

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE 3MPL

Année 2014

Nouvelle stratégie de synthèse de dimères ribonucléosidiques avec un lien amide à partir du D-xylose

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Chimie
Spécialité : Chimie Organique Fine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Laurence ARZEL

Le 16 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président	Didier DUBREUIL, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs	Sébastien PAPOT, Professeur, Université de Poitiers Jean DESSOLIN, Chargé de Recherches, Université de Bordeaux
Examineurs	Jean-Marc ESCUDIER, Directeur de Recherches, Université de Toulouse Monique MATHE-ALLAINMAT, Chargée de Recherches, Université de Nantes Jacques LEBRETON, Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse : Jacques LEBRETON - Co-directrice de thèse : Monique MATHE-ALLAINMAT

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE 3MPL

Année 2014

Nouvelle stratégie de synthèse de dimères ribonucléosidiques avec un lien amide à partir du D-xylose

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Chimie
Spécialité : Chimie Organique Fine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Laurence ARZEL

Le 16 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président	Didier DUBREUIL, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs	Sébastien PAPOT, Professeur, Université de Poitiers Jean DESSOLIN, Chargé de Recherches, Université de Bordeaux
Examineurs	Jean-Marc ESCUDIER, Directeur de Recherches, Université de Toulouse Monique MATHE-ALLAINMAT, Chargée de Recherches, Université de Nantes Jacques LEBRETON, Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse : Jacques LEBRETON - Co-directrice de thèse : Monique MATHE-ALLAINMAT

Remerciements

Les travaux de thèse présentés dans ce document ont été réalisés au sein de l'UMR6230-Laboratoire CEISAM (Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation) de l'Université de Nantes dirigée par Bruno Bujoli, Directeur de Recherches, que je remercie de m'avoir accueilli en 2006 lors de ma mutation. Il m'a ensuite encouragé à faire une thèse et soutenu pendant toute la durée de celle-ci.

Je remercie Sébastien Papot, Professeur à l'Université de Poitiers, et Jean Dessolin, Chargé de Recherches à l'Université de Bordeaux, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Jean-Marc Escudier, Directeur de Recherches à l'Université de Toulouse, d'avoir suivi mon travail en tant que rapporteur de mon comité de suivi de thèse puis d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe SYMBIOSE (SYnthèse Multiétapes et BIOScience) et plus particulièrement à Jacques Lebreton, Professeur à l'Université de Nantes, qui m'a accueilli dans son équipe en 2006, il m'a permis de revenir à la synthèse organique après sept années passées en Spectrométrie de Masse en rassurant les septiques par cette phrase "la chimie c'est comme le vélo, ça ne s'oublie pas". Sa confiance ne s'est pas arrêtée là puisqu'il m'a ensuite proposé ce sujet de thèse et m'a laissé explorer ce que je souhaitais, tout en étant très disponible lorsque je le sollicitais. Il m'a donné ce projet en me racontant une histoire d'œufs au bacon qui m'a guidée tout au long de la thèse. Cette histoire explique la différence entre être concerné et être impliqué : dans les œufs au bacon la poule est concernée mais le cochon est impliqué et quand on fait une thèse beaucoup de gens sont concernés mais la seule personne à être impliquée c'est le doctorant !

Je remercie Monique Mathé-Allainmat, Chargée de Recherches à l'Université de Nantes, ma co-directrice de thèse pour ses conseils quotidiens, sa vision très enrichissante en tant que spécialiste en synthèse multi-étapes de produits naturels ainsi que sa rigueur lors de la rédaction. Ses qualités scientifiques et humaines ont été indispensables à l'achèvement de cette thèse. Je fais également de gros bisous à Monique, ma collègue de bureau et de labo avec qui il est tellement facile et agréable de partager toutes mes journées.

Je remercie Fabrice Dénès qui ne fait pas partie de l'encadrement de cette thèse et qui l'a pourtant enrichie par ses interrogations et ses propositions concernant la réactivité de mes substrats qui ne lui étaient pas du tout familiers. Ensuite, sa lecture du manuscrit m'a permis de l'enrichir du point de vue mécanistique et a fait progresser ma réflexion.

Enfin je remercie Didier Dubreuil, mon président de jury, que je trouvais sur les marches du bâtiment 4 en arrivant tous les mercredis matins lors de sa première pause cigarette de la journée et durant laquelle nous faisons le point de la semaine. Merci infiniment pour ses encouragements visant à me déstresser le mois qui a précédé la soutenance.

D'autres membres du CEISAM ont contribué à la réussite de cette thèse dans le cadre de leur travail ou des relations humaines chaleureuses propices au bien-être nécessaire au bien-travailler. Je pense au staff analytique : Julie, Isabelle et Virginie ; à l'inclassable râleur breton (le qualificatif exact ne se trouve qu'en patois occitan : *reboussier*) prénommé Louis ; au staff administratif : Muriel, Nathalie, Karine et Fabienne ; aux collègues chercheurs et enseignants-chercheurs : Muriel, Arnaud, Virginie, Sylvain, Karine, Valérie, David, Seb, Isabelle, Françoise, Erwan, FX, Miréia ; aux doctorants passés et présents : Anne, Romain, Vincent, Tibo, Clément et ma très chère Khaoula.

Je tiens à saluer Florine Cavelier, mon encadrante de Maîtrise devenue mon amie, qui m'a toujours poussée à faire une thèse depuis 1996 ainsi que Philippe Belmont, mon ami depuis bientôt 15 ans, rencontré à Lyon dans l'équipe de M. A. Ciufolini où nous avons débuté tous les deux nos carrières au CNRS.

J'embrasse mes trois amours dans leur ordre d'apparition : Ludo, Romain et Fanny, ils sont bien plus que ma priorité absolue, ils sont toute ma vie.

J'ai une pensée émue pour les membres de ma famille présents et disparus qui ont toujours été fiers de moi, de mes études, du concours d'entrée au CNRS. Je suis la seule de la famille à avoir le Bac alors un Doctorat ...

Abréviations et acronymes

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
AMM	autorisation de mise sur le marché
ARN	acide ribonucléique
Ac	acétyle
AIBN	azobisisobutyronitrile
A. L.	acide de Lewis
B	base
BAIB	biacetoxyiodobenzene
BnCl	benzyl chloride
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acétamide
C	cytosine
Da	dalton
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
CI	chemical ionization
éq	équivalent

ESI	electrospray ionization
G	guanine
GC	gaz chromatography
GP	groupement protecteur
h	heure, hour
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
IR	infra red
j	jours
Ms	mésyle
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mmol	millimole
MS	mass spectrometry
MsCl	mesyl chloride
NMR	nuclear magnetic resonance
NMO	oxyde de <i>N</i> -méthyl morpholine
PCC	pyridinium chloro chromate
ppm	partie par million
Py	pyridine
Rdt	rendement
RMN	résonance magnétique nucléaire
SN	substitution nucléophile
T	thymine
t. a.	température ambiante
TBAF	tetrabutyl ammonium fluoride

TBDPSCI	<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl chloride
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy
TFA	acide trifluoroacétique
TLC	thin layer chromatography
TMSOTf	trimethylsilyle trifluoromethanesulfonate
Tol	toluène
TsCl	tosyl chloride
Tr	trityle
U	uracile
UV	ultra violet

Introduction

Les dimères ribonucléosidiques avec un lien amide sont des composés synthétiques destinés à intégrer des oligonucléotides de synthèse. Ces molécules à fort potentiel thérapeutique dans le domaine de la régulation des gènes représentent un défi synthétique en chimie organique.

Ce manuscrit sera divisé en trois parties. Le premier chapitre a pour objectif de dresser l'état de l'art et sera composé de généralités sur les acides nucléiques, les oligonucléotides et leurs applications. Les voies de synthèse de dimères nucléosidiques ayant un lien amide seront décrites en fin de chapitre.

La deuxième partie sera consacrée à la validation de notre concept de synthèse originale sur des substrats nucléosidiques accessibles dont notamment l'étape clé de glycosylation qui fera l'objet d'une étude bibliographique.

Enfin, notre stratégie sera appliquée aux synthèses de deux squelettes ribosidiques avec un lien amide à l'occasion desquelles la réaction d'acétolyse sera étudiée sur des substrats modèles simples. Les glycosylations de ces dimères ribosidiques permettront un large accès aux différents dimères ribonucléosidiques avec un lien amide, deux exemples seront présentés dans ce dernier chapitre.

Table des matières

1	Etat de l'art	11
1.1	Les acides nucléiques, notions de biologie à l'usage du chimiste	11
1.1.1	L'acide désoxyribonucléique (ADN)	13
1.1.2	L'acide ribonucléique (ARN)	16
1.1.3	Du gène à la protéine	16
1.2	Applications thérapeutiques et synthèse des oligonucléotides	18
1.2.1	Modes d'action des oligonucléotides antisens	21
1.2.2	Modifications chimiques des oligonucléotides antisens	27
1.2.3	Antisens "gapmers" et siARN	33
1.3	Voies de synthèse de dimères nucléosidiques avec un lien amide	35
1.3.1	Premières synthèses de dimères désoxyribonucléosidiques ayant un lien amide par De Mesmaeker et son équipe	35
1.3.2	Synthèses de dimères ribonucléosidiques ou de précurseurs de dimères ribonucléosidiques avec un lien amide-3	37
1.3.3	Plateforme amidique pour la synthèse de dimères ribonucléosidiques	44
2	Validation du concept	47
2.1	Synthèse de l'amine 4 (GP = TBDPS)	48
2.2	Synthèse de l'acide 12a (GP = TBDPS)	48
2.2.1	Du D-xylose à la cétone 7	49
2.2.2	De la cétone 7 à l'acide carboxylique 12a	59
2.3	Synthèse du dimère 13 (GP = TBDPS/TBDPS)	63
2.4	Synthèse du dimère 15 (Bn/TBDPS) et glycosylation	67

2.4.1	Etude bibliographique de synthèse des nucléosides	69
2.4.2	Acétolyse de l'isopropylidène en position 1,2 des dérivés ribosidiques.	80
2.4.3	Glycosylation du précurseur 1,2-O-acétate 16	83
2.5	Synthèse du dimère 27 (GP = Bn) et glycosylation	88
3	Synthèse de dimères ribonucléosidiques.....	95
3.1	Vers la synthèse d'homodimères ribonucléosidiques (les deux bases identiques)	95
3.1.1	Synthèse de l'amine 33	95
3.1.2	Etude de la réaction d'acétolyse de l'isopropylidène	98
3.1.3	Synthèse de l'homodimère ribosidique et glycosylation	107
3.2	Vers la synthèse d'hétérodimères ribonucléosidiques	111
3.2.1	Synthèse de l'amine 51	111
3.2.2	Synthèse de carboxamide via un iminophosphorane	114
	Conclusions et perspectives.....	125
	Références bibliographiques	129
4	Experimental part	135

1 Etat de l'art

Les nucléosides existent à l'état naturel, ce sont les éléments constitutifs des acides nucléiques (ADN et ARN), cependant pour des applications thérapeutiques bien spécifiques, divers nucléosides synthétiques ont également été préparés.

Après avoir abordé de manière assez générale ces deux aspects, nous présenterons plus en détails notre projet de synthèse de dimères ribonucléosidiques portant un lien spécifique amide. Un état de l'art concernant la synthèse de nucléosides et des voies d'accès aux dimères ribonucléosidiques et désoxyribonucléosidiques sera présenté avant d'évoquer l'originalité de notre concept.

1.1 Les acides nucléiques, notions de biologie à l'usage du chimiste

Les acides nucléiques sont des macromolécules naturelles constituées d'un enchaînement de nucléotides. Un nucléotide est composé d'un sucre lié à une base azotée et d'un groupement phosphate sur la position 5' du sucre (figure 1). La liaison nucléosidique implique le C-1 du sucre et le N-1 des pyrimidines ou le N-9 des purines.

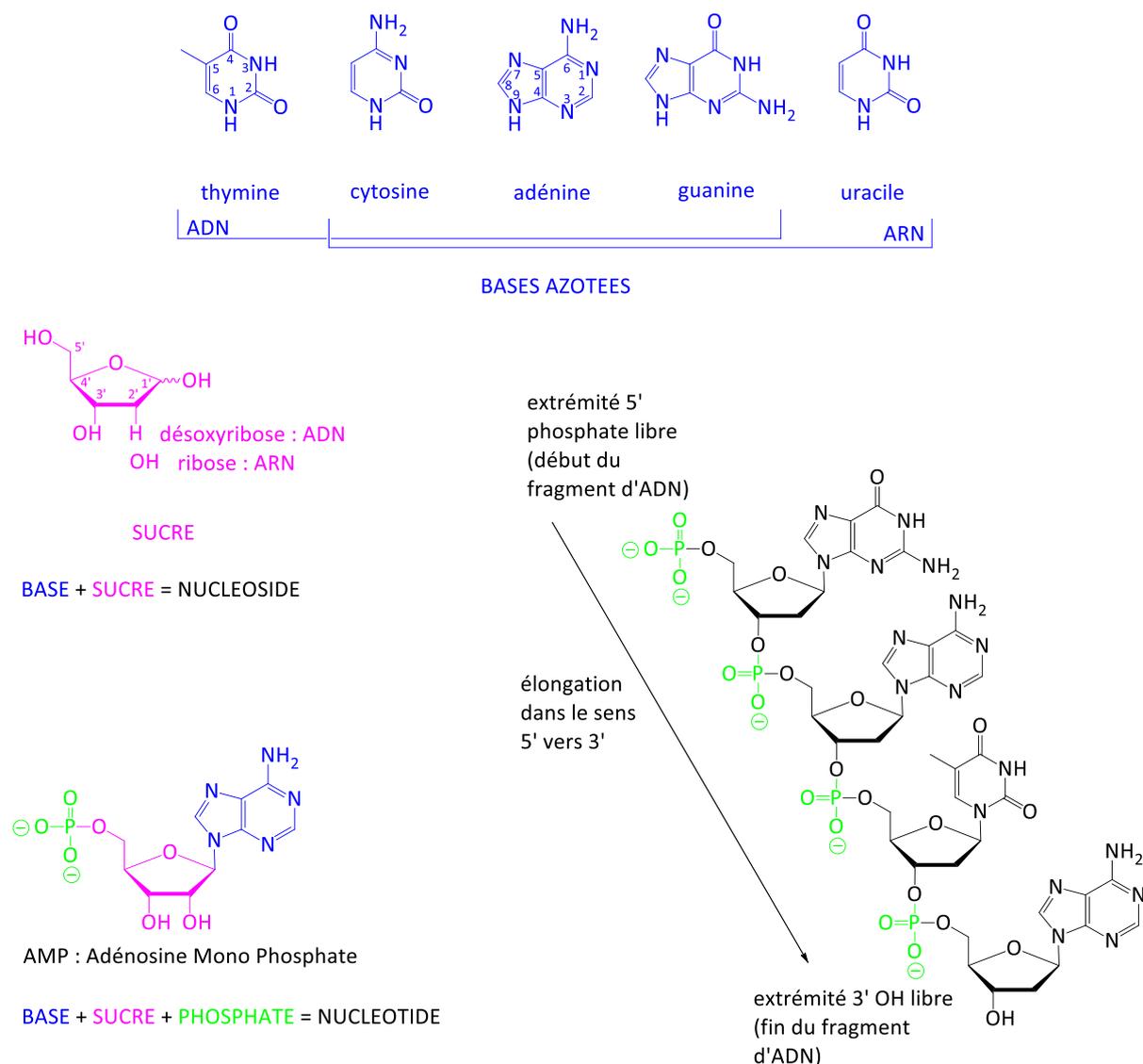


Figure 1 : représentation des bases azotées naturelles, d'un nucléoside, d'un nucléotide et d'un fragment d'ADN.

Pour former un acide nucléique, les nucléotides sont condensés les uns avec les autres par formation de liaisons phosphodiester entre le carbone 3' d'un premier nucléotide et le carbone 5' du nucléotide suivant.

La majorité des sucres naturels appartiennent à la série D (le groupement hydroxyle porté par le C_{n-1} est à droite dans la représentation de Fisher). Les différentes formes du xylose (le précurseur de nos synthèses) sont représentées sur la figure 2. Le D-xylose est dextrogyre par conséquent son énantiomère le L-xylose est lévogyre mais le D-ribose est lévogyre, l'appartenance à la série D ou L n'a pas de lien avec les propriétés optiques.

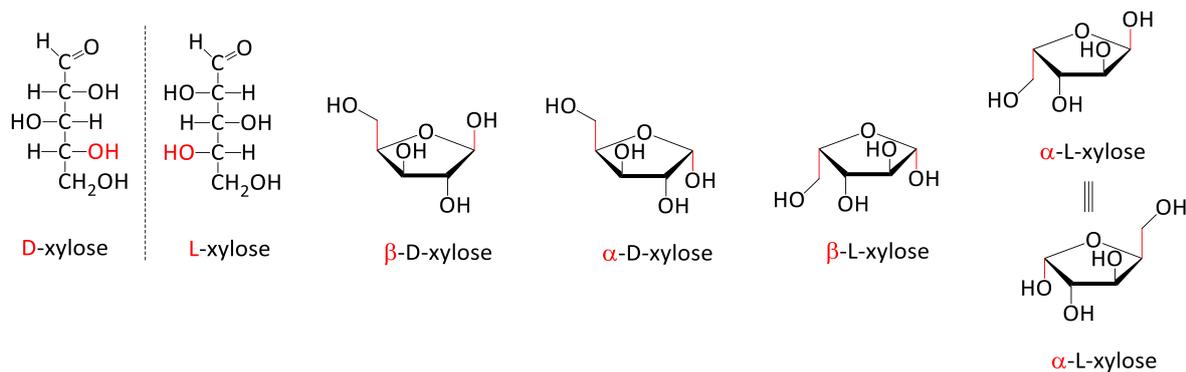


Figure 2 : différentes formes du xylose.

1.1.1 L'acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN dont la taille varie de quelques millions à quelques milliards de nucléotides est composé de deux brins qui s'organisent en double-hélice droite selon le modèle proposé par J.D. Watson et F.H.C. Crick en 1953, l'hélice gauche restant très rare. Chaque brin d'ADN s'apparie (ou s'hybride) à l'autre brin *via* des liaisons hydrogène et forme ainsi un duplex ADN-ADN. Les brins sont antiparallèles, l'un est dans le sens 5'→3' (brin sens) et l'autre est dans le sens 3'→5' (brin anti-sens). Les brins sont complémentaires puisque chaque adénine (A) d'un brin est liée par deux liaisons hydrogène à une thymine (T) ou à un uracile (U) de l'autre brin, et chaque guanine (G) d'un brin est liée par 3 liaisons hydrogène à une cytosine (C) de l'autre brin. Pour deux bases appariées, leurs sucres sont en sens inverse. L'hybridation adénine-thymine est moins stable (2 liaisons hydrogène, -21 kJ.mol^{-1}) que celle entre guanine et cytosine (3 liaisons hydrogène, -63 kJ.mol^{-1}) (figure 3).

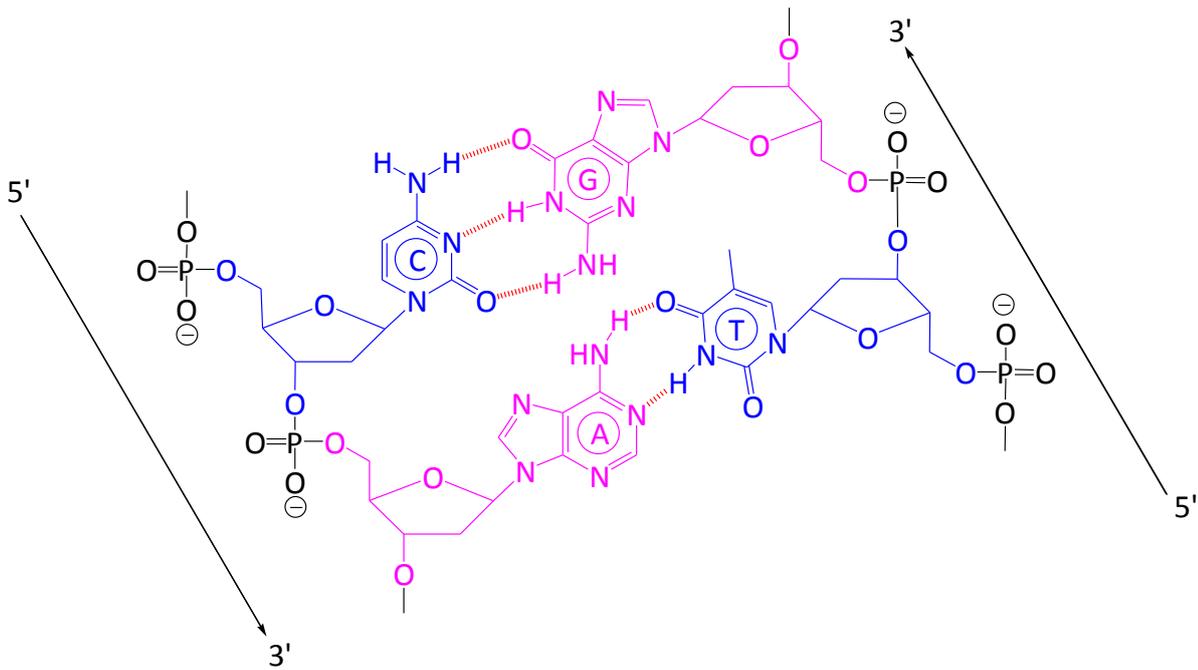


Figure 3 : hybridation Watson-Crick des bases azotées de l'ADN.

Il arrive que cette complémentarité soit perturbée, ce phénomène s'appelle le mésappariement (mismatch, en anglais). En effet, suite à une erreur de réplication de l'ADN, un nucléotide incorrect peut être incorporé dans le brin d'ADN synthétisé où deux bases non complémentaires se trouveront alors face à face. Des systèmes de réparation des mésappariements existent dans la cellule^[1].

Concernant la forme en double hélice droite de l'ADN, elle peut être de forme A ou de forme B (très rarement Z)^[2] (figure 4). Ceci provient de la conformation Nord ou Sud qu'adopte le sucre mais dans les deux cas (forme A ou B) la liaison osidique est anti (figure 5).

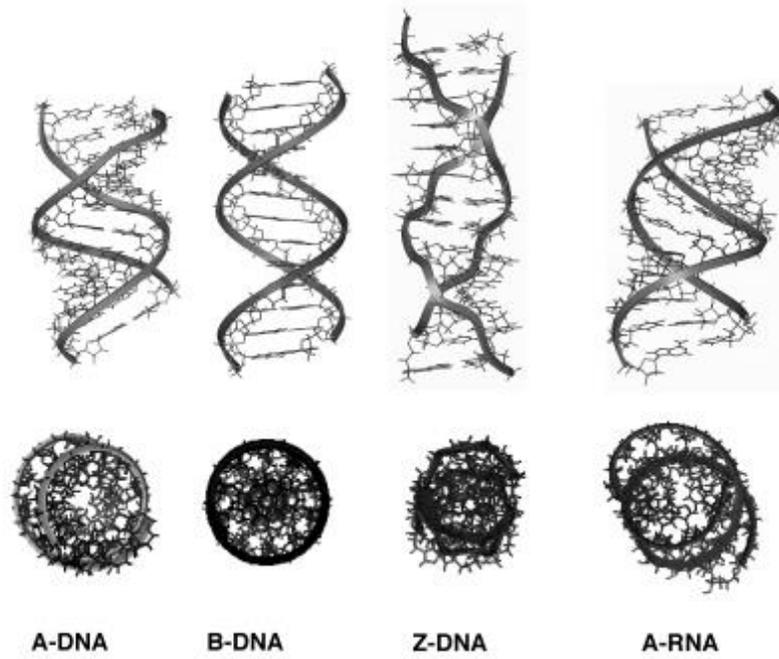


Figure 4 : modélisation moléculaire des conformations des principaux duplex d'acides nucléiques^[2].

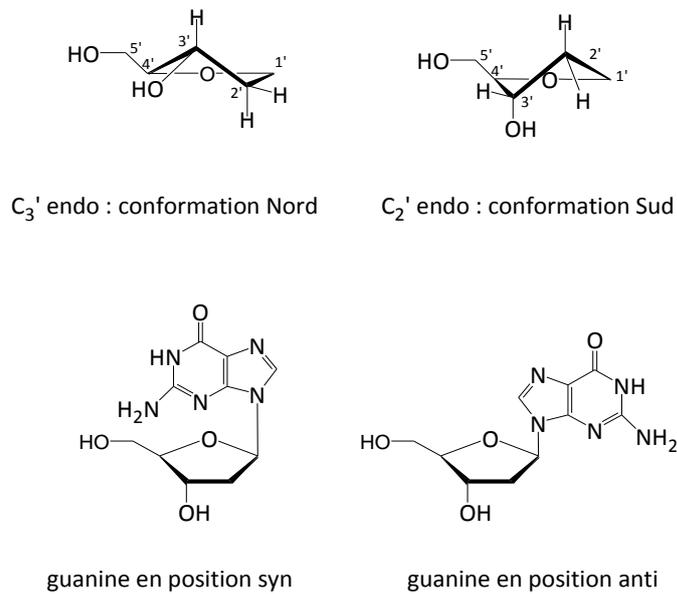


Figure 5 : conformation Nord/Sud du désoxyribose et position syn/anti de la liaison osidique.

Dans la conformation Nord le C-3' du sucre est au dessus du plan, le sucre adoptant une forme enveloppe et une conformation C_3' endo (3E) ou une forme twist et une conformation C_2' exo/ C_3' endo (3T). Dans la conformation Sud c'est le C-2' qui est endo, le sucre adoptant une

forme enveloppe et une conformation C-2'endo (²E) ou une forme twist et une conformation C₂'endo/C₃'exo (²₃T). L'ADN peut adopter les deux formes A (C₃'endo, anti) ou B (C₂'endo, anti) mais la forme B est plus fréquente car dans ce cas le grand sillon est plus large donc plus accessible aux protéines.

L'ADN détermine la synthèse des protéines, par l'intermédiaire de l'acide ribonucléique (ARN).

1.1.2 L'acide ribonucléique (ARN)

L'ARN dont la taille varie de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides est généralement composé d'un seul brin. Il peut aussi être organisé en double brins ARN-ARN ou engagé avec l'ADN en duplex ARN-ADN. La double hélice est forcément de forme A car les sucres de l'ARN sont de conformation Nord (C₃'endo, anti) pour des raisons stériques mais surtout électroniques (figure 5).

Selon leurs fonctions, on distingue plusieurs espèces d'acides ribonucléiques. On peut citer les acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) qui participent à la structure des ribosomes ; les acides ribonucléiques de transfert (ARNt) qui transportent des acides aminés activés pour la traduction ; les acides ribonucléiques messagers (ARNm) qui sont issus de la transcription d'un gène et qui portent l'information à traduire ou encore les miARN (ARN micro) et les siARN (petits ARN interférents) dont la fonction principale est de réguler le taux de synthèse des protéines (jusqu'à stopper la synthèse).

1.1.3 Du gène à la protéine

Environ 25000 gènes codent pour des protéines. Les autres gènes génèrent des ARN non codants (ARNt, ARNr, miARN). Les gènes sont composés en moyenne de 30000 paires de bases (30 kpb) mais les gènes qui produisent les miARN ont une taille de 2 à 3 kpb.

L'expression d'un gène aboutit à la synthèse, dans les cellules, d'acides ribonucléiques et de protéines. Dans un premier temps a lieu la transcription (figure 6) c'est à dire la lecture d'un gène par une ARN-polymérase qui synthétise un acide ribonucléique, dont la séquence est complémentaire du brin anti-sens (3'→5') de l'ADN donc identique à celle du brin sens et orientée dans le même sens (5'→3'). Vient ensuite la phase d'épissage du transcrit primaire

(pré-ARNm) où des réactions de maturations permettent d'enlever les introns (non opérationnels) et d'assembler les exons (opérationnels), il devient alors ARN messager (ARNm) et sort du noyau vers le cytoplasme. On assimile souvent, à tort, les concepts d'exon/intron et ceux de codant/non-codant. Ainsi des ARNm codant pour la synthèse de protéines comportent des régions non codantes aux extrémités 5' et 3' qui sont bien des régions exoniques puisque présentes dans l'ARNm après l'épissage. A l'inverse, les ARN non codants (ARNt, ARNr, etc) comportent des introns mais aussi des exons et subissent également un épissage.

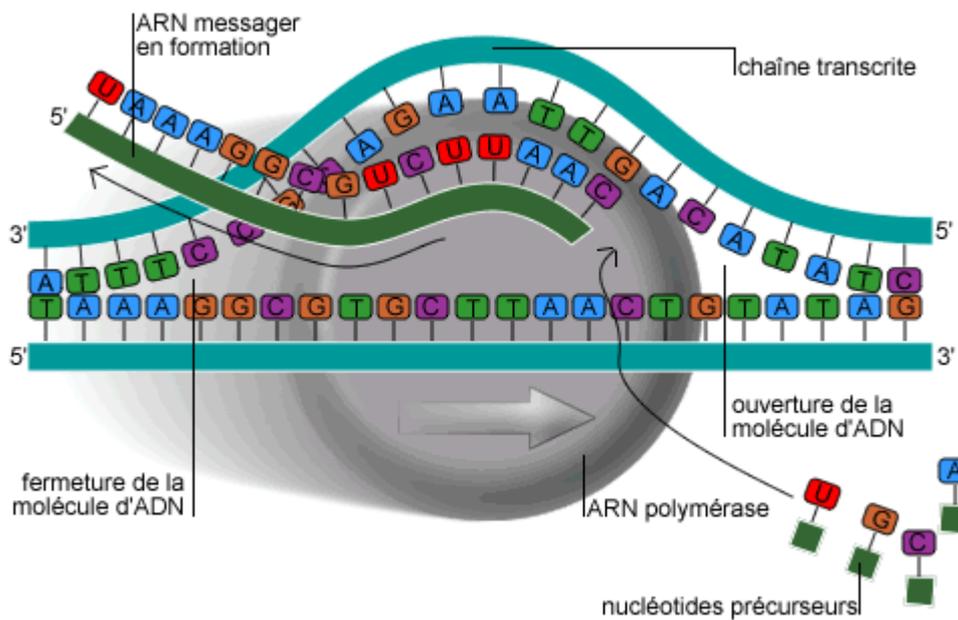


Figure 6 : transcription de l'ADN en ARN messager (source : fr.wikipedia.org).

Dans le second temps, a lieu la traduction (figure 7) où l'ARNm est lu dans le sens 5'→3' par les ribosomes par groupes de 3 nucléotides et traduit en acides aminés correspondants qui sont apportés par un ARN de transfert (ARNt). La synthèse de la protéine se fait en même temps de l'extrémité NH₂ terminale vers l'extrémité COOH terminale. Après des phases de maturation, la protéine est prête à remplir sa fonction dans la cellule.

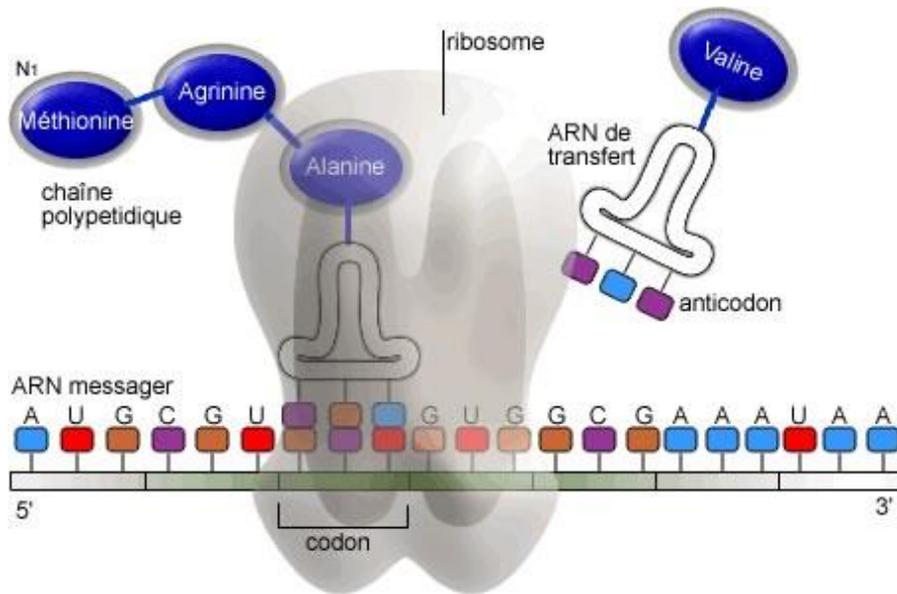


Figure 7 : traduction de l'ARN messenger en protéine (source : fr.wikipedia.org).

1.2 Applications thérapeutiques et synthèse des oligonucléotides

Les travaux de Zamecnik en 1978^[3] ont révélé l'intérêt des oligonucléotides en tant que nouvelle classe d'agents thérapeutiques appelés les antisens. Il a utilisé un oligodésoxynucléotide complémentaire (d'où l'appellation d'antisens) d'une longue séquence répétée de 13 nucléotides de l'ARN du virus du sarcome de Rous pour inhiber la synthèse des protéines virales *in vitro* et *in vivo* : d(AATGGTAAAATGG). Les ARN viraux sont donc une cible pour les agents antisens. De même l'ADN qui peut conduire à la synthèse de protéines pathogènes *via* un ARNm muté, constituera également une cible pour les oligonucléotides antisens.

Les oligonucléotides synthétiques peuvent aussi cibler des séquences spécifiques de la double hélice d'ADN, ils se fixent alors en formant une triple-hélice locale et inhibent la transcription, c'est la stratégie "triple-hélice" ou "antigène". Ces deux stratégies (antigène et antisens) peuvent par exemple être appliquées à l'inhibition sélective d'oncogènes dans les cellules tumorales, ou toute autre protéine pathogène (figure 8).

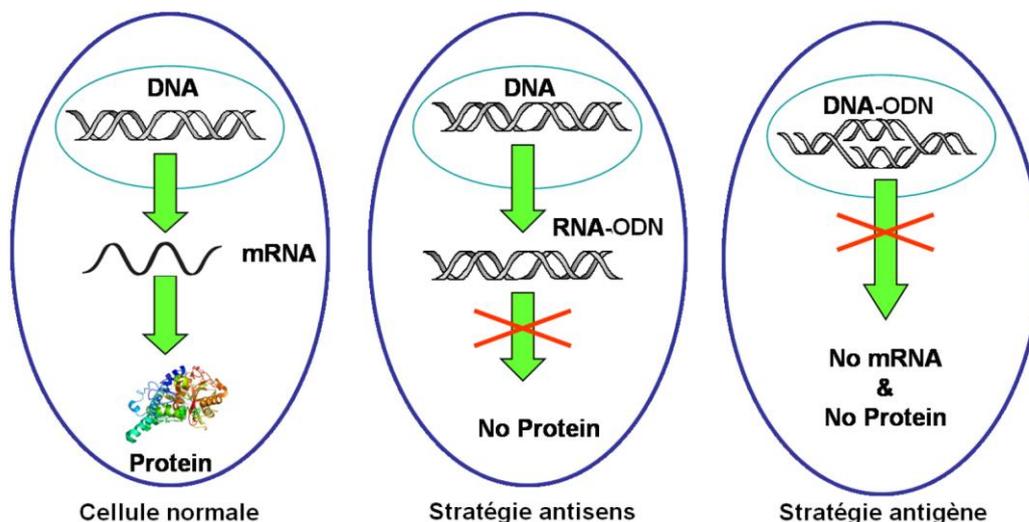


Figure 8 : stratégie antisens et antigène.

Statistiquement, une séquence de 17 paires de bases ne devrait se retrouver qu'une fois sur les 4 milliards de paires de bases de l'ADN d'une cellule humaine, c'est pourquoi un nucléotide de 17 bases devrait suffire pour être spécifique. Il s'est avéré que 13 ou 14 bases suffisaient. Un oligonucléotide antisens est donc un enchainement d'ADN ou d'ARN d'une quinzaine de bases. Il a été montré qu'un antisens d'une vingtaine de bases est très sensible à un mésappariement^[4], c'est à dire que l'antisens peut théoriquement différencier un ARNm normal d'un ARNm muté (même d'un seul acide ribonucléique), il est capable d'être extrêmement spécifique et ne devrait pas perturber les autres gènes. Lors des études de stabilité des duplex ADN modifié/ARNm, la dénaturation du duplex est une des analyses réalisées. C'est un processus qui permet de séparer les deux brins du duplex en rompant les liaisons hydrogène entre les bases azotées. Cette dénaturation est réalisée *in vitro* en soumettant le duplex à des perturbations chimiques ou physiques capables de casser les liaisons hydrogène (modification du pH, de la température ou ajout de solvants par exemple). Cette dénaturation est réversible, ainsi lors du retour lent aux conditions initiales les bases se réappariaient naturellement, on parle alors de renaturation. La dénaturation peut être suivie par spectroscopie d'absorption UV à 260 nm grâce à l'existence d'un effet hyperchrome (augmentation de l'absorption UV) dû au changement d'environnement des bases azotées qui passent d'un état empilé dans le duplex, à un état désordonné, exposé au solvant aqueux dans le simple brin. La dénaturation est souvent provoquée par une augmentation de température et suivie par UV afin de déterminer la température à laquelle 50% des fragments sont sous

forme simple brin, il s'agit de la "Tm" pour "melting temperature" car la dénaturation de l'ADN est aussi appelée fusion de l'ADN (figure 9). Lors des études de stabilité des duplex on donne la variation moyenne de la Tm par modification notée $\Delta Tm = \pm x \text{ } ^\circ\text{C}/\text{mod}$.

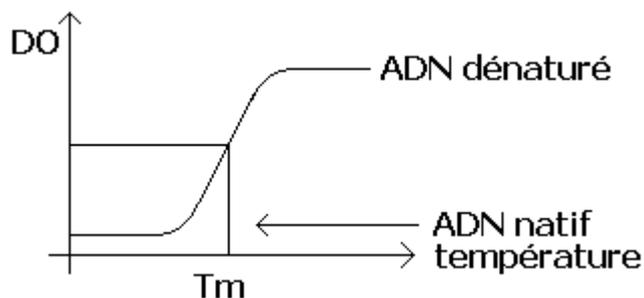


Figure 9 : dénaturation de l'ADN par augmentation de la température, suivi UV, détermination de la Tm (source : fr.wikipedia.org).

Il faut cependant être conscient que seulement 10% d'un ARNm est accessible^[5], aussi le préalable indispensable est d'identifier les sites cibles suffisamment dégagés. Enfin, l'enchaînement CG étant très présent dans l'ADN bactérien, l'introduction de cet enchaînement sur l'oligonucléotide antisens peut stimuler le système immunitaire. Il est donc généralement proscrit des stratégies antisens sauf si le système immunitaire est ciblé, c'est par exemple la stratégie développée par la société pharmaceutique Coley dans ses traitements antisens contre le cancer, l'asthme et les maladies infectieuses^[6]. Parmi les antisens visant l'ARNm de protéine pathogène et actuellement en phase de test, on peut citer l'Aganirsen (un oligonucléotide de 25 unités liées par des fonctions phosphorothioates) pour lequel la société suisse Gene Signal International a annoncé en mai 2014 des résultats positifs à l'issue de la phase III (dernière phase de tests avant l'AMM) dans le cadre d'une maladie rare (la néovascularisation cornéenne). Cet antisens est capable d'inhiber la synthèse de l'IRS-1 (le substrat 1 du récepteur de l'insuline) qui est surexprimé dans l'angiogenèse pathologique^[7], et a montré sa capacité à cibler les vaisseaux pathologiques sans entraver la croissance vasculaire physiologique^[8]. Un autre mode d'action des antisens est le saut d'exons (développé plus loin) et l'AFM-Téléthon soutient actuellement plusieurs tests en phase IIb (phase qui détermine la dose thérapeutique de la molécule sur un groupe de patients plus grand qu'en phase IIa) et en phase III d'oligonucléotides antisens pour le saut de l'exon 45 et de l'exon 53 dans le cadre de la myopathie de Duchenne.

1.2.1 Modes d'action des oligonucléotides antisens.

1.2.1.1 Blocage de la traduction de l'ARNm

Le processus général d'inhibition de l'ARNm par un oligonucléotide antisens rend impossible sa traduction en protéine (figure 10).

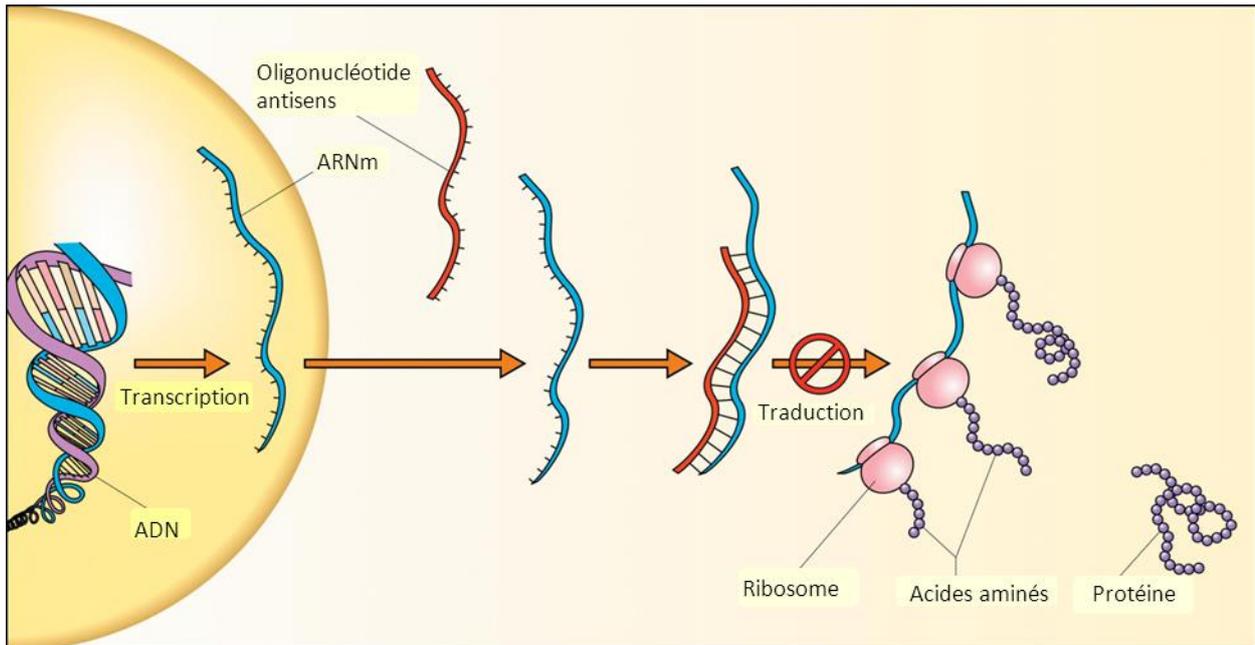


Figure 10 : blocage de la traduction par un oligonucléotide antisens (source : fr.wikipedia.org).

Plus précisément, l'oligonucléotide antisens inhibe la traduction selon différents modes d'action (figure 11).

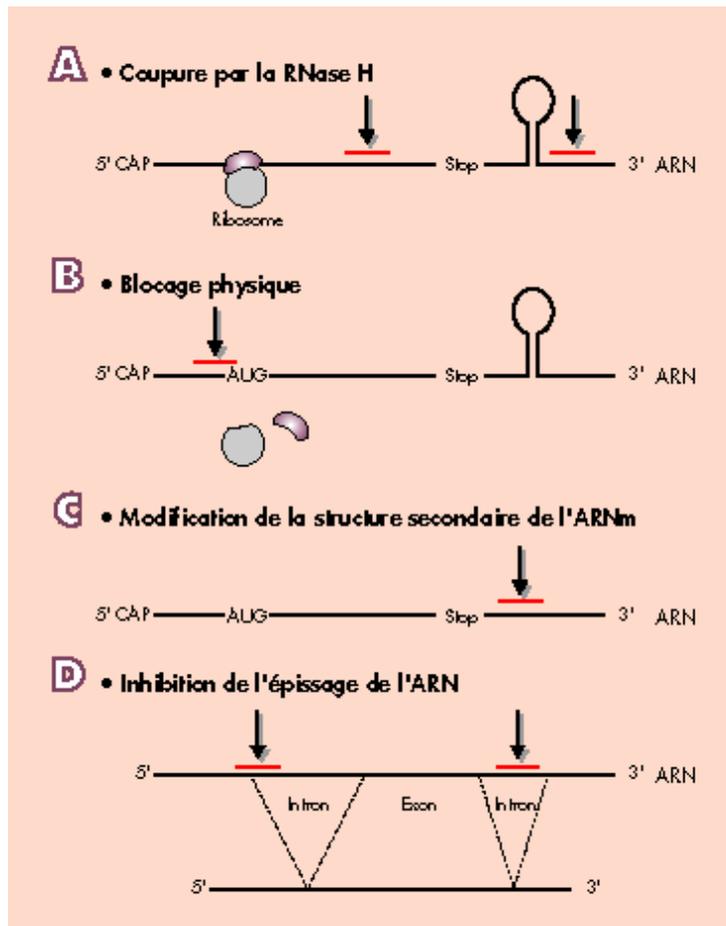


Figure 11 : différents modes d'action d'inhibition de l'ARNm par un oligonucléotide antisens.

L'oligonucléotide antisens peut conduire à la dégradation de l'ARNm en formant avec lui un duplex ADN/ARN reconnu par les RNases-H (pour RiboNucléases - Hybride) qui vont couper l'ARNm mais laisser l'antisens indemne (figure 11, partie A). Il peut aussi se fixer dans la région située entre la coiffe (CAP) et le codon d'initiation (AUG) ou sur l'AUG et ainsi inhiber la traduction par un blocage physique en empêchant l'assemblage de la machinerie de traduction (figure 11, partie B). La fixation d'un oligonucléotide sur l'ARNm peut modifier la structure secondaire de cet ARNm et le rendre accessible aux ribonucléases, ce qui diminue son temps de vie (figure 11, partie C). Enfin, les oligonucléotides antisens dirigés contre des jonctions intron-exon ou contre certaines séquences importantes pour l'épissage situées au cœur des introns sont susceptibles d'inhiber l'épissage de l'ARN empêchant la synthèse de l'ARNm mature et donc la synthèse de la protéine (figure 11, partie D).

Une nouvelle classe d'oligonucléotides de synthèse, les siARN (pour petits ARN interférents), inspirée du processus naturel des ARN interférents (ARNi) est également impliquée dans

l'inhibition de l'ARNm menant à des protéines pathogènes (figure 12), on parle aussi de mise sous silence de gènes pathogènes.

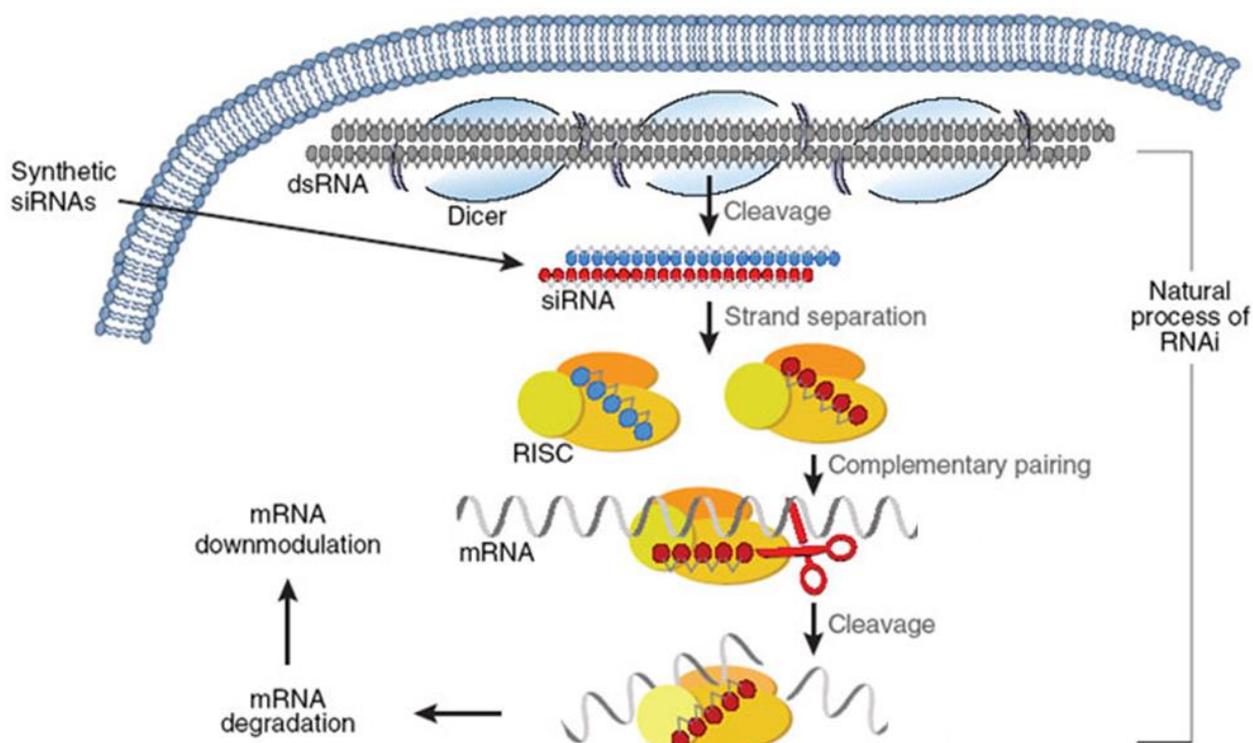


Figure 12 : Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence (source : *Nature Chemical Biology* 2, (2006), 711 - 719).

Le terme d'ARN interférent (ARNi) désigne les siARN (petits ARN interférents) et les miARN (micro ARN), deux types d'ARN non codants. Les siARN proviennent d'un long ARN (200 à 500 bp) double brin exogène (souvent d'origine virale) qui est coupé dans la cellule par une endonucléase RNase III (Dicer) en petits ARN de 21 à 23 nucléotides, les siARN. Les miARN proviennent d'un pré-miARN simple brin, endogène (d'environ 70 bp), replié en boucle qui est également coupé par Dicer. Les petits ARN s'associent ensuite à la protéine Argonaute au sein du complexe protéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui sépare les doubles brins, élimine le brin sens (aussi appelé brin passager) et conserve le brin antisens (brin guide) qui conduit l'ensemble vers la séquence d'ARNm correspondante. La nucléase Argonaute du complexe RISC possède un domaine type RNase-H capable de reconnaître et dégrader l'ARNm une fois qu'il est hybridé au siARN (figure 12). Le complexe RISC, toujours lié au brin antisens, peut aller couper un autre brin d'ARNm, c'est pourquoi ce mécanisme est dit catalytique^[9].

Les principaux modes d'action agissant sur la traduction de l'ARNm sont résumés sur la figure 13.

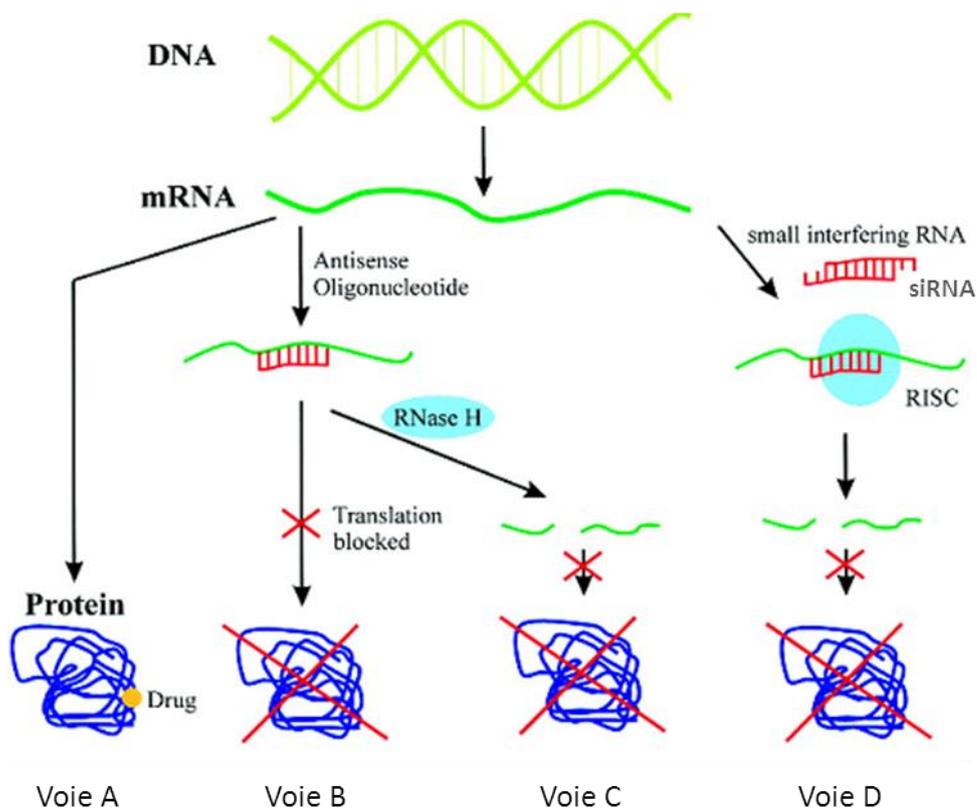


Figure 13 : Principaux modes d'action de blocage de protéines pathogènes (source : National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

L'utilisation d'un principe actif classique a pour objectif de modifier la réponse biologique en se liant à la protéine cible (voie A). Les autres voies ont pour ambition d'inhiber la production de la protéine pathogène. Les oligonucléotides antisens résistants aux RNases-H s'hybrident à l'ARNm cible et inhibent ainsi sa traduction (voie B) et les antisens sensibles aux RNases-H s'hybrident aussi à l'ARNm qui sera dégradé par les RNases-H du fait de son statut d'ARN hybridé (voie C). Les siARN s'hybrident à l'ARNm cible par leur brin antisens ce qui a pour conséquence de dégrader l'ARNm (voie D) comme détaillé précédemment.

1.2.1.2 Restauration de la traduction de l'ARNm

Les oligonucléotides antisens ne sont pas uniquement destinés à bloquer la synthèse d'une protéine, ils peuvent au contraire restaurer la synthèse d'une protéine qui, à cause d'une

mutation du gène, ne se fait pas correctement. En effet, de nombreuses mutations responsables de maladies génétiques sont à l'origine d'un épissage anormal du pré-ARNm. C'est le cas notamment pour la β -thalassémie et la mucoviscidose, il en résulte la production d'un ARNm anormalement épissé, ayant conservé une séquence intronique ou perdu une séquence exonique, et dont la traduction génère une protéine non fonctionnelle. L'oligonucléotide antisens se fixe au niveau de la mutation ce qui rend le site d'épissage invisible pour la machinerie.

Les antisens peuvent aussi être appliqués au "saut d'exons" dans le cas de maladies génétiques provoquées par une mutation qui interrompt le cadre de lecture sur l'ARNm, conduisant alors à une protéine tronquée non fonctionnelle. Apparié sur le pré-ARNm, à l'exon portant le codon STOP, un oligonucléotide antisens va forcer la machinerie d'épissage à exciser cette séquence qui sera considérée comme un intron et éliminée. L'ARNm ainsi obtenu est plus court mais lisible par le ribosome qui va synthétiser une protéine certes tronquée mais qui peut être opérationnelle. Dans le cas de la myopathie de Duchenne (ou Dystrophie Musculaire de Duchenne, DMD) il en résulte la synthèse d'une protéine différente de la dystrophine naturelle mais fonctionnelle.

La traduction peut également être interrompue *via* les miARN dont les rôles biologiques ne sont pas encore très clairs, mais qui réguleraient la traduction d'environ 30% des ARNm en régulation négative (dégradation et séquestration des transcrits, suppression traductionnelle) ou en régulation positive (activation transcriptionnelle et traductionnelle). Vu qu'ils affectent la régulation de l'expression des gènes, on peut penser que les miARN interviennent dans la plupart des processus biologiques. Ils sont d'ailleurs impliqués dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies métaboliques ou encore les infections virales. Ainsi, en 2013 Mendell a montré que les miARN miR-143 et miR-145 seraient directement impliqués dans le développement des cancers colorectaux^[10], Szabo et Bala ont mis en évidence le rôle du miR-122 dans diverses pathologies du foie^[11] et en 2014, Flemming^[12] a montré que la surexpression du miARN miR-25 était impliquée dans l'insuffisance cardiaque. Le nombre de miARN identifiés ne cesse de croître ainsi que leurs multiples implications et sont même répertoriés en base de données (Human microRNA Disease Database : HMDD).

De fait, ils sont devenus une nouvelle cible thérapeutique^[13] pour les oligonucléotides antisens, qui se comporteront avec des miARN cibles (simples brins d'ARN cellulaire) comme avec des ARNm cibles (simples brins d'ARN cellulaire) : soit en provoquant leur dégradation (antisens induisant une coupure par les RNases-H) soit en les bloquant (antisens n'activant pas les RNases-H).

Quelle que soit l'application thérapeutique de l'antisens, les oligonucléotides de synthèse non modifiés et seuls sont dégradés très rapidement dans le milieu physiologique (hydrolysés par les nucléases) et doivent donc être vectorisés et/ou modifiés chimiquement afin d'augmenter leur stabilité vis à vis des nucléases (surtout les 3'-exonucléases) et diminuer leur caractère ionique, tout en maintenant leur affinité et leur spécificité pour l'ARN messenger cible^[14]. Ainsi le PMOE23 (figure 14), un antisens de 25 bases, utilisé en saut d'exons dans la DMD et visant la jonction e23i23 (exon23-intron23), se trouve être beaucoup plus efficace lorsqu'il est conjugué à un CPP (cell-penetrating peptide)^[15], il s'appelle alors le PPMO23. Les CPP sont des petits peptides (moins de 35 acides aminés) et sont utilisés en tant que vecteurs depuis une dizaine d'années pour leurs qualités améliorant le transport cellulaire (solubilité dans l'eau et charge positive à pH physiologique).

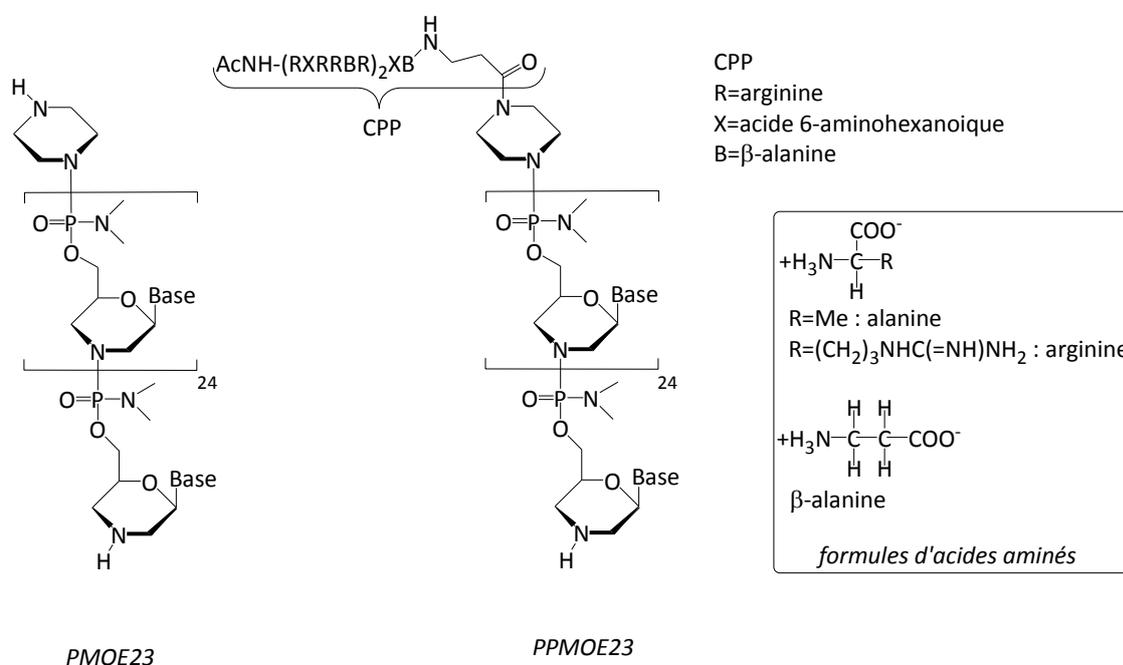


Figure 14 : structure d'un PMO et d'un PPMO (PMO conjugué avec un CPP).

Les PMO ne sont pas toxiques et ont montré leur capacité à restaurer la synthèse de dystrophine^[16] chez la souris et chez les patients. Cependant les PMO n'atteignent pas le muscle cardiaque et nécessitent des injections fréquentes de doses élevées à cause de leur mauvaise pénétration cellulaire et leur rapide élimination par les reins. La vectorisation par un CPP permet au PPMO d'être plus présent dans les cellules et même d'atteindre les cellules du muscle cardiaque, et ce à des doses plus faibles^[15].

Un autre type de vecteur (vecteur viral) a été utilisé pour l'antisens U7-SD23/BP22 également utilisé contre la myopathie de Duchenne et en 2013, Le Hir^[17] a montré l'efficacité du virus adéno-associé (AAV) en tant que vecteur de cet antisens qui lui permet de rester présent et efficace quelques semaines dans les fibres musculaires traitées d'une souris modèle.

Concernant des modifications chimiques, l'oligonucléotide antisens peut comporter quelques unités modifiées au cœur de la chaîne ou aux extrémités soit tout le long de la chaîne. Ces modifications chimiques peuvent porter sur les trois composantes d'un nucléotide : la base, le sucre et le lien phosphodiester. Les modifications de la base telles que l'ajout de substituants ou la synthèse de dérivés C-nucléosidiques sont certes très étudiées en synthèse de nucléosides modifiés en tant qu'agents thérapeutiques^[18], mais assez peu en tant qu'unités modifiées intégrant un oligonucléotide antisens. En effet, la stabilité de ces oligonucléotides antisens, leur capacité à s'apparier et leur éventuelle toxicité ne sont pas bien connues *in vivo*^[19]. La modification du sucre et du lien sont les pistes les plus explorées en stratégie des oligonucléotides antisens.

1.2.2 Modifications chimiques des oligonucléotides antisens

Les modifications les plus courantes du sucre et/ou du lien rendant l'oligonucléotide antisens plus résistant aux nucléases ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentées ici.

1.2.2.1 Modifications du sucre

Pour les stratégies où l'ARNm ne doit pas être détruit, l'oligonucléotide antisens devra former un duplex non reconnu par les RNases-H. Les modifications chimiques, qui confèrent au duplex ARNm/ADN antisens une forme hélice A, le protègent de l'attaque par les RNases-H tout comme les duplex ARNm/ARN antisens.

On sait que l'ARN double brin adopte préférentiellement une forme hélice A car le sucre étant substitué en position 2' il adopte une conformation Nord. Ainsi il a été montré que les oligonucléotides antisens 2'-O-méthyle (AS-OMe, tableau 1) ou 2'-O-méthoxyéthyle (AS-MOE, tableau 1) n'induisent pas la coupure de l'ARNm par les RNases-H^[20]. Ces antisens, dits de deuxième génération (parce qu'ils ont été synthétisés après les antisens phosphorothioates (tableau 1), dits de première génération), sont moins toxiques et ont une meilleure affinité avec l'ARN complémentaire^[21]. Ils ont été utilisés *in vivo* pour la première fois en 1996 pour corriger l'épissage d'un pré-ARNm muté de la β -globine^[22] dans le cadre du traitement de la β -thalassémie.

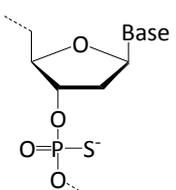
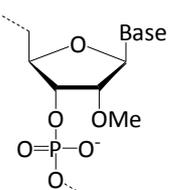
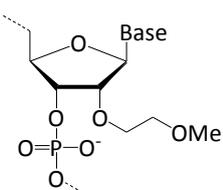
	Antisens de 1 ^{ère} génération	Antisens de 2 ^{ème} génération : 2'-O-alkyl ARN	
Structures et noms	 <p>lien phosphorothioate d'ADN AS(-PS) 1960</p>	 <p>2'-O-méthyl ARN AS(-OMe)</p>	 <p>2'-O-méthoxy-éthyl ARN AS(-MOE)</p>
Caractéristiques, modes d'action	Affinité inchangée, Spécificité médiocre, Activation RNase-H, Toxiques	Affinité légèrement accrue, Modulation épissage	
			Blocage stérique

Tableau 1 : antisens de 1^{ère} et 2^{ème} génération.

D'autres modifications du sucre peuvent lui conférer une conformation Nord et donner ainsi au duplex une forme d'hélice A, résistante aux RNases-H. Le concept de restriction conformationnelle a été largement utilisé pour augmenter la force de l'appariement^[23] et des études montrent que l'antisens d'ADN contenant un ou plusieurs nucléosides contraints comme les δ -bicyclonucléosides (pont éthane entre le C2' et C4') forment un duplex plus stable avec l'ARN que l'antisens d'ADN non modifié (en moyenne $\Delta T_m = +3$ °C/mod) et moins stable

avec l'ADN [24],[25],[26],[27] (en moyenne $\Delta T_m = -2$ °C/mod). C'est aussi le cas des LNA (pour Locked Nucleic Acid, tableau 2) qui ont été synthétisés en 1998 par les équipes de Wengel^[28] et Imanishi^[29] et comme attendu l'introduction de ces composés dans un oligonucléotide antisens induit un changement de conformation du duplex ARN/antisens vers une hélice de type A^[30]. Les LNA sont résistants aux nucléases, spécifiques et synthétiquement très accessibles, ce qui n'est pas le cas pour la plupart des bicyclonucléosides^[23]. Les LNA sont surtout remarquables pour leur affinité exceptionnelle avec l'ARNm cible ($\Delta T_m = +9,6$ °C/mod)^[30].

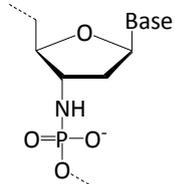
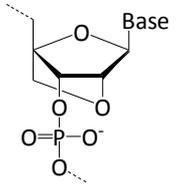
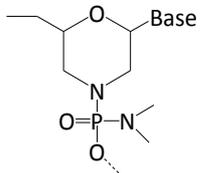
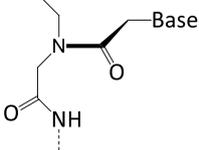
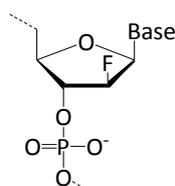
Antisens de 3 ^{ème} génération			
 <p>N3'-P5'phosphoramidate AS(-NP)</p>	 <p>β-D-ribo-Locked Nucleic Acid AS(-LNA)</p>	 <p>Morpholino Phosphorodiamidate AS(-PMO)</p>	 <p>Peptidic Nucleic Acid AS(-PNA)</p>
Fortes affinité et spécificité, Blocage stérique	Très forte affinité, non toxique	Affinité inchangée, faible spécificité, Molécule neutre, Blocage stérique, Epissage, Saut d'exon	Affinité et sélectivité fortes, Blocage stérique, Modulation épissage, Molécule neutre, Peu soluble

Tableau 2 : antisens de 3^{ème} génération.

A l'inverse, la famille des antisens FANA (2'-désoxy-2'-Fluoro- β -Arabino Nucléique Acide) dont le sucre est substitué en C2' par un fluor, est capable d'activer la RNase-H et a une bonne affinité pour l'ARN cible^[31].



2'-désoxy-2'-Fluoro-Arabino Nucléique Acide AS(-FANA)

1.2.2.2 Modifications du lien

Les oligonucléotides dits de première génération sont les phosphorothioates (PS, tableau 1) et sont les seuls liens modifiés qui permettent la dégradation de l'ARN par la RNase-H. Leur première synthèse a été réalisée en 1969 par l'équipe de De Clercq^[32], c'est une synthèse aisée ce qui est un atout important. Leur résistance vis à vis des nucléases est améliorée par rapport aux oligonucléotides phosphodiester et leur temps de demi-vie dans le sérum humain passe de 1 heure à 9-10 heures^{[33],[34],[35]}. Ce bon résultat est tout de même à pondérer car ces composés ont tendance à se lier *via* leur lien ionique aux protéines plasmatiques ce qui peut prolonger leur temps de présence dans le milieu. Ces composés étant capables d'interactions non spécifiques, les effets secondaires associés à une toxicité sont à déplorer^{[36],[37]}. Un autre inconvénient est la faible affinité pour la cible par rapport à l'ADN non modifié. En effet la T_m est inférieure de 0,5 °C par modification comparée à la T_m du duplex ARN-ADN non modifié ($\Delta T_m = -0,5$ °C/mod)^[38]. La première application de ce type d'antisens date de 1987^[39] et a consisté à inhiber le VIH. En 1998, un premier oligonucléotide antisens (PS), le Fomivirsén ISIS 2922, a obtenu l'AMM sous le nom commercial de Vitravene® pour le traitement des rétinites induites par le cytomegalovirus (CMV) par injection dans l'oeil^[40]. Actuellement, la société Gene Signal International attend l'AMM pour l'Aganirsén (sous forme d'un collyre), un oligonucléotide antisens (PS) qui traiterait la néovascularisation cornéenne.

Egalement dans les années 90, De Mesmaeker^[41] a montré qu'un lien amide entre deux unités désoxyribonucléosidiques permettait d'augmenter la stabilité des antisens vis à vis des nucléases. Un oligonucléotide qui alterne lien phosphodiester - lien amide est résistant aux nucléases (notamment 3'-exonucléases). En effet, le lien amide est résistant mais il protège également les liens phosphodiester voisins de l'attaque des 3'-exonucléases^[42]. Les oligonucléotides contenant les modifications amide-3 et -4 (figure 15) montrent les mêmes affinités et spécificités que les dérivés phosphates correspondants pour les ARN complémentaires mais ne sont pas reconnus par les RNases-H.

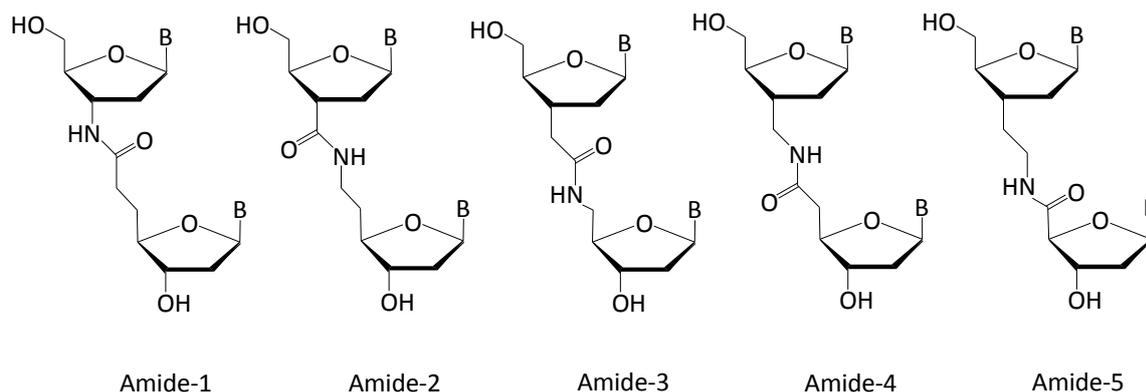


Figure 15 : dimères nucléosidiques avec liens amides.

De plus, l'incorporation dans un oligonucléotide antisens de liens amides secondaires (car le NH est important pour stabiliser le système *via* des liaisons hydrogène avec l'eau) et le fait d'avoir une restriction de rotation située au milieu du lien (amide-3 ou amide-4) a montré son efficacité^[43]. En effet, ce lien amide-3 (ou amide-4) présente la rigidité nécessaire pour que l'oligonucléotide ainsi modifié se pré-organise en vue de la formation d'un duplex ARN/antisens stable mais sans être trop contraint et donc trop rigide ce qui l'empêcherait d'adopter une conformation adéquate comme par exemple les liens urée ou carbamate^[44]. Selon une étude de modélisation réalisée par les auteurs^[43], un enchainement de dimères nucléosidiques de ce type liés entre eux par des liens phosphodiester classiques est plus enclin à adopter la forme d'une hélice A. Il n'est donc pas surprenant que ce type d'oligonucléotide antisens ait montré plus d'affinité pour l'ARN que son analogue non modifié avec une T_m supérieure de 0,6 °C par modification ($\Delta T_m = +0,6$ °C/mod) et moins d'affinité pour l'ADN ($\Delta T_m = -0,4$ °C/mod)^[45]. Ces modifications ont l'avantage d'être neutres, en effet, la diminution de la charge globale de l'oligonucléotide modifié est importante pour plusieurs aspects. Ceci permet de faciliter la pénétration à travers la membrane cellulaire (chargée négativement)^[43], de limiter les effets secondaires en évitant les interactions non spécifiques (avec les protéines plasmatiques par exemple) et donc de contribuer à la spécificité de l'antisens (liée également à son affinité pour la cible ARN et à sa longueur de chaîne qui doit se situer aux environs de 20 unités^[4]). Toutes ces considérations indiquent que le remplacement du lien phosphodiester par un lien amide-3 (ou amide-4) est un gage de réussite en stratégie antisens.

Cette modification est également applicable en série non désoxygénée puisque récemment, Rozners et son groupe^[46] ont montré qu'un dimère ribonucléosidique U-A avec un lien de type

amide-3 (noté U*A) incorporé dans une séquence d'ARN conduisait à d'excellentes propriétés en terme d'hybridation dans des duplexes ARN-ARN et n'avait quasiment pas d'effet sur la conformation de forme A du duplex, sur la stabilité thermique et sur l'hydratation des duplex. Les auteurs ont conclu que le lien amide était un mime parfait du lien phosphodiester. Ceci constitue un résultat très important concernant les analogues non-ioniques de lien phosphodiester dans des duplex ARN-ARN et positionne ce type d'antisens comme agent thérapeutique de choix de type siARN ou en stratégie saut d'exons puisqu'un duplex ARN-ARNm est résistant aux RNases-H.

Une autre modification du lien a montré son efficacité et sa spécificité, cette fois en tant que bloqueur stérique de la traduction, il s'agit du lien phosphoramidate (NP, tableau 2) mais il n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études^[47].

1.2.2.3 Modifications du sucre et du lien

La famille des morpholinos possède également un lien phosphoramidate (comme les AS-NP) mais il est non ionique (phosphorodiamidate) et le sucre est remplacé par une morpholine, on les nomme PMO pour Phosphorodiamidate Morpholino Oligomères (tableau 2). Cette famille a été décrite en 1997 par Summerton^[48] et possède une affinité pour sa cible comparable à celle d'un antisens d'ADN non modifié. Elle résiste aux nucléases et présente l'avantage d'être neutre. Ces oligonucléotides antisens ont montré leur efficacité dans le traitement *ex-vivo* de cellules de patients atteints de β -thalassémie en restaurant un épissage correct^[49] mais certaines études soulèvent un problème de manque de spécificité^[50]. Comme nous l'avons vu précédemment à propos de la myopathie de Duchenne, ces antisens peuvent être utilisés en stratégie antisens à condition d'être vectorisés, la modification chimique ne suffit pas.

Les Peptidic Nucleic Acid (PNA, tableau 2) décrits en 1991 par Nielsen^[51] sont très différents, ils possèdent un lien amide et ne possèdent pas de sucre. Ils ciblent la région codante de l'ARNm et ont montré qu'ils peuvent en inhiber la traduction *in vitro*^[52] et *in cellulo*^[53]. Le PNA forme un triplex PNA2/ARN dont un des modes d'action est de bloquer stériquement le ribosome ce qui engendre l'interruption de la traduction. Ce complexe fait intervenir des liaisons de type Watson-Crick (figure 3) entre un PNA et le brin d'ADN qui lui est

complémentaire puis un second PNA se fixe sur ce duplex par des liaisons de type Hoogsteen. Ce type d'hybridation implique une autre face des purines d'où des liaisons hydrogène sur le NH₂ et le N7 de l'adénine et le CO et le N7 de la guanine (liaisons de Hoogsteen). Les PNA, qui n'activent pas les RNases-H, peuvent également moduler l'épissage et donc relancer la traduction de l'ARNm.

1.2.3 Antisens "gapmers" et siARN

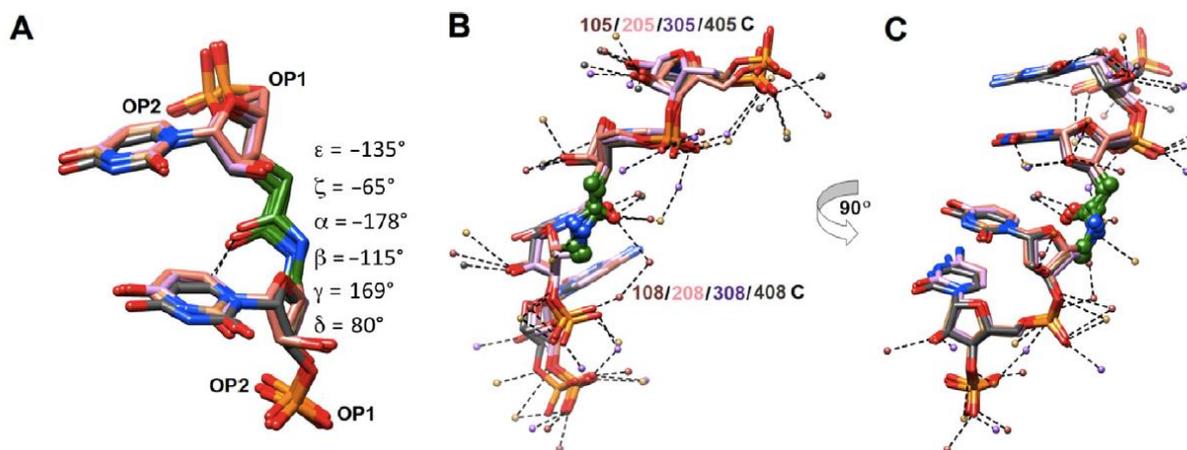
Comme nous venons de le voir, la plupart des modifications chimiques des oligonucléotides antisens entraînent une non-reconnaissance du duplex par les RNases-H (sauf AS-PS et AS-FANA). La stratégie visant à détruire l'ARNm est alors impossible avec ce type de composés.

Une solution pour que l'antisens modifié soit reconnu par les RNases-H réside dans une nouvelle catégorie d'oligonucléotides antisens appelés "gapmer" pour lesquels on distingue deux zones que sont les extrémités modifiées d'une part et un segment central de nucléotides ADN. En effet lorsque le segment central dépasse la longueur de 7 à 8 nucléotides^[35], le gapmer peut activer la RNase-H tout en bénéficiant des avantages apportés par les extrémités modifiées (résistance aux nucléases, affinité pour la cible, etc). Des tests *in vivo* d'oligonucléotides chimériques LNA-ADN ont montré l'efficacité de ces antisens^[35], la forte affinité des LNA accélérant la coupure par la RNase-H. Ils sont également très stables^[54], présentent une toxicité minimale^{[54],[55]} et des essais cliniques dans le domaine du cancer sont en cours^[56].

Une autre solution très prometteuse repose sur les petits ARN interférents de synthèse : siARN. Il ne s'agit plus d'une modification chimique d'un ADN antisens, il s'agit de modifier chimiquement un double brin d'ARN pour qu'il puisse utiliser la machinerie cellulaire d'interférence. Comme nous l'avons vu précédemment, les siARN de synthèse sont pris en charge par le complexe RISC (comme les miARN cellulaires) et détruisent l'ARNm pathogène grâce à la nucléase Argonaute qui dégrade l'ARNm une fois qu'il est hybridé au siARN complémentaire (brin guide, brin antisens). Ces duplex ARNs/ARNs sont résistants aux RNases-H cellulaires et aux endonucléases pour peu que l'on modifie leurs liens sur tout ou partie de leur enchainement. Concernant leurs modifications chimiques, il a été montré en 2012 que l'incorporation d'un PNA lié à une uridine par un lien amide et positionné à l'extrémité 3' du

brin passager est bien tolérée^[57] mais malheureusement si cette modification est au cœur du brin guide, elle fait baisser l'activité d'ARNi (mise en silence des gènes).

Très récemment, en mai 2014, Rozners^[58] a complété son étude précédente^[46] par des travaux sur l'activité en tant qu'ARN interférents de siARN de synthèse contenant entre un et huit dimères ribonucléosidiques avec un lien amide U*U ou U*A ainsi que par une étude de diffraction des rayons X de duplex cristallisés contenant un dimère U*U au cœur de la chaîne (figure 16). Il a montré que les liens amides du siARN, y compris positionnés au cœur de la chaîne nucléosidique, sont parfaitement acceptés par le système, à la fois sur le brin guide et sur le brin passager et que l'activité de mise sous silence des gènes peut même être augmentée. Quant à la structure R-X, elle a permis de confirmer la forme A adoptée par l'hélice. Elle a montré que le C=O pointe vers le grand sillon et adopte une orientation similaire au P=O du lien phosphodiester. Enfin les liens amides sont bien hydratés, l'eau fait des liaisons avec le carbonyle et aussi avec les oxygènes libres des phosphates adjacents. Ceci souligne encore une fois que le lien amide, reste une modification de choix dans les petits ARN de synthèse.



Partie (A) : Conformation du groupement amide. L'image représente une superposition de 4 liens amides indépendants avec les valeurs moyennes des angles. Les carbones de ces brins sont respectivement en beige, rose, violet et gris.

Parties (B) et (C) : respectivement, hydratation du grand et du petit sillon dans la position centrale du duplex (là où se trouve le dimère modifié U*U). Les petites sphères de couleurs représentent les molécules d'eau hydratant chacun des 4 brins (correspondance des couleurs), les liens amides (grosses sphères vertes, bleues et rouges) sont mis en évidence et les liaisons hydrogène sont en pointillés.

*Figure 16 : étude de diffraction des rayons X de duplex cristallisés contenant un dimère U*U au cœur de la chaîne.*

1.3 Voies de synthèse de dimères nucléosidiques avec un lien amide

L'obtention de dimères nucléosidiques avec un lien amide représente un défi synthétique par rapport à d'autres modifications chimiques apportées aux oligonucléotides antisens, mais comme nous l'avons vu précédemment ce lien possède toutes les qualités requises pour les stratégies antisens et siARN.

Ce défi synthétique a été relevé pour la première fois dans les années 90 par De Mesmaeker et son équipe ^{[41],[45]} et devant l'intérêt toujours croissant pour les oligonucléotides antisens et désormais très vif pour les petits ARNs, de nouvelles voies d'accès continuent d'être étudiées. Après avoir présenté les synthèses figurant à ce jour dans la littérature nous présenterons notre nouveau concept qui a fait l'objet de ce travail de thèse.

1.3.1 Premières synthèses de dimères désoxyribonucléosidiques ayant un lien amide par De Mesmaeker et son équipe

Au début des années 90, De Mesmaeker et son équipe ^{[41],[42],[45]} a mis au point les synthèses des différentes combinaisons de dimères désoxyribonucléosidiques ayant un lien amide. Un des exemples est présenté sur le schéma 1, il s'agit de la synthèse du dimère A*G qui s'est déroulé avec de bons, voire de très bons, rendements à chaque étape à partir de nucléosides sélectionnés.

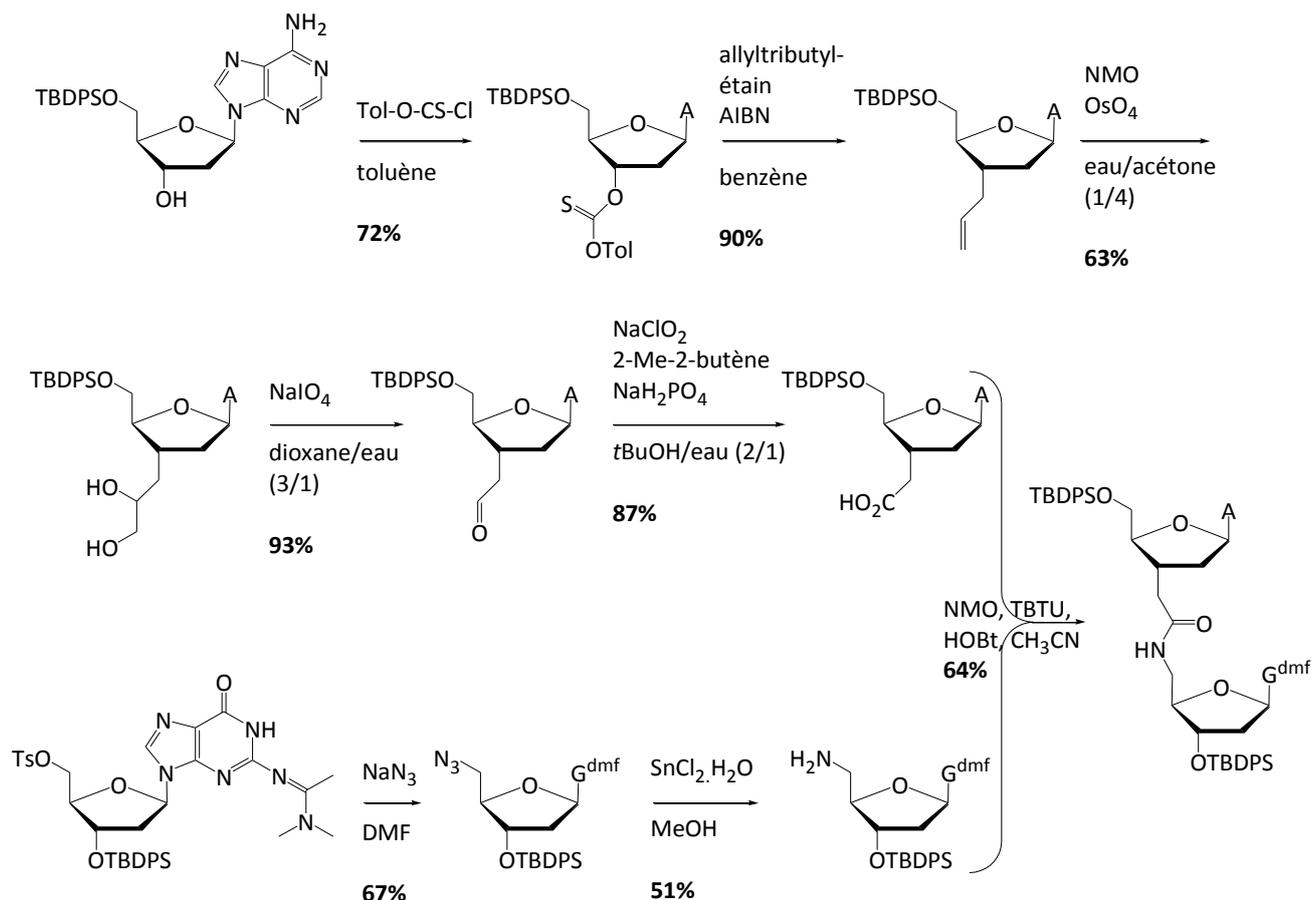


Schéma 1 : premières synthèses de dimère désoxyribonucléosidiques avec un lien amide.

Ces synthèses ambitieuses sont assez longues et se déroulent avec plus ou moins de succès selon le nucléoside. Les modifications de la position 5' du nucléoside commercial mènent au dérivé amine primaire selon une séquence assez classique qui se déroule très bien sur la (*N*-(méthylpyrrolidine)formamidine)cytidine (74% pour les 2 étapes du schéma 1) et avec des rendements plus modestes de 34% pour la (*N,N*-diméthylformamidine)guanosine. Les modifications de la position 3' nécessitent plus d'étapes parfois plus délicates. En effet, selon le nucléoside choisi, la réaction radicalaire offre des rendements voisins de 50% seulement si la base est la cytosine ou la guanine, et l'étape de coupure oxydante du groupement allyle n'est pas toujours très performante (35% de rendement sur le dérivé guanosine). Les groupements silylés sont pour leur part coupés avec TBAF/AcOH dans le THF avec succès. Ces voies de synthèses innovantes ont permis l'accès à toutes les combinaisons possible de dimères désoxyribonucléosidiques (soit 16 combinaisons) avec un lien amide et font référence encore aujourd'hui^[58] car elles demeurent efficaces.

1.3.2 Synthèses de dimères ribonucléosidiques ou de précurseurs de dimères ribonucléosidiques avec un lien amide-3

1.3.2.1 Synthèses ayant un nucléoside comme produit de départ

Quelques années plus tard, von Matt^[59] a publié la synthèse d'un intermédiaire avancé en série ARN qui pourrait être utilisé comme précurseur de dimères avec un lien amide ou pour l'élongation directe sur support solide (schéma 6).

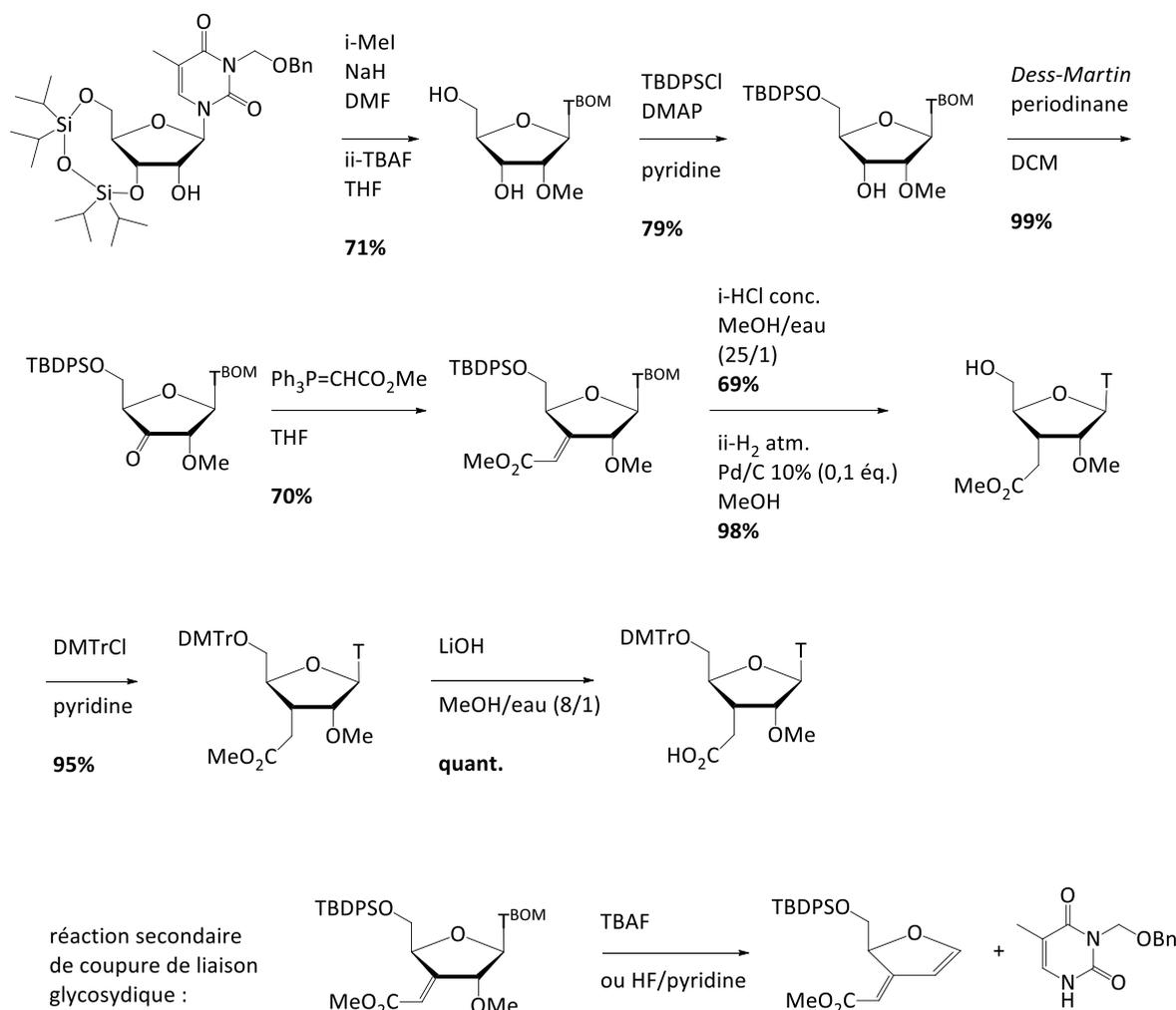


Schéma 2 : synthèse d'un ribonucléoside intermédiaire.

Selon l'auteur, l'allylation radicalaire en C-3' en présence d'un OMe en 2' serait à proscrire en raison de problèmes de sélectivité (α/β : 4/1) observés par l'auteur et De Mesmaker lors d'une étude non publiée mais citée dans cet article. L'oléfine en position 3' a donc été introduite par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons *via* l'intermédiaire cétonique. La désilylation avec

du TBAF ou HF/pyridine a systématiquement produit deux réactions secondaires, à savoir l'isomérisation de la double liaison et la coupure de la liaison nucléosidique (schéma 2). La solution réside dans l'emploi de TBAF/AcOH (1/1) ou d'HCl concentré à chaud. Le synthon acide carboxylique a été obtenu en 11 étapes à partir de la méthyluracyle avec un rendement global de 25% pour les 9 dernières étapes.

L'équipe de M. J. Robins a proposé les synthèses de différents dimères ribonucléosidiques^[60] pour lesquelles la préparation du synthon acide carboxylique se fait également *via* une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons. La synthèse d'un dimère U*U est présentée sur le schéma 3.

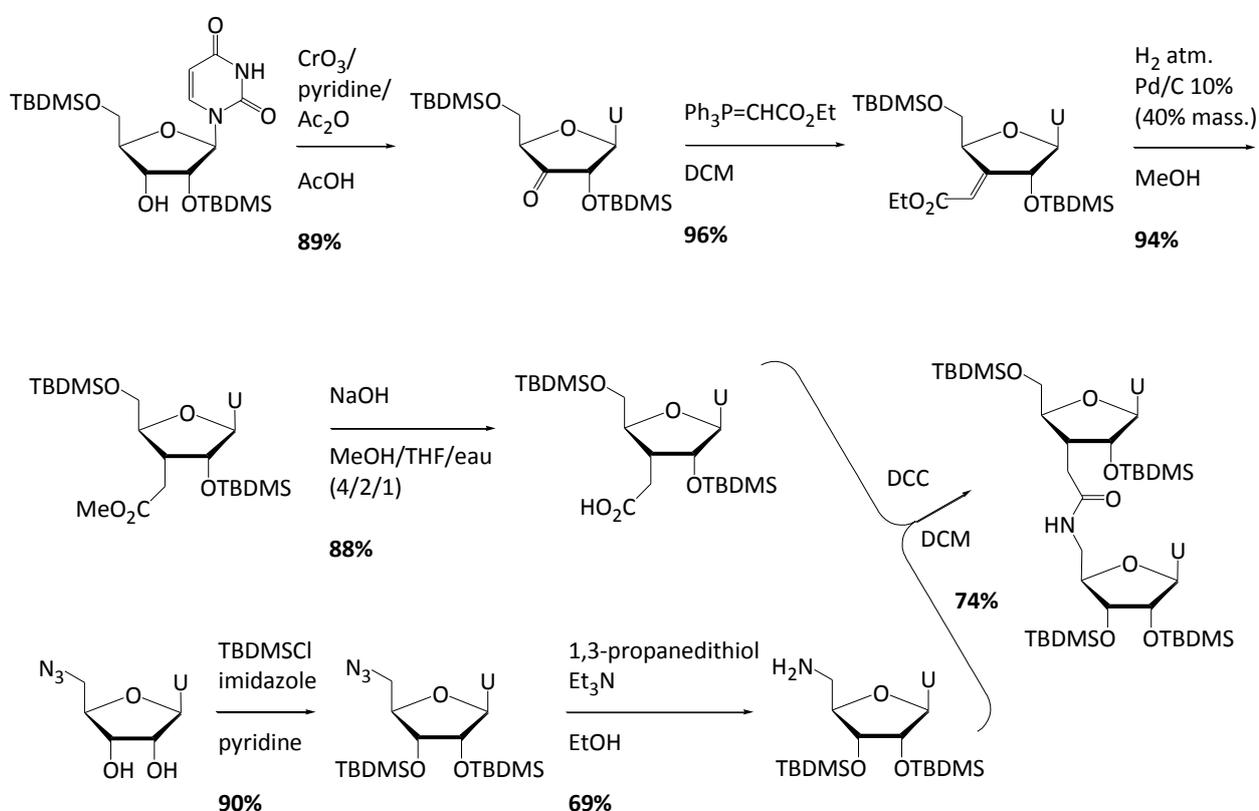


Schéma 3 : synthèse du dimère U*U en série ARN par M. J. Robins.

Le précurseur amine a été obtenu en 2 étapes et 62% de rendement à partir de l'azoture (synthétisé en 1 étape selon le protocole de Hata^[61] qui, lui, obtient 92% de rendement). Le précurseur acide carboxylique a été obtenu en 4 étapes et 70% de rendement à partir de l'uridine 2',5'-O-silylée (isolée généralement avec un rendement de 60% d'un mélange de produits diversement silylés^{[62],[63]}). Le dimère amidique protégé a finalement été obtenu suite à un couplage classique en présence de DCC avec 74% de rendement.

En 2003, l'équipe de Rozners^[64] a pour sa part utilisé avec succès l'allylation radicalaire en C-3' suivie d'une coupure oxydante de l'oléfine (schéma 4) comme précédemment décrit par De Mesmaeker^[45] lors de ses synthèses de dimères désoxyribonucléosidiques avec un lien amide.

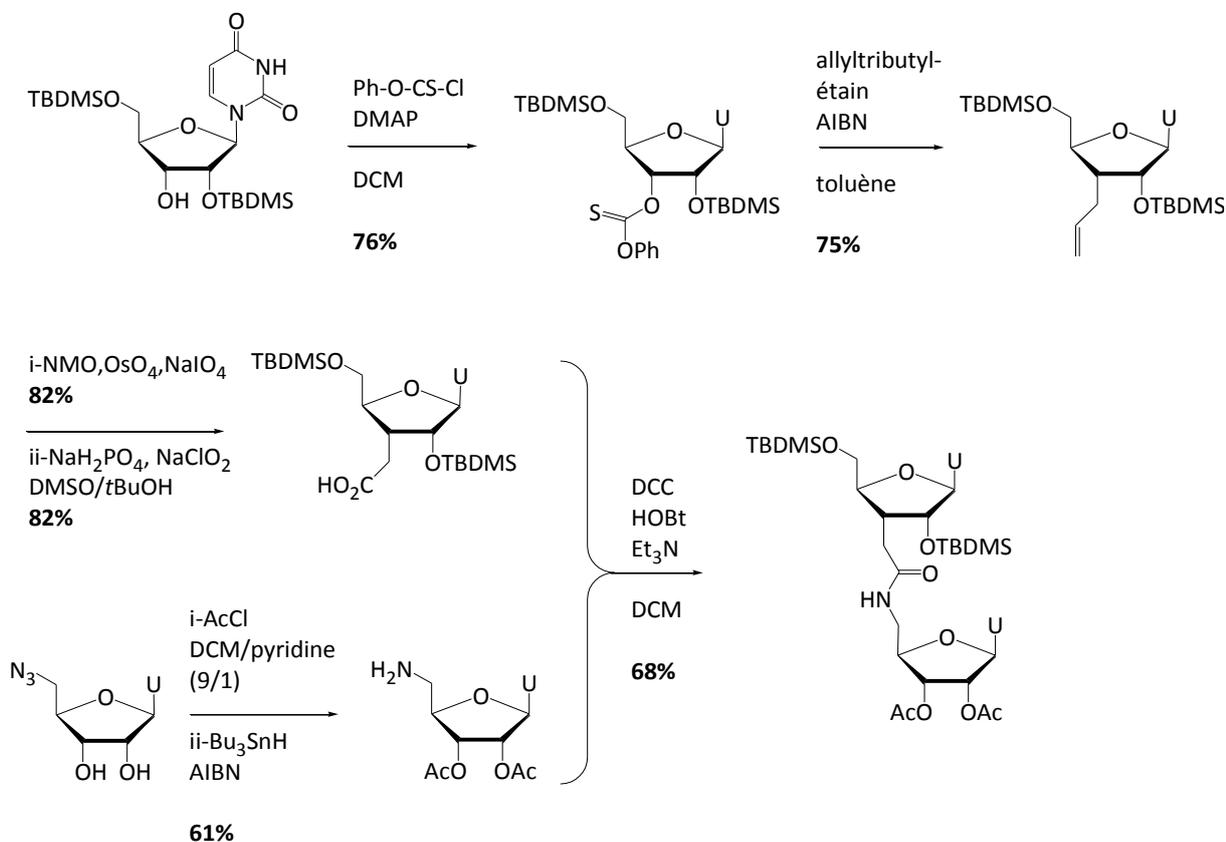


Schéma 4 : synthèse d'un dimère U*U en série ARN selon Rozners.

La synthèse du dérivé thionocarbonate a été réalisée par Rozners comme décrit par Meier^[63] avec 76% de rendement à partir de l'uridine 2',5'-O-silylée. La synthèse du précurseur acide carboxylique a ensuite été réalisée en 4 étapes avec 38% de rendement (29% pour l'analogue 2'-O-Me). Ici aussi le couplage a été effectué classiquement en présence de DCC/HOBt/Et₃N avec 68% de rendement. Cette voie de synthèse a été reprise par les mêmes auteurs en 2011^[46] et 2014^[58] pour des études biologiques d'oligonucléotides modifiés avec des liens amides afin d'identifier les capacités du lien amide à mimer le lien phosphodiester.

1.3.2.2 Synthèse de précurseurs de dimères à partir de source ribosique

Les voies de synthèse partant du ribonucléoside commercial présentent un problème de protection sélective en 2' et 5' qui se pose dès la première étape ce qui est un handicap

important, mais surtout ces voies de synthèses sont menées dès le départ avec une base azotée naturelle fixée sur le ribose. Elles nécessitent donc des stratégies de protection et déprotection spécifiques à chaque base et rendent la synthèse de plusieurs dimères très longue car chaque voie est indépendante, ne proposant aucun intermédiaire commun à plusieurs cibles nucléosidiques.

Dès 1999, l'équipe de Li-He Zhang^[65] a exploré une voie d'accès à un ribonucléoside doublement fonctionnalisé par une fonction acide carboxylique protégée sous forme d'ester et une fonction amine primaire pour l'élaboration de dimères ribonucléosidiques. Les auteurs ont réalisé une introduction tardive de la base azotée *via* une réaction de glycosylation. La synthèse comporte 11 étapes à partir du D-xylose et l'introduction de la base a lieu à la 8ème étape menant à l'intermédiaire I. La fonction amine a été introduite *via* le dérivé azoture après déprotection sélective du benzyle en position 5' en présence de l'acétyle en position 2'. Le rendement global est inférieur à 3% pour 11 étapes (schéma 5).

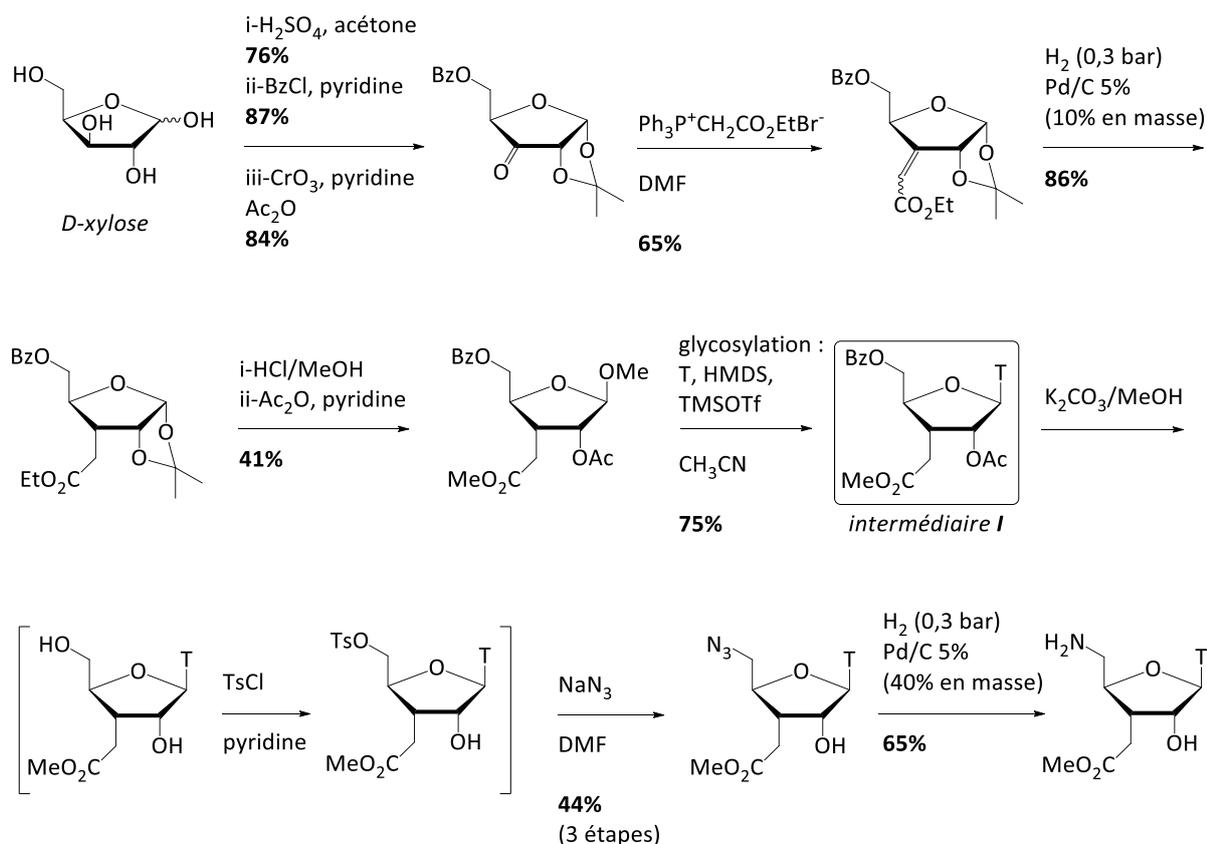


Schéma 5 : synthèse de ribonucléoside 3'-CH₂CO₂Me, 5'-NH₂ selon Zhang.

L'année suivante l'équipe de Robins^[66] a mis au point la synthèse de plusieurs nucléosides mono ou bi-fonctionnalisés précurseurs des réactions de couplage amidique. Les résultats les plus pertinents sont représentés sur le schéma 6 à partir du D-xylose et selon une séquence mise au point par Ueda en 1988 pour les quatre premières étapes^[67].

1 - Etat de l'art

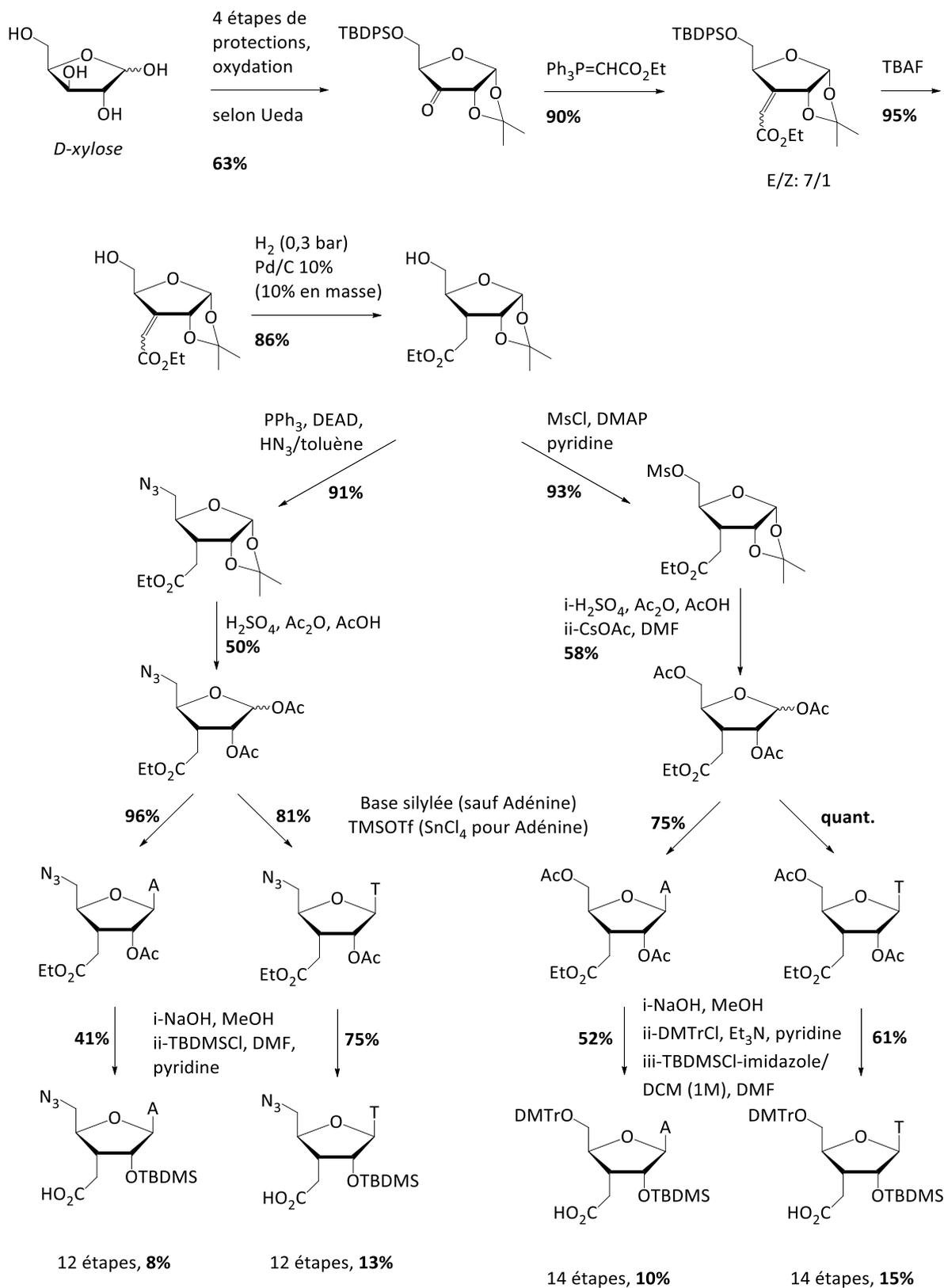


Schéma 6 : synthèse de ribonucléosides selon Robins.

Les synthèses comportent entre 12 et 14 étapes pour des rendements allant de 8 à 15% à partir du D-xylose. L'hydrolyse de l'ester en fin de synthèse et en présence de groupement acétate complique cette approche.

En 2008, Kochetkova et ses collaborateurs^[68] ont relevé les faiblesses de ces deux voies de synthèse et ont proposé une synthèse plus efficace d'intermédiaires 3'-carboxyméthyl-ribonucléosides comme précurseurs mono-fonctionnalisés d'oligonucléotides avec un lien amide. Ils ont par exemple atteint la 2'-O-acétyl-5'-O-benzoyl-3'-éthoxycarbonylméthylthymidine en 5 étapes avec 50% de rendement alors que Li-He Zhang avait décrit la même séquence en version ester méthylique en 7 étapes et 17% de rendement (intermédiaire I, schéma 5). La suite de ces travaux n'a pas encore été publiée. Depuis 2010, l'équipe s'oriente vers la synthèse d'oligonucléotides obtenus à partir de désoxyribonucléosides fonctionnalisés pour les condenser sur un acide aminé qui crée ainsi un lien peptidique^{[69],[70],[71]}.

En 2006, Rozners^[72] a publié la synthèse de 3'-aminométhyl-5'carboxy-nucléosides à partir du 1,2:5,6-di-O-isopropylidène-D-glucose en 19 étapes et avec des rendements globaux de 2 à 5%, ce type de précurseurs conduit à un lien amide de type amide-4 (figure 15).

En 2010, Rozners^[73] a proposé des améliorations pour la synthèse de nucléosides avec un lien amide-3 précédemment publiée par Robins^[66] dont les dernières étapes posaient problème. Il a mis au point une voie de synthèse qui s'écarte de celle de Robins à partir du dérivé mésylé (le 3-désoxy-3-hydroxyéthyl-1,2-O-isopropylidène-5-méthanesulfonyl- α -D-ribofuranose) pour atteindre son intermédiaire II déjà synthétisé en 2005^[74] selon une stratégie de construction du sucre. Cette stratégie présentait l'inconvénient majeur d'être limitée à 13 mmol de produit de départ à cause d'un réactif qui devait être mis en très large excès, les auteurs ont donc présenté une autre approche à partir de 200 mmoles de D-xylose (schéma 7).

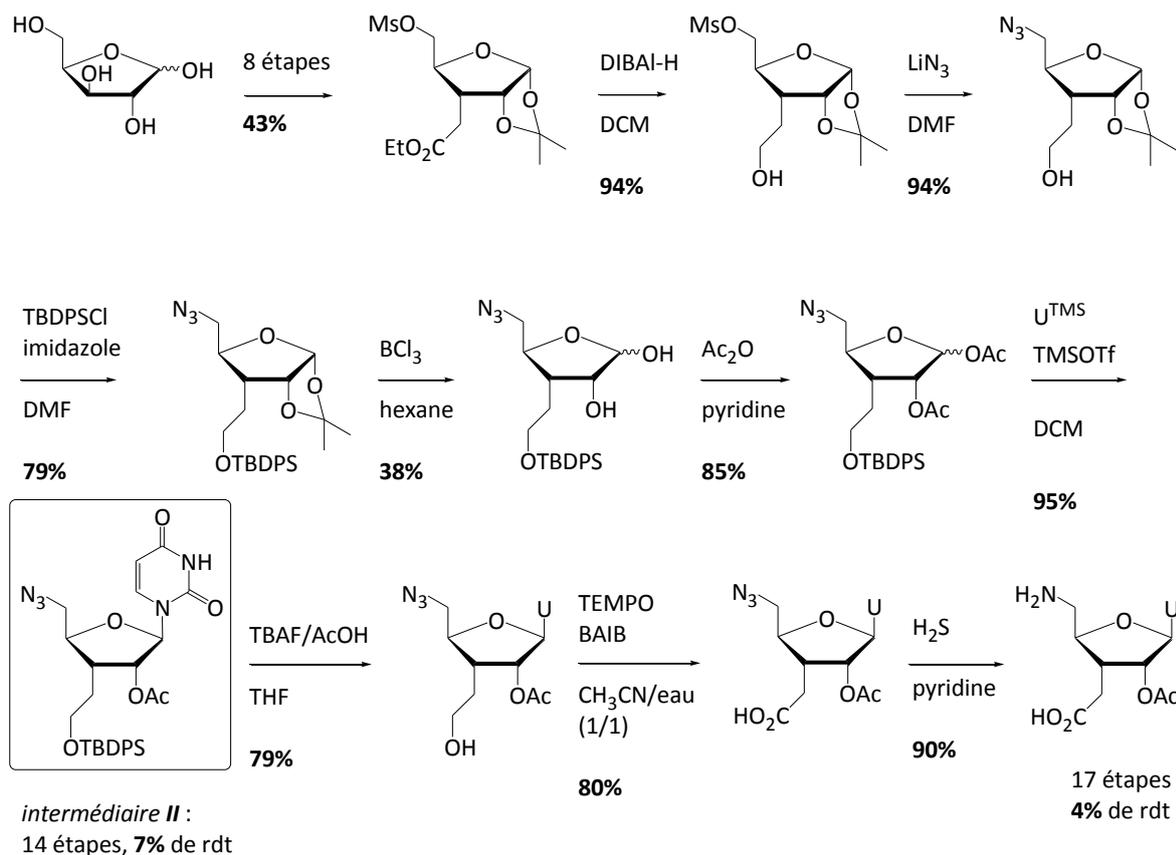


Schéma 7 : synthèse de ribonucléosides selon Rozners.

On note ici que la déprotection de l'acétone est réalisée en présence de BCl_3 suivie d'une acétylation en conditions classiques. Les auteurs souhaitent améliorer cette étape afin d'atteindre l'échelle du gramme pour le composé (II).

1.3.3 Plateforme amidique pour la synthèse de dimères ribonucléosidiques

Au regard des stratégies publiées dans la littérature, il nous est apparu intéressant de concevoir une voie d'accès modulable vers des dimères ribonucléosidiques, où le choix de la base se ferait en fin de synthèse. Ainsi nous avons imaginé une plateforme de type dimère ribosidique comportant un lien amide dont la synthèse devra être efficace pour pouvoir être préparée à l'échelle du gramme. Cette plateforme sera ensuite couplée à diverses combinaisons de bases azotées (naturelles ou non) *via* des réactions de glycosylation.

Le fait de travailler en série ribose est parfaitement adapté à la stratégie siARN et à toutes les applications relatives aux petits ARN, mais également compatible avec la stratégie antisens qui incorpore les modifications au sein d'une chaîne d'ADN synthétique. En effet, il a été montré

par De Mesmaeker^[75] que l'introduction d'unités ribonucléosidiques avec un groupement méthoxy en position 2' lié à des unités désoxyribonucléosidiques dans un oligonucléotide antisens augmentait l'affinité pour la cible.

Le fait de partir du sucre et d'introduire la base azotée en toute fin de synthèse revêt un autre avantage à savoir la possibilité d'introduire une base modifiée pouvant être fonctionnalisée élargissant encore les perspectives d'applications de ces petits ARN modifiés.

Selon que l'on envisage la préparation d'un homodimère (les deux bases identiques) ou d'un hétérodimère (deux bases différentes) les plateformes dimères ribosidiques varient légèrement mais toutes deux peuvent provenir des mêmes synthons ribosidiques **12-GP** et **33-GP** (schéma 8). La synthèse diverge seulement aux dernières étapes de glycosylations pour apporter de la diversité. En plus d'être innovante, cette synthèse ambitionne d'être moins coûteuse et modulable. Les étapes clés de cette stratégie résident dans le couplage amidique et les étapes de glycosylation (schéma rétrosynthétique 8).

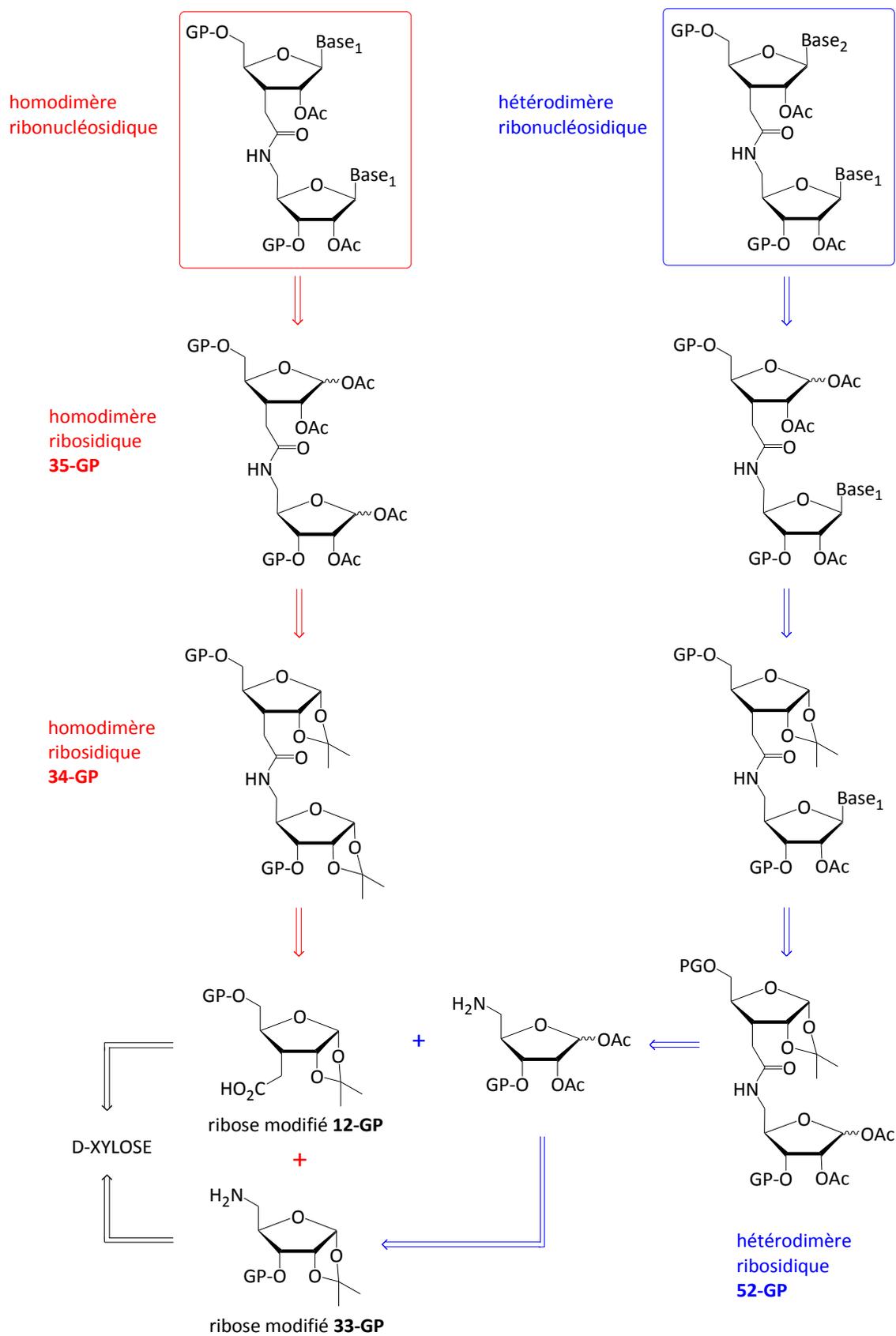


Schéma 8 : voie rétrosynthétique d'accès aux dimères ribonucléosidiques.

2 Validation du concept

L'intérêt de notre stratégie réside dans une double réaction de glycosylation qui intervient en fin de synthèse. Elle implique des bases azotées (de type purine ou pyrimidine) et un dimère ribosidique élaboré dont la synthèse nécessite une vingtaine d'étapes, dont la plupart sont à mettre au point. Aussi, dans un premier temps, nous avons envisagé de valider notre concept sur un substrat plus rapidement accessible mais de structure proche, comportant déjà un motif nucléosidique connu^[45], comme illustré sur le schéma rétrosynthétique 9.

La préparation de l'amine **4-GP** a déjà été validée au sein de l'équipe. Après l'obtention de l'acide **12-GP**, le précurseur modèle **16-GP** pourra participer à la réaction de *N*-glycosylation, pour conduire au dimère nucléosidique **27-GP**.

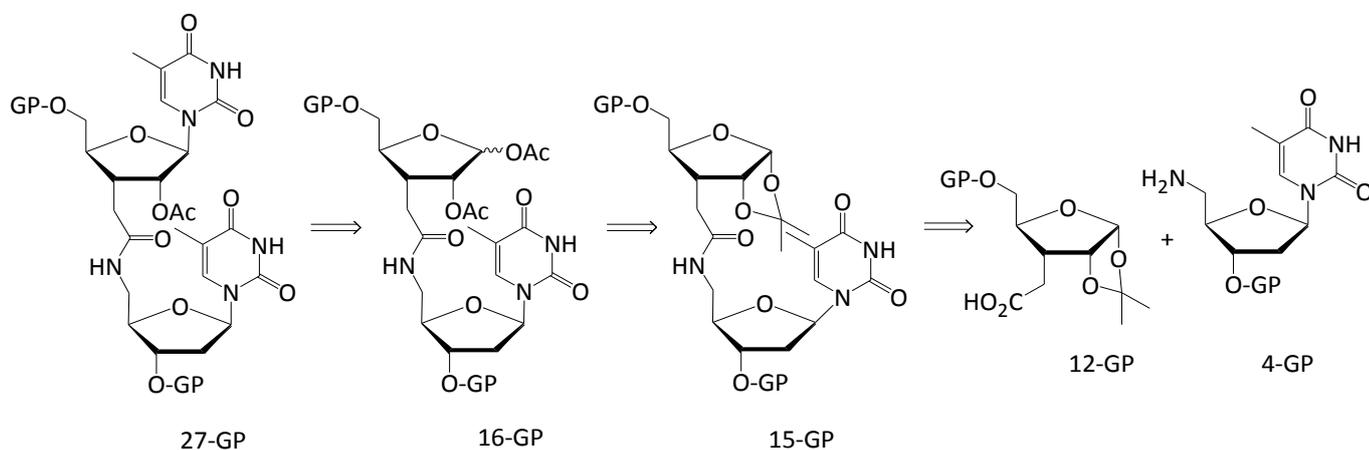


Schéma 9 : voie rétrosynthétique d'accès au dimère **27-GP**.

2.1 Synthèse de l'amine **4** (GP = TBDPS)

La synthèse du composé **4** a été décrite en 1994 par De Mesmaeker ^[45] selon le schéma réactionnel ci-après. Elle a été reproduite au laboratoire à l'échelle du gramme, en modifiant seulement la méthode de réduction de l'azoture. Initialement la réduction était proposée avec SnCl_2 ^[76] mais une hydrogénation en présence de Pd/C est aussi efficace et plus simple à purifier. L'amine **4** a ainsi été obtenue avec un rendement global de 50% pour 4 étapes (schéma 10).

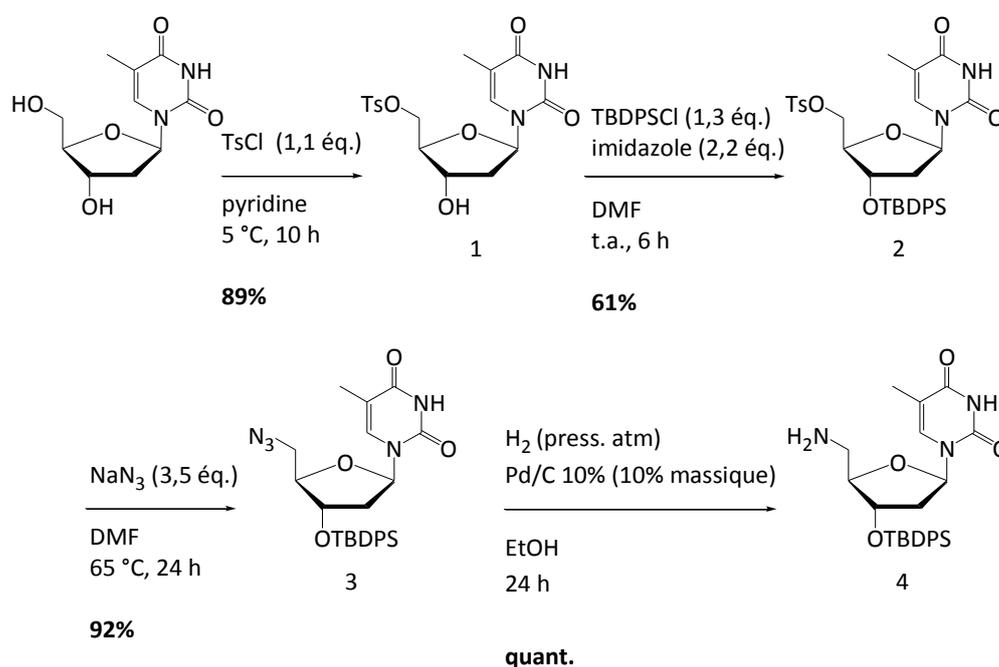
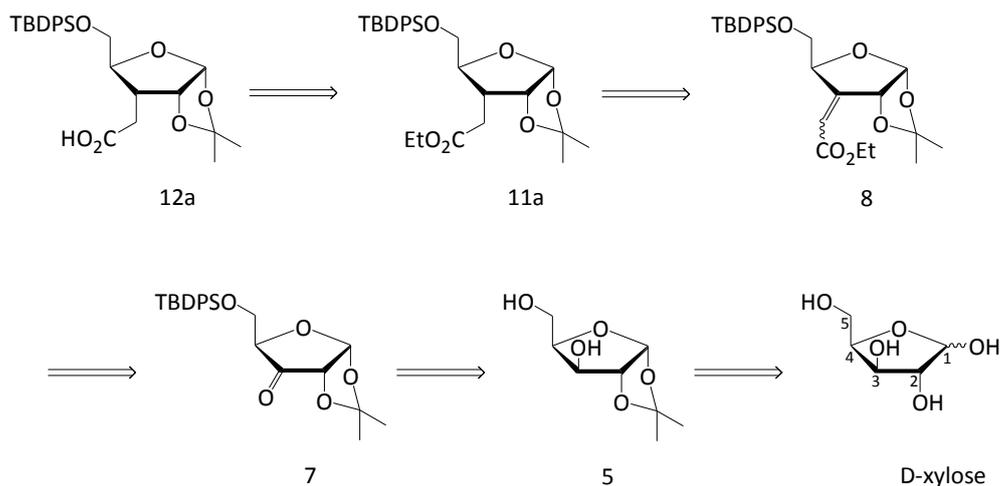


Schéma 10 : synthèse de l'amine **4**.

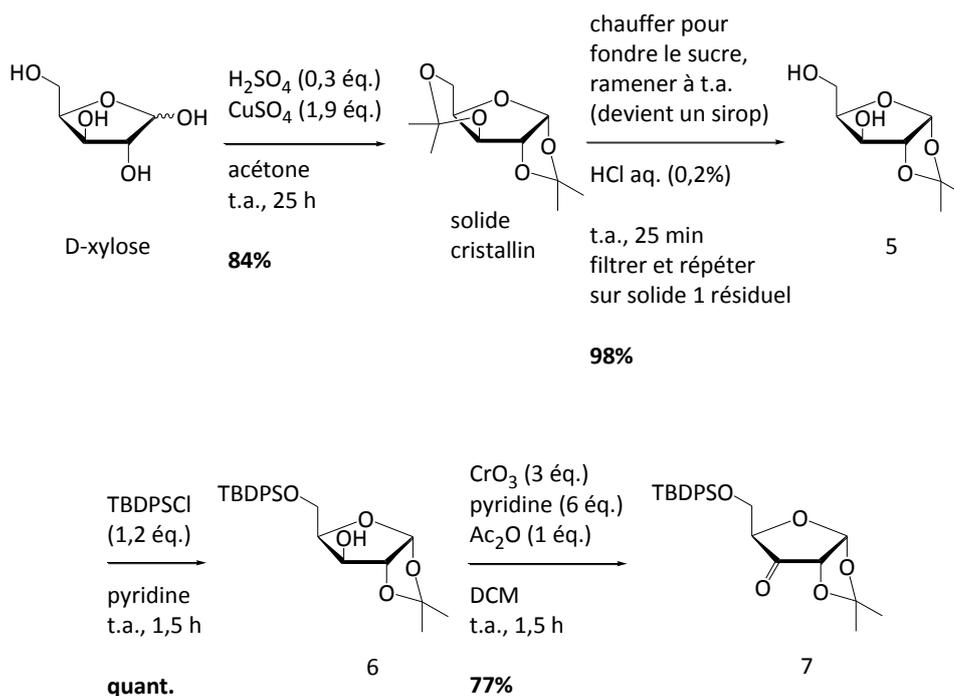
2.2 Synthèse de l'acide **12a** (GP = TBDPS)

L'intermédiaire acide carboxylique **12a** peut être obtenu en 6 étapes comme décrit sur le schéma 11. Après une séquence de protections orthogonales des alcools en positions 1, 2 et 5, la fonction alcool de la position 3 sera oxydée. L'intermédiaire **8** sera obtenu par une oléfaction de Horner-Wadsworth-Emmons. Après réduction de la double liaison, la fonction ester du composé **11a** sera hydrolysée en milieu basique pour conduire à l'acide désiré.

Schéma 11 : rétrosynthèse de l'acide **12a**.

2.2.1 Du D-xylose à la cétone **7**.

L'équipe de Ueda^[67] a synthétisé la cétone **7** à partir du D-xylose, en protégeant les fonctions alcool en positions 1 et 2 sous forme d'acétonide, en deux étapes comme décrit par Baker et Schaub en 1955^[77]. La fonction alcool primaire a ensuite été protégée sous forme d'éther de *tert*-butyldiphénylesilyle avec un rendement quantitatif. Puis la fonction alcool en C-3 a été oxydée par une solution de CrO₃-pyridine-Ac₂O, avec un rendement supérieur à 75% sur plus de 10 grammes (schéma 12).

Schéma 12 : synthèse du dérivé 3-céto-xylofuranose selon Ueda^[67].

Nous avons repris ce schéma réactionnel, mais d'autres modes opératoires de la littérature ont permis d'en améliorer les conditions au fil de nos multiples synthèses. La préparation du diacétonide a été reproduite à l'identique avec un rendement quantitatif. La déprotection sélective de l'acétonide en 3,5 a été cependant plus facile à mettre en oeuvre dans les conditions décrites par Bozo en 1998^[78] dans le méthanol avec de l'acide chlorhydrique 0,1N et ont permis d'obtenir le composé **5** de manière quantitative (schéma 13). Pour la silylation, les conditions de Greenberg^[79] (TBDPSCI/imidazole) ont été choisies et ont conduit au composé **6** avec un bon rendement de 70%. Malgré les bons rendements décrits par Ueda^[67] pour l'oxydation de **6** avec CrO₃/pyridine/Ac₂O (77%), nous n'avons obtenu aucune évolution après 4 heures de réaction. Après une nuit au reflux du DCM la conversion du produit de départ était totale, la purification a permis d'obtenir la cétone **7** et sa forme hydrate **7'** en mélange 50/50 avec un rendement peu satisfaisant de 45% (schéma 13).

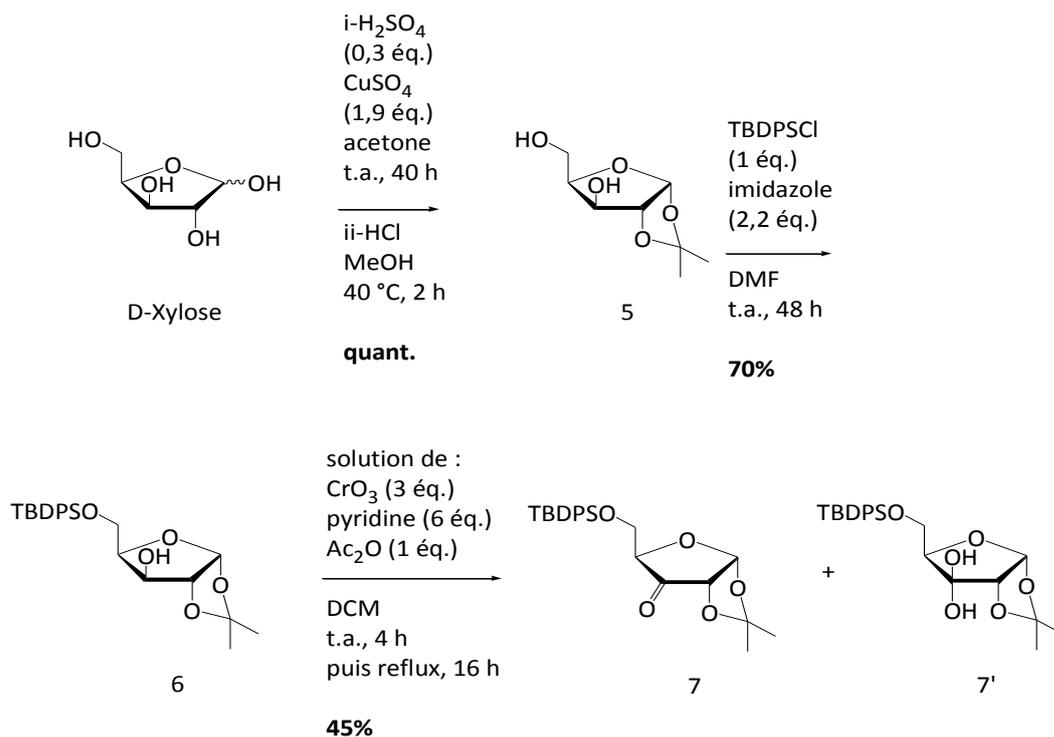


Schéma 13 : du D-xylose à la cétone 7.

Le composé **7'** n'a pas été isolé mais identifié par RMN du proton et spectrométrie de masse.

Un mode opératoire assez semblable a été utilisé avec succès par Strazewski^[80] en 1999 sur l'analogue de **6** en série L-xylofuranose puis en 2001 par Lu^[81] sur l'analogue 5-O-TBDMS du composé **6**. Il débute par la préparation d'une solution de 4 équivalents de CrO_3 et de 8 équivalents de pyridine dans le dichlorométhane pendant 15 minutes, le sucre est ensuite ajouté, suivi par 4 équivalents d'anhydride acétique. La réaction est complète après 30 minutes à température ambiante.

Lors de nos essais, selon ce protocole la conversion n'a pas excédé 30% après une nuit de réaction. Les mauvais rendements obtenus nous ont conduits à tester d'autres réactifs proches comme le PCC. Ce réactif, proposé par Corey et Suggs^[82] dès 1975, offre l'avantage d'être aujourd'hui commercial, et facile d'utilisation. Il a déjà été expérimenté avec succès sur divers motifs furanoses proches du nôtre par exemple par Fleet en 1995^[83] (schéma 14a) et, plus tard, par Novikov et Sampson^[84] (schéma 14b).

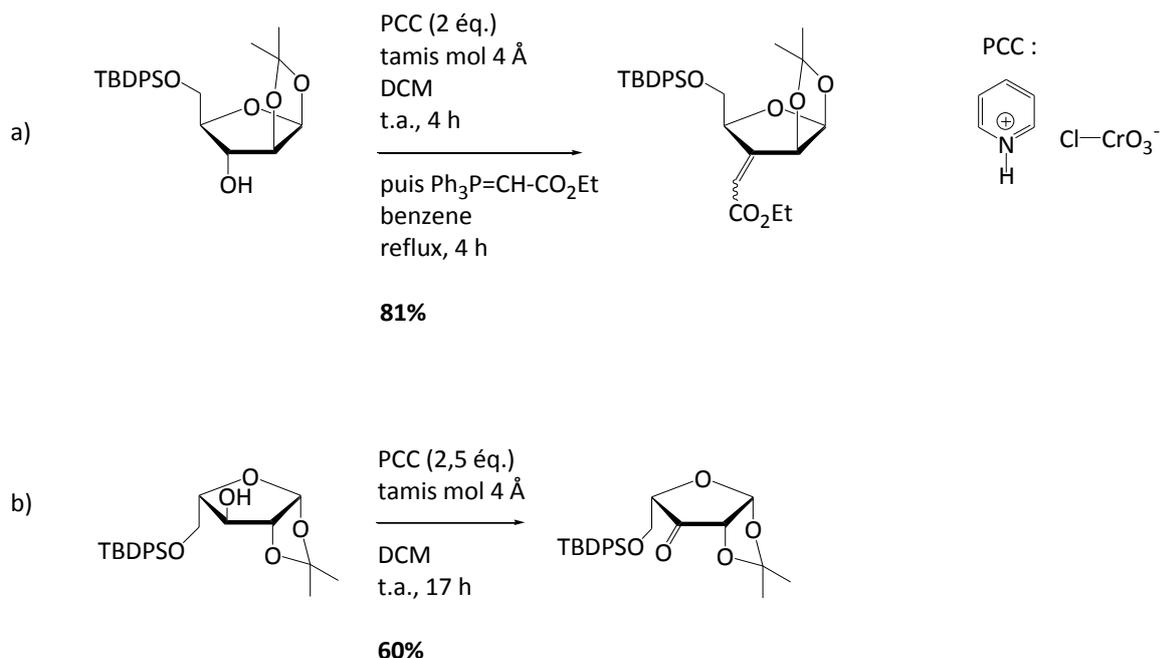


Schéma 14 : oxydation au PCC par Fleet puis Novikov et Sampson.

On observe que l'oxydation de l'alcool en série L-arabinose (schéma 14a) s'est déroulée avec succès, sachant que les auteurs^[83] ont obtenu 81% de rendement pour les 2 étapes. Le résultat de l'oxydation sur son isomère en série D-arabinose est assez surprenant car même avec un temps de réaction plus long et un léger excès de réactif, les auteurs^[84] n'ont eu que 60% de rendement en cétone (schéma 14b). Par ailleurs, quelques articles évoquent le caractère acide du PCC, ainsi Corey et Suggs^[82] se sont affranchis de cette acidité en présence d'acétate de sodium pour la synthèse du citronellal (schéma 15). Plus tard, Corey a exploité ce caractère acide du PCC qui lui a permis d'accéder à l'isopulgone par cyclisation puis d'obtenir la pulegone^[85] avec 70% de rendement (schéma 15).

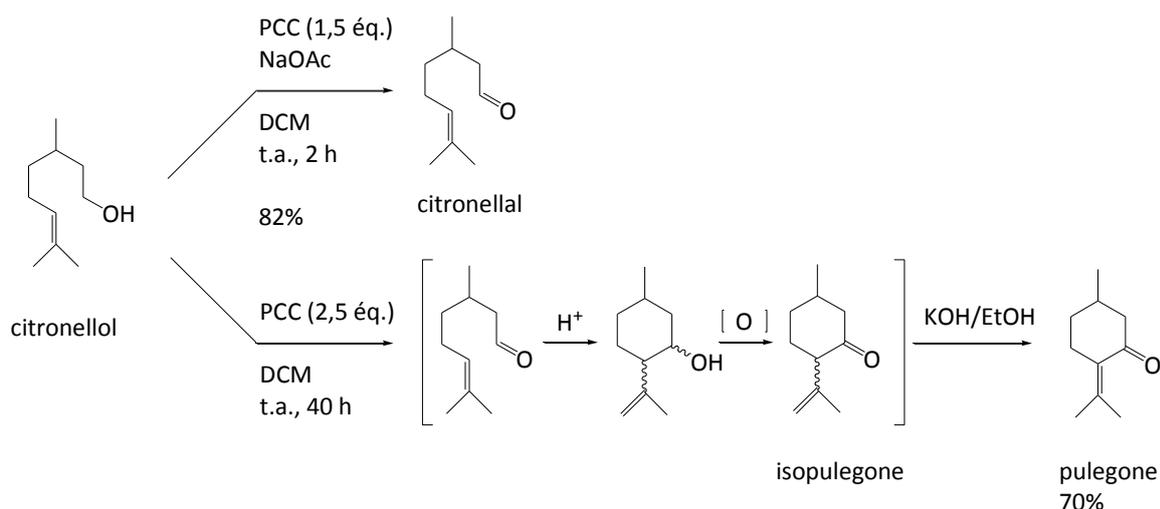


Schéma 15 : mise en évidence du caractère acide du PCC par Corey^{[82],[85]}.

De fait, l'équipe de Tilve^[86] a décrit en 2004, la mise au point d'une séquence oxydation-oléfination sur des substrats furanoses avec du PCC tamponné (AcONa) afin que la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons se déroule avec succès passant ainsi de 0% à 96% de rendement en oléfine. Cette séquence pourrait d'ailleurs nous inspirer pour notre synthèse mais, dans un premier temps, nous avons souhaité isoler la cétone qui constitue un intermédiaire commun pour la synthèse du fragment acide **12-GP** et du fragment amine **4-GP** (schéma 9).

On constate dans la littérature que les conditions d'oxydation varient en terme de quantité de réactifs (de 1,5 à 3 équivalents)^{[82],[87]}, d'ajout ou non d'additif (en cours de réaction ou en cours de traitement)^{[85],[86],[88]}, de température (ambiante ou reflux)^[89] et surtout de durée de réaction (1 heure à 3 jours)^{[82],[87]}. Notre premier essai a été réalisé avec 1,7 équivalents de PCC, sans additif, à température ambiante en suivant la réaction par CCM. En fonction de l'avancement de la réaction, ces paramètres ont été modifiés séparément ou conjointement, les essais sont rassemblés dans le tableau 3.

Le substrat de cette réaction (l'alcool **6**) et son produit (la cétone **7**) étant très difficilement séparables, il était impératif d'avoir une conversion totale du substrat. Les étapes de purification consistaient en une filtration des sels de chrome sur Célite® et l'éther diéthylique a été choisi comme solvant de rinçage car il solubilisait peu les sels de chrome contrairement aux conditions classiques (rinçage au DCM). Même si la cétone **7** restait partiellement piégée dans le précipité de sels de chrome, cette première filtration facilite ensuite la purification sur gel de silice, afin d'isoler la cétone **7** pure.

Les lots engagés étaient de l'ordre de 5 à 10 grammes car il s'agissait d'optimisation au fur et à mesure des resynthèses. Les résultats figurent dans le tableau 3.

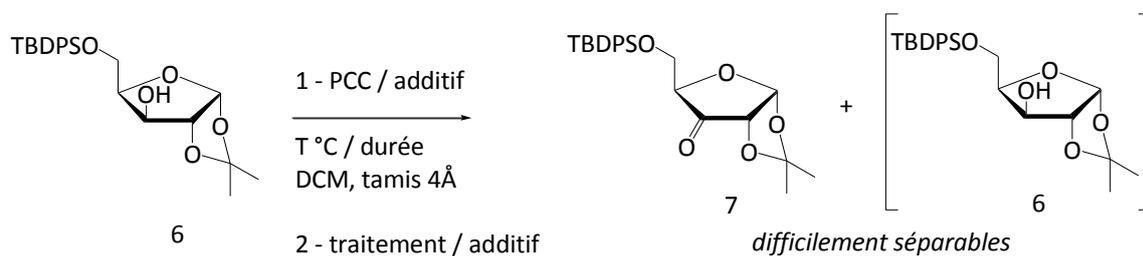


Schéma 16 : différents essais d'oxydation au PCC.

Essai	PCC (éq.)	Additif	T °C / Durée	Conversion	Rendement
1	1,7	aucun	t.a. / 20 h	incomplète (CCM)	57%
2	1,7 puis 1,7	aucun	reflux / 20 h reflux / 2,5 j	incomplète (CCM) 100% (CCM)	63%
3	1,7 puis 1,1	aucun	t.a. / 20 h reflux / 20 h	20% (RMN) 100% (RMN)	66%+(TBDPS) ₂ O
4	1,7 puis 0,5	aucun	reflux / 20 h reflux / 16 h	incomplète (CCM) 100% (CCM)	73-80%
5	1,7 puis 0,8	Célite® ^a	reflux / 24 h reflux / 16 h	incomplète (CCM) 100% (CCM)	79-84%
6	1,7 puis 0,8	Célite® ^a	reflux / 24 h reflux / 16 h	60% (RMN) 100% (CCM)	47%+(TBDPS) ₂ O
7	1 puis 0,5	Célite® ^a	reflux / 24 h reflux / 16 h	incomplète (CCM) 100% (CCM)	59%+(TBDPS) ₂ O
8	3	AcONa (6 éq.) ^b NaHCO ₃ ^c	t.a. / 16 h	100% CCM	85-94%

a : ajout en fin de réaction dans le milieu réactionnel dilué à l'éther diéthylique, agitation 1 à 2 heures ;

b : agité avec PCC pendant 30 min avant l'ajout du substrat ; c : en solution de lavage du filtrat

Tableau 3 : différents essais d'oxydation au PCC.

Le résultat de l'essai 1 reste cohérent avec la littérature^[84] (schéma 14b). Cherchant à améliorer ce résultat, la réaction a été portée au reflux puis du PCC a été ajouté au cours de la réaction (essais 2 à 4). Nous observons la présence de (TBDPS)₂O mettant en évidence la déprotection de la fonction alcool primaire (tableau 3, essai 3). Les conditions de l'essai 4 (tableau 3) restaient satisfaisantes mais aléatoires. Les essais 5 à 7 reprennent ces conditions avec un ajout de Célite® en fin de réaction qui n'a pas eu d'effet sur le rendement ni sur l'aspect du milieu réactionnel (toujours aussi foncé avec une gomme noire au fond), mais a simplement facilité la purification. Conscient du caractère acide du PCC, des essais supplémentaires ont été réalisés en présence d'acétate de sodium (tableau 3, essai 8). Conformément aux travaux de Han et Lowary^[88], la quantité de PCC a été portée à 3 équivalents. Ne souhaitant pas changer deux paramètres à la fois, la température de réaction n'a pas été augmentée (restant aux environs de 20 °C). Un temps de réaction raisonnable de 16 heures a été nécessaire mais le milieu réactionnel (de couleur claire, d'aspect homogène) est resté stable pendant 2 à 3 jours. Les conditions de l'essai 8 (tableau 3) ont permis de synthétiser cinq lots d'une dizaine de grammes, purifiés simplement et efficacement (simple filtration sur gel de silice) avec d'excellents rendements. Toutefois la qualité du PCC commercial est primordiale, en effet lorsque nous avons changé de lot de réactif les rendements ont chuté.

Vu l'irrégularité des résultats, la durée des expériences, les difficultés de purification et la toxicité du chrome, notre choix s'est ensuite porté sur des méthodes d'oxydation classiques (oxydation de Swern) ou moins classiques (utilisation du TEMPO), afin de s'affranchir des sels de métaux toxiques.

En 1978, Swern^[90] a décrit une méthode d'oxydation des alcools primaires et secondaires utilisant le DMSO "activé" par le chlorure d'oxalyle ((COCl)₂/DMSO/Et₃N : 1,1 éq./2,2 éq./5 éq.) dans le dichlorométhane à -60 °C.

Ces conditions ont été reprises avec succès par l'équipe de Parr^[91] sur un substrat très proche du nôtre (schéma 17).

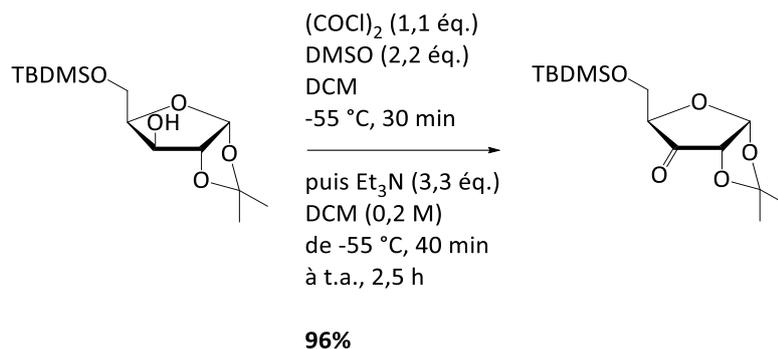


Schéma 17 : oxydation de Swern selon Parr.

Sur 500 mg de l'alcool **6**, en reprenant les conditions de Parr mais en ajoutant 5 équivalents de triéthylamine^[92], la conversion a été de 80% (schéma 18).

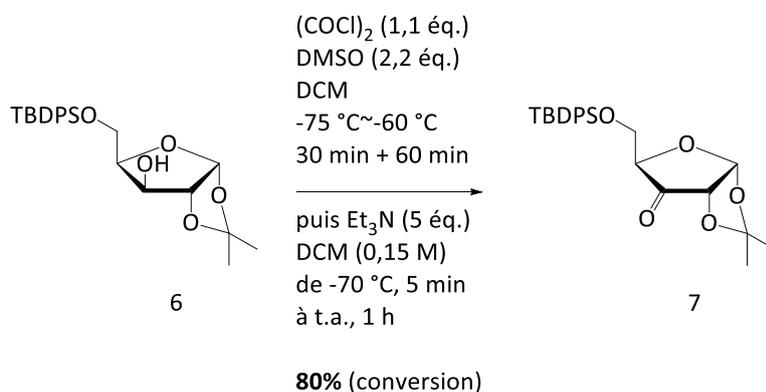


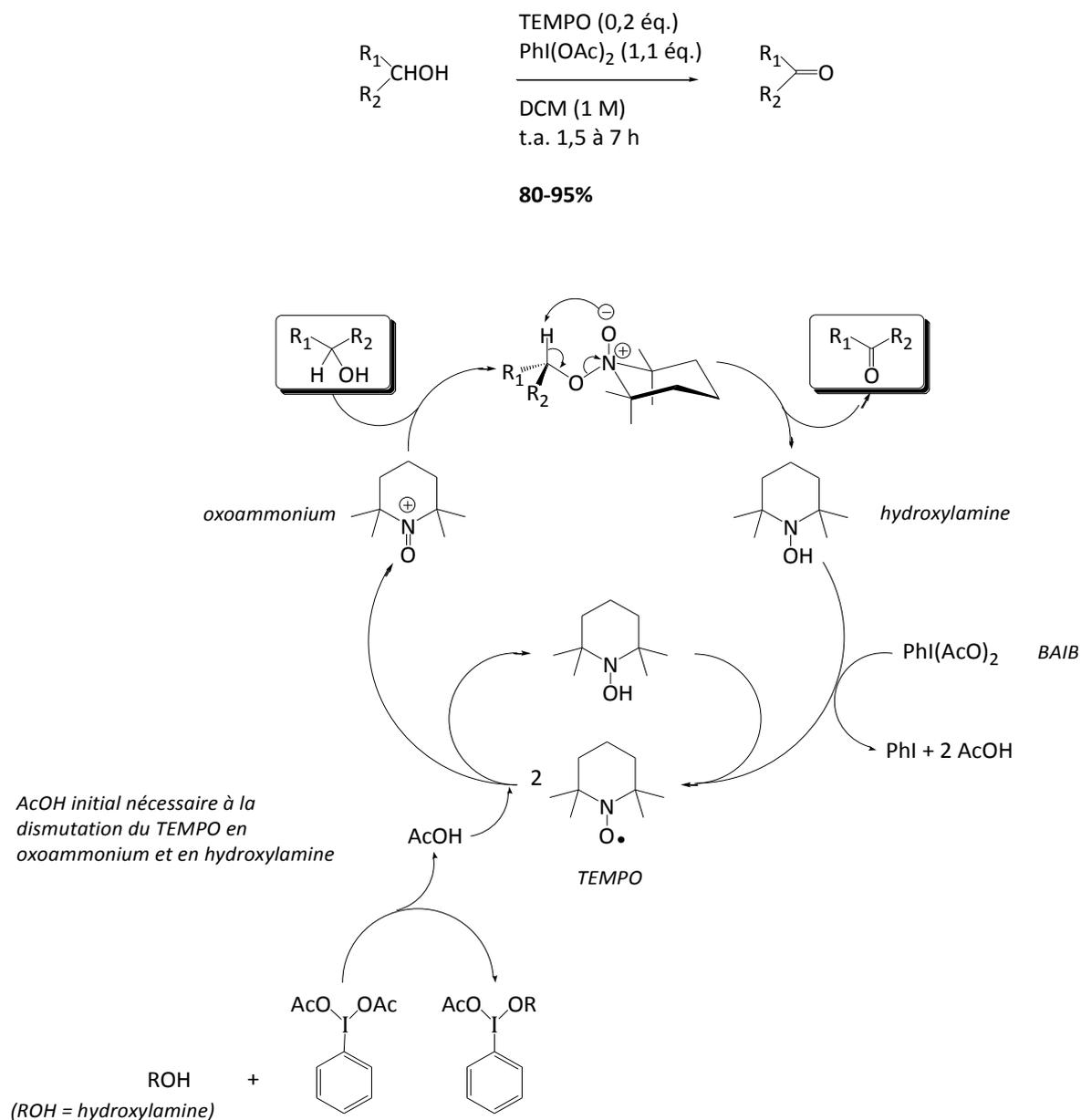
Schéma 18 : synthèse de la cétone **7** dans les conditions de Parr.

On trouve dans la bibliographie de cette réaction des modes opératoires qui, sur des substrats toujours proches du nôtre, utilisent des quantités de réactif bien plus importantes, ainsi que des durées de réactions et des températures différentes^{[93],[94]}.

En augmentant les quantités de réactifs ($\text{COCl}_2/\text{DMSO}/\text{Et}_3\text{N}$: 2 éq./4 éq./6 éq.) et la durée de réaction après l'ajout de l'alcool (deux heures au lieu d'une) la cétone **7** a été obtenue de façon quantitative. Malheureusement, des problèmes de conversion ont été rencontrés en montant en échelle (lot de 5 grammes), c'est pourquoi une troisième solution a été envisagée.

En 1993, Togo et Yokoyama ont écrit un article^[95] traitant du TEMPO ((2,2,6,6-tetraméthylpiperidin-1-yl)oxyl) et de l'iode hypervalent, mais il faut attendre 1997 pour que Margarita et Piancatelli^[96] proposent l'utilisation du TEMPO en quantité catalytique avec le BAIB

(bis(acétoxy)iodobenzène) comme co-oxydant pour l'oxydation des alcools primaires et secondaires. Cette réaction est décrite sur le schéma 19^[97].



AcOH initial nécessaire à la dismutation du TEMPO en oxoammonium et en hydroxylamine

Schéma 19 : mécanisme d'oxydation au TEMPO.

Les conditions de Margarita et Piancatelli^[96] ont été utilisées en développement dans la société Johnson and Johnson Pharmaceutical par Lemaire^[98] à l'échelle de la centaine de grammes sur un dérivé de l'uridine, ce qui illustre la pertinence de ce type de réactif. Ces conditions ont également été utilisées par Wengel^[99] sur un dérivé proche du nôtre en 2005 (schéma 20).

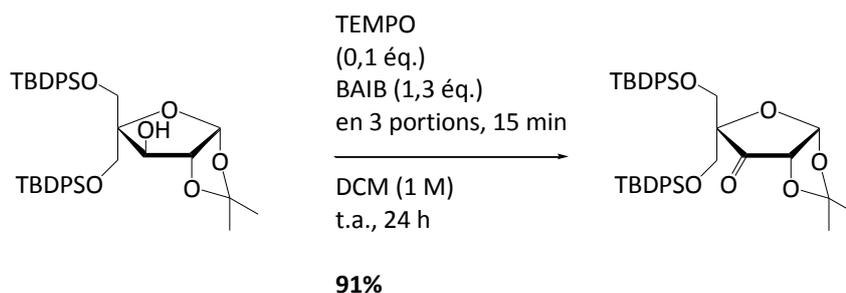


Schéma 20 : oxydation au TEMPO par Wengel.

Il existe d'autres radicaux nitroxy, qui peuvent compléter l'action du TEMPO. Des analogues ont été synthétisés par l'équipe de Iwabuchi^[100] et testés sur différents substrats, dont le nucléoside présenté sur le schéma 21.

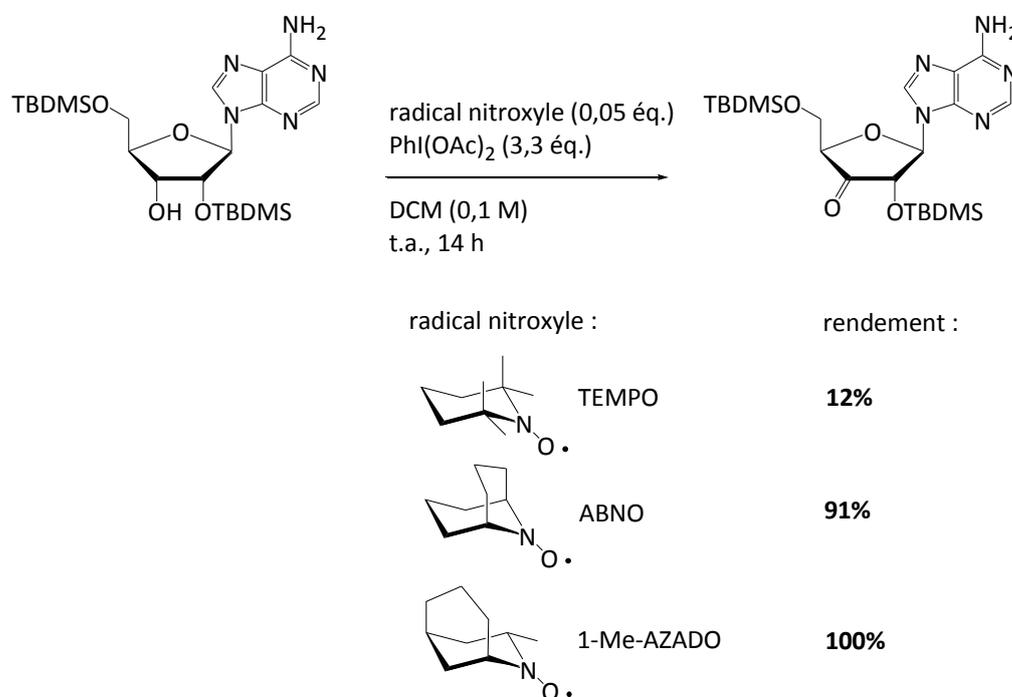
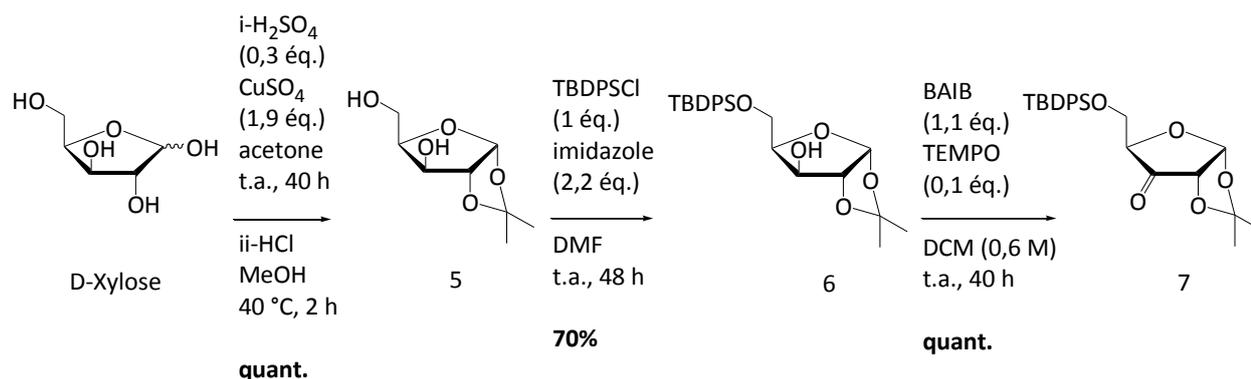


Schéma 21 : oxydation d'un nucléoside par différents radicaux nitroxyles.

Sur notre alcool **6**, les conditions d'oxydation en présence de TEMPO^[96] ont été appliquées avec quelques modifications comme l'augmentation du temps de réaction et la dilution du milieu réactionnel à 0,6 M. La réaction a toujours été très propre, la montée en échelle s'est déroulée sans surprise et la purification a toujours été très simple, avec des rendements quantitatifs. Ce sont donc ces conditions qui ont été sélectionnées pour la suite.

En conclusion, la cétone **7** a été obtenue en 4 étapes avec un rendement global de 70% à l'échelle de la dizaine de grammes (schéma 22).

Schéma 22 : du D-xylose à la cétone **7**.

2.2.2 De la cétone **7** à l'acide carboxylique **12a**

En 2001, Postema^[101] a proposé une séquence qui transforme une fonction cétone en position 3 en dérivé carboxylique sur un substrat proche du nôtre, comme présenté sur le schéma 23.

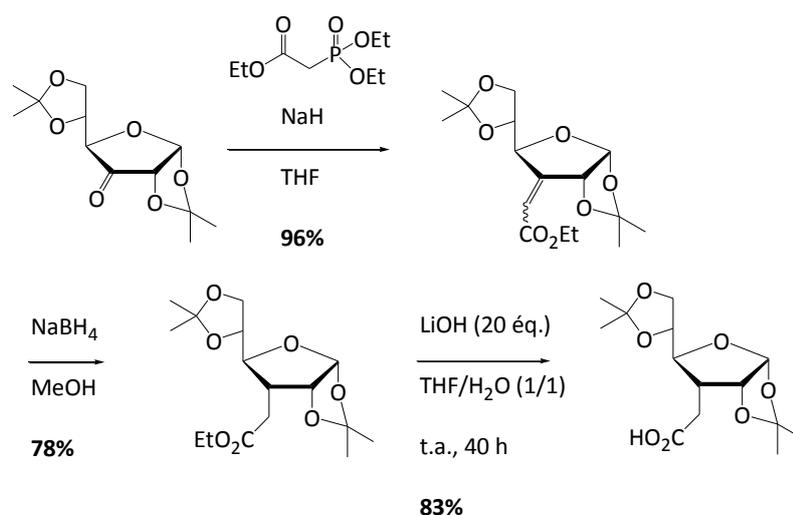


Schéma 23 : transformation de cétone en acide carboxylique sur un dérivé furanose.

Concernant les étapes d'oléfineation et de réduction à partir d'une cétone de type **7**, de nombreux articles ont proposé différents modes opératoires et notre choix s'est tourné vers l'utilisation d'un phosphorane commercial pour la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons facile à mettre en oeuvre. Dans l'article de M. J. Robins et Peterson,^[66] paru en 2000, l'isomère E est décrit comme l'isomère majoritaire (schéma 24).

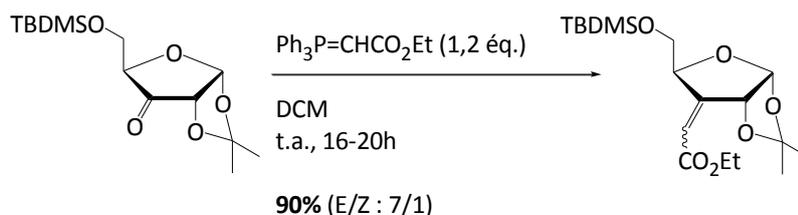


Schéma 24 : réaction de Horner-Wadsworth-Emmons par Robbins et Peterson.

Plus récemment, les travaux de Martinkova^[102] en 2006, puis Rauter^[103] en 2007, ont identifié dans les mêmes conditions d'oléfination, l'isomère Z comme l'isomère majoritaire (schéma 25).

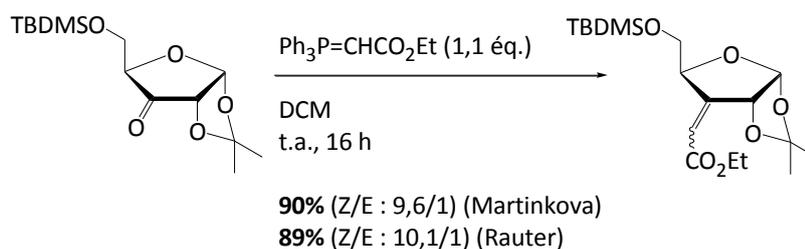
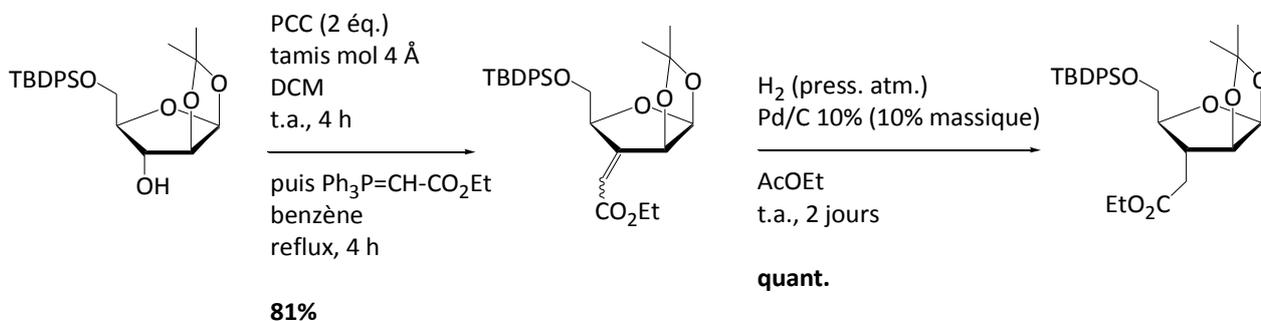


Schéma 25 : réaction de Horner-Wadsworth-Emmons par Martinkova puis Rauter.

Avec un ylure stabilisé comme $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$, la cycloaddition devrait conduire majoritairement à l'oléfine E comme décrit par Robbins et Peterson. Cependant, seul l'article de Martinkova décrit précisément les deux isomères en RMN du proton. Robbins et Peterson décrivent la RMN de leur produit majoritaire (l'isomère E) sans les attributions, cependant les déplacements chimiques sont tout de même plus proches de ceux de l'isomère Z décrit par Martinkova que de ceux de l'isomère E.

Dans la littérature, la réduction de ces esters α,β -insaturés a été réalisée en présence de borohydrure de sodium^[104] ou par hydrogénation comme décrit par Fleet^[83] en 1995 (schéma 26).

Schéma 26 : réduction d'un ester α,β -insaturé par Fleet.

Dans notre cas, la réaction de Horner-Wadsworth-Emmons avec $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$ a conduit à l'oléfine **8** avec un excellent rendement (schéma 27). La RMN du composé **8** est conforme au spectre de l'isomère Z de Martinkova (exception faite des signaux du groupement protecteur silylé). Comme il n'était pas certain qu'une expérience NOE lève définitivement le doute et que l'oléfine **8** avait pour vocation d'être réduite, la synthèse a été poursuivie sur le mélange d'isomères (dont un présent en très large excès), quel qu'il soit. La réduction a été étudiée dans les conditions présentées dans le tableau 4. Les essais de réduction ont tous été réalisés à température ambiante sur des lots allant de 100 mg à un gramme. Le rapport diastéréoisomérique (rd) a été estimé par RMN du proton.

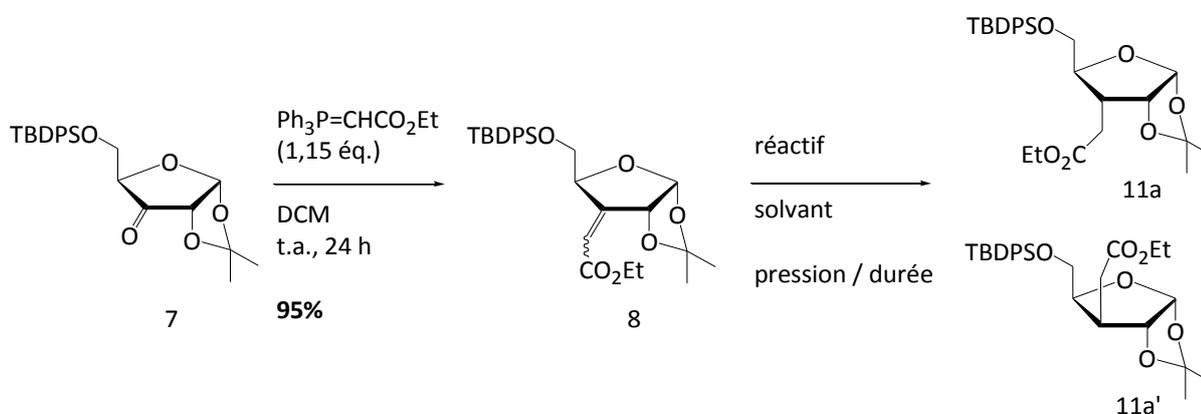


Schéma 27 : essais de réduction de l'oléfine **8**.

réactif	solvant	durée	conversion	rd 11a/11a'
NaBH_4	EtOH	1 h	48%	40/60
H_2 , Pd/C à 10% (10% massique)	EtOH	20 h	50%	51/49
H_2 , Pd/C à 10% (10% massique)	AcOEt	20 h	72%	66/34
H_2 , Pd/C à 10% (10% massique)	THF	20 h	50 %	69/31

Tableau 4 : essais de réduction de l'oléfine **8**.

Contrairement aux exemples de la littérature vus précédemment, la réduction de l'oléfine **8** fournit systématiquement un mélange de deux diastéréoisomères. Le diastéréoisomère attendu **11a** présente une configuration (R) au niveau du carbone C-3 et le diastéréoisomère nommé **11a'** présente une configuration (S). Ces deux composés sont parfaitement identifiables par RMN du proton sachant que le H-2 apparaît sous forme d'un triplet avec un déplacement chimique de 4,80 ppm pour le composé attendu **11a** et sous la forme d'un doublet avec un

déplacement chimique de 4,56 ppm pour le composé **11a'**. Ceci sera confirmé plus tard, *via* le précurseur non silylé (schéma 29).

En 2000, M. J. Robins et Peterson^[66] ont étudié cette réduction à partir de l'analogue de **8** déprotégé en position 5 (schéma 28), les résultats sont présentés dans le tableau 5.

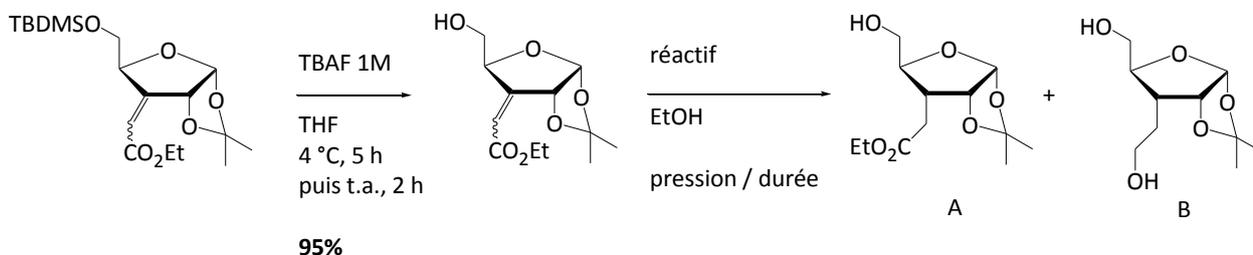


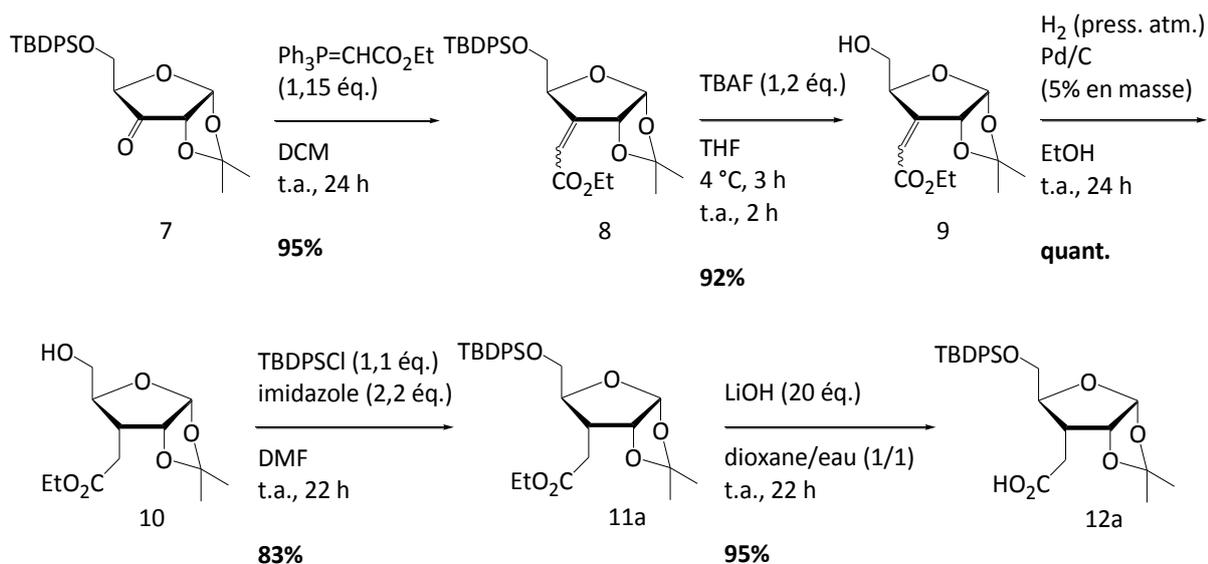
Schéma 28 : essais de réduction d'une oléfine analogue de **8** selon M. J. Robins et Peterson.

réactif	pression	durée	rdt en A	rdt en B
NaBH ₄		16 h	43%	34%
H ₂ , Pd/C 10% (10% massique)	25 psi (1,7 bar)	4 h	73%	3,5%
H ₂ , Pd/C 10% (10% massique)	5 psi (0,3 bar)	20 h	86%	0%

Tableau 5 : essais de réduction d'une oléfine analogue de **8** selon M. J. Robins et Peterson.

Les auteurs ont conclu qu'une hydrogénation à faible pression était la meilleure méthode.

Afin de réaliser un essai d'hydrogénation dans ces conditions^[66] (schéma 28), l'oléfine **8** a dû être déprotégée. Dans les conditions décrites par Robins et Peterson (schéma 28), c'est à dire en présence de TBAF à froid (4 °C) pendant 5 heures puis à température ambiante pendant 2 heures et les rendements en analogue déprotégé **9** ont toujours été supérieurs à 90%. L'hydrogénation a été testée à pression atmosphérique (et non à une pression réduite de 0,3 bar comme préconisé par les auteurs^[66]) pour des raisons pratiques. Elle a conduit, après 24 heures d'agitation vigoureuse, au produit souhaité **10** de manière quantitative qui a été resilylé pour donner **11a**. L'hydrolyse de l'ester dans les conditions de Postema^[101] (schéma 23) a été reprise en changeant simplement de solvant pour un meilleur rendement en acide carboxylique attendu **12a** (schéma 29).

Sch\u00e9ma 29 : de la c\u00e9tone **7** \u00e0 l'acide **12a**.

Nos donn\u00e9es RMN sont parfaitement conformes \u00e0 celles de Berges et Robins^[104] pour le compos\u00e9 **10** confirmant la configuration (R) du C-3. Apr\u00e8s silylation, nous avons obtenu le compos\u00e9 **11a**, de configuration (R) en C-3, ce qui a permis de valider les r\u00e9sultats des essais de r\u00e9duction pr\u00e9c\u00e9dents (tableau 4, m\u00e9lange de **11a** et **11a'**).

L'acide carboxylique **12a** a ainsi \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9 en 9 \u00e9tapes avec un rendement global de 48% \u00e0 partir du D-xylose.

2.3 Synth\u00e8se du dim\u00e8re **13** (GP = TBDPS/TBDPS)

La synth\u00e8se de dim\u00e8res d\u00e9soxyribonucl\u00e9osidiques d\u00e9crite par De Mesmaesker et Wendeborn^[75] (voir Chapitre 1) est bien connue dans l'\u00e9quipe pour avoir \u00e9t\u00e9 reproduite avec succ\u00e8s plusieurs fois.

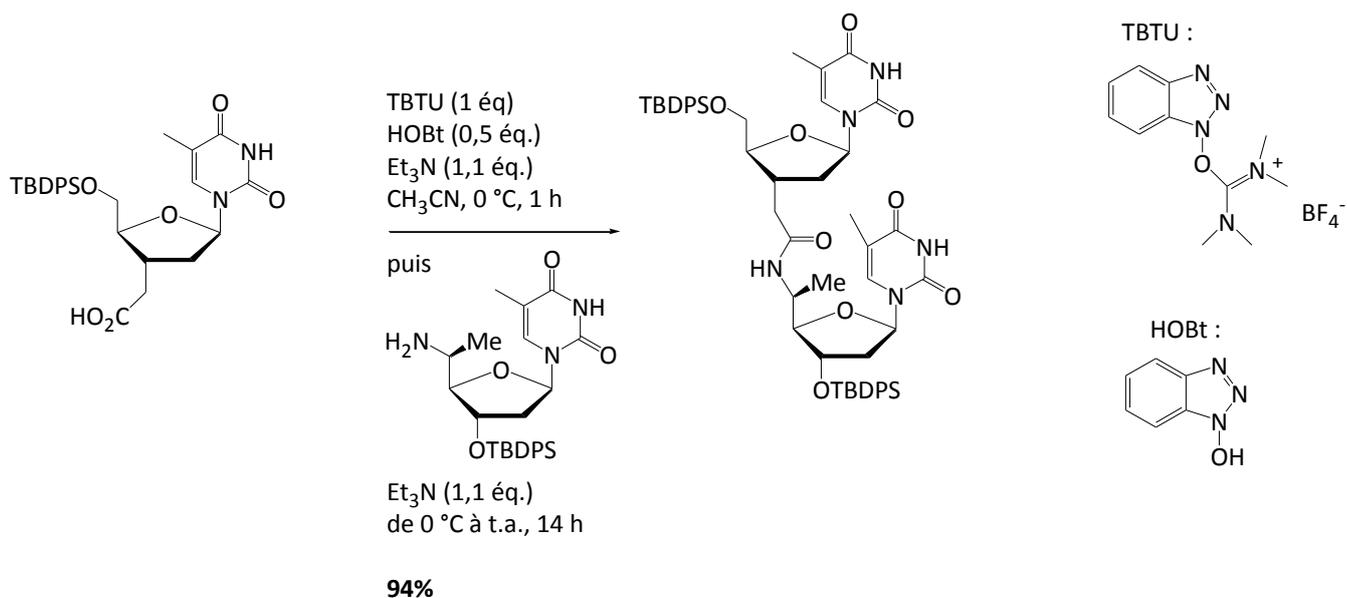
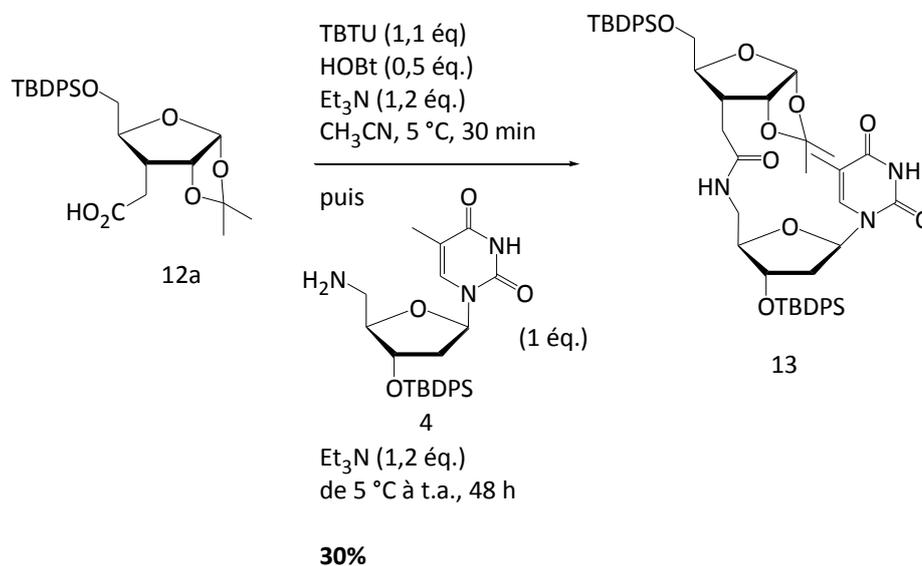


Schéma 30 : synthèse d'un dimère désoxyribonucléosidique par De Mesmaesker et Wendeborn.

A partir de l'acide **12a** (schéma 29) et de l'amine **4** (schéma 14) préalablement préparés, nous avons repris les conditions de couplages décrites par De Mesmaeker. Dans notre cas, le rendement n'a pas excédé 30% avec la présence de beaucoup d'éther silylé [(tBuPh₂Si)₂O] suggérant des conditions potentielles de déprotection (schéma 31).

Schéma 31 : couplage entre l'acide **12a** et l'amine **4**.

Les conditions de Cook^[41] (DCC/DMAP : 1 éq./0,4 éq.) n'ont pas amélioré les résultats.

Le couplage de l'amine **4** a également été effectué avec l'acide insaturé **14** (provenant de la saponification de l'ester insaturé **8**) pour tester les conditions de couplage sur un autre substrat et pour tester aussi la réduction de l'oléfine en position 3 sur un substrat différent de l'oléfine **8** (schéma 32). Ceci permettrait également de supprimer deux étapes (déprotection - protection).

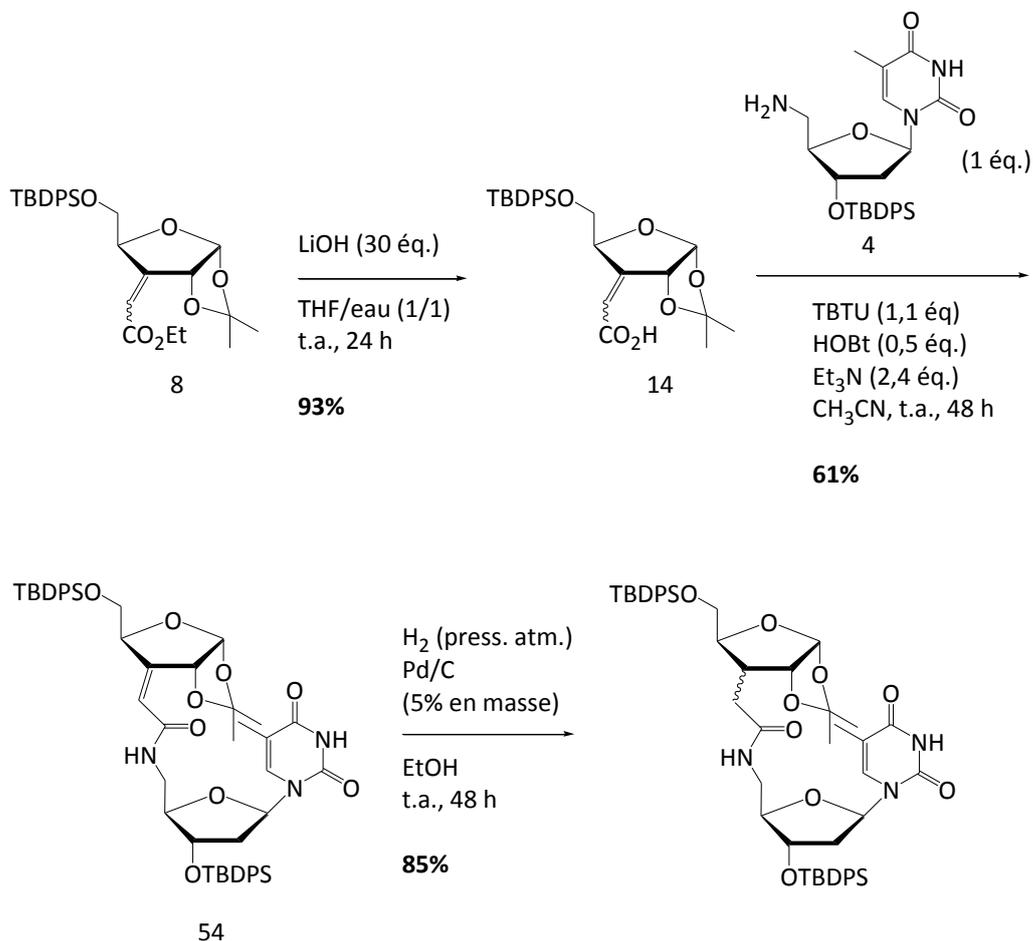


Schéma 32 : couplage entre l'acide **14** et l'amine **4**.

Le rendement du couplage peptidique a été amélioré sans pour autant atteindre un rendement très satisfaisant et malheureusement la réduction de l'oléfine n'a pas été stéréosélective, un mélange de deux diastéréoisomères dans un ratio 1/2 a été obtenu. Cette voie a donc été abandonnée.

Quelques auteurs^{[64],[105]} ont aussi décrit l'utilisation de dichlorométhane, l'acide carboxylique étant généralement activé au préalable avec un agent de couplage. L'article de Rozners^[64] a retenu notre attention car les rendements de couplage décrits restaient variables en fonction du groupement protecteur de l'alcool primaire (schéma 33).

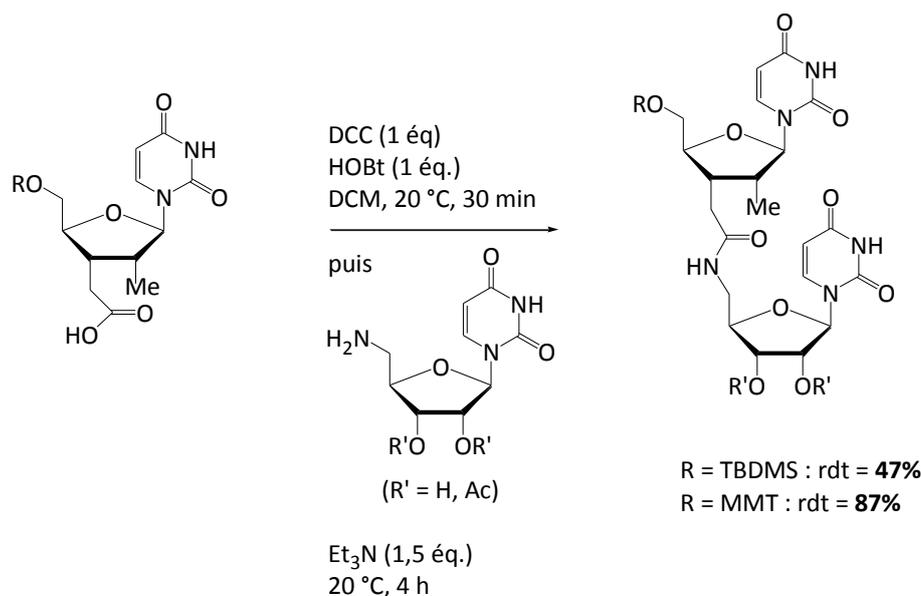


Schéma 33 : synthèse de dimères ribonucléosidiques par Rozners.

Dans notre stratégie, la stabilité du groupement protecteur silylé peut constituer un facteur limitant à diverses étapes. En effet, en 2010, l'équipe de Rozners^[73] a travaillé sur un ribose silylé et a présenté la coupure de l'acétonide comme l'étape la plus délicate de sa synthèse (schéma 34). L'éther silylé se dégrade partiellement dans les conditions classiques ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$: 1/2/60) et totalement dans diverses conditions : a) THF/TFA/ H_2O : 5/4/1, 25 °C, une nuit ; b) 80% acide acétique, 80 °C, une nuit ; c) 5% acide méthanesulfonique/MeOH, une nuit ; d) 0,3% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$, 25 °C, une nuit ; e) 0,5M HCl/THF, 50 °C, une nuit. Leur dérivé 1,2 diacétate a finalement été synthétisé de la manière suivante, avec un rendement global peu satisfaisant de 32% (schéma 34).

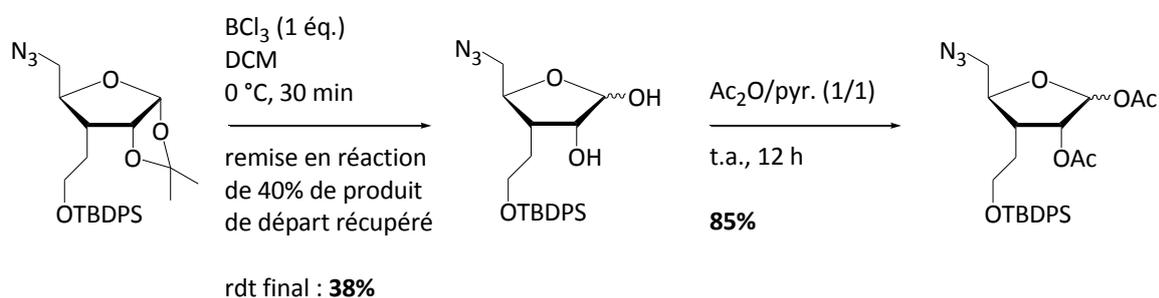


Schéma 34 : acétolyse d'un dérivé furanose par Rozners.

Une protection par un groupement benzyle a donc été choisie pour remplacer le groupement TBDPS en vue de résister aux conditions acides et basiques appliquées dans la suite de la synthèse. Une stratégie similaire a été utilisée par Wengel^[106] lors de la synthèse d'un

nucléoside à partir d'un ribofuranose (schéma 35) et ce pour les mêmes raisons de stabilité du groupement protecteur vis-à-vis des conditions acides (AcOH, TMSOTf) ou basiques (NaOH).

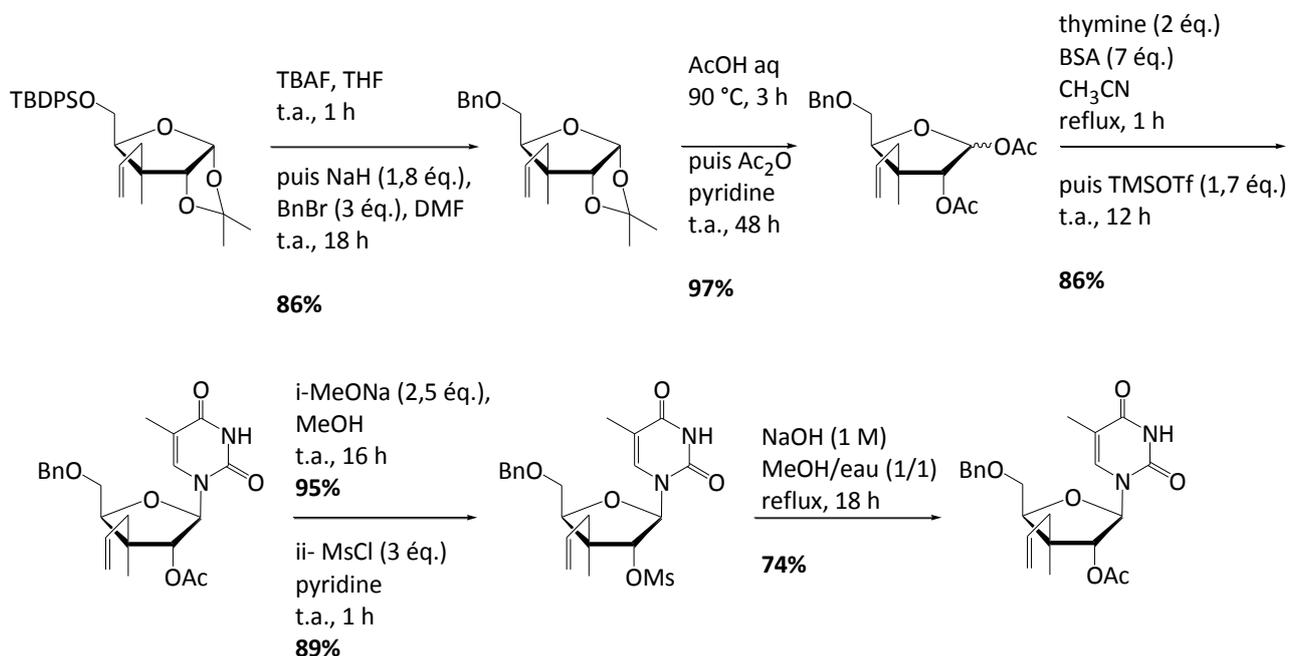


Schéma 35 : synthèse d'un ribonucléoside par Wengel.

2.4 Synthèse du dimère **15** (Bn/TBDPS) et glycosylation

L'alcool **10** a été benzylé en position 5 dans des conditions classiques, à savoir NaH/BnBr dans le THF ou le DMF. Les conditions anhydres ont dû être respectées sous peine d'observer une saponification partielle de l'ester ou une trans-estérification en ester benzylique. L'hydrolyse de l'ester **11b** a été quantitative en présence de LiOH et l'acide carboxylique **12b** a ainsi été obtenu avec un rendement global de 51% en 9 étapes à partir du D-xylose (schéma 36).

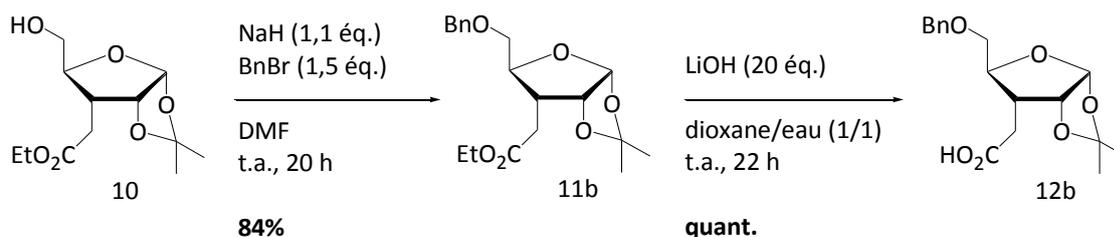


Schéma 36 : synthèse de l'acide **12b**.

Le couplage peptidique a été effectué avec succès dans les conditions classiques décrites par De Mesmaeker, nous avons simplement préféré le dichlorométhane à l'acétonitrile (schéma 37).

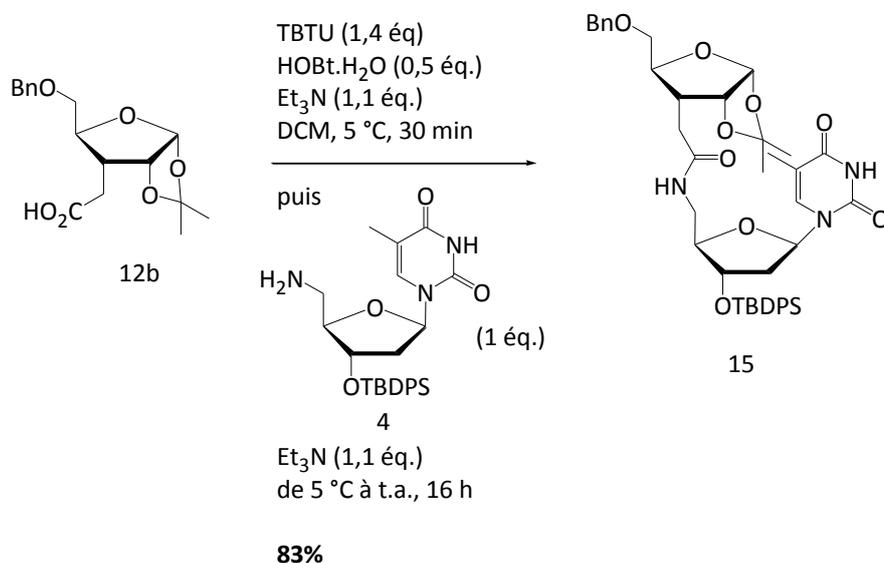


Schéma 37 : couplage peptidique entre l'acide **12b** et le nucléoside **4**.

Selon cette stratégie, le dimère **15** a été obtenu en 14 étapes avec un rendement global de 42%. Ce précurseur peut alors être engagé en réaction de glycosylation.

La création de la liaison glycosidique est une étape importante de notre stratégie. Cette liaison implique un donneur de glycosyle (un sucre) et un accepteur de glycosyle : un alcool ou un sucre pour les *O*-glycosylations, un carbone nucléophile pour les *C*-glycosylation et un azote nucléophile (nucléobase, acide aminé) pour les *N*-glycosylation.

Dans notre stratégie, la liaison sera créée entre le carbone anomérique d'un furanose (le donneur de glycosyle) et l'azote d'un hétérocycle basique (l'accepteur de glycosyle, de type purine ou pyrimidine dans le cas des bases azotées naturelles ou non). Les positions 1,2 du ribose seront libérées et activées en fonctions acétates comme indiqué sur le schéma rétrosynthétique **9** (page 47), les raisons de ce choix sont expliquées dans l'étude bibliographique qui suit.

2.4.1 Etude bibliographique de synthèse des nucléosides

En 1948, Todd (prix Nobel 1957) a publié la première synthèse de l'adénosine^[107] et de la guanosine^[108], inspiré par les travaux de Fischer et Helferich^[109], à partir d'un sel d'argent de la base chlorée et de 1-chloro-ribose *per*-acétylé.

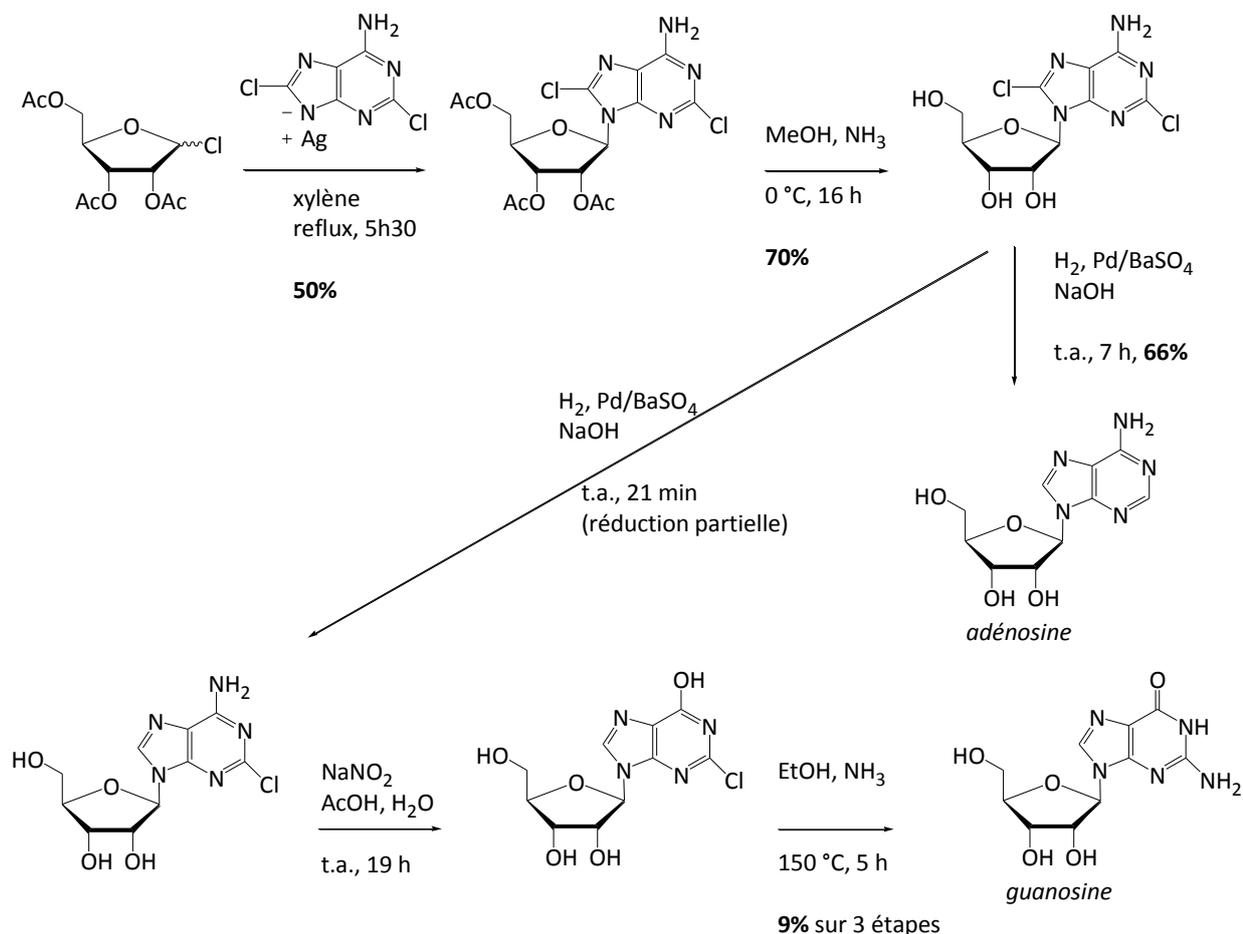


Schéma 38 : premières synthèses de l'adénosine et de la guanosine par Todd.

Une autre synthèse impliquant des métaux lourds (base azotée sous forme de sels de mercure) a été développée par Davoll dans le cadre d'un projet de synthèse de composés radio-marqués^[110].

Ces méthodes ont été revisitées en 1984 par R. K. Robins^[111] qui a proposé d'utiliser différentes purines sous forme de sels de sodium, moins chers et moins toxiques. Dans certains cas, les auteurs ont observé des problèmes de régiosélectivité (l'isomère N-7 a parfois été obtenu comme produit minoritaire). Cette réaction a été appliquée entre autres, à la synthèse de l'adénosine (schéma 39).

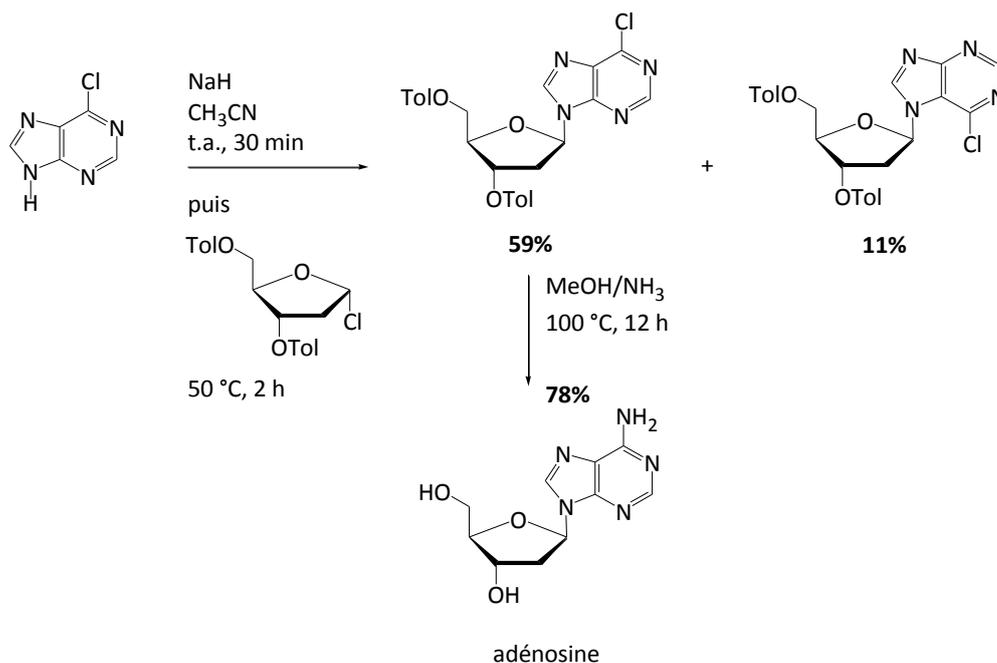


Schéma 39 : synthèse d'adénosine selon R. K. Robins.

Dès 1929, Hilbert et Johnson^[112] ont mis au point une réaction qui porte leur nom et qui implique une base pyrimidique *per*-méthylée.

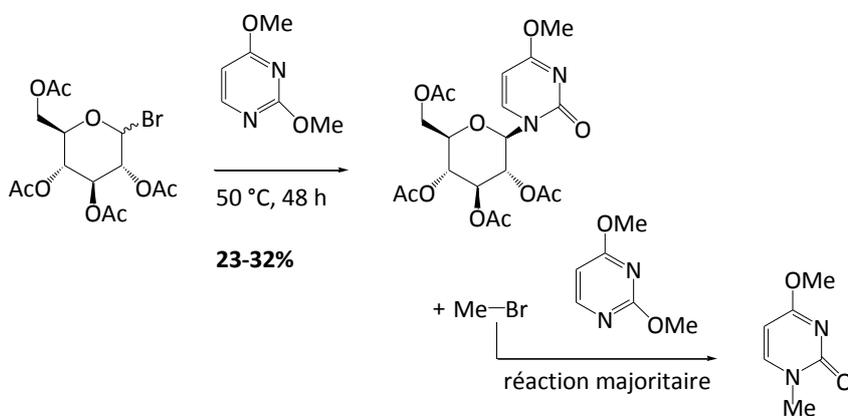


Schéma 40 : glycosylation de Hilbert et Johnson.

L'halogénure d'alkyle généré *in situ* dans ce type de réaction pose toujours problème aussi l'utilisation de bases pyrimidiques silylées a été envisagée par Nishimura^[113] (schéma 41).

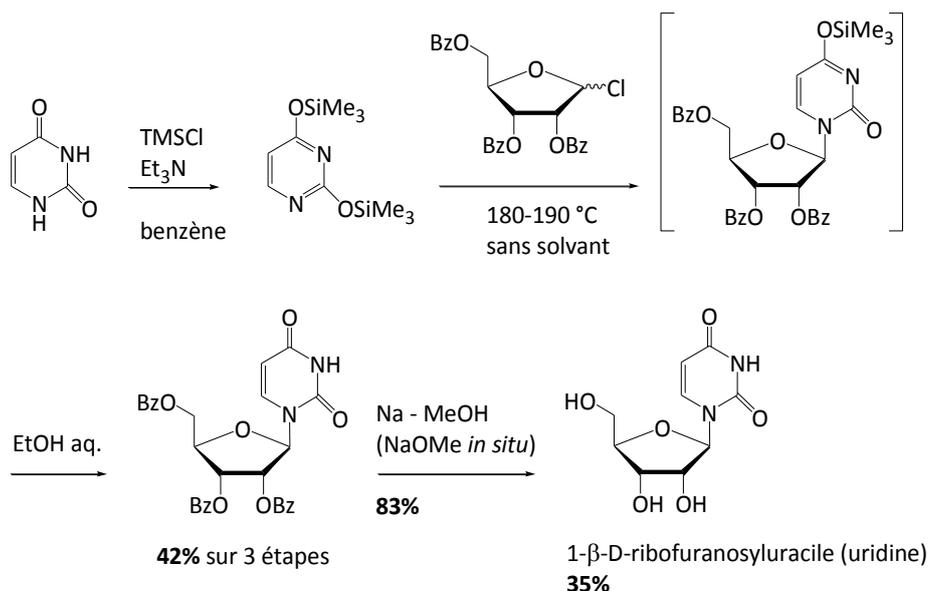


Schéma 41 : utilisation de bases silylées.

La même séquence appliquée à la thymine a permis aux auteurs d'obtenir la 1-β-D-ribofuranosylthymine (thymidine) avec un rendement de 46%.

En 1970, Vorbrüggen^[114a] a optimisé cette méthode par ajout d'un acide de Lewis (SnCl_4 , ZnCl_2 ou TMSOTf) ainsi qu'une base azotée silylée (méthode de Vorbrüggen, aussi appelée réaction silylée de Hilbert-Johnson). Les conditions de température assez douces de cette méthode permettent d'introduire des éthers ou un acétate en position anomérique qui sont plus accessibles que les dérivés halogénés (schéma 42).

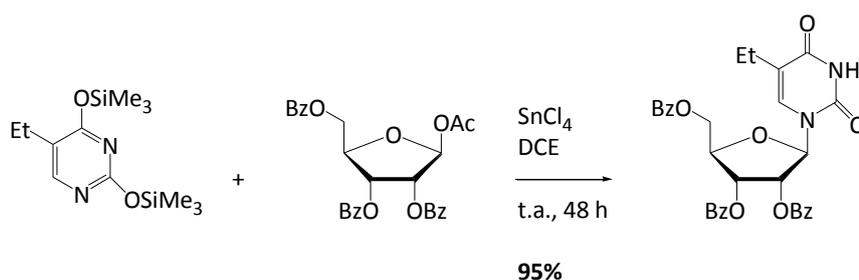


Schéma 42 : glycosylation de Vorbrüggen.

En 1978, Vorbrüggen^[114b] a amélioré sa méthode en proposant une silylation *in situ* de la base car la grande sensibilité des bases azotées silylées à l'humidité posait problème.

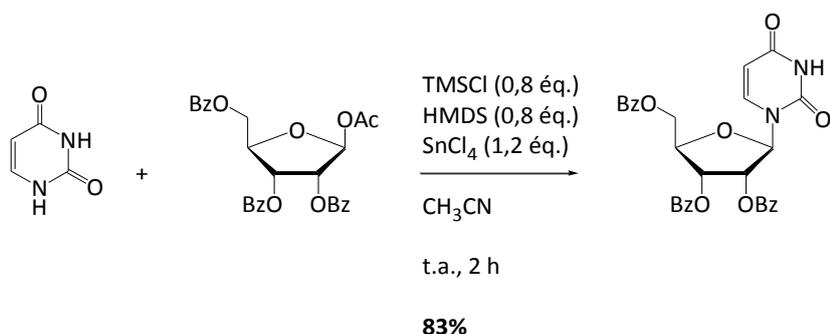


Schéma 43 : silylation in situ par Vorbrüggen.

La création de la liaison glycosidique doit s'accompagner d'un contrôle de la régiosélectivité de la substitution nucléophile avec la base (si elle possède plusieurs sites nucléophiles) et de la stéréosélectivité de l'attaque du carbone anomérique conduisant aux anomères α ou β .

En 1981, le même auteur^[115] propose l'utilisation de nouveaux acides de Lewis tels que $(\text{CH}_3)_3\text{SiClO}_4$ (TMSchlorate) et $(\text{CH}_3)_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (TMSOTf) qui ont l'avantage d'être moins acides que SnCl_4 mais suffisamment acide pour générer l'acyloxonium intermédiaire contrairement à TMSCl ou $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{SO}_4$ (bis(triméthylsilyl)sulfate). Ces nouveaux réactifs facilitent le traitement aqueux (absence d'émulsion contrairement à SnCl_4) et augmentent la régiosélectivité de la réaction (N-1 versus N-3 et N-9 versus N-7) donc le rendement en produits attendus (schéma 44).

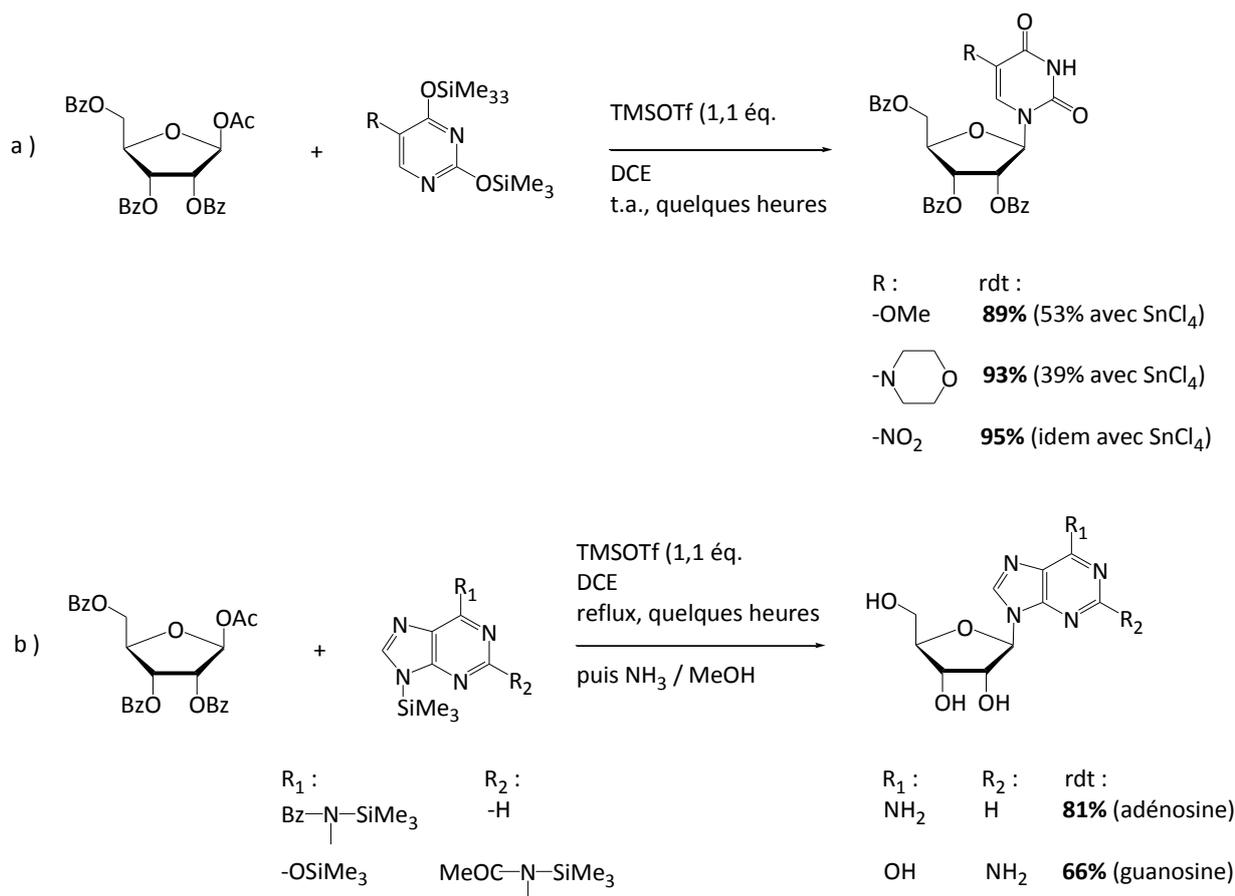


Schéma 44 : utilisation du TMSOTf pour la glycosylation selon Vorbrüggen.

La régiosélectivité des bases faiblement basiques telles que la thymine ou l'uracile persilylée avec un groupement électro-attracteur en position 5 (groupement nitro par exemple, schéma 44 partie a) étaient déjà très bonne avec SnCl₄ mais dans le cas de thymidine ou d'uracile plus basiques (groupement méthoxy ou morpholino en position 5, schéma 44 partie a) on constate que l'utilisation du TMSOTf est très bénéfique. Concernant la réaction avec les bases de types purines et notamment avec la guanosine (schéma 44 partie b), la régiosélectivité mise en avant par Vorbrüggen sera discutée par M. J. Robins en 1987^[116] à l'occasion de la publication d'une autre méthode de glycosylation régiosélective (schéma 45). Robins, qui a refait les expériences de Vorbrüggen, attribue l'obtention d'un seul régioisomère à la méthode de purification (cristallisation dans l'eau) et non à une quelconque régiosélectivité de la réaction.

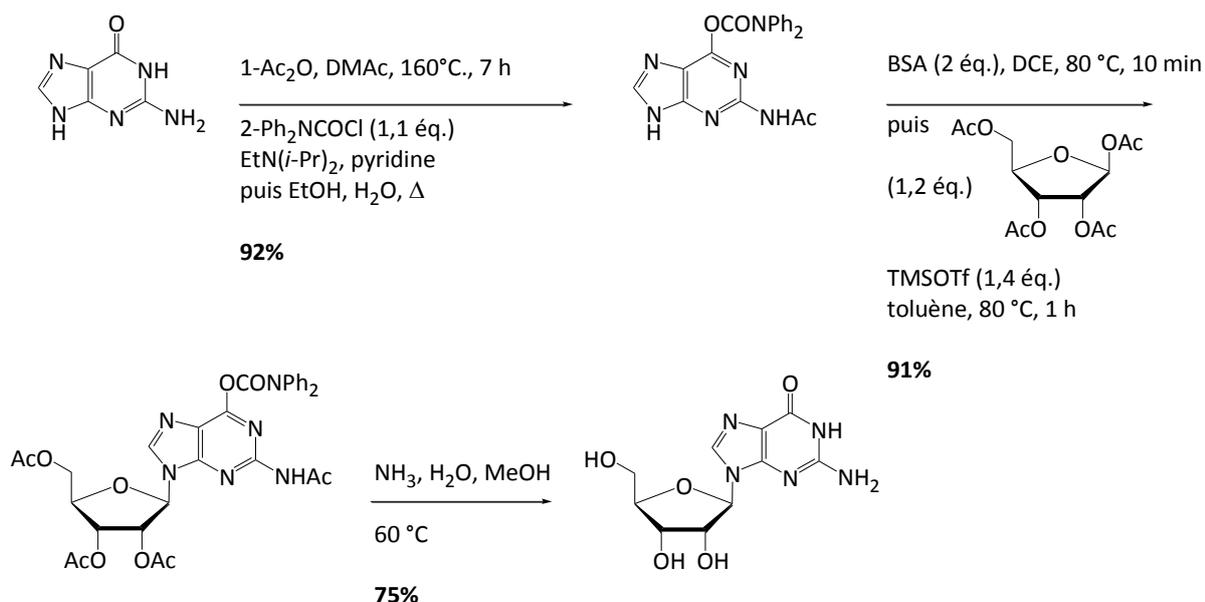


Schéma 45 : synthèse régiosélective de nucléosides puriques selon M. J. Robins^[116].

Les auteurs ont protégé tous les groupements de la base de manière à désactiver les sites nucléophiles et à assurer une régiosélectivité en N-9. Ils ont utilisé le BSA comme agent silylant d'activation de la base azotée et le TMSOTf comme acide de Lewis pour la réaction de couplage, ce sont aujourd'hui les conditions classiques de glycosylation d'une base azotée par un furanose. La même séquence réalisée par les auteurs sur le D-arabinose conduit à la 9- α -guanosine et à la 9- β -guanosine sur le D-xylose, toujours avec de bons rendements et sans détecter la présence du dérivé N-7.

La question de la régiosélectivité de la glycosylation des purines est toujours au coeur d'un débat entre Vorbrüggen et M. J. Robins qui a réaffirmé sa position dans un article en 2003^[117] soit 30 ans après la sortie de l'article de Vorbrüggen^[115]. En 2006, dans le but d'améliorer la synthèse de la Cladribine, Robins^[118] a mis au point une réaction de glycosylation à partir du chlorodésoxyribose dans un mélange de deux solvants qui offre des très bons rendements ainsi qu'une stéréosélectivité et une régiosélectivité excellentes (schéma 46).

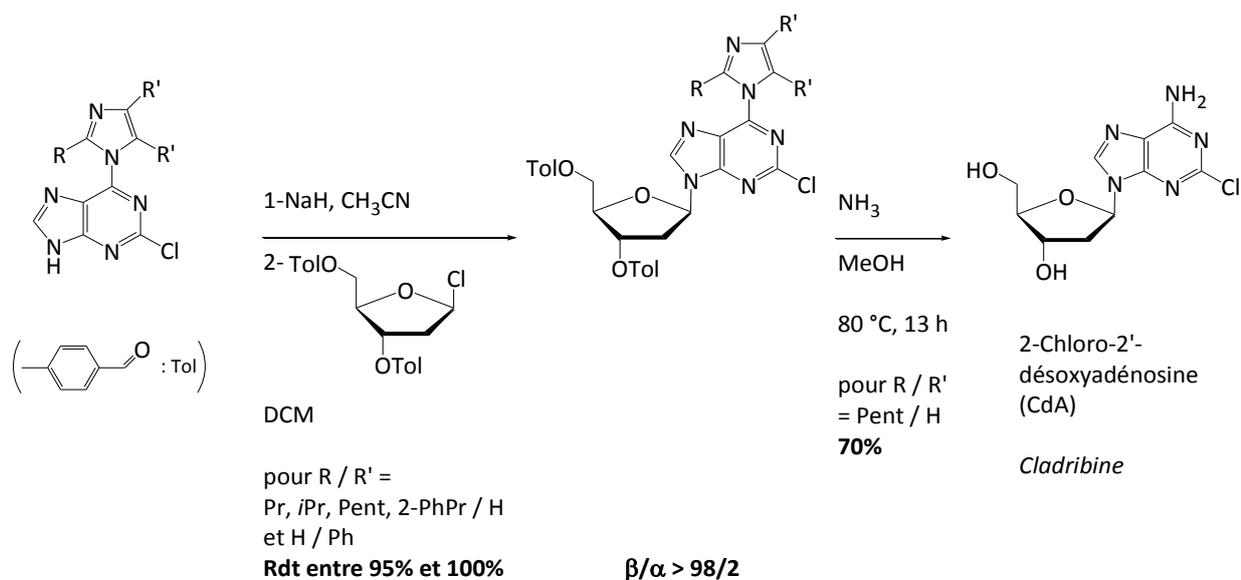


Schéma 46 : nouvelle synthèse stéréo et régiosélective de la Cladribine selon M. J. Robins^[118].

La réaction fournit exclusivement le régioisomère N-9, les groupements protecteurs sont enlevés en une étape dans le méthanol ammoniacal à chaud.

En 2014, l'équipe de Tsukamoto^[119] s'est intéressée à différents catalyseurs qui pourraient remplacer le TMSOTf, trop délicat à manipuler, et a obtenu de très bons résultats avec le perchlorate de 2-méthyl-5-phénylbenzoxazolium (schéma 47).

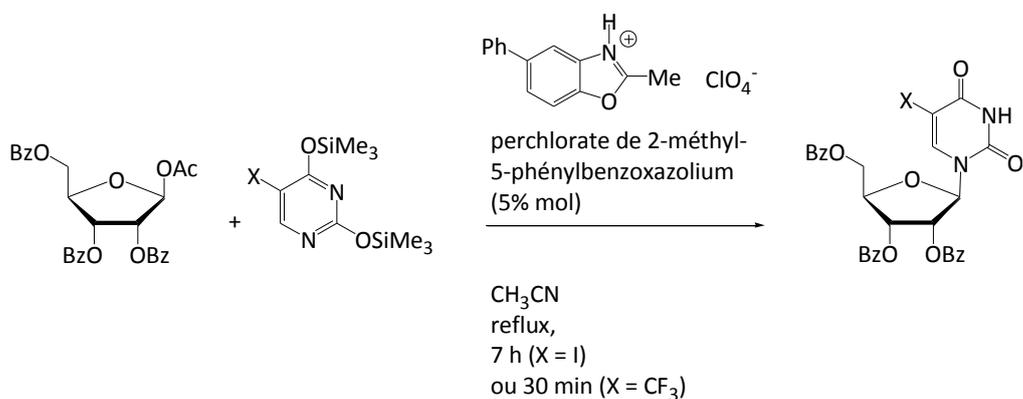


Schéma 47 : nouveau catalyseur pour la réaction de N-glycosylation.

Concernant le contrôle de l'anométrie, un groupement acyle (acétate ou benzoate) en position 2 est connu pour conduire à la création d'une liaison glycosidique en *trans* car l'acyloxonium intermédiaire dirige l'attaque nucléophile par la face opposée^[120]. En série D-ribose, cela conduit à l'anomère β (schéma 48).

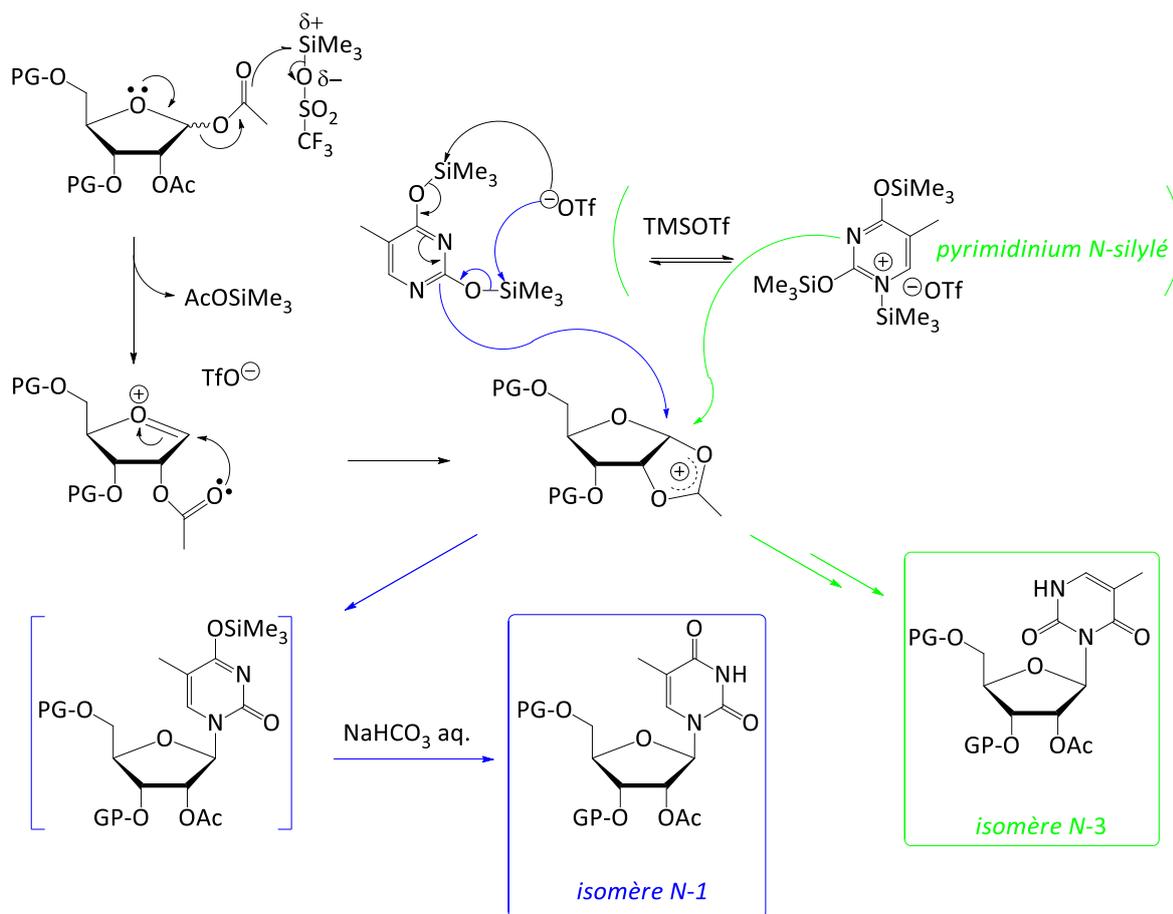


Schéma 48 : Mécanisme de glycosylation stéréocontrôlée (en bleu) selon Vorbrüggen.

La voie représentée en bleu (menant au régioisomère N-1) et celle en vert (menant au régioisomère N-3) sont issues de la publication. Le mécanisme de Vorbrüggen montre que le TMSOTf est nécessaire pour générer l'acyloxonium indispensable à la réaction de glycosylation. Or le pyrimidinium *N*-silylé monopolise un équivalent d'acide de Lewis et bloque donc la réaction. Par ailleurs, plus l'acide de Lewis est fort, plus ce complexe est favorisé, et plus l'isomère non naturel et non désiré N-3 du nucléoside est présent. Ceci explique que le TMSOTf est préféré au SnCl₄ (plus acide) et que l'acide de Lewis doit être mis en excès.

En 2013, Hayashi^[121] a étudié la stéréosélectivité de la *N*-glycosylation à l'occasion de la synthèse de nouveaux nucléosides ayant des bases pyrimidiques non naturelles (schéma 49). Il ressort de cette étude qu'avec un bon nucléophile (pyrimidin-2-one silylée ou pyrimidin-2-thione) et un très bon groupe partant en position anomérique (ici le fluor) menant très rapidement à l'oxocarbénium, l'attaque nucléophile a lieu avant que le groupement acyle en position 2 n'ait eu le temps de participer. La proportion de dérivé α est alors plus importante

que si le groupement partant est lent à partir (acétate) et si la base pyrimidique est faiblement nucléophile (base non silylée). Il apparaît que la quantité d'isomère α est très faible à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et plus élevée à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, dans tous les cas cette quantité diminue lorsque la réaction est poursuivie, elle baisse également lorsque l'acide de Lewis est en quantité très importante (10 éq.). Enfin l'étude indique qu'un anomère α pur en présence d'acide de Lewis et de base azotée à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se transforme progressivement en anomère β . Une des séries d'expérience est présentée sur le schéma 49.

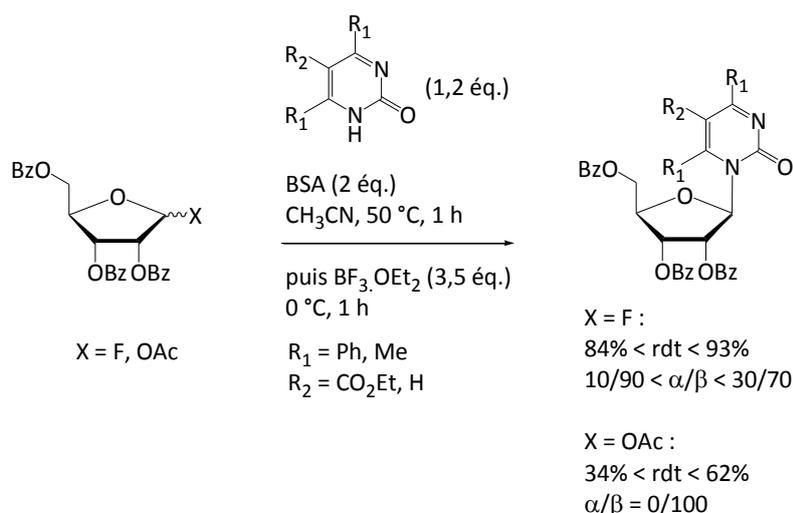


Schéma 49 : synthèse de nouveaux nucléosides selon Hayashi^[121].

Les auteurs concluent que l'anomérisation passe par un intermédiaire oxocarbénium catalysé par l'acide de Lewis. La proportion d'isomère α et β en fin de réaction serait donc liée à la fois à cinétique du groupe participant en position 2 et aux considérations thermodynamiques de l'anomérisation.

Concernant la synthèse d'un 2'-désoxyribonucléoside, il faut soit glycosyler en série ribose puis désoxygéner la position 2'^{[122],[123]}, soit utiliser un groupement participant en position 3' du désoxyribose. L'équipe de Mukaiyama a obtenu de très bons résultats en utilisant un groupement thiocarbamate en position 3 d'un 2-désoxyribose^[124] (schéma 50).

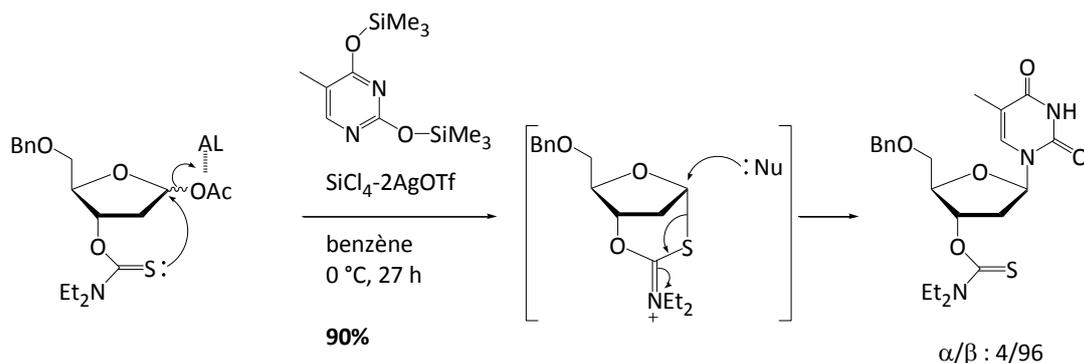


Schéma 50 : assistance d'un thiocarbamate en position 3 selon Mukaiyama.

L'assistance d'un groupement thiocarbamate en position 3 peut avoir lieu car la longueur de la liaison C=S (160 pm) est suffisante (contrairement à celle de la longueur C=O par exemple qui ne fait que 120 pm).

Plus récemment, l'équipe de Zhang^[125] a étudié l'influence de 17 groupements en position 3 d'un désoxyribose. Il est apparu que les groupements acétyle et benzoyle sont les moins efficaces (ratio $\beta/\alpha : 60/40$) et que les groupements avec un soufre ou un phosphore ne sont pas très satisfaisants (le thiocarbamate n'a pas été testé). Les groupements possédant une amine ou un amide ont fourni les meilleurs résultats et notamment l'amide représentée sur le schéma 51.

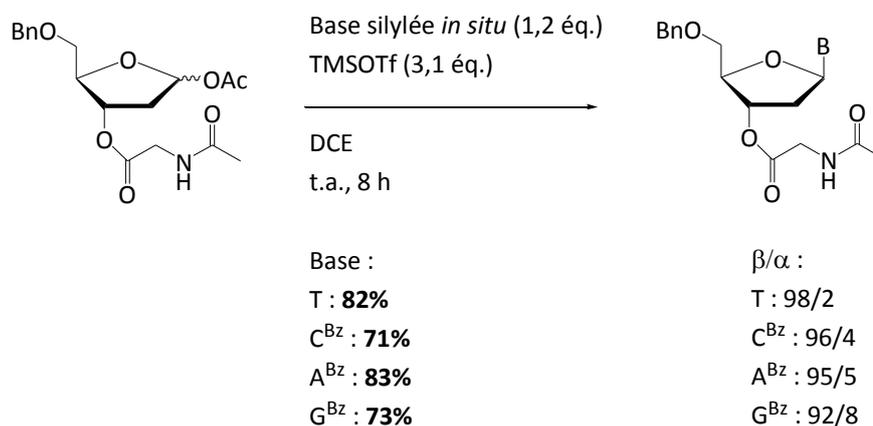


Schéma 51 : assistance d'un amide en position 3 selon Zhang.

L'alcool en C-3 est facilement libéré par hydrolyse basique (NaOH 1 M dans THF/eau).

Afin d'obtenir des nucléosides ayant les positions 1 et 2 du furanose en *cis*, Hanessian a développé une synthèse stéréocontrôlée grâce à une activation de la position anomérique par

un groupement MOP ou TOPCAT^[126] (schéma 52). Il a ainsi obtenu les anomères α en série D-ribose et β en série D-arabinose.

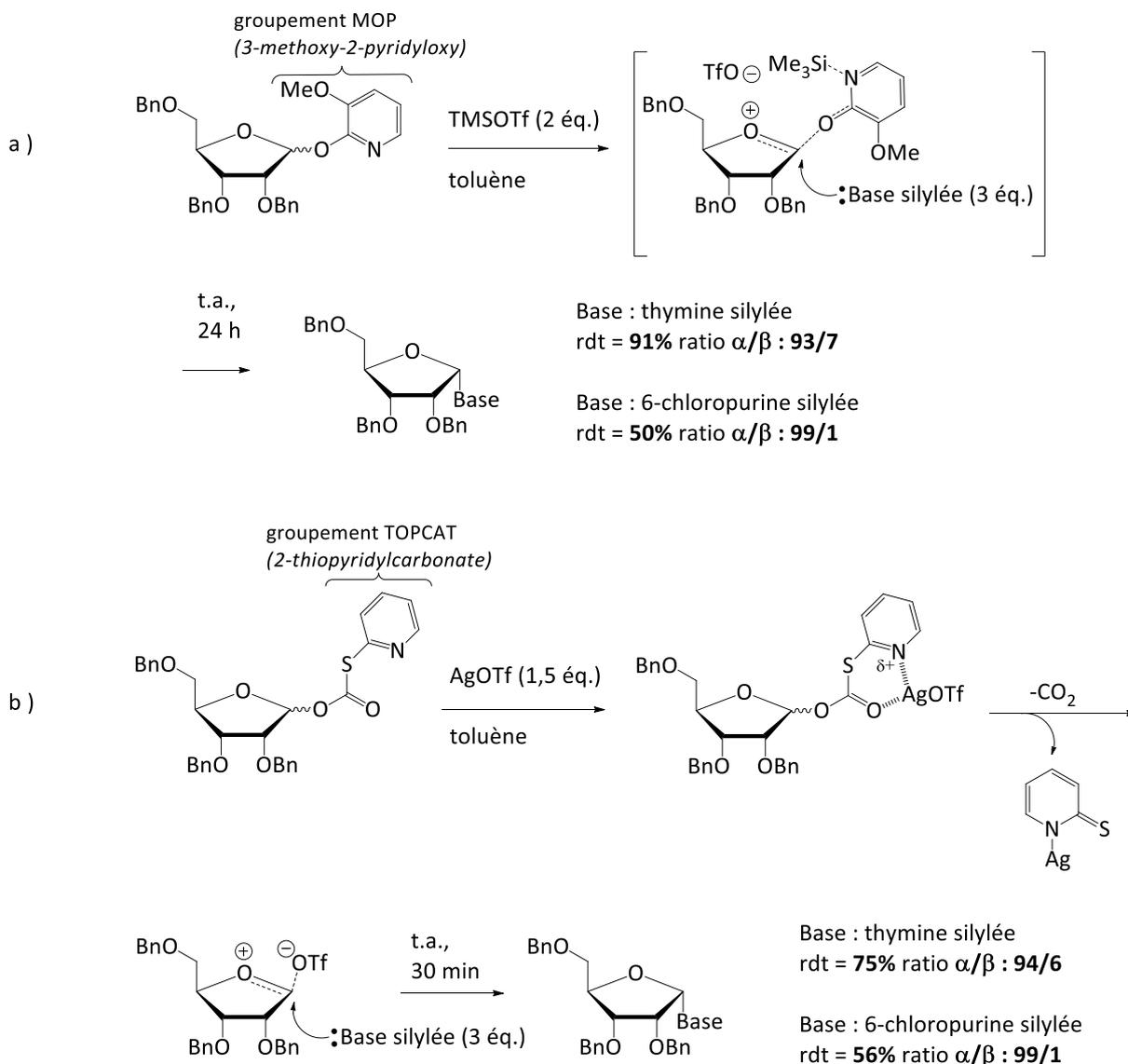


Schéma 52 : activation de la position anomérique par un groupement MOP ou TOPCAT.

La position anomérique peut être substituée par un chlore^[113] ou par un groupement méthoxy^[127] mais elle est le plus souvent substituée par un groupement acétoxy. Il peut s'agir d'un benzoate^[122] mais c'est le plus souvent un acétate, qui est, selon Vorbrüggen^[115], le meilleur groupe partant pour la formation de l'intermédiaire acyloxonium.

Ainsi les positions 1 et 2 de nos dérivés ribosidiques seront libérées et protégées sous forme d'acétates pour la réaction de β -glycosylation. Cette séquence de réactions a été fréquemment utilisée dans la littérature et le dérivé diacétate a été préparé en deux étapes ou en une seule.

2.4.2 Acétylase de l'isopropylidène en position 1,2 des dérivés ribosidiques.

Pour exemples, les nucléosides suivants ont été obtenus à partir de leurs précurseurs 1,2-*O*-isopropylidène en trois étapes comme décrit dans le schéma 53 et le tableau 6.

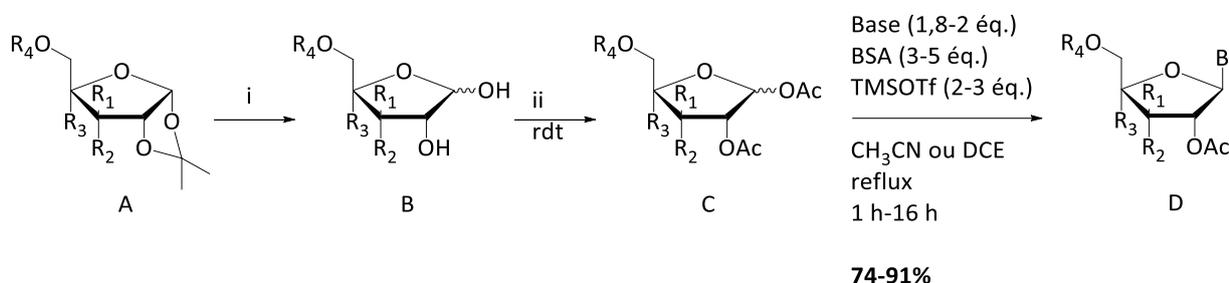


Schéma 53 : exemples d'acétylase en deux étapes dans la littérature.

Essais [réf]	Conditions	Rdt	Molécules C
1 ^[128]	i-AcOH aq. 80%, TFA, t.a., 4 h. ii-Ac ₂ O (10 éq.), DMAP (cat.), pyridine, t.a., 18 h.	35%	R ₁ =H ; R ₂ =OBn R ₃ =CH ₂ OEt ; R ₄ =TBDPS
2 ^[99]	i-TFA aq. 80%, t.a., 1h30. ii-Ac ₂ O (5 éq.), TMSOTf (0,1 éq.), DCM, 0 °C, 70 min.	88%	R ₁ =H ; R ₂ =OAc R ₃ =CH ₂ OMs ; R ₄ =Ms
3 ^[129]	i-AcOH aq. 80%, 90 °C, 3 h. ii-Ac ₂ O (17 éq.), pyridine, t.a., une nuit.	91%	R ₁ =CH ₂ OBn ; R ₂ =OBn R ₃ =CH ₂ OBz ; R ₄ =Bz

Tableau 6 : exemples d'acétylase en deux étapes dans la littérature.

L'essai 1 a fourni le dérivé di-acétate **C1** avec un rendement modeste, probablement dû à la présence du groupement protecteur silylé. Les essais 2 et 3 ont conduit avec succès, selon des méthodes différentes, à leur di-acétate correspondant **C2** et **C3**.

L'étape de *N*-glycosylation a quasiment toujours été menée dans les mêmes conditions (base azotée/BSA puis TMSOTf), les temps de réaction restant cependant très différents pour des substrats pourtant très proches.

D'autres travaux ont relaté des synthèses de nucléosides en seulement deux étapes à partir du précurseur 1,2-*O*-isopropylidène, ce qui implique une synthèse monotope du dérivé diacétate (schéma 54 et tableau 7). La glycosylation est ensuite réalisée dans les conditions décrites précédemment avec succès.

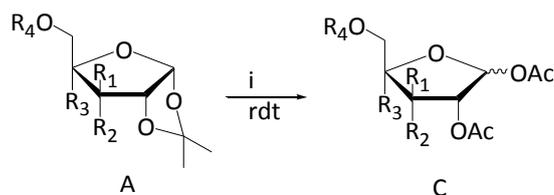


Schéma 54 : exemples d'acétylation monotopique dans la littérature.

Essais [réf]	Conditions	Rdt	Molécules C
1 [68]	i-Ac ₂ O (10 éq.), MeSO ₃ H (6 éq.), AcOH, t.a., 24 h.	83%	R ₁ =H ; R ₂ =CH ₂ CO ₂ Et R ₃ =H ; R ₄ =Bz
2 [130]	i-Ac ₂ O (4,5 éq.), H ₂ SO _{4c} (0,015%), AcOH, t.a., 16 h.	79%	R ₁ =H ; R ₂ =OBn R ₃ =Me ; R ₄ =TBDPS
3 [131]	i-Ac ₂ O (32 éq.), H ₂ SO _{4c} (3 éq.), AcOH, 0 °C, 3 jours.	82%	R ₁ =H ; R ₂ =NHAc R ₃ =H ; R ₄ =Ac
4 [132]	i-Ac ₂ O, CSA (0,2 éq.), AcOH, 70 °C, 10 min.	80%	R ₁ =H ; R ₂ =  R ₃ =H ; R ₄ =TBDPS

Tableau 7 : exemples d'acétylation monotopique dans la littérature.

En synthèse monotopique, les di-*O*-acétate **C** ont été obtenus avec des rendements homogènes très satisfaisants. La catalyse acide était assurée par différents acides plus ou moins forts comme l'acide sulfurique (pKa = -9 ; essais 2 et 3, tableau 7), l'acide méthylsulfonique (pKa = -0,6 ; essais 1, tableau 7), ou l'acide camphorsulfonique (pKa = 1,2 ; essais 4, tableau 7). Les travaux de Piettre^[133] (schéma 55) ont cependant montré que l'éther silylé en position 5 ne résiste pas aux conditions de déprotection de l'acétonide en présence d'H₂SO₄.

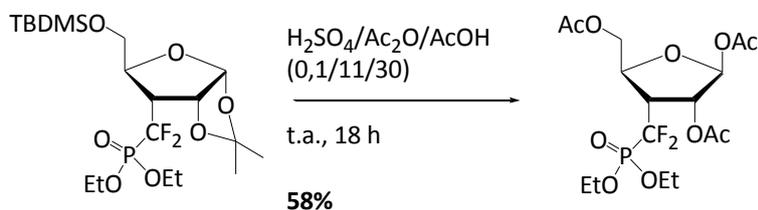


Schéma 55 : déprotection du groupement silylé en position 5 en milieu acide.

En plus de ces déprotections parasites, d'autres réactions secondaires peuvent être observées avec une fonction ester en position 3. En effet, M. J. Robins et Peterson^[66] ont observé, sur un

substrat proche du nôtre (et de celui de la référence 1 du tableau 7), la formation de lactone dans les conditions acides d'acétolyse (schéma 56).

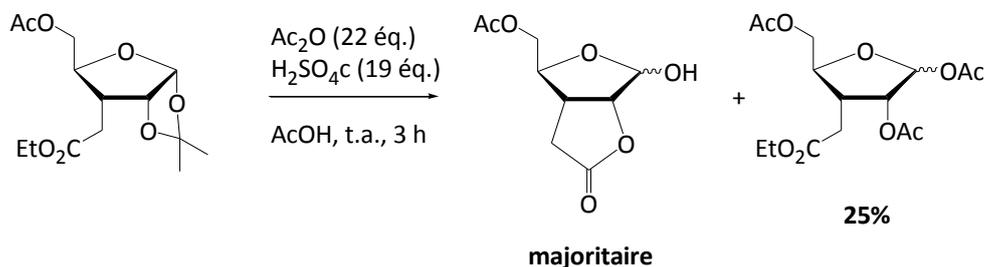


Schéma 56 : réaction secondaire lors de l'acétolyse par M. J. Robins et Peterson.

Les auteurs, dans un premier temps surpris par ce résultat, ont finalement fourni des références qui décrivaient déjà ce problème dont l'article de Lourens^[134] en 1975 (schéma 57).

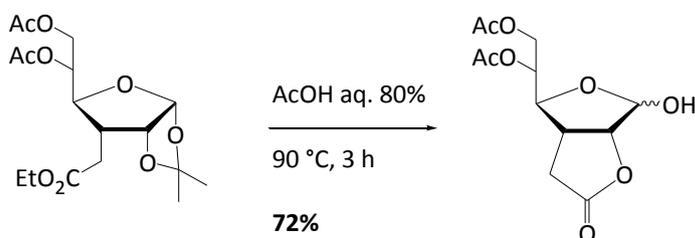


Schéma 57 : formation de lactone lors de la coupure de l'isopropylidène par Lourens.

Différentes méthodes ont donc été appliquées à notre substrat **15** en vue d'obtenir le di-O-acétate **16** (schéma 58). Les conditions en deux étapes (tableau 6, essai 1 : AcOH aq. 80%, TFA, t.a.) ont laissé le substrat intact après 4 heures de réaction. Des essais de réactions monotopes ont ensuite été envisagés et les résultats sont réunis dans le tableau 8.

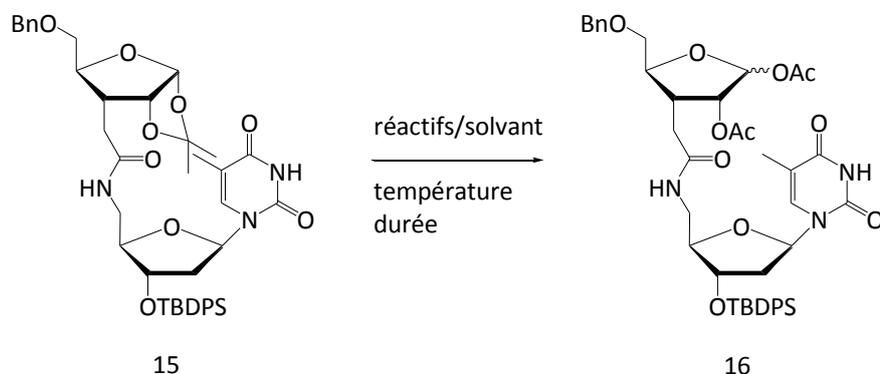


Schéma 58 : essais d'acétolyse mono-topes sur le substrat **15**.

Essais	Réactifs	T °C	Durée	Conv.	Rendement
1	Ac ₂ O (32 éq.), H ₂ SO ₄ c (3 éq.), AcOH (31 éq.)	0 °C	20 h	100%	dégradation
2	Ac ₂ O (40 éq.), H ₂ SO ₄ c (0,15 éq.), AcOH + Ac ₂ O (40 éq.), H ₂ SO ₄ c (0,15 éq.), AcOH	t.a.	16 h	40%	20% + perte des GP
			24 h	100%	
3	Ac ₂ O (40 éq.), H ₂ SO ₄ c (0,12 éq.), AcOH + H ₂ SO ₄ c (0,12 éq.)	t.a.	45 h	58%	50% + dégradation
			1h30	80%	
4	Ac ₂ O (40 éq.), H ₂ SO ₄ c (0,28 éq.), AcOH + H ₂ SO ₄ c (0,3 éq.)	t.a.	20 h	incomp	dégradation
			2 h		
5	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,2 éq.), AcOH	70°C	2 h	100%	35% + perte des GP
6	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,08 éq.), AcOH + CSA (0,08 éq.)	70°C	1 h		45% + perte des GP
		70°C	1 h	100%	

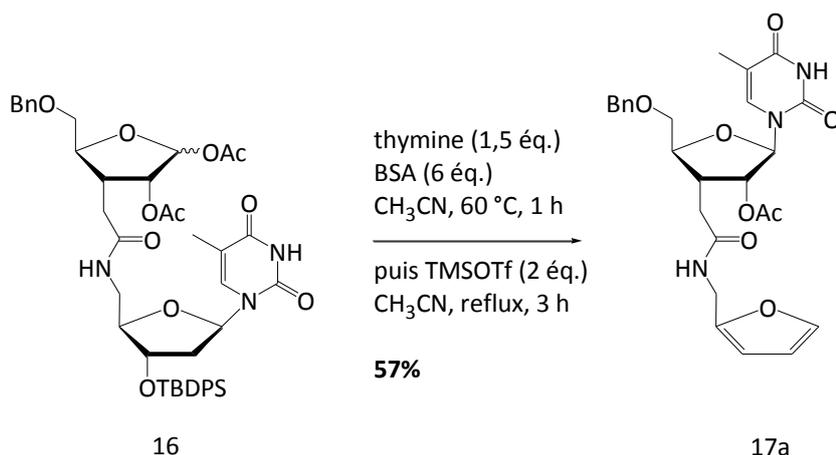
Tableau 8 : essais d'acétolyse monoatome sur le substrat **15**.

La catalyse à l'acide sulfurique (essais 1 à 4, tableau 8) reste difficile à optimiser pour avoir une conversion correcte sans dégrader le substrat ou le produit. Les conditions de l'essai 3 ont fourni le meilleur résultat mais restent trop aléatoires. En présence de CSA (essai 6, tableau 8) le rendement reste modeste mais bien reproductible. Le dimère **16** a ainsi été synthétisé en 15 étapes avec un rendement global de 19%. Il semble évident que la présence du groupement TBDPS sur la partie nucléosidique de ce dimère **15** implique la perte en produit **16** comme nous l'avons montré précédemment.

Puisque le composé **16** a néanmoins été obtenu en quantité suffisante, la glycosylation a été envisagée.

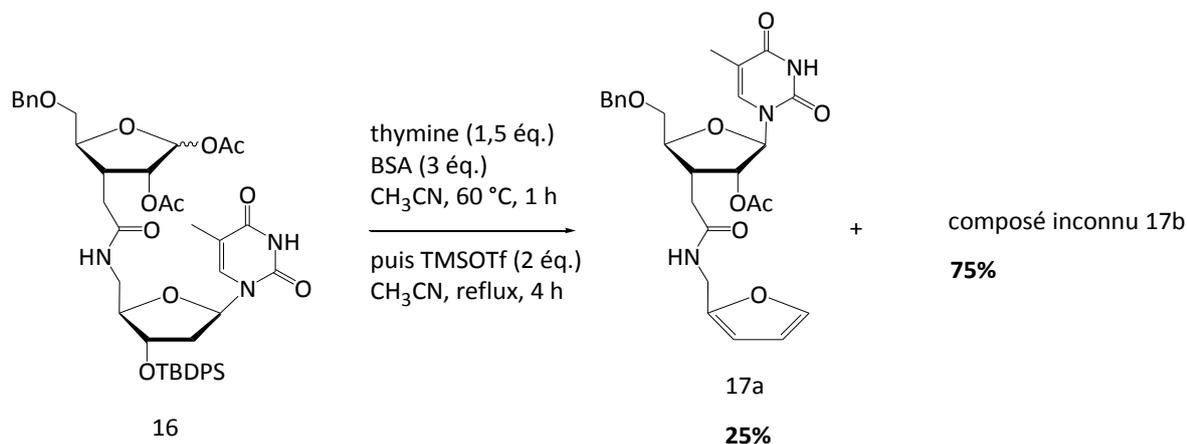
2.4.3 Glycosylation du précurseur 1,2-O-acétate **16**

L'étude bibliographique de cette réaction a montré que la méthode utilisant une base azotée préalablement *per*-silylée, et catalysée par des chlorures stanniques (SnCl₄), est encore utilisée par certains auteurs mais la méthode mettant en jeu une base azotée silylée *in situ* par le BSA/TMSOTf est désormais la plus répandue.

Schéma 59 : premier essai de glycosylation du substrat **16**.

La réaction de *N*-glycosylation n'a pas donné le résultat attendu. Après deux purifications sur gel de silice, une fraction d'un produit pur a été obtenue et le produit a été caractérisé. Le rendement de cette fraction était de 57%. L'analyse par spectrométrie de masse proposait comme formule brute C₂₆H₂₉N₃O₈ différente de celle du produit attendu. L'étude RMN menée par le Dr. Virginie Silvestre l'a conduite à nous proposer comme seule et unique structure possible la structure **17a** possédant comme formule brute C₂₆H₂₉N₃O₈.

La réaction a été essayée une seconde fois dans des conditions similaires (schéma 60).

Schéma 60 : deuxième essai de glycosylation du substrat **16**.

Après une purification, le produit **17a** a été obtenu en mélange avec un second produit nommé **17b**. Le mélange de ces composés a été analysé par RMN (proton et carbone) sans succès pour cause d'instabilité dans le CDCl₃.

Concernant la formation du composé **17a**, nous pouvons proposer plusieurs mécanismes (schémas 66-68). Le mécanisme classique d'hydrolyse en milieu acide de la liaison *N*-glycosidique est représenté au schéma 61.

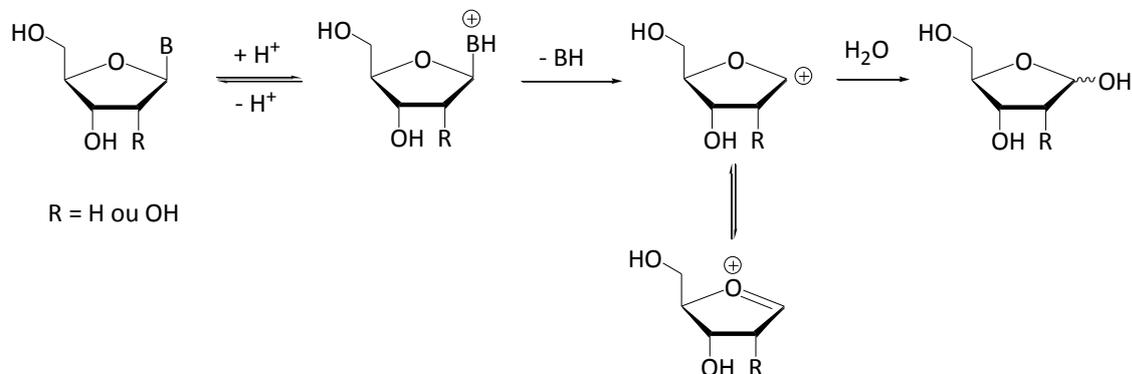


Schéma 61 : hydrolyse acide de la liaison *N*-glycosidique.

En milieu acide à chaud, l'oxocarbenium intermédiaire pourrait évoluer comme décrit au schéma 62.

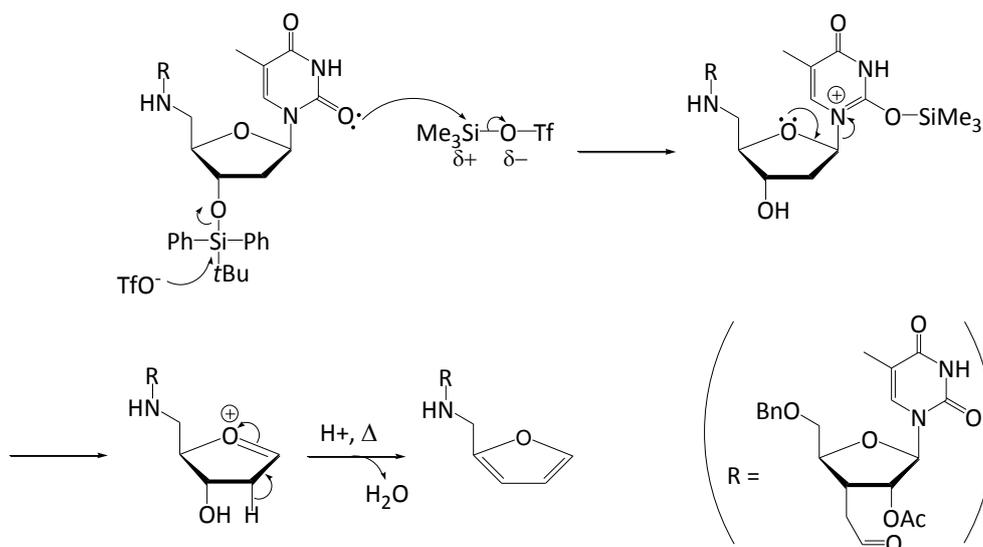


Schéma 62 : obtention du dérivé furanique en milieu acide à chaud.

Le schéma 63 propose une autre voie pour expliquer la formation du composé **17a**.

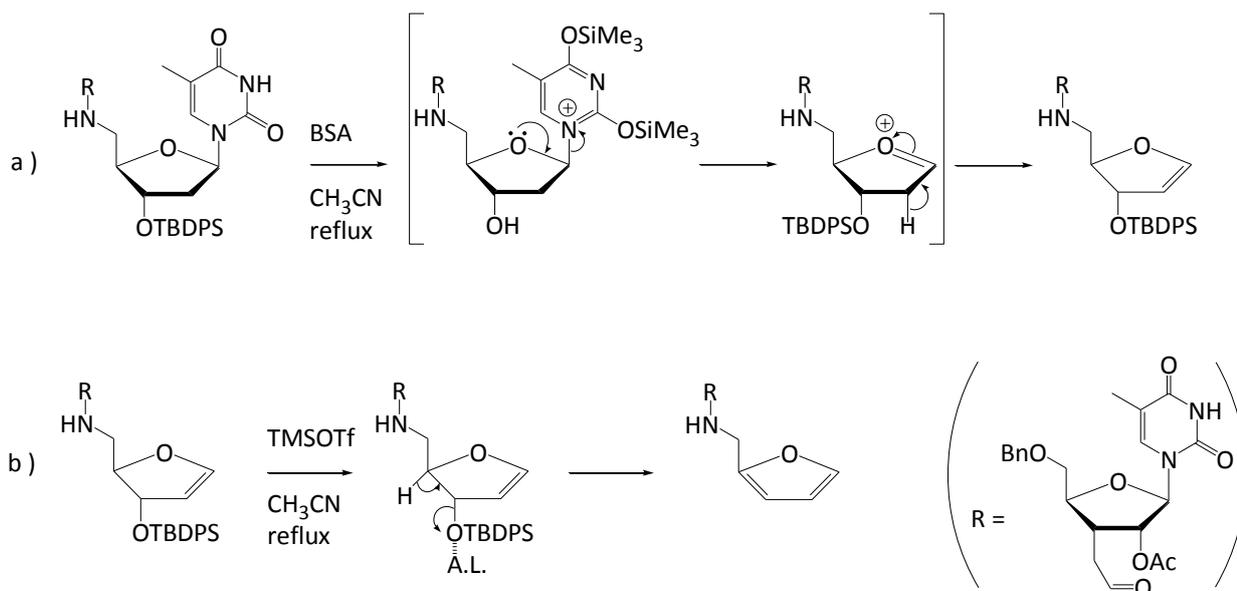


Schéma 63 : proposition de mécanisme lors de l'ajout de BSA (partie a) puis lors de l'ajout de TMSOTf (partie b).

Le mécanisme du schéma 63a est soutenu par un article de Pedersen^[135] qui effectue cette réaction pour la synthèse de glycols en une étape (schéma 64).

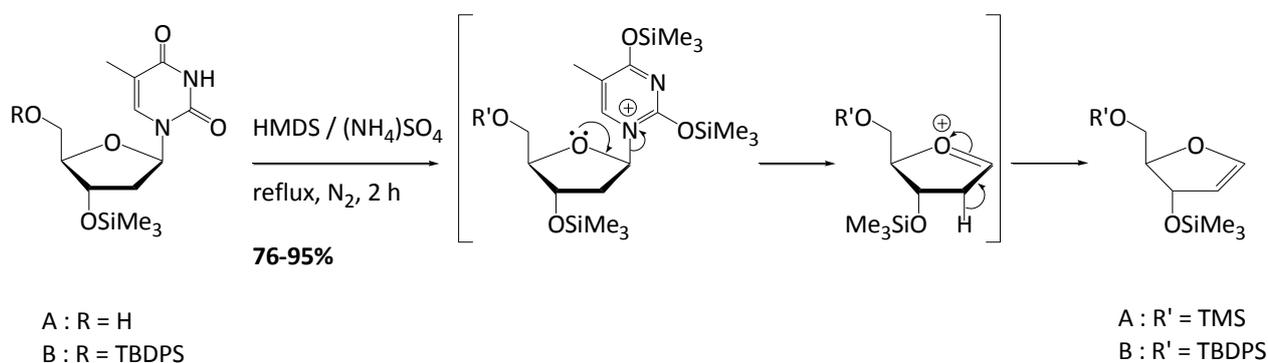


Schéma 64 : synthèse de glycol par Pedersen.

Cette réaction a été reprise de nombreuses fois dans la littérature^{[136],[137],[138],[139]} les auteurs précisant avoir fait leur transformation dans les "conditions de Pedersen".

La partie b du schéma 63 est à rapprocher d'une réaction non souhaitée rencontrée par Tan^[139] lors de la synthèse de l'Acortatarins A et présentée par l'auteur comme une élimination de type Ferrier sur son substrat pyrrologlycol (schéma 65).

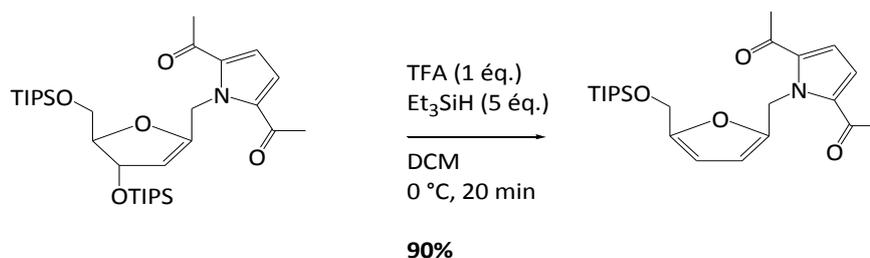


Schéma 65 : élimination de Ferrier décrite par Tan.

Le composé inconnu **17b** pourrait être une forme insaturée intermédiaire menant au furfuryl **17a**. L'insaturation proviendrait de l'élimination de la fonction en 3' comme cela est décrit pour la synthèse des 2',3'-dihydro-2',3'-dideoxynucléosides dans la littérature^{[140],[141]}, une réaction est présentée sur le schéma 66.

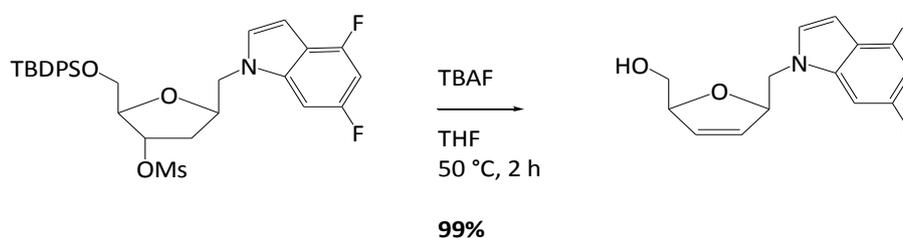


Schéma 66 : synthèse d'un 2',3'-dihydro-2',3'-dideoxynucléoside.

Le mécanisme de formation du composé **17a** à partir du composé **17b** pourrait s'inspirer du mécanisme décrit par Schinazi^[142] dont tous les substrats D4-nucléosides se dégradent en perdant leur base azotée, en milieu acétique dilué à 50 °C (schéma 67).

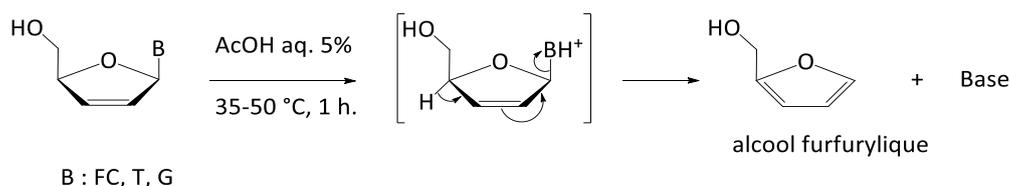


Schéma 67 : dégradation des substrats D4-nucléosides de Schinazi.

Quel que soit le mécanisme de dégradation, il apparaît encore une fois évident que le groupement silylé en position 3' ne résiste pas aux conditions de glycosylation. Il a donc été remplacé par un groupement benzyle. A ce stade de nos recherches, l'objectif était toujours d'atteindre rapidement le substrat de la glycosylation aussi avons nous préféré synthétiser la 5'-

amino-3'-*O*-benzyl-thymidine **23** qui était décrite plutôt que le 1,2-*O*-isopropylidene-3-*O*-benzyl-5-amino- α -D-ribofuranose dont la plupart des étapes restaient à mettre au point.

2.5 Synthèse du dimère **27** (GP = Bn) et glycosylation

La synthèse de la 5'-amino-3'-*O*-benzyl-thymidine passe par la 3'-*O*-benzylthymidine qui a été décrite par Griffin et Todd^[143] en 1958 à partir de la 5'-tritylthymidine elle-même décrite par Michelson et Todd^[144] en 1953 (schéma 68).

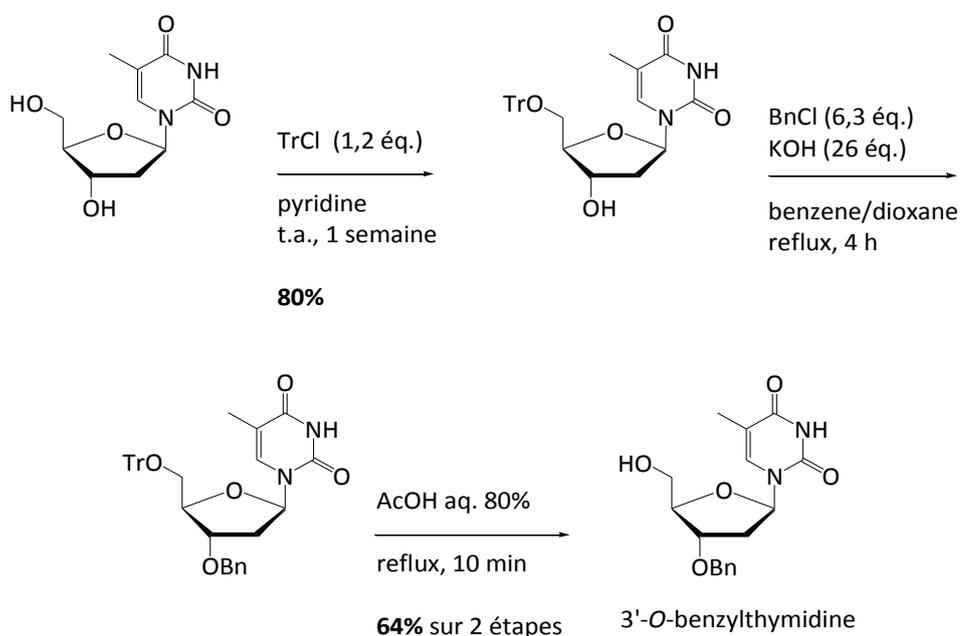


Schéma 68 : synthèse de la 3'-*O*-benzylthymidine par Griffin et Todd.

Pour les deux premières étapes nous avons apporté quelques modifications à ces modes opératoires, comme l'ajout de DMAP et un chauffage afin de raccourcir le temps de réaction de la tritylation (schéma général 78) première étape. Pour la benzoylation, les quantités de KOH qui compliquaient le traitement par filtration, ont été diminuées ainsi que les quantités de chlorure de benzyle. Le rendement en 3'-*O*-benzylthymidine sur 2 étapes après détritylation reste satisfaisant (45%, schéma 74) par rapport à la littérature.

La transformation de l'alcool primaire 5' en amine a été inspirée du schéma 14 (paragraphe 2.1) de synthèse de l'amine **4**. Cependant la tosylation de cet alcool **20** n'a pas été aussi efficace que

celle réalisée sur la thymidine (les rendements étant en moyenne de 75%) et la méthylation s'est montrée plus rapide et plus efficace (rendement supérieur à 95%). La substitution nucléophile par l'azoture de sodium a toujours fourni le composé souhaité avec des rendements quantitatifs. Dans le but de raccourcir le nombre d'étapes, une réaction monotope a été envisagée entre l'alcool **20** et $\text{PPh}_3/\text{CBr}_4/\text{NaN}_3$ en vue d'obtenir l'azoture **22**, comme décrit par Hata en 1975^[145] et repris par Xie en 2000^[146] sur des dérivés uraciles assez proches de **20**.

Le mécanisme de cette transformation est proposé par Hata comme représenté sur le schéma 69.

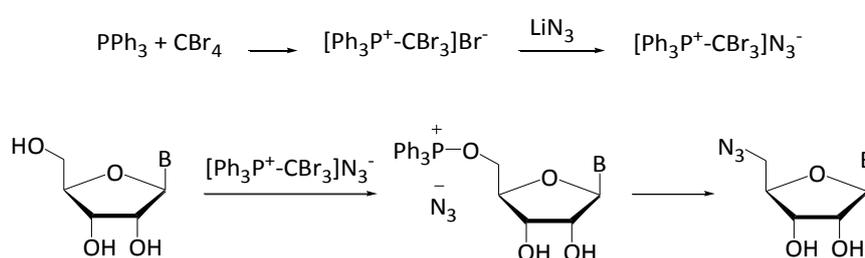


Schéma 69 : mécanisme d'obtention de l'azoture selon Hata.

On peut aussi imaginer que la première étape est une bromation (réaction de Appel) suivie d'une substitution nucléophile du brome par l'azoture. Cette réaction monotope a été réalisée sur le nucléoside **20**, l'ajout des réactifs se fait en une seule fois, dans cet ordre, et la réaction est chauffée pendant 15 heures.

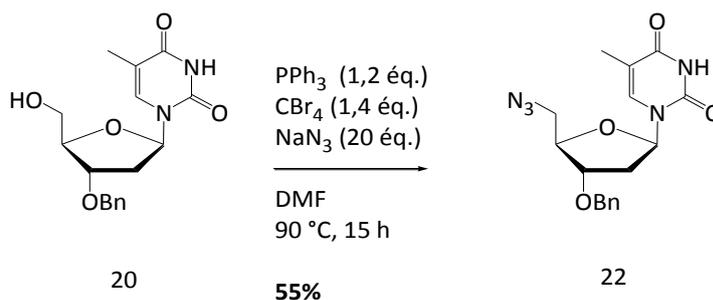


Schéma 70 : synthèse monotope de l'azoture **22**.

En doublant les quantités de réactifs, le rendement en azoture **22** est passé de 55% à 65% ce qui restait inférieur aux 90% obtenus sur deux étapes.

La dernière étape vers la synthèse de l'amine **23** est la réduction de l'azoture **22**. Des méthodes classiques, telles que la réduction de Staudinger^[147] ou la méthode au chlorure stanneux

(SnCl₂)^[76], auraient pû être envisagées mais nous avons opté pour une hydrogénation qui est très simple à purifier contrairement aux deux méthodes citées, et qui est toujours quantitative. Jusqu'à très récemment, peu d'articles décrivaient l'hydrogénation d'un azoture sur un substrat ribosique benzylé. L'équipe de Zou^[148] l'a réalisée en 2005 sur ce type de substrat en contrôlant le temps de réaction (20 minutes) afin de ne pas affecter les groupements benzylés (schéma 71).

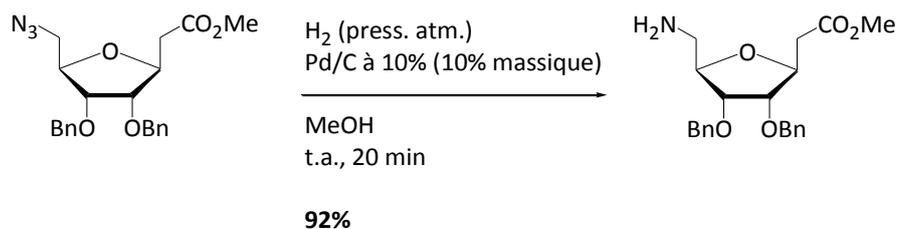


Schéma 71 : réduction d'un azoture par hydrogénation selon Zou sur un dérivé du furanose.

En 2008, la même équipe a réalisé cette réaction sur un dérivé du galactose^[149], qui dans des conditions plus dures (30% massique de catalyseur), résistait très bien (schéma 72). En avançant dans ce travail, nous avons constaté dans la littérature et expérimentalement que la réactivité variait beaucoup d'un sucre à l'autre, même de structure très proche.

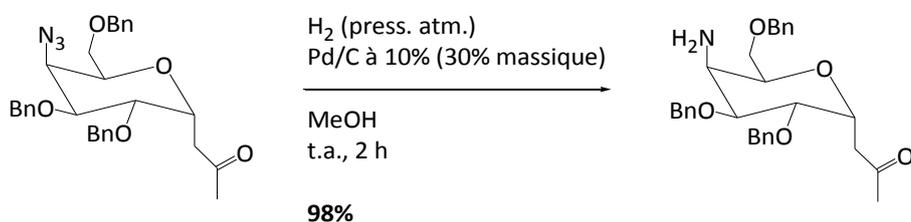


schéma 72 : réduction d'un azoture par hydrogénation selon Zou sur un dérivé du galactose.

Quelques articles plus récents^{[150],[151]}, ont également décrit l'hydrogénation pour réduire un azoture avec succès dans des conditions assez classiques (H₂ à pression atmosphérique, Pd/C 10% (10% massique), quelques heures). Cependant, très récemment, les travaux de Siriwardena^[152], ont montré à quel point la réduction sélective de l'azoture pouvait être délicate, puisqu'après 6 heures dans l'acétate d'éthyle seul l'azoture était réduit tandis qu'après 12 heures dans le méthanol ils observaient en plus une débenzylation (schéma 73).

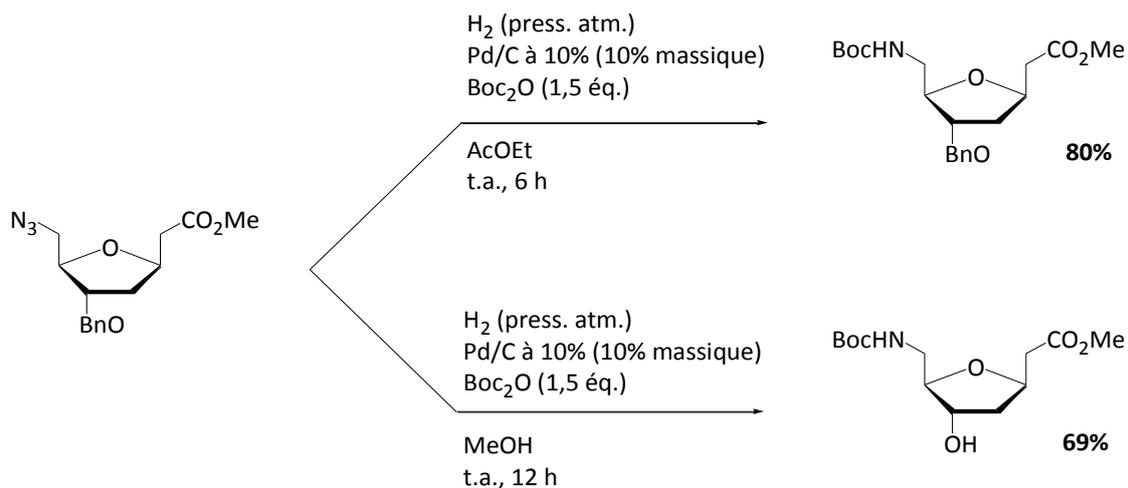
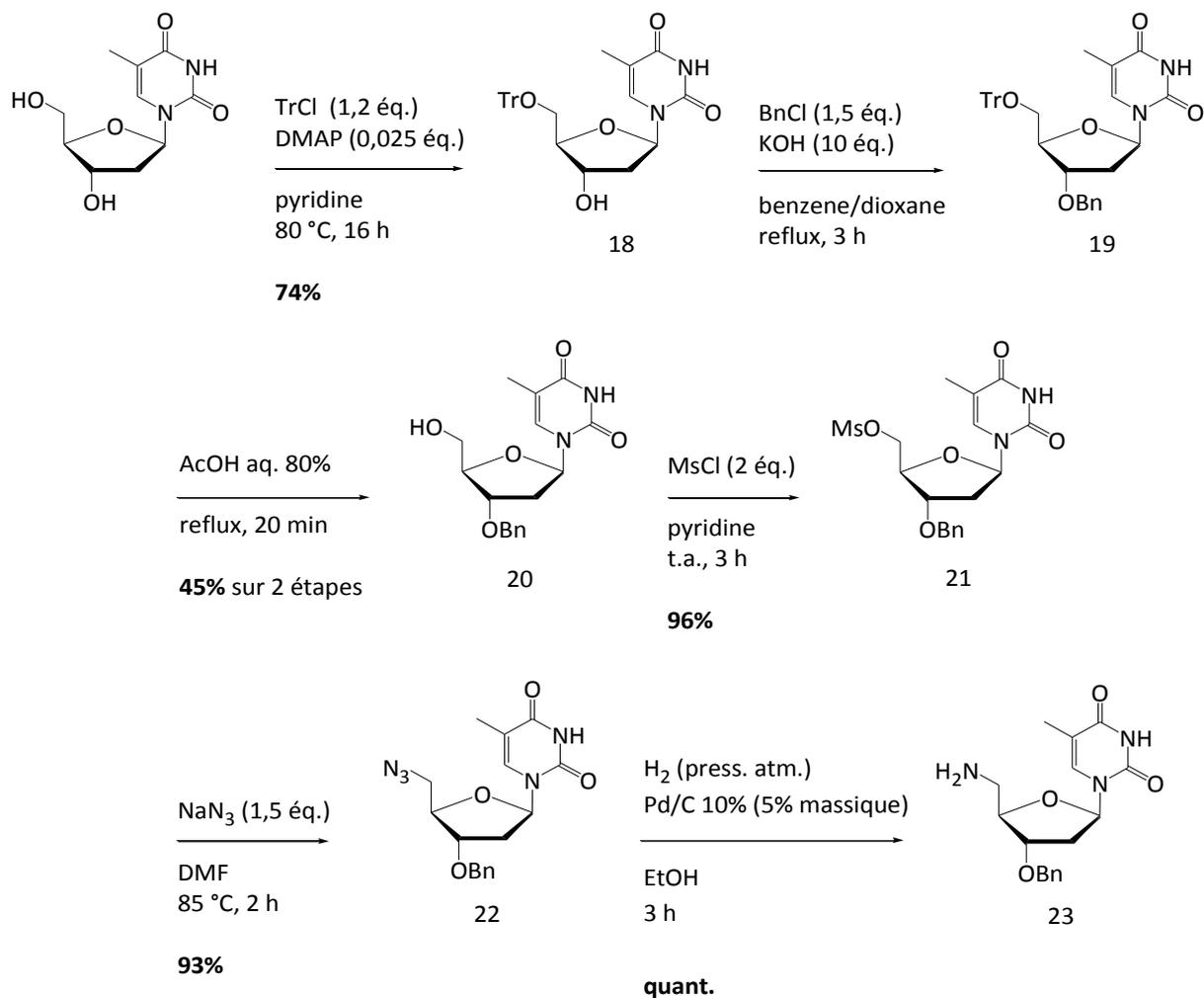


Schéma 73 : hydrogénation sélective d'un azoture par Siriwardena.

La réduction de notre azoture **22** a été réalisée par hydrogénation dans l'éthanol ($C = 0,2 \text{ M}$), avec, pour commencer, seulement 5% massique de catalyseur ; un suivi par CCM a permis d'établir le temps de réaction à 3 heures pour une conversion totale sans perte du groupement benzylé.

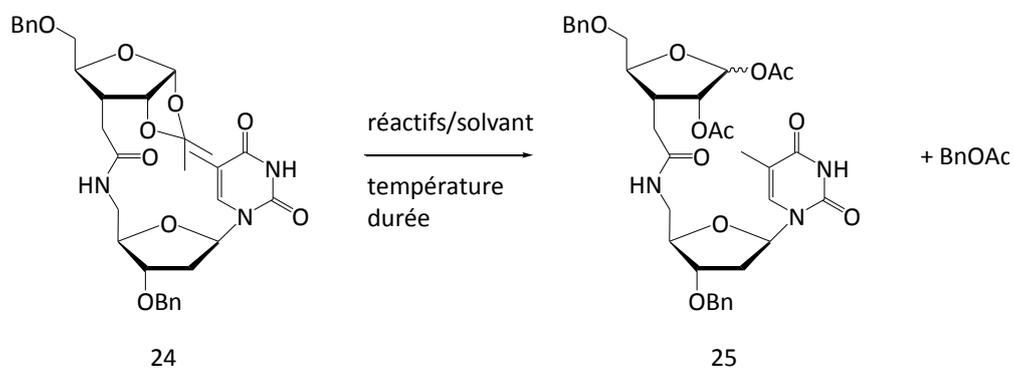
La synthèse de l'amine **23** a finalement été menée en 6 étapes avec un rendement global de 30% (schéma 74).

2 - Validation du concept



Sch\u00e9ma 74 : synth\u00e8se de l'amine **23** \u00e0 partir de la thymidine.

La synth\u00e8se du dim\u00e8re **27** a d\u00e9but\u00e9 par un couplage peptidique, dans les conditions mises au point pr\u00e9c\u00e9demment, et a fourni le dim\u00e8re **24** avec un tr\u00e8s bon rendement de 89% (sch\u00e9ma 76). L'ac\u00e9tolys\u00e9 de l'isopropylid\u00e8ne a fait l'objet de quelques essais rassembl\u00e9s dans le tableau 9.

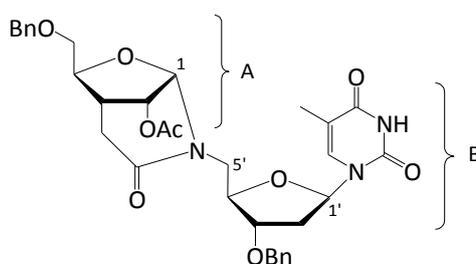


Sch\u00e9ma 75 : essais d'ac\u00e9tolys\u00e9 de l'isopropylid\u00e8ne du substrat **24**.

	Réactifs	Temp.	Durée	Conv.	Rendement
1	1-TFA aq. 80% 2- Ac ₂ O (20 éq.), pyridine	t.a.	2 h	incomplète	25 : 0% ; 26 : 32%
		t.a.	24 h	complète	
		t.a.	20 h	complète	
2	Ac ₂ O (30 éq.), CSA (0,2 éq.), AcOH	50 °C	24 h	complète	dégradation
3	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,1 éq.), AcOH + CSA (0,1 éq.)	70 °C	1 h	incomplète	25 : 34-38% + BnOAc
		70 °C	24 h	complète	
4	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,05 éq.), AcOH + CSA (0,05 éq.)	90 °C	20 min	incomplète	25 : 43% + BnOAc
			20 min	complète	

Tableau 9 : essais d'acétylolyse de l'isopropylidène du substrat **24**.

Les conditions de l'essai 1 ont permis d'isoler un produit majoritaire **26** qui a été identifié grâce à la RMN et à la spectrométrie de masse. En effet, le déplacement chimique du C-1A normalement aux environs de 100-105 ppm lorsqu'il est engagé dans une liaison C-O se trouve ici aux environs de 85 ppm, zone des C-1 engagés dans une liaison C-N. La RMN 2D dont notamment la corrélation HMBC entre le H-1_A et les H-5'_B et la mesure de masse exacte qui a fourni la formule brute et donc le nombre d'insaturations ont été déterminantes. La seule structure qui soit cohérente avec les différentes analyses est proposée ci-dessous :



26

Ce type de cyclisation a également été observé lors de l'étude de cette réaction (chapitre suivant).

Les essais 2 à 4 (tableau 9) utilisant l'acide camphorsulfonique à différentes concentrations et différentes températures, ont montré des résultats très variables. Un ajout fractionné ainsi qu'une température élevée ont donné les meilleurs résultats bien que peu satisfaisants. L'essai 4 a fourni suffisamment de composé **25**, mais cette étape incontournable devra absolument

être améliorée si le concept était validé. La réaction de *N*-glycosylation a été tentée dans les conditions précédentes (schéma 59, paragraphe 2.4.3) et après deux purifications sur gel de silice une fraction pure de dimère **27** a été isolée, avec un rendement modeste car non optimisé. Pour conclure, le dinucléoside **27** a été obtenu en 18 étapes avec un rendement global de 6% et a confirmé la faisabilité du concept (schéma 76).

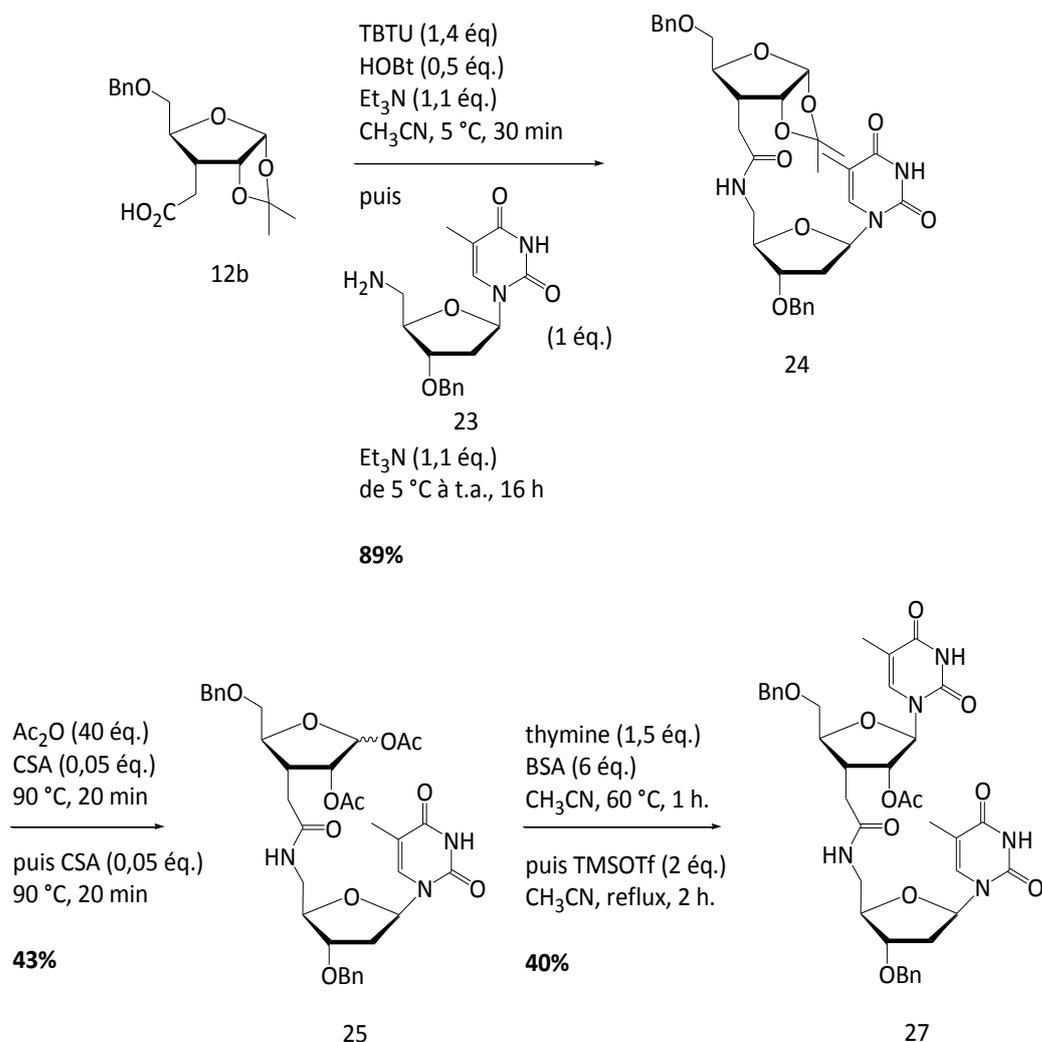


Schéma 76 : synthèse du dimère nucléosidique **27**.

Forts de ce résultat, nous avons pu entreprendre la synthèse de dimères ribosidiques en vue de les engager dans la réaction de glycosylation au dernier moment comme présenté dans l'exposé de notre concept pour accéder aux analogues nucléosidiques homo ou hétérodimères.

Pour cela, les synthèses des partenaires amines ont dû être mises au point et certaines étapes ont nécessité à nouveau des améliorations ; ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

3 Synthèse de dimères ribonucléosidiques

3.1 Vers la synthèse d'homodimères ribonucléosidiques (les deux bases identiques)

Selon notre stratégie, la synthèse d'homodimères ribonucléosidiques passe par la synthèse d'un dimère ribosidique commun **35**. Compte tenu de nos précédentes expériences, nous l'avons choisi protégé sous forme d'éther benzyle. La rétrosynthèse des homodimères ribonucléosidiques est présentée sur le schéma 77 ci-après.

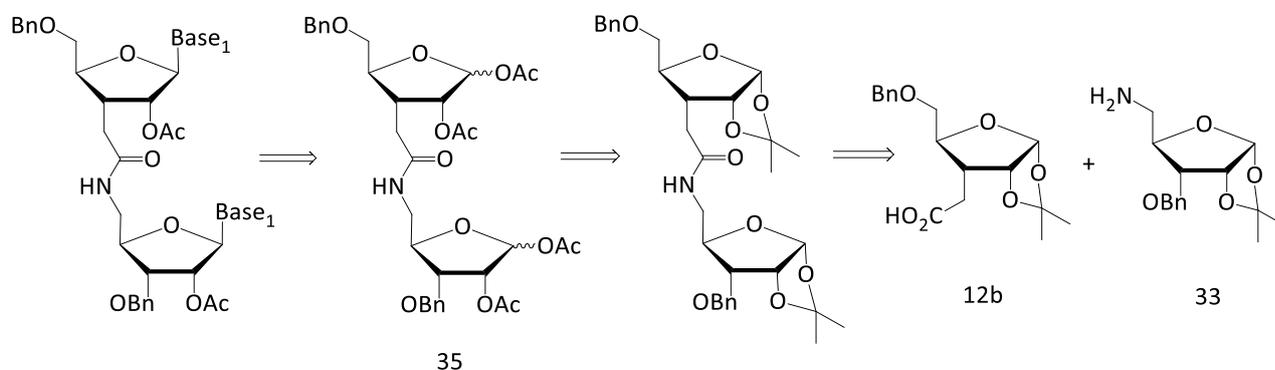


Schéma 77 : rétrosynthèse des homodimères ribonucléosidiques.

3.1.1 Synthèse de l'amine **33**

Le D-ribose aurait logiquement pu être choisi comme produit de départ pour la synthèse de la 1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl-5-amino-ribofuranose **33** mais la synthèse globale des synthons aurait été moins convergente. En effet, en partant du D-xylose les synthèses de l'amine **33** et de l'acide carboxylique **12b** passent par la cétone **7** qui devient alors un

intermédiaire commun (schéma 78). Certes, la synthèse de cette cétone commune aurait aussi pu être envisagée à partir du D-ribose mais elle aurait comporté plus d'étapes de protections-déprotections et n'est pas décrite à notre connaissance. Aussi, le D-xylose s'avère être le composé de choix comme produit de départ commun, il présente en outre l'avantage d'être moins cher que le D-ribose.

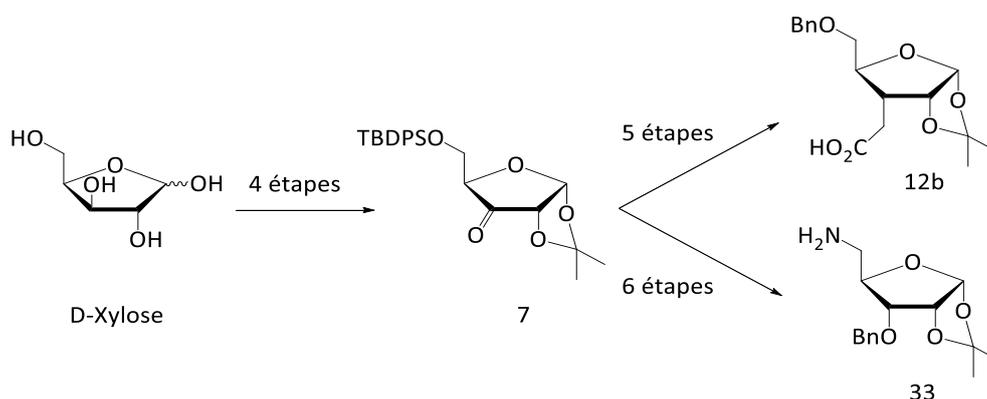


Schéma 78 : voie de synthèse de **12b** et **33** à partir d'un intermédiaire commun **7**.

La synthèse de l'amine **33** a été envisagée en 6 étapes à partir de la cétone **7** (schéma 79). L'alcool en position 3 (dans la bonne configuration) doit être protégé sous forme d'éther benzylique **29**. L'alcool de la position 5 doit ensuite être transformé en amine. En s'inspirant de la séquence appliquée à l'amine **23** (schéma 74), l'alcool primaire doit être libéré et activé par un groupement partant afin d'être transformé en azoture **32** puis en amine **33**.

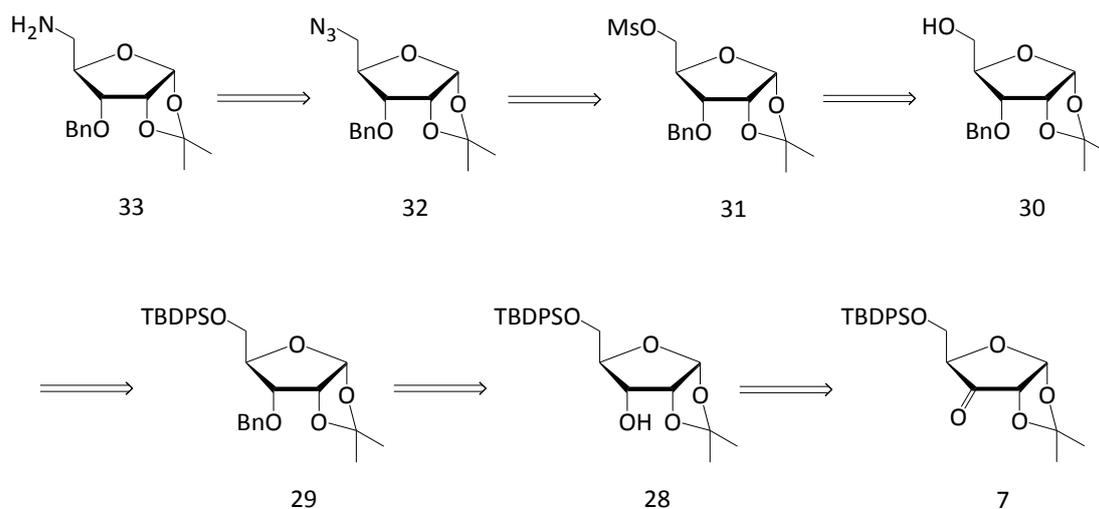


Schéma 79 : rétrosynthèse de l'amine 1,2-O-isopropylidène-3-O-benzyl-5-amino- α -D-ribofuranose **33**.

La cétone **7** a été réduite dans les conditions classiques au borohydrure de sodium pour donner l'alcool **28** avec un rendement et une stéréosélectivité excellents (95% de rendement, un seul diastéréoisomère). Cette étape de réduction de la cétone en position 3 en présence de l'éther silylé en position 5 présentait quelques incertitudes puisque, dans les mêmes conditions, la réduction d'une oléfine n'avait pas été stéréosélective (schéma 27). Les spectres RMN des deux alcools diastéréoisomères étant très différents (et décrits dans la littérature^[79]), le résultat de cette étape a été validé sans aucune ambiguïté. La protection sous forme d'éther benzylique de cet alcool n'a pas été réalisée dans les conditions utilisées sur le nucléoside **18** (BnCl/KOH) afin d'éviter une potentielle déprotection de l'alcool silylé en position 5. L'équipe de Florent'ev^[153] a réalisé la benzylation de l'alcool en position 3 d'un dérivé ribose en présence de BnBr/NaH dans le THF avec 69% de rendement. L'équipe de Migaud^[154] a publié la même transformation sur un dérivé de l'arabinose avec également un excellent rendement de 97%. Cette méthode a donc été appliquée et a conduit au composé **29** avec un très bon rendement de 92% (schéma général 85). Le groupement silylé a ensuite été enlevé selon le mode opératoire au TBAF précédemment mis au point (maintien du milieu à 4 °C pendant 5 heures). La séquence suivante menant à l'azoture a été décrite dans la littérature sur des substrats très proches^[155] (réaction a, schéma 80), voire identiques^[156] (réaction b, schéma 80)

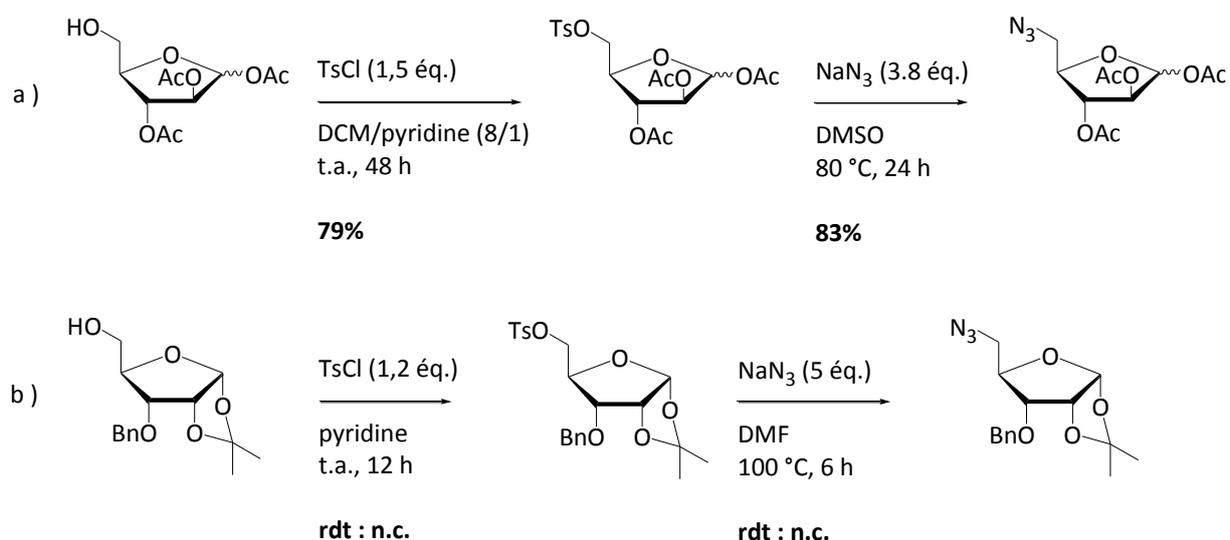


Schéma 80 : transformation d'une fonction alcool en fonction azoture dans la littérature.

Les conditions de la substitution nucléophile de la littérature nous ont paru assez dures par rapport à celles utilisées sur le nucléoside **21** aussi, en première intention, la réaction a été

reproduite comme sur le nucléoside **21** (schéma 74). Elle s'est déroulée avec le même succès et d'excellents rendements en azoture **32** ont été obtenus pour des temps de réactions courts et des quantités de réactifs raisonnables (schéma 81). L'hydrogénation a été réalisée en présence de 5% de Pd/C à 10% (schéma 74), en préservant ici aussi le groupement benzylé, et a fourni l'amine désirée avec un rendement de 62% en 6 étapes à partir de la cétone intermédiaire (schéma 81), soit un rendement global de 43% en 10 étapes.

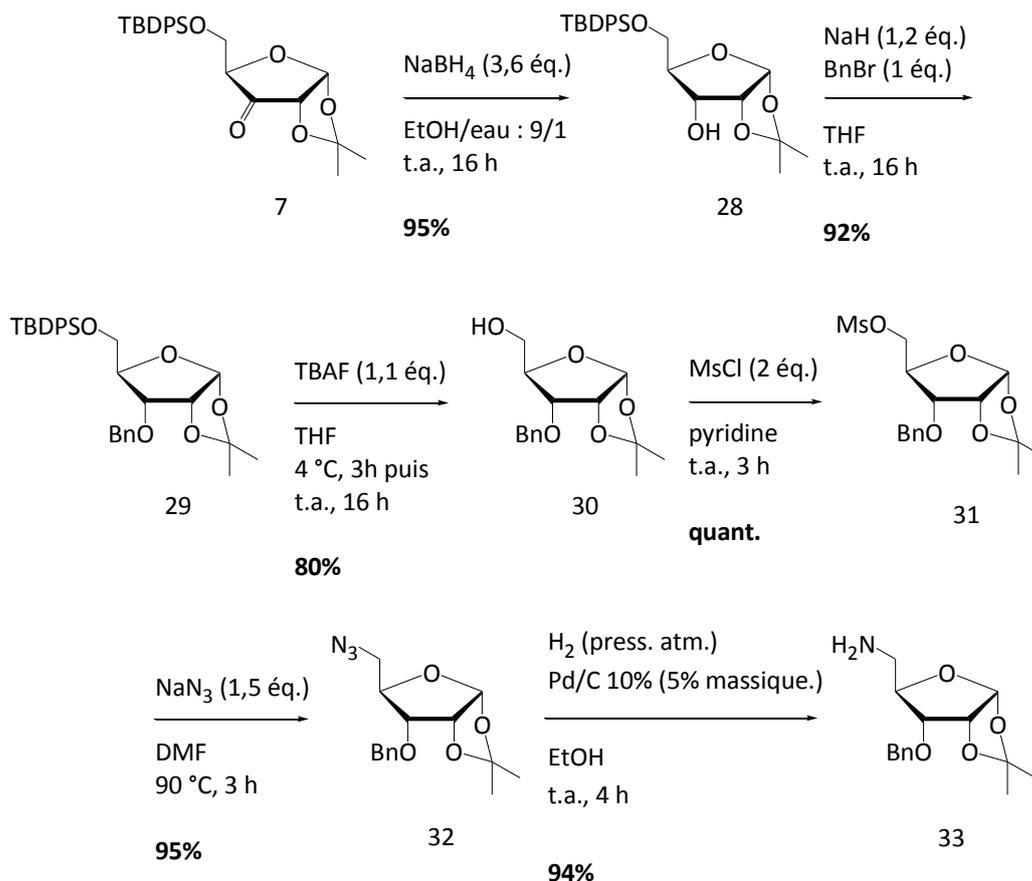


Schéma 81 : synthèse de l'amine **33** en 6 étapes à partir de la cétone **7**.

3.1.2 Etude de la réaction d'acétylolyse de l'isopropylidène

Plusieurs équipes^{[157],[133],[158],[159]} ont préparé et identifié les anomères α et/ou β dérivés ribofuranose di-acétylés en position 1,2. De ce fait, le proton anomérique d'un anomère α , plus déblindé que celui de l'anomère β , apparaît sous forme d'un doublet aux environs de 6,3 ppm tandis que celui de l'anomère β sort sous forme d'un singulet vers 6,0 ppm. L'équipe de Just^[160] se réfère à cette description pour affirmer la configuration β de son acétyl-furanose.

Les descriptions de nos composés ont donc été rédigées en s'appuyant sur ces données de la littérature.

La réaction d'acétylase de l'isopropylidène a déjà été réalisée sur le dimère nucléosidique **15** (schéma 58, tableau 8) et sur le dimère nucléosidique **24** (schéma 75, tableau 9) en présence de CSA avec des rendements légèrement supérieurs à 40%. Aussi nous avons souhaité étudier cette réaction sur un intermédiaire moins avancé, comme par exemple l'ester **11b**, plus proche des substrats rencontrés dans la littérature et plus rapidement accessible (schéma 82, tableau 10).

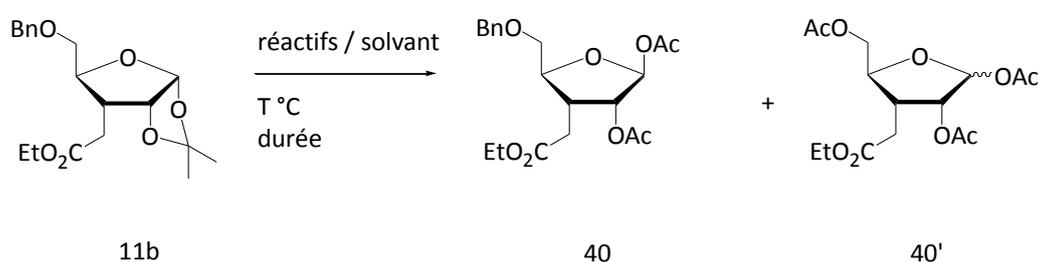


Schéma 82 : acétylase de l'isopropylidène sur le substrat modèle **11b**.

E	Réactifs / solvants	Temp.	Durée	Conv.	40 / 40'
1	Ac ₂ O (8 éq.), H ₂ SO ₄ c (7 éq.) / AcOH	t.a.	16 h	complète	62% 40' + 24% BnOAc
2	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,1 éq.) / AcOH + CSA (0,1 éq.)	90 °C	20 min	incomplète	74% 40 (0% 40')
		90 °C	20 min	complète	

Tableau 10 : essais d'acétylase de l'isopropylidène sur le substrat modèle **11b**.

La présence de l'ester en position 3 n'a pas conduit à la lactonisation observée dans la littérature^[66], mais les conditions trop acides (tableau 10, essai 1) ont conduit à la déprotection totale de l'alcool primaire. Cette déprotection n'a pas été rapportée dans la littérature comme réaction secondaire de l'acylation mais elle a été volontairement obtenue dans les travaux de Mathé en 2005^[161], dans des conditions similaires (schéma 83).

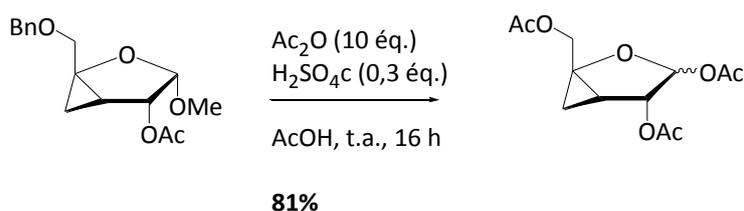


Schéma 83 : per-acylation d'un substrat osidique par Mathé et collaborateurs^[161].

Les conditions de l'essai 2 en présence d'acide camphorsulfonique ont très bien fonctionné sur le substrat **11b** ainsi que sur d'autres substrats simples y compris lorsqu'ils sont silylés en position 5 (composé **29** : 1,2-*O*-isopropylidène-3-*O*-benzyl-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose). Le groupement silylé qui a souvent été fragilisé en conditions acides à chaud semble donc rester stable à température ambiante et en fonction de la nature du substrat.

En complément d'étude, un substrat modèle amidique a été synthétisé pour une série d'expériences d'acétylation avec la fonction amide en position 3. Le composé **42** (schéma 84) a été obtenu par couplage entre l'acide carboxylique **12b** et la propylamine dans les conditions de couplage précédemment utilisées. L'acétylation de l'isopropylidène a été testée selon les différentes méthodes déjà utilisées et les résultats sont rassemblés dans le tableau 11.

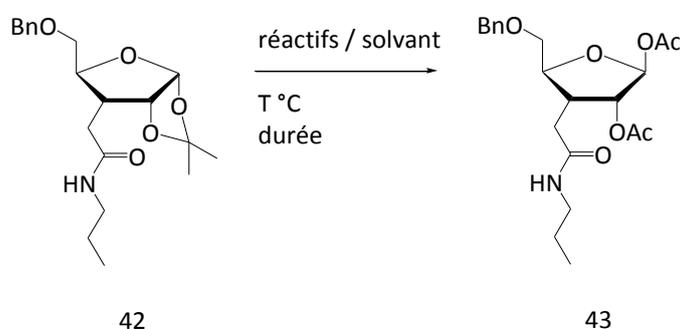


Schéma 84 : déprotection de l'acétonide du composé modèle **42**.

E	Réactifs	Temp.	Durée	Conv.	Rendement
1	1-AcOH aq. 80% 2- Ac ₂ O (17 éq.), pyridine	90 °C	3 h	66% (RMN)	0% ^a
		90 °C	3 h	complète	
		t.a.	20 h	complète	
2	Ac ₂ O (12 éq.), H ₂ SO ₄ c (0,02%), AcOH puis H ₂ SO ₄ c (0,02%)	0-4 °C	3 jours	incomplète	dégradation et perte
		0-4 °C	24 h	50% (RMN)	
		0-4 °C	24 h	complète	
3	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,15 éq.), AcOH	70 °C	1 h	incomplète	18% + dégradation
		70 °C	1 h 30	complète	
4	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,1 éq.), AcOH + CSA (0,1 éq.)	90 °C	20 min	incomplète	30% + dégradation
		90 °C	20 min	complète	

a) produits secondaires isolés **44** et **45** avec respectivement 45% et 26% de rendement (figure 13)

Tableau 11 : essais de déprotection de l'acétonide du composé modèle **42**.

Le résultat de l'essai 2 a montré la sensibilité du substrat vis-à-vis de l'acide sulfurique pourtant présent en faible quantité. Les conditions des essais n°3 et n°4 sont quasiment identiques à l'exception de la température. Cependant, si la réaction semble plus rapide à 90 °C, les rendements restent dans les deux cas très faibles (environ 20 %). Ces conditions, qui avaient donné de très bons résultats sur des substrats simples, notamment sur l'ester **11b** (entrée 2, tableau 10), se sont avérées très décevantes sur son analogue propylamide **42**.

Les conditions de l'essai 1 qui se déroule en deux temps ont d'abord montré une conversion complète du substrat en 6 heures (par RMN), probablement en diol, mais il n'a pas été isolé et cet intermédiaire a ensuite fourni deux produits secondaires **44** et **45** qui ont été isolés et caractérisés avec respectivement 45% et 26% de rendement (figure 13).

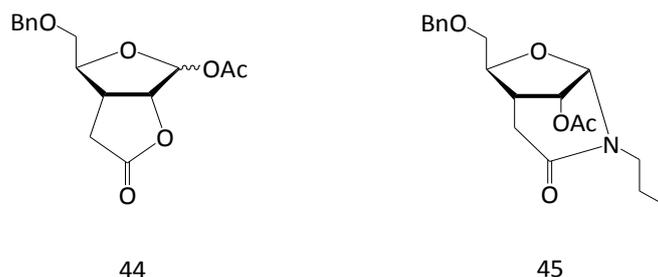


Figure 13 : composés obtenus lors de l'essai 1, tableau 11.

Le composé **45** possède la même structure δ -lactame que le composé **26** vu au chapitre 2.

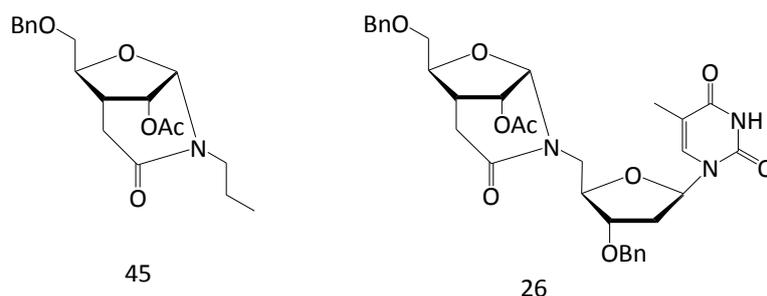


Figure 14 : δ -lactames **45** et **26**

Le composé **45** a été caractérisé sans ambiguïté. La RMN du ^{13}C n'a pas été déterminante car le carbonyle d'amide (secondaire ou tertiaire) de nos substrats est toujours situé entre 170 ppm et 173 ppm. Dans le cas de la lactone **44** le carbonyle a un déplacement de 174 ppm, ce qui reste très proche des carbonyles de nos amides. Ce sont surtout les expériences de RMN 2D, dont notamment la corrélation HMBC entre le H-1 et les CH₂-N, qui ont été déterminantes. De plus, la mesure de masse exacte a fourni la formule brute et donc le nombre de cycles et d'insaturations. L'infra-rouge a révélé l'absence de signaux caractéristiques du carbonyle d'amide secondaire dans la zone à 1510-1550 cm^{-1} et l'absence de bande à 3300 cm^{-1} (NH) et 3600 cm^{-1} (OH). Le composé **44** possède la même γ -lactone que les produits secondaires de la littérature vus aux schémas 60 et 61 et provenant d'un substrat avec un ester en position 3. La formation du composé **44** pourrait provenir d'un mécanisme direct, semblable à celui envisageable pour les dérivés ester (schéma 85).

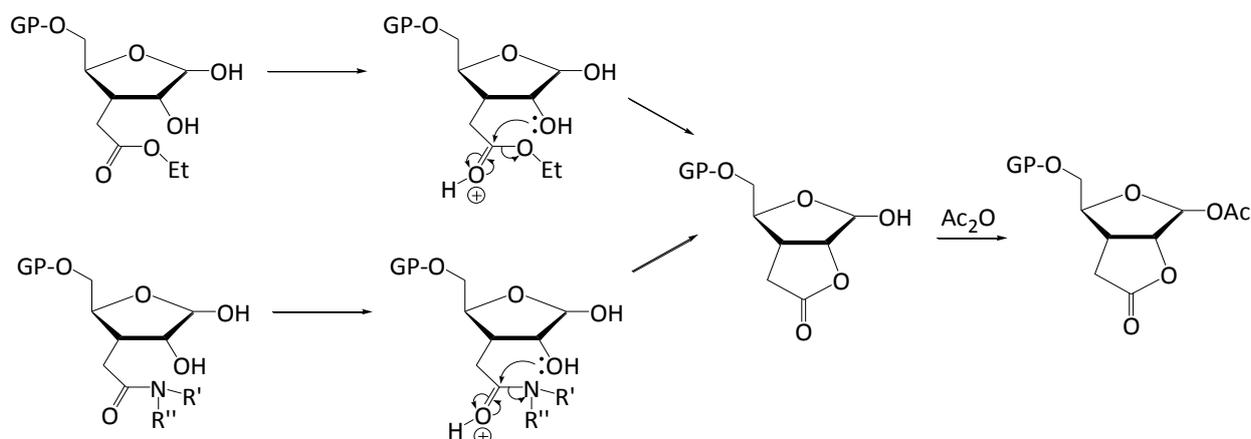


Schéma 85 : proposition de mécanisme pour la formation de la lactone **44**.

Ce mécanisme ne permettant pas d'expliquer la formation du composé **45**, il est possible de proposer un autre mécanisme de formation du composé **44** passant par un intermédiaire qui pourrait également conduire à **45** (schéma 86).

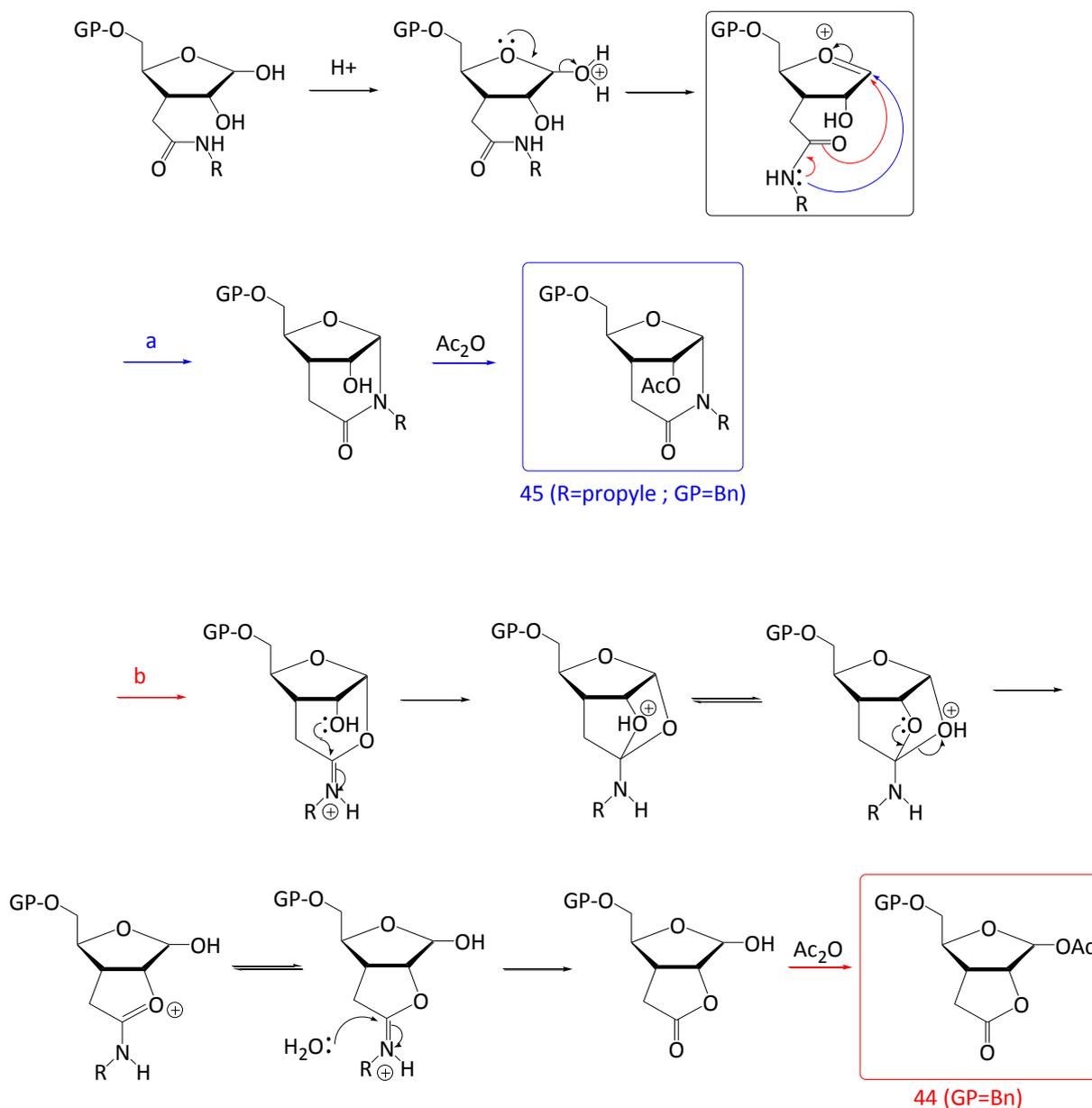
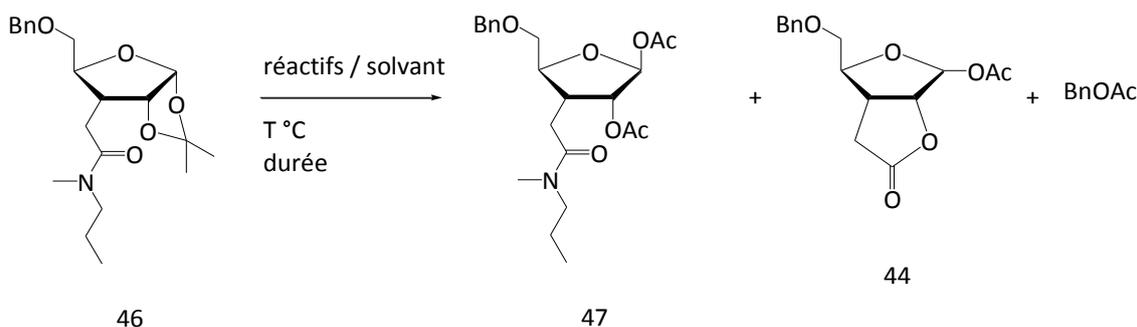


Schéma 86 : proposition de mécanisme pour la formation des composés **44** et **45**.

Dans le but d'éviter la formation du composé **45**, des essais ont été réalisés sur le composé **46**, analogue *N*-méthylé de **42**.

Schéma 87 : déprotection de l'acétonide du composé **46**.

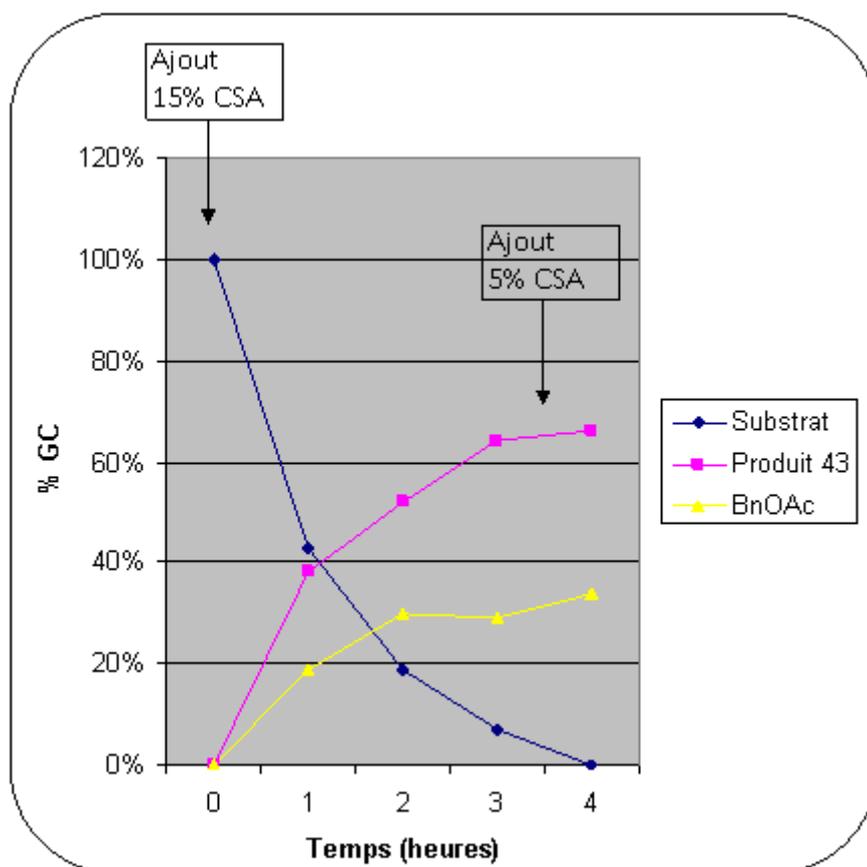
E	Réactifs	Temp.	Durée	Conv.	Rendements isolés
1	1-AcOH aq. 80% 2- Ac ₂ O (17 éq.), pyridine	90 °C	5 h	<10% (RMN)	50% 44 + BnOAc
		90 °C	16 h	complète	
		t.a.	20 h	complète	
2	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,2 éq.), AcOH	90 °C	45 min	40% (RMN)	18% 47 + BnOAc
3	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,15 éq.), AcOH + CSA (0,05 éq.)	90 °C	3 h 30	incomplète (GC) ^a	60% 47 + BnOAc
		90 °C	30 min	complète (GC)	
4	Ac ₂ O (40 éq.), CSA (0,02 éq.), AcOH + CSA (0,05 éq.) + CSA (0,05 éq.) + CSA (0,05 éq.)	90 °C	1 h 30	incomplète (GC) ^b	70% 47 + BnOAc
		90 °C	1 h	incomplète (GC)	
		90 °C	2 h	incomplète (GC)	
		90 °C	3h30	92% (GC)	

a) voir le graphe 1 pour le détail du suivi GC ; b) voir le graphe 2 pour le détail du suivi GC.

Tableau 12 : déprotection de l'acétonide du composé **46**.

Evidemment le composé **45** ne peut pas être obtenu à partir du substrat **46**. Cet amide tertiaire est moins réactif que son analogue non méthylé **42**. En effet, dans les conditions de l'essai 1, **42** était consommé à 66% en 3 heures et totalement en 6 heures alors que **46** était encore présent à plus de 90% après 5 heures de réaction. Cet essai n'a pas fourni le produit attendu mais 50% de lactone **44**. Environ la moitié du substrat a été dégradée car nous récupérons aussi de l'acétate de benzyle. L'essai 2 a fourni du produit attendu **47** mais seulement 18% pour une conversion de 40%, la dégradation du substrat avec la perte du groupement benzylé est en compétition avec la formation de **47**. C'est pourquoi les essais 3

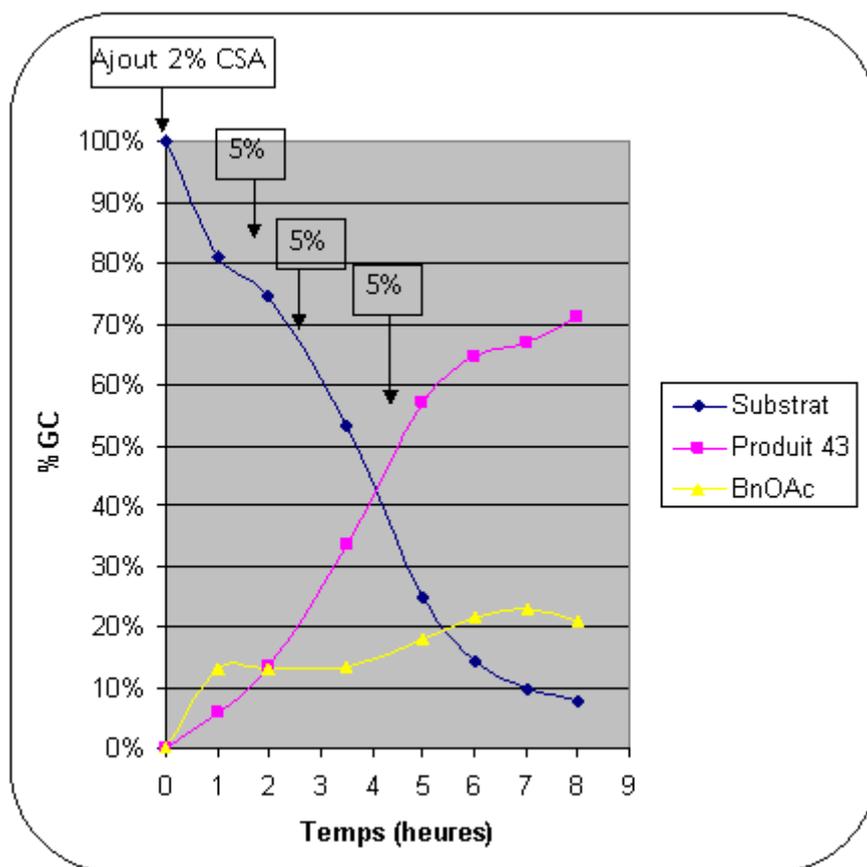
et 4 ont fait l'objet d'un suivi par chromatographie gazeuse. Le détail de l'essai 3 est représenté sur le graphe 1.



Graphie 1 : détail de l'essai 3, tableau 12.

Le rendement corrigé (tenant compte des prélèvements pour la GC) est conforme au rendement prévu par la GC, il n'y a donc pas eu de perte lors du traitement et de la purification. Le composé **47** a été obtenu avec un rendement de 60% en 4 heures et avec 0,2 équivalent de CSA.

Le ratio entre les deux espèces formées semble stable, en moyenne 65/35 tout au long de la transformation du substrat. Une seconde expérience a été menée avec des ajouts plus fractionnés (essai 4, tableau 12) et donc un suivi plus fin, représenté sur le graphe 2.



Graphie 2 : détail de l'essai 4, tableau 12.

Afin de préserver le produit **47** formé, la réaction a été arrêtée avant la fin de la conversion totale. Ceci a permis d'isoler le composé **47** avec un rendement de 70% en 8 heures et avec 0,17 équivalent de CSA. Cette seconde expérience a permis de mieux suivre les deux réactions et a montré que la formation d'acétate de benzyle en début de réaction était rapide puis progressait lentement tandis que la formation du produit **47** était régulière. Peut-être que des traces d'eau présentes dans le milieu favorise, au début, cette réaction secondaire.

Le rendement en produit attendu est supérieur lors de cette expérience, il est visiblement préférable de ne jamais être trop concentré en acide camphorsulfonique. Lors de l'acétolyse du dimère **24** (schéma 76), l'ajout de la seconde portion de CSA intervenait après seulement 20 minutes. A l'avenir un délai d'une heure pourrait être laissé afin que la première portion de CSA soit consommée avant d'en rajouter.

3.1.3 Synthèse de l'homodimère ribosidique et glycosylation

A partir des synthons amine **33** et acide carboxylique **12b**, la synthèse de l'homodimère ribosidique **35** a été engagée. Le couplage peptidique a été effectué dans les conditions précédemment choisies et a conduit au composé **34** avec un rendement quantitatif (schéma général 97). L'acétylolyse de l'isopropylidène a été réalisée avec la méthode au CSA en laissant un délai d'une heure avant de rajouter du réactif. Après la deuxième heure le substrat n'était pas consommé et il a fallu porter à 4 heures le temps de réaction pour le consommer complètement, la réactivité restant spécifique à chaque substrat. Le dimère tétra-*O*-acétate **35** a été isolé après purification sur gel de silice avec un rendement de 39% (schéma 88). Nous n'avons isolé qu'un seul anomère **35** alors que le brut de réaction semblait contenir un mélange.

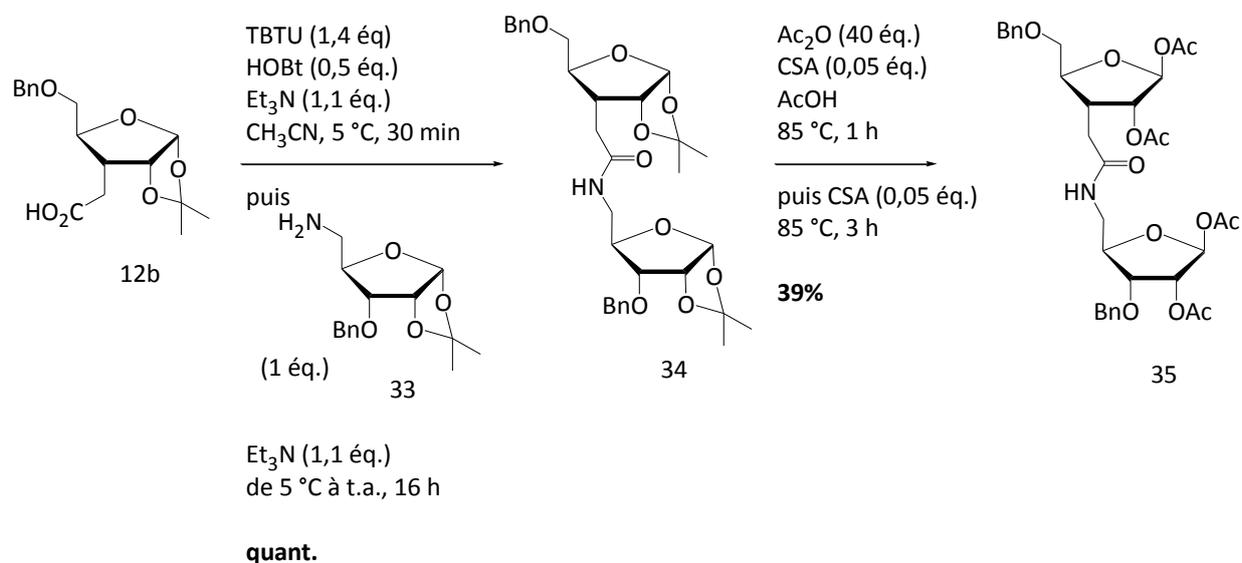


Schéma 88 : synthèse du dimère tétra-*O*-acétate **35**.

Les réactions de glycosylation ont été effectuées selon le mode opératoire mis au point précédemment, c'est à dire en présence de TMSOTf, de BSA et de base azotée. La qualité des réactifs est toujours validée au préalable sur le ribose *per*-acétylé (rendement quantitatif). La réaction a d'abord été testée sur les modèles **43** et **47** pour étudier la réactivité de ces dérivés amidiques, donnant des rendements de 97 et 76 % respectivement (schéma 89).

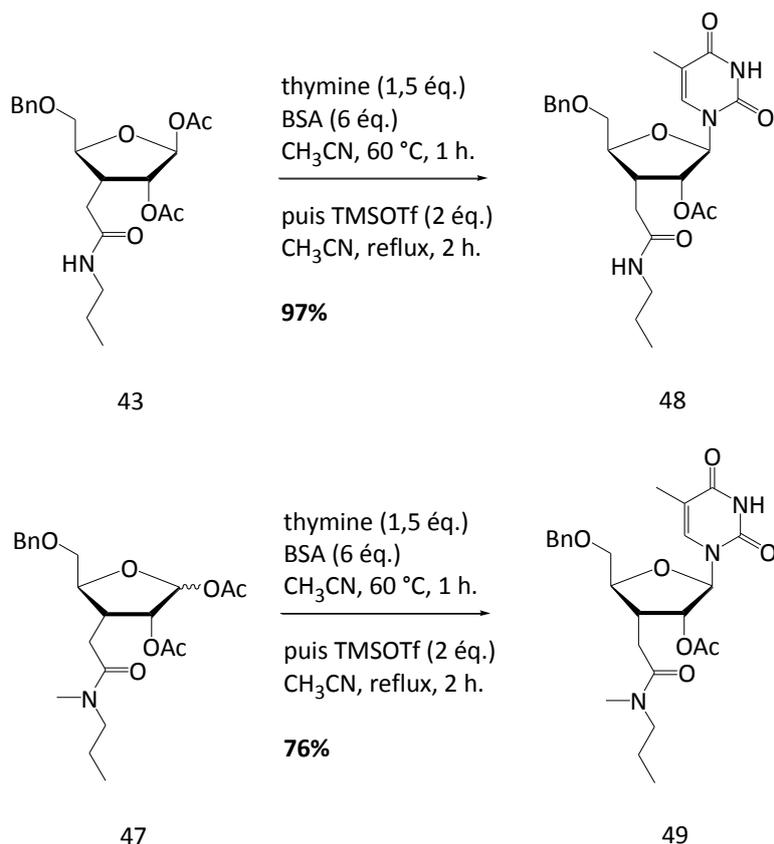


Schéma 89 : glycosylations sur divers substrats amidiques simples.

Ces conditions ont donc été appliquées au dimère ribosidique **35** et les dimères ribonucléosidiques "thymidine*thymidine" (composé **36**) et "uracile*uracile" (composé **37**) protégés ont été isolés avec des rendements voisins de 60% (schéma général 97), validant ainsi notre concept. Les positions 3' et 5' ont ensuite été débenzylées. D'expérience nous savions que 5% massique de Pd/C pendant quelques heures laissent intacts les groupements benzylés. La littérature proposait, sur des riboses benzylés, différents modes opératoires d'hydrogénation comme l'hydrogénation sous pression^[162] ou l'utilisation de Pd(OH)₂/C et de formiate d'ammonium au reflux dans le méthanol^[24]. En 1990, Czernecki^[163] a utilisé des quantités importantes de Pd/C pour déprotéger un substrat nucléosidique (schéma 90).

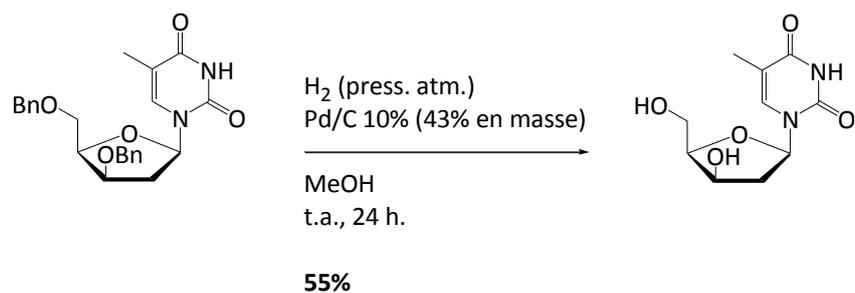


Schéma 90 : déprotection de groupements benzyles selon Czernecki^[163]

Sur nos substrats, l'utilisation de Pd(OH)/C à pression atmosphérique d' H_2 ou sous 10 bars de pression d'hydrogène, est restée sans effet. L'emploi de 30% massique de Pd/C et d'hydrogène à pression atmosphérique a finalement permis une déprotection des alcools benzyles avec des rendements très satisfaisants de 71 et 93% (schéma général 97). Les acétates sont compatibles avec la synthèse d'ARN en phase solide (synthétiseur automatisé)^[46].

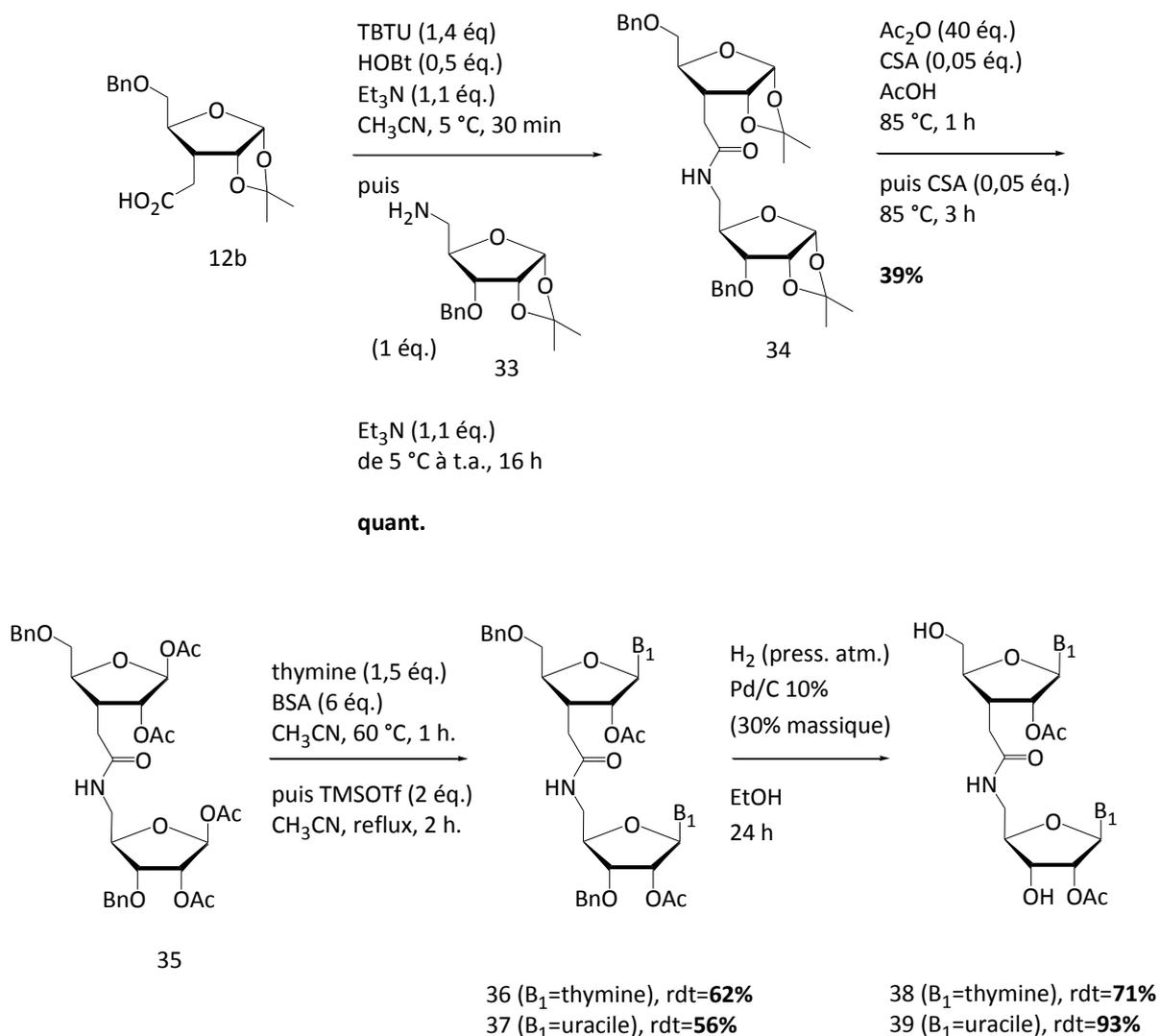


Schéma 91 : synthèse d'homodimères ribonucléosidiques **38** et **39**.

L'homodimère ribosidique **35** a été obtenu en 18 étapes avec un rendement global de 19% depuis le D-xylose ($0,70 \times [(0,80 + 0,62) / 2] \times 1 \times 0,39 = 0,19$).

Les homodimères ribonucléosidiques **38** et **39** ont été obtenus en 20 étapes avec respectivement 8% et 10% de rendement global ce qui permet de qualifier cette stratégie innovante de très efficace.

3.2 Vers la synthèse d'hétérodimères ribonucléosidiques

Selon notre stratégie, les hétérodimères ribonucléosidiques ont pour précurseur commun l'hétérodimère ribosidique **52** comportant des protections différentes sur les diols vicinaux 1,2. Celui-ci nécessite la synthèse de deux synthons clés, l'acide carboxylique **12b** et l'amine **51** (schéma 92).

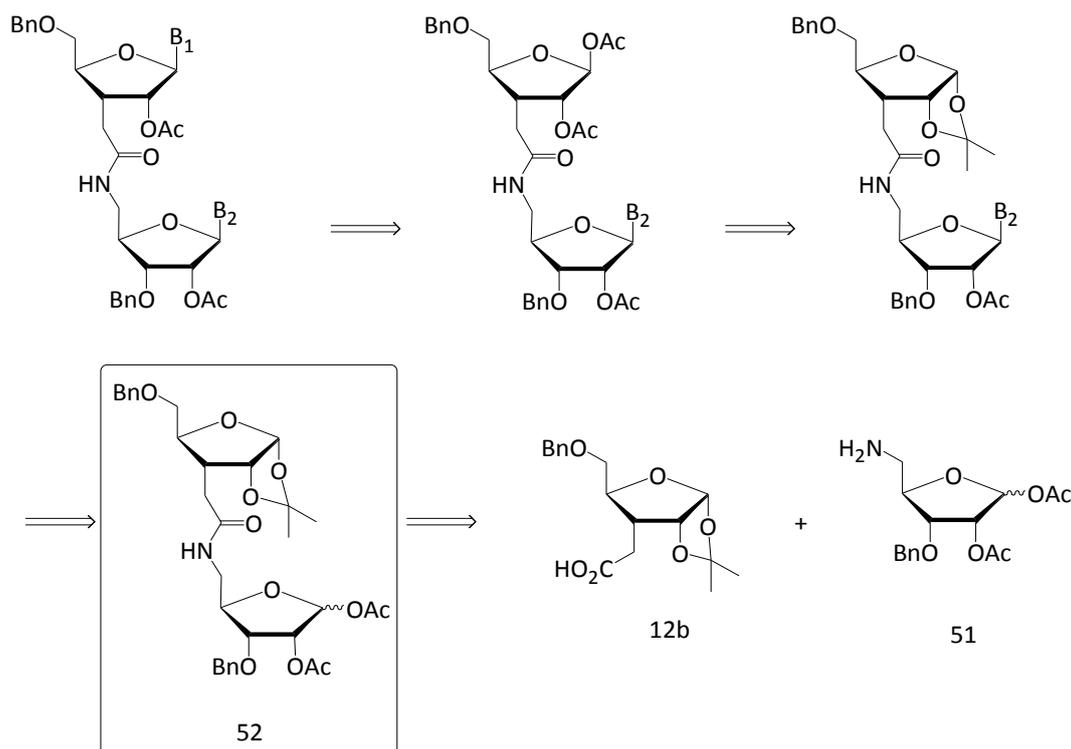
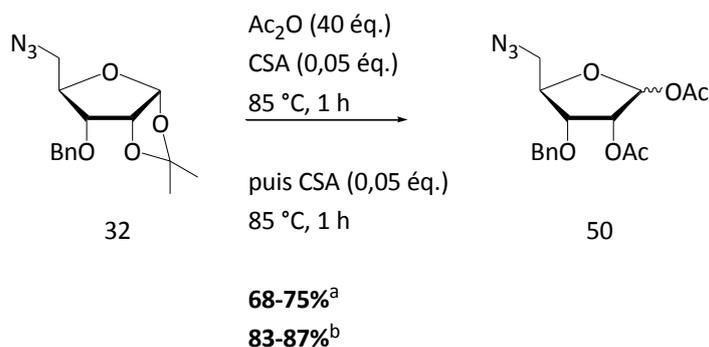


Schéma 92 : rétrosynthèse des hétérodimères ribonucléosidiques.

3.2.1 Synthèse de l'amine **51**

La synthèse de l'amine **51** a été envisagée en deux étapes à partir de l'azoture **32**. L'acétolyse de l'isopropylidène doit intervenir en premier, elle a été réalisée en présence de CSA dans l'acide acétique comme précédemment mis au point au schéma 88. Le résultat de cette réaction a été très satisfaisant, une modification dans le protocole de traitement et purification a permis d'en améliorer encore le rendement passant ainsi au-dessus des 80% (schéma 93). L'azoture **50** a pu ainsi être synthétisé en 10 étapes avec un très bon rendement global de 40%.



a) quelques lavages au carbonate, purification sur gel de silice

b) nombreux lavages au carbonate, pas d'autre purification

Schéma 93 : déprotection de l'acétonide du composé **32**.

La réduction de l'azoture a été effectuée comme précédemment par hydrogénation au Pd/C. L'équipe de Mellet et Fernandez^[164] a également effectué cette transformation, sur un substrat dérivé du ribose (schéma 94).

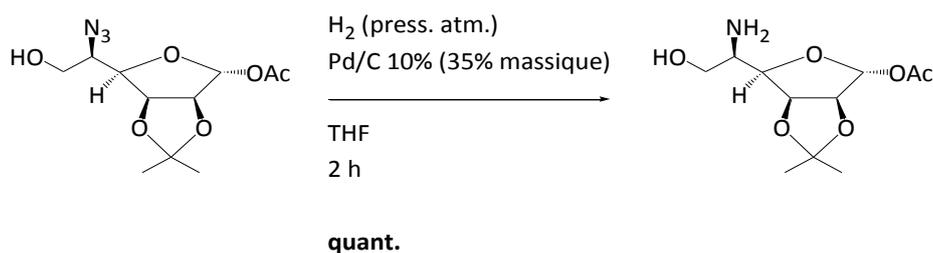


Schéma 94 : réduction d'azoture par Mellet et Fernandez^[164].

L'hydrogénation de l'azoture **50** a fourni deux produits inséparables par CCM, de même masse molaire, mais distincts en RMN du proton notamment au niveau des H-5 (schéma 95 et tableau 13).

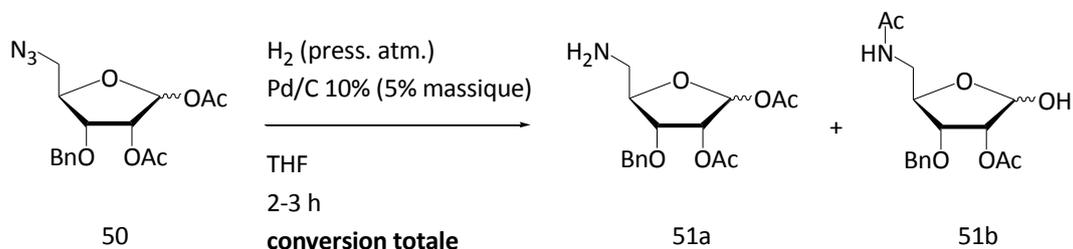


Schéma 95 : hydrogénation de l'azoture **50**.

composé	50	51a	51b
δ (ppm) H-1	6,14 (s)	6,11(s)	6,09(s)
δ (ppm) H-2	5,32 (d)	5,30 (d)	5,27 (d)
δ (ppm) H-5a	3,63 (dd)	3,01 (dd)	3,58 (dt)
δ (ppm) H-5b	3,15 (dd)	2,73 (dd)	3,48 (dt)

Tableau 13 : déplacements chimiques caractéristiques en RMN du proton

des composés **50**, **51a** et **51b**.

Différents essais ont été réalisés dans les mêmes conditions et les résultats ont été très irréguliers, la proportion des deux composés variant totalement d'un essai à l'autre sans raison évidente. Nous avons supposé que la migration se faisait durant la phase de concentration du solvant sous pression réduite. Un essai a été engagé sans concentrer le solvant et en engageant la solution brute en réaction de couplage avec l'acide benzoïque. Aucune réaction ne s'est produite, ce qui a infirmé notre hypothèse. Pour expliquer, et tenter de maîtriser, la migration aléatoire de l'acétate, l'acidité du Pd/C peut être évoquée (schéma 96).

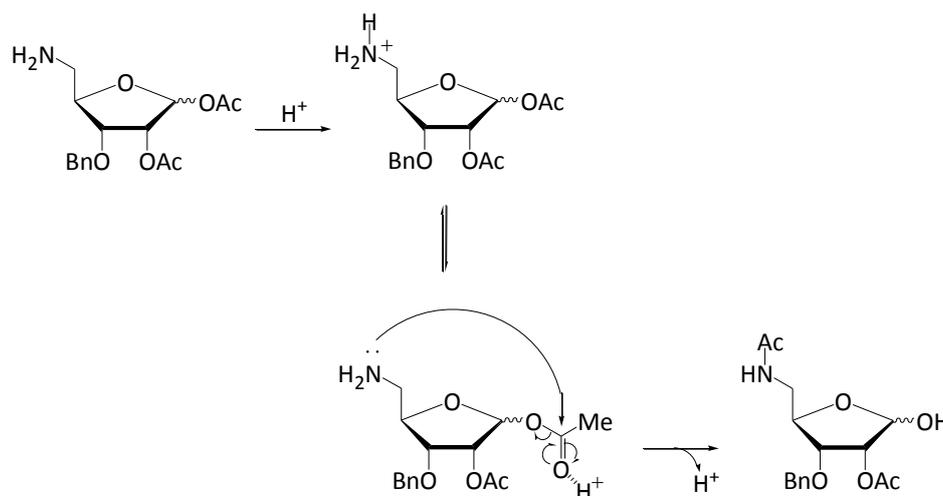


Schéma 96 : migration du groupement acétate.

Un essai a alors été réalisé avec 15% de Pd(OAc)₂ dans le THF sous pression d'hydrogène (1 bar) pour éviter toute acidité mais l'azoture est resté intact dans ces conditions.

Une réduction de Staudinger^[165] a également été tentée, elle a conduit à un composé majoritaire que nous avons supposé être l'intermédiaire iminophosphorane (sur la base des analyses par spectrométrie de masse et par RMN), qui semble stable et qui n'a pas été hydrolysé (schéma 97).

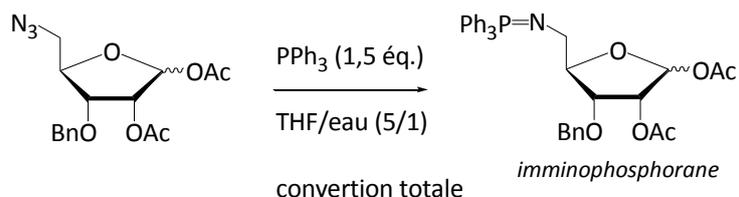


Schéma 97 : réduction de l'azoture en conditions de Staudinger.

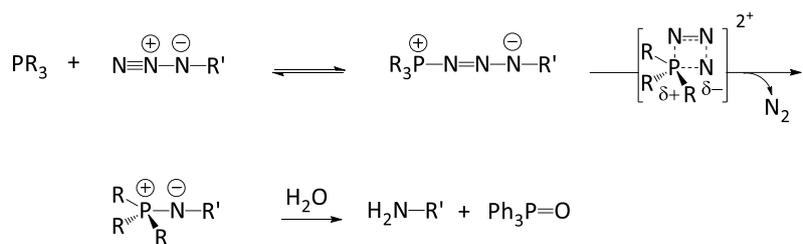
L'hydrolyse n'a pas été forcée et cette réaction n'a pas été explorée davantage car nos efforts se sont tournés vers l'étude d'une réaction de couplage entre l'acide carboxylique et l'azoture, qui permettrait d'éviter ce problème et de supprimer une étape.

3.2.2 Synthèse de carboxamide via un iminophosphorane

3.2.2.1 Etude bibliographique

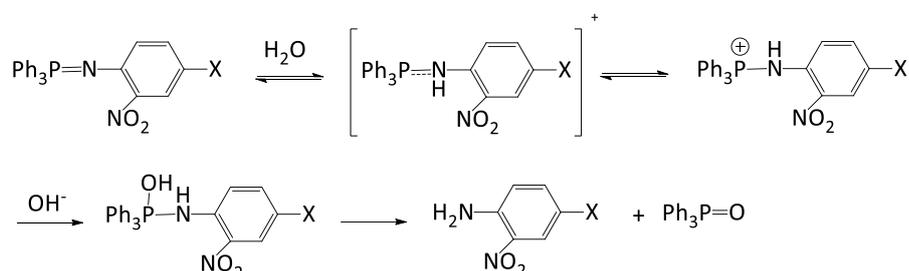
Il existe différentes méthodes de conversion monotopie d'azoture en amide dont celles qui génèrent l'amine libre *in situ*^{[45],[166]} et que nous avons préféré éviter craignant un éventuel transfert d'acétate. La présence d'une amine libre sur un substrat fonctionnalisé présente toujours un risque de réactions parasites et implique des étapes de protections et déprotections, aussi des méthodes de création de liaison amide sans générer d'amine libre ont été développées. Certaines impliquent une activation préalable de l'acide en thioacide (RCOSH)^[167] ou en sélénocarboxylate(RCOSe⁻)^[168] parfois délicates à mettre en œuvre. C'est pourquoi la méthode de conversion des azotures en amide qui intègre une étape de type Staudinger et qui implique la carbonylation d'imino-phosphorane a retenu notre attention. L'intermédiaire de la réaction de Staudinger^[165] est un imino-phosphorane dont l'atome d'azote est nucléophile (schéma 98). L'hydrolyse des *N*-arylimino(triphényl)phosphorane a été étudiée en 2005 par Pyun^[169] et le mécanisme proposé est en accord avec celui proposé dès 1970 par Zioudrou^[170] pour l'hydrolyse des imino(triéthoxy)phosphoranes (schéma 98). Ils en concluent qu'à pH < 8, la protonation de l'imino-phosphorane précède l'hydrolyse avec l'eau, tandis qu'à pH > 8 la protonation par l'eau devient l'étape cinétiquement limitante.

Réaction de Staudinger

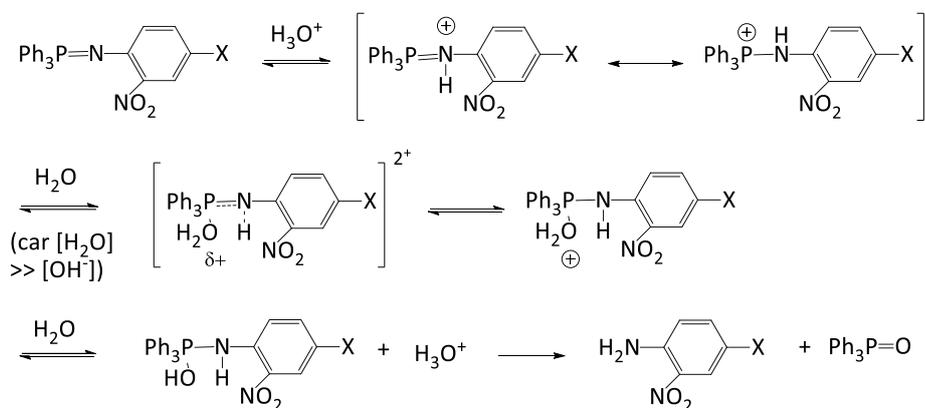
*imminophosphorane*

Mécanisme d'hydrolyse des aryliminotriphénylphosphorane :

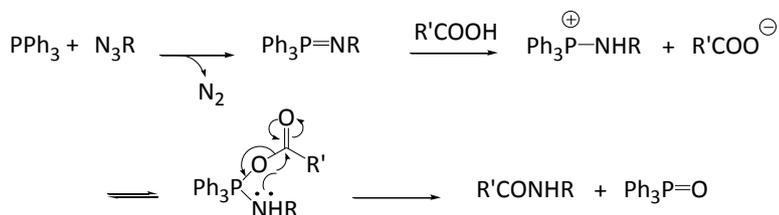
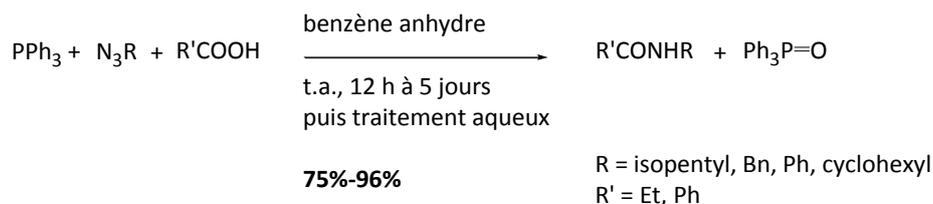
pH > 8



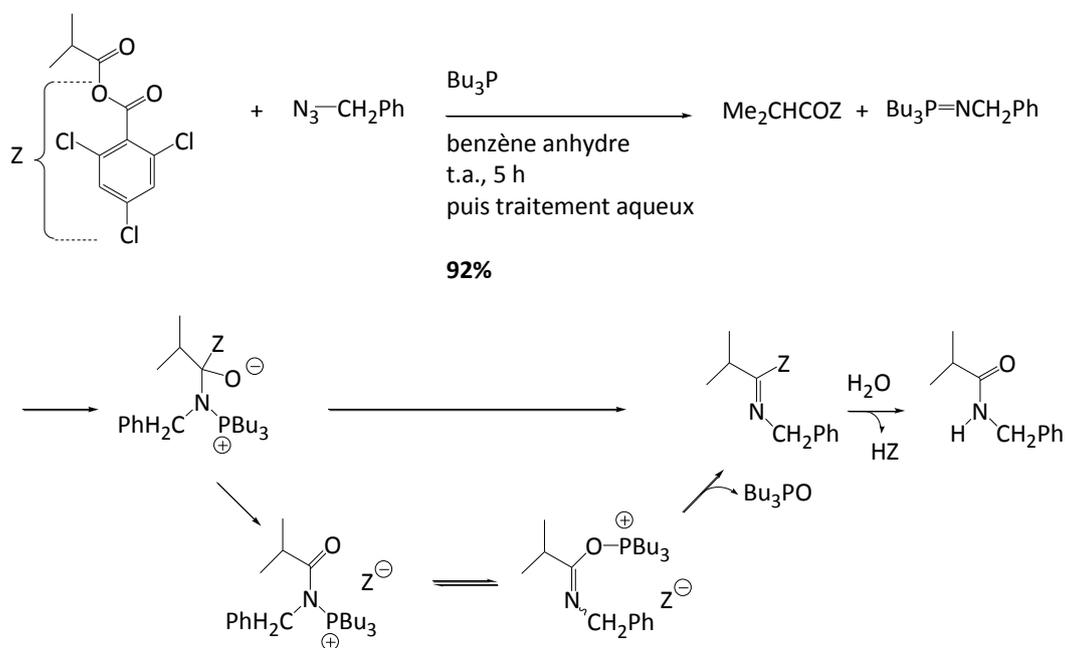
pH < 8

Schéma 98 : réaction de Staudinger^{[169],[170]}

Vilarrasa a développé en 1984 une application de la réaction de Staudinger pour la formation de liaison amide^[171]. Le schéma réactionnel ainsi qu'une proposition de mécanisme par les auteurs sont présentés sur le schéma 99.

Schéma 99 : synthèse de liaison amide par Vilarrasa^[171].

Plus tard, l'équipe de Vilarrasa^[172] a proposé une nouvelle méthode de macrolactamisation des ω -azido-acides offrant des rendements variables selon le cycle (de 38 à 82%) mais qui, en version intermoléculaire pour la synthèse d'amides linéaires, s'est avérée très efficace (rendements voisins de 90%). Elle implique un azoture, un anhydride mixte et la tributylphosphine (schéma 100). Les auteurs proposent des hypothèses mécanistiques qui impliquent une réaction de type aza-Wittig et/ou une voie alternative.

Schéma 100 : synthèse d'amide via un anhydride mixte par Vilarrasa^[172].

Suite aux travaux de Molina^[173] rapportant que la réaction entre des chlorures d'aryles et des iminotriphénylphosphoranes conduisait à des amido-phosphonium inhabituels (C-phosphonium au lieu du N-phosphonium classique), l'équipe de Vilarrasa a souhaité approfondir l'étude mécanistique de cette réaction^[174]. Les auteurs ont montré que les iminophosphoranes réagissent de manière semblable avec les chlorures d'acides et les anhydrides mixtes et que les trialkylphosphoranes et les triphénylphosphoranes ont une réactivité similaire vis à vis des acides carboxyliques activés. Ils ont conclu qu'en général, $\text{Bu}_3\text{P}=\text{NCH}_2\text{Ph}$ réagit rapidement et comme un nucléophile avec le carbonyle de l'acide activé $\text{RR}'\text{CHCOX}$ pour donner l'amide souhaité, exception faite des substrats de type $\text{Ph-CH}_2\text{-COX}$, ce qui explique les résultats étonnants de Molina (schéma 101).

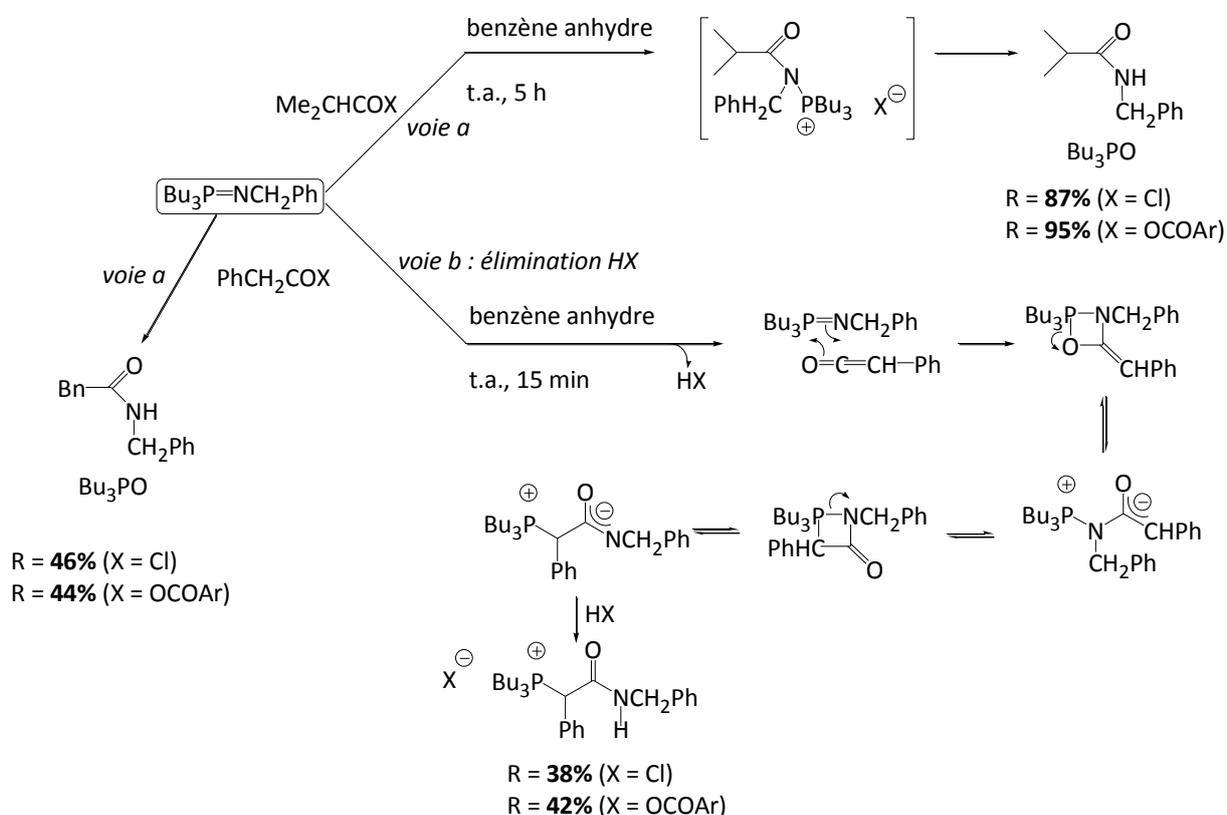


Schéma 101 : étude mécanistique par Vilarrasa^[174].

En 2000, Saxon et Bertozzi ont décrit une ligation de Staudinger, compatible avec l'eau et trouvant ainsi des applications en biologie et biochimie^[175]. Ils ont adapté cette ligation à la synthèse de liaison amide en synthétisant spécifiquement les phosphines et en proposant une ligation de Staudinger dite "sans trace"^[176]. En effet, la phosphine est reliée au groupe acyle par un lien hydrolysable, la réaction ne produit donc pas d'oxyde de triarylphosphine

toujours complexe à éliminer. Une application en synthèse nucléosidique est présentée sur le schéma 102.

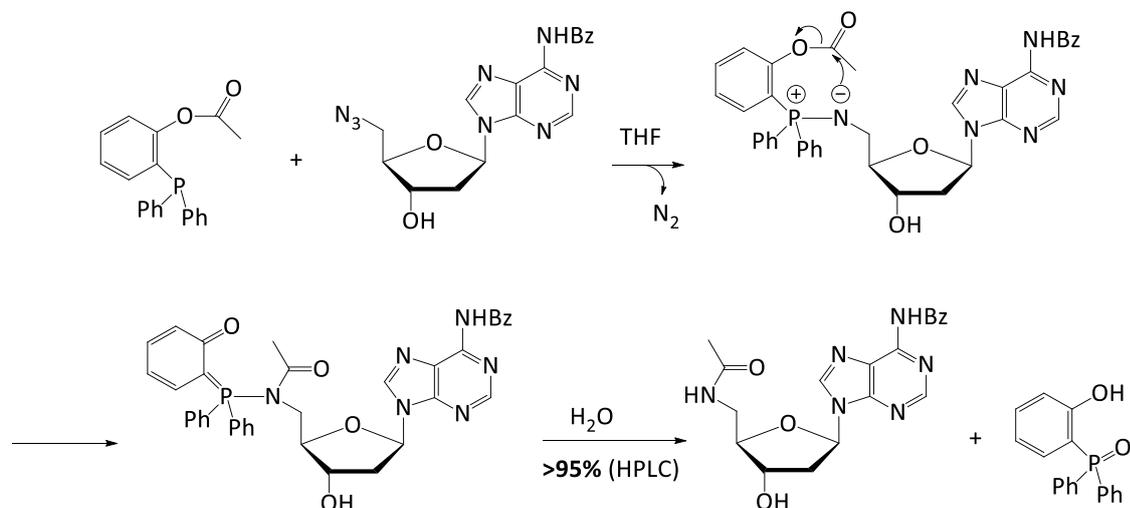


Schéma 102 : ligation de Staudinger "sans trace" par Saxon et Bertozzi^[176].

Les mêmes auteurs ont publié en 2005^[177] une étude mécanistique de la ligation de Staudinger mettant en évidence le caractère nucléophile de l'azote du phosphorane *via* un intermédiaire réactionnel isolé de type phosphorane (phosphore pentavalent) (schéma 103).

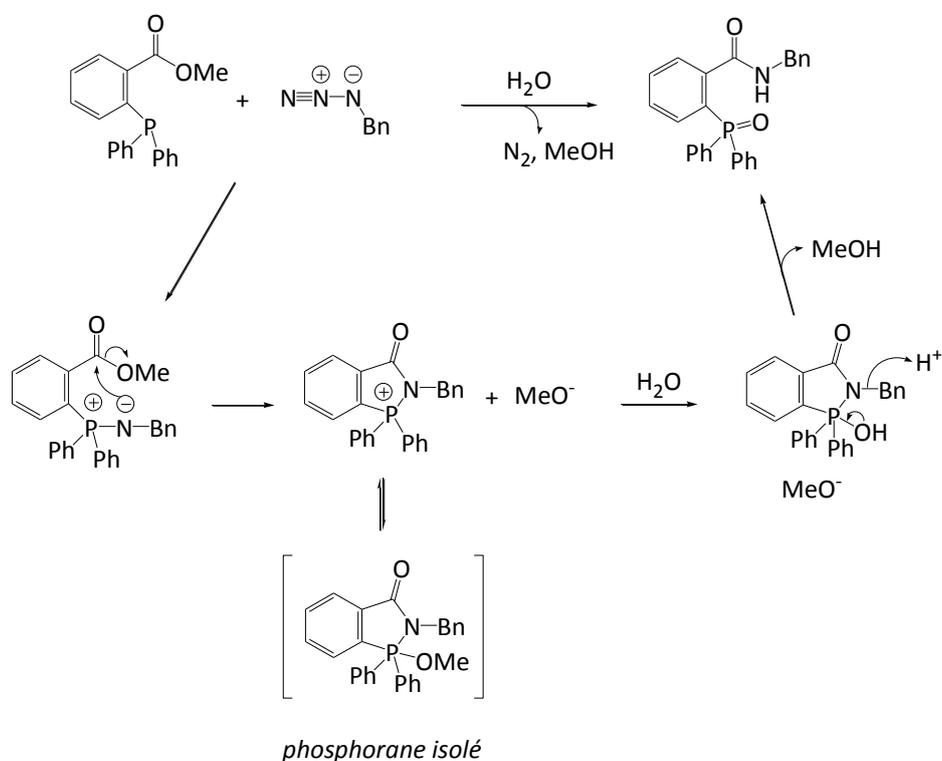


Schéma 103 : étude mécanistique de la ligation de Staudinger par Saxon et Bertozzi^[177].

En 2003, l'équipe de Fukuyama a réalisé la synthèse totale de la (-)-Ephedradine A en utilisant une réaction de couplage intramoléculaire entre un azoture et un acide préalablement activé et isolé (sous forme d'ester de pentafluorophénol) en présence de triphénylphosphine. Ils évoquent le passage par une réaction de Staudinger suivi d'une réaction d'aza-Wittig intramoléculaire menant à un iminoéther non-isolé, le couplage est en effet immédiatement suivi par l'hydrolyse qui a permis aux auteurs d'obtenir leur amide avec 73% de rendement.

En 2006, cette séquence réactionnelle a été utilisée par Strazewski^[178] et nommée "couplage de Staudinger-Vilarrasa" pour coupler des acides aminés à un dérivé d'adénine lors de la synthèse d'analogues de la Puromycine. L'acide est activé sous forme d'ester de benzotriazole *in situ* comme dans un couplage peptidique classique, ce qui rend cette méthode très attractive. Quelques années plus tard, Strazewski^[179] a rapporté une amélioration notable à cette méthode en proposant l'utilisation de triméthylphosphine qui est la seule alkylphosphine commerciale dont l'oxyde est soluble dans l'eau.

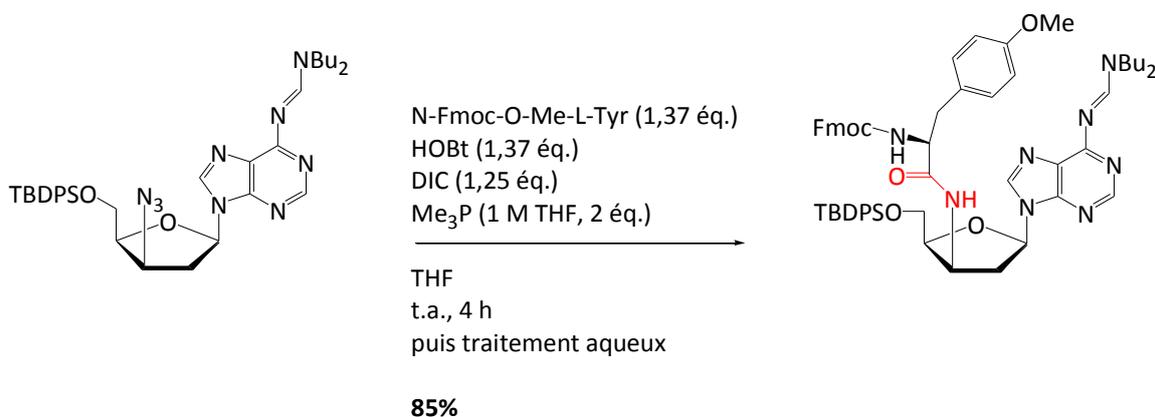


Schéma 104 : couplage de Staudinger-Vilarrasa appliqué à la synthèse d'un dérivé amidique de désoxyribonucléotide par Strazewski^[179].

Récemment, Vilarrasa^[180] a décrit une version catalytique de la réaction de Staudinger-Vilarrasa et a montré que le mécanisme ne passait pas par une aza-Wittig. En effet, le suivi par RMN du phosphore a permis de mettre en évidence différents intermédiaires mais l'intermédiaire imine caractéristique de la réaction d'aza-Wittig n'a jamais été détecté (schéma 105).

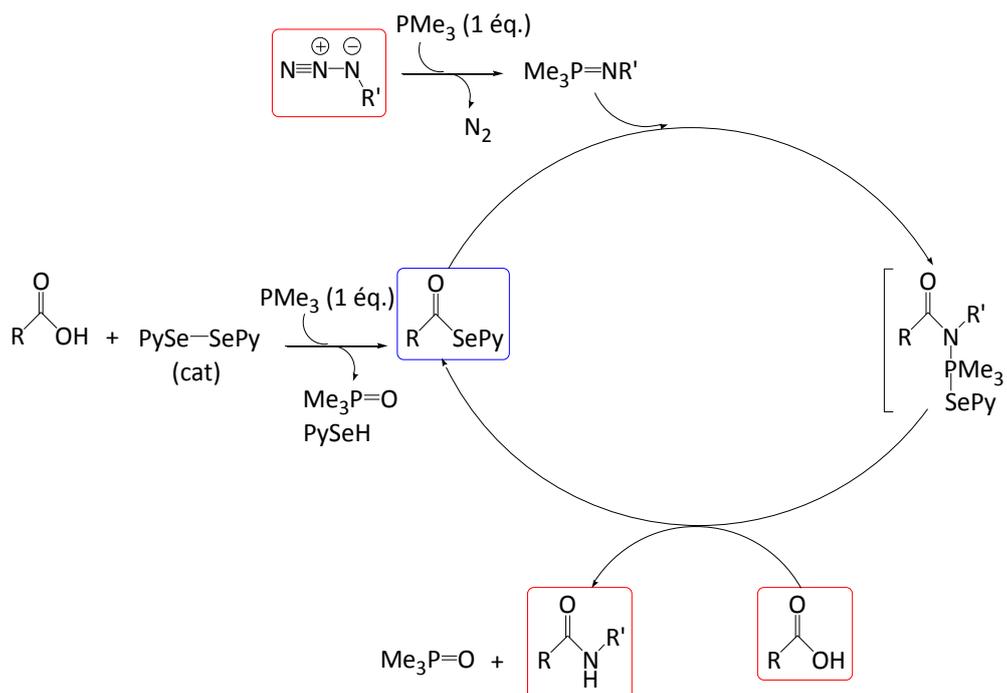
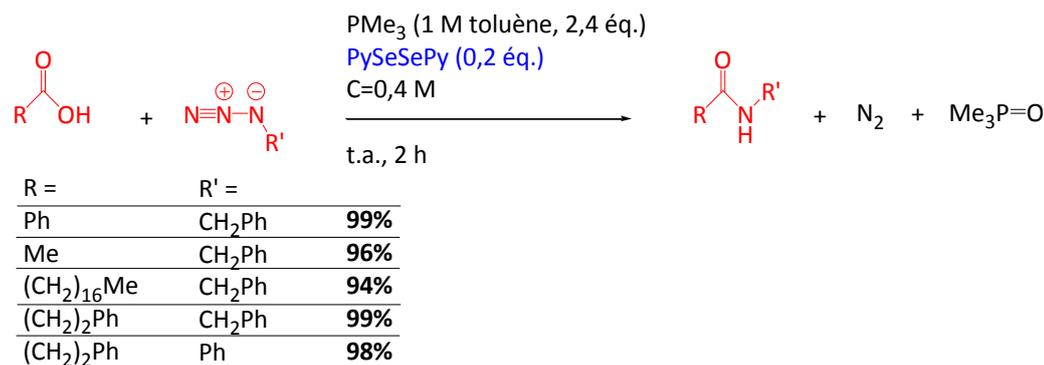


Schéma 105 : réaction de couplage en version catalytique selon Vilarrasa^[180].

La réaction entre l'acide activé RCOSePy et l'imino-phosphorane $\text{Me}_3\text{P}=\text{NR}'$ ne donne pas d'intermédiaire imine caractéristique des mécanismes concertés [2+2].

3.2.2.2 Application à la synthèse de l'hétérodimère 52

Nous avons choisi de tester la méthode de couplage de Staudinger-Vilarrasa en version catalytique sur notre azoture **50** avec différents partenaires acides carboxyliques et avec les phosphines et les catalyseurs dont nous disposions. Le catalyseur de choix selon Vilarrasa^[180] est le 2,2'-dipyridyl disélénide (PySeSePy) très coûteux (126€ les 10 mg) c'est pourquoi nous avons sélectionné le diphenyl disélénide. Nous avons également testé le couplage selon le protocole décrit par Strazewski^[179]. Ces essais sont présentés dans le tableau 14.

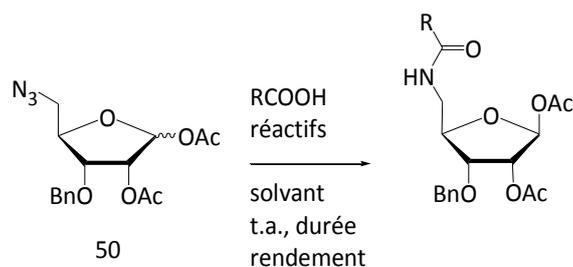
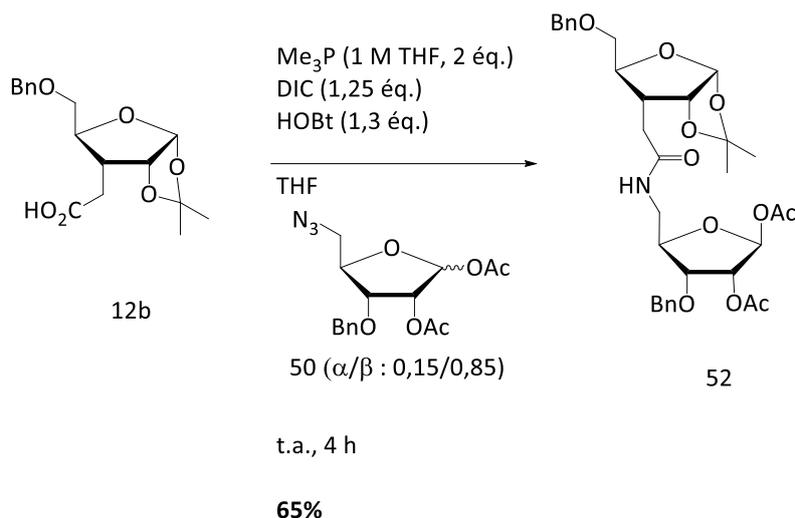


Schéma 106 : essais de création de liaison amide par une réaction de Staudinger-Vilarrasa.

E	RCOOH	Réactifs	Solvant/durée	Rdt amide
1	R=Ph-(CH ₂) ₂ - (1 éq.)	PhSeSePh (0,2 éq.), Me ₃ P (1 M THF, 2,4 éq.)	toluène / 18 h	41 47%
2	12b (1 éq.) 8b	PhSeSePh (0,2 éq.), Me ₃ P (1 M THF, 2,4 éq.)	toluène / 20 h	52 37%
3	12b (1 éq.)	PhSeSePh (0,2 éq.), Me ₃ P (1 M THF, 2,4 éq.) puis PhSeSePh (0,2 éq.)	toluène / 19 h puis 24 h	52 31%
4	12b (1,3 éq.)	Me ₃ P (1 M THF, 2 éq.), DIC (1,25 éq.), HOBT (1,3 éq.)	THF, 4 h	52 65%

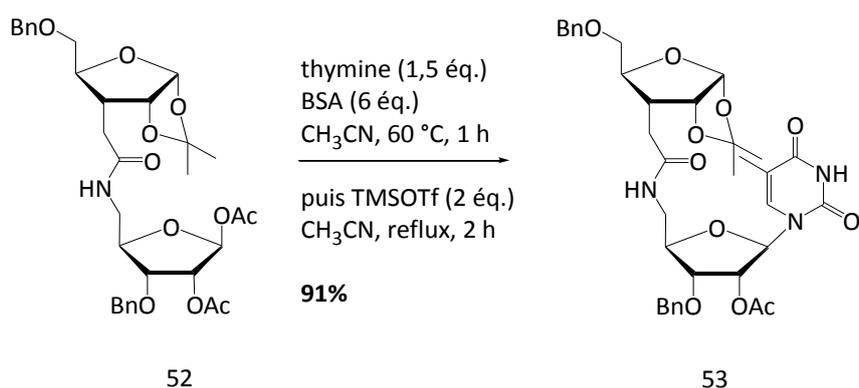
Tableau 14 : essais dans les conditions catalytiques de Vilarrasa^[180] puis de Stratzewski^[179].

L'essai 1 est cohérent avec la littérature^[180], en effet les auteurs ont montré que le THF n'est pas le solvant de choix pour cette réaction contrairement au toluène or la phosphine dont nous disposions était en solution dans le THF. Le catalyseur utilisé n'était pas non plus le plus performant, aussi un rendement autour de 40% est tout à fait conforme aux attentes. Les essais 2 et 3 montrent que la réactivité de nos substrats pour un couplage de ce type est encourageante. Enfin, en présence d'agents de couplage et de PMe₃ (essai 4, conditions de Stratzewski) nous avons isolé l'hétérodimère attendu **52** avec un rendement satisfaisant de 65% (schéma 107).

Schéma 107 : synthèse de l'hétérodimère ribosidique **52**.

L'hétérodimère ribosidique **52** a ainsi été synthétisé, en 17 étapes avec un très bon rendement global de 31%.

Le temps initialement prévu pour mener à bien ce projet ayant été atteint, les expériences ont été suspendues pour rédiger ce manuscrit. Parallèlement, l'étape de glycosylation a été réalisée dans les conditions préalablement mises au point (BSA/TMSOTf) et a permis d'isoler le composé **53** lors d'un essai. L'étape de purification a consisté en de nombreux lavages à l'eau qui ont cette fois permis d'éliminer efficacement la thymine, évitant ainsi les purifications sur gel de silice parfois mal supportées par ces composés.

Schéma 108 : synthèse du nucléoside **53**.

A ce jour, un deuxième essai n'a pas permis de confirmer ce résultat et d'obtenir les quantités suffisantes de dimère **53** pour poursuivre la synthèse. Cette étape doit encore être optimisée, puis, par analogie avec les transformations que nous avons réalisées avec succès

sur le dimère désoxy **24** (schéma 109), il restera deux étapes à réaliser pour obtenir l'hétérodimère ribonucléosidique **57** ciblé et ses analogues. La réussite de ces étapes serait conforme à ce que nous avons obtenu lors du composé désoxy **24**.

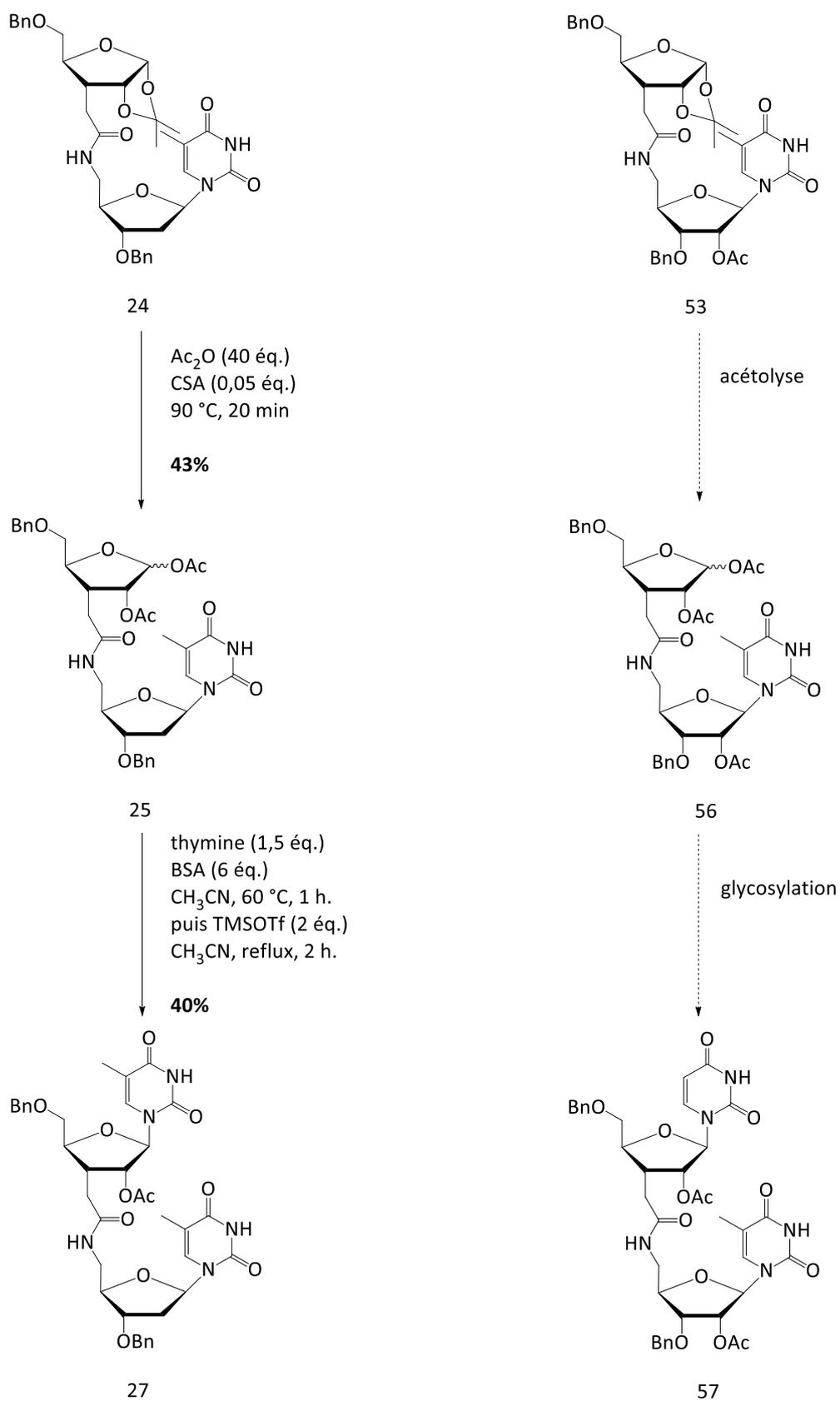


Schéma 109 : synthèse du nucléoside **57**, analogie avec la synthèse du nucléoside **27**.

Conclusions et perspectives

Les oligonucléotides antisens sont au coeur de la thérapie génique depuis plus de trente ans^[3] et l'intérêt que suscitent ces molécules synthétiques n'a pas cessé de croître depuis. Les études concernant leurs modifications synthétiques afin de les rendre stables dans le milieu physiologiques tout en conservant leur affinité pour l'ARNm cible ont débuté dans les années 90^[43] et continuent de motiver de nombreuses équipes de recherche à travers le monde. Les études biologiques sont en pleine expansion grâce aux moyens techniques de plus en plus performants et parce que l'intérêt thérapeutique demeure toujours très vif. Ces études ont porté encore très récemment sur plusieurs oligonucléotides antisens en phase clinique III et l'un d'entre eux s'étant distingué en mai 2014, son AMM est attendue pour cette année.

Depuis une quinzaine d'années, une autre famille d'oligonucléotides est très étudiée, ce sont les petits ARN (microARN). La découverte de ces ARN interférents cellulaires, leur fonctionnement et leurs implications dans la régulation des gènes a ouvert le champ des possibilités thérapeutiques liées aux petits ARN de synthèse. Il s'agit soit d'utiliser la machinerie cellulaire d'interférence pour réguler artificiellement l'expression des gènes en mimant l'action naturelle des ARN interférents cellulaires ou de bloquer ces ARN interférents cellulaires lorsqu'ils ne fonctionnent pas correctement et induisent des pathologies. De nouveaux miARN sont découverts régulièrement ainsi que leurs rôles pour le fonctionnement cellulaire et alimentent des bases de données. Les pathologies associées au dysfonctionnement des miARN sont très variées (cancers, troubles cardiaques, maladies auto-immunes, troubles neurologiques...) et en découverte permanente.

Dans ce contexte, la recherche de voies de synthèse efficaces et générales d'oligonucléotides modifiés pour être physiologiquement stables tout en conservant la même affinité pour la cible (ARNm ou miARN) est une priorité. Les voies de synthèses actuelles ont l'immense avantage d'exister et de permettre la réalisation d'études biologiques mais la stabilité des oligonucléotides de synthèse dans le milieu reste un problème majeur. Une modification chimique s'est imposée comme la modification de choix car mimant parfaitement le lien naturel phosphodiester tout en étant très stable dans le milieu physiologique, il s'agit du lien amidique entre deux unités désoxyribonucléosidiques^[45] ou ribonucléosidiques^[58].

Les dimères ribonucléosidiques ayant un lien amide peuvent être incorporés dans des chaînes d'ADN ou d'ARN aussi leur synthèse revêt un très large intérêt. Quelques équipes ont tenté de mettre au point une voie de synthèse générale grâce à une introduction tardive de la base azotée. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.3.2.2, elles mènent à des intermédiaires nucléosidiques fonctionnalisés pouvant ensuite créer un lien amide, chaque partenaire étant synthétisé en une quinzaine d'étapes avec des rendements souvent inférieurs voire très inférieurs à 10% et dont le couplage et les protections-déprotections nécessaires conduisent à un rendement global de synthèse en dimères nucléosidiques très faible.

Nous avons souhaité mettre au point une méthode encore plus générale passant par la construction d'un squelette de type dimère ribosidique possédant le lien amide et permettant d'introduire en fin de synthèse les deux bases azotées naturelles ou non offrant ainsi une grande diversité de combinaisons. La stratégie originale étant définie, pour être pertinente cette synthèse doit absolument être efficace.

L'obtention de la plateforme homodimère ribosidique **35** en 18 étapes avec un rendement global de 19% a été une première réussite importante. La synthèse de l'hétérodimère ribosidique **52** en 17 étapes avec un très bon rendement global de 31% représente un résultat encore plus satisfaisant car les améliorations réalisées lors de cette synthèse notamment l'économie d'une étape (couplage de l'acide avec l'azoture au lieu de l'amine) et l'amélioration très significative de l'étape d'acétolyse (rendement doublé) pourront être introduites dans la voie de synthèse de l'homodimère **35**.

Enfin, l'étape clé de glycosylation a été réalisée avec succès sur l'homodimère ribosidique **35** permettant l'obtention de deux dimères ribonucléosidiques avec un lien amide, le dimère T*T et le dimère U*U avec respectivement 8% et 10% de rendement global en 20 étapes, ce qui permet de qualifier cette stratégie innovante d'efficace. L'accès aux hétérodimères ribonucléosidiques est encore en cours d'optimisation au niveau de la première glycosylation qui a lieu sur l'hétérodimère ribosidique **52** possédant un groupement acétonide. Les conditions de glycosylation vont être adaptées afin d'obtenir l'hétérodimère monoglycosylé **53** de manière aussi efficace que tous les autres composés de cette stratégie. Ensuite, les deux étapes d'acétolyse et de glycosylation seront reproduites, théoriquement sans difficulté comme déjà réalisé avec succès sur différents précurseurs, que ce soit l'homodimère ribosidique **35** ou l'hétérodimère désoxyribonucléosidique **24**.

Références bibliographiques

- [1] Baas, P. D., Jansz, H. S., *J. Mol. Biol.* **1972**, *63*, 557-568.
- [2] Belmont, P., Constant, J.-F., Demeunynck, M., *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 70-81.
- [3] Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280-284.
- [4] Hélène, C., *Eur. J. Cancer*, **1994**, *30*, 1721-1726.
- [5] Richardson, P. L., Schepartz, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5109-5111.
- [6] Dove, A., *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 121-124.
- [7] Al-Mahmood, S., Colin, S., Farhat, N., Thorin, E., Steverlyncck, C., Chemtob, S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 496-504.
- [8] Cloutier, F., Lawrence, M., Goody, R., Lamoureux, S., Al-Mahmood, S., Colin, S., Ferry, A., Conduzorgues, J.-P., Hadri, A., Cursiefen, C., Udaondo, P., Viaud, E., Thorin, E., Chemtob, S., *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2012**, *53*, 1195-1203.
- [9] Rana, T. M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 23-36.
- [10] Chivukula, Raghu R., Shi, G., Acharya, A., Mills, Eric W., Zeitels, Lauren R., Anandam, Joselin L., Abdelnaby, Abier A., Balch, Glen C., Mansour, John C., Yopp, Adam C., Maitra, A., Mendell, Joshua T., *Cell* **2014**, *157*, 1104-1116.
- [11] Szabo, G., Bala, S., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10*, 542-552.
- [12] Flemming, A., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 336-336.
- [13] Esau, C. C., Monia, B. P., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 101-114.
- [14] Kurreck, J., *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
- [15] Moulton, H. M., Moulton, J. D., *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 2296-2303.
- [16] Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S. D., Partridge, T. A., Lu, Q. L., *Nat. Med.* **2006**, *12*, 175-177.
- [17] Le Hir, M., Goyenvalle, A., Peccate, C., Precigout, G., Davies, K. E., Voit, T., Garcia, L., Lorain, S., *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1551-1558.
- [18] Štambaský, J., Hocek, M., Kočovský, P., *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- [19] Herdewijn, P., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 297-310.
- [20] Zamaratski, E., Pradeepkumar, P. I., Chattopadhyaya, J., *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 189-208.
- [21] Crooke, S. T., Lemonidis, K. M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E. A., Monia, B. P., *Biochem. J.* **1995**, *312*, 599-608.
- [22] Sierakowaka, H., Sambade, M. J., Agrawal, S., Kole, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 12840-12844.
- [23] Lebreton, J., Escudier, J.-M., Arzel, L., Len, C., *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3371-3418.
- [24] Srivastava, P., Barman, J., Pathmasiri, W., Plashkevych, O., Wenska, M., Chattopadhyaya, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8362-8379.
- [25] Xu, J., Liu, Y., Dupouy, C., Chattopadhyaya, J., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6534-6554.
- [26] Kumar, S., Hansen, M. H., Albæk, N., Steffansen, S. I., Petersen, M., Nielsen, P., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6756-6769.

- [27] Zhou, C., Liu, Y., Andaloussi, M., Badgujar, N., Plashkevych, O., Chattopadhyaya, J., *J. Org. Chem.* **2008**, *74*, 118-134.
- [28] Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J., *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.
- [29] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J.-i., Morio, K.-i., Doi, T., Imanishi, T., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401-5404.
- [30] Bondensgaard, K., Petersen, M., Singh, S. K., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Wengel, J., Jacobsen, J. P., *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 2687-2695.
- [31] Damha, M. J., Wilds, C. J., Noronha, A., Brukner, I., Borkow, G., Arion, D., Parniak, M. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12976-12977.
- [32] De, C. E., Eckstein, E., Merigan, T. C., *Science* **1969**, *165*, 1137-1139.
- [33] Campbell, J. M., Bacon, T. A., Wickstrom, E., *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.
- [34] Phillips, M. I., Zhang, Y. C., *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 46-56.
- [35] Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., Erdmann, V. A., *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.
- [36] Gao, W. Y., Han, F. S., Storm, C., Egan, W., Cheng, Y. C., *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 223-229.
- [37] Rockwell, P., O'Connor, W. J., King, K., Goldstein, N. I., Zhang, L. M., Stein, C. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6523-6528.
- [38] Crooke, S. T., *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 3-45.
- [39] Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J. S., Broder, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7706-7710.
- [40] Mulamba, G. B., Hu, A., Azad, R. F., Anderson, K. P., Coen, D. M., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 971-973.
- [41] De Mesmaeker, A., Lebreton, J., Waldner, A., Cook, P. D., International Patent WO 92/20, 823, **1992**.
- [42] Lebreton, J., De Mesmaeker, A., Waldner, A., *Synlett* **1994**, 54-56.
- [43] De Mesmaeker, A., Waldner, A., Lebreton, J., Hoffmann, P., Fritsch, V., Wolf, R. M., Freier, S. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226-229.
- [44] De Mesmaeker, A., Waldner, A., Wendeborn, S., Wolf, R. M., *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 437-440.
- [45] Lebreton, J., Waldner, A., Lesueur, C., De Mesmaeker, A., *Synlett* **1994**, *1994*, 137-140.
- [46] Selvam, C., Thomas, S., Abbott, J., Kennedy, S. D., Rozners, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2068-2070.
- [47] Faria, M., Spiller, D. G., Dubertret, C., Nelson, J. S., White, M. R. H., Scherman, D., Helene, C., Giovannangeli, C., *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 40-44.
- [48] Summerton, J., Weller, D., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187-195.
- [49] Lacerra, G., Sierakowska, H., Carestia, C., Fucharoen, S., Summerton, J., Weller, D., Kole, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9591-9596.
- [50] Eisen, J. S., Smith, J. C., *Development* **2008**, *135*, 1735-1743.
- [51] Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., Buchardt, O., *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [52] Knudsen, H., Nielsen, P. E., *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 494-500.
- [53] Lecosnier, S., Cordier, C., Simon, P., François, J.-C., Saison-Behmoaras, T. E., *FASEB J.* **2011**, *25*, 2201-2210.
- [54] Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouv, J., Oerum, H., Jacobsen, M. H., Wengel, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5633-5638.
- [55] Swayze, E. E., Siwkowski, A. M., Wancewicz, E. V., Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Hung, G., Monia, B. P., Bennett, C. F., *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 687-700.
- [56] Bennett, C. F., Swayze, E. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 259-293.
- [57] Gong, W., Desaulniers, J.-P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6934-6937.
- [58] Mutisya, D., Selvam, C., Lunstad, B. D., Pallan, P. S., Haas, A., Leake, D., Egli, M., Rozners, E., *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6542-6551.

- [59] von Matt, P., Lochmann, T., Kesselring, R., Altmann, K.-H., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1873-1876.
- [60] Peterson, M. A., Nilsson, B. L., Sarker, S., Doboszewski, B., Zhang, W., Robins, M. J., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.
- [61] Yamamoto, I., Sekine, M., Hata, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 306-310.
- [62] Hakimelahi, G. H., Proba, Z. A., Ogilvie, K. K., *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106-1113.
- [63] Meier, C., Huynh-Dinh, T., *Synlett* **1991**, *1991*, 227-228.
- [64] Rozners, E., Katkevica, D., Bizdena, E., Strömberg, R., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12125-12136.
- [65] Lu, D.M., Min, J.M., Zhang, L.H., *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 193-197.
- [66] Robins, M. J., Doboszewski, B., Timoshchuk, V. A., Peterson, M. A., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2939-2945.
- [67] Yoshimura, Y., Sano, T., Matsuda, A., Ueda, T., *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 162-167.
- [68] Kochetkova, S. V., Varizhuk, A. M., Kolganova, N. A., Timofeev, E. N., Florent'ev, V. L., *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2009**, *35*, 68-74.
- [69] Varizhuk, A., Kochetkova, S., Kolganova, N., Timofeev, E., Florentiev, V., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30*, 31-48.
- [70] Varizhuk, A. M., Kochetkova, S. V., Fedotov, A. U., Kolganova, N. A., Timofeev, E. N., Florentiev, V. L., *Lett. Org. Chem.* **2012**, *9*, 106-113.
- [71] Varizhuk, A. M., Kochetkova, S. V., Kolganova, N. A., Timofeev, E. N., Florentiev, V. L., *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2010**, *36*, 528-531.
- [72] Xu, Q., Katkevica, D., Rozners, E., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5906-5913.
- [73] Tanui, P., Kullberg, M., Song, N., Chivate, Y., Rozners, E., *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4961-4964.
- [74] Rozners, E., Liu, Y., *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9841-9848.
- [75] De, M. A., Lebreton, J., Jouanno, C., Fritsch, V., Wolf, R. M., Wendeborn, S., *Synlett* **1997**, 1287-1290.
- [76] Maiti, S. N., Singh, M. P., Micetich, R. G., *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1423-1424.
- [77] Baker, B. R., Schaub, R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 5900-5905.
- [78] Bozó, É., Boros, S., Kuzsmann, J., Gács-Baitz, E., Párkányi, L., *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 297-310.
- [79] Kim, J., Weledji, Y. N., Greenberg, M. M., *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6100-6104.
- [80] Moyroud, E., Strazewski, P., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1277-1284.
- [81] Lu, Y., Just, G., *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1677-1687.
- [82] Corey, E. J., Suggs, J. W., *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647-2650.
- [83] Pilar Vázquez-Tato, M., Seijas, J. A., Fleet, G. W. J., Mathews, C. J., Hemmings, P. R., Brown, D., *Tetrahedron* **1995**, *51*, 959-974.
- [84] Novikov, Y. Y., Sampson, P., *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2263-2266.
- [85] Corey, E. J., Ensley, H. E., *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6908-6909.
- [86] Shet, J., Desai, V., Tilve, S., *Synthesis* **2004**, *2004*, 1859-1863.
- [87] Ewing, D. F., Goethals, G., Mackenzie, G., Martin, P., Ronco, G., Vanbaelinghem, L., Villa, P., *Carbohydr. Res.* **1999**, *321*, 190-196.
- [88] Han, J.-S., Lowary, T. L., *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4116-4119.
- [89] Avi, M., Fechter, M. H., Gruber, K., Belaj, F., Pöchlauer, P., Griengl, H., *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10411-10418.
- [90] Mancuso, A. J., Huang, S.-L., Swern, D., *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480-2482.
- [91] Parr, I. B., Horenstein, B. A., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7489-7494.
- [92] Streicher, H., Meisch, J., Bohner, C., *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8851-8859.
- [93] Tojo, S., Isobe, M., *Synthesis* **2005**, *2005*, 1237-1244.
- [94] Sánchez-Eleuterio, A., Quintero, L., Sartillo-Piscil, F., *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5466-5471.
- [95] Togo, H., Aoki, M., Kuramochi, T., Yokoyama, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2417-2427.

- [96] De Mico, A., Margarita, R., Parlanti, L., Vescovi, A., Piancatelli, G., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6974-6977.
- [97] Nooy, A. E. J. d., Besemer, A. C., Bekkum, H. v., *Synthesis* **1996**, *1996*, 1153-1176.
- [98] Lemaire, S., Houpis, I., Wechselberger, R., Langens, J., Vermeulen, W. A. A., Smets, N., Nettekoven, U., Wang, Y., Xiao, T., Qu, H., Liu, R., Jonckers, T. H. M., Raboisson, P., Vandyck, K., Nilsson, K. M., Farina, V., *J. Org. Chem.* **2010**, *76*, 297-300.
- [99] Hrdlicka, P. J., Andersen, N. K., Jepsen, J. S., Hansen, F. G., Haselmann, K. F., Nielsen, C., Wengel, J., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2597-2621.
- [100] Shibuya, M., Tomizawa, M., Sasano, Y., Iwabuchi, Y., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4619-4622.
- [101] Liu, L., Postema, M. H. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8602-8603.
- [102] Martinkova, M., Gonda, J., Raschmanova, J. *Molecules* **2006**, *11*, 564-573.
- [103] Xavier, N. M., Rauter, A. P., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3339-3341.
- [104] Xie, M., Berges, D. A., Robins, M. J., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5178-5179.
- [105] Gong, Y., Sun, H., Xie, J., *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 6027-6033.
- [106] Nielsen, P., M. Pfundheller, H., Erik Olsen, C., Wengel, J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3423-3434.
- [107] Davoll, J., Lythgoe, B., Todd, A. R., *J. Chem. Soc.* **1948**, 967-969.
- [108] Davoll, J., Lythgoe, B., Todd, A. R., *J. Chem. Soc.* **1948**, 1685-1687.
- [109] Fischer, E., Helferich, B., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1914**, *47*, 210-235.
- [110] Davoll, J., Lowy, B. A., *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1650-1655.
- [111] Kazimierczuk, Z., Cottam, H. B., Revankar, G. R., Robins, R. K., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6379-6382.
- [112] Hilbert, G. E., Johnson, T. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1930**, *52*, 4490-4494.
- [113] Nishimura, T., Shimizu, B., Iwai, I., *Chem. Pharm. Bull.* **1963**, *11*, 1470-1472.
- [114a] Niedballa U., Vorbrüggen H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 461-462.
- [114b] Vorbrüggen, H., Bennua, B., *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1339-1342.
- [115] Vorbrüggen, H., Krolikiewicz, K., Bennua, B., *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234-1255.
- [116] Zou, R., Robins, M. J., *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1436-1437.
- [117] Zhong, M., Robins, M. J., *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9327-9330.
- [118] Zhong, M., Nowak, I., Robins, M. J., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7773-7779.
- [119] Shirouzu, H., Morita, H., Tsukamoto, M., *Tetrahedron* **2014**, *70*, 3635-3639.
- [120] Vorbrüggen, H., *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509-520.
- [121] Michigami, K., Uchida, S., Adachi, M., Hayashi, M., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 595-599.
- [122] Wang, Z., Prudhomme, D. R., Buck, J. R., Park, M., Rizzo, C. J., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5969-5985.
- [123] Robins, M. J., Wilson, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 932-933.
- [124] Mukaiyama, T., Hirano, N., Nishida, M., Uchiro, H., *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 99-100.
- [125] Liu, Z., Li, D., Yin, B., Zhang, J., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 240-243.
- [126] Hanessian, S., Condé, J. J., Lou, B., *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5865-5868.
- [127] Schmidt, J., Eschgfäller, B., Benner, S. A., *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2937-2958.
- [128] Gaster, J., Marx, A., *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1861-1870.
- [129] Kumar, S., Sharma, P. K., Stein, P. C., Nielsen, P., *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5715-5722.
- [130] Rangam, G., Rudinger, N. Z., Müller, H. M., Marx, A., *Synthesis* **2005**, 1467-1472.
- [131] Anisuzzaman, A. K. M., Whistler, R. L., *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3187-3189.
- [132] Prhavc, M., Bhat, B., Just, G., Dan Cook, P., Manoharan, M., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 995-997.
- [133] Lopin, C., Gautier, A., Gouhier, G., Piettre, S. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14668-14675.
- [134] Lourens, G. J., Koekemoer, J. M., *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3719-3722.
- [135] Larsen, E., Jorgensen, P. T., Sofan, M. A., Pedersen, E. B., *Synthesis* **1994**, *1994*, 1037-1038.
- [136] Cameron, M. A., Cush, S. B., Hammer, R. P., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 9065-9069.
- [137] Lan, T., McLaughlin, L. W., *Bioorg. Chem.* **2001**, *29*, 198-210.

- [138] Singh, I., Seitz, O., *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4319-4322.
- [139] Wurst, J. M., Verano, A. L., Tan, D. S., *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4442-4445.
- [140] Gohlke, H., Bozilovic, J., Engels, J. W., in *Fluorine in Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, pp. 3-32, **2012**, Imperial College Press.
- [141] Haraguchi, K., Takeda, S., Tanaka, H., Nitanda, T., Baba, M., Dutschman, G. E., Cheng, Y.-C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3775-3777.
- [142] Shi, J., Ray, A. S., Mathew, J. S., Anderson, K. S., Chu, C. K., Schinazi, R. F., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2159-2162.
- [143] Griffin, B. E., Todd, A., *J. Chem. Soc.* **1958**, 1389-1393.
- [144] Michelson, A. M., Todd, A. R., *J. Chem. Soc.* **1953**, 951-956.
- [145] Hata, T., Yamamoto, I., Sekine, M., *Chem. Lett.* **1975**, 977-980.
- [146] Grugier, J., Xie, J., Duarte, I., Valéry, J.-M., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 979-984.
- [147] Staudinger, H., Meyer, J., *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [148] Yi, T., Wu, A.-T., Wu, S.-H., Zou, W., *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11716-11722.
- [149] Sandbhor, M., Bhasin, M., Williams, D. T., Hsieh, M., Wu, S.-H., Zou, W., *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2878-2886.
- [150] Simone, M., Edwards, A., Tranter, G., Fleet, G. J., *Amino Acids* **2011**, *41*, 643-661.
- [151] Jabgunde, A. M., Yeole, S. D., Sanap, S. P., Gadre, S. R., Dhavale, D. D., *Synthesis* **2012**, *44*, 2277-2286.
- [152] Siriwardena, A., Pulukuri, K. K., Kandiyal, P. S., Roy, S., Bande, O., Ghosh, S., Garcia Fernández, J. M., Ariel Martin, F., Ghigo, J.-M., Beloin, C., Ito, K., Woods, R. J., Ampapathi, R. S., Chakraborty, T. K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10221-10226.
- [153] Varizhuk, A. M., Kochetkova, S. V., Kolganova, N. A., Timofeev, E. N., Florent'ev, V. L., *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2009**, *35*, 585-591.
- [154] Chevallerier, O. P., Migaud, M. E., *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 14.
- [155] Smellie, I. A., Bhakta, S., Sim, E., Fairbanks, A. J., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2257-2266.
- [156] Patil, N. T., John, S., Sabharwal, S. G., Dhavale, D. D., *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2155-2160.
- [157] Obika, S., Morio, K.-i., Nanbu, D., Hari, Y., Itoh, H., Imanishi, T., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3039-3049.
- [158] Morita, K., Takagi, M., Hasegawa, C., Kaneko, M., Tsutsumi, S., Sone, J., Ishikawa, T., Imanishi, T., Koizumi, M., *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2211-2226.
- [159] Couturier, S., Aljarah, M., Gosselin, G., Mathé, C., Périgaud, C., *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11260-11266.
- [160] Kawai, S. H., Chin, J., Just, G., *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 245-260.
- [161] Gagneron, J., Gosselin, G., Mathé, C., *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6891-6897.
- [162] Doboszewski, B., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 875-901.
- [163] Benhaddou, R., Czernecki, S., Valery, J. M., Bellosta, V., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1991**, 108-111.
- [164] Díaz Pérez, P., García-Moreno, M. I., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J. M., *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2903-2913.
- [165] Staudinger, H., Meyer, J., *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 619-635.
- [166] Bavikar, S. N., Salunke, D. B., Hazra, B. G., Pore, V. S., Thierry, J., Dodd, R. H., *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3815-3819.
- [167] Kolakowski, R. V., Shangguan, N., Sauers, R. R., Williams, L. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5695-5702.
- [168] Wu, X., Hu, L., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 765-774.
- [169] Pyun, S. Y., Lee, Y. H., Kim, T. R., *Kinet Catal* **2005**, *46*, 21-28.
- [170] Chaturvedi, R. K., Pletcher, T. C., Zioudrou, C., Schmir, G. L., *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 4339-4342.
- [171] Garcia, J., Urpí, F., Vilarrasa, J., *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4841-4844.
- [172] Bosch, I., Romea, P., Urpí, F., Vilarrasa, J., *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4671-4674.
- [173] Molina, P., Alajarín, M., López-Leonardo, C., Alcántara, J., *Tetrahedron* **1993**, *49*, 5153-5168.

- [174] Bosch, I., González, A., Urpí, F., Vilarrasa, J., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5638-5643.
- [175] Saxon, E., Bertozzi, C. R., *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [176] Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- [177] Lin, F. L., Hoyt, H. M., van Halbeek, H., Bergman, R. G., Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695.
- [178] Chapuis, H., Strazewski, P., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12108-12115.
- [179] Krishnakumar, K. S., Strazewski, P., *Synlett* **2010**, *2010*, 1055-1058.
- [180] Burés, J., Martín, M., Urpí, F. I., Vilarrasa, J., *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2203-2206.

4 Experimental part

General considerations

All solvents were reagent grade. Dichloromethane, ethyl acetate and petroleum ether were distilled on a *Buchi rotavapor R-220-SE*. Acetonitrile was freshly distilled from calcium hydride under argon. TMSOTf was freshly distilled under argon.

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on *Bruker Avance 300* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBO probe carefully tuned to the recording frequency of 300.13 MHz (for ^1H) and 75.47 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at room temperature (around 293-294 K), on a *Bruker Avance 400* spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBFO+ probe carefully tuned to the recording frequency of 400.13 MHz (for ^1H) and 100.61 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at 303 K, on a *Bruker Avance III 500* spectrometer fitted with a 5mm i.d. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ cryoprobe carefully tuned to the recording frequency of 500.13 MHz (for ^1H) and 125.76 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at 303 K. The spectra are referenced to the solvent in which they were run (7.26 ppm for ^1H CDCl_3 and 77.16 ppm for ^{13}C CDCl_3 , 2.50 ppm for ^1H DMSO-d_6 and 39.52 ppm for ^{13}C DMSO-d_6 , 3.31 ppm for ^1H CD_3OD and 49.00 ppm for ^{13}C , 7.16 ppm for ^1H C_6D_6 and 128.06 ppm for ^{13}C C_6D_6). Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm), and coupling constants (J) are given in Hz. Multiplicity of signals is indicated as following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), brs (broad singlet), dd (doublet of doublet), dt (doublet of triplet) ...

Mass spectrometry

Low resolution mass spectrometry (MS) were recorded on a *ThermoFinnigan DSQII* quadrupolar spectrometer (coupled with a *TracUltra GC* apparatus) for Chemical Ionization (CI), on a *ThermoFinnigan LCQ Advantage* spectrometer for ElectroSpray Ionisation (ESI).

High resolution mass spectrometry (HRMS) were recorded on a *ThermoFinnigan MAT95XL* spectrometer (for CI), on a *ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap* spectrometer (for ESI+), on a *Bruker Autoflex III* spectrometer (for MALDI+).

Chromatography

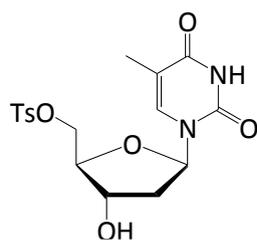
HPLC chromatograms were recorded on a *Agilent 1100* (UV detection), GC chromatograms were recorded on a *Agilent 6890N* (FID detection), Flash column chromatography : *SDS-CarloErba Silica gel 60 ACC (40-63 μ m)*, thin layer chromatography (TLC) : *Merck Silica gel 60 F254* analytical plates, detection either with UV (254 nm) or dipping in a solution of vanillin , molybdate and subsequent heating.

Infra-Red spectroscopy

Infra-Red spectra (IR) were recorded on a *Bruker Vector 22* spectrometer. The wave numbers (ν) are given in cm^{-1} .

Optical rotation measurements

Optical rotation data were obtained on a *Perkin-Elmer 341* polarimeter, in a 100 mm cell, under Na lamp radiation at 20 °C.

5'-O-tosyl-thymidine 1Chemical Formula: C₁₇H₂₀N₂O₇SMolecular Weight: 396.4 g.mol⁻¹

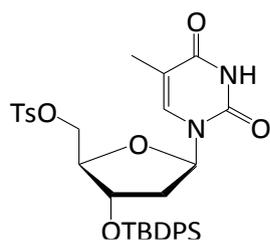
To a cooled solution of thymidine (1 eq, 20.6 mmol, 5 g) in dry pyridine (25 mL) was added dropwise a solution of tosyl chloride (1.1 eq, 22.7 mmol, 4.33g in 25 mL of dry pyridine). The mixture was stirred under argon for 10 h at 5 °C, then poured into iced water (150 mL), the aqueous layer was extracted with DCM (3x100 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (7.3 g, 18.4 mmol, 89%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 11.32 (s, 1 H, NH_T), 7.80 (brs, 1 H, H_{ar}), 7.78 (brs, 1 H, H_{ar}), 7.48 (brs, 1 H, H_{ar}), 7.46 (brs, 1 H, H_{ar}), 7.38 (d, *J*_{6,Me(T)} = 1.1, 1 H, H₆), 6.14 (t, *J*_{1',2'} = 6.8, 1 H, H_{1'}), 5.44 (d, *J*_{OH,3'} = 4.5, 1 H, OH), 4.28-4.23 (m, 1 H, H_{5'a}), 4.19-4.14 (m, 2 H, H_{5'b}, H_{3'}), 3.87-3.83 (m, 1 H, H_{4'}), 2.41 (s, 3 H, Me_{tosyl}), 2.20-2.05 (m, 2 H, H_{2'}), 1.76 (d, *J*_{6,Me(T)} = 0.9, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 164.05 (C₄), 150.67 (C₂), 145.41 (C_{IV(ar)}), 138.17 (C_{IV(ar)}), 136.19 (C₆), 128.34 (C_{ar}), 128.69 (C_{ar}), 110.11 (C₅), 85.47 (C_{4'}), 84.00 (C_{1'}), 71.34 (C_{3'}), 44.94 (C_{5'}), 38.28 (C_{2'}), 20.96 (Me_{tosyl}), 12.30 (Me_T).

MS (ESI⁺): *m/z* = 419.1 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₁₇H₂₀N₂O₇S₁Na = 419.0883 Da, found = 419.0887 Da.

3'-O-tert-butylidiphenylsilyl-5'-O-tosyl-thymidine 2Chemical Formula: $C_{33}H_{38}N_2O_7SSi$ Molecular Weight: $634.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS 138840-74-1

To a cooled solution of 1 (1 eq, 5 mmol, 2 g) in DMF (10 mL) was added imidazole (2.2 eq, 11.6 mmol, 760 mg). The mixture was stirred under argon for 15 min at 5 °C, then was added dropwise TBDPSCI (1.3 eq, 6.5 mmol, 1.8 mL) and the stirring was pursuing for 30 min at 5 °C. The mixture was stirring for 6 h at r.t. then quenched with water (100 mL) and extracted with Et₂O (2x100 mL). The combined organic layers were washed with brine (4x100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/MeOH, 99/1) to obtain the desired compound (1.93 g, 3.04 mmol, 61%).

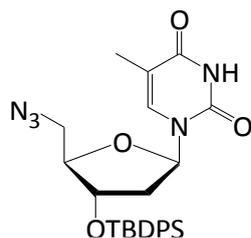
TLC: $R_f = 0.2$ (eluent: DCM/MeOH, 99/1).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.02 (s, 1 H, NH_T), 7.48-7.29 (m, 15 H, H_{ar}, H₆), 6.46 (dd, $J_{1',2'} = 8.7$, $J_{1',2'} = 5.6$, 1 H, H_{1'}), 4.32-4.28 (m, 1 H, H_{3'}), 3.95-3.89 (m, 2 H, H_{5'}), 3.32-3.28 (m, 1 H, H_{4'}), 2.44 (s, 3 H, Me_{tosyl}), 2.36-2.33 (m, 1 H, H_{2'a}), 2.31-2.28 (m, 1 H, H_{2'b}), 1.90 (brs, 3 H, Me_T), 1.05 (s, 9 H, tBu).

MS (ESI⁺): $m/z = 635.2 \text{ Da}$ [MH]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₃₃H₃₉N₂O₇S₁Si = 635.2242 Da, found = 635.2256 Da.

Literature reported compound: A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226-229.

3'-O-tert-butylidiphenylsilyl-5'-azido-thymidine 3Chemical Formula: C₂₆H₃₁N₅O₄SiMolecular Weight: 505.6 g.mol⁻¹

CAS 14657-62-2

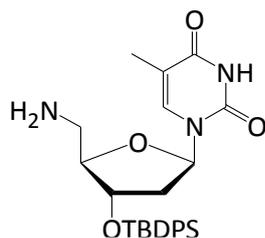
To a solution of 2 (1 eq, 2.36 mmol, 1.5 g) in DMF (30 mL) was added sodium azide (3.5 eq, 8.4 mmol, 550 mg). The mixture was stirred for 24 h at 65 °C, then cooled to r.t. and quenched with water (100 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (2x80 mL) and the combined organic layers were washed with brine (3x80 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (1.1 g, 2.17 mmol, 92 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.02 (s, 1 H, NH_T), 7.66-7.61 (m, 4 H, H_{ar(m)}), 7.49-7.39 (m, 6 H, H_{ar(o,p)}), 7.20 (d, J_{6,Me(T)} = 1.2, 1 H, H₆), 6.37 (dd, J_{1',2'b} = 8.0, J_{1',2'a} = 6.1, 1 H, H_{1'}), 4.31 (dt, J_{2'b,3'} = 6.2, J_{2'a,3'} = J_{3',4'} = 3.0, 1 H, H_{3'}), 3.96 (q, J_{3',4'} = J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = 3.3, 1 H, H_{4'}), 3.34 (dd, J_{gem} = 13.1, J_{4',5'a} = 3.0, H_{5'a}), 2.79 (dd, J_{gem} = 13.1, J_{4',5'b} = 3.4, H_{5'b}), 2.36 (ddd, J_{gem} = 13.5, J_{1',2'a} = 6.0, J_{2'a,3'} = 3.0, 1 H, H_{2'a}), 1.94 (ddd, J_{gem} = 13.6, J_{1',2'b} = 7.9, J_{2'b,3'} = 6.6, 1 H, H_{2'b}), 1.88 (d, J_{6,Me(T)} = 1.2, 3 H, Me_T), 1.08 (s, 9 H, tBu).

MS (ESI⁺): m/z = 506.2 Da [MH]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₆H₃₂N₅O₄Si = 506.2218 Da, found = 506.2233 Da.

Literature reported compound : De Mesmaeker, A., Lebreton, J., Waldner, A., Cook, P. D., International Patent WO 92/20, 823, **1992**.

3'-O-tert-butylidiphenylsilyl-5'-deoxyamino-thymidine 4

Chemical Formula: $C_{26}H_{33}N_3O_4Si$
Molecular Weight: $479.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS : 146557-63-3

To a solution of **3** (2 mmol, 1 g) in EtOH (10 mL) was added Pd/C (10% weight, 100 mg). The reaction was stirred under hydrogen pressure (1 bar) at r.t. for 24 h. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure to give **4** as single product (960 mg, 2 mmol, quantitative).

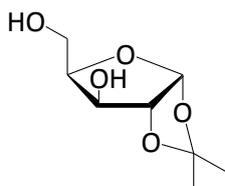
TLC: $R_f = 0.2$ (eluent: DCM/MeOH, 95/5).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.67-7.62 (m, 4 H, H_{ar}), 7.47-7.36 (m, 6 H, H_{ar}), 7.24 (d, $J_{6,\text{Me(T)}} = 1.3$, 1 H, H_6), 6.27 (t, $J_{1',2'} = 3.7$, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 4.29-4.23 (m, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 3.90-3.86 (m, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 2.68 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.5$, $J_{4',5'a} = 3.6$, $\text{H}_{5'a}$), 2.46 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.5$, $J_{4',5'b} = 5.5$, $\text{H}_{5'b}$), 2.34 (ddd, $J_{\text{gem}} = 13.5$, $J_{2'a,3'} = 6.2$, $J_{1',2'a} = 3.7$, 1 H, $\text{H}_{2'a}$), 2.02-1.93 (m, 1 H, $\text{H}_{2'b}$), 1.85 (d, $J_{6,\text{Me(T)}} = 1.2$, 3 H, Me_T), 1.08 (s, 9 H, $t\text{Bu}$).

MS (ESI⁺): $m/z = 480.2 \text{ Da}$ [MH]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si} = 480.2313 \text{ Da}$, found = 480.2311 Da.

Literature reported compound: A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226-229.

1,2-O-isopropylidene- α -D-xylofuranose 5

Chemical Formula: C₈H₁₄O₅
Molecular Weight: 190.2 g.mol⁻¹

To 350 mL of reagent acetone were added successively: sulfuric acid concentrated (2 mL), copper sulfate (1.88 eq, 250 mmol, 40 g) and xylose (1 eq, 133 mmol, 20 g). The reaction was stirred at r.t. for 48 h. The mixture was filtered, NH₄OHc (25%, 6.4 mL) was added, the mixture was filtered, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with methanol (150mL) and HCl 0.1N (44 mL) was added. The reaction was stirred at 40 °C for 2 h and quenched with NaHCO₃ (6.3 g until neutral pH). The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was co-evaporated with EtOH/toluene, was diluted with DCM, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (25.3 g, 133 mmol, quantitative).

GC: Rt = 8.55 min (column OPTIMA Δ3, 80 °C 1 min, then 12 °C/min until 250 °C)

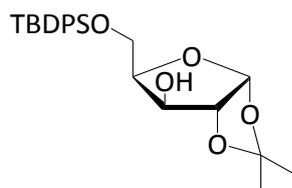
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.96 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H₁), 4.51 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H₂), 3.34 (br, 1 H, H₃), 4.15 (q, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = J_{4,3} = 3.2$, 1 H, H₄), 4.08 (d, $J_{5a,5b} = 12.2$, 1 H, H_{5a}), 3.50 (d, $J_{5a,5b} = 12.2$, 1 H, H_{5b}), 1.47 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.31 (s, 3 H, Me_{acetone}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 112.11 (C_{IV}), 105.62 (C₁), 85.75 (C₂), 83.77 (C₄), 78.95 (C₃), 66.32 (C₅), 26.96 (Me_{acetone}), 26.30 (Me_{acetone}).

MS (Cl⁺): m/z = 208 Da [MNH₄]⁺, 191 Da [MH]⁺.

MS (ESI⁺): m/z = 213.1 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₈H₁₄O₅Na = 213.0739 Da, found = 213.0739 Da.

1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-xylofuranose 6

Chemical Formula: C₂₄H₃₂O₅Si
Molecular Weight: 428.6 g.mol⁻¹

To a cooled solution of 1,2-*O*-isopropylidene- α -D-xylofuranose 5 (1 eq, 36.8 mmol, 7g) and imidazole (2.2 eq, 81 mmol, 5.5 g) in DMF (70 mL) was added *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (1 eq, 36.8 mmol, 9.5 mL). After stirring at r.t. for 48 h, the reaction was quenched with Et₂O (70 mL) and water (70 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3x70 mL) and the combined organic layers were washed with brine (5x70 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was poured into pentane, after 1 h at -18 °C the white solid was filtered to obtain the desired compound (11.3 g, 25 mmol, 70%).

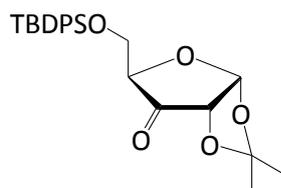
TLC: R_f = 0.35 (eluent: DCM) ; R_f = 0.23 (eluent: DCM/PE, 90/10) ; R_f = 0.1 (eluent: pentane/AcOEt, 95/5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.73-7.66 (m, 4 H, H_{ar}), 7.48-7.37 (m, 6 H, H_{ar}), 6.02 (d, $J_{1,2} = 3.7$, 1 H, H₁), 4.55 (d, $J_{1,2} = 3.7$, 1 H, H₂), 4.38 (d, $J_{3,4} = 2.0$, 1 H, H₄), 4.14-4.10 (m, 3H, H₃, H_{5a}, H_{5b}), 4.07 (d, $J_{OH,3} = 3.3$, 1 H, OH), 1.47 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.33 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.05 (s, 9 H, Me_{tBu}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 135.85-135.64 (C_{ar}), 132.56-132.01 (C_{IV(ar)}), 130.21-128.06 (C_{ar}), 111.66 (C_{IV(acetonide)}), 105.14 (C₁), 85.57 (C₂), 78.48 (C₃), 77.05 (C₄), 62.96 (C₅), 26.93 (Me_{acetonide}), 26.83 (Me_{tBu}), 26.32 (Me_{acetonide}), 19.22 (C_{IV(tBu)}).

MS (ESI⁺): m/z = 451.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₄H₃₂O₅SiNa = 451.1917 Da, found = 451.1923 Da.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-ceto-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-xylofuranose 7

Chemical Formula: $C_{24}H_{30}O_5Si$
Molecular Weight: $426.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-xylofuranose 6 (1 eq, 23.3 mmol, 10g) in DCM (40 mL) were added BAIB (1.1 eq, 25.6 mmol, 8.3 g) and TEMPO (0.1 eq, 2.3 mmol, 350 mg). After 2 nights, the mixture was diluted with DCM (20 mL), quenched with $Na_2S_2O_3$ (20 mL) and extracted with DCM (4x20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: diethyl ether/PE, 0/1 to 1/4, v/v) to obtain the desired compound (10 g, 23.4 mmol, quantitative).

TLC: $R_f = 0.35$ (eluent: DCM) ; $R_f = 0.23$ (eluent: DCM/PE, 90/10) ; $R_f = 0.28$ (eluent: PE/Et₂O, 80/20).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.69-7.66 (m, 2 H, H_{ar}), 7.62-7.59 (m, 2 H, H_{ar}), 7.43-7.39 (m, 6 H, H_{ar}), 6.26 (d, $J_{1,2} = 4.5$, 1 H, H₁), 4.43 (dd, $J_{1,2} = 4.5$, $J_{2,4} = 1.0$, 1 H, H₂), 4.40-4.35 (m, 1 H, H₄), 3.92 (dd, $J_{gem} = 11$, $J_{4,5a} = 1.8$, 1 H, H_{5a}), 3.85 (dd, $J_{gem} = 11$, $J_{4,5b} = 2.0$, 2 H, H_{5b}), 1.48 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.47 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.00 (s, 9 H, Me_{tBu}).

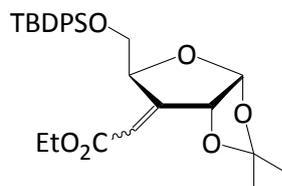
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 211.07 (CO), 135.66 (C_{ar}), 135.62 (C_{ar}), 132.47 (C_{IV(ar)}), 132.33 (C_{IV(ar)}), 130.14 (C_{ar}), 130.09 (C_{ar}), 128.03 (C_{ar}), 114.37 (C_{IV(acetonide)}), 103.91 (C₁), 81.66 (C₄), 77.27 (C₂), 64.61 (C₅), 27.86 (Me_{acetonide}), 27.35 (Me_{acetonide}), 26.81 (Me_{tBu}), 19.21 (C_{IV(tBu)}).

MS (Cl⁺): $m/z = 444.0 \text{ Da}$ [MNH₄]⁺, **MS** (ESI⁺): $m/z = 481.2 \text{ Da}$ [M+MeOH+Na]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₅H₃₄O₆SiNa = 481.2022 Da, found = 481.2028 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +76.9 (CHCl₃, $c = 1.7 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-(*Z*) or (*E*)-ethoxycarbonylmethylene-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-xylofuranose **8**



Chemical Formula: C₂₈H₃₆O₆Si
Molecular Weight: 496.7 g.mol⁻¹

To a solution of **7** (1eq, 10.5 mmol, 4.5g) in DCM (30 mL) was added (carbethoxymethylene)triphenylphosphorane (1.15 eq, 12.07 mmol, 4.2 g). After stirring under argon at r.t. for 30 min the mixture became pink. After stirring for 24 h the mixture was concentrated and the residue was diluted with Et₂O (100 mL) and stirred for 30 min. Triphenylphosphine oxide was filtered, the organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM) to obtain the desired compound as a yellow oil (5.0 g, 10 mmol, 95%).

TLC: R_f = 0.64 (eluent: DCM).

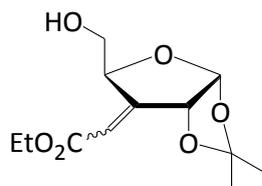
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.67-7.61 (m, 4 H, H_{ar}), 7.44-7.37 (m, 6 H, H_{ar}), 5.99 (d, $J_{1,2} = 4.1$, 1 H, H₁), 5.97 (t, $J_{CH,2} = J_{CH,4} = 1.7$, 1 H, CH=C), 5.71 (dt, $J_{1,2} = 4.1$, $J_{2,4} = J_{CH,2} = 1.7$, 1 H, H₂), 4.90 (tt, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 3.5$, $J_{4,2} = J_{4,CH} = 1.7$, 1 H, H₄), 4.27 (q, $^3J = 7.1$, 1 H, CH₂CH₃), 4.26 (q, $^3J = 7.1$, 1 H, CH₂CH₃), 3.86 (dd, $J_{gem} = 10.9$, $J_{4,5a} = 3.8$, 1 H, H_{5a}), 3.71 (dd, $J_{gem} = 10.9$, $J_{4,5b} = 3.2$, 1 H, H_{5b}), 1.49 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.45 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.33 (t, $^3J = 7.1$, 3 H, CH₂CH₃), 1.03 (s, 9 H, *t*Bu).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.09 (CO), 156.84 (C₃), 135.74 (C_{ar(o)}), 135.70 (C_{ar(o)}), 132.93 (C_{IV}), 129.96 (C_{ar(m)}), 129.77 (C_{ar(m)}), 127.92 (C_{ar(p)}), 116.92 (CHCO₂Et), 113.08 (C_{IV(acetone)}), 105.77 (C₁), 81.45 (C₄), 79.14 (C₂), 66.18 (C₅), 60.76 (CH₂CH₃), 27.74 (Me_{acetone}), 27.44 (Me_{acetone}), 26.86 (Me_{*t*Bu}), 19.27 (C_{IV(*t*Bu)}), 14.33 (CH₂CH₃).

MS (ESI⁺): m/z = 519.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₈H₃₆O₆SiNa = 519.2178 Da, found = 519.2178 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +47 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-O-isopropylidene-3-deoxy-3-C-ethoxycarbonylmethylene- α -D-xylofuranose **9**

Chemical Formula: $C_{12}H_{18}O_6$
Molecular Weight: $258.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **9** (1 eq, 12.9 mmol, 6.4 g) in THF (100 mL) was added TBAF (1.2 eq, 15.5 mmol, 15.5 mL of a solution 1M in THF), the mixture became brown. It was stirred under argon at 4 °C for 3 h and at r.t. for 2 h. The reaction was quenched with a solution of a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (100 mL), extracted with DCM (3x80 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/PE, 9/1 then DCM/MeOH, 100/0 to 96/4, v/v) to obtain the desired compound as a yellow oil (3.06 g, 11.86 mmol, 92%).

TLC: $R_f = 0.18$ (eluent: DCM/MeOH, 99/1) ; $R_f = 0.36$ (eluent: DCM/ Et_2O , 90/10).

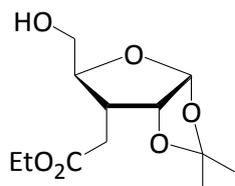
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.92 (d, $J_{1,2} = 4.2$, 1 H, H_1), 5.90 (t, $J_{\text{CH},2} = J_{\text{CH},4} = 1.8$, 1 H, $\text{CH}=\text{C}$), 5.75-5.68 (m, 1 H, H_2), 4.92-4.86 (m, 1 H, H_4), 4.23 (q, $^3J = 7.1$, 2 H, CH_2CH_3), 3.92 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.2$, $J_{4,5a} = 3.3$, 1 H, H_{5a}), 3.72 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.2$, $J_{4,5b} = 4.3$, 1 H, H_{5b}), 1.49 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.41 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.29 (t, $^3J = 7.1$, 3 H, CH_2CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 164.94 (CO), 154.63 (C_3), 116.92 (CHCO_2Et), 113.02 ($\text{C}_{\text{IV}}(\text{acetone})$), 105.03 (C_1), 80.49 (C_4), 78.49 (C_2), 63.10 (C_5), 60.96 (CH_2CH_3), 27.46 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 27.21 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 14.27 (CH_2CH_3).

MS (ESI^+): $m/z = 281.1 \text{ Da}$ [MNH_4] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{Na} = 281.1001 \text{ Da}$, found = 281.1005 Da.

Literature reported compound: N. M. Xavier, A. P. Rauter, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3339-3341.

1,2-O-isopropylidene-3-deoxy-3-C-[(ethoxycarbonyl)methyl]- α -D-ribofuranose 10

Chemical Formula: $C_{12}H_{20}O_6$
Molecular Weight: $260.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of 9 (8.5 mmol, 2.2 g) in EtOH (35 mL) was added 10% Pd/C (5% weighth, 110 mg). The reaction was stirred under hydrogen pressure (1 bar) at r.t. for 24 h. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure to give 6 as single product (2.2 g, 8.5 mmol, quantitative).

TLC: $R_f = 0.36$ (eluent: DCM/Et₂O, 90/10).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.82 (d, $J_{1,2} = 3.9$, 1 H, H₁), 4.78 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 3.9$, 1 H, H₂), 4.16 (q, $^3J = 7.1$, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 3.89-3.85 (m, 2H, H₄ and H_{5a}), 3.56 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.2$, $J_{4,5b} = 4.2$, 1 H, H_{5b}), 2.70 (dd, $J_{\text{gem}} = 16.3$, $^3J = 7.9$, 1 H, CH₂CO), 2.49-2.34 (m, 2H, CH₂CO, H₃), 1.98 (brs, 1 H, OH), 1.49 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.32 (s, 3 H, Me_{acetonide}), 1.27 (t, $^3J = 7.1$, 3 H, CH₂ $\underline{\text{CH}_3}$).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.46 (CO), 111.88 (C_{IV(acetonide)}), 104.85 (C₁), 81.76 (C₂), 81.46 (C₄), 61.49 (C₅), 60.98 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$), 39.78 (C₃), 29.98 ($\underline{\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}}$), 26.79 (Me_{acetonide}), 26.44 (Me_{acetonide}), 14.30 (CH₂ $\underline{\text{CH}_3}$).

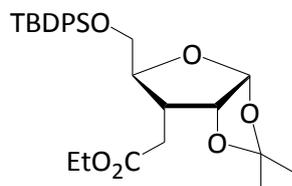
MS (ESI⁺): $m/z = 283.1$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $C_{12}H_{20}O_6\text{Na} = 283.1158$ Da, found = 283.1160 Da.

$[\alpha]_D^{20} = +59.4$ (CHCl₃, $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

Literature reported compound: M. Xie, D. A. Berges, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5178-5179.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-[(ethoxycarbonyl)methyl]-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose **11a**



Chemical Formula: C₂₈H₃₈O₆Si
Molecular Weight: 498.7 g.mol⁻¹

To a cooled solution of 1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-[(ethoxycarbonyl)methyl]- α -D-ribofuranose **10** (1 eq, 1.23 mmol, 320 mg) and imidazole (2.2 eq, 2.64 mmol, 180 mg) in DMF (3 mL) was added *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (1.1 eq, 1.35 mmol, 0.35 mL). After stirring at r.t. for 22 h, the TLC analysis (DCM) showed disappearance of the starting material. The reaction was quenched with Et₂O (20 mL) and water (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3x20 mL) and the combined organic layers were washed with brine (5x15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM) to obtain the desired compound as a white oil (500 mg, 1 mmol, 83%).

TLC: R_f = 0.64 (eluent: DCM).

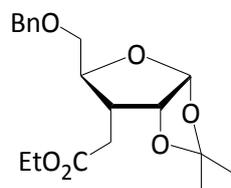
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.68-7.64 (m, 4 H, H_{ar}), 7.42-7.35 (m, 6 H, H_{ar}), 5.83 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H₁), 4.80 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.1$, 1 H, H₂), 4.15 (q, $^3J = 7.1$, 1 H, CH₂CH₃), 4.14 (q, $^3J = 7.1$, 1 H, CH₂CH₃), 3.88-3.82 (m, 2 H, H_{5a} and H₄), 3.74-3.69 (m, 1 H, H_{5b}), 2.62 (dd, $J_{gem} = 16$, $J_{3,CH_2CO} = 10.5$, 1 H, CH₂CO), 2.55-2.46 (m, 1 H, H₃), 2.35 (dd, $J_{gem} = 16$, $J_{3,CH_2CO} = 3.2$, 1 H, CH₂CO), 1.48 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.32 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.26 (t, $^3J = 7.1$, 3 H, CH₂CH₃), 1.05 (s, 9 H, *t*Bu).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.57 (CO), 135.68-134.54 (C_{ar}), 133.05 (C_{IV(ar)}), 129.96-127.77 (C_{ar}), 111.62 (C_{IV(acetone)}), 105.12 (C₁), 81.31 (C₂), 81.20 (C₄), 63.62 (C₅), 60.82 (CH₂CH₃), 41.12 (C₃), 29.92 (CH₂CO₂Et), 26.99 (Me_{acetone}), 26.84 (Me_{*t*Bu}), 26.51 (Me_{acetone}), 19.24 (C_{IV(*t*Bu)}), 14.30 (CH₂CH₃).

MS (Cl⁺): $m/z = 516.4$ Da [MNH₄]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG400): calcd for C₂₈H₃₈O₆SiNa = 521.2335 Da, found 521.2318 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +24.8 (CHCl₃, $c = 1$ g/100mL).

1,2-O-isopropylidene-3-deoxy-3-C-[(ethoxycarbonyl)methyl]-5-O-benzyl- α -D-ribofuranose**11b**

Chemical Formula: $C_{19}H_{26}O_6$
Molecular Weight: $350.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **10** (1 eq, 3.8 mmol, 1 g) in dry DMF (30 mL) was added slowly NaH (1.2 eq, 4.61 mmol, 185 mg of a 60% suspension in oil). The mixture was stirred under argon at 5 °C for 10 min and then was added BnBr (1.5 eq, 5.8 mmol, 0.70 mL). The reaction was stirred at r.t. until the TLC showed the completion of reaction and then cooled to 0 °C. It was quenched with NH_4Cl (30 mL) and extracted with Et_2O (3x30 mL). The combined organic layers were washed with brine (5x30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/PE, 9/1 to 9/0, v/v) to obtain the desired compound as a yellow oil (1.1 g, 3.14 mmol, 84%).

TLC: $R_f = 0.31$ (eluent: DCM/ Et_2O , 9/1) ; $R_f = 0.26$ (eluent: DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.37-7.28 (m, 5 H, H_{ar}), 5.84 (d, $J_{1,2} = 3.9$, 1 H, H_1), 4.78 (dd, $J_{1,2} = 3.9$, $J_{2,3} = 4$, 1 H, H_2), 4.60 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$, 1 H, CH_2Ph), 4.53 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$, 1 H, CH_2Ph), 4.13 (q, $^3J = 7.1$, 2H, CH_2CH_3), 3.97-3.92 (m, 1 H, H_4), 3.65 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.8$, $J_{4,5a} = 3.5$, 1 H, H_{5a}), 3.53 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.8$, $J_{4,5b} = 4.4$, 1 H, H_{5b}), 2.64 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.9$, $^3J = 9.4$, 1 H, CH_2CO), 2.44-2.31 (m, 2H, CH_2CO , H_3), 1.49 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.31 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.26 (t, $^3J = 7.1$, 3 H, CH_2CH_3).

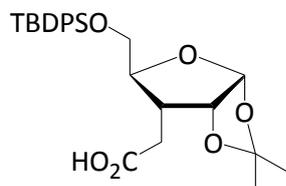
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 172.18 (CO), 138.08 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.68 (C_{ar}), 128.52 (C_{ar}), 127.83 (C_{ar}), 127.10 (C_{ar}), 111.68 ($\text{C}_{\text{IV(acetone)}}$), 105.01 (C_1), 81.18 (C_2), 79.83 (C_4), 73.63 (CH_2Ph), 69.52 (C_5), 60.73 (CH_2CH_3), 41.69 (C_3), 29.88 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 26.78 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 26.47 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 14.31 (CH_2CH_3).

MS (ESI⁺): $m/z = 373.1 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na} = 373.1627 \text{ Da}$, found = 373.1631 Da.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +31.6 (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-carboxymethyl-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose 12a



Chemical Formula: C₂₆H₃₄O₆Si
Molecular Weight: 470.6 g.mol⁻¹

To a solution of 1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-[(ethoxycarbonyl)methyl]-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose 11a (1 eq, 2 mmol, 1 g) in dioxane (25 mL) was added a solution of LiOH monohydrate (20 eq, 20 mmol, 840 mg) in water (25 mL). After stirring at r.t. for 22 h, the mixture was quenched with DCM (20 mL) and acidified with a solution of HCl 1N (22 mL, pH=2). The aqueous layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound as a white oil (900 mg, 1.9 mmol, 95%).

TLC: R_f = 0.2 (eluent: DCM).

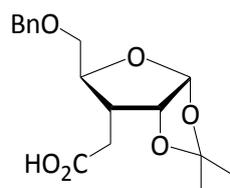
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.73-7.70 (m, 4 H, H_{ar}), 7.42-7.36 (m, 6 H, H_{ar}), 5.83 (d, $J_{1,2} = 3.7$, 1 H, H₁), 4.80 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.0$, 1 H, H₂), 3.88-3.82 (m, 2 H, H₄ and H_{5a}), 3.74-3.69 (m, 1 H, H_{5b}), 2.69 (dd, $J_{gem} = 16.3$, $J_{3,H_a} = 10.0$, 1 H, H_a (CH₂CO)), 2.55-2.47 (m, 1 H, H₃), 2.42 (dd, $J_{gem} = 16.3$, $J_{3,H_b} = 3.5$, 1 H, H_b (CH₂CO)), 1.49 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.33 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.05 (s, 9 H, Me_{tBu}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177.51 (CO), 135.79-134.94 (C_{ar}), 133.20 (C_{IV(ar)}), 129.95-127.57 (C_{ar}), 111.77 (C_{IV(acetone)}), 105.10 (C₁), 81.19 (C₂), 80.93 (C₄), 63.52 (C₅), 41.07 (C₃), 29.56 (CH₂CO₂H), 26.97 (Me_{acetone}), 26.69 (Me_{tBu}), 26.55 (Me_{acetone}), 19.15 (C_{IV(tBu)}).

MS (ESI⁺): m/z = 493.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₆H₃₄O₆SiNa = 493.2022 Da, found = 493.2022 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +5.7 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-O-isopropylidene-3-deoxy-3-C-carboxymethyl-5-O-benzyl- α -D-ribofuranose 12b

Chemical Formula: $C_{17}H_{22}O_6$
Molecular Weight: $322.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **11b** (1 eq, 1.86 mmol, 650 mg) in mixture dioxane/water (20 mL/20 mL) was added LiOH (20 eq, 37.2 mmol, 1.56 g). The mixture was stirred at r.t. for 48 h, then diluted with DCM (40 mL) and acidified with HCl 2N (16.8 mL) until pH=2. The aqueous layer was extracted with DCM (3x20 mL), the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound (600 mg, 1.86 mmol, quantitative).

TLC: $R_f = 0.09$ (eluent: DCM).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38-7.33 (m, 5 H, H_{ar}), 5.85 (d, $J_{1,2} = 3.8$, 1 H, H_1), 4.80 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 3.8$, 1 H, H_2), 4.61 (d, $J_{gem} = 12.2$, 1 H, CH_2Ph), 4.53 (d, $J_{gem} = 12.2$, 1 H, CH_2Ph), 3.94 (dt, $J_{3,4} = 10.1$, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 4$, 1 H, H_4), 3.66 (dd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{4,5a} = 3.8$, 1 H, H_{5a}), 3.56 (dd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{4,5b} = 4.2$, 1 H, H_{5b}), 2.71 (dd, $J_{gem} = 17.8$, $J_{3,\text{Ha}} = 10.8$, 1 H, H_a (CH_2CO)), 2.47-2.36 (m, 2 H, H_b (CH_2CO) and H_3), 1.49 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.32 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, C_6D_6): δ (ppm) = 7.17-7.04 (m, 5 H, H_{ar}), 5.55 (d, $J_{1,2} = 3.7$, 1 H, H_1), 5.01 (d, $J_{gem} = 12.4$, 1 H, CH_2Ph), 4.88 (d, $J_{gem} = 12.4$, 1 H, CH_2Ph), 4.57 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.2$, 1 H, H_2), 3.69 (dt, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 3.2$, 1 H, H_4), 3.64-3.58 (m, 1 H, H_5), 3.31-3.25 (m, 1 H, H_5), 2.59 (dd, $J_{gem} = 16.9$, $J_{3,\text{Ha}} = 9.7$, 1 H, H_a (CH_2CO)), 2.15 (dd, $J_{gem} = 16.9$, $J_{3,\text{Ha}} = 4.6$, 1 H, H_b (CH_2CO)), 1.37 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.10 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$).

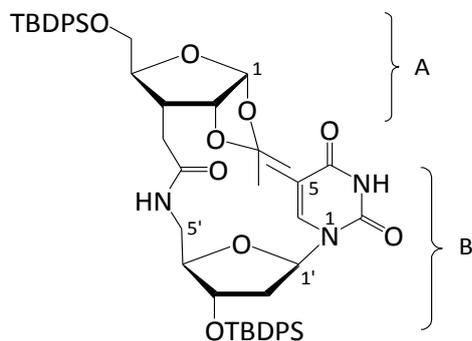
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 172.61 (CO), 137.99 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.58 (C_{ar}), 127.91 (C_{ar}), 111.81 ($\text{C}_{IV(\text{acetone})}$), 105.05 (C_1), 81.04 (C_2), 79.64 (C_4), 73.71 (CH_2Ph), 69.46 (C_5), 41.62 (C_3), 29.52 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 26.76 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 26.49 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$).

MS (ESI⁺): $m/z = 345.1 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na} = 345.1314 \text{ Da}$, found = 345.1314 Da.

$[\alpha]_D^{20} = +33.3$ (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidinyl)-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose **13**



Chemical Formula: $C_{52}H_{65}N_3O_9Si_2$
Molecular Weight: $932.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **12a** (1 eq, 0.72 mmol, 340 mg) in acetonitrile (6 mL) was added TBTU (1.1 eq, 0.8 mmol, 254 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.36 mmol, 48 mg), triethylamine (1.2 eq, 0.64 mmol, 89 μ L). The mixture was stirred under argon for 60 min at 5 °C. Then was added the amine **4** (1 eq, 0.72 mmol, 350 mg) and triethylamine (1.2 eq, 0.64 mmol, 89 μ L), the mixture was stirred at r.t. for 48 h. The reaction was quenched with water (20 mL), extracted with DCM (3x20 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM to DCM/MeOH, 99/1, v/v) to obtain the desired compound as a colorless oil (190 mg, 0.20 mmol, 30%).

TLC: $R_f = 0.61$ (eluent: DCM/Et₂O, 80/20).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.42 (s, 1 H, NH_T), 7.66-7.62 (m, 8 H, H_{ar}), 7.42-7.35 (m, 12 H, H_{ar}), 7.07 (d, $J_{Me(T),6B} = 0.9$, 1 H, H_{6B}), 6.18 (dd, $J_{1'B,2'Ba} = 8.2$, $J_{1'B,2'Bb} = 5.9$, 1 H, H_{1'B}), 6.02 (t, $J_{NH,5'Ba} = J_{NH,5'Bb} = 5.4$, 1 H, NH_{amide}), 5.76 (d, $J_{1A,2A} = 3.6$, 1 H, H_{1A}), 4.55 (t, $J_{1A,2A} = J_{2A,3A} = 3.9$, 1 H, H_{2A}), 4.24-4.19 (m, 1 H, H_{3'B}), 3.99-3.94 (m, 1 H, H_{4'B}), 3.84-3.81 (m, 1 H, H_{5Aa}), 3.79-3.77 (m, 1 H, H_{4A}), 3.72-3.66 (m, 1 H, H_{5Ab}), 3.31-3.21 (m, 1 H, H_{5'Ba}), 3.08 (dt, $J_{gem} = 14$, $J_{5'Bb,4'B} = J_{5'Bb,3'B} = 4.1$, 1 H, H_{5'Bb}), 2.49-2.39 (m, 1 H, H_{3'B}), 2.35-2.26 (m, 1 H, H_{a(CH₂CO)}), 2.25-2.21 (m, 1 H, H_{2'Ba}), 2.19-2.13 (m, 1 H, H_{b(CH₂CO)}), 2.07-2.00 (m, 1 H, H_{2'Bb}), 1.88 (d, $J_{Me(T),6B} = 0.9$, 3 H, Me_T), 1.44 (s, 3 H, Me_{acetamide(a)}), 1.21 (s, 3 H, Me_{acetamide(b)}), 1.07 (s, 9 H, Me_{tBu}), 1.03 (s, 9 H, Me_{tBu}).

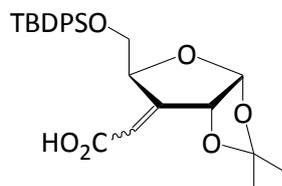
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 165.88 (CO_{amide}), 163.39 ($\text{C}_{4\text{B}}$), 150.18 ($\text{C}_{2\text{B}}$), 136.51 ($\text{C}_{6\text{B}}$), 135.79-127.83 (C_{ar}), 111.50 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{acetonide})}$), 111.39 ($\text{C}_{5\text{B}}$), 105.02 ($\text{C}_{1\text{A}}$), 87.08 ($\text{C}_{1'\text{B}}$), 85.95 ($\text{C}_{4'\text{B}}$), 81.40 ($\text{C}_{2\text{A}}$), 81.32 ($\text{C}_{4\text{A}}$), 74.21 ($\text{C}_{3'\text{B}}$), 63.82 ($\text{C}_{5\text{A}}$), 42.00 ($\text{C}_{3\text{A}}$), 41.28 ($\text{C}_{5'\text{B}}$), 39.47 ($\text{C}_{2'\text{B}}$), 26.95 ($\text{Me}_{\text{acetonide(a)}}$, $t\text{Bu}_{\text{A}}$, $t\text{Bu}_{\text{B}}$, CH_2CO), 26.48 ($\text{Me}_{\text{acetonide(b)}}$), 19.36 ($\text{C}_{\text{IV}(t\text{Bu})}$), 19.16 ($\text{C}_{\text{IV}(t\text{Bu})}$), 12.53 (Me_{T}).

MS (ESI^+): m/z = 932.4 [MH] $^+$, 954.4 [MNa] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{66}\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}_2$ = 932.4332 Da, found 932.4346 Da.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +14.4 (CHCl_3 , c = 1 g/100mL).

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-*C*-carboxymethylene-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose **14**



Chemical Formula: $C_{26}H_{32}O_6Si$
Molecular Weight: $468.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **8** (1 eq, 3 mmol, 1.5 g) in mixture THF/water (25 mL/8 mL) was added LiOH (30 eq, 90 mmol, 3.78 g). The mixture was stirred at r.t. for 24 h, then diluted with AcOEt (50 mL) and acidified with HCl 1N (25 mL) until pH=5. The aqueous layer was extracted with AcOEt (3x25 mL), the combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound as a yellow oil (1.3 g, 2.77 mmol, 93 %).

TLC: $R_f = 0.4$ (eluent: DCM/MeOH, 99/1).

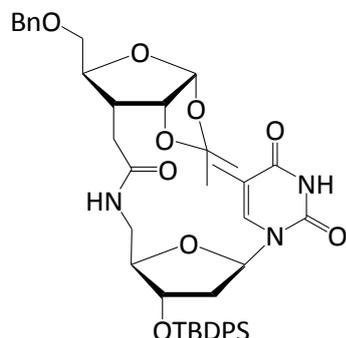
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.72-7.62 (m, 4 H, H_{ar}), 7.41-7.38 (m, 6 H, H_{ar}), 5.98 - 5.96 (m, 2 H, H_1 et $CH=C$), 5.71-5.69 (m, 1 H, H_2), 4.90-4.88 (m, 1 H, H_4), 3.86 (dd, $J_{gem} = 10.7$, $J_{4,5a} = 3.9$, 1 H, H_{5a}), 3.72 (dd, $J_{gem} = 10.7$, $J_{4,5b} = 3.2$, 1 H, H_{5b}), 1.49 (s, 3 H, $Me_{acetamide}$), 1.44 (s, 3 H, $Me_{acetamide}$), 1.03 (s, 9 H, tBu).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 156.82 (C_3), 135.78-135.68 ($C_{ar(o)}$), 133.00 (C_{IV}), 129.81 ($C_{ar(m)}$), 127.88 ($C_{ar(p)}$), 117.00 ($\underline{CH=C}$), 113.10 ($C_{IV(acetamide)}$), 105.82 (C_1), 81.29 (C_4), 79.12 (C_2), 66.14 (C_5), 27.84 ($Me_{acetamide}$), 27.50 ($Me_{acetamide}$), 26.87 (Me_{tBu}), 19.31 ($C_{IV(tBu)}$).

MS (Cl^+): $m/z = 486.2 \text{ Da}$ [MNH_4] $^+$.

HRMS (Cl^+): calcd for $C_{26}H_{36}N_1O_6Si = 486.2306$, found 486.2310.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidinyl)-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose **15**



Chemical Formula: C₄₃H₅₃N₃O₉Si
Molecular Weight: 784.0 g.mol⁻¹

To a cooled solution of **12b** (1 eq, 1.13 mmol, 364 mg) in DCM (12 mL) was added TBTU (1.4 eq, 1.58 mmol, 508 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.57 mmol, 76.3 mg) and triethylamine (1.1 eq, 1.24 mmol, 172 μ L). The mixture was stirred under argon for 30 min at 5 °C. Then was added the amine **4** (1 eq, 1.24 mmol, 596 mg rinsed with 10 mL of DCM) and triethylamine (1.1 eq, 1.24 mmol, 172 μ L). The mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with water (20 mL), extracted with DCM (3x20 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. If necessary, the crude was diluted with toluene and washed with water (3x20 mL) to eliminate urea. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (690 g, 0.88 mmol, 83%).

TLC: R_f = 0.41 (eluent: DCM/MeOH, 98/2).

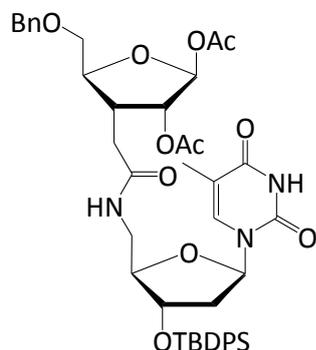
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.30 (brs, 1 H, NH_T), 7.65-7.61 (m, 4 H, H_{ar(o)Ph}), 7.48-7.37 (m, 6 H, H_{ar(m,p)Ph}), 7.32-7.30 (m, 5 H, H_{ar(Bn)}), 7.04 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.0$, 1 H, H_{6B}), 6.13 (dd, $J_{1'B,2'Bb} = 8.0$, $J_{1'B,2'Ba} = 6.0$, 1 H, H_{1'B}), 6.05 (br, 1 H, NH_{amide}), 5.77 (d, $J_{1A,2A} = 3.7$, 1 H, H_{1A}), 4.60-4.54 (m, 1 H, H_{2A}), 4.57 (d, $J_{gem} = 12.1$, 1 H, CHH'Ph), 4.53 (d, $J_{gem} = 12.1$, 1 H, CHH'Ph), 4.23 (q, $J_{2'Ba,3'B} = J_{2'Bb,3'B} = J_{3'B,4'B} = 2.6$, 1 H, H_{3'B}), 3.99-3.95 (m, 1 H, H_{4'B}), 3.93-3.88 (m, 1 H, H_{4A}), 3.61 (dd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{4A-5Aa} = 3.5$, 1 H, H_{5Aa}), 3.51 (dd, $J_{gem} = 10.8$, $J_{4A-5Ab} = 4.7$, 1 H, H_{5Ab}), 3.28-3.20 (m, 1 H, H_{5'Ba}), 3.17-3.09 (m, 1 H, H_{5'Bb}), 2.40-2.35 (m, 1 H, CHH'CO), 2.34-2.30 (m, 1 H, H_{3A}), 2.22 (ddd, $J_{gem} = 13.5$, $J_{1'B,2'Ba} = 6$, $J_{2'B,3'B} = 2.6$, 1 H, H_{2'Ba}), 2.18-2.12 (m, 1 H, CHH'CO), 2.11-2.03 (m, 1 H, H_{2'Bb}), 1.89 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.0$, 3 H, Me_T), 1.46 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.22 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.08 (s, 9 H, tBu).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 171.35 (CO_{amide}), 163.31 ($\text{C}_{4\text{B}}$), 150.15 ($\text{C}_{2\text{B}}$), 138.05 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{Bn})}$), 136.75 ($\text{C}_{6\text{B}}$), 135.86 ($\text{C}_{\text{ar}(\text{o})\text{Ph}}$), 133.06 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{Ph})}$), 130.35 ($\text{C}_{\text{ar}(\text{m})\text{Ph}}$), 128.54-127.88 ($\text{C}_{\text{ar}(\text{p})\text{Ph}}$ and $\text{C}_{\text{ar}(\text{Bn})}$), 111.58 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{acetone})}$), 111.40 ($\text{C}_{5\text{B}}$), 105.00 ($\text{C}_{1\text{A}}$), 87.49 ($\text{C}_{1'\text{B}}$), 85.89 ($\text{C}_{4'\text{B}}$), 81.18 ($\text{C}_{2\text{A}}$), 80.13 ($\text{C}_{4\text{A}}$), 74.11 ($\text{C}_{3'\text{B}}$), 73.66 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 69.85 ($\text{C}_{5\text{A}}$), 42.49 ($\text{C}_{3\text{A}}$), 41.21 ($\text{C}_{5'\text{B}}$), 39.41 ($\text{C}_{2'\text{B}}$), 32.04 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 26.99 (Me_{tBu}), 26.86 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 26.46 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 19.17 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{tBu})}$), 12.52 (Me_{T}).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 806.3 Da [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_9\text{SiNa}$ = 806.3443 Da, found 806.3422 Da.

1,2-*O*-acetyl-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidiny)-5-*O*-benzyl- β -D-ribofuranose 16



Chemical Formula: $C_{44}H_{53}N_3O_{11}Si$
Molecular Weight: $828.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of 15 (1 eq, 0.25 mmol, 200 mg) in acetic acid (2 mL) was added acetic anhydride (80 eq, 32.8 mmol, 3 mL), camphor sulfonic acid (0.08 eq, 0.002 mmol, 4.7 mg). The mixture was stirred for 2 h at 70 °C but after one hour another portion of camphor sulfonic acid (0.08 eq, 0.002 mmol, 4.7 mg) was added. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with DCM (15 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3x20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: $\text{Et}_2\text{O}/\text{EP}$, 90/10, v/v to Et_2O) to obtain the desired compound as a single isomer (90 mg, 0.11 mmol, 44%).

TLC: $R_f = 0.22$ (eluent: $\text{DCM}/\text{Et}_2\text{O}$, 70/30).

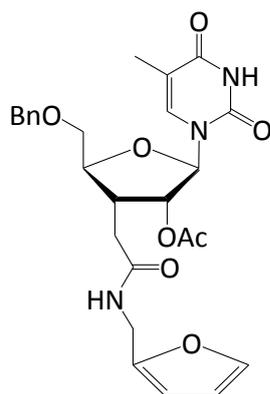
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.40 (brs, 1 H, NH_T), 7.64-7.62 (m, 4 H, $\text{H}_{ar(o)\text{Ph}}$), 7.46-7.30 (m, 11 H, $\text{H}_{ar(m,p)\text{Ph}}$, $\text{H}_{ar(\text{Bn})}$), 7.00 (d, $J_{6B,Me(T)} = 0.9$, 1 H, H_{6B}), 6.07 (t, $J_{\text{NH},\text{H}5'B} = 4.9$, 1 H, NH_{amide}), 6.05-6.02 (m, 2 H, H_{1A} , $\text{H}_{1'B}$), 5.14 (d, $J_{2A,3A} = 4.7$, 1 H, H_{2A}), 4.56 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.53 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.26-4.23 (m, 1 H, $\text{H}_{3'B}$), 4.07 (dt, $J_{3A,4A} = 9.4$, $J_{4A,5A} = J_{2A,4A} = 4.8$, 1 H, H_{4A}), 3.98-3.94 (m, 1 H, $\text{H}_{4'B}$), 3.57 (t, $J_{4A,5A} = J_{3A,5A} = 4.4$, 1 H, H_{5A}), 3.23-3.08 (m, 2 H, $\text{H}_{5'B}$), 2.87-2.83 (m, 1 H, H_{3A}), 2.26 (d, $J_{\text{CH}_2,3A} = 7.4$, 2 H, CH_2CO), 2.17-2.14 (m, 2 H, $\text{H}_{2'B}$), 2.03 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.95 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.89 (s, $J_{6B,Me(T)} = 0.9$, 3 H, Me_T), 1.08 (s, 9 H, tBu).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.66 (CO_{amide}), 169.85 ($\text{CO}_{\text{Ac(a)}}$), 169.48 ($\text{CO}_{\text{Ac(b)}}$), 163.41 (C_{4B}), 150.33 (C_{2B}), 138.16 ($\text{C}_{IV(\text{Bn})}$), 137.36 (C_{6B}), 135.99-135.77 ($\text{C}_{ar(o)\text{Ph}}$), 133.11 ($\text{C}_{IV(\text{Ph})}$), 133.08 ($\text{C}_{IV(\text{Ph})}$), 130.38 ($\text{C}_{ar(m)\text{Ph}}$), 130.33 ($\text{C}_{ar(m)\text{Ph}}$), 128.68-127.72 ($\text{C}_{ar(p)\text{Ph}}$ and $\text{C}_{ar(\text{Bn})}$),

111.43 (C_{5B}), 98.87 (C_{1A}), 88.23 (C_{1'B}), 85.69 (C_{4'B}), 83.68 (C_{4A}), 77.84 (C_{2A}), 74.04 (C_{3'B}), 73.48 (C_{H2}Ph), 71.65 (C_{5A}), 41.27 (C_{5'B}), 39.29 (C_{2'B}), 38.86 (C_{3A}), 32.36 (C_{H2}CO), 27.02 (Me_{tBu}), 21.21 (Me_{Ac(b)}), 20.81 (Me_{Ac(a)}), 19.19 (C_{IV(tBu)}), 12.39 (Me_T).

MS (ESI⁺): m/z = 850.3 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₄₄H₅₃N₃O₁₁SiNa = 850.3347 Da, found 850.3330 Da.

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-(2-methylacetamido-furyl)-5'-O-benzyl-β-D-ribothymidine 17aChemical Formula: C₂₆H₂₉N₃O₈Molecular Weight: 511.5 g.mol⁻¹

To a solution of thymine (1.5 eq, 0.15 mmol, 19 mg) in freshly distilled acetonitrile (2 mL) was added BSA (3 eq, 0.33 mmol, 75 μL). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (2 eq, 0.34 mmol, 62 μL) and **16** (1 eq, 0.1 mmol, 82 mg in solution in 2 mL of DCM). The reaction was stirring for 2 h at reflux and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3x15 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x25 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified twice by flash column chromatography (eluent: DCM to DCM/MeOH, 99/1, v/v) to obtain the compound **17a** (29 mg, 0.057 mmol, 57%).

TLC: R_f = 0.2 (eluent: DCM/MeOH, 99/1).

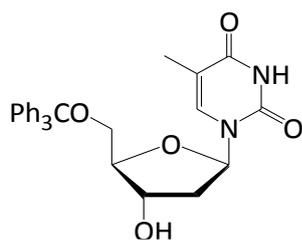
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.37 (brs, 1 H, NH_T), 7.56 (d, J_{6A,Me(T)} = 1.2, 1 H, H_{6A}), 7.36-7.34 (m, 6 H, H_{ar} and H_{1B}), 6.31 (dd, J_{2B,3B} = 3.2, J_{1B,2B} = 1.9, 1 H, H_{2B}), 6.22 (dd, J_{2B,3B} = 3.2, J_{3B,4B} = 0.7, 1 H, H_{3B}), 6.02-5.98 (m, 1 H, NH_{amide}), 5.93 (d, J_{1'A,2'A} = 3.1, 1 H, H_{1'A}), 5.47 (dd, J_{2'A,3'A} = 6.4, J_{1'A,2'A} = 3.1, 1 H, H_{2'A}), 4.59 (AB syst. strong "roof" effect, J_{gem} = 11.6, 2 H, CH₂Ph), 4.41 (d, J_{5B,NH} = 4.4, 2 H, H_{5B}), 4.11 (dt, J_{3'A,4'A} = 8.0, J_{4'A,5'Aa} = J_{4'A,5'Ab} = 2.4, 1 H, H_{4'A}), 3.88 (dd, J_{gem} = 10.9, J_{4'A,5'Aa} = 2.4, 1 H, H_{5'Aa}), 3.63 (dd, J_{gem} = 10.9, J_{4'A,5'Ab} = 2.4, 1 H, H_{5'Ab}), 3.14-3.07 (m, 1 H, H_{3'A}), 2.43 (dd, J_{gem} = 15.2, J_{3'A,CH₂CO} = 7.2, 1 H, CHH'CO), 2.27 (dd, J_{gem} = 15.2, J_{3'A,CH₂CO} = 7.2, 1 H, CHH'CO), 2.06 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.58 (s, J_{6A,Me(T)} = 1.2, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169.86 (CO_{amide}), 169.71 (CO_{Ac}), 163.57 (C_{4A}), 151.05 (C_{4B}), 150.30 (C_{2A}), 142.46 (C_{1B}), 137.59 (C_{IV(Bn)}), 135.91 (C_{6A}), 128.78-127.96 (C_{ar}), 111.19

(C_{5A}), 110.70 (C_{2B}), 107.89 (C_{3B}), 88.69 (C_{1'A}), 83.42 (C_{4'A}), 77.49 (C_{2'A}), 73.88 (CH₂Ph), 69.62 (C_{5'A}), 38.01 (C_{3'A}), 36.72 (C_{5B}), 32.95 (CH₂CO), 20.72 (Me_{Ac}), 12.17 (Me_T).

MS (Cl⁺): m/z = 512.2 [MH]⁺, 529.2 [MNa]⁺, 1040.6 [2M+NH₄]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₂₆H₃₀N₃O₈ = 512.2033, found 512.2055.

5'-O-trityl-thymidine 18

Chemical Formula: C₂₉H₂₈N₂O₅
Molecular Weight: 484.5 g.mol⁻¹

CAS 7791-71-1

To a heated solution (at 80 °C) of thymidine (1 eq, 20 mmol, 4.8g) in dry pyridine were added trityl chloride (1.2 eq, 24.4 mmol, 6.8 g) and DMAP (0.025 eq, 0.5 mmol, 60 mg) under argon. The mixture was stirred over night at 80 °C, then cooled to r.t., poured into iced water (1 L) and filtered. The solid was freeze-dried to obtain the desired compound (7.2 g, 14.86 mmol, 74%).

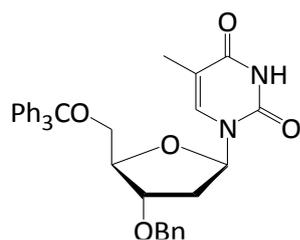
TLC: R_f = 0.61 (eluent: DCM/MeOH, 94/6).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10.08 (s, 1 H, NH_T), 7.35-7.23 (m, 16 H, H_{ar}, H₆), 6.48 (dd, J_{1',2'b} = 7.4, J_{1',2'a} = 6.1, 1 H, H_{1'}), 4.64 (dt, J_{2'b,3'} = 6.2, J_{2'a,3'} = J_{3',4'} = 3.0, 1 H, H_{3'}), 4.14 (q, J_{3',4'} = J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = 3.0, 1 H, H_{4'}), 3.50 (dd, J_{gem} = 10.6, J_{4',5'a} = 3.0, H_{5'a}), 3.40 (dd, J_{gem} = 10.7, J_{4',5'b} = 3.3, H_{5'b}), 2.50 (ddd, J_{gem} = 13.6, J_{1',2'a} = 6.1, J_{2'a,3'} = 3.2, 1 H, H_{2'a}), 2.34 (ddd, J_{gem} = 13.8, J_{1',2'b} = 7.4, J_{2'b,3'} = 6.5, 1 H, H_{2'b}), 1.50 (d, J_{6,Me(T)} = 0.9, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 164.40 (C₄), 149.31 (C₂), 143.37 (C_{IV(ar)}), 136.24 (C₆), 128.60-127.27 (C_{ar}), 110.97 (C₅), 87.25 (C_{3'}), 86.27 (C_{1'}), 84.77 (C_{4'}), 63.78 (C_{5'}), 41.00 (C_{2'}), 11.81 (Me_T).

MS (ESI⁺): m/z = 507.2 Da [MNa]⁺, 991.4 Da [2MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₉H₂₈N₂O₅Na = 507.1890 Da, found = 507.1897 Da.

3'-O-benzyl-5'-O-trityl-thymidine 19

Chemical Formula: $C_{36}H_{34}N_2O_5$
Molecular Weight: $574.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **18** (1 eq, 2.67 mmol, 1.3 g) in a mixture benzene/dioxane (10 mL/5 mL) were added KOH (10 eq, 26.7 mmol, 1.5 g) and benzyl chloride (1.5 eq, 4 mmol, 0.46 mL) under argon. The mixture was stirred at reflux for 3 h, then quickly filtered. It was diluted with DCM (20 mL), washed with HCl 0.5 N water (2x20 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (20 mL). The combined organic layers were washed with water (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude is involved without purification.

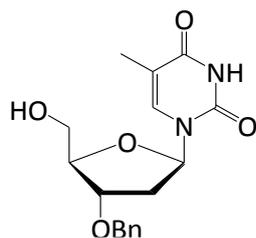
TLC: $R_f = 0.60$ (eluent: DCM/MeOH, 97/3) ; $R_f = 0.58$ (eluent: DCM/Et₂O, 80/20).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.04 (brs, 1 H, NH_T), 7.57 (d, $J = 1.2$, 1 H, H₆), 7.39-7.27 (m, 20 H, H_{ar}), 6.37 (dd, $J_{1,2b} = 7.9$, $J_{1,2a} = 5.8$, 1 H, H_{1'}), 4.54 (d, $J_{\text{gem}} = 11.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.45 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.31 (ddd, $J_{2'b,3'} = 6.1$, $J_{3',4'} = 2.8$, $J_{2'a,3'} = 2.5$, 1 H, H_{3'}), 4.18 (q, $J_{3',4'} = J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = 2.8$, 1 H, H_{4'}), 3.46 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.6$, $J_{4',5'a} = 2.8$, 1 H, H_{5'a}), 3.31 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.6$, $J_{4',5'b} = 3.1$, 1 H, H_{5'b}), 2.54 (ddd, $J_{\text{gem}} = 13.6$, $J_{1',2'a} = 5.7$, $J_{2'a,3'} = 2.5$, 1 H, H_{2'a}), 2.20 (ddd, $J_{\text{gem}} = 13.6$, $J_{1',2'b} = 7.9$, $J_{2'b,3'} = 6.1$, 1 H, H_{2'b}), 1.45 (d, $J_{6,\text{Me(T)}} = 1.1$, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 163.72 (C₄), 150.13 (C₂), 143.53 (C_{IV(ar)}), 137.53 (C₆), 135.65 (C_{IV(ar)}), 128.79-127.41 (C_{ar}), 111.25 (C₅), 85.05 (C_{1'}), 84.20 (C_{4'}), 78.82 (C_{3'}), 71.53 (CH₂Ph), 63.95 (C_{5'}), 38.19 (C_{2'}), 11.98 (Me_T).

MS (ESI⁺): $m/z = 597.2 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $C_{36}H_{34}O_5N_2Na = 597.2360 \text{ Da}$, found = 597.2363 Da.

3'-O-benzyl-thymidine 20

Chemical Formula: $C_{17}H_{20}N_2O_5$
Molecular Weight: $332.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

CAS 63593-01-1

A solution of 19 in acetic acid 80% was refluxed for 20 min. The mixture was co-evaporated with water (2x10 mL), diluted with DCM and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 until basic pH. The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (400 mg, 1.2 mmol, 45% for two steps).

TLC: $R_f = 0.37$ (eluent: DCM/MeOH, 97/3) ; $R_f = 0.24$ (eluent: DCM/MeOH, 98/2).

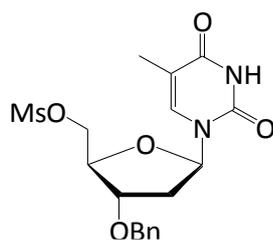
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.48 (brs, 1 H, NH_T), 7.39-7.29 (m, 6 H, H_6 , H_{ar}), 6.12 (dd, $J_{1',2'} = 7.3$, $J_{1',2'} = 6.1$, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 4.58 (dd, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.52 (dd, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.29 (dt, $J_{2'a,3'} = 6.2$, $J_{2'b,3'} = J_{3',4'} = 3.1$, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 4.17 (q, $J = 2.9$, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.93 (dd, $J_{gem} = 11.8$, $J_{4',5'a} = 2.7$, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 3.75 (dd, $J_{gem} = 11.8$, $J_{4',5'b} = 2.9$, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 2.41-2.35 (m, 1 H, $\text{H}_{2'}$), 1.91 (d, $J_{6,\text{Me}(T)} = 1.1$, 3 H, Me_T).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 163.68 (C_4), 150.41 (C_2), 137.14 (C_6), 137.64 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.71 (C_{ar}), 128.15 (C_{ar}), 127.84 (C_{ar}), 111.24 (C_5), 87.58 ($\text{C}_{1'}$), 85.31 ($\text{C}_{4'}$), 78.75 ($\text{C}_{3'}$), 71.80 (C_{CH_2Ph}), 62.97 ($\text{C}_{5'}$), 37.33 ($\text{C}_{2'}$), 12.64 (Me_T).

MS (ESI^+): $m/z = 355.1 \text{ Da}$ [MNa] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na} = 355.1270 \text{ Da}$, found = 345.1273 Da.

Literature reported compound: B. E. Griffin, A. Todd, *J. Chem. Soc.* **1958**, 1389-1393.

3'-O-benzyl-5'-O-mesyl-thymidine 21

Chemical Formula: $C_{18}H_{22}N_2O_7S$
Molecular Weight: $410.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **20** (1 eq, 3 mmol, 1 g) in pyridine (12 mL) was added dropwise mesyl chloride (2 eq, 6 mmol, 465 μL). The mixture was stirred under argon at r.t. for 3 h and quenched with water (2 mL), co-evaporated with toluene (2x5 mL). The residue was diluted with DCM (20 mL), washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2x15 mL) and brine (2x15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (1.2 g, 2.9 mmol, 96%).

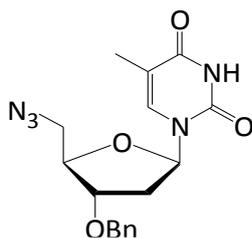
TLC: $R_f = 0.48$ (eluent: DCM/MeOH, 97/3) ; $R_f = 0.26$ (eluent: DCM/MeOH, 98/2).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.80 (brs, 1 H, NH_T), 7.38-7.32 (m, 6 H, H_{ar} and H_6), 6.30 (dd, $J_{1',2'b} = 7.5$, $J_{1',2'a} = 6.3$, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 4.60 (d, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.51 (d, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.46 (dd, $J_{gem} = 11.2$, $J_{4',5'a} = 2.7$, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 4.35 (dd, $J_{gem} = 11.2$, $J_{4',5'b} = 3.2$, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 4.28-4.23 (m, 2 H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'}$), 3.04 (s, 3 H, MeSO_2), 2.49 (ddd, $J_{gem} = 13.8$, $J_{1',2'a} = 6.3$, $J_{2'a,3'} = 2.9$, 1 H, $\text{H}_{2'a}$), 2.13 (ddd, $J_{gem} = 13.8$, $J_{1',2'b} = 7.5$, $J_{2'b,3'} = 6.1$, 1 H, $\text{H}_{2'b}$), 1.94 (d, $J_{6,\text{Me}(T)} = 1.1$, 3 H, Me_T).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 163.89 (C_4), 150.63 (C_2), 137.74 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 136.55 (C_6), 129.68 ($\text{C}_{ar(o)}$), 128.94 ($\text{C}_{ar(m)}$), 128.45 ($\text{C}_{ar(p)}$), 111.24 (C_5), 86.22 ($\text{C}_{4'}$), 85.83 ($\text{C}_{1'}$), 78.38 ($\text{C}_{3'}$), 71.95 (CH_2Ph), 66.53 ($\text{C}_{5'}$), 37.39 (Me SO_2), 36.68 ($\text{C}_{2'}$), 12.30 (Me_T).

MS (ESI^+): $m/z = 411.1 \text{ Da}$ [MH] $^+$, 821.2 Da [2MH] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_1 = 411.1221 \text{ Da}$, found = 411.1221 Da .

3'-O-benzyl-5'-azido-thymidine 22

Chemical Formula: $C_{17}H_{19}N_5O_4$
 Molecular Weight: $357.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **21** (1 eq, 3 mmol, 1.2 g) in DMF (25 mL) was added sodium azide (1.5 eq, 4.5 mmol, 293 mg). The mixture was stirred for 2 h at 85 °C, then cooled to r.t. and quenched with brine (30 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (2x30 mL) and the combined organic layers were washed with brine (5x30 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (1 g, 2.8 mmol, 93 %).

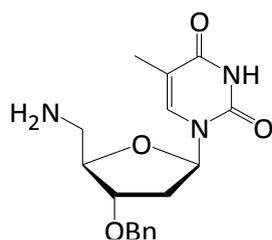
TLC: $R_f = 0.55$ (eluent: DCM/Et₂O, 70/30)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.40 (brs, 1 H, NH_T), 7.40-7.30 (m, 6 H, H_{ar} and H₆), 6.27 (dd, $J_{1',2'b} = 7.5$, $J_{1',2'a} = 6.2$, 1 H, H_{1'}), 4.59 (d, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, CHH'Ph), 4.49 (d, $J_{gem} = 11.7$, 1 H, CHH'Ph), 4.17-4.13 (m, 2 H, H_{3'} and H_{4'}), 3.70 (dd, $J_{gem} = 13.1$, $J_{4',5'a} = 3.1$, 1 H, H_{5'a}), 3.49 (dd, $J_{gem} = 13.1$, $J_{4',5'b} = 3.2$, 1 H, H_{5'b}), 2.47 (ddd, $J_{gem} = 13.8$, $J_{1',2'a} = 6.2$, $J_{2'a,3'} = 2.7$, 1 H, H_{2'a}), 2.16-2.07 (m, 1 H, H_{2'b}), 1.94 (d, $J_{6,Me(T)} = 1.1$, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 163.78 (C₄), 150.44 (C₂), 137.01 (C₆), 135.41 (C_{IV(ar)}), 132.28-132.08 (C_{ar}), 128.73-128.61 (C_{ar}), 111.03 (C₅), 85.48 (C_{1'} and C_{4'}), 79.05 (C_{3'}), 71.61 (CH₂Ph), 62.73 (C_{5'}), 37.60 (C_{2'}), 12.57 (Me_T).

MS (ESI⁺): $m/z = 358.1 \text{ Da}$ [MH]⁺, 715.2 Da [2MH]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₁₇H₂₀N₅O₄ = 358.1510 Da, found = 358.1515 Da.

3'-O-benzyl-5'-amino-thymidine 23

Chemical Formula: C₁₇H₂₁N₃O₄
 Molecular Weight: 331.4 g.mol⁻¹

To a solution of 22 (6.8 mmol, 2.3 g) in EtOH (25 mL) was added 10% Pd/C (5% weight, 115 mg). The reaction was stirred under hydrogen pressure (1 bar) at r.t. for 3 h. The mixture was filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound as a white powder (2.25 g, 6.8 mmol, quantitative).

TLC (alumine): R_f = 0.48 (eluent: DCM/MeOH, 94/6) ; **(alumine):** R_f = 0.05 (eluent: DCM/MeOH, 97/3).

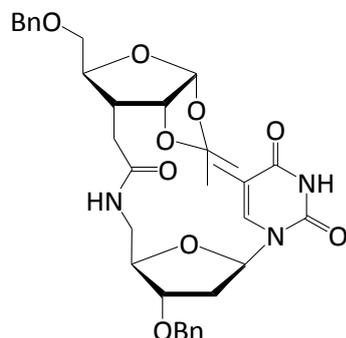
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.01 (s, 1 H, NH_T), 7.39-7.30 (m, 6 H, H_{ar}, H₆), 6.23 (t, J_{1',2'} = 6.9, 1 H, H_{1'}), 4.58 (d, J_{gem} = 11.8, 1 H, CHH'Ph), 4.51 (d, J_{gem} = 11.8, 1 H, CHH'Ph), 4.14-4.09 (m, 1 H, H_{3'}), 4.04-4.00 (m, 1 H, H_{4'}), 3.04 (dd, J_{gem} = 13.6, J_{4',5'a} = 4.1, 1 H, H_{5'a}), 2.90 (dd, J_{gem} = 13.6, J_{4',5'b} = 5.4, 1 H, H_{5'b}), 2.45 (ddd, J_{gem} = 13.7, J_{1',2'a} = 6.3, J_{2'a,3'} = 3.3, 1 H, H_{2'a}), 2.13 (dt, J_{gem} = 13.9, J_{1',2'b} = J_{2'b,3'} = 7.1, 1 H, H_{2'b}), 1.92 (brs, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 163.95 (C₄), 150.51 (C₂), 137.64 (C_{IV(ar)}), 135.92 (C₆), 128.67 (C_{ar}), 128.10 (C_{ar(p)}), 127.82 (C_{ar}), 111.31 (C₅), 85.32 (C_{1'} and C_{4'}), 78.80 (C_{3'}), 71.83 (CH₂Ph), 43.87 (C_{5'}), 37.56 (C_{2'}), 12.68 (Me_T).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 332.2 Da [MH]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG200): calcd for C₁₇H₂₂N₃O₄ = 332.1605 Da, found 332.1601 Da.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-*O*-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidinyl)-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose 24



Chemical Formula: $C_{34}H_{41}N_3O_9$
Molecular Weight: $635.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **12b** (1 eq, 1.76 mmol, 570 mg) in DCM (12 mL) was added TBTU (1.4 eq, 2.4 mmol, 791 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.88 mmol, 119 mg) and triethylamine (1.1 eq, 1.93 mmol, 263 μ L). The mixture was stirred for 30 min at 5 °C. Then was added the amine **23** (1 eq, 1.76 mmol, 590 mg rinsed with 10 mL of DCM) and triethylamine (1.1 eq, 1.93 mmol, 263 μ L), the mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with water (50 mL), extracted with DCM (3x50 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x50 mL) and brine (2x50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. If necessary, the crude was diluted with toluene and washed with water (3x50 mL) to eliminate urea. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (1 g, 1.57 mmol, 89%).

TLC: $R_f = 0.34$ (eluent: Et₂O/isopropanol, 98/2).

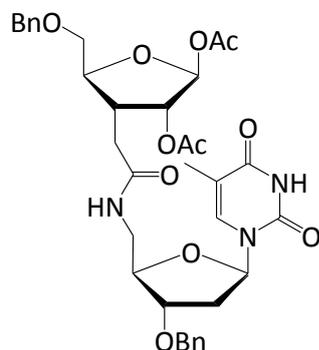
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.06 (brs, 1 H, NH_T), 7.38-7.30 (m, 10 H, H_{ar}), 7.09 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.2$, 1 H, H_{6B}), 6.50-6.44 (m, 1 H, NH_{amide}), 5.94 (dd, $J_{1'B,2'B} = 7.9$, $J_{1'B,2'B} = 6.4$, 1 H, H_{1'B}), 5.82 (d, $J_{1A,2A} = 3.7$, 1 H, H_{1A}), 4.69 (t, $^3J = 4.1$, 1 H, H_{2A}), 4.57 (AB syst., strong roof effect, 2 H, CH₂Ph), 4.51 (AB syst., strong roof effect, 2 H, CH₂Ph), 4.14-4.11 (m, 1 H, H_{4'B}), 4.08-4.05 (m, 1 H, H_{3'B}), 3.98-3.94 (m, 1 H, H_{4A}), 3.70-3.63 (m, 2 H, H_{5A}, H_{5'B}), 3.55 (dd, $J_{gem} = 10.9$, $J_{4A,5A} = 4.7$, 1 H, H_{5A}), 3.43 (dt, $J_{gem} = 14.2$, $J_{4'B,5'B} = J_{NH,5'B} = 4.2$, 1 H, H_{5'B}), 2.51-2.28 (m, 5 H, H_{2'B}, H_{3A}, CH₂CO), 1.93 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.2$, 3 H, Me_T), 1.48 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.28 (s, 3 H, Me_{acetone}).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 171.67 (CO_{amide}), 163.20 ($\text{C}_{4\text{B}}$), 150.09 ($\text{C}_{2\text{B}}$), 138.09 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 137.46 ($\text{C}_{6\text{B}}$), 137.37 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.76-127.86 (C_{ar}), 111.62 ($\text{C}_{5\text{B}}$), 111.47 ($\text{C}_{\text{IV(acetonide)}}$), 105.06 ($\text{C}_{1\text{A}}$), 88.75 ($\text{C}_{1'\text{B}}$), 83.55 ($\text{C}_{4'\text{B}}$), 81.33 ($\text{C}_{2\text{A}}$), 80.21 ($\text{C}_{4\text{A}}$), 79.56 ($\text{C}_{3'\text{B}}$), 73.71 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 71.97 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 69.88 ($\text{C}_{5\text{A}}$), 42.51 ($\text{C}_{3\text{A}}$), 41.69 ($\text{C}_{5'\text{B}}$), 36.42 ($\text{C}_{2'\text{B}}$), 32.10 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 26.89 ($\text{Me}_{\text{acetonide}}$), 26.55 ($\text{Me}_{\text{acetonide}}$), 12.58 (Me_{T}).

MS (ESI^+): $m/z = 658.3$ Da [$\text{M} + \text{MeOH} + \text{Na}$] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na} = 658.2747$ Da, found = 658.2747 Da.

1,2-O-acetyl-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-O-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidinyl)-5-O-benzyl- β -D-ribofuranose 25



Chemical Formula: $C_{35}H_{41}N_3O_{11}$
Molecular Weight: $679.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **24** (1 eq, 0.28 mmol, 180 mg) in acetic acid (4 mL) was added acetic anhydride (40 eq, 11.2 mmol, 1.1 mL), camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.01 mmol, 3.2 mg). The mixture was stirred for 20 min at 90 °C but after one hour another portion of camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.01 mmol, 3.2 mg) was added. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with DCM (15 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3x20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/isopropanol, 96/4, v/v) to obtain the desired compound as a single isomer and a light brown solid (85 mg, 0.12 mmol, 43%).

TLC: $R_f = 0.10$ (eluent: Et_2O /isopropanol, 98/2) ; $R_f = 0.64$ (eluent: DCM/isopropanol, 95/5).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.29 (brs, 1 H, NH_T), 7.35-7.30 (m, 10 H, H_{ar}), 7.05 (d, $J_{6B,Me(T)} = 0.9$, 1 H, H_{6B}), 6.58-6.55 (m, 1 H, NH_{amide}), 6.07 (s, 1 H, H_{1A}), 5.80 (t, $J_{1'B,2'B} = 7.1$, 1 H, $\text{H}_{1'B}$), 5.26 (d, $J_{2A,3A} = 4.7$, 1 H, H_{2A}), 4.57 (AB syst., strong roof effect, 2 H, CH_2Ph), 4.52 (AB syst., strong roof effect, 2 H, CH_2Ph), 4.16-4.09 (m, 3 H, H_{4A} , $\text{H}_{3'B}$, $\text{H}_{4'B}$), 3.69-3.63 (m, 1 H, $\text{H}_{5'B}$), 3.62-3.61 (m, 2 H, H_{5A}), 3.44-3.37 (m, 1 H, $\text{H}_{5'B}$), 2.98-2.92 (m, 1 H, H_{3A}), 2.54-2.45 (m, 1 H, $\text{H}_{2'B}$), 2.39-2.37 (m, 2 H, CH_2CO), 2.36-2.30 (m, 1 H, $\text{H}_{2'B}$), 2.08 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.96 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.93 (d, $J_{6B,Me(T)} = 0.9$, 3 H, Me_T).

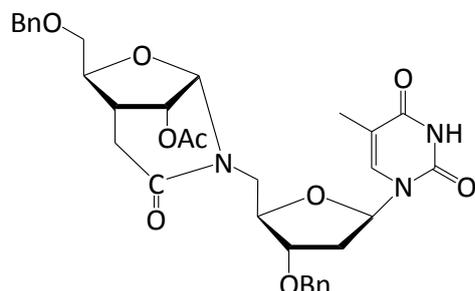
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.98 (CO_{amide}), 169.97 (CO_{Ac}), 169.54 (CO_{Ac}), 163.31 (C_{4B}), 150.33 (C_{2B}), 138.34 (C_{6B}), 138.18 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 137.49 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.74-127.74 (C_{ar}), 111.48 (C_{5B}), 98.97 (C_{1A}), 89.97 ($\text{C}_{1'B}$), 83.57-83.43 (C_4 and C_4'), 79.53 ($\text{C}_{3'B}$), 77.74 (C_{2A}), 73.53

(CH₂Ph), 72.20 (CH₂Ph), 71.67 (C_{5A}), 41.69 (C_{5'B}), 39.03 (C_{3A}), 36.42 (C_{2'B}), 32.22 (CH₂CO), 21.24 (Me_{Ac}), 20.92 (Me_{Ac}), 12.44 (Me_T).

MS (Cl⁺): m/z = 680.4 Da [MH]⁺, 620.4 Da [MH-AcOH]⁺; (MALDI⁺: DHB, PEG600): 702.3 [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₃₅H₄₁N₃O₁₁Na = 702.2633, found 702.2610.

2-O-acetyl-1,3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-O-benzyl-5'-deoxy-5'-cycloacetamido-thymidinyl)-5-O-benzyl- α -D-ribofuranose 26



Chemical Formula: $C_{33}H_{37}N_3O_9$
Molecular Weight: 619.66 g.mol⁻¹

A solution of acetamide 24 (1 eq, 0.31 mmol, 200 mg) in trifluoroacetic acid / water (2.4 mL / 0.6 mL) was stirred for 24 hours at room temperature then diluted with DCM and washed with water and a saturated aqueous solution of NaHCO₃, dried over Na₂SO₄. The crude was co-evaporated with pyridine, diluted in pyridine and acetic anhydride (20 eq, 6.3 mmol, 0.8 mL) was added. The mixture was stirred for 20 hours at room temperature and then was diluted with DCM (10 mL), washed with water and HCl 1N (15 mL), then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/Et₂O, 6/4 to 0/10 v/v) to obtain compound 26 (65 mg, 0.10 mmol, 32%).

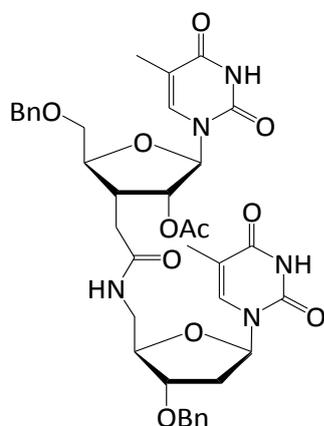
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.88 (s, 1 H, NH_T), 7.43 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.0$, 1 H, H_{6B}), 7.37-7.30 (m, 10 H, H_{ar}), 6.23 (dd, $J_{1'B,2'Bb} = 8.1$, $J_{1'B,2'Ba} = 5.6$, 1 H, H_{1'B}), 5.36 (d, $J_{1A,2A} = 4.1$, 1 H, H_{1A}), 5.07 (t, $^3J = 4.8$, 1 H, H_{2A}), 4.47-4.59 (m, 4 H, 2xCH₂Ph), 4.14-4.10 (m, 1 H, H_{4'B}), 4.01-3.96 (m, 2 H, H_{3'B}, H_{4A}), 3.82 (dd, $J_{gem} = 14.2$, $J_{4'B,5'Ba} = 8.8$, 1 H, H_{5'Ba}), 3.51-3.49 (m, 2 H, H_{5A}), 3.41 (dd, $J_{gem} = 14.2$, $J_{4'B,5'Bb} = 3.4$, 1 H, H_{5'Bb}), 2.83 (dd, $J_{gem} = 17.9$, $J_{CH_2CO,3A} = 4.2$, 1 H, CHH'CO), 2.69-2.67 (m, 1 H, H_{3A}), 2.47 (ddd, $J_{gem} = 13.8$, $J_{1'B,2'Ba} = 5.6$, $J_{2'Ba,3'B} = 2.5$, 1 H, H_{2'Ba}), 2.41 (d, $J_{gem} = 17.9$, 1 H, CHH'CO), 1.99 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.95 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.0$, 3 H, Me_T).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.58 (CO_{Ac}), 169.79 (CO_{amide}), 163.91 (C_{4B}), 150.31 (C_{2B}), 137.70 (C_{IV(ar)}), 137.39 (C_{IV(ar)}), 135.82 (C_{6B}), 128.67-127.81 (C_{ar}), 111.34 (C_{5B}), 85.62 (C_{1'B}), 84.64 (C_{1A}), 81.84 (C_{4A}), 81.74 (C_{4'B}), 79.60 (C_{3'B}), 73.74 (CH₂Ph), 71.60 (CH₂Ph), 71.11 (C_{5A}), 70.10 (C_{2A}), 47.10 (C_{5'B}), 37.07 (C_{2'B}), 36.44 (CH₂CO), 35.98 (C_{3A}), 20.67 (Me_{Ac}), 12.43 (Me_T).

MS (MALDI⁺: DHB, PEG600): 642.3 [MNa]⁺, 620.3 [MH-H₂O]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₃₃H₃₇N₃O₉Na = 642.2427, found 642.2411.

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-(2'-deoxy-3'-O-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido-thymidinyl)-5'-O-benzyl- β -D-ribothymidine 27



Chemical Formula: $C_{38}H_{43}N_5O_{11}$
Molecular Weight: $745.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of thymine (1.5 eq, 0.26 mmol, 32 mg) in freshly distilled acetonitrile (2 mL) was added BSA (6 eq, 1 mmol, 250 μL). The mixture was stirred for one hour at 60 $^{\circ}\text{C}$, then cooled to 5 $^{\circ}\text{C}$ before adding TMSOTf (2 eq, 0.3 mmol, 63 μL) and 25 (1 eq, 0.17 mmol, 120 mg). The reaction was stirring for 2 h at reflux and cooled to 5 $^{\circ}\text{C}$ before adding a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3x2 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/MeOH, 99.5/0.5 to 95/5, v/v for the first chromatography and DCM/MeOH, 98/2 to 96/4, v/v for the second) to obtain the desired compound (50 mg, 0.07 mmol, 40%).

TLC: $R_f = 0.10$ (eluent: DCM/MeOH, 96/4).

HPLC: $rt = 19.33$ column LUNA (eluent: hexane/isopropanol 55/45).

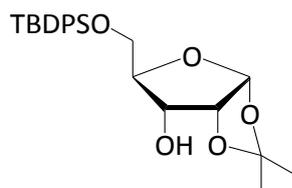
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) of two rotamers in a ratio 6/4: δ (ppm) = 9.84 (s, 0.4 H, NH_T), 9.68 (s, 0.6 H, NH_T), 9.20 (s, 0.4 H, NH_T), 8.93 (s, 0.6 H, NH_T), 7.62 (brs, 0.4 H, H_6), 7.52 (brs, 0.6 H, H_6), 7.38-7.32 (m, 10 H, H_{ar}), 7.09 (d, $J_{6,Me(T)} = 0.8$, 0.4 H, H_6), 7.06 (brs, 0.6 H, H_6), 6.96-6.93 (m, 1 H, NH_{amide}), 5.96 (d, $J_{1'A,2'A} = 2.9$, 1 H, $\text{H}_{1'A}$), 5.94-5.91 (m, 1 H, $\text{H}_{1'B}$), 5.57-5.52 (m, 1 H, $\text{H}_{2'A}$), 4.62 (brs, 4 H, $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 4.15-4.10 (m, 3 H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{4'A}$ and $\text{H}_{4'B}$), 3.76-3.62 (m, 4 H, $\text{H}_{5'A}$ and $\text{H}_{5'B}$), 3.22-3.18 (m, 1 H, $\text{H}_{3'A}$), 2.81-2.31 (m, 4 H, $\text{H}_{2'B}$ and CH_2CO), 2.12 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.87 (brs, 3 H, Me_T), 1.59 (brs, 3 H, Me_T).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 169.89 (CO_{amide}), 169.67 (CO_{Ac}), 163.58 ($\text{C}_{4\text{B}}$), 163.51 ($\text{C}_{4\text{A}}$), 151.68 ($\text{C}_{2\text{A}}$), 150.37 ($\text{C}_{2\text{B}}$), 137.52 ($\text{C}_{6\text{B}}$), 137.47 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 136.06 ($\text{C}_{6\text{A}}$), 135.84 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.81-127.86 (C_{ar}), 111.55 ($\text{C}_{5\text{A}}$), 111.02 ($\text{C}_{5\text{B}}$), 89.02 ($\text{C}_{1'\text{A}}$), 83.39 ($\text{C}_{1'\text{B}}$), 83.12 ($\text{C}_{4'}$), 83.05 ($\text{C}_{4'}$), 78.41 ($\text{C}_{3'\text{B}}$), 77.57 ($\text{C}_{2'\text{A}}$), 73.92 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 73.88 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 69.90 ($\text{C}_{5'\text{A}}$), 37.92 ($\text{C}_{5'\text{B}}$), 37.84 ($\text{C}_{3'\text{A}}$), 37.29 ($\text{C}_{2'\text{B}}$), 32.08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 20.87 (Me_{Ac}), 12.28 (Me_{T}), 12.18 (Me_{T}).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 768.3 Da [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Na}$ = 768.2851 Da, found 768.2825 Da.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +11.6 (CHCl_3 , c = 0.1 g/100mL).

1,2-O-isopropylidene-5-O-tert-butyl-diphenylsilyl- α -D-ribofuranose 28

Chemical Formula: $C_{24}H_{32}O_5Si$
Molecular Weight: $428.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **7** (1 eq, 2.2 mmol, 950 mg) in a mixture of EtOH/water 9/1 (13.5 mL/1.5 mL) was added NaBH_4 (3.6 eq, 8.3 mmol, 317 mg) portionwise and the reaction was stirred at r.t. overnight. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted in mixture DCM/ NH_4Cl (25 mL/25 mL) and stirred for 30 min. The aqueous layer was extracted with DCM (25 mL), the combined organic layers were washed with NH_4Cl , water and brine, then dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound (900 mg, 2.1 mmol, 95%).

TLC: $R_f = 0.39$ (eluent: DCM/PE, 90/10).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.71-7.67 (m, 4 H, H_{ar}), 7.41-7.37 (m, 6 H, H_{ar}), 5.85 (d, $J_{1,2} = 3.9$, 1 H, H_1), 4.61 (dd, $J_{2,3} = 5$, $J_{1,2} = 3.9$, 1 H, H_2), 4.14 (dd, $J_{3,4} = 8$, $J_{2,3} = 5$, 1 H, H_3), 3.98-3.93 (m, 1 H, H_{5a}), 3.88-3.82 (m, 2H, H_{5b} and H_4), 2.30 (br,s, 1 H, OH), 1.56 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.38 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.05 (s, 9 H, $\text{Me}_{t\text{Bu}}$).

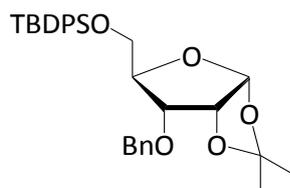
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 135.80 (C_{ar}), 135.74 (C_{ar}), 133.45 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 133.31 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 129.83 (C_{ar}), 127.83 (C_{ar}), 112.72 ($\text{C}_{IV(\text{acetamide})}$), 104.34 (C_1), 81.40 (C_2), 78.91 (C_3), 71.40 (C_4), 62.48 (C_5), 26.94 ($\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 26.92 ($\text{Me}_{t\text{Bu}}$), 26.75 ($\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 19.43 ($\text{C}_{IV(t\text{Bu})}$).

MS (ESI^+): $m/z = 451.2 \text{ Da}$ [MNa] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{SiNa} = 451.1911 \text{ Da}$, found = 451.1904 Da.

$[\alpha]_D^{20} = +28.2$ (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

Except for the H-3 and H-4 attribution, conform with literature : N. C. R. van Straten, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6509-6522.

1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl-5-O-tert-butyl-diphenylsilyl- α -D-ribofuranose 29

Chemical Formula: $C_{31}H_{38}O_5Si$
Molecular Weight: $518.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **28** (1 eq, 2.1 mmol, 900 mg) in dry THF (30 mL) was added under argon NaH (1.2 eq, 2.52 mmol, 101 mg of a 60% NaH in oil) portionwise at 4 °C and then benzyl bromide (1 eq, 2.1 mmol, 900 mL) was added slowly. The reaction was stirred at r.t. over night. The mixture was diluted with Et₂O, washed with NH₄Cl, water and brine then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: PE/ethyl acetate, 9/1 v/v) to obtain the desired compound as a white oil (1 g, 1.93 mmol, 92%).

TLC: R_f = 0.80 (eluent: DCM).

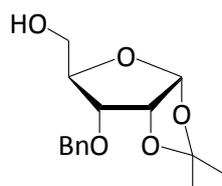
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.68-7.65 (m, 4 H, H_{ar(Ph)}), 7.43-7.30 (m, 11 H, H_{ar(Ph, Bn)}), 5.77 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H₁), 4.78 (d, $J_{gem} = 12.1$, 1 H, $\underline{C}H\overline{H}'Ph$), 4.60 (d, $J_{gem} = 12.1$, 1 H, $\overline{C}H\overline{H}'Ph$), 4.61 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.0$, 1 H, H₂), 4.14 (dt, $J_{3,4} = 8.8$, $J_{4,5} = 2.3$, 1 H, H₄), 4.06 (dd, $J_{3,4} = 8.8$, $J_{2,3} = 4.1$, 1 H, H₃), 3.98 (dd, $J_{gem} = 11.8$, $J_{4,5a} = 1.6$, 1 H, H_{5a}), 3.80 (dd, $J_{gem} = 11.8$, $J_{4,5b} = 2.7$, 1 H, H_{5b}), 1.60 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.38 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.01 (s, 9 H, Me_{tBu}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 137.86 (C_{IV(Bn)}), 135.83 (C_{ar}), 135.69 (C_{ar}), 133.67 (C_{IV(ar)}), 133.29 (C_{IV(ar)}), 129.77-127.77 (C_{ar}), 113.02 (C_{IV(acetone)}), 104.27 (C₁), 79.65 (C₄), 77.81 (C₂), 76.83 (C₃), 72.43 ($\underline{C}H_2Ph$), 61.85 (C₅), 27.06 (Me_{acetone}), 26.93 (Me_{tBu}), 26.73 (Me_{acetone}), 19.45 (C_{IV(tBu)}).

MS (Cl⁺): m/z = 536.2 Da [MNH₄]⁺; (ESI⁺): m/z = 541.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₃₁H₃₈O₅SiNa = 541.2386 Da, found = 541.2390 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +8.9 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl- α -D-ribofuranose 30

Chemical Formula: $C_{15}H_{20}O_5$
Molecular Weight: $280.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **29** (1 eq, 1.6 mmol, 800 mg) in THF (20 mL) was added TBAF (1.1 eq, 1.8 mmol, 1.8 mL of a 1M solution in THF), the mixture became yellow. It was stirred at 4 °C for 3 h, then at r.t. overnight. The reaction was quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (15 mL), extracted with DCM (3x15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ MeOH, 98/2 to 97/3, v/v) to obtain the desired compound (360 mg, 1.28 mmol, 80%).

TLC: $R_f = 0.35$ (eluent: DCM/MeOH, 98/2).

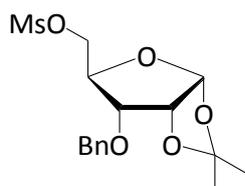
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38-7.30 (m, 5 H, H_{ar}), 5.72 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H_1), 4.77 (d, $J_{gem} = 11.9$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.59 (d, $J_{gem} = 11.9$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.57 (dd, $J_{2,3} = 4.3$, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H_2), 4.11 (dt, $J_{3,4} = 9.1$, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 2.7$, 1 H, H_4), 3.91 (dd, $J_{gem} = 12.5$, $J_{4,5a} = 2.4$, 1 H, H_{5a}), 3.84 (dd, $J_{3,4} = 9.1$, $J_{2,3} = 4.3$, 1 H, H_3), 3.64 (dd, $J_{gem} = 12.5$, $J_{4,5b} = 3.0$, 1 H, H_{5b}), 1.73 (brs, 1 H, OH), 1.60 (s, 3 H, $\text{Me}_{acetonide}$), 1.36 (s, 3 H, $\text{Me}_{acetonide}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 137.66 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.63 (C_{ar}), 128.21 ($\text{C}_{ar(p)}$), 128.14 (C_{ar}), 113.26 ($\text{C}_{IV(acetonide)}$), 104.21 (C_1), 78.87 (C_4), 77.74 (C_2), 76.73 (C_3), 72.49 (CH_2Ph), 60.74 (C_5), 26.94 ($\text{Me}_{acetonide}$), 26.63 ($\text{Me}_{acetonide}$).

MS (ESI⁺): $m/z = 303.1 \text{ Da}$ [MNa]⁺, 583.2 Da [2MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na} = 303.1208 \text{ Da}$, found 303.1210 Da .

$[\alpha]_D^{20} = +54$ (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl-5-O-mesyl- α -D-ribofuranose 31

Chemical Formula: $C_{16}H_{22}O_7S$
Molecular Weight: $358.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **30** (1 eq, 4.5 mmol, 1.27 g) in pyridine (18 mL) was added dropwise mesyl chloride (2 eq, 9 mmol, 0.7 mL). The mixture was stirred under argon few hours (or overnight). The reaction was quenched with water (2 mL), concentrated under reduced pressure and co-evaporated with toluene (20 mL). The residu was diluted with DCM (30 mL), washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3x20 mL), brine (1x20 mL) then dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound as a brown oil (1.64 g, 4.5 mmol, quantitative).

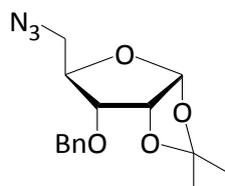
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.38-7.33 (m, 5 H, H_{ar}), 5.73 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H_1), 4.77 (d, $J_{\text{gem}} = 11.8$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.57 (d, $J_{\text{gem}} = 11.8$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.57 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.0$, 1 H, H_2), 4.48-4.43 (m, 1 H, H_{5a}), 4.27 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.3$, $J_{4,5b} = 4.0$, 1 H, H_{5b}), 4.24 (ddd, $J_{3,4} = 9.0$, $J_{4,5b} = 4.0$, $J_{4,5a} = 1.8$, 1 H, H_4), 3.76 (dd, $J_{3,4} = 9.0$, $J_{2,3} = 4.0$, 1 H, H_3), 2.98 (s, 3 H, MeSO_2), 1.59 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.36 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 137.17 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.75 (C_{ar}), 128.43 (C_{ar}), 128.29 (C_{ar}), 113.26 ($\text{C}_{\text{IV(acetone)}}$), 104.21 (C_1), 77.36 (C_2), 77.03 (C_3), 76.37 (C_4), 72.55 (CH_2Ph), 67.77 (C_5), 37.65 (MeSO_2), 26.93 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 26.59 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$).

MS (ESI^+): $m/z = 381.1 \text{ Da}$ [MNa] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}_1\text{Na} = 381.0978 \text{ Da}$, found 381.0977 Da.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +8.1$ (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl-5-azido- α -D-ribofuranose 32

Chemical Formula: $C_{15}H_{19}N_3O_4$
Molecular Weight: $305.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **31** (1 eq, 3.2 mmol, 1.16 g) in DMF (30 mL) was added sodium azide (1.5 eq, 4.8 mmol, 312 mg). The reaction was stirred 3 h at 90 °C. The mixture was quenched with water (30 mL), extracted with Et₂O (3x30 mL). The combined organic layers were washed with brine, then dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound as a yellow oil (940 mg, 3.07 mmol, 95%).

TLC: $R_f = 0.54$ (eluent: DCM/PE, 70/30).

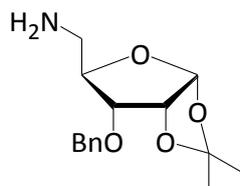
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38-7.32 (m, 5 H, H_{ar}), 5.75 (d, $J_{1,2} = 3.6$, 1 H, H₁), 4.77 (d, $J_{gem} = 11.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.58 (t, $J_{2,3} = J_{1,2} = 3.9$, 1 H, H₂), 4.55 (d, $J_{gem} = 11.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.22-4.16 (m, 1 H, H₄), 3.77 (dd, $J_{3,4} = 8.9$, $J_{2,3} = 4.2$, 1 H, H₃), 3.66 (dd, $J_{gem} = 13.5$, $J_{4,5a} = 2.6$, 1 H, H_{5a}), 3.24 (dd, $J_{gem} = 13.5$, $J_{4,5b} = 3.9$, 1 H, H_{5b}), 1.59 (s, 3 H, Me_{acetone}), 1.36 (s, 3 H, Me_{acetone}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 137.39 (C_{IV(ar)}), 128.69 (C_{ar}), 128.36 (C_{ar(p)}), 128.20 (C_{ar}), 113.39 (C_{IV(acetone)}), 104.18 (C₁), 77.85 (C₃), 77.45 (C₄), 77.35 (C₂), 72.51 (CH₂Ph), 50.64 (C₅), 26.94 (Me_{acetone}), 26.63 (Me_{acetone}).

MS (ESI⁺): $m/z = 328.1 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $C_{15}H_{19}N_3O_4Na = 328.1268 \text{ Da}$, found 328.1264 Da.

$[\alpha]_D^{20} = +158.3$ (CHCl₃, $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-O-isopropylidene-3-O-benzyl-5-amino- α -D-ribofuranose 33

Chemical Formula: $C_{15}H_{21}NO_4$
Molecular Weight: $279.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The compound **32** (1.1 mmol, 340 mg) was hydrogenated in the presence of 10% Pd/C (5% weight, 17 mg) in EtOH (5 mL) under hydrogen atmosphere. After stirring at r.t. for 4h, the TLC analysis (DCM) showed disappearance of the starting material. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the desired compound as a light brown oil (290 mg, 1.04 mmol, 94%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.35-7.28 (m, 5 H, H_{ar}), 5.70 (d, $J_{1,2} = 3.7$, 1 H, H_1), 4.77 (d, $J_{\text{gem}} = 12.0$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.57 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.1$, 1 H, H_2), 4.52 (d, $J_{\text{gem}} = 12.0$, 1 H, $\text{CHH}'\text{Ph}$), 4.03 (ddd, $J_{3,4} = 9.0$, $J_{4,5b} = 5.4$, $J_{4,5a} = 3.2$, 1 H, H_4), 3.62 (dd, $J_{3,4} = 9.0$, $J_{2,3} = 4.3$, 1 H, H_3), 3.01 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.8$, $J_{4,5a} = 3.4$, 1 H, H_{5a}), 2.70 (dd, $J_{\text{gem}} = 13.8$, $J_{4,5b} = 5.4$, 1 H, H_{5b}), 1.60 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$), 1.36 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetone}}$).

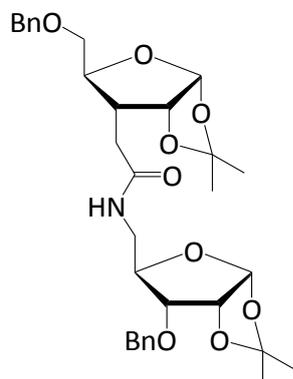
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 137.66 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{ar})}$), 128.57 (C_{ar}), 128.48 (C_{ar}), 128.14 (C_{ar}), 128.06 (C_{ar}), 127.99 (C_{ar}), 112.97 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{acetone})}$), 104.12 (C_1), 79.47 (C_3), 78.19 (C_4), 77.47 (C_2), 72.13 (CH_2Ph), 42.51 (C_5), 26.80 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$), 26.61 ($\text{Me}_{\text{acetone}}$).

MS (ESI^+): $m/z = 280.2 \text{ Da}$ [MH] $^+$.

HRMS (ESI^+): calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_1\text{O}_4 = 280.1549 \text{ Da}$, found 280.1546 Da.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +53.8$ (CHCl_3 , $c = 1 \text{ g}/100\text{mL}$).

1,2-*O*-isopropylidene-3-(1,2-*O*-isopropylidene-3-*O*-benzyl-5-deoxy-5-acetamido- α -D-ribofuranose)-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose **34**



Chemical Formula: C₃₂H₄₁NO₉
Molecular Weight: 583.7 g.mol⁻¹

To a cooled solution of **12b** (1 eq, 1.5 mmol, 483 mg) in DCM (18 mL) was added TBTU (1.4 eq, 2.1 mmol, 690 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.75 mmol, 100 mg) and triethylamine (1.1 eq, 1.65 mmol, 230 μ L). The mixture was stirred under argon for 30 min at 5 °C. Then the amine **33** was added (1 eq, 1.5 mmol) and triethylamine (1.1 eq, 1.65 mmol, 230 μ L), the mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with water (35 mL), extracted with DCM (3x35 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x30 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was diluted with toluene and washed with water (3x30 mL) to eliminate urea. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM to DCM/MeOH, 99/1, v/v) to obtain the desired compound (880 mg, 1.5 mmol, quantitative).

TLC: R_f = 0.21 (eluent: DCM/MeOH, 98/2).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.41-7.29 (m, 10 H, H_{ar}), 5.83 (dd, $J_{\text{NH},5\text{Ba}} = 5.6$, $J_{\text{NH},5\text{Bb}} = 4.3$, 1 H, NH_{amide}), 5.74 (d, $J_{1\text{A},2\text{A}} = 3.8$, 1 H, H_{1A}), 5.67 (d, $J_{1\text{B},2\text{B}} = 3.7$, 1 H, H_{1B}), 4.78 (d, $J_{\text{gem}} = 12.3$, 1 H, CHH'_{PhB}), 4.60 (d, $J_{\text{gem}} = 12.3$, 1 H, CHH'_{PhB}), 4.59 (d, $J_{\text{gem}} = 12.3$, 1 H, CHH'_{PhA}), 4.54 (d, $J_{\text{gem}} = 12.3$, 1 H, CHH'_{PhA}), 4.50 (t, $J_{1\text{B},2\text{B}} = J_{2\text{B},3\text{B}} = 3.9$, 1 H, H_{2B}), 4.36 (t, $J_{1\text{A},2\text{A}} = J_{2\text{A},3\text{A}} = 3.8$, 1 H, H_{2A}), 4.16-4.10 (m, 1 H, H_{4B}), 3.93-3.88 (m, 1 H, H_{4A}), 3.70-3.61 (m, 2 H, H_{5Aa} and H_{5Ba}), 3.55-3.45 (m, 3 H, H_{5Ab}, H_{5Bb} and H_{3B}), 2.42-2.23 (m, 2 H, H_{3A}, CHH'_{CO}), 2.26-2.20 (m, 1 H, CHH'_{CO}), 1.59 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.46 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.36 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.23 (s, 3 H, Me_{acetamide}).

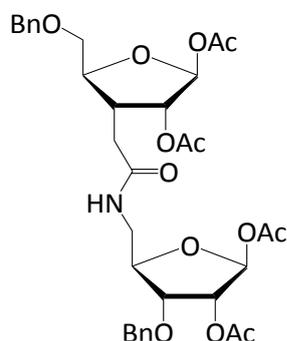
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.10 (CO_{amide}), 138.13 (C_{IV(ar)}), 137.63 (C_{IV(ar)}), 128.73-127.86 (C_{ar}), 113.40 (C_{IV(acetonide)}), 111.56 (C_{IV(acetonide)}), 105.15 (C_{1A}), 104.17 (C_{1B}), 81.21 (C_{2A}), 80.31 (C_{4A}), 78.50 (C_{3B}), 77.60 (C_{2B}), 77.09 (C_{4B}), 73.73 (CH₂Ph_A), 72.40 (CH₂Ph_B), 69.96 (C_{5A}), 42.69 (C_{3A}), 39.73 (C_{5B}), 32.52 (CH₂CO), 26.91 (Me_{acetonide}), 26.88 (Me_{acetonide}), 26.63 (Me_{acetonide}), 26.61 (Me_{acetonide}).

MS (Cl⁺): m/z = 584.4 Da [MH]⁺, 601.4 Da [MNH₄]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₃₂H₄₁N₁O₉Na = 606.2674 Da, found 606.2662 Da.

[α]_D²⁰ = +25 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-O-acetyl-3-deoxy-3-(1,2-O-acetyl-3-O-benzyl-5-deoxy-5-acetamido- β -D-ribose)-5-O-benzyl- β -D-ribofuranose 35



Chemical Formula: $C_{34}H_{41}NO_{13}$
Molecular Weight: $671.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **34** (1 eq, 0.41 mmol, 240 mg) in acetic acid (18 mL) was added acetic anhydride (80 eq, 32.8 mmol, 3 mL), camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.02 mmol, 4.7 mg). The mixture was stirred for 4 h at 80-85 °C but after one hour another portion of camphor sulfonic acid (5% weight, 0.02 mmol, 4.7 mg) was added. The reaction was diluted with DCM (15 mL), washed with water (3x20 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (3x20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure and co-evaporated with toluene (20 mL) then Et_2O (20 mL). The crude was purified by flash column chromatography (eluent: $\text{Et}_2\text{O}/\text{EP}$, 90/10, v/v to Et_2O) to obtain the desired compound as a single isomer (110 mg, 0.16 mmol, 39%).

TLC: $R_f = 0.18$ (eluent: Et_2O).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.35-7.30 (m, 10 H, H_{ar}), 6.10 (s, 1 H, H_1), 6.07 (s, 1 H, H_1), 5.78 (t, $J_{\text{NH},5B} = 5.7$, 1 H, NH_{amide}), 5.29-5.27 (m, 2 H, H_2), 4.60-4.54 (m, 4 H, $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$), 4.13-4.08 (m, 2 H, H_4), 3.97 (dd, $J = 8.1$, $J = 4.4$, 1 H, H_{3B}), 3.67-3.58 (m, 3 H, $2 \times \text{H}_{5A}$ and H_{5B}), 3.32-3.26 (m, 1 H, H_{5B}), 2.96-2.88 (m, 1 H, H_{3A}), 2.37-2.31 (m, 2 H, CH_2CO), 2.09 (s, 3 H, Me_{Ac}), 2.07 (s, 6 H, Me_{Ac}), 1.95 (s, 3 H, Me_{Ac}).

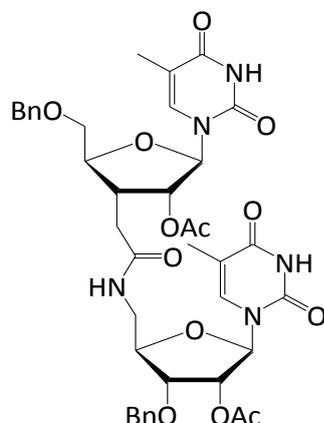
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.43 (CO_{amide}), 169.88 (CO_{Ac}), 169.84 (CO_{Ac}), 169.47 (CO_{Ac}), 169.05 (CO_{Ac}), 138.12 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 137.18 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.70-127.74 (C_{ar}), 98.83 (C_1), 98.73 (C_1), 83.56 (C_{4A}), 80.77 (C_{4B}), 78.15 (C_{3B}), 77.94 (C_{2A}), 73.62 (CH_2Ph), 73.58 (C_{2B}), 73.54 (CH_2Ph), 71.85 (C_{5A}), 42.16 (C_{5B}), 38.95 (C_{3A}), 32.38 (CH_2CO), 21.21 ($2 \times \text{Me}_{Ac}$), 20.81 ($2 \times \text{Me}_{Ac}$).

MS (MALDI⁺: DHB): $m/z = 694.2 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₃₄H₄₁N₁O₁₃Na = 694.2470 Da, found 694.2450 Da.

[α]_D²⁰ = +8.7 (CHCl₃, c = 1.5 g/100mL).

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-(2'-O-acetyl-3'O-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido- β -ribothymidinyl)-5'-O-benzyl- β -ribothymidine 36



Chemical Formula: C₄₀H₄₅N₅O₁₃
Molecular Weight: 803.8 g.mol⁻¹

To a solution of thymine (3 eq, 0.45 mmol, 56 mg) in freshly distilled acetonitrile (4 mL) were added 35 (1 eq, 0.15 mmol, 100 mg) under argon then BSA (12 eq, 1.8 mmol, 440 μ L). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (4 eq, 0.6 mmol, 108 μ L). The reaction was stirring for 2 h at reflux then diluted with DCM (10 mL) and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2x15 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/MeOH, 99/1 to 95/5, v/v for the first chromatography and DCM/isopropanol, 96/4, v/v for the second) to obtain the desired compound (75 mg, 0.093 mmol, 62%).

TLC: R_f = 0.35 (eluent: DCM/isopropanol, 95/5).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.65 (brs, 1 H, NH_T), 9.06 (brs, 1 H, NH_T), 7.57 (d, $J_{6A,Me(T)}$ = 0.9, 1 H, H_{6A}), 7.36-7.28 (m, 10 H, H_{ar}), 6.94 (d, $J_{6B,Me(T)}$ = 0.8, 1 H, H_{6B}), 6.71 (dd, $J_{NH,5'aB}$ = 6.9, $J_{NH,5'bB}$ = 2.7, 1 H, NH_{amide}), 6.00 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 2.6, 1 H, H_{1'A}), 5.56 (dd, $J_{2'A,3'A}$ = 6.1, $J_{1'A,2'A}$ = 2.6, 1 H, H_{2'A}), 5.48 (dd, $J_{2'B,3'B}$ = 6.3, $J_{1'B,2'B}$ = 2.9, 1 H, H_{2'B}), 5.18 (d, $J_{1'B,2'B}$ = 2.9, 1 H, H_{1'B}), 4.62-4.53 (m, 4 H, 2xCH₂Ph), 4.42 (t, $J_{2'B,3'B}$ = $J_{3'B,4'B}$ = 7, 1 H, H_{3'B}), 4.12-4.11 (m, 1 H, H_{4'A}), 4.10-4.09 (m, 1 H, H_{4'B}), 3.88 (dd, J_{gem} = 11.1, $J_{4'A,5'Aa}$ = 2.0, 1 H, H_{5'Aa}), 3.79 (ddd, J_{gem} = 14.5, $J_{NH(amide),5'Ba}$ = 6.9, $J_{4'A,5'Ba}$ = 2.8, 1 H, H_{5'Ba}), 3.63 (dd, J_{gem} = 11.1, $J_{4'A,5'Ab}$ = 2.6, 1 H, H_{5'Ab}), 3.40 (dt, J_{gem} = 14.5, $J_{4',5'Bb}$ = $J_{5'Bb,NH}$ = 2.7, 1 H, H_{5'Bb}), 3.15-3.05 (m, 1 H, H_{3'A}), 2.40 (dd, J_{gem} = 15.4, $J_{H3'A,Ha(CH2CO)}$ = 8.0, 1 H, H_{a(CH2CO)}), 2.22 (dd, J_{gem} = 15.4, $J_{H3'A,Hb(CH2CO)}$ = 6.0, 1 H, H_{b(CH2CO)}), 2.16

(s, 3 H, Me_{Ac(A)}), 2.06 (s, 3 H, Me_{Ac(B)}), 1.91 (d, $J_{6B,Me(T)} = 0.8$, 3 H, Me_{T(B)}), 1.57 (d, $J_{6A,Me(T)} = 0.8$, 3 H, Me_{T(A)}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.82 (CO_{amide}), 170.37 (CO_{Ac(B)}), 170.20 (CO_{Ac(A)}), 164.11 (C_{4B}), 163.52 (C_{4A}), 151.15 (C_{2A}), 150.66 (C_{2B}), 139.87 (C_{6B}), 137.67 (C_{IV(ar)}), 137.47 (C_{IV(ar)}), 135.85 (C_{6A}), 128.75-127.97 (C_{ar}), 111.64 (C_{5B}), 111.58 (C_{5A}), 96.23 (C_{1'B}), 89.05 (C_{1'A}), 83.35 (C_{4'A}), 81.18 (C_{4'B}), 77.57 (C_{2'A}), 76.05 (C_{3'B}), 74.17 (CH₂Ph), 74.02 (C_{2'B}), 73.90 (CH₂Ph), 69.29 (C_{5'A}), 39.73 (C_{5'B}), 38.01 (C_{3'A}), 32.22 (CH₂CO), 20.99 (Me_{Ac(A)}), 20.87 (Me_{Ac(B)}), 12.37 (Me_{T(B)}), 12.19 (Me_{T(A)}).

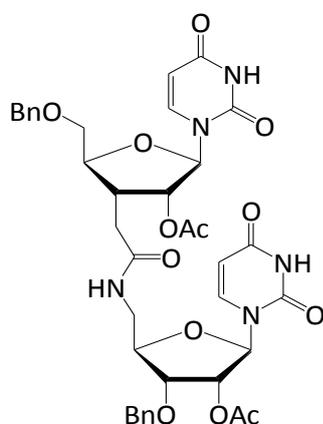
MS (ESI⁺): m/z = 826.3 Da [MNa]⁺, 804.3 Da [MH]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₄₀H₄₅N₅O₁₃Na = 826.2906 Da, found = 826.2884 Da.

calcd C₄₀H₄₆N₅O₁₃ = 804.3087 Da, found 804.3065 Da.

[α]_D²⁰ = -28 (CHCl₃, c = 0.1 g/100mL).

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-(2'-O-acetyl-3'-O-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido- β -uridyl)-5'-O-benzyl- β -uridine 37



Chemical Formula: C₃₈H₄₁N₅O₁₃
Molecular Weight: 775.8 g.mol⁻¹

To a solution of uracile (3 eq, 0.45 mmol, 51 mg) in freshly distilled acetonitrile (4 mL) were added 35 (1 eq, 0.15 mmol, 100 mg) under argon then BSA (12 eq, 1.8 mmol, 440 μ L). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (4 eq, 0.6 mmol, 108 μ L). The reaction was stirring for 2 h at reflux then diluted with DCM (10 mL) and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous layer was extracted with DCM (2x10 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/MeOH, 99/1 to 95/5, v/v for the first chromatography and DCM/isopropanol, 96/4, v/v for the second) to obtain the desired compound (65 mg, 0.084 mmol, 56%).

TLC: R_f = 0.4 (eluent: DCM/isopropanol, 95/5).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.94 (brs, 1 H, NH_U), 9.43 (brs, 1 H, NH_U), 7.85 (d, $J_{5A,6A}$ = 8.1, 1 H, H_{6A}), 7.32-7.29 (m, 10 H, H_{ar}), 7.14 (d, $J_{5B,6B}$ = 8.0, 1 H, H_{6B}), 6.71 (dd, $J_{NH,5'aB}$ = 6.8, $J_{NH,5'bB}$ = 3.2, 1 H, NH_{amide}), 5.96 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 2.2, 1 H, H_{1'A}), 5.70 (dd, $J_{5B,6B}$ = 8.0, $J_{5B,NH(U)}$ = 1.9, 1 H, H_{5B}), 5.54 (dd, $J_{2'A,3'A}$ = 5.8, $J_{1'A,2'A}$ = 2.2, 1 H, H_{2'A}), 5.45 (dd, $J_{2'B,3'B}$ = 6.5, $J_{1'B,2'B}$ = 3.1, 1 H, H_{2'B}), 5.36 (dd, $J_{5A,6A}$ = 8.1, $J_{5A,NH(U)}$ = 2.0, 1 H, H_{5A}), 5.26 (d, $J_{1'B,2'B}$ = 3.1, 1 H, H_{1'B}), 4.60-4.47 (m, 4 H, 2xCH₂Ph), 4.35 (t, $J_{2'B,3'B}$ = $J_{3'B,4'B}$ = 6.5, 1 H, H_{3'B}), 4.15-4.08 (m, 2 H, H_{4'A} and H_{4'B}), 3.89 (dd, J_{gem} = 11.0, $J_{4'A,5'Aa}$ = 2.2, 1 H, H_{5'Aa}), 3.76 (ddd, J_{gem} = 14.5, $J_{NH(amide),5'Ba}$ = 6.8, $J_{4'A,5'Ba}$ = 3.2, 1 H, H_{5'Ba}), 3.65 (dd, J_{gem} = 11.0, $J_{4'A,5'Ab}$ = 2.4, 1 H, H_{5'Ab}), 3.45 (dt, J_{gem} = 14.5, $J_{4',5'Bb}$ = $J_{5'Bb,NH}$ = 3.2, 1 H, H_{5'Bb}), 3.07-3.00 (m, 1 H, H_{3'A}), 2.40 (dd, J_{gem} = 15.4, $J_{H3'A,Ha(CH2CO)}$ = 7.6, 1 H,

$H_{a(CH_2CO)}$, 2.22 (dd, $J_{gem} = 15.4$, $J_{H3'A,Hb(CH_2CO)} = 6.3$, 1 H, $H_{b(CH_2CO)}$), 2.13 (s, 3 H, Me_{Ac}), 2.06 (s, 3 H, Me_{Ac}).

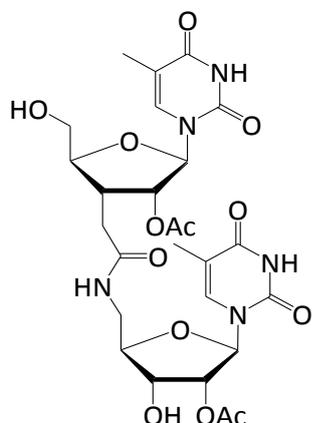
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.84 (CO_{amide}), 170.33 (CO_{Ac(B)}), 170.10 (CO_{Ac(A)}), 163.58 (C_{4B}), 163.21 (C_{4A}), 150.96 (C_{2A}), 150.46 (C_{2B}), 143.75 (C_{6B}), 140.37 (C_{6A}), 137.47 (C_{IV(ar)}), 137.37 (C_{IV(ar)}), 128.69-128.03 (C_{ar}), 102.87 (C_{5B}), 102.48 (C_{5A}), 95.53 (C_{1'B}), 89.10 (C_{1'A}), 83.62 (C_{4'A}), 81.16 (C_{4'B}), 77.36 (C_{2'A}), 76.07 (C_{3'B}), 74.05 (CH₂Ph), 73.86 (CH₂Ph), 73.77 (C_{2'B}), 69.07 (C_{5'A}), 39.67 (C_{5'B}), 37.77 (C_{3'A}), 32.14 (CH₂CO), 20.87 (Me_{Ac(A)}), 20.79 (Me_{Ac(B)}).

MS (ESI⁺): $m/z = 798.3$ Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₃₈H₄₁N₅O₁₃Na = 798.2599 Da, found 798.2582 Da.

$[\alpha]_D^{20}$ = +11.6 (CHCl₃, $c = 0.203$ g/100mL).

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-(2'-O-acetyl-5'-deoxy-5'-acetamido- β -ribothymidinyI)- β -ribothymidine **38**



Chemical Formula: $C_{26}H_{33}N_5O_{13}$
Molecular Weight: $623.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

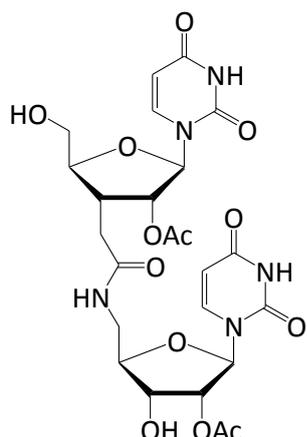
The compound **36** (0.05 mmol, 40 mg) was hydrogenated in the presence of 10% Pd/C (30% weight, 12 mg) in EtOH (5 mL) under hydrogen atmosphere. After stirring at r.t. for 24 h, the mixture was filtered, washed with EtOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (22 mg, 0.035 mmol, 71%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm) = 7.82 (d, $J_{\text{Me(T)},6\text{A}} = 1.1$, 1 H, H_{6A}), 7.47 (d, $J_{\text{Me(T)},6\text{B}} = 1.1$, 1 H, H_{6B}), 5.79 (d, $J_{1'\text{B},2'\text{B}} = 4.9$, 1 H, H_{1'\text{B}}}), 5.77 (d, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 1.9$, 1 H, H_{1'\text{A}}}), 5.37 (dd, $J_{2'\text{A},3'\text{A}} = 6.3$, $J_{1'\text{A},2'\text{A}} = 1.9$, 1 H, H_{2'\text{A}}}), 5.27 (dd, $J_{2'\text{B},3'\text{B}} = 5.9$, $J_{1'\text{B},2'\text{B}} = 4.9$, 0.8 H, H_{2'\text{B(R1)}}), 5.05 (dd, $J_{2'\text{B},3'\text{B}} = 5.9$, $J_{1'\text{B},2'\text{B}} = 4.2$, 0.2 H, H_{2'\text{B(R2)}}), 4.51 (t, $J_{2'\text{B},3'\text{B}} = J_{3'\text{B},4'\text{B}} = 5.9$, 0.2 H, H_{3'\text{B(R2)}}), 4.30 (t, $J_{2'\text{B},3'\text{B}} = J_{3'\text{B},4'\text{B}} = 5.9$, 0.8 H, H_{3'\text{B(R1)}}), 3.97-3.94 (m, 2 H, H_{4'\text{A}}}, H_{4'\text{B}}}), 3.92 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$, $J_{4'\text{A},5'\text{Aa}} = 2.2$, 1 H, H_{5'\text{Aa}}}), 3.71 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$, $J_{4'\text{A},5'\text{Ab}} = 2.9$, 1 H, H_{5'\text{Ab}}}), 3.63-3.57 (m, 1 H, H_{5'\text{Ba}}}), 3.47 (dd, $J_{\text{gem}} = 14.3$, $J_{4'\text{B},5'\text{Bb}} = 3.7$, 1 H, H_{5'\text{Bb}}}), 3.01-2.94 (m, 1 H, H_{3'\text{A}}}), 2.50-2.36 (m, 2 H, CH₂CO), 2.11 (s, 3 H, Me_{Ac}), 2.09 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.88 (brs, 6 H, Me_T).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ (ppm) = 173.67 (CO_{amide}), 171.82 (CO_{Ac(B)}), 171.51 (CO_{Ac(A)}), 166.41 (C_{4B}), 166.23 (C_{4A}), 152.38 (C_{2A}), 152.11 (C_{2B}), 139.46 (C_{6B}), 138.41 (C_{6A}), 111.98 (C_{5B}), 111.46 (C_{5A}), 91.32 (C_{1'\text{A}}), 90.90 (C_{1'\text{B}}), 85.87 (C_{4'\text{A}}), 83.90 (C_{4'\text{B}}), 79.26 (C_{2'\text{A}}), 76.04 (C_{2'\text{B}}), 71.03 (C_{3'\text{B}}), 61.75 (C_{5'\text{A}}), 42.03 (C_{5'\text{B}}), 38.40 (C_{3'\text{A}}), 32.47 (CH₂CO), 20.63 (Me_{Ac}), 20.55 (Me_{Ac}), 12.42 (Me_T), 12.26 (Me_T).

MS (ESI⁺): $m/z = 624.2 \text{ Da}$ [MH]⁺, 646.2 Da [MNa]⁺, 1247.4 Da [2MH]⁺, 1269.4 Da [2MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for $C_{26}H_{34}N_5O_{13} = 624.2147 \text{ Da}$, found 624.2143 Da .

2'-O-acetyl-3'-(2'-O-acetyl-5'-deoxy-5'-acetamido- β -uridyl)- β -uridine 39Chemical Formula: C₂₄H₂₉N₅O₁₃Molecular Weight: 595.5 g.mol⁻¹

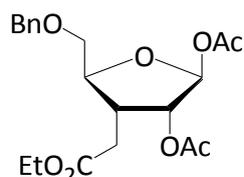
The compound 37 (0.058 mmol, 45 mg) was hydrogenated in the presence of 10% Pd/C (30% weight, 14 mg) in EtOH (5 mL) under hydrogen atmosphere. After stirring at r.t. for 24 h, the mixture was filtered, washed with EtOH and the filtrate was concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound (32 mg, 0.054 mmol, 93%).

¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) = 8.03 (d, $J_{5A,6A}$ = 8.0, 1 H, H_{6A}), 7.66 (d, $J_{5B,6B}$ = 8.1, 1 H, H_{6B}), 5.80 (d, $J_{1'B,2'B}$ = 4.6, 1 H, H_{1'B}), 5.76 (d, $J_{1'A,2'A}$ = 1.5, 1 H, H_{1'A}), 5.72-5.67 (m, 2 H, H_{5B} and H_{5A}), 5.42 (dd, $J_{2'A,3'A}$ = 6.1, $J_{1'A,2'A}$ = 1.5, 1 H, H_{2'A}), 5.28 (dd, $J_{2'B,3'B}$ = 6.0, $J_{1'B,2'B}$ = 4.6, 1 H, H_{2'B}), 4.30 (dd, $J_{2'B,3'B}$ = $J_{3'B,4'B}$ = 6.0, 1 H, H_{3'B}), 3.98-3.92 (m, 3 H, H_{4'A}, H_{4'B} and H_{5'Aa}), 3.70 (dd, J_{gem} = 12.5, $J_{4'A,5'Ab}$ = 2.9, 1 H, H_{5'Ab}), 3.45-3.56 (m, 2 H, H_{5'B}), 2.96-2.90 (m, 1 H, H_{3'A}), 2.44-2.39 (m, 2 H, CH₂CO), 2.11 (s, 6 H, 2xMe_{Ac}).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ (ppm) = 173.65 (CO_{amide}), 171.77 (CO_{Ac(B)}), 171.50 (CO_{Ac(A)}), 166.20 (C_{4B}), 165.97 (C_{4A}), 152.10 (C_{2A}), 151.94 (C_{2B}), 143.89 (C_{6B}), 142.67 (C_{6A}), 103.11 (C_{5B}), 102.50 (C_{5A}), 91.49 (C_{1'A}), 91.12 (C_{1'B}), 86.01 (C_{4'A}), 83.87 (C_{4'B}), 79.24 (C_{2'A}), 76.09 (C_{2'B}), 70.89 (C_{3'B}), 61.58 (C_{5'A}), 41.84 (C_{5'B}), 38.28 (C_{3'A}), 32.22 (CH₂CO), 20.66 (Me_{Ac(A)}), 20.56 (Me_{Ac(B)}).

MS (ESI⁺): m/z = 618.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₄H₂₉N₅O₁₃Na = 618.1654 Da, found 618.1647 Da.

1,2-O-acetyl-3-deoxy-3-C-[(ethoxycarbonyl)methyl]-5-O-benzyl-β-D-ribofuranose 40

Chemical Formula: C₂₀H₂₆O₈
Molecular Weight: 394.4 g.mol⁻¹

To a solution of **11b** (1 eq, 0.42 mmol, 150 mg) in acetic acid (3 mL) was added acetic anhydride (40 eq, 16.8 mmol, 1.6 mL), camphor sulfonic acid (0.1 eq, 0.042 mmol, 10 mg). The mixture was stirred for 20 min at 80 °C but after 20 min another portion of camphor sulfonic acid (0.1 eq, 0.042 mmol, 10 mg) was added. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with DCM (15 mL) and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM) to obtain the desired compound as a single isomer and a white oil (125 mg, 0.31 mmol, 74%).

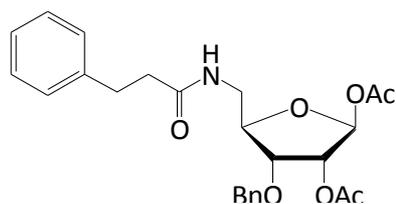
TLC: R_f = 0.20 (eluent: DCM)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.34-7.30 (m, 5 H, H_{ar}), 6.07 (s, 1 H, H₁), 5.29 (d, J_{2,3} = 4, 1 H, H₂), 4.56 (s, 2 H, CH₂Ph), 4.14-4.09 (m, 1 H, H₄), 4.11 (q, ³J = 7.1, 2H, CH₂CH₃), 3.60-3.58 (m, 2 H, H₅), 2.93-2.82 (m, 1 H, H₃), 2.50 (d, J_{3,CH₂CO} = 8.3, 2 H, CH₂CO), 2.09 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.96 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.24 (t, ³J = 7.1, 3 H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.47 (C=O₂Et), 169.92 (CO_{Ac}), 169.52 (CO_{Ac}), 138.12 (C_{IV(ar)}), 128.56 (C_{ar}), 127.80 (C_{ar}), 127.66 (C_{ar}), 98.88 (C₁), 83.44 (C₄), 77.36 (C₂), 73.48 (CH₂Ph), 71.47 (C₅), 61.01 (CH₂CH₃), 38.64 (C₃), 30.74 (CH₂CO₂Et), 21.25 (Me_{Ac}), 20.79 (Me_{Ac}), 14.26 (CH₂CH₃).

MS (Cl⁺): m/z = 412.1 [MNH₄]⁺, 335.0 [MH-AcOH]⁺; (ESI⁺): m/z = 417.2 [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₀H₂₆O₈Na = 417.1520, found 417.1532.

1,2-O-acetyl-3-O-benzyl-5-O-deoxy-5-(3-phenyl-propionamido)- β -D-ribofuranose 41

Chemical Formula: $C_{25}H_{29}N_1O_7$
Molecular Weight: $455.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **50** (1 eq, 0.26 mmol, 90 mg) in toluene (1 mL) was added trimethylphosphine 1M in THF (1.2 eq, 0.31 mmol, 0.31 mL) and the mixture was stirred at r.t. for 2 hours. Hydroxysuccinic acid (1 eq, 0.26 mmol, 39 mg), trimethylphosphine 1M in THF (1.2 eq, 0.31 mmol, 0.31 mL) and diphenyl diselenide (0.2 eq., 0.05 mmol, 16 mg) were added and the mixture was stirred for 16 hours at room temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with Et₂O (10 mL) and washed with water (2x10 mL), a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x10 mL), HCl 1N solution (2x10 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM to DCM / isopropanol: 95/5, v/v) to obtain the desired compound as a single isomer (55 mg, 0.12 mmol, 47%).

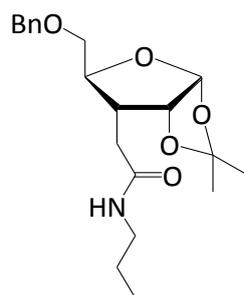
TLC: $R_f = 0.20$ (eluent: DCM / isopropanol: 95/5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.39-7.29 (m, 8 H, H_{ar}), 7.23-7.18 (m, 2 H, H_{ar}), 6.08 (s, 1 H, H₁), 5.24 (d, $J_{2,3} = 4.4$, 1 H, H₂), 4.57 (d, $J_{gem} = 10.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.45 (d, $J_{gem} = 10.9$, 1 H, CHH'Ph), 4.10 (dt, $J_{3,4} = 8.4$, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 4.3$, 1 H, H₄), 3.91 (dd, $J_{3,4} = 8.2$, $J_{2,3} = 4.4$, 1 H, H₃), 3.54-3.50 (m, 2 H, H₅), 3.02-2.91 (m, 2 H, CH₂-CH₂-Ph), 2.48 (dd, $J_{gem} = 8.0$, $^3J = 1.9$, 1 H, CHH'CO), 2.45 (dd, $J_{gem} = 8.0$, $^3J = 2.9$, 1 H, CHH'CO), 2.12 (s, 1 H, Me_{Ac}), 2.05 (s, 1 H, Me_{Ac}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.25 (CO_{amide}), 168.88 (CO_{Ac}), 168.06 (CO_{Ac}), 139.85 (C_{IV(ar)}), 136.23 (C_{IV(ar)}), 127.71-127.13 (C_{ar}), 125.46 (C_{ar}), 97.69 (C₁), 79.83 (C₄), 76.36 (C₃), 72.72 (CH₂(Bn)), 72.60 (C₂), 39.99 (C₅), 37.51 (CH₂CO), 30.67 (CH₂-CH₂Ph), 20.26 (Me_{Ac}), 19.86 (Me_{Ac}).

MS (Cl⁺): $m/z = 473.3 \text{ Da}$ [MNH₄]⁺, 456.3 Da [MH]⁺, 396.2 Da [MH-AcOH]⁺, (ESI⁺): $m/z = 478.2 \text{ Da}$ [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₅H₂₉N₁O₇Na = 478.1836 Da, found 478.1831 Da.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-propylacetamido-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose 42

Chemical Formula: C₂₀H₂₉NO₅
Molecular Weight: 363.4 g.mol⁻¹

To a cooled solution of **12b** (1 eq, 1.86 mmol, 600 mg) in DCM (30 mL) was added TBTU (1.4 eq, 2.6 mmol, 840 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.9 mmol, 126 mg) and triethylamine (1.1 eq, 2 mmol, 285 μ L). The mixture was stirred for 30 min at 5 °C. Then was added propylamine (1.5 eq, 2.8 mmol, 230 μ L) and triethylamine (1.1 eq, 1.24 mmol, 285 μ L), the mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with water (40 mL), extracted with DCM (3x40 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x40 mL) and brine (2x40 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. If necessary, the crude was diluted with toluene and washed with water (3x40 mL) to eliminate urea. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the desired compound as a yellow oil (570 g, 1.578 mmol, 74%).

TLC: R_f = 0.84 (eluent: DCM).

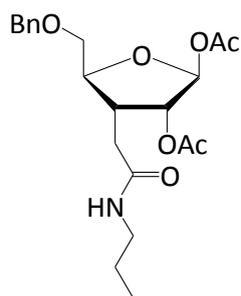
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.33-7.32 (m, 5 H, H_{ar}), 5.83 (d, $J_{1,2}$ = 3.7, 1 H, H₁), 5.71 (brs, 1 H, NH_{amide}), 4.69 (d, $J_{1,2}$ = 3.7, 1 H, H₂), 4.56 (s, 2 H, CH₂Ph), 3.95 (q, $J_{3,4}$ = 8.9, $J_{4,5a}$ = $J_{4,5b}$ = 4.4, 1 H, H₄), 3.64 (dd, J_{gem} = 10.7, $J_{4,5a}$ = 3.5, 1 H, H_{5a}), 3.53 (dd, J_{gem} = 10.7, $J_{4,5b}$ = 4.8, 1 H, H_{5b}), 3.25 (dq, J_{gem} = 18, $J_{Ha(CH_2NH),Ha(CH_2CH_3)}$ = $J_{Ha(CH_2NH),Hb(CH_2CH_3)}$ = $J_{Ha(CH_2NH),NH}$ = $J_{Ha(CH_2NH),NH}$ = 6.6, 1 H, H_{a(CH_2NH)}), 3.14 (dq, J_{gem} = 18, $J_{Hb(CH_2NH),Ha(CH_2CH_3)}$ = $J_{Hb(CH_2NH),Hb(CH_2CH_3)}$ = $J_{Hb(CH_2NH),NH}$ = $J_{Hb(CH_2NH),NH}$ = 6.6, 1 H, H_{b(CH_2NH)}), 2.44-2.37 (m, 2 H, H_{a(CH_2CO)} and H₃), 2.28-2.18 (m, 1 H, H_{b(CH_2CO)}), 1.50 (q, J_{CH_2,CH_3} = 7.4, 2 H, CH₂CH₃), 1.50 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.31 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 0.91 (t, J_{CH_2,CH_3} = 7.4, 3 H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.10 (CO_{amide}), 137.03 (C_{IV(ar)}), 128.91 (C_{ar}), 127.52 (C_{ar}), 126.89 (C_{ar}), 126.80 (C_{ar}), 110.67 (C_{IV(acetamide)}), 104.00 (C₁), 80.31 (C₂), 79.29 (C₄), 72.65

(CH₂Ph), 68.95 (C₅), 41.75 (C₃), 40.35 (NH-CH₂), 31.56 (CH₂CO), 25.83 (Me_{acetone}ide), 25.46 (Me_{acetone}ide), 21.89 (CH₂CH₃), 10.44 (CH₂CH₃).

MS (ESI⁺): m/z = 386.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₀H₂₉N₁O₅Na = 386.1943 Da, found = 386.1945 Da.

1,2-O-acetyl-3-deoxy-3-propylacetamido-5-O-benzyl-β-D-ribofuranose 43

Chemical Formula: $C_{21}H_{29}NO_7$
Molecular Weight: $407.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **42** (1 eq, 0.41 mmol, 150 mg) in acetic acid (3 mL) was added acetic anhydride (40 eq, 16.4 mmol, 1.5 mL), camphor sulfonic acid (0.1 eq, 0.04 mmol, 9 mg). The mixture was stirred for 40 min at 80 °C but after 20 min an other portion of camphor sulfonic acid (0.1 eq, 0.04 mmol, 9 mg) was added. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with DCM (15 mL) and washed with water (2x20 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2x20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ Et_2O , 90/10, v/v) to obtain the desired compound as a single isomer (50 mg, 0.12 mmol, 30%).

TLC: $R_f = 0.27$ (eluent: DCM/ Et_2O , 90/10).

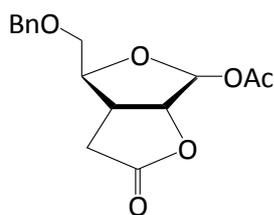
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.34-7.27 (m, 5 H, H_{ar}), 6.07 (s, 1 H, H_1), 5.58 (brs, 1 H, NH), 5.26 (d, $J_{2,3} = 4.7$, 1 H, H_2), 4.56 (s, 2 H, CH_2Ph), 4.12 (dt, $J_{3,4} = 9.5$, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 4.8$, 1 H, H_4), 3.63-3.58 (m, 2 H, H_5), 3.22-3.10 (m, 2 H, CH_2NH), 2.94-2.87 (m, 1 H, H_3), 2.37-2.29 (m, 2 H, CH_2CO), 2.09 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.95 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.47 (q, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.3$, 2 H, CH_2CH_3), 0.89 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.3$, 3 H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.32 (CO_{amide}), 169.98 (CO_{Ac}), 169.49 (CO_{Ac}), 138.15 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.50 (C_{ar}), 127.78 (C_{ar}), 127.72 (C_{ar}), 98.81 (C_1), 83.73 (C_4), 78.05 (C_2), 73.52 (CH_2Ph), 71.88 (C_5), 41.49 (CH_2NH), 39.00 (C_3), 32.70 (CH_2CO), 22.93 (CH_2CH_3), 21.20 (Me_{Ac}), 20.83 (Me_{Ac}), 11.43 (CH_2CH_3).

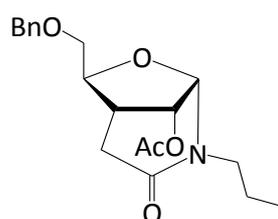
MS (Cl^+): $m/z = 408.2 \text{ Da}$ [MH] $^+$, 348.1 Da [MH-AcOH] $^+$; (MALDI $^+$: DHB): $m/z = 430.2 \text{ Da}$ [MNa] $^+$, 348.2 Da [MH-AcOH] $^+$.

HRMS (MALDI $^+$: DHB, PEG400): calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_1\text{O}_7\text{Na} = 430.1836 \text{ Da}$, found 430.1837 Da .

Attempt to glycosylation of **42** : formation of by-product **44** and **45**



Chemical Formula: $C_{16}H_{18}O_6$
Molecular Weight: $306.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Chemical Formula: $C_{19}H_{25}NO_5$
Molecular Weight: $347.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A solution of **42** (1 eq, 0.72 mmol, 260 mg) in acetic acid / water (4 mL / 1 mL) was stirred for 6 hours at 90 °C and then co-evaporated with pyridine. The crude was diluted with pyridine and acetic anhydride (17 eq, 12.6 mmol, 1.1 mL) was added. The mixture was stirred for 20 hours at room temperature, and then iced water was added. The aqueous layer was extracted with Et_2O (3x10 mL) and the combined organic layers were washed with water (2x15 mL) and HCl 0.2N (15 mL), then dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ Et_2O , 95/5 to 85/5 v/v) to obtain compound **44** as a single isomer (80 mg, 0.26 mmol, 45%) and **45** (52 mg, 0.15 mmol, 26%).

Compound 44 :

TLC: $R_f = 0.82$ (eluent: DCM/ Et_2O , 80/20).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.37-7.30 (m, 5 H, H_{ar}), 5.33 (s, 1 H, H_1), 4.90 (d, $J_{2,3} = 6.3$, 1 H, H_2), 4.56 (s, 2 H, CH_2Ph), 4.24-4.20 (m, 1 H, H_4), 3.63 (dd, $J_{gem} = 9.9$, $J_{4,5a} = 5.2$, 1 H, H_{5a}), 3.50 (dd, $J_{gem} = 9.9$, $J_{4,5b} = 6.7$, 1 H, H_{5b}), 3.16-3.11 (m, 1 H, H_3), 2.84 (dd, $J_{gem} = 18.2$, $J_{\text{Ha}(\text{CH}_2\text{CO})_3} = 9.1$, 1 H, $\text{H}_{a\text{CH}_2\text{CO}}$), 2.52 (dd, $J_{gem} = 18.2$, $J_{\text{Hb}(\text{CH}_2\text{CO})_3} = 2.1$, 1 H, $\text{H}_{b\text{CH}_2\text{CO}}$), 2.00 (s, 3 H, Me_{Ac}).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 174.86 (CO), 169.10 (CO_{Ac}), 137.81 ($\text{C}_{IV(ar)}$), 128.66 (C_{ar}), 128.09 (C_{ar}), 127.79 (C_{ar}), 99.93 (C_1), 87.38 (C_4), 86.90 (C_2), 73.68 (CH_2Ph), 71.95 (C_5), 40.09 (C_3), 34.02 (CH_2CO), 21.18 (Me_{Ac}).

MS (Cl^+): $m/z = 324.1 \text{ Da}$ [MNH_4] $^+$; (Cl^-): $m/z = 340.9 \text{ Da}$ [$\text{M}+\text{Cl}$] $^-$, (MALDI $^+$: DHB): $m/z = 307.2 \text{ Da}$ [MH] $^+$.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG200): calcd for C₁₆H₁₉O₆ = 307.1178 Da, found 307.1176 Da.

Compound 45 :

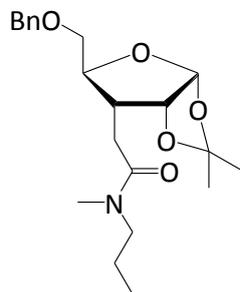
TLC: R_f = 0.57 (eluent: DCM/Et₂O, 80/20).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.25-7.38 (m, 5 H, H_{ar}), 5.17 (dd, J_{1,2} = 4.3, J_{1,3} = 0.7, 1 H, H₁), 5.10 (t, J_{2,3} = 4.8, J_{1,2} = 4.3, 1 H, H₂), 4.58 (d, J_{gem} = 12.1, 1 H, CH₂Ph), 4.52 (d, J_{gem} = 12.1, 1 H, CH₂Ph), 4.12 (t, J_{4,5a} = J_{4,5b} = 4.5, 1 H, H₄), 3.54 (dd, J_{gem} = 10.4, J_{4,5a} = 4.8, 1 H, H_{5a}), 3.50 (dd, J_{gem} = 10.4, J_{4,5b} = 4.3, 1 H, H_{5b}), 3.47-3.43 (m, 1 H, CH₂N), 3.26-3.16 (m, 1 H, CH₂N), 2.81 (dd, J_{gem} = 17.8, J_{Ha(CH₂CO)₃} = 4.5, 1 H, H_{a(CH₂CO)}), 2.70-2.63 (m, 1 H, H₃), 2.39 (dd, J_{gem} = 17.8, J_{Hb(CH₂CO)₃} = 1.5, 1 H, H_{b(CH₂CO)}), 2.07 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.57-1.43 (m, 2 H, CH₂(Pr)), 0.87 (t, J_{CH₂,CH₃} = 7.4, 3 H, Me_{Pr}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.44 (CO_{amide}), 169.09 (CO_{Ac}), 137.84 (C_{IV(ar)}), 128.62 (C_{ar}), 127.97 (C_{ar}), 127.81 (C_{ar}), 85.44 (C₁), 81.82 (C₄), 73.75 (CH₂Ph), 71.30 (C₅), 70.20 (C₂), 47.98 (CH₂N), 36.41 (CH₂CO), 36.14 (C₃), 22.01 (CH₂(Pr)), 20.79 (Me_{Ac}), 11.26 (Me_{Pr}).

MS (Cl⁺): m/z = 348.1 Da [MH]⁺ ; (Cl⁻): m/z = 382.1 Da [M+Cl]⁻ , (MALDI⁺: DHB): m/z = 348.2 Da [MH]⁺ , 370.2 [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG200): calcd for C₁₉H₂₆N₁O₅ = 348.1805 Da, found 348.1802 Da.

1,2-O-isopropylidene-3-deoxy-3-propyl-N-methyl-acetamido-5-O-benzyl- α -D-ribofuranose**46**

Chemical Formula: $C_{21}H_{31}NO_5$
 Molecular Weight: $377.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a cooled solution of **8b** (1 eq, 1.55 mmol, 500 mg) in DCM (30 mL) was added TBTU (1.4 eq, 2.17 mmol, 600 mg), HOBT. H_2O (0.5 eq, 0.78 mmol, 90 mg) and triethylamine (1.1 eq, 1.7 mmol, 200 μL). The mixture was stirred for 30 min about 5 °C. Then was added methylpropylamine (1.5 eq, 2.32 mmol, 210 μL) and triethylamine (1.1 eq, 1.7 mmol, 200 μL), the mixture was stirred at r.t. overnight. The reaction was quenched with water (30 mL), extracted with DCM (3x30 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2x40 mL) and brine (2x30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ Et_2O , 99/1, v/v) to obtain the desired compound as a white oil (375 mg, 1 mmol, 65%).

TLC: $R_f = 0.34$ (eluent: DCM/ Et_2O , 90/10).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) of two rotamers in ratio 1/1: δ (ppm) = 7.37-7.29 (m, 5 H, H_{ar}), 5.82 (d, $J_{1,2} = 3.8$, 0.5 H, H_1), 5.81 (d, $J_{1,2} = 3.8$, 0.5 H, H_1), 4.83 (t, $J_{1,2} = J_{2,3} = 4.2$, 1 H, H_2), 4.56-4.55 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.02-3.96 (m, 1 H, H_4), 3.65-3.56 (m, 2 H, H_5), 3.41-3.16 (m, 2 H, CH_2NMe), 2.92 (s, 1.5 H, NMe), 2.90 (s, 1.5 H, NMe), 2.70-2.59 (m, 2 H, $\text{H}_{\text{a}(\text{CH}_2\text{CO})}$, H_3), 2.34 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.9$, $J_{\text{CH}_2,\text{H}_3} = 3.5$, 0.5 H, $\text{H}_{\text{b}(\text{CH}_2\text{CO})}$), 2.29 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.9$, $J_{\text{CH}_2,\text{H}_3} = 3.5$, 0.5 H, $\text{H}_{\text{b}(\text{CH}_2\text{CO})}$), 1.60-1.49 (m, 2 H, CH_2CH_3), 1.48 (s, 1.5 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.47 (s, 1.5 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 1.29 (s, 3 H, $\text{Me}_{\text{acetamide}}$), 0.88 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$, 1.5 H, CH_2CH_3), 0.87 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.4$, 1.5 H, CH_2CH_3).

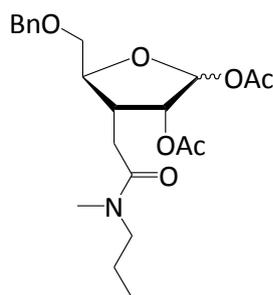
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.99 (CO_{amide}), 170.98 (CO_{amide}), 138.25 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{ar})}$), 138.18 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{ar})}$), 128.66-127.09 (C_{ar}), 111.44 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{acetamide})}$), 111.41 ($\text{C}_{\text{IV}(\text{acetamide})}$), 105.15 (C_1), 105.11 (C_1), 81.48 (C_2), 79.98 (C_4), 79.86 (C_4), 73.69 (CH_2Ph), 73.63 (CH_2Ph), 70.69 (C_5), 70.49

(C₅), 51.56 (CH₂NMe), 49.59 (CH₂NMe), 42.90 (C₃), 42.66 (C₃), 35.38 (CH₂CO), 33.53 (CH₂CO), 28.98 (NMe), 28.48 (NMe), 26.88 (Me_{acetone}), 26.86 (Me_{acetone}), 26.48 (Me_{acetone}), 26.46 (Me_{acetone}), 21.54 (CH₂CH₃), 20.66 (CH₂CH₃), 11.34 (CH₂CH₃), 11.20 (CH₂CH₃).

MS (ESI⁺): m/z = 400.2 Da [MNa]⁺, 777.4 Da [2MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₁H₃₁N₁O₅Na = 400.2094 Da, found = 400.2103 Da.

[α]_D²⁰ = +13.6 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-O-acetyl-3-deoxy-3-propyl-N-methyl-acetamido-5-O-benzyl-D-ribofuranose 47

Chemical Formula: $C_{22}H_{31}NO_7$
Molecular Weight: $421.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of **46** (1 eq, 0.45 mmol, 170 mg) in acetic acid (3 mL) was added acetic anhydride (40 eq, 18 mmol, 1.7 mL), camphor sulfonic acid (0.02 eq, 0.009 mmol, 2 mg). The mixture was stirred for 1h30 min at 80 °C, then three portions of camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.02 mmol, 5 mg each portion) were added each hour. After stirring during 4 h, the mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with DCM (15 mL) and washed with water (2x20 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (2x20 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ Et_2O , 95/5, v/v) to obtain the desired compound (82 mg, 0.19 mmol, 75% from 0.26 mmol remaining in the mixture after GC samples).

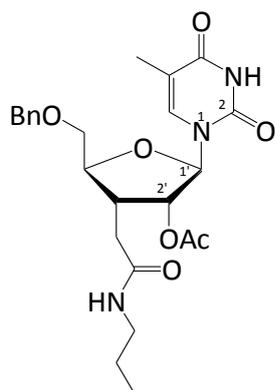
TLC: $R_f = 0.46$ (eluent: DCM/ Et_2O , 80/20).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) of two anomers in ratio 0.15/0.85: δ (ppm) = 7.35-7.31 (m, 5 H, H_{ar}), 6.42 (dd, $J_{1,2} = 4.3$, $J_{1,3} = 1.0$, 0.15 H, $\text{H}_{1\alpha}$), 6.09 (s, 0.85 H, $\text{H}_{1\beta}$), 5.41 (dd, $J_{2,3} = 8.4$, $J_{1,2} = 4.4$, 0.15 H, $\text{H}_{2\alpha}$), 5.33 (d, $J_{2,3} = 4.7$, 0.85 H, $\text{H}_{2\beta}$), 4.58-4.57 (m, 0.3 H, $\text{CH}_2\text{Ph}_\alpha$), 4.56-4.54 (m, 1.7 H, $\text{CH}_2\text{Ph}_\beta$), 4.23-4.20 (m, 0.15 H, $\text{H}_{4\alpha}$), 4.19-4.12 (m, 0.85 H, $\text{H}_{4\beta}$), 3.66-3.58 (m, 2 H, H_5), 3.32-3.15 (m, 2 H, CH_2NMe), 3.00-2.94 (m, 1 H, H_3), 2.57-2.46 (m, 2 H, CH_2CO), 2.09 (s, 0.9 H, $\text{Me}_{\text{Ac}\alpha}$), 2.08 (s, 2.1 H, $\text{Me}_{\text{Ac}\beta}$), 2.07 (s, 0.9 H, $\text{Me}_{\text{Ac}\beta}$), 2.06 (s, 2.1 H, $\text{Me}_{\text{Ac}\alpha}$), 1.57-1.47 (m, 2 H, CH_2CH_3), 0.90-0.84 (m, 3 H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 170.20 (CO_{amide}), 169.20 (CO_{Ac}), 169.61 (CO_{Ac}), 138.18 ($\text{C}_{\text{IV(ar)}}$), 128.49-127.74 (C_{ar}), 98.68 (C_1), 83.43 ($\text{C}_{4\beta}$), 83.21 ($\text{C}_{4\alpha}$), 78.06 ($\text{C}_{2\beta}$), 77.36 ($\text{C}_{2\alpha}$), 73.49 (CH_2Ph), 72.35 (C_5), 72.28 (C_5), 51.44 (CH_2NMe), 49.64 (CH_2NMe), 39.25 (C_3), 39.00 (C_3), 29.53 (CH_2CO), 28.91 (CH_2CO), 21.63 (CH_2CH_3), 21.28 (NMe), 20.91 (Me_{Ac}), 20.58 (CH_2CH_3), 11.33 (CH_2CH_3), 11.21 (CH_2CH_3).

MS (Cl⁺): m/z = 422.3 [MNH₃]⁺, 462.2 [MNH₃-AcOH]⁺ ; (ESI⁺): m/z = 444.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₂₂H₃₁N₁O₇Na = 444.1998 Da, found = 444.2002 Da.

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-propylacetamido-5'-O-benzyl- β -D-ribothymidine 48

Chemical Formula: $C_{24}H_{31}N_3O_7$
Molecular Weight: $473.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of thymine (1.5 eq, 0.51 mmol, 65 mg) in freshly distilled acetonitrile (4 mL) were added 43 (1 eq, 0.34 mmol, 140 mg) then BSA (6 eq, 2.04 mmol, 0.5 mL). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (2 eq, 0.68 mmol, 125 μ L). The reaction was stirring for 2 h at reflux then diluted with DCM (10 mL) and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2x15 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/ Et_2O , 8/2 to 6/4, v/v) to obtain the desired compound (160 mg, 0.33 mmol, 97%).

TLC: $R_f = 0.10$ (eluent: DCM/ Et_2O , 60/40).

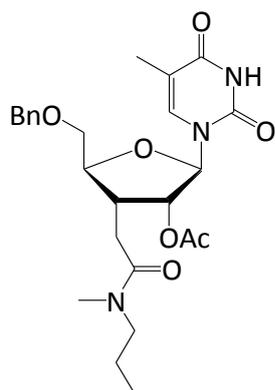
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.35 (s, 1 H, NH_T), 7.59 (d, $J_{6-\text{Me}(T)} = 1.2$, 1 H, H_6), 7.36-7.30 (m, 5 H, H_{ar}), 5.94 (d, $J_{1',2'} = 3.1$, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 5.64 (brs, 1 H, NH_{amide}), 5.47 (dd, $J_{2',3'} = 6.1$, $J_{1',2'} = 1.2$, 1 H, $\text{H}_{2'}$), 4.64 (d, $J_{\text{gem}} = 11.5$, 1 H, CH_2Ph), 4.59 (d, $J_{\text{gem}} = 11.5$, 1 H, CH_2Ph), 4.12 (dt, $J_{3',4'} = 7.8$, $J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = 2.4$, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.90 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.9$, $J_{4'5'a} = 2.3$, 1 H, $\text{H}_{5'a}$), 3.66 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.9$, $J_{4',5'b} = 2.6$, 1 H, $\text{H}_{5'b}$), 3.22-3.16 (m, 2 H, NHCH_2), 3.12-3.05 (m, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 2.39 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.1$, $J_{\text{CH}_2,\text{H}_{3'}} = 7.2$, 1 H, $\text{CHH}'\text{CO}$), 2.24 (dd, $J_{\text{gem}} = 15.1$, $J_{\text{CH}_2,\text{H}_{3'}} = 7.2$, 1 H, $\text{CHH}'\text{CO}$), 2.11 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.57 (d, $J_{6,\text{Me}(T)} = 1.2$, 3 H, Me_T), 1.51 (q, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.3$, 2 H, CH_2CH_3), 0.91 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7.3$, 3 H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 169.99 (CO_{amide}), 169.73 (CO_{Ac}), 163.56 (C_4), 150.31 (C_2), 137.60 ($\text{C}_{\text{IV}(ar)}$), 135.88 (C_6), 128.78 (C_{ar}), 128.21 (C_{ar}), 127.95 (C_{ar}), 111.14 (C_5), 88.63 ($\text{C}_{1'}$),

83.51 (C_{4'}), 77.60 (C_{2'}), 73.91 (CH₂Ph), 69.69 (C_{5'}), 41.63 (NH-CH₂), 38.09 (C_{3'}), 33.03 (CH₂CO), 22.97 (CH₂CH₃), 20.83 (Me_{Ac}), 12.17 (Me_T), 11.49 (CH₂CH₃).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 496.2 Da [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG400): calcd for C₂₄H₃₁N₃O₇Na = 496.2054 Da, found 496.2042 Da.

2'-O-acetyl-3'-deoxy-3'-propyl-N-methyl-acetamido-5'-O-benzyl-β-D-ribothymidine 49

Chemical Formula: C₂₅H₃₃N₃O₇
Molecular Weight: 487.5 g.mol⁻¹

To a solution of thymine (1.5 eq, 0.63 mmol, 80 mg) in freshly distilled acetonitrile (5 mL) were added **47** (1 eq, 0.42 mmol, 180 mg) then BSA (6 eq, 2.52 mmol, 0.6 mL). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (2 eq, 0.84 mmol, 150 μL). The reaction was stirring for 2 h at reflux then diluted with DCM (10 mL) and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2x15 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2x15 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM/Et₂O, 9/1 to 7/3, v/v) to obtain the desired compound as a sticky oil (155 mg, 0.32 mmol, 76%).

TLC: R_f = 0.33 (eluent: DCM/Et₂O, 70/30).

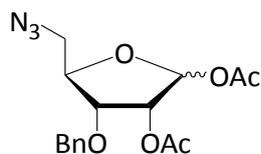
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) of two rotamers in ratio 1/1: δ (ppm) = 8.60 (brs, 1 H, NH_T), 7.58 (d, *J*_{6,Me(T)} = 1.1, 0.5 H, H₆), 7.56 (d, *J*_{6,Me(T)} = 1.1, 0.5 H, H₆), 7.35-7.29 (m, 5H, H_{ar}), 6.02 (d, *J*_{1',2'} = 3.9, 0.5 H, H_{1'}), 6.00 (d, *J*_{1',2'} = 3.9, 0.5 H, H_{1'}), 5.53-5.49 (m, 2 H, H_{2'} and NH_{amide}), 4.62-4.58 (m, 2 H, CH₂Ph), 4.13-4.19 (m, 1 H, H_{4'}), 3.89-3.85 (m, 1 H, H_{5'a}), 3.72-3.67 (m, 1 H, H_{5'b}), 3.35-3.21 (m, 2 H, CH₂-NMe), 3.17-3.10 (m, 1 H, H_{3'}), 2.96 (s, 1.5 H, NMe), 2.90 (s, 1.5 H, NMe), 2.61-2.31 (m, 2 H, CH₂CO), 2.09 (s, 1.5 H, Me_{Ac}), 2.08 (s, 1.5 H, Me_{Ac}), 1.59 (d, *J*_{6,Me(T)} = 1.1, 1.5 H, Me_T), 1.58 (d, *J*_{6,Me(T)} = 1.1, 1.5 H, Me_T), 1.52 (q, *J*_{CH₂,CH₃} = 7.4, 2 H, CH₂CH₃), 0.92 (t, *J*_{CH₂,CH₃} = 7.4, 1.5 H, CH₂CH₃), 0.87 (t, *J*_{CH₂,CH₃} = 7.4, 1.5 H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.54 (CO), 168.38 (CO_{Ac}), 167.75 (CO_{Ac}), 162.89 (C₄), 149.10 (C₂), 136.43 (C_{IV(ar)}), 134.41 (C₆), 127.08 (C_{ar}), 126.42 (C_{ar}), 126.32 (C_{ar}), 108.78 (C₅), 87.25 (C_{1'}), 81.42 (C_{4'}), 81.30 (C_{4'}), 76.05 (C_{2'}), 75.98 (C_{2'}), 71.84 (CH₂Ph), 67.90 (C_{5'}), 49.58

(CH₂-NMe), 47.84 (CH₂-NMe), 36.24 (C_{3'}), 36.11 (C_{3'}), 27.92 (CH₂CO), 27.42 (CH₂CO), 19.93 (CH₂CH₃), 19.80 (CH₂CH₃), 19.27 (NMe), 18.93 (Me_{Ac}), 10.72 (Me_T), 9.89 (CH₂CH₃), 9.69 (CH₂CH₃).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 488.2 [MH]⁺, 510.2 [MNa]⁺ ; (Cl⁺): m/z = 488.3 [MH]⁺, 505.3 [MNH₃]⁺, 362.2 [MH-thymine]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG400): calcd for C₂₅H₃₃N₃O₇Na = 510.2211, found 510.2214.

1,2-O-acetyl-3-O-benzyl-5-deoxy-5-azido-D-ribofuranose 50

Chemical Formula: C₁₆H₁₉N₃O₆
Molecular Weight: 349.3 g.mol⁻¹

To a solution of **32** (1 eq, 2.95 mmol, 900 mg) in acetic acid (33 mL) was added acetic anhydride (40 eq, 118 mmol, 11 mL), camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.15 mmol, 34 mg). The mixture was stirred for 2 h at 80 °C but after one hour another portion of camphor sulfonic acid (0.05 eq, 0.15 mmol, 34 mg) was added. The mixture was diluted with DCM (40 mL) and washed with water (2x50 mL) and a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (5x50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was co-evaporated three times with toluene to obtain the desired compound (900 mg, 2.58 mmol, 87%).

TLC: R_f = 0.37 (eluent: DCM/PE, 70/30).

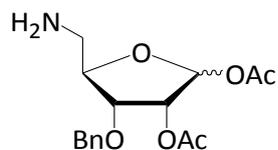
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) of two anomers α/β in ratio 0.15/0.85: δ (ppm) = 7.36-7.28 (m, 5 H, H_{ar}), 6.39 (d, J_{1,2} = 4.5, 0.15 H, H_{1α}), 6.14 (s, 0.85 H, H_{1β}), 5.32 (d, J_{1,2} = 4.2, 0.85 H, H_{2β}), 5.15 (dd, J_{2,3} = 6.5, J_{1,2} = 4.5, 0.15 H, H_{2α}), 4.63 (d, J_{gem} = 11.3, 1 H, CH₂Ph), 4.46 (d, J_{gem} = 11.3, 1 H, CH₂Ph), 4.29-4.26 (m, 0.15 H, H_{4α}), 4.27 (dd, J_{3,4} = 8.1, J_{2,3} = 4.2, 0.85 H, H_{3β}), 4.21 (dt, J_{3,4} = 8.1, J_{4,5a} = J_{4,5b} = 3.2, 0.85 H, H_{4β}), 4.02 (dd, J_{2,3} = 6.5, J_{3,4} = 5.0, 0.15 H, H_{3α}), 3.63 (dd, J_{gem} = 13.7, J_{4,5a} = 3.0, 0.85 H, H_{5aβ}), 3.44 (dd, J_{gem} = 13.3, J_{4,5a} = 3.6, 0.15 H, H_{5aα}), 3.15 (dd, J_{gem} = 13.7, J_{4,5b} = 3.5, 0.85 H, H_{5bβ}), 3.12 (dd, J_{gem} = 13.3, J_{4,5b} = 4.2, 0.15 H, H_{5bα}), 2.13 (s, 2.55 H, Me_{Acβ}), 2.11 (s, 0.45 H, Me_{Acα}), 2.09 (s, 2.55 H, Me_{Acβ}), 2.07 (s, 0.45 H, Me_{Acα}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.20 (C_{Acα}), 170.00 (C_{Acα}), 169.84 (C_{Acβ}), 169.14 (C_{Acβ}), 137.18 (C_{IV(ar)}), 128.65-128.08 (C_{ar}), 98.39 (C_{1β}), 94.64 (C_{1α}), 81.47 (C_{4α}), 80.85 (C_{4β}), 76.56 (C_{3β}), 75.76 (C_{3α}), 73.55 (C_{2β}), 73.52 (CH₂Ph), 71.00 (C_{2α}), 51.10 (C_{5β}), 51.60 (C_{5α}), 21.11 (Me_{Acβ}), 20.99 (Me_{Acα}), 20.78 (Me_{Acβ}), 20.62 (Me_{Acα}).

MS (ESI⁺): m/z = 372.1 [MNa]⁺, 290.1 [MH-AcOH]⁺, 721.2 [2MNa]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₁₆H₁₉N₃O₆Na = 372.1166, found 372.1179.

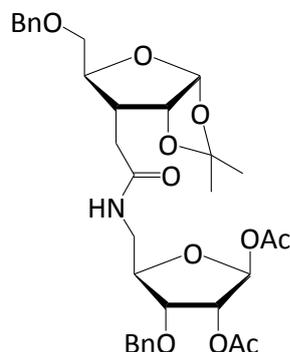
1,2-O-acetyl-3-O-benzyl-5-deoxy-5-amino-D-ribofuranose 51



Chemical Formula: $C_{16}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: $323.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

The compound **50** (0.43 mmol, 150 mg) was hydrogenated in the presence of 10% Pd/C (5% weight, 8 mg) in THF (8 mL) under hydrogen atmosphere. After stirring at r.t. for 3 h, the TLC analysis (DCM) showed disappearance of the starting material. The mixture was filtered, washed with DCM and the filtrate was concentrated under reduced pressure (bath temperature at 20 °C) to reduce it to half. This solution will be engaged directly in coupling reaction.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(1,2-*O*-acetyl-3-*O*-benzyl-5-deoxy-5-acetamido- β -riboseyl)-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose 52



Chemical Formula: C₃₃H₄₁NO₁₁
Molecular Weight: 627.7 g.mol⁻¹

The acid 12b (1.3 eq., 0.74 mmol, 239 mg) and HOBt.H₂O (1.3 eq., 0.74 mmol, 100 mg) were co-evaporated with toluene and then diluted with THF (7 mL), cooled down to 0 °C under N₂ for 10 min. DIC (1.25 eq., 0.7 mmol, 88 mg) was added and the mixture was stirred at the same temperature for 15 min and then 10 min at room temperature. Trimethylphosphine 1M in THF (2 eq., 1.14 mmol, 1.14 mL) was added to the azide 50 (1 eq, 0.57 mmol, 200 mg) in THF (7 mL) and stirred at room temperature for 5 min. The acid mixture was added to the iminophosphorane solution and stirred for 4 hours at room temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure, diluted with toluene (20 mL) and washed with water (2x20 mL) to eliminate urea. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM / isopropanol: 99.5/0.5 to 95/5, v/v) to obtain the desired compound as a single isomer (225 mg, 0.36 mmol, 65%).

TLC: R_f = 0.40 (eluent: DCM/isopropanol, 96/4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.28 (m, 10 H, H_{ar}), 6.11 (s, 1 H, H_{1B}), 5.86-5.82 (m, 1 H, NH_{amide}), 5.81 (d, $J = 3.9$, 1 H, H_{1A}), 5.27 (d, $J_{2B,3B} = 4.4$, 1 H, H_{2B}), 4.69 (t, $J = 3.7$, 1 H, H_{2A}), 4.59 (d, $J_{gem} = 11.1$, 1H, CH₂Ph_A), 4.58-4.56 (m, 2 H, CH₂Ph_B), 4.46 (d, $J_{gem} = 11.1$, 1H, CH₂Ph_{Ab}), 4.15-4.10 (m, 1 H, H_{4B}), 4.01 (d, $J_{2B,3B} = 4.4$, 1 H, H_{3B}), 3.95-3.91 (m, 1 H, H_{4A}), 3.65-3.41 (m, 4 H, H_{5A} and H_{5B}), 2.45-2.37 (m, 2 H, H_{3A} and CHH'CO), 2.31-2.24 (m, 1 H, CHH'CO), 2.12 (s, 3 H, Me_{Ac}), 2.08 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.49 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.31 (s, 3 H, Me_{acetamide}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.20 (CO_{amide}), 169.07 (CO_{Ac}), 168.05 (CO_{Ac}), 138.00 (C_{IV(ar)}), 137.16 (C_{IV(ar)}), 129.19-127.91 (C_{ar}), 111.64 (C_{IV(acetamide)}), 105.09 (C_{1A}), 98.70 (C_{1B}),

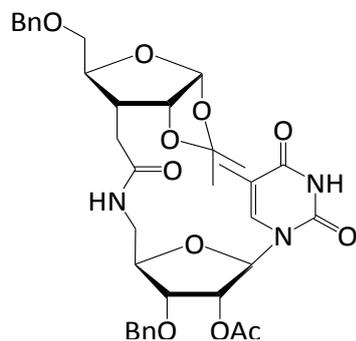
Experimental part

81.27 (C_{2A}), 80.92 (C_{4B}), 80.07 (C_{4A}), 78.81 (C_{3B}), 73.66 (C_{2B}, C_{H2}Ph), 69.96 (C_{5A}), 42.45 (C_{3A}), 41.53 (C_{5B}), 32.09 (C_{H2}CO), 26.87 (Me_{acetone}), 26.49 (Me_{acetone}), 21.21 (Me_{Ac}), 20.81 (Me_{Ac}).

MS (Cl⁺): m/z = 628.4 Da [MH]⁺, 570.3 Da [MH-acetone]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG600): calcd for C₃₃H₄₁N₁O₁₁Na = 650.2572 Da, found 650.2577 Da.

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(2'-*O*-acetyl-3'-*O*-benzyl-5'-deoxy-5'-acetamido- β -ribothymidinyl)-5-*O*-benzyl- α -D-ribofuranose 53



Chemical Formula: $C_{36}H_{43}N_3O_{11}$
Molecular Weight: $693.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of thymine (3 eq, 0.45 mmol, 56 mg) in freshly distilled acetonitrile (4 mL) were added 52 (1 eq, 0.13 mmol, 80 mg) under argon then BSA (12 eq, 1.8 mmol, 440 μ L). The mixture was stirred for one hour at 60 °C, then cooled to 5 °C before adding TMSOTf (4 eq, 0.6 mmol, 108 μ L). The reaction was stirring for 2 h at reflux then diluted with DCM (10 mL) and cooled to 5 °C before adding a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (10 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (2x15 mL) and the combined organic layers were washed with water (to eliminate thymine) and brine (2x15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was diluted with methanol and filtered, concentrated, diluted with ether and then concentrated under reduced pressure. The desired compound was obtain without other purification (83 mg, 0.12 mmol, 91%).

TLC: $R_f = 0.35$ (eluent: DCM/isopropanol, 95/5).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.54 (brs, 1 H, NH_T), 7.35-7.30 (m, 10 H, H_{ar}), 6.97 (d, $J_{6B,Me(T)} = 1.1$, 1 H, H_{6B}), 6.23 (t, 1 H, NH_{amide}), 5.82 (d, $J_{1A,2A} = 3.7$, 1 H, H_{1A}), 5.46 (dd, $J_{2'B,3'B} = 6.2$, $J_{2'B,1'B} = 3.5$, 1 H, $\text{H}_{2'B}$), 5.40 (d, $J_{1'B,2'B} = 3.5$, 1 H, $\text{H}_{1'B}$), 4.75 (t, $J_{2A,1A} = J_{2A,3A} = 4.0$, 1 H, H_{2A}), 4.57 (AB syst. strong "roof" effect, $J_{gem} = 12.1$, 2 H, CH_2Ph), 4.53 (AB syst. strong "roof" effect, $J_{gem} = 11.1$, 2 H, CH_2Ph), 4.26 (t, $J_{3'B,2'B} = J_{3'B,4'B} = 6.7$, 1 H, $\text{H}_{3'B}$), 4.10-4.06 (m, 1 H, $\text{H}_{4'B}$), 3.98-3.94 (m, 1 H, H_{4A}), 3.69-3.65 (m, 1 H, $\text{H}_{5'Ba}$), 3.64-3.62 (m, 1 H, H_{5Aa}), 3.56 (dd, $J_{gem} = 10.9$, $J_{5Ab,4A} = 4.7$, 1 H, H_{5Ab}), 3.51-3.45 (m, 1 H, $\text{H}_{5'Bb}$), 2.51 (dd, $J_{gem} = 14.3$, $J_{\text{Ha}(\text{CH}_2\text{CO}),3A} = 9.9$, 1 H, $\text{H}_{a(\text{CH}_2\text{CO})}$), 2.46-2.39 (m, 1 H, H_{3A}), 2.26 (dd, $J_{gem} = 14.3$, $J_{3A,\text{Hb}(\text{CH}_2\text{CO})} = 3.9$, 1 H, $\text{H}_{b(\text{CH}_2\text{CO})}$), 2.10 (s, 3 H, Me_{Ac}), 1.92 (d, $J_{\text{Me}(T),6B} = 1.1$, 3 H, Me_T), 1.50 (s, 3 H, $\text{Me}_{acetone}$), 1.30 (s, 3 H, $\text{Me}_{acetone}$).

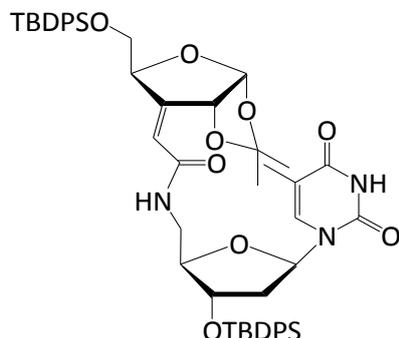
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.70 (CO_{amide}), 169.24 (CO_{Ac}), 162.42 (C_{4B}), 149.10 (C_{2B}), 137.62 (C_{6B}), 137.16 (C_{IV(ar)}), 136.31 (C_{IV(ar)}), 127.72-126.82 (C_{ar}), 110.70 (C_{IV(acetone)}), 110.56 (C_{5B}), 104.13 (C_{1A}), 92.89 (C_{1'B}), 80.42 (C_{2A}), 80.29 (C_{4'B}), 79.33 (C_{4A}), 75.46 (C_{3'B}), 72.98 (C_{H2Ph}), 72.81 (C_{2'B}), 72.69 (C_{H2Ph}), 68.94 (C_{5A}), 41.36 (C_{3A}), 39.34 (C_{5'B}), 30.90 (C_{H2CO}), 25.90 (Me_{acetone}), 25.59 (Me_{acetone}), 19.85 (Me_{Ac}), 11.48 (Me_T).

MS (ESI⁺): m/z = 694.3 Da [MH]⁺, 636.3 Da [MH-acetone]⁺.

HRMS (ESI⁺): calcd for C₃₆H₄₄N₃O₁₁ = 694.2976 Da, found = 694.2967 Da.

[α]_D²⁰ = +11.3 (CHCl₃, c = 1 g/100mL).

1,2-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-(2'-deoxy-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl)-5'-deoxy-5'-ethylene-amido-thymidinyl)-5-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α -D-ribofuranose 54



Chemical Formula: C₅₂H₆₃N₃O₉Si₂
Molecular Weight: 930.2 g.mol⁻¹

To a solution of **14** (1 eq, 0.53 mmol, 250 mg) in acetonitrile (3 mL) was added TBTU (1.1 eq, 0.58 mmol, 187 mg), HOBT.H₂O (0.5 eq, 0.26 mmol, 36 mg), **3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-5'-deoxyamino-thymidine 4** (1.1 eq, 0.59 mmol, 284 mg) and triethylamine (2.4 eq, 1.28 mmol, 177 μ L). The mixture was stirred at r.t. for 48 h. The reaction was quenched with water (20 mL), extracted with DCM (3x20 mL) and the combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2x20 mL) and brine (2x20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (eluent: DCM to DCM/MeOH, 99/1, v/v) to obtain the desired compound as a colorless oil (300 mg, 0.32 mmol, 61%).

TLC: R_f = 0.2 (eluent: DCM).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.10 (s, 1 H, NH_T), 7.65-7.59 (m, 8 H, H_{ar}), 7.45-7.36 (m, 12 H, H_{ar}), 7.11 (d, $J_{Me(T),6B} = 1.1$, 1 H, H_{6B}), 6.84 (t, $J_{NH,5'Ba} = J_{NH,5'Bb} = 5.4$, 1 H, NH_{amide}), 6.22 (dd, $J_{1'B,2'Ba} = 8.3$, $J_{1'B,2'Bb} = 5.7$, 1 H, H_{1'B}), 5.96 (d, $J_{1A,2A} = 4.2$, 1 H, H_{1A}), 5.85 (t, $J_{CH,3A} = J_{CH,4A} = 1.5$, 1 H, C=CH), 5.44 (d, $J_{1A,2A} = 4.2$, 1 H, H_{2A}), 4.85 (dd, $J_{4A,5Aa} = 3.7$, $J_{4A,5Ab} = 3.3$, 1 H, H_{4A}), 4.23 (ddd, $J_{3'B,2'Ba} = 6$, $J_{3'B,4'B} = 2.6$, $J_{3'B,2'Bb} = 2.4$, 1 H, H_{3'B}), 4.03 (ddd, $J_{4'B,5'Ba} = 7$, $J_{4'B,5'Bb} = 4.3$, $J_{4'B,3'B} = 2.6$, 1 H, H_{4'B}), 3.84 (dd, $J_{5Aa,5Ab} = 10.8$, $J_{4A,5Aa} = 3.7$, 1 H, H_{5Aa}), 3.66 (dd, $J_{5Aa,5Ab} = 10.8$, $J_{4A,5Ab} = 3.3$, 1 H, H_{5Ab}), 3.28-3.20 (m, 2 H, H_{5'B}), 2.28 (ddd, $J_{2'Bb,2'Ba} = 13.6$, $J_{2'Bb,1'B} = 5.7$, $J_{2'Bb,3'B} = 2.4$, 1 H, H_{2'Bb}), 1.97 (ddd, $J_{2'Bb,2'Ba} = 13.6$, $J_{2'Ba,1'B} = 8.3$, $J_{2'Ba,3'B} = 6$, 1 H, H_{2'Ba}), 1.87 (d, $J_{Me(T),6B} = 1.1$, 3 H, Me_T), 1.48 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.37 (s, 3 H, Me_{acetamide}), 1.08 (s, 9 H, Me_{tBu(A)}}), 0.99 (s, 9 H, Me_{tBu(B)}}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.20 (CO_{amide}), 163.29 (C_{4B}), 150.12 (C_{2B}), 149.94 (C_{3A}), 136.36 (C_{6B}), 135.81 (C_{ar(o)}), 135.67 (C_{ar(o)}), 133.00 (C_{IV}), 130.35 (C_{ar(m)}), 130.04 (C_{ar(m)}), 127.96 (C_{ar(p)}), 120.85 (C=CH), 113.09 (C_{IV(acetone)}), 111.43 (C_{5B}), 105.80 (C_{1A}), 87.00 (C_{1'B}), 86.06 (C_{4'B}), 81.69 (C_{4A}), 79.12 (C_{2A}), 74.33 (C_{3'B}), 66.51 (C_{5A}), 41.55 (C_{5'B}), 39.72 (C_{2A}), 27.75 (Me_{acetone}), 27.35 (Me_{acetone}), 26.98 (tBu_A), 26.87 (tBu_B), 19.22 (C_{IV(tBu)}), 19.16 (C_{IV(tBu)}), 12.51 (Me_T).

MS (MALDI⁺: DHB): m/z = 952.3 [MNa]⁺.

HRMS (MALDI⁺: DHB, PEG1000): calcd for C₅₂H₆₃N₃O₉Si₂Na = 952.3995, found 952.3989.

Résumé

Les nucléosides existent à l'état naturel, ce sont les éléments constitutifs des acides nucléiques (ARN et ADN). Ils représentent aussi une famille de molécules synthétiques ayant des applications en thérapie génique dans les stratégies antisens et ARN interférents. Des modifications chimiques sont indispensables pour garantir une résistance vis-à-vis des nucléases et diminuer leur caractère ionique, tout en maintenant leur affinité et leur spécificité pour l'ARN messager cible.

Différentes modifications ont été envisagées dans la littérature dont la modification du lien internucléosidique, et notamment le remplacement du lien phosphodiester par un lien amide qui s'impose comme une modification de choix mimant parfaitement le lien phosphodiester. Différentes approches synthétiques ont été étudiées dans la littérature à partir soit de nucléosides soit de dérivés ribosiques mais le couplage peptidique créant ce lien amide a toujours lieu entre deux unités nucléosidiques. Nous présentons ici une stratégie de synthèse innovante et efficace à partir d'un précurseur peu onéreux le D-xylose. Notre stratégie passe par des squelettes de type dimères ribosidiques avec un lien amide qui, judicieusement protégés, permettent d'accéder par simple glycosylation soit à des homodimères ribonucléosidiques soit à des hétérodimères ribonucléosidiques.

Mots clés : D-xylose, glycosylation, lien amide, dimères ribonucléosidiques, antisens, siARNs

Abstract

Nucleosides occur naturally and are building blocks for nucleic acids (RNA and DNA). Moreover, they also represent a family of synthetic compounds that have application in genetic therapy with the antisens and siRNA strategies. Chemical modifications are required in order to ensure resistance to nucleases, decreasing their ionic character, while keeping the affinity and specificity for the targeted messenger RNA.

Various modifications have been envisaged in the literature including modification of the internucleic linkage, replacing the phosphodiester linkage with an amide is of particular interest as the amide perfectly mimics the phosphodiester moiety. Several synthetic approaches have been studied in the literature starting from nucleosides or ribosic derivatives but the peptide coupling to create this amide linkage always occurs between two nucleoside units. Here we present a strategy for innovative and efficient synthesis from an inexpensive precursor, the D-xylose. Our strategy includes backbone ribosidic dimers with an amide linkage, those one being judiciously protected to access by simple glycosylation to ribonucleosidic homodimers and ribonucleosidic heterodimers.

Key words: D-xylose, glycosylation, amide linkage, ribonucleosidic dimers, antisens, siRNAs