hauteur de 38 % (Tableau 4.2). Souhaitant limiter la formation de ce sous-produit, nous avons utilisé un lot de catalyseur neuf lors du couplage de Sonogashira entre l'alcyne **24** et le dérivé bromé **108**. Malgré cela, le produit **115** a été obtenu avec un rendement de 47 % accompagné par la formation du produit d'homocouplage à hauteur de 42 %.

Les diadénosines **114** et **115** ont ensuite été déprotégées par traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Ces réactions ont permis d'obtenir les produits de déprotection **116** et **117** avec des rendements respectifs de 52 % et 79 % après purification CLHP (Tableau 4.2).



a) Dérivé bromé (1,5 équiv.), alcyne **24** (1,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), Cul (5 mol%), NEt₃ (3,0 équiv.), THF, 60 °C;
 b) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 5 h.

Schéma 4.15 – Obtention des diadénosines **116** et **117** à partir des dérivés bromés **107** et **108**

Couplage				Déprotections	
Dérivé bromé	Biligand	Rendement	Homocouplage	Produit	Rendement
107	114	32 %	38 %	116	52 %
108	115	47 %	42 %	117	79 %

Tableau 4.2 – Tableau résumant les rendements des synthèses des composés **116** et **117**

Résultats biologiques

La diadénosine portant un sulfonamide **113** a ensuite été soumise aux mêmes évaluations que précédemment décrites (CLHP, Ki et activité sur bactérie). Elle a été comparée aux diadénosines **38** et **104** afin d'apprécier l'effet additif des deux fonctions introduites (Figure 4.15, partie A).

L'analyse CLHP permet de mesurer un temps de rétention de l'analogue **113** compris entre les temps de rétentions des composés **38** et **104** (Figure 4.15, partie A, suivis CLHP). On estime donc que son hydrophilie relative est comprise entre celle de ces deux composés. Concernant la constante d'inhibition, on remarque bien l'effet additif attendu : le Ki mesuré de la diadénosine **113** est réduit d'un facteur deux par comparaison aux Ki des composés **38** et **104**. Cependant, cette additivité n'est pas retrouvée lors des mesures d'activité sur culture bactérienne de *S. aureus*. En effet, l'activité de la diadénosine **113** est moins bonne que celle des composés **38** et **104** (Figure 4.15, partie A, histogramme).

Concernant les urées **116** et **117**, celles-ci ont été comparées aux composés **105** et **38** (Figure 4.15, partie B). L'hydrophilie du composé **116** est presque inchangée par rapport à l'hydrophilie du composé **38**. De façon attendue, la présence du groupement phényle

4. Synthèse d'analogues linéaires de **NKI-1**

du composé **117** diminue ce paramètre par rapport à la diadénosine **38** (Figure 4.15, partie B, suivis CLHP). Concernant la constante d'inhibition vis-à-vis de *Lm*NADK, l'effet additif des groupements aminopropyles et urées conduit à une nette amélioration de celle-ci. Cette amélioration est d'un facteur cinq pour le composé **116** et d'un facteur dix pour le composé **117**. Cependant, cette additivité n'est pas retrouvée lors des mesures d'activité sur culture bactérienne des deux diadénosines "croisées". L'effet est faible dans le cas du composé **116** et inexistant dans le cas du composé **117** (Figure 4.15, partie B, histogramme).

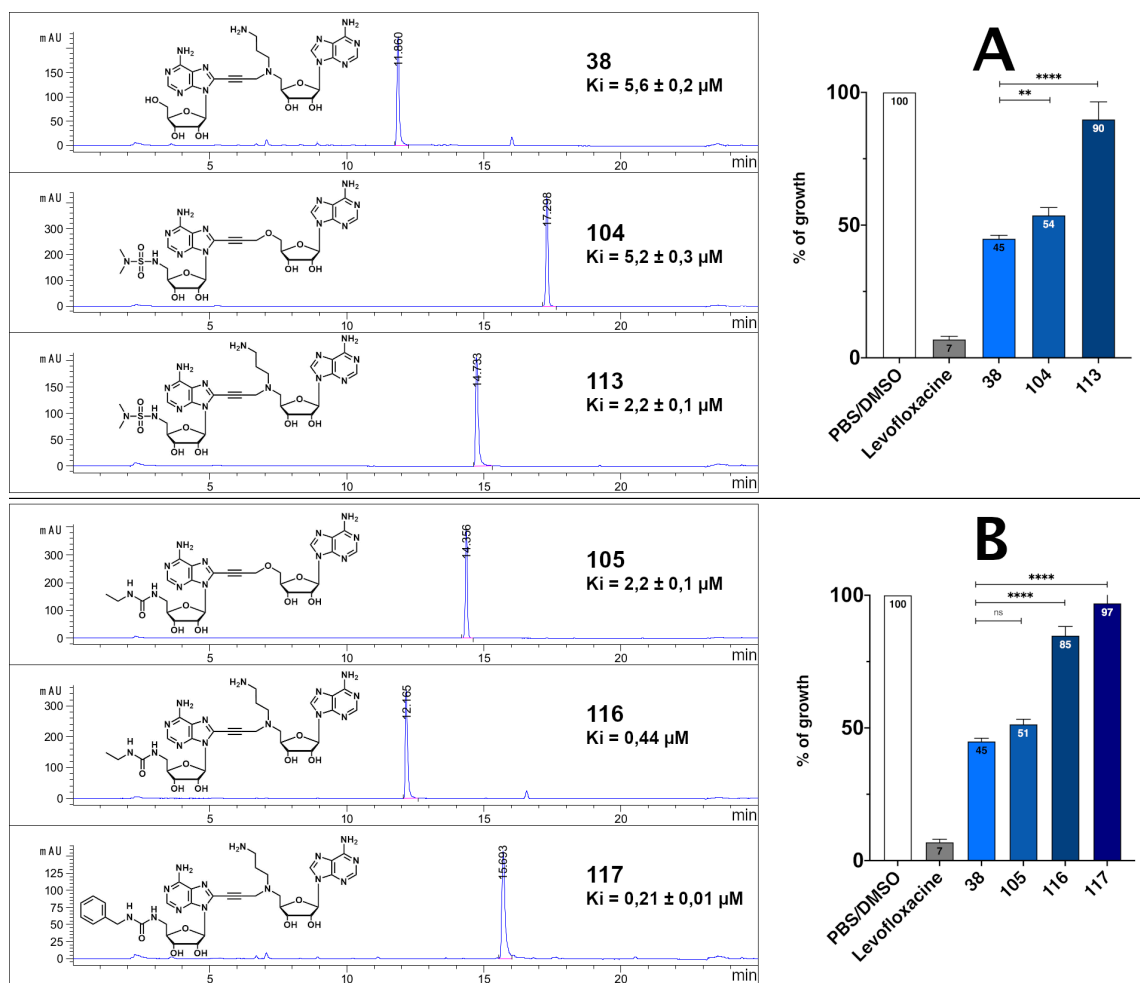


Figure 4.15 – Propriétés des diadénosines **113**, **116** et **117**

Les analogues **113**, **116** et **117**, modifiés en position 5', possèdent de meilleurs constantes d'inhibition vis-à-vis de *Lm*NADK que le composé de référence **38**. Malgré cela, leur activité sur croissance bactérienne est moins bonne. Une des explications possible est que ces composés franchissent moins bien la membrane bactérienne (poids moléculaire légèrement augmenté) diminuant l'activité des composés sur bactéries.

4.3 Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé neuf analogues de diadénosines dans le but d'obtenir des composés présentant de meilleures propriétés d'inhibition que le composé de référence **NKI1**.

Les composés guanylés **85** et **86** n'ont pas eu d'effet significativement meilleur sur l'inhibiteur de croissance bactérienne malgré une amélioration de leur affinité pour l'enzyme cible. Il est possible que les amines confèrent aux diadénosines un pouvoir pénétrant suffisant qui n'est pas amélioré par l'introduction de groupement guanidinium.

Les deux modifications apportées en position centrale (groupement polaire, diadénosine **87** ou groupement apolaire diadénosine **88**) n'ont pas eu d'impact majeur sur le Ki. De plus, testés sur *S. aureus*, ces composés ne montrent pas d'effet sur la croissance bactérienne.

De même, le remplacement du ribose par un groupement benzyle a aussi conduit à des constantes d'inhibition presque inchangées, accompagnées par une nette diminution de l'effet des analogues sur culture bactérienne. La présence d'un groupement benzyle n'est pas grandement pénalisant en terme de Ki.

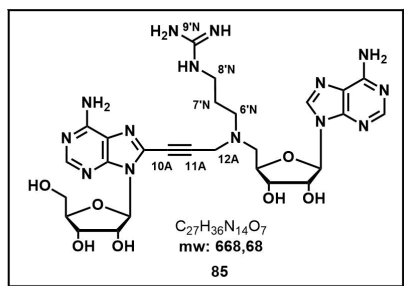
Les diadénosines "bifonctionnalisées" **113**, **116** et **117** présentent des meilleures constantes d'inhibition, jusqu'à un facteur 25, que celles des composés "monofonctionnalisés" **NKI1**, **38**, **104** et **105**. Cependant, l'effet additif observé *in vitro* sur enzyme purifiée (Ki) n'est pas retrouvé sur l'inhibiteur de croissance bactérienne.

Les faibles inhibitions de croissance observée avec les diadénosines synthétisées dans ce chapitre peuvent s'expliquer par une mauvaise pénétration membranaire. D'une part, les composés modifiés en position centrale **87** et **88** n'ont plus de fonction amine facilitant leur pénétration membranaire. D'autre part, concernant les composés "bifonctionnalisés" **113**, **116** et **117**, l'augmentation de leur poids moléculaire diminue probablement leur pénétration membranaire par voie passive, conduisant à une perte d'activité sur bactérie.

Pour s'assurer que l'absence d'activité de ces molécules est liée à une mauvaise pénétration cellulaire, il est possible d'avoir recours à l'imagerie Raman afin de déterminer la localisation des composés *via* leur fonction alcyne. Une absence de signal intracellulaire confirmerait cette hypothèse nous incitant à concevoir des molécules portant des fonctions favorisant leur transport à travers la membrane.

Experimental section

5'-(*N*-(3-guanidino)propyl-*N*-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl])amino-5'-deoxy-adenosine (85**)**

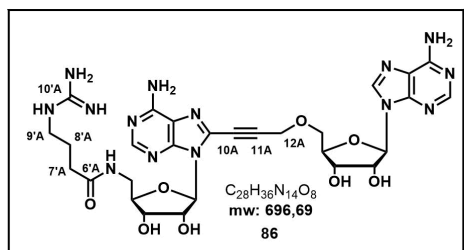


To a solution of 1-H pyrazole-1-carboxamidine chlorhydrate (6 mg, 0.036 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (40 μ L) was added a Na₂CO₃ solution (0.25 N in water, 144 μ L, 1.0 equiv.) followed by **38** (25 mg, 0.036 mmol, 1.0 equiv.). After 1 hour at 35°C, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by HPLC (0-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 11.9 min) to yield guanylated compound **85** (9,9 mg, 37 %) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.64-1.70 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.60-2.63 (m, 2H, H-6'N), 2.82 (dd, J_{5'N,4'N} = 7.0 Hz, J_{5'N,5''N} = 13.4 Hz, 1H, H-5'N), 2.92 (dd, J_{5''N,4'N} = 4.4 Hz, J_{5''N,5'N} = 13.4 Hz, 1H, H-5'N), 3.09-3.14 (m, 2H, H-8'N), 3.50-3.57 (m, 1H, H-5'A), 3.69 (dd, J_{5'A,4'A} = 3.6 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 3.81 (s, 2H, CH₂-12A), 3.98-4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.03-4.09 (m, 1H, H-4'N), 4.14-4.18 (m, 1H, H-3'N), 4.20-4.23 (m, 1H, H-3'A), 4.66-4.70 (m, 1H, H-2'N), 4.98-5.03 (m, 1H, H-2'A), 5.90 (d, J_{1'N,2'N} = 5.0 Hz, 1H, H-1'N), 5.99 (d, J_{1'A,2'A} = 6.6 Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH₂-6N), 7.43 (br s, 4H, guanidinium), 7.61 (s, 2H, NH₂-6A), 8.16 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.36 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 27.1 (CH₂-7'N), 39.1 (CH₂-8'N), 43.7 (CH₂-12A), 51.4 (C-6'N), 56.1 (C-5'N), 62.7 (C-5'A), 71.5 (C-3'A), 72.1 (C-2'A), 72.2 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 74.9 (C-11A), 82.9 (C-4'N), 87.1 (C-4'A), 88.2 (C-1'N), 90.0 (C-1'A), 92.8 (C-10A), 119.6 (2C, C-5A and C-5N), 113.9 (C-8A), 140.3 (C-8N), 148.8 (C-4A), 159.9 (C-4N), 153.1 (C-2N) 153.7 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N), 157.7 (Cq guanidinium).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₂₇H₃₆N₁₄O₇+H]⁺ 669.2969 found 669.2964.

5'-O-[3-(5'-[4-guanidinobutylamido]-5'-deoxy-adenosine-yl)prop-2-yn-1-yl]-adenosine (86)

To a solution of 1-H pyrazole-1-carboxamidine chlorhydrate (6 mg, 0.036 mmol, 1.0 equiv.) in a Na_2CO_3 solution (1 N in water, 40 μL , 1.0 equiv.) was added **45** (26 mg, 0.036 mmol, 1.0 equiv.). After 1,5 hours at 35°C , the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by HPLC

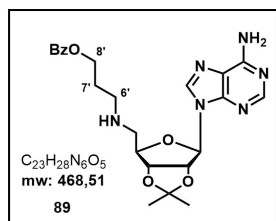
(10-25% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 8.75$ min) to yield guanylated compound **86** (11 mg, 44 %) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 1.66-1.73 (m, 2H, CH_2 -8'A), 2.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-7'A), 3.04 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2 -9'A), 3.36-3.42 (m, 1H, H-5'A), 3.44-3.51 (m, 1H, H-5''A), 3.77 (dd, $J_{5'\text{N},4'\text{N}} = 5.6$ Hz, $J_{5'\text{N},5''\text{N}} = 10.6$ Hz, 1H, H-5'N), 3.85 (dd, $J_{5''\text{N},4'\text{N}} = 3.6$ Hz, $J_{5''\text{N},5'\text{N}} = 10.6$ Hz, 1H, H-5''N), 3.98-4.02 (m, 1H, H-4'A), 4.08-4.14 (m, 2H, H4'N and H-3'A), 4.20 (t app, $J_{3'\text{N},2'\text{N}} = J_{3'\text{N},4'\text{N}} = 4.6$ Hz, 1H, H-3'N), 4.60-4.63 (m, 3H, H-2'N and CH_2 -12A), 5.04 (dd, $J_{2'\text{A},1'\text{A}} = 6.4$ Hz, $J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'A), 5.92 (d, $J_{1'\text{N},2'\text{N}} = 5.2$ Hz, 1H, H-1'N), 5.94 (d, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 6.4$ Hz, 1H, H-1'A), 7.26 (s, 2H, NH_2 -6), 7.62 (s, 2H, NH_2 -6), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.24 (d, 1H, H-2A), 8.32 (s, 1H, H-8N), 8.40-8.43 (m, 1H, NH -5'A).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 25.2 (CH_2 -8'A), 32.6 (CH_2 -7'A), 40.5 (CH_2 -9'A), 41.3 (C-5'A), 58.7 (CH_2 -12A), 70.8 (C-5'N), 71.0 (C-3'N), 71.7 (C-2'A), 71.8 (C-3'A), 73.7 (C-2'N), 75.7 (C-10A), 83.3 (C-4'N), 84.5 (C-4'A), 88.0 (C-1'N), 89.7 (C-1'A), 92.5 (C-11A), 119.5 (C-5N), 119.8 (C-5A), 133.4 (C-8A), 139.8 (C-8N), 149.2 (C-4A), 150.0 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.2 (C-2A), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-6A), 157.9 (Cq guanidinium), 172.4 (C-6'A).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_{14}\text{O}_8 + \text{H}]^+$ 697.2919 found 697.2916

5'-(3-(*O*-benzoyl-hydroxy)propanamino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (89**)**



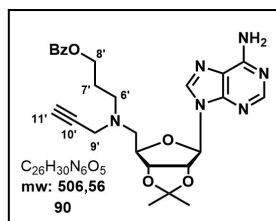
To a solution of **35** (983 mg, 2.0 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (5 mL) was added K_2CO_3 (819 mg, 6.0 mmol, 3.0 equiv.) followed by 3-bromopropyl benzoate (584 mg, 2.4 mmol, 1.2 equiv.). After 96 hours at room temperature, thiophenol (412 μ L, 4.0 mmol, 2.0 equiv.) was added. After 18 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (100 g SiO_2 , 5 to 9% methanol in dichloromethane) to yield compound **89** (600 mg, 64%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 1.32 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.53 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.79-1.85 (m, 2H, CH_2 -7'), 2.65 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2 -6'), 2.71 (dd, $J_{5',4'} = 6.2$ Hz, $J_{5',5''} = 12.3$ Hz, 1H, H-5'), 2.78 (dd, $J_{5'',4'} = 5.9$ Hz, $J_{5'',5''} = 12.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.20-4.24 (m, 1H, H-4'), 4.31 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2 -8'), 4.98 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.46 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.10 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 7.31 (s, 2H, NH_2 -6), 7.50-7.55 (m, 2H, CH-M Bz), 7.62-7.67 (m, 1H, CH-P Bz), 7.94-7.97 (m, 2H, CH-O Bz), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.35 (s, 1H, H-6).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (C-7'), 29.0 (CH_3 isop.), 46.3 (C-6'), 51.4 (C-5'), 63.5 (C-8'), 82.7 (C-3'), 83.2 (C-2'), 85.4 (C-4'), 89.7 (C-1'), 113.7 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 129.2 (2C, CH-M Bz), 129.5 (2C, CH-O Bz), 130.3 (Cq Bz), 133.7 (CH-P Bz), 140.4 (C-8), 149.4 (C-4), 153.1 (C-2), 156.6 (C-6), 166.2 (CO Bz).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[C_{23}H_{28}N_6O_5+H]^+$ 469.2193 found 469.2189

5'-(3-(*O*-benzoyl-hydroxy)propyl-N-propargylamino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene adenosine (90**)**



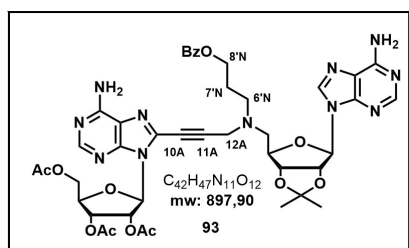
To a solution of **89** (590 mg, 1.26 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (10.0 mL), were added DIEA (658 μ L, 3.8 mmol, 3.0 equiv.) and propargyl bromide (80% in toluene, 211 μ L, 1.9 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO_2 , 5% methanol in dichloromethane, isocratic) to yield compound **90** (574 mg, 90%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.28 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.47 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.75-1.82 (m, 2H, CH₂-7'), 2.55-2.63 (m, 3H, H-5' and CH₂-6'), 2.69-2.74 (m, 1H, H-5''), 3.04 (t, 1H, CH-11'), 3.41 (ABq d, J_{9',9''} = 17.6 Hz, J_{9',11'} = 2.3 Hz, 2H, CH₂-9'), 4.21-4.30 (m, 3H, H-4', CH₂-8'), 4.99 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 3.0 Hz, 1H, H-3'), 5.47 (dd, J_{2',1'} = 2.4 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.13 (d, J_{1',2'} = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 7.31 (s, 2H, NH₂-6), 7.51-7.55 (m, 2H, CH-M Bz), 7.63-7.67 (m, 1H, CH-P Bz), 7.96-7.98 (m, 2H, CH-O Bz), 8.16 (C-2), 8.31 (C-6).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.6 (CH₃ isop.), 26.5 (C-7'), 27.3 (CH₃ isop.), 42.5 (C-9'), 50.4 (C-6'), 55.4 (C-5'), 63.2 (C-8'), 76.1 (C-11'), 79.3 (C-10'), 83.3 (C-3'), 83.4 (C-2'), 84.9 (C-4'), 89.7 (C-1'), 113.6 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 129.2 (2C, CH-M Bz), 129.5 (2C, CH-O Bz), 130.4 (Cq Bz), 133.6 (CH-P Bz), 140.5 (C-8), 149.2 (C-4), 153.1 (C-2), 156.6 (C-6), 166.2 (CO Bz).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₂₆H₃₀N₆O₅+H]⁺ 507.2350 found 507.2349.

5'-(3-(*O*-benzoyl-hydroxy)propyl-*N*-[3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-adenosine-8-yl)-prop-2-yn-1-yl]amino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (93**)**



To a solution of bromo derivative **3** (354 mg, 0.75 mmol, 1.5 equiv.) and alkyne **90** (253 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in THF (5 mL) was added NEt₃ (209 μL, 1.5 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (10 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (32 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon

degassing. After 5 hours at 60 °C volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (30 g SiO₂, 2 to 6% methanol in dichloromethane) to yield **93** (304 mg, 68%) as a white foam.

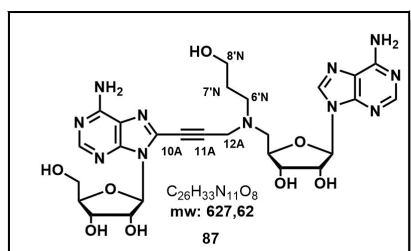
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.29 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.49 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.85-1.91 (m, 2H, CH₂-7'N), 1.94 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.95 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.05 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.69-2.76 (m, 3H, CH₂-6'N and H-5'N), 2.86 (dd, J_{5'N,4'N} = 7.7 Hz, J_{5'N,5''N} = 13.2 Hz, 1H, H-5'N), 3.88 (ABq, J = 18.3 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.15 (dd, J_{5'A,4'A} = 5.6 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 4.20-4.35 (m, 4H, H-4'A, H-4'N and CH₂-8'N), 4.39 (dd, J_{5'A,4'A} = 3.6 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 5.04 (dd, J_{3'N,2'N} = 6.3 Hz, J_{3'N,4'N} = 3.0 Hz, 1H, H-3'N), 5.49 (dd, J_{2'N,1'N} = 2.4 Hz, J_{2'N,3'N} = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.72 (t app, J_{3'A,2'A} = J_{3'A,4'A} = 6.0 Hz, 1H, H-3'A), 6.13 (d, J_{1'A,2'A} = 4.6 Hz, 1H, H-1'A), 6.15 (d, J_{1'N,2'N} = 2.4 Hz, 1H, H-1'N), 6.18 (dd, J_{2'A,1'A} = 4.5 Hz, J_{2'A,3'A} = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 7.31 (s, 2H, NH₂-6N), 7.46-7.52 (m, 2H, CH-M Bz), 7.56

(s, 2H, NH₂-6A), 7.59-7.64 (m, 1H, CH-P Bz), 7.94-7.97 (m, 2H, CH-O Bz), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.19 (s, 1H, H-2A), 8.34 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 20.5 (CH₃ OAc), 20.7 (CH₃ OAc), 20.8 (CH₃ OAc), 25.6 (CH₃ isop.), 26.6 (CH₂-7'N), 27.3 (CH₃ isop.), 43.2 (C-12A), 50.6 (C-6'N), 55.5 (C-5'N), 62.9 (C-5'A), 63.1 (C-8'N), 70.2 (C-3'A), 10.7 (C-2'A), 74.4 (C-10A), 79.7 (C-4'A), 83.2 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.5 (C-4'N), 87.3 (C-1'A), 89.7 (C-1'N), 93.2 (C-11A), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 113.7 (Cq isop.), 129.1 (2C, CH-M Bz), 129.5 (2C, CH-O Bz), 130.3 (Cq Bz), 133.2 (C-8A), 133.6 (CH-P Bz), 140.6 (C-8N), 149.0 (C-4N), 149.2 (C-4A), 153.1 (C-2N), 154.3 (C-2A), 156.4 (C-6A), 156.6 (C-6N), 166.2 (CO Bz), 169.7 (Cq OAc), 169.8 (Cq OAc), 170.4 (Cq OAc).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₄₂H₄₇N₁₁O₁₂+H]⁺ 898.3478 found 898.3479.

5'-(N-(3-hydroxy)propyl-N-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl])amino-5'-deoxy-adenosine (87)



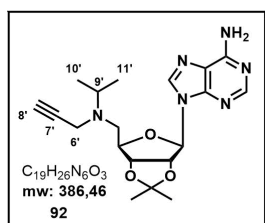
To a suspension of **93** (259 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.) in water (2.0 mL) and 1,4-dioxane (2.0 mL) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 880 μL, 1.76 mmol, 6.0 equiv.). After 2 hour at room temperature, the crude was lyophilized and the residue was dissolved in an ice-cold TFA solution (4 mL, 50% in water). After 6 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilized and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-50 acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 9.21 min) to yield fully deprotected compound **87** (129 mg, 71%) as a light yellow powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.59-1.65 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.63-2.66 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.80 (dd, J_{5'N,4'N} = 6.8 Hz, J_{5'N,5''N} = 13.6 Hz, 1H, H-5'N), 2.90 (dd, J_{5',4'} = 3.8 Hz, J_{5',5''} = 13.6 Hz, 1H, H-5'N), 3.43-3.47 (m, 2H, CH₂-8'N), 3.55 (ddd, J_{5'A,4'A} = 4.0 Hz, J_{5'A,5''A} = 12.2 Hz, J_{5'A,OH5'A} = 8.6 Hz, 1H, H-5'A), 3.68 (dt, J_{5''A,4'A} = J_{5''A,OH5'A} = 3.8 Hz, J_{5''A,5'A} = 12.2 Hz, 1H, H-5'A), 3.80 (s, 2H, CH₂-12A), 3.98-4.00 (m, 1H, H-4'A), 4.02-4.06 (m, 1H, H-4'N), 4.13-4.16 (m, 1H, H-3'N), 4.19-4.22 (m, 1H, H-3'A), 3.39 (t, J_{OH8'N,8'N} = 5.1 Hz, 1H, OH-8'N), 4.67-4.71 (m, 1H, H-2'N), 4.98-5.02 (m, 1H, H-2'A), 5.17 (d, J_{OH3'A,3'A} = 4.2 Hz, 1H, OH-3'A), 5.22 (d, J_{OH3'N,3'N} = 5.2 Hz, 1H, OH-3'N), 5.41 (d, J_{OH2'A,2'A} = 6.2 Hz, 1H, OH-2'A), 5.46 (d, J_{OH2'N,2'N} = 5.9 Hz, 1H, OH-2'N), 5.55 (dd, J_{OH5'A,5'A} = 8.6 Hz, J_{OH5'A,5''A} = 3.8 Hz, 1H, OH-5'A), 5.89 (d, J_{1'N,2'N} = 5.4 Hz, 1H, H-1'N), 5.98 (d, J_{1'A,2'A} = 6.7 Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH₂-6A), 7.61 (s, 2H, NH₂-6N), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.35 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 31.0 (C-7'N), 43.8 (C-12A), 51.6 (C-6'N), 56.2 (C-5'N), 59.5 (C-8'N), 62.7 (C-5'A), 71.5 (C-3'A), 72.0 (C-2'A), 72.2 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 74.7 (C-10A), 83.1 (C-4'N), 87.0 (C-4'A), 88.0 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 119.6 (2C, C-5A and C-5N), 134.0 (C-8A), 140.2 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.7 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₂₆H₃₃N₁₁O₈+H]⁺ 628.2568 found 628.2586.

5'-(*N*-isopropyl-*N*-propargylamino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (92**)**



To a solution of **20** (515 mg, 1.5 mmol, 1.0 equiv.) and acetone (333 μ L, 4.5 mmol, 3.0 equiv.), in DCE (45.0 mL) was added NaBH(OAc)₃ (1.26 g, 6.0 mmol, 4.0 equiv.). After 48 hours at room temperature, a second addition of acetone (4.0 equiv.) and NaBH(OAc)₃ (5.0 equiv.) was made. After an additional 18 hours at room temperature, NaHCO₃ sat. solution was added (35 mL) and the crude was extracted twice with DCM (2x 200mL).

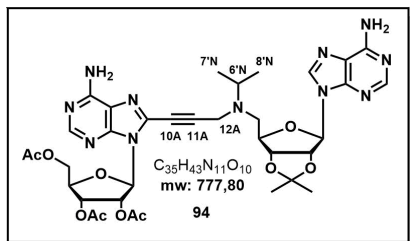
The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (24 g, SiO₂, 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **92** (410 mg, 71%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : 0.87 (d, J_{10',9'} = 6.5 Hz, 3H, CH₃-10'), 0.96 (d, J_{11',9'} = 7.5 Hz, 3H, CH₃-11'), 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.53 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.53 (dd, J_{5',4'} = 6.4 Hz, J_{5'',5'} = 13.4 Hz, 1H, H-5'), 2.74 (dd, J_{5'',5'} = 7.5 Hz, J_{5'',5'} = 13.4 Hz, 1H, H-5''), 2.86 (sept., J = 6.5 Hz, 1H, H-9'), 3.01 (t, J_{8',6'} = 2.3 Hz, 1H, H-8'), 3.35 (ABq d, J_{6',6''} = 17.6 Hz, J_{6',8'} = 2.3 Hz, 2H, H-6'), 4.22 (m, 1H, H-4'), 4.99 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.53 (dd, J_{2',1'} = 2.3 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.15 (d, J_{1',2'} = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 7.31 (br s, 2H, NH₂), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : 19.1 (CH₃ 11'), 20.31 (CH₃ 10'), 25.7 (CH₃ isop.), 27.42 (CH₃ isop.), 39.9 (CH₂-6'), 50.9 (C-5'), 52.3 (C-9'), 75.4 (C-8'), 81.4 (C-7'), 83.2 (C-3'), 83.3 (C-2'), 85.4 (C-4'), 89.8 (C-1'), 113.5 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.7 (C-8), 149.2 (C-4), 153.1 (C-2), 156.6 (C-6).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₂₉H₂₆N₆O₃+H]⁺ 387.2145 found 387.2136

5'-(*N*-isopropyl-*N*-[3-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-amino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (94**)**

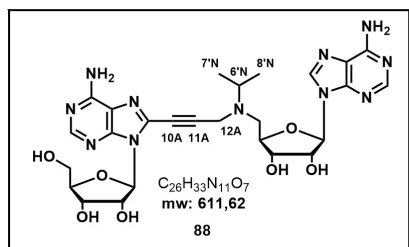


To a solution of bromo derivative **3** (107 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **92** (145 mg, 0.38 mmol, 1.5 equiv.) in THF (2.5 mL) was added NEt₃ (105 µL, 0.75 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (5 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (14 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. The reaction was first stirred 3 hours at 60 °C then 16 hours at room temperature before filtering the crude over celite and removing the volatile. The residue was purified by flash column chromatography (12 g SiO₂, 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield **94** (100 mg, 51%) as a light yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : 0.98 (d, J7'N,6'N = 6.4 Hz, 3H, CH₃-7'N), 1.05 (d, J8'N,6'N = 6.4 Hz, 3H, CH₃-8'N), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.96 (s, 3H, CH₃ OAc), 1.96 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.07 (s, 3H, CH₃ OAc), 2.69 (dd, J5'N,4'N = 6.2 Hz, J5'N,5''N = 13.4 Hz, 1H, H-5'N), 2.88 (dd, J5''N,4'N = 7.8 Hz, J5''N,5'N = 13.4 Hz, 1H, H-5''N), 2.95 (sept., J = 6.4 Hz, 1H, H-6'N), 3.82 (ABq, J = 18.5 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.17 (dd, J5'A,4'A = 5.6 Hz, J5'A,5''A = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 4.28-4.32 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.41 (dd, J5''A,4'A = 3.6 Hz, J5''A,5'A = 12.0 Hz, 1H, H-5''A), 5.03 (dd, J3'N,2'N = 6.2 Hz, J3'N,4'N = 2.7 Hz, 1H, H-3'N), 5.55 (dd, J2'N,1'N = 2.3 Hz, J2'N,3'N = 6.2 Hz, 1H, H-2'N), 5.70 (t app, J = 5.8 Hz, 1H, H-3'A), 6.11 (d, J1'A,2'A = 4.8 Hz, 1H, H-1'A), 6.18 (d, J1'N,2'N = 2.3 Hz, 1H, H-1'N), 6.21 (dd, J2'A,1'A = 4.8 Hz, J2'A,3'A = 5.9 Hz, 1H, H-2'A), 7.31 (br s, 2H, NH₂-6N), 7.56 (br s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2A), 8.19 (s, 1H, H-2N), 8.34 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : 19.6 (CH₃-7'N), 20.5 (2C, CH₃ OAc and CH₃-7'N), 20.7 (CH₃ OAc), 20.9 (CH₃ OAc), 25.6 (CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 40.5 (C-12A), 51.0 (C-5'N), 53.1 (C-6'N), 62.9 (C-5'A), 70.3 (C-3'A), 71.5 (C-2'A), 73.8 (C-10A), 79.7 (C-4'A), 83.2 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 85.0 (C-4'N), 87.2 (C-1'A), 89.9 (C-1'N), 95.2 (C-11A), 113.6 (Cq isop.), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 133.4 (C-8A), 140.8 (C-8N), 149.1 (C-4N), 149.2 (C-4A), 153.1 (C-2A), 154.3 (C-2N), 156.4 (C-6A), 156.6 (C-6N), 169.7 (Cq OAc), 169.8 (Cq OAc), 170.4 (Cq OAc).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₃₅H₄₃N₁₁O₁₀+2H]²⁺ 389.6675 found 389.6689

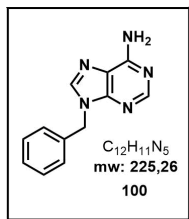
5'-(*N*-isopropyl-*N*-[3-(adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-5'-deoxy-adenosine (88**)**

To a solution of **94** (100 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) in methanol (1.3 mL), was added NH₄OH (28%, 314 μ L, 5.14 mmol, 20 equiv.). After 6 hours at room temperature a second addition of NH₄OH (20 equiv.) was made. After 4 additional hours at room temperature, volatiles were removed and the crude material was brought to 0°C before adding an ice cold solution of TFA (50% in water, 2.6 mL). After 4 hours at room temperature, ice cold water was added (30 mL) and the reaction mixture was lyophilised. The residue was purified by HPLC (10-40% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 9.6 min) to yield fully deprotected compound **88** (76 mg, 95 %) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : 1.06 (d, $J_{7'N,6'N}$ = 6.4 Hz, 3H, CH₃-7'N), 1.08 (d, $J_{8'N,6'N}$ = 6.4 Hz, 3H, CH₃-7'N), 2.79 (dd, $J_{5'N,4'N}$ = 6.4 Hz, $J_{5'N,5''N}$ = 14.0 Hz, 1H, H-5'N), 2.98 (dd, $J_{5''N,4'N}$ = 5.3 Hz, $J_{5''N,5'N}$ = 14.0 Hz, 1H, H-5'N), 3.04 (sept., J = 6.4 Hz, 1H, H-6'N), 3.53 (ddd, $J_{5'A,4'A}$ = 4.0 Hz, $J_{5'A,5''A}$ = 12.3 Hz, $J_{5'A,OH-5'A}$ = 8.6 Hz, 1H, H-5'A), 3.68 (dt, $J_{5''A,4'A}$ = $J_{5''A,OH-5'A}$ = 3.8 Hz, $J_{5''A,5'A}$ = 12.3 Hz, 1H, H-5''A), 3.79 (ABq, J = 18.2 Hz, 2H, CH₂-12A), 3.97-4.00 (m, 1H, H-4'A), 4.01-4.05 (m, 1H, H-4'N), 4.14-4.18 (m, 1H, H-3'N), 4.19-4.22 (m, 1H, H-3'A), 4.71-4.75 (m, 1H, H-2'N), 4.98-5.03 (m, 1H, H-2'A), 5.16 (d, $J_{OH-3'A,H-3'A}$ = 4.2 Hz, 1H, OH-3'A), 5.20 (d, $J_{OH-3'N,H-3'N}$ = 5.2 Hz, 1H, OH-3'N), 5.40 (d, $J_{OH-2'A,H-2'A}$ = 6.2 Hz, 1H, OH-2'A), 5.44 (d, $J_{OH-2'N,H-2'N}$ = 6.0 Hz, 1H, OH-2'N), 5.54 (dd, $J_{OH-5'A,H-5'A}$ = 8.6 Hz, $J_{OH-5'N,H-5'N}$ = 3.8 Hz, 1H, OH-5'A), 5.89 (d, $J_{1'N,2'N}$ = 5.6 Hz, 1H, H-1'N), 5.96 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 6.7 Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH₂-6N), 7.60 (br s, 2H, NH₂-6A), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.16 (s, 1H, H-2N), 8.37 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : 19.6 (CH₃-7'N), 20.4 (CH₃-8'N), 41.1 (C-12A), 51.6 (C-5'N), 52.6 (C-6'N), 62.7 (C-5'A), 71.6 (C-3'A), 72.0 (2C, C-3'N and C-2'A), 72.9 (C-2'N), 74.1 (C-10A), 83.8 (C-4'N), 87.0 (C-4'A), 87.9 (C-1'N), 89.9 (C-1'A), 94.8 (C-11A), 119.7 (2C, C-5A and C-5N), 134.1 (C-8A), 140.3 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.6 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₂₆H₃₃N₁₁O₇+H]⁺ 612.2637 found 612.2628

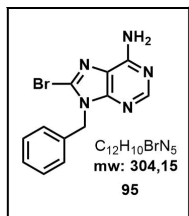
9-Benzyl-adenine (100)

A suspension of adenine (675 mg, 5.0 mmol, 1.0 equiv.) and K_2CO_3 (828 mg, 6.0 mmol, 1.2 equiv.) in DMF (50.0 mL) was stirred 1,5 hours at room temperature before being cooled down to 0°C and adding benzyl bromide (712 μ L, 60. mL, 1.2 equiv.). After 2 hours at room temperature, volatiles were removed and the crude residue was purified by flash column chromatography (65 g SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield **100** (667 mg, 59%) as a white solid.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 5.37 (s, 2H, CH_2 -Bn), 7.23 (s, 2H, NH_2 -6), 7.26-7.36 (m, 5H, CH Bn), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.25 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 46.6 (CH_2 -Bn), 119.2 (C-5), 128.0 (2C, CH-Bn-O), 128.2 (CH-Bn-P), 129.1 (2C, CH-Bn-M), 137.6 (Cq Bn), 141.2 (C-8), 150.0 (C-4), 153.1 (C-2), 156.5 (C-6).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[C_{12}H_{11}N_5+H]^+$ 226.1093 found 226.1088.

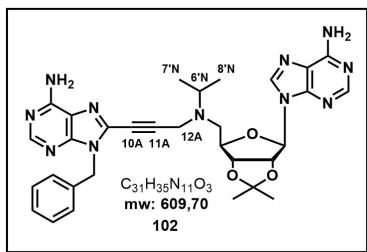
9-Benzyl-8-bromo-adenine (95)

To a solution of **100** (606 mg, 2.7 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-Dioxane (25.6 mL) and sodium acetate buffer (14.8 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (276 μ L, 5.4 mmol, 2.0 equiv.) dropwise. After 4 hours at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$. After full discoloration $NaHCO_3$ sat. solution was added (100 mL) and the aqueous layer was extracted twice with DCM (2x 100 mL). The combined organic layer were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (30 g SiO_2 , 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **95** (367 mg, 45%) as a pale yellow foam and the 9-benzyl-8-thio-adenine (93 mg, 13%).

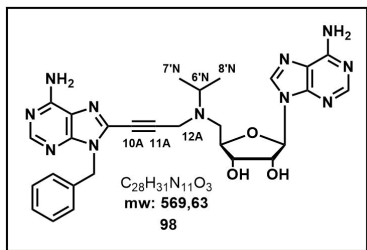
1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 5.36 (s, 2H, CH_2 -Bn), 7.22-7.37 (m, 5H, 5x CH Bn), 7.43 (s, 2H, NH_2 -6), 8.17 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 47.1 (CH_2 -Bn), 119.5 (C-5), 126.9 (C-8), 127.6 (2C, CH-Bn-O), 128.3 (CH-Bn-P), 129.2 (2C, CH-Bn-M), 136.4 (Cq Bn), 151.4 (C-4), 153.6 (C-2), 155.3 (C-6).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[C_{12}H_{10}^{79}BrN_5+H]^+$ 304.0198 found 304.0202.

5'-(*N*-isopropyl-*N*-[3-(9-benzyl-adenine-8-yl)prop-2-yn-1yl]amino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (102**)**

To a solution of bromo derivative **95** (61 mg, 0.2 mmol, 1.0 equiv.) and alkyne **92** (116 mg, 0.3 mmol, 1.5 equiv.) in THF (2.0 mL) was added NEt₃ (84 µL, 0.6 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (4 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (12 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 16 hours at 60 °C, a second addition of alkyne **92** (0.6 equiv.) and Pd(PPh₃)₄ (5 mol%) was made. After an additional 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (21 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to obtain a mixture of **102** along with the corresponding homocoupling product as a light yellow foam (86 mg, 35 % of the mass is the coupling product by NMR estimation). The yield will be calculated in two steps after the deprotection step.

5'-(*N*-isopropyl-*N*-[3-(9-benzyl-adenine-8-yl)prop-2-yn-1yl]amino)-5'-deoxy-adenosine (98**)**

A mixture of **102** and the corresponding homocoupling product (86 mg) was dissolved in an ice cold TFA solution (50% in water, 5.0 mL). After 6 hours at room temperature, the crude was transferred dropwise into ice-cold water (20 mL) before being lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC (25-35% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 9.8 min) to yield fully deprotected compound **98** (26 mg, 23% from **95** in two steps) as a white foam.

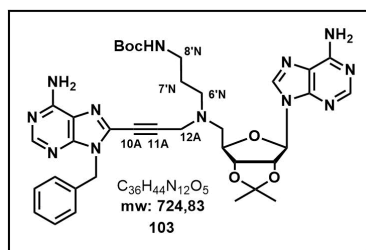
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.97-1.00 (m, 6H, CH₃-7'N and CH₃-8'N), 2.71 (dd, J_{5'N,4'N} = 6.4 Hz, J_{5'N,5''N} = 14.0 Hz, 1H, H-5'N), 2.85-2.92 (m, 2H, H-5''N and H-6'), 3.75 (s, 2H, CH₂-12A), 3.98-4.02 (m, 1H, H-4'N), 4.12-4.17 (m, 1H, H-3'N), 4.69-4.74 (m, 1H, H-2'N), 5.22 (s, 1H, OH-3'N), 5.34 (s, 2H, CH₂-Bn), 5.48 (s, 1H, OH-2'N), 5.88 (d, J_{1'N,2'N} = 5.4 Hz, 1H, H-1'N), 7.20-7.29 (m, 7H, NH₂-6N, 5x CH Bn), 7.44 (s, 2H, NH₂-6A), 8.14 (s, 1H, H-2A), 8.18 (s, 1H, H-2N), 8.35 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 19.7 (CH₃-7'N), 20.41 (CH₃-8'N), 41.1 (CH₂-12A), 46.5 (CH₂-Bn), 51.6 (C-5'N), 52.5 (C-6'N), 72.0 (C-3'N), 72.9 (C-2'N), 74.4 (C-11A), 83.8

(C-4'N), 88.1 (C-1'N), 94.6 (C-10A), 118.9 (C-5A), 119.7 (C-5N), 127.7 (2C, CH-Bn-O), 128.1 (CH-Bn-P), 129.0 (2C, CH-Bn-M), 133.6 (C-8A), 136.9 (Cq-Bn), 140.4 (C-8N), 149.7 (C-4N), 149.9 (C-4A), 153.1 (C-2A), 154.3 (C-2N), 156.3 (C-6N), 156.5 (C-6A).

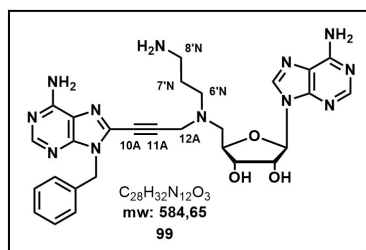
HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₂₈H₃₁N₁₁O₃+2H]²⁺ 285.6384 found 285.6384.

5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-*N*-[3-(9-benzyl-adenine-8-yl)prop-2-yn-1yl]-amino)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (103**)**



To a solution of bromo derivative **95** (80 mg, 0.26 mmol, 1.2 equiv.) and alkyne **24** (110 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv.) in THF (3.0 mL) was added NEt₃ (92 μ L, 0.66 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (4 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (12 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to obtain a mixture of **103** along with the corresponding homocoupling product (80 mg) as a light yellow foam. Yield will be calculated in two steps after the deprotection step.

5'-(*N*-(3-amino)propyl-*N*-[3-(9-benzyl-adenine-8-yl)prop-2-yn-1yl]amino)-5'-deoxy-adenosine (99**)**



A mixture of **103** and the corresponding homocoupling product (80 mg) was dissolved in an ice cold TFA solution (50% in water, 2.0 mL). After 6.5 hours at room temperature, the crude was transferred dropwise into ice-cold water (20 mL) before being lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC (10-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 8.6 min) to yield fully deprotected compound **99** (16 mg, 12% from **24** in two steps) as a white foam.

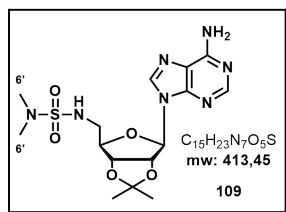
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.54-1.61 (m, 2H, H-7'N), 2.49-2.54 (m, 2H, H-6'N), 2.62-2.68 (m, 2H, H-8'N), 2.72 (dd, J_{5'N,4'N} = 7.0 Hz, J_{5'N,5'N} = 13.6 Hz, 1H, H-5'N), 2.81 (dd, J_{5'N,4'N} = 4.8 Hz, J_{5'N,5'N} = 13.6 Hz, 1H, H-5'N), 3.78 (s, 2H, CH₂-12A), 4.00-4.04 (m, 1H, H-4'N), 4.12 (dd, J_{3'N,2'N} = 5.2 Hz, J_{3'N,4'N} = 4.5 Hz, 1H, H-3'N), 4.68 (t app, J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.2 Hz, 1H, H-2'N), 5.35 (s, 2H, CH₂-Bn), 5.88 (d, J_{1'N,2'N} = 5.2 Hz, 1H, H-1'N), 7.20-7.30 (m, 7H, 5x CH Bn and

NH₂-6N), 7.45 (s, 2H, NH₂-6A), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.19 (s, 1H, H-2N), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 28.2 (CH₂-7'N), 38.7 (CH₂-8'N), 43.4 (CH₂-12A), 46.5 (CH₂-Bn), 51.6 (CH₂-6'N), 56.7 (CH₂-5'N), 72.2 (CH-3'N), 73.0 (C-2'N), 75.2 (C-10A), 83.0 (CH-4'N), 88.3 (C-11A), 118.9 (C-5A), 119.7 (C-5N), 127.7 (2C, CH-Bn-O), 128.1 (CH-Bn-P), 129.1 (2C, CH-Bn-M), 133.5 (Cq Bn), 136.9 (C-8A), 140.3 (C-8N), 149.8 (C-4N), 149.9 (C-4A), 153.1 (C-2A), 154.3 (C-2N), 156.3 (C-6N), 156.6 (C-6A).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₂₈H₃₂N₁₂O₃+H]⁺ 585.2793 found 585.2783.

5'-Deoxy-5'-((*N,N*-dimethylsulfamoyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (109)



To a solution of **26** (250 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.) and NEt₃ (128 μL, 0.92 mmol, 1.13 equiv.), in DMF (7.7 mL), was added *N,N*-Dimethylsulfamoyl chloride (100 μL, 0.92 mmol, 1.13 equiv.). After 18 hours at room temperature, the reaction was diluted with water (100 mL) and extracted twice with DCM (2x 100 mL). The combined organic layer were dried over

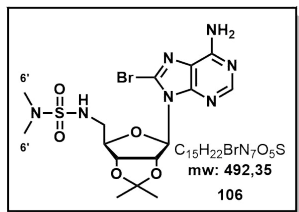
Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (12 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **109** (238 mg, 71%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.58 (s, 6H, 2x CH₃-6'), 3.10-3.17 (m, 1H, H-5'), 3.22-3.28 (m, 1H, H-5''), 4.22-4.27 (m, 1H, H-4'), 5.02 (dd, J_{3',2'} = 6.2 Hz, J_{3',4'} = 2.5 Hz, 1H, H-3'), 5.42 (dd, J_{2',1'} = 2.2 Hz, J_{2',3'} = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 6.16 (d, J_{1',2'} = 2.2 Hz, 1H, H-1'), 7.36 (br s, 2H, NH₂-6), 7.69 (br t, 1H, NH-5'), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.7 (CH₃ isop.), 37.5 (CH₃ isop.), 37.9 (2C, C-6'), 45.3 (C-5'), 82.2 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.8 (C-4'), 90.1 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 140.7 (C-8), 149.0 (C-4), 153.1 (C-2), 156.7 (C-6).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₁₅H₂₃N₇O₅S+H]⁺ 414.1554 found 414.1545.

5'-Deoxy-5'-((*N,N*-dimethylsulfamoyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-8-bromoadenosine (106**)**



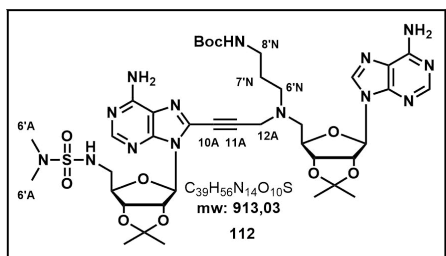
To a solution of **109** (230 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-Dioxane (2.1 mL) and sodium acetate buffer (6.2 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (67 μ L, 1.3 mmol, 2.3 equiv.) dropwise. After 2.5 hours at room temperature, the reaction was cooled down to 0°C and was quenched by adding a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (10 mL). After full discoloration, the aqueous layer was extracted twice with DCM (2x 50 mL). The combined organic layer were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (16 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **106** (225 mg, 82%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.54 (s, 6H, 2x CH₃-6'), 3.04-3.11 (m, 1H, H-5'), 3.18-3.25 (m, 1H, H-5''), 4.26 (td, J_{4',3'} = 2.8 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.2 Hz, 1H, H-4'), 5.09 (dd, J_{3',2'} = 6.2 Hz, J_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.66 (dd, J_{2',3'} = 6.2 Hz, J_{2',1'} = 2.3 Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, J_{1',2'} = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 7.53-7.60 (m, 3H, NH-5' and NH₂-6), 8.15 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25.6 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 37.9 (2C, C-6'), 45.1 (C-5'), 82.5 (C-3'), 82.8 (C-2'), 85.9 (C-4'), 91.7 (C-1'), 113.8 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.8 (C-8), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₁₅H₂₂⁷⁹BrN₇O₅S+H]⁺ 492.0639 found 492.0655

5'-Deoxy-5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-*N*-[3-(5'-deoxy-5'-((*N,N*-dimethylsulfamoyl)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (112**)**



To a solution of alkyne **24** (150 mg, 0.30 mmol, 1.0 equiv) and bromo derivative **106** (221 mg, 0.45 mmol, 1.5 equiv) in THF (3.0 mL) was added triethylamine (125 μ L, 0.90 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (6 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 18 hours at 60 °C, the reaction was brought back to room temperature and a second addition of Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 5 mol%) was made. The reaction mixture was then degasses with argon for 15 minutes. After 5 hours at

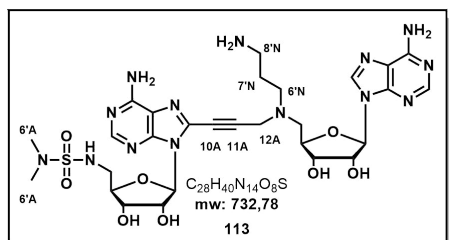
60 °C volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (16 g SiO₂, 0-6% methanol in dichloromethane) to yield the coupling product **112** (42 mg, 14%) along with the homocoupling product (104 mg, 69%) as pale orange foams.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.37 (s, 3H, CH₃ isop.) 1.41 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.45 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.57 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.63 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.62-1.68 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.65 (t, J_{6'N,7'N} = 6.5 Hz, 2H, CH₂-6'N), 2.75 (s, 6H, 2x CH₃-6'A), 2.86-2.91 (m, 2H, CH₂-5'N), 3.12-3.25 (m, 2H, CH₂-8'N), 3.39 (dt, J_{5'A,4'A} = 2.4 Hz, J_{5'A,5''A} = 13.2 Hz, J_{5'A,NH5'A} = 2.4 Hz, 1H, H-5'A), 3.47 (ddd, J_{5''A,4'A} = 3.6 Hz, J_{5''A,5'A} = 13.2 Hz, J_{5''A,NH5'A} = 8.3 Hz, 1H, H-5''A), 3.70 (s, 2H, CH₂-12A), 4.41 (td, J_{4'N,3'N} = 3.3 Hz, J_{4'N,5'N} = 6.6 Hz, 1H, H-4'N), 4.50-4.53 (m, 1H, H-4'A), 5.05-5.11 (br s, 1H, H-3'N), 5.13 (dd, J_{3'A,2'A} = 6.3 Hz, J_{3'A,4'A} = 2.4 Hz, 1H, H-3'A), 5.35 (dd, J_{2'A,1'A} = 4.2 Hz, J_{2'A,3'A} = 6.3 Hz, 1H, H-2'A), 5.52-5.55 (m, 1H, H-2'N), 6.12 (d, J_{1'N,2'N} = 1.8 Hz, 1H, H-1'N), 6.14 (d, J_{1'A,2'A} = 4.2 Hz, 1H, H-1'A), 6.18 (br s, 2H, NH₂-6N), 6.50 (br s, 1H, NH-8'N), 7.98 (s, 1H, H-8N), 8.30 (s, 1H, H-2N), 8.40 (s, 1H, H-2A), 8.59 (dd, J_{NH5'A,5'A} = 2.4 Hz, J_{NH5'A,5''A} = 8.3 Hz, 1H, NH-5'A).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 25.3 (CH₃ isop.), 25.4 (CH₃ isop.), 27.1 (CH₃ isop.), 27.3 (C-7'N), 27.5 (CH₃ isop.), 28.5 (3C, CH₃ Boc), 37.9 (2C, C-6'A), 38.4 (C-8'N), 43.56 (C-12A), 45.4 (C-5'A), 51.6 (C-6'N), 55.8 (C-5'N), 73.8 (C-10A), 79.1 (Cq *t*Bu), 81.6 (C-3'A), 82.8 (2'A), 83.2 (C-3'N), 83.9 (C-4'A), 84.0 (C-2'N), 86.1 (C-4'N), 91.0 (C-1'N), 91.7 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 114.4 (Cq isop.), 114.5 (Cq isop.), 119.8 (C-5A), 120.2 (C-5N), 133.8 (C-8A), 140.1 (C-8N), 148.3 (C-4A), 149.1 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.9 (C-2A), 155.7 (2C, C-6A and C-6N), 156.2 (Cq carbamate).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₃₉H₅₆N₁₄O₁₀S+H]⁺ 913.40973 found 913.4114.

5'-deoxy-5'-(*N*-(3-amino)propyl-*N*-[3-(5'-deoxy-5'-((*N,N*-dimethylsulfamoyl)-amino)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-adenosine (113**)**



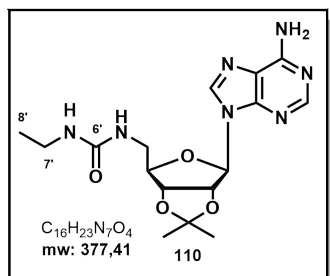
Compound **112** (64 mg, 0.08 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in an ice cold solution of TFA (50% in water, 0.8 mL). After 3 hours at room temperature, the crude was transferred dropwise into ice-cold water (50 mL) before being lyophilised. The residue was purified by HPLC (10-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 7.4 min) to yield fully deprotected compound **113** (22.6 mg, 45%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 1.65 (quint., $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-7''N}$), 2.63-2.68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-6''N}$), 2.66 (s, 6H, 2x $\text{CH}_3\text{-6'A}$), 2.70 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-8''N}$), 2.80 (dd, $J_{5'\text{N},4'\text{N}} = 7.0$ Hz, $J_{5'\text{N},5''\text{N}} = 13.5$ Hz, 1H, H-5'N), 2.90 (dd, $J_{5''\text{N},4'\text{N}} = 4.8$ Hz, $J_{5''\text{N},5'\text{N}} = 13.5$ Hz, 1H, H-5''N), 3.20 (dd, $J_{5'\text{A},4'\text{A}} = 4.3$ Hz, $J_{5'\text{A},5''\text{A}} = 13.4$ Hz, 1H, H-5'A), 3.31 (dd, $J_{5''\text{A},4'\text{A}} = 4.3$ Hz, $J_{5''\text{A},5'\text{A}} = 13.5$ Hz, 1H, H-5''A), 3.81 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-12A}$), 4.03-4.08 (m, 1H, H-4'N), 4.08-4.12 (m, 1H, H-4'A), 4.15 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-3'N), 4.22 (dd, $J_{3'\text{A},2'\text{A}} = 5.3$ Hz, $J_{3'\text{A},4'\text{A}} = 2.3$ Hz, 1H, H-3'A), 4.68 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-2'N), 4.99 (dd, $J_{2'\text{A},1'\text{A}} = 6.7$ Hz, $J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 5.4$ Hz, 1H, H-2'A), 5.89 (d, $J_{1'\text{N},2'\text{N}} = 5.3$ Hz, 1H, H-1'N), 5.99 (d, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{-6N}$), 7.64 (s, 2H, $\text{NH}_2\text{-6A}$), 8.16 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.35 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 28.1 (C-7'N), 38.1 (2C, C-6'A), 38.8 (C-8'N), 43.6 (C-12A), 45.6 (C-5'A), 51.7 (C-6'N), 56.2 (C-5'N), 71.7 (C-3'A), 71.8 (C-2'A), 72.2 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 74.7 (C-10A), 83.0 (C-4'N), 84.7 (C-4'A), 88.1 (C-1'N); 90.0 (C-1'A), 93.1 (C-11A), 119.7 (2C, C-5A and C-5N), 133.9 (C-8A), 140.3 (C-8N), 148.7 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.6 (C-2A), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-6A).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_{14}\text{O}_8\text{S}+\text{H}]^+$ 733.2947 found 733.2948.

5'-deoxy-5'-(3-ethylureido)-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (**110**)



A solution of **26** (250 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (7.5 mL), was cooled down to 0°C before adding ethyl isocyanate (96 μL , 0.89 mmol, 2.2 equiv) dropwise. After 1 hour at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (15 g SiO_2 , 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield the coupling product **110** (309 mg, quant. yield) as a white foam.

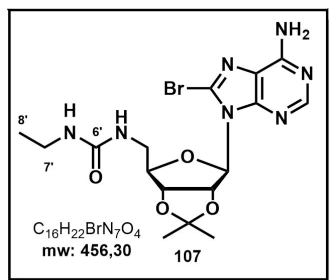
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 0.97 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-7'}$), 1.32 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.53 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.0 (qd, $J_{7'\text{N},\text{NH}_2\text{-6'}} = 5.7$ Hz, $J_{7'\text{N},8'} = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-7'}$), 3.17 (dt, $J_{5',5''} = 13.7$ Hz, $J_{5',4'} = J_{5'\text{N},\text{NH}_5'} = 6.1$ Hz, 1H, H-5'), 3.26-3.34 (m, 1H, H-5''), 4.13 (td, $J_{4',3'} = 3.1$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.3$ Hz, 1H, H-4'), 4.19 (dd, $J_{3',4'} = 3.1$ Hz, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.44 (dd, $J_{2',1'} = 2.9$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.83 (t, $J_{\text{NH}_2\text{-6'},7'} = 5.6$ Hz, 1H, NH-6'), 6.01 (t, $J_{\text{NH-5'},5'} = 5.9$ Hz, 1H NH-5'), 6.12 (d, $J_{1',2'} = 2.9$ Hz, 1H, H-1'), 7.32 (brs, 2H, $\text{NH}_2\text{-6}$), 8.18 (d, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 16.1 (C-8'), 25.7 (CH_3 isop.), 27.49 (CH_3 isop.), 34.6

(C-7'), 42.0 (C-5'), 82.2 (C-3'), 83.4 (C-2'), 85.5 (C-4'), 89.3 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.6 (C-5), 140.3 (C-8), 149.4 (C-4), 153.3 (C-2), 156.6 (C-6), 158.3 (C-6').

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₁₆H₂₃N₇O₄+H]⁺ 378.1884 found 378.1881.

5'-Deoxy-5'-(3-ethylureido)-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (**107**)



To a solution of **110** (301 mg, 0.80 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-Dioxane (7.5 mL) and sodium acetate buffer (4.5 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (95 μ L, 1.8 mmol, 2.3 equiv.) dropwise. After 1.5 hour at room temperature, the reaction was cooled down to 0°C and was quenched by adding a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ (50 mL). After full discoloration, the aqueous layer was extracted twice with DCM (2x 100 mL). The combined organic layer

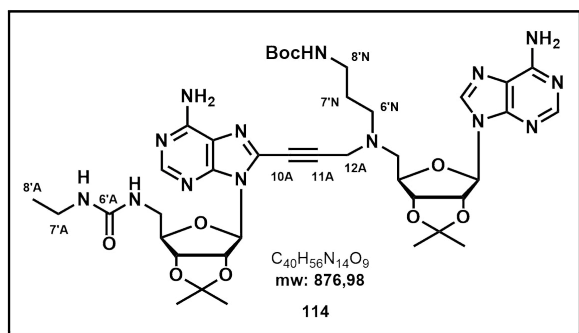
were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (14 g SiO₂, 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **107** (184 mg, 54%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 0.56 (t, J_{8',7'} = 7.2 Hz, 3H, CH₃-8'), 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.98 (qd, J_{7',NH6'} = 5.6 Hz, J_{7',8'} = 7.2 Hz, 2H, CH₂-7'), 3.12 (ddd, J_{5',4'} = 6.8 Hz, J_{5',5''} = 12.7 Hz, J_{5',NH5'} = 5.7 Hz, 1H, H-5'), 3.26-3.35 (m, 1H, H-5''), 4.12 (td, J_{4',3'} = 3.3 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.7 Hz, 1H, H-4'), 5.01 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 3.3 Hz, 1H, H-3'), 5.69 (dd, J_{2',1'} = 2.4 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 5.76 (t, J_{NH6'-7'} = 5.6 Hz, 1H, NH-6'), 5.99 (t, J_{NH5',5''} = J_{NH5',5''} = 5.8 Hz, 1H, NH-5'), 6.03 (d, J_{1',2'} = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 7.51 (br s, 2H, NH₂-6), 8.17 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 16.1 (C-8'), 25.7 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 34.5 (C-7'), 41.8 (C-5'), 82.4 (C-3'), 82.7 (C-2'), 86.4 (C-4'), 90.9 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 126.7 (C-8), 150.4 (C-4), 153.4 (C-2), 155.5 (C-6), 158.2 (C-6').

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for [C₁₆H₂₂⁷⁹BrN₇O₄+H]⁺ 456.0994 found 456.0994.

5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-5'-deoxy-[3-(5'-deoxy-5'-(3-ethylureido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (114)



To a solution of alkyne **24** (167 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv) and bromo derivative **107** (184 mg, 0.40 mmol, 1.2 equiv) in THF (3.3 mL) was added triethylamine (139 μ L, 1.00 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (6 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (19 mg, 5 mol%) followed

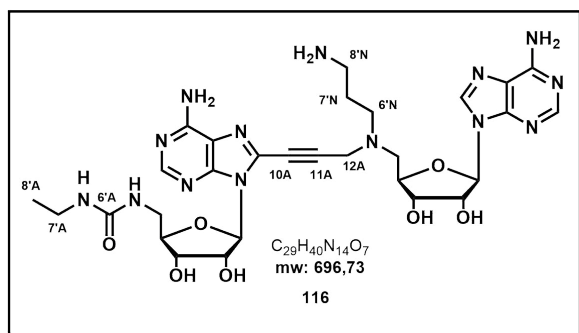
by a second 15 minutes argon degassing. After 18 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield the coupling product **114** (94 mg, 32%).

¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃-8'A), 1.27 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.44 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.51-1.58 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.51-2.56 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.66 (dd, *J*_{5'N,4'N} = 6.1 Hz, *J*_{5'N,5''N} = 13.0 Hz, 1H, H-5'N), 2.82 (dd, *J*_{5''N,4'N} = 7.8 Hz, *J*_{5''N,5'N} = 13.0 Hz, 1H, H-5''N), 2.90-3.02 (m, 4H, CH₂-7'A and CH₂-8'N), 3.15 (dt, *J*_{5'A,4'A} = *J*_{5'A,NH5'A} = 6.1 Hz, *J*_{5'A,5''A} = 13.8 Hz, 1H, H-5'A), 3.32-3.40 (m, 1H, H-5''A), 3.84 (ABq, *J* = 18.5 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.10 (td, *J*_{4'A,3'A} = 3.4 Hz, *J*_{4'A,5'A} = *J*_{4'A,5''A} = 6.2 Hz, 1H, H-4'A), 4.29-4.34 (m, 1H, H-4'N), 4.95 (dd, *J*_{3'A,2'A} = 6.4 Hz, *J*_{3'A,4'A} = 3.4 Hz, 1H, H-3'A), 5.03 (dd, *J*_{3'N,4'N} = 2.7 Hz, *J*_{3'N,2'N} = 6.2 Hz, 1H, H-3'N), 5.50 (dd, *J*_{2'N,1'N} = 2.4 Hz, *J*_{2'N,3'N} = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.58 (dd, *J*_{2'A,1'A} = 2.8 Hz, *J*_{2'A,3'A} = 6.4 Hz, 1H, H-2'A), 5.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH-6'A), 5.99 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH-5'A), 6.11 (d, *J*_{1'A,2'A} = 2.7 Hz, 1H, H-1'A), 6.16 (d, *J*_{1'N,2'N} = 2.4 Hz, 1H, H-1'N), 6.72-6.78 (br t, 1H, NH-8'N), 7.30 (s, 2H, NH₂-6N), 7.54 (s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.20 (s, 1H, H-2A), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.0 (C-8'A), 25.7 (2C, CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 27.9 (C-7'N), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 34.5 (C-7'A), 38.3 (C-8'N), 41.9 (C-5'A), 43.2 (C-12A), 51.8 (C-6'N), 55.4 (C-5'N), 74.7 (C-10A), 77.9 (Cq *t*Bu), 82.4 (C-3'A), 82.7 (C-2'A), 83.3 (C-3'N), 83.5 (C-2'N), 84.4 (C-4'N), 86.0 (C-4'A), 89.7 (C-1'N), 90.0 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 113.8 (Cq isop.), 113.9 (Cq isop.), 119.2 (C-5A), 119.7 (C-5N), 133.0 (C-8A), 140.5 (C-8N), 148.8 (C-4A), 149.2 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.3 (C-2A), 156.1 (Cq carbamate), 156.4 (C-6N), 156.6 (C-6A), 158.3 (C-6'A).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[C_{40}H_{56}N_{14}O_9+H]^+$ 877.4427 found 877.4430.

5'-(*N*-(3-amino)propyl-5'-deoxy-[3-(5'-deoxy-5'-(3-ethylureido)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-adenosine (116)



Compound **114** (94 mg, 0.11 mmol, 1.0 equiv) was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (50% in water, 2.2 mL). After 5 hours at room temperature, the crude was transferred dropwise into ice-cold water (30 mL) before being lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC (5-40% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer,

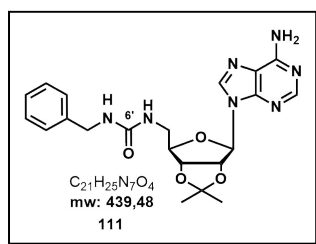
linear gradient over 15 min, $t_R = 8.1$ min) to yield fully deprotected compound **116** (39 mg, 52%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 0.96 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃-8'A), 1.63 (quint., $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-7'N), 2.64 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-6'N), 2.68 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-8'N), 2.80 (dd, $J_{5'N,4'N} = 6.8$ Hz, $J_{5'N,5''N} = 13.7$ Hz, 1H, H-5'N), 2.90 (dd, $J_{5''N,4'N} = 4.7$ Hz, $J_{5''N,5'N} = 13.6$ Hz, 1H, H-5''N), 2.96-3.03 (m, 2H, CH₂-7'A), 3.24 (dt, $J_{5'A,4'A} = J_{5'A,NH5'A} = 5.9$ Hz, $J_{5'A,5''A} = 13.7$ Hz, 1H, H-5'A), 3.43 (dt, $J_{5''A,4'A} = J_{5''A,NH5'A} = 5.7$ Hz, $J_{5''A,5'A} = 13.8$ Hz, 1H, H-5''A), 3.81 (s, 2H, CH₂-12A), 3.88-3.93 (m, 1H, H-4'A), 4.03-4.08 (m, 1H, H-4'N), 4.14 (t app, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-3'N), 4.18 (dd, $J_{3'A,2'A} = 5.2$ Hz, $J_{3'A,4'A} = 3.2$ Hz, 1H, H-3'A), 4.68 (t, $J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'N), 5.10 (dd, $J_{2'A,1'A} = 6.3$ Hz, $J_{2'A,3'A} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'A), 5.86 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH-6'A), 5.89 (d, $J_{1'N,2'N} = 5.3$ Hz, 1H, H-1'N), 5.98 (d, $J_{1'A,2'A} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'A), 6.14 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH-5'A), 7.25 (s, 2H, NH₂-6N), 7.52 (s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.22 (s, 1H, H-2A), 8.36 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 16.1 (C-8'A), 28.7 (C-7'N), 34.6 (C-7'A), 39.0 (C-8'N), 42.2 (C-5'A), 43.7 (C-12A), 51.8 (C-6'N), 56.3 (C-5'N), 71.5 (C-2'A), 71.7 (C-3'A), 72.2 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 75.0 (C-10A), 83.0 (C-4'N), 84.9 (C-4'A), 88.1 (C-1'N), 89.5 (C-1'A), 92.9 (C-11A), 119.5 (C-5N), 119.6 (C-5A), 133.9 (C-8A), 140.3 (C-8N), 149.3 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 154.1 (C-2A), 156.4 (C-6A), 156.5 (C-6N), 158.4 (C-6'A).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[C_{29}H_{40}N_{14}O_7+H]^+$ 697.3277 found 697.3272.

5'-Deoxy-5'-(3-benzylureido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (111)

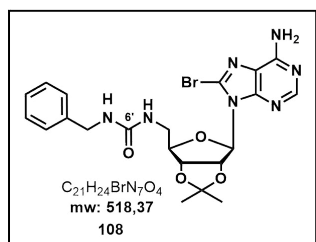


A solution of **26** (243 mg, 0.75 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (7.5 mL), was cooled down to 0°C before adding benzyl isocyanate (110 μ L, 0.89 mmol, 1.2 equiv) dropwise. After 40 minutes at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (35 g SiO_2 , 3% to 4.5% methanol in dichloromethane) to yield the coupling product **111** (321 mg, 91%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 1.32 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.19-3.26 (m, 1H, H-5'), 3.32-3.39 (m, 1H, H-5''), 4.16 (td, $J_{4',3'} = 3.0$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.3$ Hz, 1H, H-4'), 4.21 (d, $J_{7'-NH6'} = 6.0$ Hz, 2H, CH_2 -Bn), 4.94 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.44 (dd, $J_{2',1'} = 2.9$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.13 (d, $J_{1',2'} = 2.9$ Hz, 1H, H-1'), 6.19 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH-5'), 6.39 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH-6'), 7.18-7.24 (m, 3H, 2x CH -9' and CH -11'), 7.27-7.31 (m, 2H, 2x CH -10'), 7.33 (br s, 2H, NH_2 -6), 8.18 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) : δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 42.0 (C-5'), 43.4 (CH_2 -Bn), 82.2 (C-3'), 83.4 (C-2'), 85.4 (C-4'), 89.3 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 127 (CH-P-Bn), 127.4 (2C, CH-M-Bn), 128.6 (2C, CH-O-Bn), 140.3 (C-8), 141.2 (Cq-Bn), 149.4 (C-4), 153.3 (C-2), 156.6 (C-6), 158.5 (C-6').

5'-Deoxy-5'-(3-benzylureido)-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (**108**)



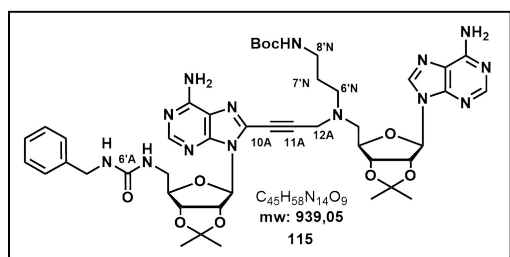
To a solution of **111** (298 mg, 0.68 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-Dioxane (6.8 mL) and sodium acetate buffer (4.1 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (87 μ L, 1.7 mmol, 2.5 equiv.) dropwise. After 1.5 hour at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (50 mL). After full discoloration, water was added and the aqueous layer was extracted twice with AcOEt (2x 100 mL). The organic layer were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **108** (291 mg, 79%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.15-3.22 (m, 1H, H-5'), 3.33-3.40 (m, 1H, H-5''), 4.16 (td, J_{4',3'} = 3.5 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.3 Hz, 1H, H-4'), 4.19 (d, J_{7',NH-6'} = 6.0 Hz, 2H, CH₂-Bn), 5.03 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 5.69 (dd, J_{2',1'} = 2.4 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, J_{1',2'} = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 6.14 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH-5'), 6.32 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH-6'), 7.18-7.23 (m, 3H, 2x CH-O-Bn and CH-P-Bn), 7.27-7.31 (m, 2H, CH-M-Bn), 7.51 (brs, 2H, NH₂-6), 8.17 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 41.9 (C-5'), 43.4 (CH₂-Bn), 82.4 (C-3'), 82.7 (C-2'), 86.3 (C-4'), 90.9 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 126.6 (C-8), 127.0 (CH-P-Bn), 127.4 (2C, CH-O-Bn), 128.6 (2C, CH-M-Bn), 141.3 (Cq-Bn), 150.4 (C-4), 153.5 (C-2), 155.5 (C-6), 158.4 (C-6').

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₂₁H₂₄⁷⁹BrN₇O₄+H]⁺ 518.1146 found 518.1138.

5'-Deoxy-5'-(*N*-(3-*N*-Boc-amino)propyl-*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(3-benzylureido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (115)



To a solution of alkyne **24** (180 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv) and bromo derivative **108** (279 mg, 0.54 mmol, 1.5 equiv) in THF (3.6 mL) was added triethylamine (150 μ L, 1.08 mmol, 3.0 equiv). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (7 mg, 10 mol%) and

Pd(PPh₃)₄ (21 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 8 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield the coupling product **115** (159 mg, 47%) as a pale orange foam.

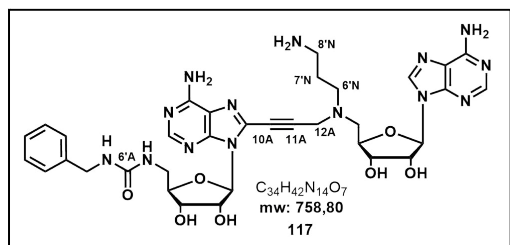
¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.27 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.36 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.45 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.51-1.59 (m, 5H, CH₃ isop and CH₂ 7'N), 2.52-2.57 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.66 (dd, J_{5'N,4'N} = 6.1 Hz, J_{5'N,5''N} = 13.0 Hz, 1H, H-5'N), 2.82 (dd, J_{5'N,4'N} = 7.9 Hz, J_{5'N,5'N} = 13.0 Hz, 1H, H-5'N), 2.88-2.98 (m, 2H, CH₂-8'N), 3.21 (dt, J_{5'A,4'A} = J_{5'A,NH5'A} = 6.0 Hz, J_{5'A,5''A} = 13.8 Hz, 1H, H-5'A), 3.40 (dt, J_{5'A,4'A} = J_{5'A,NH5'A} = 6.3 Hz, J_{5'A,5'A} = 13.0 Hz, 1H, H-5'A), 3.84 (ABq, J = 18.4 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.13 (td, J_{4'A,3'A} = 3.4 Hz, J_{4'A,5'A} = J_{4'A,5''A} = 6.3 Hz, 1H, H-4'A), 4.20 (d, J_{7'A,NH6'A} = 6.0 Hz, 2H, CH₂-Bn), 4.29-4.35 (m, 1H, H-4'N), 4.97 (dd, J_{3'A,2'A} = 6.4 Hz, J_{3'A,4'A} = 3.4 Hz, 1H, H-3'A), 5.03 (dd, J_{3'N,2'N}

= 6.2 Hz, J3'N,4'N = 2.8 Hz, 1H, H-3'N), 5.50 (dd, J2'N,1'N = 2.5 Hz, J2'N,3'N = 6.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.58 (dd, J2'A,1'A = 2.7 Hz, J2'A,3'A = 6.4 Hz, 1H, H-2'A), 6.12 (d, J1'A,2'A = 2.8 Hz, 1H, H-1'A), 6.16 (d, J1'N,2'N = 2.5 Hz, 1H, H-1'N), 6.20 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH-5'A), 6.35 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NH-6'A), 6.72-6.78 (br t, 1H, NH-8'N), 7.19-7.24 (m, 3H, 2x CH-O-Bn and CH-P-Bn), 7.26-7.32 (m, 4H, 2x CH-M-Bn and NH₂-6N), 7.54 (s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.19 (s, 1H, H-2A), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25.7 (2C, CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 27.9 (C-7'N), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 38.3 (C-8'N), 41.9 (C-5'A), 43.2 (C-12N), 43.4 (C-7'A), 51.8 (C-6'N), 55.4 (C-5'N), 74.6 (C-10A), 77.9 (Cq *t*Bu), 82.4 (C-3'A), 82.8 (C-2'A), 83.3 (C-3'N), 83.4 (C-2'N), 84.4 (C-4'N), 85.9 (C-4'A), 89.7 (C-1'N), 90.0 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 113.8 (Cq isop.), 113.9 (Cq isop.), 119.3 (C-5A), 119.7 (C-5N), 127.0 (CH-P-Bn), 127.4 (2C, CH-O-Bn), 128.6 (2C, CH-M-Bn), 133.0 (C-8A), 140.54 (C-8N), 141.3 (Cq Bn), 148.8 (C-4A), 149.2 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.3 (C-2A), 156.1 (Cq carbamate), 156.4 (C-6A), 156.6 (C-6N), 158.4 (C-6'A).

HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* calcd for [C₄₅H₅₈N₁₄O₉+H]⁺ 939.4584 found 939.4563.

5'-Deoxy-5'-(*N*-(3-amino)propyl-*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(3-benzylureido)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]amino)-adenosine (117)



Compound **115** (129 mg, 0.14 mmol, 1.0 equiv) was brought to 0 °C before adding an ice cold solution of TFA (50% in water, 2.8 mL). After 5 hours at room temperature, the crude was transferred dropwise into ice-cold water (50 mL) before being lyophilised. The residue was purified by reverse phase HPLC

(10-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 8.3 min) to yield fully deprotected compound **117** (39 mg, 79%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.65-1.72 (m, 2H, CH₂-7'N), 2.64-2.69 (m, 2H, CH₂-6'N), 2.74-2.78 (m, 2H, CH₂-8'N), 2.82 (dd, J5'N,4'N = 7.3 Hz, J5'N,5'N = 13.8 Hz, 1H, H-5'N), 2.91 (dd, J5'N,4'N = 4.6 Hz, J5'N,5'N = 13.8 , 1H, H-5'N), 3.26-3.32 (m, 1H, H-5'A), 3.44-3.51 (m, 1H, H-5'A), 3.82 (s, 2H, CH₂-12A), 3.92-3.96 (m, 1H, H-4'A), 4.05-4.09 (m, 1H, H-4'N), 4.13-4.16 (m, 1H, H-3'N), 4.19-4.22 (m, 3H, H-3'A and CH₂-7'A), 4.69 (t app, J2'N,1'N = J2'N,3'N = 5.3 Hz, 1H, H-2'N), 5.14 (dd, J2'A,3'A = 5.2 Hz, J2'A,1'A = 6.3 Hz, 1H, H-2'A), 5.90 (d, J1'N,2'N = 5.3 Hz, 1H, H-1'N), 5.98 (d, J1'A,2'A = 6.3 Hz, 1H, H-1'A), 6.26-6.29 (m, 1H, NH-5'A), 6.38-6.40 (m, 1H, NH-6'A), 7.18-7.31 (m, 7 H, 5x CH Bn and NH₂-6N), 7.51 (s, 2H, NH₂-6A), 8.18 (s, 1H, H-2N),

8.21 (s, 1H, H-2A), 8.35 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 27.0 (C-7'N), 38.5 (C-8'N), 42.3 (C-5'A), 43.4 (C-7'A), 43.5 (C-12A), 51.4 (C-6'N), 56.3 (C-5'N), 71.5 (C-2'A), 71.7 (C-3'A), 72.2 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 75.0 (C-10A), 82.9 (C-4'N), 84.9 (C-4'A), 88.2 (C-1'N), 89.5 (C-1'A), 92.7 (C-11N), 119.6 (C-5A), 119.7 (C-5N), 127.0 (CH-P-Bn), 127.4 (2C, CH-O-Bn), 128.6 (2C, CH-M-Bn), 133.9 (C-8A), 140.3 (C-8N), 141.3 (Cq-Bn), 149.3 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.2 (C-2A), 156.4 (C-6A), 156.5 (C-6N), 158.5 (C-6'A).

HRMS (ESI⁺-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_{14}\text{O}_7+\text{H}]^+$ 759.3434 found 759.3403.

Chapitre 5

Synthèse d'analogues macrocycliques de NKI-1

5.1 Du composé linéaire au macrocycle

Le NAD^+ , substrat des NAD kinases, adopte naturellement une forme contrainte présentant un rapprochement des deux riboses au sein du site actif de l'enzyme.^{87,250} Dans l'optique de développer des inhibiteurs les plus sélectifs possible, il a donc été envisagé de forcer cette contrainte en synthétisant une nouvelle famille de molécules macrocycliques.

Les études cristallographiques de *Lm*NADK en complexe avec le composé **46** (Chapitre 2) ont mis en évidence une proximité spatiale *in crystallo* de deux positions de la molécule. D'après les structures produites, une distance de 3.4 Å séparerait la fonction amine primaire portée par le bras en position 5' de la partie A et l'atome d'oxygène du lien central (Figure 5.1). Nous avons exploité ces données pour le développement de molécules macrocycliques en envisageant de relier ces deux positions par une chaîne de six atomes.

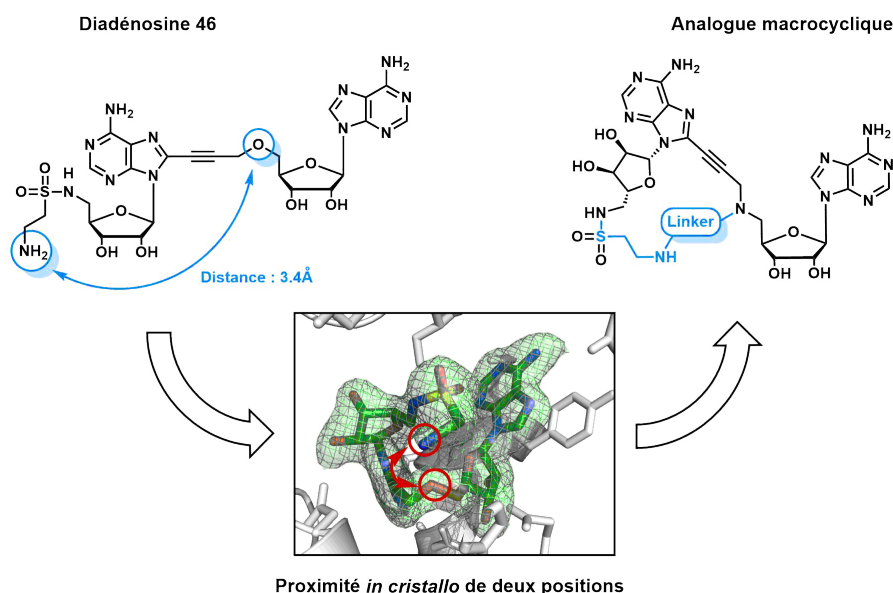


Figure 5.1 – Proximité spatiale entre la fonction amine primaire portée par le bras en position 5' de la partie A et l'atome d'oxygène du lien central

Je tiens à préciser que certaines réactions ont été réalisées par Tara Delpech, stagiaire de master 2 sous mon encadrement. Dans ce chapitre, les rendements marqués d'une dague (†) représentent les réactions menées par celle-ci. De plus, Valérie Huteau, technicienne au laboratoire, a également participé à la synthèse de certains composés. Les rendements marqués d'une double dague (‡) représentent les réactions menées par celle-ci.

250. Petrelli, R.; Sham, Y. Y. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 5656-5664.

Dans le but de simplifier ces molécules, et de diminuer leur haut poids moléculaire, nous avons choisi de préparer des analogues tronqués, ne possédant pas de fragment adénosine dans la partie N (Figure 5.2). Parmi les nombreuses méthodes de macrocyclisation décrites dans la littérature,²⁵¹ nous avons opté pour la formation de lien amide, cette fonction chimique étant stables en milieu biologique.^{252,253} Deux molécules différentes ont été envisagées, le macrocycle **120** ayant un amide en position propargylique et le macrocycle **121** ayant une amine secondaire à cette même position.

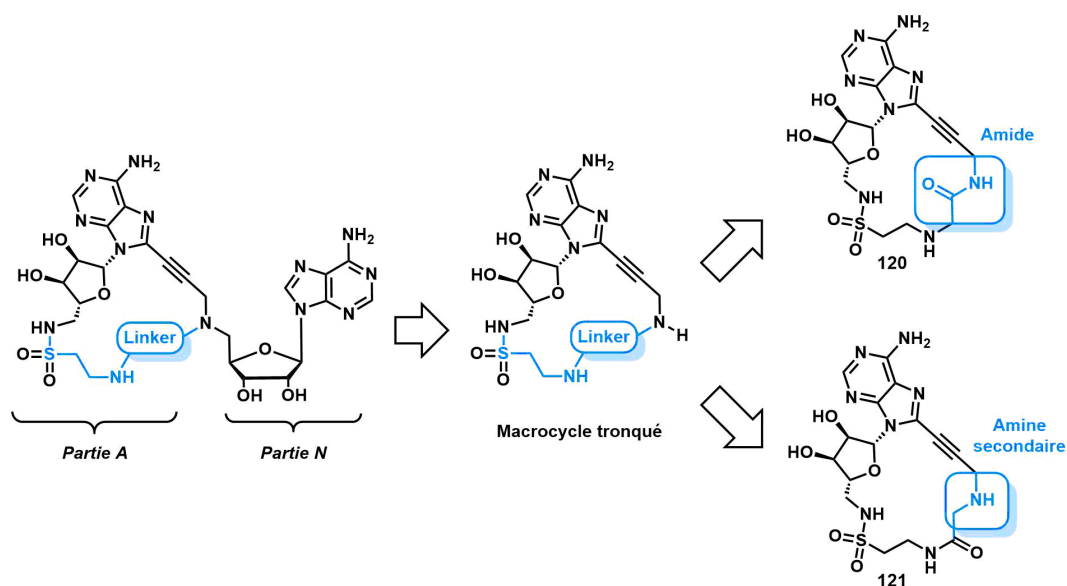


Figure 5.2 – Macrocycles **120** et **121** envisagés

D'un point de vue rétrosynthétique, tous les macrocycles qui ont été envisagés, ont comme point de départ commun la 5'-amino-5'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-8-bromoadénosine (**48**). Ce composé étant la véritable pierre angulaire de ce chapitre, nous avons commencé par en optimiser la préparation afin de pouvoir en produire les larges quantités requises avec la plus grande efficacité possible.

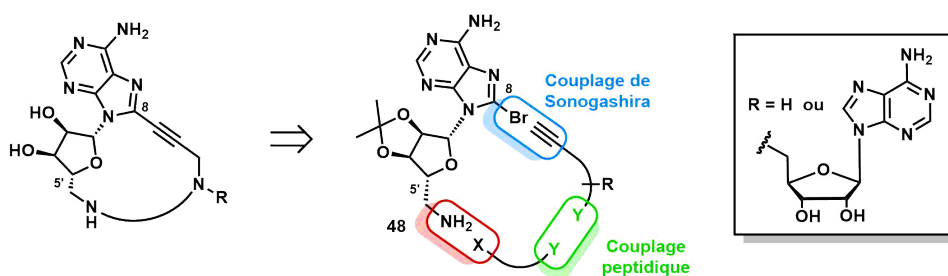


Schéma 5.1 – Importance du dérivé **48**

251. Martí-Centelles, V. ; Pandey, M. D. *et al. Chemical Reviews* **2015**, *115*, 8736-8834.

252. De Vita, R. J. ; Frontier, A. J. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 1244-1259.

253. Lécaillon, J. ; Gilles, P. *et al. Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 4674-4676.

5.2 Optimisation de la synthèse du précurseur 48

Au laboratoire, la méthode habituellement suivie pour obtenir **48** est une synthèse en quatre étapes à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adenosine (Schéma 5.2). Cette stratégie possède deux principaux défauts. Tout d'abord, la première étape de synthèse est relativement lente. En effet la sélectivité de la réaction est apportée en travaillant à -20 °C conduisant à un long temps réactionnel. Le second écueil est le faible rendement de la préparation de l'azoture **49** dû à la formation du cyclonucléoside **21**.^{173,254} Ces deux éléments conduisent à un rendement global de synthèse de la 5'-amino-5'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-8-bromoadénosine de seulement de 28 % en quatre étapes.

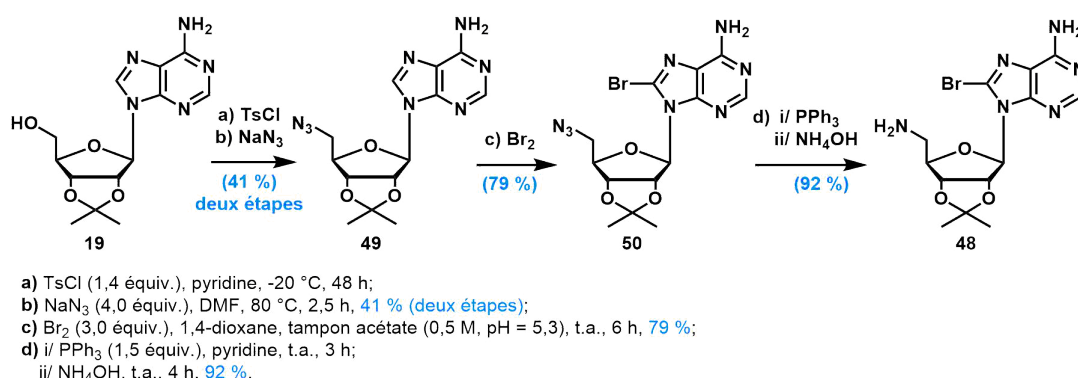


Schéma 5.2 – Synthèse du composé **48** selon la méthode classique du laboratoire.

Deux options ont été étudiées pour améliorer le rendement en produit souhaité (Schéma 5.3). Dans un premier temps nous avons envisagé de travailler sur le composé **19** portant un phtalimide en position 5'. Dans un second temps, nous avons également exploré une méthode alternative pour obtenir le composé **49** avec de meilleurs rendements. Une réaction de bromation permettrait de bromer les positions 8 de ces deux composés avant de convertir leur azoture ou phtalimide en amine.

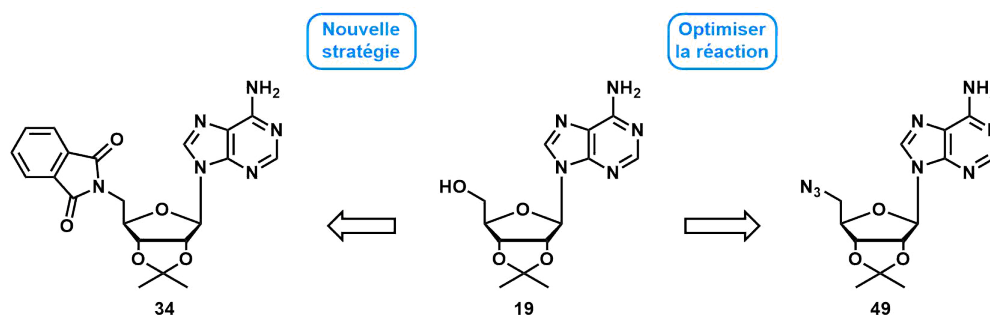


Schéma 5.3 – Stratégies envisagées afin d'optimiser la synthèse de **48**

254. Clark, V. M. ; Todd, A. R. *et al. Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1951**, 2952-2958.

5.2.1 Stratégie passant par un groupement phtalimide en position 5'

Le phtalimide **34** est le précurseur de la 5'-amino-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**34**) utilisée dans certaines voies de synthèses présentées chapitre 2. Celui-ci est obtenu en une étape à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**20**) avec un rendement de 76 % (Cf. page 91).

L'introduction du brome en position 8 de la base (Schéma 5.4) s'est ensuite faite d'après le protocole décrit par Mai et Comstock²⁵⁵ en traitant le phtalimide **34** avec du dibrome en milieu tamponné. Ces conditions ont permis d'obtenir le composé bromé **122** avec un rendement comparable à celui reporté (à savoir 96 % contre 97 % décrit).

L'obstacle majeur de cette stratégie survient à l'étape suivante de déprotection du phtalimide. En effet, l'hydrazine utilisée possède un pouvoir nucléophile suffisant pour substituer le brome en position 8 conduisant à la formation de la 2',3'-*O*-isopropylidène-8-hydrazinoadénosine (**123**), un sous-produit non désiré (Schéma 5.4). Souhaitant minimiser sa formation, nous avons adapté les conditions de déprotection décrites précédemment (Cf. page 91) en travaillant à température ambiante. Dans un premier essai, le large excès d'hydrate d'hydrazine (16,0 équivalents) conduit à une déprotection rapide, pour une durée totale de 2 h, et permet, après traitement et purification, d'obtenir **48** avec un rendement de 42 % (Schéma 5.4). Dans une seconde tentative, nous avons diminué le nombre d'équivalents d'hydrazine dans l'espoir d'améliorer ce rendement en réduisant la formation du produit secondaire **123**. Malheureusement, ces conditions n'ont pas eu l'effet attendu : non seulement le temps de réaction s'est retrouvé allongé, passant de 2 h à 20 h, mais le rendement de l'étape reste comparable au précédent.

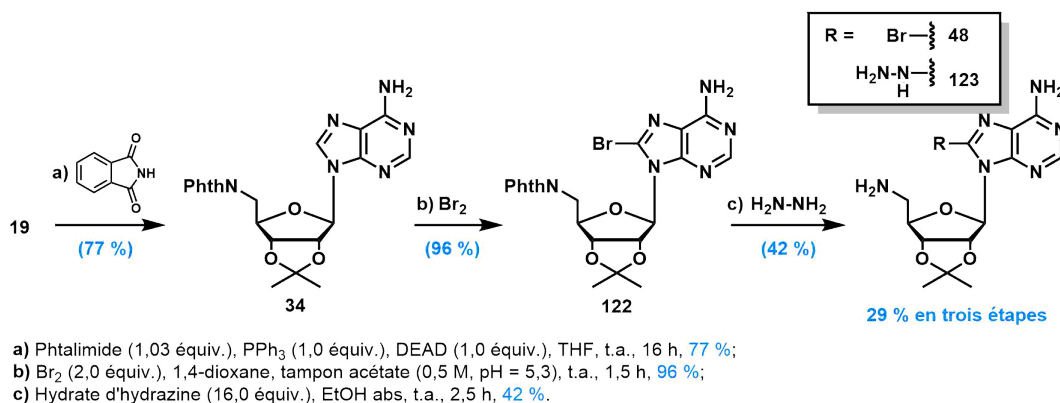


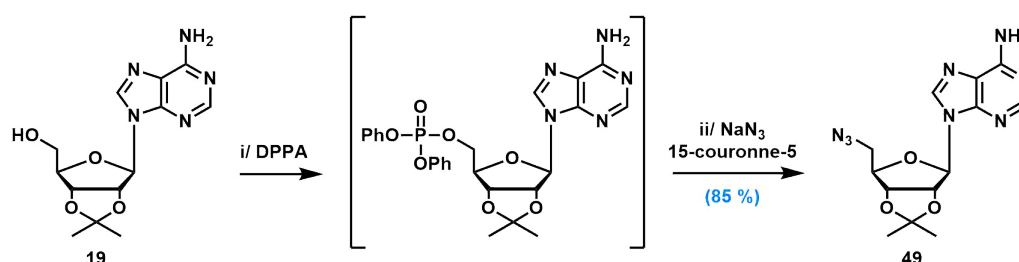
Schéma 5.4 – Bromation du composé **34** suivie de la déprotection du phtalimide

Cette voie alternative, bien que plus rapide, possède un rendement global de 29 % en trois étapes, même ordre de grandeur que le précédent (30 %).

255. Mai, V.; Comstock, L. R. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 10319-10324.

5.2.2 Optimisation - phosphotriester

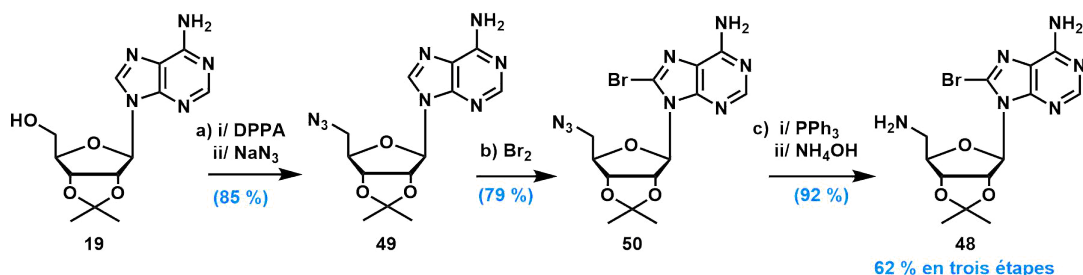
La seconde voie est une alternative au déplacement de tosylate pour obtenir l'azide 49. Mise au point par Liu et Austin en 2001,^{256,257} cette méthode repose sur l'activation transitoire de l'alcool en position 5' *via* la formation d'un phosphotriester par réaction avec l'azoture de diphenyl phosphoryle (DPPA). L'ajout subséquent d'un excès d'azoture de sodium et d'éther 15-couronne-5, suivi d'un chauffage à 100 °C durant 3 heures, permet l'obtention du composé 49 de façon bien plus rapide et avec un rendement de 85 %.



i/ DBU (3,0 équiv.), DPPA (2,0 équiv.), 1,4-dioxane, t.a., 3 h;
 ii/ NaN₃ (5,0 équiv.), 15-couronne-5 (0,1 équiv.), TBAI (0,1 équiv.), 1,4-dioxane, 100 °C, 3 h, **85 %**.

Schéma 5.5 – Utilisation d'un phosphotriester afin d'obtenir l'azide 49, précurseur d'amine

Les étapes suivantes de bromation et de réduction de Staudinger, sont identiques à celles exposées précédemment (Schéma 5.2) et permettent d'obtenir la 5'-amino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidène-8-bromoadénosine (48). Non seulement plus rapide que la première voie de synthèse, celle-ci nous permet d'obtenir le produit souhaité avec un rendement global de 62 % en trois étapes.



a) i/ DBU (3,0 équiv.), DPPA (2,0 équiv.), 1,4-dioxane, t.a., 3 h;
 ii/ NaN₃ (5,0 équiv.), 15-couronne-5 (0,1 équiv.), TBAI (0,1 équiv.), 1,4-dioxane, 100 °C, 3 h, **85 %**;
 b) Br₂ (3,0 équiv.), 1,4-dioxane, tampon acétate (0,5 M, pH = 5,3), t.a., 6 h, **79 %**;
 c) i/ PPh₃ (1,5 équiv.), pyridine, t.a., 3 h;
 ii/ NH₄OH, t.a., 4 h, **92 %**.

Schéma 5.6 – Voie retenue pour synthétiser le composé 48

256. Liu, F. ; Austin, D. J. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 3153-3154.

257. Liu, F. ; Austin, D. J. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 8643-8645.

5.3 Macrocycles de type sulfonamide

Comme énoncé précédemment, deux macrocycles de la famille des sulfonamides ont été envisagés, les macrocycles **120** et **121** (Schéma 5.7). Ceux-ci diffèrent par la nature du lien macrocyclique, un amide dans le cas de **120** et une amine secondaire dans le cas de **121**.

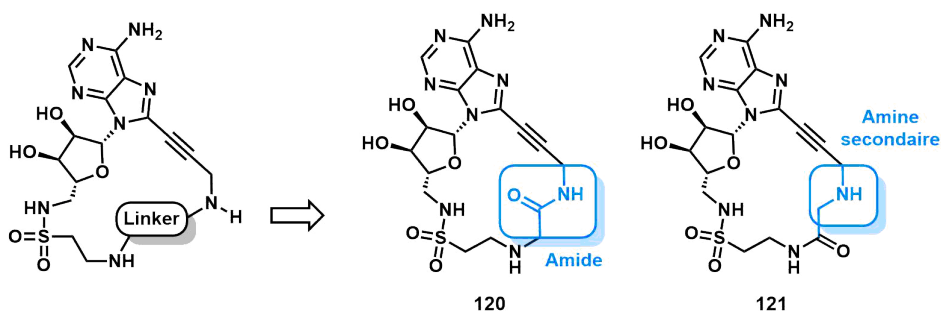


Schéma 5.7 – Rétrosynthèse des macrocycles **120** et **121**

La méthode la plus classique pour obtenir des sulfonamides est la réaction d'une amine avec le chlorure de sulfonyle souhaité. De part sa facilité de mise en oeuvre et la vaste disponibilité des chlorures de sulfonyle commerciaux, nous avons opté pour cette stratégie.

5.3.1 Macrocycle **120**

Pour ce premier macrocycle, le 8-bromonucléoside doit porter en 5' une chaîne se terminant par un ester tandis que l'alcyne doit porter une amine protégée (Schéma 5.8). L'obtention du bromonucléoside **124** repose sur la synthèse de l'accepteur de Michael **125** sur lequel pourra être additionné une fonction suffisamment nucléophile, dans notre cas l'ester éthylique de glycine. Concernant l'alcyne, nous avons, dans un premier temps, utilisé la *N*-Boc-propargylamine commerciale.

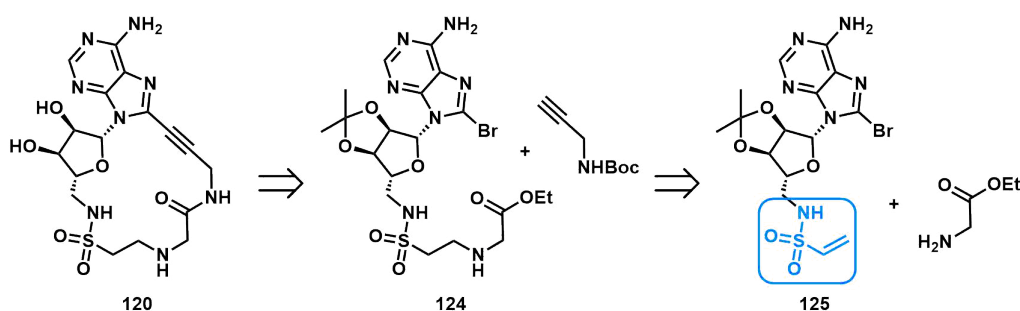


Schéma 5.8 – Rétrosynthèse du macrocycle tronqué **120**

Pour synthétiser **125** nous avons appliqué un protocole déjà décrit par le groupe de Aldrich C.¹⁷¹ qui fait réagir la 5'-amino-5'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**20**) avec du chlorure de 2-chloroéthanesulfonyl (Schéma 5.9). L'utilisation de deux équivalents

de triéthylamine est nécessaire pour mener cette réaction à terme. Le premier équivalent servira à neutraliser l'acide chlorhydrique généré par la formation du sulfonamide, tandis que le second fera office de base permettant l'élimination du chlore en position β pour former le vinylsulfonamide.²⁵⁸ Cette réaction nous a permis d'obtenir **125** à partir de **48** avec un rendement de 58 %, similaire à celui décrit (46 %).¹⁷¹

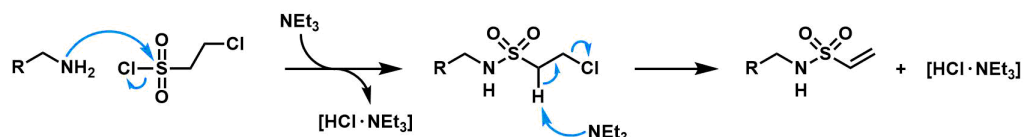
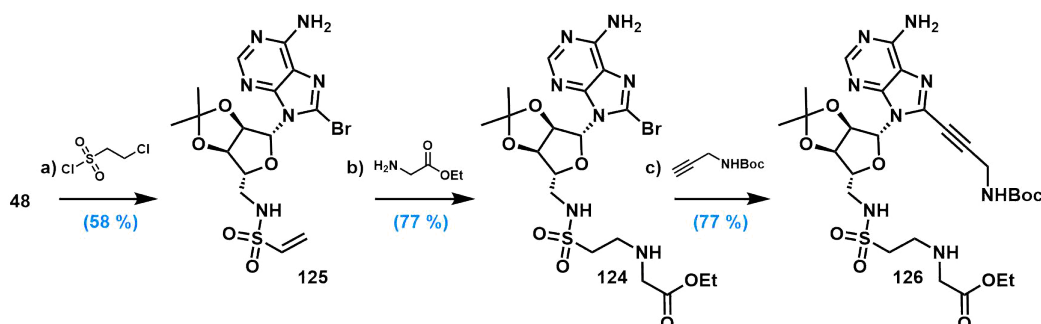


Schéma 5.9 – Réaction d'une amine sur le chlorure de 2-chloroéthanesulfonyl formant un accepteur de Michael

Nous avons ensuite dissous **125** dans un mélange eau/acétonitrile (5:5) avant d'ajouter un large excès de chlorhydrate d'ester éthylique de glycine, neutralisé par l'ajout de triéthylamine en proportion équimolaire. Après 16 heures à t.a., le traitement de la réaction a permis d'isoler le composé **124** avec un rendement de 77 %. Un couplage de Sonogashira a ensuite été effectué entre la *N*-Boc-propargylamine et le composé **124** conduisant à l'obtention du pré-macrocycle **126** avec un rendement de 77 %.



- a) Chlorure de 2-chloroéthanesulfonyl (1,0 équiv.), NEt₃ (2,0 équiv.), DMF, t.a., 16 h, 58 %;
 b) Chlorhydrate d'ester éthylique de glycine (10,0 équiv.), NEt₃ (10,0 équiv.), MeCN, H₂O, t.a., 48 h, 77 %;
 c) **17** (1,0 équiv.), *N*-Boc-propargylamine (1,5 équiv.), NEt₃ (3,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), Cul (5 mol%), THF, 60 °C, 3,5 h, 77 %.

Schéma 5.10 – Obtention de **126** par addition d'ester de glycine sur **137** suivi d'un couplage de Sonogashira

L'étape suivante consiste en la saponification de la fonction ester avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Le suivi CL/SM de la réaction, ainsi que l'analyse du brut après lyophilisation, confirme la présence du produit souhaité. Cependant, le chromatographe de l'étape de purification CLHP présente de nombreux pics dont aucun ne correspond au produit de déprotection souhaité. Nous n'avons pas été en mesure de les identifier malgré les analyses HRMS.

258. Li, M.; Wu, R. S. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 383-386.

5.3.2 Étude de la réactivité du 5' sulfonamide

Dans le but de trouver une explication à ce résultat, nous avons d'abord évalué l'implication de la chaîne propargyle en position 8 dans la dégradation du sulfonamide déprotégé. A cette fin, nous avons d'abord synthétisé un analogue de **126** portant un atome hydrogène en position 8 plutôt que le groupement propargylamine protégé. Pour ce faire, nous avons d'abord fait réagir la fonction amine de **19** avec le chlorure de 2-chloroéthanesulfonyl, toujours en présence de deux équivalents de triéthylamine, pour former l'accepteur de Michael **127** avec un rendement de 73 % (Schéma 5.11). Nous avons ensuite procédé à l'addition de Michael en suivant les mêmes conditions que celles précédemment décrites dans le cas de **125** et avons ainsi obtenu **128** avec un rendement de 62 %. Enfin, nous avons saponifié la fonction ester du composé **128** avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau) permettant d'obtenir le composé déprotégé **129** avec un rendement de 50 % après purification CLHP.

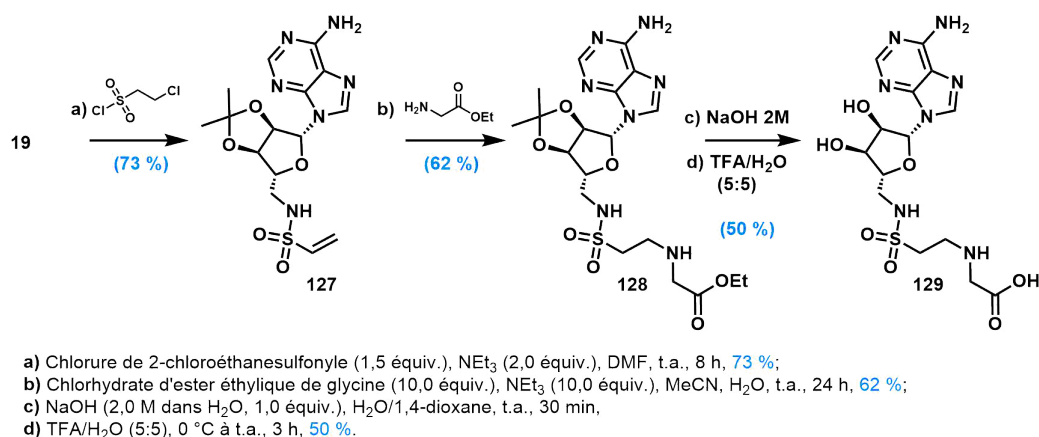
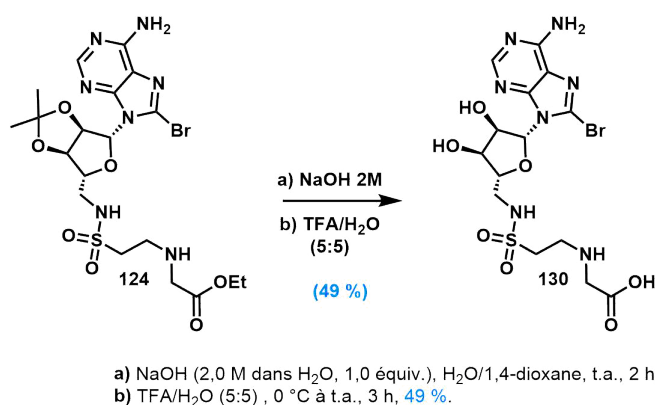


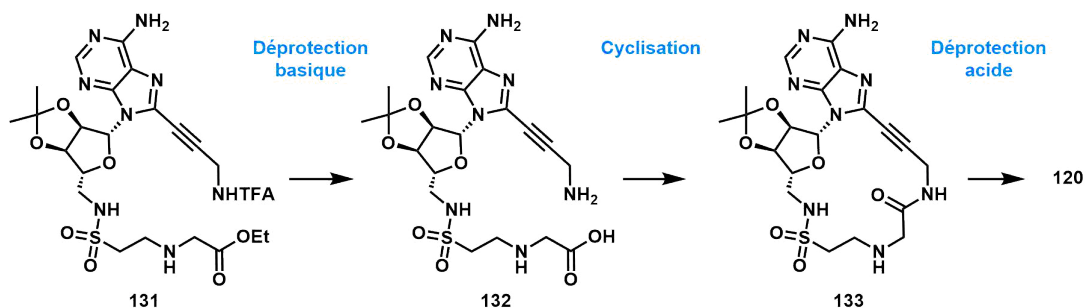
Schéma 5.11 – Synthèse de **129**, analogue de **130**

En parallèle, nous avons également déprotégé les groupements protecteurs du composé **124** (Schéma 5.12) par traitement basique (soude 2 M) suivi d'un traitement acide (TFA 50 % dans l'eau). Encore une fois, la déprotection du composé a permis de retirer les groupements protecteurs sans réel problème conduisant à l'obtention du composé bromé déprotégé **130** avec un rendement de 49 % après purification par CLHP.

Schéma 5.12 – Obtention de **130** par déprotection du composé **124**

Ces éléments tendent à confirmer que la propargylamine en position 8 est responsable de la dégradation du sulfonamide déprotégé.

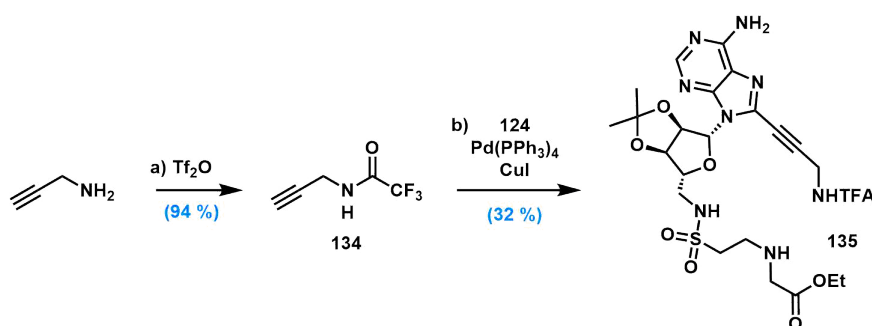
Nous avons donc, à la lumière de ces nouveaux résultats, envisagé une nouvelle stratégie synthétique reposant sur une macrocyclisation avant l'étape de déprotection finale et purification HPLC. A cette fin, nous avons envisagé la protection de l'amine par un groupement pouvant être retiré en conditions basiques. La première étape serait la déprotection simultanée de l'amine et de l'acide suivie de leur macrocyclisation pour obtenir un macrocycle protégé **133**. Après cela, celui-ci serait traité en condition acide afin de déprotéger l'isopropylidène restant et d'obtenir le macrocycle final **120** (Schéma 5.13).

Schéma 5.13 – Nouvelle synthèse envisagée du macrocycle **120**.

La première étape de cette voie consiste en la protection de la propargylamine. Parmi les groupements protecteurs d'amines sensibles aux bases classiques figure le groupement fluorénylméthoxycarbonate (Fmoc). Il a cependant été à exclure dans cette voie, celui-ci ne résistant pas aux conditions de couplage de Sonogashira où l'on chauffe à 60 °C en présence de triéthylamine. Notre choix s'est donc porté sur un autre groupement habituel aux propriétés similaires : le trifluoroacétate (TFA).

Son introduction *via* l'anhydride triflique ($\text{ Tf}_2\text{O}$), a été décrite pour la première fois par F. Weygand et E. Csendes qui l'utilisent en tant que groupement protecteur d'acides aminés.²⁵⁹ Depuis lors, la trifluoroacétylation d'amine par le $\text{ Tf}_2\text{O}$ a été employée dans de nombreuses voies de synthèses, notamment pour préparer la propargylamine trifluoroacétylée.^{260,261}

La réaction se fait à 0 °C avec un léger excès de $\text{ Tf}_2\text{O}$ en présence d'une amine (dans notre cas la DIEA). Après trois heures de réaction, le traitement et la purification du brut nous a permis l'obtention du composé désiré **134** avec un rendement de 94 % (Schéma 5.14). Le couplage de Sonogashira subséquent avec le dérivé bromé **124** nous a permis d'isoler le composé **135** avec un rendement modeste de 32 %.



a) Propargylamine (1,0 équiv.), anhydride trifluoroacétique (1,5 équiv.), NEt_3 (2,0 équiv.), THF, 0 °C à t.a., 3 h, 94 %;
b) Dérivé bromé **124** (1,0 équiv.), alcyne **134** (1,8 équiv.), NEt_3 (3,6 équiv.), $\text{ Pd(PPh}_3)_4$ (12 mol%), Cul (6 mol%), THF, 60 °C, 3,5 h, 32 %.

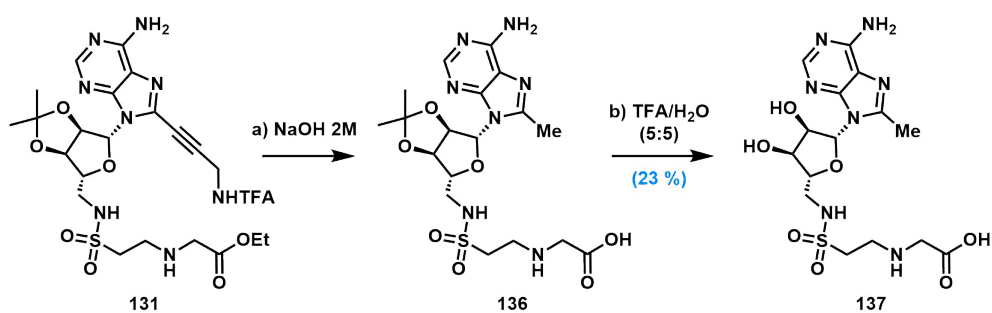
Schéma 5.14 – Trifluoroacétylation de la propargylamine suivi d'un couplage de Sonogashira pour obtenir **135**

Le traitement basique du composé avec une solution de soude 2 M a ensuite eu des résultats très inattendus (Schéma 5.15). En effet, le chromatographe du suivi CL/SM de la réaction indiquait bien la disparition du produit de départ (pic de masse à 684 g.mol^{-1}). Cependant, plutôt que de voir apparaître le produit d'arrivé (avec une masse de 524 g.mol^{-1}) nous avons constaté la formation d'un produit secondaire. Après purification par CLHP, nous avons pu isoler le produit de déprotection **136** portant un méthyle en position 8 au lieu du propargyle attendu. Le traitement en milieu acide de ce composé permet de retirer l'isopropylidène avec succès conduisant au produit entièrement déprotégé **137** avec un rendement de 23 %.

259. F. Weygand, E. C. *Angew. Chem.* **1952**, 64, 1.

260. Merkul, E.; Müller, T. J. J. *Chemical Communications* **2006**, 4817-4819.

261. Annapragada, A.; Tanifum, E. A. Hydrophilic fluorinated molecules for liposomal 19F MRI probes with unique MR signatures, US 2018/0154025 A1, 2018.



a) NaOH (2,0 M dans H₂O, 1,0 équiv.), H₂O/1,4-dioxane, t.a., 3 h;
 b) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 1 h, 23 %.

Schéma 5.15 – Formation inattendue du composé 8-méthylé **136**

Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à proposer un mécanisme réactionnel permettant d'expliquer cette réaction inattendue. Suite à l'instabilité du produit et aux réactions exotiques que nous avons observées, nous avons choisi de ne pas poursuivre dans cette voie et de synthétiser un autre macrocycle de la même famille.

5.3.3 Macrocycle 121

Le second macrocycle sur lequel nous nous sommes penchés est le macrocycle **121**. La voie de synthèse envisagée (Schéma 5.16) passe par le sulfonamide **47**, composé déjà synthétisé dans le cadre de la préparation de supports fonctionnalisés (Cf. Chapitre 2, page 98). Celui-ci a été obtenu avec un rendement de 86 % par réaction entre le composé **48** et le chlorure de 2-phthalimidoéthanesulfonyl. Cependant, le groupement phthalimide ne peut pas être conservé pour le reste de la synthèse. En effet, comme mentionné dans le chapitre 2, l'hydrazine utilisée lors de sa déprotection conduit à la formation majoritaire du produit secondaire d'addition sur l'alcyne (Cf. page 99). Afin de minimiser les réactions secondaires, il est donc nécessaire d'opter pour une stratégie moins élégante consistant en la déprotection du phthalimide suivie d'une nouvelle protection avec un groupement Boc. Le dérivé d'adénosine **139** obtenu serait ensuite engagé dans un couplage de Sonogashira avec l'alcyne **140** afin d'obtenir le composé **138**. La déprotection de celui-ci, suivie de sa macrocyclisation, permettrait l'obtention du macrocycle souhaité **121**.

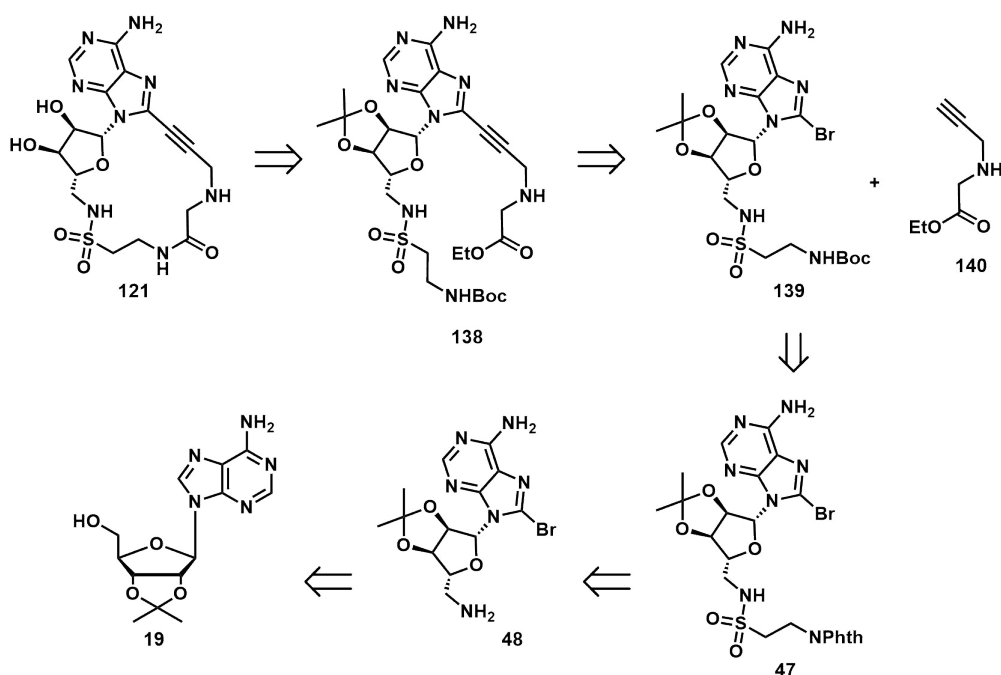


Schéma 5.16 – Rétrosynthèse proposée du macrocycle **121**

A l'instar de la réaction de déprotection du phthalimide du composé **122** pour obtenir l'amine **48** (Cf. page 256) la déprotection du composé **47** a eu le modeste rendement de 42 % (Schéma 5.17). Celui-ci s'explique également par la formation du produit secondaire de substitution du brome en 8 par l'hydrazine. L'amine primaire ainsi formée a été engagée dans une réaction avec le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) permettant d'obtenir le composé **139** avec un rendement de 73 %.

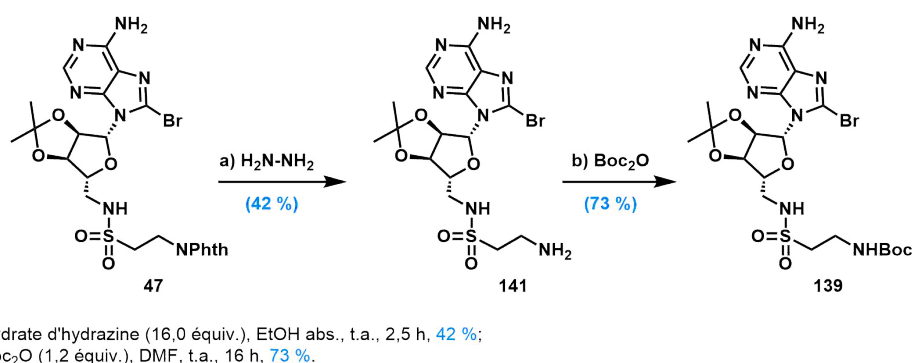


Schéma 5.17 – Préparation de **139** par déprotection du phtalimide **47** suivi de la protection de l'amine **141**

En parallèle, l'alcyne primaire nécessaire au couplage de Sonogashira a été préparé en alkylant la propargylamine avec le bromoacétate d'éthyle selon une méthode déjà décrite dans la littérature.²⁶² Nous n'avons cependant pas eu les rendements escomptés (57 % contre 94 % décrit). Les deux principales raisons de ce faible rendement sont, d'une part, la formation du produit dialkylé et, d'autre part, la volatilité de l'ester éthylique de *N*-propargylglycine (**140**). Une perte du produit a donc eu lieu lors de l'évaporation à sec des fractions de purification de colonne chromatographique. La quantité d'alcyne obtenue étant cependant suffisante pour poursuivre la synthèse, nous ne nous sommes pas attardés sur l'optimisation de cette étape. Le couplage de Sonogashira entre dérivé bromé **139** et un excès d'alcyne **140** a ensuite permis d'obtenir le pré-macrocycle **138** protégé avec un rendement de 50 %.

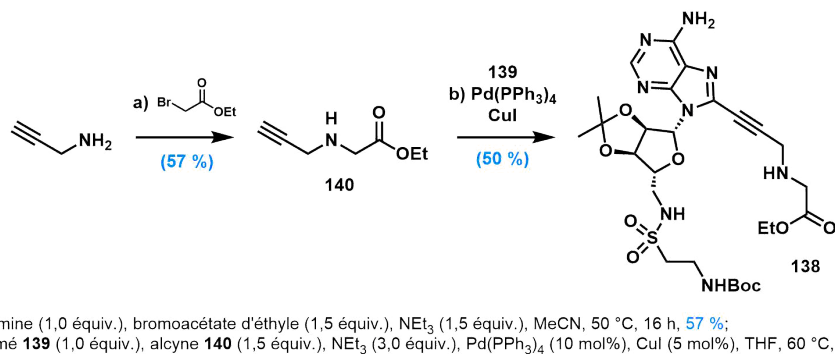
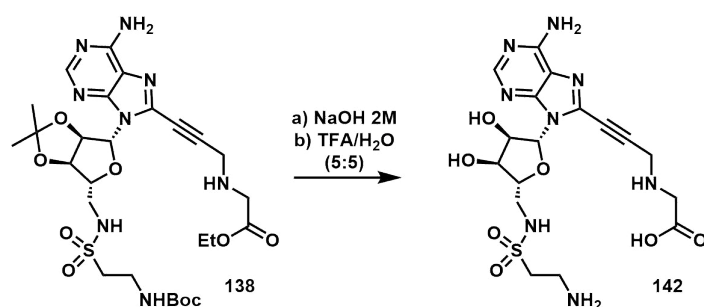


Schéma 5.18 – Préparation de **138** par couplage de Sonogashira entre **140** et **139**

L'étape suivante consiste en la saponification de la fonction ester avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Les résultats inattendus que nous avons eu lors de la déprotection du pré-macrocycle **126** (Cf. page 259) se sont répétés. La purification CLHP n'a pas permis d'isoler **142**, le composé s'étant dégradé en un mélange complexe de produits que nous n'avons pas pu caractériser.

262. Struthers, H.; Spingler, B. *et al. Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 6173-6183.



a) NaOH (2,0 M dans H₂O, 1,0 équiv.), H₂O/1,4-dioxane, t.a., 3 h;
b) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 1 h.

Schéma 5.19 – Tentative infructueuse de déprotection du pré-macrocycle **138**.

Lors de la synthèse des sulfonamides, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés, que ce soit la nécessité de remplacer le phthalimide par un groupement Boc dans le cadre du macrocycle **121**, ou bien de la formation inattendue d'un méthyle en position 8 de l'adénine dans le cas de macrocycle **120**. Nous avons enfin eu, de manière plus générale, les dégradations des composés déprotégés. Ces échecs consécutifs nous ont conduit à envisager des structures macrocycliques alternatives en remplaçant le sulfonamide par des fonctions amides ou, plus tard, par des fonctions urées.

5.4 Macrocycles de type amide

Le remplacement d'un sulfonamide par un amide impliquera très certainement des interactions différentes entre ces motifs potentiels et le site actif de l'enzyme. Contrairement aux sulfonamides, nous n'avons ici pas de données cristallographiques indiquant un rapprochement clair entre la position centrale de la molécule et son bras introduit en position 5'. Après modélisation informatique et docking, il s'est avéré que les candidats les plus prometteurs *in silico* étaient des diadénosines macrocyclisées **via** des linkers non aliphatiques d'une longueur de cinq à six atomes (Schéma 5.20). Nous avons distingué deux familles de composés : la famille "amide central" possédant un amide secondaire en position centrale et la famille "amine centrale" possédant une amine tertiaire.

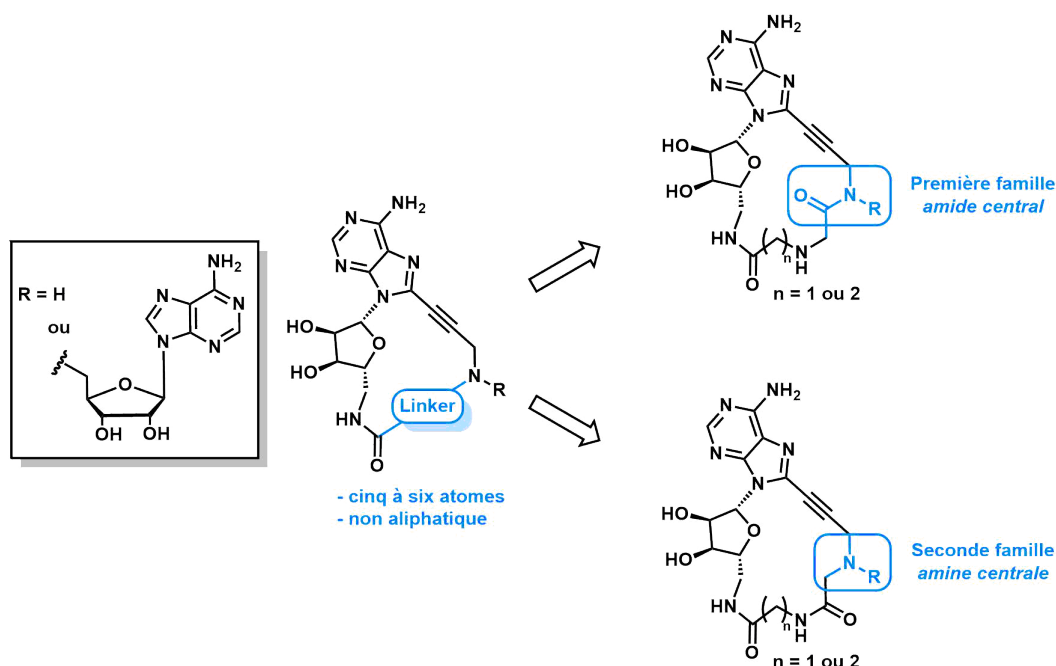


Schéma 5.20 – Deux familles de macrocycles

5.4.1 Macrocycle de type "amide central" 143

Dans la famille des amides, le premier composé sur lequel nous avons travaillé est le macrocycle **143** possédant un bras d'une longueur de cinq atomes et dont le lien central est un amide disubstitué (Schéma 5.21). D'un point de vue rétrosynthétique, les deux composés clef nécessaire à sa synthèse sont le dérivé bromé **144** et l'alcyne **145**.

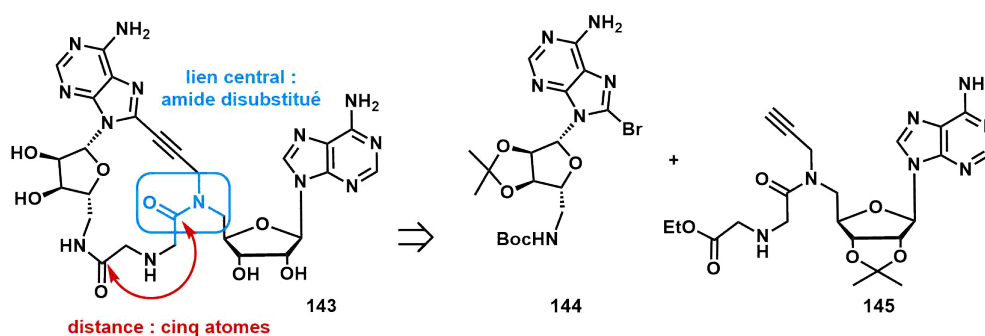
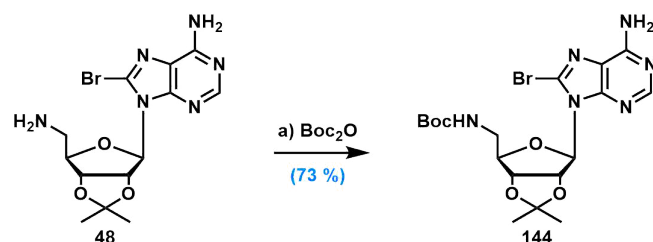


Schéma 5.21 – Première déconnection envisagée

Le dérivé bromé **144** a été obtenu par réaction entre l'amine en position 5' du composé **48** et le Boc_2O selon les conditions classiques. Nous avons ainsi obtenu le composé protégé **144** avec un rendement de 73 %.



a) Boc_2O (1,2 équiv.), DCM, t.a., 24 h, 73 %;

Schéma 5.22 – Protection de l'amine primaire du composé 48

La synthèse envisagée du composé **145** repose sur des fonctionnalisations successives sur l'amine secondaire en position 5' du composé **20** (Schéma 5.23). Une première réaction, de type "couplage peptidique", permettrait la création d'un lien amide pour obtenir le dérivé d'adénosine **146**. L'amine primaire de celui-ci serait ensuite alkylée en conditions diluées, pour minimiser la réaction de di-alkylation, afin de former le composé désiré **145**.

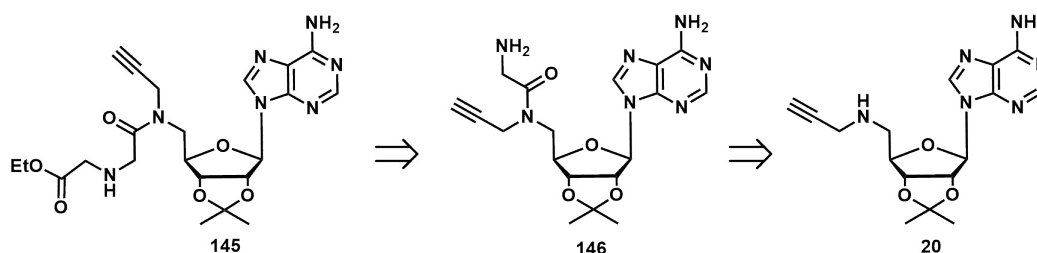
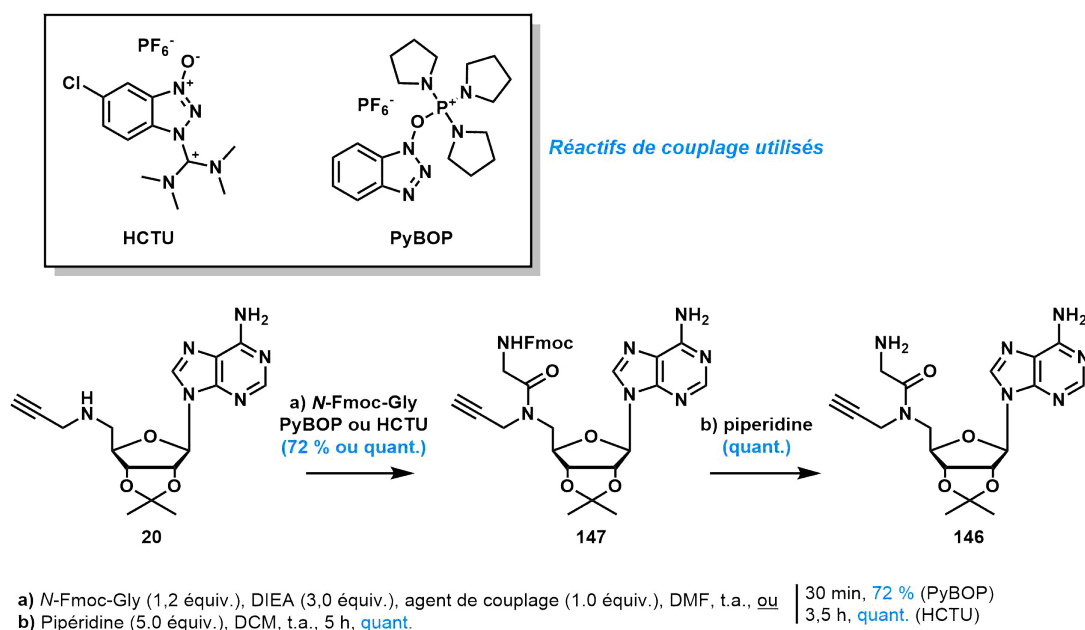


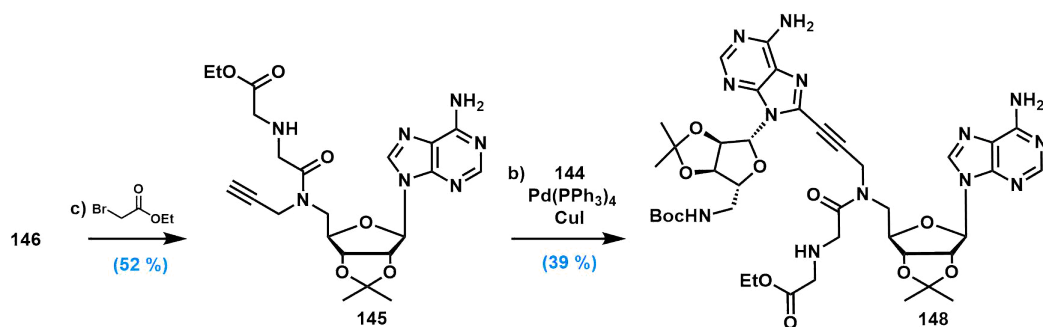
Schéma 5.23 – Rétrosynthèse envisagée du composé 145

La première étape de cette voie de synthèse consiste en la création du lien amide entre un dérivé de glycine *N*-protégé et l'amine secondaire du composé **20**. Parmi les groupements protecteurs classiques d'acides aminés, notre choix s'est porté sur le groupement Fmoc plutôt que le groupement Boc. En effet la déprotection du groupement Boc nécessite des conditions acides, non orthogonales avec le groupement isopropylidène protégeant les alcools 2' et 3' du ribose, alors que la déprotection du groupement Fmoc se fait en condition basique douce *via* la pipéridine.²⁶³ A l'occasion de ce couplage de type "peptidique", nous avons remarqué que l'emploi d'hexafluorophosphate de 1-[bis(diméthylamino)méthylène]-5-chlorobenzotriazolium 3-oxide (HCTU) plutôt que de PyBOP conduit à une réaction, non seulement plus rapide, mais avec un meilleur rendement en produit **147** (quantitatif en 30 min contre 72 % en 2,5 h). La déprotection subséquente du Fmoc a permis d'obtenir **146** avec un rendement quantitatif.

263. Theodora W., G.; Peter G. M., W. in *Protective groups in organic synthesis, Third edition*; J. Wiley. : 1999, p. 506-507.

Schéma 5.24 – Préparation de **146** à partir de l'amine secondaire **20**

L'amine formée est ensuite mono-alkylée à l'aide d'un très léger excès (1.05 équivalents) de bromoacétate d'éthyle (Schéma 5.25). Après 24 heures de réaction, un suivi CL/SM permet d'estimer un taux de conversion de 90 % (70 % de produit de mono-alkylation et 20 % de produit de di-alkylation). De crainte d'augmenter la proportion de sous-produit di-alkylé nous n'avons pas cherché à pousser la réaction en ajoutant des équivalents supplémentaires de bromoacétate d'éthyle. Après purification nous avons obtenu le composé **145** avec le modeste rendement de 52 % ainsi que le produit de di-alkylation de l'amine aliphatique (13 %). Le dérivé bromé **144** et l'alcyne **145** ont ensuite été couplés par réaction de Sonogashira afin d'obtenir **148** avec un rendement modeste de 39 %, le reste de l'alcyne n'ayant pas réagi (19 %) ou s'étant homocouplé (21 %).



a) Bromoacétate d'éthyle (1,05 équiv.), NEt₃ (2,0 équiv.), THF, 0 °C à t.a., 16 h, **52 %**;
 b) Alcyne **145** (1,0 équiv.), Dérivé bromé **144** (1,5 équiv.), NEt₃ (3,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), CuI (5 mol%), THF, 60 °C, 2 h, **39 %**.

Schéma 5.25 – Obtention du pré-macrocyclé **148** à partir du composé **146**

5. Synthèse d'analogues macrocycliques de NKI-1

Les groupements protecteurs du composé **148** ont ensuite été retirés par traitement basique, avec une solution de soude 2 M, puis par un traitement acide avec un mélange H₂O/TFA. Cette réaction n'a pas donné lieu aux résultats attendus : les suivis CL/SM de la réaction indiquent que les déprotections ont lieu correctement cependant le produit semble se dégrader au moment de la purification CLHP. Il y a en effet l'apparition de nombreux pics sur le chromatogramme.

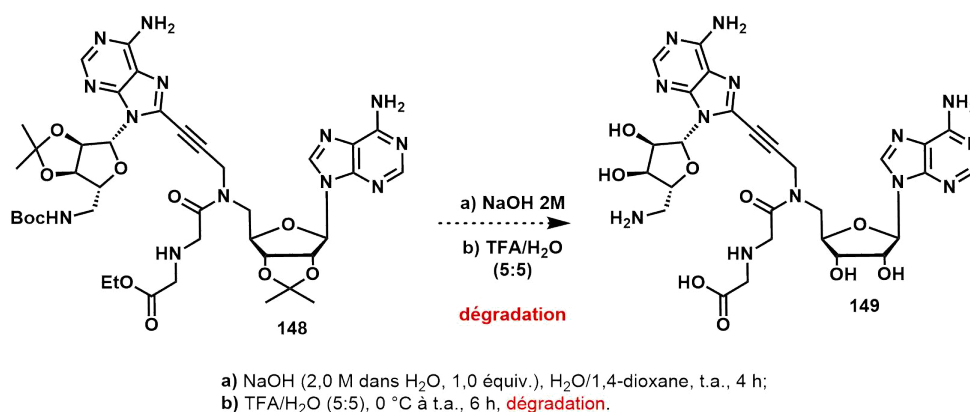


Schéma 5.26 – Dégradation de la diadénosine **148** au moment de sa déprotection.

Malgré leur collecte et analyse, aucun des produits secondaires formés n'a pu être identifiés.

Le second macrocycle de type "amide" sur lequel nous avons travaillé est le macrocycle **150** (Schéma 5.27). Le lien entre l'amine en position 5' du bloc A et l'amine en position centrale est composé de cinq atomes. La réaction de macrocyclisation étant une formation de lien amide, il est possible d'exploiter l'une de ces deux fonctions présente sur le composé **150**. Ainsi, deux déconnexions différentes sont possibles : la première repose sur la création du lien amide en position 5' et la seconde repose sur la création du lien amide central.

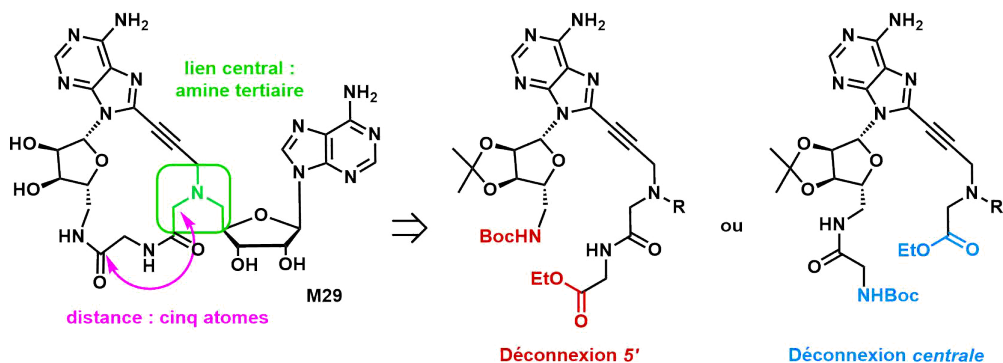


Schéma 5.27 – déconnexions envisagées dans le but de former le macrocycle **150**

5.4.2 Macrocycle de type "amine centrale" **150**, déconnection 5'

La voie nécessitant une déconnection en position 5' pour obtenir **150** passe par le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **151** et le dérivé bromé **144** (Schéma 5.28). Ce dernier ayant déjà été préparé à l'occasion de la synthèse infructueuse du macrocycle **149** (Cf. page 265), nous avons préféré explorer cette voie en premier.

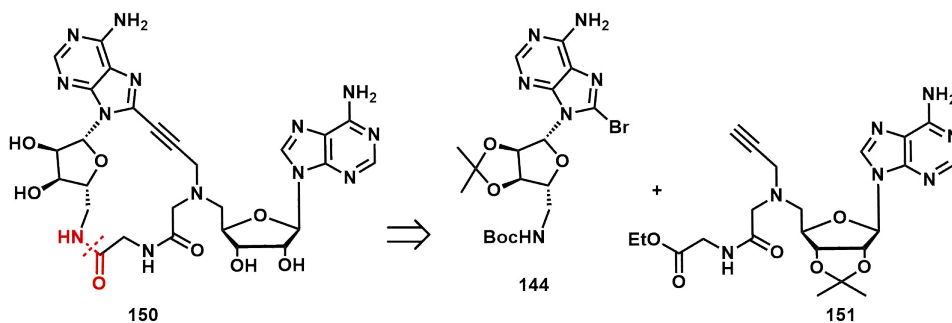


Schéma 5.28 – Premiers précurseurs envisagés du macrocycle **150**

La première étape est l'alkylation de l'amine secondaire du composé **20** par le bromoacétate d'éthyle. L'ester du composé **152** est ensuite saponifié avec une solution 2 M de NaOH pour obtenir l'acide correspondant sous forme de sel de sodium. Cette séquence réactionnelle permet d'obtenir **153** avec un rendement quantitatif en deux étapes. Un couplage de type "peptidique" est ensuite engagé entre l'acide **153** et l'ester éthylique de glycine via l'utilisation de PyBOP permettant d'obtenir le composé **151** avec un bon rendement de 86 %.

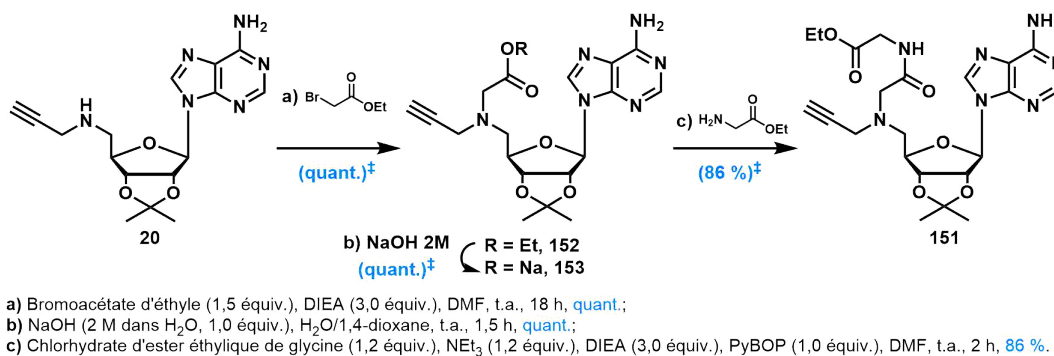
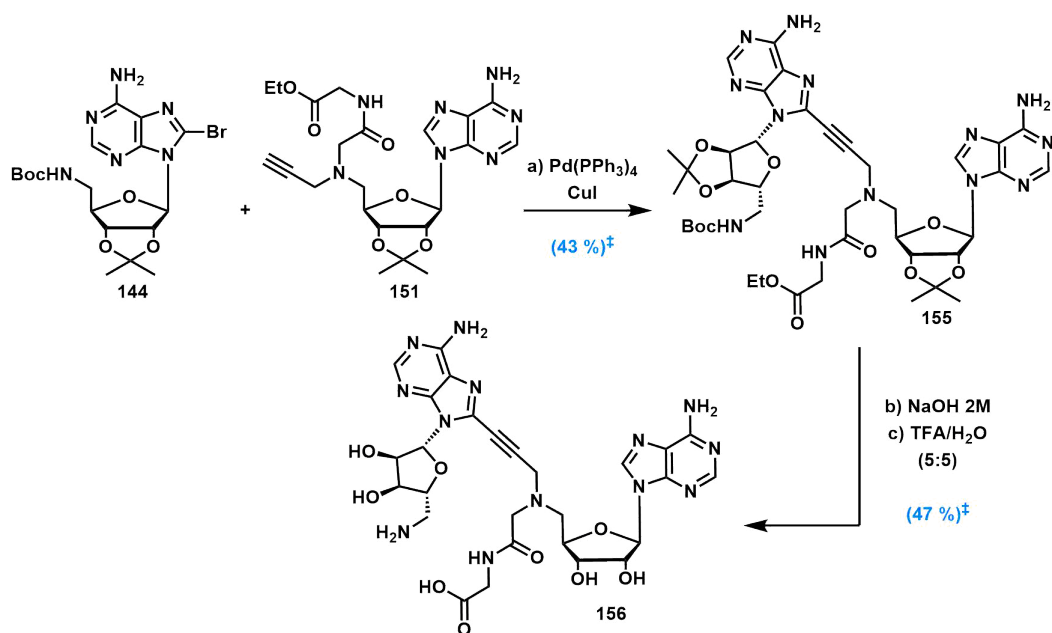


Schéma 5.29 – Synthèse de **151** à partir de **20**

L'alcyne **151** et le dérivé bromé **144** ont ensuite été engagés dans un couplage de Sonogashira pour former la diadénosine **155** avec un rendement de 43 % ainsi que le produit d'homocouplage de l'alcyne (à hauteur de 50 % de l'alcyne engagé). Les groupements protecteurs de **155** ont ensuite été retirés par saponification de la fonction ester avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Nous avons ainsi obtenu le composé **156** avec un rendement de 47 % après purification CLHP.



a) Alcyne **151** (1,5 équiv.), dérivé bromé **144** (1,0 équiv.), NEt_3 (3,0 équiv.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (10 mol %), CuI (5 mol %), THF, 60 °C, 5,5 h, 43 %;
 b) NaOH (2,0 M dans H_2O , 1,0 équiv.), $\text{H}_2\text{O}/1,4$ -dioxane, t.a., 4 h;
 c) $\text{TFA/H}_2\text{O}$ (5:5), 0 °C à t.a., 12 h, 47 %.

Schéma 5.30 – Couplage de Sonogashira entre **144** et **154** suivi de la déprotection du produit de couplage.

La réaction de macrocyclisation de **156** a ensuite été engagée dans le DMF, les deux fonctions réactives étant l'amine d'une part et l'acide carboxylique de l'autre. Dans ce type de réaction, il est nécessaire de travailler en condition très diluée afin de favoriser le couplage intramoléculaire et former le macrocycle. Ainsi, nous avons préparé une solution 2 mM du pré-macrocycle **156** dans le DMF que nous avons ajouté goutte à goutte à une solution 80 mM de PyBOP (sous vive agitation) sur une durée de 8 h. Après cet ajout, la réaction a été laissée 16 heures supplémentaires à température ambiante avant d'être concentrée à sec. Le macrocycle **150** a été obtenu, après purification CLHP, avec un rendement modeste de 10 %.

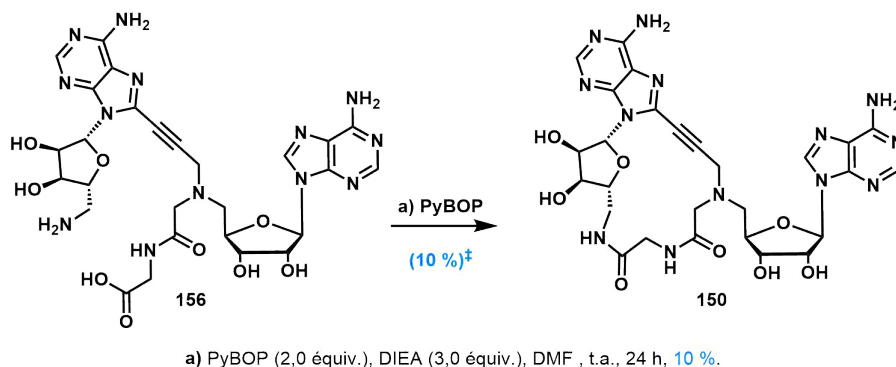


Schéma 5.31 – Obtention de **150** par macrocyclisation de **156**

5.4.3 Macrocycle de type "amine centrale" **150**, déconnection centrale

En parallèle, nous avons étudié la seconde stratégie, de "déconnection centrale", conduisant au macrocycle **150**. Celle-ci repose sur le couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **157** et l'alcyne du composé **152**, décrit précédemment (Schéma 5.32).

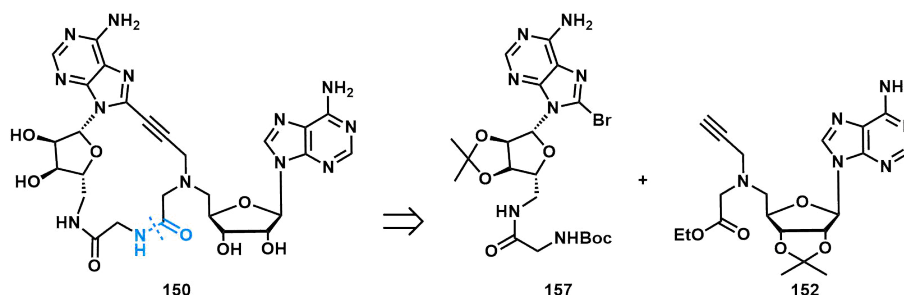
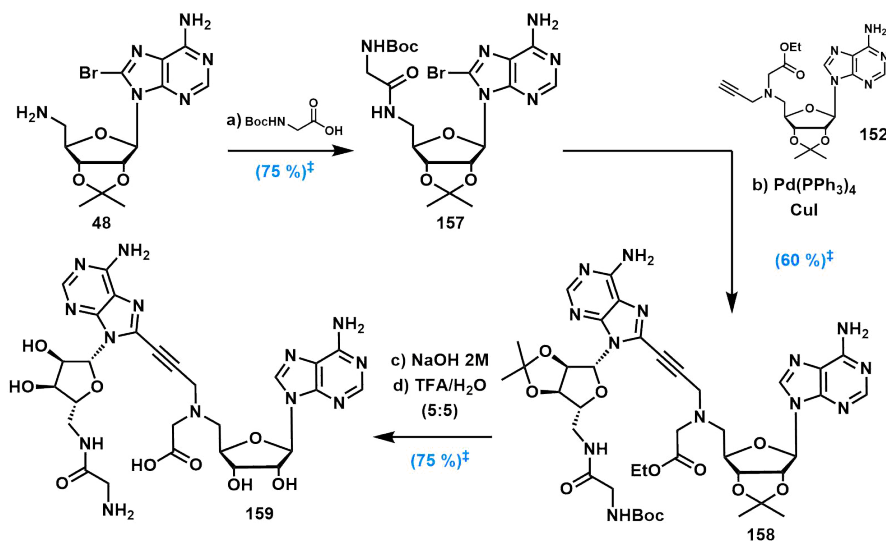


Schéma 5.32 – Rétrosynthèse alternative envisagée de **150**

La première étape consiste en la formation d'un lien amide entre le composé **48** et la *N*-Boc-glycine (Schéma 5.33). A cette occasion, nous avons utilisé le PyBOP comme agent activateur permettant d'obtenir le composé désiré **157** avec un rendement de 75 %. L'alcyne **152** et le dérivé bromé **157** ont ensuite été engagés dans un couplage de Sonogashira pour former la diadénosine **158** avec un rendement de 60 % ainsi que le produit d'homocouplage de l'alcyne (à hauteur de 18 % de l'alcyne engagé). Les groupements protecteurs de **118** ont ensuite été retirés par saponification de la fonction ester avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Nous avons ainsi obtenu le pré-macrocycle déprotégé **159** avec un rendement de 75 % après purification CLHP.



- a) *N*-boc-Gly (1,2 équiv.), DIEA (3,0 équiv.), PyBOP (1,0 équiv.), DMF, t.a., 2 h, 75 %;
 b) Alcyne **152** (1,3 équiv.), dérivé bromé **157** (1,0 équiv.), NEt₃ (3,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), Cul (5 mol%), THF, 60 °C, 5,5 h, 60 %;
 c) NaOH (2,0 M dans H₂O, 1,0 équiv.), H₂O/1,4-dioxane, t.a., 2 h;
 d) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 8 h, 75 %.

Schéma 5.33 – Préparation du pré-macrocycle **159** à partir de **48**

Enfin, l'étape finale de macrocyclisation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, et nous a permis d'obtenir le macrocycle **150** avec un rendement de 22 %, meilleur que le précédent.

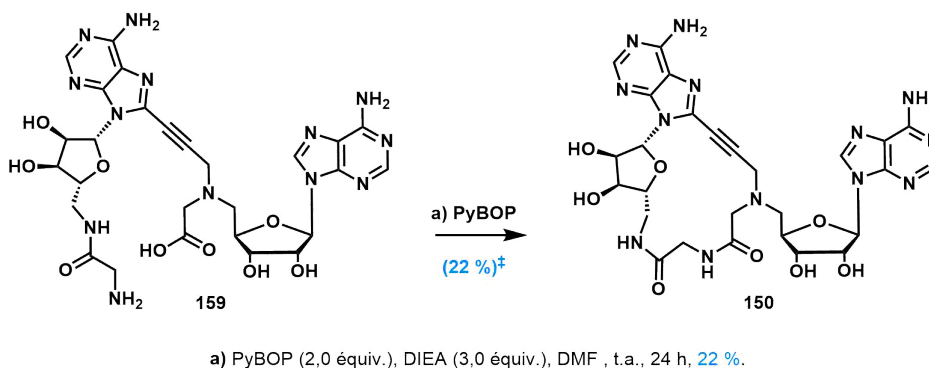


Schéma 5.34 – Obtention de **150** par macrocyclisation de **159**

En conclusion, la comparaison de ces deux stratégies indique que le rendement de cyclisation est supérieur dans la stratégie de déconnection centrale. A partir du couplage de Sonogashira, celle-ci possède un rendement de 10 % en trois étapes là où la "déconnection 5'" n'a un rendement global que de 2 %. Forts de ces résultats, nous avons adopté la seconde stratégie pour la synthèse des macrocycles suivants de cette famille.

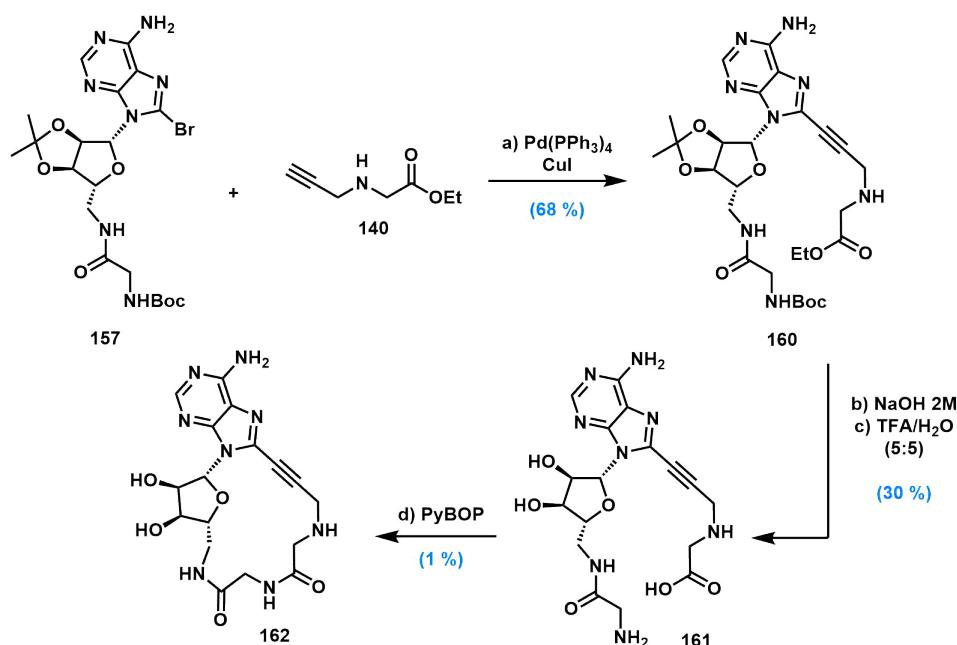
5.4.4 Autres macrocycles de la famille "amine centrale"

Le schéma de synthèse global de cette famille de macrocycles est identique et sera brièvement résumé ci-après.

La synthèse du macrocycle **162** commence par le couplage de Sonogashira entre un excès d'alcyne **140** (2,8 équivalents) et la 8-bromoadénosine **157** (Schéma 5.35). L'alcyne ayant été entièrement consommé après 2 heures à 50 °C, une seconde addition (0,5 équivalent) a été faite. Après deux heures de réaction supplémentaires, le traitement de la réaction et la purification du brut ont permis d'isoler le composé souhaité **160** avec un rendement de 68 %.

Les groupements protecteurs du composé **161** ont ensuite été retirés par traitement basique avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Nous avons ainsi obtenu le composé **161** avec un rendement de 30 % après purification CLHP.

La réaction de macrocyclisation a été réalisée dans des conditions légèrement différentes de celles précédemment décrites. Pour des raisons de solubilité, nous avons dû utiliser un mélange DMF/DMSO (5:5) afin de solubiliser le pré-macrocycle **161**. L'addition de cette solution diluée à une solution concentrée de PyBOP dans un mélange DMF/DMSO a ensuite permis d'obtenir le macrocycle **162** avec un faible rendement de 1 % après purification CLHP.

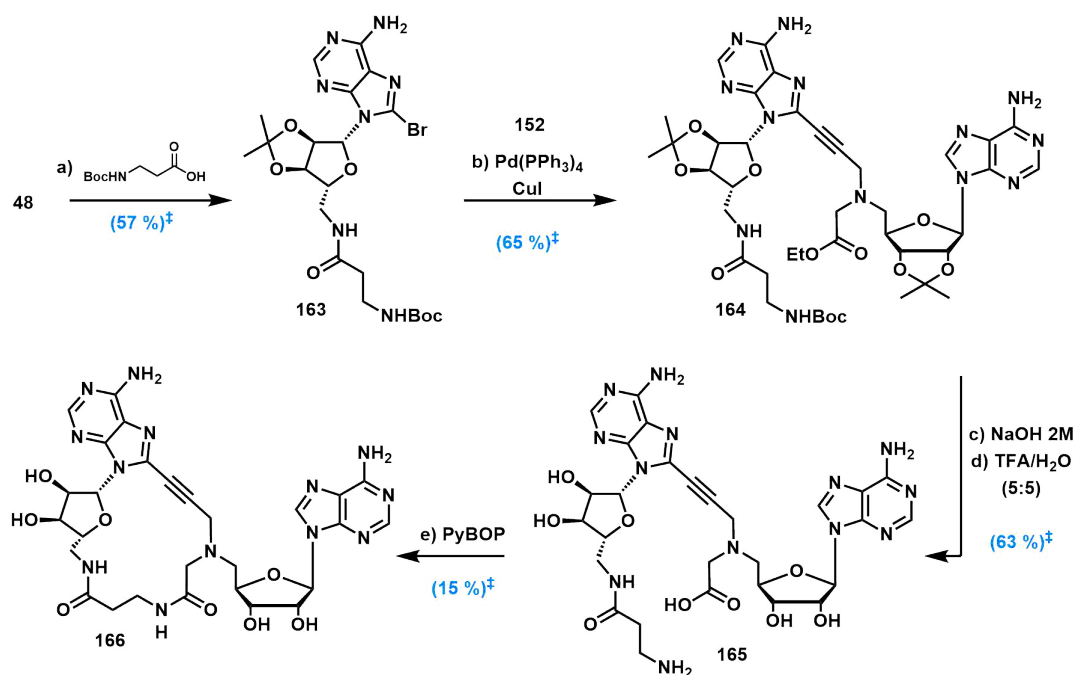


- a) Alcyne **140** (3,3 équiv.), dérivé bromé **157** (1,0 équiv.), NEt_3 (5,4 équiv.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (14 mol%), CuI (18 mol%), THF, 60 °C, 4 h, 68 %;
 b) NaOH (2,0 M dans H_2O , 1,0 équiv.), $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-dioxane}$, t.a., 2 h;
 c) $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$ (5:5), 0 °C à t.a., 8 h, 30 %;
 d) PyBOP (2,0 équiv.), DIEA (3,0 équiv.), DMF, DMSO, t.a., 24 h, 1 %.

Schéma 5.35 – Préparation du macrocycle **162**

La synthèse du macrocycle **166** commence par la préparation du dérivé bromé **163** par couplage de type "peptidique" entre l'amine en position 5' du composé **48** et la *N*-Boc- β -alanine commerciale (Schéma 5.36). Le produit formé co-éluant avec l'oxyde de tripyrrolidinophosphine, produit secondaire de la réaction de couplage avec le PyBOP, nous avons opté pour l'utilisation d'HCTU, un autre réactif de couplage peptidique commercial. Cette réaction nous a permis d'obtenir le composé souhaité **163** avec un rendement de 57 %. Le couplage de Sonogashira entre l'alcyne **140** et la 8-bromoadénosine **157** a ensuite permis d'obtenir le produit de couplage **164** avec un rendement de 65 %. Les groupements protecteurs du composé **164** ont ensuite été retirés par traitement basique avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Nous avons ainsi obtenu le composé **165** avec un rendement de 63 % après purification CLHP.

La réaction de macrocyclisation a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le macrocycle **150** permettant d'obtenir le macrocycle souhaité **166** avec un rendement de 15 % après purification CLHP.

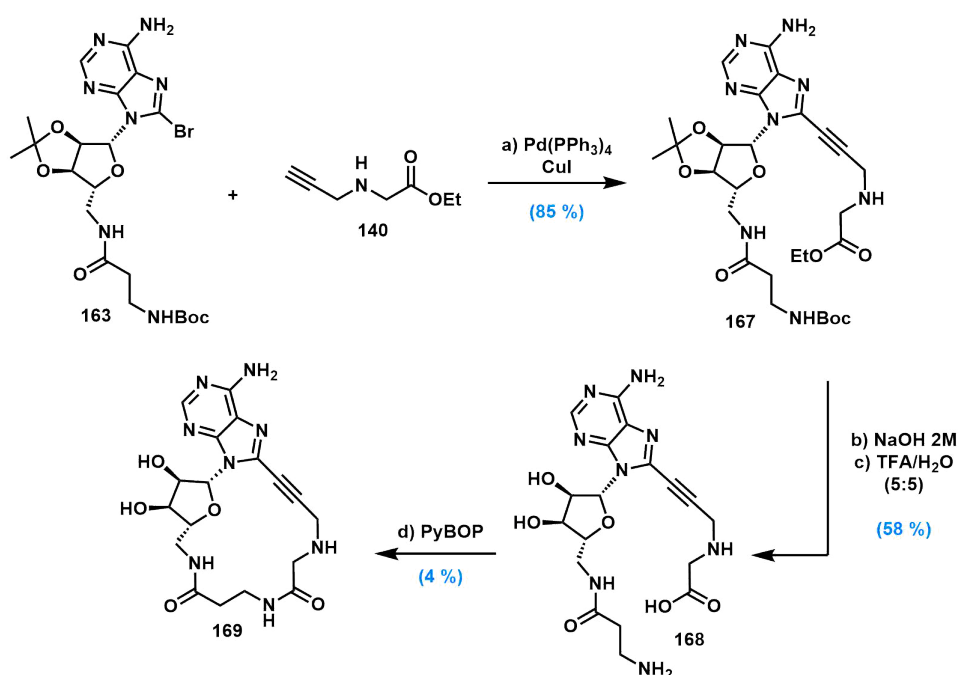


- a) *N*-Boc- β -Ala (1,2 équiv.), DIEA (1,5 équiv.), HCTU (1,0 équiv.), DMF, t.a., 2 h, 57 % ;
 b) Alcyne **152** (2,8 équiv.), dérivé bromé **163** (1,0 équiv.), NEt₃ (5,5 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (9 mol%), Cul (18 mol%), THF, 60 °C, 2,5 h, 65 % ;
 c) NaOH (2,0 M dans H₂O, 1,0 équiv.), H₂O/1,4-dioxane, t.a., 2 h ;
 d) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 5 h, 63 % ;
 e) PyBOP (2,0 équiv.), DIEA (3,0 équiv.), DMF, t.a., 24 h, 15 %.

Schéma 5.36 – Préparation du macrocycle **162**

La synthèse du macrocycle **169** commence par le couplage de Sonogashira entre un excès d'alcyne **140** (1,5 équivalents) et le dérivé bromé **163** décrit précédemment (Schéma 5.37). Cette réaction a permis d'obtenir le produit de couplage **167** avec un rendement de 85 %. Les groupements protecteurs du composé **167** ont ensuite été retirés par traitement basique avec une solution de soude 2 M suivi d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau). Nous avons ainsi obtenu le composé **168** avec un rendement de 58 % après purification CLHP.

La réaction de macrocyclisation a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le macrocycle **162** permettant d'obtenir le macrocycle souhaité **169** avec un rendement de 4 % après purification CLHP.



- a) Alcyne **140** (1,5 équiv.), dérivé bromé **163** (1,0 équiv.), NEt_3 (3,0 équiv.), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (5 mol%), CuI (10 mol%), THF, 60 °C, 3 h, 85 %;
 b) NaOH (2,0 M dans H_2O , 1,0 équiv.), $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-dioxane}$, t.a., 2 h;
 c) $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$ (5:5), 0 °C à t.a., 8 h, 58 %;
 d) PyBOP (2,0 équiv.), DIEA (3,0 équiv.), DMF , DMSO , t.a., 24 h, 4 %.

Schéma 5.37 – Préparation du macrocycle **162**

La voie de synthèse mise au point a donc permis l'obtention de quatre macrocycles différents de la famille "amide". Leurs propriétés *in vitro* ont ensuite été mesurées sur enzyme purifiée (K_i et cristallographie) ainsi que sur culture bactérienne (*S. aureus*). Les résultats seront présentés à la page 283.

5.5 Macrocycle de type urée

En parallèle de la synthèse des macrocycles de la famille "amide", d'autres fonctions ont été envisagées en position 5'. Des expériences de docking *in silico*, ainsi que des données cristallographiques sur des composés portant cette fonction (Cf. Chapitre 4) ont révélé des interactions favorables entre l'inhibiteur et *Lm*NADK. Cette fois, la longueur de chaîne désirée serait plutôt comprise entre sept et huit atomes là où, pour les amides, la longueur favorable était de cinq à six atomes. Concernant le lien central, les malheureux résultats que nous avons obtenu avec la synthèse d'amides disubstitués (Cf. page 270) nous ont poussé à plutôt envisager l'emploi d'amines tertiaires.

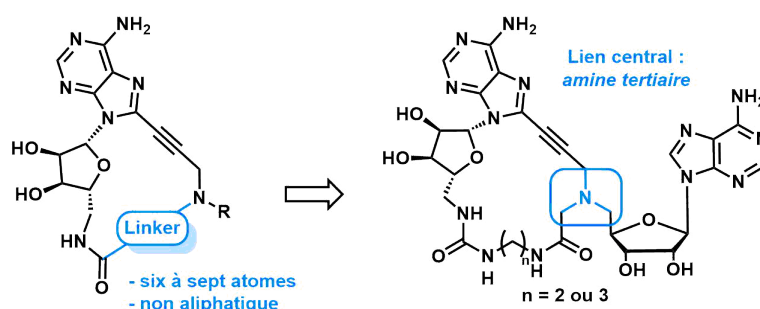


Schéma 5.38 – Troisième famille de macrocycle envisagée

La fonction urée fait parti des fonctions centrales en chimie médicinale. En effet, celle-ci possède à la fois des atomes donneurs et receveurs lui conférant un paramètre d'hydrosolubilité favorable.²⁶⁴ Cette fonction est retrouvée dans de nombreuses molécules d'intérêt thérapeutiques avec plusieurs domaines d'application différents (Figure 5.3).

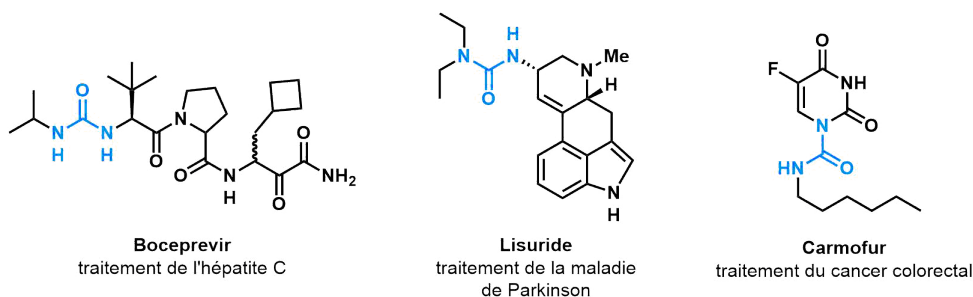


Figure 5.3 – Exemples de molécules actives approuvées par la FDA possédant une fonction urée

Historiquement, les premières protocoles de synthèse de dérivés d'urée reposaient sur la réaction en milieu basique entre une amine et le phosgène (Schéma 5.39). Ce gaz toxique peut être remplacé par d'autres agents moins dangereux tels que le diphosgène ou le triphosgène. Cette réaction permet la formation d'un isocyanate sur lequel réagit un

264. Ghosh, A. K. ; Brindisi, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, 63, 2751-2788.

second équivalent d'amine, conduisant à l'urée symétrique.^{265,266} Le réarrangement de Curtius est une autre méthode de génération d'isocyanates évitant l'emploi du phosgène. Cette réaction consiste en le réarrangement d'azoture d'acyle en isocyanate sous l'action de la chaleur. Le traitement de l'intermédiaire formé par une amine permet ensuite la formation d'une urée.^{267,268}

Il est aussi possible de synthétiser des dérivés d'urées par l'utilisation de *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI).^{269,270} L'addition successive d'amines sur ce réactif commercialement disponible permet la génération de dérivés d'urée. Cependant, la limitation de cette voie est la formation d'urée symétrique en tant que produit secondaire. L'aminolyse de carbamates est une autre voie qui a été développée dans le but de préparer des urées. Celle-ci permet en théorie de s'affranchir de la formation de l'urée symétrique.²⁷¹⁻²⁷³

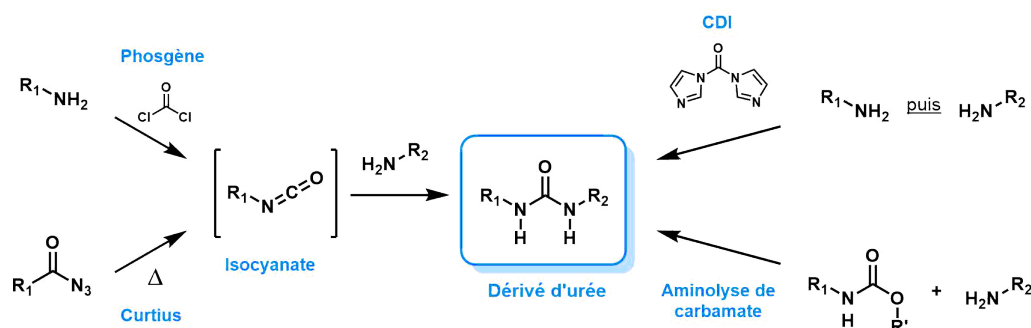


Schéma 5.39 – Exemples de voies de synthèse permettant de préparer des dérivés d'urée

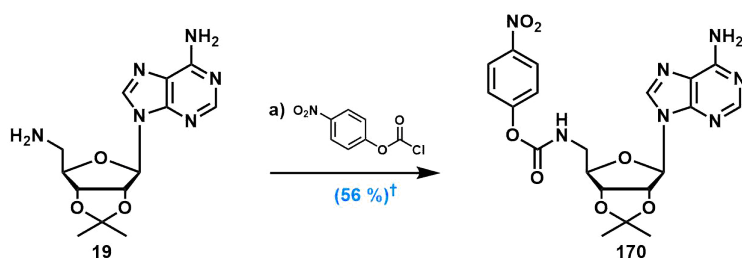
Deux méthodes de synthèse d'urées ont été explorées en parallèle au laboratoire. La première, reposant sur l'utilisation de carbamates activés, a été étudiée par Tara Delpech dans le cadre de son stage de master 2 au laboratoire. La seconde, consistant en la génération d'isocyanates par réarrangement de Curtius, a été étudiée par moi-même.

265. Vishnyakova, T. P.; Golubeva, I. A. *et al. Russian Chemical Reviews* **1985**, 54, 249-261.
 266. Nowick, J. S.; Powell, N. A. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 7364-7366.
 267. Lebel, H.; Leogane, O. *Organic Letters* **2006**, 8, 5717-5720.
 268. Groszek, G. *Organic Process Research & Development* **2002**, 6, 759-761.
 269. Patel, M.; Kaltenbach, R. F. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, 8, 1077-1082.
 270. Matzen, L.; van Amsterdam, C. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 1149-1157.
 271. Gante, J. *Chemische Berichte* **1965**, 98, 3334-3339.
 272. Kitteringham, J.; Shipton, M. R. *et al. Synthetic Communications* **2000**, 30, 1937-1943.
 273. Gallou, I.; Eriksson, M. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 6960-6963.

5.5.1 Synthèse d'urées ...

... par utilisation de carbamates activés

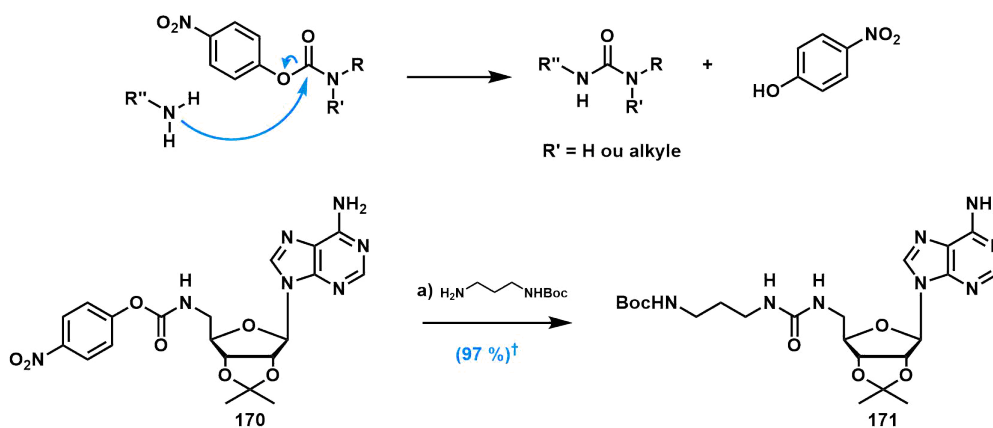
Introduite par Gante J. en 1965,²⁷¹ et perfectionnée par Kruijtzter *et al.* en 1997²⁷⁴, la première voie explorée repose sur la formation d'un carbamate activé par réaction d'une amine primaire sur le chloroformiate de *para*-nitrophényle. Au laboratoire, la réaction de ce composé avec le dérivé d'adénosine **19** (préparation page 91), permet d'obtenir le carbamate souhaité **170** avec un rendement de 56 % ainsi que le produit d'addition de l'amine en position 5' du composé **19** sur le produit formé (à hauteur de 16 %).



a) Chloroformiate de *para*-nitrophényle (1,3 équiv.), DIEA (2,3 équiv.), pyridine (1,5 équiv.), DCE, t.a., 15 min., 56 %.

Schéma 5.40 – Formation du carbamate activé **170** à partir de **19**

Cet intermédiaire peut ensuite être converti en urée par substitution nucléophile du carbamate activé par l'amine souhaitée (Schéma 5.41).^{275,276} Ainsi, le traitement de **170** par la *N*-Boc-propylène diamine a permis d'obtenir l'urée correspondante **171** avec un excellent rendement de 97 %.



a) *N*-Boc-propylène diamine (2,0 équiv.), DIEA (2,5 équiv.), THF, 50 °C, 1,5 h, 97 %.

Schéma 5.41 – Mécanisme de formation de l'urée **171** à partir du carbamate activé **170**

274. Kruijtzter, J. A. W.; Lefeber, D. J. *et al. Tetrahedron Letters* **1997**, 38, 5335-5338.

275. Bhattacharyya, T.; Sundin, A. *et al. Tetrahedron* **2003**, 59, 7921-7928.

276. Dewal, M. B.; Wani, A. S. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 51, 145-153.

... par réarrangement de Curtius

La seconde méthode qui a été étudiée afin de produire des urées passe par la formation d'isocyanate par réarrangement de Curtius. Décrite par Theodor Curtius en 1894,²⁷⁷ cette réaction consiste en le réarrangement d'un azoture d'acyle en isocyanate sous l'action de la chaleur (Schéma 5.42). L'ajout d'une amine au mélange réactionnel conduit à la formation d'un dérivé urée.²⁶⁷

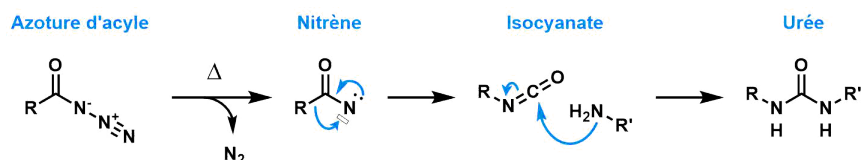
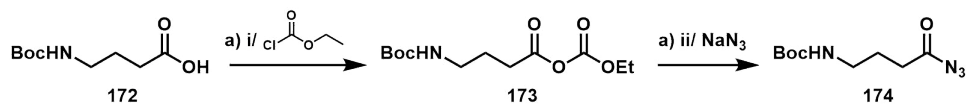


Schéma 5.42 – Mécanisme du ré-arrangement de Curtius

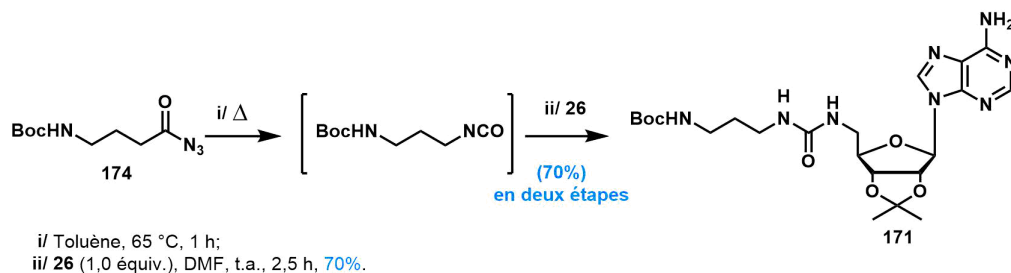
Au laboratoire nous avons converti l'acide γ -*N*-Boc-aminobutyrique (**172**) en azoture d'acyle correspondant (Schéma 5.43). Pour ce faire, l'anhydride mixte **173** a d'abord été formé par réaction du chloroformiate d'éthyle sur l'acide carboxylique en condition basique. Afin d'avoir la meilleure conversion possible, il est essentiel de faire cette étape à froid, le chloroformiate d'éthyle se décomposant à des températures trop élevées. Le composé **173** a ensuite été converti en azoture d'acyle **174**, par réaction avec un excès d'azoture de sodium.



i/ *N*-Boc-GABA (1,0 équiv.), *N*-méthyl morpholine (1,2 équiv.), Chloroformiate d'éthyle (1,2 équiv.), THF, -20 °C, 20 min;
ii/ NaN₃ (2,5 équiv.), H₂O, -5 °C, 30 min.

Schéma 5.43 – Préparation de l'azoture d'acyle **174**

Par la suite, l'azoture d'acyle **174** a été réarrangé en isocyanate, par chauffage du mélange réactionnel (Schéma 5.44). Nous avons ensuite additionné la 5'-amino-5'-désoxy-2',3'-*O*-isopropylidène-adénosine (**26**) au milieu afin de former l'urée **171** avec un rendement de 70 % en deux étapes.



i/ Toluène, 65 °C, 1 h;
ii/ **26** (1,0 équiv.), DMF, t.a., 2,5 h, 70%.

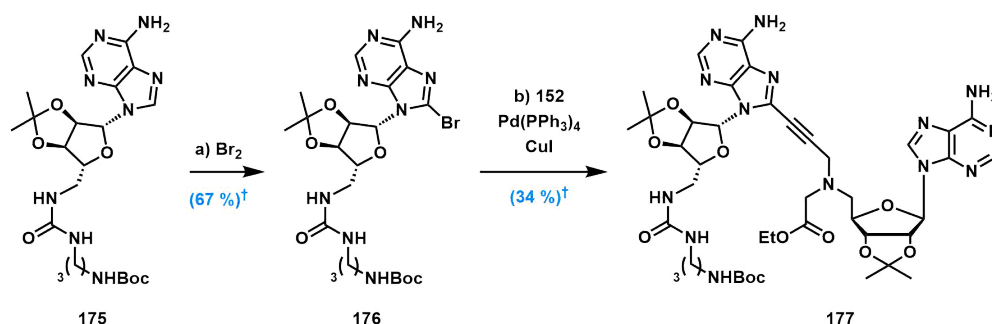
Schéma 5.44 – Réarrangement de **174** en isocyanate permettant la formation de l'urée **171**

277. Curtius, T. *Journal für Praktische Chemie* **1894**, 50, 275-294.

Les deux voies ont permis d'obtenir le composé désiré **175** avec succès. La première possède un rendement en deux étapes de 54 % à partir de l'amine **19** là où la deuxième possède un rendement en deux étapes de 70 % également à partir de **19**.

5.5.2 Synthèse du macrocycle **179**

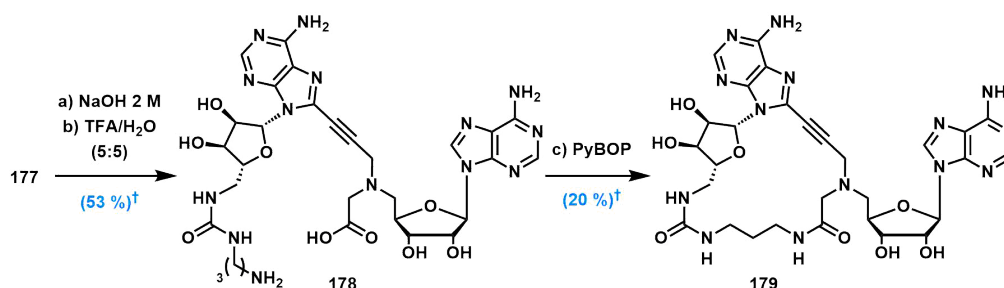
Afin d'obtenir le macrocycle **179** souhaité, il est nécessaire de bromer la position 8 de l'adénine du composé **175** (Schéma 5.45). Cette réaction s'est faite avec du dibrome en milieu tamponné et a permis d'obtenir le composé souhaité avec un rendement de 67 %. Le couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **176** et l'alcyne **152** a ensuite permis d'isoler le produit **177**, avec un rendement de 34 %, ainsi que le produit d'homocouplage de l'alcyne avec un rendement de 48 %.



a) Br₂ (5,0 équiv.), 1,4-dioxane, tampon acétate (0,5 M, pH = 5,3), t.a., 22 h, 67 %;
b) Dérivé bromé **176** (1,5 équiv.), alcyne **152** (1,0 équiv.), NEt₃ (3,0 équiv.), Pd(PPh₃)₄ (5 mol%), Cul (10 mol%), THF, 60 °C, 16 h, 34 %.

Schéma 5.45 – Formation de la diadénosine **177** à partir du composé **175**

Les groupements protecteurs du pré-macrocycle **177** ont ensuite été retirés par saponification de la fonction ester avec une solution de soude 2 M suivie d'un traitement acide avec une solution de TFA (50 % dans l'eau, Schéma 5.46). Nous avons ainsi obtenu le pré-macrocycle déprotégé **178** avec un rendement de 47 % après purification CLHP. Enfin, celui-ci a été macrocyclisé dans les mêmes conditions que précédemment décrites permettant d'obtenir le macrocycle **179** avec un rendement de 20 % également après purification CLHP.



a) NaOH (2,0 M dans H₂O, 1,0 équiv.), H₂O/1,4-dioxane, t.a., 4 h;
b) TFA/H₂O (5:5), 0 °C à t.a., 6 h, 53 %;
c) PyBOP (2,0 équiv.), DIEA (3,0 équiv.), DMF, t.a., 24 h, 20 %.

Schéma 5.46 – Déprotection de **178** suivi de la formation de **179** par réaction de macrocyclisation

Cinq composés macrocycles différents ont ainsi été synthétisés dans l'espoir d'avoir un gain en affinité. A l'instar des composés décrits dans le chapitre 4, les macrocycles **150**, **162**, **166**, **169** et **179** ont été évalués par mesure de leur K_i sur *Lm*NADK. Des expériences soaking ont également été réalisées pour obtenir des structures (cristallographie) et l'activité sur *S. aureus* a été mesurée. Ces composés faisant parti d'une nouvelle famille, ils ont été comparés à la diadénosine **38**, notre meilleur candidat actuel.

5.6 Résultats biochimiques et biologiques

Les composés macrocycliques "tronqués" **162** et **169** ont une affinité pour *Lm*NADK drastiquement moins bonne que le composé **38** (Figure 5.4, K_i largement supérieur à 125 μ M). Les expériences de cristallographie avec *Lm*NADK et la mesure de l'activité sur bactérie corroborent ces résultats. En effet, les deux composés n'ont pas conduit à la formation de complexe cristal/ligand et leur effet sur la croissance bactérienne est quasi-nul (remarque : le macrocycle **162** ayant été obtenu en trop faible quantité il n'a pas pu être testé sur bactéries d'où le diagramme grisé).

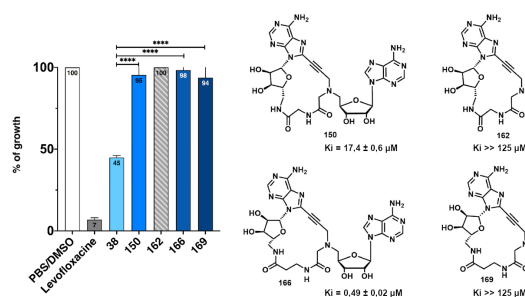


Figure 5.4 – Propriétés des macrocycles "tronqués" **162** et **169** et des macrocycles "entiers" **150** et **166**

Les composés macrocycliques "entiers" **150** et **166** ont une meilleure constante d'inhibition vis-à-vis de *Lm*NADK que leurs analogues tronqués (Figure 5.4). Le composé **166**, avec un bras de six atomes, possède un K_i environ 10 fois meilleur que la diadénosine **35** et 35 fois meilleur que le macrocycle **150**, avec un bras de cinq atomes. Les expériences de cristallographie ont permis d'avoir des structures de complexes cristal/ligand permettant de visualiser les interactions entre le site NAD et les macrocycles synthétisés (Figure 5.5). Le bras plus long, légèrement plus flexible, du macrocycle **166**, permet un meilleur positionnement au sein du site NAD expliquant le meilleur K_i . Cependant, nous n'avons pas eu d'effet lors des mesures d'activité sur culture bactérienne de *S. aureus*.

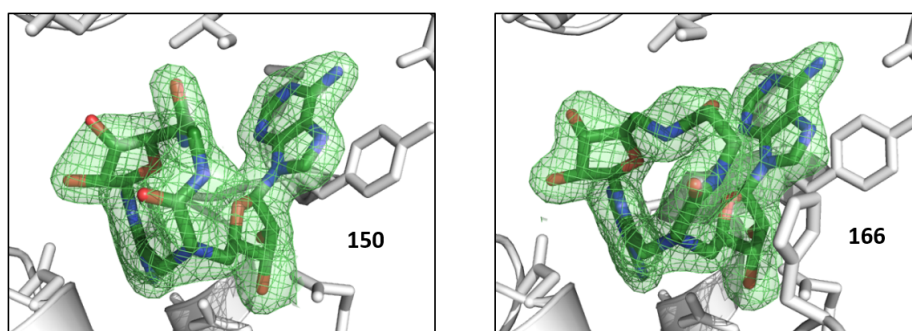


Figure 5.5 – Complexes cristal/ligand entre *LmNADK* et les macrocycles "entiers" **150** et **166**

Le macrocycle de type urée **179** possède la meilleure constante d'inhibition parmi tous les composés synthétisés durant mes trois ans de thèse. Sa valeur est de l'ordre du nanomolaire ($55 \pm 7,0$ nM), cent fois meilleure que le K_i du composé **35**. *In silico*, la fonction urée était censée créer plusieurs liaisons hydrogène avec le site NAD, expliquant la si bonne affinité mesurée. Les expériences de cristallographie étant encore en cours de réalisation, nous n'avons pas encore pu confirmer cette hypothèse. Malheureusement, ce macrocycle n'a aucun effet sur l'inhibition de croissance bactérienne.

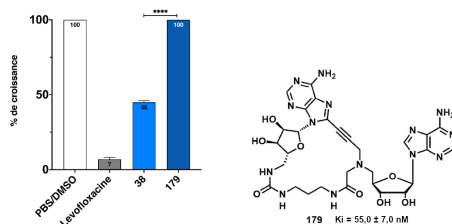


Figure 5.6 – Propriétés du macrocycle **179**

5.7 Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé cinq composés macrocycliques, analogues contraints du composé de référence **NKI-1**, dans le but d'obtenir des molécules présentant de meilleures propriétés d'inhibition que celui-ci.

A cette fin, nous avons mis au point des voies de synthèse permettant de préparer deux familles de composés macrocycliques avec un lien de type "amide" (tronqués ou non) ou de type "urée". Le premier macrocycle obtenu a été le macrocycle **150**. Deux stratégies ont été suivies afin de déterminer quelle était la liaison amide à déconnecter la plus favorable et ont permis de conclure que c'était la déconnection centrale qui donnait lieu à des meilleurs rendements de cyclisation. Nous avons ensuite appliqué cette stratégie pour préparer trois autres macrocycles de cette même famille (**162**, **166** et **169**). Nous avons également synthétisé le macrocycle de type "urée" **179**, avec succès.

Les tests *in vitro* sur enzyme purifiée ont permis de déterminer que l'adénosine du site N était nécessaire au maintien d'une bonne affinité. En effet, les macrocycles

"tronqués" **162** et **169** sont peu affins de la cible ($K_i > 125 \mu\text{M}$). Les trois autres composés macrocycliques ont présenté une bonne, voire excellente, affinité pour *Lm*NADK confirmant l'hypothèse de départ selon laquelle des inhibiteurs plus contraints auraient une meilleure affinité pour l'enzyme modèle. Malheureusement, cette bonne affinité ne s'est pas traduite par une bonne activité *in vitro* sur cultures de *S. aureus*.

A l'instar des composés décrits au chapitre 4, il est possible que les faibles inhibitions de croissance observée soient dues à une mauvaise pénétration membranaire. En effet, les hauts poids moléculaires des macrocycles diminuent probablement leur pénétration membranaire par voie passive, conduisant à une perte d'activité sur bactérie.

Encore une fois, il serait possible d'avoir recours à l'imagerie Raman afin de déterminer la localisation des composés *via* leur fonction alcyne. Dans le cas où la pénétration cellulaire ne serait pas suffisante, il serait nécessaire de concevoir des molécules portant des fonctions favorisant un transport à travers la membrane.

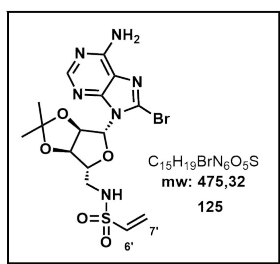
Experimental section

5'-Azido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylideneadenosine (49)

Synthesis and characterisation of the compound described page 148.

5'-Amino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (48)

Synthesis and characterisation of the compound described page 150.

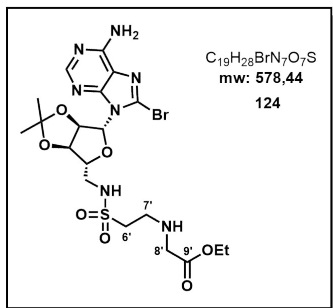
5'-Deoxy-5'-vinylsulfonamido-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (125)

A solution of **48** (378 mg, 0.92 mmol, 1.0 equiv.) and NEt₃ (258 μ L, 1.84 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (9.2 mL) was cooled down to 0°C before adding 2-chloroethanesulfonyl chloride (0.96 μ L, 0.92 mmol, 1.0 equiv.). After 16 hours at room temperature, water was added (30 mL) and the aqueous layer was extracted twice with DCM (2x 30 mL). Organic layers were combined and washed with brine (40 mL) before being dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (16 g SiO₂, 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **125** (253 mg, 53%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.99-3.06 (m, 1H, H-5'), 3.13-3.19 (s, 1H, H-5''), 4.26 (td, J_{4',3'} = 2.8 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.1 Hz, 1H, H-4'), 5.09 (dd, J_{3',2'} = 6.2 Hz, J_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.64 (dd, J_{2',1'} = 2.3 Hz, J_{2',3'} = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 5.87 (d, J_{7',6'} = 9.9 Hz, 1H, H-7'), 5.93 (d, J_{7'',6'} = 16.5 Hz, 1H, H-7''), 6.04 (d, J_{1',2'} = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 6.62 (dd, J_{6',7'} = 9.9 Hz, J_{6',7''} = 16.5 Hz, 1H, H-6') 7.55 (s, 2H, NH₂-6), 7.74-7.77 (m, 1H, NH-5'), 8.14 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.6 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 44.6 (C-5'), 82.4 (C-3'), 82.8 (C-2'), 86.0 (C-4'), 91.6 (C-1'), 113.8 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 125.9 (C-7'), 126.8 (C-8), 137.1 (C-6'), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₅H₁₉⁷⁹BrN₆O₅S+H]⁺ 475.0399 found 475.0409.

5'-(2-(2-(Ethyl ethanoate)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (124**)**

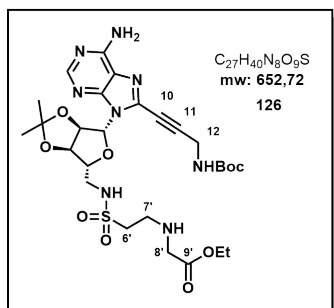
To a suspension of **125** (250 mg, 0.53 mmol, 1.0 equiv.), in MeCN (5.0 mL) was added glycine ethyl ester hydrochloride (734 mg, 5.26 mmol, 10.0 equiv.) followed by NEt_3 (710 μ L, 5.26 mmol, 10.0 equiv.). After 16 hours at room temperature, water (5.0 mL) was added and the reaction was stirred up to completion (48 additional hours). Water was added (50 mL) and the aqueous layer was extracted three times with DCM (3x 50 mL). Organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (15 g SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **124** (235 mg, 77%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 OEt), 1.34 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.56 (s, 3H, CH_3 isop.), 2.79-2.83 (m, 2H, CH_2-7'), 3.07-3.11 (m, 2H, CH_2-6'), 3.13-3.20 (m, 1H, H-5'), 3.24-3.29 (m, 3H, H-5'' and CH_2-8'), 4.06 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 OEt), 4.26 (td, $J_{4',3'} = 2.9$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.0$ Hz, 1H, H-4'), 5.09 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.9$ Hz, 1H, H-3'), 5.63 (dd, $J_{2',1'} = 2.5$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, $J_{1',2'} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.50-7.60 (m, 3H, NH_2-6 and NH_2-5'), 8.14 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 14.6 (CH_3 OEt), 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 43.4 (CH_2-7'), 44.6 (C-5'), 50.3 (CH_2-8'), 51.7 (C-6'), 60.4 (CH_2 OEt), 82.4 (C-3'), 82.8 (C-2'), 86.1 (C-4'), 91.5 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.7 (C-8), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6), 170.3 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{19}H_{28}^{79}BrN_7O_7S+H]^+$ 578.1033 found 578.1025.

5'-(2-(2-(Ethyl ethanoate)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-(1-*N*-boc-aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (126**)**

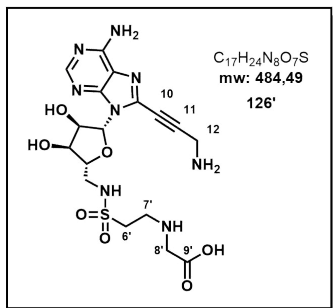


To a solution of *N*-boc-propargylamine (123 mg, 0.79 mmol, 1.5 equiv.) and bromo derivative **124** (304 mg, 0.53 mmol, 1.0 equiv.) in THF (6.0 mL) was added triethylamine (222 μ L, 1.59 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (10 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (30 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 3.5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 3 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **126** (265 mg, 77%) as a pale yellow foam.

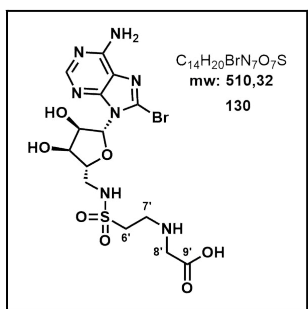
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.42 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.57 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.88-2.92 (m, 2H, CH₂-7'), 3.15-3.19 (m, 2H, CH₂-6'), 3.20-3.24 (m, 1H, H-5'), 3.26-3.29 (m, 1H, H-5''), 3.41 (s, 2H, CH₂-8'), 4.06-4.12 (m, 4H, CH₂ OEt and CH₂-12), 4.24 (td, *J*_{4',3'} = 3.0 Hz, *J*_{4',5'} = *J*_{4',5''} = 5.8 Hz, 1H, H-4'), 5.07 (dd, *J*_{3',2'} = 6.2 Hz, *J*_{3',4'} = 2.9 Hz, 1H, H-3'), 5.50 (dd, *J*_{2',1'} = 2.8 Hz, *J*_{2',3'} = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 6.15 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 2.8 Hz, 1H, H-1'), 7.49-7.54 (m, 1H, NH-12), 7.55-7.61 (m, 2H, NH₂-6), 7.64-7.70 (m, 1H, NH-5'), 8.18 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 30.7 (CH₂-12), 43.1 (CH₂-7'), 44.7 (C-5'), 49.7 (C-8'), 50.9 (C-6'), 60.8 (CH₃ OEt), 70.9 (C-10), 79.1 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 83.0 (C-2'), 85.6 (C-4'), 90.2 (C-1'), 94.9 (C-11), 114.0 (Cq isop.), 119.3 (C-5), 133.0 (C-8), 148.6 (C-4), 154.1 (C-2), 155.8 (Cq carbamate), 156.5 (C-6), 171.3 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₇H₄₀N₈O₉S+H]⁺ 653.2717 found 653.2715.

5'-(2-(2-(Acetic acid)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-(1-aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (126'**)**

To a suspension of **126** (307 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) in water (2.4 mL) and 1,4-dioxane (1.2 mL) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 235 μ L, 0.47 mmol, 1.0 equiv.). After 2 hours at room temperature a second addition of NaOH 2 M solution (0.1 equiv.) was made. After 3 additional hours, volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 5.0 mL). After 4 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (5-40% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min). Unfortunately, the compound was probably degraded at this step.

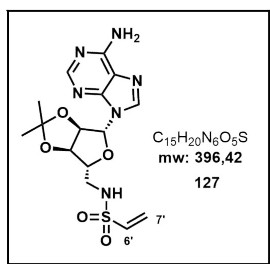
5'-(2-(2-(Acetic acid)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-8-bromoadenosine (130**)**

To a solution of **124** (30 mg, 0.05 mmol, 1.0 equiv.) in water (260 μ L) and 1,4-dioxane (100 μ L) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 26 μ L, 0.05 mmol, 1.0 equiv.). After 2 hours at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 5.0 mL). After 3 hour at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (10-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 7.3 min) to yield fully deprotected compound **130** as a white foam (12.8 mg, 49%).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.00-3.05 (m, 2H, H-7'), 3.26 (s, 2H, CH₂-8'), 3.28-3.39 (m, 4H, CH₂-5' and CH₂-6'), 4.07-4.11 (m, 1H, H-4'), 4.22 (dd, J_{3',2'} = 5.3 Hz, J_{3',4'} = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 5.09 (dd, J_{2',1'} = 6.6 Hz, J_{2',3'} = 5.3 Hz, 1H, H-2'), 5.84 (d, J_{1',2'} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.58 (s, 2H, NH₂-6), 8.13 (s, 1H, H-2), 8.18 (s, 1H, NH-7').

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 42.7 (CH₂-7'), 45.0 (C-5'), 50.1 (C-6'), 50.2 (C-8'), 71.3 (C-2'), 71.6 (C-3'), 84.9 (C-4'), 90.9 (C-1'), 120.1 (C-5), 127.5 (C-8), 150.3 (C-4), 152.9 (C-2), 155.7 (C-6), 170.9 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{14}H_{20}^{79}BrN_7O_7S+H]^+$ 510.0506 found 510.0506.

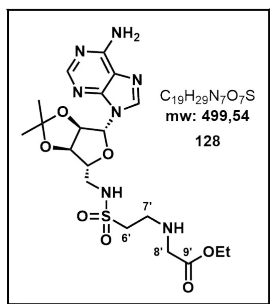
5'-Deoxy-5'-vinylsulfonamido-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (127)

A solution of **19** (153 mg, 0.50 mmol, 1.0 equiv.) and NEt_3 (139 μ L, 1.0 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (5.0 mL) was cooled down to 0°C before adding 2-chloroethanesulfonyl chloride (0.52 μ L, 0.5 mmol, 1.0 equiv.). After 4 hours at room temperature, DCM was added (50 mL) and the aqueous layer was washed once with water (10 mL) and once with brine (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (9 g SiO_2 , 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **127** (253 mg, 73%) as a white foam.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.55 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.04-3.11 (m, 1H, H-5'), 3.19 (dt, $J_{5'',4'} = J_{5'',NH-5'} = 5.6$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.6$ Hz, 1H, H-5''), 4.25 (td, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.7$ Hz, $J_{4',3'} = 2.9$ Hz, 1H, H-4'), 5.02 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 2.9$ Hz, 1H, H-3'), 5.41 (dd, $J_{2',1'} = 3.0$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 5.90 (d, $J_{7',6'} = 10.0$ Hz, 1H, H-7'), 5.98 (d, $J_{7',6'} = 16.5$ Hz, 1H, H-7''), 6.16 (d, $J_{1',2'} = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 6.67 (dd, $J_{6',7'} = 10.0$ Hz, $J_{6',7''} = 16.5$ Hz, 1H, H-6'), 7.38 (s, 2H, NH_2 -6), 7.84-7.87 (m, 1H, NH -5'), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8).

^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 25.7 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 44.7 (C-5'), 82.1 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.9 (C-4'), 90.0 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.0 (C-7'), 137.1 (C-6'), 140.6 (C-8), 149.0 (C-4), 153.1 (C-2), 156.7 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{15}H_{20}N_6O_5S+H]^+$ 397.1289 found 397.1288.

5'-(2-(2-(Ethyl ethanoate)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-O-isopropylideneadenosine (128)

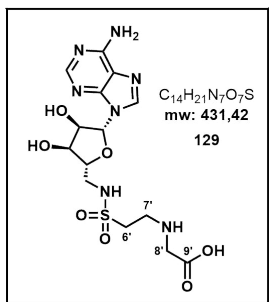
To a suspension of **127** (74 mg, 0.19 mmol, 1.0 equiv.), in MeCN (1.0 mL) and water (1.0 mL) was added glycine ethyl ester hydrochloride (261 mg, 1.87 mmol, 10.0 equiv.) followed by NEt_3 (252 μ L, 1.87 mmol, 10.0 equiv.). After 24 hours at room temperature, water (30 mL) and the aqueous layer was extracted twice times with DCM (2x 30 mL). Organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **128** (58 mg, 62%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.82-2.86 (m, 2H, CH₂-7'), 3.10-3.14 (m, 2H-CH₂-6'), 3.17-3.24 (m, 1H, H-5'), 3.27-3.33 (m, 3H, CH₂-8' and H-5''), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.24 (td, *J*_{4',3'} = 2.8 Hz, *J*_{4',5'} = *J*_{4',5''} = 5.6 Hz, 1H, H-4'), 5.02 (dd, *J*_{3',2'} = 6.3 Hz, *J*_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.40 (dd, *J*_{2',1'} = 3.0 Hz, *J*_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.16 (d, *J*_{1',2'} = 3.0 Hz, 1H, H-1'), 7.37 (s, 2H, NH₂-6), 7.57-7.65 (m, 1H, NH-5'), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.33 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.6 (CH₃ OEt), 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 43.44 (CH₂-7'), 44.73 (C-5'), 50.31 (CH₂-8'), 51.71 (CH₂-6'), 60.40 (CH₂ OEt), 82.08 (C-3'), 83.3 (C-2'), 85.0 (C-4'), 90.0 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 140.5 (C-8), 149.1 (C-4), 153.1 (C-2), 156.7 (C-6), 172.4 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₉H₂₉N₇O₇S+H]⁺ 500.1927 found 500.1933.

5'-(2-(2-(Acetic acid)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-O-isopropylideneadenosine (129**)**

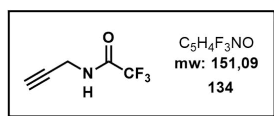


To a solution of **128** (50 mg, 0.1 mmol, 1.0 equiv.) in water (500 μ L) and 1,4-dioxane (300 μ L) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 50 μ L, 0.1 mmol, 1.0 equiv.). After 10 minutes at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 7.0 mL). After 3 hour at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 10.2 min) to yield fully deprotected compound **129** as a white foam (28 mg, 55%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.02-3.08 (m, 2H, CH₂-7'), 3.22-3.27 (m, 3H, CH₂-8' and H-5'), 3.30-3.37 (m, 3H, CH₂-6' and H-5''), 4.04-4.07 (m, 1H, H-4'), 4.16 (dd, *J*_{3',2'} = 5.1 Hz, *J*_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 4.70 (dd, *J*_{2',1'} = 6.6 Hz, *J*_{2',3'} = 5.2 Hz, 1H, H-2'), 5.88 (d, *J*_{1',2'} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.37 (s, 2H, NH₂-6), 8.15 (s, 1H, H-2), 8.34 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 42.6 (CH₂-7'), 45.1 (C-5'), 50.0 (CH₂-6'), 50.5 (CH₂-8'), 71.6 (C-3'), 73.0 (C-2'), 84.3 (C-4'), 88.7 (C-1'), 120.0 (C-5), 140.8 (C-8), 149.4 (C-4), 152.8 (C-2), 156.7 (C-6), 177.0 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₄H₂₁N₇O₇S+H]⁺ 432.1302 found 432.1308.

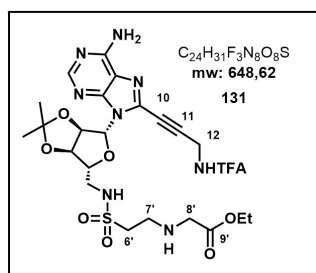
Propargyl-*N*-(trifluoroacetyl)-amine (134)

A solution of propargylamine (4 mL, 62.45 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (21.8 mL, 124.9 mmol, 2 equiv.) in THF (156 mL) was cooled down to 0 °C before adding trifluoroacetic anhydride (13.0 mL, 93.68 mmol, 1.5 equiv.). After 3 hours at room temperature, a solution of HCl (1 N, 300 mL) was added and the aqueous layer was extracted three times with AcOEt (3x 150 mL). Organic phases were combined and washed once with NaHCO₃ sat. solution (200 mL) and once with brine (200 mL) before being dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (200 g SiO₂ pure dichloromethane, isocratic) to yield compound **134** (8.9 g, 94%) as a yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.35 (t, J = 2.6 Hz, 1H, CH), 4.17 (dd, J = 2.6 Hz, J = 5.4 Hz, 2H, CH₂), 6.79 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 29.7 (CH₂), 73.2 (C-H), 77.0 (Cq alkyne), 115.5 (q, J = 288 Hz, CF₃), 156.9 (q, J = 38 Hz, COCF₃).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₅H₄F₃NO+H]⁺ found.

5'-(2-(2-(Ethyl ethanoate)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-(1-*N*-(trifluoroacetyl)-aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (131)

To a solution of alkyne **134** (110 mg, 0.73 mmol, 1.8 equiv.) and bromo derivative **139** (235 mg, 0.41 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4.1 mL) was added triethylamine (203 μL, 1.46 mmol, 3.6 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (9 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (28 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 6 hours at 60 °C a second addition of Pd(PPh₃)₄ (10 mol%) and alkyne **134** (1.0 equiv) was made. After 16 additional hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **131** 102 mg, 32%) as a white foam.

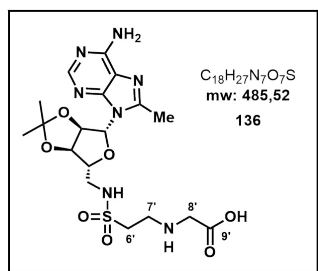
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.31 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.51 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.82-2.87 (m, 2H, CH₂-7'), 3.09-3.19 (m, 3H, CH₂-6' and H-5'), 3.23-2.28 (m, 1H, H-5''), 3.31 (s, 2H, CH₂-8'), 4.07 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.21-4.25 (m, 1H, H-4'), 4.63 (d, J_{12',12''} = 17.7 Hz, 1H, H-12'), 4.76 (d, J_{12'',12'} = 17.7

Hz, 1H, H-12''), 5.07 (dd, $3',2' = 6.3$ Hz, $J3',4' = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.54 (dd, $J2',3' = 6.3$ Hz, $J2',1' = 2.8$ Hz, 1H, H-2'), 6.14 (d, $J1',2' = 2.8$ Hz, 1H, H-1'), 7.36 (s, 2H, NH₂-6), 7.52 (s, 1H, NH-12), 7.69-7.73 (m, 1H, NH-5'), 8.14 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 25.1 (CH₂-12), 25.6 (CH₃ isop), 27.3 (CH₃ isop.), 43.3 (C-7'), 44.6 (C-5'), 50.1 (C-8'), 51.5 (C-6'), 60.5 (CH₂ OEt), 82.1 (C-3'), 83.0 (C-2'), 85.2 (C-4'), 89.9 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 118.5 (C-5), 126.7 (C-8), 146.2 (CF₃), 150.0 (C-4), 151.5 (COCF₃), 152.9 (C-2), 156.2 (C-6), 172.0 (C-9'). (Note : C-10 and C-11 are missing from the spectra).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₄H₃₁F₃N₈O₈S+H]⁺ 649.2016 found 649.2006.

5'-(2-(2-(Acetic acid)amino)ethane-1-sulfonamido)-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-methyladenosine (136**)**



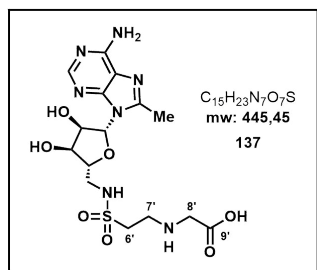
To a suspension of **131** (100 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv.) in water (770 μ L) and 1,4-dioxane (400 μ L) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 77 μ L, 0.15 mmol, 1.0 equiv.). After 3 hours at room temperature, volatiles were removed and a quarter of the crude was purified by reverse phase HPLC (10-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 7.2$ min) to yield 8-methylated compound **136** (2.6 mg, 14%) as a white foam. See description of **137** for the acidic treatment of the other three quaters of the crude.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.57 (s, 3H, CH₃-8), 2.92-2.97 (m, 2H, CH₂-7'), 3.15-3.22 (m, 4H, CH₂-5' and CH₂-6'), 3.23 (s, 1H, CH₂-8'), 4.20-4.24 (m, 1H, H-4'), 5.06 (dd, $J3',2' = 6.3$ Hz, $J3',4' = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.56 (dd, $J2',1' = 2.7$ Hz, $J2',3' = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.05 (d, $J1',2' = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.22 (d, 2H, NFH2-6), 7.82 (s, 1H, NH-5'), 8.11 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.6 (CH₃-8) 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 42.8 (CH₂-7'), 44.6 (C-5'), 50.3 (CH₂-8'), 50.4 (CH₂-6'), 82.2 (C-3'), 82.9 (C-2'), 85.1 (C-4'), 89.7 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 118.3 (C-5), 149.0 (C-8), 150.0 (C-4), 152.3 (C-2), 155.8 (C-6), 171.0 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₈H₂₇N₇O₇S+H]⁺ 486.1771 found 486.1776.

5'-(2-(2-(Acetic acid)amino)ethane-1-sulfonamido)5'-deoxy-8-methyladenosine (137)



Three quaters of the crude material from **136** were cooled down to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 1.2 mL). After 1 hour at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 11.8 min) to yield fully deprotected compound **137** as a light yellow powder (11.4 mg, 23%).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.55 (s, 3H, CH₃-8), 3.0-3.08 (m, 2H, H-7'), 3.25 (s, 2H, CH₂-8'), 3.27-3.39 (m, 4H, CH₂-5' and CH₂-6'), 4.09-4.13 (m, 1H, H-4'), 4.15-4.19 (m, 1H, H-3'), 4.86 (dd, $J_{2',3'} = 5.2$ Hz, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, 1H H-2'), 5.76 (d, $J_{1',2'} = 6.9$ Hz, 1H, H-1'), 7.27 (s, 2H, NH₂-6), 8.08 (s, 1H, C-2).

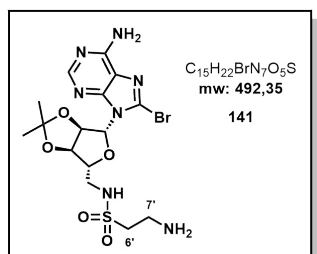
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 14.7 (CH₃-8), 42.7 (CH₂-7'), 45.1 (C-5'), 49.9 (CH₂-6'), 50.4 (CH₂-8'), 71.6 (C-3'), 72.1 (C-2'), 84.6 (C-4'), 89.1 (C-1'), 118.6 (C-5), 149.3 (C-8), 149.9 (C-4), 151.8 (C-2), 155.9 (C-6), 170.9 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{15}H_{23}N_7O_7S+H]^+$ 446.1458 found 446.1433.

5'-Deoxy-5'-(2-phthalimidoethyl)sulfonamido-2',3'-O-isopropylidene-8-Bromo adenosine (47)

Synthesis and characterisation of the compound described page 151.

5'-(2-aminoethyl)sulfonamido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (141)



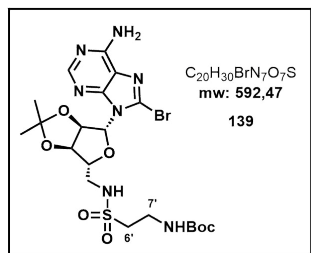
To a suspension of **47** (525 mg, 0.84 mmol, 1.0 equiv.) in absolute ethanol (6 mL) was added hydrazine hydrate (419 μ L, 13.4 mmol, 16.0 equiv.). After 1 hour at room temperature, volatiles were removed. The residue was dissolved in water (100 mL) and extracted four times with DCM (4x 100 mL). Organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (20 g SiO₂ 70-230 mesh, 10% methanol in dichloromethane, isocratic) to yield compound **141** (172 mg, 42 %) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.77-2.82 (m, 2H, CH₂-7'), 2.97-3.02 (m, 2H, CH₂-6'), 3.14 (dd, J_{5',4'} = 6.3 Hz, J_{5',5''} = 13.4 Hz, 1H, H-5'), 3.26 (dd, J_{5'',4'} = 6.2 Hz, J_{5'',5'} = 13.4 Hz, 1H, H-5'), 4.25 (td, J_{4',3'} = 2.9 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.2 Hz, 1H, H-4'), 5.10 (dd, J_{3',2'} = 6.1 Hz, J_{3',4'} = 2.9 Hz, 1H, H-3'), 5.64 (dd, J_{2',1'} = 2.4 Hz, J_{2',3'} = 6.1 Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, J_{1',2'} = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 7.55 (s, 2H, NH₂-6), 8.15 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 37.1 (CH₂-7'), 44.6 (C-5'), 54.9 (CH₂-6'), 82.4 (C-3'), 82.8 (C-2'), 86.2 (C-4'), 91.5 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.7 (C-8), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₁₅H₂₂⁷⁹BrN₇O₅S+H]⁺ 492.0665 found 492.0667.

5'-(2-boc-aminoethyl)sulfonamido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (139)

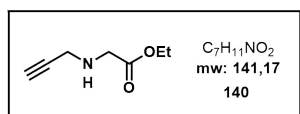


To a solution of **141** (230 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (4.7 mL) was added Boc₂O (122 mg, 0.56 mmol, 1.2 equiv.). After 18 hours at room temperature, the reaction was diluted with DCM (50 mL) and washed twice with water (2x 50mL). Organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (12 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **139** (203 mg, 73 %) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.35 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.06-3.10 (m, 2H, CH₂-6'), 3.13-3.30 (m, 4H, CH₂-5' and CH₂-7'), 4.24-4.28 (m, 1H, H-4'), 5.10 (dd, J_{3',2'} = 6.2 Hz, J_{3',4'} = 2.8 Hz, 1H, H-3'), 5.62 (dd, J_{2',1'} = 2.4 Hz, J_{2',3'} = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 6.04 (d, J_{1',2'} = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 6.79-6.71 (m, 1H, NH-7'), 7.56 (s, 2H, NH₂-6), 7.59-7.62 (m, 1H, NH-5'), 8.14 (H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CJ3 isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 35.5 (CH₂-7'), 44.5 (C-5'), 51.1 (CH₂-6'), 78.6 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.8 (C-2'), 86.1 (C-4'), 91.5 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.7 (C-8), 150.1 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6), 155.8 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₀H₃₀⁷⁹BrN₇O₇S+H]⁺ 592.1189 found 592.1195.

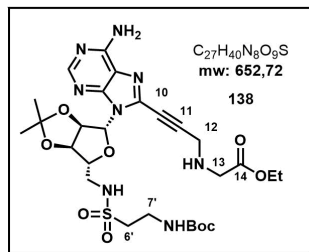
Ethyl 2-*N*-propargylaminoacetate (140)

To a solution of propargylamine (641 μ L, 10 mmol, 1.0 equiv.) and NEt_3 (2.09 mL, 15.0 mmol, 1.5 equiv.) in MeCN (33 mL) was added ethyl bromoacetate (1.66 mL, 15 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at 60°C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (100 g SiO_2 , 0 to 1% methanol in dichloromethane) to yield compound **140** 799 mg, 57%) as a pale oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.29 (t, $H = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 OEt), 1.79 (s, 1H, NH), 2.23 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH_2 -5), 3.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, CH_2 -3), 3.51 (s, 2H, CH_2 -2), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 OEt).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.2 (CH_3 OEt), 37.7 (CH_2 -3), 49.3 (CH_2 -2), 60.8 (CH_2 OEt), 71.9 (CH -5) 81.2 (C -4), 171.9 (C -1).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 142.0868 found 142.0874.

5'-(2-Boc-aminoethyl)sulfonamido-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-(1-(ethyl ethanoate)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (138)

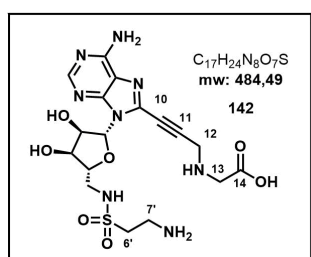
To a solution of alkyne **140** (69 mg, 0.49 mmol, 1.5 equiv.) and bromo derivative **139** (192 mg, 0.32 mmol, 1.0 equiv.) in THF (3.2 mL) was added triethylamine (136 μ L, 0.97 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (6 mg, 10 mol%) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (19 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 2.5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (18 g SiO_2 , 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **138** 163 mg, 50%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 OEt), 1.33 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.34 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.56 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.07-3.12 (m, 2H, CH_2 -6'), 3.16-3.27 (m, 4H, CH_2 -5' and CH_2 -7'), 3.46 (s, 2H, CH_2 -13), 3.78 (s, 2H, CH_2 -12), 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 OEt), 4.24-4.28 (m, 1H, H-4'), 5.08 (dd, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.51 (dd, $J_{2',1'} = 2.8$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.16 (d, $J_{1',2'} = 2.8$ Hz, 1H, H-1'), 6.80-6.82 (m, 1H, NH-7'), 7.58 (s, 2H, NH_2 -6), 7.70-7.74 (m, 1H, NH -5'), 8.17 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.6 (CH₃ OEt), 25.7 (CH₃ isop), 27.5 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 35.5 (CH₂-7'), 37.9 (CH₂-12), 44.6 (C-5'), 49.2 (C-13), 51.1 (C-6'), 60.6 (CH₂ OEt), 72.6 (C-10), 78.6 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.9 (C-2'), 85.5 (C-4'), 90.4 (C-1'), 94.2 (C-11'), 114.0 (Cq isop.), 119.3 (C-5), 133.1 (C-8), 148.5 (C-4), 154.1 (C-2), 155.8 (Cq carbamate), 156.5 (C-6), 171.9 (C-14).

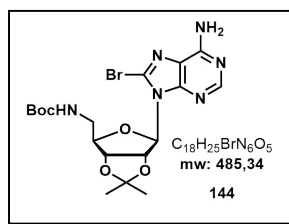
HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₇H₄₀N₈O₉S+H]⁺ 653.2717 found 653.2723.

5'-(2-Aminoethyl)sulfonamido-5'-deoxy-8-(1-(ethanoic acid)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (**142**)



To a suspension of **138** (107 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv.) in water (1.6 mL) and 1,4-dioxane (1.6 mL) was slowly added a solution of NaOH (1 M in water, 164 μ L, 0.16 mmol, 1.0 equiv.). After 3 hours at room temperature, volatiles were removed before adding a solution of TFA (50% in water, 2.0 mL). After 1 hour at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min). Unfortunately, the compound was probably degraded at this step.

5'-Deoxy-5'-*tert*-butoxycarbonylamino-2',3'-*O*-isopropylidene-8-bromoadenosine (**144**)



To a solution of **48** (193 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (5.0 mL), was added Boc₂O (164 mg, 0.75 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at room temperature, DCM (20 mL) was added and the organic layer was washed twice with water (2x 20 mL) before being dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (16 g SiO₂, 0 to 2% methanol in dichloromethane) to yield compound **144** (174 mg, 72 %) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.63 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.11-3.22 (m, 2H, H-5'), 4.16-4.22 (m, 1H, H-4'), 5.02 (dd, J_{3',2'} = 6.2 Hz, J_{3',4'} = 3.0 Hz, 1H, H-3'), 5.64 (dd, J_{2',1'} = 2.2 Hz, J_{2',3'} = 6.2 Hz, 1H, H-2'), 6.01 (d, J_{1',2'} = 2.22 Hz, 1H, H-1'), 7.11-7.17 (m, 1H, NH-5'), 7.52 (s, 2H, NH₂-6), 8.16 (s, 1H, H-2).

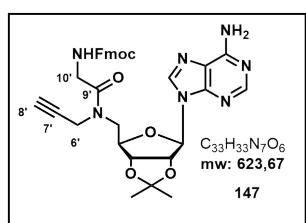
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ *t*Bu), 42.3 (C-5'), 78.4 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.7 (C-2'), 85.6 (C-4'), 91.2 (C-1'), 113.9

(Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.6 (C-8), 150.3 (C-4), 153.3 (C-2), 155.5 (C-6), 156.1 (Cq carbamate).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{18}H_{25}^{79}BrN_6O_5+H]^+$ 485.1148 found 485.1144.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(*N*-Fmoc-amino)ethylamido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (147**)**

Procedure A : Using PyBOP.



A solution of **20** (34 mg, 0.1 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (52 μ L, 0.3 mmol, 3.0 equiv.) was added *N*-Fmoc-glycine (36 mg, 0.12 mmol, 1.2 equiv.) followed by PyBOP (62 mg, 0.12 mmol, 1.2 equiv.). After 3.5 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (19 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to yield compound **147** 45 mg, 72%) as a white foam.

Procedure B : Using HCTU.

A solution of **20** (172 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (260 μ L, 1.5 mmol, 3.0 equiv.) was added *N*-Fmoc-glycine (178 mg, 0.6 mmol, 1.2 equiv.) followed by HCTU (207 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv.). After 2.5 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (30 g SiO₂, 2 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **147** (302 mg, 97%) as a white foam.

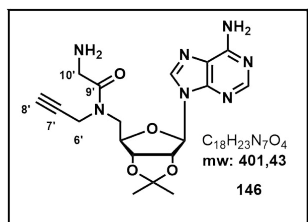
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.62 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.16-2.22 (br s, 1H, H-8'), 3.72-4.05 (m, 5H, CH₂ 5', CH₂-6' and H-10'), 4.12-4.18 (br s, 1H, H-10''), 4.19-4.26 (br s, 1H, CH-Fmoc), 4.30-4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.45-4.53 (m, 1H, H-4'), 5.04-5.14 (br s, 1H, H-3'), 5.42-5.51 (br s, 1H, H-2'), 5.74-5.95 (br s, 1H, NH-Fmoc), 6.03-6.08 (br s, 1H, H-1'), 6.25 (s, 2H, NH₂-6), 7.28-7.34 (m, 2H, CH aro Fmoc), 7.36-7.43 (m, 2H, CH aro Fmoc), 7.55-7.63 (m, 2H, CH aro Fmoc), 7.73-7.79 (m, 2H, CH aro Fmoc), 7.88-7.91 (br s, 1H, H-8), 8.35-8.45 (br s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.3 (CH₃ isop.), 25.2 (CH₃ isop.), 37.7 (CH₂-6'), 42.7 (CH₂-10'), 47.1 (CH-Fmoc), 47.7 (C-5'), 67.2 (CH₂-Fmoc), 73.4 (CH-8'), 77.9 (C-7'), 82.3 (C-3'), 84.0 (C-2'), 85.5 (C-4'), 90.8 (C-1'), 114.7 (Cq isop.), 115.0 (C-5), 119.9 (2C, CH aro Fmoc), 125.1 (2C, CH aro Fmoc), 127.0 (2C, CH aro Fmoc), 127.7 (2C, CH aro Fmoc), 140.4 (C-8), 141.3 (2C, Cq Fmoc), 143.8 (2C, Cq Fmoc), 149.0 (C-4), 152.6 (C-2), 155.3

(C-6), 156.4 (CO-Fmoc), 169.0 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{33}H_{33}N_7O_6+H]^+$ 624.2571 found 624.2574.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(amino)ethylamido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (146)



To a solution of **147** (1.81 g, 2.9 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (60 mL) was added piperidine (1.44 mL, 14.5 mmol, 5.0 equiv.). After 5 hours at room temperature volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (100 g SiO₂, 8 to 15:1:84 methanol/NH₄OH/dichloromethane) to yield compound **146**

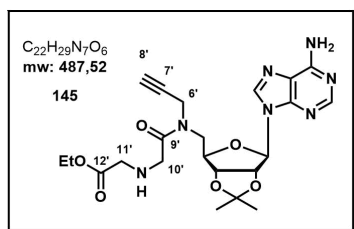
(971 mg, 84%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.08-3.30 (m, 2H, CH₂-6'), 3.39-3.55 (m, 2H, H-5' and CH-8'), 3.70-3.74 (m, 1H, H-5''), 3.79-4.22 (m, 2H, CH₂-10'), 4.32-4.47 (m, 1H, H-4'), 5.02-5.07 (m, 1H, H-3'), 5.39-5.50 (m, 1H, H-2'), 6.15-6.23 (m, 1H, H-1'), 7.33 (s, 2H, NH₂-6), 8.20 (s, 1H, H-2), 8.36 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 36.1 (CH₂-10'), 42.7 (CH₂-6'), 48.1 (C-5'), 74.4 (C-8'), 75.3 (C-7'), 82.3 (C-3'), 83.7 (C-2'), 84.5 (C-4'), 89.3 (C-1'), 113.8 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 140.6 (C-8), 149.2 (C-4), 153.3 (C-2), 156.7 (C-6), 170.1 (C-9').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{18}H_{23}N_7O_4+H]^+$ 402.1890 found 402.1891.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(2-(ethyl ethanoate)amino)ethylamido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (145)



A solution of **146** (971 mg, 2.42 mmol, 1.0 equiv.) and NEt₃ (752 μ L, 5.4 mmol, 2.2 equiv.) in THF (27 mL), was cooled down to 0 °C before adding ethyl bromoacetate (312 μ L, 2.8 mmol, 1.15 equiv.). After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (60 g SiO₂, 4 to 6% methanol in dichloromethane) to yield compound **145** (691 mg, 59%) as a light yellow foam.

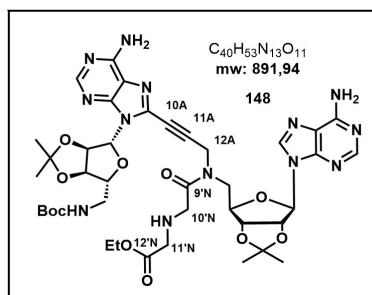
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.33 (s, 3H, CH₃

isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.0-3.22 (m, 3H, CH-8' and CH₂-6'), 3.35-3.40 (m, 1H, H-11'), 3.41-3.55 (m, 2H, H-11'' and H-5'), 3.64-3.79 (m, 1H, H-5''), 3.80-4.15 (m, 4H, CH₂-10' and CH₂ OEt), 4.32-4.49 (m, 1H, H-4'), 5.0-5.08 (m, 1H, H-3'), 5.40-5.49 (m, 1H, H-2'), 6.14-6.24 (m, 1H, H-1'), 7.33 (s, 2H, NH₂-6), 8.19 (s, 1H, H-2), 8.35 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 36.3 (CH₂-10'), 47.9 (C-5'), 49.0 (CH₂-6'), 50.0 (CH₂-11'), 60.5 (CH₂ OEt), 74.9 (CH-8'), 79.7 (C-7'), 82.3 (C-3'), 83.6 (C-2'), 84.4 (C-4'), 89.4 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 140.6 (C-8), 149.2 (C-4), 153.2 (C-2), 156.6 (C-6), 169.9 (C-9'), 170.8 (C-12').

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₂H₂₉N₇O₆+H]⁺ 488.2258 found 488.2259.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-*tert*-butoxycarbonyl-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(2-(ethyl ethanoate)amino)ethylamido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (148)



To a solution of alkyne **145** (170 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv.) and bromo derivative **144** (364 mg, 0.75 mmol, 2.1 equiv.) in THF (5.0 mL) was added triethylamine (209 μL, 1.50 mmol, 4.3 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (10 mg, 14 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (30 mg, 7 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 2 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (25 g SiO₂, 2 to 10% methanol in dichloromethane) to yield compound **148** (97 mg, 31%) as a pale yellow foam.

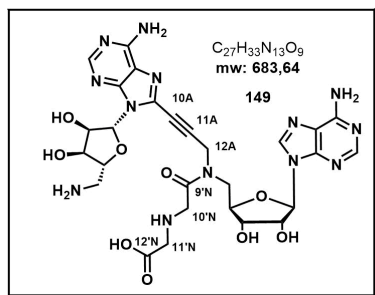
removed and the residue was purified by flash column chromatography (25 g SiO₂, 2 to 10% methanol in dichloromethane) to yield compound **148** (97 mg, 31%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ 1.20 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.30 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.46 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.53 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.15-3.20 (m, 2H, H-5'A), 3.68-3.72 (m, 2H, H-5'N), 3.99 (AB q, *J* = 16.0 Hz, 2H, CH₂-11'N), 4.10-4.14 (m, 1H, H-4'A), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.28-4.32 (m, 2H, CH₂-12A), 4.38 (td *J*_{4'N,3'N} = 3.2 Hz, *J*_{4'N,5'N} = *J*_{4'N,5''N} = 6.3 Hz, 1H, H-4'N), 4.84-4.94 (m, 2H, H-3'A and H-10'N), 5.07 (dd, *J*_{3'N,2'N} = 6.2 Hz, *J*_{3'N,4'N} = 3.2 Hz, 1H, H-3'N), 5.21 (d, *J*_{10''N,10'N} = 17.0 Hz, 1H, H-10'N), 5.40 (dd, *J*_{2'N,1'N} = 2.5 Hz, *J*_{2'N,3'N} = 6.2 Hz, 1H, H-2'N), 5.52 (dd, *J*_{2'A,1'A} = 2.8 Hz, *J*_{2'A,3'A} = 6.2 Hz, 1H, H-2'A), 5.98 (d, *J*_{1'A,2'A} = 2.8 Hz, 1H, H-1'A), 6.14 (d, *J*_{1'N,2'N} = 2.5 Hz, 1H, H-1'N), 6.94 (s, 2H, NH₂-6), 7.26-7.32 (m, 3H, NH₂-6 and NH-5'A), 8.07 (s, 1H, H-2A), 8.16 (s, 1H, H-2N), 8.32 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : δ 14.5 (CH_3 OEt), 25.5 (CH_3 isop.), 25.7 (CH_3 isop.), 27.4 (CH_3 isop.), 27.5 (CH_3 isop.), 28.6 (3C, CH_3 Boc), 42.6 (C-5'A), 47.7 (C-5'N), 47.9 (CH_2 -10'N), 51.9 (CH_2 -12A), 54.3 (CH_2 -11'N), 61.3 (CH_2 OEt), 78.3 (Cq $t\text{Bu}$), 80.0 (C-10A), 82.1 (C-3'A), 82.3 (C-3'N), 82.4 (C-2'A), 83.8 (2C, C-2'N and C-4'N), 84.1 (C-4'A), 88.9 (C-1'A), 89.1 (2C, C-1'N and C-11A), 113.9 (Cq isop.), 114.1 (Cq isop.), 119.1 (C-5A), 119.5 (C-5N), 140.2 (C-8N), 149.3 (C-4N), 149.4 (C-4A), 149.7 (C-8A), 151.2 (C-2A), 153.3 (C-2N), 154.7 (C-6A), 156.2 (Cq carbamate), 156.5 (C-6N). 167.9 (C-9'N), 169.4 (C-12'N).

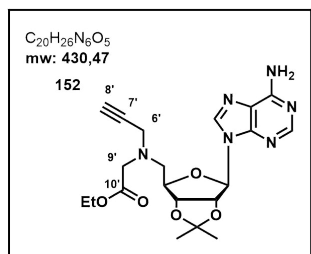
HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{N}_{13}\text{O}_{11}+\text{H}]^+$ 892.4066 found 892.4048.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-amino-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(2-(acetic acid)amino)ethylamido)-adenosine (149)



To a suspension of **148** (38 mg, 0.04 mmol, 1.0 equiv.) in water (430 μL) and 1,4-dioxane (210 μL) was slowly added a solution of NaOH (1 M in water, 43 μL , 0.47 mmol, 1.0 equiv.). After 1 hours at room temperature, volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 1.0 mL). After 4.5 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilized and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min). Unfortunately, the compound was probably degraded at this step.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(ethyl ethanoate)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (**152**)



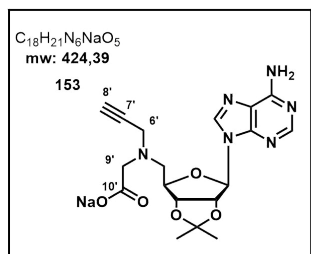
To a solution of **20** (344 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (523 μ L, 3.0 mmol, 3.0 equiv.) in DMF (10.0 mL) was added ethyl bromoacetate (166 μ L, 1.5 mmol, 1.5 equiv.). After 16 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO₂, 3 to 3.5% methanol in dichloromethane) to yield compound **152** (416 mg, 97%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.40 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.62 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.18 (t, $J_{8',6'}$ = 2.3 Hz, 1H, H-8'), 2.91 (dd, $J_{5',4'}$ = 7.0 Hz, $J_{5',5''}$ = 13.7 Hz, 1H, H-5'), 2.97 (dd, $J_{5'',4'}$ = 5.4 Hz, $J_{5'',5'}$ = 13.7 Hz, 1H, H-5''), 3.41 (s, 2H, CH₂-9'), 3.56 (d, $J_{6',8'}$ = 2.3 Hz, 2H, CH₂-6'), 4.14 (qd, J = 7.1 Hz, J = 1.6 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.37-4.42 (m, 1H, H-4'), 5.10 (dd, $J_{3',2'}$ = 6.4 Hz, $J_{3',4'}$ = 3.6 Hz, 1H, H-3'), 5.44 (dd, $J_{2',1'}$ = 2.3 Hz, $J_{2',3'}$ = 6.4 Hz, 1H, H-2'), 6.02 (s, 2H, NH₂-6), 6.10 (d, $J_{1',2'}$ = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 8.00 (s, 1H, H-8), 8.35 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1 (CH₃ OEt), 25.4 (CH₃ isop.), 27.2 (CH₃ isop.), 43.7 (CH₂-6'), 54.9 (C-5'), 55.4 (CH₂-9'), 60.6 (CH₂ OEt), 73.4 (CH-8'), 78.4 (C-7'), 82.7 (C-3'), 83.9 (C-2'), 85.6 (C-4'), 90.5 (C-1'), 114.5 (Cq isop.), 120.3 (C-5), 139.8 (C-8), 149.4 (C-4), 153.1 (C-2), 155.6 (C-6), 170.6 (C-10').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₀H₂₆N₆O₅+H]⁺ 431.2043 found 431.2058.

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(sodium acetate)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (**153**)



To a solution of **152** (711 mg, 1.65 mmol, 1.0 equiv.) in water (8.0 mL) and 1,4-dioxane (4.0 mL) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 825 μ L, 1.65 mmol, 1.0 equiv.). After 1.5 hours at room temperature the reaction mixture was lyophilised to yield deprotected acid **153** (696 mg, quant.) as a light purple solid that was used without further purification.

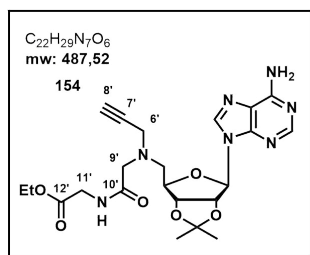
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.53 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.62

(dd, $J_{5',4'} = 6.4$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.2$ Hz, 1H, H-5'), 2.75 (dd, $J_{5'',4'} = 7.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.2$ Hz, 1H, H-5''), 2.93 (s, 2H, CH₂-9'), 2.95 (t, $J_{8',6'} = 2.2$ Hz, 1H, CH-8'), 3.51 (s, 2H, CH₂-6'), 4.23-4.28 (m, 1H, H-4'), 5.06 (dd, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz, $J_{3',4'} = 2.7$ Hz, 1H, H-3'), 5.44 (dd, $J_{2',1'} = 2.5$ Hz, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.10 (d, $J_{1',2'} = 2.5$ Hz, 1H, H-1'), 7.33 (d, 2H, NH₂-6), 8.17 (s, 1H, H-2) 8.45 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 43.1 (CH₂-6'), 55.5 (C-5'), 58.7 (CH-9'), 75.2 (CH-8'), 80.8 (C-7'), 83.1 (C-3'), 83.6 (C-2'), 84.9 (C-4'), 89.5 (C-1'), 113.5 (Cq isop.), 119.5 (C-5), 140.4 (C-8), 149.5 (C-4), 153.2 (C-2), 156.5 (C-6), 174.3 (C-10').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₈H₂₂N₆O₅+H]⁺ 403.1724 found 403.1737

5'-Deoxy-5'-(*N*-propargyl-2-(*N*-(2-ethoxy-2-oxoethyl)ethylamide)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (154**)**



To a solution of **153** (700 mg, 1.65 mmol, 1.0 equiv) in DMF (16 mL) was added PyBOP (859 mg, 1.65 mmol, 1.0 equiv) followed by NEt₃ (279 μ L, 2.0 mmol, 1.2 equiv), glycine ethyl ester hydrochloride (279 mg, 2.0 mmol, 1.2 equiv.) and DIEA (856 μ L, 4.95 mmol, 3.0 equiv.). After 2 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash chromatography (75g, SiO₂, 2% to 4% methanol in dichloromethane) to yield **154** (690 mg, 86%) as a white foam.

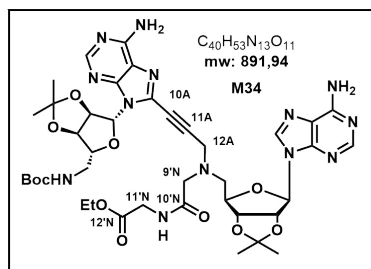
iupac

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.73 (dd, $J_{5',4'} = 7.0$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.4$ Hz, 1H, H-5'), 2.83 (dd, $J_{5'',4'} = 5.9$ Hz, $J_{5'',5'} = 13.4$ Hz, 1H, H-5''), 0.10 (t, $J_{8',6'} = 2.2$ Hz, 1H, CH-8'), 3.13 (s, 2H, CH₂-9'), 3.45 (ABq d, $J_{6',6''} = 17.5$ Hz, $J_{6',8'} = 2.2$ Hz, 2H, CH₂-6'), 3.71 (dd, $J_{11',NH-10'} = 5.8$ Hz, $J_{11',11''} = 17.3$ Hz, 1H, H-11'), 3.83 (dd, $J_{11'',NH-10'} = 6.3$ Hz, $J_{11'',11'} = 17.3$ Hz, 1H, H-11''), 4.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.28-4.32 (m, 1H, H-4'), 5.04 (dd, $J_{3',4'} = 3.3$ Hz, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J_{2',1'} = 2.7$ Hz, $J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.13 (d, $J_{1',2'} = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.30 (s, 2H, NH₂-6), 8.00-8.04 (m, 1H, NH-10'), 8.16 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 26.3 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 40.9 (CH₂-11'), 43.5 (CH₂-6'), 55.6 (C-5'), 57.5 (CH₂-9'), 60.9 (CH₂ OEt), 76.4 (CH-8'), 79.0 (C-7'), 82.9 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.5 (C-4'), 89.2 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.6 (C-5), 140.3 (C-8), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 156.6 (C-6), 170.1 (C-12'), 170.4 (C-10').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{22}H_{29}N_7O_6+H]^+$ 488.2252 found 488.2254.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-*tert*-butoxycarbonylamino-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(*N*-(2-ethoxy-2-oxoethyl)ethylamide)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (155)



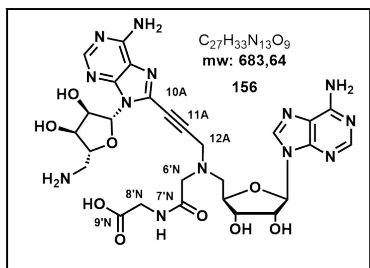
To a solution alkyne **154** (140 mg, 0.3 mmol, 1.5 equiv.) and bromo derivative **144** (107 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4.0 mL) was added triethylamine (92 μ L, 0.66 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (4 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (12 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 5.5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (18 g SiO₂, 2 to 8% methanol in dichloromethane) to yield compound **155** (84 mg, 43%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.28 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.36 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.47 (s, 3H, CH₃ isop), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop), 2.86 (dd, $J_{5'N,4'N}$ = 6.6 Hz, $J_{5'N,5''N}$ = 13.3 Hz, 1H, H-5'N), 2.98 (dd, $J_{5''N,4'N}$ = 6.0 Hz, $J_{5''N,5'N}$ = 13.3 Hz, 1H, H-5''N), 3.02-3.10 (m, 2H, CH₂-9'N), 3.15-2.25 (m, 2H, H-5'A), 3.73 (dd, $J_{11'N,NH-10'N}$ = 5.7 Hz, $J_{11'N,11'N}$ = 17.4 Hz, 1H, H-11'N), 3.86 (dd, $J_{11'N,NH-10'N}$ = 6.5 Hz, $J_{11'N,11'N}$ = 17.4 Hz, 1H, H-11'N), 3.93 (AB q, J = 18.1 Hz, 2H, CH₂-12A), 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.15-4.20 (m, 1H, H-4'A), 4.35-4.40 (m, 1H, H-4'N), 4.95-5.0 (m, 1H, H-3'A), 5.07 (dd, $J_{3'N,2'N}$ = 6.3 Hz, $J_{3'N,4'N}$ = 3.3 Hz, 1H, H-3'N), 5.45 (dd, $J_{2'N,1'N}$ = 2.7 Hz, $J_{2'N,3'N}$ = 6.2 Hz, 1H, H-2'N), 5.51 (dd, $J_{2'A,1'A}$ = 2.3 Hz, $J_{2'A,3'A}$ = 6.1 Hz, 1H, H-2'A), 6.11 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 2.3 Hz, 1H, H-1'A), 6.15 (d, $J_{1'N,2'N}$ = 2.7 Hz, 1H, H-1'N), 7.18-7.24 (m, 1H, NHBoc), 7.29 (s, 2H, NH₂-6N), 7.59 (s, 2H, NH₂-6A), 8.08-8.13 (m, 1H, NH-10'N), 8.14 (s, 1H, H-2A), 8.20 (s, 1H, H-2N), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 25.7 (CH₃ isop.), 25.8 (CH₃ isop.), 27.5 (2C, CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 41.1 (CH₂-11'N), 42.4 (C-5'A), 44.2 (CH₂-12A), 46.3 (CH₂-9'N), 55.9 (C-5'N), 60.9 (CH₃ OEt), 74.8 (C-10A), 78.3 (Cq *t*Bu), 82.2 (C-3'A), 82.8 (C-3'N), 82.9 (C-2'A), 83.3 (C-2'N), 84.0 (C-4'N), 85.1 (C-4'A), 89.2 (C-1'N), 90.2 (C-1'A), 92.5 (C-11A), 114.0 (Cq isop.), 114.1 (Cq isop.), 119.3 (C-5A), 19.6 (C-5N), 132.8 (C-8A), 140.3 (C-8N), 148.7 (C-4A), 149.3 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.2 (C-2A), 156.2 (Cq carbamate.), 156.5 (C-6A), 156.6 (C-6N), 170.1 (2C, C-10'N and C-12'N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{40}H_{53}N_{13}O_{11}+H]^+$ 891.4061 found 892.4060.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-amino-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(*N*-(1-carboxymethyl)ethylamide)amino)-adenosine (156**)**



To a suspension of **155** (75 mg, 0.084 mmol, 1.0 equiv.) in water (840 μ L) and 1,4-dioxane (420 μ L) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 42 μ L, 0.084 mmol, 1.0 equiv.). After 2.5 hours at room temperature, a second addition of 2 M NaOH was made (0.2 equiv.). After an additional 1.5 hours at room temperature, volatiles were removed by dry freezing. The solid

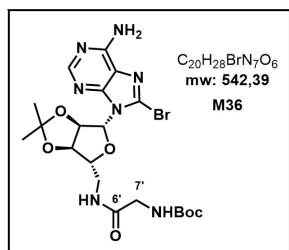
residue was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 2.0 mL). After 11 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (7-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 6.8 min) to yield deprotected compound **156** (27 mg, 47%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.93 (dd, $J_{5'\text{N},4'\text{N}} = 6.3$ Hz, $J_{5'\text{N},5''\text{N}} = 13.6$ Hz, 1H, H-5'N), 3.03 (dd, $J_{5''\text{N},4'\text{N}} = 4.8$ Hz, $J_{5''\text{N},5'\text{N}} = 13.6$ Hz, 1H, H-5''N), 3.09-3.15 (m, 2H, H-5'A), 3.25 (ABq, $J = 16.0$ Hz, 2H, CH₂-6'N), 3.47 (dd, $J_{8'\text{N},\text{NH}-7'} = 5.0$ Hz, $J_{8'\text{N},8''\text{N}} = 16.8$ Hz, 1H, H-8'N), 3.55 (dd, $J_{8''\text{N},\text{NH}-7'} = 5.3$ Hz, $J_{8''\text{N},8'\text{N}} = 16.8$ Hz, 1H, H-8''N), 3.89 (s, 2H, CH₂-12A), 4.08-4.15 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.25-4.32 (m, 2H, H-3'A and H-3'N), 4.65 (t app, $J_{2'\text{N},1'\text{N}} = J_{2'\text{N},3'\text{N}} = 5.0$ Hz, 1H, H-2'N), 4.99 (t app, $J_{2'\text{A},1'\text{A}} = J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 5.8$ Hz, 1H, H-2'A), 5.90 (d, $J_{1'\text{N},2'\text{N}} = 5.0$ Hz, 1H, H-1'N), 6.06 (d, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 5.8$ Hz, 1H, H-1'A), 7.26 (s, 2H, NH₂-6), 7.58 (s, 2H, NH₂-6), 7.76-7.81 (m, 1H, NH-7'N), 8.16 (s, 1H, H-2N), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.36 (s, 1H, H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 42.1 (C-5'A), 43.5 (C-8'N), 44.8 (CH₂-12A), 56.6 (C-5'N), 58.5 (C-6'N), 71.7 (2C, 3'N and 3'A), 72.1 (C-2'A), 73.1 (C-2'N), 74.5 (C-10A), 83.0 (2C, C-4'A and C-4'N), 88.3 (C-1'N), 89.6 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 119.5 (2C, C-5A and C-5N), 133.5 (C-8A), 140.3 (C-8N), 149.2 (C-4A), 149.8 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.1 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N), 169.3 (C-7'N), 172.2 (C-9'N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{27}H_{33}N_{13}O_9+H]^+$ 684.2597 found 684.2596.

**5'-(2-(*N*-Boc-amino)ethylamido)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-bromoade-
nosine (**157**)**



To a solution of **48** (385 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) in DMF (10 mL) was added PyBOP (520 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) followed by DIEA (519 μ L, 3.0 mmol, 1.0 equiv) and *N*-Boc-glycine (210 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv). After 1 hour at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash chromatography (25g, SiO₂, 2% to 3% methanol in dichloromethane) to yield **157** (406 mg, 75%) as a

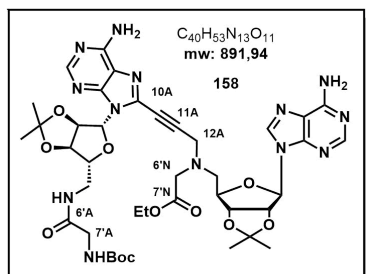
pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop), 1.34 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop), 3.33-3.41 (m, 2H, H-5'), 3.52 (d, $J_{7',NH-7'} = 6.0$ Hz, 2H, H-7'), 4.22 (td, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.6$ Hz, $J_{4',3'} = 3.1$ Hz, 1H, H-4'), 4.96 (dd, $J_{3',4'} = 3.1$ Hz, $J_{3',2'} = 6.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.61 (dd, $J_{2',1'} = 2.6$ Hz, $J_{2',3'} = 6.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.02 (d, $J_{1',2'} = 2.7$ Hz, 1H, H-1'), 6.92 (t, $J_{NH-7',7'} = 6.0$ Hz, 1H, NH-7'), 7.54 (s, 2H, NH₂-6), 8.10 (br s, 1H, NH-5'), 8.21 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 41.1 (C-5'), 4.7 (CH₂-7'), 78.4 (Cq *t*Bu), 82.2 (C-3'), 82.6 (C-2'), 85.2 (C-4'), 91.1 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.6 (C-8), 150.3 (C-4), 153.5 (C-2), 155.5 (C-6), 156.2 (Cq carbamate), 170.2 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₀H₂₈⁷⁹BrN₇O₆+H]⁺ 542.1363 found 542.1369.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(2-(*N*-Boc-amino)ethylamido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(ethyl ethanoate)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (158**)**



To a solution alkyne **152** (405 mg, 0.94 mmol, 1.3 equiv.) and bromo derivative **157** (395 mg, 0.73 mmol, 1.0 equiv.) in THF (7.0 mL) was added triethylamine (305 μ L, 2.2 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (13 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (40 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing.

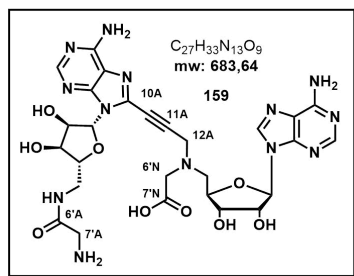
After 3 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (40 g SiO₂, 3 to 7% methanol in dichloromethane) to yield compound **158** (391 mg, 60%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.28 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.33 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.46 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.86 (dd, *J*_{5'N,4'N} = 6.4 Hz, *J*_{5'N,5''N} = 13.4 Hz, 1H, H-5'N), 2.96 (dd, *J*_{5'N,4'N} = 6.6 Hz, *J*_{5'N,5''N} = 13.4 Hz, 1H, H-5''N), 3.32-3.45 (m, 2H, H-5'A), 3.45-3.50 (m, 2H, CH₂-6'N), 3.51- 3.56 (m, 2H, CH₂-7'A), 3.94 (AB q, *J* = 18.2 Hz, 1H, CH₂-12A), 4.02-4.09 (m, 2H, CH₂ OEt), 4.18-4.23 (m, 1H, H-4'A), 4.34 (td, *J*_{4'N,3'N} = 3.2 Hz, *J*_{4'N,5'N} = *J*_{4'N,5''N} = 6.4 Hz, 1H, H-4'N), 4.90 (dd, *J*_{3'A,2'A} = 5.8 Hz, *J*_{3'A,4'A} = 2.6 Hz, 1H, H-3'A), 5.08 (dd, *J*_{3'N,2'N} = 3.1 Hz, *J*_{3'N,4'N} = 6.2 Hz, 1H, H-3'N), 5.46-5.52 (m, 2H, H-2'A and H-2'N), 6.10 (d, *J*_{1'A,2'A} = 3.0 Hz, 1H, H-1'A), 6.14 (d, *J*_{1'N,2'N} = 2.6 Hz, 1H, H-1'N), 6.90-6.95 (m, 1H, NH-7'A), 7.30 (s, 2H, NH₂-6N), 7.59 (s, 2H, NH₂-6A), 8.14 (s, 1H, H-2N), 8.16-8.20 (m, 1H, NH-5'A), 8.25 (s, 1H, H-2A), 8.33 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.4 (CH₃ OEt), 25.7 (2C, CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 41.2 (C-5'A), 43.7 (C-7'A), 44.0 (C-12A), 55.2 (C-5'N), 55.4 (C-6'N), 60.6 (CH₂ OEt), 74.4 (C-10A) 78.4 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'A), 82.7 (C-3'N), 82.9 (C-2'A), 83.2 (C-2'N), 84.5 (C-4'N), 84.9 (C-4'A), 89.5 (C-1'N), 90.3 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 113.9 (Cq isop.), 114.0 (Cq isop.), 119.4 (C-5A), 119.7 (C-5N), 132.9 (C-8A), 140.4 (C-8N), 148.7 (C-4A), 149.3 (C-4N), 153.2 (C-2N), 154.4 (C-2A), 156.3 (Cq carbamate), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-6A), 170.2 (C-7'N), 170.5 (C-6'A).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₄₀H₅₃N₁₃O₁₁+H]⁺ 892.4060 found 892.4035.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(2-(amino)ethylamido)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(acetic acid)amino)-adenosine (159**)**



To a suspension of **158** (368 mg, 0.4 mmol, 1.0 equiv.) in water (4 mL) and 1,4-dioxane (2 mL) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 200 μ L, 0.4 mmol, 1.0 equiv.). After 2 hours at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 4.0 mL). After 5 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue

was purified by reverse phase HPLC (0-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, *t_R* = 7.8 min) to yield deprotected compound **159** (205 mg, 75%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.98-3.04 (m, 1H, H-5'N), 3.05-3.12 (m, 1H, H-5''N),

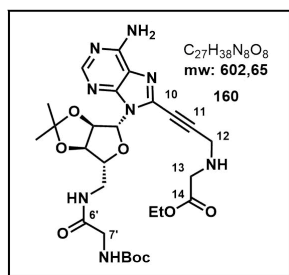
reverse phase HPLC (5-25% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 9.0$ min) to yield macrocyclised compound **150** (15 mg, 22%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.93-3.05 (m, 2H, H-5'N), 3.37-3.50 (m, 5H, CH_2 -6'A, CH_2 -6'N and H-5'A), 3.75-3.98 (m, 5H, H-3'A, H-4'A, H-5'A and CH_2 -12A), 4.06-4.12 (m, 1H, H-4'N), 4.13-4.19 (m, 1H, H-3'N), 4.65-4.71 (m, 1H, H-2'N), 4.80-4.86 (m, 1H, H-2'A), 5.22 (d, JOH -3'A,3'A = 6.7 Hz, 1H, OH-3'A), 5.27 (d, JOH -3'N,3'N = 5.4 Hz, 1H, OH-3'N), 5.46 (d, JOH -2'A,2'A = 5.5 Hz, 1H, OH-2'A), 5.52 (d, JOH -2'N,2'N = 5.9 Hz, 1H, OH-2'N), 5.90-5.92 (m, 2H, H-1'A and H-1'N), 6.82-6.85 (m, 1H, NH-7'A), 7.26 (s, 2H, NH_2 -6), 7.59 (s, 2H, NH_2 -6), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.20 (s, 1H, H-2A), 8.37 (s, 1H, H-8N), 8.40-8.45 (m, 1H, NH-5'A).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 38.5 (CH_2 -7'A), 43.1 (2C, CH_2 -12A and C-5'A), 56.5 (CH_2 -6'N), 57.4 (C-5'N), 67.0 (C-3'A), 71.3 (C-2'A), 72.3 (C-3'N), 73.1 (C-2'N), 76.1 (C-10A), 80.0 (C-4'A), 83.1 (C-4'N), 88.3 (C-1'N), 88.6 (C-1'A), 92.2 (C-11A), 118.5 (C-5N), 119.7 (C-5A), 131.8 (C-8A), 140.3 (C-8N), 149.9 (C-4N), 150.1 (C-4A), 153.2 (C-2A), 154.6 (C-2N), 156.3 (C-6A), 156.5 (C-6N), 169.9 (C-7'N), 170.3 (C-6'A).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_{13}\text{O}_8 + \text{H}]^+$ 666.2491 found 666.2494.

5'-(2-(*N*-Boc-amino)ethylamido)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-(1-(ethyl ethanoate)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (160**)**



To a solution alkyne **140** (129 mg, 0.91 mmol, 2.8 equiv.) and bromo derivative **157** (177 mg, 0.33 mmol, 1.0 equiv.) in THF (3.3 mL) was added triethylamine (246 μL , 1.76 mmol, 5.4 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (11 mg, 18 mol%) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (34 mg, 9 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 2 hours at 60 $^\circ\text{C}$, a second addition of alkyne **140** (0.5 equiv.) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (5 mol%) was made.

After an additional two hours at 60 $^\circ\text{C}$, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield compound **160** (135 mg, 68%) as a pale yellow foam.

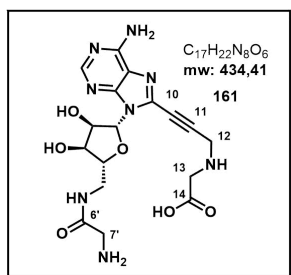
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 OEt), 1.32 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.33 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 3.34-3.45 (m, 2H, H-5'), 3.46 (s, 2H, CH_2 -13), 3.54 (d, $J_{7',\text{NH}-7'} = 6.0$ Hz, 2H, CH_2 -7'), 3.78 (s, 2H, CH_2 -12), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 OEt), 4.20-4.25 (m, 1H, H-4'), 4.92 (dd, $J_{3',2'} = 6.0$ Hz, $J_{3',4'} = 2.6$

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 5.51 (dd, $J_{2',1'} = 3.1$ Hz, $J_{2',3'} = 6.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.13 (d, $J_{1',2'} = 3.1$ Hz, 1H, H-1'), 6.93 (t, $J_{\text{NH-}7',7'} = 6.0$ Hz, 1H, NH-7'), 7.57 (s, 2H, NH₂-6), 8.18-8.23 (m, 1H, NH-5'), 8.25 (s, 1H, H-2).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 14.5 (CH_3 OEt), 25.7 (CH_3 isop.), 27.6 (CH_3 isop.), 28.6 (3C, CH_3 Boc), 37.9 (CH_2 -12), 41.2 (C-5'), 43.7 (CH_2 -7'), 49.2 (CH_2 -13), 60.5 (CH_2 -OEt), 72.6 (C-10), 78.4 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.7 (C-2'), 84.8 (C-4'), 90.2 (C-1'), 90.17 (C-11), 114.0 (Cq isop.), 119.4 (C-5), 133.2 (C-8), 148.7 (C-4), 154.3 (C-2), 156.3 (Cq carbamate), 156.5 (C-6), 170.2 (C-6'), 171.9 (C-14).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_8 + \text{H}]^+$ 603.2891 found 603.2897.

5'-(2-(Amino)ethylamido)-5'-deoxy-8-(1-(acetic acid)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (**161**)



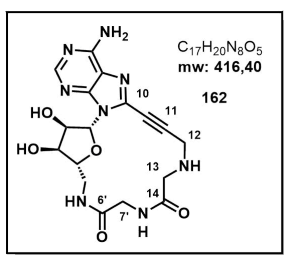
To a suspension of **160** (135 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv.) in water (1.1 mL) and 1,4-dioxane (600 μL) was slowly added a solution of NaOH (1 M in water, 224 μL , 0.22 mmol, 1.0 equiv.). After 1 hours at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 4.4 mL). After 2 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, $t_R = 10.9$ min) to yield deprotected compound **161** (29.2 mg, 30%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3.06 (AB q, $J = 16.2$ Hz, 2H, CH_2 -13), 3.32-3.39 (m, 1H, H-5''), 3.55 (AB q, $J = 16.0$ Hz, 2H, CH_2 -7'), 3.62-3.66 (m, 1H, H-5''), 3.70 (AB q, $J = 18.0$ Hz, 2H, CH_2 -12), 3.88 (dd, $J_{3',4'} = 2.3$ Hz, $J_{3',2'} = 6.0$ Hz, 1H, H-3'), 4.03-4.08 (m, 1H, H-4'), 4.88 (dd, $J_{2',1'} = 7.6$ Hz, $J_{2',3'} = 6.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.19 (d, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, 1H, H-1'), 7.53 (s, 2H, NH₂-6), 8.22 (s, 1H, H-2), 8.71-8.76 (m, 1H, NH-5').

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 39.0 (CH_2 -12), 41.7 (C-5'), 42.0 (CH_2 -7'), 52.4 (C-13), 71.9 (C-3'), 72.3 (C-2'), 72.8 (C-10), 85.5 (C-4'), 89.3 (C-1), 96.0 (C-11), 119.8 (C-5), 134.6 (C-8), 148.9 (C-4), 153.8 (C-2), 156.5 (C-6), 168.6 (C-6'), 175.8 (C-14).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6 + \text{H}]^+$ 435.1735 found 435.1721.

Macrocycle (**162**)

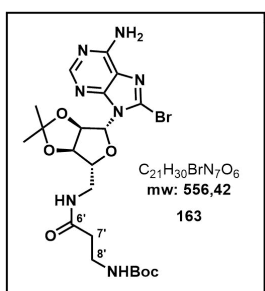


A solution of **161** (20 mg, 0.05 mmol, 1.0 equiv.) in DMF (23 mL) was added by a slow dropwise (during 8 hours) to a solution of PyBOP (93 mg, 0.18 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (11 mL). After 16 hours at room temperature, DMF was removed *in vacuo* and the solid residue was purified by reverse phase HPLC (10-30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 8.9 min) to yield macrocyclised compound **162** (0.65 mg, 1%) as a white foam. Unfortunately too little compound was obtained to perform NMR analysis, the macrocycle was confirmed by HRMS.

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₇H₂₀N₈O₅+H]⁺ 417.1635 found 417.1625.

5'-(3-(N-Boc-amino)propylamido)-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (**163**)

Procedure A : Using PyBOP.



To a solution of **49** (215 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv) in DMF (6 mL) was added PyBOP (291 mg, 0.56 mmol, 1.0 equiv) followed by DIEA (291 μ L, 1.68 mmol, 3.0 equiv) and *N*-Boc- β -alanine (127 mg, 0.67 mmol, 1.2 equiv). After 4 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash chromatography (35 g, SiO₂, 2% to 4% methanol in dichloromethane) to yield **163** (150 mg, 48%) as a white foam.

Procedure B : Using HCTU.

To a solution of **49** (193 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv) in DMF (5 mL) was added HCTU (207 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv) followed by DIEA (260 μ L, 3.0 mmol, 1.5 equiv) and *N*-Boc- β -alanine (114 mg, 0.6 mmol, 1.2 equiv). After 2 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash chromatography (21 g, SiO₂, 0% to 3% methanol in dichloromethane) to yield **163** (160 mg, 57%) as a white foam.

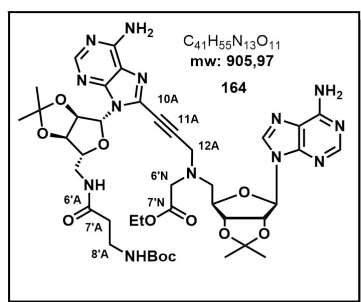
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.34 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.23 (td, $J_{7',8'} = 7.0$ Hz, $J_{7',7''} = 3.3$ Hz, 2H, CH₂-7'), 3.08-3.15 (m, 2H, CH₂-8'), 3.30-3.35 (m, 2H, H-5'), 4.20 (td, $J_{4',3'} = 3.3$ Hz, $J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.7$ Hz, 1H, H-4'), 4.99 (dd, $J_{3',2'} = 6.3$ Hz, $J_{3',4'} = 3.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.62 (dd, $J_{2',1'} = 2.6$ Hz,

$J_{2',3'} = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.02 (d, $J_{1',2'} = 2.6$ Hz, 1H, H-1'), 6.68-6.71 (m, 1H, NH-8'), 7.53 (s, 2H, NH₂-6), 8.06-8.10 (m, 1H, NH-5'), 8.18 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.8 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc) 36.2 (CH₂-7'), 37.1 (CH₂-8'), 41.0 (C-5'), 78.0 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.6 (C-2'), 85.4 (C-4'), 91.0 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.8 (C-5), 126.7 (C-8), 150.3 (C-4), 153.4 (C-2), 155.5 (C-6), 155.9 (Cq carbamate), 171.12 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₁H₃₀⁷⁹BrN₇O₆+H]⁺ 556.1519 found 556.1518.

5'-Deoxy-5'-(N-[3-(5'-deoxy-5'-(3-(N-Boc-amino)propylamido)-adenosine-8-yl)-prop-2-yn-1-yl]-2-(ethyl ethanoate)amino)-2',3'-O-isopropylideneadenosine (164)



To a solution alkyne **152** (323 mg, 0.75 mmol, 2.8 equiv.) and bromo derivative **163** (150 mg, 0.27 mmol, 1.0 equiv.) in THF (5 mL) was added triethylamine (209 μ L, 1.5 mmol, 5.5 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (9.5 mg, 18 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (29 mg, 9 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 2.5 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (25 g SiO₂, 2 to 8% methanol in dichloromethane) to yield compound **164** (159 mg, 65%) as a pale yellow foam.

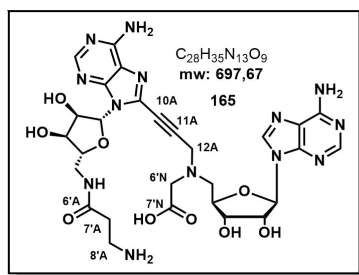
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.16 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.28 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.32 (s, 12H, CH₃ Boc and CH₃ isop.), 1.46 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.21-2.30 (m, 2H, CH₂-7'A), 2.82-2.89 (m, 1H, H-5'N), 2.93-3.00 (mn 1H, H-5'N), 3.08-3.16 (m, 2H, CH₂-8'A), 3.33-3.40 (m, 2H, H-5'A), 3.48 (AB q, $J = 17$ Hz, 2H, H-6'N), 3.94 (s, 2H, CH₂-12A), 4.02-4.09 (m, 1H, H-4'A), 4.16-4.21 (m, 1H, H-4'N), 4.91-4.96 (m, 1H, H-3'A), 5.05-5.10 (m, 1H, H-3'N), 5.46-5.53 (m, 2H, H-2'A and H-2'N), 6.08-6.12 (m, 1H, H-1'A), 6.13-6.16 (m, 1H, H-1'N), 6.67-6.73 (m, 1H, NH-8'A), 7.30 (s, 2H, NH₂-6), 7.58 (s, 2H, NH₂-6), 8.14 (s, 1H, H-2N), 8.22 (s, 1H, H-2A), 8.32 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.4 (CH₃ OEt), 25.7 (2C, CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ boc), 36.2 (CH₂-7'A), 37-2 (CH₂-8'A), 41.0 (C-5'A), 44.0 (CH₂-12A), 55.2 (2C, C-5'N and CH₂-6'N), 60.5 (CH₂ OEt), 74.4 (C-10), 78.0 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'A), 82.7 (C-3'N), 82.9 (C-2'A), 83.2 (C-2'N), 84.5 (C-4'N), 85.0 (C-4'A), 89.6 (C-1'N), 90.2 (C-1'A), 93.0 (C-11), 113.9 (Cq isop.), 114.0 (Cq isop.), 119.4 (C-5A), 119.7 (C-5N), 132.9 (C-8N), 140.4 (C-8A), 148.7 (C-4A), 149.3 (C-4N), 153.2 (C-2N),

154.3 (C-2A), 155.9 (Cq carbamate), 156.5 (C-6N), 156.6 (C-6A), 170.5 (C-7'N), 171.2 (C-6'A).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{41}H_{55}N_{13}O_{11}+H]^+$ 906.4217 found 906.4221.

5'-Deoxy-5'-(N-[3-(5'-deoxy-5'-(3-(amino)propylamido)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(acetic acid)amino)-adenosine (165**)**



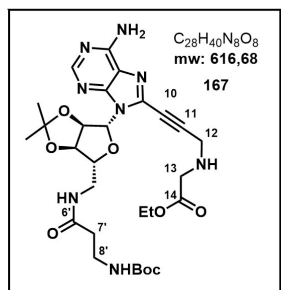
To a suspension of **164** (149 mg, 0.16 mmol, 1.0 equiv.) in water (1.6 mL) and 1,4-dioxane (800 μ L) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 82 μ L, 0.16 mmol, 1.0 equiv.). After 2 hours at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 2.0 mL). After 5 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the

residue was purified by reverse phase HPLC (0-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 7.7 min) to yield deprotected compound **165** (70 mg, 63%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.55-2.60 (m, 2H, CH₂-8'A), 2.99-3.04 (m, 2H, CH₂-7'A), 3.05-3.10 (m, 2H, H-5'N), 3.11-3.21 (m, 2H, CH₂-6'N), 3.24-3.31 (m, 1H, H-5'A), 3.58-3.65 (m, 1H, H-5'A), 3.82-3.93 (m, 3H, H-3'A and CH₂-12A), 4.01-4.07 (m, 2H, H-4'A and H-4'N), 4.19 (t app, J_{3'N,2'N} = J_{3'N,4'N} = 4.8 Hz, 1H, H-3'N), 4.64 (t app, J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.2 Hz, 1H, H-2'N), 4.85 (dd, J_{2'A,1'N} = 7.4 Hz, J_{2'A,3'N} = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 5.89 (d, J_{1'N,2'N} = 5.1 Hz, 1H, H-1'N), 6.23 (d, J_{1'A,2'A} = 7.4 Hz, 1H, H-1'A), 7.26 (s, 2H, NH₂-6N), 7.56 (s, 2H, NH₂-6A), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.40 (s, 1H, H-8N), 8.61-8.66 (m, 1H, NH-5'A).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 33.4 (CH₂-8'A), 36.0 (CH₂-7'A), 41.6 (C-5'A), 44.7 (CH₂-12A), 56.0 (C-5'N), 59.5 (C-6'N), 71.8 (C-3'A), 72.3 (C-3'N), 72.5 (C-2'A), 73.5 (C-2'N), 74.1 (C-10A), 83.2 (C-4'N), 85.4 (C-4'A), 87.9 (C-1'N), 89.0 (C-1'A), 94.3 (C-11A), 119.5 (C-5N), 119.7 (C-5A), 134.3 (C-8A), 140.2 (C-8N), 149.0 (C-4A), 150.0 (C-4N), 153.1 (C-2N), 153.9 (C-2A), 156.5 (2C, C-6A and C-6N), 170.3 (C-6'A), 175.3 (C-7'N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{28}H_{35}N_{13}O_9+H]^+$ 698.2753 found 698.2754.

5'-(3-(*N*-Boc-amino)propylamido)-5'-deoxy-2',3'-*O*-isopropylidene-8-(1-(ethyl ethanoate)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (167**)**

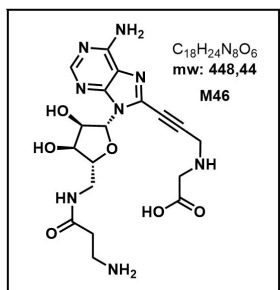
To a solution alkyne **140** (75 mg, 0.53 mmol, 1.5 equiv.) and bromo derivative **163** (199 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv.) in THF (3.5 mL) was added triethylamine (148 μ L, 1.07 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (7 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (21 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 3 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO₂, 0 to 6% methanol in dichloromethane) to yield compound **167** (186 mg, 85%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.33 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.20-2.30 (m, 2H, CH₂-7'), 3.07-3.14 (m, 2H, CH₂-8'), 3.34-3.40 (m, 2H, H-5'), 3.46 (s, 2H, CH₂-13), 3.79 (s, 2H, CH₂-12), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.19-4.23 (m, 1H, H-4'), 4.96 (dd, *J*_{3',2'} = 6.3 Hz, *J*_{3',4'} = 3.2 Hz, 1H, H-3'), 5.51 (dd, *J*_{2',1'} = 3.0 Hz, *J*_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.13 (d, *J*_{1',2'} = 3.0 Hz, 1H, H-1'), 6.99-6.74 (m, 1H, NH-8'), 7.56 (s, 2H, NH₂-6), 8.15-8.19 (m, 1H, NH-5'), 8.22 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.5 (CH₃ OEt), 25.8 (CH₃ isop.), 27.6 (CH₃ isop.), 28.6 (3C, CH₃ Boc), 36.2 (CH₂-7'), 37.2 (CH₂-8'), 37.9 (CH₂-12), 41.1 (C-5'), 49.2 (CH₂-13), 60.5 (CH₂ OEt), 72.6 (C-10), 78.0 (Cq *t*Bu), 82.3 (C-3'), 82.8 (C-2'), 84.9 (C-4'), 90.0 (C-1'), 95.8 (C-11), 114.1 (Cq isop.), 119.4 (C-5), 133.1 (C-8), 148.7 (C-4), 154.2 (C-2), 155.9 (Cq carbamate), 156.5 (C-6), 171.2 (C-6'), 171.9 (C-14).

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₈H₄₀N₈O₈+H]⁺ 617.3047 found 617.3031.

5'-(3-(Amino)propylamido)-5'-deoxy-8-(1-(acetic acid)aminoprop-2-yn-3-yl)adenosine (**168**)



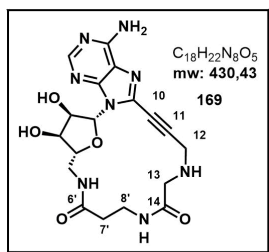
To a suspension of **167** (186 mg, 0.31 mmol, 1.0 equiv.) in water (1.5 mL) and 1,4-dioxane (800 μ L) was slowly added a solution of NaOH (1 M in water, 308 μ L, 0.31 mmol, 1.0 equiv.). After 1 hour at room temperature volatiles were removed by dry freezing. The solid residue was cooled down to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 6.2 mL). After 2 hours at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (5-20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 7.1 min) to yield deprotected compound **168** (80 mg, 58%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.52-2.57 (m, 2H, CH₂-8'), 2.99-3.04 (m, 2H, CH₂-7'), 3.37 (s, 2H, CH₂-13), 3.38-3.43 (m, 1H, H-5'), 3.49-3.56 (m, 1H, H-5''), 3.85 (s, 2H, CH₂-12), 4.00-4.04 (m, 1H, H-4'), 4.11 (dd, $J_{3',2'} = 5.6$ Hz, $J_{3',4'} = 3.0$ Hz, 1H, H-3'), 4.97 (dd, $J_{2',1'} = 6.4$ Hz, $J_{2',3'} = 5.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.00 (d, $J_{1',2'} = 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 7.58 (s, 2H, NH₂-6), 8.24 (s, 1H, H-2), 8.5-8.54 (m, 1H, NH-5').

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 32.6 (CH₂-8'), 35.8 (CH₂-7'), 38.0 (CH₂-12), 41.4 (C-5'), 49.6 (CH₂-13), 71.7 (C-3'), 71.9 (C-2'), 73.5 (C-10), 84.6 (C-4'), 89.6 (C-1'), 93.9 (C-11), 119.7 (C-5), 139.4 (C-8), 149.2 (C-4), 154.0 (C-2), 156.4 (C-6), 170.1 (C-6'), 172.8 (C-14).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₁₈H₂₄N₈O₆+H]⁺ 449.1897 found 449.1887.

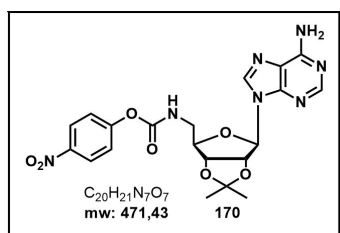
Macrocycle (**169**)



A solution of **168** (40 mg, 0.09 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (46 μ L, 0.27 mmol, 3.0 equiv.) in DMF (9 mL) and DMSO (9 mL) was added by a slow dropwise (during 8 hours) to a solution of PyBOP (93 mg, 0.18 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (900 μ L) and DMSO (900 μ L). After 16 hours at room temperature, DMF was removed *in vacuo* before adding water and freeze drying the crude. The solid residue was purified by reverse phase HPLC (10-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 4.6 min) to yield macrocyclised compound **169** (1.54 mg, 4%) as a white foam. Unfortunately too little compound was obtained to perform NMR analysis, the macrocycle was confirmed by HRMS.

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{18}H_{22}N_8O_5+H]^+$ 431.1786 found 431.1789.

5'-Deoxy-5'-*para*-nitrophenoxycarbonylamino-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (170)



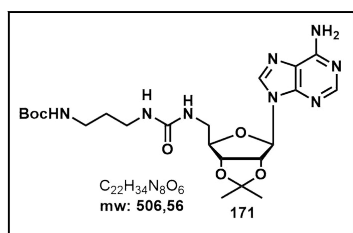
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.56 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.33-3.49 (m, 2H, CH₂-5'), 4.28 (td, J_{4',3'} = 3.3 Hz, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 5.8 Hz, 1H, H-4'), 5.05 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 3.3 Hz, 1H, H-3'), 5.47 (dd, J_{2',1'} = 2.8 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.19 (d, J_{1',2'} = 2.8 Hz, 1H, H-1'), 7.35 (s, 2H, NH₂-6), 7.37-7.42 (m, 2H, CH-O), 8.18 (s, 1H, H-2), 8.23-8.28 (m, 2H, CH-M), 8.34 (s, 1H, H-8), 8.37-8.42 (m, 1H, NH-5').

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.4 (CH₃ isop.), 43.3 (C-5'), 82.1 (C-3'), 83.4 (C-2'), 85.4 (C-4'), 89.5 (C-1'), 114.0 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 122.8 (2C, CH-O), 125.6 (2C, CH-M), 140.3 (C-8), 149.4 (C-4), 153.2 (C-2), 153.9 (C-NO₂), 156.6 (C-6), 158.3 (Cq carbamate), 164.5 (Cq-I) .

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{20}H_{21}N_7O_7+H]^+$ 472.1575 found 472.1568.

5'-Deoxy-5'-(3-(3-*N*-Boc-aminopropyl)ureido)-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (171)

Procedure A : From activated carbamate **170**.



N-Boc-1,3-propanediamine (290 mg, 1.65 mmol, 2.0 equiv.) was added to a solution of **170** (389 mg, 0.83 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (357 μ L, 2.0 mmol, 2.5 equiv) in THF (8.3 equiv). After 1.5 hours at 50°C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (25 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield compound **171** (407 mg, 97%) as a white foam.

Procedure B : From Curtius rearrangement.

A solution of 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)butyric acid (203 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in THF (4.0 mL) was cooled down to 0°C before adding *N*-methyl-morpholine (132

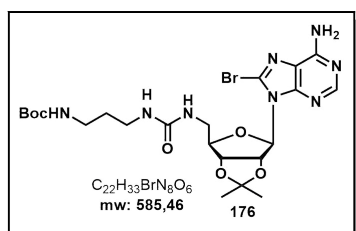
μL , 1.2 mmol, 1.2 equiv.) followed by ethyl chloroformate (114 μL , 1.2 mmol, 1.2 equiv.). After 20 minutes at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, the mixture was brought to $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ before adding a solution of NaN_3 (162 mg, 2.5 mmol, 2.5 equiv.) in water (1.0 mL). After 30 minutes at $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ the reaction was allowed back to room temperature. AcOEt was added (40 mL) and the organic layer was washed three times with brine (3x 10 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in toluene (8.0 mL) and heated 1 hour at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. The mixture was brought back to room temperature before adding a solution of amine **26** (306 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) in DMF (4.0 mL). After 2.5 hours at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield compound **171** (357 mg, 70%) as a white foam.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.32 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.36 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop.), 1.55-1.63 (m, 2H, CH_2 -8'), 2.06-2.12 (m, 2H, CH_2 -7'), 2.86-2.93 (m, 2H, CH_2 -9'), 3.32-3.36 (m, 2H, H-5'), 7.17 (td, $J_{4',3'} = 3.2\text{ Hz}$, $J_{4',5'} = 5.8\text{ Hz}$, 1H, H-4'), 4.90 (dd, $J_{3',2'} = 6.4\text{ Hz}$, $J_{3',4'} = 3.2\text{ Hz}$, 1H, H-3'), 5.43 (dd, $J_{2',1'} = 3.0\text{ Hz}$, $J_{2',3'} = 6.4\text{ Hz}$, 1H, H-2'), 6.12 (d, $J_{1',2'} = 3.0\text{ Hz}$, 1H, H-1'), 6.72-6.78 (m, 1H, NH-9'), 7.33 (s, 2H, NH₂-6), 8.06 (t, $J_{\text{NH}-5',5'} = 5.4\text{ Hz}$, 1H, NH-5').

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 25.7 (CH_3 isop.), 26.2 (CH_2 -8'), 27.5 (CH_3 isop.), 28.7 (3C, CH_3 Boc), 33.1 (CH_2 -7'), 39.9 (CH_2 -6'), 41.2 (C-5'), 77.9 (Cq Boc), 82.2 (C-3'), 83.3 (C-2'), 84.6 (C-4'), 89.6 (C-1'), 114.0 (Cq isop), 119.8 (C-5), 140.5 (C-8), 159.2 (C-4), 153.2 (C-2), 156.0 (Cq carbamate), 156.7 (C-6), 172.7 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_6 + \text{H}]^+$ 507.2674 found 507.2664.

5'-Deoxy-5'-(3-(3-*N*-Boc-aminopropyl)ureido)-2',3'-O-isopropylidene-8-bromoadenosine (**176**)



To a solution of **175** (652 mg, 1.3 mmol, 1.0 equiv.) in 1,4-dioxane (12.9 mL) and sodium acetate buffer (7.7 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (86 μL) dropwise. After 3.5 hours at room temperature, water (50 mL) was added and the aqueous layer was extracted twice with DCM (2x 50 mL). The combined organic layer were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*.

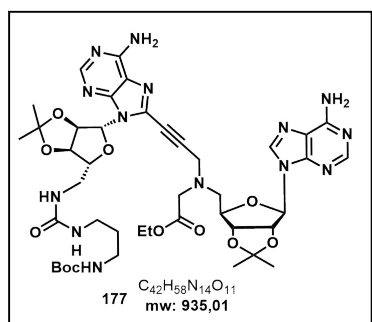
The residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO_2 , 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **176** (503 mg, 67%) as a pale yellow foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.39-1.47 (m, 2H, CH₂-9'), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop.), 2.85-2.92 (m, 2H, CH₂-9'), 2.93-2.99 (m, 2H, CH₂-7'), 3.09-3.17 (m, 1H, H-5'), 3.27-3.35 (m, 1H, H-5''), 4.12 (td, J_{4',5'} = J_{4',5''} = 6.4 Hz, J_{4',3'} = 3.4 Hz, 1H, H-4'), 5.01 (dd, J_{3',2'} = 6.3 Hz, J_{3',4'} = 3.4 Hz, 1H, H-3'), 5.68 (dd, J_{2',1'} = 2.3 Hz, J_{2',3'} = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 5.81 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH-6'), 6.03 (d, J_{1',2'} = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 6.04-6.08 (m, 1H, NH-5'), 6.69-6.75 (m, 1H, NHBoc), 7.50 (s, 1H, NH₂-6), 8.17 (s, 1H, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.7 (CH₃ isop.), 27.5 (CH₃ isop.), 28.7 (3C, CH₃ Boc), 30.9 (CH₂-8'), 37.3 (CH₂-7'), 37.8 (CH₂-9'), 41.9 (C-5'), 77.9 (Cq *t*Bu), 82.4 (C-3'), 82.7 (C-2'), 86.4 (C-4'), 90.9 (C-1'), 113.9 (Cq isop.), 119.7 (C-5), 126.7 (C-8), 150.4 (C-4), 153.4 (C-2), 155.4 (C-6), 156.1 (Cq carbamate), 158.4 (C-6').

HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₂H₃₃⁷⁹BrN₈O₆+H]⁺ 585.1779 found 585.1773.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(3-(3-*N*-Boc-aminopropyl)ureido)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(ethyl ethanoate)amino)-2',3'-*O*-isopropylideneadenosine (177**)**



To a solution of alkyne **152** (123 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.) and bromo derivative **176** (251 mg, 0.43 mmol, 1.5 equiv.) in THF (9.0 mL) was added triethylamine (119 μL, 0.86 mmol, 3.0 equiv.). The reaction mixture was degassed with argon for 15 minutes before adding sequentially CuI (5 mg, 10 mol%) and Pd(PPh₃)₄ (17 mg, 5 mol%) followed by a second 15 minutes argon degassing. After 16 hours at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (15 g SiO₂, 0 to 8% methanol in dichloromethane) to yield compound **177** (91 mg, 34%) as a pale yellow foam.

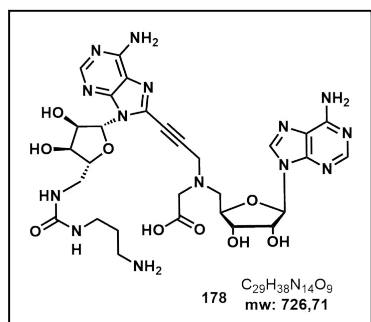
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃ OEt), 1.36 (s, 1H, CH₃ isop.), 1.40 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.42 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.58 (s, 3H, CH₃ isop.), 1.59-1.61 (m, 2H, CH₂-8'A), 1.62 (s, 3H, CH₃ isop.), 3.04 (dd, J_{5'N,5''N} = 13.8 Hz, J_{5'N,4'N} = 4.6 Hz, 1H, H-5'N), 3.08-3.19 (m, 3H, C-5''N and CH₂-9'A), 3.20-3.33 (m, 2H, CH₂-7'A), 3.45-3.55 (m, 3H, H-5'A and CH₂-6'N), 3.69-3.76 (m, 1H, H-5'A), 3.90 (ABq, J = 18 Hz, 2H, CH₂-12), 4.17 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂ OEt), 4.40-4.43 (m, 1H, H-4'N), 4.46-4.51 (m, 1H, H-4'A), 4.96 (dd, J_{3'N,2'N} = 6.1 Hz, J_{3'N,4'N} = 2.5 Hz, 1H, H-3'N), 5.01-5.08 (m, 1H, NH), 5.14 (dd, J_{3'A,2'A} = 6.3 Hz, J_{3'A,4'A} = 3.6 Hz, 1H, H-3'A), 5.44-5.50 (m, 2H, H-2'A and H-2'N), 6.10 (d, J_{1'N,2N} = 3.8 Hz, 1H, H-1'N), 6.14 (d, J_{1'A,2'A} = 2.0 Hz, 1H, H-1'A), 6.19 (s, 2H, NH₂-6), 6.49 (s, 2H, NH₂-6), 6.70 (s, 1H, NH), 8.03 (s, 1H,

H-2N), 8.32 (s, 1H H-8N), 8.35 (s, 1H, H-8A).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 8.6 (CH_2 -8'A), 14.2 (CH_3 -OEt), 25.4 (CH_3 isop), 25.5 (CH_3 isop.), 27.2 (CH_3 isop.), 27.4 (CH_3 isop.), 28.4 (3C, CH_3 Boc), 31.0 (CH_2 -8'A), 36.7 (CH_2 -7'A), 37.1 (CH_2 -9'A), 42.2 (C-5'A), 44.7 (C-12A), 55.3 (C-5'N), 55.6 (C-6'N), 60.8 (C-7'N), 73.9 (C-10A), 79.2 (Cq *t*Bu), 82.0 (C-3'N), 82.6 (C-2'N), 83.0 (C-2'A), 83.9 (C-3'A), 85.1 (C-4'N), 86.6 (C-4'A), 90.7 (1'A), 91.0 (1'N), 92.7 (C-11A), 114.2 (Cq isop.), 114.5 (Cq isop.), 119.9 (C-5A), 120.0 (C-5N), 134.1 (C-8A), 140.2 (C-8N), 149.6 (C-4N), 149.1 (C-4A), 152.9 (C-2A), 153.5 (C-2N), 155.5 (C-6A), 155.7 (C-6N), 156.5 (Cq carbamate), 158.9 (C6'A), 170.3 (C-7'N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_{14}\text{O}_{11}+2\text{H}]^+$ 468.2278 found 468.2283.

5'-Deoxy-5'-(*N*-[3-(5'-deoxy-5'-(3-(3-aminopropyl)ureido)-adenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2-(acetic acid)amino)-adenosine (178**)**



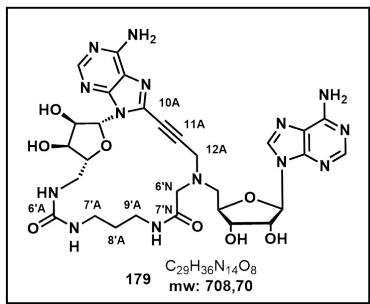
To a solution of **177** (91 mg, 0.1 mmol, 1.0 equiv.) in water (500 μL) and 1,4-dioxane (500 μL) was slowly added a solution of NaOH (2 M in water, 53 μL , 0.05 mmol, 1.1 equiv.). After 2 hours at room temperature a second addition of NaOH (2 M in water, 0.2 equiv) was made. After 2 additional hours, the mixture was cooled down to 0°C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 1.0 mL). After 6 hour at room temperature, the reaction mixture was lyophilised and the residue was purified by reverse phase HPLC (0-50% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 7.8 min) to yield fully deprotected compound **178** as a white foam (34 mg, 49%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.59-1.68 (m, 2H, CH_2 -6'A), 2.73-2.78 (m, 2H, CH_2 -8'A), 2.95-3.11 (m, 4H, CH_2 -5'N and CH_2 -7'A), 3.11-3.21 (m, 2H, CH_2 -6'A), 3.22-3.31 (m, 1H, H-5'A), 3.33-3.41 (m, 1H, H-5'A), 3.88 (s, 2H, CH_2 -12A), 3.91-4.00 (m, 2H, H-4'A and H-3'A), 4.01-4.07 (m, 1H, H-4'N), 4.19 (tapp, $J_{3'N,2'N} = J_{3'N,4'N} = 4.8$ Hz, 1H, H-3'N), 4.63 (tapp, $J_{2'N,1'N} = J_{2'N,3'N} = 5.2$ Hz, 1H, H-2'N), 4.94-4.99 (m, 1H, H-2'A), 5.89 (d, $J_{1'N,2'N} = 5.0$ Hz, 1H, H-1'N), 6.16 (d, $J_{1'A,2'A} = 6.09$ Hz, 1H, H-1'A), 6.18-6.22 (m, 1H, NH-6'A), 6.45-6.50 (m, 1H, NH-5'A), 7.29 (s, 2H, NH_2 -6), 7.48 (s, 2H, NH_2 -6), 8.17 (s, 1H, H-2N), 8.21 (H-2A), 8.41 (H-8N).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 29.0 (CH_2 -8'A), 36.5 (CH_2 -7'A), 37.0 (CH_2 -9'A), 42.6 (C-5'A), 44.6 (CH_2 -12A), 56.2 (C-5'N), 59.5 (C-6'N), 71.7 (C-3'A), 772.0 (C-2'A),

72.3 (C-3'N), 73.5 (C-2'N), 74.4 (C-10A), 83.2 (C-4'N), 85.2 (C-4'A), 87.9 (C-1'N), 88.7 (C-1'A), 94.2 (C-11A), 119.5 (2C, C-5A and C-5N), 134.1 (C-8A), 140.1 (C-8N), 149.3 (C-4A), 149.9 (C-4N), 153.1 (C-2N), 154.0 (C-2A), 156.4 (2C, C-6A and C-6N) 159.2 (C-6'A), 175.1 (C-7'N).

Macrocycle **179**



A solution of **178** (20.0 mg, 0.02 mmol, 1.0 equiv.) and DIEA (41 μ L, 0.08 mmol, 3.0 equiv.) in DMF (2.8 mL) and DMSO (2.8 mL) was added by a slow dropwise (during 4 hours) to a solution of PyBOP (31 mg, 0.06 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (300 μ L) and DMSO (300 μ L). After 36 hours at room temperature a second addition of PyBOP (2.5 equiv.) and DIEA (2.0 equiv), was made. After an additional 16 hours at room temperature, DMF

was removed *in vacuo*. The crude was purified by reverse phase HPLC (5-15% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer, linear gradient over 15 min, t_R = 13.1 min) to yield macrocyclised compound **179** (4.0 mg, 20%) as a white foam.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.45-1.56 (m, 2H, CH₂-8'A), 2.91-3.29 (m, 9H, CH₂-5'N, H-5'A, CH₂-7'A, CH₂-9'A, CH₂-6'N), 3.49-3.57 (m, 1H, H-5'A), 3.80 (ABq, J = 17.8 Hz, 2H, CH₂-12A), 3.85-3.89 (m, 1H, H-4'A), 4.07-4.14 (m, 2H, H-3'A and H-4'N), 4.20-4.25 (m, 1H, H-3'N), 4.62-4.68 (m, 1H, H-2'N), 4.87-4.92 (m, 1H, H-2'A), 5.17 (d, JOH3'A,3'A = 6.0 Hz, 1H, OH-3'A), 5.27 (d, JOH3'N,3'N = 5.5 Hz, 1H, OH-3'N), 5.40 (d, OH2'A,2'A = 6.0 Hz, 1H, OH-2'A), 5.48 (d, OH2'N,2'N = 6.0 Hz, 1H, OH-2'N) 5.85-5.89 (m, 2H, NH-5'A and NH-6'A), 5.91 (d, J1'N,2'N = 5.1 Hz, 1H, H-1'N), 6.0 (d, J1'A,2'A = 5.3 Hz, 1H, H-1'A), 7.24 (s, 2H, NH₂-6), 7.53 (s, 2H, NH₂-6), 7.59 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH-9'A), 8.16 (s, 1H, H-2N), 8.19 (s, 1H, H-2A), 8.36 (s, 1H, H-8N).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.7 (CH₂-8'A), 37.9 (CH₂-9'A), 39.2 (C-5'N), 42.0 (C-5'A), 44.7 (C-12A), 56.9 (C-7'A), 57.9 (C-6'N), 71.0 (C-3'A), 72.0 (C-2'A), 72.2 (C-3'N), 73.2 (C-2'N), 75.4 (C-10A), 82.9 (C-4'N), 83.1 (C-4'A), 88.1 (C-1'N), 88.4 (C-1'A), 93.0 (C-11A), 118.8 (C-5A), 119.9 (C-5N), 132.6 (C-8A), 140.2 (C-8N), 149.8 (C-4N), 149.9 (C-4A), 153.2 (C-2N), 154.4 (C-2A), 156.3 (C-6A), 156.5 (C-6N), 158.9 (C-6'A), 169.5 (C-7'N).

HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for [C₂₉H₃₆N₁₄O₈+H]⁺ 709.2913 found 709.2905.

Conclusion et perspectives

La NAD kinase est une enzyme ubiquitaire ayant été montrée essentielle pour de nombreux micro-organismes pathogènes. Dans ce cadre, elle a été choisie comme cible pour le développement de nouveaux agents anti-bactériens.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons abordé la conception et la synthèse d'outils moléculaires permettant une confirmation de la cible ou un suivi intracellulaire des inhibiteurs. Nous avons également synthétisé de nouveaux composés, dans le but d'améliorer leur efficacité contre *S. aureus*.

En nous reposant sur les structures de complexe enzyme/ligand entre *Lm*NADK et **NKI-1**, nous avons identifié trois positions de la diadénosine modèle potentiellement dérivatisables pour concevoir des outils moléculaires. Nous avons entrepris la synthèse de différents analogues possédant une chaîne carbonée fonctionnalisée à chacune de ces trois positions (Chapitre n°2).

Afin d'obtenir les composés souhaités, plusieurs stratégies de synthèse ont été envisagées à partir de la 2',3'-*O*-isopropylidène adénosine. Toutes reposent sur un couplage de Sonogashira entre deux blocs A et N préalablement fonctionnalisés (Substitution nucléophile, amination réductrice, couplage peptidique, stratégie nosyle) et ont permis l'obtention de cinq analogues de **NKI-1** possédant une chaîne aminoalkyle avec des rendements satisfaisants.

L'affinité de ces inhibiteurs (K_i) a été mesurée sur l'enzyme modèle *Lm*NADK afin de s'assurer que la modification apportée n'était pas préjudiciable. Une étude cristallographique a complété la mesure du K_i en précisant le positionnement des inhibiteurs dans le site NAD de l'enzyme et permettant de guider notre choix dans la sélection des candidats à greffer sur support solide.

Des expériences de chromatographie d'affinité ont ensuite été réalisées en utilisant des lysats bactériens de *E. coli* surexprimant *Sa*NADK-His. L'analyse des fractions de colonne (Gel SDS-PAGE) suivie de la détection des protéines éluées (coloration au bleu de Coomassie et *western blot*) ont permis la validation de l'un des supports préparés.

Il serait maintenant intéressant de poursuivre ces expériences en utilisant des lysats de *S. aureus* suivi d'analyses de protéomiques dans le but d'identifier les protéines "*off targets*" des inhibiteurs.

A l'issue du second chapitre, nous avons identifié la position centrale de **NKI-1** comme propice pour le développement d'outils chimiques. Tirant parti de cette information, nous avons préparé d'autres outils dans le but de localiser nos composés *in vitro* par microscopie de fluorescence (Chapitre n°3).

A cette fin, nous avons appliqué la stratégie nosyle, mise au point au chapitre

précédent, afin de préparer une diadénosine portant une fonction alcyne vrai, plutôt qu'une amine primaire, en position centrale. Nous avons également synthétisé un fluorophore de type azidocoumarine qui présente de bonnes propriétés de fluorescence après réaction de click, minimisant le bruit de fond dû au fluorophore n'ayant pas réagi. Afin de déterminer les paramètres d'absorption et d'émission optimaux pour les expériences de microscopie de fluorescence, nous avons synthétisé le produit de réaction de cycloaddition (CuAAC) entre les deux partenaires.

Le premier essai de microscopie de fluorescence, utilisant l'azidocoumarine, n'a pas été concluant. En effet, un phénomène d'autofluorescence des bactéries a été observé aux longueurs d'ondes sélectionnées. Nous avons alors choisi un fluorophore commercial dont la longueur d'onde d'excitation ne produisait pas d'autofluorescence. La seconde expérience a permis l'obtention de données exploitables permettant de conclure que la diadénosine utilisée colocalise bien avec les bactéries. Des expériences de microscopie de fluorescence à haute résolution sont en cours afin de déterminer la localisation cellulaire (cytoplasmique ou membranaire) du composé. L'étape suivante serait la modification génétique de *Sa*NADK, la combinant avec une protéine fluorescente verte (GFP en anglais), pour en faire une protéine de fusion fluorescente. Cela permettrait de réaliser des expériences de colocalisation entre les inhibiteurs synthétisés et la NADK, confirmant qu'elle est bien la cible principale.

Parmi les outils chimiques synthétisés, l'un d'entre eux (**38**) s'est révélé prometteur, exposant une meilleure affinité et inhibition de croissance bactérienne que **NKI-1**. Nous avons donc conduits une petite étude structure activité autour de ce composé, renommé "*NKI-2*" (Chapitre n°4).

L'application de la stratégie nosyle a permis l'obtention de six analogues de **NKI-2** portant des modifications en position centrale, en position 5' ou des modifications du motif ribose. Nous avons également évalué l'effet additif entre le groupement aminopropyle central et diverses modifications apportées en position 5' du site A.

Le pouvoir inhibiteur *in vitro* sur enzyme purifiée (*Lm*NADK) et sur cultures de *S. aureus* a ensuite été évalué. De manière générale, les Ki des composés décrits dans ce chapitre restent bons, avec quelques améliorations (allant jusqu'à un facteur 25). Malgré cela, nous avons systématiquement observé une faible inhibition de croissance lors des tests sur bactéries pouvant s'expliquer par une mauvaise pénétration membranaire. Il serait envisageable d'avoir recours à l'imagerie Raman afin de confirmer cette hypothèse nous incitant, par la suite, à concevoir des molécules portant des fonctions favorisant leur transport à travers la membrane.

Les données cristallographiques obtenues dans le chapitre 2 nous ont conduit à envisager une nouvelle série d'analogues macrocycliques, plus contraints, dans l'espoir d'augmenter l'affinité des composés synthétisés pour la cible (Chapitre n°5).

A cette fin, nous avons synthétisé cinq molécules différentes appartenant à deux familles de composés macrocycliques présentant un lien de type "amide" (tronqués ou non) ou "urée".

Les tests *in vitro* sur enzyme purifiée ont montré que l'adénosine du site N était nécessaire au maintien d'une bonne affinité et ont confirmé l'hypothèse selon laquelle des inhibiteurs plus contraints auraient une meilleure affinité pour l'enzyme modèle (amélioration d'un facteur 300 par rapport à **NKI-1**). Malheureusement, cette forte affinité ne s'est pas traduite par une bonne activité *in vitro* sur culture de *S. aureus*.

A l'instar des composés décrits au chapitre 4, il est possible que les faibles inhibitions de croissance observées soient dues à une mauvaise pénétration membranaire. L'imagerie Raman devrait permettre de confirmer cette hypothèse.

A l'issue de ces travaux, nous avons à notre disposition plusieurs composés ayant une affinité sub-micromolaire pour la cible (*Lm*NADK). Nous avons également conçu plusieurs molécules pouvant servir d'outils chimiques afin de mieux caractériser et comprendre les interactions entre les inhibiteurs et le pathogène ciblé. Pour ce faire, nous avons initié une collaboration avec la plate-forme de protéomique de l'Institut Pasteur afin de caractériser les protéines *off target*.

Bibliographie

- (1) Relman, D. A. ; Falkow, S. in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Bennett, J. E., Dolin, R. *et al.*, éd. ; W.B. Saunders : Philadelphia, 2015, 1-10.e2.
- (2) Tremaroli, V. ; Bäckhed, F. *Nature* **2012**, *489*, 242-249.
- (3) Al-Mebairik, N. F. ; El-Kersh, T. A. *et al. Reviews in Medical Microbiology* **2016**, *27*.
- (4) Tuberculosis fact sheet, who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis.
- (5) Behr, M. A. ; Edelstein, P. H. *et al. BMJ* **2018**, *362*, DOI : 10.1136/bmj.k2738.
- (6) Riedel, S. *Baylor University Medical Center Proceedings* **2005**, *18*, 21-25.
- (7) Zhabiz, G. ; Omar, B. *et al. The Journal of Infection in Developing Countries* **2014**, *8*, DOI : 10.3855/jidc.3573.
- (8) Chanishvili, N. in *Advances in Virus Research*, Łobocka, M., Szybalski, W., éd. ; Academic Press : 2012, p. 3-40.
- (9) Bechinger, B. ; Gorr, S. U. *Journal of Dental Research* **2016**, *96*, 254-260.
- (10) Lohans, C. T. ; Vederas, J. C. *International Journal of Microbiology* **2012**, *2012*, 386410.
- (11) Silhavy, T. J. ; Kahne, D. *et al. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*.
- (12) Noda, M. ; Kawahara, Y. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 46143-46152.
- (13) Christensen, B. G. ; Leanza, W. J. *et al. Science* **1969**, *166*, 123.
- (14) Hendlin, D. ; Stapley, E. O. *et al. Science* **1969**, *166*, 122.
- (15) Fleming, A. *British journal of experimental pathology* **1929**, *10*, 226-236.
- (16) D.C., J. ; P.E., R., *Vancomycin* ; Antibiotics, t. 1 ; Springer, Berlin, Heidelberg : 1967.
- (17) Reynolds, P. E. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **1989**, *8*, 943-950.

- (18) Stone, K. J. ; Strominger, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, 3223-3227.
- (19) Mascher, T. ; Margulis, N. G. *et al. Molecular Microbiology* **2003**, 50, 1591-1604.
- (20) Steenbergen, J. N. ; Alder, J. *et al. Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, 55, 283-288.
- (21) Velkov, T. ; Roberts, K. D. *et al. Future Microbiology* **2013**, 8, 711-724.
- (22) Falagas, M. E. ; Kasiakou, S. K. *et al. Clinical Infectious Diseases* **2005**, 40, 1333-1341.
- (23) Garneau-Tsodikova, S. ; Labby, K. J. *MedChemComm* **2016**, 7, 11-27.
- (24) Chopra, I. ; Roberts, M. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2001**, 65, 232.
- (25) Tocher, J. H. ; Edwards, D. I. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **1992**, 22, 661-663.
- (26) Mikata, Y. ; Kishigami, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, 9, 2141-2144.
- (27) Campbell, E. A. ; Korzheva, N. *et al. Cell* **2001**, 104, 901-912.
- (28) Pham, T. D. M. ; Ziora, Z. M. *et al. MedChemComm* **2019**, 10, 1719-1739.
- (29) Rossi, M. ; Amaretti, A. *et al. Nutrients* **2011**, 3, DOI : 10.3390/nu3010118.
- (30) Gleckman, R. ; Blagg, N. *et al. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **1981**, 1, 14-19.
- (31) Sir Alexander, F. *Nobel lecture, Physiology or Medicine* **1945**.
- (32) Martinez, J. L. *Drug Discovery Today: Technologies* **2014**, 11, 33-39.
- (33) Wood, T. K. ; Knabel, S. J. *et al. Applied and Environmental Microbiology* **2013**, 79, 7116.
- (34) Reygaert, W. C. *AIMS microbiology* **2018**, 4, 482-501.
- (35) D'Costa, V. M. ; King, C. E. *et al. Nature* **2011**, 477, 457-461.
- (36) Bhullar, K. ; Waglechner, N. *et al. PLOS ONE* **2012**, 7, e34953.
- (37) Cox, G. ; Wright, G. D. *International Journal of Medical Microbiology* **2013**, 303, 287-292.
- (38) Beceiro, A. ; Tomás, M. *et al. Clinical Microbiology Reviews* **2013**, 26, 185.
- (39) Bush, K. ; Bradford, P. A. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2016**, 6.
- (40) Ramirez, M. S. ; Tolmasky, M. E. *Drug Resistance Updates* **2010**, 13, 151-171.
- (41) Robicsek, A. ; Strahilevitz, J. *et al. Nature Medicine* **2006**, 12, 83-88.

-
- (42) Schwarz, S. ; Kehrenberg, C. *et al. FEMS Microbiology Reviews* **2004**, *28*, 519-542.
- (43) O'Neill, J. ; Resistance, R. o. A., *Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*; Review on Antimicrobial Resistance : 2016.
- (44) Lee, A. S. ; de Lencastre, H. *et al. Nature Reviews Disease Primers* **2018**, *4*, 18033.
- (45) El-Sayed, M. T. ; Zoraghi, R. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31*, 1666-1671.
- (46) Srivastava, A. ; Singh, B. N. *et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 2169.
- (47) Roland, S. ; Jolivalt, C. *et al. Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 1442-1446.
- (48) Nagel, B. ; Dellweg, H. *et al. Pure and Applied Chemistry* **1992**, *64*, 143-168.
- (49) Broderick, J. B. in *eLS*, 2001.
- (50) Koźmiński, P. ; Halik, P. K. *et al. International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, DOI : 10.3390/ijms21103483.
- (51) Harden, A. ; Young, W. J. *et al. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **1906**, *78*, 369-375.
- (52) Von Euler, H. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* **1936**, *38*, 1-30.
- (53) Warburg, O. ; Christian, W. *Helvetica Chimica Acta* **1936**, *19*, E79-E88.
- (54) Berger, F. ; Ramirez-Hernández, M. H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2004**, *29*, 111-118.
- (55) Cantó, C. ; Menzies, K. J. *et al. Cell Metabolism* **2015**, *22*, 31-53.
- (56) Xiao, W. ; Wang, R.-S. *et al. Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, *28*, 251-272.
- (57) Spaans, S. ; Weusthuis, R. *et al. Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, DOI : 10.3389/fmicb.2015.00742.
- (58) Ward, B. in *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Tang, Y.-W., Sussman, M. *et al.*, éd. ; Academic Press : Boston, 2015, p. 201-233.
- (59) Sohlenkamp, C. ; Geiger, O. *FEMS Microbiology Reviews* **2016**, *40*, 133-159.
- (60) Singh, R. ; Mailloux, R. J. *et al. Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, 6665.
- (61) Giro, M. ; Carrillo, N. *et al. Microbiology* **2006**, *152*, 1119-1128.
- (62) Magni, G. ; Amici, A. *et al. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **2004**, *61*, 19-34.
- (63) Rozenberg, A. ; Lee, J. K. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 9314-9319.

- (64) Vestin, R. *Naturwissenschaften* **1937**, *25*, 667-668.
- (65) Kornberg, A. *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *182*, 805-813.
- (66) Kornberg, A. ; Pricer, W. E. *Journal of Biological Chemistry* **1950**, *186*, 557-567.
- (67) Kawai, S. ; Mori, S. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *276*, 57-63.
- (68) Labesse, G. ; Douguet, D. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 273-275.
- (69) Giulio, M. ; Giuseppe, O. *et al. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 739-746.
- (70) Chung, A. E. *Journal of Biological Chemistry* **1967**, *242*, 1182-1186.
- (71) Chung, A. E. in *Methods in Enzymology*; Academic Press : **1971**, p. 149-156.
- (72) Apps, D. K. *European Journal of Biochemistry* **1971**, *19*, 301-308.
- (73) Kawai, S. ; Murata, K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2008**, *72*, 919-930.
- (74) Lerner, F. ; Niere, M. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *288*, 69-74.
- (75) Chang, A. ; Ebeling, C. *et al. Nucleic acids research* **2004**, *32*, 431-433.
- (76) Garavaglia, S. ; Raffaelli, N. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 40980-40986.
- (77) Liu, J. ; Lou, Y. *et al. Journal of Molecular Biology* **2005**, *354*, 289-303.
- (78) Mori, S. ; Yamasaki, M. *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *327*, 500-508.
- (79) Poncet-Montange, G. ; Assairi, L. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33925-33934.
- (80) Outten, C. E. ; Falk, R. L. *et al. Biochemical Journal* **2005**, *388*, 93-101.
- (81) Shianna, K. V. ; Marchuk, D. A. *et al. Mitochondrion* **2006**, *6*, 99-106.
- (82) Zhang, K. ; Kim, H. *et al. Gastroenterology* **2018**, *154*, 224-237.
- (83) Houten, S. M. ; Denis, S. *et al. Human Molecular Genetics* **2014**, *23*, 5009-5016.
- (84) Pollak, N. ; Niere, M. *et al. Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 33562-33571.
- (85) Grose, J. H. ; Joss, L. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 7601.
- (86) Kobayashi, K. ; Ehrlich, S. D. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 4678.

-
- (87) Gelin, M. ; Paoletti, J. *et al.* *ACS Infectious Diseases* **2020**, *6*, 422-435.
- (88) Gerdes, S. Y. ; Scholle, M. D. *et al.* *Journal of Bacteriology* **2002**, *184*, 4555.
- (89) Sassetti, C. M. ; Boyd, D. H. *et al.* *Molecular Microbiology* **2003**, *48*, 77-84.
- (90) Pollak, N. ; Dölle, C. *et al.* *The Biochemical journal* **2007**, *402*, 205-218.
- (91) Raffaelli, N. ; Finaurini, L. *et al.* *Biochemistry* **2004**, *43*, 7610-7617.
- (92) Mori, S. ; Kawai, S. *et al.* *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 24104-24112.
- (93) Felczak, K. ; Pankiewicz, K. W. *Current Medicinal Chemistry* **2011**, *18*, 1891-1908.
- (94) Felczak, K. ; Chen, L. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 1594-1605.
- (95) Chen, L. ; Gao, G. *et al.* *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5743-5751.
- (96) Erlanson, D. A. ; Fesik, S. W. *et al.* *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 605-619.
- (97) Congreve, M. ; Carr, R. *et al.* *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 876-877.
- (98) Hartshorn, M. J. ; Murray, C. W. *et al.* *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 403-413.
- (99) Thomas, S. E. ; Collins, P. *et al.* *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2019**, *377*, 20180422.
- (100) Gelin, M. ; Poncet-Montange, G. *et al.* *Structure* **2012**, *20*, 1107-1117.
- (101) Paoletti, J. ; Assairi, L. *et al.* *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 1041-1056.
- (102) Rodriguez, E. L. ; Poddar, S. *et al.* *Journal of Chromatography B* **2020**, *1157*, 122332.
- (103) Cuatrecasas, P. ; Wilchek, M. *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1968**, *61*, 636.
- (104) Kim, H. S. ; Kye, Y. S. *et al.* *Journal of Chromatography A* **2004**, *1049*, 51-61.
- (105) Gunarti, D. R. ; Rahmi, H. *et al.* *HAYATI Journal of Biosciences* **2013**, *20*, 1-6.
- (106) Clément, D. A. ; Leseigneur, C. *et al.* *Molecules* **2020**, *25*, 4893.
- (107) Paterson, I. ; Davies, R. D. M. *et al.* *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 603-607.
- (108) Bock, M. ; Dehn, R. *et al.* *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 9134-9137.
- (109) Toyota, M. ; Komori, C. *et al.* *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 7110-7113.

- (110) Shchetnikov, G. T. ; Zotova, M. A. *et al. European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 2010, 1587-1592.
- (111) Andresen, B. M. ; Couturier, M. *et al. Organic Process Research & Development* **2004**, 8, 643-650.
- (112) Pu, Y.-M. ; Grieme, T. *et al. Organic Process Research & Development* **2005**, 9, 45-50.
- (113) Dieck, H. A. ; Heck, F. R. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, 93, 259-263.
- (114) Cassar, L. *Journal of Organometallic Chemistry* **1975**, 93, 253-257.
- (115) Sonogashira, K. ; Tohda, Y. *et al. Tetrahedron Letters* **1975**, 16, 4467-4470.
- (116) Chinchilla, R. ; Nájera, C. *Chemical Reviews* **2007**, 107, 874-922.
- (117) Negishi, E.-i. ; Anastasia, L. *Chemical Reviews* **2003**, 103, 1979-2018.
- (118) Agrofoglio, L. A. ; Gillaizeau, I. *et al. Chemical Reviews* **2003**, 103, 1875-1916.
- (119) Matsuda, A. ; Shinozaki, M. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 241-252.
- (120) Crisp, G. T. ; Gore, J. *Tetrahedron* **1997**, 53, 1523-1544.
- (121) Robins, M. J. ; Barr, P. J. *The Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48, 1854-1862.
- (122) Sagi, G. ; Otvos, L. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37, 1307-1311.
- (123) Seela, F. ; Zulauf, M. *et al. Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 910-927.
- (124) Heinrich, D. ; Wagner, T. *et al. Organic Letters* **2007**, 9, 5311-5314.
- (125) Adamo, M. F. A. ; Pergoli, R. *et al. Tetrahedron* **2010**, 66, 9242-9251.
- (126) Bobula, T. ; Hock, M. *et al. Tetrahedron* **2010**, 66, 530-536.
- (127) Chiba, J. ; Takeshima, S. *et al. Chemistry – A European Journal* **2007**, 13, 8124-8130.
- (128) Fujimoto, K. ; Aizawa, S. *et al. Chemistry – A European Journal* **2010**, 16, 2401-2406.
- (129) Theodora W., G. ; Peter G. M., W. in *Protective groups in organic synthesis, Third edition*; J. Wiley. : **1999**, p. 207-215.
- (130) Errico, S. ; Oliviero, G. *et al. Molecules* **2012**, 17, DOI : 10.3390/molecules171113036.
- (131) Mathew, S. C. ; Ghosh, N. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 6736-6739.
- (132) Chen, J.-B. ; Liu, E. M. *et al. ChemMedChem* **2011**, 6, 1390-1400.
- (133) Jawalekar, A. M. ; Meeuwenoord, N. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, 287-290.

-
- (134) Poppe, L. ; Rétey, J. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1993**, 76, 2367-2383.
- (135) Matthews, A. J. ; Bhardwaj, P. K. *et al. Helvetica Chimica Acta* **2004**, 87, 2273-2295.
- (136) Morrell, A. ; Placzek, M. S. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50, 2040-2048.
- (137) Stewart, R. ; Harris, M. G. *Canadian Journal of Chemistry* **1977**, 55, 3807-3814.
- (138) Sonogashira, K. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, 653, 46-49.
- (139) Pankaskie, M. ; Abdel-Monem, M. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **1980**, 23, 121-127.
- (140) Shi, G. ; Shaw, G. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 4303-4309.
- (141) Dixit, V. M. ; Poulter, C. D. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25, 4055-4058.
- (142) Bhattarai, S. ; Freundlieb, M. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 6248-6263.
- (143) Stout, M. G. ; Robins, M. J. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1969**, 12, 658-662.
- (144) Kvasyuk, E. I. ; Kulak, T. I. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1995**, 78, 1777-1784.
- (145) Davis, M. ; Dudman, N. P. B. *et al. Australian Journal of Chemistry* **1983**, 36, 1623-1627.
- (146) Minnick, A. A. ; Kenyon, G. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53, 4952-4961.
- (147) Sakami, W. in *Biochemical preparations, Volume 6* ; J. Wiley. : 1958 ; chap. 8.
- (148) Donnier-Maréchal, M. ; Carato, P. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 138, 964-978.
- (149) Hogley, G. ; McKelvie, J. C. *et al. Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, 22, 3079-3082.
- (150) Dowden, J. ; Pike, R. A. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, 7814-7821.
- (151) Zhang, G. ; Richardson, S. L. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, 13, 4149-4154.
- (152) Mori, S. ; Iwase, K. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 8158-8166.
- (153) Gibbons, G. ; Showalter, H. *et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2015**, 34, 348-60.
- (154) Atdjian, C. ; Iannazzo, L. *et al. European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 4411-4425.

- (155) Zhu, X.-F.; Williams, H. J. *et al. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 2305-2306.
- (156) Choi Eun, J.; Kim, E. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 1346-1350.
- (157) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 3849-3862.
- (158) Fukuyama, T.; Jow, C.-K. *et al. Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 6373-6374.
- (159) Kan, T.; Fukuyama, T. *Chemical Communications* **2004**, 353-359.
- (160) Marvin, C. C. in *Comprehensive Organic Synthesis II (Second Edition)*, Knochel, P., éd.; Elsevier : Amsterdam, 2014, p. 49-50.
- (161) Halby, L.; Marechal, N. *et al. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2018**, *373*, 20170072.
- (162) Kolb, M.; Danzin, C. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1982**, *25*, 550-556.
- (163) Ren, L.; Lin, Z. *et al. Applied Microbiology and Biotechnology* **2018**, *102*, 1085-1096.
- (164) Manfredini, S.; Solaroli, N. *et al. Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2003**, *14*, 183-194.
- (165) Joce, C.; White, R. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 278-284.
- (166) Zhang, Y.; Jumppanen, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 1588-1597.
- (167) Srivastava, P. C.; Nagpal, K. L. *Experientia* **1970**, *26*, 220-220.
- (168) Comstock, L. R.; Rajski, S. R. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 1425-1428.
- (169) Moreau, C.; Kirchberger, T. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 10079-10102.
- (170) Homma, H.; Watanabe, Y. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35*, 2881-2890.
- (171) Qiao, C.; Wilson, D. J. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6350-6351.
- (172) Moukha-chafiq, O.; Reynolds, R. C. *ACS Combinatorial Science* **2013**, *15*, 147-152.
- (173) Mieczkowski, A.; Roy, V. *et al. Chemical Reviews* **2010**, *110*, 1828-1856.
- (174) Beauchemin, A. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 7039-7050.

-
- (175) Wang, L. ; Yu, X. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 1693-1698.
- (176) Lerner, C. ; Masjost, B. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 42-49.
- (177) In *Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules*; G. E. Helth-care : **2016**, p. 80-83.
- (178) Chen, Y. W., *Structural Genomics: General Applications*; Methods in Molecular Biology ; Humana Press Incorporated : 2014.
- (179) Burnette, W. N. in *Protein Blotting and Detection: Methods and Protocols*, Kurien, B. T., Scofield, R. H., éd. ; Humana Press : Totowa, NJ, 2009, p. 5-8.
- (180) Mahmood, T. ; Yang, P.-C. *North American Journal of Medical Sciences* **2012**, 4, 429-434.
- (181) Adams, P. D. ; Afonine, P. V. *et al. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, 66, 213-221.
- (182) Yalow, R. S. ; Berson, S. A. *The Journal of Clinical Investigation* **1960**, 39, 1157-1175.
- (183) Goldsmith, S. J. *Seminars in Nuclear Medicine* **1975**, 5, 125-152.
- (184) Phelps, M. E. *Journal of Nuclear Medicine* **2000**, 41, 661-681.
- (185) Nordberg, A. ; Rinne, J. O. *et al. Nature Reviews Neurology* **2010**, 6, 78-87.
- (186) Shona Stewart, J. P. A. D. in *The Current State of Raman Imaging in Clinical Application*; McGraw-Hill Education : New York, 2010, p. 265-297.
- (187) Delhay, M. ; Dhamelin-court, P. *Journal of Raman Spectroscopy* **1975**, 3, 33-43.
- (188) Yamakoshi, H. ; Dodo, K. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, 20681-20689.
- (189) Weeks, C. L. ; Jo, H. *et al. Journal of Raman Spectroscopy* **2012**, 43, 1244-1249.
- (190) Van Manen, H.-J. ; Lenferink, A. *et al. Analytical Chemistry* **2008**, 80, 9576-9582.
- (191) Xie, X. S. ; Yu, J. *et al. Science* **2006**, 312, 228.
- (192) Yee, D. J. ; Balsanek, V. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 2282-2283.
- (193) Beatty, K. E. ; Xie, F. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 14150-14151.
- (194) Lesur, E. ; Baron, A. *et al. Chemical Communications* **2019**, 55, 13074-13077.
- (195) Carvalho, P. H. P. R. ; Correa, J. R. *et al. Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2019**, 15, 2644-2654.
- (196) Salic, A. ; Mitchison, T. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105, 2415.

- (197) Zidovska, A. ; Weitz, D. A. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 15555.
- (198) Stöckmann, H. ; Neves, A. A. *et al. Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 7303-7305.
- (199) Meldal, M. ; Tornøe, C. W. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2952-3015.
- (200) Saxon, E. ; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007.
- (201) Hoyle, C. E. ; Bowman, C. N. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1540-1573.
- (202) Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 565-598.
- (203) Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 633-645.
- (204) Tornøe, C. W. ; Christensen, C. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- (205) Rostovtsev, V. V. ; Green, L. G. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (206) Worrell, B. T. ; Malik, J. A. *et al. Science* **2013**, *340*, 457.
- (207) Zhu, L. ; Brassard, C. J. *et al. The Chemical Record* **2016**, *16*, 1501-1517.
- (208) Kim, E. ; Koo, H. *Chemical Science* **2019**, *10*, 7835-7851.
- (209) Besanceney-Webler, C. ; Jiang, H. *et al. Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 8051-8056.
- (210) Jewett, J. C. ; Bertozzi, C. R. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1272-1279.
- (211) Chan, T. R. ; Hilgraf, R. *et al. Organic Letters* **2004**, *6*, 2853-2855.
- (212) Soriano del Amo, D. ; Wang, W. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16893-16899.
- (213) Wu, P. ; Fokin, V. V. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7-17.
- (214) Jewett, J. C. ; Sletten, E. M. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3688-3690.
- (215) Signore, G. ; Nifosì, R. *et al. Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1276-1288.
- (216) Rajaganesh, R. ; Ravinder, P. *et al. Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 2327-2336.
- (217) Ishizuka, T. ; Liu, H. S. *et al. Scientific Reports* **2016**, *6*, 33217.
- (218) Perkin, W. H. *Journal of the Chemical Society* **1868**, *21*, 53-63.
- (219) Perkin, W. H. *Journal of the Chemical Society* **1877**, *32*, 660-674.

- (220) Ortiz Villamizar, M. C. ; Puerto Galvis, C. E. *et al.* in *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products*, Brahmachari, G., éd. ; Elsevier : 2018, p. 149-235.
- (221) Kudale, A. A. ; Kendall, J. *et al.* *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5077-5080.
- (222) Austin, M. J. ; Hearnshaw, S. J. *et al.* *MedChemComm* **2016**, *7*, 1387-1391.
- (223) Morris, J. C. ; McMurtrie, J. C. *et al.* *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 4964-4972.
- (224) Costa, M. ; Rodrigues, A. I. *et al.* *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4869-4875.
- (225) Proença, M. F. ; Costa, M. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4542-4550.
- (226) Cheng, W.-C. ; Kurth, M. J. *Organic Preparations and Procedures International* **2002**, *34*, 585-608.
- (227) Zincke, T. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1904**, *330*, 361-374.
- (228) Sivakumar, K. ; Xie, F. *et al.* *Organic Letters* **2004**, *6*, 4603-4606.
- (229) Pinney, K. G. ; Mejia, M. P. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 2417-2425.
- (230) Peter G. M. Wuts, T. W. G. in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 2006, p. 927-933.
- (231) Bräse, S. ; Wertal, H. *et al.* *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, *2005*, 4167-4178.
- (232) Willard, M. D. ; Lajiness, M. E. *et al.* *Molecular Cancer Research* **2012**, *10*, 739.
- (233) *Journal officiel de l'Union européenne* **2016**, *L 54*, p. 2.
- (234) Andreev, K. ; Bianchi, C. *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 2492-2502.
- (235) Sarciaux, M. ; Pantel, L. *et al.* *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 7814-7826.
- (236) Neubert, B. J. ; Snider, B. B. *Organic Letters* **2003**, *5*, 765-768.
- (237) Bernatowicz, M. S. ; Wu, Y. *et al.* *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 2497-2502.
- (238) Chesworth, R. ; Kuntz Kevin, W. *et al.* Modulators of histone methyltransferase, and methods of use thereof, WO2012/82436 (A2), 2012.
- (239) Lambertucci, C. ; Antonini, I. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 2812-2822.
- (240) Distler, H. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1967**, *6*, 544-553.
- (241) Bunte, H. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1874**, *7*, 646-648.

- (242) Kastrinsky, D. B.; Sangodkar, J. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 6528-6534.
- (243) Li, J.; Lou, J. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *92*, 370-376.
- (244) Babin, V.; Tournier, B. B. *et al. Bioorganic Chemistry* **2020**, *96*, 103582.
- (245) Oh, C.-H.; Lee, S.-C. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38*, 841-850.
- (246) Cui, H.; Carrero-Lérida, J. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 10948-10957.
- (247) Vega-Pérez, J. M.; Perinán, I. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *58*, 591-612.
- (248) Landagaray, E.; Ettaoussi, M. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 986-996.
- (249) Burmistrov, V.; Morisseau, C. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2193-2197.
- (250) Petrelli, R.; Sham, Y. Y. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 5656-5664.
- (251) Martí-Centelles, V.; Pandey, M. D. *et al. Chemical Reviews* **2015**, *115*, 8736-8834.
- (252) De Vita, R. J.; Frontier, A. J. *et al. Helvetica Chimica Acta* **1997**, *80*, 1244-1259.
- (253) Lécaillon, J.; Gilles, P. *et al. Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 4674-4676.
- (254) Clark, V. M.; Todd, A. R. *et al. Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1951**, 2952-2958.
- (255) Mai, V.; Comstock, L. R. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 10319-10324.
- (256) Liu, F.; Austin, D. J. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 3153-3154.
- (257) Liu, F.; Austin, D. J. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 8643-8645.
- (258) Li, M.; Wu, R. S. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 383-386.
- (259) F. Weygand, E. C. *Angew. Chem.* **1952**, *64*, 1.
- (260) Merkul, E.; Müller, T. J. J. *Chemical Communications* **2006**, 4817-4819.
- (261) Annapragada, A.; Tanifum, E. A. Hydrophilic fluorinated molecules for liposomal ¹⁹F MRI probes with unique MR signatures, US 2018/0154025 A1, 2018.
- (262) Struthers, H.; Spingler, B. *et al. Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 6173-6183.

- (263) Theodora W., G.; Peter G. M., W. in *Protective groups in organic synthesis, Third edition*; J. Wiley. : **1999**, p. 506-507.
- (264) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 2751-2788.
- (265) Vishnyakova, T. P.; Golubeva, I. A. *et al. Russian Chemical Reviews* **1985**, *54*, 249-261.
- (266) Nowick, J. S.; Powell, N. A. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 7364-7366.
- (267) Lebel, H.; Leogane, O. *Organic Letters* **2006**, *8*, 5717-5720.
- (268) Groszek, G. *Organic Process Research & Development* **2002**, *6*, 759-761.
- (269) Patel, M.; Kaltenbach, R. F. *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1077-1082.
- (270) Matzen, L.; van Amsterdam, C. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 1149-1157.
- (271) Gante, J. *Chemische Berichte* **1965**, *98*, 3334-3339.
- (272) Kitteringham, J.; Shipton, M. R. *et al. Synthetic Communications* **2000**, *30*, 1937-1943.
- (273) Gallou, I.; Eriksson, M. *et al. The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 6960-6963.
- (274) Kruijtzter, J. A. W.; Lefeber, D. J. *et al. Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 5335-5338.
- (275) Bhattacharyya, T.; Sundin, A. *et al. Tetrahedron* **2003**, *59*, 7921-7928.
- (276) Dewal, M. B.; Wani, A. S. *et al. European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *51*, 145-153.
- (277) Curtius, T. *Journal für Praktische Chemie* **1894**, *50*, 275-294.

Annexe I : From Substrate to
Fragments to Inhibitor Active *In*
Vivo against *Staphylococcus aureus*

Pour des questions de droit d'auteur, cette annexe a été retirée de la version finale du document.

Annexe II : New Chemical Probe Targeting Bacterial NAD Kinase

Article

New Chemical Probe Targeting Bacterial NAD Kinase

David A. Clément ^{1,2,†}, Clarisse Leseigneur ^{2,3,†}, Muriel Gelin ^{4,†} , Dylan Coelho ¹,
Valérie Huteau ¹, Corinne Lionne ⁴ , Gilles Labesse ^{4,*} , Olivier Dussurget ^{2,3,*}  and
Sylvie Pochet ^{1,*}

¹ Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, UMR3523 CNRS, 75015 Paris, France; david.clement@pasteur.fr (D.A.C.); dylan.coelho@etu.parisdescartes.fr (D.C.); valerie.huteau@pasteur.fr (V.H.)

² Faculté des Sciences, Université de Paris, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France; clarisse.leseigneur@pasteur.fr

³ Institut Pasteur, Unité de Recherche Yersinia, 75015 Paris, France

⁴ Centre de Biochimie Structurale (CBS), CNRS, INSERM, Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France; gelin@cbs.cnrs.fr (M.G.); lionne@cbs.cnrs.fr (C.L.)

* Correspondence: labesse@cbs.cnrs.fr (G.L.); olivier.dussurget@pasteur.fr (O.D.); sylvie.pochet@pasteur.fr (S.P.)

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 30 September 2020; Accepted: 17 October 2020; Published: 22 October 2020



Abstract: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) kinases are essential and ubiquitous enzymes involved in the tight regulation of NAD/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) levels in many metabolic pathways. Consequently, they represent promising therapeutic targets in cancer and antibacterial treatments. We previously reported diadenosine derivatives as NAD kinase inhibitors with bactericidal activities on *Staphylococcus aureus*. Among them, one compound (namely **NKI1**) was found effective in vivo in a mouse infection model. With the aim to gain detailed knowledge about the selectivity and mechanism of action of this lead compound, we planned to develop a chemical probe that could be used in affinity-based chemoproteomic approaches. Here, we describe the first functionalized chemical probe targeting a bacterial NAD kinase. Aminoalkyl functional groups were introduced on **NKI1** for further covalent coupling to an activated SepharoseTM matrix. Inhibitory properties of functionalized **NKI1** derivatives together with X-ray characterization of their complexes with the NAD kinase led to identify candidate compounds that are amenable to covalent coupling to a matrix.

Keywords: antibiotics; chemical probe; diadenosine derivatives; NAD kinase; nucleoside; Sonogashira coupling; staphylococci

1. Introduction

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) kinases (NADK) are ubiquitous enzymes, which catalyze the phosphorylation of NAD to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), which is subsequently reduced to NADPH [1–3]. Since it is the only known enzyme producing NADP de novo, NAD kinase plays a crucial role in controlling the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H) in many cellular metabolic pathways [4,5]. While the NADK enzymatic activity has been known for decades, their genes were identified more recently, leading to the discovery of orthologs in nearly all living organisms. The essentiality of the NADK gene has been experimentally validated in several bacteria, including *Escherichia coli* [6], *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* [7,8], *Mycobacterium tuberculosis* [9] and *Staphylococcus aureus* [10–12]. Moreover, it was shown that human NAD kinase displays kinetic and structural features that differ considerably from that of prokaryotes [13,14].

Therefore, NADK represents a promising target for the development of novel antibiotics with an original mode of action.

Previously we solved the crystal structures of NADK from *Listeria monocytogenes* (*Lm*NADK1) in the free state and bound to NAD and NADP, and described the first non-natural inhibitor of this enzyme [15]. Following a fragment-based approach, we identified a series of diadenosine derivatives with low micromolar inhibitory potencies against recombinant *Lm*NADK1 and *S. aureus* NADK [16,17]. We subsequently discovered the first NAD kinase inhibitor (namely **NKI1**, Figure 1) active in mice infected with *S. aureus*, including antibiotic-resistant strains [18].

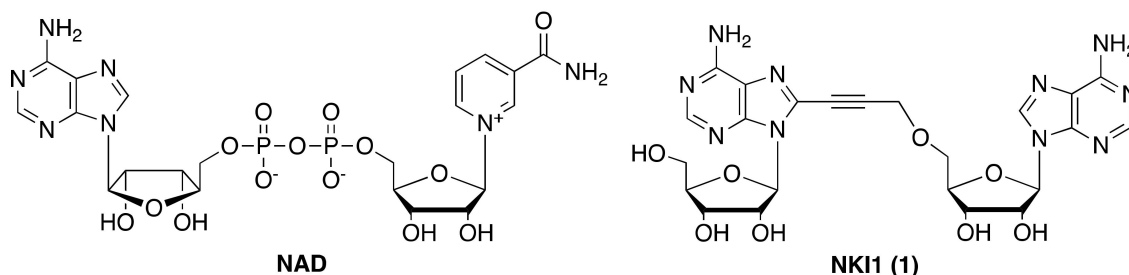


Figure 1. Chemical structures of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and NAD kinase inhibitor NKI1 (**1**).

To get more information about the selectivity of our lead compound and its mechanism of action, we aimed at immobilizing **NKI1** derivatives on a SepharoseTM matrix that could be further used in chemical proteomics [19]. Affinity chromatography is one of the most powerful chromatographic methods to analyze and purify proteins from complex mixtures or crude extracts. Various immobilized-nucleos(t)ides and cofactors are now commercially available. However specific affinity matrices may need to be developed by coupling the suitable ligand onto the matrix. The attachment chemistry and the spacer between the ligand and the matrix are important factors to be considered [20].

Here, we describe the synthesis of a series of functionalized diadenosine derivatives based on the chemical structure of **NKI1** [18]. Short aminoalkyl chains were introduced at each flanking region or middle region of the diadenosine motif (Figure 2) that could be used for coupling with a NHS-activated matrix. NADK binding properties of functionalized **NKI1** were analyzed by X-ray crystallography and by measuring NADK activity, allowing selection of the candidate ligands for further covalent attachment to a matrix.

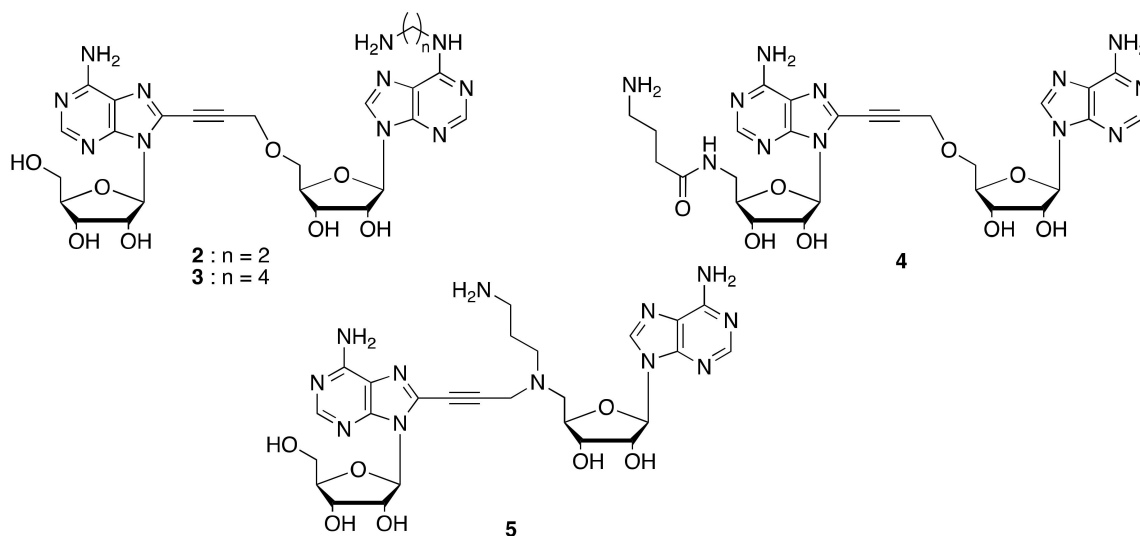


Figure 2. Chemical structures of the **NKI1** analogues 2–5.

2. Results

2.1. Chemical Synthesis of Functionalized Diadenosine Derivatives

The key step for synthesizing derivatives 2–5 is a Sonogashira cross-coupling reaction between a bromide (6 or 7) and an alkyne (8 or 9) (Figure 3). The appropriate building blocks were easily prepared according to classical methodology.

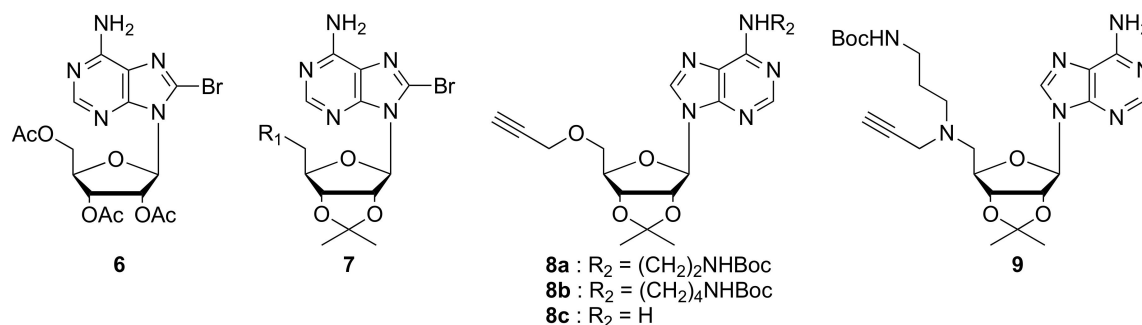
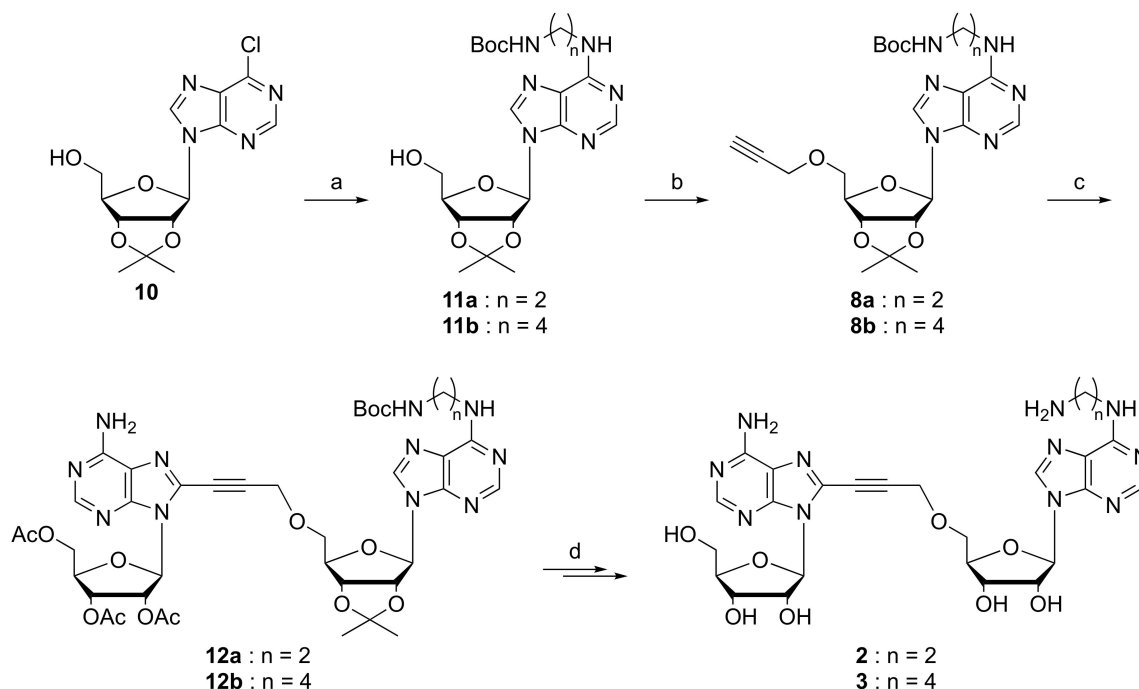


Figure 3. Key building blocks involved in Sonogashira cross-coupling reaction.

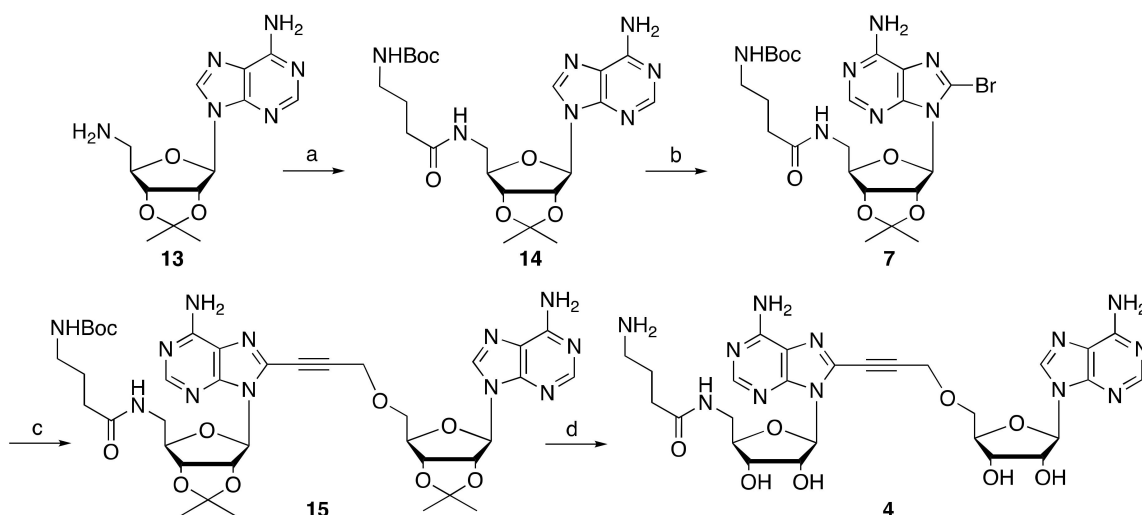
The synthetic route to the N6-functionalized **NKI1** derivatives 2 and 3 is depicted in Scheme 1. An aminoalkyl side chain (2 or 4 carbon) was introduced at the 6-position of adenosine by S_NAr from the 6-chloropurine derivative 10. Selective 5'-O-propargylation of 11a and 11b in the presence of propargyl bromide and NaH in DMF afforded the building blocks 8a and 8b, respectively, which were involved in Sonogashira cross-coupling reaction with bromide 6 to give 12a and 12b. Finally, removal of all protecting groups provided the desired compounds 2 and 3.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) $BocNH(CH_2)_nNH_2$, DME, NEt_3 , 80 °C, 66% ($n = 2$) or 91% ($n = 4$); (b) NaH, propargylbromide, THF, 4 °C, 60% or 68%; (c) 6, $Pd(PPh_3)_4$, CuI, NEt_3 , THF, 60 °C, 37% or 40%; (d) 28% $NH_4OH/MeOH$, rt; TFA/ H_2O , 4 °C, 42% or 61% in two steps.

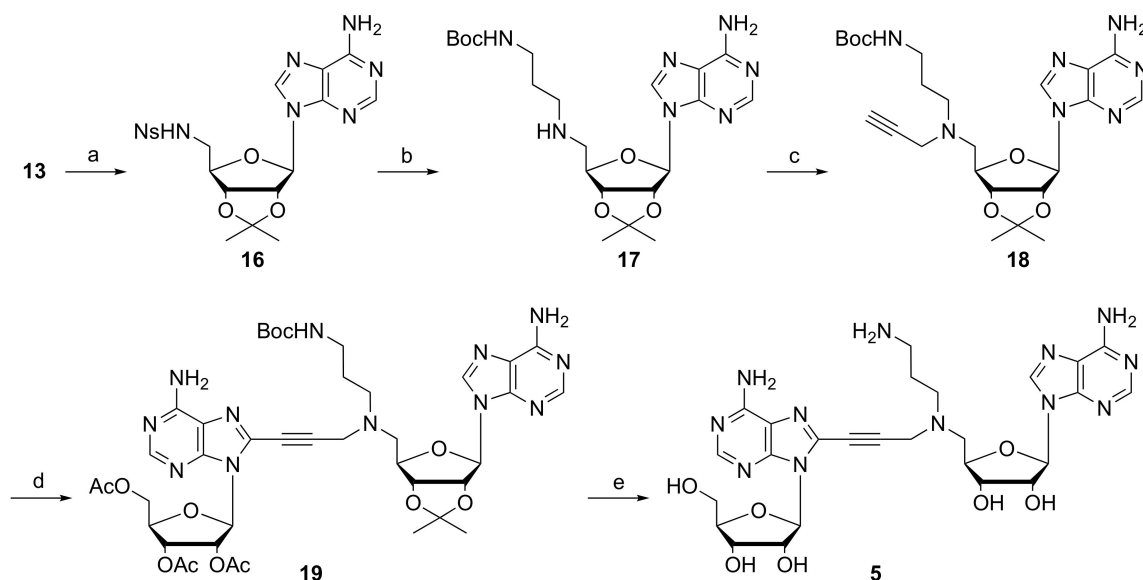
The synthesis of compound 4 was achieved by reaction of 4-(N-Boc-amino)butyric acid (Boc-GABA-OH) with the 5'-amino derivative 13 in the presence of PyBOP and DIEA in DMF,

followed by C8 bromination of the resulting amide **14** to give the key intermediate **7** (Scheme 2). Sonogashira coupling of bromide **7** and alkyne **8c** [16], followed by acidic treatment of the coupling product **15** gave the desired derivative **4** (Scheme 2).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) Boc-GABA, PyBOP, DIEA, DMF, 74%; (b) Br₂, acetate buffer/dioxane, 69%; (c) **8c**, Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, THF, 60 °C, 25%; (d) TFA/H₂O, 4 °C, 45%.

Finally, introduction of an aminoalkyl side chain at the middle position of the ligand was achieved from 5'-amino derivative **13** via the Ns strategy [21]. Nosylation of **13**, followed by alkylation of the N-sulfonamide **16** and removal of Ns group afforded the N-monosubstituted amine **17** (Scheme 3). Alkylation of the secondary amine using propargyl bromide afforded the key N-alkylated intermediate **9** in good overall yield. Sonogashira reaction between **9** and **6** led to the coupling product **19**. Finally, two-step removal of protecting groups gave the desired derivative **5**.



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) NsCl, pyridine, 88%; (b) BocNH(CH₂)₃Br, K₂CO₃, DMF, 50 °C; then PhSH, 79%; (c) Propargyl bromide, DIEA, DMF, 82%; (d) **6**, Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, THF, 60 °C, 63%; (e) 28% NH₄OH, MeOH; TFA/H₂O, 61% in two steps.

2.2. X-ray Structures of *Lm*NADK1 Bound to Compounds 2–5

A prerequisite to use a chemical probe is that it retains its binding affinity for its target. The binding properties of the four synthesized derivatives 2–5 were analyzed by X-ray crystallography. We checked the binding properties of these new di-adenosine derivatives by determining their complex with crystallized *Lm*NADK1. The soaking procedure described previously for inhibitor 1 [18] was used to obtain crystals of the target in complex with compounds 2–5. The X-ray structures were solved by molecular replacement using PDB6RGC [18] as a starting template and refined to 2.2–2.4 Å resolution. The resulting structures showed the same overall mode of binding to *Lm*NADK1, the ligands occupying both sub-sites A and N of the NAD binding pocket (Figure 4).

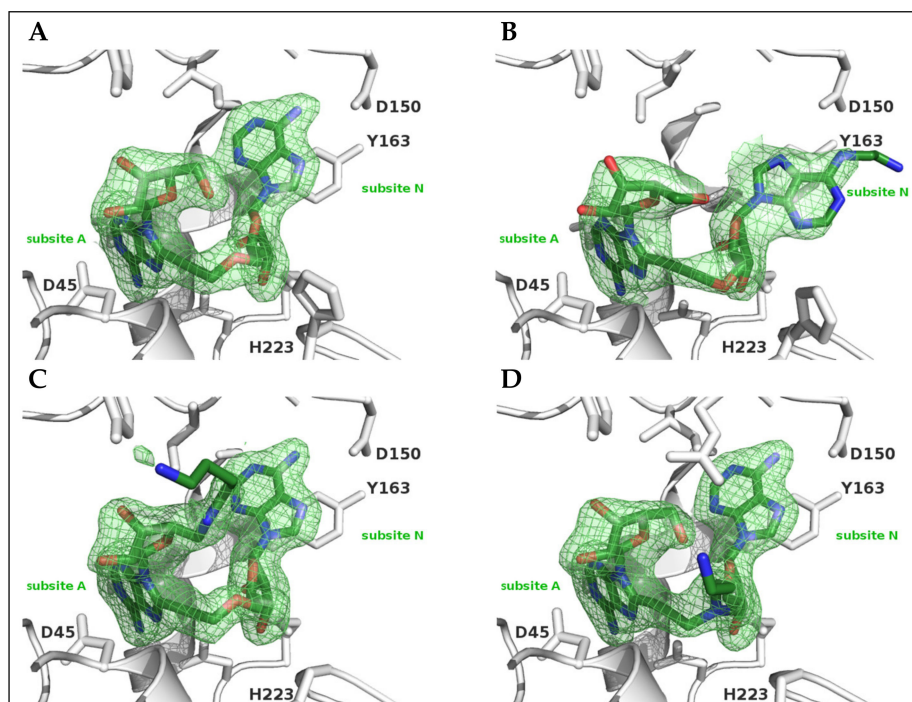


Figure 4. X-ray structures of *Lm*NADK1 in complex with ligands **NKI1** (6RG9), **2** (6Z61), **4** (6Z65) and **5** (6Z64). A zoomed in view of the NAD binding site is shown in the image. Important residues discussed in the text are shown in stick and labeled. Compounds **NKI1** (A), **2** (B), **4** (C) and **5** (D) are shown in sticks color according to cpk code with carbon in green. The figures were drawn using Pymol (www.pymol.org).

While compound 3 failed to yield complex with the crystallized target, compound 2 soaking led to a complex with the target. The structure (Figure 4B) showed a clear change in the orientation of the adenine moiety located in the subsite N (*syn* vs *anti* conformation), while that of the adenine moiety in the subsite A was maintained. The purine base flipping positioned the amino end out of the target, while the imidazole ring of the adenine still stacked on Tyr163. However, the N6 spacer arm appears to prevent the usual orientation of the ligand in the subsite N due to van der Waals clashes with neighboring residues, especially Asp150 which is normally hydrogen bonded to the N6 atom. The binding modes of compounds 4 and 5 were very similar to that of **NKI1**, the spacer arm having little impact on the orientation of the ligands. When the 4-carbon aminoalkyl chain is grafted at the 5'-end of the di-adenosine derivative (compound 4), no particular interaction of this added spacer arm with any residues from the protein could be observed (Figure 4C) and the amino functional group appeared readily amenable to derivatization. Similarly, when the spacer arm was introduced between the two adenosine residues via the *N*-propargyl atom (compound 5), the aminoalkyl chain pointed outside the NAD binding site (Figure 4D). In all three cases, the spacer arms appeared flexible in the

crystal structures (weak electron densities; see Figure 4B–D) suggesting they are perfectly amenable to column grafting.

2.3. Effects of Compounds 2–5 on *Lm*NADK1 Activity

Another important parameter to select the chemical probe is that it retains its binding properties. The potency of ligands 2–5 as inhibitors of recombinant *Lm*NADK1 *in vitro* were determined using the coupling assay described previously [15].

The introduction of an aminoalkyl chain at position 6 of the adenosine residue located in the N subsite (compounds 2 and 3) led to sharp decrease in inhibitory potency (Figure 5). This finding is consistent with our previous work describing the affinity drop induced by the introduction of a N6-cyclopropylamino group on the adenosine residue located in the subsite N [18]. Introduction of the spacer arm at the 5'-end of the diadenosine derivative (compound 4) resulted in a slightly reduced inhibitory potency as compared to that of inhibitor 1 (NKI1). In contrast, when the spacer arm was attached in the middle part of the ligand, between the two adenosine residues via the N propargyl atom, inhibitory potency of compound 5 was slightly increased.

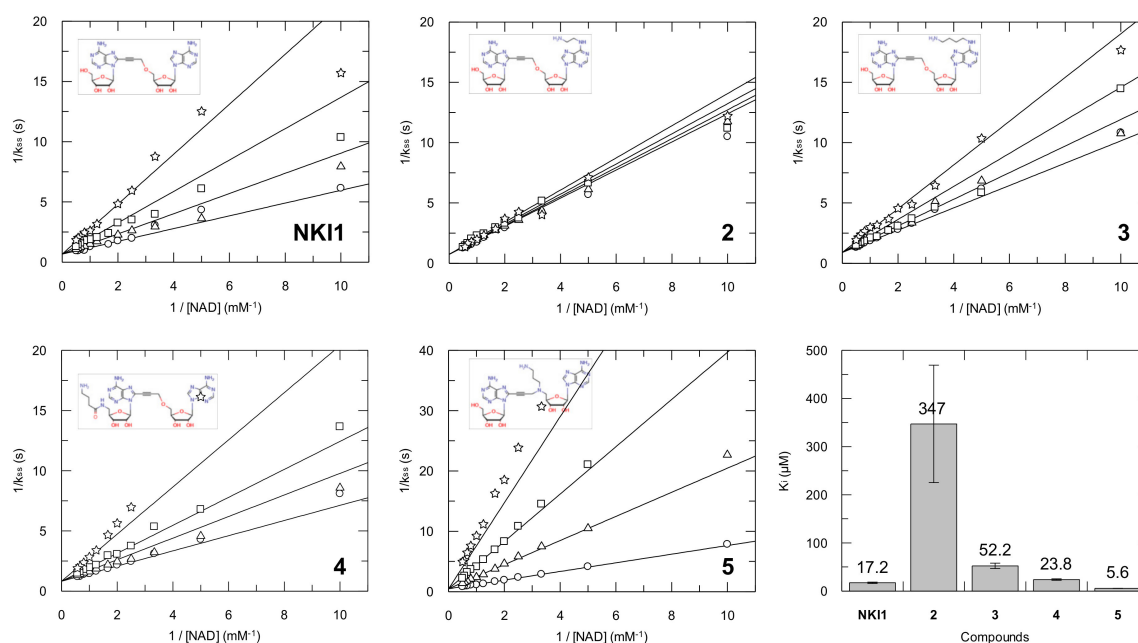


Figure 5. Determination of inhibition constants of compounds 1–5. Inhibitor concentrations were 0 (circles), 10 (triangles), 25 (squares) and 50 (stars) μM . Secondary plots (k_{ss} as a function of initial NAD concentration) were fitted assuming a competitive inhibition using GraFit software (v 7.0.3) and are presented here as double reciprocal plots. K_i values determined are represented as bars (values are displayed on top of the bars).

3. Discussion

By taking advantage of the substrate recognition characteristics of NADK [15,16], we designed four ligand derivatives based on the structure of our lead NADK inhibitor NKI1 [18]. Successful synthesis of the four diadenosine derivatives bearing short aminoalkyl chains to be coupled to NHS-activated SepharoseTM matrix allowed investigation of their specific properties towards NADK. NADK from *L. monocytogenes* was selected as representative target for this study, as the recombinant enzyme is easily produced and more amenable to subsequent crystallization trials than NADK from *S. aureus*. Additionally, we showed that *Sa*NADK shares 57% of sequence identity with its listerial counterpart [14,18]. While compound 3 failed to bind to *Lm*NADK, the other three derivatives yielded complexes that diffracted with 2.2–2.4 Å resolution. Compounds 4 and 5 in complex with *Lm*NADK1

showed a binding mode highly similar to that of NKI1. In contrast, compound **2** showed a different orientation which could explain its increased inhibition constant. In line with their binding properties, compounds **4** and **5** had inhibition potentials in the range of NKI1 K_i . Compound **5** had the highest apparent affinity for the purified enzyme of all derivatives tested in our study.

Our functionalized diadenosine derivative **5**, and in a lesser extent compound **4**, have the required features to develop a specific affinity chromatography column, which could be applied to bacterial NADKs. Ultimately, this chemical probe will help to decipher the selectivity characteristics of our lead compound.

4. Materials and Methods

4.1. General Information

Commercially available reagents and solvents, unless otherwise stated, were used without purification. Anhydrous reactions were carried out under an argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on TLC plates pre-coated with silica gel 60 F₂₅₄. Compounds were visualized with UV light (254 nm) and by spraying with a mixture of ethanol/anisaldehyde/sulfuric acid/acetic acid (90/5/4/1), followed by heating. Reactions were also monitored using an HPLC system (Agilent (Agilent Technologies, France, Les Ulis) 1100 equipped with a C18 reverse phase column) coupled to a mass spectrometer (ESI source). Flash chromatography was performed with silica gel 60 (230–400 mesh). HPLC purification was carried out on an Agilent system (1100 Series) equipped with a diode array detector using a C18 reverse phase column (Kromasil, 5 μ m, 100 Å, 150 $\times$ 10 mm) and a linear gradient of acetonitrile in 10 mM triethylammonium acetate (TEAA) buffer over 15 or 20 min at a flow rate of 4 mL/min. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 (Bruker, France, Wissembourg) at 400.13 MHz and 100.62 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the solvent signals. Coupling constants (J values) are reported in Hz. The complete assignment of ¹H and ¹³C signals was performed by analysis of the correlated homonuclear ¹H,¹H-COSY and heteronuclear ¹H,¹³C-HMBC, ¹H,¹³C-HSQC spectra (see copies of ¹H and ¹³C NMR spectra of prepared compounds in the Supplementary Materials). High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Q-ToF Micro mass spectrometer under electrospray ionization (ESI) using 0.1% formic acid in acetonitrile/water in positive ion mode. The purity of all tested compounds was greater than 97% (HPLC analysis). Retention time (t_R) and gradient are specified.

4.2. Synthesis

2',3',5'-Tri-O-acetyl-8-bromoadenosine (6). The title compound was obtained by peracetylation of commercially available 8-bromoadenosine (90% yield).

6-Chloro-9-(2',3'-O-isopropylidene- β -D-ribofuranosyl)purine (10). The title compound was obtained by reaction of 6-chloropurine riboside with 2,2-dimethoxypropane in acetone in the presence of toluene-4-sulfonic acid for 3 h at room temperature (91% yield) [22].

N⁶-(2-tert-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (11a). To a stirred solution of 6-chloro-9-(2',3'-O-isopropylidene- β -D-ribofuranosyl)purine (**10**) (0.98 g, 3.0 mmol) in anhydrous DME (15 mL) was added NEt₃ (1.25 mL, 9.0 mmol), followed by a solution of *N*-Boc-ethylenediamine (prepared according to reported procedures) [23] (1.44 g, 9.0 mmol) in anhydrous DME (15 mL). The stirred mixture was heated at 80 °C overnight under an argon atmosphere, then concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (80 mL), washed in turn with water (80 mL) and brine (80 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (50 g SiO₂, 0 to 3% methanol in dichloromethane) to afford compound **11a** (0.90 g, 66%) as a white foam. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.40 (s, 3H, CH₃ isop), 1.44 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.66 (s, 3H, CH₃ isop), 3.44–3.48 (m,

2H, CH_2NHBoc), 3.76–3.84 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$ and H-5'), 3.99 (dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.53–4.56 (m, 1H, H-4'), 5.09 (br s, 1H, NHBoc), 5.13 (dd, $J = 5.8$ Hz, $J = 1.0$ Hz, 1H, H-3'), 5.21 (pt, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-2'), 5.87 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-1'), 6.40–6.90 (br s, 2H, NH-6 and OH-5'), 7.84 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.25 (CH_3 isop), 27.66 (CH_3 isop), 28.34 (3 CH_3 Boc), 40.74 ($\text{CH}_2\text{NH-6}$ and CH_2NHBoc), 63.42 (C-5'), 79.59 (Cq Boc), 81.71 (C-3'), 83.09 (C-2'), 86.15 (C-4'), 94.32 (C-1'), 113.98 (Cq isop), 121.42 (C-5), 139.76 (C-8), 147.61 (C-4), 152.91 (C-2), 155.35 (C-6), 156.30 (CO Boc); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6+\text{H}]^+$ 451.2305, found 451.2293.

*N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-*O*-isopropylidene-adenosine (**11b**). Compound **11b** was prepared from **10** (0.98 g, 3.0 mmol) and *N*-Boc-1,4-butanediamine (prepared according to reported procedures) [23] (1.69 g, 9.0 mmol) following the same procedure as for **11a**. Purification by flash column chromatography (50 g SiO_2 , 0 to 3% methanol in dichloromethane) yielded compound **11b** (1.31 g, 91%) as a white foam. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.39 (s, 3H, CH_3 isop), 1.45 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.61 (quint, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 1.66 (s, 3H, CH_3 isop), 1.74 (quint, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.19 (br q, 2H, CH_2NHBoc), 3.68 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 3.80 (br d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-5'), 3.99 (dd, $J = 1.3$ Hz, $J = 12.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.53–4.56 (m, 1H, H-4'), 4.78 (br s, 1H, NHBoc), 5.13 (dd, $J = 1.0$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-3'), 5.22 (pt, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-2'), 5.86 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-1'), 6.04 (br s, 1H, OH-5'), 6.67 (br s, 1H, NH-6), 7.79 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.34 (CH_3 isop), 26.97 (CH_2), 27.24 (CH_2), 27.65 (CH_3 isop), 28.42 (CH_3 Boc), 40.16 ($\text{CH}_2\text{NH-6}$ and CH_2NHBoc), 63.42 (C-5'), 79.15 (Cq Boc), 81.72 (C-3'), 83.06 (C-2'), 86.14 (C-4'), 94.35 (C-1'), 113.94 (Cq isop), 121.25 (C-5), 139.52 (C-8), 147.31 (C-4), 152.69 (C-2), 155.25 (C-6), 156.01 (CO Boc); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_6+\text{H}]^+$ 479.2618, found 479.2614.

*N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-propargyl-adenosine (**8a**). To a stirred suspension of sodium hydride (0.10 g 60% in oil, 2.5 mmol) in anhydrous THF (12 mL) was added at 0 °C a solution of **11a** (0.56 g, 1.2 mmol) in THF (12 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h, then propargyl bromide (80% in toluene, 0.13 mL, 1.2 mmol) was added dropwise. After 24 h at 4 °C, the reaction was quenched by adding glacial acetic acid (0.14 mL) and stirring for 1 h at 4 °C. After removal of the volatiles under reduced pressure, the crude residue was dissolved ethyl acetate (50 mL) and washed twice with water (60 mL). The organic layer was dried, concentrated under reduced pressure and the residue purified by flash column chromatography (30 g SiO_2 , 0 to 3% methanol in dichloromethane) affording compound **8a** (0.35 g, 60%) as a white foam. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 3H, CH_3 isop), 1.43 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.64 (s, 3H, CH_3 isop), 2.44 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, $\text{HC}\equiv$), 3.44 (br q, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2NHBoc), 3.73 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.78 (dd, $J = 3.9$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 3.81–3.85 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 4.14 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 4.49–4.53 (m, 1H, H-4'), 5.03 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.17 (br s, 1H, NHBoc), 5.34 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-1'), 6.33 (br s, 1H, NH-6), 8.01 (s, 1H, H-8), 8.39 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.38 (CH_3 isop), 27.18 (CH_3 isop), 28.35 (3 CH_3 Boc), 40.90 ($\text{CH}_2\text{NH-6}$ and CH_2NHBoc), 58.57 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 69.85 (C-5'), 75.24 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 78.80 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 79.44 (Cq Boc), 81.88 (C-3'), 84.76 (C-2'), 85.74 (C-4'), 91.20 (C-1'), 114.23 (Cq isop), 120.16 (C-5), 138.93 (C-8), 148.87 (C-4), 152.91 (C-2), 154.88 (C-6), 156.27 (CO Boc); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6+\text{H}]^+$ 489.2462, found 489.2463.

*N*⁶-(2-*tert*-Butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-*O*-isopropylidene-5'-*O*-propargyl-adenosine (**8b**). Compound **8b** was prepared from **11b** (0.95 g, 2.0 mmol) following the same procedure as for **8a**. Purification by flash column chromatography (70 g SiO_2 , 0 to 2% methanol in dichloromethane) afforded compound **8b** (0.70 g, 68%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.36 (s, 3H, CH_3 isop), 1.41 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.51–1.63 (m, 2H, CH_2), 1.59 (s, 3H, CH_3 isop), 1.69 (quint, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2), 2.42 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, $\text{HC}\equiv$), 3.10–3.19 (m, 2H, CH_2NHBoc), 3.60–3.66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 3.69 (dd, $J = 4.9$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.74 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.10 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 4.44–4.49 (m, 1H, H-4'), 4.99 (dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-3'), 5.32 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.05 (br s, 1H,

NH-6), 6.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-1'), 7.94 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 25.34 (CH_3 isop), 27.08 (CH_3 isop), 27.14 and 27.19 (2 CH_2), 28.40 (3 CH_3 Boc), 40.12 ($\text{CH}_2\text{NH-6}$ and CH_2NHBoc), 58.53 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 69.82 (C-5'), 75.30 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 78.83 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 78.99 (C_q Boc), 81.85 (C-3'), 84.68 (C-2'), 85.68 (C-4'), 91.06 (C-1'), 114.17 (C_q isop), 120.07 (C-5), 138.66 (C-8), 148.68 (C-4), 153.23 (C-2), 154.94 (C-6), 156.04 (CO Boc); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6+\text{H}]^+$ 517.2775, found 517.2780.

2',3',5'-Tri-O-acetyl-8-[3-(N^6 -(2-*tert*-butyloxycarbonyl)aminoethyl-2',3'-O-isopropylidene-5'-O-adenosinyl)propargyl]adenosine (12a). To an argon-degassed solution (three times) of 8a (0.20 g, 0.42 mmol) and bromide 6 (0.31 g, 0.63 mmol) in anhydrous THF (8 mL) in the presence of NEt_3 (0.18 mL, 1.26 mmol) were added CuI (8 mg, 0.042 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (24 mg, 0.021 mmol). The stirred mixture was degassed 3 times, then heated at 60 °C under argon atmosphere for 5 h. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue purified by flash column chromatography (20 g SiO_2 , 0 to 4% methanol in dichloromethane) affording compound 12a (0.15 g, 40%) and the homocoupling product (63 mg, 8%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 3H, CH_3 isop), 1.43 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.64 (s, 3H, CH_3 isop), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.14 (s, 3H, COCH_3), 3.39-3.47 (m, 2H, CH_2NHBoc) 3.77 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 3.84 (dd, $J = 5.1$ Hz, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-5'B), 3.92 (dd, $J = 4.0$ Hz, $J = 10.2$ Hz, 1H, H-5''B), 4.32 (dd, $J = 6.0$ Hz, $J = 11.8$ Hz, 1H, H-5'A), 4.41 (td, $J = 6.0$ Hz, $J = 11.8$ Hz, 1H, H-4'A), 4.47 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 4.50-4.55 (m, 2H, H-4'B and H-5''A), 5.07 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'B), 5.23 (br s, 1H, NHBoc), 5.35-5.41 (br s, 1H, H-2'B), 5.96 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-3'A), 6.19 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-1'B), 6.22 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H-1'A), 6.24 (br s, 2H, NH_2), 6.30 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-2'A), 6.46 (br s, 1H, NH-6B), 8.02 (s, 1H, H-8B), 8.37 (s, 1H, H-2A), 8.42 (s, 1H, H-2B); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.43 (COCH_3), 20.49 (COCH_3), 20.64 (COCH_3), 25.36 (CH_3 isop), 27.16 (CH_3 isop), 28.36 (3 CH_3 Boc), 40.71 (CH_2NHBoc and $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 59.04 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 63.05 (C-5'A), 70.49 (C-5'B), 70.54 (C-3'A), 72.52 (C-2'A), 76.69 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 79.49 (C_q Boc), 79.86 (C-4'A), 81.80 (C-3'B), 84.70 (C-2'B), 85.74 (C-4'B), 87.37 (C-1'A), 91.12 (C-1'B), 91.80 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 114.36 (C_q isop), 119.78 (C-5A), 120.20 (C-5B), 133.26 (C-8A), 138.88 (C-8B); 148.90 (C-4B); 149.50 (C-4A), 153.23 (C-2B), 154.26 (C-2A), 155.00 (C-6B), 155.52 (C-6A), 156.31 (CO Boc), 169.42 (CO), 169.50 (CO), 170.58 (CO); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_{11}\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 880.3589, found 880.3582.

2',3',5'-Tri-O-acetyl-8-[3-(N^6 -(4-*tert*-butyloxycarbonyl)aminobutyl-2',3'-O-isopropylidene-5'-O-adenosinyl)propargyl]adenosine (12b). Compound 12b was prepared from 8b (206 mg, 0.4 mmol) and bromide 6 (184 mg, 0.26 mmol) following the same procedure as for 12a. Purification by chromatography on silica gel (1 to 4% methanol in dichloromethane) gave compound 12b (88 mg, 37%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 3H, CH_3 isop), 1.46 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.56-1.66 (m, 2H, CH_2), 1.64 (s, 3H, CH_3 isop), 1.67-1.79 (m, 2H, CH_2), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 2.15 (s, 3H, COCH_3), 3.15-3.25 (m, 2H, CH_2NHBoc), 3.60-3.70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-6}$), 3.85 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-5'B), 3.92 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-5''B), 4.33 (dd, 1H, $J = 6.0$ Hz, $J = 11.8$ Hz, H-5'A), 4.38-4.44 (m, 1H, H-4''A), 4.48 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 4.50-4.55 (m, 2H, H-4'B and H-5''A), 5.10 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'B), 5.41 (dd, $J = 2.2$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-2'B), 5.93 (br, 2H, NH_2), 5.96 (pt, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-3'A), 6.18 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-1'B), 6.23 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz, H-1'A), 6.30 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-2'A), 7.96 (s, 1H, H-8B), 8.39 (s, 1H, H-2A), 8.43 (s, 1H, H-2B); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 20.44 (COCH_3), 20.51 (COCH_3), 20.65 (COCH_3), 25.36 (CH_3 isop), 27.04 (CH_2), 27.16 (CH_3 isop), 27.26 (CH_2), 28.44 (3 CH_3 Boc), 40.03 ($\text{CH}_2\text{NH-6}$ and CH_2NHBoc), 59.05 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 63.05 (C-5'A), 70.50 (C-3'A), 70.56 (C-5'B), 72.50 (C-2'A), 75.62 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 79.16 (C_q Boc), 79.88 (C-4'A), 81.86 (C-3'B), 84.59 (C-2'B), 85.79 (C-4'B), 87.41 (C-1'A), 91.05 (C-1'B), 91.91 ($\text{C}\equiv\text{C-CH}_2$), 114.37 (C_q isop), 118.13 (C-5A); 119.80 (C-5B), 133.42 (C-8A), 138.71 (C-8B), 148.92 (C-4B); 149.40 (C-4A); 153.43 (C-2B); 154.27 (C-2A); 154.96 (C-6B), 155.38 (C-6A), 156.05 (CO Boc), 169.37 (CO), 169.48 (CO), 170.55 (CO); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_{11}\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 908.3803, found 908.4268.

8-[3-(N⁶-2-Aminoethyl-5'-O-adenosinyl)propargyl]adenosine (2). To a solution of **12a** (46 mg, 0.05 mmol) in MeOH (5 mL) was added 28% NH₄OH (1 mL). After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the crude product (37 mg) was used in the next step without further purification. To the foam (37 mg, 0.05 mmol) was added at 0 °C a 70% aqueous solution of TFA (1 mL). After stirring for 2 h, water was added and the mixture was lyophilized. Purification by reverse phase HPLC (0 to 20% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer over 15 min, *t_R* = 13.3 min) afforded compound **2** as acetate salt (13 mg, 42% in two steps). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.88 (s, 1.3H, CH₃ Ac), 2.81–2.86 (m, 2H, CH₂NH₂), 3.54 (d, *J* = 4.2 Hz, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-5'A), 3.59 (br, 2H, CH₂NH-6), 3.68 (d, *J* = 3.9 Hz, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-5''A), 3.76 (d, *J* = 5.5 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H, H-5'B), 3.85 (dd, *J* = 3.6 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H, H-5''B), 3.97–4.02 (m, 1H, H-4'A), 4.08–4.13 (m, 1H, H-4'B), 4.19–4.23 (m, 2H, H-3'A and H-3'B), 4.60 (s, 2H, CH₂C≡), 4.63 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-2'B), 5.01 (dd, *J* = 5.3 Hz, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2'A), 5.93 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-1'B), 5.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'A), 7.63 (br s, 2H, NH₂), 7.73 (br s, 2H, NH₂), 8.17 (s, 1H, H-2B), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.33 (s, 1H, H-8B); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21.83 (CH₃ Ac), 40.94 (CH₂NH₂ and CH₂NH-6), 58.76 (C≡C-CH₂), 62.63 (C-5'A), 70.74 (C-5'B), 71.00 (C-3'B), 71.43 (C-3'A), 72.11 (C-2'A), 73.71 (C-2'B), 75.55 (C≡C-CH₂), 83.33 (C-4'B), 87.16 (C-4'A), 87.98 (C-1'B), 89.92 (C-1'A), 92.60 (C≡C-CH₂), 119.83 (C-5A and C-5B), 133.45 (C-8A), 139.76 (C-8B), 148.89 (C-4A and C-4B), 153.07 (C-2A), 153.90 (C-2B), 156.63 (C-6A and C-6B), 172.70 (CO Ac); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₅H₃₁N₁₁O₈+H]⁺ 614.2435, found 614.2433.

8-[3-(N⁶-4-Aminobutyl-5'-O-adenosinyl)propargyl]adenosine (3). Compound **3** was obtained from **12b** (63 mg, 0.07 mmol) following the same procedure as for **2**. Purification by reverse phase HPLC (0 to 30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer over 20 min, *t_R* = 8.7 min) afforded compound **3** as acetate salt (22.6 mg, 50% in two steps). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.48–1.58 (m, 2H, CH₂), 1.58–1.69 (m, 2H, CH₂), 1.84 (s, 1H, CH₃ Ac), 2.73 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂NH₂), 3.50 (br, 2H, CH₂NH-6), 3.54 (dd, *J* = 4.2 Hz, *J* = 12.1 Hz, 1H, H-5'A), 3.69 (m, *J* = 3.9 Hz, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-5''A), 3.76 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-5'B), 3.85 (dd, *J* = 3.8 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-5''B), 3.98–4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.08–4.12 (m, 1H, H-4'B), 4.19–4.23 (m, 2H, H-3'A and H-3'B), 4.60 (s, 2H, CH₂C≡), 4.63 (pt, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-2'B), 5.00 (dd, *J* = 5.3 Hz, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-2'A), 5.93 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1'B), 5.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-1'A), 7.63 (br s, 2H, NH₂), 7.79 (br s, 2H, NH₂), 8.17 (s, 1H, H-2B), 8.23 (s, 1H, H-2A), 8.32 (s, 1H, H-8B); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23.40 (CH₃ Ac), 25.81 (CH₂), 26.53 (CH₂), 39.39 (CH₂NH₂ and CH₂NH-6), 58.73 (C≡C-CH₂), 62.49 (C-5'A), 70.66 (C-5'B), 70.83 (C-3'B), 71.29 (C-3'A), 72.12 (C-2'A), 73.56 (C-2'B), 75.51 (C≡C-CH₂), 83.33 (C-4'B), 87.07 (C-4'A), 87.82 (C-1'B), 89.88 (C-1'A), 92.72 (C≡C-CH₂), 119.71 (C-5A and C-5B), 133.45 (C-8A), 139.76 (C-8B), 148.83 (C-4A and C-4B), 153.18 (C-2A), 153.88 (C-2B), 156.40 (C-6A and C-6B), 173.90 (CO Ac); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₇H₃₅N₁₁O₈ + H]⁺ 642.2748, found 642.2748.

5'-[4-(N-tert-Butyloxycarbonyl-amino)butylamido]-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (14). To a solution of 5'-amino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (**13**) [24] (0.31 g, 1.0 mmol) in DMF were added DIEA (0.35 mL, 2.0 mmol), PyBOP (0.52 g, 1.0 mmol) and 4-(tert-butoxycarbonylamino)-butyric acid (0.20 g, 1.0 mmol). After stirring for 1 h at room temperature, the reaction was diluted with water (40 mL) and extracted with ethyl acetate (2x 80 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (18 g SiO₂, 0 to 5% methanol in dichloromethane) to yield compound **3** (0.36 g, 74%) as a white foam. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.32 (s, 3H, CH₃ isop), 1.36 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop), 1.59 (quint, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.09 (td, *J* = 2.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CO), 2.89 (br q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 3.30–3.35 (m, 2H, H-5' and H5''), 4.17 (td, *J* = 3.2 Hz, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-4'), 4.90 (dd, *J* = 6.3 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1H, H-3'), 5.43 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.12 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-1'), 6.75 (br s, 1H, NHBoc), 7.34 (s, 2H, NH₂) 8.06 (br, 1H, NHCO), 8.19 (s, 1H, H-2), 8.32 (s, 1H, H-8); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.70 (CH₃ isop), 26.15 (CH₂), 27.50 (CH₃ isop), 28.70 (3 CH₃ Boc), 33.14 (CH₂CO), 39.95 (CH₂NHBoc), 41.16 (C-5'), 77.85 (Cq Boc), 82.17 (C-3'), 83.30 (C-2'), 84.63

(C-4'), 89.55 (C-1'), 113.99 (Cq isop), 119.80 (C-5), 140.53 (C-8), 149.25 (C-4), 153.19 (C-2), 156.02 (CO Boc), 156.67 (C-6), 172.68 (CONH); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{22}H_{33}N_7O_6+H]^+$ 492.2570, found 492.2582.

8-Bromo-5'-(4-(N-tert-butyloxycarbonyl-amino)butylamido)-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (7). To a solution of **14** (0.17 g, 0.35 mmol) in 1,4-dioxane (1.4 mL) and sodium acetate buffer (2.1 mL, 0.5 M, pH = 5.3) was added bromine (36 μ L, 0.69 mmol) dropwise. After stirring for 3 h at room temperature, the reaction was quenched by adding a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (10 mL). After full discoloration, ethyl acetate (80 mL) was added and the organic layer was washed with water (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (10 g SiO_2 , 0–4% methanol in dichloromethane) to yield compound **7** (0.135 g, 69%) as a pale yellow foam. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.38 (s, 3H, CH_3 isop), 1.42 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.65 (s, 3H, CH_3 isop), 1.83–1.92 (m, 2H, CH_2), 2.32–2.40 (m, 2H, CH_2CO), 3.18–3.23 (m, 2H, CH_2NHBoc), 3.37 (dt, $J = 3.0$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H, H-5'), 3.99 (ddd, $J = 4.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.46 (pq, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-4'), 4.86 (br s, 1H, $NHBoc$), 4.89 (dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J = 4.2$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-2'), 6.09 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H-1'), 6.40 (br s, 2H, NH_2), 7.64 (br s, 1H, $NHCO$), 8.35 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 25.41 (CH_3 isop), 26.04 (CH_2), 27.46 (CH_3 isop), 28.38 (3 CH_3 Boc), 33.49 (CH_2CO), 39.94 (CH_2NHBoc), 40.93 (C-5'), 79.22 (Cq Boc), 81.49 (C-3'), 82.18 (C-2'), 83.95 (C-4'), 91.98 (C-1'), 114.83 (Cq isop), 120.51 (C-5), 127.79 (C-8), 150.17 (C-4), 151.59 (C-2), 153.96 (C-6), 156.23 (CO Boc), 173.01 (CONH); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{22}H_{32}BrN_7O_6+H]^+$ 570.1675, found 570.1683.

5'-O-[3-(5'-(4-(N-tert-Butyloxycarbonyl-amino)butylamido)-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylideneadenosine-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-2',3'-O-isopropylideneadenosine (15). To a solution of bromide **7** (0.19 g, 0.34 mmol) and alkyne **8c** [18] (0.18 g, 0.51 mmol) in THF (4.0 mL) was added NEt_3 (0.14 mL, 1.02 mmol). The stirred mixture was degassed by vacuum/argon purging (3 times) before adding sequentially CuI (7 mg, 0.036 mmol) and $Pd(PPh_3)_4$ (20 mg, 0.017 mmol), followed by another 15 min argon degassing. After stirring for 3 h at 60 °C, reaction was incomplete (TLC monitoring), $Pd(PPh_3)_4$ (40 mg, 0.034 mmol) was added. After 3 h at 60 °C, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (18 g SiO_2 , 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield **15** (74 mg, 25 %) as a pale orange foam. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.28 (s, 3H, CH_3 isop), 1.34 (s, 3H, CH_3 isop), 1.35 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.48 (s, 3H, CH_3 isop), 1.55 (s, 3H, CH_3 isop), 1.58 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.04–2.08 (m, 2H, CH_2CO), 2.89 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.30–3.40 (m, 2H, H-5'A and H-5''A), 3.72 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5'B), 3.80 (dd, $J = 5.7$ Hz, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-5''B), 4.14–4.18 (m, 1H, H-4'A), 4.36–4.40 (m, 1H, H-4'B), 4.58 (s, 2H, $CH_2C\equiv$), 4.95 (dd, $J = 3.4$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-3'A), 5.02 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'B), 5.43 (dd, $J = 2.6$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-2'B), 5.51 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-2'A), 6.11 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-1'A), 6.19 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-2'B), 6.73 (br, 1H, $NHBoc$), 7.54 (br, 2H, NH_2), 7.65 (br, 2H, NH_2), 8.03 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, $NHCO$), 8.22 (s, 1H, H-2B), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.36 (s, 1H, H-8B); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 25.66 (2 CH_3 isop), 26.12 (CH_2), 27.50 (2 CH_3 isop), 28.69 (3 CH_3 Boc), 33.12 (CH_2CO), 39.82 (CH_2NHBoc), 41.06 (C-5'A), 58.67 ($C\equiv C-CH_2$), 70.33 (C-5'B), 75.50 ($C\equiv C-CH_2$), 77.85 (Cq Boc), 81.91 (C-3'B), 82.37 (C-3'A), 82.96 (C-2'A), 83.80 (C-2'B), 84.81 (C-4'B), 85.25 (C-4'A), 89.76 (C-1'A and C-1'B), 92.75 ($C\equiv C-CH_2$), 113.90 (Cq isop), 114.01 (Cq isop), 119.44 (C-5A and C-5B), 132.57 (C-8A), 140.45 (C-8B), 148.78 (C-4A), 149.24 (C-4B), 152.24 (C-2A), 154.24 (C-2B), 155.76 (C-6B), 156.03 (C-6A), 156.38 (CO Boc), 172.60 (CONH); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[C_{38}H_{50}N_{12}O_{10}+H]^+$ 835.3851, found 835.3840.

5'-O-[3-(5'-(4-Aminobutylamido)-5'-deoxy-adenosin-8-yl)prop-2-yn-1-yl]-adenosine (4). Compound **15** (64 mg, 0.08 mmol) was dissolved in an ice-cold solution of 50% aqueous TFA (5.0 mL) and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 3 h at room temperature, water was added and the reaction mixture was lyophilized. Purification of the residue by reverse phase HPLC (5 to 25% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer over 15 min) yielded **4** (22.6 mg, 45%) as acetate

salt. $t_R = 10.4$ min; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.68 (quint, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.79 (s, 1.88 H, CH_3 Ac), 2.20 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.65 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2NH_2), 3.38 (dt, $J = 4.8$ Hz, $J = 14.0$ Hz, 1H, H-5'A), 3.47 (dt, $J = 5.8$ Hz, $J = 14.0$ Hz, 1H, H-5''A), 3.77 (dd, $J = 5.6$ Hz, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-5'B), 3.85 (dd, $J = 3.7$ Hz, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-5''B), 3.98–4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.08–4.13 (m, 2H, H-3'A and H-4'B), 4.20 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H, H-3'B), 4.61–4.63 (m, 3H, H-2'B and $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 5.01–5.04 (m, 1H, H-2'A), 5.92 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1'B), 5.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-1'A), 7.25 (s, 2H, NH_2), 7.62 (s, 2H, NH_2), 8.17 (s, 1H, H-2B), 8.24 (s, 1H, H-2A), 8.27 (m, 1H, NHCO), 8.32 (s, 1H, H-8B); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 23.08 (CH_3 Ac), 26.58 (CH_2), 33.02 (CH_2CO), 40.02 (CH_2NH_2), 41.27 (C-5'A), 58.74 ($\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 70.77 (C-5'B), 71.02 (C-3'B), 71.71 (C-3'A and C-2'A), 73.69 (C-2'B), 75.70 ($\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 83.28 (C-4'B), 84.55 (C-4'A), 87.96 (C-1'B), 89.67 (C-1'A), 92.56 ($\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 119.50 (C-5B), 119.81 (C-5A), 133.41 (C-8A), 139.84 (C-8B), 149.16 (C-4A), 149.95 (C-4B), 153.18 (C-2B), 154.21 (C-2A), 156.50 (C-6B), 156.59 (C-6A), 172.41 (CONH), 173.60 (CO Ac); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_{12}\text{O}_8+\text{H}]^+$ 655.2701, found 655.2708.

5'-Deoxy-5'-(2-nitrobenzenesulfonamido)-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (16). To a solution of **13** (2.30 g, 7.5 mmol) in pyridine (75 mL) was added 2-nitro-benzenesulfonyl chloride (3.82 g, 17.25 mmol). After stirring for 2 h at room temperature, volatiles were removed and the residue was purified by flash column chromatography (240 g SiO_2 , 3% isocratic methanol in dichloromethane) to yield compound **16** (3.25 g, 88%) as a white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.29 (s, 3H, CH_3 isop), 1.52 (s, 3H, CH_3 isop), 3.19–3.33 (m, 2H, H-5' and H-5''), 4.24 (td, $J = 2.9$ Hz, $J = 5.7$ Hz, 1H, H-4'), 4.95 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.37 (dd, $J = 2.9$ Hz, $J = 6.2$ Hz, H-2'), 6.12 (d, $J = 2.9$ Hz, H-1'), 7.38 (s, 2H, NH_2), 7.70–7.74 (m, 1H, H-4 Ns), 7.78–7.82 (m, 1H, H-3 Ns), 7.85–7.87 (m, 1H, H-5 Ns), 7.91–7.93 (m, 1H, H-2 Ns), 8.13 (s, 1H, H-8), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.60 (br s, 1H, $\text{NH}-5'$); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 25.60 (CH_3 isop), 27.42 (CH_3 isop), 45.12 (C-5'), 82.01 (C-3'), 83.33 (C-2'), 84.68 (C-4'), 90.00 (C-1'), 133.94 (Cq isop), 299.82 (C-5), 124.83 (C-3 Ns), 129.90 (C-6 Ns), 132.93 (C-5 Ns), 133.01 (C-1 Ns), 134.50 (C-4 Ns), 140.63 (C-8), 148.00 (C-2 Ns), 148.90 (C-4), 153.05 (C-2), 156.71 (C-6); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}+\text{H}]^+$ 492.1302 found, 492.1302.

5'-N-(N-tert-Butyloxycarbonyl-aminopropyl)amino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (17). To a solution of **17** (0.80 g, 1.63 mmol) in DMF was added K_2CO_3 (0.68 g, 4.88 mmol) followed by *tert*-butyl-3-bromopropylcarbamate (prepared according reported procedures) [25] (0.47 g, 1.95 mmol). After stirring overnight at 50 °C, alkylation was incomplete and *tert*-butyl-3-bromopropylcarbamate (0.23 g, 0.98 mmol) was further added. After heating at 50 °C for 24 h, thiophenol (0.36 mL, 3.26 mmol) was added and stirring was maintained for 18 h at room temperature. Volatiles were then removed under reduced pressure and the residue purified by flash column chromatography (85 g SiO_2 70–230 mesh, 5 to 11% methanol in dichloromethane) to yield compound **17** (0.61 g, 79%) as a white foam. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.33 (s, 3H, CH_3 isop), 1.36 (s, 9H, CH_3 Boc), 1.48 (quint, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 1.54 (s, 3H, CH_3 isop), 2.46–2.51 (m, 2H, CH_2NH), 2.66 (dd, $J = 6.1$ Hz, $J = 12.2$ Hz, 2H, H-5'), 2.73 (dd, $J = 5.9$ Hz, $J = 12.2$ Hz, 2H, H-5''), 2.93 (br q, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2NHBoc), 4.21 (td, $J = 2.8$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-4'), 4.97 (dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.45 (dd, $J = 3.0$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H, H-2'), 6.09 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 6.75 (br, 1H, NHBoc), 7.30 (s, 2H, NH_2), 8.16 (s, 1H, H-8), 8.35 (s, 1H, H-2); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 25.72 (CH_3 isop), 27.53 (CH_3 isop), 28.72 (3 CH_3 Boc), 30.08 (CH_2), 38.51 (CH_2NHBoc), 47.26 (CH_2NH), 51.47 (C-5'), 77.81 (Cq Boc), 82.65 (C-3'), 83.20 (C-2'), 85.33 (C-4'), 89.75 (C-1'), 113.68 (Cq isop), 119.71 (C-5), 140.42 (C-8), 149.41 (C-4), 153.15 (C-2), 156.07 (CO Boc), 156.62 (C-6); HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_5+\text{H}]^+$ 464.2621, found 464.2628.

5'-N-(N-tert-Butyloxycarbonyl-aminopropyl)propargylamino-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (18). To a solution of **17** (0.60 g, 1.3 mmol) in DMF (13 mL), were added DIEA (1.35 mL, 7.7 mmol) and propargyl bromide (80% in toluene, 0.79 mL, 7.10 mmol). After stirring for 2 h at room temperature, the reaction was diluted with ethyl acetate (100 mL) and washed with water (2 x 50 mL). Organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified

by flash column chromatography (20 g SiO₂, 3 to 4% methanol in dichloromethane) to yield compound **18** (0.53 g, 82%) as a white foam. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.33 (s, 3H, CH₃ isop), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.46 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 1.54 (s, 3H, CH₃ isop), 2.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 2.51–2.55 (m, 1H, H-5'), 2.67 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 13.1 Hz, 1H, H-5''), 2.84–2.99 (m, 2H, CH₂NHBoc), 3.01 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, HC≡C), 3.29–3.41 (m, 2H, CH₂C≡), 4.22 (td, *J* = 2.8 Hz, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-4'), 4.99 (dd, *J* = 2.8 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-3'), 5.49 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-2'), 6.14 (dd, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-1'), 6.72 (br, 1H, NHBoc), 7.30 (s, 2H, NH₂), 8.18 (s, 1H, H-8), 8.31 (s, 1H, H-2); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.67 (CH₃ isop), 27.43 (CH₃ isop), 27.79 (CH₂), 28.73 (3 CH₃ Boc), 38.39 (CH₂NHBoc), 42.40 (C≡C-CH₂), 51.53 (CH₂N), 55.32 (C-5'), 76.01 (HC≡C-CH₂), 77.84 (Cq Boc), 79.21 (C≡C-CH₂), 83.34 (C-3'), 83.43 (C-2'), 84.75 (C-4'), 89.67 (C-1'), 113.64 (Cq isop), 119.69 (C-5), 140.47 (C-8), 149.28 (C-4), 153.18 (C-2), 156.04 (CO Boc), 156.60 (C-6); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₄H₃₅N₇O₅+H]⁺ 502.2778, found 502.2770.

5'-Deoxy-5'-N-(N-tert-Butyloxycarbonyl-aminopropyl)-3-(2',3',5'-tri-O-acetyl-adenosine-8-yl)propargyl amino-2',3'-O-isopropylidene-adenosine (19). To a solution of bromide **6** (0.26 g, 0.55 mmol) and alkyne **18** (0.41 g, 0.82 mmol) in THF (16.5 mL) was added NEt₃ (0.23 mL, 1.65 mmol). The stirred mixture was degassed with argon (3 times) before adding sequentially CuI (10 mg, 0.05 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (32 mg, 0.028 mmol), followed by argon degassing. After stirring for 4 h at 60 °C, a second addition of Pd(PPh₃)₄ (32 mg, 0.028 mmol) was made. After 18 h at 60 °C, crude was filtered over Celite and volatiles were removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (31 g SiO₂, 0 to 7% methanol in dichloromethane) to yield **7** (0.31 g, 63%) as a white foam. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 3H, CH₃ isop), 1.37 (s, 9H, CH₃ Boc), 1.55 (s, 3H, CH₃ isop), 1.51–1.60 (m, 2H, CH₂), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.96 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 2.51–2.56 (m, 2H, CH₂N), 2.66 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 13.2 Hz, 1H, H-5'B), 2.82 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 13.2 Hz, 1H, H-5''B), 2.89–3.05 (m, 2H, CH₂NHBoc), 3.77–3.88 (m, 2H, CH₂C≡), 4.16 (dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-5'A), 4.28–4.35 (m, 2H, H-4'A and H-4'B), 4.41 (dd, *J* = 3.7 Hz, *J* = 12.0 Hz, 1H, H-5''A), 5.04 (dd, *J* = 2.8 Hz, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-3'B), 5.51 (dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-2'B), 5.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-3'A), 6.11 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H-1'A), 6.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1'B), 6.19 (dd, *J* = 4.6 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 6.77 (br t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NHBoc), 7.31 (br, 1H, NH₂), 7.57 (s, 2H, NH₂), 8.18 (s, 1H, H-2A), 8.19 (s, 1H, H-2B), 8.33 (s, 1H, H-8B); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.48 (CH₃), 20.69 (CH₃), 20.84 (CH₃), 25.66 (CH₃ isop), 27.43 (CH₃ isop), 27.90 (CH₂), 28.70 (3 CH₃ Boc), 38.31 (CH₂NHBoc), 43.16 (C≡C-CH₂), 51.78 (CH₂N), 55.35 (C-5'B), 62.86 (C-5'A), 70.24 (C-3'A), 71.71 (C-2'A), 74.34 (C≡C-CH₂), 77.90 (Cq Boc), 79.69 (C-4'A), 83.26 (C-3'B), 83.43 (C-2'B), 84.33 (C-4'B), 87.30 (C-1'A), 89.71 (C-1'B), 93.23 (C≡C-CH₂), 113.77 (Cq isop), 119.26 (C-5A), 119.71 (C-5B), 133.28 (C-8A), 140.54 (C-8B), 149.04 (C-4B), 149.24 (C-4A), 153.19 (C-2A), 154.32 (C-2B), 156.09 (CO Boc), 156.43 (C-5B), 156.62 (C-6A), 169.73 (CO), 169.81 (CO), 170.41 (CO); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₄₀H₅₂N₁₂O₁₂+H]⁺ 893.3906, found 893.3939.

5'-[N-3-Aminopropyl-N-(3-(adenosin-8-yl)propargyl)amino]-5'-deoxyadenosine (5). To a solution of **7** (0.29 g, 0.33 mmol) in methanol (3.3 mL) was added 28% NH₄OH (0.80 mL, 13.3 mmol). After stirring for 18 h at room temperature, volatiles were removed under reduced pressure and the crude material was brought to 0 °C before adding an ice-cold solution of TFA (50% in water, 10 mL). After 4 h at room temperature, water was added and the reaction mixture was lyophilized. Purification by reverse phase HPLC (0 to 30% acetonitrile in 10 mM TEAA buffer over 15 min) afforded the fully deprotected compound **5** as acetate salt (0.12 g, 61%) as white powder. *t*_R = 10.8 min; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.65 (quint, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 1.78 (s, 3H, CH₃ Ac), 2.65 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 2.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NH₂), 2.80 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 13.7 Hz, 1H, H-5'B), 2.90 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 13.7 Hz, 1H, H-5''B), 3.53 (dd, *J* = 4.0 Hz, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-5'A), 3.69 (dd, *J* = 3.6 Hz, *J* = 12.2 Hz, 1H, H-5''A), 3.80 (s, 2H, CH₂C≡), 3.96–4.01 (m, 1H, H-4'A), 4.03–4.08 (m, 1H, H-4'B), 4.14 (pt, *J* = 5.0 Hz, 1H, H-3'B), 4.20 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-3'A), 4.67 (pt, *J* = 5.1 Hz, 1H, H-2'B), 4.98 (dd, *J* = 5.3 Hz, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-2'A), 5.89 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1'B), 6.00 (dd, *J* = 6.8 Hz, H-1'A), 7.25 (br, 1H, NH₂ B), 7.61 (s, 2H,

NH₂ A), 8.15 (s, 1H, H-2A), 8.17 (s, 1H, H-2B), 8.36 (s, 1H, H-8B); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23.23 (CH₃ Ac), 28.50 (CH₂N), 38.89 (CH₂NH₂), 44.80 (C≡C-CH₂), 51.78 (CH₂N), 56.23 (C-5'B), 62.69 (C-5'A), 71.49 (C-3'A), 72.21 (C-3'B and C-2'A), 73.14 (C-2'B), 74.81 (C≡C-CH₂), 83.03 (C-4'B), 87.11 (C-4'A), 88.10 (C-1'B), 90.01 (C-1'A), 92.96 (C≡C-CH₂), 119.64 and 119.67 (C-5A and C-5B), 133.94 (C-8A), 140.24 (C-8B), 148.84 (C-4A), 149.90 (C-4B), 153.14 (C-2B), 153.67 (C-2A), 156.52 (C-6B), 156.54 (C-6A), 173.90 (CO Ac); HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for [C₂₆H₃₄N₁₂O₇+H]⁺ 627.2751 found, 627.2731.

4.3. K_i Measurements

Activity was measured at 30 °C in 50 mM Bis-Tris pH 7.0, 2 mM sodium citrate, 1 mM MgCl₂. Reaction mixtures contained 0–2 mM NAD, 4 mM MgATP, 5 mM Glucose 6-phosphate, 1 U/mL Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 0.1 μM *Lm*NADK1. Steady state rate constants (*k*_{ss}) were calculated by fitting the initial (first 500–1000 s) linear part of the NADP production time courses per NADK. Inhibitors were tested at 4 concentrations: 0, 10, 25 or 50 μM and *K*_i values were determined using the competitive inhibition equation, $k_{ss} = k_{cat} \times \text{NAD} / (K_M \times (1 + [\text{inhibitor}] / K_i) + \text{NAD})$, with GraFit software (v 7.0.3).

Supplementary Materials: Supplementary File: Copies of ¹H and ¹³C NMR spectra of prepared compounds.

Author Contributions: Conceptualization, S.P., O.D. and G.L.; investigation, D.A.C., C.L. (Clarisse Leseigneur), M.G., D.C., V.H., G.L. and C.L. (Corinne Lionne); writing, S.P., O.D., G.L., C.L. (Corinne Lionne), D.A.C., C.L. (Clarisse Leseigneur) and M.G.; supervision, S.P., O.D. and G.L.; funding acquisition, S.P., O.D., G.L. and C.L. (Corinne Lionne) All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EMMA-019-03; ANR-17-CE18-0011-02) and supported by Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS and Inserm. The *Yersinia* Research Unit is a member of the Laboratory of Excellence Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases (ANR-LBX-62-IBEID).

Acknowledgments: We thank Frédéric Bonhomme for assisting with HRMS analysis. We thank the members of the *Yersinia* Research Unit for helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- McGuinness, E.T.; Butler, J.R. NAD⁺ kinase—A review. *Int. J. Biochem.* **1985**, *17*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
- Magni, G.; Orsomando, G.; Raffaelli, N. Structural and functional properties of NAD kinase, a key enzyme in NADP biosynthesis. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 739–746. [\[CrossRef\]](#)
- Depaix, A.; Kowalska, J. NAD Analogs in aid of chemical biology and medicinal chemistry. *Molecules* **2019**, *24*, 4187. [\[CrossRef\]](#)
- Kawai, S.; Murata, K. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: Key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 919–930. [\[CrossRef\]](#)
- Bi, J.; Wang, H.; Xie, J. Comparative genomics of NAD(P) biosynthesis and novel antibiotic drug targets. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 331–340. [\[CrossRef\]](#)
- Gerdes, S.Y.; Scholle, M.D.; D'Souza, M.; Bernal, A.; Baev, M.V.; Farrell, M.; Kurnasov, O.V.; Daugherty, M.D.; Mseeh, F.; Polanuyer, B.M.; et al. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: Examples in cofactor biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 4555–4572. [\[CrossRef\]](#)
- Kobayashi, K.; Ehrlich, S.D.; Albertini, A.; Amati, G.; Andersen, K.K.; Arnaud, M.; Asai, K.; Ashikaga, S.; Aymerich, S.; Bessieres, P.; et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4678. [\[CrossRef\]](#)
- Peters, J.M.; Colavin, A.; Shi, H.; Czarny, T.L.; Larson, M.H.; Wong, S.; Hawkins, J.S.; Lu, C.H.S.; Koo, B.-M.; Marta, E.; et al. A Comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell* **2016**, *165*, 1493–1506. [\[CrossRef\]](#)
- Sasseti, C.M.; Boyd, D.H.; Rubin, E.J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 77–84. [\[CrossRef\]](#)

10. Bae, T.; Banger, A.K.; Wallace, A.; Glass, E.M.; Åslund, F.; Schneewind, O.; Missiakas, D.M. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12312. [[CrossRef](#)]
11. Chaudhuri, R.R.; Allen, A.G.; Owen, P.J.; Shalom, G.; Stone, K.; Harrison, M.; Burgis, T.A.; Lockyer, M.; Garcia-Lara, J.; Foster, S.J.; et al. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genom.* **2009**, *10*, 291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yamachika, S.; Onodera, Y.; Hiramatsu, K.; Takase, H. Plasmid integration method: A new tool for analysis of the essentiality and function of genes in *S. aureus*. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *90*, 250–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lerner, F.; Niere, M.; Ludwig, A.; Ziegler, M. Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 69–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Labesse, G.; Douguet, D.; Assairi, L.; Gilles, A.-M. Diacylglyceride kinases, sphingosine kinases and NAD kinases: Distant relatives of 6-phosphofructokinases. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 273–275. [[CrossRef](#)]
15. Poncet-Montange, G.; Assairi, L.; Arold, S.; Pochet, S.; Labesse, G. NAD kinases use substrate-assisted catalysis for specific recognition of NAD. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33925–33934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gelin, M.; Poncet-Montange, G.; Assairi, L.; Morellato, L.; Huteau, V.; Dugué, L.; Dussurget, O.; Pochet, S.; Labesse, G. Screening and in situ synthesis using crystals of a NAD kinase lead to a potent antistaphylococcal compound. *Structure* **2012**, *20*, 1107–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Paoletti, J.; Assairi, L.; Gelin, M.; Huteau, V.; Nahori, M.-A.; Dussurget, O.; Labesse, G.; Pochet, S. 8-Thioalkyl-adenosine derivatives inhibit *Listeria monocytogenes* NAD kinase through a novel binding mode. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 1041–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gelin, M.; Paoletti, J.; Nahori, M.A.; Huteau, V.; Leseigneur, C.; Jouvion, G.; Dugue, L.; Clement, D.; Pons, J.L.; Assairi, L.; et al. From substrate to fragments to inhibitor active *in vivo* against *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 422–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Katayama, H.; Oda, Y. Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography. *J. Chromatogr. B* **2007**, *855*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Urh, M.; Simpson, D.; Zhao, K. Chapter 26 Affinity chromatography: General methods. In *Methods in Enzymology*; Burgess, R.R., Deutscher, M.P., Eds.; Elsevier Academic Press: Burlington, VT, USA, 2009; Volume 463, pp. 417–438. [[CrossRef](#)]
21. Kan, T.; Fukuyama, T. Ns strategies: A highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Comm.* **2004**, 353–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Amiable, C.; Paoletti, J.; Haouz, A.; Padilla, A.; Labesse, G.; Kaminski, P.-A.; Pochet, S. 6-(Hetero)Arylpurine nucleotides as inhibitors of the oncogenic target DNPH1: Synthesis, structural studies and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 418–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Morrell, A.; Placzek, M.S.; Steffen, J.D.; Antony, S.; Agama, K.; Pommier, Y.; Cushman, M. Investigation of the lactam side chain length necessary for optimal indenoisoquinoline topoisomerase I inhibition and cytotoxicity in human cancer cell cultures. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2040–2048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kolb, M.; Danzin, C.; Barth, J.; Claverie, N. Synthesis and biochemical properties of chemically stable product analogs of the reaction catalyzed by S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 550–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Donnier-Maréchal, M.; Carato, P.; Larchanché, P.-E.; Ravez, S.; Boulahjar, R.; Barczyk, A.; Oxombre, B.; Vermersch, P.; Melnyk, P. Synthesis and pharmacological evaluation of benzamide derivatives as potent and selective sigma-1 protein ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 964–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de NAD kinase, cible bactérienne pour le développement d'antibiotiques.

Il est estimé qu'environ sept cent mille individus meurent chaque année suite à une infection par des bactéries multi-résistantes (BMR). D'ici 2050, si aucune action n'est entreprise, ce chiffre pourrait atteindre dix millions de morts annuelles. Parmi les différentes actions permettant de lutter contre la propagation des BMR figure l'identification de nouvelles cibles pour le développement d'agents antibactériens. Les NAD kinases (NADK) sont les enzymes responsables de la synthèse *de novo* de NADP⁺, cofacteur essentiel impliqué dans de nombreux processus biologiques. Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis l'obtention d'une première série de mimes de NAD⁺, inhibiteurs actifs *in vitro* sur enzyme purifiée et sur cultures bactériennes de *Staphylococcus aureus* (Sa). Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de ce projet.

Dans les deux premiers chapitres de ce mémoire, nous décrivons la conception, la synthèse et l'évaluation d'outils chimiques permettant la validation et la localisation de la cible. A cette fin, nous avons identifié les éléments structuraux permettant la fonctionnalisation des inhibiteurs précédemment conçus tout en conservant une bonne affinité pour la NADK. Ainsi, l'introduction d'une amine a permis de greffer ces analogues sur support solide afin d'en évaluer la sélectivité par chromatographie d'affinité. Par ailleurs, l'introduction d'une fonction alcyne a permis l'obtention d'une sonde fluorescente afin de localiser l'inhibiteur *in cellulo* par microscopie de fluorescence. Dans un troisième chapitre, nous décrivons nos efforts pour améliorer les paramètres physico-chimiques des inhibiteurs de NADK et gagner en efficacité. Enfin, dans une dernière partie, nous présentons la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une nouvelle famille d'inhibiteurs, dérivés macrocycliques de la famille précédente.

L'ensemble de ces travaux ont permis d'une part, la préparation d'outils chimiques pour la validation et localisation de la cible et d'autre part, l'obtention de molécules plus actives *in vitro*.

Design, synthesis and evaluation of inhibitors targeting bacterial NAD kinase for the development of new antibiotics.

It is estimated that around seven hundred thousand people die every year due to antimicrobial resistance (AMR). If no action is undertaken, in 2050, this number will have skyrocketed to ten million annual death. Among the actions undertaken to fight against AMR, figures the identification of new metabolic targets for the development of antimicrobials. NAD kinases (NADK) are ubiquitous enzymes involved in the *de novo* synthesis of NADP⁺, an essential cofactor in numerous biological processes. Previous work undertaken by the laboratory has allowed the identification of a first series of NAD⁺ mimics showing inhibitory activity *in vitro* on both purified enzyme and bacterial cultures of *Staphylococcus aureus* (Sa).

The first two chapters of this manuscript describes the design, synthesis and evaluation of chemical tools allowing the validation and localisation of the target. To this end, we identified structural elements of our previous inhibitors that could be modified without causing major impact on their inhibitory potency toward the target. This knowledge allowed us to synthesise molecules modified by an aminoalkyl chain to be grafted on solid support, in order to evaluate their selectivity towards NADK by affinity chromatography. We also introduced a clickable alkyne function to perform fluorescence assays in order to localise the modified compound *in cellulo*. In the third chapter, we describe the work made to improve the physico-chemical parameters of inhibitors to increase their activity. In the last chapter, we report the synthesis and *in vitro* evaluation of macrocyclic compounds as a new family of inhibitors.

This work allowed on one hand the preparation of chemical tools to validate and localise the target and, on the other hand, the synthesis of new molecules showing *in vitro* activity.

