

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Développement de nucléosides visant l'inhibition de
méthyltransférases et synthèse d'une nouvelle famille à
visée thérapeutique**

par

Marc-Olivier Labbé

Département de chimie, Université de Montréal
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en chimie

Septembre 2018

© Marc-Olivier Labbé, 2018

Résumé

Le travail présenté dans cet ouvrage porte sur la synthèse diastéréosélective d'analogues de nucléosides et leurs usages thérapeutiques. L'intérêt pour cette classe de molécules comme agents anti-cancer et/ou antiviraux réside dans l'existence d'acides nucléiques (sous la forme d'ADN ou d'ARN) nécessaires à la reproduction des cellules cancéreuses et la réplication virale. Plusieurs cofacteurs enzymatiques importants possèdent également une structure nucléosidique et occupent des rôles clés dans les processus cellulaires.

La première partie concerne le développement d'une sonde chimique pour l'inhibition de protéines méthyltransférases (PMTs). Cette famille d'enzymes assure la méthylation de protéines, soit une modification post-traductionnelle qui a été associée récemment à certaines maladies incluant le cancer. Sur la base de la structure du cofacteur naturel *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) et d'inhibiteurs émergents, de nouveaux nucléosides fluorés ont été conçus et synthétisés pour potentiellement améliorer l'activité inhibitrice vis-à-vis certaines de ces enzymes. En collaboration avec le SGC de Toronto, les analogues de nucléosides ont été testés biologiquement et certains ont présenté une activité intéressante contre la lysine méthyltransférase SETDB1.

La seconde partie, quant à elle, porte sur la synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides C2'-fluorés comportant un centre quaternaire fonctionnalisé en position C3'. Différentes bases azotées ont été introduites diastéréosélectivement et, plus de vingt analogues de nucléosides et pronucléotides ont été préparés. Une collaboration avec le laboratoire de la Pre Mona Nemer à l'Université d'Ottawa a permis de les tester *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses du pancréas, où certains montrent une activité biologique intéressante.

Mots-clés : Analogues de nucléosides, *S*-adénosyl-L-méthionine, Méthyltransférases, SETDB1, Cancer, Centre quaternaire, Pronucléotides, Pancréas, Glycosylation, Diastéréosélectivité

Abstract

The work presented in this manuscript describes the diastereoselective synthesis of nucleoside analogues and their therapeutic uses. The interest in this important class of molecules as anticancer and/or antiviral agents stems from the administration of modified nucleosides that interfere with cell division and viral replication through incorporation into DNA and RNA and/or inhibition of essential enzymes. These analogues thus compete with their natural counterparts to inhibit the synthesis of nucleotides which is the limiting process in cell proliferation.

The first objective of this thesis is the development of a chemical probe with inhibitory properties against protein methyltransferases (PMTs). This enzyme family is responsible for protein methylation, a post-translational modification recently linked to cancer and other diseases. Based on the structure of the natural cofactor, *S*-adenosyl-L-methionine (SAM), novel fluorinated nucleoside analogues were synthesized in an effort to further improve biological activity. In collaboration with the SGC in Toronto, two of these compounds showed interesting activity toward the lysine methyltransferase SETDB1.

The second part of this thesis describes the synthesis of a new family of nucleoside analogues bearing a C2' fluorine and a novel all-carbon quaternary center at C3'. Generation of these molecules required optimization of the glycosylation reaction to incorporate various nucleobases as well as modifications to the substituents on the sugar backbone. This resulted in the synthesis of more than twenty analogues including pronucleotides. The biological activity of these molecules was determined in collaboration with Pre Mona Nemer's laboratory at the University of Ottawa. Such nucleoside analogues have shown interesting activity against pancreatic cancer cell lines.

Keywords : Nucleoside analogues, *S*-adenosyl-L-methionine, Methyltransferases, SETDB1, Cancer, Quaternary center, Pronucleotides, Pancreas, Glycosylation, Diastereoselectivity

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	ix
Liste des schémas.....	xii
Liste des tableaux.....	xv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxiii
Chapitre 1. Introduction.....	1
1.1 Structure et fonctions des nucléotides et nucléosides naturels.....	1
1.2 Usage thérapeutique des analogues de nucléosides	2
1.3 Synthèse d’analogues de <i>S</i> -adénosyl-L-méthionine (SAM).....	3
1.4 Synthèse d’une nouvelle famille de nucléosides à visée thérapeutique.....	5
1.5 Conclusion et perspectives de recherche.....	6
1.6 Références	6
Chapitre 2. Stratégies de modification et méthodes de synthèse des analogues de nucléosides.....	8
2.1 Modification des nucléosides.....	8
2.1.1 Stratégies générales	8

2.1.2	Modification de la base azotée : les cas de l'azacytidine et de la décitabine	11
2.2	Méthodes de synthèse des analogues de nucléosides.....	17
2.2.1	Approche convergente : synthèse de liens <i>N</i> -glycosidiques.....	17
2.2.1.1	Voie cyclique : stratégies de <i>N</i> -glycosylation de C2-alkoxy furanosides	18
2.2.1.2	Voie cyclique : stratégies de <i>N</i> -glycosylation de furanosides C2- monofluorés.....	22
2.2.1.3	Voie acyclique : stratégies de <i>N</i> -glycosylation	23
2.2.2	Approche divergente : fonctionnalisation de <i>N</i> -glycosides.....	26
2.2.2.1	Fluoration de <i>N</i> -glycosides : synthèse de nucléosides C2'-monofluorés	27
2.2.2.2	Synthèse d'analogues de <i>S</i> -adénosyl-L-méthionine	28
2.3	Conclusion et perspectives de recherche.....	31
2.4	Références	31

Partie 1.	Synthèse d'analogues de <i>S</i> -adénosyl-L-méthionine : développement d'une sonde chimique pour l'inhibition de méthyltransférases	38
------------------	---	----

Chapitre 3.	Introduction sur les analogues de SAM utilisés pour l'inhibition de protéines méthyltransférases.....	39
3.1	Mise en contexte	39
3.2	Facteurs épigénétiques : la méthylation de l'ADN et les modifications de l'histone.....	40
3.2.1	La régulation du génome et l'épigénétique	40
3.2.2	L'histone et l'information génétique	41

3.2.3	Les modifications post-traductionnelles de l’histone	42
3.3	La méthylation de l’histone et de l’ADN : les méthyltransférases et la dépendance au cofacteur SAM	43
3.4	Inhibiteurs sélectifs de protéines méthyltransférases	46
3.4.1	Inhibiteurs de DOT1L : EPZ004777, SGC0946 et EPZ-5676	47
3.4.2	Inhibiteur sélectif de PRMT5 et PRMT7 : DS-437	49
3.5	Conclusion et perspectives de recherche.....	51
3.6	Références	52

Chapitre 4. Synthèse de nouveaux analogues de SAM pour l’inhibition de PRMT5 et PRMT7..... 56

4.1	Conception de nouveaux analogues nucléosidiques	56
4.1.1	Proposition de nos nouveaux inhibiteurs.....	56
4.1.2	Intérêt et utilité de la substitution par le fluor	57
4.1.2.1	Généralités.....	57
4.1.2.2	Chez les nucléosides	58
4.2	Synthèse des nouveaux nucléosides monofluorés.....	60
4.2.1	Stratégies de synthèse d’analogues C2'-fluorés.....	60
4.2.2	Synthèse de l’analogue 1',2'- <i>trans</i> C2'-fluoré.....	61
4.2.3	Synthèse de l’analogue 1',2'- <i>cis</i> C2'-fluoré.....	62
4.3	Résultats biologiques	64
4.4	Conclusion et perspectives	66
4.5	Références	67

Chapitre 5.	Synthèse de nucléosides pour l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1	70
5.1	Mise en contexte et objectifs de recherche	70
5.2	Synthèse d'analogues N6-substitués	71
5.3	Synthèse de l'analogue 6-amino-7-déazapurine	73
5.4	Synthèse de l'analogue 1',2'- <i>cis</i> C2'-hydroxyle	74
5.5	Tentatives de modification de la chaîne latérale	75
5.6	Résultats biologiques	77
5.7	Conclusion et perspectives.....	78
5.8	Références	79
Chapitre 6.	Synthèse de 2'-fluoro-4'-thiofuranosylpurines	82
6.1	Mise en contexte	82
6.2	Stratégies de <i>N</i> -glycosylation existantes	82
6.2.1	<i>N</i> -glycosylation de thiofuranosides C2-monofluorés par voie cyclique	82
6.2.2	<i>N</i> -glycosylation par voie acyclique	83
6.3	Développement de la voie de synthèse acyclique	86
6.3.1	Objectifs reliés à la synthèse de 2'-fluoro-4'-thionucléosides.....	86
6.3.2	Réaction d'oléfination	86
6.3.3	Stratégie de fluoration	87
6.3.4	Formation de dithioacétals.....	90
6.3.5	Couplage de la 6-chloropurine sur des dithioacétals	91
6.4	Conclusion et perspectives.....	93
6.5	Références	94

Partie 2.	Synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides C2'-fluorés à visée thérapeutique.....	97
Chapitre 7.	Synthèse et étude des propriétés anticancéreuses de nucléosides monofluorés comportant un centre quaternaire fonctionnalisé	98
7.1	Mise en contexte et objectifs de recherche	98
7.2	Nouvelle famille de nucléosides possédant un centre quaternaire.....	100
7.2.1	Conformations associées aux analogues de nucléosides	100
7.2.2	Interaction avec la ribonucléotide réductase	102
7.2.3	Stratégie ProTide et développement de pronucléotides	102
7.2.4	Conception de la nouvelle famille	105
7.2.5	Stratégies de fluoration et d'alkylation.....	106
7.3	Synthèse de la nouvelle famille.....	107
7.3.1	Préparation du lactol avec les stratégies d'alkylation et de fluoration	107
7.3.2	Introduction de bases azotées : <i>N</i> -glycosylation.....	109
7.3.3	Synthèse du pronucléotide dérivé de la cytosine.....	111
7.3.4	Synthèse de nucléosides et pronucléotides dérivés de la purine	111
7.4	Résultats biologiques préliminaires	117
7.5	Conclusion et perspectives.....	121
7.6	Références	122
Conclusion générale	128

Annexe A : Partie expérimentale et caractérisation	i
Remarques générales.....	ii
Instrumentation	iii
Procédure générale.....	iv
Section expérimentale du chapitre 4	v
Section expérimentale du chapitre 5	xiv
Section expérimentale du chapitre 6	xxxiii
Section expérimentale du chapitre 7	xlvi
Références de la partie expérimentale	lxxvii

Liste des figures

Figure 1.1	Appariement des bases azotées de l'ADN.....	1
Figure 1.2	Nucléosides naturels retrouvés dans l'ADN et l'ARN.....	2
Figure 1.3	Analogues de SAM dans le développement d'inhibiteurs de PMTs.....	3
Figure 1.4	Développement et synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides.....	5
Figure 2.1	Analogues de la pyrimidine possédant une activité antitumorale	8
Figure 2.2	Analogues de la purine utilisés pour le traitement de la leucémie	9
Figure 2.3	Mode d'action et métabolisation d'un pronucléotide	10
Figure 2.4	Pronucléotides possédant une activité antivirale	11
Figure 2.5	Agents de déméthylation de l'ADN	12
Figure 2.6	Mécanismes d'activation de l'azacytidine et de la décitabine.....	13
Figure 2.7	Mécanismes de production de C5-méthylcytosine et d'inactivation par l'azacytosine	14
Figure 2.8	Mécanisme de trappage par la 5-fluorocytosine.....	16
Figure 2.9	Agents de déméthylation en développement.....	16
Figure 3.1	Caractéristiques des sondes chimiques et des médicaments	40
Figure 3.2	Les degrés d'organisation de l'information génétique et les facteurs épigénétiques	42
Figure 3.3	La méthylation des composantes du nucléosomes par les méthyltransférases	44
Figure 3.4	Biosynthèse du cofacteur SAM impliqué dans la réaction de méthylation catalysée par les méthyltransférases	44

Figure 3.5	Transfert d'un groupe méthyle aux résidus acides aminés par les protéines méthyltransférases	45
Figure 3.6	Structures d'inhibiteurs naturels non sélectifs de méthyltransférases	46
Figure 3.7	Stratégie de développement d'inhibiteurs bisubstrats pour l'inhibition de PMTs	46
Figure 3.8	Structures d'inhibiteurs sélectifs de DOT1L	48
Figure 3.9	Molécules conçues pour l'inhibition de PRMT5.....	50
Figure 3.10	Structure de DS-437, inhibiteur double de PRMT5 et PRMT7	51
Figure 4.1	Proposition d'analogues de SAM pour l'inhibition de PRMT5 et PRMT7 .	56
Figure 4.2	Projections de Newman des conformères décalés <i>anti</i> et <i>gauche</i>	58
Figure 4.3	Nucléosides C2'-fluorés ayant une activité anticancéreuse ou antivirale	58
Figure 4.4	Cycle de pseudorotation des nucléosides et les paramètres impliqués.....	59
Figure 4.5	Préférences conformationnelles de certains nucléosides C2'-fluorés.....	60
Figure 4.6	Courbes dose-réponse pour l'inhibition de l'activité enzymatique de SETDB1.....	66
Figure 5.1	Structure de DS-431, inhibiteur non sélectif de méthyltransférases	74
Figure 7.1	Agents thérapeutiques nucléosidiques comportant une fonctionnalité nitrile	98
Figure 7.2	Nouvelle famille d'analogues de nucléosides et précédents	99
Figure 7.3	Équilibre conformationnel (pseudorotation) chez les nucléosides naturels	101
Figure 7.4	Biais conformationnel des nouveaux analogues possédant un centre quaternaire	101
Figure 7.5	Stratégie d'un pronucléotide.....	103
Figure 7.6	Pronucléotides développés à des fins thérapeutiques	104
Figure 7.7	Interactions 1,3-diaxiales défavorisant la protection du diol 1,3.....	109

Figure 7.8	Cycle catalytique de la formation d'un tétrazole par études computationnelles.....	114
Figure 7.9	Pronucléotides préparés possédant un groupement tétrazole ou nitrile.....	116
Figure 7.10	Pronucléotides 7.50 et 7.51 dérivés de l'adénine	117
Figure 7.11	Étude SAR et activités biologiques pour différents ANs puriques synthétisés	118
Figure 7.12	Courbes dose-réponse sur les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas	120

Liste des schémas

Schéma 1.1	Cyclisation de thioaminals 1',2'- <i>syn</i> pour l'atteinte de nucléosides C2'-fluorés	4
Schéma 2.1	<i>N</i> -glycosylation par assistance anchimérique menant aux analogues 1',2'- <i>trans</i>	19
Schéma 2.2	<i>N</i> -glycosylation par déplacement de type S _N 2 d'une paire d'ions	20
Schéma 2.3	<i>N</i> -glycosylation par déplacement d'un chlorure anomérique.....	21
Schéma 2.4	<i>N</i> -glycosylation en présence de bromure de diméthylbore	21
Schéma 2.5	Synthèse commerciale de la clofarabine par <i>N</i> -glycosylation d'un bromoacétal	22
Schéma 2.6	<i>N</i> -glycosylation menant aux C2'-fluoronucléosides 1',2'- <i>trans</i>	23
Schéma 2.7	Synthèse stéréosélective de l'AZT par voie acyclique.....	24
Schéma 2.8	Synthèse et cyclisation d'un intermédiaire thioaminal.....	25
Schéma 2.9	Voie de synthèse acyclique pour l'atteinte de nucléosides et thionucléosides	26
Schéma 2.10	Synthèse de nucléosides C2'-fluorés 1',2'- <i>cis</i> et 1',2'- <i>trans</i>	27
Schéma 2.11	Méthodes de synthèse de dérivés N6-substitués de l'adénosine	28
Schéma 2.12	Méthodes générales de fonctionnalisation en C5' de dérivés de l'adénosine	29
Schéma 2.13	Synthèse de l'inhibiteur de protéines arginine méthyltransférases DS-437.	30
Schéma 4.1	Synthèse de C2'-fluoronucléosides 1',2'- <i>trans</i> réalisée par Starr Dostie	62
Schéma 4.2	Synthèse d'analogues 1',2'- <i>cis</i> C2'-fluorés	63
Schéma 5.1	Synthèse de l'analogue 1',2'- <i>cis</i> N6-benzylé	72
Schéma 5.2	Synthèse de l'analogue 1',2'- <i>cis</i> N6-méthylé.....	72

Schéma 5.3	Synthèse de l'analogue 1',2'- <i>cis</i> comportant une N7-déazaadénine 73
Schéma 5.4	Synthèse de l'analogue 1',2'- <i>cis</i> C2'-hydroxyle 5.12 75
Schéma 5.5	Tentative de fonctionnalisation en C5' avec la synthèse de précurseurs protégés en position C3' 77
Schéma 6.1	<i>N</i> -glycosylation de C2-fluorothiofuranosides avec l'usage de purines 83
Schéma 6.2	Couplage d'une purine sur un dithioacétal et cyclisation du thioaminal 1',2'- <i>syn</i> par Starr Dostie 84
Schéma 6.3	Synthèse du dithioacétal acyclique C2-fluoré par Starr Dostie 85
Schéma 6.4	Conditions optimisées pour générer le composé 6.18 87
Schéma 6.5	Synthèse du lactol C2-fluoré 6.19 87
Schéma 6.6	Synthèse des dérivés F-TEDA-PF ₆ et F-TEDA-OTf 88
Schéma 6.7	Synthèse de dithioacétals à partir de substrats cycliques 90
Schéma 6.8	Synthèse du dithioacétal 6.30 depuis des substrats cycliques 91
Schéma 6.9	Synthèse envisagée du 4'-thioanalogue 6.32 94
Schéma 7.1	Mécanisme de déshydroxylation par la ribonucléotide réductase 102
Schéma 7.2	Synthèse rapportée du diastéréoisomère phosphoramidate 7.2 104
Schéma 7.3	Analyse rétrosynthétique menant aux analogues de nucléosides cibles 105
Schéma 7.4	Fluoration énantiosélective d'un aldéhyde avec une imidazolinone 106
Schéma 7.5	Méthode d'alkylation diastéréosélective d'un β-hydroxy ester 107
Schéma 7.6	Synthèse du lactol C2-fluoré 7.23 incorporant un centre quaternaire avec une fonctionnalité nitrile 108
Schéma 7.7	Couplage de la cytosine et séparation du nucléoside 1',2'- <i>cis</i> 7.27 111
Schéma 7.8	Synthèse du pronucléotide 7.28 111
Schéma 7.9	Accès au dérivé de l'adénine 7.31 112

Schéma 7.10	Synthèse de dérivés puriques possédant un groupe aryle en position N6 ..	113
Schéma 7.11	Synthèse de nucléosides possédant un tétrazole.....	114
Schéma 7.12	Préparation des pronucléotides comportant un nitrile et une purine modifiée	115
Schéma 7.13	Hydrogénation du pronucléotide 7.39	117

Liste des tableaux

Tableau 4.1	Activités <i>in vitro</i> d'analogues comportant une fonctionnalité urée.....	64
Tableau 4.2	Activité <i>in vitro</i> du nucléoside 4.4 à l'égard de protéines méthyltransférases	65
Tableau 5.1	Tentatives de fonctionnalisation en C5'.....	76
Tableau 5.2	Activités <i>in vitro</i> des analogues comportant une fonctionnalité amine pour l'inhibition de la méthyltransférase SETDB1	78
Tableau 6.1	Fluoration du glycal 6.18	89
Tableau 6.2	Couplage de la 6-chloropurine sur le dithioacétal 6.30	92
Tableau 6.3	Couplage de la 6-chloropurine sur le dithioacétal 6.9	93
Tableau 7.1	Couplage de la 2,6-dichloropurine sur le lactol 7.23	110
Tableau 7.2	Activité anti-proliférique du composé 7.41 sur les cellules cancéreuses du pancréas	121

Liste des abréviations

[α]_D²⁵	Rotation spécifique basée sur la raie D du sodium (589 nm) à 25 °C
Å	Angström
Ac	Acétyle
Acétyl-CoA	Acétyl-coenzyme A
ADA	Adénosine désaminase
Adé, A	Adénine
ADMA	Diméthylarginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AdoHcy ou SAH	S-Adénosyl-L-homocystéine
AdoMet ou SAM	S-Adénosyl-L-méthionine
A.L.	Acide de Lewis
<i>t</i>-am	<i>tert</i> -Amyle
AN	Analogue de nucléoside
AN-MP	Analogue de nucléoside monophosphate
app	Apparent
aq.	Aqueux ou aqueuse
araA	Vidarabine
araC	Cytarabine
Arg, R	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
Ar	Aryle, cycle aromatique
ATP	Adénosine triphosphate
5-aza-C	Azacytidine, azacitidine ou 5-azacytidine
5-aza-CDP	5-Azacytidine-5'-diphosphate
5-aza-CMP	5-Azacytidine-5'-monophosphate
5-aza-CTP	5-Azacytidine-5'-triphosphate
5-aza-dC	Décitabine ou 5-aza-2'-désoxycytidine

5-aza-dCDP	5-Aza-2'-désoxycytidine-5'-diphosphate
5-aza-dCMP	5-Aza-2'-désoxycytidine-5'-monophosphate
5-aza-dCTP	5-Aza-2'-désoxycytidine-5'-triphosphate
5-aza-dU	5-Aza-2'-désoxyuridine
Aza-TdC	5-Aza-4'-thio-2'-désoxycytidine ou aza-T-dCyd
5-aza-U	5-Azauridine
AZT	Zidovudine
Bn	Benzyle
Bp	Point d'ébullition
Bu	Butyle
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -Butyle
Bz	Benzoyle
<i>c</i>	Concentration en g/100 mL
°C	Degré Celsius
Calcd	Calculé
cat.	Catalytique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDA	Cytidine désaminase
CMPK	Cytidine monophosphate kinase
CoA	Coenzyme A
Conc.	Concentré
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
Cy	Cyclohexyle
Cyt, C	Cytosine
d	Doublet
D	Debye
<i>D</i>	Dextrogyre
DAST	Trifluorure de diéthylaminosulfure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
dCK	Désoxycytidine kinase
DCE	1,2-Dichloroéthane

DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet de doublets
ddd	Doublet de doublets de doublets
δ	Déplacement chimique
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMI	1,3-Diméthyl-2-imidazolidinone
DMPD	1,3-Diméthyl-2-phényl-1,3,2-diazaphospholidine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT	4,4'-Diméthoxytrityle
DNMT	ADN méthyltransférase
DOT1L	<i>Disruptor of telomeric silencing 1-like</i>
dt	Doublet de triplets
e.d.	Excès diastéréomérique
e.e.	Excès énantiomérique
éq.	Équivalent(s)
ESI	Ionisation par électronébulisateur
Et	Éthyle
ÉT	État de transition
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FdCyd	5-Fluoro-2'-désoxycytidine
FUDR	Floxuridine
g	Gramme
GemCMP	Gemcitabine monophosphate
Gua, G	Guanine
h	Heure
HAT	Histone acétyltransférase
hCNT	<i>Human concentrative nucleoside transporter</i>

HDAC	Histone désacétylase
hENT	<i>Human equilibrative nucleoside transporter</i>
Hex	<i>n</i> -Hexane
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HMT	Histone méthyltransférase
HRMS	Spectrométrie de masse de haute résolution
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentration inhibitrice médiane
imid.	Imidazole
IR	Infrarouge
<i>J</i>	Constante de couplage
Kme	Lysine monométhylée
Kme2	Lysine diméthylée
Kme3	Lysine triméthylée
L	Litre
<i>L</i>	Lévogyre
LCM	Lymphome à cellules du manteau
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LNA	Analogue de nucléoside bloqué
Lys, K	Lysine
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
μmol	Micromole
m	Multiplet
<i>m</i>	<i>méta</i>
M	Molarité ou concentration molaire (mol/L)
MAT	Méthionine adénosyltransférase
Me	Méthyle

MeCN	Acétonitrile
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
mM	Millimolaire
MMA	Monométhylarginine
mmol	Millimole
mol	Mole
MOP	3-Méthoxy-2-pyridyloxy
Ms	Méthanesulfonyle ou mésylate
MS	Tamis moléculaire
MTase	Méthyltransférase
MW	Masse moléculaire
N	Normalité ou concentration équivalente
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NDPK	Nucléotide diphosphate kinase
NFSI	<i>N</i> -Fluorobenzènesulfonimide
nm	Nanomètre
nM	Nanomolaire
NMPK	Nucléotide monophosphate kinase
nOe	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Nu	Nucléophile
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
Pd/C	Palladium sur charbon activé
pH	Potentiel hydrogène
Ph	Phényle
Pi	Phosphate inorganique

PKMT	Protéine lysine méthyltransférase
pM	Picomolaire
PMB	<i>para</i> -Méthoxybenzyle
PMBz	<i>para</i> -Méthoxybenzoyle
PMT	Protéine méthyltransférase
PPi	Pyrophosphate
ppm	Partie par million
Pr	Propyle
<i>i</i>-Pr	Isopropyle
PRMT	Protéine arginine méthyltransférase
ProTide	PROdrome + nucléoTIDE
pyr. ou py	Pyridine
q	Quadruplet
r.d.	Rapport diastéréomérique
r.e.	Rapport énantiomérique
réf.	Référence
Rend.	Rendement
R_f	Facteur de rétention
RMN (NMR) ¹³C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN (NMR) ¹H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RNR	Ribonucléotide réductase
s	Singulet
SAH ou AdoHcy	<i>S</i> -Adénosyl-L-homocystéine
SAM ou AdoMet	<i>S</i> -Adénosyl-L-méthionine
SAR	<i>Structure-activity relationship</i>
Sat.	Saturé
SBn	Thiobenzyle
SDMA	Diméthylarginine symétrique
Ser, S	Sérine
SETDB1	<i>SET Domain Bifurcated 1</i>
SGC	<i>Structural Genomics Consortium</i>

SMD	Syndromes myélodysplasiques
S_N1	Substitution nucléophile monomoléculaire
S_N2	Substitution nucléophile bimoléculaire
t	Triplet
Temp.	Température
T-araC	Thiarabine
TBAF	Fluorure de tétra- <i>N</i> -butylammonium
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphénylesilyle
TBS ou TBDMS	<i>tert</i> -Butyldiméthylesilyle
td	Triplet de doublets
T-dCyd	4'-Thio-2'-désoxycytidine
TES	Triéthylesilyle
Tf	Trifluorométhanesulfonyle ou triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
THP	2-Tétrahydropyranyle
Thr, T	Thréonine
THU	Tétrahydrouridine
Thy, T	Thymine
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMS	Triméthylesilyle
Tr	Triphénylméthyle ou trityle
<i>p</i>-Ts	<i>para</i> -Toluènesulfonyle ou tosyle
Tyr, Y	Tyrosine
UCK	Uridine-cytidine kinase
Ura, U	Uracile
UV	Ultraviolet
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Dans un premier temps, je voudrais remercier mon superviseur, soit le professeur Yvan Guindon, pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche situé à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) afin d'y mener des études dans un domaine vraiment passionnant. Son expertise et ses conseils en ce qui a trait à la chimie médicinale m'ont permis d'améliorer mes compétences en recherche et de cultiver mon désir d'apprendre au fil de mes études. Son encouragement à assister, mais également à présenter mes travaux lors de congrès scientifiques m'aura permis de prendre part à cette communauté tout en continuant à adopter un regard critique au sens de ces travaux. Je l'en remercie pour cette grande opportunité, pour sa supervision au cours de ces trois années et pour la liberté scientifique qu'il m'a offert sur plusieurs projets. Sa confiance, son soutien et les nombreuses discussions sur la chimie et autres sujets font de lui une personne en qui j'aurai toujours un grand respect et une grande admiration.

Je voudrais, dans un deuxième temps, remercier les chercheurs associés ainsi que mes nombreux collègues, passés et actuels, qui ont fait du laboratoire un environnement stimulant où évoluer sur le plan professionnel, mais également sur le plan personnel. D'abord, d'avoir pu bénéficier du soutien des associés de recherche, soit le Dr Michel Prévost et la Dre Starr Dostie, a été un atout grandement apprécié. Ils ont su répondre à mes nombreuses interrogations et leur aide a été précieuse dans l'avancement de mes projets de recherche et la rédaction de ce mémoire. Leurs qualités humaines en plus de leurs qualités scientifiques font également d'eux des personnes qu'il a été agréable de côtoyer pendant mon séjour au laboratoire. De plus, les nombreuses discussions sur la chimie et ses aspects professionnels ont été rendues possibles par les membres passés et présents du laboratoire (Dr Philippe Mochirian, Dr François Godin, Dre Laura Gillard, Dr Guillaume Tambutet, Dr Amarender Manchoju, Dr Renaud Zelli, Louis Leblanc, Audrey Belouin, Tommy Lussier, Ryan Simard, Gang Wang) et les nombreux stagiaires (David Clément, Laura Jean, Garrett Freure, Scott

Foster, Carla Eymard, Élodie Hardine) avec qui il a été possible de partager de très bons moments. Merci à tous ceux que j'ai pu côtoyer pendant mon séjour à l'IRCM.

Je remercie également les membres du comité, les professeurs Stephen Hanessian et William D. Lubell pour leur évaluation de ce mémoire.

Le travail présenté dans cet ouvrage scientifique ne serait pas complet sans l'apport de collaborateurs afin d'étudier l'activité biologique des molécules préparées. Je tiens d'abord à remercier le *Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie* du Canada (CRSNG/NSERC), à travers le programme *CREATE ChemNET*, pour avoir rendu possible une collaboration avec les chercheurs du *Structural Genomics Consortium* (SGC) de Toronto. Ce programme m'aura permis de suivre une formation en biologie structurale et chimie biologique dans les laboratoires du SGC, de prendre part à des réunions, d'assister à des conférences scientifiques, et d'effectuer un stage de recherche en milieu industriel. De plus, je tiens à remercier la professeure Mona Nemer, et en particulier Janie Beauregard, Claudia Teran et Laura Nicole Collins de l'Université d'Ottawa pour les tests biologiques en lien avec le projet d'analogues de nucléosides comportant un centre quaternaire.

Je voudrais remercier la compagnie *NuChem Therapeutics Inc.* pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer un stage de recherche dans leurs laboratoires. Ce stage s'est inscrit dans le cadre du programme *CREATE* du CRSNG et m'a permis d'explorer les aspects industriels de la recherche dans le secteur de la chimie médicinale à l'automne 2016. À travers cette expérience, il m'a été possible d'être impliqué dans plusieurs projets internes et de travailler en collaboration avec des gens formidables au sein de cette entreprise. J'ai eu la chance de travailler sous la supervision du Dr John Mancuso au cours de ce séjour et de bénéficier de ses précieux conseils pour lesquels je l'en remercie spécialement.

Un remerciement à l'amitié, car à travers les études on vient à rencontrer diverses personnes et certaines s'avèreront de bons amis avec qui partager de bons moments et garder un certain équilibre personnel. Mes amis Kévin, Kevin et Nathaniel pour leur support, les nombreuses soirées et une amitié de longue date. Je garderai de très bons souvenirs de notre

voyage au Japon, mon premier à l'extérieur du pays. Mes amis Éric et Émilie avec qui j'ai eu la chance d'entreprendre mon baccalauréat à l'Université de Montréal depuis le cégep Montmorency, et de continuer aux études supérieures. J'ai apprécié me défouler en jouant au badminton avec vous et plusieurs membres de votre groupe de recherche durant les dernières années. Mes amis Claude, Kevin, Prettiny, Simon, pour les shows de musique électronique entre autres. Je lève mon verre également à ceux que j'ai eu la chance de côtoyer pendant les nombreuses activités à l'université depuis le baccalauréat jusqu'à la maîtrise (Marc-Antoine, Olivier, François), les bières et pizzas, les jeux de chimie et autres. Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin à travers mes études et que je ne voudrais surtout pas oublier de nommer.

Je voudrais réserver mes derniers remerciements (et non les moindres) à ma famille, à mes parents et à ma sœur. C'est par leurs encouragements, leur appui, leur implication, leur compréhension, qu'il sera toujours possible de partager le rire, la joie, les larmes. Je tiens à souligner votre importance, votre présence et votre contribution tout au long de mon cheminement. Merci à mes parents Sylvain et Suzanne de m'accompagner dans tous les projets que j'entreprends (sport, études, travail). Je vous exprime ma gratitude pour les valeurs que vous m'avez transmises et pour l'aide que vous m'avez apporté. Merci à mon oncle Pierre et ma tante Danuta de m'avoir accueilli à Toronto pendant quelques séjours et pour m'avoir fait visiter une multitude d'endroits (dont le *Hockey Hall of Fame*). Merci également à mon oncle Jean-Claude et ma tante Ginette pour leur apport. Merci à mes grand-parents pour leur soutien; à mon grand-père qui a nous a quitté, dans la maladie, dans ma première année de maîtrise et qui m'a accompagné dans nombre d'activités étant plus jeune. Merci à ma sœur Jessica qui s'est avérée être une amie avec qui j'ai pu partager nombre de discussions et d'activités. Ton amitié s'est avérée précieuse dans les moments difficiles.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je termine ce chapitre universitaire, avec ce bagage et ce milieu de vie, afin de relever les nouveaux défis qui se présenteront; tout en voulant continuer à apprendre, et sachant que l'inspiration trouve sa voie.

À ma famille, mes amis

*Life is a learning experience;
The Project we have to fulfill*

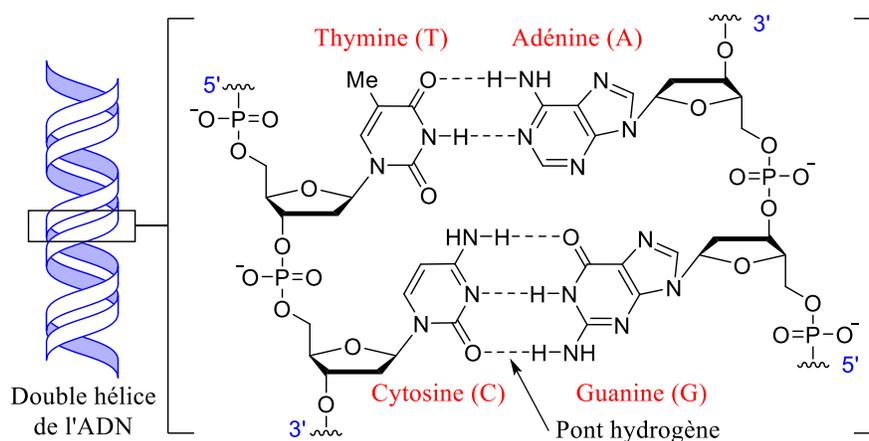
Chapitre 1

Introduction

1.1 Structure et fonctions des nucléotides et nucléosides naturels

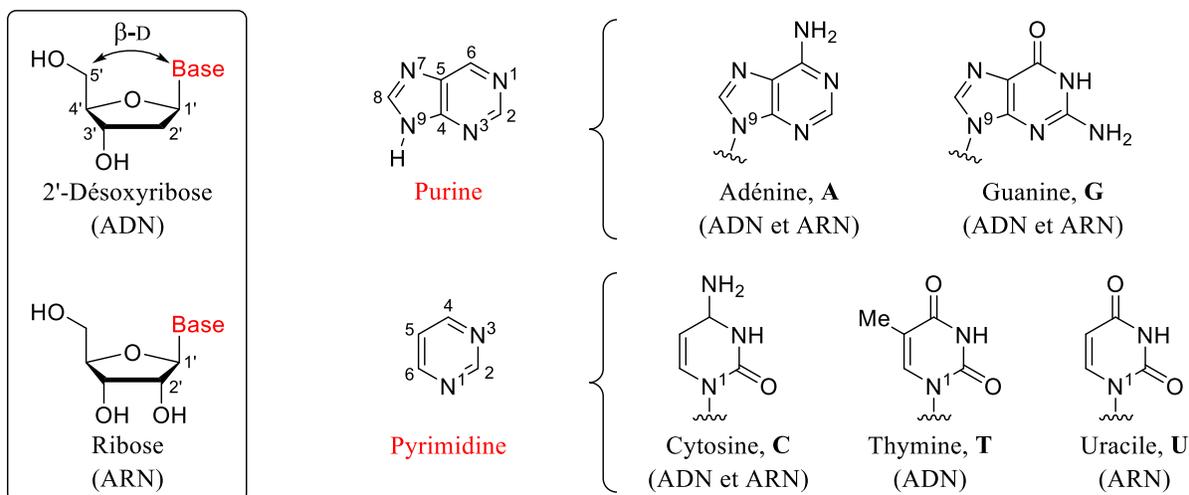
L'ADN (acide désoxyribonucléique) est le berceau de l'information génétique. En incluant l'ARN (acide ribonucléique), les acides nucléiques sont des polymères de nucléotides jouant un rôle de premier plan dans l'entreposage et la transmission du matériel génétique. Les acides nucléiques et les nucléotides occupent également des fonctions structurales et catalytiques dans les cellules.¹ En ce qui concerne les monomères, les nucléotides, ils sont impliqués dans des réactions d'oxydoréduction, de biosynthèse, dans la signalisation cellulaire, ainsi que dans l'apport énergétique des cellules. Ce sont les composants structurels de plusieurs cofacteurs enzymatiques considérables, tels que l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire dans la biosynthèse de *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM, AdoMet). Ils sont dotés d'un sucre pentose (désoxyribose ou ribose), d'une base azotée (purine ou pyrimidine) et d'un groupement phosphate en C5' : l'appariement de leurs bases au sein de l'ADN forme une double hélice pour laquelle les deux brins antiparallèles sont liés par des liaisons hydrogène (Figure 1.1).¹

Figure 1.1 Appariement des bases azotées de l'ADN



Pour l'ADN, qui comporte un désoxyribose, la thymine est appariée avec l'adénine et la cytosine avec la guanine. Pour l'ARN, qui comporte un ribose (hydroxyle en position C2'), l'appariement de l'adénine a plutôt lieu avec l'uracile en remplacement de la thymine.¹ Pour les nucléosides, on note cependant l'absence du groupe phosphate en C5' (Figure 1.2). Attachées à la position C1' via un lien C–N glycosidique de stéréochimie β , les bases azotées puriques (adénine et guanine) sont liées au monosaccharide (pentose) par l'azote N9 tandis que les bases azotées pyrimidiques (cytosine, thymine et uracile) y sont liées par l'azote N1. Bien que les nucléosides naturels soient de stéréochimie β -D (substituant de configuration D en C4' et base azotée occupant la même face du furanoside), la stéréochimie des nucléosides non naturels est toutefois variable (série D ou L, anomère α ou β).¹

Figure 1.2 Nucléosides naturels retrouvés dans l'ADN et l'ARN



1.2 Usage thérapeutique des analogues de nucléosides

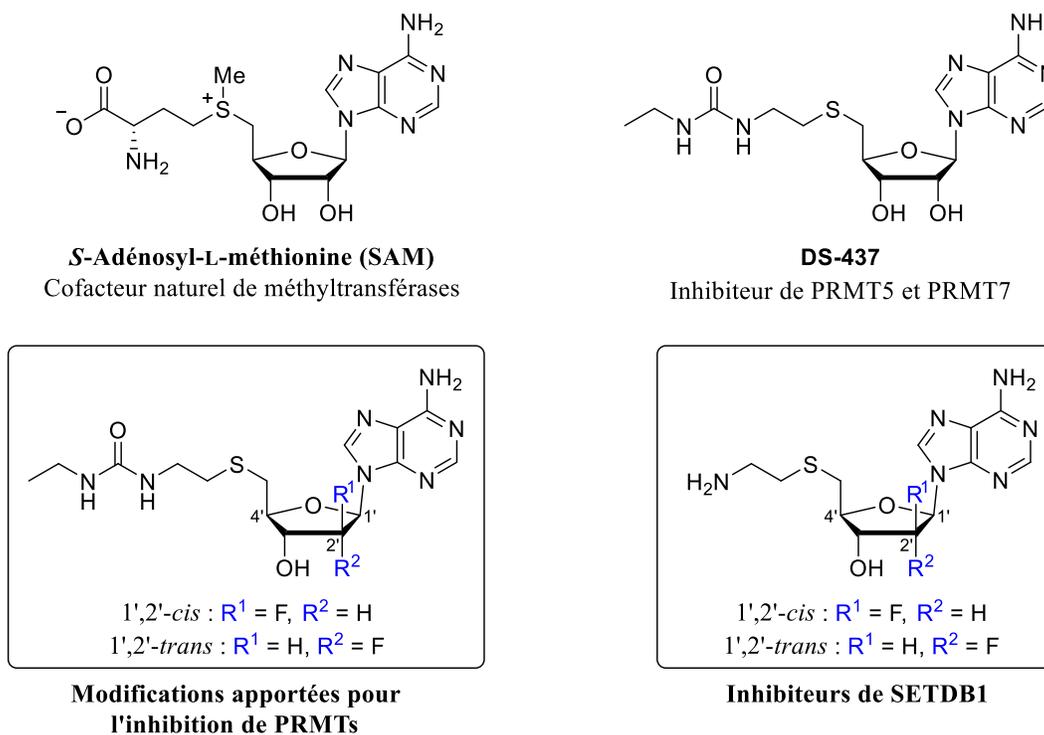
Depuis la détermination de la structure de l'ADN en 1953 et l'approbation en 1969 de la cytarabine (araC) pour le traitement de la leucémie par l'agence américaine *Food and Drug Administration* (FDA), les analogues de nucléosides (ANs) continuent de trouver des applications dans l'inhibition de la division cellulaire et la réplication virale.^{1,2} En effet, cette classe de molécules synthétiques est utilisée depuis près de cinquante ans dans le traitement du

cancer et des virus et, pourtant, elle présente toujours un potentiel thérapeutique dans le développement de nouvelles médications.

1.3 Synthèse d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM)

La première partie de ce manuscrit porte sur le développement d'une sonde chimique pour l'inhibition de protéines méthyltransférases (PMTs), des protéines pour lesquelles les fonctions enzymatiques ont été récemment reliées au cancer.^{3,4} La structure du cofacteur naturel *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM, Figure 1.3) constitue le point de départ dans la conception de nouveaux inhibiteurs afin d'augmenter l'affinité avec les cibles enzymatiques en mimant l'état de transition.⁵ Notre laboratoire, en collaboration avec le consortium SGC de Toronto, s'intéresse à de nouvelles modifications intervenant dans l'anneau glucidique pour l'amélioration des propriétés thérapeutiques de la molécule DS-437 (Figure 1.3), un inhibiteur sélectif d'arginine méthyltransférases (PRMT5 et PRMT7).⁶

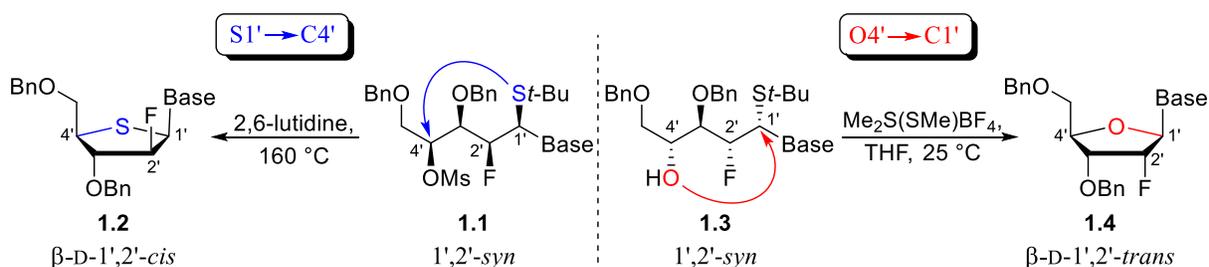
Figure 1.3 Analogues de SAM dans le développement d'inhibiteurs de PMTs



Ces nucléosides sont conçus pour occuper le site du cofacteur enzymatique, SAM, et la fonctionnalité urée est incorporée pour mimer le groupe guanidine du résidu argine présent sur l'histone. La présence d'un atome de fluor vise l'accroissement de la stabilité du lien glycosidique des nucléosides. Certains de nos analogues C2'-fluorés possédant une fonctionnalité amine (Figure 1.3) ont montré une activité intéressante pour l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1 pour laquelle il n'existait aucun inhibiteur jusqu'à maintenant. Une série d'analogues a été préparée pour améliorer l'activité biologique vis-à-vis cette cible thérapeutique.

Dans le développement de nouvelles approches synthétiques, notre laboratoire s'intéresse à la synthèse d'analogues de nucléosides en employant une approche acyclique. Cette stratégie a récemment été appliquée à la synthèse de nucléosides C2'-fluorés comprenant les 4'-thioanalogues avec une pyrimidine (Schéma 1.1).⁷ On s'intéresse au développement et à l'optimisation de la stratégie pour les thiofuranosides C2'-fluorés comportant une base purique. Ces nucléosides représentent un défi synthétique important, puisque les méthodes conventionnelles leur donnant accès sont peu sélectives.⁸⁻¹⁰ La stratégie acyclique développée par le laboratoire du professeur Guindon serait une voie efficace à emprunter et des résultats préliminaires sont très encourageants.

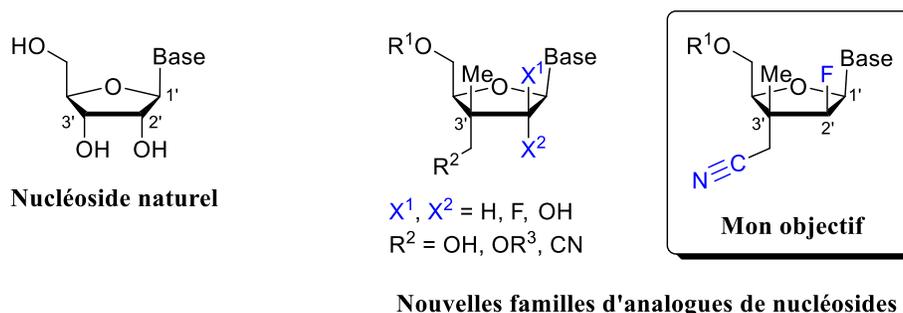
Schéma 1.1 Cyclisation de thioaminals 1',2'-*syn* pour l'atteinte de nucléosides C2'-fluorés⁷



1.4 Synthèse d'une nouvelle famille de nucléosides à visée thérapeutique

La seconde partie de ce manuscrit décrit le développement d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides et pronucléotides (à la Figure 1.4)¹¹ pour la découverte d'agents antiprolifératifs de cellules cancéreuses. On s'intéresse en particulier à l'identification d'une molécule prototypique ayant une activité biologique intéressante sur les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas. Les traitements actuels sont peu efficaces pour ce type de cancer et le taux de survie après cinq ans est très faible.^{12,13} En ce sens, plusieurs analogues C2'-fluorés possédant un centre quaternaire fonctionnalisé en position C3' ont été synthétisés et testés biologiquement en collaboration avec le laboratoire de la Pre Mona Nemer à l'Université d'Ottawa. Le travail lié à ce projet fait partie intégrante d'un brevet¹¹, lequel confirme la nouveauté associée à ces structures et les applications biologiques qui en découlent.

Figure 1.4 Développement et synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides¹¹



La construction du centre quaternaire, la stratégie de fluoration, ainsi que la *N*-glycosylation sélective représentent les défis synthétiques pour l'accès à ces nouveaux ANs. Différentes bases azotées ont été introduites diastérosélectivement et plus d'une vingtaine d'analogues ont été préparés. Une stratégie impliquant des prodrogues a été utilisée afin d'outrepasser des mécanismes de résistance liés aux nucléosides (désamination des bases azotées, problèmes liés à la monophosphorylation) et accroître la lipophilicité. De plus, les présences d'un centre quaternaire carboné et d'un fluor permettraient d'améliorer la stabilité de nos nucléosides dans le milieu biologique. Les modifications subséquentes apportées au

centre quaternaire, de même qu'à la base azotée permettraient d'explorer de nouveaux sites d'interaction avec les cibles thérapeutiques potentielles.

1.5 Conclusion et perspectives de recherche

Au cours de cet ouvrage de nombreux analogues de nucléosides comportant des modifications seront présentés advenant leurs applications thérapeutiques. Les stratégies de modification des nucléosides seront présentées au chapitre suivant, de même que les méthodes de synthèse donnant accès, entre autres, aux nucléosides comportant un groupe alkoxy ou fluoro en position C2' pour les relations stéréochimiques 1',2'-*cis* et 1',2'-*trans*. Les diverses stratégies diastéréosélectives de *N*-glycosylation seront abordées à l'aide des approches convergentes (en incluant l'usage de la voie acyclique). Les diverses stratégies divergentes de fonctionnalisation utilisées pour la préparation d'analogues de SAM seront également discutées. La première partie concerne le développement d'une sonde chimique et la synthèse d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine pour l'inhibition de protéines méthyltransférases (PMTs). La seconde partie concerne la synthèse d'une nouvelle famille de nucléosides et la découverte d'agents antiprolifératifs.

1.6 Références

1. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry – Life at the Molecular Level* (4th ed.); John Wiley & Sons : Hoboken, 2013; ch. 3, 27.
2. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
3. Copeland, R. A.; Solomon, M. E.; Richon, V. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 724-732.
4. Yang, Y.; Bedford, M. T. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 37-50.
5. Zhang, J.; Zheng, Y. G. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 583-597.

6. Smil, D.; Eram, M. S.; Li, F.; Kennedy, S.; Szewczyk, M. M.; Brown, P. J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Schapira, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 408-412.
7. Dostie, S.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Tanveer, K.; Andrella, N.; Rostami, A.; Tambutet, G.; Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10769-10790.
8. Yoshimura, Y.; Endo, M.; Miura, S.; Sakata, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7912-7920.
9. Yoshimura, Y.; Kitano, K.; Yamada, K.; Sakata, S.; Miura, S.; Ashida, N.; Machida, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1545-1558.
10. Takahashi, M.; Daidouji, S.; Shiro, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4313-4324.
11. Guindon, Y.; Mochirian, P.; Nemer, M.; Prévost, M. *Nucleoside Analogues and Methods of use thereof*, 2017, PCT/CA2017/051096.
12. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 505-527.
13. Di Marco, M.; Di Cicilia, R.; Macchini, M.; Nobili, E.; Vecchiarelli, S.; Brandi, G.; Biasco, G. *Oncol. Rep.* **2010**, *23*, 1183-1192.

Chapitre 2

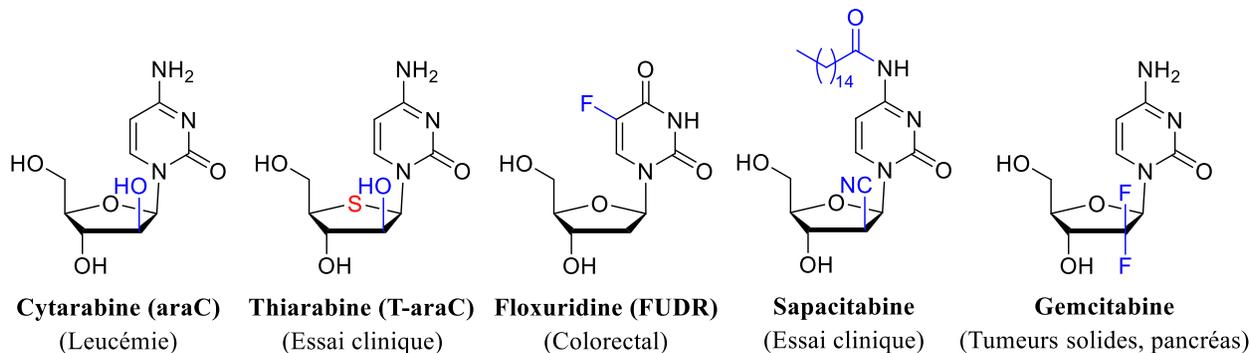
Stratégies de modification et méthodes de synthèse des analogues de nucléosides

2.1 Modification des nucléosides

2.1.1 Stratégies générales

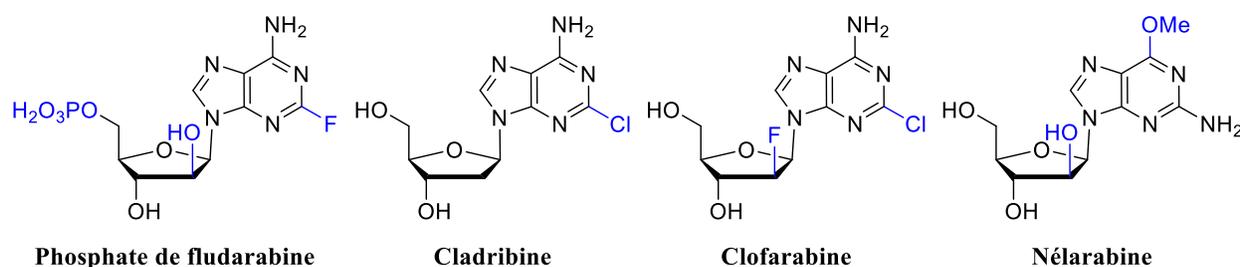
Diverses stratégies de modification des nucléosides ont été développées afin de perturber les processus biologiques impliquant leurs homologues naturels, par leur incorporation en acides nucléiques et/ou par l'inhibition d'enzymes clés, telles que les polymérases, les kinases, la ribonucléotide réductase (RNR), et les méthyltransférases.^{1,2} Leur action repose surtout sur l'emprunt des voies métaboliques des nucléosides endogènes. Les nucléosides pénètrent à l'intérieur de la cellule avec l'aide de transporteurs de nucléosides transmembranaires ou par diffusion, subissent une première phosphorylation, généralement par la déoxycytidine kinase (dCK) qui constitue l'étape limitante, et peuvent ensuite subir une seconde et une troisième phosphorylation par des kinases. Ils sont transformés sous leur forme active lors de leur phosphorylation et agissent dès lors comme antimétabolites.¹

Figure 2.1 Analogues de la pyrimidine possédant une activité antitumorale¹⁻⁴



Les nucléosides modifiés possédant une base pyrimidique (Figure 2.1) ou purique (Figure 2.2) sont conçus afin de compromettre la prolifération des cellules cancéreuses.¹⁻⁵ Les différentes modifications structurales comprennent les bases azotées (incorporation d'un atome halogène, protection de l'amine, azotation), la partie glucidique naturelle ou non (arabinoside, fluorée, thiofuranoside, etc.), et la présence ou non de groupes latéraux (prodrogue, phosphate/phosphonate avec ou sans masque chimique).¹

Figure 2.2 Analogues de la purine utilisés pour le traitement de la leucémie^{2,3,5}

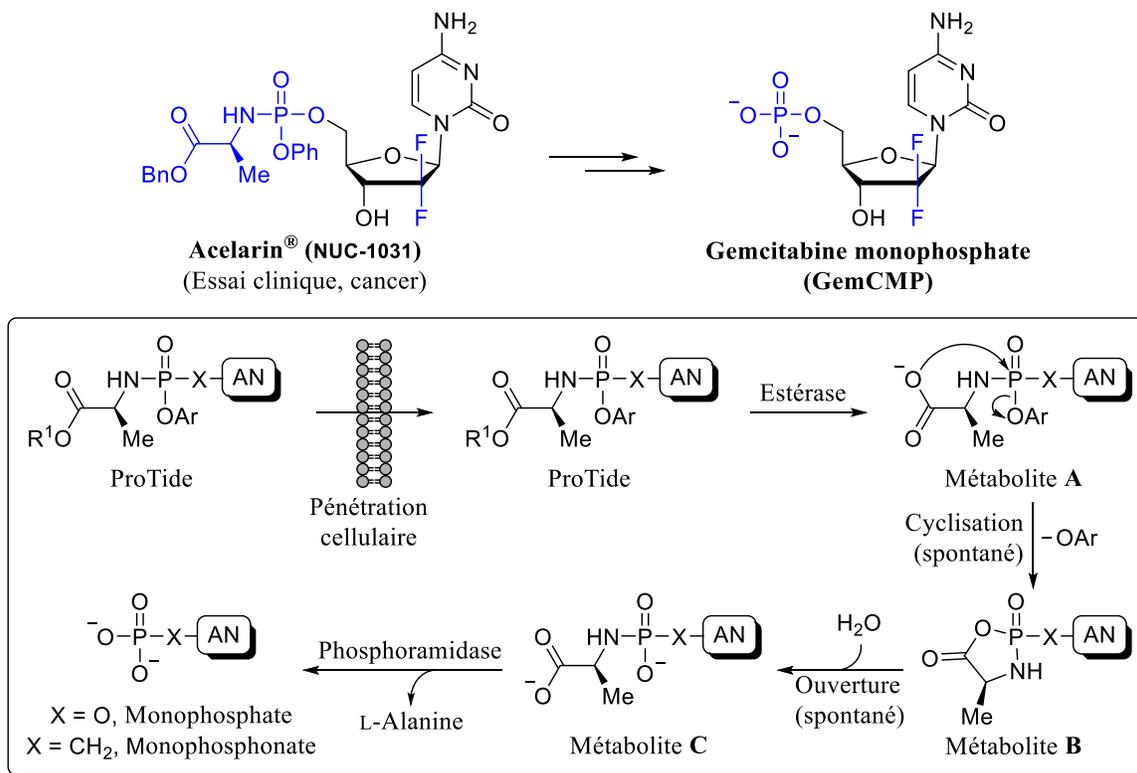


Plusieurs nucléosides ayant une relation stéréochimique 1',2'-*cis* ont été développés avec un groupement polaire en position C2' (cytarabine, thiarabine, sapacitabine, fludarabine, nélarabine) pour faciliter la première phosphorylation par la dCK.^{1,6} C'est notamment le cas de la clofarabine (Figure 2.2) qui possède une haute affinité pour cette kinase.^{6b} Ce médicament, sous sa forme active triphosphorylée, inhibe la RNR et l'ADN polymérase, puis son incorporation dans l'ADN induit la mort cellulaire (apoptose).⁷ La structure de la clofarabine fait suite aux développements de la cladribine et de la fludarabine : la présence d'un fluor en position C2' permet d'augmenter la stabilité du lien glycosidique et l'incorporation d'un atome halogène sur la purine permet d'éviter la désamination par l'adénosine désaminase (ADA). Cette dernière est responsable de la métabolisation des analogues de purines sous une forme inactive, causant ainsi une diminution de leur activité thérapeutique. La nélarabine (Figure 2.2), quant à elle, incorpore une base azotée protégée analogue de la guanine.⁵ Elle est convertie dans le milieu cellulaire en arabinosylguanine.

L'atteinte d'analogues comportant un atome de soufre dans l'anneau glucidique revêt aussi un intérêt particulier dans le développement d'agents thérapeutiques. La thiarabine (4'-Thio-ara-C, T-araC) à la Figure 2.1 possède une activité anticancéreuse considérable et une meilleure biodisponibilité par rapport à la cytarabine : la forme triphosphate du T-araC est moins sujette à une métabolisation par la cytidine désaminase (CDA), ce qui améliore sa rétention pour une meilleure inhibition de la synthèse d'ADN.⁸⁻¹⁰ Son activité anti-angiogénique est également une propriété intéressante afin d'empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) nécessaires à la croissance de tumeurs solides.¹¹

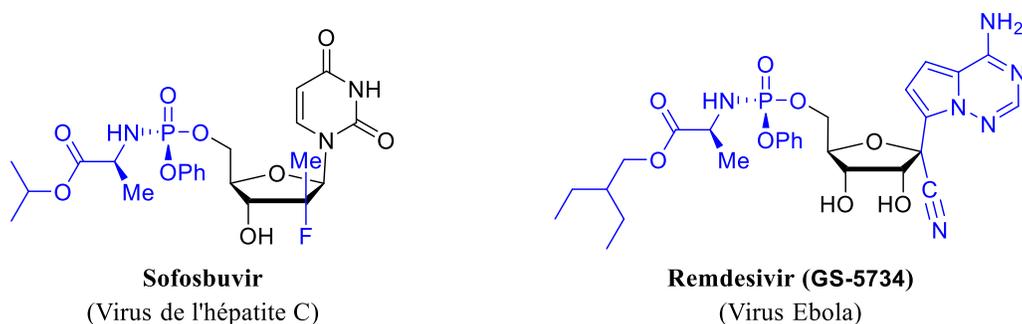
La technologie ProTide (PROdrogue + nucléoTIDE) développée par Christopher McGuigan permet, pour sa part, de relarguer un nucléoside monophosphate ou monophosphonate dans le milieu cellulaire après clivage enzymatique et ce, en outrepassant la première phosphorylation (Figure 2.3).^{12,13}

Figure 2.3 Mode d'action et métabolisation d'un pronucléotide¹²⁻¹⁴



Pour améliorer le temps de demi-vie de la gemcitabine, cette stratégie a été appliquée dans le développement de l'Acélarin®.^{1,14} L'usage de prodrogues permet d'accroître la lipophilicité des molécules, leur permettant d'entrer dans le milieu intracellulaire par diffusion passive sans le recours à des transporteurs de nucléosides. Les pronucléotides sont aussi insensibles à la désamination intervenant dans les milieux intra et extracellulaires, les protégeant contre les désaminases.¹ L'emploi de cette stratégie permet d'outrepasser certains mécanismes de résistance, ce qui mène à l'augmentation du temps de demi-vie (rétention) et de la biodisponibilité des agents thérapeutiques.¹²⁻¹⁴ Cette stratégie est également appliquée au développement d'agents antiviraux (Figure 2.4).^{1,15}

Figure 2.4 Pronucléotides possédant une activité antivirale^{1,15}

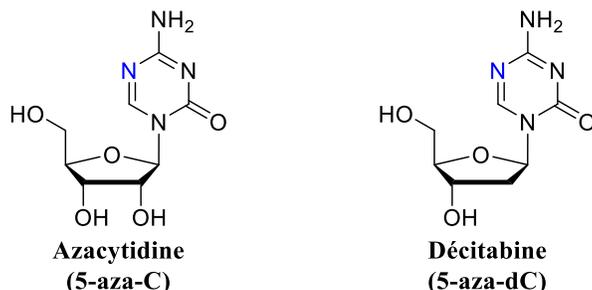


2.1.2 Modification de la base azotée : les cas de l'azacytidine et de la décitabine

Le développement de l'azacytidine (azacitidine, 5-azacytidine, Vidaza®) et de la décitabine (5-aza-2'-désoxycytidine, Dacogen®) est un exemple intéressant sur la découverte des médicaments (Figure 2.5). Approuvés respectivement par la FDA en 2004 et 2006, ils sont utilisés actuellement comme agents hypométhylants pour le traitement de la leucémie et des syndromes myélodysplasiques (SMD).^{1,16} D'abord développés comme agents cytostatiques il y a plus de quarante ans, le mécanisme d'action de ces analogues de la cytidine a été résolu plusieurs années plus tard lorsqu'ils ont montré une inhibition de la méthylation de l'ADN *in vitro*.^{17,18} Une activité cytotoxique sur les cellules à la fois saines et cancéreuses est observée lorsqu'ils sont utilisés à fortes doses mais, sur une période prolongée à faibles doses, leur efficacité thérapeutique sur le mécanisme épigénétique est rencontrée.^{16,19} Il s'agit

présentement des deux médicaments les plus avancés pour la thérapie épigénétique et le traitement du cancer.^{1,18}

Figure 2.5 Agents de déméthylation de l'ADN

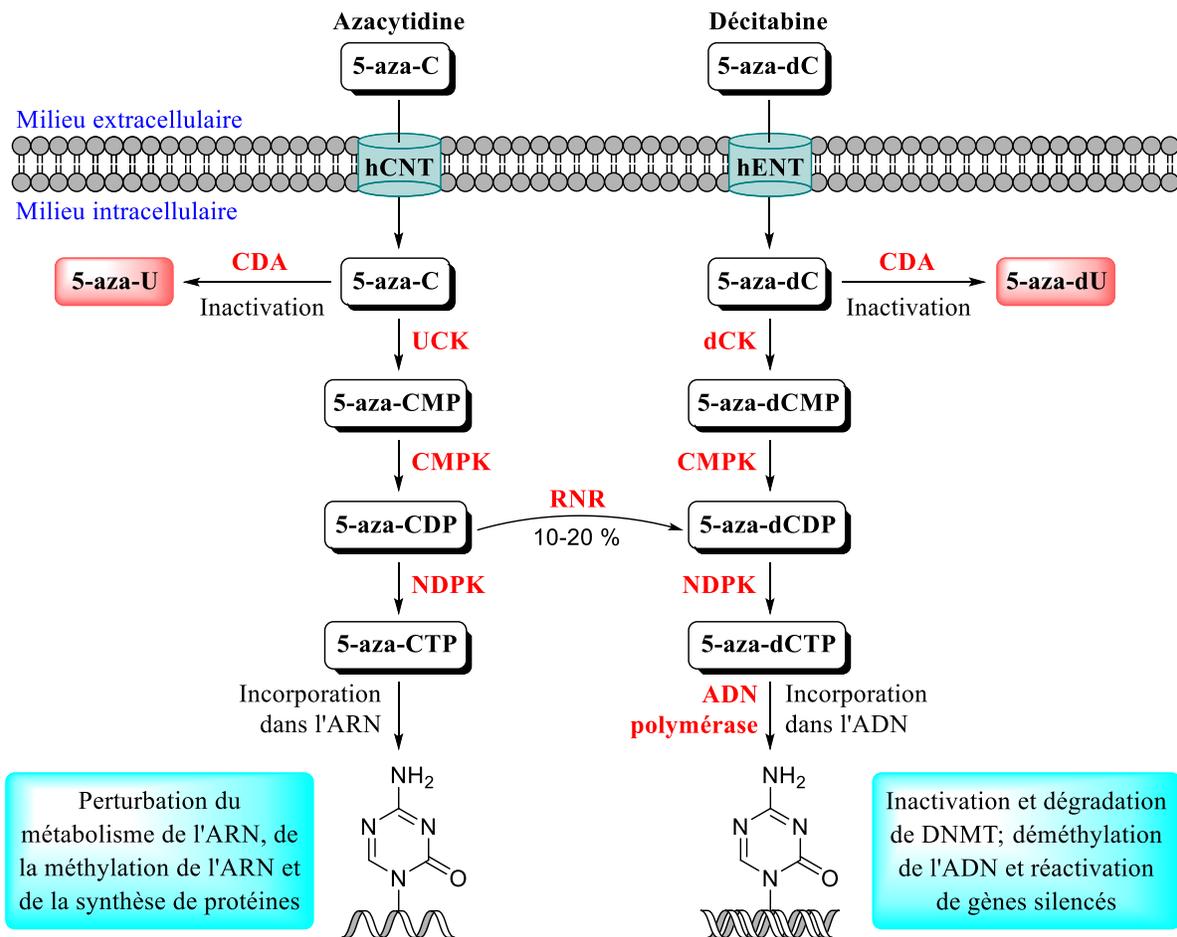


La méthylation de l'ADN, qui est assurée par les ADN méthyltransférases (DNMTs), est une modification épigénétique qui permet de réguler l'expression du génome et de préserver son intégrité. L'hyperméthylation de certains promoteurs de gènes est responsable, par la production de C5-méthylcytosine, du silençage de gènes suppresseurs de tumeur (ou anti-oncogènes). Lorsqu'ils sont activés, ceux-ci permettent une régulation négative de la division cellulaire. Cependant, l'inactivation inappropriée de suppresseurs clés par une hyperméthylation anormale de l'ADN contribue, entre autres, à la modification du phénotype et à la prolifération des cellules cancéreuses.¹⁹ Lors de la réplication de l'ADN, DNMT1 est la principale enzyme responsable de maintenir les profils de méthylation, ce qui en fait une cible thérapeutique pour la réactivation des gènes suppresseurs de tumeur.¹⁹⁻²¹

Tout comme les nucléosides naturels, l'azacytidine et la décitabine parviennent au milieu intracellulaire avec l'aide de transporteurs de nucléosides (Figure 2.6) : hCNT (*human concentrative nucleoside transporter*) pour l'azacytidine et hENT (*human equilibrative nucleoside transporter*) pour la décitabine. L'uridine-cytidine kinase (UCK) est responsable de la première phosphorylation de l'azacytidine et, dans le cas de la décitabine, il s'agit de la désoxycytidine kinase (dCK) qui remplit ce rôle. Pour les deux nucléosides monophosphates, la seconde phosphorylation par une cytidine monophosphate kinase (CMPK) est suivie d'une

troisième phosphorylation par une nucléotide diphosphate kinase (NDPK). Au cours du processus, la ribonucléotide réductase (RNR) convertit environ de 10 à 20 % de 5-azacytidine-5'-diphosphate (5-aza-CDP) en désoxynucléotide correspondant (5-aza-dCDP). Les nucléosides triphosphates sont dès lors les formes actives de ces azanucléosides.^{18,19,22,23}

Figure 2.6 Mécanismes d'activation de l'azacytidine et de la décitabine (modifiée à partir de Yang *et al.*)²²

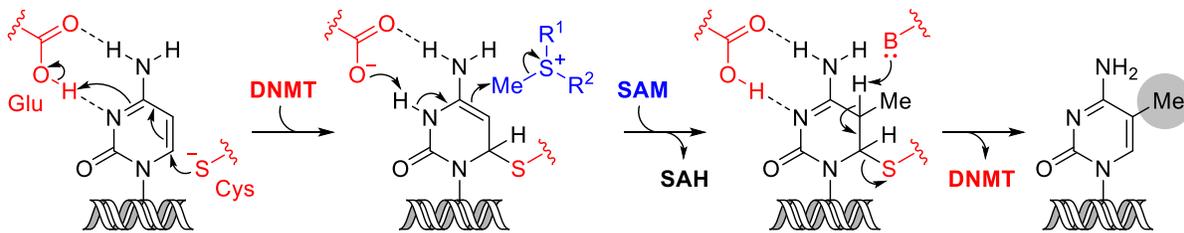


Lors de la division cellulaire, le 5-aza-2'-désoxycytidine-5'-triphosphate (5-aza-dCTP) est incorporé dans l'ADN par l'ADN polymérase à la place du nucléotide naturel (2'-désoxycytidine-5'-triphosphate). Afin de maintenir le degré de méthylation au sein du nouveau brin d'ADN synthétisé, une DNMT (principalement DNMT1) va effectuer la méthylation de

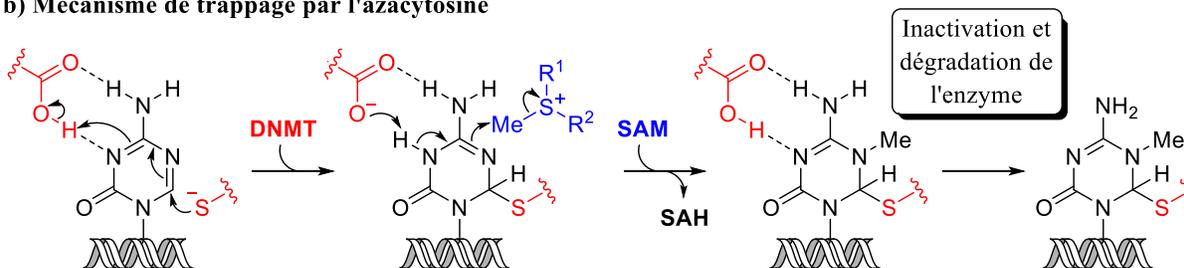
la cytosine (base naturelle de l'ADN) avec l'emploi du cofacteur SAM (Figure 2.7a). En présence de l'azacytosine (base azotée modifiée), il y a plutôt la formation d'un lien covalent irréversible avec l'enzyme menant à son inactivation, puis à sa dégradation par protéolyse (Figure 2.7b). Cette dégradation de la DNMT inhibe la méthylation du nouveau brin d'ADN synthétisé au cours de la réplication, alors que le brin parental contient toujours son degré de méthylation initial. Après quelques divisions cellulaires, l'hypométhylation de l'ADN est notable. La présence de l'azacytosine induit ainsi la déméthylation et la réactivation des gènes silencés provenant d'une hyperméthylation de l'ADN.^{18,19,22,23}

Figure 2.7 Mécanismes de production de C5-méthylcytosine et d'inactivation par l'azacytosine (modifiée à partir de Stresemann *et al.*)¹⁸

a) Mécanisme de méthylation de la cytosine



b) Mécanisme de trappage par l'azacytosine



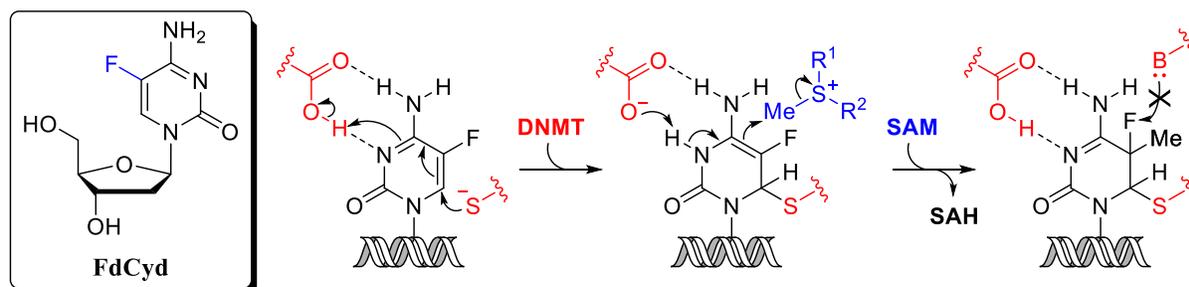
Pour ce qui est de l'incorporation de l'azacytidine triphosphorylée (5-aza-CTP) dans l'ARN, celle-ci perturbe le métabolisme et la méthylation de l'ARN, ainsi que la synthèse de protéines. Il en résulte une certaine cytotoxicité, autant pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines. L'azacytidine représente environ 10 % de l'activité hypométhylante de la décitabine, puisqu'elle est essentiellement incorporée sous forme d'ARN (voir la Figure 2.6).^{18,19}

Cependant, ces deux azanucléosides font face à l'instabilité chimique. À pH alcalin, l'ouverture de la base azotée 5-azacytosine mène à leur décomposition. À pH acide, le lien glycosidique est clivé, ce qui limite l'administration de ces médicaments par voie orale. Lorsque conservées dans une solution à pH neutre, le temps de demi-vie de ces molécules est tout de même limité : à 4 °C, il est de 21 jours pour l'azacytidine et de 7 jours pour la décitabine. Pour une température équivalente à celle du corps humain (37 °C) le temps de demi-vie est plutôt réduit à moins d'une journée, soit 7 heures pour l'azacytidine et 21 heures pour la décitabine.^{18,19}

En plus de l'instabilité chimique, il existe des mécanismes de résistance pour l'azacytidine et la décitabine, dont la phosphorylation par la dCK et la métabolisation par la CDA. D'abord, la monophosphorylation de la décitabine par la dCK constitue l'étape limitante. Une faible activité liée à cette kinase rend les cellules résistantes aux analogues de la cytosine. Ensuite, une métabolisation par la cytidine désaminase (CDA) peut intervenir à chaque étape du mécanisme puisque l'azacytidine, la décitabine, ainsi que leurs nucléosides mono-, di- et triphosphates peuvent être dégradés. L'inactivation par cette désaminase est responsable du court temps de demi-vie, et de la diminution de l'activité épigénétique et antinéoplasique. De plus, une résistance face aux inhibiteurs de DNMTs provient des cellules cancéreuses qui peuvent emprunter des alternatives épigénétiques pour la répression des gènes déméthylés.¹⁹

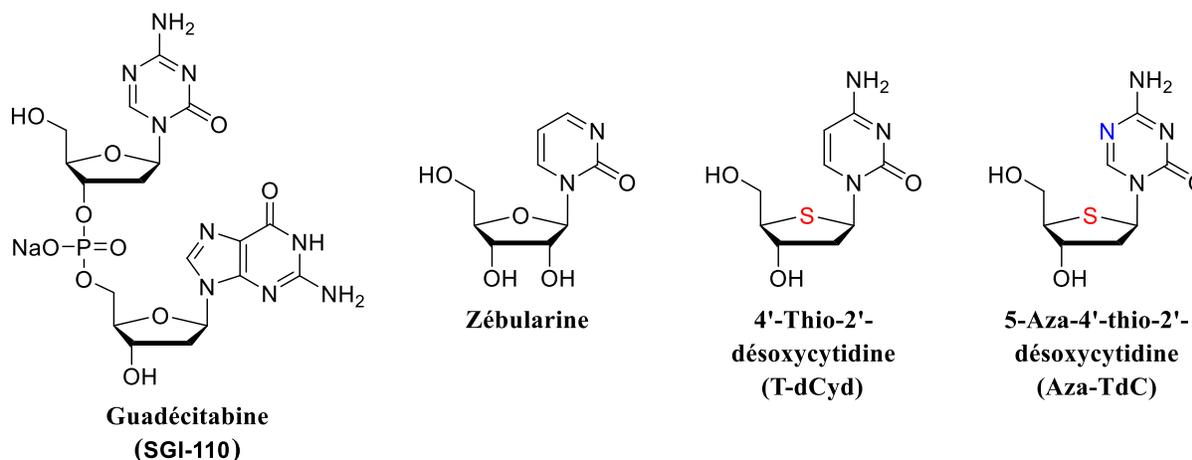
Parmi les inhibiteurs en développement se trouve la 5-fluoro-2'-désoxycytidine (FdCyd). La stratégie repose sur l'incorporation de la base azotée 5-fluorocytosine au sein de l'ADN où la présence de l'atome de fluor mène à l'inactivation de l'enzyme DNMT (Figure 2.8).²⁴⁻²⁶ Par contre, la métabolisation très rapide par la CDA résulte en des métabolites inactifs ou toxiques. Une combinaison avec un inhibiteur de la CDA, la tétrahydrouridine (THU), permettrait l'accroissement de la stabilité métabolique et l'amélioration de l'activité.²⁷

Figure 2.8 Mécanisme de trappage par la 5-fluorocytosine (modifiée à partir de Chen *et al.*)²⁵



D'autres agents de déméthylation sont également en développement (Figure 2.9).¹ La guadécitabine est un oligonucléotide composé de la décitabine et de la guanosine, qui est en développement clinique pour le traitement de la leucémie et du syndrome myélodysplasique.²⁸ Ce conjugué permet de protéger la portion 5-azacytosine face à la désamination par la CDA. Le lien phosphodiester du dinucléotide est clivé par une phosphodiesterase menant, après une phosphorylation extensive, à l'incorporation de la forme active de la décitabine dans l'ADN.

Figure 2.9 Agents de déméthylation en développement¹



La zébularine, un analogue comportant une base 2-(1*H*)-pyrimidinone, a été développée initialement pour l'inhibition de la cytidine désaminase (CDA).²⁹ Son activité comme agent de déméthylation accompagnée d'une faible cytotoxicité est d'autant plus

intéressante que sa stabilité : sa demi-vie à 37 °C en milieu acide est évaluée à 44 heures.^{23,29} L'administration orale sur un modèle animal résulte en la déméthylation et la réactivation d'un gène silencé hyperméthylé.³⁰

De manière intéressante, de nouveaux analogues de 2'-désoxycytidine (dCyd) ont pour leur part démontré un potentiel *in vitro* et *in vivo* avec la déplétion de DNMT1 et l'inhibition de la prolifération tumorale.^{1,31} Il s'agit des 4'-thioanalogues T-dCyd (4'-thio-2'-désoxycytidine) et aza-TdC (5-aza-4'-thio-2'-désoxycytidine, aza-T-dCyd) à la Figure 2.9. L'aza-TdC est également sous investigation pour le traitement des tumeurs solides.³¹

2.2 Méthodes de synthèse des analogues de nucléosides

La recherche de nouvelles stratégies de modification des nucléosides constitue un enjeu important afin de trouver de nouveaux inhibiteurs de cibles enzymatiques liées aux maladies et résoudre les principaux problèmes liés aux traitements actuels (résistance, faible biodisponibilité, toxicité).¹ Différentes méthodes ont été développées au fil des années pour accéder à une variété de molécules plus complexes et renfermant différents groupements, fonctionnalités et une variété de bases azotées. Elles se regroupent en deux catégories principales : les approches convergentes et les approches divergentes.³² Ces méthodes employées dans la synthèse d'analogues de nucléosides seront utilisées pour l'accès à nos composés d'intérêt.

2.2.1 Approche convergente : synthèse de liens *N*-glycosidiques

Cette approche confère une importante versatilité et une flexibilité des plus intéressantes pour l'incorporation de différentes bases azotées sur des sucres fonctionnalisés. Diverses méthodes ont été développées afin d'offrir un contrôle diastéréosélectif pour la formation du lien *N*-glycosidique et l'atteinte de nucléosides de relation stéréochimique 1',2'-*cis* et 1',2'-*trans* lorsque ceux-ci comportent un groupe fonctionnel en position C2'. Parmi les

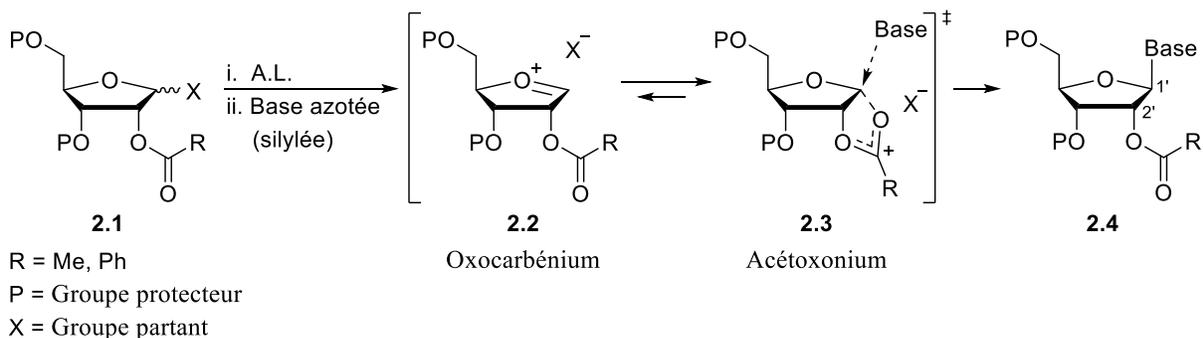
pentoses utilisés à des fins thérapeutiques se trouvent les ribosides et les arabinosides ayant un hydroxyle ou un atome de fluor en C2. Les stratégies de synthèses leur donnant accès empruntent généralement une voie cyclique ou acyclique.

La réaction de silyl-Hilbert-Johnson (ou de Vorbrüggen) est la plus utilisée dans la synthèse des nucléosides. Elle concerne le couplage d'une base azotée silylée (nucléophile) sur un sucre électrophile en présence d'un acide de Lewis (A.L.). La silylation des bases azotées permet d'accroître leur solubilité dans les solvants organiques de même que leur caractère nucléophile, et d'augmenter les rendements associés aux glycosylations. Les sels métalliques de mercure, d'argent ou de sodium sont également d'usage pour les purines, dont les rendements sont souvent modérés et où la formation de régioisomères³³ est plus fréquente. Les stratégies stéréosélectives de glycosylation emploient différents groupements pour les substrats (groupes protecteurs, groupes partants) afin de générer les analogues de nucléosides désirés dans les conditions réactionnelles optimales (acide de Lewis, activateur, solvant, temps réactionnel, température).^{34,35,36}

2.2.1.1 Voie cyclique : stratégies de *N*-glycosylation de C2-alkoxy furanosides

L'atteinte des analogues de nucléosides de relation stéréochimique 1',2'-*trans* implique l'assistance anchimérique avec la présence d'un groupement benzoyle ou acétyle en position C2 du furanoside (**2.1**, Schéma 2.1). L'activation de la position anomérique par un acide de Lewis (SnCl₄, TMSOTf, etc.) permet le départ d'un groupe partant (X = Cl, Br, OAc, OBz, OMe) et la formation d'un intermédiaire oxocarbénium (**2.2**), lequel est stabilisé par ledit groupement voisin (OBz ou OAc) par une délocalisation de la charge positive (**2.3**). L'addition de la base azotée est dès lors dirigée sur la face la moins encombrée, soit la face supérieure du plan du furanoside, pour l'obtention sélective du nucléoside **2.4**.^{34,35,37}

Schéma 2.1 *N*-glycosylation par assistance anchimérique menant aux analogues 1',2'-*trans*

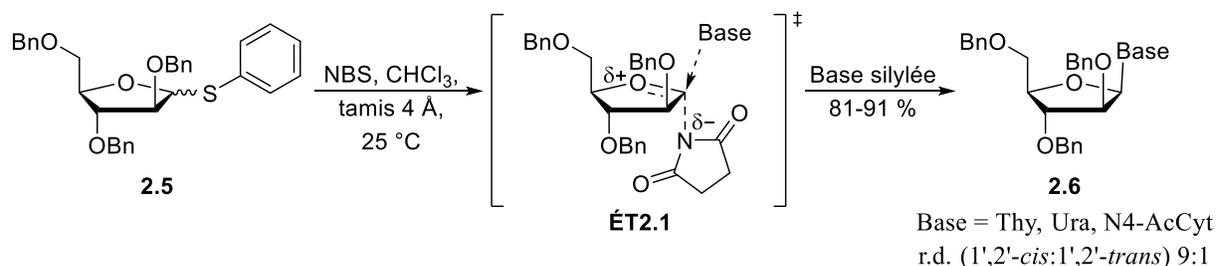


L'atteinte des nucléosides de relation stéréochimique 1',2'-*cis* nécessitant l'introduction de la base azotée sur la face la plus encombrée du furanoside, diverses méthodes ont été étudiées à cette fin. Celles-ci tirent plutôt avantage de la présence d'un groupement benzyle en position C2, puisque celui-ci ne peut pas être impliqué dans l'assistance anchimérique.

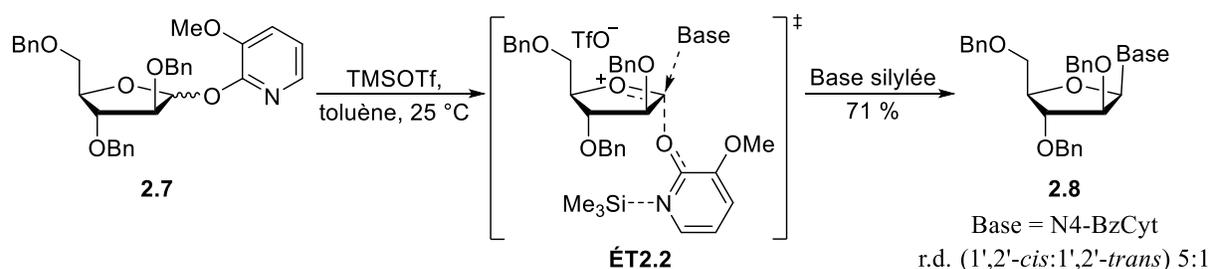
L'une de ces stratégies consiste en la formation d'une paire d'ions sur la face la moins encombrée du plan du furanoside, puis en son déplacement par la base azotée selon un mécanisme proposé de type S_N2 (Schéma 2.2).^{38,39} Dans un premier cas, l'activation du thioglycoside **2.5** par la *N*-bromosuccinimide (NBS) mène à la formation préférentielle de l'anion succinimide sur la face inférieure (ÉT2.1), puis à son déplacement depuis la face supérieure par la base azotée silylée (Schéma 2.2a).³⁸ Dans le second cas, l'usage de TMSOTf permet d'activer le groupement 3-méthoxy-2-pyridyloxy (MOP) du substrat **2.7** et de former la paire d'ions qui sera déplacée par la base azotée silylée (ÉT2.2, Schéma 2.2b).³⁹ Cette stratégie a ainsi été appliquée aux D-arabinofuranosides **2.5** et **2.7** afin d'obtenir les nucléosides 1',2'-*cis* **2.6** et **2.8** respectivement, soit les anomères β correspondants.

Schéma 2.2 *N*-glycosylation par déplacement de type S_N2 d'une paire d'ions^{38,39}

a) Sugimura et collaborateurs

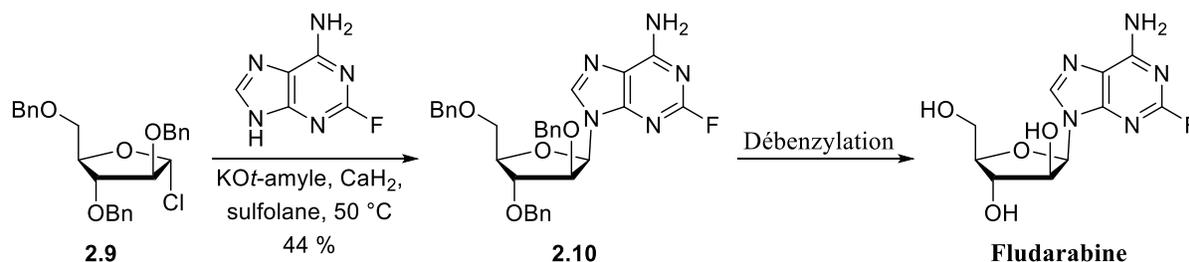


b) Hanessian et collaborateurs



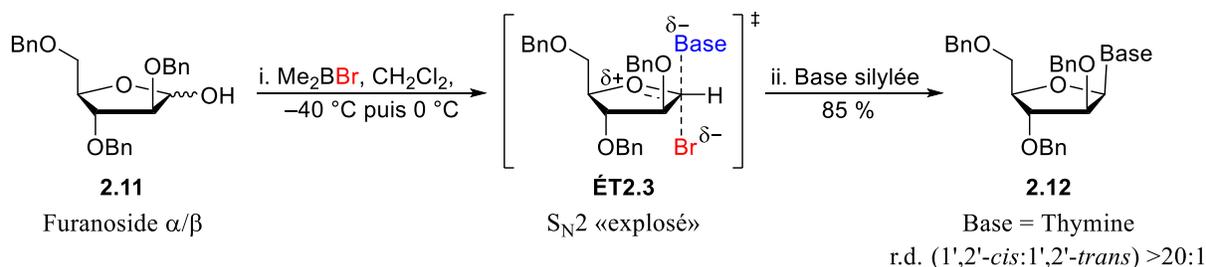
Une autre stratégie consiste en le déplacement d'un halogénure anomérique (chlorure, bromure) afin de générer des nucléosides 1',2'-*cis*.³⁵ L'usage du chloroarabino-**2.9** est effectivement répandu afin d'obtenir une inversion de configuration à la position anomérique en des conditions favorisant un déplacement de type S_N2 par des pyrimidines ou des purines.⁴⁰ Cet haloacétal, décrit comme étant majoritairement l'anomère α-chloré, a été utilisé dans les premières synthèses de la fludarabine par Montgomery et ses collaborateurs.⁴¹ Une approche plus directe a été réalisée, par Schulmeier et ses collègues, avec l'optimisation de la condensation de la 2-fluoroadénine avec ce même composé **2.9** (Schéma 2.3).⁴² L'usage d'un tel milieu hétérogène ou, dans certains cas, l'usage d'un système biphasique est nécessaire afin d'augmenter la réactivité des bases azotées non silylées ou non protégées (peu solubles) et atteindre de bonnes sélectivités.^{35,42,43} Le composé **2.10** est alors généré depuis le chloroarabino-**2.9** avec une sélectivité appréciable (6,7:1 en faveur de l'anomère β pour le mélange réactionnel brut) et un rendement de 44 % après recristallisation (Schéma 2.3).⁴²

Schéma 2.3 *N*-glycosylation par déplacement d'un chlorure anomérique⁴²



Une étude approfondie de l'addition sur des bromoéthers pour générer des nucléosides 1',2'-*cis* a été menée par le laboratoire du professeur Guindon (Schéma 2.4).⁴⁴ Une activation du furanoside **2.11** avec le bromure de diméthylbore (Me_2BBr), suivie par l'addition d'une pyrimidine silylée à 25 °C mène au composé **2.12** avec un rapport diastéréomérique très élevé (>20:1) selon un état de transition $\text{S}_{\text{N}}2$ dit «explosé» (**ÉT2.3**). Bien que la bromation mène à des mélanges de bromofuranosides 1,2-*cis* et 1,2-*trans* à l'équilibre, la *N*-glycosylation s'effectue préférentiellement et plus rapidement sur le bromure anomérique 1,2-*trans*. En plus d'être applicable aux furanosides de la série D (arabino-, ribo-, lyxo-, xylo-) avec un groupe benzyloxy (OBn) en C2, la méthodologie a été utilisée pour des lactols ayant un groupe *tert*-butyl(diméthyl)silyloxy (OTBS) ou un atome de fluor en cette position C2. Des sélectivités remarquables (allant de 10:1 à plus de 20:1) ont aussi été obtenues pour la formation des composés 1',2'-*cis* correspondants.

Schéma 2.4 *N*-glycosylation en présence de bromure de diméthylbore⁴⁴

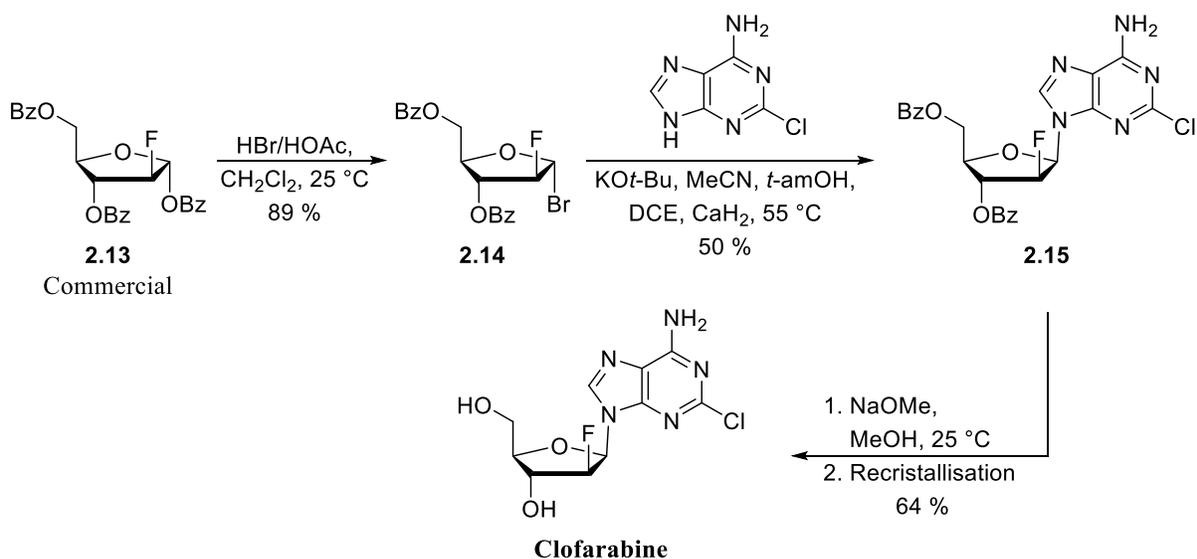


2.2.1.2 Voie cyclique : stratégies de *N*-glycosylation de furanosides C2-monofluorés

En l'absence d'un groupe alkoxy à la position C2 des furanosides, les défis synthétiques sont plus importants, notamment pour les 2'-désoxynucléosides et les 2'-fluoronucléosides. Les analogues de nucléosides C2'-fluorés présentent un intérêt particulier en synthèse. Plusieurs d'entre eux sont utilisés à des fins thérapeutiques (agents anti-cancer et antiviraux) en lien avec la stabilité du lien glycosidique en conditions d'hydrolyse.⁴⁵

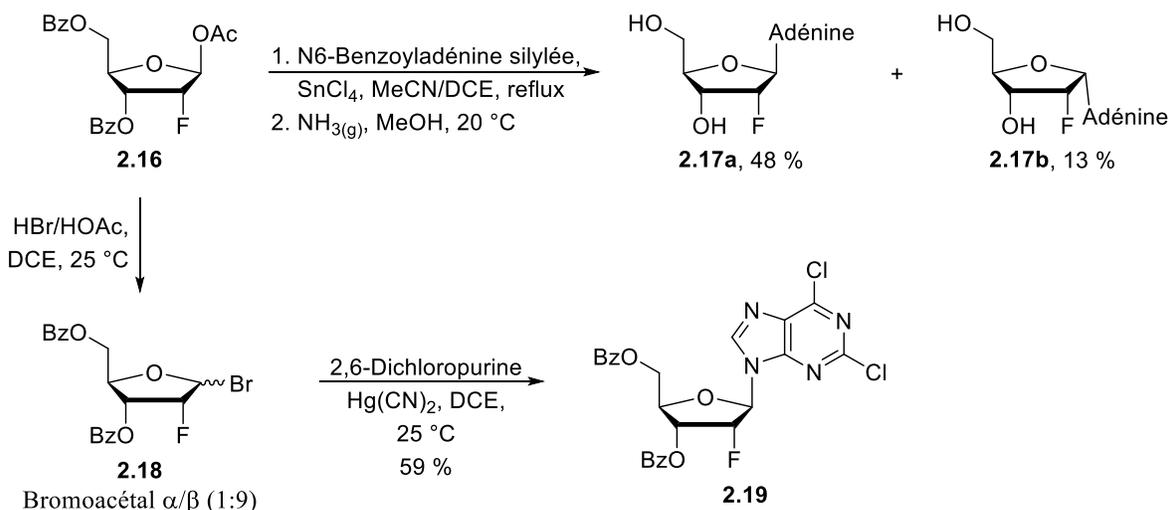
L'approche synthétique de prédilection dans l'atteinte des nucléosides 1',2'-*cis* consiste en le déplacement d'un bromure anomérique par des pyrimidines, mais également des purines.⁴⁶⁻⁴⁹ Cette stratégie a été utilisée au cours de la première synthèse de la clofarabine par Montgomery et ses collègues.⁵⁰ Elle est d'ailleurs toujours utilisée dans la synthèse commerciale sur grande échelle au Schéma 2.5.⁵¹ En effet, le furanoside α -bromé **2.14**⁴⁸, qui est formé exclusivement lors de la bromation en milieu acide du substrat commercial **2.13** (2-désoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranose), permet de générer le nucléoside **2.15**. La sélectivité obtenue du couplage direct de la 2-chloroadénine est de 15:1 en faveur de l'anomère β (d'après l'analyse rapportée pour le mélange réactionnel brut).⁵¹

Schéma 2.5 Synthèse commerciale de la clofarabine par *N*-glycosylation d'un bromoacétal⁵¹



En ce qui a trait à la préparation des analogues 1',2'-*trans*, quelques stratégies ont été développées et sont présentées au Schéma 2.6.^{52,53} L'une d'entre elles consiste en l'activation de la position anomérique du glycoside **2.16** en présence de SnCl₄, laquelle est suivie par le couplage avec la base silylée.⁵² À la suite du retrait des groupes benzoyles, le rendement obtenu pour le nucléoside 1',2'-*trans* **2.17a** est de 48 %, alors qu'il n'est que de 13 % pour le nucléoside 1',2'-*cis* **2.17b**. D'autre part, le bromoacétal **2.18**, qui provient de la bromation du composé **2.16**, est utilisé pour le couplage de la 2,6-dichloropurine en présence de cyanure de mercure (II).⁵³ L'analogue 1',2'-*trans* **2.19** est obtenu majoritairement à hauteur de 59 %.

Schéma 2.6 *N*-glycosylation menant aux C2'-fluoronucléosides 1',2'-*trans*.^{52,53}

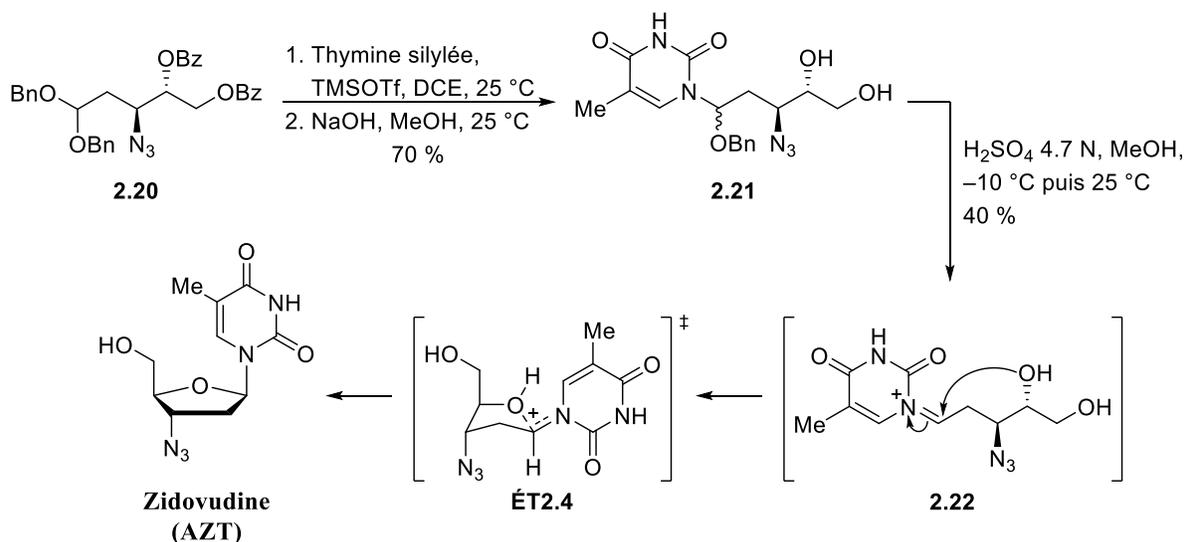


2.2.1.3 Voie acyclique : stratégies de *N*-glycosylation

Cette stratégie offre une alternative efficace pour la synthèse des nucléosides par l'introduction de la base azotée sur un intermédiaire acyclique, suivie d'une cyclisation intramoléculaire. L'un des premiers exemples employant cette stratégie a été rapporté par Hager et Liotta pour la synthèse de la zidovudine (AZT), qui est un agent antiviral utilisé pour le traitement du VIH et dépourvu d'un groupement discriminant à la position C2' (Schéma 2.7).⁵⁴ Le couplage de la thymine silylée sur l'acétal **2.20** en présence de TMSOTf mène à la formation d'un mélange diastéréomérique d'aminals. Après le retrait des groupes benzoyles, le

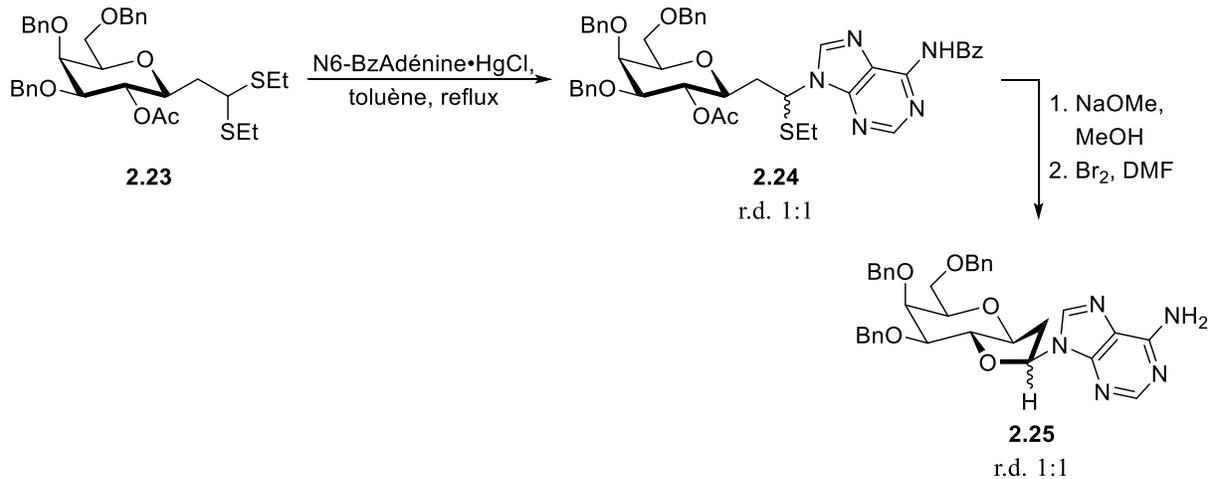
mélange d'aminals **2.21** est activé en milieu acide afin d'induire la formation de l'iminium **2.22** et une cyclisation intramoléculaire sélective (**ÉT2.4**) menant à l'anomère β .

Schéma 2.7 Synthèse stéréosélective de l'AZT par voie acyclique⁵⁴



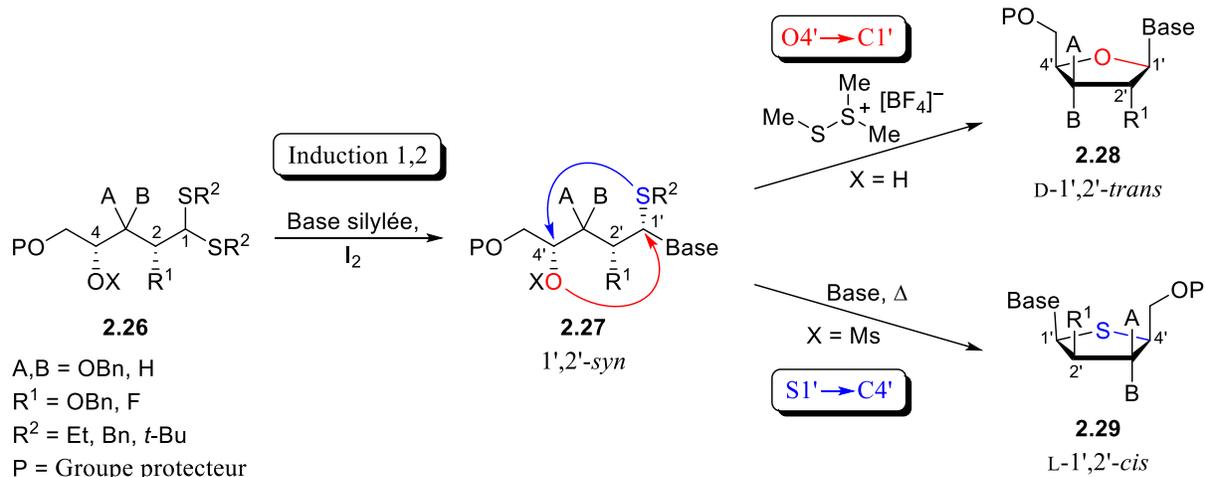
Le groupe du professeur Hanessian a également effectué le couplage d'une base azotée sur un intermédiaire acyclique et sa cyclisation subséquente pour la synthèse d'antibiotiques nucléosidiques (Schéma 2.8).⁵⁵ L'addition de l'adénine protégée d'un groupe benzoyle sur le diéthylthioacétal **2.23** mène à la formation d'un mélange de thioaminals **2.24** (ratio diastéréomérique de 1:1). Le retrait de l'acétyle (de même que le benzoyle de l'adénine) est suivi par l'étape de cyclisation en présence d'un agent activant. En employant le brome (Br₂) comme agent thiophile, le système bicyclique **2.25** est généré en un mélange diastéréomérique.

Schéma 2.8 Synthèse et cyclisation d'un intermédiaire thioaminal⁵⁵



Laisant entrevoir beaucoup de flexibilité, la voie acyclique a par la suite été développée par le laboratoire du professeur Guindon afin d'offrir un contrôle diastéréosélectif lors du couplage de la base azotée, ainsi qu'une cyclisation intramoléculaire selon un mécanisme de type S_N2 (Schéma 2.9).⁵⁶⁻⁵⁸ La première partie de la stratégie implique le couplage diastéréosélectif de la base azotée sur un dithioacétal acyclique activé en présence d'iode. L'information stéréochimique contenue en position C2 du dithioacétal **2.26** permet d'induire une addition diastéréosélective et la formation du produit majoritaire 1',2'-*syn* **2.27**. La seconde partie de la stratégie repose quant à elle sur la cyclisation du thioaminal **2.27** selon un mécanisme « S_N2 -like» afin de préserver la chiralité. Deux modes de cyclisation sont dès lors possibles : une inversion de configuration en C1' menant au furanoside **2.28** ou une inversion de configuration en C4' menant au thiofuranoside **2.29**. La cyclisation O4'→C1' implique l'oxygène nucléophile en C4' et le déplacement du thioéther activé en présence de $Me_2S(SMe)BF_4$, tandis que la cyclisation S1'→C4' implique le déplacement d'un mésylate par le soufre nucléophile en C1' et sa désalkylation au cours de la réaction. L'information stéréochimique désirée peut ainsi être obtenue au sein des nucléosides et thionucléosides cibles par l'usage de cette voie acyclique.

Schéma 2.9 Voie de synthèse acyclique pour l'atteinte de nucléosides et thionucléosides⁵⁶⁻⁵⁸



Cette stratégie a été appliquée notamment à la synthèse des furanosides de la série D (arabino-, ribo-, lyxo-, xylo-), mais également aux thiofuranosides de la série L (thioarabino-, thioribo-, thioxylo-, thioxylo-) comportant un groupe C2'-benzyloxy.⁵⁶ La diastéréosélectivité lors de la cyclisation des thioaminals minoritaires 1',2'-*anti* est également maintenue dans les deux modes de cyclisation (O4'→C1' et S1'→C4'). De plus, une application extensive de la méthodologie a été récemment réalisée sur des substrats acycliques comportant un atome de fluor pour la préparation de furanosides et thiofuranosides en série D.⁵⁷ Les précurseurs acycliques fonctionnalisés sont ainsi des intermédiaires forts utiles dans la préparation des analogues de nucléosides.

2.2.2 Approche divergente : fonctionnalisation de N-glycosides

Cette approche est, pour sa part, caractérisée par l'usage d'un nucléoside comportant un lien glycosidique de stéréochimie établie. En effet, les modifications ont généralement lieu sur la partie glucidique des substrats et ce, sans altération du lien glycosidique en cours de synthèse.³² Les nucléosides naturels constituent un bassin utile, mais limité, de molécules pouvant être exploitées dans la préparation de nouveaux analogues. Des nucléosides non naturels possédant également un lien glycosidique prédéfini deviennent de plus en plus accessibles commercialement, puisqu'ils sont des intermédiaires synthétiques nécessaires à la

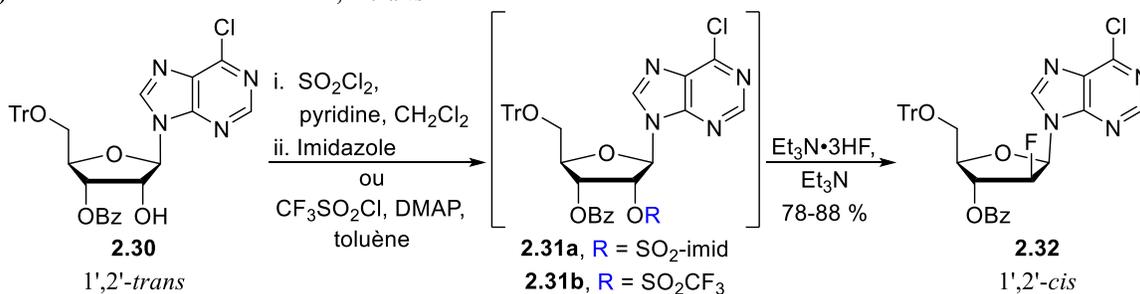
préparation sur grande échelle d'agents thérapeutiques. Malgré la faible variété de structures accessibles et le peu de flexibilité découlant de cette approche, celle-ci laisse tout de même entrevoir certains avantages sur le plan synthétique.

2.2.2.1 Fluoration de *N*-glycosides : synthèse de nucléosides C2'-monofluorés

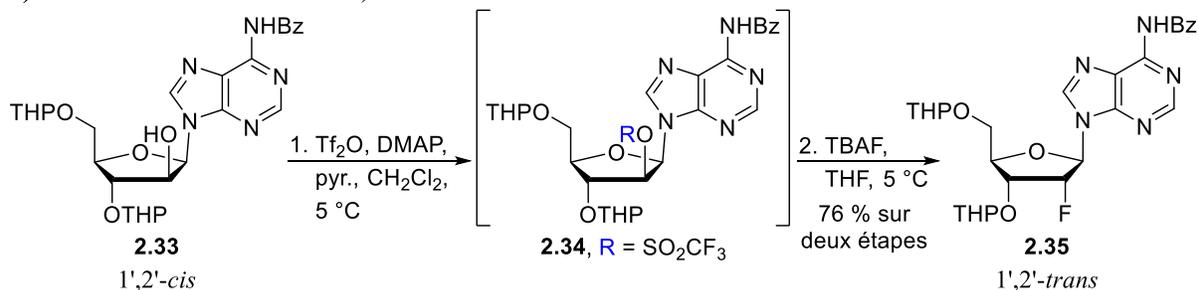
Les nucléosides comportant un atome de fluor en position C2' peuvent, en plus des stratégies convergentes, être synthétisés en employant des intermédiaires possédant déjà une base azotée. La stratégie de fluoration consiste en le déplacement d'un groupe partant par une source nucléophile de fluor. D'abord, le nucléoside **2.30** peut être converti en son analogue fluoré 1',2'-*cis* **2.32** avec le déplacement d'un groupe imidzolesulfonate (**2.31a**) ou triflate (**2.31b**) en présence de 3HF•NEt₃ (Schéma 2.10a).⁵⁹ Une autre alternative consiste en l'usage du réactif DAST qui permet d'obtenir directement le nucléoside **2.32** depuis le composé **2.30**.⁵⁹ Ensuite, le nucléoside **2.33** peut être converti en son analogue fluoré 1',2'-*trans* **2.35** avec le déplacement d'un triflate (**2.34**) en présence de TBAF (Schéma 2.10b).⁶⁰

Schéma 2.10 Synthèse de nucléosides C2'-fluorés 1',2'-*cis* et 1',2'-*trans*^{59,60}

a) Fluoration d'un nucléoside 1',2'-*trans*



b) Fluoration d'un nucléoside 1',2'-*cis*

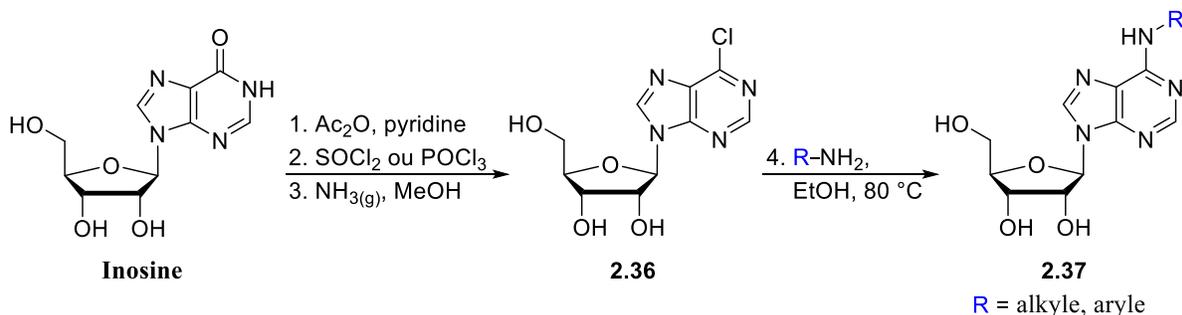


2.2.2.2 Synthèse d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine

L'approche divergente est répandue dans la synthèse des sondes chimiques basées sur la structure de *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM), puisqu'elle permet d'ajouter de nouvelles chaînes latérales et d'atteindre rapidement de nouveaux analogues. Parmi les molécules de départ préconisées se trouvent l'inosine et l'adénosine, des ribosides naturels ayant une base purique.

D'abord, l'inosine est un nucléoside résultant de l'association d'un ribose et d'une base azotée hypoxanthine. Son utilisation en début de synthèse permet de diversifier les substituants de la base azotée en position N6 de la purine (Schéma 2.11).⁶¹⁻⁶³ La méthode consiste en ces quatre étapes : 1) la protection des trois groupes hydroxyles du furanoside avec l'anhydride acétique; 2) la chloration de la purine en présence de chlorure de thionyle (SOCl₂) ou de trichlorure de phosphore (POCl₃); 3) le clivage des groupes protecteurs; 4) le déplacement du chlorure en position C6 par l'usage d'une amine en présence ou non d'une base (Et₃N, DIPEA). Les rendements associés à ces quelques étapes sont généralement très élevés. Il est aussi possible d'utiliser une dialkylamine pour l'obtention d'une position N6 doublement substituée.⁶³ L'analogue **2.37** généré peut alors contenir un large éventail de groupes alkyles et aryles.

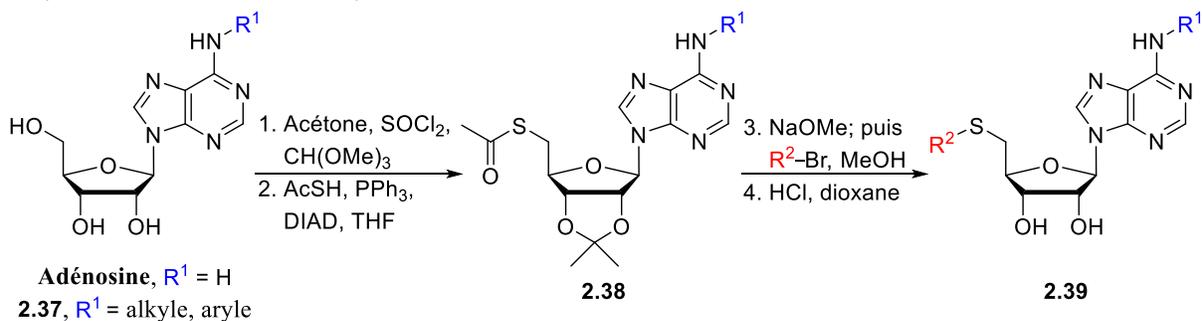
Schéma 2.11 Méthodes de synthèse de dérivés N6-substitués de l'adénosine⁶¹⁻⁶³



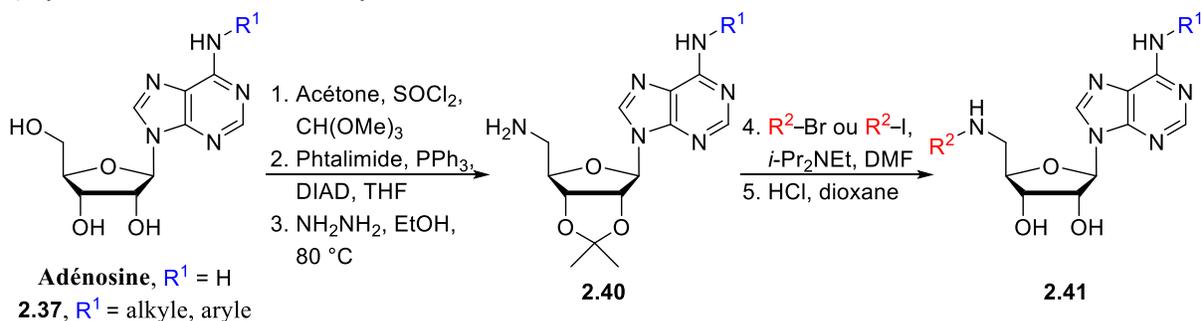
Ensuite, l'adénosine et ses dérivés N6-substitués sont les précurseurs permettant l'accès à bon nombre de modifications en position C5'. Dans une étude de la relation structure-activité pour l'inhibition de DOT1L, une lysine méthyltransférase, Anglin et ses collègues ont employé une méthode générale (Schéma 2.12) permettant une synthèse de dérivés substitués C5'-S (**2.39**) et C5'-N (**2.41**).⁶² Après la protection des hydroxyles en C2' et C3', la réaction de Mitsunobu permet une substitution de la position C5' avec l'acide thioacétique ou le phtalamide. Dans le premier cas, l'hydrolyse du thioester **2.38** est suivie par l'alkylation (avec R₂-Br, où R₂ est un groupe alkyle fonctionnalisé). Dans le second cas, un traitement avec l'hydrazine permet d'obtenir l'intermédiaire **2.40** qui est sollicité pour l'alkylation. Dès lors, la dernière étape ne requiert que le retrait de l'acétonide en milieu acide.

Schéma 2.12 Méthodes générales de fonctionnalisation en C5' de dérivés de l'adénosine⁶²

a) Synthèse de dérivés C5'-S alkylés

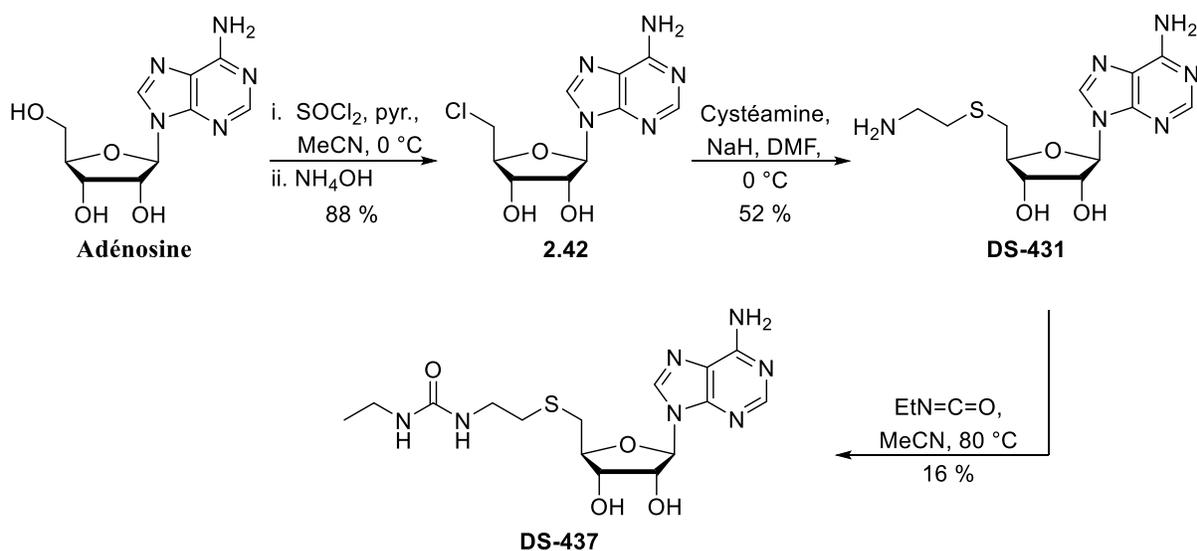


b) Synthèse de dérivés C5'-N alkylés



En d'autres circonstances, il est aussi possible de fonctionnaliser la partie latérale d'un nucléoside sans le recours à des groupes protecteurs. Par exemple, en effectuant l'halogénéation de l'hydroxyle primaire en position C5' avec l'usage du chlorure de thionyle ou la réaction d'Appel (PPh₃ avec I₂ ou CBr₄), puis en effectuant la substitution de l'halogénure (Cl, Br, I) par un nucléophile.^{62,64-67} Cette stratégie a notamment été employée pour la synthèse du nucléoside DS-437 (Schéma 2.13), qui est un analogue de SAM et un inhibiteur des protéines arginine méthyltransférases PRMT5 et PRMT7.⁶⁴ Sa préparation a nécessité une courte séquence linéaire de trois étapes depuis l'adénosine, disponible commercialement. La chloration de l'adénosine en position C5' menant à l'intermédiaire **2.42** est suivie par le déplacement du chlorure par la cystéamine (DS-431). Le soufre étant plus nucléophile en ces conditions, celui-ci permet de fonctionnaliser la partie latérale de la molécule avec la présence d'une amine en bout de chaîne. La réaction du composé DS-431 avec l'isocyanate d'éthyle génère alors DS-437, où une portion latérale comprenant une fonctionnalité urée a été obtenue sans l'usage de groupements protecteurs.

Schéma 2.13 Synthèse de l'inhibiteur de protéines arginine méthyltransférases DS-437⁶⁴



2.3 Conclusion et perspectives de recherche

Les analogues de nucléosides représentent une importante classe de biomolécules ayant diverses applications médicales. Au cours de ce chapitre, diverses stratégies de modification et méthodes de synthèse ont été présentées. Celles-ci permettent d'avoir accès aux *N*-glycosides comportant divers groupes fonctionnels selon les approches qui conviennent le mieux. Les nucléosides arabinosides et ribosides comportant un fluor ou un hydroxyle en position C2', de même que certains C2'-désoxynucléosides, trouvent des applications biologiques pour le traitement du cancer, mais également pour le traitement des infections virales. Ils possèdent ainsi un profil structural intéressant dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Les analogues de nucléosides sont modifiés (au sein du furanoside, de la base azotée, de la portion latérale en C5', etc.) afin de leur permettre d'entrer en compétition avec leurs homologues naturels. Bien que la décitabine et l'azacytidine soient présentement les deux médicaments les plus avancés pour la thérapie épigénétique et le traitement du cancer, le développement d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) est en plein essor dans ce domaine avec la conception de sondes chimiques et l'avancement de candidats en études cliniques. La synthèse d'analogues de SAM et leur application pour l'inhibition de protéines méthyltransférases (PMTs) sera le sujet de la première partie de ce manuscrit (Chapitres 3 à 6). La seconde partie de cet ouvrage (Chapitre 7), pour sa part, vise la synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides C2'-fluorés possédant un centre quaternaire et la découverte de molécules interférant avec la prolifération des cellules cancéreuses du pancréas.

2.4 Références

1. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
2. Shao, J.; Zhou, B.; Chu, B.; Yen, Y. *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 409-431.
3. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 415-424.
4. Tsume, Y.; Hilfinger, J. M.; Amidon, G. L. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 717-727.

5. Cohen, M. H.; Johnson, J. R.; Massie, T.; Sridhara, R.; McGuinn, W. D. Jr.; Abraham, S.; Booth, B. P.; Goheer, M. A.; Morse, D.; Chen, X. H.; Chidambaram, N.; Kenna, L.; Gobburu, J. V.; Justice, R.; Pazdur, R. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5329-5335.
6. (a) Sabini, E.; Ort, S.; Monnerjahn, C.; Konrad, M.; Lavie, A. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 513-519; (b) Zhang, Y.; Secrist III, J. A.; Ealick, S. E. *Acta Cryst.* **2006**, *D62*, 133-139; (c) Sabini, E.; Hazra, S.; Konrad, M.; Lavie, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3004-3014.
7. (a) Parker, W. B.; Shaddix, S. C.; Chang, C.-H.; White, E. L.; Rose, L. M.; Brockman, R. W.; Shortnacy, A. T.; Montgomery, J. A.; Secrist III, J. A.; Bennett Jr., L. L. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2386-2394; (b) Pui, C.-H.; Jeha, S.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 369-370; (c) Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Cantrell Jr.; W. R.; Stephenson, K.; Secrist III, J. A.; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 855-863; (d) Zenchuk, A.; Lotfi, K.; Juliusson, G.; Albertioni, F. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 1351-1359.
8. Waud, W. R.; Gilbert, K. S.; Shepherd, R. V.; Montgomery, J. A.; Secrist, J. A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *51*, 422-426.
9. Richardson, K. A.; Vega, T. P.; Richardson, F. C.; Moore, C. L.; Rohloff, J. C.; Tomkinson, B.; Bendele, R. A.; Kuchta, R. D. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2337-2346.
10. Someya, H.; Waud, W. R.; Parker, W. B. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *57*, 772-780.
11. Roy, A. M.; Tiwari, K. N.; Parker, W. B.; Secrist, J. A., 3rd; Li, R.; Qu, Z. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2218-2224.
12. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
13. Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2211-2226.
14. Slusarczyk, M.; Lopez, M. H.; Balzarini, J.; Mason, M.; Jiang, W. G.; Blagden, S.; Thompson, E.; Ghazaly, E.; McGuigan, C. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1531-1542.

15. Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; Siegel, D.; Perron, M.; Bannister, R.; Hui, H. C.; Larson, N.; Strickley, R.; Wells, J.; Stuthman, K. S.; Van Tongeren, S. A.; Garza, N. L.; Donnelly, G.; Shurtleff, A. C.; Retterer, C. J.; Gharaibeh, D.; Zamani, R.; Kenny, T.; Eaton, B. P.; Grimes, E.; Welch, L. S.; Gomba, L.; Wilhelmsen, C. L.; Nichols, D. K.; Nuss, J. E.; Nagle, E. R.; Kugelman, J. R.; Palacios, G.; Doerffler, E.; Neville, S.; Carra, E.; Clarke, M. O.; Zhang, L.; Lew, W.; Ross, B.; Wang, Q.; Chun, K.; Wolfe, L.; Babusis, D.; Park, Y.; Stray, K. M.; Trancheva, I.; Feng, J. Y.; Barauskas, O.; Xu, Y.; Wong, P.; Braun, M. R.; Flint, M.; McMullan, L. K.; Chen, S.-S.; Fearn, R.; Swaminathan, S.; Mayers, D. L.; Spiropoulou, C. F.; Lee, W. A.; Nichol, S. T.; Cihlar, T.; Bavari, S. *Nature* **2016**, *531*, 381-385.
16. Derissen, E. J. B.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *The Oncologist* **2013**, *18*, 619-624.
17. Jones, P. A.; Taylor, S. M. *Cell* **1980**, *20*, 85-93.
18. Stresemann, C.; Lyko, F. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8-13.
19. Raynal, N. J.-M.; Issa, J.-P. J. Chapter 7 – DNA Methyltransferase Inhibitors. In *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*; Academic Press : Boston, 2016; pp. 169-190.
20. Robertson, K. D. *Oncogene* **2001**, *20*, 3139-3155.
21. Lewandowska, J.; Bartoszek, A. *Mutagenesis* **2011**, *26*, 475-487.
22. Yang, X.; Lay, F.; Han, H.; Jones, P. A. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 536-546.
23. Gnyszka, A.; Jastrzębski, Z.; Flis, S. *Anticancer Res.* **2013**, *33*, 2989-2996.
24. Osterman, D. G.; DePillis, G. D.; Wu, J. C.; Matsuda, A.; Santi, D. V. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5204-5210.
25. Chen, L.; MacMillan, A. M.; Chang, W.; Ezaz-Nikpay, K.; Lane, W. S.; Verdine, G. L. *Biochemistry* **1991**, *30*, 11018-11025.
26. Cheng, X. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 4-10.

27. (a) Beumer, J. H.; Parise, R. A.; Newman, E. M.; Doroshow, J. H.; Synold, T. W.; Lenz, H.-J.; Egorin, M. J. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *62*, 363-368; (b) Zhao, Q.; Fan, J.; Hong, W.; Li, L.; Wu, M. *SpringerPlus* **2012**, *1*, 65-75.
28. (a) Yoo, C. B.; Jeong, S.; Egger, G.; Liang, G.; Phiasivongsa, P.; Tang, C.; Redkar, S.; Jones, P. A. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6400-6408; (b) Chuang, J. C.; Warner, S. L.; Vollmer, D.; Vankayalapati, H.; Redkar, S.; Bearss, D. J.; Qiu, X.; Yoo, C. B.; Jones, P. A. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1443-1450; (c) Griffiths, E. A.; Choy, G.; Redkar, S.; Taverna, P.; Azab, M.; Karpf, A. R. *Drugs Future* **2013**, *38*, 535-543; (d) Srivastava, P.; Paluch, B. E.; Matsuzaki, J.; James, S. R.; Collamat-Lai, G.; Karbach, J.; Nemeth, M. J.; Taverna, P.; Karpf, A. R.; Griffiths, E. A. *Leuk. Res.* **2014**, *38*, 1332-1341; (e) Issa, J.-P. J.; Roboz, G.; Rizzieri, D.; Jabbour, E.; Stock, W.; O'Connell, C.; Yee, K.; Tibes, R.; Griffiths, E. A.; Walsh, K.; Daver, N.; Chung, W.; Naim, S.; Taverna, P.; Oganessian, A.; Hao, Y.; Lowder, J. N.; Azab, M.; Kantarjian, H. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 1099-1110.
29. Yoo, C. B.; Cheng, J. C.; Jones, P. A. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 910-912.
30. Cheng, J. C.; Matsen, C. B.; Gonzales, F. A.; Ye, W.; Greer, S.; Marquez, V. E.; Jones, P. A.; Selker, E. U. *J. Natl Cancer Inst.* **2003**, *95*, 399-409.
31. Thottassery, J. V.; Sambandam, V.; Allan, P. W.; Maddry, J. A.; Maxuitenko, Y. Y.; Tiwari, K.; Hollingshead, B. P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74*, 291-302.
32. Wilson, J. L.; Hager, M. W.; El-Kattan, Y. A.; Liotta, D. C. *Synthesis* **1995**, 1465-1479.
33. (a) Garner, P.; Ramakanth, S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1294-1298; (b) Li, N.-S.; Piccirilli, J. A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4018-4020.
34. (a) Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3654-3660; (b) Vorbrüggen, H.; Höfle, G. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256-1268; (c) Vorbrüggen, H. *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 25-36.

35. (a) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. Synthesis of Nucleosides. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons : New York, 2000; vol. 55; (b) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis*; John Wiley & Sons : New York, 2001.
36. Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 4489-4494.
37. Guo, J.; Ye, X.-S. *Molecules* **2010**, *15*, 7235-7265.
38. Sugimura, H.; Muramoto, I.; Nakamura, T.; Osumi, K. *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 169-172.
39. Hanessian, S.; Condé, J. J.; Lou, B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5865-5868.
40. (a) Glaudemans, C. P. J.; Fletcher Jr., H. G. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3004-3006; (b) Glaudemans, C. P. J.; Fletcher Jr., H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2456-2461; (c) Glaudemans, C. P. J.; Fletcher Jr.; H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4636-4641; (d) Shen, T. Y.; Lewis, H. M.; Ruyle, W. V. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 835-838; (e) Keller, F.; Tyrrill, A. R. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1289-1291; (f) Keller, F.; Sugisaka, N.; Tyrrill, A. R.; Brown, L. H.; Bunker, J. E.; Botvinick, I. J. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3842-3843.
41. (a) Montgomery, J. A.; Hewson, K. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 498-504; (b) Montgomery, J. A.; Clayton, S. D.; Shortnacy, A. T. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, *16*, 157-160.
42. Schulmeier, B. E.; Cantrell Jr., W. R.; Bauta, W. E. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25*, 735-745.
43. Seela, F.; Winkeler, H.-D. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 226-230.
44. Prévost, M.; St-Jean, O.; Guindon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12433-12439.
45. (a) Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C. K. *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 743-766; (b) Qiu, X.-L.; Xu, X.-H.; Qing, F.-L. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 789-843; (c) Wójtowicz-Rajchel, H. *J. Fluor. Chem.* **2012**, *143*, 11-48.
46. Tann, C. H.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Sapino Jr., C.; Howell, H. G. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3644-3647.

47. Montgomery, J. A.; Shortnacy, A. T.; Carson, D. A.; Secrist III, J. A. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2389-2392.
48. Howell, H. G.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Benigni, D. A.; Sapino Jr., C. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.
49. Schärer, O. D.; Verdine, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10781-10782.
50. Montgomery, J. A.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Clayton, S. D.; Riordan, J. M.; Secrist III, J. A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 397-401.
51. (a) Bauta, W. E.; Schulmeier, B. E.; Burke, B.; Puente, J. F.; Cantrell Jr., W. R.; Lovett, D.; Goebel, J.; Anderson, B.; Ionescu, D.; Guo, R. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 889-896; (b) Anderson, B. G.; Bauta, W. E.; Cantrell Jr., Engles, T.; Lovett, D. P. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1229-1237.
52. Mikhailopulo, I. A.; Sivets, G. G.; Poopeiko, N. E.; Khripach, N. B. *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 71-89.
53. Thomas, H. J.; Tiwari, K. N.; Clayton, S. J.; Secrist III, J. A.; Montgomery, J. A. *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 309-323.
54. Hager, M. W.; Liotta, D. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5117-5119.
55. Hanessian, S.; Dixit, D. M.; Liak, T. J. *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 129-148.
56. Chapdelaine, D.; Cardinal-David, B.; Prévost, M.; Gagnon, Thumin, I.; Guindon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17242-17245.
57. Dostie, S.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Tanveer, K.; Andrella, N.; Rostami, A.; Tambutet, G.; Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10769-10790.
58. Guindon, Y.; Gagnon, M.; Thumin, I.; Chapdelaine, D.; Jung, G.; Guérin, B. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 241-244.
59. Izawa, K.; Takamatsu, S.; Katayama, S.; Hirose, N.; Kozai, S.; Maruyama, T. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 507-517.
60. Kawasaki, A. M.; Casper, M. D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Zounes, M. C.; Cummins, L. L.; Gonzalez, C.; Cook, P. D. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841.

61. Mathew, S. C.; Ghosh, N.; By, Y.; Berthault, A.; Virolleaud, M.-A.; Carrega, L.; Chouraqui, G.; Commeiras, L.; Condo, J.; Attolini, M.; Gaudel-Siri, A.; Ruf, J.; Parrain, J.-L.; Rodriguez, J.; Guieu, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6736-6739.
62. Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8066-8074.
63. Bhattarai, S.; Freundlieb, M.; Pippel, J.; Meyer, A.; Abdelrahman, A.; Fiene, A.; Lee, S.-Y.; Zimmermann, H.; Yegutkin, G. G.; Sräter, N.; El-Tayeb, A.; Müller, C. E. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6248-6263.
64. Smil, D.; Eram, M. S.; Li, F.; Kennedy, S.; Szewczyk, M. M.; Brown, P. J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Schapira, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 408-412.
65. Liu, T.; Ren, H.; Li, C.; Chen, G.; Cheng, M.; Zhao, D.; Shen, J.; Li, J.; Zhou, Y.; Xiong, B.; Chen, Y.-L. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 415-417.
66. Bothwell, I. R.; Luo, M. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3056-3059.
67. (a) Perchyonok, V. T. *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 337-340. (b) Kóšiová, I.; Buděšínský, M.; Panova, N.; Rosenberg, I. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2856-2860.

Partie 1

**Synthèse d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine :
développement d'une sonde chimique pour l'inhibition de
méthyltransférases**

Chapitre 3

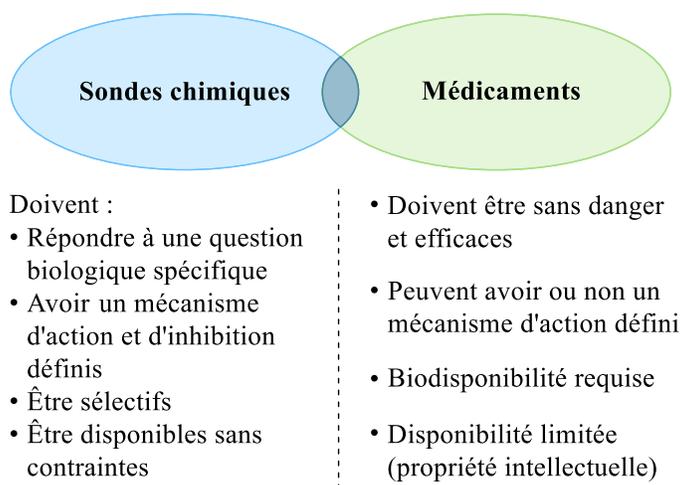
Introduction sur les analogues de SAM utilisés pour l'inhibition de protéines méthyltransférases

3.1 Mise en contexte

Au cours de la dernière décennie, le domaine de la chimie biologique a connu un engouement considérable avec l'amélioration des technologies de criblage et l'émergence de nouvelles cibles potentielles pour le développement de médicaments.¹ L'étude des systèmes biologiques demeure complexe, mais essentielle dans la compréhension de la biologie humaine et le traitement des maladies. Afin d'élucider les mécanismes d'interaction entre les biomolécules et le rôle de protéines cibles dans les cellules saines et malades, les outils chimiques (tels que les sondes chimiques, les sondes de photo-affinité, etc.) complètent les outils biologiques et biochimiques (tels que les anticorps, les petits ARN interférents, etc.).^{1,2,3} Dans le cas des sondes chimiques, ce sont de puissants atouts dans la recherche de nouvelles médications si elles sont bien caractérisées (Figure 3.1): il s'agit de petites molécules sélectives capables de moduler la fonction de la protéine cible et ce, dans le but de fournir des réponses mécanistiques et phénotypiques.¹ Un large éventail et une caractérisation adéquate des sondes chimiques permettra l'approfondissement des connaissances sur les cibles enzymatiques dans l'objectif de développer des médicaments sur les cibles choisies. Depuis quelques années, l'activité enzymatique de plusieurs protéines impliquées dans la régulation du génome a été reliée à diverses maladies, notamment le cancer, les maladies inflammatoires et les maladies neurodégénératives.⁴

Dans ce contexte, en collaboration avec le SGC (*Structural Genomics Consortium*) de Toronto et à travers le programme *CREATE ChemNET* soutenu par le CRSNG, notre laboratoire s'intéresse au développement d'inhibiteurs potentiels de cibles épigénétiques.

Figure 3.1 Caractéristiques des sondes chimiques et des médicaments (modifiée à partir d'Arrowsmith *et al.*)¹



3.2 Facteurs épigénétiques : la méthylation de l'ADN et les modifications de l'histone

3.2.1 La régulation du génome et l'épigénétique

Chez les organismes pluricellulaires, où la spécialisation des cellules dicte quels gènes seront exprimés au-delà des autres, la grande majorité de l'ADN n'est pas transcrit d'autant plus que certaines portions n'encodent pas pour la synthèse d'ARN et de protéines.⁵ En effet, les mécanismes complexes qui gouvernent la régulation de l'expression des gènes doivent permettre une lecture appropriée (localisation précise dans l'échelle du temps), de manière ni aléatoire ni totalement reprogrammée, afin de moduler la synthèse des produits (ARN et protéines) provenant d'une séquence spécifique d'ADN.⁵ L'épigénétique s'intéresse aux modifications réversibles et transmissibles qui interviennent dans la régulation du génome (mécanismes d'activation ou d'inactivation des gènes) sans le changement de la séquence d'ADN, c'est-à-dire les variations phénotypiques héréditaires qui n'altèrent pas le génotype.^{6,7} Les deux principaux mécanismes qui relèvent de l'épigénétique sont la méthylation de l'ADN et les modifications de l'histone.^{8,9}

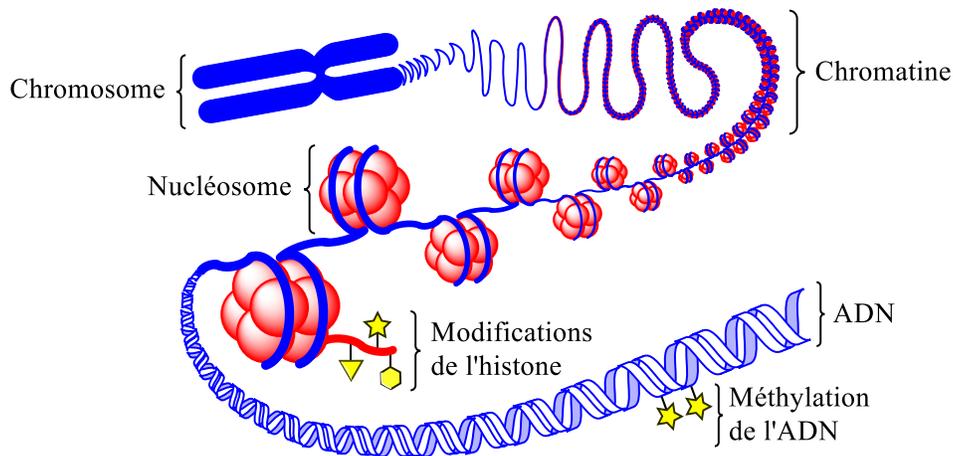
3.2.2 L'histone et l'information génétique

L'information génétique contenue dans la séquence d'ADN d'un organisme doit être organisée de manière à pouvoir être exprimée en fonction des variations des conditions internes et externes à cet organisme. Le génome est condensé et emballé dans plusieurs chromosomes (23 paires de chromosomes chez l'humain), soit un complexe d'ADN et de protéines appelé chromatine.⁵ La portion plus dense de la chromatine, l'hétérochromatine, comporte généralement l'ADN qui ne sera pas exprimé alors que l'euchromatine est une région moins dense comportant les gènes qui seront exprimés.^{5,10}

La chromatine est elle-même composée d'unités appelés nucléosomes (Figure 3.2).^{5,11} Ceux-ci consistent en l'enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones : $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ où H2A, H2B, H3 et H4 sont quatre classes d'histones.⁵ Il existe une cinquième histone, H1, qui est associée de manière différente au nucléosome. Ces dernières, les histones, sont des protéines comportant une proportion suffisante de résidus arginine (Arg, R) et lysine (Lys, K) chargés positivement afin de lier par des forces électrostatiques l'ADN et ses phosphates de charge négative.⁵

La diminution du caractère électropositif de l'histone par son acétylation et/ou sa phosphorylation a pour conséquence l'altération des interactions entre l'histone et l'ADN.⁸ Les modifications chimiques covalentes de l'histone jouent un rôle dans la modulation du degré de condensation de l'ADN et le repositionnement des nucléosomes. Les facteurs de transcription du génome pourront dès lors accéder ou non aux régions condensées de la chromatine.⁵

Figure 3.2 Les degrés d'organisation de l'information génétique et les facteurs épigénétiques (modifiée à partir de Zaidi *et al.*)¹¹



3.2.3 Les modifications post-traductionnelles de l'histone

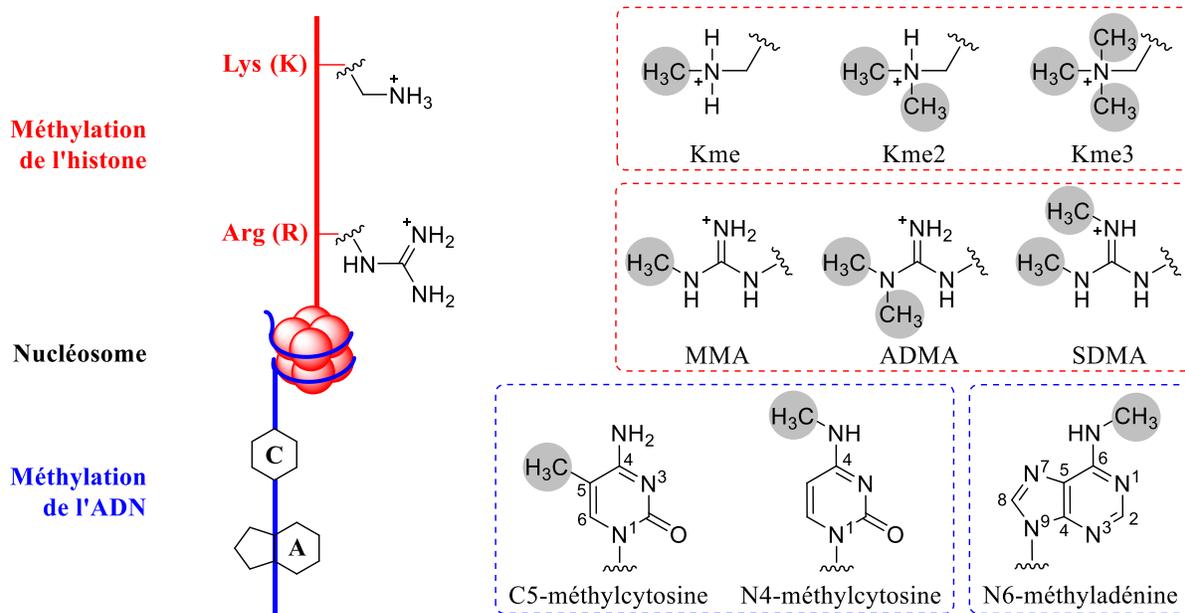
Les modifications chimiques de l'histone, qui peuvent être réversibles, sont dites post-traductionnelles car il s'agit de protéines : elles comprennent l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation, etc.⁸ Différentes enzymes permettent d'écrire, de lire et d'effacer les nombreux facteurs épigénétiques.^{9,12} Par exemple, l'acétylation des résidus lysines est un processus dynamique où le résidu lysine de la chaîne terminale de l'histone est neutralisé par l'ajout d'un groupe acétyle.⁸ Les histones acétyltransférases (HATs), avec l'aide du cofacteur acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA), effectuent l'acétylation. La reconnaissance spécifique et la liaison des résidus acétylés est effectuée par les protéines bromodomaines, puis les histones désacétylases (HDACs) sont responsables du retrait des groupements acétyles. La phosphorylation est également un processus dynamique dans lequel les kinases et les phosphatases sont responsables respectivement de l'ajout et du retrait d'un groupement phosphate sur des résidus sérine (Ser, S), thréonine (Thr, T) et tyrosine (Tyr, Y) contenus sur la chaîne terminale de l'histone.⁸ L'adénosine triphosphate (ATP) est le cofacteur nécessaire aux kinases dans la phosphorylation des substrats en servant de source de phosphate.

Les méthyltransférases (MTases), quant à elles, assurent la méthylation des résidus lysine et arginine de l'histone (histones méthyltransférases, HMTs, ou plus communément les protéines méthyltransférases, PMTs), en plus de la méthylation de l'ADN (ADN méthyltransférases, DNMTs).¹³ La méthylation de l'ADN et les modifications de l'histone sont des processus qui peuvent mutuellement s'influencer : l'histone méthylée peut affecter la manière dont l'ADN est méthylé, et l'ADN méthylé peut dicter la manière dont l'histone est modifiée.¹⁴ Cette classe d'enzymes représente une cible de choix pour le développement de nouveaux inhibiteurs aux propriétés anti-cancer.^{4,12,13,15}

3.3 La méthylation de l'histone et de l'ADN : les méthyltransférases et la dépendance au cofacteur SAM

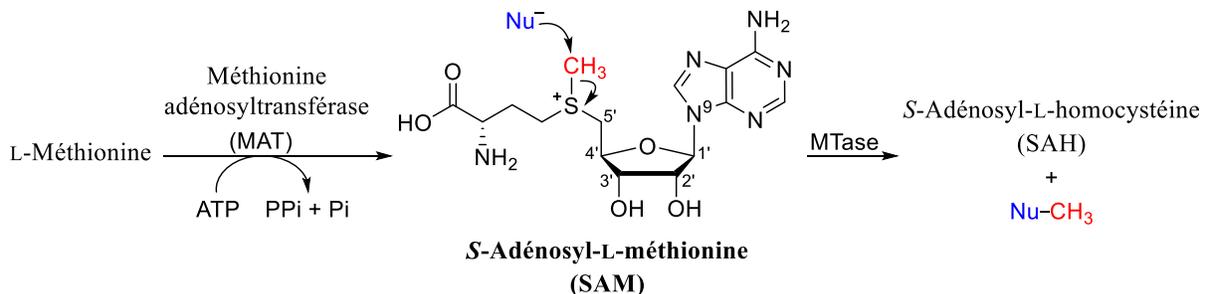
Longtemps considérée comme étant statique, la méthylation de l'histone est un processus pouvant être réversible et qui fait intervenir les protéines méthyltransférases (PMTs).⁸ Les protéines lysine méthyltransférases (PKMTs) et les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs) sont les familles responsables de la méthylation des résidus lysine et arginine de l'histone respectivement et ce, sans modification de la charge positive (Figure 3.3).¹³ Le degré de méthylation dépend du type d'enzyme impliquée : les PKMTs sont responsables de la monométhylation (Kme), diméthylation (Kme2) et/ou la triméthylation (Kme3) du résidu lysine, tandis que les PRMTs sont responsables de la production de monométhylarginine (MMA), de diméthylarginine symétrique (SDMA) et/ou de diméthylarginine asymétrique (ADMA).¹³ Dans le cas de la méthylation de l'ADN par d'autres méthyltransférases (DNMTs), seule la production de C5-méthylcytosine intervient chez l'humain.^{5,13}

Figure 3.3 La méthylation des composants du nucléosome par les méthyltransférases (modifiée à partir de Zhang *et al.*)¹³



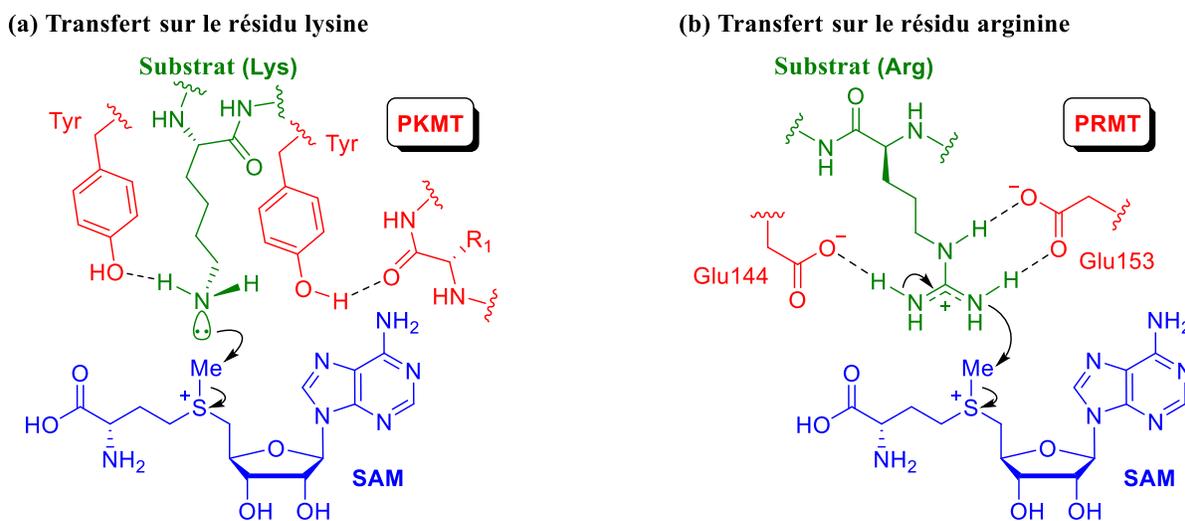
Afin d'effectuer la méthylation du substrat (résidu acide aminé de l'histone ou l'ADN), ces enzymes dépendent du cofacteur *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM), soit un métabolite nucléosidique biosynthétisé par la méthionine adényltransférase avec l'aide de l'adénosine triphosphate (Figure 3.4).¹³ SAM est le donneur d'un groupe méthyle dans la réaction de transfert catalysée par les méthyltransférases. Le sous-produit *S*-adénosyl-L-homocystéine (SAH, AdoHcy) est généré et ce, en plus du produit de méthylation (Figure 3.4).¹³

Figure 3.4 Biosynthèse du cofacteur SAM impliqué dans la réaction de méthylation catalysée par les méthyltransférases (modifiée à partir de Zhang *et al.*)¹³



Les protéines méthyltransférases (PMTs) sont une classe d'enzymes dont le génome humain encode plusieurs PKMTs et PRMTs.⁴ Ces dernières familles d'enzymes possèdent des caractéristiques communes quant à l'architecture de leurs sites actifs catalytiques : il y a un site de liaison pour le cofacteur SAM accessible d'une face de la protéine et un canal hydrophobique étroit pouvant accueillir le résidu acide aminé (substrat/Nu) depuis la face opposée.⁴ La rencontre des deux entités dans le site catalytique est dès lors possible depuis des faces opposées pour le transfert d'un groupe méthyle. Il s'agit d'un mécanisme de substitution nucléophile S_N2 dans lequel la paire d'électrons libres de l'atome d'azote (d'une lysine ou d'une arginine) effectue une attaque sur le cation méthylsulphonium de SAM (Figure 3.5).^{4,6,13}

Figure 3.5 Transfert d'un groupe méthyle aux résidus acides aminés par les protéines méthyltransférases (modifiée à partir de Zheng *et al.* et à partir de Zhang *et al.*)^{6,13}



La surexpression, la mutation et/ou la modification de l'activité enzymatique de plusieurs protéines méthyltransférases PKMTs et PRMTs ont été reliées au cancer.^{4,13,15,16} Les analogues de S-adenosyl-L-méthionine (SAM), qui incluent aussi des inhibiteurs naturels (tels que la sinéfungine et la méthylthioadénosine à la Figure 3.6), sont le point de départ pour le développement de nouveaux inhibiteurs.^{12,13} La conception de nouvelles molécules capables d'occuper à la fois le site du cofacteur et celui du substrat peptidique a le potentiel d'accroître

l'affinité de même que la sélectivité vis-à-vis une cible enzymatique en mimant l'état de transition de la méthylation (Figure 3.7).¹³

Figure 3.6 Structures d'inhibiteurs naturels non sélectifs de méthyltransférases^{12,13}

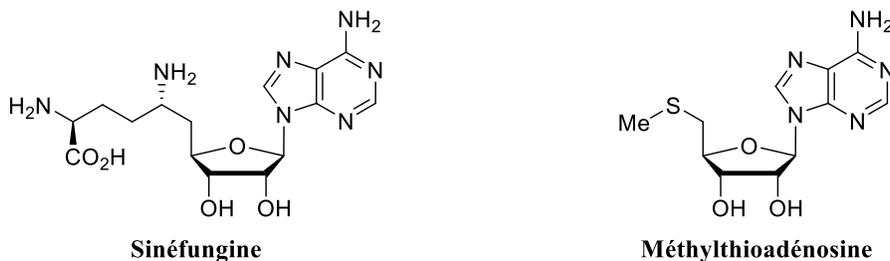
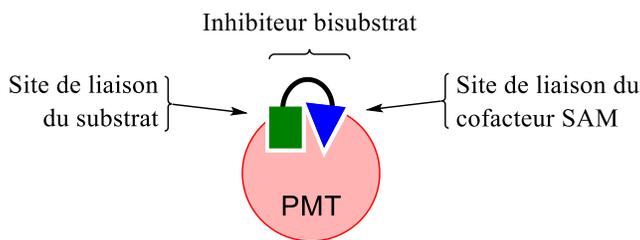


Figure 3.7 Stratégie de développement d'inhibiteurs bisubstrats pour l'inhibition de PMTs (modifiée à partir de Zhang *et al.*)¹³



3.4 Inhibiteurs sélectifs de protéines méthyltransférases

Plusieurs molécules ont été conçues afin d'inhiber les fonctions enzymatiques de méthyltransférases.^{12,17,18} Le développement d'analogues de *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) est en plein essor pour la conception de sondes chimiques. La disponibilité des structures cristallines des cibles enzymatiques offre la possibilité d'orienter la conception rationnelle des nouveaux composés pouvant être synthétisés dans un programme de découverte de médicaments.⁵ De nouvelles modifications (fonctionnelles et/ou structurelles) visent l'amélioration des propriétés biologiques (affinité, sélectivité, propriétés thérapeutiques et pharmaceutiques incluant la biodisponibilité). L'un des meilleurs exemples est le développement d'inhibiteurs de DOT1L pour le traitement de leucémies aiguës.^{12,19}

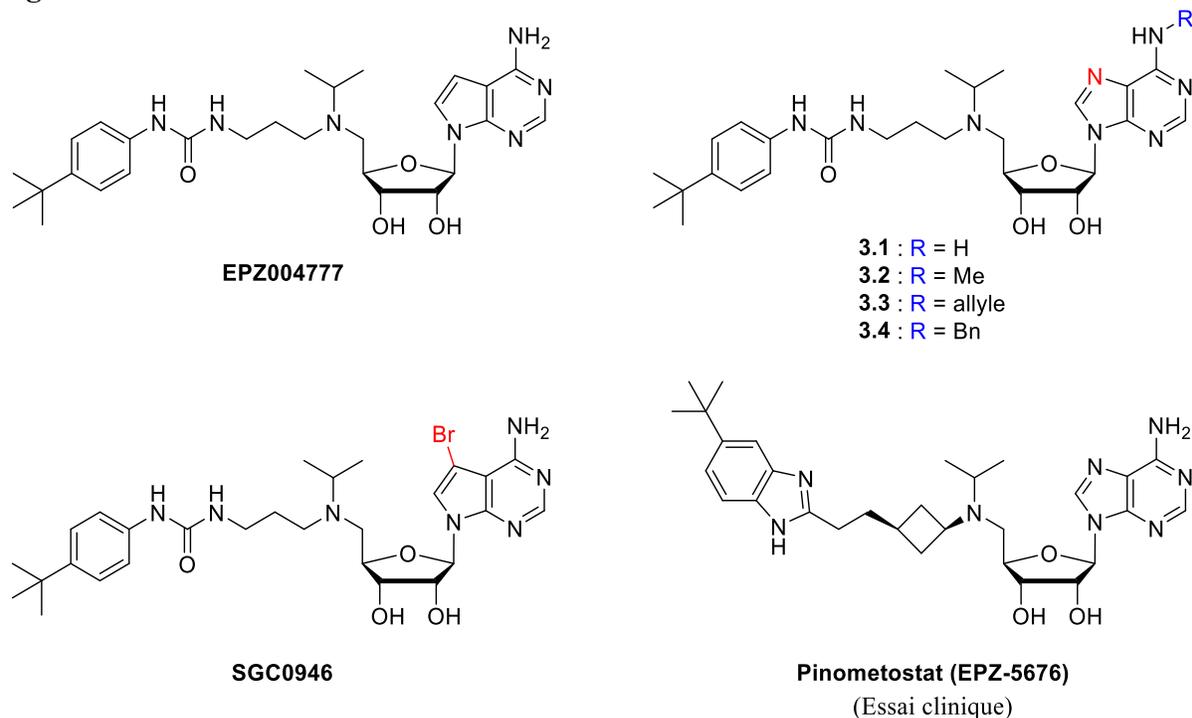
3.4.1 Inhibiteurs de DOT1L : EPZ004777, SGC0946 et EPZ-5676

La protéine DOT1L (*disruptor of telomeric silencing 1-like*) est une cible enzymatique dans le traitement des leucémies aigues présentant des réarrangements du gène MLL (*Mixed Lineage Leukemia*).^{19,20} C'est la seule lysine méthyltransférase (PKMT) responsable de la méthylation du résidu lysine 79 de l'histone H3 (H3K79), un substrat situé dans la région ordonnée de l'octamère d'histones et non pas sur la partie moins ordonnée de la chaîne terminale de l'histone. La méthylation de H3K79 est associée à l'activation de la chromatine pour le processus de transcription et aucune enzyme n'a été rapportée jusqu'à maintenant en ce qui a trait à sa déméthylation. L'utilisation anormale de DOT1L dans la méthylation de H3K79, par la formation de complexes protéiques, accroît l'expression de gènes nécessaires à la leucémogénèse.

Le tout premier inhibiteur de DOT1L a été rapporté en 2011 par Daigle et ses collègues.²¹ En se basant sur le mécanisme enzymatique et avec l'aide de la structure cristalline du site actif de DOT1L, une série d'analogues du cofacteur *S*-adénosyl-L-méthionine a été conçue et testée afin d'en étudier la relation structure-activité.^{21,22} La molécule EPZ004777 (Figure 3.8) a montré une inhibition efficace avec un IC₅₀ de 400 ± 100 pM *in vitro* et une sélectivité supérieure à mille fois pour DOT1L (par rapport à neuf autres méthyltransférases).²¹ EPZ004777 est un inhibiteur compétitif envers le cofacteur SAM.^{21,22}

En 2012, Anglin et ses collègues ont publié une étude exhaustive de la relation structure-activité d'une très grande série de composés similaires à EPZ004777.²³ À travers les modifications effectuées sur la portion latérale et la purine, le composé **3.1** (K_i de 0,46 nM) à la Figure 3.8 s'est avéré être le plus actif. Avec des modifications intervenant sur la purine, ils ont également démontré que la sélectivité pour DOT1L est conservée avec l'ajout d'un groupement méthyle (analogue **3.2**, K_i de 0,76 nM), allyle (analogue **3.3**, K_i de 12 nM) ou benzyle (analogue **3.4**, K_i de 22 nM) à la position N6 de l'adénine.

Figure 3.8 Structures d'inhibiteurs sélectifs de DOT1L



Également en 2012, Yu et ses collègues ont exploité une partie hydrophobe de DOT1L se trouvant à proximité de la position 7 de la déazaadénosine de EPZ004777.²⁴ L'analogue SGC0946 a été élaboré avec l'incorporation d'un atome de brome à cette position (Figure 3.8). Avec tout autant de sélectivité pour DOT1L, SGC0946 s'est avéré efficace pour la réduction de la méthylation de H3K79 *in vitro* : IC₅₀ de 8,8 ± 1,6 nM pour SGC0946 versus un IC₅₀ de 84 ± 20 nM pour EPZ004777 dans les essais cellulaires.

Enfin, en 2013, la molécule EPZ-5676 (Figure 3.8) a été avancée en études cliniques.²⁵ Développée par l'entreprise Epizyme, celle-ci possède une affinité (K_i) de 80 pM, une sélectivité pour DOT1L supérieure à 37 000 fois (par rapport à 16 autres méthyltransférases) et de meilleures propriétés pharmacocinétiques par comparaison à EPZ004777. L'usage de ce composé permet une inhibition de la méthylation de H3K79 dans les essais cellulaires et la régression des tumeurs chez un modèle animal avec une toxicité minimale.²⁵ Également connu sous le nom de Pinometostat, cet inhibiteur continue de faire l'objet d'études pour son

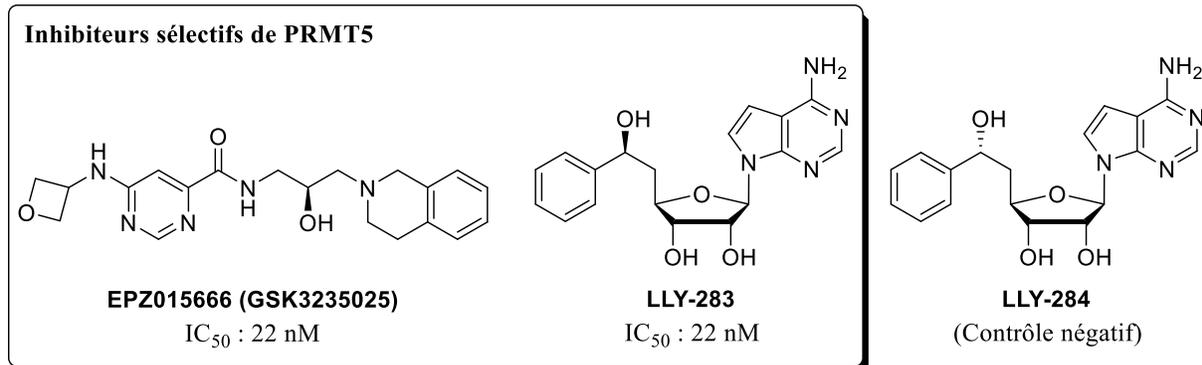
développement clinique, sa combinaison avec d'autres agents thérapeutiques (par exemple la cytarabine) et l'étude de mécanismes de résistance.²⁶⁻²⁸

3.4.2 Inhibiteur sélectif de PRMT5 et PRMT7 : DS-437

Parmi les neuf protéines arginine méthyltransférases (PRMTs) rapportées jusqu'à maintenant chez l'humain, il existe trois classes distinctes pour la méthylation du résidu arginine de l'histone (voir la Figure 3.3) : type I pour la diméthylation asymétrique (ADMA), type II pour la diméthylation symétrique (SDMA) et type III pour la monométhylation (MMA).¹⁵ Chaque groupe méthyle ajouté à la fonctionnalité guanidine de l'arginine entraîne le retrait d'un potentiel donneur de pont hydrogène sans une modification de la charge positive, c'est-à-dire que la fonctionnalité demeure protonée sous conditions physiologiques. PRMT5 est essentiellement la seule enzyme responsable de la diméthylation symétrique (type II) alors que PRMT7 est associée surtout à la monométhylation (type III). Excluant PRMT9 qui n'est pas caractérisée, les autres PRMTs (PRMT1, PRMT2, PRMT3, CARM1, PRMT6, PRMT8) sont de type I. La surexpression ou l'augmentation de l'activité enzymatique de PRMT5 est associée aux cancers gastrique, colorectal, des poumons, ainsi qu'au lymphome et à la leucémie.¹⁵ Quant à PRMT7, l'enzyme serait impliquée dans le cancer du sein.¹⁵ Des inhibiteurs sélectifs de PRMT5 ont déjà été rapportés avec des activités intéressantes (Figure 3.9).¹²

Le composé EPZ015666 s'est avéré être un inhibiteur non nucléosidique efficace de la méthyltransférase PRMT5 (IC₅₀ de 22 nM) et surtout, un candidat intéressant pour le traitement du lymphome à cellules du manteau (LCM) : l'usage du composé mène à une activité antiproliférative sur des modèles *in vitro* et *in vivo*.²⁹ L'inhibition est compétitive envers le substrat peptidique et non compétitive envers le cofacteur SAM.

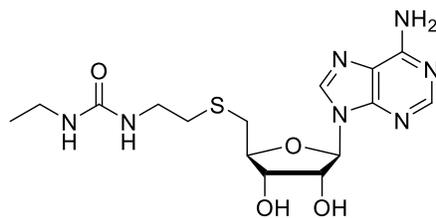
Figure 3.9 Molécules conçues pour l'inhibition de PRMT5^{29,30}



Une collaboration entre le consortium SGC et l'entreprise Eli Lilly a permis d'élaborer la molécule LLY-283 (Figure 3.9) pour l'inhibition de PRMT5.³⁰ Ce petit analogue nucléosidique comportant une base nucléique 7-déazaadénine s'est avéré efficace dans les essais biochimiques (IC₅₀ de 22 ± 3 nM) et cellulaires (IC₅₀ de 25 ± 1 nM) avec un mécanisme d'inhibition compétitif envers le cofacteur SAM. Cependant, son analogue LLY-284, s'est avéré moins efficace dans les essais biochimiques.³⁰

Une autre avancée a été réalisée lorsque le groupe de Schapira a rapporté en 2015 la découverte d'un inhibiteur double de PRMT5 et PRMT7.³¹ En effet, la molécule DS-437 (Schéma 2.13, Figure 3.10) s'est avérée efficace pour l'inhibition de ces deux enzymes (IC₅₀ de 6 μM) et sélective en raison de son inactivité auprès de 29 autres méthyltransférases. Conçue avec l'aide de la structure cristalline de PRMT5, la molécule DS-437 est un inhibiteur compétitif envers le cofacteur SAM qui permet d'inhiber la diméthylation symétrique dans les essais cellulaires. Cette molécule offre ainsi un outil chimique intéressant pour l'évaluation du potentiel thérapeutique découlant de l'inhibition de PRMT5-PRMT7.

Figure 3.10 Structure de DS-437, inhibiteur double de PRMT5 et PRMT7³¹



DS-437

IC₅₀ : 6 μM (PRMT5 et PRMT7)

3.5 Conclusion et perspectives de recherche

Les sondes chimiques contribuent à la recherche fondamentale dans le domaine biologique et peuvent constituer l'une des premières étapes dans un programme de découverte de médicaments. Ces petites molécules, qui sont des outils chimiques, doivent être efficaces et sélectives pour l'inhibition des fonctions enzymatiques. D'après le SGC en matière de sondes chimiques, les critères sont : une efficacité *in vitro* (IC₅₀ ou *K_d*) inférieure à 100 nM (inhibition lors d'essais enzymatiques), une sélectivité supérieure à 30 fois pour une cible enzymatique, une activité significative de l'enzyme à 1 μM en milieu cellulaire (inhibition lors d'essais en milieu cellulaire), et aucune toxicité cellulaire.³²

L'inhibiteur DS-437 a été conçu pour occuper le site du cofacteur enzymatique et sa fonctionnalité urée a été incorporée pour mimer le groupe guanidine du résidu arginine 3 de l'histone H4 (H4R3). Dans le développement d'agents thérapeutiques visant l'inhibition de protéines méthyltransférases (dont PRMT5 et PRMT7), la structure de la molécule DS-437 ouvre la voie à de nouvelles perspectives pour l'étude de la relation structure-activité et l'amélioration des propriétés biologiques. Notre collaboration avec le SGC a été menée dans l'objectif de synthétiser des inhibiteurs plus efficaces de protéines méthyltransférases (PMTs) basée sur l'expertise développée par le laboratoire du professeur Guindon pour la synthèse d'analogues de nucléosides (ANs). Plusieurs méthodes ont été développées afin de synthétiser ces molécules d'intérêt biologique et pouvoir accéder à une diversité appréciable de motifs structuraux les distinguant de leurs homologues naturels : que ce soit avec l'incorporation de

différentes fonctionnalités dans l'anneau glucidique, de bases azotées et/ou de chaînes latérales. Il sera discuté dans le chapitre suivant comment notre laboratoire s'est penché sur la préparation de nouveaux inhibiteurs potentiels présentant différentes modifications pour le développement d'une sonde chimique. Grâce à cette collaboration avec les chercheurs du SGC, les activités biologiques de nos composés seront également présentées.

3.6 Références

1. Arrowsmith, C. H.; Audia, J. E.; Austin, C.; Baell, J.; Bennett, J.; Blagg, J.; Bountra, C.; Brennan, P. E.; Brown, P. J.; Bunnage, M. E.; Buser-Doepner, C.; Campbell, R. M.; Carter, A. J.; Cohen, P.; Copeland, R. A.; Cravatt, B.; Dahlin, J. L.; Dhanak, D.; Edwards, A. M.; Frederiksen, M.; Frye, S. V.; Gray, N.; Grimshaw, C. E.; Hepworth, D.; Howe, T.; Huber, K. V. M.; Jin, J.; Knapp, S.; Kotz, J. D.; Kruger, R. G.; Lowe, D.; Mader, M. M.; Marsden, B.; Mueller-Fahrnow, A.; Müller, S.; O'Hagan, R. C.; Overington, J. P.; Owen, D. R.; Rosenberg, S. H.; Ross, R.; Roth, B.; Schapira, M.; Schreiber, S. L.; Shoichet, B.; Sundström, M.; Superti-Furga, G.; Taunton, J.; Toledo-Sherman, L.; Walpole, C.; Walters, M. A.; Willson, T. M.; Workman, P.; Young, R. N.; Zuercher, W. J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 536-541.
2. Preston, G. W.; Wilson, A. J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3289-3301.
3. Dana, H.; Chalbatani, G. M.; Mahmoodzadeh, H.; Karimloo, R.; Rezaiean, O.; Moradzadeh, A.; Mehmandoost, N.; Moazzen, F.; Mazraeh, A.; Marmari, V.; Ebrahimi, M.; Rashno, M. M.; Abadi, S. J.; Gharagouzlo, E. *Int. J. Biomed. Sci.* **2017**, *13*, 48-57.
4. Copeland, R. A.; Solomon, M. E.; Richon, V. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 724-732.
5. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry – Life at the Molecular Level* (4th ed.); John Wiley & Sons : Hoboken, 2013; ch. 3, 12, 24, 28.

6. Zheng, W.; Ibáñez, G.; Wu, H.; Blum, G.; Zeng, H.; Dong, A.; Li, F.; Hajian, T.; Allali-Hassani, A.; Amaya, M. F.; Siarheyeva, A.; Yu, W.; Brown, P. J.; Schapira, M.; Vedadi, M.; Min, J.; Luo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18004-18014.
7. Kouzarides, T. *Cell* **2007**, *128*, 693-705.
8. Bannister, A. J.; Kouzarides, T. *Cell Res.* **2011**, *21*, 381-395.
9. SGC (2003-2018). [En ligne] *Epigenetics – Chemical Probes for Drug Discovery* <http://www.thesgc.org/epigenetics> (page consultée le 05 juillet 2018).
10. Margueron, R.; Reinberg, D. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 285-296.
11. Zaidi, S. K.; Young, D. W.; Montecino, M.; Lian, J. B.; Stein, J. L.; van Wijnen, A. J.; Stein, G. S. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 4758-4766.
12. Kaniskan, H. U.; Martini, M. L.; Jin, J. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 989-1068.
13. Zhang, J.; Zheng, Y. G. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 583-597.
14. Jin, B.; Li, Y.; Robertson, K. D. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 607-617.
15. Yang, Y.; Bedford, M. T. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 37-50.
16. Schneider, R.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 396-402.
17. Wagner, T.; Jung, M. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 622-623.
18. Schapira, M. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 1067-1076.
19. Anglin, J. L.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8972-8983.
20. (a) Feng, Q.; Wang, H.; Ng, H. H.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Struhl, K.; Zhang, Y. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1052-1058; (b) Min, J.; Feng, Q.; Li, Z.; Zhang, Y.; Xu, R.-M. *Cell* **2003**, *112*, 711-723; (c) Okada, Y.; Feng, Q.; Lin, Y.; Jiang, Q.; Li, Y.; Coffield, V. M.; Su, L.; Xu, G.; Zhang, Y. *Cell* **2005**, *121*, 167-178; (d) Krivtsov, A. V.; Armstrong, S. A. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 823-833; (e) Steger, D. J.; Lefterova, M. I.; Aaron, L. Y.; Stonestrom, A. J.; Schupp, M.; Zhuo, D.; Vakoc, A. L.; Kim, J.-E.; Chen, J.; Lazar, M. A.; Blobel, G. A.; Vakoc, C. R. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 2825-2839; (f) Krivtsov, A. V.; Feng, Z.; Lemieux, M. E.; Faber, J.; Vempati, S.; Sinha, A.

- U.; Xia, X.; Jesneck, J.; Bracken, A. P.; Silverman, L. B.; Kutok, J. L.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 355-368; (g) Bernt, K. M.; Zhu, N.; Sinha, A. U.; Vempati, S.; Faber, J.; Krivtsov, A. V.; Feng, Z.; Punt, N.; Daigle, A.; Bullinger, L.; Pollock, R. M.; Richon, V. M.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 66-78; (h) Nguyen, A. T.; Taranova, O.; He, J.; Zhang, Y. *Blood* **2011**, *117*, 6912-6922; (i) Grembecka, J.; He, S.; Shi, A.; Purohit, T.; Muntean, A. G.; Sorenson, R. J.; Showalter, H. D.; Murai, M. J.; Belcher, A. M.; Hartley, T.; Hess, J. L.; Cierpicki, T. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 277-284.
21. Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Majer, C. R.; Sneeringer, C. J.; Song, J.; Johnston, L. D.; Scott, M. P.; Smith, J. J.; Xiao, Y.; Jin, L.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Bernt, K. M.; Tseng, J.-C.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 53-65.
22. Basavapathruni, A.; Jin, L.; Daigle, S. R.; Majer, C. R. A.; Therkelsen, C. A.; Wigle, T. J.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Pollock, R. M.; Scott, M. P.; Moyer, M. P.; Richon, V. M.; Copeland, R. A.; Olhava, E. J. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2012**, *80*, 971-980.
23. Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8066-8074.
24. Yu, W.; Chory, E. J.; Wernimont, A. K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J. J.; Qi, J.; Baryte-Lovejoy, D.; Yi, J.; Marcellus, R.; Iacob, R. E.; Engen, J. R.; Griffin, C.; Aman, A.; Wienholds, E.; Li, F.; Pineda, J.; Estiu, G.; Shatseva, T.; Hajian, T.; Al-awar, R.; Dick, J. E.; Vedadi, M.; Brown, P. J.; Arrowsmith, C. H.; Bradner, J. E.; Schapira, M. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1288.
25. Daigle, S. R.; Olhava, E. J.; Therkelsen, C. A.; Basavapathruni, A.; Jin, L.; Boriack-Sjodin, P. A.; Allain, C. J.; Klaus, C. R.; Raimondi, A.; Porter Scott, M.; Waters, N. J.; Chesworth, R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Richon, V. M.; Pollock, R. M. *Blood* **2013**, *122*, 1017-1025.
26. Stein, E. M.; Garcia-Manero, G.; Rizzieri, D. A.; Tibes, R.; Berdeja, J. G.; Jongen-Lavrencic, M.; Altman, J. K.; Dohner, H.; Thomson, B.; Blakemore, S. J.; Daigle, S.;

- Fine, G.; Waters, N. J.; Krivstov, A. V.; Koche, R.; Armstrong, S. A.; Ho, P. T.; Lowenberg, B.; Tallman, M. S. *Blood* **2015**, *126*, 2547.
27. Klaus, C. R.; Iwanowicz, D.; Johnston, D.; Campbell, C. A.; Smith, J. J.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Olhava, E. J.; Scott, M. P.; Pollock, R. M.; Daigle, S. R.; Raimondi, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, *350*, 646-656.
28. Campbell, C. T.; Haladyna, J. N.; Drubin, D. A.; Thomson, T. M.; Maria, M. J.; Yamauchi, T.; Waters, N. J.; Olhava, E. J.; Pollock, R. M.; Smith, J. J.; Copeland, R. A.; Blakemore, S. J.; Bernt, K. M.; Daigle, S. R. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1669-1679.
29. Chan-Penebre, E.; Kuplast, K. G.; Majer, C. R.; Boriack-Sjondin, P. A.; Wigle, T. J.; Johnston, L. D.; Rioux, N.; Munchhof, M. J.; Jin, L.; Jacques, S. L.; West, K. A.; Lingaraj, T.; Stickland, K.; Ribich, S. A.; Raimondi, A.; Scott, M. P.; Waters, N. J.; Pollock, R. M.; Smith, J. J.; Barbash, O.; Pappalardi, M.; Ho, T. F.; Nurse, K.; Oza, K. P.; Gallagher, K. T.; Kruger, R.; Moyer, M. P.; Copeland, R. A.; Chesworth, R.; Duncan, K. W. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 432-437.
30. (a) SGC (2003-2018). [En ligne] *LLY-283 A Chemical Probe For PRMT5* <https://www.thesgc.org/chemical-probes/LLY-283> (page consultée le 05 juillet 2018);
(b) Bonday, Z. Q.; Cortez, G. S.; Grogan, M. J.; Antonysamy, S.; Weichert, K.; Bocchinfuso, W. P.; Li, F.; Kennedy, S.; Li, B.; Mader, M. M.; Arrowsmith, C. H.; Brown, P. J.; Eram, M. S.; Szewczyk, M. M.; Barsyte-Lovejoy, D.; Vedadi, M.; Guccione, E.; Campbell, R. M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 612-617.
31. Smil, D.; Eram, M. S.; Li, F.; Kennedy, S.; Szewczyk, M. M.; Brown, P. J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Schapira, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 408-412.
32. SGC (2003-2018). [En ligne] *Chemical Probes* <https://www.thesgc.org/chemical-probes> (page consultée le 05 juillet 2018).

Chapitre 4

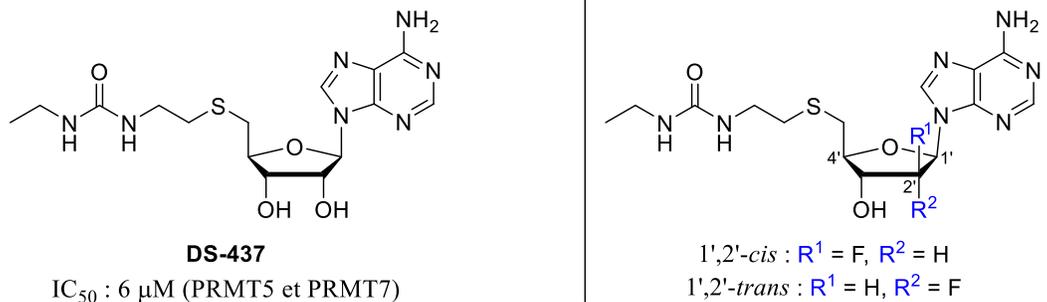
Synthèse de nouveaux analogues de SAM pour l'inhibition de PRMT5 et PRMT7

4.1 Conception de nouveaux analogues nucléosidiques

4.1.1 Proposition de nos nouveaux inhibiteurs

En collaboration avec le SGC, notre laboratoire s'intéresse à la préparation de nouveaux analogues de *S*-adényl-L-méthionine dans la recherche de sondes chimiques plus efficaces. La structure de la molécule DS-437 (Figure 4.1), un inhibiteur de PRMT5 et PRMT7, constitue un excellent point de départ pour de nouvelles modifications.¹ On s'intéresse dans un premier temps à l'incorporation d'un atome de fluor à la position C2' de l'anneau glucidique (Figure 4.1) afin d'améliorer la stabilité du lien glycosidique, d'influencer la liaison de la molécule avec ces protéines et d'offrir une piste d'optimisation dans une étude de la relation structure-activité. Le nucléoside 1',2'-*trans* C2'-monofluoré a été préparé par ma collègue Starr Dostie.² Quant au nucléoside 1',2'-*cis* C2'-monofluoré ($R^1 = F$ et $R^2 = H$ à la Figure 4.1), mon objectif est de le préparer en quelques étapes pour débiter notre étude de la relation structure-activité (SAR).

Figure 4.1 Proposition d'analogues de SAM pour l'inhibition de PRMT5 et PRMT7



4.1.2 Intérêt et utilité de la substitution par le fluor

4.1.2.1 Généralités

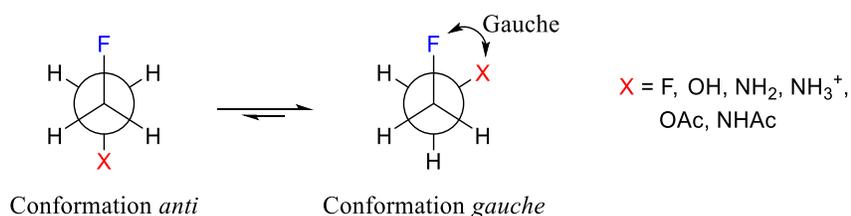
Dans le développement des médicaments, le fluor trouve une place importante pour la modification de la lipophilicité, de la stabilité, de l'acidité, des propriétés dipolaires, des préférences conformationnelles : des facteurs pouvant améliorer leur sélectivité, leur biodisponibilité, leur efficacité et leur puissance.³⁻⁸ L'incorporation du fluor dans les composés organiques altère les propriétés physico-chimiques de ceux-ci et permet d'en retirer une stabilité biologique et chimique appréciable.

Cet atome, qui possède un rayon de van der Waals de 1,47 Å, est le deuxième plus petit avec un rayon se situant entre celui de l'hydrogène (1,20 Å) et de l'oxygène (1,52 Å). La force du lien C-F (485 kJ/mol) étant supérieure à celle du lien C-H (411 kJ/mol), la substitution d'un ou plusieurs hydrogènes par un nombre équivalent d'atomes de fluor est considérée dans l'accroissement de la stabilité métabolique (bioisostère de l'hydrogène ne causant qu'une légère distortion stérique). D'autre part, la similarité des liaisons C-F (1,35 Å) et C-O (1,43 Å) de l'hydroxyle fait du fluor un mime isoélectronique intéressant dans le remplacement de l'oxygène et l'augmentation du caractère lipophile des composés organiques (faible accepteur de pont hydrogène).³⁻⁸

La forte électronégativité du fluor (3,98 sur l'échelle de Pauling, par comparaison avec 3,16 et 2,20 pour les atomes de chlore et d'hydrogène respectivement) contribue à la polarisation élevée du lien C-F. Ce lien possède un fort moment dipolaire ($\mu_{C-F} = 1,41$ D) et une orbitale antiliante σ^*_{C-F} de basse énergie disponible pour l'hyperconjugaison : les électrons d'une liaison adjacente (par exemple un lien σ_{C-H} , un lien π) peuvent interagir avec cette orbitale σ^* et contribuer à augmenter la stabilité du système. L'hyperconjugaison, les interactions dipôle-dipôle, les interactions électrostatiques, ou une combinaison de ces effets stéréoélectroniques permet de stabiliser la conformation *gauche* des composés aliphatiques comportant un fluor et un groupe fonctionnel vicinal (dérivés du fluoroéthane à la Figure 4.2).

Par exemple, le 1,2-difluoroéthane (Figure 4.2, X = F) possède deux interactions $\sigma_{C-H} \rightarrow \sigma_{C-F}^*$ stabilisantes (hyperconjugaison) pour la conformation *gauche*. Cet effet *gauche* mène à des préférences conformationnelles pouvant également être exploitées dans la conception des médicaments afin de promouvoir des conformations biologiquement actives.³⁻⁸

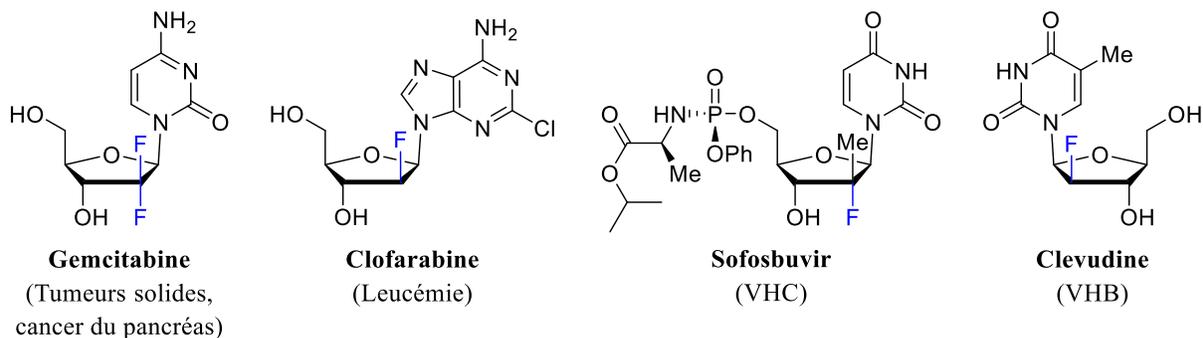
Figure 4.2 Projections de Newman des conformères décalés *anti* et *gauche*^{6,7}



4.1.2.2 Chez les nucléosides

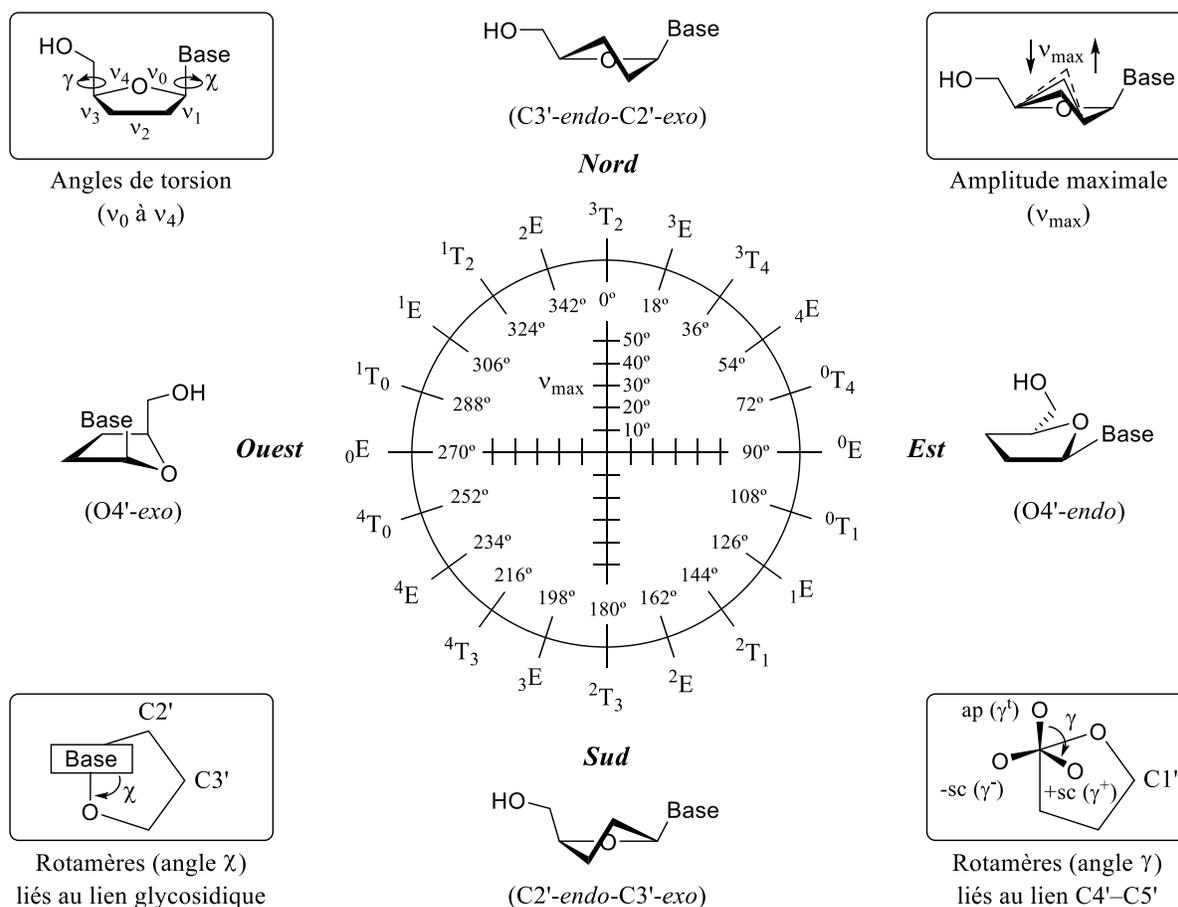
Un atome de fluor en position C2' de l'anneau glucidique représente un bioisostère classique permettant d'augmenter la stabilité du lien glycosidique face à l'hydrolyse par la déstabilisation de la formation d'un ion oxocarbenium.⁹⁻¹¹ La présence du fluor permet également d'altérer les préférences conformationnelles des nucléosides et peut permettre une meilleure reconnaissance par certaines cibles enzymatiques.^{7,8} En ce sens, plusieurs nucléosides comportant un ou des atomes de fluor à la position C2' ont été développés comme agents thérapeutiques pour le traitement du cancer et des virus (Figure 4.3).¹²⁻¹⁴

Figure 4.3 Nucléosides C2'-fluorés ayant une activité anticancéreuse ou antivirale¹²⁻¹⁴



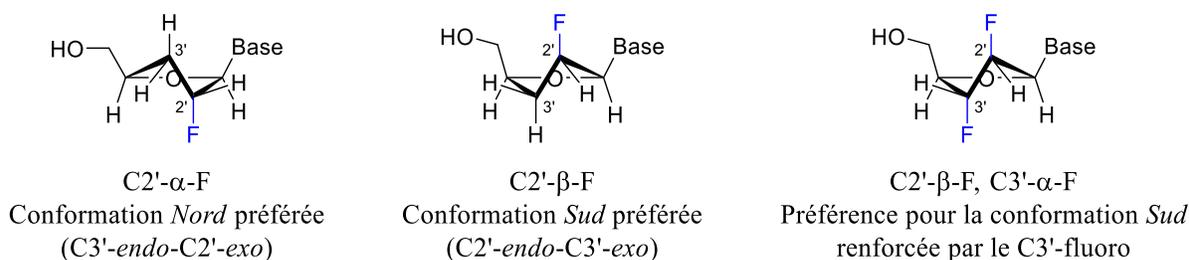
Il existe chez les nucléosides naturels un équilibre dynamique (en solution) entre les conformères majoritaires de type *Nord* (C3'-endo) et *Sud* (C2'-endo).¹⁵⁻²⁰ La Figure 4.4 présente le cycle de pseudorotation des furanosides, ainsi que les paramètres permettant d'analyser leurs conformations : l'angle de phase P de pseudorotation (0 à 360°); l'amplitude maximale v_{\max} pouvant être atteinte par les furanosides (0 à 50°); les angles de torsion endocyclique (v_0 à v_4); les rotations possibles autour des liens glycosidique (angle χ) et C4'-C5' (angle γ); les conformations de type enveloppe (E) et demi-chaise (T) sont en alternance tous les 18°; et les conformères *Nord* (3T_2 , $P = 0^\circ$) et *Sud* (2T_3 , $P = 180^\circ$) sont aux antipodes.

Figure 4.4 Cycle de pseudorotation des nucléosides et les paramètres impliqués (modifiée à partir de Gagneron *et al.* et à partir de Barchi Jr. *et al.*)^{19,20}



La fonctionnalisation des furanosides, dont l'incorporation d'un atome de fluor, contribue de manière importante au biais conformationnel et influence la flexibilité des nucléosides par l'entremise de plusieurs facteurs stériques et stéréoelectroniques interreliés (favorables ou défavorables) : effet *gauche*, effet anomérique, interactions dipôle-dipôle, effet antipériplanaire, interactions possibles entre la base azotée et le fluor ou autres fonctionnalités présentes.^{7,8,17,18,21} Les nucléosides comportant un fluor à la position C2' adoptent une conformation préférentielle (Figure 4.5), car la présence de cet atome contribue à la stabilisation d'un des conformères (influence sur l'équilibre conformationnel).^{7,8,17,18} Une telle conformation de départ peut permettre à un substrat, moyennant un coût énergétique, de maximiser son interaction avec une cible enzymatique. L'ajout d'autres fonctionnalités (par exemple un groupe hydroxyle à la position C3', un fluor à cette position à la Figure 4.5)^{7,8} et la possibilité d'incorporer différentes bases nucléiques aura un effet sur le degré de flexibilité des nucléosides et leur équilibre conformationnel.^{20,22-24} L'incorporation d'un atome de fluor revêt dès lors une attention plus que particulière dans la conception de nos nouveaux analogues C2'-monofluorés et l'investigation de l'effet de cette substitution à la position C2' dans notre étude de la relation structure-activité.

Figure 4.5 Préférences conformationnelles de certains nucléosides C2'-fluorés^{7,8}



4.2 Synthèse des nouveaux nucléosides monofluorés

4.2.1 Stratégies de synthèse d'analogues C2'-fluorés

Plusieurs efforts ont déjà été investis dans la synthèse d'analogues de nucléosides fluorés.⁹⁻¹¹ Tel que discuté au Chapitre 2, les approches convergente (section 2.2.1) et

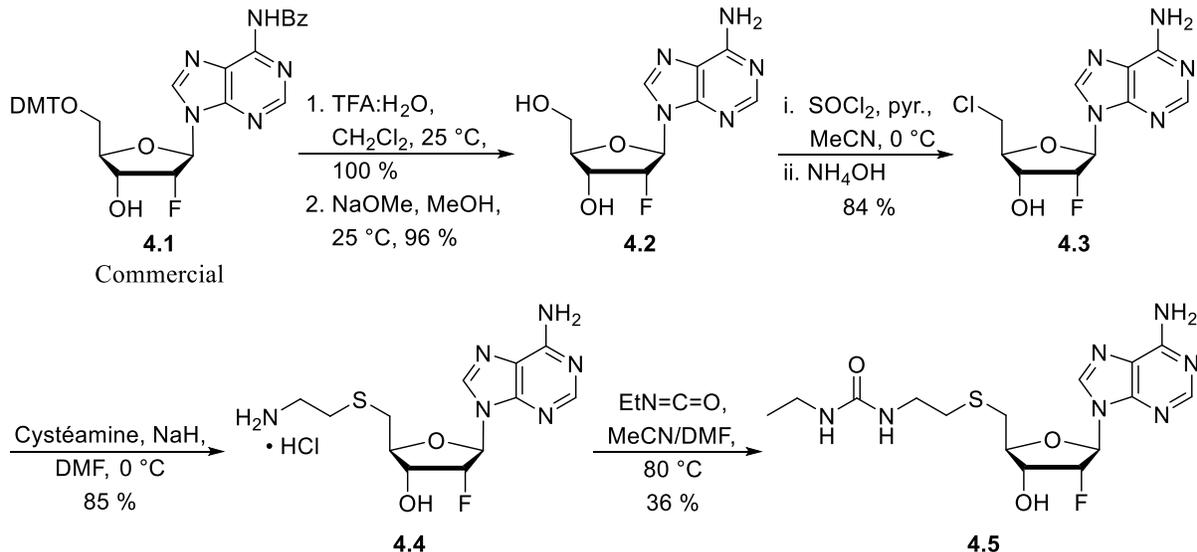
divergente (section 2.2.2) regroupent les stratégies permettant d'atteindre les *N*-glycosides C2'-fluorés de relation stéréochimique 1',2'-*cis* et 1',2'-*trans*. Une première stratégie consiste en l'addition de la base azotée sur un nucléoside comportant déjà un atome de fluor.²⁵⁻³² Bien que cette stratégie soit plus versatile, la stéréochimie du lien glycosidique doit cependant être contrôlée. Une seconde stratégie consiste en la fluoration d'un nucléoside naturel où la configuration originelle du lien glycosidique est conservée.^{33,34} La limitation dans ce cas-ci demeure la disponibilité des substrats naturels.

Afin d'améliorer l'activité de DS-437 et guider notre étude de la relation structure-activité (SAR), des substrats commerciaux comportant déjà un atome de fluor ont été considérés pour accéder rapidement à de nouveaux analogues. Les premières modifications pour lesquelles notre groupe a voulu investiguer est l'influence d'un atome de fluor à la position C2' dans les séries ribose et arabinose.

4.2.2 Synthèse de l'analogue 1',2'-*trans* C2'-fluoré

Une approche divergente a été considérée pour l'introduction de la chaîne latérale depuis la position C5'. La synthèse du premier analogue fluoré a été réalisée par Starr Dostie lors de ses études doctorales dans le laboratoire du professeur Guindon (Schéma 4.1).² Le substrat commercial **4.1**, possédant déjà un atome de fluor à la position C2' en plus d'un lien glycosidique établi, a permis une synthèse de quelques étapes basées sur la préparation de DS-437. La chloration de l'alcool primaire à la position C5' du composé **4.2** a eu lieu après le retrait des groupes DMT (4,4'-diméthoxytrityle) et benzoyle en conditions acides et basiques respectivement. Le déplacement du chlorure (**4.3**) avec la cystéamine a permis l'obtention du composé **4.4**. Enfin, la réaction de l'amine avec l'isocyanate d'éthyle a fourni l'analogue désiré **4.5**.

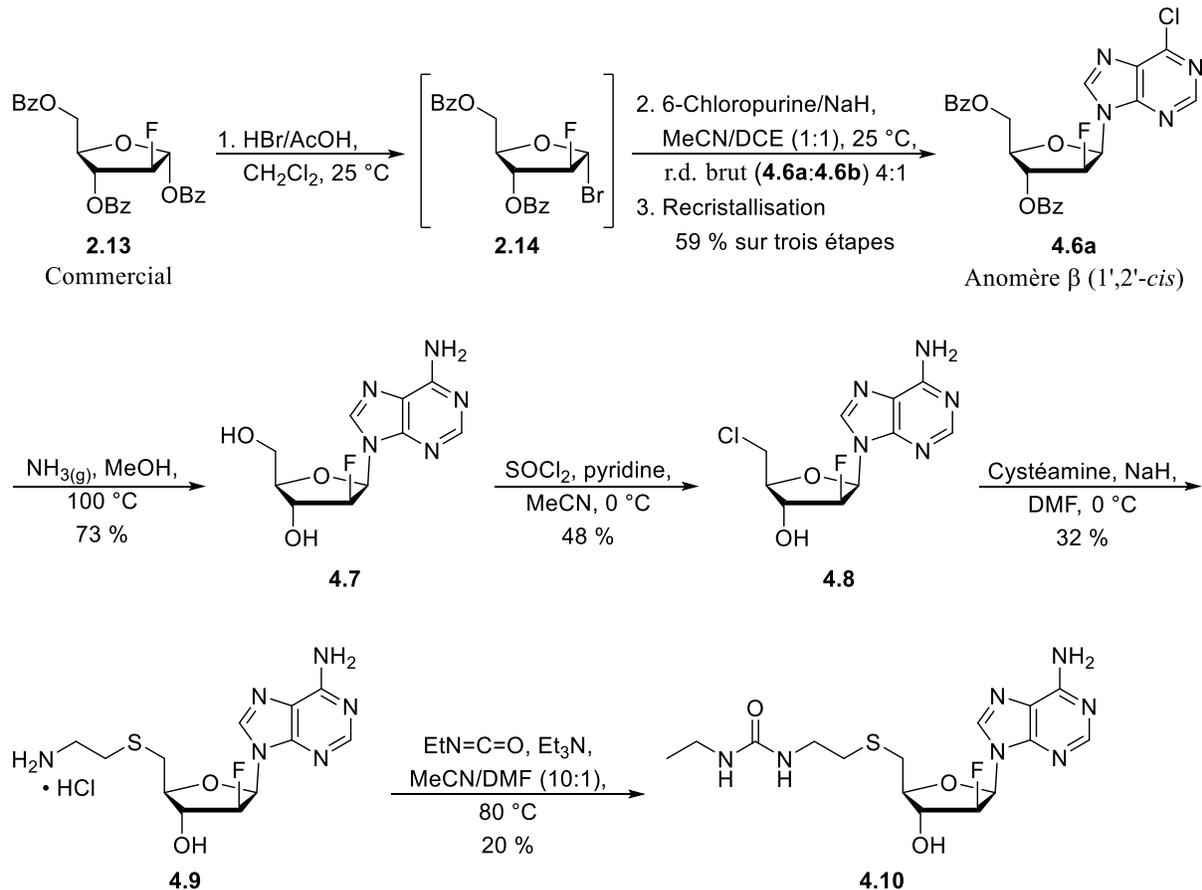
Schéma 4.1 Synthèse de C2'-fluoronucléosides 1',2'-*trans* réalisée par Starr Dostie²



4.2.3 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* C2'-fluoré

En ayant en main le composé 1',2'-*trans*, j'étais responsable de la préparation du nucléoside 1',2'-*cis* correspondant. Le déplacement d'un halogénure anomérique est typiquement stéréosélectif pour la préparation de nucléosides 1',2'-*cis* et la formation du lien *N*-glycosidique.²⁵⁻³⁰ Le substrat commercial **2.13** est considéré, puisqu'il contient déjà un atome de fluor et qu'il permet d'atteindre l'analogue désiré **4.10** en quelques étapes (Schéma 4.2). La bromation en milieu acide du substrat commercial **2.13** mène à la formation du bromoacétal **2.14**^{27,28} (un seul diastéréoisomère observé par analyse RMN ¹H du mélange brut réactionnel). Celui-ci est utilisé sans purification pour le couplage de la base azotée. La glycosylation en présence du sel de sodium de la 6-chloropurine permet d'obtenir le nucléoside β 1',2'-*cis* **4.6a**^{28,35} dans un rendement allant jusqu'à 59 % après recristallisation. Lors de l'étape de couplage avec la 6-chloropurine, l'analyse du mélange brut réactionnel (RMN ¹H) pour différents lots a révélé des ratios allant de 4:1 à 6:1 en faveur de l'anomère β (**4.6a**). L'anomère α 1',2'-*trans* (**4.6b**) a été identifié et caractérisé afin de permettre la détermination des ratios (voir l'Annexe A et les expériences RMN bidimensionnelles NOESY).

Schéma 4.2 Synthèse d'analogues 1',2'-*cis* C2'-fluorés

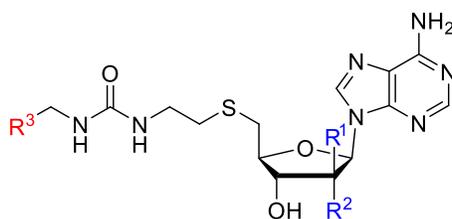


Le composé **4.7** est ensuite obtenu après le retrait des groupes benzoyles et la substitution de la position C6 de la purine. La chloration de l'alcool primaire en position C5' permet de fonctionnaliser la partie latérale du nucléoside. Le chlorure du composé **4.8** est déplacé par la cystéamine pour générer un analogue intéressant possédant une amine en bout de chaîne (**4.9**). La dernière étape consiste alors en la réaction avec l'isocyanate d'éthyle afin de générer le nucléoside **4.10** désiré dans une courte séquence linéaire.

4.3 Résultats biologiques

La détermination de l'activité des analogues C2'-fluorés a été réalisée par le *Structural Genomics Consortium* (SGC) de Toronto. Les nucléosides **4.5** et **4.10** ont été testés pour l'inhibition de PRMT5 et PRMT7 *in vitro* (Tableau 4.1). Ceux-ci se sont avérés moins actifs que l'inhibiteur DS-437 (IC₅₀ de 6 µM). La substitution de l'hydroxyle en position C2' par un atome de fluor (**4.5** et **4.10**) ne permet pas d'améliorer l'inhibition à l'égard de ces méthyltransférases. D'autres analogues ont également été préparés par le SGC afin d'en étudier la relation structure-activité (Tableau 4.1).³⁶ Les analogues DS-464 et DS-466 comportant des groupes cycliques (benzyle ou cyclohexyle) en bout de chaîne sont cependant moins efficaces que DS-437 pour l'inhibition de la méthyltransférase PRMT5.

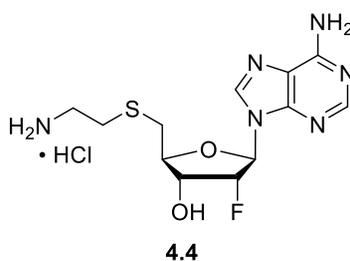
Tableau 4.1 Activités *in vitro* d'analogues comportant une fonctionnalité urée



Composé	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (µM)	
				PRMT5	PRMT7
DS-437 ¹	H	OH	Me	6	6
4.5	H	F	Me	Inactif	>200
4.10	F	H	Me	>200	117
DS-464 ³⁶	H	OH	Bn	>40	-----
DS-466 ³⁶	H	OH	Cy	>50	-----

L'inhibiteur DS-437, de même que nos composés C2'-fluorés (**4.5** et **4.10**) ont été conçus avec une fonctionnalité urée afin de mimer le groupe guanidine du résidu argine pour l'inhibition de protéines arginine méthyltransférases (PRMTs) comme PRMT5 et PRMT7. Nos analogues C2'-fluorés comportant cette fois-ci une fonctionnalité amine sur la chaîne latérale (précurseurs de nos nucléosides d'intérêt initial) pourraient mimer le groupe amine du résidu lysine pour l'inhibition de protéines lysine méthyltransférases (PKMTs). Dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de cibles enzymatiques, nos analogues de nucléosides ont alors été testés sur plusieurs PMTs. Un criblage a été mené avec l'analogue 1',2'-*trans* **4.4** (Tableau 4.2). Ce nucléoside comportant une amine sur la portion latérale a montré une activité intéressante pour l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1 par rapport à PRMT5, PRMT7 et d'autres PKMTs (SUV39H1, SUV39H2 et SETD2). Un IC₅₀ de 12 µM a été obtenu pour l'inhibition de l'enzyme SETDB1.

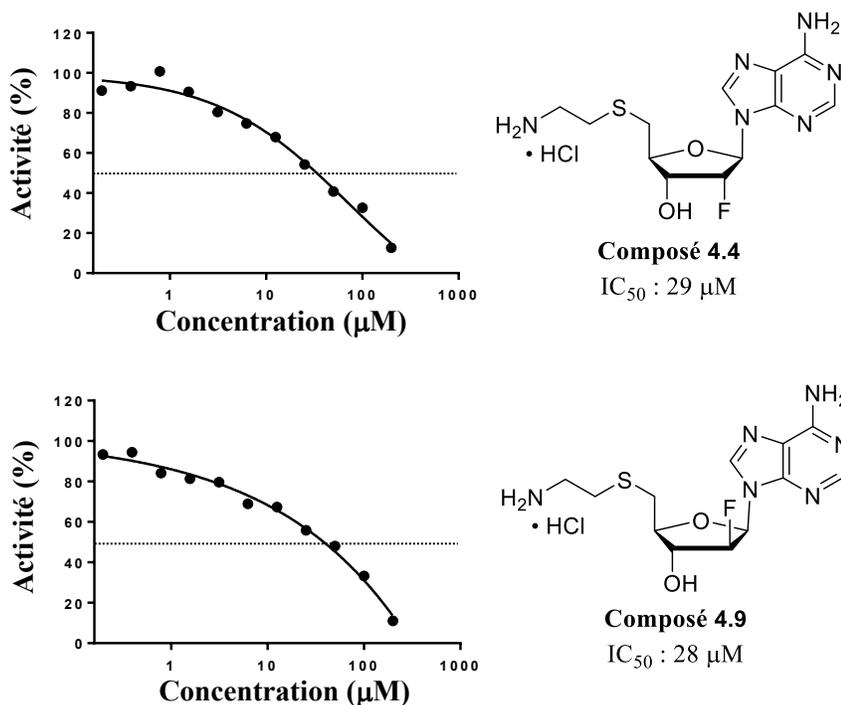
Tableau 4.2 Activité *in vitro* du nucléoside **4.4** à l'égard de protéines méthyltransférases



IC ₅₀ (µM)					
PRMT5	PRMT7	SETDB1	SUV39H1	SUV39H2	SETD2
Inactif	85	12	32	76	69

Sur la base de ce résultat intéressant, un second essai biologique a été mené. Les nucléosides **4.4** et **4.9** ont été testés pour l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1. Pour une relation stéréochimique différente impliquant l'atome de fluor, les nucléosides 1',2'-*trans* (**4.4**) et 1',2'-*cis* (**4.9**) ont montré une activité similaire (Figure 4.6).³⁷

Figure 4.6 Courbes dose-réponse pour l'inhibition de l'activité enzymatique de SETDB1



4.4 Conclusion et perspectives

Les analogues proposés C2'-fluorés 1',2'-*trans* et 1',2'-*cis* ont été préparés en quelques étapes. Nos nucléosides fluorés comprenant la fonctionnalité urée sur la chaîne latérale (4.5 et 4.10) se sont avérés moins actifs que DS-437, soit l'inhibiteur de PRMT5 et PRMT7. Les résultats biologiques renseignent sur l'importance du groupement hydroxyle en position C2' du riboside DS-437. D'autres méthyltransférases pouvant être ciblées, le nucléoside 1',2'-*trans* 4.4 a montré une activité intéressante pour l'inhibition de la méthyltransférase SETDB1. Son analogue 1',2'-*cis* (4.9) possède une activité similaire et ce, pour une relation stéréochimique différente impliquant l'atome de fluor. Il n'y a présentement aucune molécule rapportée ou caractérisée pour l'inhibition de SETDB1, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'optimiser les nucléosides préparés dans une étude de la relation structure-activité (Chapitre 5).

4.5 Références

1. Smil, D.; Eram, M. S.; Li, F.; Kennedy, S.; Szewczyk, M. M.; Brown, P. J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Arrowsmith, C. H.; Vedadi, M.; Schapira, M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 408-412.
2. Dostie, S., *Diastereoselective Synthesis of Nucleoside Analogues via Cyclization of Acyclic Precursors*. Thèse de doctorat (Université McGill), 2016.
3. Hagmann, W. K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369.
4. Zhou, Y.; Wang, J.; Gu, Z.; Wang, S.; Zhu, W.; Aceña, J. L.; Soloshonok, V. A.; Izawa, K.; Liu, H. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 422-518.
5. O'Hagan, D. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308-319.
6. Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529-2591.
7. Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315-8359.
8. Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822-5880.
9. Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C. K. *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 743-766.
10. Qiu, X.-L.; Xu, X.-H.; Qing, F.-L. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 789-843.
11. Wójtowicz-Rajchel, H. *J. Fluor. Chem.* **2012**, *143*, 11-48.
12. Shao, J.; Zhou, B.; Chu, B.; Yen, Y. *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 409-431.
13. Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281.
14. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 447-464.
15. (a) Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205-8212; (b) Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2333-2344.
16. Harvey, S. C.; Prabhakaran, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6128-6136.
17. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer : New York, 1984; ch. 2, 4.

18. Thibaudeau, C.; Acharya, P.; Chattopadhyaya, J. *Stereoelectronic Effects in Nucleosides and Nucleotides and Their Structural Implications* (2nd ed.); Uppsala University Press : Uppsala, 2005.
19. Gagneron, J.; Gosselin, G.; Mathé, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4891-4897.
20. Barchi Jr., J. J.; Karki, R. G.; Nicklaus, M. C.; Siddiqui, M. A.; George, C.; Mikhailopulo, I. A.; Marquez, V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9048-9057.
21. (a) Plavec, J.; Tong, W.; Chattopadhyaya, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9734-9746; (b) Thibaudeau, C.; Janez Plavec, J.; Chattopadhyaya, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8033-8037.
22. Barchi Jr., J. J.; Jeong, L.-S.; Siddiqui, M. A.; Marquez, V. E. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1997**, *34*, 11-29.
23. Watts, J. K.; Damha, M. J. *Can. J. Chem.* **2008**, *86*, 641-656.
24. Dawadi, S.; Viswanathan, K.; Boshoff, H. I.; Barry III, C. E.; Aldrich, C. C. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4835-4850.
25. Tann, C. H.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Sapino Jr., C.; Howell, H. G. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3644-3647.
26. Montgomery, J. A.; Shortnacy, A. T.; Carson, D. A.; Secrist III, J. A. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2389-2392.
27. Howell, H. G.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Benigni, D. A.; Sapino Jr., C. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.
28. Schärer, O. D.; Verdine, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10781-10782.
29. Montgomery, J. A.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Clayton, S. D.; Riordan, J. M.; Secrist III, J. A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 397-401.
30. (a) Bauta, W. E.; Schulmeier, B. E.; Burke, B.; Puente, J. F.; Cantrell Jr., W. R.; Lovett, D.; Goebel, J.; Anderson, B.; Ionescu, D.; Guo, R. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 889-896; (b) Anderson, B. G.; Bauta, W. E.; Cantrell Jr., Engles, T.; Lovett, D. P. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1229-1237.

31. Mikhailopulo, I. A.; Sivets, G. G.; Poopeiko, N. E.; Khripach, N. B. *Carbohydr. Res.* **1995**, *278*, 71-89.
32. Thomas, H. J.; Tiwari, K. N.; Clayton, S. J.; Secrist III, J. A.; Montgomery, J. A. *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 309-323.
33. Izawa, K.; Takamatsu, S.; Katayama, S.; Hirose, N.; Kozai, S.; Maruyama, T. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 507-517.
34. Kawasaki, A. M.; Casper, M. D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Zounes, M. C.; Cummins, L. L.; Gonzalez, C.; Cook, P. D. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841.
35. Mackman, R. L.; Ray, A. S.; Hui, H. C.; Zhang, L.; Birkus, G.; Boojamra, C. G.; Desai, M. C.; Douglas, J. L.; Gao, Y.; Grant, D.; Laflamme, G.; Lin, K.-Y.; Markevitch, D. Y.; Mishra, R.; McDermott, M.; Pakdaman, R.; Petrakovsky, O. V.; Vela, J. E.; Cihlar, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3606-3617.
36. Structural Genomics Consortium (SGC), Toronto. Résultats biologiques non publiés.
37. Des IC₅₀ de 29 µM et 28 µM ont respectivement été obtenus pour les composés **4.4** et **4.9** lors d'un second essai biologique visant l'inhibition de SETDB1. La différence d'activité vis-à-vis l'enzyme SUV39H1 doit être déterminée.

Chapitre 5

Synthèse de nucléosides pour l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1

5.1 Mise en contexte et objectifs de recherche

La lysine méthyltransférase SETDB1 (*SET Domain Bifurcated 1*) est l'une des enzymes responsables de la triméthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), un marqueur associé à la répression de la transcription génique.¹⁻³ Cette protéine remplit ses fonctions enzymatiques pour effectuer le silençage de gènes et la triméthylation de H3K9 est coordonnée avec la méthylation de l'ADN afin d'accroître le silençage génique.⁴⁻⁷ L'expression anormale de SETDB1 a été associée à la maladie de Huntington, au mélanome, ainsi qu'aux cancers des poumons, du foie, des seins et de la prostate.⁸⁻¹⁴ La découverte d'un inhibiteur efficace et sélectif de cette lysine méthyltransférase permettrait de fournir des réponses mécanistiques et phénotypiques. À ce jour, il n'existe aucun inhibiteur et aucune structure cristalline n'a été rapportée pour la méthyltransférase SETDB1.¹

Certains de nos analogues C2'-fluorés (composés **4.4** et **4.9**, Figure 4.6) ont présenté une activité inhibitrice pour SETDB1 (IC₅₀ ~30 µM) et offrent un profil structural intéressant pour l'amélioration de l'activité biologique. Dans cet objectif, on s'intéresse à la préparation de nouveaux analogues comprenant différentes modifications et l'étude de leur activité. En l'absence d'une structure cristalline et de précédents dans la littérature, la conception et la synthèse des inhibiteurs potentiels pour SETDB1 représentent un défi considérable.

5.2 Synthèse d'analogues N6-substitués

On s'intéresse dans un premier temps à la substitution de la position N6 de l'adénine afin de vérifier la tolérance de l'enzyme à la présence d'un groupe alkyle ou aryle. Certaines enzymes possèdent des régions hydrophobes qu'il est possible d'exploiter dans la recherche d'inhibiteurs efficaces. C'est notamment le cas de l'enzyme DOT1L qui possède une cavité pouvant tolérer un groupe méthyle, voire même un groupe benzyle à la position N6 d'analogues de SAM : il a été démontré que ces analogues N6-substitués conservaient leur sélectivité à l'égard de DOT1L.^{15,16} La protection de l'amine des bases azotées est également une stratégie connue de modification des nucléosides thérapeutiques pour l'accroissement de la lipophilicité et de la stabilité métabolique face à la désamination.¹⁷ Ainsi, un substituant pourrait potentiellement bénéficier à nos analogues dans l'amélioration de l'activité biologique.

Étant donné que la relation stéréochimique impliquant l'atome de fluor ne semble pas influencer l'activité biologique pour les molécules **4.4** et **4.9**, l'intermédiaire **4.6a** avec une relation stéréochimique 1',2'-*cis* du chapitre précédent est un substrat idéal pour l'accès à nos analogues N6-substitués. Les dérivés 1',2'-*cis* présentent en effet une flexibilité supérieure pour l'incorporation de différentes bases azotées et l'accès rapide à de nouveaux dérivés en raison du substrat commercial **2.13**. Le chlorure en position C6 de la purine du composé **4.6a** peut être déplacé via différentes amines afin d'introduire les groupements benzyle et méthyle désirés (Schémas 5.1 et 5.2).

D'abord, le chlorure de l'intermédiaire **4.6a** est substitué en présence de benzylamine et le retrait des groupes benzoyles s'en suit (**5.1**, Schéma 5.1). Le chlorure de thionyle permet de fonctionnaliser la position C5' (**5.2**) pour la réaction avec la cystéamine, ce qui mène à la formation d'un premier analogue comportant une amine en bout de chaîne (**5.3**). Ensuite, la méthylamine est utilisée pour le déplacement *ipso* du chlorure en position C6 (composé **4.6a**), puis la déprotection est complétée en présence d'ammoniac (**5.4**, Schéma 5.2). La chloration de l'hydroxyle primaire (**5.5**) est suivie par le déplacement avec la cystéamine : l'analogue

N6-méthylé **5.6** est obtenu dans un rendement de 45 %. Ainsi, les nucléosides N6-substitués **5.3** et **5.6** sont générés en ces quelques étapes.

Schéma 5.1 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* N6-benzylé

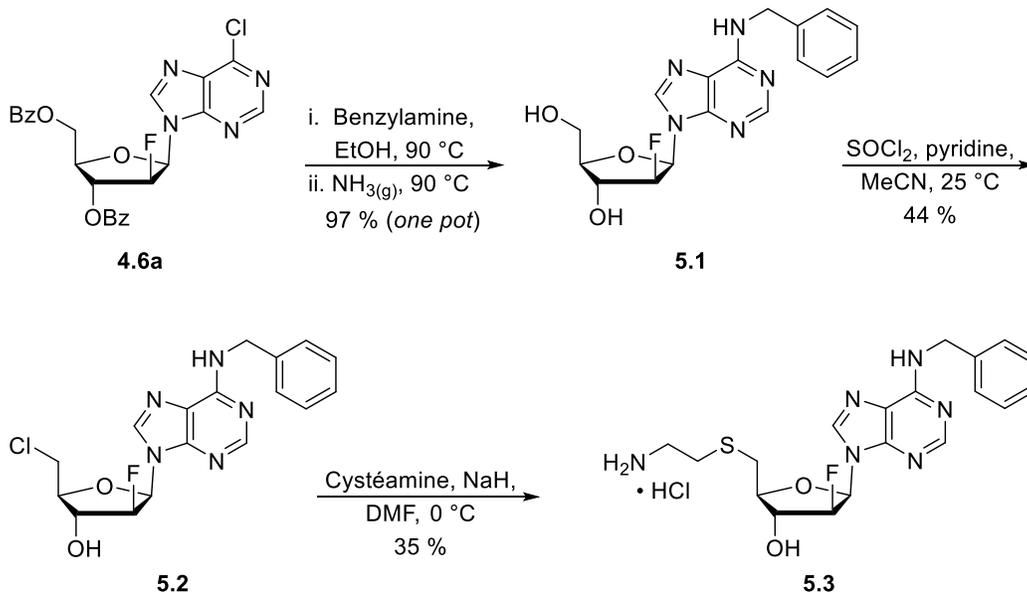
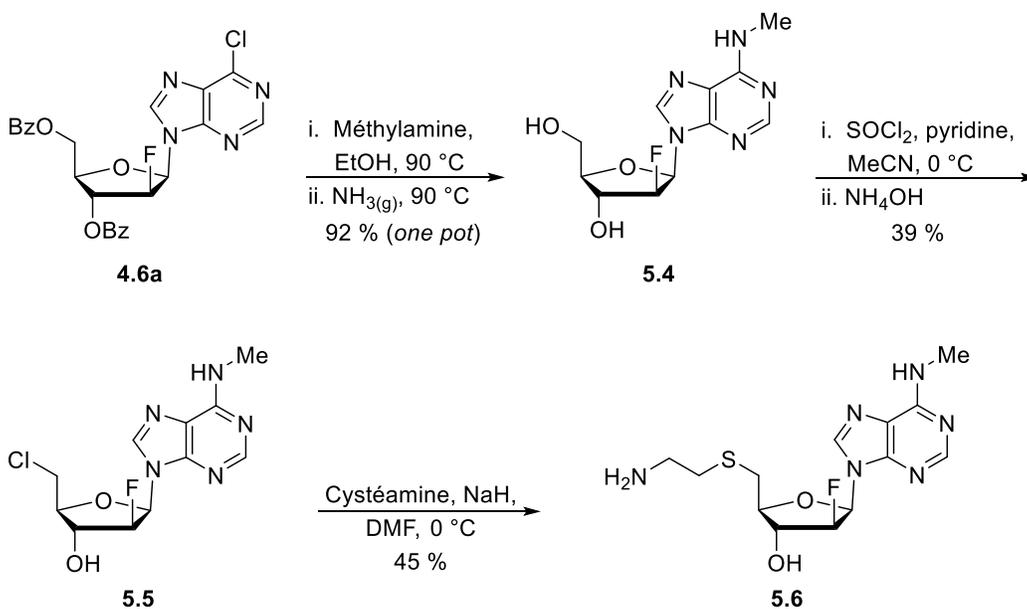


Schéma 5.2 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* N6-méthylé

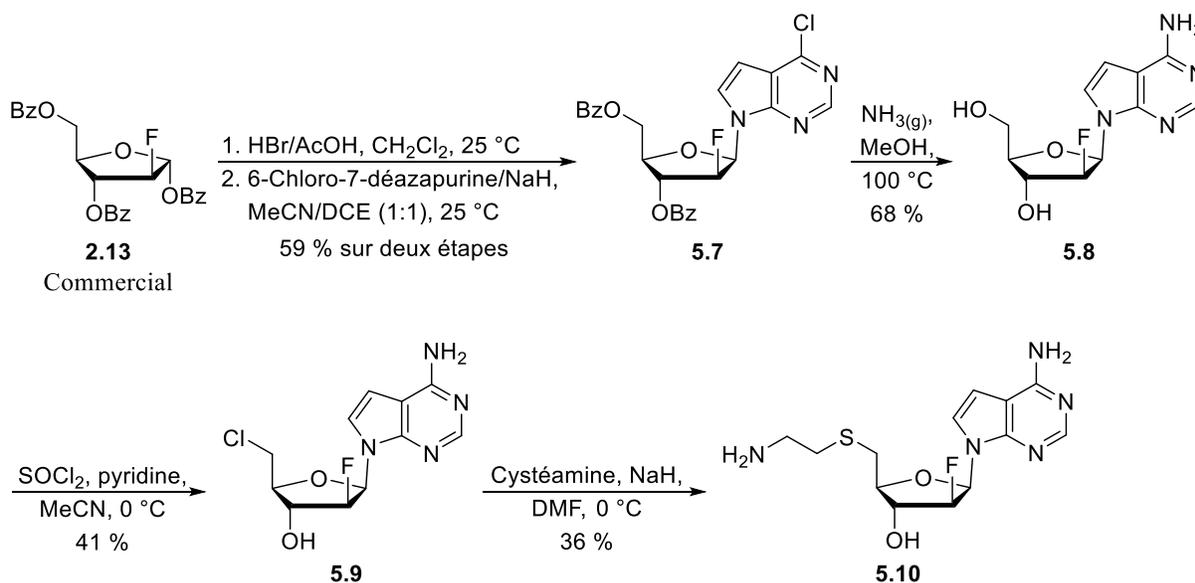


5.3 Synthèse de l'analogue 6-amino-7-déazapurine

Certains inhibiteurs ont été développés avec une 6-amino-7-déazapurine comme base nucléique, soit EPZ004777 et LLY-283 (voir les Figure 3.8 et Figure 3.9).^{18,19} Ces derniers ont effectivement montrés une affinité remarquable pour leur cible thérapeutique respective : DOT1L et PRMT5. Dès lors, on s'intéresse à la préparation d'un analogue comportant une base azotée N7-déazaadénine dans le développement de notre sonde chimique.

L'incorporation de cette base azotée s'entreprind via le déplacement d'un halogénure anomérique pour la formation du lien *N*-glycosidique (Schéma 5.3). La première étape consiste en la bromation du substrat commercial **2.13** où le couplage avec la 6-chloro-7-déazapurine est réalisé subséquemment. Seul le composé 1',2'-*cis* **5.7**, soit l'anomère β , est identifié lors de cette étape de couplage et la purification du mélange réactionnel brut mène à un rendement de 59 % pour celui-ci. La prochaine étape concerne la substitution du chlorure en position C6 de la purine et le retrait des groupements protecteurs en présence d'ammoniac méthanolique (**5.8**). La chloration permet de fonctionnaliser la portion C5' du nucléoside (**5.9**) et de générer l'analogue **5.10** après la réaction avec la cystéamine.

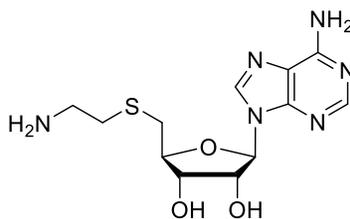
Schéma 5.3 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* comportant une N7-déazaadénine



5.4 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* C2'-hydroxyle

Lors d'un criblage enzymatique visant l'inhibition de méthyltransférases, la molécule DS-431 (Figure 5.1) a présenté de l'activité pour la famille des protéines arginine méthyltransférases (PRMTs).²⁰ Cependant, il n'y a aucune sélectivité à l'égard d'un des membres de cette famille, une des caractéristiques requises pour une sonde chimique. En ce qui concerne SETDB1, l'activité inhibitrice de ce nucléoside n'est que de 20 % à une concentration de 50 μM (résultats précédents obtenus par le SGC). Avec ces résultats en main, il semble que la substitution d'un groupe hydroxyle en position C2' par un atome de fluor (1',2'-*trans* et 1',2'-*cis*) permette une meilleure inhibition de SETDB1. En lien avec nos molécules, on s'intéresse alors à la préparation de l'analogue arabinoside de DS-431 pour une meilleure investigation concernant l'effet des substituants à la position C2'.

Figure 5.1 Structure de DS-431, inhibiteur non sélectif de méthyltransférases²⁰



DS-431

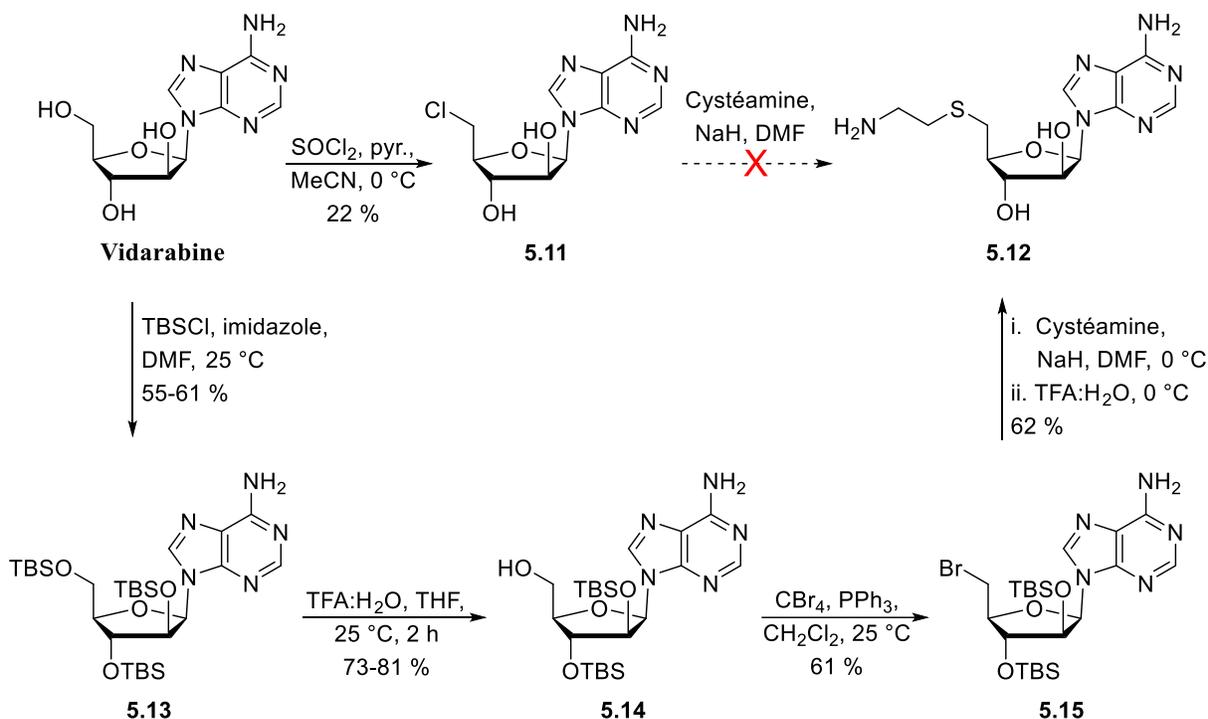
PRMTs : profil d'inhibition non sélectif

SETDB1 : 20 % d'inhibition à 50 μM

Une approche divergente est considérée dans l'atteinte du nucléoside arabinoside cible 1',2'-*cis* (**5.12**, Schéma 5.4). La vidarabine (araA), qui est commercialement disponible, possède la stéréochimie désirée à la position anomérique, de même qu'à la position C2'. La stratégie générale de chloration de l'alcool primaire a été appliquée et permet de générer le composé **5.11**. La tentative de déplacer le chlorure en position C5' directement avec la cystéamine a toutefois échoué et de la décomposition a été observée. Une autre stratégie, celle-ci nécessitant des groupes protecteurs, a été adoptée. Les hydroxyles libres de la vidarabine sont protégés avec la formation d'éthers silylés (OTBS). Le composé **5.13**²¹ est

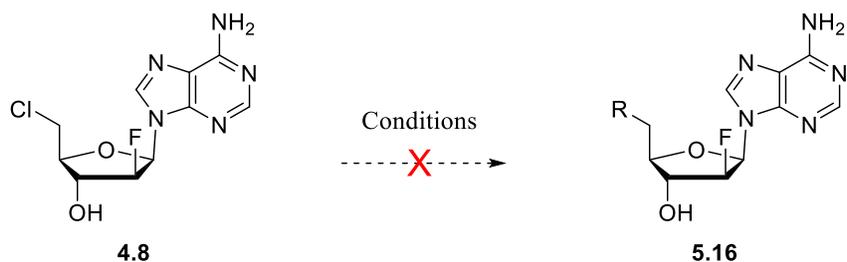
alors traité en milieu acide afin de retirer le groupe TBS primaire. La réaction d'Appel en employant le substrat **5.14**²¹ permet de générer le bromure en position C5' dans un rendement de 61 % (**5.15**). Le déplacement du bromure par la cystéamine, suivi par le retrait des groupes protecteurs en positions C2' et C3' mène à la formation de l'analogue désiré **5.12**.

Schéma 5.4 Synthèse de l'analogue 1',2'-*cis* C2'-hydroxyle **5.12**



5.5 Tentatives de modification de la chaîne latérale

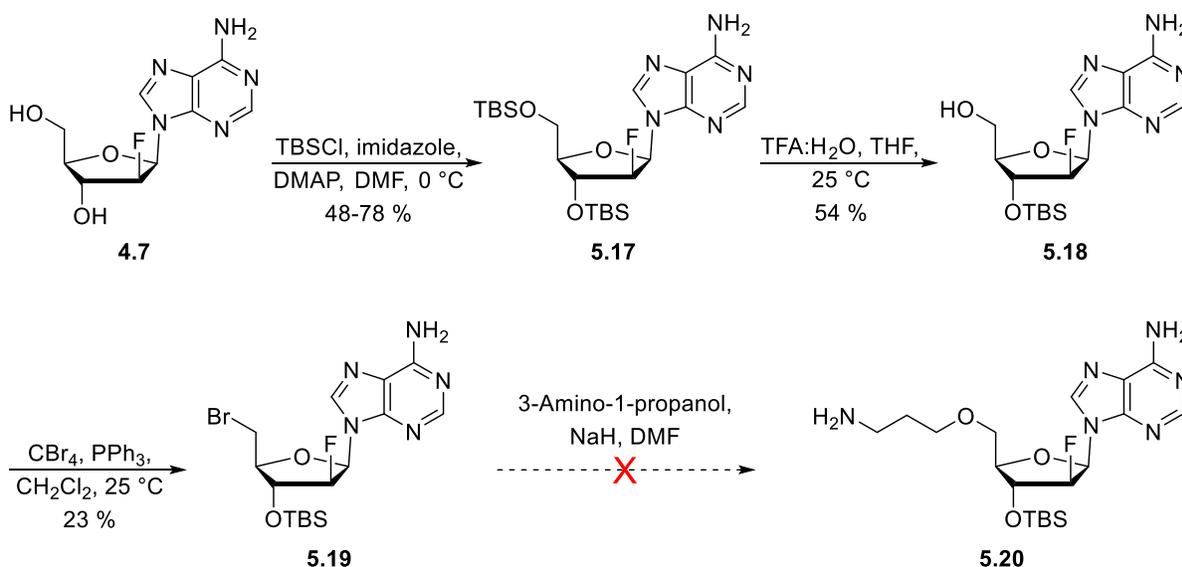
La modification de la chaîne latérale demeure un aspect nécessaire dans l'amélioration de l'activité biologique. Quelques tentatives ont été réalisées en employant l'intermédiaire C5'-chloré **4.8** et sont résumées au Tableau 5.1. Bien qu'il soit possible d'effectuer le déplacement du chlorure en présence de cystéamine (soufre nucléophile) en des rendements généralement autour de 40 %, il est plus difficile de fonctionnaliser la chaîne latérale en présence de l'éthylènediamine (entrée 1), l'éthanolamine (entrée 2) ou le 3-amino-1-propanol (entrée 3). Les dérivés **5.16** n'ont pas pu être générés via ces conditions.

Tableau 5.1 Tentatives de fonctionnalisation en C5'

Entrée	Conditions	Temp. (°C)	R (5.16)	Résultat
1	Éthylènediamine	100	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂	Produits inconnus
2	Éthanolamine, NaH, DMF	0	-O(CH ₂) ₂ NH ₂	Décomposition et produits inconnus
3	3-Amino-1-propanol, NaH, DMF	25	-O(CH ₂) ₃ NH ₂	Décomposition, produit de départ et produits inconnus

Une autre alternative a été tentée pour une fonctionnalisation de la portion latérale (Schéma 5.5). Les hydroxyles libres du composé **4.7** ont été protégés par la formation d'éthers silylés (**5.17**²²). Le retrait du groupe primaire en position C5' (**5.18**) a été suivi par la bromation en présence de triphénylphosphine (PPh₃) et de tétrabromure de carbone (CBr₄). Quelques tentatives ont été réalisées avec l'usage du 3-amino-1-propanol, mais celles-ci ont malheureusement échouées (Schéma 5.5). D'autres conditions réactionnelles, nucléophiles et groupes partants à la position C5' pourront être explorés pour l'accès à ces motifs structuraux.

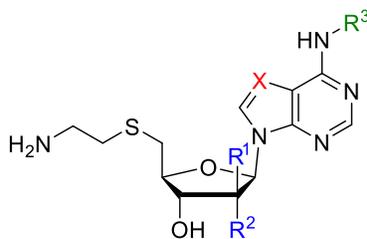
Schéma 5.5 Tentative de fonctionnalisation en C5' avec la synthèse de précurseurs protégés en position C3'



5.6 Résultats biologiques

Les molécules comportant une amine sur la portion latérale ont été testées pour l'inhibition de SETDB1 par nos collaborateurs du SGC et les résultats sont présentés au Tableau 5.2. La substitution en position N6 de l'adénine par un groupe benzyle (**5.3**) ou méthyle (**5.6**) n'est pas tolérée par SETDB1. Alors, les groupes aromatique (benzyle) et alkyle (méthyle) ne constituent pas une piste d'optimisation. La présence du lien C–H de la base N7-déazaadénine pour le composé **5.10** ne permet pas non plus d'augmenter l'activité biologique. Dès lors, la base azotée adénine doit être préservée dans son intégralité ($X = \text{N}$ et $\text{R}^3 = \text{H}$). Ensuite, la présence d'un groupe hydroxyle en position C2' n'améliore pas l'inhibition de SETDB1. En effet, le nucléoside DS-431 (1',2'-*trans* C2'-hydroxyle) possède une très faible activité vis-à-vis la cible enzymatique, de même que son analogue **5.12** (1',2'-*cis* C2'-hydroxyle). L'abstraction de ce groupe fonctionnel et son remplacement par un atome de fluor produit une activité inhibitrice. Jusqu'à maintenant, nos analogues C2'-fluoré **4.4** et **4.9** sont les plus actifs contre SETDB1.

Tableau 5.2 Activités *in vitro* des analogues comportant une fonctionnalité amine pour l'inhibition de la méthyltransférase SETDB1



Composé	X	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (μM)
					SETDB1
4.4	N	H	F	H	29
4.9	N	F	H	H	28
5.3	N	F	H	Bn	>100
5.6	N	F	H	Me	>100
5.10	CH	F	H	H	Aucune inhibition
5.12	N	OH	H	H	>100
DS-431 ²⁰	N	H	OH	H	20 % d'inhibition à 50 μM

5.7 Conclusion et perspectives

Ce chapitre portait sur la synthèse de nucléosides visant l'inhibition de la lysine méthyltransférase SETDB1. Cette enzyme, qui a été associée à diverses maladies incluant le cancer, est une cible thérapeutique pour laquelle il n'existe aucun précédent quant à son inhibition. Les premiers inhibiteurs de SETDB1 ont été préparés par notre laboratoire et testés par le SGC de Toronto. En l'absence d'une structure cristalline, certaines modifications ont été apportées à nos analogues afin de tenter d'en améliorer les activités. Des précédents associés à d'autres cibles enzymatiques et des stratégies sollicitées dans le développement d'agents thérapeutiques nous ont mené à la conception de nouveaux analogues. Une brève étude de la relation structure-activité a été réalisée : nos nucléosides C2'-monofluorés **4.4** et **4.9** ont

présenté les meilleures activités inhibitrices jusqu'à maintenant. Les résultats laissent place à de nouvelles modifications qui comprennent, entre autres, la diversification de la chaîne latérale. La synthèse de composés difluorés en position C2' et l'étude de leur activité pourraient emprunter une nouvelle avenue. De plus, la préparation de 4'-thioanalogues est en cours de développement (Chapitre 6). Ainsi, toutes ces perspectives d'améliorations structurelles pourraient fournir des pistes d'optimisation pour notre sonde chimique.

5.8 Références

1. Kaniskan, H. U.; Martini, M. L.; Jin, J. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 989-1068.
2. Wu, H.; Min, J.; Lunin, V. V.; Antoshenko, T.; Dombrovski, L.; Zeng, H.; Allali-Hassani, A.; Campagna-Slater, V.; Vedadi, M.; Arrowsmith, C. H.; Plotnikov, A. N.; Schapira, M. *PLoS One* **2010**, *5*, e8570.
3. Kouzarides, T. *Cell* **2007**, *128*, 693-705.
4. Bird, A. *Science* **2001**, *294*, 2113-2115.
5. Schultz, D. C.; Ayyanathan, K.; Negorev, D.; Maul, G. G.; Rauscher III, F. J. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 919-932.
6. Li, H.; Rauch, T.; Chen, Z.-X.; Szabó, P. E.; Riggs, A. D.; Pfeifer, G. P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19489-19500.
7. Sharma, S.; Kelly, T. K.; Jones, P. A. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 27-36.
8. Ryu, H.; Lee, J.; Hagerty, S. W.; Soh, B. Y.; McAlpin, S. E.; Cormier, K. A.; Smith, K. M.; Ferrante, R. J. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19176-19181.
9. Miura, S.; Maesawa, C.; Shibazaki, M.; Yasuhira, S.; Kasai, S.; Tsunoda, K.; Maeda, F.; Takahashi, K.; Akasaka, T.; Masuda, T. *Am. J. Dermatopathol.* **2014**, *36*, 211-216.
10. Wu, P.-C.; Lu, J.-W.; Yang, J.-Y.; Lin, I.-H.; Ou, D.-L.; Lin, Y.-H.; Chou, K.-H.; Huang, W.-F.; Wang, W.-P.; Huang, Y.-L.; Hsu, C.; Lin, L.-I.; Lin, Y.-M.; Shen, C.-K. J.; Tzeng, T.-Y. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 7333-7343.

11. Rodriguez-Paredes, M.; Martinez de Paz, A.; Simó-Riudalbas, L.; Sayols, S; Moutinho, C.; Moran, S.; Villanueva, A.; Vázquez-Cedeira, M.; Lazo, P. A.; Carneiro, F.; Moura, C. S.; Vieira, J.; Teixeira, M. R.; Esteller, M. *Oncogene* **2014**, *33*, 2807-2813.
12. Fei, Q.; Shang, K.; Zhang, J.; Chuai, S.; Kong, D.; Zhou, T.; Fu, S.; Liang, Y.; Li, C.; Chen, Z.; Zhao, Y.; Yu, Z.; Huang, Z.; Hu, M.; Ying, H.; Chen, Z.; Zhang, Y.; Xing, F.; Zhu, J.; Xu, H.; Zhao, K.; Lu, C.; Atadja, P.; Xiao, Z.-X.; Li, E.; Shou, J. *Nat. Commun.* **2015**, *6*:8651, DOI: 10.1038/ncomms9651.
13. Liu, L.; Kimball, S.; Liu, H.; Holowatyj, A.; Yang, Z.-Q. *Oncotarget* **2014**, *6*, 2466-2482.
14. Sun, Y.; Wei, M.; Ren, S.-C.; Chen, R.; Xu, W.-D.; Wang, F.-B.; Lu, J.; Shen, J.; Yu, Y.-W.; Hou, J.-G.; Xu, C.-L.; Huang, J.-T.; Sun, Y.-H. *Asian J. Androl.* **2014**, *16*, 319-324.
15. Yao, Y.; Chen, P.; Diao, J.; Cheng, G.; Deng, L.; Anglin, J. L.; Prasad, B. V. V.; Song, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16746-16749.
16. Anglin, J. L.; Deng, L.; Yao, Y.; Cai, G.; Liu, Z.; Jiang, H.; Cheng, G.; Chen, P.; Dong, S.; Song, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8066-8074.
17. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
18. Basavapathruni, A.; Jin, L.; Daigle, S. R.; Majer, C. R. A.; Therkelsen, C. A.; Wigle, T. J.; Kuntz, K. W.; Chesworth, R.; Pollock, R. M.; Scott, M. P.; Moyer, M. P.; Richon, V. M.; Copeland, R. A.; Olhava, E. J. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2012**, *80*, 971-980.
19. Bonday, Z. Q.; Cortez, G. S.; Grogan, M. J.; Antonysamy, S.; Weichert, K.; Bocchinfuso, W. P.; Li, F.; Kennedy, S.; Li, B.; Mader, M. M.; Arrowsmith, C. H.; Brown, P. J.; Eram, M. S.; Szewczyk, M. M.; Barsyte-Lovejoy, D.; Vedadi, M.; Guccione, E.; Campbell, R. M. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 612-617.
20. Structural Genomics Consortium (SGC), Toronto. Résultats biologiques non publiés.

21. Xu, Z.; Yin, W.; Martinelli, L. K.; Evans, J.; Chen, J.; Yu, Y.; Wilson, D. J.; Mizrahi, V.; Qiao, C.; Aldrich, C. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1726-1735.
22. Bockman, M. R.; Kalinda, A. S.; Petrelli, R.; De la Mora-Rey, T.; Tiwari, D.; Liu, F.; Dawadi, S.; Nandakumar, M.; Rhee, K. Y.; Schnappinger, D.; Finzel, B. C.; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7349-7369.

Chapitre 6

Synthèse de 2'-fluoro-4'-thiofuranosylpurines

6.1 Mise en contexte

Les propriétés thérapeutiques et métaboliques de 4'-thioanalogues ont été présentées (au Chapitre 2) advenant leurs diverses applications : agents en développement pour le traitement du cancer et pour la déméthylation de l'ADN. En effet, il existe un réel engouement à la substitution de l'atome d'oxygène par un atome de soufre au sein de l'anneau glucidique. Notre intérêt est d'incorporer cet isostère dans nos analogues C2'-fluorés ayant une base azotée purique et il se trouve que l'accès à ces structures représente un défi synthétique important. Bien que des stratégies de *N*-glycosylation ont déjà été développées à cette fin, l'approche acyclique développée par le laboratoire du professeur Guindon serait une voie plus efficace permettant d'atteindre ce type de motifs structuraux. Mon objectif est de développer cette stratégie acyclique pour l'accès aux 2'-fluoro-4'-thiofuranosylpurines.

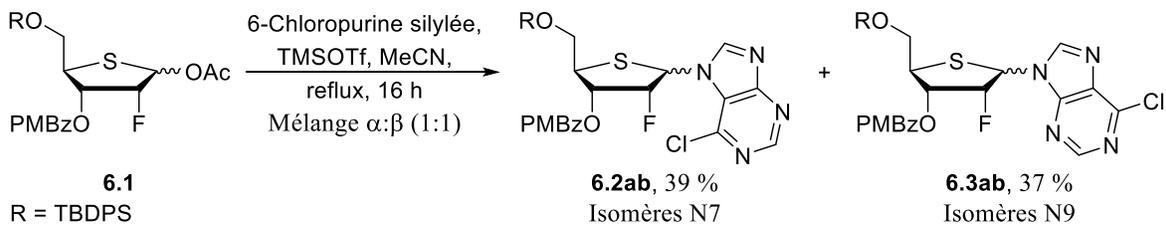
6.2 Stratégies de *N*-glycosylation existantes

6.2.1 *N*-glycosylation de thiofuranosides C2-monofluorés par voie cyclique

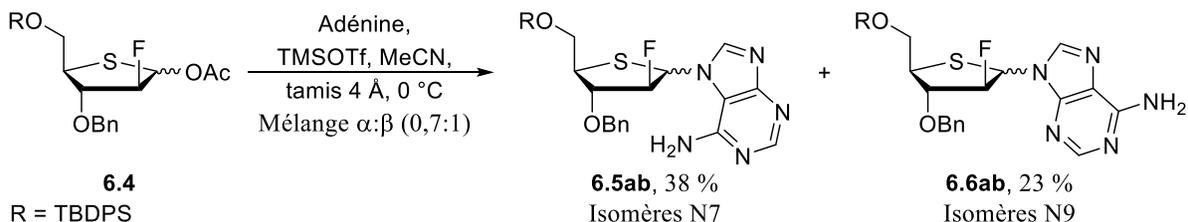
La glycosylation des thiofuranosides C2-fluorés est généralement peu sélective selon les méthodes conventionnelles par voie cyclique (Schéma 6.1).¹⁻³ D'abord, la glycosylation d'un acétyle anomérique (6.1 et 6.4) mène à des mélanges complexes : les anomères α et β sont obtenus en des ratios similaires pour les régioisomères N7 et N9.^{1,2} Ensuite, le déplacement d'un bromure anomérique (Schéma 6.1c) permet de générer seulement l'isomère N9, mais en un mélange anomérique $\sim 1:1$ (6.8ab).³ Étant donné que l'isomère β -N9 est celui désiré, il incombe de développer une stratégie de synthèse efficace lui donnant accès.

Schéma 6.1 *N*-glycosylation de C2-fluorothiofuranosides avec l'usage de purines¹⁻³

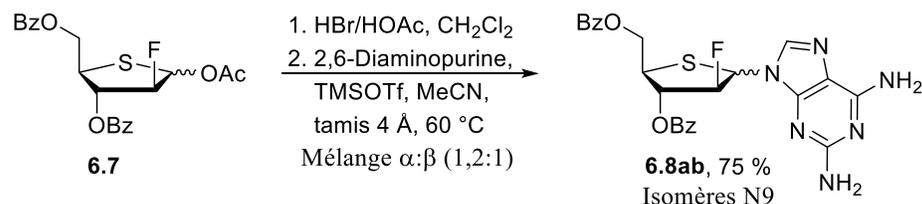
a) Takahashi et collaborateurs



b) Yoshimura et collaborateurs



c) Yoshimura et collaborateurs

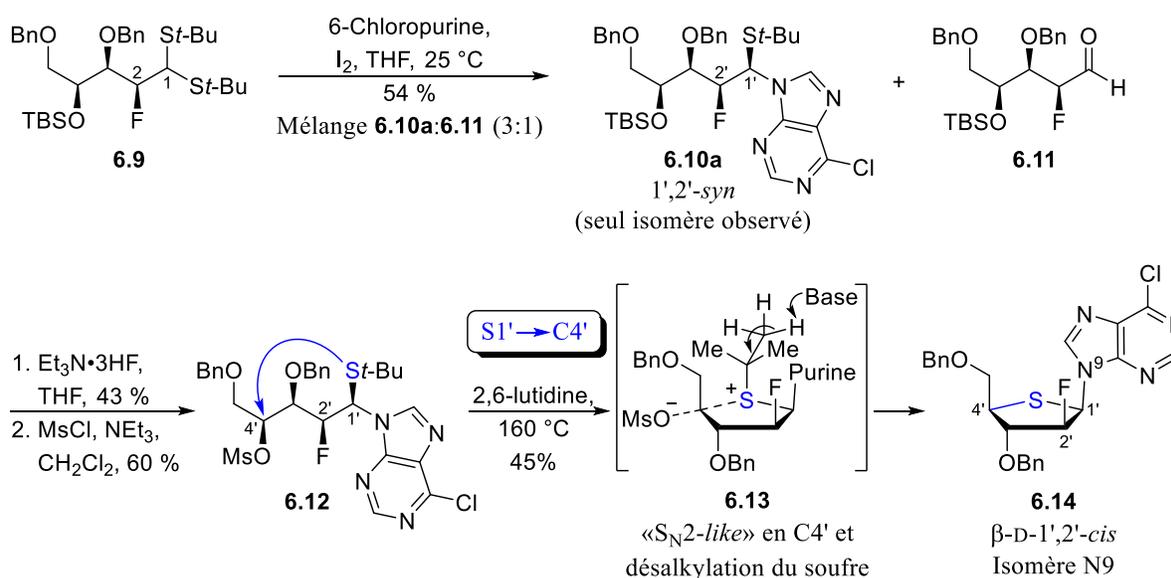


6.2.2 *N*-glycosylation par voie acyclique

Une autre stratégie de *N*-glycosylation consiste en le couplage de la base azotée sur un substrat acyclique (voir la section 2.2.1 du Chapitre 2). Quelques exemples ont déjà été rapportés dans la littérature pour l'addition d'une purine (sous la forme d'un sel de mercure) sur un intermédiaire acyclique dithioacétal (avec la présence ou non d'un groupe alkoxy en position C2).⁴⁻⁸ Notre laboratoire s'est par la suite penché sur le couplage d'une purine (en employant différentes conditions) sur une variété de dithioacétals comportant particulièrement un groupe C2-alkoxy.⁹ Ces intermédiaires acycliques, les thioaminals, avaient alors été soumis subséquentment dans des conditions de cyclisation via le mode S1'→C4' pour l'atteinte de 4'-thionucléosides comportant l'adénine et un groupe C2'-benzyloxy.⁹

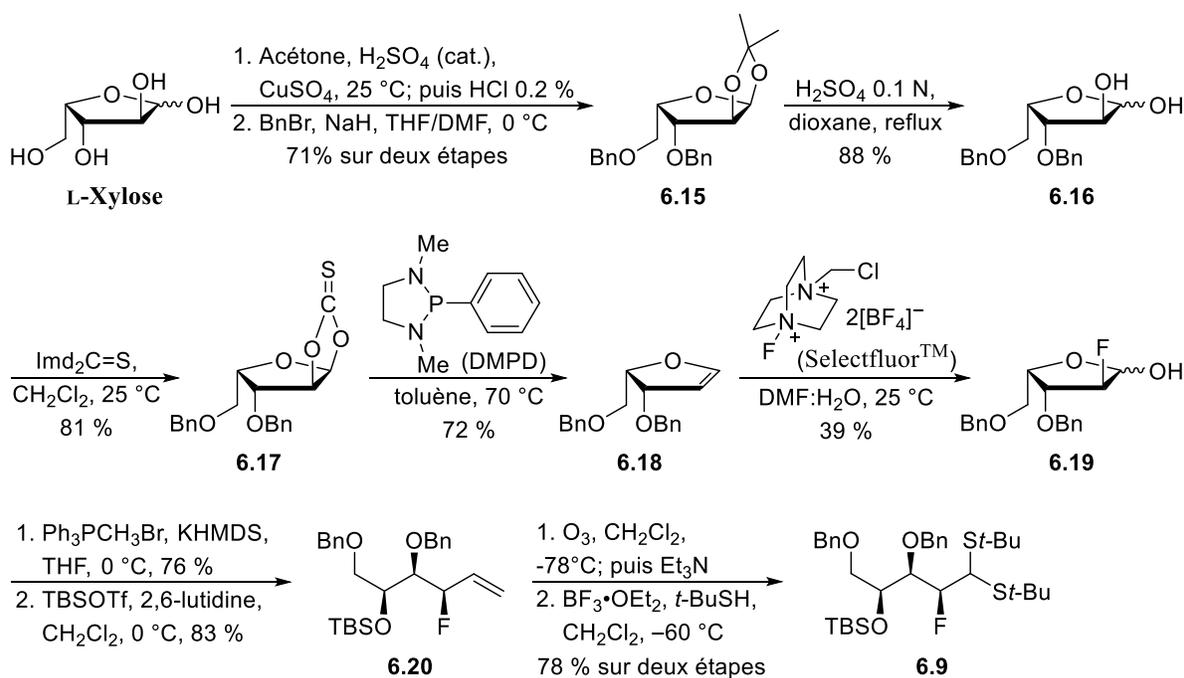
Plus récemment, le laboratoire du professeur Guindon a élargi l'utilisation de la voie acyclique à la synthèse de 2'-fluoronucléosides et 2'-fluoro-4'-thionucléosides avec la thymine (une base azotée pyrimidique), lesquels représentent aussi un défi synthétique important.¹⁰ En ce qui concerne l'usage d'une purine pour l'atteinte de 2'-fluoro-4'-thiofuranosylpurines, les résultats initiaux de notre laboratoire, au Schéma 6.2, ont montré que le couplage de la 6-chloropurine sur le dithioacétal acyclique **6.9**^{10,11} en présence d'iode génère sélectivement un seul isomère (**6.10a**, isomère 1',2'-*syn*, de configuration *R* à la position C1').¹¹ L'analyse du brut réactionnel révèle la formation d'un seul isomère (**6.10a**) où l'isomère minoritaire 1',2'-*anti* (de configuration *S* à la position C1', **6.10b**) n'a pas été identifié. Après le retrait du groupe TBS et l'installation d'un mésylate en position C4', le thioaminal 1',2'-*syn* **6.12** est soumis aux conditions de cyclisation : le mode S1'→C4' implique une inversion de configuration en C4' par le déplacement du mésylate, ainsi que la désalkylation du soufre (**6.13**). Le nucléoside **6.14** est alors généré et sa structure a été confirmée par des expériences RMN bidimensionnelles.¹¹ Ainsi, le développement de cette stratégie empruntant une voie acyclique permet de surmonter les faibles sélectivités rencontrées pour ces motifs structuraux et offre une alternative plus qu'efficace.

Schéma 6.2 Couplage d'une purine sur un dithioacétal et cyclisation du thioaminal 1',2'-*syn* par Starr Dostie^{10,11}



Les résultats préliminaires présentés au Schéma 6.2 sont très encourageants pour ce qui est de l'accès à des thioanalogues avec une excellente sélectivité pour l'anomère β depuis des substrats acycliques. Les quelques étapes présentées laissent toutefois entrevoir l'optimisation des conditions employées pour le couplage et la cyclisation. En ce qui concerne le dithioacétal fonctionnalisé **6.9**, qui est nécessaire pour la stratégie acyclique, plusieurs étapes liées à sa préparation doivent être améliorées et/ou optimisées (Schéma 6.3).¹¹

Schéma 6.3 Synthèse du dithioacétal acyclique C2-fluoré par Starr Dostie¹¹



La synthèse débute avec le L-xylose afin d'obtenir un nucléoside de série D lors de l'étape de cyclisation (inversion en position C4'). La protection des hydroxyles en positions C1 et C2 par un acétonide permet d'introduire des groupes benzyles aux positions C3 et C5 (**6.15**^{11,12}). Le retrait en milieu acide de l'acétonide (**6.16**^{11,12}) est suivi par la formation du thionocarbonate **6.17**^{11,13} avec le thiocarbonyldiimidazole. Le traitement avec la DMPD (1,3-diméthyl-2-phényl-1,3,2-diazaphospholidine) génère le glycal **6.18**^{11,14}. Une alternative moins dispendieuse est envisagée pour réaliser l'oléfination de Corey-Winter. La fluoration du glycal **6.18** en présence d'une source électrophile de fluor (Selectfluor™) a permis d'introduire

l'atome halogène sur le sucre avec un rendement modeste (39 %) pour le lactol **6.19**^{10,11}. L'ouverture du sucre fluoré avec la réaction de Wittig est suivie par la protection de l'hydroxyle en C4 (**6.20**^{10,11}). Une ozonolyse de l'alcène permet de générer l'aldéhyde correspondant qui est converti en dithioacétal acyclique (**6.9**) en présence d'un acide de Lewis. Bien que les rendements associés à ces dernières étapes soient élevés, une réduction du nombre d'étapes est envisageable pour générer un dithioacétal directement depuis le lactol C2-fluoré **6.19**.

6.3 Développement de la voie de synthèse acyclique

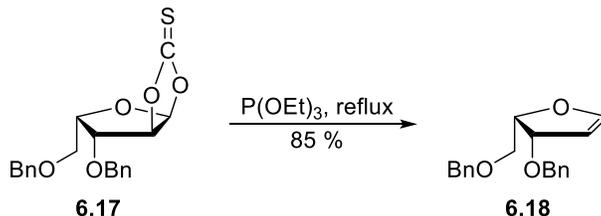
6.3.1 Objectifs reliés à la synthèse de 2'-fluoro-4'-thionucléosides

Tel que mentionné précédemment, certaines étapes menant au thionucléoside avec une purine (**6.14**) peuvent être améliorées et/ou optimisées. En ce sens, mon objectif est d'explorer certaines alternatives et de fournir des pistes d'optimisation, puisque la formation de 2'-fluoro-4'-thionucléosides comportant une purine représente un défi considérable selon les approches standards.

6.3.2 Réaction d'oléfination

En premier lieu, on s'intéresse à l'usage d'une phosphite en remplacement du dispendieux réactif de Corey-Hopkins (DMPD). Ce dernier est utilisé pour l'oléfination de Corey-Winter, une méthode de synthèse d'alcènes depuis des diols-1,2 convertis en leurs 1,2-thionocarbonates cycliques correspondants. En employant la peu coûteuse triéthylphosphite (Bp = 156 °C) à reflux¹⁵, il a été possible de générer le glycal **6.18** en un bon rendement (85 % sur une échelle supérieure à 10 g, Schéma 6.4). Il est important de noter que l'usage de la triméthylphosphite (Bp = 112 °C) à reflux ne permettait pas une conversion complète du produit de départ. Donc, le composé **6.18** a pu être formé dans un rendement légèrement supérieur (85 % versus 72 %) avec une phosphite moins dispendieuse.

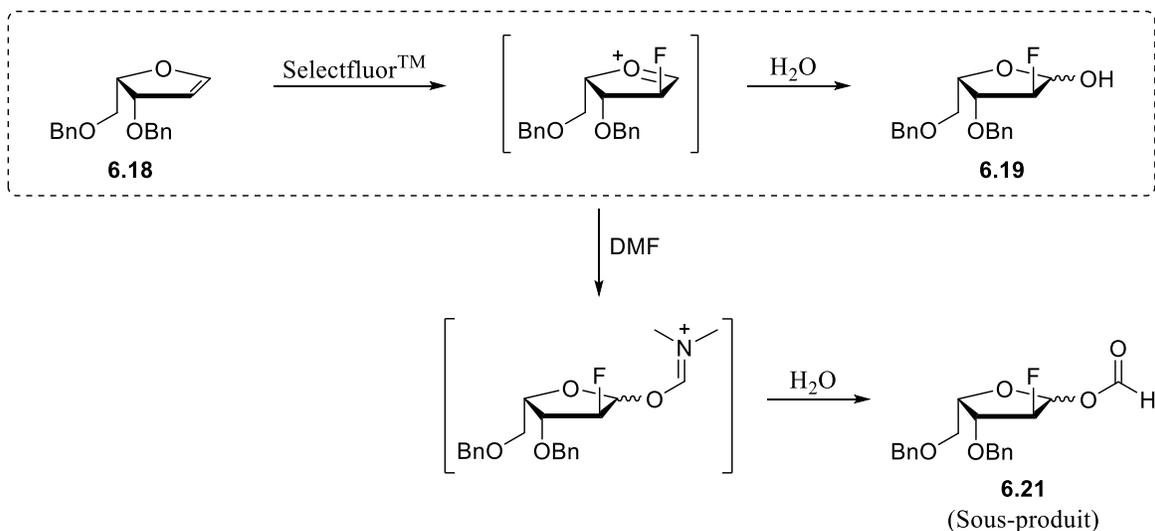
Schéma 6.4 Conditions optimisées pour générer le composé **6.18**



6.3.3 Stratégie de fluoration

La fluoration du glycal **6.18** est une étape charnière permettant l'atteinte de nos dérivés C2-fluorés. La méthode repose sur la fluoration sélective d'un glycal en position C2 et sur l'addition nucléophile (H_2O) à la position anomérique.¹⁶ Le réactif SelectfluorTM sert de source de fluor électrophile et la présence d'eau dans le système de solvant utilisé permet de générer le 2-désoxy-2-fluorofuranoside **6.19** (Schéma 6.5).^{11,16}

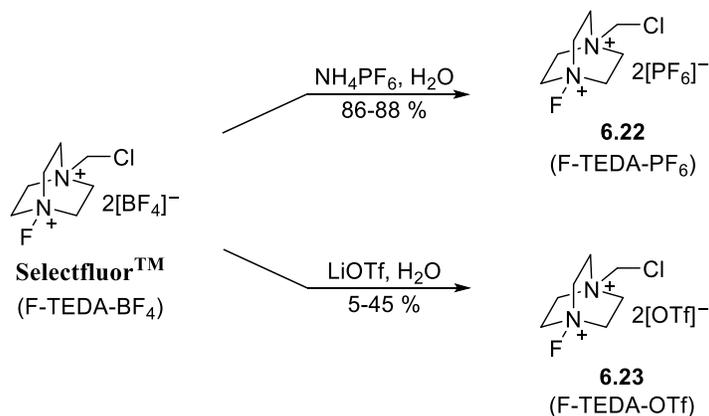
Schéma 6.5 Synthèse du lactol C2-fluoré **6.19**¹¹



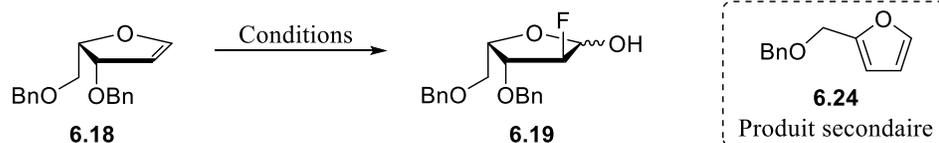
Les premières conditions employées pour générer le lactol **6.19** ont été réalisées pour divers ratios DMF: H_2O , où un ratio de 10:1 s'est avéré optimal (rendement de 39 %, Schéma 6.3).¹¹ Cependant, un sous-produit (**6.21**) peut être observé avec l'usage de DMF (voir Schéma

6.5).¹¹ On s'est alors tourné vers différents systèmes de solvant et la modification du contre-ion du SelectfluorTM, qui sont des paramètres dits cruciaux pour cette méthode.^{17,18} Les versions F-TEDA-PF₆ (**6.22**¹⁹) et F-TEDA-OTf (**6.23**²⁰) du SelectfluorTM (F-TEDA-BF₄) ont alors été préparées (Schéma 6.6).

Schéma 6.6 Synthèse des dérivés F-TEDA-PF₆ et F-TEDA-OTf



Les différentes conditions utilisées pour la fluoration du composé **6.18** sont répertoriées au Tableau 6.1. Dans les conditions initiales (DMF:H₂O), la réaction génère un mélange brut **6.19**:**6.21** (3:1) dont le lactol **6.21** peut être séparé après purification (rendement de 39 %, entrée 1). En effectuant une variation du système de solvant, il a été observé que l'acétonitrile ne permet pas de générer le produit désiré (entrée 2). Avec l'usage de DCM, le produit secondaire **6.24** est formé (entrée 3). Ce produit secondaire (**6.24**) est aussi formé lorsque le glycol **6.18** n'est pas utilisé au cours des 24 heures suivant sa purification. Le système THF:H₂O (ratio de 5 ou 10:1, entrée 4) s'est avéré être un aussi bon système que celui utilisé précédemment (DMF:H₂O, entrée 1).

Tableau 6.1 Fluoration du glycal **6.18**

Entrée	Solvant (0,2 M)	Agent de fluoration	Temp. (°C)	Temps (h)	Rend. ^a (%)
1	DMF:H ₂ O (10:1)	Selectfluor™	25	16	39
2	MeCN:H ₂ O (10:1)	Selectfluor™	25	16	----- ^b
3	CH ₂ Cl ₂ :H ₂ O (10:1)	Selectfluor™	25	36	----- ^c
4	THF:H ₂ O (5-10:1)	Selectfluor™	25	16	24-44 ^d
5	THF:H ₂ O (10:1)	Selectfluor™	50	16	19 ^b
6	THF:H ₂ O (20:1)	Selectfluor™	25	16	11 ^c
7	THF:H ₂ O (10:1)	NFSI	25	60	----- ^c
8	THF:H ₂ O (5-10:1)	F-TEDA-OTf	25	16	44-49 ^e
9	THF:H ₂ O (5-10:1)	F-TEDA-PF ₆	25	16	35-59 ^f

^a Rendement des produits isolés. ^b Décomposition, produits inconnus. ^c Produit secondaire **6.24** observé majoritairement. ^d Échelle du gramme. ^e Trois expériences réalisées. ^f Cinq expériences réalisées.

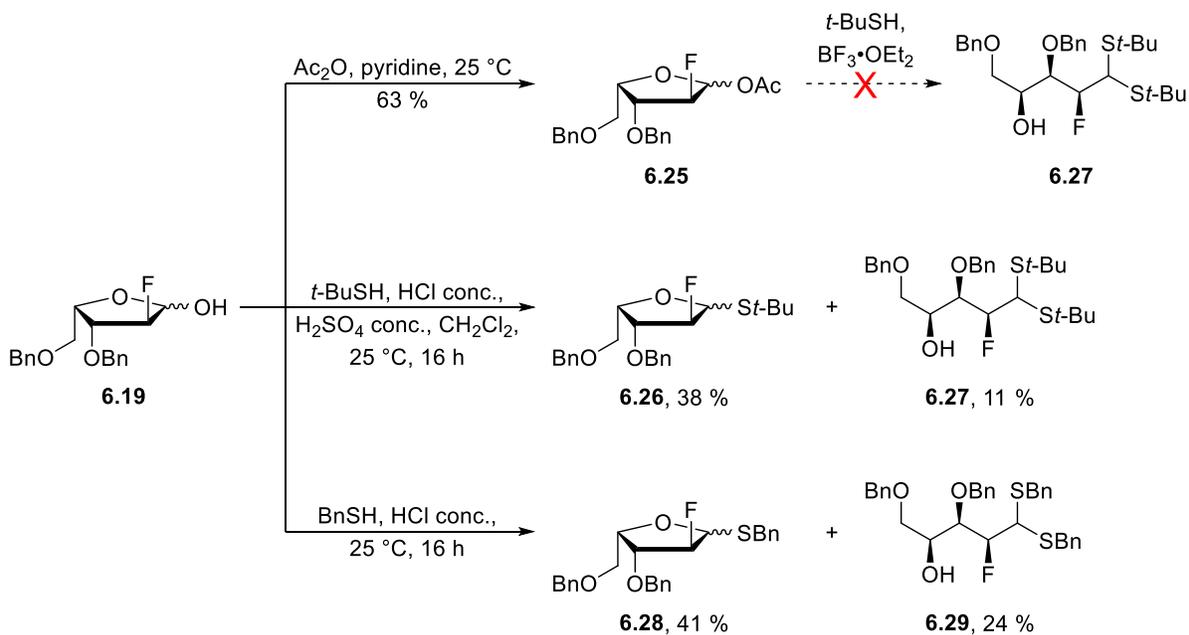
À une température de 50 °C (entrée 5), de la décomposition est observée et divers produits inconnus sont formés. En des proportions insuffisantes d'eau pour la fluoration (ratio de 20:1 THF:H₂O, entrée 6), le produit secondaire **6.24** est généré majoritairement. Il est également observé lorsque la *N*-fluorobenzènesulfonimide (NFSI) est utilisée comme source électrophile de fluor (entrée 7). Malheureusement, la modification du contre-ion (entrées 8 et 9) ne permet pas d'améliorer significativement les rendements associés à la fluoration : un résultat légèrement plus élevé est obtenu avec le F-TEDA-PF₆ (rendement maximal de 59 %, entrée 9) en comparaison avec le F-TEDA-OTf (rendement maximal de 49 %, entrée 8) et le Selectfluor™ (rendement maximal de 44 %, entrée 4). Les meilleures conditions ont été utilisées sur l'échelle du gramme, soit un système THF:H₂O de 5:1 ou 10:1 avec le Selectfluor™ disponible commercialement (entrée 4). Les faibles rendements obtenus, qui sont inférieurs à 50 % dans les meilleures conditions, renseignent sur la pertinence de trouver

une alternative à cette stratégie de fluoration afin d'atteindre les 4'-thionucléosides C2'-fluorés plus efficacement. Par exemple, la fluoration énantiosélective de substrats acycliques comportant un acétonide protégeant un groupe alkoxy en C3 a été publiée et pourrait être une approche envisageable.²¹

6.3.4 Formation de dithioacétals

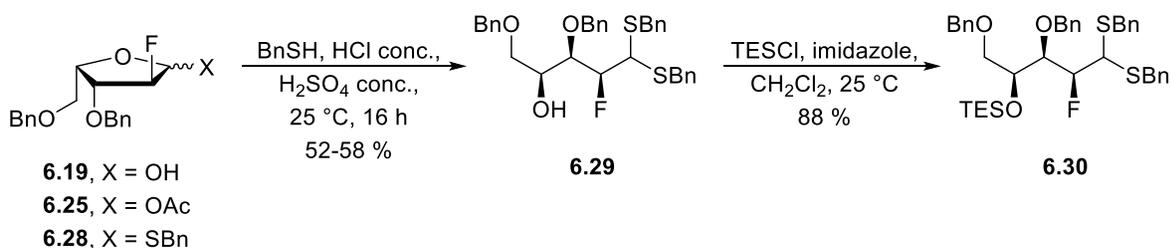
Afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires à la formation du dithioacétal **6.9**, des tentatives ont été réalisées sur le furanoside **6.19** pour accéder directement au dithioacétal sans l'utilisation de la réaction de Wittig (Schéma 6.7). L'usage d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) ne permet pas la formation du dithioacétal acyclique **6.27** depuis le furanoside **6.25** : de la décomposition a été observée, de même que le thioglycoside **6.26**. Bien que la réaction de Fischer avec l'ajout d'acide sulfurique concentré permet de générer le dithioacétal **6.27** dans un faible rendement de 11 %, cette réaction ne constitue pas la meilleure alternative. Alors, pour générer le *tert*-butyldithioacétal **6.9**, l'emploi de la réaction de Wittig et l'ozonolyse est la voie la plus efficace (rendements respectifs de 76 et 78 % au Schéma 6.3).

Schéma 6.7 Synthèse de dithioacétals à partir de substrats cycliques



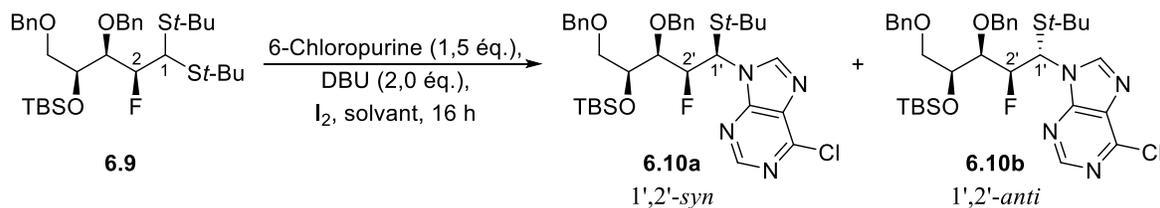
En passant du 2-méthyl-2-propanethiol (*t*-BuSH) au benzyle mercaptan (BnSH) au Schéma 6.7, la réaction de Fischer a permis de générer le dithioacétal **6.29** dans un rendement de 24 %. Le thioglycoside **6.28** est également obtenu dans un rendement de 41 %. En ajoutant de l'acide sulfurique concentré pour la réaction de Fischer avec le benzyle mercaptan (Schéma 6.8), les furanosides **6.19**, **6.25** et **6.28** ont été complètement convertis en dithioacétal **6.29** en des rendements se situant entre 52 et 58 %. S'en est suivi par la protection de l'hydroxyle en position C4 avec un groupe triéthylsilyle (TES) pour la formation du composé **6.30**. La génération du benzyldithioacétal **6.30** en employant la réaction de Fischer est une approche plus directe et peut être considérée comme une meilleure alternative dans ce cas-ci.

Schéma 6.8 Synthèse du dithioacétal **6.30** depuis des substrats cycliques



6.3.5 Couplage de la 6-chloropurine sur des dithioacétals

Le couplage de la base azotée sur le dithioacétal **6.30** a permis de générer le thioaminal 1',2'-*syn* **6.31a** en présence de DBU (Tableau 6.2).²² Cette base, préférée à l'hydrure de sodium, a été ajoutée afin de déprotoner l'azote N9 de la 6-chloropurine et rendre cette position plus nucléophile. En employant 5 équivalents d'iode à 40 °C, aucune réaction n'est intervenue dans le THF (entrée 1) alors que dans l'acétonitrile (entrée 2) le produit 1',2'-*syn* a été observé et identifié dans un mélange complexe de produits inconnus (aucun produit de départ observé). La réduction à 4 équivalents d'iode à une concentration de 0,2 M (entrée 3) ne permettant pas de générer un produit de couplage, la molarité de la réaction a été élevée à 0,5 M (entrées 4, 5 et 6). Pour 4 équivalents d'iode, la réaction s'effectue à 40 °C et permet l'obtention du produit majoritaire 1',2'-*syn* **6.31a** à hauteur de 18-29 % (entrée 6). L'analyse

Tableau 6.3 Couplage de la 6-chloropurine sur le dithioacétal **6.9**

Entrée	I ₂ (éq.)	Solvant	Temp. (°C)	Rend. ^a (%)
1	4,0	MeCN (0,5 M)	25	28-45 ^{b,c}
2	2,0	MeCN (0,5 M)	25	7 ^d
3	2,0	MeCN (0,2 M)	40	----- ^e

^a Rendement de **6.10a** (1',2'-syn). ^b Mélange complexe de produits inconnus par analyse RMN ¹H du brut réactionnel pour lequel le produit **6.10a** s'est avéré majoritaire (trois expériences réalisées). ^c Un autre isomère a été observé, celui-ci serait potentiellement l'isomère N7. ^d Produit de départ observé. ^e Aucune réaction, produit de départ observé.

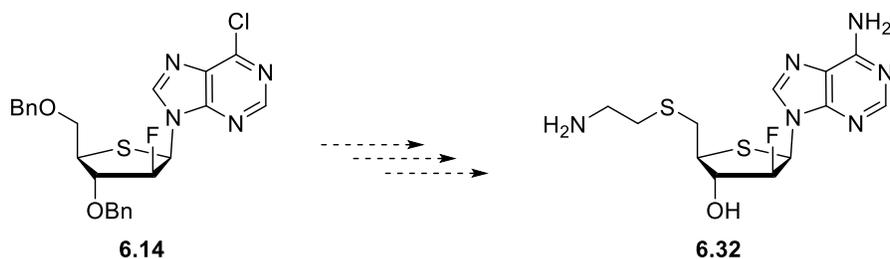
À partir de ces résultats obtenus, le couplage d'une purine sur un dithioacétal acyclique doit davantage être investigué et optimisé. La déprotection du groupe silylé en position C4' et la réaction de cyclisation subséquente réalisées dans notre laboratoire nous laissent penser que cette approche pourrait être utilisée pour générer des 4'-thioanalogues incorporant une base azotée purique et un atome de fluor en position C2'.

6.4 Conclusion et perspectives

La méthodologie développée dans le laboratoire du professeur Guindon est la plus efficace pour l'accès aux thiofuranosides avec une pyrimidine. Le couplage diastéréosélectif d'une base azotée purique par l'usage de l'approche acyclique doit être davantage optimisé. Des améliorations ont été apportées à la préparation des précurseurs nécessaires à cette stratégie acyclique dont l'oléfination de Corey-Winter, qui a été effectuée avec une phosphite en un rendement de 85 % après optimisation. La stratégie actuelle de fluoration avec le SelectfluorTM demeure une étape problématique et ce, malgré les tentatives d'optimisation (modification du système de solvant utilisé, du contre-ion de la source de fluor). La mise en

place d'une autre stratégie devra être considérée. Différents furanosides C2-fluorés ont été transformés en dithioacétals acycliques afin d'effectuer le couplage avec la 6-chloropurine. Des thioaminals ont été isolés et ceux-ci pourront être soumis dans les conditions de cyclisation donnant l'accès au nucléoside **6.14** (Schéma 6.2, Schéma 6.9). Il est envisageable que la génération de thionucléosides comme le composé **6.14** pourrait servir à l'amélioration des propriétés thérapeutiques de notre sonde chimique visant l'inhibition de SETDB1 (**6.32**, Schéma 6.9).

Schéma 6.9 Synthèse envisagée du 4'-thioanalogue **6.32**



6.5 Références

1. Takahashi, M.; Daidouji, S.; Shiro, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4313-4324.
2. Yoshimura, Y.; Kitano, K.; Yamada, K.; Sakata, S.; Miura, S.; Ashida, N.; Machida, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1545-1558.
3. Yoshimura, Y.; Endo, M.; Miura, S.; Sakata, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7912-7920.
4. Pedersen, C.; Fletcher Jr., H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5210-5211.
5. Hanessian, S.; Dixit, D. M.; Liak, T. J. *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 129-148.
6. Horton, D.; Liu, C.-M. *Carbohydr. Res.* **1982**, *107*, 55-70.
7. Horton, D.; Thomas, S.; Gallucci, J. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2211-2218.

8. Voir aussi pour la synthèse de thioaminals acycliques comportant une purine : (a) Wolfrom, M. L.; McWain, P.; Thompson, A. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3549-3551; (b) Wolfrom, M. L.; McWain, P.; Bhat, H. B.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 296-300; (c) Horton, D.; Kokrady, S. S. *Carbohydr. Res.* **1972**, *24*, 333-341; (d) Horton, D. *Pure Appl. Chem.* **1975**, *42*, 301-325; (e) Baker, D. C.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1979**, *69*, 117-134.
9. Cardinal-David, B., *Création de centres stéréogéniques sur des molécules acycliques par contrôle du substrat: synthèse de centres quaternaires et d'analogues de nucléosides*. Thèse de doctorat (Université de Montréal), 2008.
10. Dostie, S.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Tanveer, K.; Andrella, N.; Rostami, A.; Tambutet, G.; Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10769-10790.
11. Dostie, S., *Diastereoselective Synthesis of Nucleoside Analogues via Cyclization of Acyclic Precursors*. Thèse de doctorat (Université McGill), 2016.
12. Bouillon, M. E.; Pyne, S. G. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 475-478.
13. Procédure et caractérisation de l'énantiomère par : Murakami, M.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 1733-1736.
14. Procédure et caractérisation de l'énantiomère par : Diaz, R. R.; Melgarejo, C. R.; Cubero, I. I.; Plaza López-Espinosa, M. T. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 375-380.
15. Robertson, J.; Stafford, P. M.; Bell, S. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7133-7148.
16. Burkart, M. D.; Zhang, Z.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11743-11746.
17. Vincent, S. P.; Burkart, M. D.; Tsai, C.-Y.; Zhang, Z.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5264-5279.
18. Albert, M.; Dax, K.; Ortner, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4839-4848.
19. Furuya, T.; Strom, A. E.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1662-1663.
20. Yuan, G.; Wang, F.; Stephenson, N. A.; Wang, L.; Rotstein, B. H.; Vasdev, N.; Tang, P.; Liang, S. H. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 126-129.

21. Hu, X.-G.; Lawer, A.; Peterson, M. B.; Iranmanesh, H.; Ball, G. E.; Hunter, L. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 662-665.
22. Sur la base des résultats précédents obtenus par Starr Dostie, il est assumé que le thioaminal 1',2'-*syn* est formé (**6.31a**), mais celui-ci doit être confirmé avec une cyclisation subséquente.

Partie 2

Synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides C2'-fluorés à visée thérapeutique

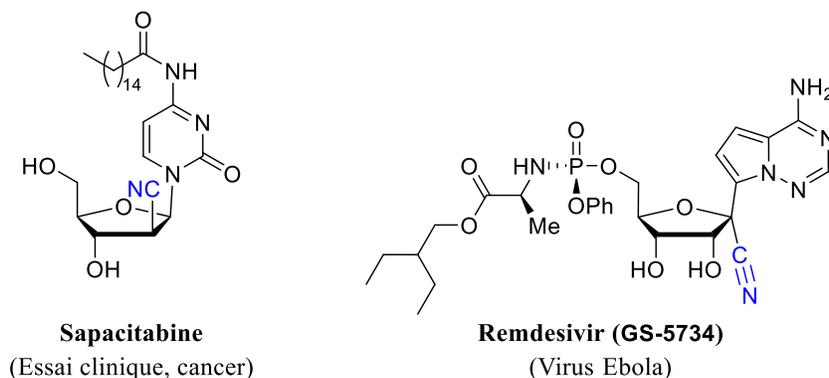
Chapitre 7

Synthèse et étude des propriétés anticancéreuses de nucléosides monofluorés comportant un centre quaternaire fonctionnalisé

7.1 Mise en contexte et objectifs de recherche

Des nucléosides possédant un groupe nitrile ont été présentés antérieurement pour le traitement du cancer et des virus (voir la section 2.1.1 du Chapitre 2). En effet, la sapacitabine, qui est en développement pour le cancer et le traitement des tumeurs solides, de même que le remdesivir pour le traitement du virus Ebola possèdent tous deux un tel groupe fonctionnel (Figure 7.1).¹⁻⁴ Ils sont respectivement à la position C2' et C1' de l'anneau glucidique. D'autres nucléosides ont aussi été rapportés avec un groupe nitrile aux positions C1', C2', C3' et C4'.⁵⁻⁹ Girijavallabhan et ses collaborateurs ont notamment préparé des analogues comportant un centre quaternaire carboné ayant un nitrile à la position C2' (Figure 7.2).⁹

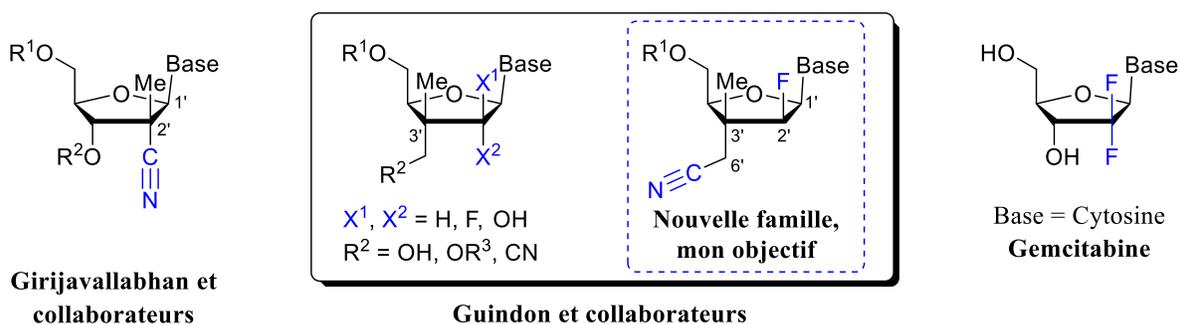
Figure 7.1 Agents thérapeutiques nucléosidiques comportant une fonctionnalité nitrile¹⁻⁴



Notre laboratoire s'intéresse à des familles de nucléosides ayant un centre quaternaire carboné plutôt en position C3' (Figure 7.2), où cette nouveauté a été confirmée par le dépôt d'un brevet.¹⁰ Le laboratoire du professeur Guindon possède effectivement un engouement

particulier pour ces motifs structuraux, les défis synthétiques qui leur sont rattachés et leurs applications thérapeutiques.¹⁰⁻¹⁴ Des analogues développés précédemment dans notre groupe de recherche avec un centre quaternaire en C3' ont présenté une activité prometteuse sur des lignées cellulaires cancéreuses du pancréas.¹⁴ Certains de ces analogues possèdent un groupe hydroxyméthyle substitué d'un phosphoramidate à la position C3', ainsi qu'un phosphoramidate à la position C5'. Les cellules cancéreuses du pancréas, lesquelles possèdent des mutations de type KRAS, ne répondent pas au traitement avec la gemcitabine (Figure 7.2), l'actuel médicament utilisé.¹⁵ De plus, le taux de survie des patients atteints après 5 ans (suivant le diagnostique) demeure très faible, soit autour de 5 %.

Figure 7.2 Nouvelle famille d'analogues de nucléosides et précédents^{9,10-14}



Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés à découvrir une molécule prototypique (*lead molecule*) qui interfère avec la prolifération de ces cellules cancéreuses. Afin d'introduire ultérieurement des bioisostères variés en position C3', notre intérêt et mon objectif concernent la synthèse d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides 1',2'-*cis* C2'-monofluorés comportant un centre quaternaire fonctionnalisé d'un cyanométhyle en position C3' (Figure 7.2). Ainsi, l'incorporation d'un groupement fonctionnel nitrile et de bioisostères associés pourrait mener au développement de nouveaux agents antiprolifératifs de la classe des nucléosides.

La présence d'un atome de fluor à la position C2' vise l'accroissement de la stabilité du lien *N*-glycosidique de nos nucléosides dans le milieu biologique et celui-ci sera utilisé afin

d'introduire diastéréosélectivement les bases azotées désirées en cours de synthèse. En ce qui concerne le centre quaternaire à la position C3', la présence du groupe méthyle à cette position offre la possibilité d'outrepasser un mécanisme de résistance associé à la gemcitabine.¹⁶ La portion cyanométhyle offre, quant à elle, une flexibilité conformationnelle supplémentaire (par rapport au groupe cyano seul) avec un groupe espaceur -CH₂- lié au nitrile et la rotation possible du lien C3'-C6'. Cette flexibilité du groupe cyanométhyle, combinée au biais conformationnel associé au centre quaternaire pourraient permettre une meilleure reconnaissance de nos nucléosides par de potentielles cibles enzymatiques. Afin d'outrepasser certains mécanismes de résistance (désamination des bases azotées, problèmes liés à la monophosphorylation) et augmenter le caractère lipophile de nos molécules, une stratégie prodrogue sera utilisée (groupe R¹ pour notre nouvelle famille). Enfin, les modifications qui seront apportées à la fonctionnalité nitrile (introduction subséquente de dérivés et de bioisostères), de même qu'à la base azotée, visent l'exploration de nouveaux sites d'interaction avec les cibles thérapeutiques potentielles.

Plusieurs défis sont reliés à la synthèse de notre nouvelle famille de nucléosides et pronucléotides. Ceux-ci concernent la formation du centre quaternaire, l'introduction d'un groupement fonctionnel nitrile, la stratégie de fluoration, de même que l'introduction diastéréosélective de bases nucléiques pour l'atteinte de nucléosides β -D-1',2'-*cis*. Les diverses stratégies permettant de relever ces défis et d'accéder à nos nucléosides seront abordées plus en détail au cours des prochaines sections de ce chapitre.

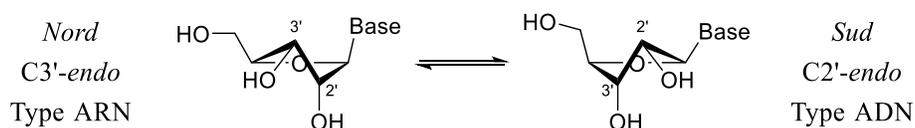
7.2 Nouvelle famille de nucléosides possédant un centre quaternaire

7.2.1 Conformations associées aux analogues de nucléosides

Les nucléosides endogènes possèdent un degré de flexibilité qui leur permet d'être reconnus par des enzymes selon la conformation désirée, favorisant la liaison avec celles-ci. Les deux conformations majoritaires, désignées *Nord* (C3'-*endo*) et *Sud* (C2'-*endo*), sont à l'équilibre (Figure 7.3) et l'une d'entre elles permettra au substrat de maximiser son

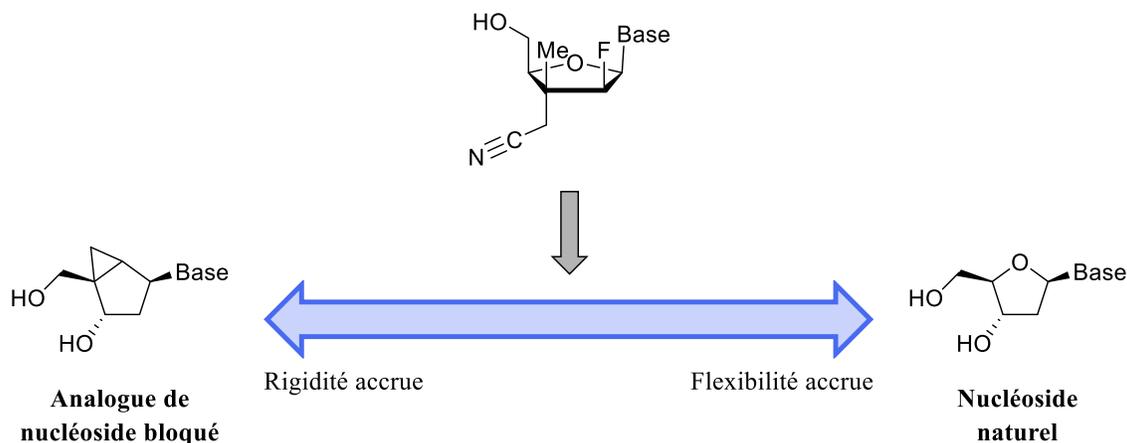
interaction avec sa cible enzymatique moyennant un coût énergétique.¹⁷⁻²¹ Les transporteurs de nucléosides ont également une reconnaissance propre à chacune d'elles : les hCNTs démontrent une préférence pour les nucléosides de conformation *Nord* (type ARN), alors qu'il s'agit de la conformation *Sud* (type ADN) pour les hENTs.²² Il est postulé que nos analogues possédant un centre quaternaire carboné à la position C3', avec une minimisation des contraintes stériques, favoriseraient la conformation *Sud*.^{13,14}

Figure 7.3 Équilibre conformationnel (pseudorotation) chez les nucléosides naturels¹⁷⁻²¹



À l'opposé des nucléosides naturels se retrouvent les analogues de conformation bloquée (LNA, *locked nucleoside analogues*).²³⁻²⁵ Ceux-ci sont conçus pour augmenter le degré de rigidité de la structure nucléosidique. La présence d'un centre quaternaire sur nos analogues offrirait un compromis sur la flexibilité (Figure 7.4) tout en favorisant une conformation de départ, et pourrait aussi permettre une meilleure reconnaissance par des cibles enzymatiques jouant un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses ou la prolifération virale.

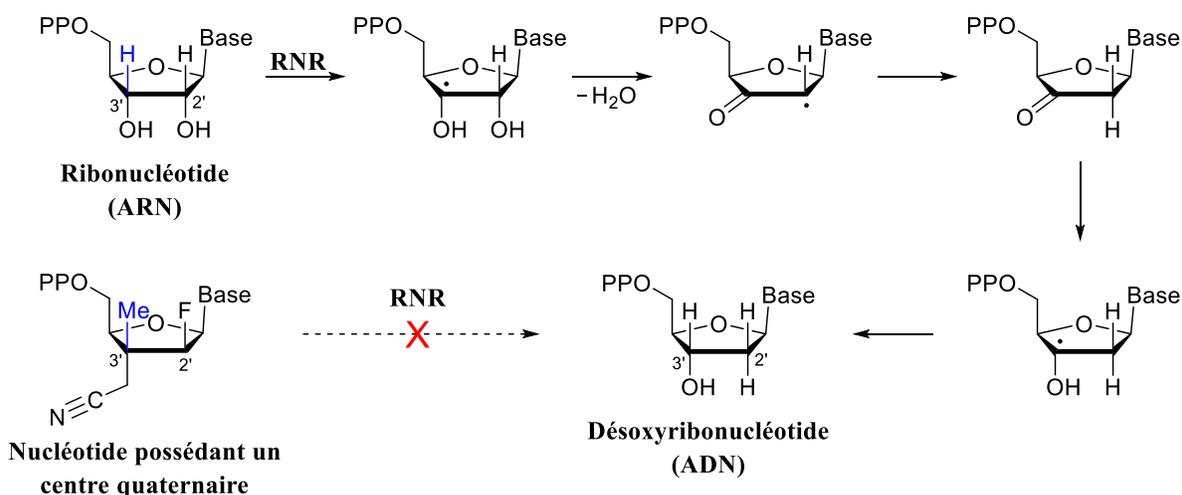
Figure 7.4 Biais conformationnel des nouveaux analogues possédant un centre quaternaire



7.2.2 Interaction avec la ribonucléotide réductase

La gemcitabine (structure présentée à la Figure 7.2) est un nucléoside utilisé pour le traitement du cancer (dont celui du pancréas) et des tumeurs solides, mais qui souffre de nombreuses résistances.^{26,27} L'un des mécanismes d'action de la gemcitabine concerne sa forme diphosphorylée qui permet d'inhiber la ribonucléotide réductase (RNR). L'inhibition de celle-ci provoque la déplétion des 2'-désoxyribonucléotides essentiels à la synthèse d'ADN, ce qui mène subséquemment à l'apoptose.²⁸ Cependant, la surexpression de cette enzyme chez les cellules cancéreuses est liée à la dégradation partielle et à la chimiorésistance de l'agent thérapeutique.¹⁶ La présence d'un proton en position C3' permet d'initier le mécanisme radicalaire par le clivage homolytique du lien C-H (Schéma 7.1).^{29,30} La présence d'un centre quaternaire comportant un groupe méthyle à cette position permettrait à nos analogues de contourner ce mécanisme de résistance.

Schéma 7.1 Mécanisme de déshydroxylation par la ribonucléotide réductase^{29,30}



7.2.3 Stratégie ProTide et développement de pronucléotides

Nombreux sont les analogues de nucléosides qui présentent des mécanismes de résistance.²⁶ En effet, la désamination par la CDA (cytidine désaminase) ou l'ADA (adénosine désaminase), de même que la première phosphorylation par la dCK (désoxycytidine kinase) en

sont en partie responsables. La désamination de certains nucléosides par les désaminases est une source d'inactivation pour certains agents antitumoraux. Une basse expression de l'enzyme responsable de la première phosphorylation est aussi une source de résistance. Des prodrogues incorporées sur les nucléotides monophosphates (AN-MP) ont été développés pour contourner ces problèmes (Figure 7.5) : il s'agit de pronucléotides.¹ De plus, l'usage d'une prodrogue (masque chimique) permet de contourner une autre source de résistance, soit la diminution des transporteurs actifs de nucléosides. Le caractère lipophile de la prodrogue leur permet de pénétrer le milieu intracellulaire (par diffusion passive à travers la membrane cellulaire) où celle-ci est clivée.^{31,32} Des pronucléotides ont été développés pour le traitement des infections virales (par exemple le remdesivir pour le traitement du virus Ebola à la Figure 7.1, le sofosbuvir pour le traitement de l'hépatite C à la Figure 7.6) et le traitement du cancer (par exemple l'Acelarin[®] à la Figure 7.6). En ce sens, la préparation de pronucléotides employant la technologie ProTide³² pourrait potentiellement bénéficier à notre nouvelle famille d'analogues de nucléosides.

Figure 7.5 Stratégie d'un pronucléotide (modifiée à partir de Jordheim *et al.*)¹

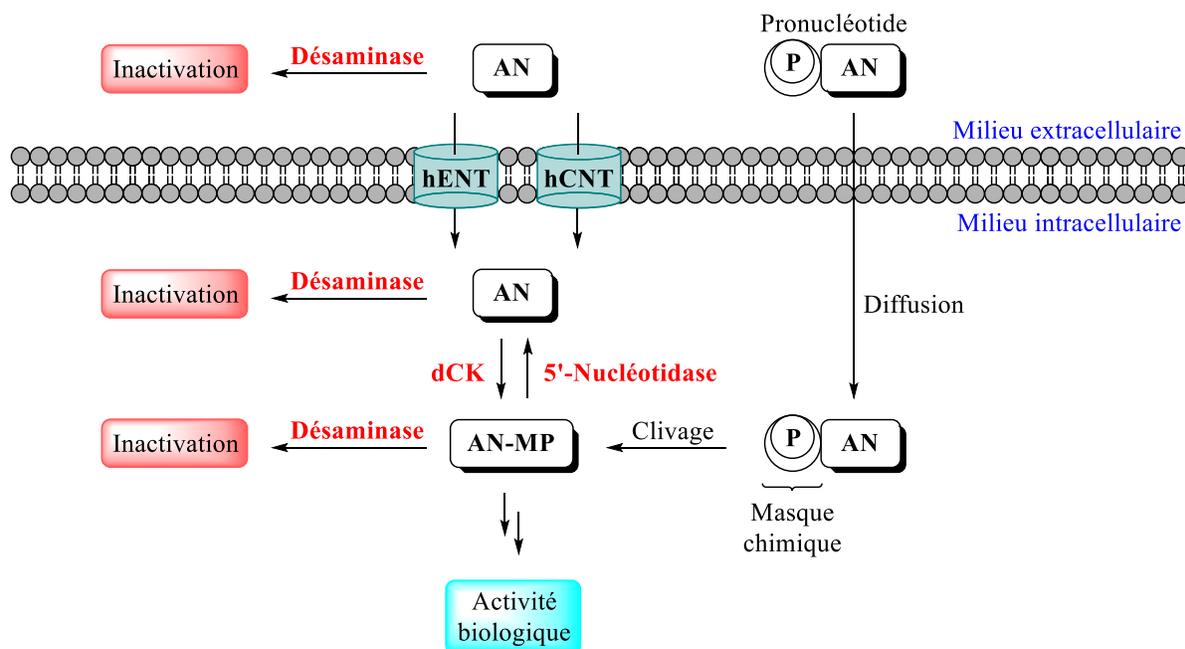
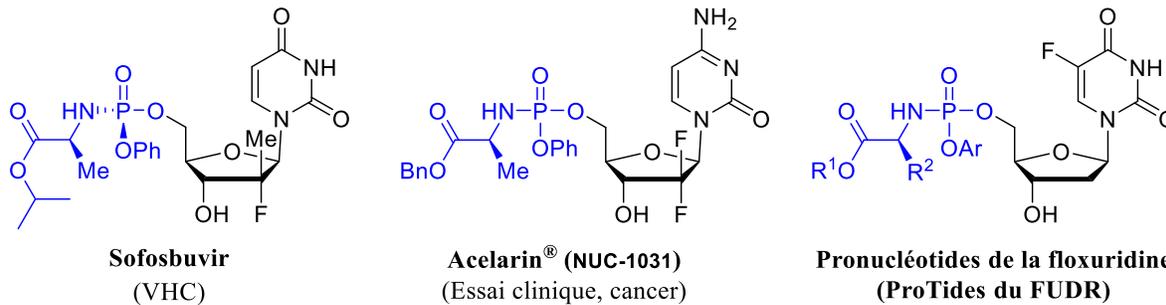
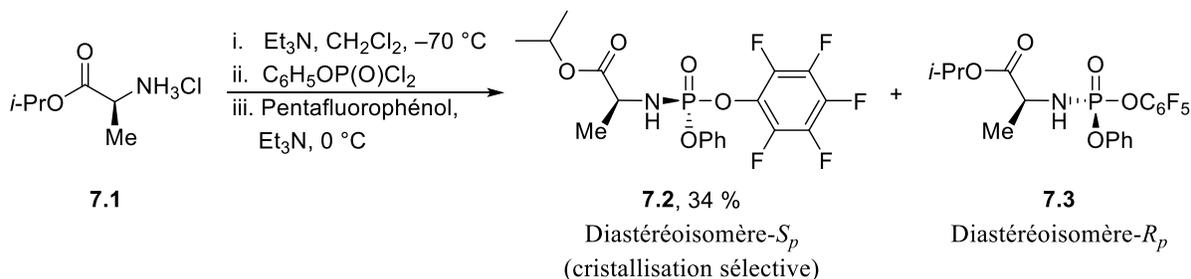


Figure 7.6 Pronucléotides développés à des fins thérapeutiques^{1,32,35}



Des études de la relation structure-activité (SAR) pour différents phosphoramidates comportant un acide aminé estérifié et un groupe aryle ont été menées par le groupe de McGuigan afin d'améliorer, par cette approche, les propriétés biologiques d'agents anticancéreux et antiviraux de nature nucléosidique.³³⁻³⁶ Il en ressort que, pour un phosphoramidate incorporant un phényle (groupe aryle) et un acide aminé L-alanine estérifié d'un isopropyle, les activités biologiques *in vitro* s'en retrouvent améliorées.^{34,35} Le couplage de ce phosphoramidate avec la floxuridine (ProTide du nucléoside FUDR à la Figure 7.6 avec R¹ = *i*-Pr, R² = Me, Ar = Ph) permet effectivement d'améliorer l'activité vis-à-vis différentes lignées cellulaires cancéreuses.³⁵ Des activités intéressantes ont été associées à l'un des diastéréoisomères (isomère *S_p* du phosphore couplé à un nucléoside) pour lequel la synthèse du phosphoramidate **7.2**³⁷ est décrite au Schéma 7.2.³⁷

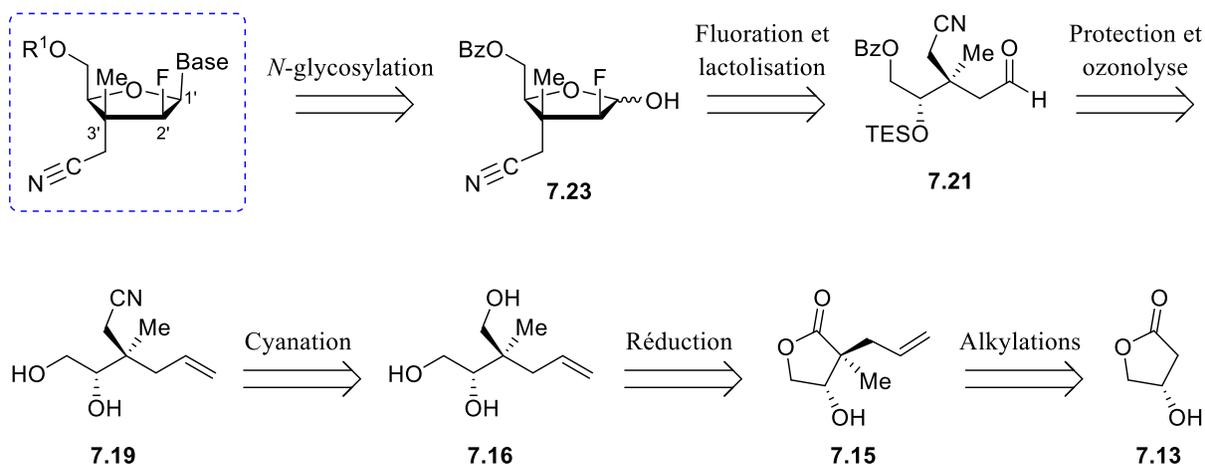
Schéma 7.2 Synthèse rapportée du diastéréoisomère phosphoramidate **7.2**³⁷



7.2.4 Conception de la nouvelle famille

L'analyse rétrosynthétique permettant l'accès à notre nouvelle famille d'analogues de nucléosides est présentée au Schéma 7.3. Nous avons choisi d'utiliser un précurseur chiral (**7.13**), commercialement disponible, pour construire l'intermédiaire cyclique (**7.23**) donnant l'accès à notre famille.

Schéma 7.3 Analyse rétrosynthétique menant aux analogues de nucléosides cibles

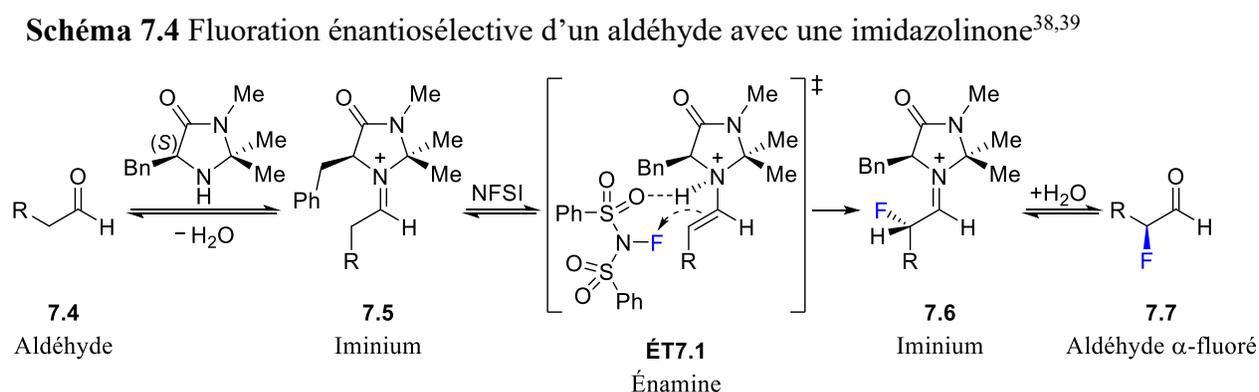


D'abord, une stratégie de *N*-glycosylation sur un substrat cyclique sera employée pour introduire diastérosélectivement la base azotée sur le lactol **7.23**. Les stratégies de *N*-glycosylation de nucléosides 1',2'-*cis* C2'-fluorés présentées au cours des chapitres précédents peuvent être utilisées pour optimiser nos nouveaux analogues. Ensuite, une fluoration stéréosélective en α de l'aldéhyde **7.21** permettra d'introduire l'atome de fluor en employant l'organocatalyse. Une protection appropriée de groupements hydroxyles offrira la possibilité d'installer un groupe fonctionnel nitrile (**7.19**) depuis le triol **7.16**. Enfin, la lactone **7.15** sera obtenue à partir de la (*S*)- β -hydroxy- γ -butyrolactone **7.13** commerciale et ce, après une séquence d'alkylations diastérosélectives successives.

Outre la stratégie de *N*-glycolysation qui sera discutée plus tard, deux stratégies sont essentielles pour l'atteinte de nos nouveaux analogues de nucléosides. Celles-ci concernent la fluoruration, de même que la méthode qui permettra de construire le centre quaternaire carboné propre à nos nucléosides.

7.2.5 Stratégies de fluoruration et d'alkylation

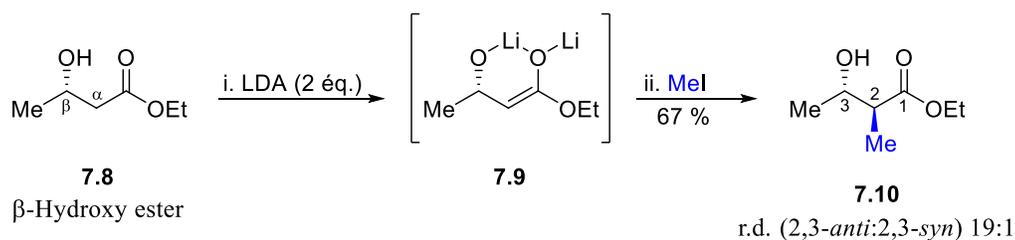
Une stratégie énantiosélective de fluoruration permet de générer, avec l'emploi d'une imidazolidinone et une source électrophile de fluor, des aldéhydes α -fluorés (7.7, Schéma 7.4) en d'excellents excès énantiomériques.^{38,39} L'iminium 7.5 est formé préférentiellement avec l'usage de la (*S*)-5-benzyl-2,2,3-triméthylimidazolidin-4-one^{38,39} et la minimisation des interactions impliquant le groupe diméthyle géminale.^{40,41} Un lien proton-sulfone entre l'imidazolidinone et la *N*-fluorobenzenesulfonimide (NFSI) serait à l'origine de l'activation de l'énamine et du fluor (ÉT7.1).³⁸ Le groupe benzyle de l'imidazolidinone permet la discrimination d'une des faces de la double liaison et la fluoruration s'effectue dès lors sélectivement sur la face la moins encombrée.^{40,41} Cette stratégie de fluoruration, qui a été développée par MacMillan³⁸, Barbas³⁹ et leurs collaborateurs respectifs, sera employée à notre aldéhyde 7.21 au Schéma 7.3.



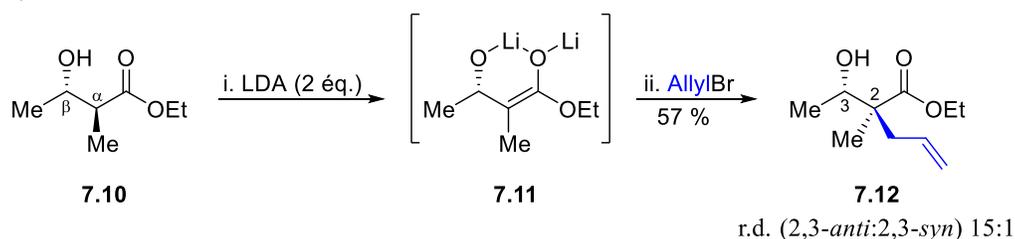
Pour ce qui est de la construction du centre quaternaire de nos analogues, une méthode d'alkylation diastéréosélective de Fráter-Seebach⁴²⁻⁴⁸ sera employée. Celle-ci concerne particulièrement l'alkylation de β -hydroxy esters au Schéma 7.5.⁴⁸ En présence de diisopropylamidure de lithium (LDA) à hauteur de 2 équivalents, les substrats **7.8** et **7.10** se retrouvent sous la forme d'un dianion (**7.9** et **7.11** respectivement). La configuration du centre stéréogénique en position β de l'ester permet de diriger sélectivement l'attaque nucléophile pour former les produits 2,3-*anti* **7.10** et **7.12** en de bons ratios diastéromériques.

Schéma 7.5 Méthode d'alkylation diastéréosélective d'un β -hydroxy ester⁴⁸

a) Méthylation diastéréosélective d'un énolate



b) Alkylation d'un centre tertiaire carboné



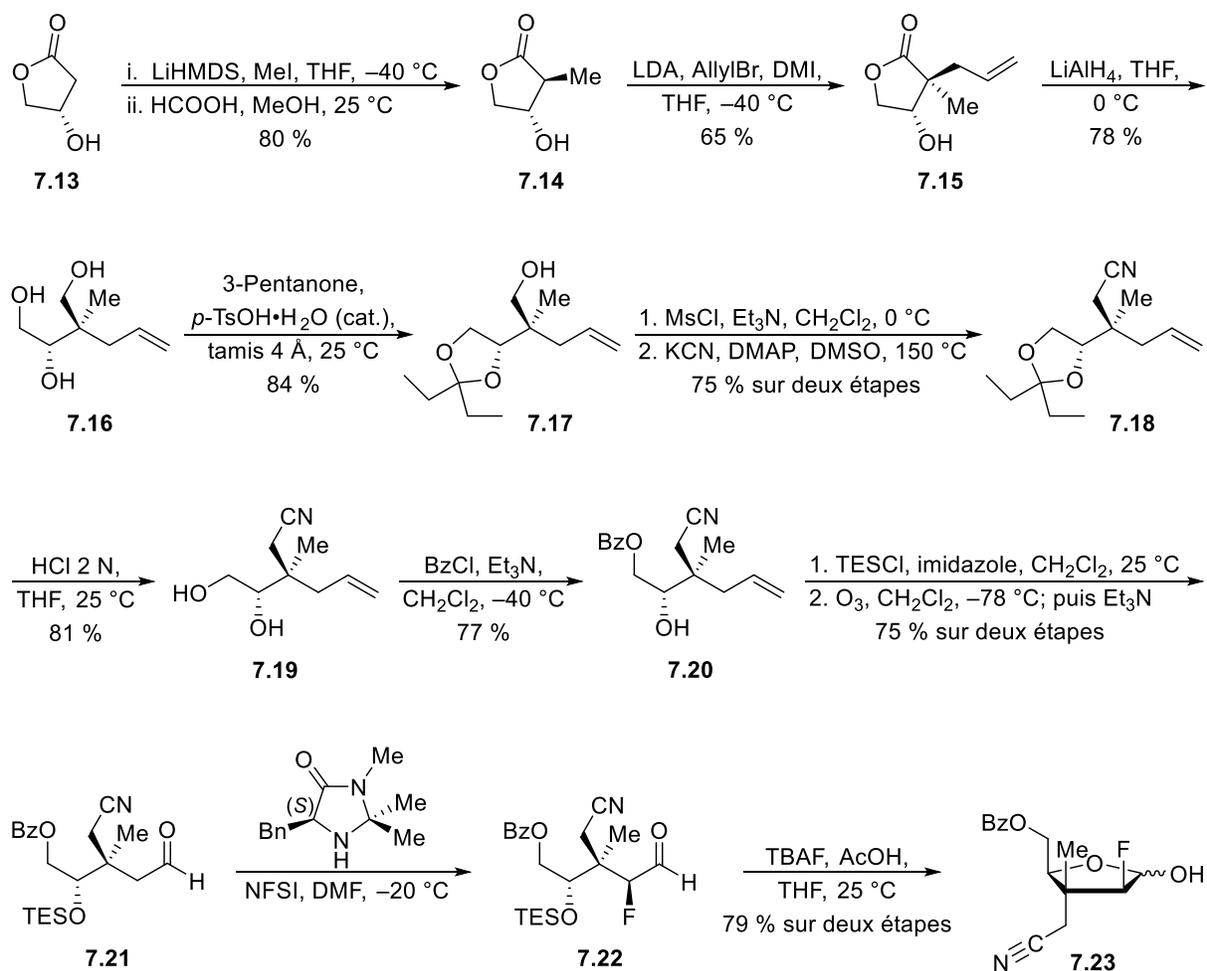
7.3 Synthèse de la nouvelle famille

7.3.1 Préparation du lactol avec les stratégies d'alkylation et de fluoration

Notre groupe de recherche a mis sur pied une voie de synthèse efficace pour l'accès au lactol C2-fluoré **7.23** depuis la lactone commerciale **7.13** (Schéma 7.6).¹³ Suivant les alkylations diastéréosélectives successives qui permettent de générer le centre quaternaire carboné, la réduction de la lactone **7.15** génère le triol **7.16**. Certains groupes hydroxyles

doivent alors être protégés afin de discriminer l'alcool primaire permettant d'introduire la fonctionnalité nitrile, laquelle composera la portion cyanométhyle de notre nouvelle famille d'analogues de nucléosides.

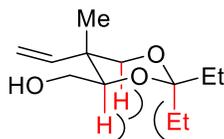
Schéma 7.6 Synthèse du lactol C2-fluoré **7.23** incorporant un centre quaternaire avec une fonctionnalité nitrile¹³



La formation d'un ac\u00e9tonide avec l'usage de la 3-pentanone permet de prot\u00e9ger le diol 1,2 (**7.17**) au-del\u00e0 du diol 1,3.⁴⁹ La protection du diol 1,3 m\u00e9nerait \u00e0 la formation d'un cycle \u00e0 6 pour lequel il existerait deux interactions 1,3-diaxiales d\u00e9favorables impliquant les groupes \u00e9thyles de l'ac\u00e9tonide (Figure 7.7). La discrimination d'un des alcools primaires permet de

fonctionnaliser le centre quaternaire avec la préparation du mésylate, lequel sert de groupe partant pour l'insertion du cyanure en présence de DMAP (7.18, Schéma 7.6).

Figure 7.7 Interactions 1,3-diaxiales défavorisant la protection du diol 1,3

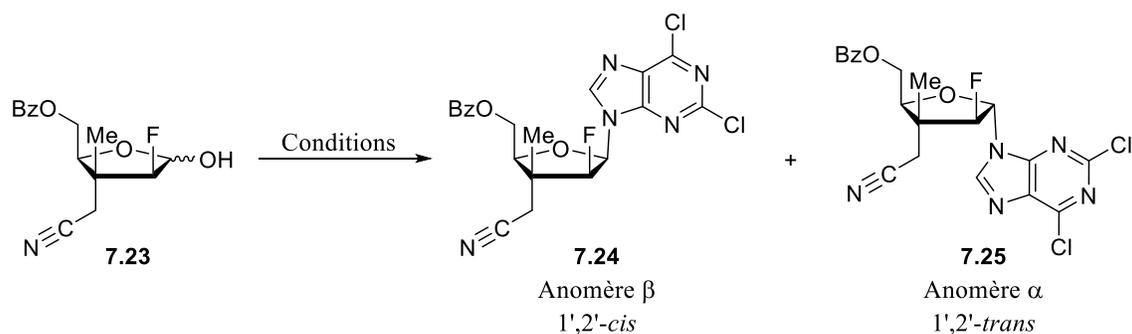


Le composé 7.18, qui possède dès lors un nitrile, est soumis en conditions acides pour le retrait de l'acétonide (7.19). La protection sélective de l'alcool primaire par un benzoyle (7.20) est suivie par la protection de l'alcool secondaire avec un groupe triéthylsilyle (TES). L'ozonolyse de la double liaison génère l'aldéhyde 7.21 nécessaire pour la stratégie de fluoration (d'après les conditions développées par MacMillan³⁸ et Barbas³⁹). L'intermédiaire fluoré 7.22 est généré avec l'implication de la (*S*)-5-benzyl-2,2,3-triméthylimidazolidin-4-one^{38,39} et NFSI comme source électrophile de fluor (la formation du diastéréomère en employant l'organocatalyseur-(*R*) a permis de confirmer un ratio diastéréomérique de 17:1)¹³. Enfin, la déprotection de l'éther silylé en milieu acide avec TBAF a permis la formation du lactol 7.23, soit le précurseur clé permettant l'accès à notre famille de nucléosides.

7.3.2 Introduction de bases azotées : *N*-glycosylation

On s'intéresse dans un premier temps au couplage d'une base purique, la 2,6-dichloropurine. La *N*-glycosylation du composé 7.23 avec la réaction de Mitsunobu (entrée 1, Tableau 7.1) génère un mélange d'anomères favorisant le produit 1',2'-*cis* 7.24 (anomère β) dans un ratio de 4:1 (β : α). Afin d'améliorer ce dernier, on a employé la réaction d'Appel⁵⁰ pour la bromation de la position anomérique du furanoside 7.23, puis le sel métallique de sodium de la base azotée pour le déplacement de l'halogénure. Avec l'emploi de cette stratégie (entrée 2, Tableau 7.1), des ratios supérieurs à 12:1 (β : α) ont été obtenus et les rendements associés aux deux étapes peuvent atteindre 58 %.

Tableau 7.1 Couplage de la 2,6-dichloropurine sur le lactol **7.23**

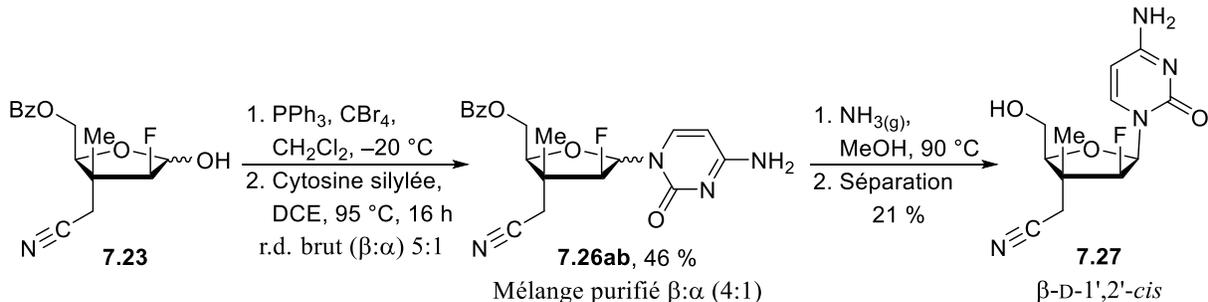


Entrée	Conditions	Ratio ^a (β : α)	Rend. (%)
1	DEAD, PPh ₃ , 2,6-dichloropurine, THF, 25 °C, 16 h	4:1	40 ^b
2	1. PPh ₃ , CBr ₄ , CH ₂ Cl ₂ , -20 °C, 16 h 2. 2,6-Dichloropurine/NaH, MeCN/DCE (1:1), 25 °C, 1–2.5 h	>12:1	37-58 ^c

^a Déterminé pour l'étape de couplage par analyse RMN ¹H du brut réactionnel. ^b Mélange purifié β : α de 4:1. ^c Mélange purifié β : α >12:1.

Dans un deuxième temps, on s'intéresse au couplage d'une base azotée pyrimidique, en particulier la cytosine (Schéma 7.7). En employant la réaction d'Appel pour l'halogénéation du lactol **7.23**, puis la cytosine silylée avec la méthode de silyl-Hilbert-Johnson⁵¹, un mélange anomérique β : α de 5:1 est obtenu. Le mélange purifié **7.26ab** (ratio β : α de 4:1) a par la suite été soumis en conditions basiques pour la déprotection du benzoyle, où le produit 1',2'-*cis* **7.27** est isolé après purification par chromatographie en phase inverse.

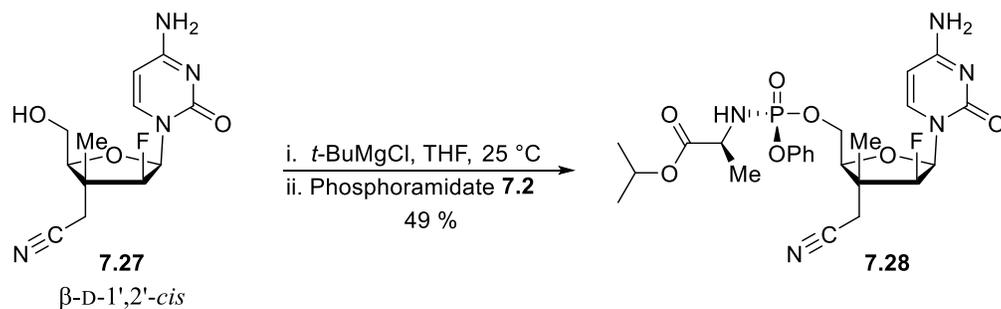
Schéma 7.7 Couplage de la cytosine et séparation du nucléoside 1',2'-*cis* 7.27



7.3.3 Synthèse du pronucléotide dérivé de la cytosine

On s'est dès lors intéressé à l'incorporation d'un phosphoramidate, tel que vu précédemment, pour le développement de nos pronucléotides. Le couplage du nucléoside 7.27 en présence d'une base forte encombrée (*t*-BuMgCl) avec le phosphoramidate 7.2³⁷ a permis de générer le pronucléotide 7.28 dans un rendement de 49 %.

Schéma 7.8 Synthèse du pronucléotide 7.28

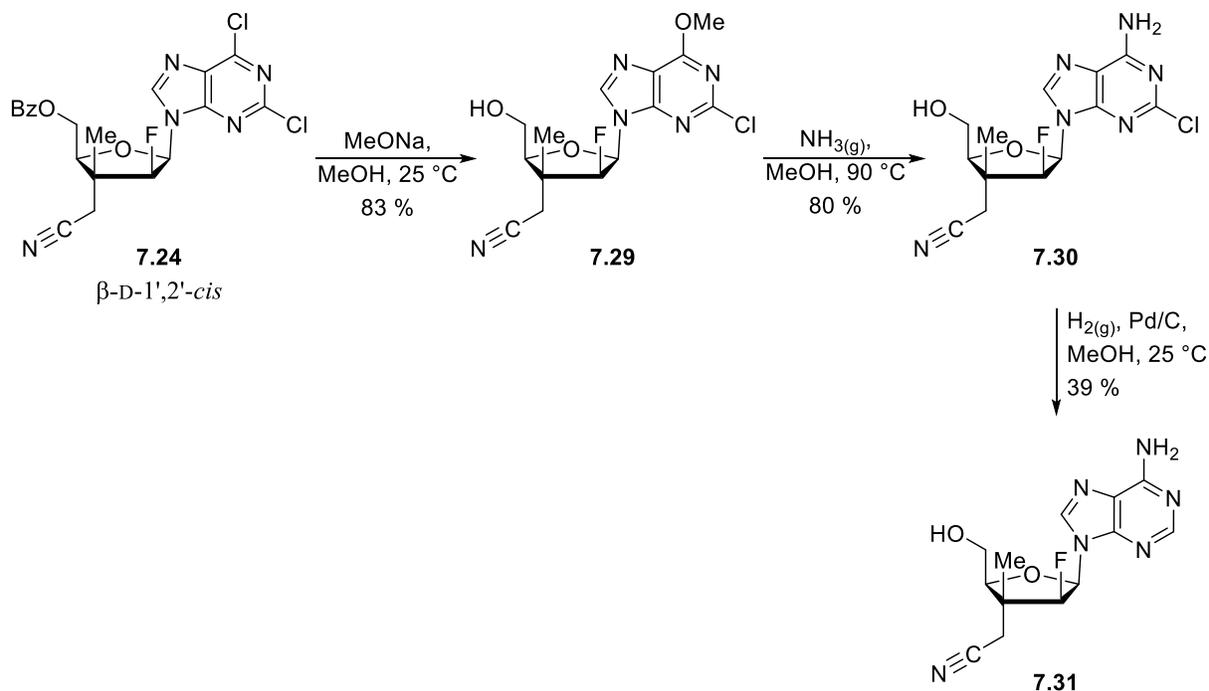


7.3.4 Synthèse de nucléosides et pronucléotides dérivés de la purine

La 2,6-dichloropurine présente de nombreuses possibilités de modification pouvant intervenir par la substitution des chlorures en positions C2 et C6. D'abord, la conversion en analogue de l'adénine 7.31 depuis le composé 7.24 est décrite au Schéma 7.9. Le traitement avec le méthoxyde de sodium mène au composé 7.29 dans un rendement de 83 %. Ce dernier, mis en présence d'ammoniac, permet d'accéder au dérivé de la 2-chloroadénine 7.30. Les

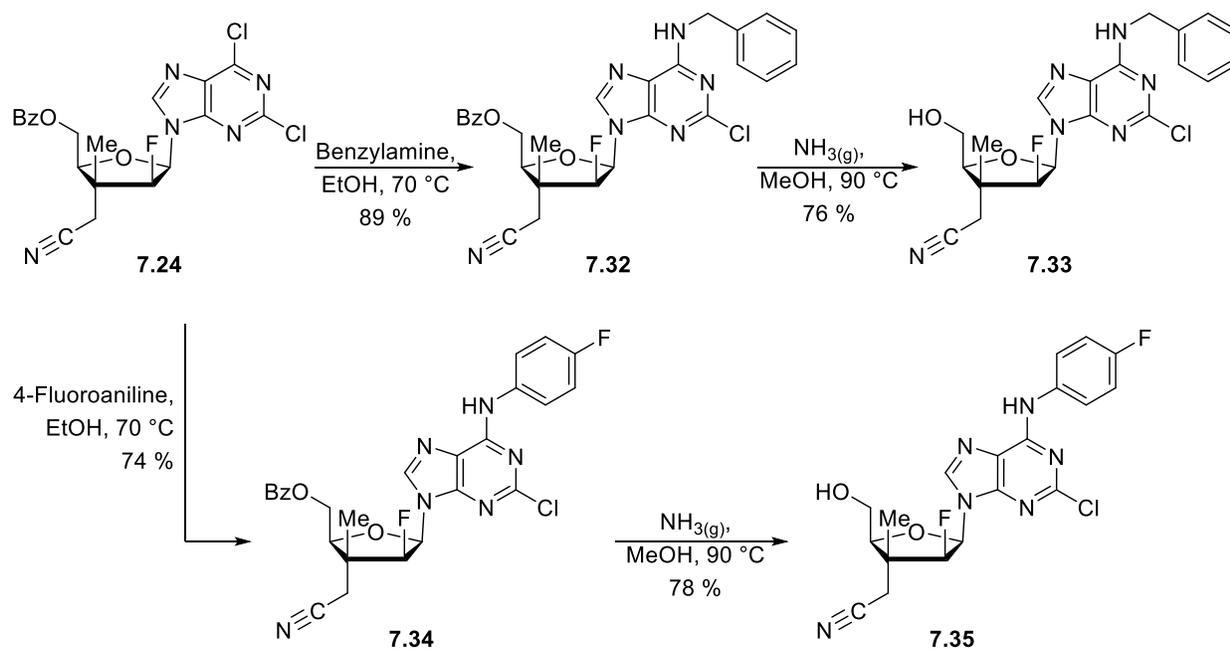
analyses RMN ^1H , ^{13}C , NOESY, HMBC et HMQC du composé **7.31** (voir l'Annexe A), qui est obtenu après l'hydrogénation du nucléoside **7.30**, a permis de confirmer la régiosélectivité N9 ainsi que les substitutions intervenant sur l'anneau purique.

Schéma 7.9 Accès au dérivé de l'adénine **7.31**



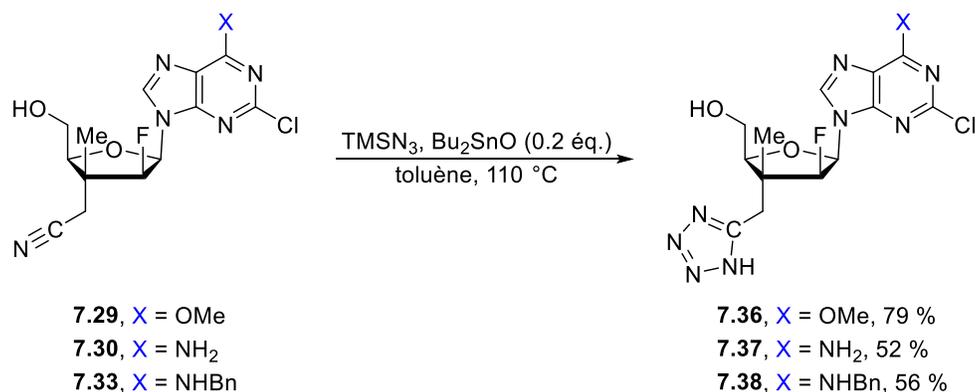
La fonctionnalisation de l'amine en N6 de la purine offre une opportunité d'explorer de nouveaux sites d'interaction avec les cibles thérapeutiques potentielles et d'étudier l'effet de certains substituants à cette position. Cette fonctionnalisation pourrait également permettre d'accroître la lipophilicité de nos nucléosides et leur stabilité métabolique vis-à-vis la désamination, car la protection de l'amine des bases azotées est une stratégie de modification des agents thérapeutiques.¹ En ce sens, la substitution d'un hydrogène en N6 par un groupe aromatique est une modification que nous voulons explorer particulièrement dans notre étude de la relation structure-activité (SAR). Alors, les dérivés **7.33** et **7.35** comportant des groupes aromatiques (benzyle, F-aryle) ont été préparés en de bons rendements à partir du nucléoside **7.24** (Schéma 7.10).

Schéma 7.10 Synthèse de dérivés puriques possédant un groupe aryle en position N6



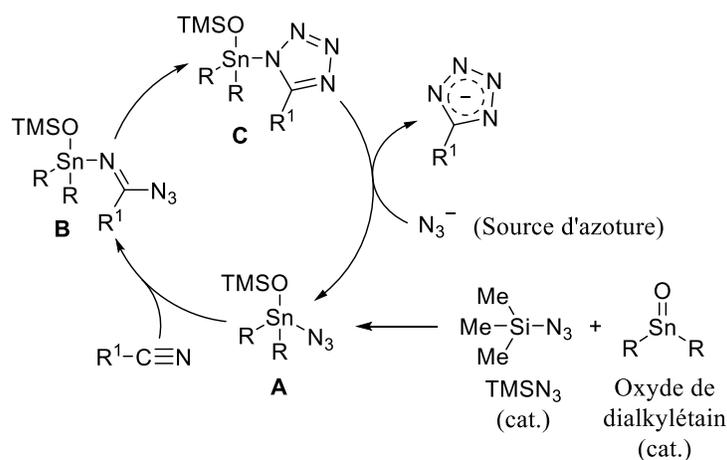
La fonctionnalisation du centre quaternaire offre également une opportunité d'explorer de nouveaux sites d'interaction avec les cibles thérapeutiques potentielles. Par exemple, certains inhibiteurs de protéines tyrosine kinases ont été développés avec l'incorporation d'un groupement acide carboxylique.⁵²⁻⁵⁶ Ces protéines jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et les inhibiteurs conçus sont utilisés pour le traitement de plusieurs cancers. Le tétrazole est un bioisostère de l'acide carboxylique qui peut améliorer la perméabilité membranaire en augmentant la lipophilicité et en réduisant sa polarité.⁵⁷⁻⁶⁰ Afin d'accéder à cet hétérocycle depuis un nitrile, des conditions⁶¹ employant l'oxyde de dibutylétain (Bu₂SnO) ont été utilisées. De cette manière, les composés **7.36**, **7.37** et **7.38** ont été générés (Schéma 7.11).⁶²

Schéma 7.11 Synthèse de nucléosides possédant un tétrazole



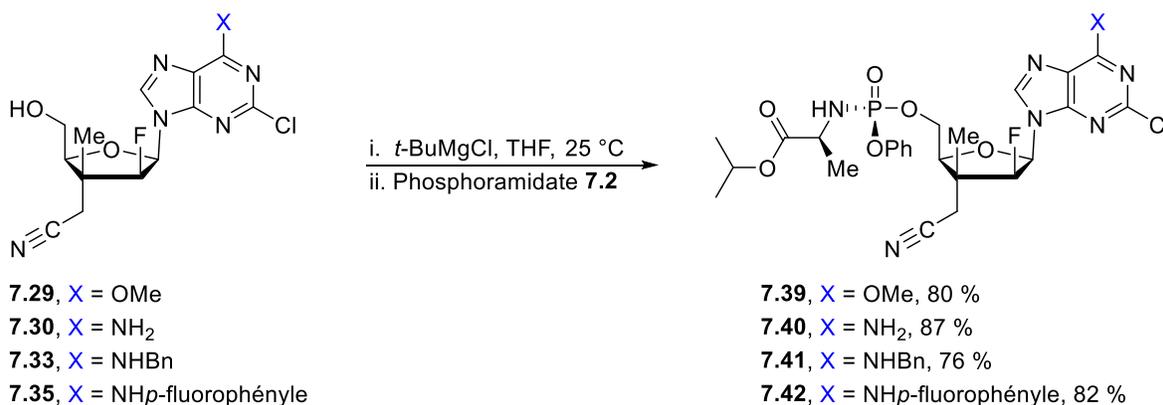
Le mécanisme de la réaction de cycloaddition azoture-nitrile a été avancé par Cantillo et ses collaborateurs à l'aide d'études computationnelles (R, R¹ = Me; Figure 7.8).⁶³ Dans le mécanisme proposé, le complexe **A** est formé à partir de quantités catalytiques de TMSN₃ et d'oxyde de dialcylétain. L'addition du complexe **A** sur le nitrile mène à la formation du complexe ouvert **B** où s'en suit la cyclisation et la formation de l'intermédiaire **C**. En présence d'une source d'azoture (TMSN₃), le complexe catalytique **A** est régénéré et le tétrazole relargué.

Figure 7.8 Cycle catalytique de la formation d'un tétrazole par études computationnelles⁶³



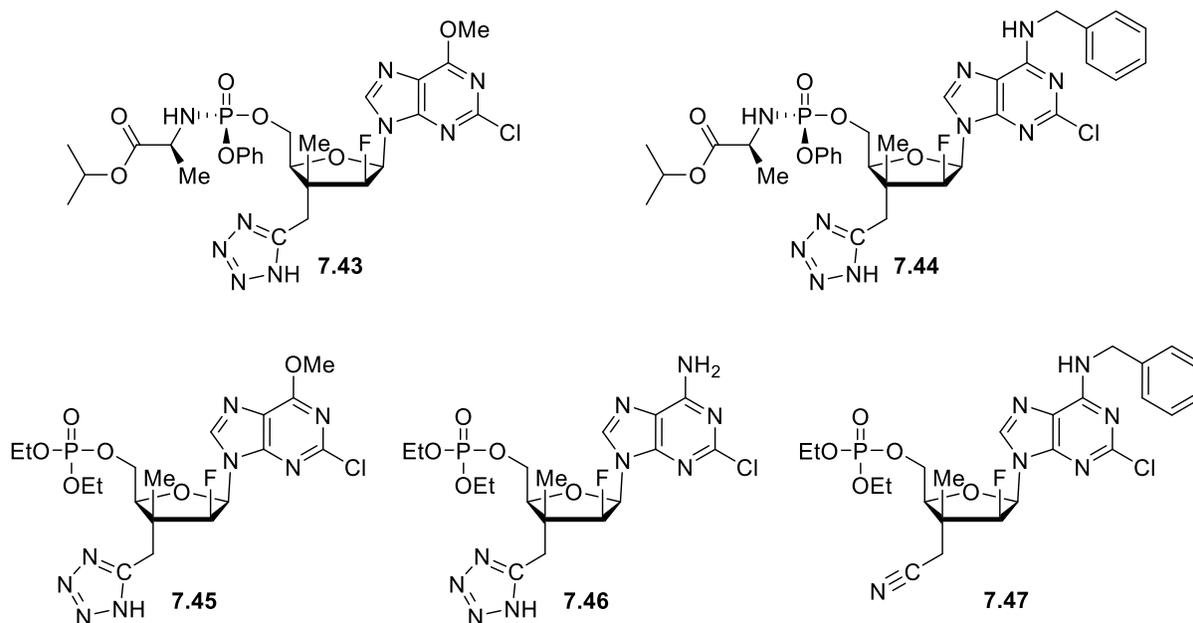
Pour le développement de nouveaux pronucléotides ayant une base azotée purine, le phosphoramidate **7.2**³⁷ est d'abord incorporé en position C5' pour les nucléosides dotés du groupement nitrile (Schéma 7.12). Les quatre substrats concernés (**7.29**, **7.30**, **7.33** et **7.35**) ont été convertis en leur pronucléotide respectif (**7.39**, **7.40**, **7.41** et **7.42**) en des rendements se situant entre 76 et 87 %.

Schéma 7.12 Préparation des pronucléotides comportant un nitrile et une purine modifiée



D'autres dérivés comportant une prodrogue monophosphate ont par la suite été synthétisés à partir des nucléosides présentés jusqu'à maintenant (Figure 7.9). Ceux-ci comprennent en particulier l'hétérocycle tétrazole (**7.43** à **7.46**). L'emploi du chlorophosphate de diéthyle, (EtO)₂P(O)Cl, en remplacement du phosphoramidate **7.2**³⁷ a permis de générer les composés **7.45**, **7.46** et **7.47**.

Figure 7.9 Pronucléotides préparés possédant un groupement tétrazole ou nitrile



Enfin, en effectuant l'hydrogénation de certains pronucléotides, de nouvelles molécules s'ajoutent à notre famille d'analogues. C'est notamment le cas pour celle du composé **7.39** qui donne un accès aux analogues **7.48** et **7.49** (Shéma 7.13). Les conditions employées sont à l'origine d'une fonctionnalisation supplémentaire du centre quaternaire avec la conversion du nitrile en amine primaire. Les dérivés de l'adénine **7.50** et **7.51** ont aussi été préparés (Figure 7.10).

Schéma 7.13 Hydrogénation du pronucléotide 7.39

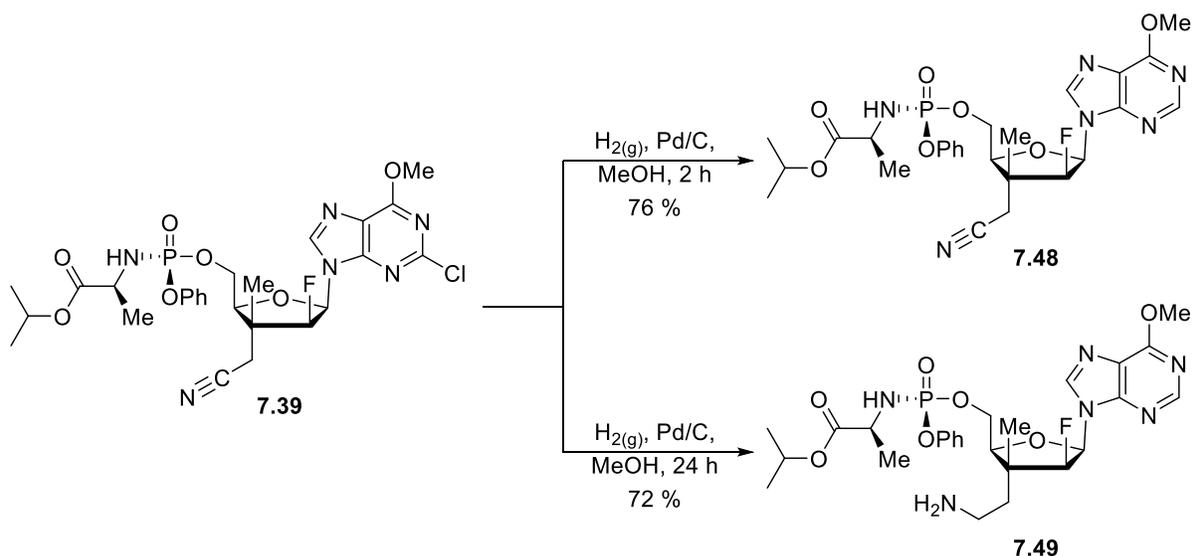
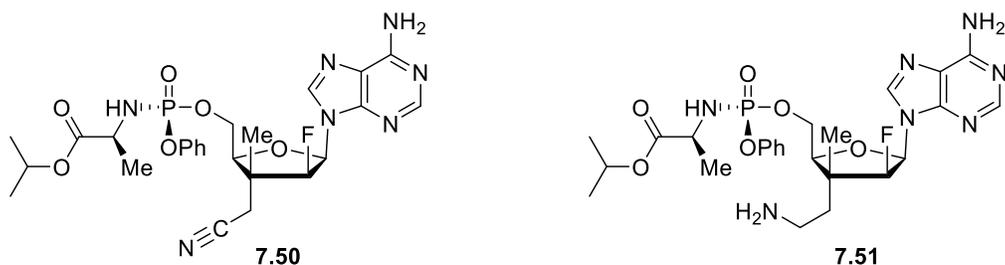


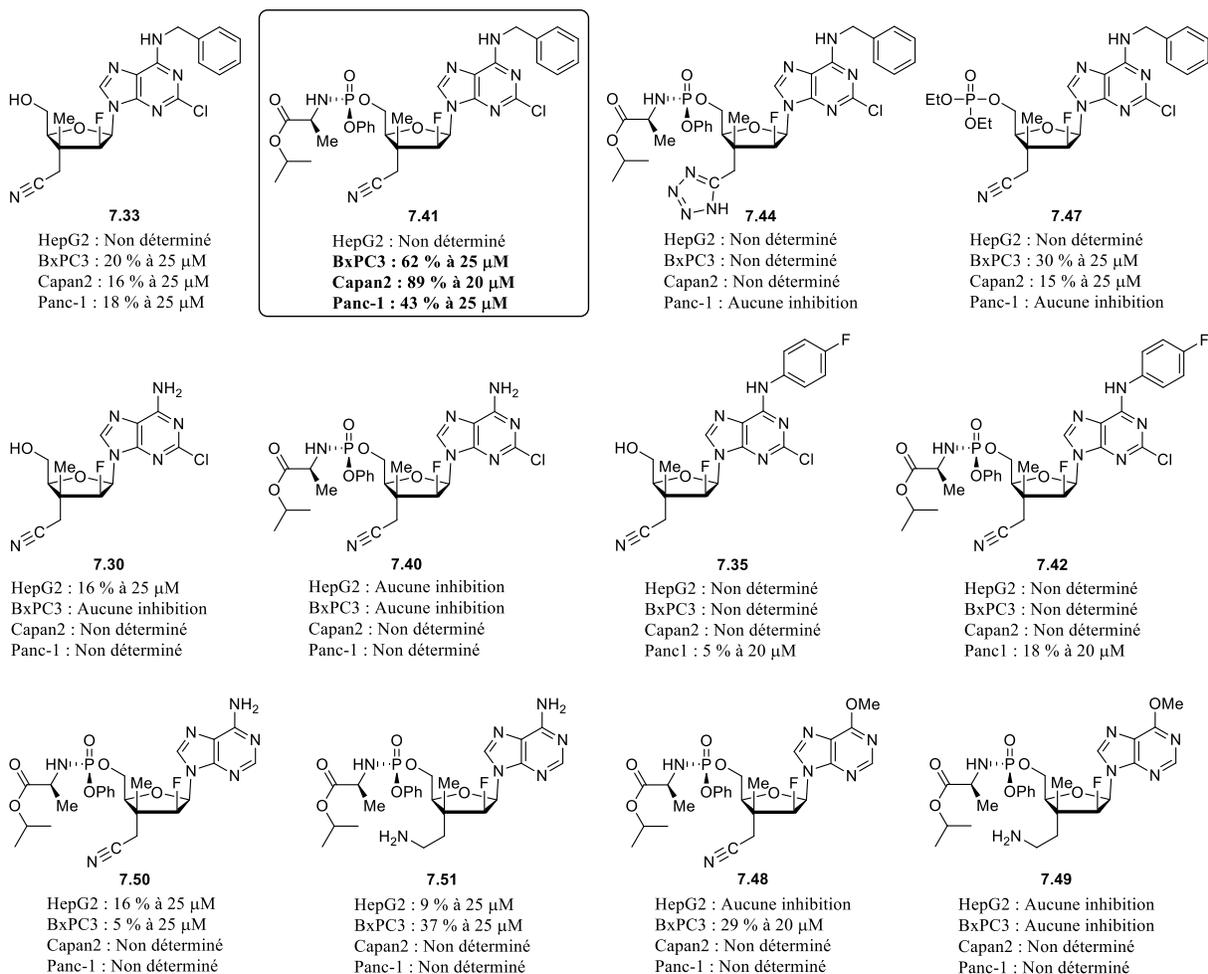
Figure 7.10 Pronucléotides 7.50 et 7.51 dérivés de l'adénine



7.4 Résultats biologiques préliminaires

En collaboration avec le laboratoire de la professeure Mona Nemer situé à l'Université d'Ottawa, nos analogues de nucléosides possédant un centre quaternaire fonctionnalisé ont été testés *in vitro* sur certaines lignées de cellules cancéreuses (sein, poumon, foie, colon et pancréas). Dans le lot de molécules testées sur les cellules du pancréas (BxPC3, Capan2 et/ou Panc-1) et/ou du foie (HepG2), un candidat intéressant possédant une base azotée purique s'est avéré actif dans les lignées cellulaires du pancréas (composé 7.41, Figure 7.11).

Figure 7.11 Étude SAR et activités biologiques pour différents ANs puriques synthétisés

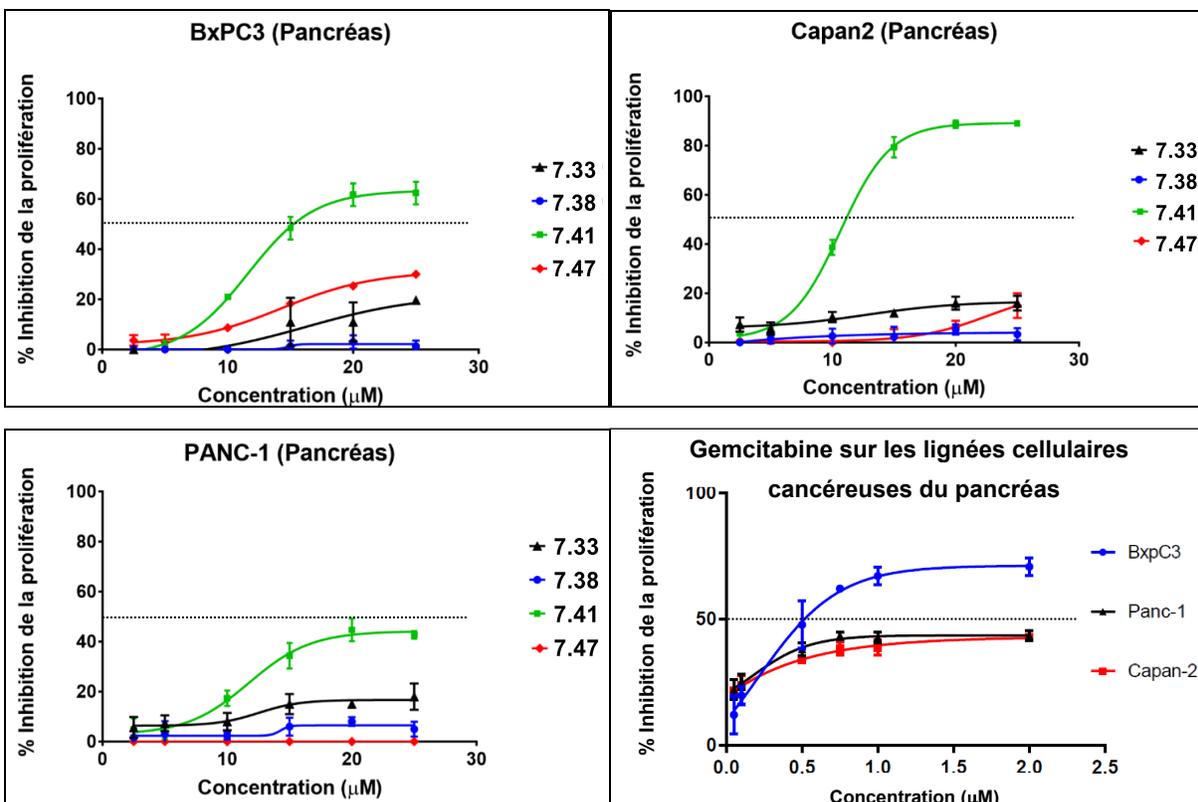
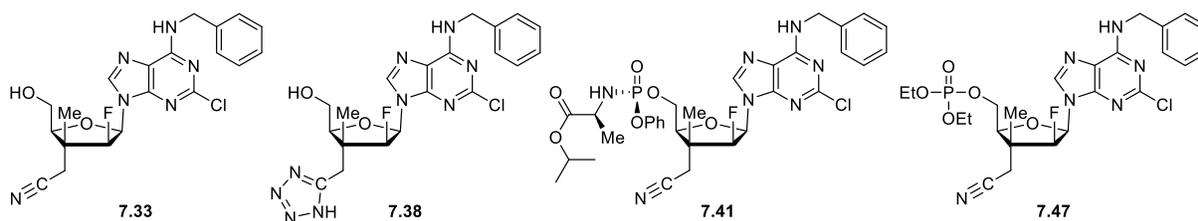


Les résultats ont montrés que près de 90 % de la prolifération cellulaire cancéreuse a été inhibée pour Capan2 (pancréas) grâce à seulement 20 µM du composé **7.41**. Avec 25 µM de ce même composé **7.41**, les proliférations cellulaires cancéreuses pour BxPC3 (pancréas) et Panc-1 (pancréas) ont été inhibées à 62 % et 43 % respectivement. Le pronucléotide **7.41**, possédant une prodrogue de type phosphoramidate, a montré une meilleure inhibition pour ces lignées cellulaires cancéreuses par rapport à son analogue dépourvu de prodrogue (**7.33**) et par rapport à son analogue ayant un groupe diéthylphosphate (**7.47**). Concernant les dérivés possédant un groupe fonctionnel tétrazole, dont le pronucléotide **7.44**, ceux-ci sont inactifs sur Panc-1.

Parmi les différentes modifications apportées à la base azotée purique, c'est le dérivé possédant une amine protégée en N6 d'un groupe benzyle (**7.41**) qui a montré une amélioration significative de l'activité sur les lignées cancéreuses testées. Ses analogues dépourvus de ce groupement (**7.30** et son pronucléotide **7.40**) se sont avérés inactifs sur BxPC3 (de même que sur les lignées cellulaires cancéreuses HePG2 du foie) bien que l'activité sur Capan2 doit être vérifiée. La protection de l'amine en N6 avec un groupe 4-fluorophényle (**7.35** et son pronucléotide **7.42**) n'a toutefois pas permis d'améliorer les activités sur Panc-1 (pancréas). Les molécules possédant une adénine (**7.50**, **7.51**) ou une hypoxanthine protégée (**7.48**, **7.49**) ne permettent pas d'atteindre une inhibition significative sur les lignées cancéreuses testées. Évidemment, les études biologiques pour nos composés seront complétées afin de poursuivre l'investigation sur les lignées cellulaires d'intérêt.

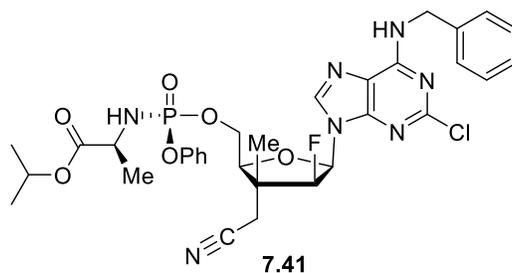
Les courbes dose-réponse vis-à-vis les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas (BxPC3, Capan2 et Panc-1) pour une série de composés comprenant notre molécule active **7.41** et la gemcitabine sont présentées à la Figure 7.12. La comparaison structurelle des nucléosides possédant une base azotée N6-benzylaminopurine (**7.33**, **7.38**, **7.41** et **7.47**) permet de montrer l'importance d'une stratégie prodrogue, un phosphoramidate dans ce cas-ci pour le composé actif **7.41**.

Figure 7.12 Courbes dose-réponse sur les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas



Les médicaments actuels comprenant la gemcitabine sont peu efficaces sur les tumeurs du cancer du pancréas. Seulement un maximum de 40 % d'inhibition (Figure 7.12) de la prolifération cellulaire des lignées Capan2 et Panc-1 est obtenu pour la gemcitabine, puisque ces lignées cancéreuses du pancréas sont résistantes.⁶⁴ De manière intéressante, notre pronucléotide **7.41** possède une activité antiproliférative qui atteint près de 90 % d'inhibition pour Capan2, ce qui est exceptionnel. Tel que présenté au Tableau 7.2, **7.41** a un IC_{50} de $10,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ pour Capan2 et un IC_{50} de $11,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ pour BxPC3.

Tableau 7.2 Activité anti-proliférique du composé **7.41** sur les cellules cancéreuses du pancréas



Lignée	Inhibition de la prolifération	IC ₅₀ (μM)
BxPC3	62 % à 25 μM	11,6 ± 0,4
Panc-1	43 % à 25 μM	-----
Capan2	89 % à 25 μM	10,6 ± 0,2

7.5 Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre une nouvelle famille de nucléosides et pronucléotides C2'-fluorés a été synthétisée. Les membres de celle-ci sont de relation stéréochimique 1',2'-*cis* et possèdent un centre quaternaire fonctionnalisé en position C3' avec la présence d'un nitrile ou d'un dérivé (tétrazole, amine primaire). Plus de vingt analogues, comprenant les versions incorporant une prodrogue monophosphate, ont été préparés et soumis à certains tests biologiques. L'un d'entre eux a présenté une activité très intéressante pour l'inhibition de la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses du pancréas. Le pronucléotide **7.41**, identifié comme étant le plus actif, incorpore un centre quaternaire avec un groupement nitrile ainsi qu'une base azotée N6-benzylée. Il a une activité antiproliférative qui atteint près de 90 % d'inhibition pour Capan2, une lignée cellulaire cancéreuse du pancréas pour laquelle la gemcitabine montre seulement 40 % d'inhibition. Avec la découverte de cet excitant résultat, de nouvelles modifications pourraient mener à l'amélioration des propriétés biologiques.

7.6 Références

1. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
2. Liu, X.; Jiang, Y.; Nowak, B.; Hargis, S.; Plunkett, W. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2302-2313.
3. Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; Siegel, D.; Perron, M.; Bannister, R.; Hui, H. C.; Larson, N.; Strickley, R.; Wells, J.; Stuthman, K. S.; Van Tongeren, S. A.; Garza, N. L.; Donnelly, G.; Shurtleff, A. C.; Retterer, C. J.; Gharaibeh, D.; Zamani, R.; Kenny, T.; Eaton, B. P.; Grimes, E.; Welch, L. S.; Gomba, L.; Wilhelmsen, C. L.; Nichols, D. K.; Nuss, J. E.; Nagle, E. R.; Kugelman, J. R.; Palacios, G.; Doerffler, E.; Neville, S.; Carra, E.; Clarke, M. O.; Zhang, L.; Lew, W.; Ross, B.; Wang, Q.; Chun, K.; Wolfe, L.; Babusis, D.; Park, Y.; Stray, K. M.; Trancheva, I.; Feng, J. Y.; Barauskas, O.; Xu, Y.; Wong, P.; Braun, M. R.; Flint, M.; McMullan, L. K.; Chen, S.-S.; Fearn, R.; Swaminathan, S.; Mayers, D. L.; Spiropoulou, C. F.; Lee, W. A.; Nichol, S. T.; Cihlar, T.; Bavari, S. *Nature* **2016**, *531*, 381-385.
4. Siegel, D.; Hui, H. C.; Doerffler, E.; Clarke, M. O.; Chun, K.; Zhang, L.; Neville, S.; Carra, E.; Lew, W.; Ross, B.; Wang, Q.; Wolfe, L.; Jordan, R.; Soloveva, V.; Knox, J.; Perry, J.; Perron, M.; Stray, K. M.; Barauskas, O.; Feng, J. Y.; Xu, Y.; Lee, G.; Rheingold, A. L.; Ray, A. S.; Bannister, R.; Strickley, R.; Swaminathan, S.; Lee, W. A.; Bavari, S.; Cihlar, T.; Lo, M. K.; Warren, T. K.; Mackman, R. L. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1648-1661.
5. Nucléosides possédant un nitrile en position C1' : (a) Mish, M. R.; Cho, A.; Kirschberg, T.; Xu, J.; Zonte, C. S.; Fenaux, M.; Park, Y.; Babusis, D.; Feng, J. Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3092-3095; (b) Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Lee, R.; Butler, T.; Metobo, S.; Aktoudianakis, V.; Lew, W.; Ye, H.; Clarke, M.; Doerffler, E.; Byun, D.; Wang, T.; Babusis, D.; Carey, A. C.; German, P.; Sauer, D.; Zhong, W.; Rossi, S.; Fenaux, M.; McHutchison, J. G.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1812-1825.

6. Nucléosides possédant un nitrile en position C2' : (a) Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2917-2919; (b) Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4183-4189; (c) Ohtawa, M.; Ichikawa, S.; Teishikata, Y.; Fujimuro, M.; Yokosawa, H.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2007-2010.
7. Nucléosides possédant un nitrile en position C3' : (a) Calvo-Mateo, A.; Camarasa, M.-J.; Díaz-Ortíz, A.; De las Heras, F. G. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 941-944; (b) Calvo-Mateo, A.; Camarasa, M.-J.; Díaz-Ortíz, A.; De las Heras, F. G. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4895-4903.
8. Nucléosides possédant un nitrile en position C4' : (a) Baker, J. J.; Mian, A. M.; Tittenson, J. R. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2939-2942; (b) Nomura, M.; Shuto, S.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Mori, S.; Shigeta, S.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2901-2908; (c) Smith, D. B.; Martin, J. A.; Klumpp, K.; Baker, S. J.; Blomgren, P. A.; Devos, R.; Granycome, C.; Hang, J.; Hobbs, C. J.; Jiang, W.-R.; Laxton, C.; Le Pogam, S.; Leveque, V.; Ma, H.; Maile, G.; Merrett, J. H.; Pichota, A.; Sarma, K.; Smith, M.; Swallow, S.; Symons, J.; Vesey, D.; Najera, I.; Cammack, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2570-2576.
9. Nucléosides possédant un centre quaternaire carboné et un nitrile en position C2' : (a) Girijavallabhan, V.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Chen, K.; Dang, Q.; Huang, Y.; Kerekes, A.; Nair, L.; Pissarnitski, D.; Verma, V.; Alvarez, C.; Chen, P.; Cole, D.; Esposite, S.; Huang, Y.; Hong, Q.; Liu, Z.; Pan, W.; Pu, H.; Rossman, R.; Truong, Q.; Vibulbhan, B.; Wang, J.; Zhao, Z.; Olsen, D.; Stamford, A.; Bogen, S.; Njoroge, F. G. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2016**, *35*, 277-294; (b) Girijavallabhan, V.; Bogen, S.; Pan, W.; Dang, Q.; Davies, I. 2014, Merck Sharp & Dohme Corp., US, WO2014/059901 A1; (c) Girijavallabhan, V.; Bogen, S.; Truong, Q. T.; Chen, P.; Kerekes, A.; Bennett, F.; Esposite, S.; Hong, Q.; Davies, I. 2014, Merck Sharp & Dohme Corp., US, WO2014/062596 A1; (d) Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G.; Bogen, S.; Kerekes, A.; Bennett, F.; Huang, Y.; Nair, L.; Pissarnitski, D.; Verma, V.;

- Dang, Q.; Davies, I.; Olsen, D. B.; Stamford, A.; Vacca, J. P. 2014, Merck Sharp & Dohme Corp., US, US2014/0161770 A1.
10. Guindon, Y.; Mochirian, P.; Nemer, M.; Prévost, M. *Nucleoside Analogues and Methods of use thereof*, 2017, PCT/CA2017/051096.
11. Tambutet, G.; Becerril-Jiménez, F.; Dostie, S.; Simard, R.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Guindon, Y. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5698-5701.
12. Dostie, S.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Tanveer, K.; Andrella, N.; Rostami, A.; Tambutet, G.; Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10769-10790.
13. Dostie, S., *Diastereoselective Synthesis of Nucleoside Analogues via Cyclization of Acyclic Precursors*. Thèse de doctorat (Université McGill), 2016.
14. Tambutet, G., *Synthèse stéréosélective de centres tertiaires et quaternaires par voie radicalaire et leur application à la synthèse d'analogues de nucléosides et de polypropionate*. Thèse de doctorat (Université de Montréal), 2017.
15. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 505-527.
16. Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8507-8515.
17. (a) Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205-8212; (b) Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2333-2344.
18. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer : New York, 1984; ch. 2, 4.
19. Harvey, S. C.; Prabhakaran, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6128-6136.
20. Thibaudeau, C.; Acharya, P.; Chattopadhyaya, J. *Stereoelectronic Effects in Nucleosides and Nucleotides and Their Structural Implications* (2nd ed.); Uppsala University Press : Uppsala, 2005.
21. Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.-I.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.

22. Damaraju, V. L.; Mowles, D.; Smith, K. M.; Yao, S. Y. M.; Young, J. D.; Marquez, V. E.; Cass, C. E. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2774-2778.
23. 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.
24. Marquez, V. E.; Hughes, S. H.; Sei, S.; Agbaria, R. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 268-275.
25. Ludek, O. R.; Marquez, V. E. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8461-8467.
26. Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. *Leukemia* **2001**, *15*, 875-890.
27. de Sousa Calvacante, L.; Monteiro, G. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *741*, 8-16.
28. Shao, J.; Zhou, B.; Chu, B.; Yen, Y. *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 409-431.
29. Jordan, A.; Reichard, P. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 71-98.
30. Cerqueira, N. M. F. S. A.; Fernandes, P. A.; Eriksson, L. A.; Ramos, M. J. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 2109-2119.
31. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
32. Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2211-2226.
33. McGuigan, C.; Thiery, J.-C.; Daverio, F.; Jiang, W. G.; Davies, G.; Mason, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3219-3227.
34. McGuigan, C.; Harris, S. A.; Daluge, S. M.; Gudmundsson, K. S.; McLean, E. W.; Burnette, T. C.; Marr, H.; Hazen, R.; Condreay, L. D.; Johnson, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3504-3515.
35. McGuigan, C.; Murziani, P.; Slusarczyk, M.; Gonczy, B.; Voorde, J. V.; Liekens, S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7247-7258.
36. Slusarczyk, M.; Lopez, M. H.; Balzarini, J.; Mason, M.; Jiang, W. G.; Blagden, S.; Thompson, E.; Ghazaly, E.; McGuigan, C. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1531-1542.
37. Ross, B. S.; Reddy, P. G.; Zhang, H.-R.; Rachakonda, S.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8311-8319.

38. Beeson, T. D.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8826-8828.
39. Steiner, D. D.; Mase, N.; Barbas III, C. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3706-3710.
40. Gaunt, M. J.; Johansson, C. C. C.; McNally, A.; Vo, N. T. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 8-27.
41. Liang, X.; Fan, J.; Shi, F.; Su, W. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2505-2507.
42. Fráter, G. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 2825-2828.
43. Fráter, G. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *63*, 1383-1390.
44. Fráter, G. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 425-428.
45. Seebach, D.; Wasmuth, D. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 197-200.
46. Züger, M.; Weller, T.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 2005-2009.
47. Seebach, D.; Wasmuth, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 971.
48. Fráter, G.; Müller, U.; Günther, W. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1269-1277.
49. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (4th ed.); John Wiley & Sons : Hoboken, 2007; pp. 306-307.
50. Reddy, P. G.; Chun, B.-K.; Zhang, H.-R.; Rachakonda, S.; Ross, B. S.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3782-3790.
51. Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis*; John Wiley & Sons : New York, 2001.
52. Mohammadi, M.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R. *Cell* **1996**, *86*, 577-587.
53. Beenken, A.; Mohammadi, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 235-253.
54. Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 5-10.
55. Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422-439.
56. Mohammadi, M.; McMahon, G.; Sun, L.; Tang, C.; Hirth, P.; Yeh, B. K.; Hubbard, S. R.; Schlessinger, J. *Science* **1997**, *276*, 955-960.
57. Herr, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3379-3393.

58. Lima, L. M.; Barreiro, E. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23-49.
59. Ballatore, C.; Huryn, D. M.; Smith III, A. B. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 385-395.
60. Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529-2591.
61. Saneyoshi, H.; Tamaki, K.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4370-4376.
62. Ces analogues ont été envoyés pour des tests biologiques contre les FGFRs (*fibroblast growth factor receptors*) sans activité intéressante jusqu'à maintenant.
63. Cantillo, D.; Gutmann, B.; Kappe, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4465-4475.
64. Moon, S.-U.; Kim, J. W.; Sung, J. H.; Kang, M. H.; Kim, S.-H.; Chang, H.; Lee, J.-O.; Kim, Y. J.; Lee, K.-W.; Kim, J. H.; Bang, S.-M.; Lee, J. S. *Cancer Res. Treat.* **2015**, *47*, 501-508.

Conclusion générale

Au cours de cet ouvrage, de nombreux analogues de nucléosides ont été préparés pour diverses applications thérapeutiques. Les stratégies diastéréosélectives de *N*-glycosylation permettent d'atteindre les nucléosides de relation stéréochimique 1',2'-*cis* et 1',2'-*trans* pour des furanosides comportant un groupe alkoxy ou fluoro en position C2. La première partie portait sur le développement d'une sonde chimique visant l'inhibition de protéines méthyltransférases en collaboration avec le SGC de Toronto. Nos analogues de SAM C2'-fluorés possédant une fonctionnalité urée ont été préparés pour l'inhibition de PRMT5 et PRMT7 et se sont avérés moins actifs que l'inhibiteur en tête de série (Chapitre 4). D'autres analogues, ceux-ci possédant plutôt une fonctionnalité amine se sont avérés actifs contre la lysine méthyltransférase SETDB1. Aucun inhibiteur n'étant encore rapporté pour cette enzyme, de nouveaux analogues ont été préparés afin d'améliorer l'activité biologique vis-à-vis SETDB1 (Chapitre 5). La stratégie acyclique développée par notre laboratoire permet d'atteindre efficacement des 4'-thioanalogues avec un fluor en C2' (Chapitre 6). Plusieurs étapes ont été optimisées et une investigation supplémentaire pour l'incorporation de bases azotées puriques pourrait améliorer notre nouvelle stratégie acyclique. La seconde partie portait, quant à elle, sur le développement d'une nouvelle famille d'analogues de nucléosides et pronucléotides pour la découverte d'agents anti-prolifériques de cellules cancéreuses (Chapitre 7). Plus de vingt analogues C2'-fluorés possédant un centre quaternaire fonctionnalisé en position C3' ont été synthétisés et testés biologiquement en collaboration avec le laboratoire de la Pre Mona Nemer à l'Université d'Ottawa. Le travail réalisé a permis l'identification d'une molécule prototypique ayant une activité intéressante sur les lignées cellulaires cancéreuses du pancréas résistantes à la gemcitabine, soit l'un des traitements actuels.

Annexe A : Partie expérimentale et caractérisation

Partie expérimentale et caractérisation

Remarques générales

Tel que permis par le *Guide de présentation des mémoires et des thèses de la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal*, la partie expérimentale a été rédigée en anglais. La nomenclature des composés a été obtenue à partir du logiciel *ChemDraw Professional* (version 16.0).

Tous les solvants anhydres, de grade HPLC, ont été séchés avec des tamis moléculaires de 4 Å avant utilisation. Les tamis moléculaires de 4 Å (billes de 1 à 2 mm) ont été activés par chauffage à 180 °C pendant 48 heures sous vide avant d'être ajoutés à de nouvelles bouteilles de solvant purgées avec de l'argon ou de l'azote. Toutes les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été effectuées sous atmosphère positive d'argon ou d'azote dans des montages préalablement séchés à l'étuve (60 °C) et flambés sous vide. Des techniques de seringue standard ont été utilisées. Les réactifs disponibles commercialement ont été utilisés sans purification supplémentaire. Le *n*-butyllithium (2.5 M dans l'hexane) a été titré avant utilisation (point de virage de l'acide diphenylacétique dans du THF anhydre).

Lorsque mentionné, les produits réactionnels ont été purifiés par chromatographie éclair (*flash chromatography*) sur un gel de silice (porosité : 60 Å, taille : 40-75 µm) avec des solvants de grade HPLC, en utilisant une pression d'air comprimé.¹ Certains produits ont également été purifiés à l'aide d'un appareil de type *Biotage Isolera One* (version 1.3.6). Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques F254 de gel de silice 60 sur aluminium (*EMD Chemicals Inc.*). Après élution, les produits ont d'abord été révélés par lampe UV, puis par une solution aqueuse de molybdate d'ammonium ou de permanganate de potassium.

Instrumentation

Les spectres de résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) et carbone (RMN ^{13}C) ont été enregistrés à l'aide d'un appareil *Varian Unity INOVA* (500 MHz) en utilisant le pic résiduel de solvant non deutéré comme référence interne. Les déplacements chimiques des signaux sont rapportés en partie par million (δ , ppm), auxquels s'ajoutent les données de multiplicité, de constante de couplage en hertz (J , Hz) et de valeur d'intégration pour les spectres RMN ^1H , et RMN ^{13}C le cas échéant. La multiplicité a été assignée selon le code suivant : s (singulet), d (doublet), app d (doublet apparent), t (triplet), app t (triplet apparent), app dt (doublet de triplets apparent), q (quadruplet), app q (quadruplet apparent) et m (multiplet).

Les assignations RMN ^1H ont été effectuées sur la base du déplacement chimique, de l'intégration, des constantes de couplage et de la multiplicité, et ont été confirmées par des expériences de corrélation bidimensionnelles $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY. Les preuves stéréochimiques ont été confirmées par des expériences d'effet Overhauser nucléaire (nOe) bidimensionnelles (NOESY) pertinentes permettant, entre autres, la détermination de la configuration relative C1'-C2'. Les assignations RMN ^{13}C ont été effectuées sur la base du déplacement chimique et de la multiplicité, et ont été confirmées par des expériences de corrélation bidimensionnelles $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (gHSQC et/ou gHMBC). Les grandes valeurs J résultent du couplage $^1\text{H}-\text{F}$ en RMN ^1H (supérieures à 16 Hz), d'un couplage $^{13}\text{C}-\text{F}$ ou $^{13}\text{C}-\text{P}$ en RMN ^{13}C (supérieures à 180 Hz), et sont rapportées lorsque possible (le couplage longue distance est également rapporté lorsque possible). La régiochimie N9 des composés comportant un anneau purine a été confirmée par le déplacement chimique du carbone en C5. Tous les ratios de produits ont été calculés à partir du spectre RMN ^1H du mélange brut réactionnel.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'aide de spectromètres à transformée de Fourier (FTIR) de type *ABB Bomen* (série MB) et de type *Bruker Platinum ATR* (série Alpha II) à partir d'un film de produit purifié. La position des pics en mode de transmittance sont rapportés en cm^{-1} .

Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ ont été mesurés à température ambiante à l'aide d'un polarimètre *PerkinElmer 343* par la raie D du sodium (589 nm) avec une cellule de 1.0 mL et d'un parcours optique de 9.998 cm. La concentration (en g/100 mL) ainsi que le solvant utilisé sont également rapportés.

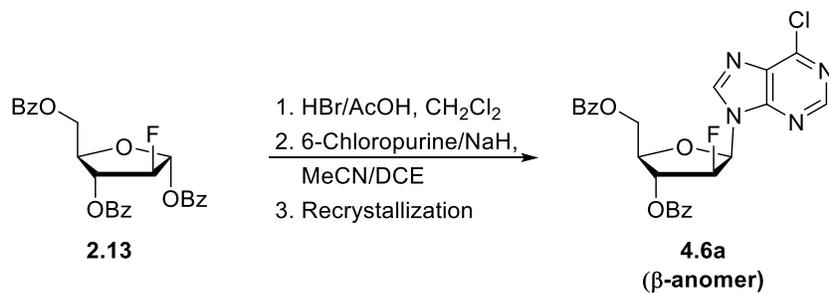
Les analyses de masse de basse (MS) et de haute résolution (HRMS) ont été réalisées par la *Plateforme de découvertes en protéomique* à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM). Les spectres ont été enregistrés sur un appareil *Thermo Fischer LTQ Orbitrap XL* avec un mode d'ionisation par électronébulisateur (ESI) couplé à un piège à ions (IT).

Procédure générale

Preparation of silylated nucleobases² – To a suspension of the nucleobase in HMDS (2.7 eq.) under inert atmosphere was added $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1 eq.). The reaction mixture was refluxed at 180 °C under a clear solution was obtained (typically three hours for pyrimidine nucleobases). Upon cooling to 25 °C, the solution was placed under high vacuum for ~1 hour to remove excess HMDS. A solution of the silylated nucleobase was made in DCE (0.30 – 0.90 M).

Section expérimentale du chapitre 4

(-)-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-(benzoyloxy)-5-(6-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**4.6a**, β -anomer)



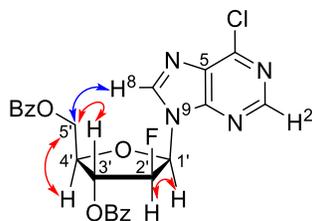
Purine **4.6a** was previously described in literature but obtained by using different conditions.^{3,4}

A solution of 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinose **2.13** (2.52 g, 5.43 mmol) in anhydrous DCM (21.5 mL, 0.25 M) was treated with 33 % HBr (3.0 equivalents) in acetic acid (2.8 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 24 hours, then slowly neutralized with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x), then the combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. The resulting light yellow oil (bromo-sugar) was used for the next step without further purification. ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude residue indicated a >20:1 diastereomeric ratio for the bromination and was consistent with data reported for the bromo-sugar.^{3,5} To a suspension of 6-chloropurine (1.16 g, 7.51 mmol) in anhydrous acetonitrile (86.1 mL) at 25 °C, NaH (344 mg, 8.61 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. After stirring for 30 minutes, a solution of the crude bromo-sugar dissolved in anhydrous DCE (26.9 mL) was slowly added to the reaction mixture. After 16 hours, the reaction mixture was treated with a saturated aqueous solution of NH₄Cl, and extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. ¹H NMR spectrum of the crude showed a ~4:1 ratio of β : α anomers. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc,

gradient), followed by recrystallization from DCM/MeOH provided the pure **β -anomer 4.6a** (1.58 g, 59 %) as a white crystalline solid. NMR data were consistent with data reported in literature for **β -anomer 4.6a**.^{3,4} A small amount of pure **α -anomer 4.6b** was isolated from a purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) of the resulting filtrate. β and α anomers were identified by NOESY experiments which are detailed below (β and α anomers were isolated and characterized).

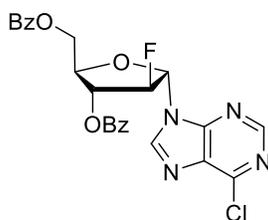
β -Anomer 4.6a: $R_f = 0.36$ (Hexanes/EtOAc, 1:1); $[\alpha]_D^{25} -32$ (c 1.2, CDCl_3); **Formula:** $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_5$; **MW:** 496.88 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3130, 3064, 2981, 1720, 1591, 1563, 1491, 1451, 1421, 1262 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 8.40 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 8.10 – 8.04 (m, 4H), 7.66 – 7.61 (m, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 1H), 7.49 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.69 (dd, $J = 21.8, 2.8$ Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 16.6, 2.8$ Hz, 1H), 5.40 (dd, $J = 49.9, 2.8$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 4.63 (dd, $J = 7.4, 4.5$ Hz, 1H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 165.2, 152.3, 151.4, 151.2, 144.5 (d, $J = 6.3$ Hz), 134.3, 133.5, 131.5, 130.0, 129.8, 129.4, 128.8, 128.6, 128.2, 92.6 (d, $J = 193.0$ Hz), 84.0 (d, $J = 16.9$ Hz), 81.6, 76.7 (d, $J = 30.4$ Hz), 63.2 (d, $J = 2.0$ Hz) ppm (J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 519.0842; found: 519.0849 (+1.37 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments for beta-anomer 4.6a:



Strong, medium

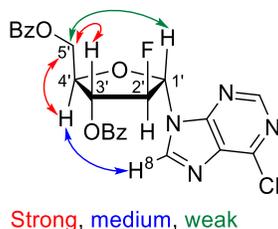
(-)-((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-3-(benzoyloxy)-5-(6-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (4.6b, α -anomer)



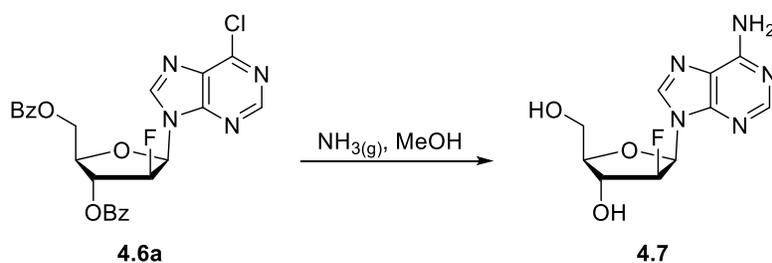
4.6b
(α -anomer)

α -Anomer 4.6b: $R_f = 0.36$ (Hexanes/EtOAc, 1:1); $[\alpha]^{25}_D -8.6$ (c 1.0, CDCl_3); **Formula:** $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{O}_5$; **MW:** 496.88 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3064, 2960, 1722, 1590, 1561, 1489, 1451, 1338, 1264, 1093 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.10 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 2H), 7.66 (dd, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 2H), 7.61 – 7.55 (m, 2H), 7.46 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.39 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.58 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 6.21 (app dt, $J = 48.6, 1.4$ Hz, 1H), 5.82 (ddd, $J = 16.9, 3.0, 1.6$ Hz, 1H), 4.99 (dd, $J = 8.3, 5.0$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 165.0, 152.4, 151.8, 151.0, 143.3, 134.3, 133.6, 132.5, 130.0, 129.6, 129.4, 128.9, 128.7, 128.0, 96.4 (d, $J = 189.1$ Hz), 89.8 (d, $J = 36.1$ Hz), 84.5 (d, $J = 1.7$ Hz), 76.7 (d, $J = 29.5$ Hz), 63.4 (d, $J = 2.2$ Hz) ppm (J values result from ^{13}C - F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClFN}_4\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 519.0842; found: 519.0848 (+1.19 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments for alpha-anomer 4.6b:

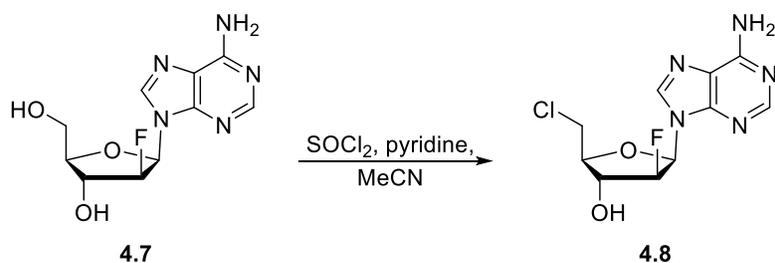


(+)-(2R,3R,4S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (4.7)



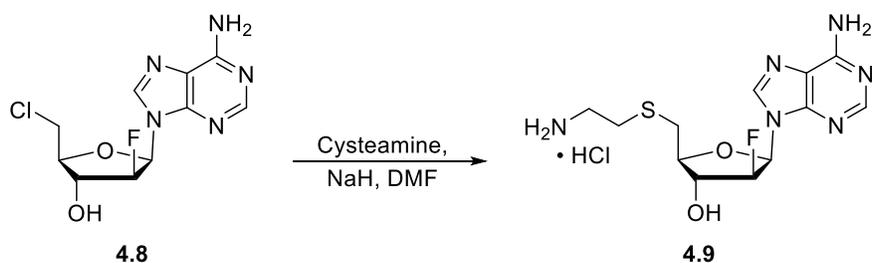
A solution of **4.6a** (2.08 g, 4.19 mmol) in MeOH (175 mL, 0.02 M) in a high-pressure flask at 25 °C was saturated with NH₃ gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 72 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) provided **4.7** (824 mg, 73 %) as a white powder. $R_f = 0.15$ (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]^{25}_D +37$ (c 1.3, DMSO-*d*₆); **Formula**: C₁₀H₁₂FN₅O₃; **MW**: 269.24 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3333, 3157, 2921, 2851, 1665, 1605, 1571, 1480, 1337, 1306 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.34 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.49 (dd, $J = 16.1, 4.1$ Hz, 1H), 5.15 (ddd, $J = 52.2, 4.1, 3.1$ Hz, 1H), 4.55 (ddd, $J = 18.2, 4.8, 3.0$ Hz, 1H), 4.02 (app q, $J = 4.6$ Hz, 1H), 3.89 (ddd, $J = 12.2, 4.0, 1.3$ Hz, 1H), 3.83 (dd, $J = 12.1, 5.1$ Hz, 1H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.3, 154.0, 150.4, 141.6 (d, $J = 4.6$ Hz), 119.7, 96.9 (d, $J = 193.0$ Hz), 85.7 (d, $J = 4.3$ Hz), 84.4 (d, $J = 17.3$ Hz), 74.8 (d, $J = 24.6$ Hz), 62.1 (d, $J = 1.7$ Hz) ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₀H₁₃FN₅O₃ [M+H]⁺: 270.0997; found: 270.0995 (–0.88 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2-(chloromethyl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol (4.8)



To **4.7** (196 mg, 0.728 mmol) in anhydrous MeCN (7.3 mL, 0.10 M) at 0 °C, anhydrous pyridine (177 μ L, 2.18 mmol) was added, followed by slow addition of thionyl chloride (0.37 mL, 5.1 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at 0 °C and at 25 °C for 16 hours, and then concentrated. The crude mixture was dissolved in 5:1 MeOH:H₂O (5.0 mL MeOH, 1.0 mL H₂O, 0.12 M). Stirring was maintained for 30 minutes at 25 °C followed by concentration. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient), followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **4.8** (101 mg, 48 %). **R_f** = 0.45 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +32 (*c* 1.0, MeOH); **Formula:** C₁₀H₁₁ClFN₅O₂; **MW:** 287.68 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3324, 3180, 1646, 1478, 1425, 1339, 1299, 1247, 1095, 1037 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 18.8, 3.6 Hz, 1H), 5.21 – 5.06 (m, 1H), 4.60 – 4.52 (m, 1H), 4.22 – 4.16 (m, 1H), 3.87 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.1, 153.8, 150.4, 141.5 (d, *J* = 5.5 Hz), 119.6, 96.4 (d, *J* = 191.9 Hz), 85.2 (d, *J* = 3.2 Hz), 84.7 (d, *J* = 16.7 Hz), 76.3 (d, *J* = 25.0 Hz), 44.3 (d, *J* = 3.4 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₀H₁₂ClFN₅O₂ [M+H]⁺: 288.0658; found: 288.0661 (+0.92 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2-(((2-aminoethyl)thio)methyl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol hydrochloride (4.9)

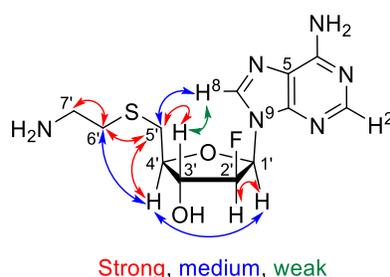


To a solution of cysteamine (69 mg, 0.90 mmol) in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.15 M) at 0 °C, NaH (40 mg, 0.99 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. When evolution of H₂ stopped (~20 minutes), **4.8** (129 mg, 0.448 mmol) was added as a solution in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.07 M). The reaction mixture was warmed to 25 °C, then stirred for 16 hours. The reaction mixture was quenched with H₂O (5.0 mL), neutralized to pH 7 with a 1 N HCl solution, and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH with 3 % conc. aq. NH₄OH, gradient) provided the free base of the title compound (47 mg, 32 %) that was diluted in MeOH, acidified under pH 7 with a 1 N HCl solution, and then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) to provide the title compound **4.9** as the hydrochloride salt. The hydrochloride salt and the free base were characterized.

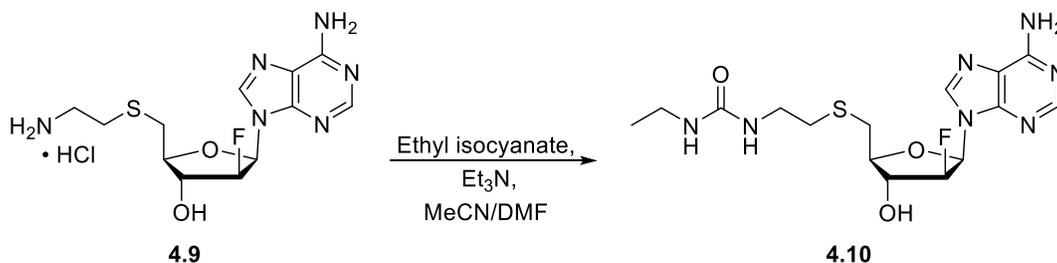
Free base: $R_f = 0.3$ (CHCl₃/MeOH, 80:20 with 3 % conc. aq. NH₄OH); $[\alpha]^{25}_D +63$ (c 1.2, MeOH); **Formula:** C₁₂H₁₇FN₆O₂S; **MW:** 328.37 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3325, 3150, 3922, 1644, 1599, 1474, 1422, 1334, 1298, 1248 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.24 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.49 (dd, $J = 18.3, 3.8$ Hz, 1H), 5.12 (ddd, $J = 51.9, 3.8, 2.5$ Hz, 1H), 4.51 (ddd, $J = 17.1, 4.0, 2.6$ Hz, 1H), 4.12 (app td, $J = 6.4, 4.0$ Hz, 1H), 2.98 (app qd, $J = 14.0, 6.5$ Hz, 2H), 2.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.79 – 2.70 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.4, 154.2, 150.4, 141.5 (d, $J = 5.5$ Hz), 119.6, 96.6 (d, $J = 192.0$ Hz), 85.1 (d, $J = 3.2$ Hz), 84.4 (d, $J = 16.8$ Hz), 77.6 (d, $J = 24.5$ Hz), 41.5, 35.6, 34.6 (d, $J = 2.7$ Hz) ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₂H₁₇FN₆NaO₂S $[M+Na]^+$: 351.1010; found: 351.1005 (–1.46 ppm).

Hydrochloride salt (4.9): $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +52$ (c 0.77, MeOH); **Formula:** $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ClFN}_6\text{O}_2\text{S}$; **MW:** 364.82 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3322, 3186, 2923, 1646, 1599, 1478, 1422, 1248, 1092, 1035 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.52 – 8.41 (m, 2H), 6.57 (dd, $J = 17.1, 3.8$ Hz, 1H), 5.30 – 5.09 (m, 1H), 4.57 – 4.48 (m, 1H), 4.17 (dd, $J = 10.8, 5.7$ Hz, 1H), 3.17 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.11 – 2.98 (m, 2H), 2.97 – 2.81 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 157.4, 154.2, 150.5, 141.5 (d, $J = 5.9$ Hz), 119.6, 96.7 (d, $J = 192.4$ Hz), 84.9 (d, $J = 3.9$ Hz), 84.2 (d, $J = 16.9$ Hz), 77.8 (d, $J = 24.4$ Hz), 40.1, 34.6, 31.0 ppm (J values result from ^{13}C – F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} - \text{Cl}]^+$: 329.1196; found: 329.1187 (–1.18 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:

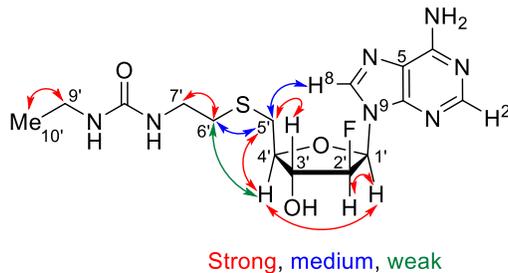


(+)-1-(2-((((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)thio)ethyl)-3-ethylurea (4.10)

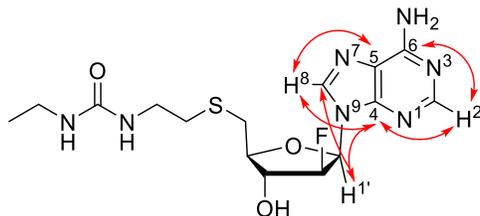


To a solution of **4.9** (84 mg, 0.26 mmol) in anhydrous MeCN/DMF (3.8 mL MeCN : 0.4 mL DMF, 0.06 M), Et₃N (36 μ L, 0.26 mmol) was added, followed by ethyl isocyanate (32 μ L, 0.38 mmol). The reaction mixture was refluxed at 80 °C for 3 hours, then more ethyl isocyanate (21 μ L, 256 μ mol) was added (TLC showed remaining starting material). The reaction mixture was stirred for an additional hour at 80 °C. The precipitate was filtered off by washing with MeCN and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) provided **4.10** (20 mg, 20 %). **R_f** = 0.27 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +41 (*c* 1.0, MeOH); **Formula**: C₁₅H₂₂FN₇O₃S; **MW**: 399.45 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3318, 3201, 2973, 2928, 2877, 1618, 1478, 1424 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.50 (dd, *J* = 18.5, 3.7 Hz, 1H), 5.12 (ddd, *J* = 51.9, 3.7, 2.4 Hz, 1H), 4.52 (ddd, *J* = 17.0, 3.8, 2.5 Hz, 1H), 4.14 (app td, *J* = 6.4, 4.0 Hz, 1H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 3.15 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.01 (app qd, *J* = 13.9, 6.5 Hz, 2H), 2.78 – 2.68 (m, 2H), 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 161.0, 157.4, 154.1, 150.4, 141.5 (d, *J* = 5.5 Hz), 119.6, 96.6 (d, *J* = 191.9 Hz), 85.2 (d, *J* = 3.2 Hz), 84.5 (d, *J* = 16.7 Hz), 77.6 (d, *J* = 24.5 Hz), 40.8, 35.8, 34.7 (d, *J* = 2.7 Hz), 34.0, 15.7 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₅H₂₂FN₇NaO₃S [M+Na]⁺: 422.1381; found: 422.1377 (–0.89 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:



HSQC and HMBC experiments:



From HSQC

H^2 (8.24 ppm) \leftrightarrow C^2 (154.1 ppm)

H^8 (8.26 ppm) \leftrightarrow C^8 (141.5 ppm)

$H^{1'}$ (6.50 ppm) \leftrightarrow $C^{1'}$ (84.5 ppm)

From HMBC

H^2 (8.24 ppm) \leftrightarrow C^4 (150.4 ppm)

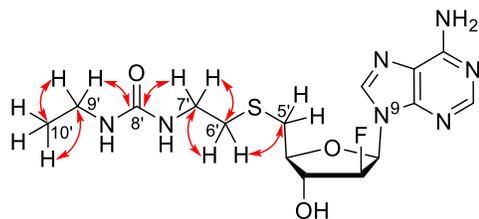
H^2 (8.24 ppm) \leftrightarrow C^6 (157.4 ppm)

H^8 (8.26 ppm) \leftrightarrow C^4 (150.4 ppm)

H^8 (8.26 ppm) \leftrightarrow C^5 (119.6 ppm)

$H^{1'}$ (6.50 ppm) \leftrightarrow C^4 (150.4 ppm)

$H^{1'}$ (6.50 ppm) \leftrightarrow C^8 (141.5 ppm)



From HSQC

$H^{6'}$ (2.73 ppm) \leftrightarrow $C^{6'}$ (34.0 ppm)

$H^{7'}$ (3.34 ppm) \leftrightarrow $C^{7'}$ (40.8 ppm)

$H^{9'}$ (3.15 ppm) \leftrightarrow $C^{9'}$ (35.8 ppm)

$H^{10'}$ (1.10 ppm) \leftrightarrow $C^{10'}$ (15.7 ppm)

From HMBC

$H^{6'}$ (2.73 ppm) \leftrightarrow C^5 (34.7 ppm)

$H^{6'}$ (2.73 ppm) \leftrightarrow $C^{7'}$ (40.8 ppm)

$H^{7'}$ (3.34 ppm) \leftrightarrow C^6 (34.0 ppm)

$H^{7'}$ (3.34 ppm) \leftrightarrow C^8 (161.0 ppm)

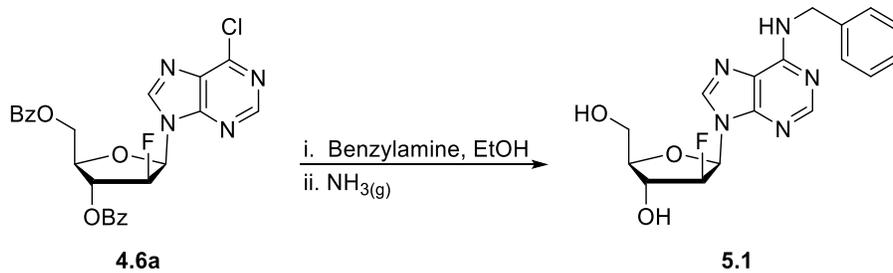
$H^{9'}$ (3.15 ppm) \leftrightarrow C^8 (161.0 ppm)

$H^{9'}$ (3.15 ppm) \leftrightarrow $C^{10'}$ (15.7 ppm)

$H^{10'}$ (1.10 ppm) \leftrightarrow $C^{9'}$ (35.8 ppm)

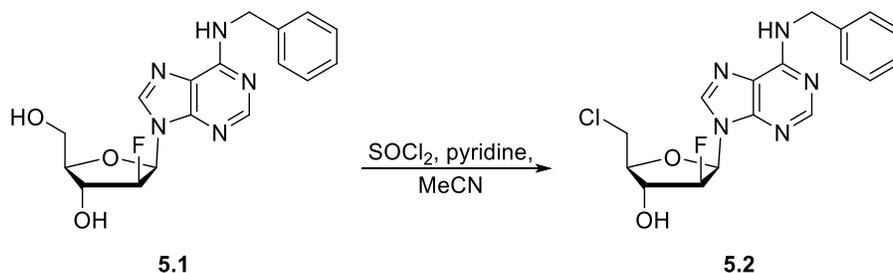
Section expérimentale du chapitre 5

(+)-(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-(benzylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (**5.1**)



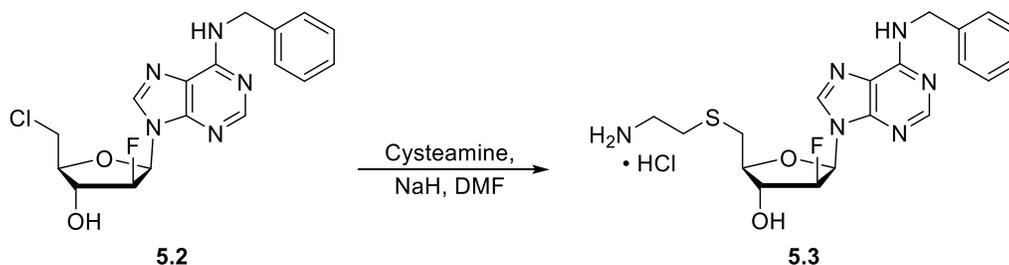
To a solution of **4.6a** (1.21 g, 2.44 mmol) in EtOH (61 mL, 0.04 M) in a high-pressure flask at 25 °C, benzylamine (2.66 mL, 24.4 mmol) was added and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 hours and cooled to 25 °C. The high-pressure flask was opened, the mixture was saturated with NH₃ gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was suspended in DCM, the suspension was filtered off by washing with DCM and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.1** (852 mg, 97 %). **R_f** = 0.45 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +36 (*c* 0.98, MeOH); **Formula**: C₁₇H₁₈FN₅O₃; **MW**: 359.36 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3242, 2920, 2866, 1621, 1479, 1337, 1234, 1041 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 16.1, 4.1 Hz, 1H), 5.14 (ddd, *J* = 52.2, 4.0, 3.1 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.53 (ddd, *J* = 18.2, 4.7, 3.1 Hz, 1H), 4.01 (app q, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.87 (ddd, *J* = 12.1, 4.0, 1.2 Hz, 1H), 3.81 (dd, *J* = 12.1, 5.1 Hz, 1H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.1, 154.1, 149.8, 141.2 (d, *J* = 4.9 Hz), 140.2, 129.6, 128.5, 128.2, 120.0, 96.9 (d, *J* = 193.0 Hz), 85.7 (d, *J* = 4.2 Hz), 84.4 (d, *J* = 17.3 Hz), 74.8 (d, *J* = 24.5 Hz), 62.1 (d, *J* = 2.0 Hz), 45.1 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₇H₁₉FN₅O₃ [M+H]⁺: 360.1466; found: 360.1466 (–0.01 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-(benzylamino)-9*H*-purin-9-yl)-2-(chloromethyl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol (5.2)



To **5.1** (242 mg, 0.673 mmol) in anhydrous MeCN (17 mL, 0.04 M) at 25 °C, anhydrous pyridine (272 μ L, 3.37 mmol) was added. After stirring for 15 minutes, thionyl chloride (0.34 mL, 4.71 mmol) was slowly added. The reaction mixture was stirred for 16 hours at 25 °C and concentrated. The crude mixture was dissolved in 5:1 MeOH:H₂O (15.0 mL MeOH, 3.0 mL H₂O, 0.04 M). Stirring was maintained for 30 minutes followed by concentration. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient), followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.2** (112 mg, 44 %). **R_f** = 0.60 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +32 (*c* 1.0, MeOH); **Formula**: C₁₇H₁₇ClFN₅O₂; **MW**: 377.80 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3183, 3033, 2931, 2877, 1610, 1476, 1336, 1288, 1234, 1046 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.43 – 7.17 (m, 5H), 6.58 – 6.46 (m, 1H), 5.12 (app dtd, *J* = 5.8, 3.9, 2.1 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.59 – 4.50 (m, 1H), 4.18 (app dt, *J* = 5.7, 3.5 Hz, 1H), 3.89 – 3.82 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.0, 154.2, 149.7, 140.9 (d, *J* = 6.8 Hz), 140.2, 129.5, 128.5, 128.2, 119.9, 96.3 (d, *J* = 191.9 Hz), 85.1 (d, *J* = 3.4 Hz), 84.7 (d, *J* = 16.7 Hz), 76.3 (d, *J* = 25.0 Hz), 45.0, 44.3 (d, *J* = 3.7 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₇H₁₈ClFN₅O₂ [M+H]⁺: 378.1128; found: 378.1125 (–0.74 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(((2-aminoethyl)thio)methyl)-5-(6-(benzylamino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol hydrochloride (5.3)

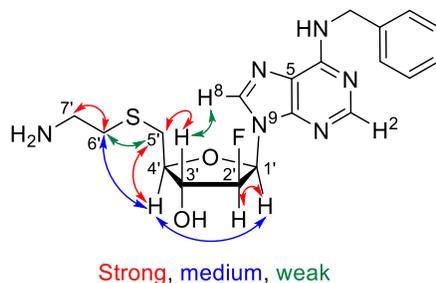


To a solution of cysteamine (52 mg, 0.67 mmol) in anhydrous DMF (2.5 mL, 0.27 M) at 0 °C, NaH (30 mg, 0.74 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. When evolution of H₂ stopped (~45 minutes), **5.2** (127 mg, 0.336 mmol) was added as a solution in anhydrous DMF (2.5 mL, 0.13 M). The reaction mixture was warmed to 25 °C, then stirred at 25 °C for 48 hours. The reaction mixture was quenched with H₂O (5.0 mL), acidified under pH 7 with a 1 N HCl solution, then the solvents were evaporated. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.3** (54 mg, 35 %) as the hydrochloride salt. The free base of the title compound was obtained and characterized from a purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH with 3 % conc. aq. NH₄OH, gradient).

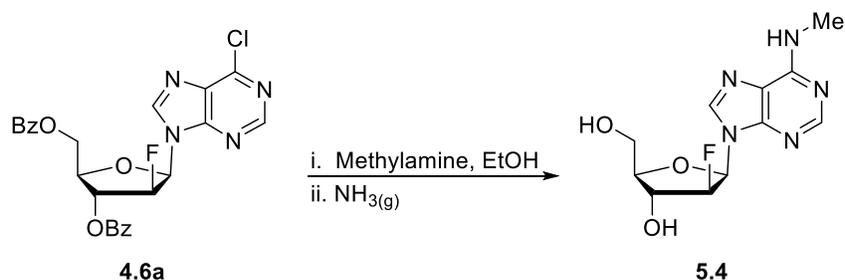
Hydrochloride salt (5.3): [α]²⁵_D +47 (*c* 0.94, MeOH); **Formula:** C₁₉H₂₄ClFN₆O₂S; **MW:** 454.95 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3328, 3033, 2928, 1622, 1479, 1338, 1295, 1236, 1041 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.28 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 17.9, 3.8 Hz, 1H), 5.21 – 5.06 (m, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.55 – 4.47 (m, 1H), 4.12 (dd, *J* = 10.8, 5.8 Hz, 1H), 3.13 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.08 – 2.99 (m, 2H), 2.94 – 2.84 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.1, 154.3, 149.9, 141.1 (d, *J* = 6.9 Hz), 140.2, 129.5, 128.5, 128.2, 120.0, 96.7 (d, *J* = 192.2 Hz), 84.9 (d, *J* = 3.8 Hz), 84.2 (d, *J* = 16.9 Hz), 77.8 (d, *J* = 24.4 Hz), 45.0, 40.1, 34.6 (d, *J* = 2.2 Hz), 31.1 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₉H₂₄FN₆O₂S [M–Cl]⁺: 419.1660; found: 419.1660 (+0.04 ppm).

Free base: $R_f = 0.40$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 80:20 with 3 % conc. aq. NH_4OH); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +47$ (c 0.95, MeOH); **Formula:** $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_6\text{O}_2\text{S}$; **MW:** 418.49 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3269, 3031, 2918, 2863, 1620, 1477, 1336, 1295, 1235, 1039 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.28 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 18.4, 3.7$ Hz, 1H), 5.11 (ddd, $J = 51.9, 3.7, 2.5$ Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.51 (ddd, $J = 17.1, 3.8, 2.5$ Hz, 1H), 4.11 (app td, $J = 6.4, 4.0$ Hz, 1H), 2.96 (app qd, $J = 14.0, 6.4$ Hz, 2H), 2.83 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.79 – 2.68 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 156.1, 154.2, 149.7, 141.1 (d, $J = 6.4$ Hz), 140.2, 129.5, 128.5, 128.2, 120.0, 96.6 (dd, $J = 191.9, 2.9$ Hz), 85.1 (d, $J = 3.4$ Hz), 84.4 (d, $J = 17.0$ Hz), 77.6 (d, $J = 24.4$ Hz), 45.0, 41.6, 36.2, 34.6 (d, $J = 2.7$ Hz) ppm (*J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_6\text{NaO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 441.1479; found: 441.1478 (-0.35 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:

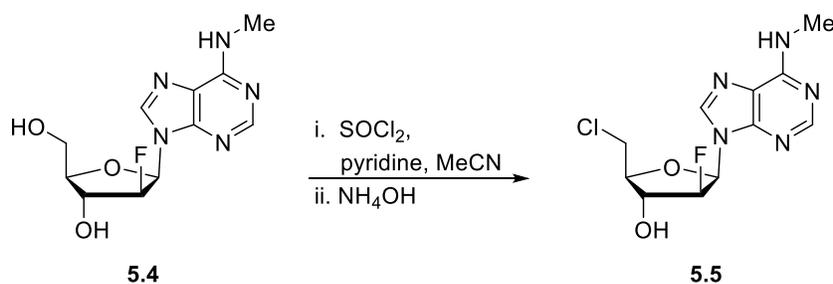


(+)-(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-5-(6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (5.4)



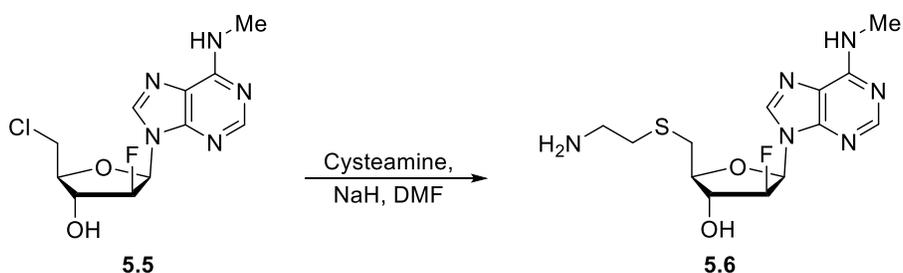
To a solution of **4.6a** (650 mg, 1.31 mmol) in EtOH (33 mL, 0.04 M) in a high-pressure flask at 25 °C, methylamine (1.64 mL, 13.1 mmol, 33 % wt in EtOH) was added and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 hours and cooled to 25 °C. To complete the deprotection, the mixture was saturated with NH₃ gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) provided **5.4** (339 mg, 92 %). *R_f* = 0.20 (DCM/MeOH, 9:1); [α]²⁵_D +47 (*c* 1.2, MeOH); **Formula**: C₁₁H₁₄FN₅O₃; **MW**: 283.26 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3285, 2934, 1628, 1486, 1376, 1336, 1239, 1041 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.32 – 8.16 (m, 2H), 6.46 (dd, *J* = 16.1, 4.1 Hz, 1H), 5.14 (dddd, *J* = 52.2, 4.0, 3.0, 0.8 Hz, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 18.2, 4.5, 3.1 Hz, 1H), 4.03 – 3.99 (m, 1H), 3.90 – 3.84 (m, 1H), 3.81 (dd, *J* = 12.2, 5.1 Hz, 1H), 3.10 (s, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.6, 154.0, 149.2, 141.0 (d, *J* = 4.6 Hz), 120.2, 96.9 (d, *J* = 192.9 Hz), 85.6 (d, *J* = 4.3 Hz), 84.3 (d, *J* = 17.2 Hz), 74.7 (d, *J* = 24.5 Hz), 62.1 (d, *J* = 1.8 Hz), 27.7 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₁H₁₅FN₅O₃ [M+H]⁺: 284.1153; found: 284.1148 (–1.92 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(chloromethyl)-4-fluoro-5-(6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (5.5)



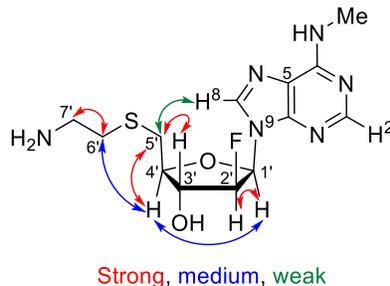
To **5.4** (151 mg, 0.533 mmol) in anhydrous MeCN (10 mL, 0.05 M) at 0 °C, anhydrous pyridine (129 μ L, 1.60 mmol) was added, followed by slow addition of thionyl chloride (0.27 mL, 3.73 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at 0 °C and at 25 °C for 16 hours, and then concentrated. The crude mixture was dissolved in 5:1 MeOH:H₂O (10 mL MeOH, 2.0 mL H₂O, 0.04 M) and conc. aq. NH₄OH (0.3 mL) was added. Stirring was maintained for 30 minutes followed by concentration. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient), provided **5.5** (62 mg, 39 %). R_f = 0.42 (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ +43 (*c* 1.3, MeOH); **Formula**: C₁₁H₁₃ClFN₅O₂; **MW**: 301.71 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3287, 3129, 2942, 2872, 1628, 1486, 1336, 1297, 1238, 1051 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 19.0, 3.6 Hz, 1H), 5.14 (ddd, *J* = 51.6, 3.4, 2.4 Hz, 1H), 4.60 – 4.50 (m, 1H), 4.19 (app td, *J* = 5.8, 3.9 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.11 (s, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.7, 154.1, 149.2, 140.7 (d, *J* = 5.7 Hz), 120.1, 96.3 (dd, *J* = 191.9, 4.6 Hz), 85.1 (d, *J* = 3.8 Hz), 84.6 (dd, *J* = 16.7, 3.3 Hz), 76.3 (d, *J* = 24.6 Hz), 44.3 (d, *J* = 3.1 Hz), 27.7 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₁H₁₄ClFN₅O₂ [M+H]⁺: 302.0815; found: 302.0806 (–2.93 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(((2-aminoethyl)thio)methyl)-4-fluoro-5-(6-(methylamino)-9*H*-purin-9-yl)tetrahydrofuran-3-ol (5.6)

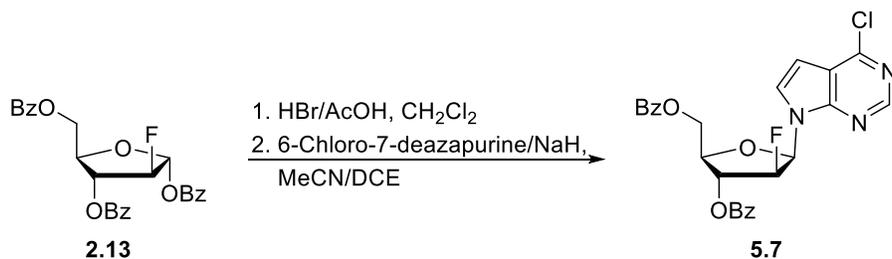


To a solution of cysteamine (35 mg, 0.45 mmol) in anhydrous DMF (5.0 mL, 0.09 M) at 0 °C, NaH (20 mg, 0.50 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. When evolution of H₂ stopped (~20 minutes), **5.5** (68 mg, 0.22 mmol) was added as a solution in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.038 M). The reaction mixture was warmed to 25 °C, and stirred for 24 hours. The reaction mixture was quenched with H₂O (5.0 mL), neutralized to pH 7 with a 1 N HCl solution, then the solvents were evaporated. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH with 3 % conc. aq. NH₄OH, gradient) provided the free base **5.6** (35 mg, 45 %). *R_f* = 0.38 (CHCl₃/MeOH, 80:20 with 3 % conc. aq. NH₄OH); [α]²⁵_D +58 (*c* 0.92, MeOH); **Formula**: C₁₃H₁₉FN₆O₂S; **MW**: 342.39 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3281, 2924, 2870, 1625, 1584, 1484, 1334, 1298, 1238, 1040 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.48 (dd, *J* = 18.4, 3.7 Hz, 1H), 5.12 (ddd, *J* = 51.9, 3.7, 2.5 Hz, 1H), 4.51 (ddd, *J* = 17.1, 3.9, 2.5 Hz, 1H), 4.12 (app td, *J* = 6.4, 4.0 Hz, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.97 (app dt, *J* = 14.1, 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.78 – 2.70 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.7, 154.2, 149.3, 140.9 (d, *J* = 5.6 Hz), 120.1, 96.6 (dd, *J* = 191.9, 3.3 Hz), 85.1 (d, *J* = 3.6 Hz), 84.4 (dd, *J* = 16.8, 2.6 Hz), 77.6 (d, *J* = 24.5 Hz), 41.7, 36.2, 34.6 (d, *J* = 2.6 Hz), 27.7 ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₃H₁₉FN₆NaO₂S [M+Na]⁺: 365.1166; found: 365.1165 (–0.27 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:



(-)-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-(benzoyloxy)-5-(4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl)-4-fluorotetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**5.7**)

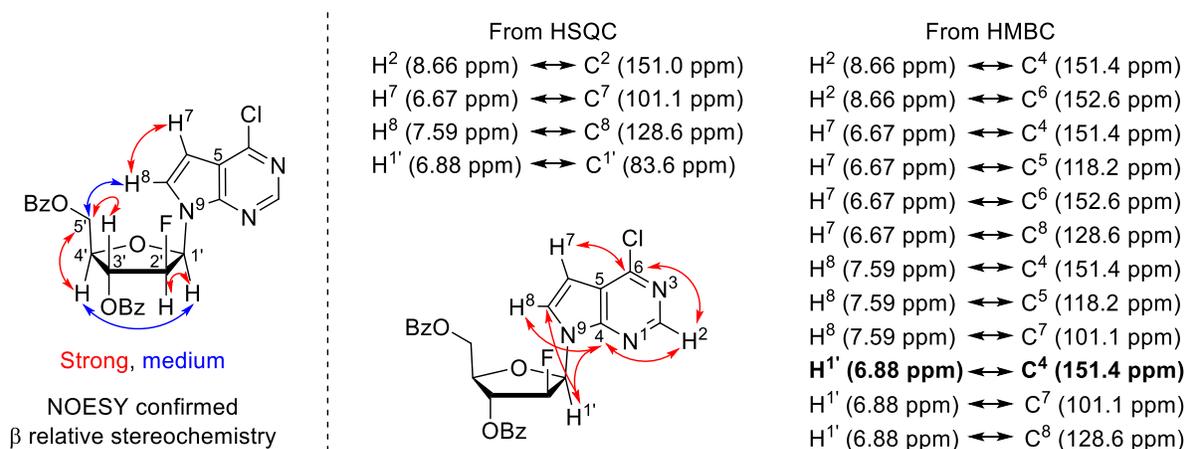


Purine **5.7** was previously described in literature but obtained by using different conditions.⁶

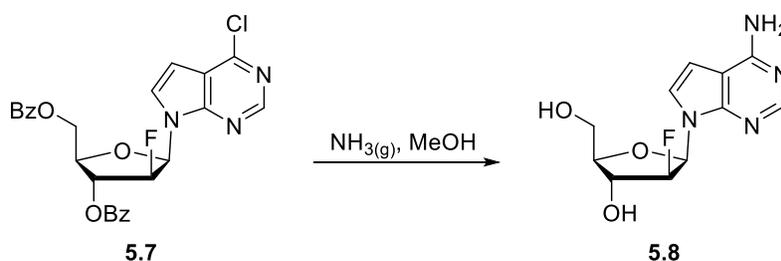
A solution of 2-deoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinose **2.13** (3.18 g, 6.85 mmol) in anhydrous DCM (45.7 mL, 0.15 M) was treated with 33 % HBr (3.0 equivalents) in acetic acid (3.6 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 16 hours, then slowly neutralized with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x), then the combined organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. The resulting light yellow oil (bromo-sugar) was used for the next step without further purification. ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude residue indicated a >20:1 diastereomeric ratio for the bromination and was consistent with data reported for the bromo-sugar.^{3,5} To a suspension of 6-chloro-7-deazapurine (1.47 g, 9.59 mmol) in anhydrous acetonitrile (68.5 mL) at 25 °C, NaH (493 mg, 12.3 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. After stirring for 30 minutes, a solution of the crude bromo-sugar dissolved in anhydrous DCE (68.5 mL) was slowly added to the reaction

mixture. After 2.5 hours, the reaction mixture was treated with a saturated aqueous solution of NH_4Cl , and the mixture was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and condensed under reduced pressure. ^1H NMR spectrum of the crude showed the β -anomer as the major product (the minor α -anomer has not yet been identified). The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Hexanes/ Et_2O , gradient) to provide only the pure β -anomer **5.7** (1.99 g, 59 %) as a white foam. β -anomer was identified by NOESY correlations which are detailed below (α -anomer has not yet been identified and characterized). $R_f = 0.55$ (Hexanes/ EtOAc , 1:1); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -35$ (c 1.0, CDCl_3); **Formula:** $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_5$; **MW:** 495.89 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3062, 1725, 1587, 1550, 1512, 1453, 1269, 1096 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (s, 1H), 8.15 – 8.07 (m, 4H), 7.66 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.61 – 7.56 (m, 2H), 7.52 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.88 (dd, $J = 22.6, 2.7$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 5.76 (dd, $J = 17.1, 2.8$ Hz, 1H), 5.34 (dd, $J = 50.1, 2.8$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.58 (dd, $J = 7.7, 4.6$ Hz, 1H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 165.3, 152.6, 151.4, 151.0, 134.3, 133.5, 130.1, 129.9, 129.6, 128.9, 128.65, 128.6 (d, $J = 5.5$ Hz), 128.4, 118.2, 101.1, 93.3 (d, $J = 192.8$ Hz), 83.6 (d, $J = 16.6$ Hz), 80.8, 77.1, 63.6 (d, $J = 1.4$ Hz) ppm (J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 518.0889; found: 518.0900 (+2.09 ppm).

NOESY, HSQC and HMBC experiments:

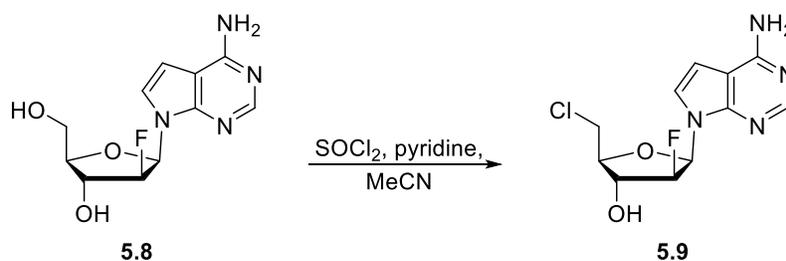


(+)-(2R,3R,4S,5R)-5-(4-amino-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (5.8)



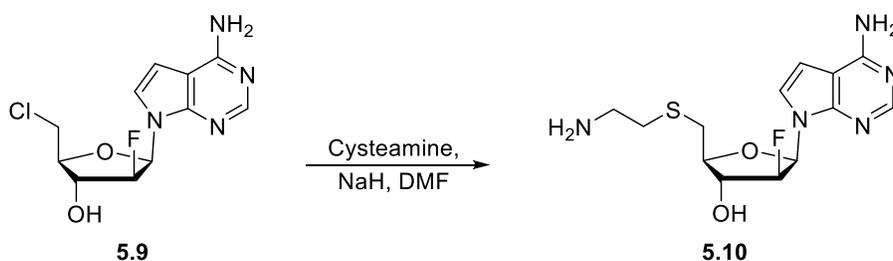
A solution of **5.7** (1.84 g, 3.71 mmol) in MeOH (175 mL, 0.02 M) in a high-pressure flask at 25 °C was saturated with NH₃ gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 100 °C for 72 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) provided **5.8** (676 mg, 68 %) as a white powder. $R_f = 0.3$ (DCM/MeOH, 8:2); $[\alpha]^{25}_D +38$ (c 0.99, DMSO-*d*₆); **Formula:** C₁₁H₁₃FN₄O₃; **MW:** 268.25 g/mol; **IR** (neat, powder) ν_{max} 3459, 3353, 3142, 2925, 2743, 1642, 1593, 1560, 1322 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.11 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.64 – 6.55 (m, 2H), 5.04 (app dt, $J = 52.4, 3.1$ Hz, 1H), 4.49 – 4.42 (m, 1H), 3.95 (dd, $J = 9.1, 4.4$ Hz, 1H), 3.83 (app qd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 158.9, 152.2, 150.9, 125.0 (d, $J = 4.8$ Hz), 104.3, 100.7, 97.4 (d, $J = 192.5$ Hz), 84.9 (d, $J = 4.2$ Hz), 83.9 (d, $J = 17.1$ Hz), 75.2 (d, $J = 24.8$ Hz), 62.4 (d, $J = 1.7$ Hz) ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₁H₁₄FN₄O₃ [M+H]⁺: 269.1044; found: 269.1043 (–0.67 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(4-amino-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl)-2-(chloromethyl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol (5.9)



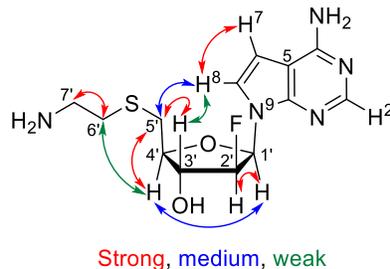
To **5.8** (194 mg, 0.723 mmol) in anhydrous MeCN (7.2 mL, 0.1 M) at 0 °C, anhydrous pyridine (175 μ L, 2.17 mmol) was added, followed by slow addition of thionyl chloride (0.30 mL, 4.1 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at 0 °C and at 25 °C for 16 hours, and then concentrated. The crude mixture was dissolved in 5:1 MeOH:H₂O (5.0 mL MeOH, 1.0 mL H₂O, 0.12 M). Stirring was maintained for 30 minutes followed by concentration. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient), followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.9** (86 mg, 41 %). $R_f = 0.3$ (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]^{25}_D +41$ (c 0.84, MeOH); **Formula:** C₁₁H₁₂ClFN₄O₂; **MW:** 286.69 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3457, 3344, 3204, 2947, 2861, 1638, 1594, 1561, 1476, 1275 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.12 (s, 1H), 7.35 – 7.27 (m, 1H), 6.70 – 6.61 (m, 2H), 5.04 (ddd, $J = 51.9, 3.6, 2.3$ Hz, 1H), 4.49 (ddd, $J = 16.9, 3.6, 2.3$ Hz, 1H), 4.14 (app td, $J = 5.8, 3.7$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 159.0, 152.5, 151.0, 124.7 (d, $J = 5.2$ Hz), 104.3, 100.9, 96.9 (d, $J = 191.6$ Hz), 84.3, 84.2 (d, $J = 12.8$ Hz), 76.5 (d, $J = 25.2$ Hz), 44.4 (d, $J = 3.3$ Hz) ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₁H₁₃ClFN₄O₂ [M+H]⁺: 287.0706; found: 287.0706 (+0.17 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(4-amino-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl)-2-(((2-aminoethyl)thio)methyl)-4-fluorotetrahydrofuran-3-ol (5.10)

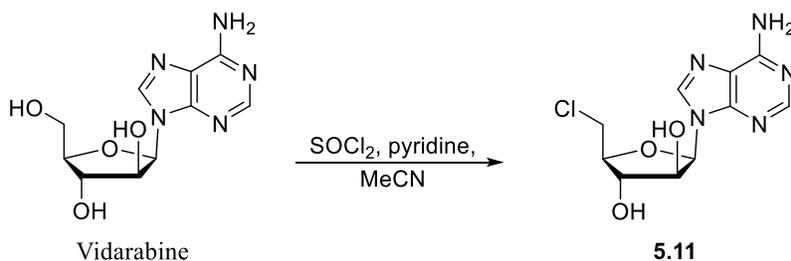


To a solution of cysteamine (39 mg, 0.50 mmol) in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.08 M) at 0 °C, NaH (22 mg, 0.55 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. When evolution of H₂ stopped (~20 minutes), **5.9** (72 mg, 0.25 mmol) was added as a solution in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.04 M). The reaction mixture was warmed to 25 °C, then stirred for 16 hours. The reaction mixture was quenched with H₂O (5.0 mL), neutralized to pH 7 with a 1 N HCl solution, then the solvents were evaporated. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH with 3 % conc. aq. NH₄OH, gradient) provided the free base **5.10** (29 mg, 36 %). **R_f** = 0.27 (CHCl₃/MeOH, 80:20 with 3 % conc. aq. NH₄OH); [α]²⁵_D +60 (*c* 1.2, MeOH); **Formula**: C₁₃H₁₈FN₅O₂S; **MW**: 327.38 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3339, 3188, 2931, 2866, 1634, 1592, 1563, 1511, 1475, 1273 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.09 (s, 1H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 6.64 – 6.55 (m, 2H), 5.01 (ddd, *J* = 52.2, 3.8, 2.6 Hz, 1H), 4.41 (ddd, *J* = 17.9, 4.2, 2.6 Hz, 1H), 4.08 – 4.01 (m, 1H), 2.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.80 – 2.70 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 159.0, 152.5, 151.1, 124.8 (d, *J* = 5.3 Hz), 104.2, 101.0, 97.2 (d, *J* = 191.8 Hz), 84.2 (d, *J* = 3.4 Hz), 83.8 (d, *J* = 16.7 Hz), 77.8 (d, *J* = 24.7 Hz), 41.3, 35.2, 34.6 (d, *J* = 2.5 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₃H₁₈FN₅NaO₂S [M+Na]⁺: 350.1057; found: 350.1057 (–0.17 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:

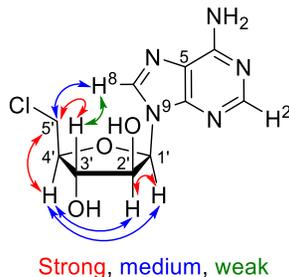


(2*R*,3*S*,4*S*,5*S*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-5-(chloromethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (5.11)

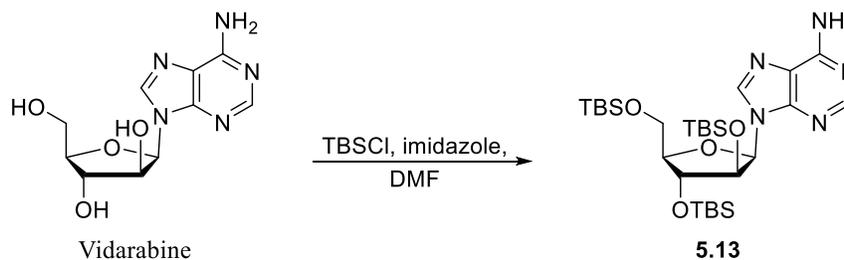


To vidarabine (258 mg, 0.965 mmol) in anhydrous MeCN (10.0 mL, 0.096 M) at 0 °C, anhydrous pyridine (156 μ L, 1.93 mmol) was added, followed by slow addition of thionyl chloride (0.21 mL, 2.9 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at 0 °C and at 25 °C for 16 hours, and then concentrated. The crude mixture was dissolved in 5:1 MeOH:H₂O (10 mL MeOH, 2.0 mL H₂O, 0.08 M) and conc. aq. NH₄OH (0.3 mL) was added. Stirring was maintained for 30 minutes at 25 °C followed by concentration. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient), followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.11** (61 mg, 22 %). R_f = 0.43 (DCM/MeOH, 8:2); **Formula**: C₁₀H₁₂ClN₅O₃; **MW**: 285.69 g/mol; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.47 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.34 (t, J = 3.3 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 4.3, 3.2 Hz, 1H), 4.13 (app td, J = 6.1, 3.3 Hz, 1H), 3.92 (app qd, J = 11.4, 6.2 Hz, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.2, 153.8, 150.5, 142.4, 119.6, 86.6, 85.5, 78.5, 77.0, 44.7 ppm; **HRMS** calcd for: C₁₀H₁₃ClN₅O₃ [M+H]⁺: 286.0701; found: 286.0698 (-1.11 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:

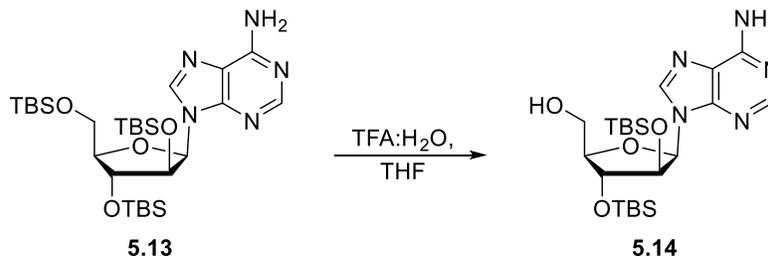


9-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-amine (5.13)



Purine **5.13** was previously described in literature and obtained by using reported conditions. ^1H and ^{13}C NMR data were consistent with data reported by the authors.⁷
Formula: $\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}_3$; **MW:** 610.03 g/mol; **HRMS** calcd for: $\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{NaO}_4\text{Si}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 632.3450; found: 632.3450 (−0.62 ppm).

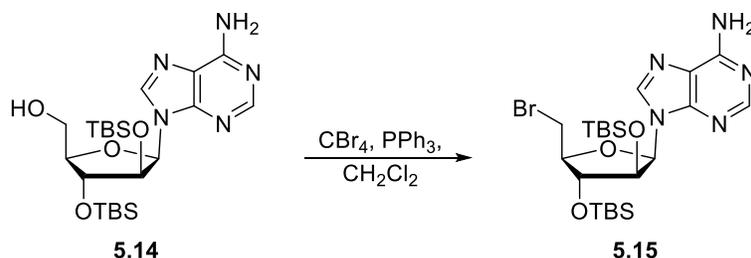
((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methanol (5.14)



Purine **5.14** was previously described in literature and obtained by using reported conditions. ^1H and ^{13}C NMR data were consistent with data reported by the authors.⁷

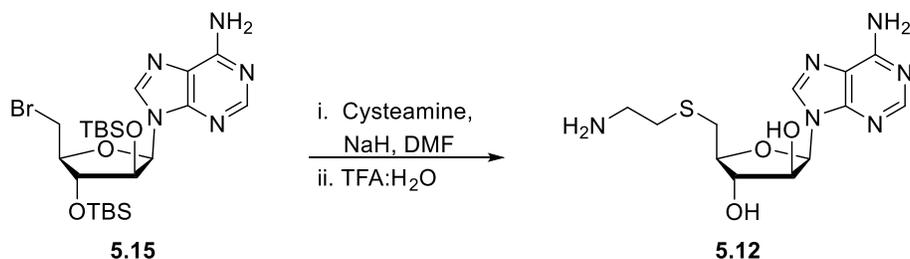
Formula: C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂; **MW:** 495.77 g/mol; **HRMS** calcd for: C₂₂H₄₁N₅NaO₄Si₂ [M+Na]⁺: 518.2589; found: 518.2585 (−0.84 ppm).

(−)-9-((2*R*,3*S*,4*R*,5*S*)-5-(bromomethyl)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-amine (5.15)



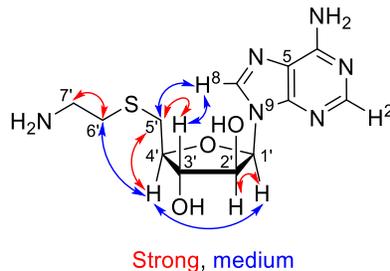
To a stirred suspension of **5.14** (178 mg, 359 μmol) in anhydrous DCM (7.2 mL, 0.05 M) at 25 °C, PPh₃ (113 mg, 431 μmol) was added. CBr₄ (167 mg, 503 μmol) was added and the reaction mixture became a clear solution after few minutes. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. The precipitate was filtered off by washing with DCM and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.15** (122 mg, 61 %). *R_f* = 0.48 (EtOAc 100%); [α]²⁵_D −18 (*c* 0.82, CDCl₃); **Formula:** C₂₂H₄₀BrN₅O₃Si₂; **MW:** 558.67 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3283, 3141, 2954, 2930, 2886, 2859, 1683, 1609, 1574, 1471, 1303, 1259 cm^{−1}; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.55 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 4.41 (s, 1H), 4.21 (dd, *J* = 9.6, 5.6 Hz, 1H), 4.16 (dd, *J* = 3.3, 1.2 Hz, 1H), 3.71 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 9.8, 5.6 Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.74 (s, 9H), 0.19 (s, 3H), 0.18 (s, 3H), −0.07 (s, 3H), −0.48 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 155.5, 153.1, 149.5, 140.6, 119.5, 87.3, 86.0, 79.4, 77.2, 31.0, 25.9, 25.7, 18.0, 17.8, −4.2, −4.3, −5.2, −5.6 ppm; **HRMS** calcd for: C₂₂H₄₀BrN₅NaO₃Si₂ [M+Na]⁺: 580.1745; found: 580.1738 (−1.25 ppm).

(+)-(2*R*,3*S*,4*S*,5*S*)-2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-5-(((2-aminoethyl)thio)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (5.12)

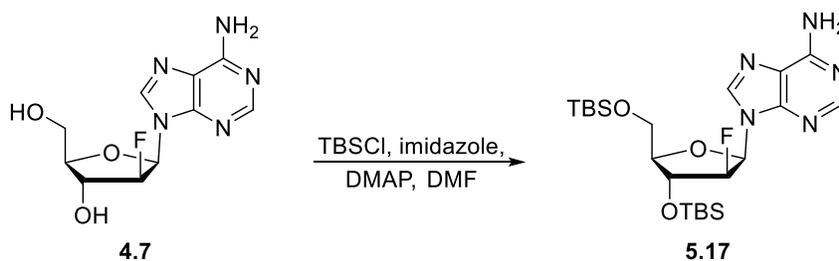


To a solution of cysteamine (25 mg, 0.33 mmol) in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.05 M) at 0 °C, NaH (15 mg, 0.37 mmol, 60 % wt in oil) was slowly added. When evolution of H₂ stopped (~20 minutes), **5.15** (122 mg, 0.218 mmol) was added as a solution in anhydrous DMF (6.0 mL, 0.04 M). The reaction mixture was warmed to 25 °C, then stirred at 25 °C for 16 hours. The reaction mixture was quenched with H₂O (5.0 mL), neutralized to pH 7 with a 1 N HCl solution, then the solvents were evaporated. The residue was diluted with H₂O (2.2 mL, 0.1 M) and TFA (8.7 mL, 0.025 M) was slowly added at 0 °C (H₂O/TFA, 1:4). After stirring at 0 °C for 30 minutes, the reaction mixture was warmed to 25 °C and stirred for 2.5 hours. The solvents were evaporated, and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH with 3 % conc. aq. NH₄OH, gradient) to provide the free base **5.12** (44 mg, 62 %). **R_f** = 0.16 (CHCl₃/MeOH, 70:30 with 3 % conc. aq. NH₄OH); **[α]²⁵_D** +34 (*c* 1.0, MeOH); **Formula:** C₁₂H₁₈N₆O₃S; **MW:** 326.38 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3324, 3137, 2917, 1640, 1598, 1474, 1417, 1331, 1299, 1246 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.28 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 6.40 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.31 – 4.26 (m, 2H), 4.05 (app td, *J* = 6.2, 4.3 Hz, 1H), 3.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.09 – 3.01 (m, 2H), 2.91 – 2.81 (m, 2H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.2, 153.8, 150.6, 142.5, 119.6, 86.0, 85.0, 79.8, 77.3, 40.1, 34.7, 31.3 ppm; **HRMS** calcd for: C₁₂H₁₉N₆O₃S [M+H]⁺: 327.1234; found: 327.1231 (–0.91 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:

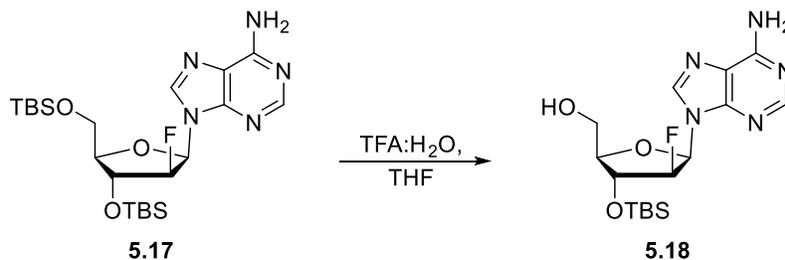


9-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-3-fluorotetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-amine (5.17)



Purine **5.17** was previously described in literature and obtained by using reported conditions. ^1H and ^{13}C NMR data were consistent with data reported by the authors.⁸
Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{FN}_5\text{O}_3\text{Si}_2$; **MW:** 497.76 g/mol; **HRMS** calcd for: $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{FN}_5\text{O}_3\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 498.2726; found: 498.2729 (+0.52 ppm).

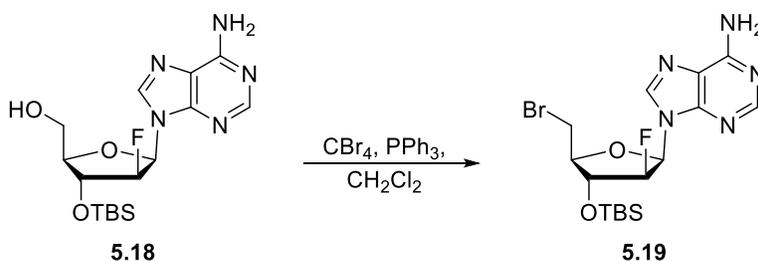
(+)-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-fluorotetrahydrofuran-2-yl)methanol (5.18)



To a solution of **5.17** (803 mg, 1.61 mmol) in THF (21.5 mL, 0.075 M), 35 % aqueous TFA (4.0 mL) was slowly added. The reaction mixture was stirred for 3.5 hours at 25 °C, then

quenched with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with EtOAc (3x). The combined organic extracts were dried over anhydrous MgSO₄, filtered, condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.18** (331 mg, 54 %). $R_f = 0.45$ (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]^{25}_D +21$ (*c* 1.5, DMSO-*d*₆); **Formula**: C₁₆H₂₆FN₅O₃Si; **MW**: 383.50 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3239, 3121, 2929, 2857, 2455, 2285, 1637, 1569, 1421, 1301, 1240, 1078 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.49 (dd, *J* = 15.1, 4.3 Hz, 1H), 5.28 – 5.09 (m, 1H), 4.73 (ddd, *J* = 18.1, 4.8, 3.3 Hz, 1H), 4.01 (app q, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.89 (ddd, *J* = 12.1, 4.2, 1.4 Hz, 1H), 3.81 (dd, *J* = 12.2, 4.6 Hz, 1H), 0.98 (s, 9H), 0.20 (app d, *J* = 2.8 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.4, 154.0, 150.4, 141.6 (d, *J* = 4.6 Hz), 119.7, 97.1 (d, *J* = 193.8 Hz), 85.8 (d, *J* = 4.9 Hz), 84.2 (d, *J* = 17.3 Hz), 75.8 (d, *J* = 24.8 Hz), 61.6 (d, *J* = 2.4 Hz), 26.1, 18.8, -4.7, -4.8 ppm (*J* values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₆H₂₆FN₅NaO₃Si [M+Na]⁺: 406.1681; found: 406.1681 (-0.01 ppm).

(+)-9-((2R,3S,4R,5S)-5-(bromomethyl)-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-3-fluorotetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-amine (5.19)

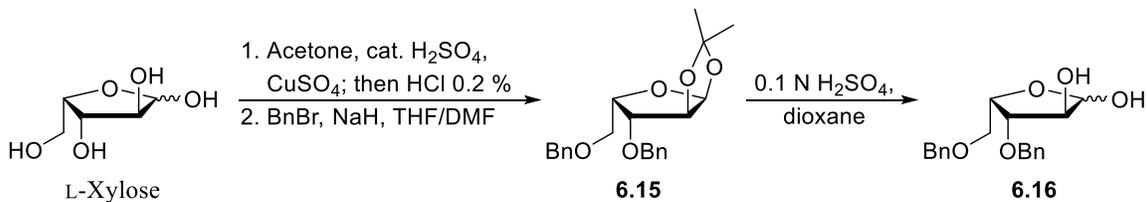


To a stirred suspension of **5.18** (103 mg, 269 μ mol) in anhydrous DCM (5.4 mL, 0.05 M) at 25 °C, PPh₃ (84 mg, 322 μ mol) was added. CBr₄ (125 mg, 376 μ mol) was added and the reaction mixture became a clear solution after few minutes. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. The precipitate was filtered off by washing with DCM and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient), followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **5.19** (28 mg, 23 %). $R_f = 0.24$ (EtOAc 100%); $[\alpha]^{25}_D +5.5$ (*c* 0.95, CDCl₃);

Formula: C₁₆H₂₅BrFN₅O₂Si; **MW:** 446.40 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3303, 3153, 2954, 2929, 2891, 2858, 1677, 1606, 1576, 1473, 1300, 1114 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (s, 1H), 8.06 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 21.5, 3.0 Hz, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.98 (ddd, J = 51.5, 3.0, 1.6 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 15.0, 1.5 Hz, 1H), 4.20 (app td, J = 7.3, 2.5 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 4.1, 3.1 Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.21 (s, 3H), 0.19 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 155.5, 153.4, 150.0, 140.1 (d, J = 6.7 Hz), 119.3, 95.0 (d, J = 193.4 Hz), 84.4 (d, J = 2.2 Hz), 83.7 (d, J = 16.5 Hz), 77.2 (d, J = 26.7 Hz), 30.6 (d, J = 3.9 Hz), 25.8, 18.1, -4.5, -4.6 ppm (J values result from ¹³C-F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₁₆H₂₆BrFN₅O₂Si [M+H]⁺: 446.1018; found: 446.1013 (-1.08 ppm).

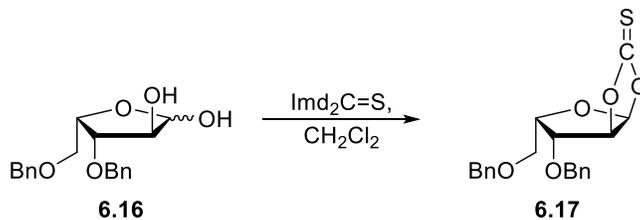
Section expérimentale du chapitre 6

(+)-(3*aS*,5*S*,6*R*,6*aS*)-6-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[2,3-*d*][1,3]dioxole (6.15) & (-)-(3*S*,4*S*,5*S*)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)tetrahydrofuran-2,3-diol (6.16)



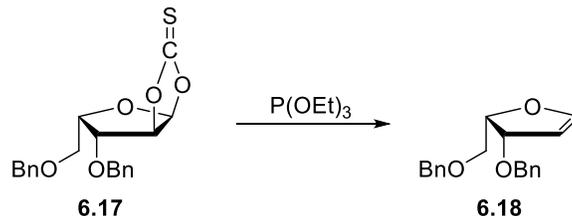
Furanosides **6.15** and **6.16** were previously described in literature.⁹ **6.15** and **6.16** were also described by our research group and obtained by using reported conditions.¹⁰

(-)-(3*aS*,5*S*,6*R*,6*aS*)-6-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)tetrahydrofuro[2,3-*d*][1,3]dioxole-2-thione (6.17)



Thionocarbonate **6.17** was previously described by our research group and obtained by using reported conditions.¹⁰ Synthetic procedures and characterization for the enantiomer were also described in literature.¹¹

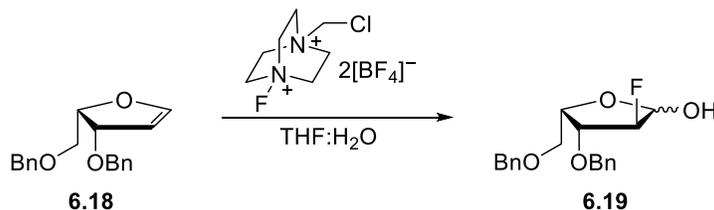
(+)-(2*S*,3*S*)-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-2,3-dihydrofuran (6.18)



Glycal **6.18** was previously described by our research group but obtained by using different conditions.¹⁰ Synthetic procedures and characterization for the enantiomer were also described in literature.¹²

A solution of **6.17** (11.8 g, 31.7 mmol) in triethyl phosphite (160 mL, 0.20 M) was stirred at reflux for 16 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residual oil was co-evaporated with toluene (3x). Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.18** (7.97 g, 85 %). Glycal **6.18** should be used directly after purification for the next step to avoid decomposition. $R_f = 0.45$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); **Formula:** C₁₉H₂₀O₃; **MW:** 296.37 g/mol; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.26 (m, 10H), 6.65 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 5.27 (app t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.70 – 4.45 (m, 6H), 3.99 (dd, $J = 10.7, 4.6$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 10.6, 7.7$ Hz, 1H) ppm.

(-)-(3*S*,4*R*,5*S*)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-3-fluorotetrahydrofuran-2-ol (6.19)

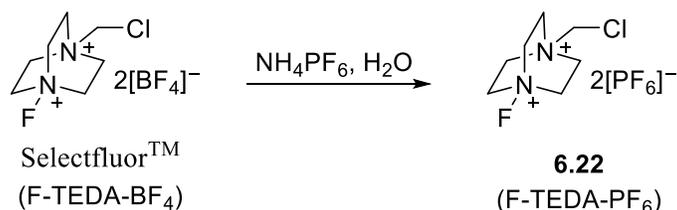


Lactol **6.19** was previously described by our research group but obtained by using different conditions.^{10,13}

To a solution of **6.18** (1.21 g, 4.09 mmol) in 5:1 THF:H₂O (22.7 mL, 0.18 M), SelectfluorTM (2.17 g, 6.13 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours and condensed under reduced pressure. The mixture was suspended in EtOAc, the

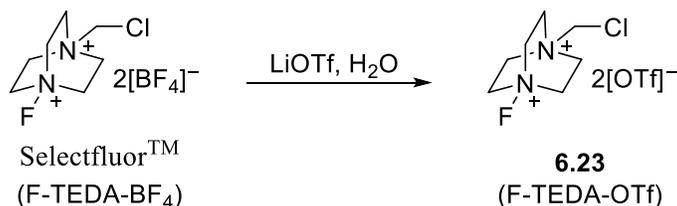
suspension was filtered off by washing with EtOAc and the filtrate was condensed under reduced pressure. The residual oil was purified by flash chromatography (Hexanes/EtOAc, 70:30) to provide **6.19** (516 mg, 38 %). $R_f = 0.27$ (Hexanes/EtOAc, 7:3); **Formula:** $C_{19}H_{21}FO_4$; **MW:** 332.37 g/mol; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.41 – 7.25 (m, 20H), 5.55 – 5.46 (m, 1H), 5.32 (dd, $J = 13.7, 11.4$ Hz, 1H), 4.98 (dd, $J = 52.1, 2.9$ Hz, 1H), 4.93 (dt, $J = 52.2, 3.5$ Hz, 1H), 4.73 – 4.48 (m, 8H), 4.42 (dd, $J = 10.0, 4.5$ Hz, 1H), 4.34 – 4.22 (m, 3H), 4.00 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.80 – 3.65 (m, 4H) ppm (*OH signal missing possibly due to exchange with deuterated solvent*).

1-(Chloromethyl)-4-fluoro-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane bis(hexafluorophosphate) (6.22)



F-TEDA-PF₆ (**6.22**) was previously described in literature and obtained by using reported conditions. 1H , ^{13}C and ^{19}F NMR data were consistent with data reported by the authors.¹⁴ **Formula:** $C_7H_{14}ClF_{13}N_2P_2$; **MW:** 470.58 g/mol; **HRMS** calcd for: $C_7H_{14}ClF_7N_2P [M-PF_6]^+$: 325.0466; found: 325.0456 (+3.08 ppm).

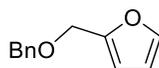
1-(Chloromethyl)-4-fluoro-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane bis(trifluoromethanesulfonate) (6.23)



F-TEDA-OTf (**6.23**) was previously described in literature and obtained by using reported conditions. 1H , ^{13}C and ^{19}F NMR data were consistent with data reported by the

authors.¹⁵ **Formula:** C₉H₁₄ClF₇N₂O₆S₂; **MW:** 478.78 g/mol; **HRMS** calcd for: C₈H₁₄ClF₄N₂O₃S [M-OTf]⁺: 329.0344; found: 329.0335 (+2.74 ppm).

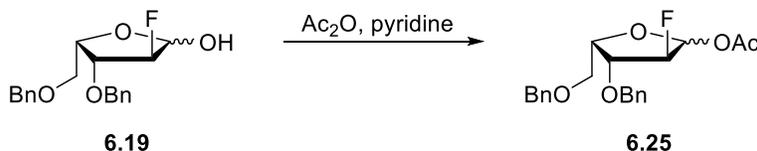
2-((Benzyloxy)methyl)furan (6.24)



6.24

R_f = 0.67 (Hexanes/EtOAc, 7:3); **Formula:** C₁₂H₁₂O₂; **MW:** 188.23 g/mol; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.42 (m, 1H), 7.41 – 7.29 (m, 5H), 6.36 (dd, *J* = 3.0, 1.9 Hz, 1H), 6.34 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.56 (s, 2H), 4.50 (s, 2H) ppm; **HRMS** calcd for: C₁₂H₁₂NaO₂ [M+Na]⁺: 211.0730; found: 211.0728 (–0.77 ppm).

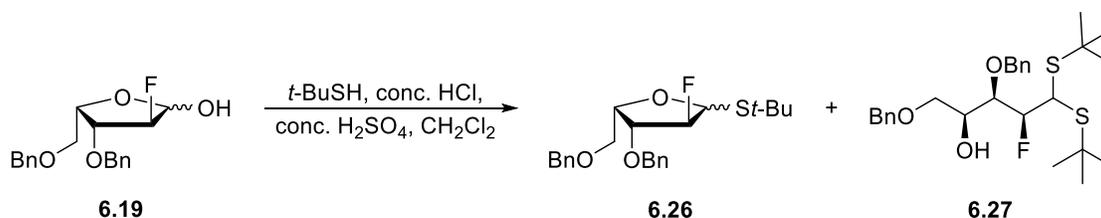
(3*S*,4*R*,5*R*)-4-(benzyloxy)-5-((benzyloxy)methyl)-3-fluorotetrahydrofuran-2-yl acetate (6.25)



To a stirred solution of **6.19** (524 mg, 1.58 mmol) in anhydrous pyridine (6.4 mL, 0.25 M), acetic anhydride (447 μL, 4.73 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours, then concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.25** (374 mg, 63 %). **R_f** = 0.46 (Hexanes/EtOAc, 7:3); **Formula:** C₂₁H₂₃FO₅; **MW:** 374.41 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3031, 2929, 2869, 1750, 1497, 1454, 1372, 1227, 1101, 1012 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.39 – 7.26 (m, 20H), 6.37 (dd, *J* = 4.3, 2.9 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 5.20 (dt, *J* = 52.5, 4.5 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 50.2 Hz, 1H), 4.75 – 4.49 (m, 10H), 4.42 – 4.34 (m, 1H), 4.23 (ddd, *J* = 15.3, 5.6, 1.4 Hz, 1H), 3.81 (dd, *J* = 10.2, 5.4 Hz, 1H), 3.74 – 3.70 (m, 2H), 3.65 (dd, *J* = 10.6, 5.3 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 169.81, 169.76, 138.2, 138.1, 137.36, 137.35, 128.7, 128.53, 128.51, 128.3, 128.2, 128.15, 128.1, 128.0, 127.9, 127.82, 127.78, 127.7, 99.3 (d, *J* = 37.2 Hz), 97.0 (d, *J* = 183.9 Hz), 93.8 (d, *J* =

198.5 Hz), 93.75 (d, $J = 17.3$ Hz), 82.2, 80.1 (d, $J = 25.9$ Hz), 79.8 (d, $J = 22.7$ Hz), 78.5 (d, $J = 7.0$ Hz), 73.7, 73.6, 72.8, 72.6, 68.6, 68.3, 21.2, 21.1 ppm (J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{FNaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 397.1422; found: 397.1422 (+0.02 ppm).

(2*S*,3*R*,4*S*)-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-5-(*tert*-butylthio)-4-fluorotetrahydrofuran (6.26) & (+)-(2*S*,3*R*,4*S*)-1,3-bis(benzyloxy)-5,5-bis(*tert*-butylthio)-4-fluoropentan-2-ol (6.27)

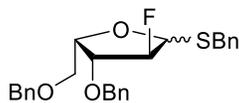


To a stirred solution of **6.19** (81 mg, 0.24 mmol) in anhydrous DCM (0.24 mL, 1.0 M) at 25 °C, 2-methyl-2-propanethiol (220 μL , 1.95 mmol) was added, followed by slow addition of concentrated HCl (200 μL , 2.44 mmol). Then concentrated H_2SO_4 (27 μL , 0.49 mmol) was slowly added and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. The mixture was slowly neutralized with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The aqueous phase was extracted with DCM (3x), then the combined organic extracts were dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.26** (38 mg, 38 %) and **6.27** (13 mg, 11 %).

Thioglycoside 6.26: $R_f = 0.48$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); **Formula:** $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{FO}_3\text{S}$; **MW:** 404.54 g/mol; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.47 – 7.21 (m, 20H), 5.57 (dd, $J = 28.7, 3.7$ Hz, 1H), 5.32 (dd, $J = 25.6, 2.2$ Hz, 1H), 5.12 – 4.94 (m, 2H), 4.73 – 4.50 (m, 9H), 4.35 (app q, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 10.3, 3.9$ Hz, 1H), 4.12 (dd, $J = 12.4, 4.7$ Hz, 1H), 3.86 – 3.75 (m, 3H), 3.71 (dd, $J = 9.9, 5.6$ Hz, 1H), 1.44 – 1.40 (m, 18H) ppm; **HRMS** calcd for: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{FNaO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 427.1714; found: 427.1698 (–3.69 ppm).

Dithioacetal 6.27: $R_f = 0.31$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); $[\alpha]^{25}_D +52$ (c 1.1, $CDCl_3$); **Formula:** $C_{27}H_{39}FO_3S_2$; **MW:** 494.72 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3446, 3030, 2960, 2863, 1497, 1455, 1393, 1365, 1211, 1093 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 – 7.25 (m, 10H), 5.04 (ddd, $J = 47.2, 7.3, 2.5$ Hz, 1H), 4.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.58 – 4.44 (m, 3H), 4.29 (dd, $J = 25.0, 2.5$ Hz, 1H), 4.10 (ddd, $J = 13.6, 7.3, 2.1$ Hz, 1H), 4.05 (app t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.62 – 3.54 (m, 1H), 3.48 (dd, $J = 9.5, 5.7$ Hz, 1H), 1.42 (s, 18H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 138.2, 138.0, 128.57, 128.55, 128.5, 128.0, 127.93, 127.91, 98.3 (d, $J = 180.0$ Hz), 78.5 (d, $J = 18.2$ Hz), 75.1 (d, $J = 4.0$ Hz), 73.5, 71.2 (d, $J = 2.2$ Hz), 69.6 (d, $J = 8.4$ Hz), 46.6 (d, $J = 22.1$ Hz), 46.0, 45.2, 31.73, 31.69 ppm (*J values result from $^{13}C-F$ coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $C_{27}H_{39}FNaO_3S_2$ $[M+Na]^+$: 517.2217; found: 517.2195 (–4.28 ppm).

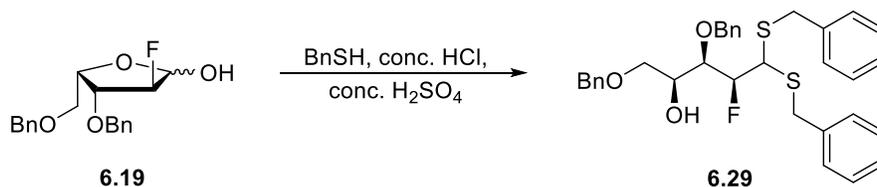
(2S,3R,4S)-3-(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-5-(benzylthio)-4-fluorotetrahydrofuran (6.28)



6.28

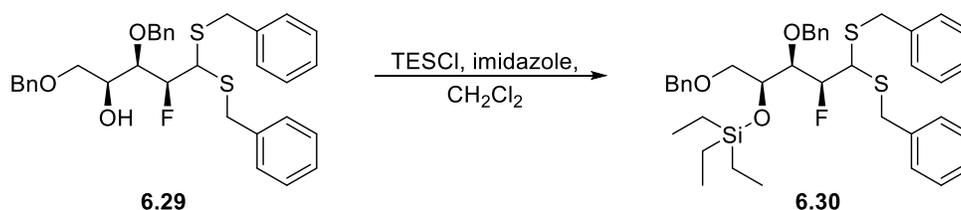
$R_f = 0.38$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); **Formula:** $C_{26}H_{27}FO_3S$; **MW:** 438.56 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3029, 2919, 2866, 1507, 1457, 1351, 1060, 1026 cm^{-1} ; **1H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 – 7.22 (m, 30H), 5.38 (dd, $J = 23.5, 4.3$ Hz, 1H), 5.15 – 4.87 (m, 3H), 4.70 – 4.48 (m, 9H), 4.39 (dd, $J = 10.7, 5.5$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 12.0, 4.1$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 12.7, 5.0$ Hz, 1H), 3.96 – 3.70 (m, 8H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ 138.3, 138.2, 137.9, 137.7, 137.4, 137.3, 129.22, 129.18, 128.67, 128.65, 128.62, 128.60, 128.51, 128.49, 128.14, 128.10, 127.89, 127.87, 127.84, 127.78, 127.75, 127.3, 127.2, 98.7 (d, $J = 189.4$ Hz), 95.7 (d, $J = 190.1$ Hz), 85.9 (d, $J = 27.6$ Hz), 84.9 (d, $J = 18.1$ Hz), 81.6 (d, $J = 25.2$ Hz), 81.2, 81.0 (d, $J = 24.7$ Hz), 78.4 (d, $J = 2.1$ Hz), 73.63, 73.60, 72.7, 72.5, 68.6, 67.7, 35.5, 34.8 (d, $J = 2.7$ Hz) ppm (*J values result from $^{13}C-F$ coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $C_{26}H_{27}FNaO_3S$ $[M+Na]^+$: 461.1557; found: 461.1538 (–4.07 ppm).

(+)-(2*S*,3*R*,4*S*)-1,3-bis(benzyloxy)-5,5-bis(benzylthio)-4-fluoropentan-2-ol (6.29)



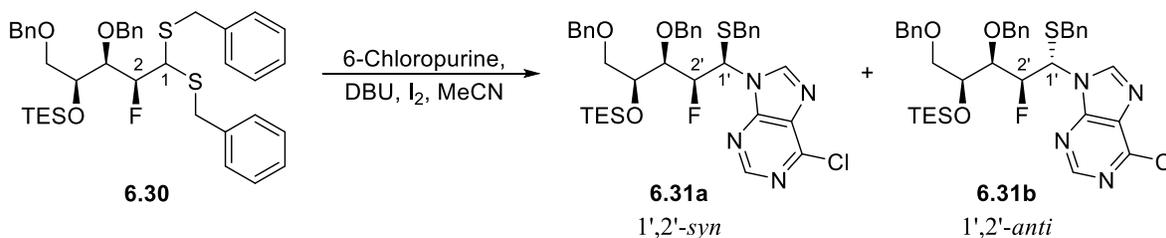
To a stirred solution of **6.19** (805 mg, 2.42 mmol) in benzyl mercaptan (2.27 mL, 19.4 mmol) at 0 °C, concentrated HCl (2.00 mL, 24.2 mmol) was added. Then concentrated H₂SO₄ (269 μL, 4.84 mmol) was slowly added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. The mixture was diluted with DCM and slowly neutralized with a saturated aqueous solution of NaHCO₃. The aqueous phase was extracted with DCM (3x), then the combined organic extracts were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude mixture showed complete conversion of starting material and no traces of thioglycoside **6.28**. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.29** (738 mg, 54 %). **R_f** = 0.20 (Hexanes/EtOAc, 8:2); **[α]²⁵_D** +54 (*c* 1.2, CDCl₃); **Formula**: C₃₃H₃₅FO₃S₂; **MW**: 562.76 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3553, 3456, 3086, 3062, 3029, 2919, 2865, 1602, 1495, 1454, 1096 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.49 – 7.11 (m, 20H), 4.93 (dt, *J* = 47.0, 5.2 Hz, 1H), 4.60 – 4.46 (m, 4H), 3.99 – 3.81 (m, 6H), 3.60 – 3.54 (m, 1H), 3.46 (ddd, *J* = 9.4, 6.5, 1.2 Hz, 1H), 3.41 (dd, *J* = 9.7, 5.0 Hz, 1H), 2.25 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 138.0, 137.9, 137.85, 137.8, 129.3, 129.2, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9, 127.8, 127.3, 127.2, 96.3 (d, *J* = 181.4 Hz), 78.3 (d, *J* = 18.0 Hz), 74.8 (d, *J* = 2.8 Hz), 73.3, 71.0 (d, *J* = 2.9 Hz), 69.7 (d, *J* = 6.4 Hz), 49.3 (d, *J* = 21.5 Hz), 35.7 (d, *J* = 3.2 Hz), 35.3 ppm (*J* values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₃₃H₃₅FNaO₃S₂ [M+Na]⁺: 585.1904; found: 585.1886 (–3.12 ppm).

(-)-(((2*S*,3*R*,4*S*)-1,3-bis(benzyloxy)-5,5-bis(benzylthio)-4-fluoropentan-2-yl)oxy)triethylsilane (6.30)



To a stirred solution of **6.29** (873 mg, 1.55 mmol) in anhydrous DCM (10.3 mL, 0.15 M) at 25 °C, imidazole (264 mg, 3.88 mmol) was added, followed by addition of chlorotriethylsilane (365 μ L, 2.17 mmol). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. A saturated solution of NH₄Cl was added and the aqueous phase was extracted with Et₂O (3x). The combined organic extracts were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.30** (926 mg, 88 %). R_f = 0.41 (Hexanes/EtOAc, 9:1); $[\alpha]^{25}_D$ -113 (c 1.04, CDCl₃); **Formula**: C₃₉H₄₉FO₃S₂Si; **MW**: 677.02 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3029, 2952, 2875, 1602, 1495, 1454, 1415, 1366, 1239, 1103 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.13 (m, 18H), 7.07 – 7.01 (m, 2H), 4.85 (ddd, J = 46.1, 8.7, 2.2 Hz, 1H), 4.52 – 4.45 (m, 2H), 4.40 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.04 – 3.97 (m, 2H), 3.94 – 3.80 (m, 4H), 3.73 – 3.68 (m, 2H), 3.50 (ddd, J = 10.3, 6.7, 3.5 Hz, 1H), 0.92 (t, J = 7.9 Hz, 9H), 0.65 – 0.47 (m, 6H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 138.5, 138.3, 138.1, 137.7, 129.5, 129.1, 128.7, 128.6, 128.34, 128.28, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.2, 127.1, 94.2 (d, J = 183.7 Hz), 78.4 (d, J = 17.3 Hz), 73.8, 73.3, 72.2 (d, J = 5.9 Hz), 71.7 (d, J = 1.7 Hz), 49.5 (d, J = 22.8 Hz), 36.4 (d, J = 4.8 Hz), 34.6, 7.0, 5.0 ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₃₉H₄₉FNaO₃S₂Si [M+Na]⁺: 699.2769; found: 699.2773 (+0.64 ppm).

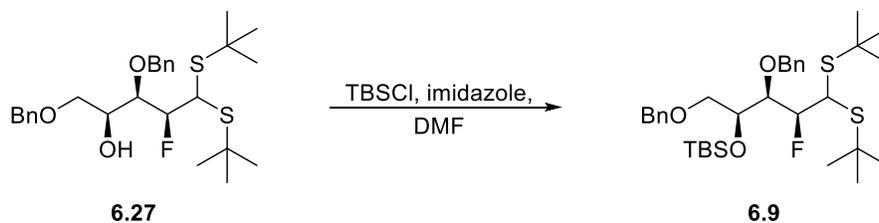
(+)-9-((1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)-3,5-bis(benzyloxy)-1-(benzylthio)-2-fluoro-4-((triethylsilyl)oxy)pentyl)-6-chloro-9*H*-purine (6.31a)



To a stirred solution of **6.30** (344 mg, 508 μmol) in anhydrous acetonitrile (1.0 mL, 0.5 M) at 25 $^\circ\text{C}$, DBU (152 μL , 1.02 mmol) was added, followed by addition of 6-chloropurine (118 mg, 762 μmol). The mixture was stirred at 25 $^\circ\text{C}$ for 10 minutes before the addition of I_2 (516 mg, 2.03 mmol). The reaction mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 16 hours. A saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was added and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3x). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. ^1H NMR spectroscopic analysis of the crude mixture showed the 1',2'-*syn* product **6.31a** in a mixture of undetermined compounds. The minor 1',2'-*anti* diastereomer **6.31b** has not been identified. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.31a** (88 mg, 25 %).

Thioaminal 1',2'-*syn* 6.31a: $R_f = 0.23$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); $[\alpha]_D^{25} +18$ (c 0.62, CDCl_3); **Formula:** $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{ClFN}_4\text{O}_3\text{SSi}$; **MW:** 707.38 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3030, 2954, 2912, 2875, 1587, 1561, 1454, 1398, 1335, 1100 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 5H), 7.23 – 7.14 (m, 5H), 7.07 – 6.97 (m, 5H), 6.25 (dd, $J = 26.1, 3.2$ Hz, 1H), 5.22 (ddd, $J = 48.6, 6.7, 3.2$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J = 25.8, 11.6$ Hz, 2H), 4.37 (app q, $J = 11.8$ Hz, 2H), 3.99 – 3.95 (m, 1H), 3.80 (ddd, $J = 16.1, 6.7, 4.3$ Hz, 1H), 3.70 (app q, $J = 13.8$ Hz, 2H), 3.63 (ddd, $J = 10.0, 5.0, 1.4$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, 1H), 0.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 9H), 0.57 (q, $J = 8.0$ Hz, 6H) ppm; **^{13}C NMR** (125 MHz, CDCl_3) δ 151.7, 151.2, 150.8, 144.9 (d, $J = 4.8$ Hz), 137.8, 135.8, 130.9, 128.6, 128.41, 128.39, 128.3, 128.24, 128.15, 127.7, 127.6, 127.4, 95.1 (d, $J = 181.1$ Hz), 78.6 (d, $J = 16.3$ Hz), 74.4 (d, $J = 2.5$ Hz), 73.6, 71.4 (d, $J = 6.2$ Hz), 70.8, 60.0 (d, $J = 21.6$ Hz), 36.2, 7.0, 5.0 ppm (J values result from ^{13}C - F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{ClFN}_4\text{NaO}_3\text{SSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 729.2468; found: 729.2481 (+1.80 ppm).

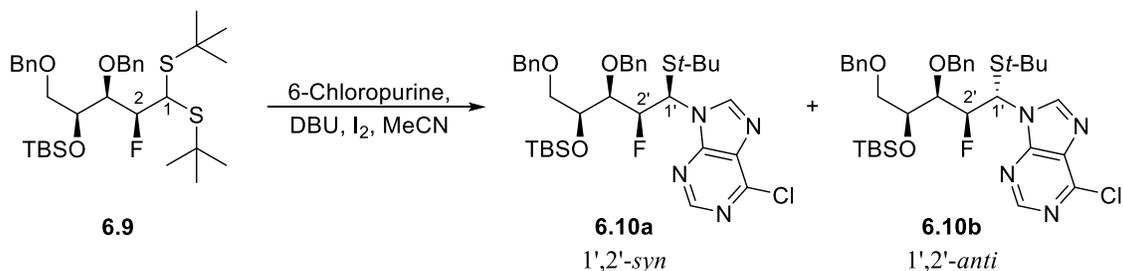
(-)-(((2*S*,3*R*,4*S*)-1,3-bis(benzyloxy)-5,5-bis(*tert*-butylthio)-4-fluoropentan-2-yl)oxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (**6.9**)



Dithioacetal **6.9** was previously described by our research group but obtained by using different conditions.^{10,13}

To a stirred solution of **6.27** (98 mg, 0.20 mmol) in anhydrous DMF (1.3 mL, 0.15 M) at 25 °C, imidazole (34 mg, 0.50 mmol) was added, followed by addition of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (45 mg, 0.30 mmol). The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours. A saturated solution of NH₄Cl was added and the aqueous phase was extracted with Et₂O (3x). The combined organic extracts were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.9** (88 mg, 73 %). $R_f = 0.5$ (Hexanes/EtOAc, 9:1); **Formula:** C₃₃H₅₃FO₃S₂Si; **MW:** 608.99 g/mol; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 138.8, 138.5, 128.4, 128.3, 127.8, 127.7, 127.6, 127.4, 91.9 (d, $J = 187.2$ Hz), 78.2 (d, $J = 17.2$ Hz), 73.5, 73.3, 72.6 (d, $J = 7.1$ Hz), 71.8, 47.2 (d, $J = 24.5$ Hz), 46.0, 45.4, 32.0 (d, $J = 2.7$ Hz), 31.8, 26.1, 18.3, -4.3, -4.4 ppm (J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible).

(+)-9-((1*R*,2*S*,3*R*,4*S*)-3,5-bis(benzyloxy)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-(*tert*-butylthio)-2-fluoropentyl)-6-chloro-9*H*-purine (6.10a)



Thioaminal 1',2'-*syn* **6.10a** was previously described by our research group but obtained by using different conditions.^{10,13} $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +40.6$ (*c* 0.34, CDCl₃) was previously reported by our research group for **6.10a**.

To a stirred solution of **6.9** (91 mg, 0.15 mmol) in anhydrous acetonitrile (0.30 mL, 0.5 M) at 25 °C, DBU (45 μL, 0.30 mmol) was added, followed by addition of 6-chloropurine (35 mg, 0.22 mmol), then cooled to 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 10 minutes before the addition of I₂ (152 mg, 0.598 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 hour and warmed to 25 °C. After stirring at 25 °C for 16 hours, a saturated aqueous solution of Na₂S₂O₃ was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude mixture showed the 1',2'-*syn* product **6.10a** in a mixture of undetermined compounds. The minor 1',2'-*anti* diastereomer **6.10b** has not been identified. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **6.10a** (36 mg, 36 %).

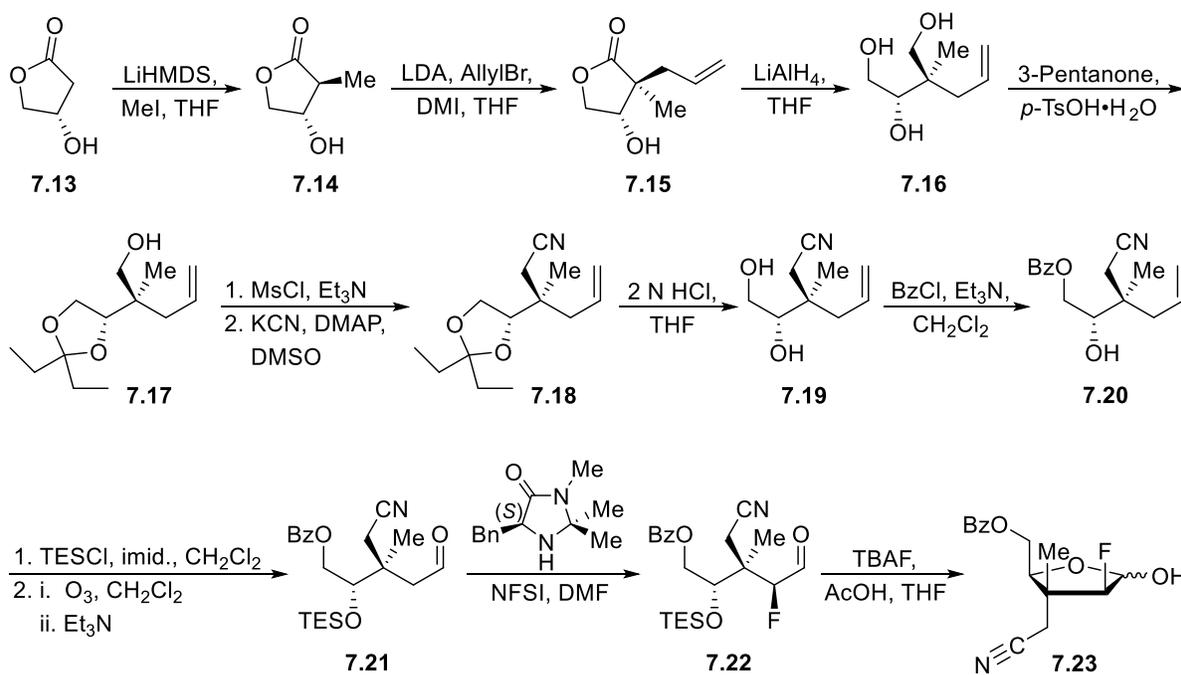
Thioaminal 1',2'-*syn* 6.10a: $R_f = 0.34$ (Hexanes/EtOAc, 8:2); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +39$ (*c* 1.1, CDCl₃);

Formula: C₃₄H₄₆ClFN₄O₃SSi; **MW:** 673.36 g/mol; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.70 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.39 – 7.25 (m, 10H), 6.09 (dd, *J* = 16.2, 5.8 Hz, 1H), 5.18 (ddd, *J* = 46.0, 5.7, 3.7 Hz, 1H), 4.60 (dd, *J* = 41.5, 11.4 Hz, 2H), 4.44 (dd, *J* = 31.7, 12.0 Hz, 2H), 4.17 (app dt, *J* = 6.8, 4.0 Hz, 1H), 3.68 (dd, *J* = 10.0, 3.6 Hz, 1H), 3.57 (app dt, *J* = 23.0, 3.8 Hz, 1H), 3.50 (ddd, *J* = 10.1, 6.7, 3.5 Hz, 1H), 1.21 (s, 9H), 0.79 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.02 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 152.1, 151.3, 151.1, 145.3 (d, *J* = 2.3 Hz), 138.2, 137.7,

131.5, 128.6, 128.4, 128.1, 128.0, 127.62, 127.59, 91.8 (d, $J = 186.3$ Hz), 78.0 (d, $J = 16.7$ Hz), 73.7, 73.3, 71.5 (d, $J = 5.4$ Hz), 70.9 (d, $J = 2.7$ Hz), 57.6 (d, $J = 25.5$ Hz), 45.4, 31.0, 25.9, 18.1, -4.0 , -4.8 ppm (J values result from $^{13}\text{C}-\text{F}$ coupling and were assigned when possible).

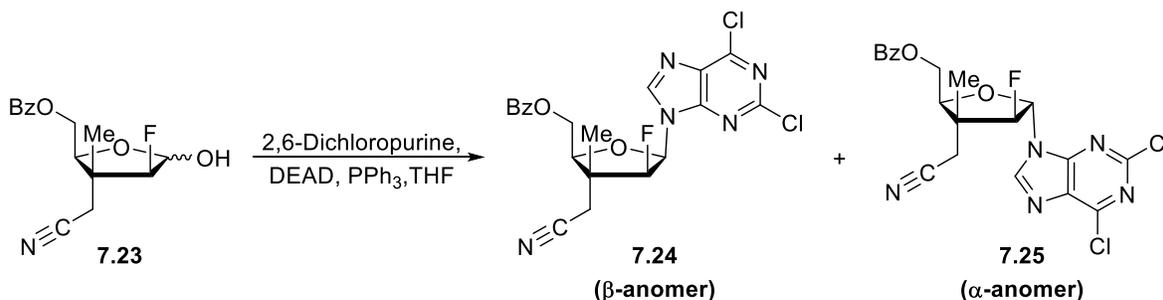
Section expérimentale du chapitre 7

((2*S*,3*R*,4*S*)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-5-hydroxy-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.23)



The complete synthesis of lactol **7.23** from **7.13** was previously reported by our research group.¹⁰ Compounds **7.14**–**7.23** were also characterized and described by our research group.¹⁰

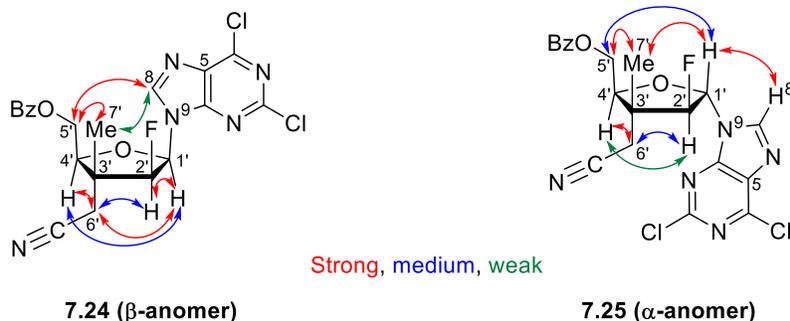
((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-(cyanomethyl)-5-(2,6-dichloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.24, β -anomer) & ((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-3-(cyanomethyl)-5-(2,6-dichloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.25, α -anomer)



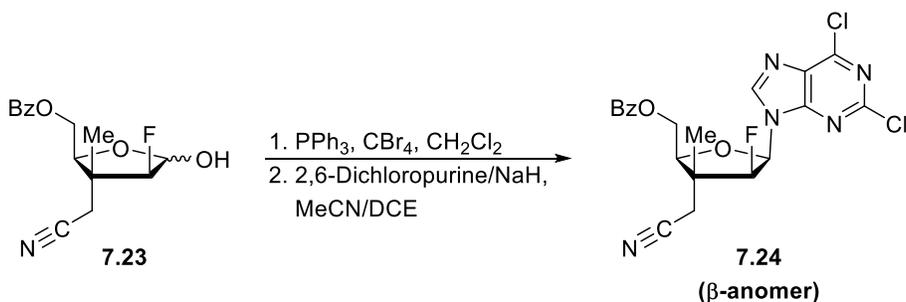
To a stirred solution of 2,6-dichloropurine (157 mg, 0.833 mmol), PPh₃ (219 mg, 0.833 mmol) and diethyl azodicarboxylate (0.13 mL, 0.83 mmol) in anhydrous THF (3.2 mL) at 0 °C, a solution of **7.23** (188 mg, 0.641 mmol) in THF (3.2 mL, 0.2 M) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 16 hours, then condensed under reduced pressure. ¹H NMR spectrum of the crude showed a ~4:1 ratio of β : α anomers. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Hexanes/Et₂O, gradient) to provide a mixture of anomers **7.24** (β -anomer) and **7.25** (α -anomer) in a ~4:1 (β : α) ratio (118 mg, 40 %). β and α anomers were identified by NOESY experiments which are detailed below. **R_f** = 0.56 (Hexanes/EtOAc, 1:1); **Formula**: C₂₀H₁₆Cl₂FN₅O₃; **MW**: 464.28 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3131, 3061, 2959, 2926, 2249, 1717, 1592, 1557, 1356, 1267 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, J = 2.7 Hz, 1H $_{\beta}$), 8.24 (s, 1H $_{\alpha}$), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 2H $_{\beta}$), 7.97 (d, J = 7.9 Hz, 2H $_{\alpha}$), 7.60 – 7.53 (m, 2H $_{\alpha,\beta}$), 7.46 – 7.39 (m, 4H $_{\alpha,\beta}$), 6.58 (dd, J = 20.5, 3.3 Hz, 1H $_{\beta}$), 6.19 (dd, J = 17.1, 4.5 Hz, 1H $_{\alpha}$), 5.92 (dd, J = 53.7, 4.6 Hz, 1H $_{\alpha}$), 5.08 (dd, J = 52.0, 3.4 Hz, 1H $_{\beta}$), 4.87 (app t, J = 5.6 Hz, 1H $_{\alpha}$), 4.67 (dd, J = 12.1, 8.0 Hz, 1H $_{\beta}$), 4.58 – 4.52 (m, 3H $_{\alpha,\beta}$), 4.44 (dd, J = 7.9, 4.1 Hz, 1H $_{\beta}$), 2.95 (dd, J = 46.7, 17.0 Hz, 2H $_{\alpha}$), 2.77 (app q, J = 17.0 Hz, 2H $_{\beta}$), 1.53 (d, J = 3.0 Hz, 3H $_{\beta}$), 1.43 (d, J = 3.8 Hz, 3H $_{\alpha}$) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 166.1, 166.0, 153.3, 153.2, 152.7, 152.4, 152.3, 152.0, 145.5, 144.8 (d, J = 5.3 Hz), 133.7, 133.6, 131.9, 130.7, 129.71, 129.69, 129.1, 129.0, 128.7, 128.6, 116.1, 115.7 (d, J = 0.6 Hz), 97.5 (d, J = 199.3 Hz), 94.7 (d, J = 199.0 Hz), 88.4 (d, J = 35.1 Hz), 84.2 (d, J = 16.9 Hz), 83.4 (d, J = 3.4 Hz), 83.0, 63.5 (d, J = 3.1 Hz), 62.5 (d, J = 1.1 Hz), 47.2 (d, J = 19.6 Hz), 46.2 (d, J = 18.7 Hz), 27.4 (d, J = 7.5 Hz),

25.4, 14.7 (d, $J = 10.5$ Hz), 13.3 (d, $J = 11.4$ Hz) ppm (J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible); HRMS calcd for: $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 486.0506; found: 486.0502 (-0.89 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments:



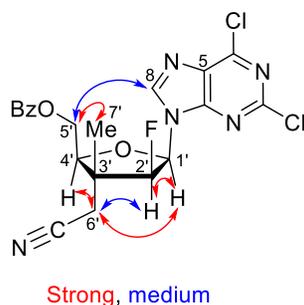
(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-(cyanomethyl)-5-(2,6-dichloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.24, β -anomer)



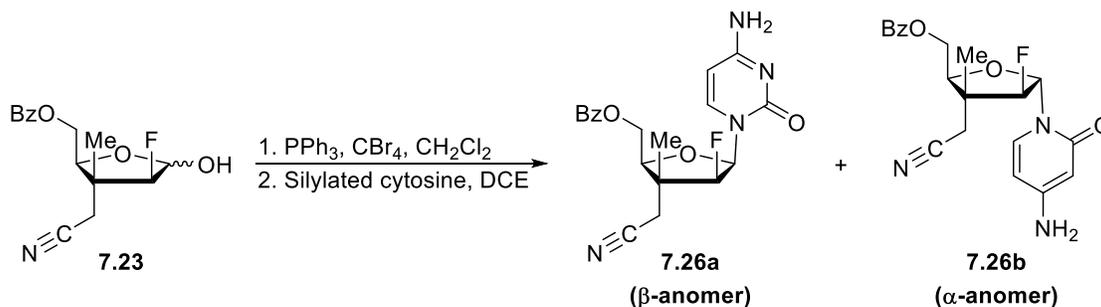
To a stirred solution of **7.23** (0.781 g, 2.66 mmol) in anhydrous DCM (13 mL, 0.2 M) at 0 °C, PPh_3 (0.977 g, 3.72 mmol) was added. CBr_4 (1.32 g, 3.99 mmol) was added and the reaction mixture was cooled to -20 °C. After stirring for 16 hours, the reaction mixture was poured onto a pad of silica gel (200 mg of silica gel / 94 mg of PPh_3) in a sintered glass Büchner funnel and eluted with 30 % EtOAc in Hexanes. The filtrate was condensed under reduced pressure and the crude residue was used for the next step without further purification. ^1H NMR spectroscopic analysis of the crude residue indicated a >20:1 diastereomeric ratio for the bromination. To a suspension of 2,6-dichloropurine (0.654 g, 3.46 mmol) in anhydrous

acetonitrile (19 mL) at 25 °C, NaH (0.149 g, 3.72 mmol, 60 % wt in oil) was added. After stirring for 20 minutes, a solution of the crude bromo-sugar dissolved in anhydrous DCE (13 mL) was slowly added to the reaction mixture at 25 °C. After 1 hour, the reaction mixture was filtered over Celite® and the filtrate was condensed under reduced pressure. The residue was treated with a saturated aqueous solution of NH₄Cl, and the mixture was extracted with EtOAc (3x). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and condensed under reduced pressure. ¹H NMR spectrum of the crude showed **7.24** (β-anomer) as the major product in a ~12:1 ratio of β:α anomers. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) to provide the pure β-anomer **7.24** (0.664 g, 54% yield) as a white foam. β-anomer was identified by NOESY experiments which are detailed below (α-anomer was not isolated). **β-Anomer 7.24**: *R_f* = 0.56 (Hexanes/EtOAc, 1:1); [α]²⁵_D +84 (*c* 1.0, CDCl₃); **Formula**: C₂₀H₁₆Cl₂FN₅O₃; **MW**: 464.28 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 3129, 2963, 2254, 1712, 1599, 1551, 1352, 1272 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.58 (dd, *J* = 20.4, 3.3 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 52.0, 3.3 Hz, 1H), 4.67 (dd, *J* = 12.0, 8.0 Hz, 1H), 4.56 (dd, *J* = 12.1, 4.1 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 7.9, 4.1 Hz, 1H), 2.76 (app q, *J* = 17.0 Hz, 2H), 1.54 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H) ppm; **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 166.1, 153.4, 152.5, 152.2, 144.8 (d, *J* = 5.1 Hz), 133.8, 130.8, 129.8, 129.1, 128.8, 115.6, 94.7 (d, *J* = 199.2 Hz), 84.2 (d, *J* = 16.9 Hz), 83.1, 63.6 (d, *J* = 2.8 Hz), 47.3 (d, *J* = 19.6 Hz), 27.5 (d, *J* = 7.3 Hz), 14.8 (d, *J* = 10.3 Hz) ppm (*J* values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₂₀H₁₆Cl₂FN₅NaO₃ [M+Na]⁺: 486.0506; found: 486.0511 (+0.95 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments for β-anomer 7.24:



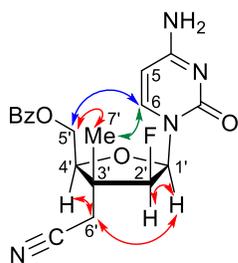
((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.26a, β -anomer) & ((2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.26b, α -anomer)



To a stirred solution of **7.23** (0.586 g, 2.00 mmol) in anhydrous DCM (20 mL, 0.1 M) at 0 °C, PPh₃ (0.734 g, 2.80 mmol) was added. CBr₄ (0.994 g, 3.00 mmol) was added and the reaction mixture was cooled to -20 °C. After stirring for 16 hours, the reaction mixture was poured onto a pad of silica gel (200 mg of silica gel / 94 mg of PPh₃) in a sintered glass Büchner funnel and eluted with 30 % EtOAc in Hexanes. The filtrate was condensed under reduced pressure and the crude residue was used for the next step without further purification. ¹H NMR spectroscopic analysis of the crude residue indicated a >20:1 diastereomeric ratio for the bromination. To a DCE solution of bis-silylated cytosine nucleobase (33 mL, 12 mmol, 0.36 M solution, following general procedure for silylated nucleobases²) at 25 °C, the crude bromo-sugar as a DCE solution (20 mL) was added. The reaction mixture was refluxed at 95 °C for 16 hours, then cooled to room temperature. MeOH was added and the mixture was filtered over Celite[®] and the filtrate was condensed under reduced pressure. ¹H NMR spectrum of the crude showed a ~5:1 ratio of β : α anomers. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) to provide a mixture of **7.26a** (β -anomer) and **7.26b** (α -anomer) in a ~4:1 (β : α) ratio (359 mg, 46 %). β and α anomers were identified by NOESY experiments which are detailed below. **R_f** = 0.28 (DCM/MeOH, 9:1); **Formula:** C₁₉H₁₉FN₄O₄; **MW:** 386.38 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3349, 3198, 2963, 2248, 1718, 1645, 1489, 1273, 1109, 1068 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H $_{\beta}$), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H $_{\alpha}$), 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H $_{\beta}$), 7.67 – 7.60 (m, 3H $_{\alpha,\beta}$), 7.53 – 7.47 (m, 4H $_{\alpha,\beta}$), 6.29 (dd, *J* = 20.1, 2.9 Hz, 1H $_{\beta}$), 5.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H $_{\alpha}$), 5.87 – 5.80 (m, 2H $_{\alpha,\beta}$), 5.61

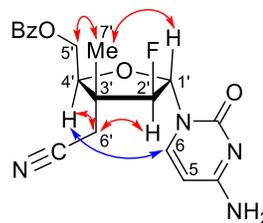
(dd, $J = 55.0, 4.4$ Hz, $1H_{\alpha}$), 5.10 (dd, $J = 52.3, 3.0$ Hz, $1H_{\beta}$), 4.81 (dd, $J = 7.1, 3.5$ Hz, $1H_{\alpha}$), 4.62 – 4.54 (m, $3H_{\alpha,\beta}$), 4.49 (dd, $J = 12.0, 7.4$ Hz, $1H_{\alpha}$), 4.42 (app t, $J = 5.6$ Hz, $1H_{\beta}$), 3.02 – 2.87 (m, $4H_{\alpha,\beta}$), 1.42 (d, $J = 2.6$ Hz, $3H_{\beta}$), 1.36 (d, $J = 3.6$ Hz, $3H_{\alpha}$) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 168.0, 167.8, 167.6, 167.5, 158.0, 157.7, 145.1, 142.5 (d, $J = 2.6$ Hz), 134.6, 134.5, 130.9, 130.8, 130.65, 130.63, 129.7, 129.6, 118.19, 118.16, 99.2 (d, $J = 194.0$ Hz), 96.5, 96.3 (d, $J = 195.4$ Hz), 95.5, 94.6 (d, $J = 35.2$ Hz), 87.7 (d, $J = 16.8$ Hz), 84.8 (d, $J = 3.8$ Hz), 84.0, 65.1 (d, $J = 3.2$ Hz), 64.6 (d, $J = 1.4$ Hz), 47.6 (d, $J = 19.5$ Hz), 46.7 (d, $J = 18.6$ Hz), 27.2 (d, $J = 7.7$ Hz), 25.5, 14.6 (d, $J = 10.9$ Hz), 13.5 (d, $J = 12.0$ Hz) ppm (J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible); HRMS calcd for: $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{FN}_4\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 409.1283; found: 409.1284 (+0.27 ppm).

Interactions observed by NOESY experiments for 7.26ab:



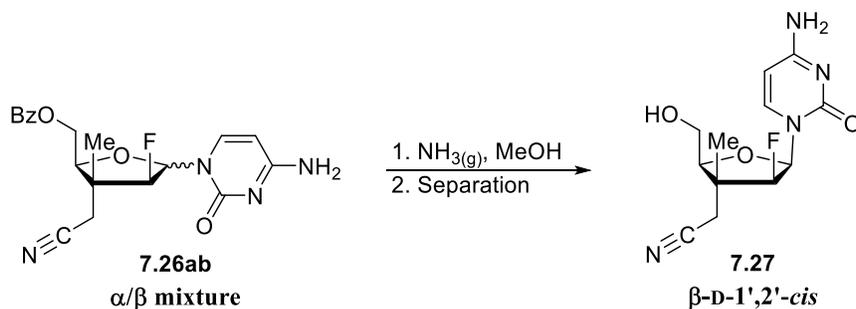
7.26a (β -anomer)

Strong, medium, weak



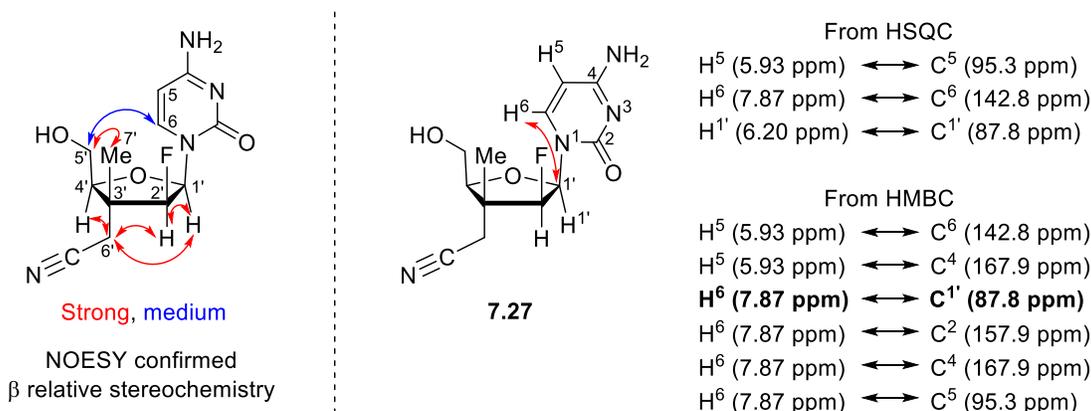
7.26b (α -anomer)

(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(4-amino-2-oxypyrimidin-1(2*H*)-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.27)

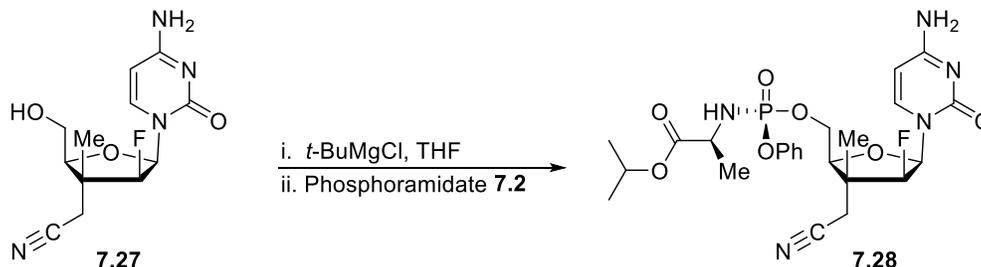


To a solution of **7.63ab** (~4:1 β : α mixture, 208 mg, 538 μ mol) in MeOH (50 mL, 11 mM) in a high-pressure flask at 25 °C was saturated with NH₃ gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 16 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. ¹H NMR spectrum of the crude showed a ~4:1 ratio of β : α anomers. The residue was purified by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) to provide the pure β -anomer **7.27** (32 mg, 21 %). Only the β anomer was isolated, characterized and identified by NOESY experiments which are detailed below. Proof of N1 regiochemistry of the cytosine ring was determined from HSQC and HMBC experiments in CD₃OD. **β -anomer 7.27**: $[\alpha]^{25}_D +143$ (c 0.92, MeOH); **Formula**: C₁₂H₁₅FN₄O₃; **MW**: 282.28 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3353, 3206, 2941, 2250, 1647, 1526, 1490, 1409, 1291, 1061 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 7.87 (dd, $J = 7.5, 0.9$ Hz, 1H), 6.20 (dd, $J = 19.2, 3.5$ Hz, 1H), 5.93 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 52.5, 3.5$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 8.0, 4.6$ Hz, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 2H), 2.92 – 2.81 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 3.5$ Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 167.9, 157.9, 142.8 (d, $J = 2.3$ Hz), 118.3, 96.5 (d, $J = 196.2$ Hz), 95.3, 87.8 (d, $J = 17.0$ Hz), 86.7, 62.6 (d, $J = 3.3$ Hz), 47.3 (d, $J = 19.4$ Hz), 27.2 (d, $J = 7.5$ Hz), 14.2 (d, $J = 11.4$ Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₂H₁₅FN₄NaO₃ [M+Na]⁺: 305.1020; found: 305.1026 (+1.89 ppm).

NOESY, HSQC and HMBC experiments for 7.27:

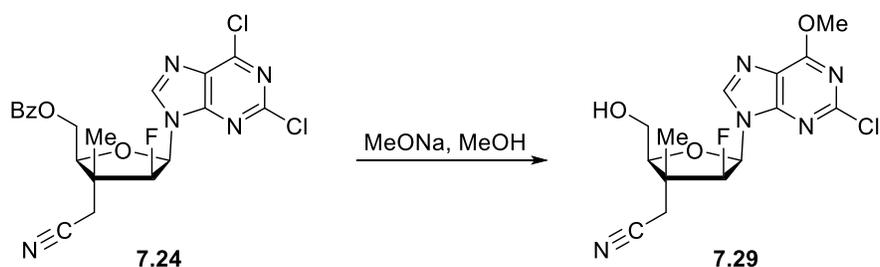


(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.28)



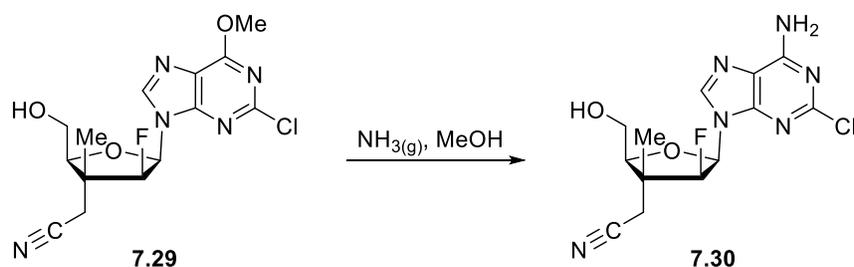
To a solution of **β -anomer 7.27** (74 mg, 0.26 mmol) in anhydrous THF (2.6 mL, 0.1 M) and DMF (1.0 mL) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.39 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (131 mg, 288 μ mol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.28** (70 mg, 49 %). **R_f** = 0.24 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +66 (*c* 1.0, MeOH); **Formula**: C₂₄H₃₁FN₅O₇P; **MW**: 551.51 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3349, 3204, 2984, 2249, 1731, 1649, 1491, 1210, 1149, 1105 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 7.78 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.42 – 7.21 (m, 5H), 6.24 (dd, *J* = 20.0, 3.3 Hz, 1H), 5.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.11 – 4.94 (m, 2H), 4.32 – 4.23 (m, 3H), 3.94 (app dq, *J* = 9.8, 7.1 Hz, 1H), 2.92 – 2.82 (m, 2H), 1.37 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.29 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.24 (dd, *J* = 6.2, 1.6 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.4 Hz), 167.9, 157.8, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 142.7 (d, *J* = 2.4 Hz), 130.9, 126.3 (d, *J* = 1.8 Hz), 121.5 (d, *J* = 4.8 Hz), 118.0, 96.2 (d, *J* = 195.6 Hz), 95.6, 87.8 (d, *J* = 16.8 Hz), 84.4 (d, *J* = 8.1 Hz), 70.2, 67.3 (app dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz), 51.7 (d, *J* = 1.6 Hz), 47.5 (d, *J* = 19.5 Hz), 27.0 (d, *J* = 7.5 Hz), 22.0, 21.9, 20.5 (d, *J* = 6.6 Hz), 14.3 (d, *J* = 11.0 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₄H₃₂FN₅O₇P [M+H]⁺: 552.2018; found: 552.2012 (–1.13 ppm).

(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2-chloro-6-methoxy-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.29)



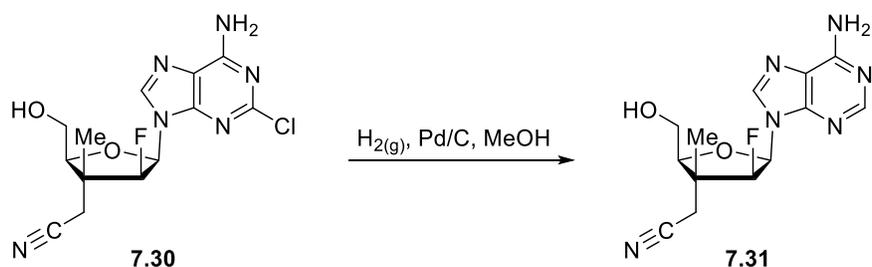
To a stirred solution of **β -anomer 7.24** (501 mg, 1.08 mmol) in MeOH (22 mL, 0.05 M) at 25 °C, sodium methoxide (0.25 mL, 1.1 mmol, 4.4 M solution in MeOH) was added. The reaction mixture was stirred for 1 hour and 45 minutes before the addition of formic acid to neutral pH. After evaporation of volatiles, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) to provide **7.29** (317 mg, 83 %) as a white foam. **R_f** = 0.65 (DCM/MeOH, 9:1); **[α]²⁵_D** +66 (*c* 0.94, MeOH); **Formula**: C₁₄H₁₅ClFN₅O₃; **MW**: 355.75 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3355, 2955, 2244, 1597, 1473, 1388, 1320, 1231, 1164, 1056 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.46 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 19.5, 3.7 Hz, 1H), 5.12 (dd, *J* = 52.8, 3.7 Hz, 1H), 4.21 (s, 3H), 4.11 (dd, *J* = 6.5, 5.2 Hz, 1H), 3.86–3.80 (m, 2H), 2.94 (app q, *J* = 17.3 Hz, 2H), 1.40 (d, *J* = 3.5 Hz, 3H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 162.6, 154.6, 153.8, 143.9 (app dd, *J* = 3.9, 2.9 Hz), 120.9, 118.2, 96.6 (d, *J* = 197.6 Hz), 86.8, 85.7 (d, *J* = 16.7 Hz), 62.6, 55.7, 47.5 (d, *J* = 19.2 Hz), 27.3 (d, *J* = 7.1 Hz), 14.3 (d, *J* = 11.9 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₄H₁₅ClFN₅NaO₃ [**M+Na**]⁺: 378.0740; found: 378.0747 (+1.87 ppm).

(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.30)



A solution of **7.29** (180 mg, 506 μmol) in MeOH (50 mL, 0.01 M) in a high-pressure flask at 25 °C was saturated with NH_3 gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 16 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, gradient) provided **7.30** (138 mg, 80%) as a white powder. $R_f = 0.41$ (DCM/MeOH , 9:1); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +45$ (c 0.63, $\text{DMSO}-d_6$); **Formula**: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClFN}_6\text{O}_2$; **MW**: 340.74 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3339, 2963, 2244, 1623, 1473, 1419, 1360, 1317, 1258, 1043 cm^{-1} ; **^1H NMR** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.23 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 19.8, 3.6$ Hz, 1H), 5.05 (dd, $J = 52.8, 3.6$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.90 (app q, $J = 17.1$ Hz, 2H), 1.37 (d, $J = 3.3$ Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **^{13}C NMR** (125 MHz, CD_3OD) δ 158.1, 155.5, 151.4, 141.5 (d, $J = 4.5$ Hz), 118.7, 118.2, 96.6 (d, $J = 197.2$ Hz), 86.6, 85.5 (d, $J = 16.8$ Hz), 62.7 (d, $J = 3.0$ Hz), 47.5 (d, $J = 19.3$ Hz), 27.3 (d, $J = 7.2$ Hz), 14.3 (d, $J = 11.3$ Hz) ppm (*J values result from $^{13}\text{C}-\text{F}$ coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClFN}_6\text{NaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 363.0743; found: 363.0746 (+0.83 ppm).

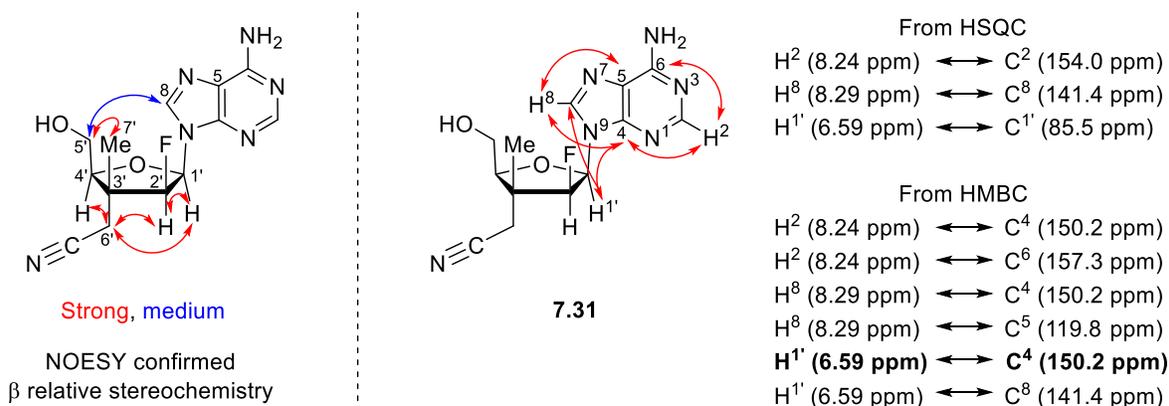
(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.31)



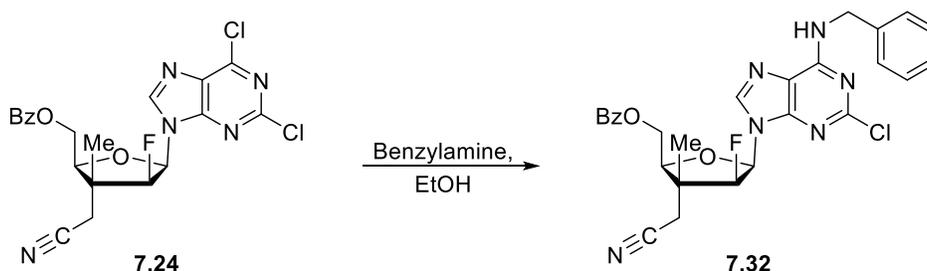
To a solution of **7.30** (57 mg, 0.17 mmol) in MeOH (12 mL, 0.014 M), Pd on activated carbon (57 mg, wt/wt, Pd 10 wt. %) was added. Inert gas atmosphere was purged by 3 cycles of vacuum–H₂ gas before stirring the reaction mixture at 25 °C. After 16 hours, the mixture was filtered on a pad of Celite[®], washed thoroughly with MeOH and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) provided **7.31** (20 mg, 39 %). *R_f* = 0.23 (DCM/MeOH, 9:1); [α]²⁵_D +48 (*c* 0.64, DMSO-*d*₆); **Formula**: C₁₃H₁₅FN₆O₂; **MW**: 306.30 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3334, 3189, 2952, 2249, 1648, 1603, 1477, 1422, 1338, 1300, 1252, 1055 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.59 (dd, *J* = 19.8, 3.6 Hz, 1H), 5.08 (dd, *J* = 52.8, 3.6 Hz, 1H), 4.09 (app t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.93 (app q, *J* = 17.1 Hz, 2H), 1.40 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.19 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.35 (s, 2H), 6.55 (dd, *J* = 20.0, 4.0 Hz, 1H), 5.15 – 4.98 (m, 2H), 3.90 (dd, *J* = 6.9, 4.8 Hz, 1H), 3.70 – 3.59 (m, 2H), 3.07 – 2.97 (m, 2H), 1.25 (d, *J* = 3.8 Hz, 3H) ppm (*labile protons were observed*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 157.3, 154.0, 150.2, 141.4 (d, *J* = 4.6 Hz), 119.8, 118.2, 96.7 (d, *J* = 197.5 Hz), 86.6, 85.5 (d, *J* = 16.8 Hz), 62.7 (d, *J* = 2.8 Hz), 47.5 (d, *J* = 19.3 Hz), 27.3 (d, *J* = 7.1 Hz), 14.3 (d, *J* = 11.4 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.0, 152.8, 149.0, 139.3 (d, *J* = 4.8 Hz), 118.22, 118.19, 95.2 (d, *J* = 196.6 Hz), 84.3, 82.8 (d, *J* = 16.5 Hz), 60.7 (d, *J* = 2.2 Hz), 45.5 (d, *J* = 19.1 Hz), 25.8 (d, *J* = 6.7 Hz), 13.7 (d, *J* = 12.1 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₃H₁₅FN₆NaO₂ [M+Na]⁺: 329.1133; found: 329.1129 (–1.24 ppm).

Proof of N9 regiochemistry of the purine ring was determined from HSQC and HMBC experiments in CD₃OD for compound **7.31**.

NOESY, HSQC and HMBC experiments for **7.31**:



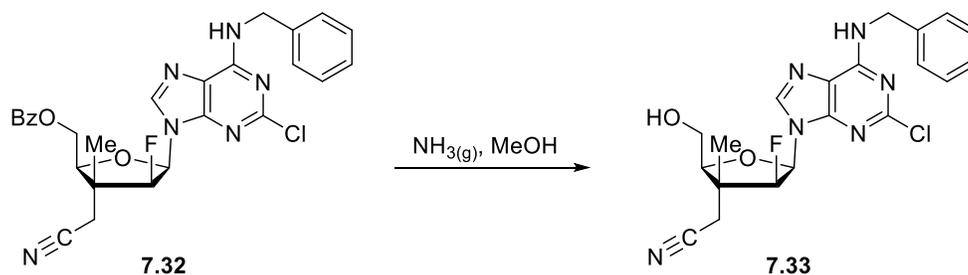
(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (**7.32**)



To a solution of **β-anomer 7.24** (128 mg, 275 μmol) in EtOH (2.8 mL, 0.1 M) in a high-pressure flask at 25 °C, benzylamine (150 μL, 1.4 mmol) was added and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 70 °C for 16 hours, cooled to 25 °C and condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **7.32** (131 mg, 89 %). *R_f* = 0.52 (Hexanes/EtOAc, 3:7); [α]²⁵_D +60 (*c* 1.2, CDCl₃); [α]²⁵_D +75 (*c* 1.2, MeOH); **Formula**: C₂₇H₂₄ClFN₆O₃; **MW**: 534.98 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3278, 3141, 3064, 2958, 2250, 1720, 1621, 1453, 1353, 1272, cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.07 – 8.00 (m, 3H), 7.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.40 – 7.26

(m, 5H), 6.50 (dd, $J = 21.1, 3.2$ Hz, 1H), 4.99 (dd, $J = 52.0, 3.1$ Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.63 (dd, $J = 11.8, 7.9$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 12.0, 4.4$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $J = 7.5, 4.5$ Hz, 1H), 2.71 (dd, $J = 37.6, 16.9$ Hz, 2H), 1.53 (d, $J = 2.8$ Hz, 3H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 8.21 (s, 1H), 8.10 – 8.02 (m, 2H), 7.63 – 7.56 (m, 1H), 7.46 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.58 (dd, $J = 20.8, 3.3$ Hz, 1H), 5.11 (dd, $J = 52.3, 3.3$ Hz, 1H), 4.80 – 4.65 (m, 3H), 4.57 (dd, $J = 12.1, 4.0$ Hz, 1H), 4.43 (dd, $J = 7.5, 4.0$ Hz, 1H), 2.98 (app q, $J = 17.1$ Hz, 2H), 1.48 (d, $J = 3.1$ Hz, 3H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 155.4, 154.7, 149.5, 139.0, 137.5, 133.7, 129.9, 129.2, 128.9, 128.8, 128.2, 128.0, 117.2, 115.7, 94.7 (d, $J = 198.8$ Hz), 83.8 (d, $J = 17.0$ Hz), 82.8, 63.8 (d, $J = 3.7$ Hz), 47.2 (d, $J = 19.7$ Hz), 45.0, 27.6 (d, $J = 7.5$ Hz), 14.8 (d, $J = 10.3$ Hz) ppm (*J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible*); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 167.6, 156.2, 156.0, 150.6, 140.8, 139.7, 134.5, 130.9, 130.6, 129.7, 129.6, 128.8, 128.4, 118.5, 118.0, 96.4 (d, $J = 196.1$ Hz), 85.5 (d, $J = 15.9$ Hz), 84.0, 65.2 (d, $J = 3.1$ Hz), 47.9 (d, $J = 19.4$ Hz), 45.2, 27.2 (d, $J = 7.6$ Hz), 14.6 (d, $J = 10.6$ Hz) ppm (*J values result from ^{13}C -F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClFN}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 535.1655; found: 535.1653 (–0.34 ppm).

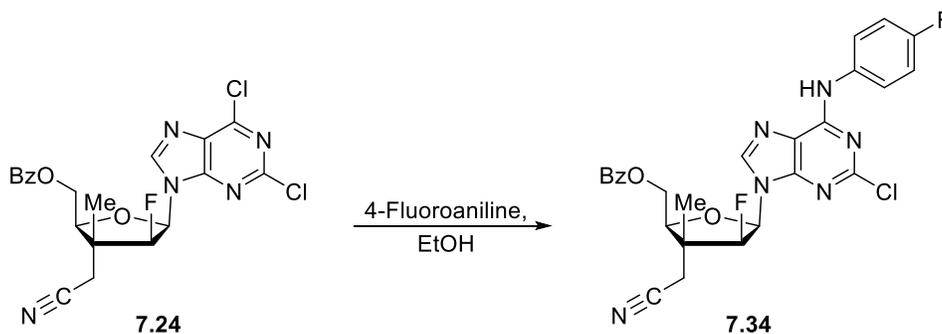
(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.33)



A solution of **7.32** (147 mg, 275 μmol) in MeOH (50 mL, 5.5 mM) in a high-pressure flask at 25 $^\circ\text{C}$ was saturated with NH_3 gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 $^\circ\text{C}$ for 24 hours, then cooled to room temperature and concentrated under reduced

pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.33** (90 mg, 76 %) as a white powder. $R_f = 0.45$ (EtOAc 100%); $[\alpha]^{25}_D +49$ (*c* 0.88, MeOH); **Formula:** C₂₀H₂₀ClFN₆O₂; **MW:** 430.87 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3355, 3134, 3027, 2931, 2246, 1609, 1473, 1359, 1321, 1245 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.20 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.52 (dd, *J* = 19.8, 3.6 Hz, 1H), 5.07 (dd, *J* = 52.8, 3.6 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.08 (dd, *J* = 6.4, 5.3 Hz, 1H), 3.83 (dd, *J* = 4.7, 2.9 Hz, 2H), 2.91 (app q, *J* = 17.1 Hz, 2H), 1.39 (d, *J* = 3.4 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.4, 155.8, 150.7, 141.1, 139.9, 129.6, 128.8, 128.3, 119.1, 118.2, 96.6 (d, *J* = 197.4 Hz), 86.6, 85.4 (d, *J* = 16.6 Hz), 62.7 (d, *J* = 2.9 Hz), 47.5 (d, *J* = 19.2 Hz), 45.2, 27.3 (d, *J* = 8.2 Hz), 14.3 (d, *J* = 11.4 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₀H₂₀ClFN₆NaO₂ [M+Na]⁺: 453.1213; found: 453.1210 (–0.61 ppm).

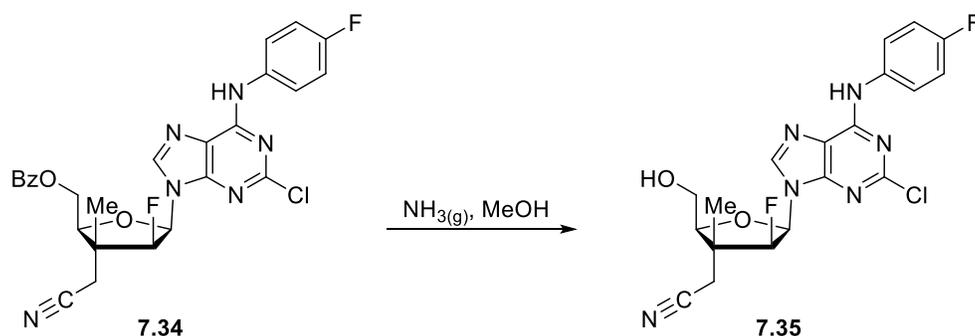
(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2-chloro-6-((4-fluorophenyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl benzoate (7.34**)**



To a solution of **β -anomer 7.24** (330 mg, 711 μ mol) in EtOH (3.5 mL, 0.2 M) in a high-pressure flask at 25 °C, 4-fluoroaniline (0.50 mL, 5.3 mmol) was added and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 70 °C for 16 hours, cooled to 25 °C and condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **7.34** (283 mg, 74 %). $R_f = 0.46$ (Hexanes/EtOAc, 3:7); $[\alpha]^{25}_D +73$ (*c* 0.86, CDCl₃); $[\alpha]^{25}_D +90$ (*c* 0.86, MeOH); **Formula:** C₂₆H₂₁ClF₂N₆O₃; **MW:** 538.94 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3331, 3137, 3070, 2967, 2250, 1720, 1624, 1598, 1507, 1462, 1315, 1272 cm⁻¹; **¹H**

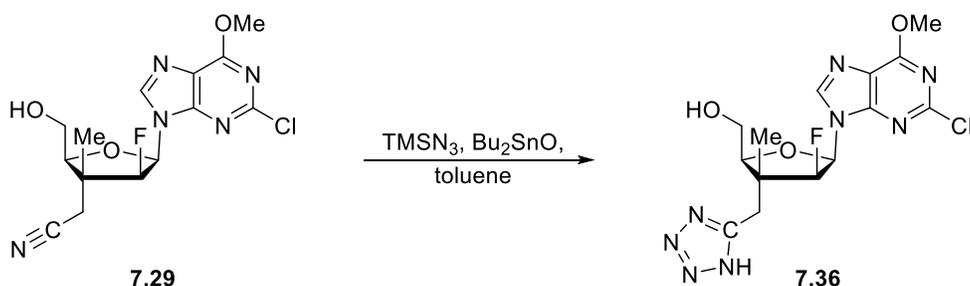
NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 8.06 – 8.03 (m, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.72 – 7.66 (m, 2H), 7.61 – 7.56 (m, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.11 – 7.04 (m, 2H), 6.53 (dd, *J* = 21.0, 3.3 Hz, 1H), 5.02 (dd, *J* = 52.0, 3.3 Hz, 1H), 4.66 (dd, *J* = 11.9, 7.8 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 12.1, 4.3 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 7.7, 4.3 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 37.1, 16.9 Hz, 2H), 1.53 (d, *J* = 3.0 Hz, 3H) ppm (*labile proton was observed*); **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 2H), 7.80 – 7.73 (m, 2H), 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.13 – 7.05 (m, 2H), 6.61 (dd, *J* = 20.9, 3.3 Hz, 1H), 5.13 (dd, *J* = 52.3, 3.3 Hz, 1H), 4.71 (dd, *J* = 12.0, 7.6 Hz, 1H), 4.59 (dd, *J* = 12.0, 4.1 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 7.5, 4.1 Hz, 1H), 2.99 (app q, *J* = 17.1 Hz, 2H), 1.49 (d, *J* = 3.0 Hz, 3H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 159.6 (d, *J* = 244.0 Hz), 154.6, 152.3, 150.2, 140.1 (d, *J* = 5.6 Hz), 133.8 (d, *J* = 3.0 Hz), 133.7, 129.8, 129.2, 128.7, 122.45, 122.4, 118.4, 116.0, 115.8, 115.7, 94.8 (dd, *J* = 198.8, 5.4 Hz), 83.8 (dd, *J* = 16.9, 3.2 Hz), 82.7, 63.8 (d, *J* = 3.2 Hz), 47.2 (d, *J* = 19.7 Hz), 27.6 (d, *J* = 7.6 Hz), 14.8 (d, *J* = 10.1 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 167.5, 160.7 (d, *J* = 241.9 Hz), 155.2, 153.7, 151.2, 141.6 (d, *J* = 5.2 Hz), 136.0 (d, *J* = 3.3 Hz), 134.5, 130.9, 130.7, 129.7, 123.8, 123.7, 119.5, 118.0, 116.4, 116.2, 96.4 (app dd, *J* = 196.0, 3.9 Hz), 85.4 (app dd, *J* = 16.6, 2.1 Hz), 84.0, 65.2, 47.9 (d, *J* = 19.3 Hz), 27.2 (d, *J* = 7.6 Hz), 14.6 (d, *J* = 10.8 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₆H₂₁ClF₂N₆NaO₃ [M+Na]⁺: 561.1224; found: 561.1221 (–0.60 ppm).

(+)-2-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(2-chloro-6-((4-fluorophenyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-2-(hydroxymethyl)-3-methyltetrahydrofuran-3-yl)acetonitrile (7.35)



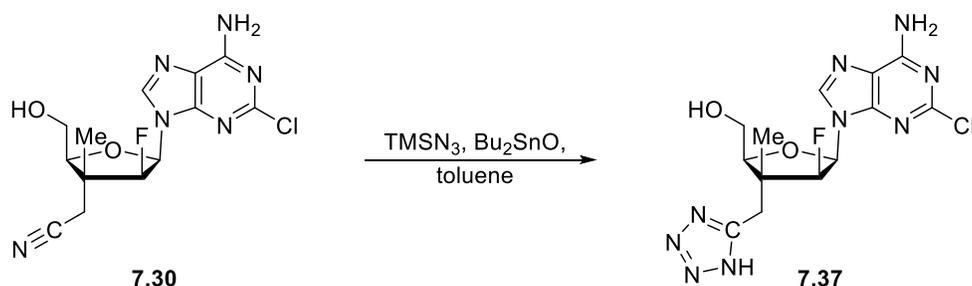
A solution of **7.34** (240 mg, 445 μmol) in MeOH (50 mL, 8.9 mM) in a high-pressure flask at 25 °C was saturated with NH_3 gas and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 24 hours, cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, gradient) provided **7.35** (151 mg, 78 %) as a powder. $R_f = 0.45$ (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +54$ (c 1.1, MeOH); **Formula**: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_2\text{N}_6\text{O}_2$; **MW**: 434.83 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3328, 3140, 2947, 2249, 1627, 1598, 1508, 1465, 1316, 1228 cm^{-1} ; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.30 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 2H), 7.15 – 7.08 (m, 2H), 6.55 (dd, $J = 19.7, 3.7$ Hz, 1H), 5.08 (dd, $J = 52.8, 3.7$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 6.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.83 (dd, $J = 4.9, 2.8$ Hz, 2H), 2.91 (app q, $J = 17.1$ Hz, 2H), 1.39 (d, $J = 3.4$ Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **$^{13}\text{C NMR}$** (125 MHz, CD_3OD) δ 160.7 (d, $J = 241.9$ Hz), 155.2, 153.8, 151.4, 141.9 (d, $J = 4.4$ Hz), 136.0 (d, $J = 3.1$ Hz), 123.9, 123.8, 119.6, 118.2, 116.4, 116.2, 96.6 (d, $J = 197.3$ Hz), 86.7, 85.5 (d, $J = 16.8$ Hz), 62.7 (d, $J = 3.0$ Hz), 47.5 (d, $J = 19.3$ Hz), 27.3 (d, $J = 7.3$ Hz), 14.3 (d, $J = 11.4$ Hz) ppm (J values result from $^{13}\text{C}-\text{F}$ coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClF}_2\text{N}_6\text{NaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 457.0962; found: 457.0959 (–0.60 ppm).

(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-((1*H*-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(2-chloro-6-methoxy-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methanol (7.36)



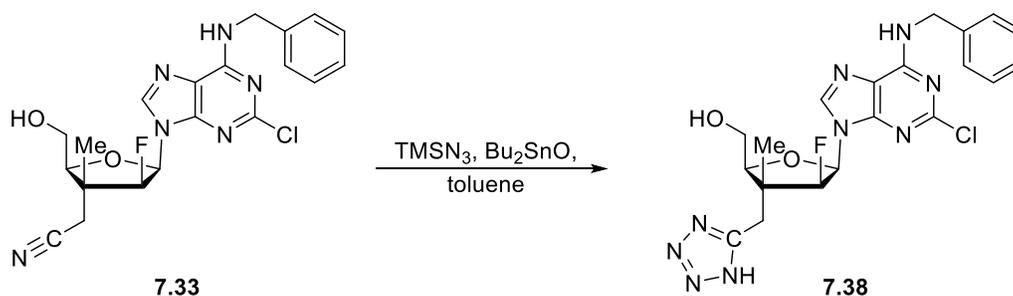
To a stirred solution of **7.29** (216 mg, 607 μmol) in anhydrous toluene (3.0 mL, 0.2 M) in a high-pressure flask at 25°C, Bu_2SnO (30 mg, 0.12 mmol) and TMSN_3 (282 μL , 2.12 mmol) were added, and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 16 hours, and then condensed under reduced pressure. The residue was purified by C18 reverse flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, gradient) to provide **7.36** (192 mg, 79 %) as a foam. $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ +76 (*c* 0.87, MeOH); **Formula:** $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClFN}_8\text{O}_3$; **MW:** 398.78 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3368, 2959, 1596, 1473, 1388, 1320, 1233, 1053 cm^{-1} ; **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CD_3OD) δ 8.42 (s, 1H), 6.67 (dd, $J = 19.5, 3.4$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J = 53.1, 3.4$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J = 7.5, 4.3$ Hz, 1H), 4.17 (s, 3H), 3.84 – 3.68 (m, 2H), 3.31 – 3.27 (m, 2H), 1.16 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **$^{13}\text{C NMR}$** (125 MHz, CD_3OD) δ 162.5, 155.3, 154.5, 153.8, 143.9, 120.8, 97.0 (d, $J = 196.2$ Hz), 87.2, 85.9 (d, $J = 16.6$ Hz), 62.8, 55.7, 48.8 (d, $J = 18.0$ Hz), 32.8 (d, $J = 6.9$ Hz), 14.2 (d, $J = 11.6$ Hz) ppm (*J values result from $^{13}\text{C}-\text{F}$ coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClFN}_8\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 421.0910; found: 421.0911 (+0.24 ppm).

(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-((1*H*-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(6-amino-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methanol (7.37)



To a stirred solution of **7.30** (46 mg, 0.14 mmol) in anhydrous toluene (2.0 mL, 0.068 M) in a high-pressure flask at 25 °C, Bu₂SnO (8 mg, 0.03 mmol) and TMSN₃ (70 μL, 0.53 mmol) were added, and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 16 hours, and then condensed under reduced pressure. The residue was purified by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) to provide **7.37** (27 mg, 52 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +87$ (*c* 0.80, MeOH); **Formula:** C₁₃H₁₅ClFN₉O₂; **MW:** 383.77 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3326, 3197, 1648, 1465, 1354, 1309, 1249, 1048 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 19.9, 3.6 Hz, 1H), 5.22 (dd, *J* = 53.1, 3.6 Hz, 1H), 4.28 – 4.24 (m, 1H), 3.80 (dd, *J* = 11.9, 7.7 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H), 3.36 – 3.23 (m, 2H), 1.18 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 158.1, 155.5, 155.0, 151.5, 141.6 (d, *J* = 4.6 Hz), 118.7, 97.0 (d, *J* = 196.3 Hz), 87.0, 85.6 (d, *J* = 16.7 Hz), 62.8 (d, *J* = 3.1 Hz), 48.9, 32.7 (d, *J* = 7.0 Hz), 14.1 (d, *J* = 11.5 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₃H₁₅ClFN₉NaO₂ [M+Na]⁺: 406.0913; found: 406.0914 (+0.25 ppm).

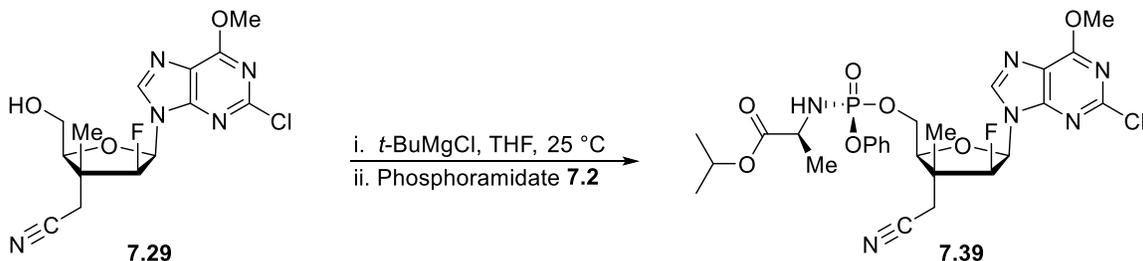
(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-((1*H*-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methanol (7.38)



To a stirred solution of **7.33** (42 mg, 0.098 mmol) in anhydrous toluene (1.0 mL, 0.1 M) in a high-pressure flask at 25 °C, Bu₂SnO (5 mg, 0.02 mmol) and TMSN₃ (46 μL, 0.34 mmol) were added, and the flask was sealed. The reaction mixture was stirred at 110 °C for 16 hours, and then condensed under reduced pressure. The residue was purified by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) to provide **7.38** (26 mg, 56 %) as a foam. [α]²⁵_D +46 (*c* 0.96, MeOH); **Formula**: C₂₀H₂₁ClFN₉O₂; **MW**: 473.90 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3367, 3142, 3050, 2927, 1609, 1473, 1411, 1359, 1320, 1244 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.19 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 20.1, 3.6 Hz, 1H), 5.19 (dd, *J* = 53.2, 3.6 Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.26 (dd, *J* = 7.8, 4.2 Hz, 1H), 3.82 – 3.74 (m, 1H), 3.69 (dd, *J* = 12.0, 4.1 Hz, 1H), 3.24 (app q, *J* = 14.9 Hz, 2H), 1.16 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.4, 156.1, 155.8, 150.8, 141.3, 139.9, 129.6, 128.8, 128.3, 119.1, 97.2 (d, *J* = 195.9 Hz), 87.1, 85.8 (d, *J* = 17.0 Hz), 63.0 (d, *J* = 3.2 Hz), 48.9, 45.2, 33.2 (d, *J* = 7.4 Hz), 14.2 (d, *J* = 11.4 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₀H₂₂ClFN₉O₂ [M+H]⁺: 474.1564; found: 474.1562 (–0.24 ppm).

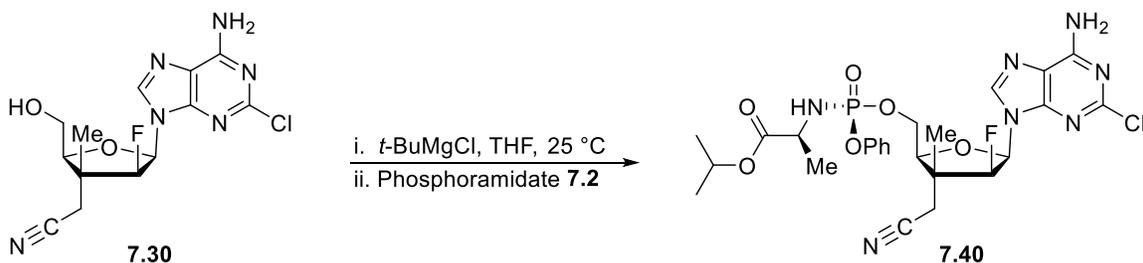
(+)-Isopropyl

((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(2-chloro-6-methoxy-9H-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.39)



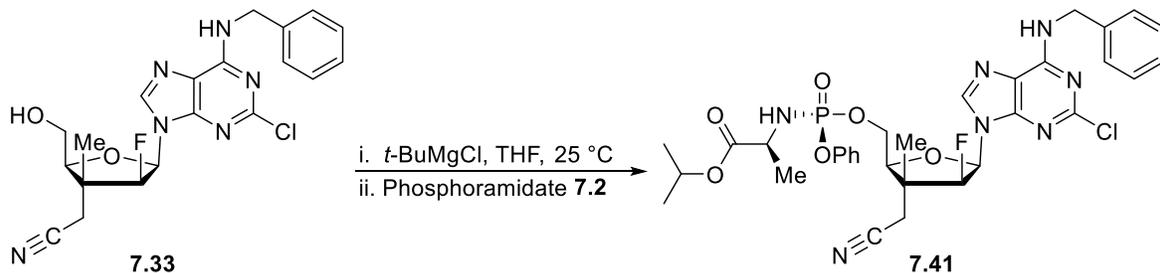
To a solution of **7.29** (126 mg, 0.354 mmol) in anhydrous THF (3.5 mL, 0.1 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.53 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (238 mg, 0.525 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.39** (178 mg, 80 %). *R*_f = 0.47 (DCM/MeOH, 9:1); [α]²⁵_D +39 (*c* 1.1, MeOH); **Formula**: C₂₆H₃₁ClFN₆O₇P; **MW**: 624.99 g/mol; **IR** (neat) *v*_{max} 2980, 2244, 1729, 1592, 1469, 1386, 1318, 1193, 1105, 1053 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.44 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 20.3, 3.5 Hz, 1H), 5.14 (dd, *J* = 52.4, 3.4 Hz, 1H), 5.01 – 4.91 (m, 1H), 4.44 – 4.33 (m, 2H), 4.28 (dd, *J* = 6.8, 4.8 Hz, 1H), 4.21 (s, 3H), 3.93 (app dq, *J* = 10.0, 7.1 Hz, 1H), 3.00 – 2.90 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (dd, *J* = 6.2, 3.6 Hz, 6H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.3 (d, *J* = 5.5 Hz), 162.6, 154.6, 153.8, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 143.8 (d, *J* = 5.2 Hz), 130.8, 126.2 (d, *J* = 1.7 Hz), 121.5, 121.4, 120.8, 118.0, 96.4 (d, *J* = 196.8 Hz), 85.6 (d, *J* = 16.6 Hz), 84.3 (d, *J* = 8.3 Hz), 70.1, 67.1 (app dd, *J* = 5.7, 3.0 Hz), 55.8, 51.7, 47.8 (d, *J* = 19.4 Hz), 27.0 (d, *J* = 7.2 Hz), 22.0, 21.9, 20.5 (d, *J* = 6.5 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.2 Hz) ppm (*J* values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₂₆H₃₁ClFN₆NaO₇P [M+Na]⁺: 647.1557; found: 647.1564 (+1.17 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(6-amino-2-chloro-9H-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate
(7.40)



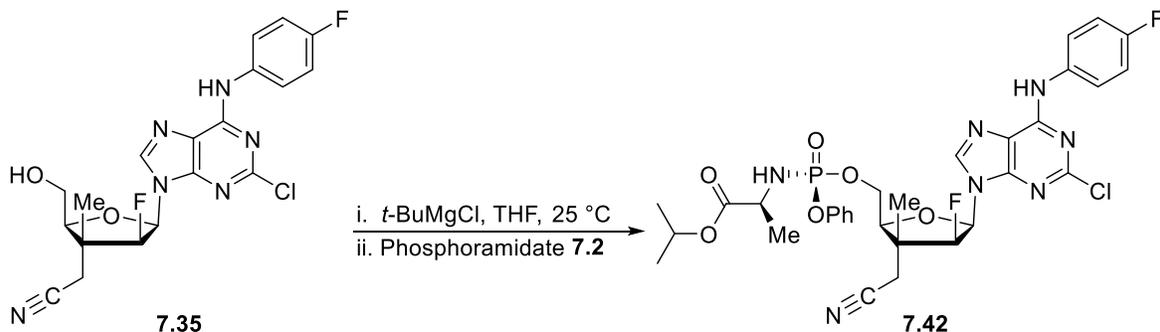
To a solution of **7.30** (63 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (2.0 mL, 0.1 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.30 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (131 mg, 0.289 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.40** (98 mg, 87 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ +46 (*c* 1.1, MeOH); **Formula**: C₂₅H₃₀ClFN₇O₆P; **MW**: 609.98 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 2981, 2243, 1731, 1615, 1465, 1349, 1311, 1212, 1105, 1025 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.25 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.43 – 7.34 (m, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 20.6, 3.4 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 52.5, 3.4 Hz, 1H), 5.01 – 4.92 (m, 1H), 4.44 – 4.32 (m, 2H), 4.27 (dd, *J* = 7.1, 4.6 Hz, 1H), 3.94 (ddd, *J* = 14.2, 9.8, 7.0 Hz, 1H), 2.98 – 2.88 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.22 (dd, *J* = 6.2, 5.0 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.5 Hz), 158.1, 155.6, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 151.4, 141.5 (d, *J* = 5.2 Hz), 130.8, 126.2 (d, *J* = 1.8 Hz), 121.5, 121.4, 118.6, 118.0, 96.4 (d, *J* = 196.5 Hz), 85.3 (d, *J* = 16.6 Hz), 84.2 (d, *J* = 8.3 Hz), 70.2, 67.3 (dd, *J* = 5.8, 3.0 Hz), 51.7 (d, *J* = 1.5 Hz), 47.8 (d, *J* = 19.4 Hz), 27.0 (d, *J* = 7.3 Hz), 21.94, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.5 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.1 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₅H₃₀ClFN₇NaO₆P [M+Na]⁺: 632.1560; found: 632.1545 (–2.33 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9H-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.41)



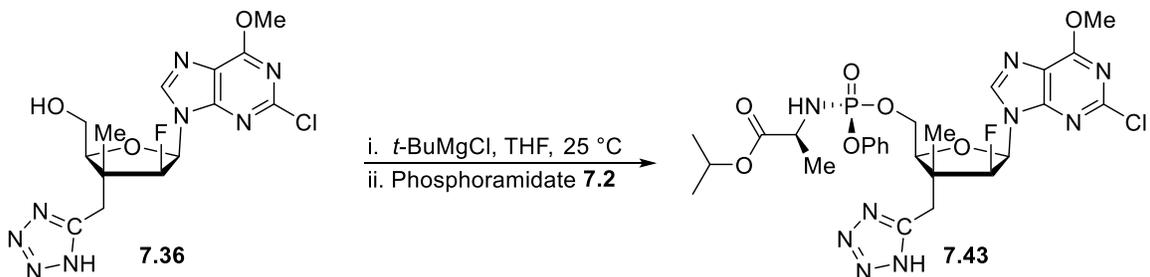
To a solution of **7.33** (54 mg, 0.12 mmol) in anhydrous THF (2.5 mL, 0.05 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.20 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (85 mg, 0.19 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.41** (67 mg, 76 %). *R_f* = 0.64 (DCM/MeOH, 9:1); [α]²⁵_D +43 (*c* 0.56, MeOH); **Formula**: C₃₂H₃₆ClFN₇O₆P; **MW**: 700.11 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2979, 2249, 1728, 1619, 1490, 1454, 1350, 1301, 1208, 1153 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.21 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.43 – 7.18 (m, 10H), 6.56 (dd, *J* = 20.7, 3.4 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 52.5, 3.4 Hz, 1H), 5.00 – 4.90 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.40 – 4.31 (m, 2H), 4.26 (dd, *J* = 7.1, 4.5 Hz, 1H), 3.93 (app dq, *J* = 9.9, 7.1 Hz, 1H), 2.97 – 2.87 (m, 2H), 1.38 (d, *J* = 3.2 Hz, 3H), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.20 (app t, *J* = 6.5 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.5 Hz), 156.4, 155.8, 152.1 (d, *J* = 7.4 Hz), 150.7, 141.1, 139.8, 130.8, 129.6, 128.8, 128.3, 126.2 (d, *J* = 1.4 Hz), 121.5, 121.4, 119.0, 118.0, 96.3 (d, *J* = 196.5 Hz), 85.2 (d, *J* = 16.8 Hz), 84.2 (d, *J* = 8.4 Hz), 70.2, 67.3 (app dd, *J* = 5.9, 2.7 Hz), 51.6, 47.8 (d, *J* = 19.5 Hz), 45.2, 27.0 (d, *J* = 7.3 Hz), 21.94, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.6 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.1 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₃₂H₃₆ClFN₇NaO₆P [M+Na]⁺: 722.2029; found: 722.2020 (–1.35 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(2-chloro-6-((4-fluorophenyl)amino)-9H-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.42)



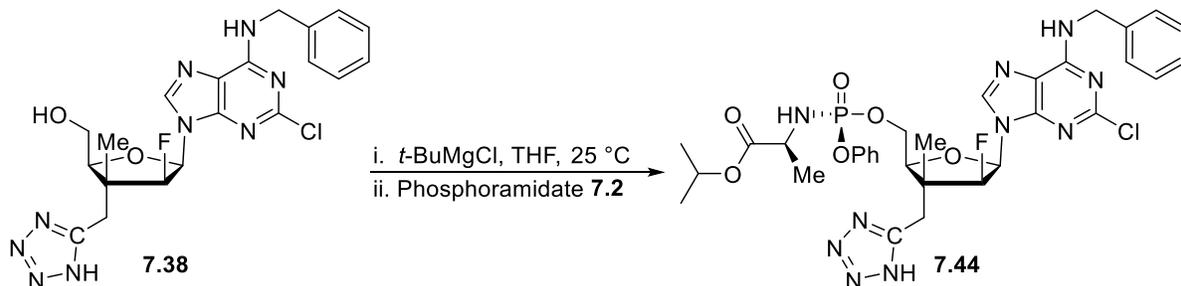
To a solution of **7.35** (57 mg, 0.13 mmol) in anhydrous THF (2.6 mL, 0.05 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.20 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (89 mg, 0.20 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Hexanes/EtOAc, gradient) provided **7.42** (76 mg, 82 %). $R_f = 0.54$ (EtOAc 100%); $[\alpha]^{25}_D +39$ (*c* 1.1, MeOH); **Formula**: C₃₁H₃₃ClF₂N₇O₆P; **MW**: 704.07 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2981, 2246, 1725, 1591, 1505, 1462, 1355, 1322, 1210, 1102 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.81 – 7.74 (m, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 – 7.05 (m, 2H), 6.57 (dd, *J* = 20.6, 3.4 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 52.4, 3.4 Hz, 1H), 4.95 (app dq, *J* = 12.5, 6.1 Hz, 1H), 4.41 – 4.30 (m, 2H), 4.26 (dd, *J* = 7.1, 4.5 Hz, 1H), 3.93 (app dq, *J* = 9.8, 7.1 Hz, 1H), 2.95 – 2.85 (m, 2H), 1.37 (d, *J* = 3.2 Hz, 3H), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.19 (dd, *J* = 6.3, 1.5 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.6 Hz), 160.6 (d, *J* = 242.0 Hz), 155.2, 153.7, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 151.3, 141.8 (d, *J* = 5.2 Hz), 136.0 (d, *J* = 3.1 Hz), 130.8, 126.3, 123.74, 123.68, 121.49, 121.46, 119.5, 118.0, 116.4, 116.2, 96.4 (d, *J* = 196.5 Hz), 85.3 (d, *J* = 16.6 Hz), 84.2 (d, *J* = 8.3 Hz), 70.2, 67.3 (app dd, *J* = 5.9, 3.1 Hz), 51.6, 47.8 (d, *J* = 19.4 Hz), 27.1 (d, *J* = 7.4 Hz), 22.0, 21.9, 20.5 (d, *J* = 6.5 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.0 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₃₁H₃₃ClF₂N₇NaO₆P [M+Na]⁺: 726.1779; found: 726.1781 (+0.38 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-3-((1H-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(2-chloro-6-methoxy-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.43)



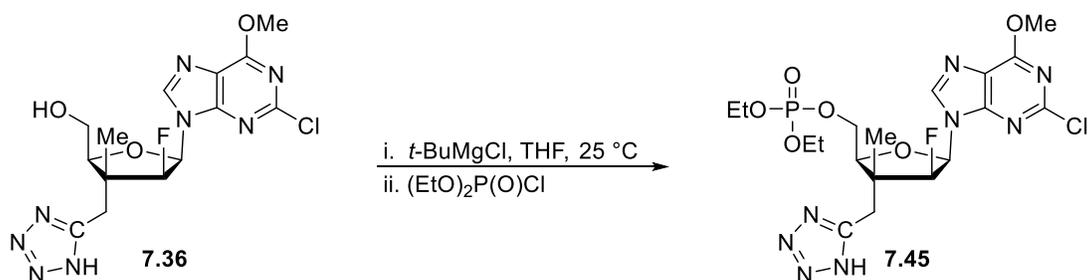
To a solution of **7.36** (100 mg, 0.251 mmol) in anhydrous THF (2.5 mL, 0.1 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.60 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (270 mg, 0.596 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.43** (26 mg, 16 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +36$ (*c* 1.1, MeOH); **Formula**: C₂₆H₃₂ClFN₉O₇P; **MW**: 668.02 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3132, 2981, 1731, 1593, 1471, 1386, 1319, 1208, 1158, 1105 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.36 – 7.32 (m, 2H), 7.25 – 7.15 (m, 3H), 6.73 (dd, *J* = 20.5, 3.4 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 52.7, 3.4 Hz, 1H), 4.97 – 4.89 (m, 1H), 4.53 (dd, *J* = 7.4, 4.4 Hz, 1H), 4.40 – 4.26 (m, 2H), 4.20 (s, 3H), 3.90 (app dq, *J* = 9.9, 7.1 Hz, 1H), 3.37 – 3.26 (m, 2H), 1.32 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.22 – 1.16 (m, 9H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.3 (d, *J* = 5.6 Hz), 162.6, 155.3, 154.6, 153.8, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 143.9 (d, *J* = 5.3 Hz), 130.8, 126.2 (d, *J* = 1.7 Hz), 121.5, 121.4, 120.8, 96.9 (d, *J* = 195.7 Hz), 85.9 (d, *J* = 16.5 Hz), 84.8 (d, *J* = 8.1 Hz), 70.1, 67.6 (app dd, *J* = 6.0, 3.2 Hz), 55.7, 51.6, 49.0 (d, *J* = 16.3 Hz), 32.5 (d, *J* = 7.2 Hz), 21.94, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.4 Hz), 14.2 (d, *J* = 11.2 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₆H₃₂ClFN₉NaO₇P [M+Na]⁺: 690.1727; found: 690.1727 (–0.05 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-3-((1H-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.44)



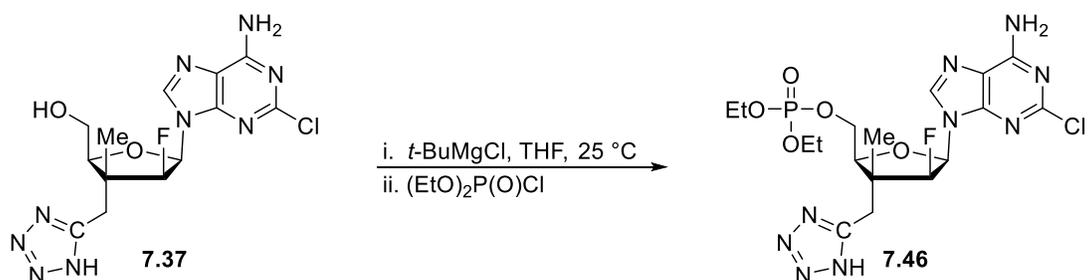
To a solution of **7.38** (98 mg, 0.21 mmol) in anhydrous THF (8.3 mL, 0.025 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.52 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of phosphoramidate **7.2**¹⁶ (141 mg, 0.310 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (1.0 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH with 0.5 % formic acid, gradient) provided **7.44** (14 mg, 9 %). *R_f* = 0.45 (DCM/MeOH, 8:2); [α]²⁵_D +40 (*c* 0.33, MeOH); **Formula**: C₃₂H₃₇ClFN₁₀O₆P; **MW**: 743.13 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2983, 2921, 2854, 1228, 1606, 1490, 1357, 1322, 1243, 1213 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.38 – 7.23 (m, 7H), 7.19 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.66 (dd, *J* = 20.9, 3.2 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 52.8, 2.9 Hz, 1H), 4.96 – 4.90 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.51 (dd, *J* = 7.4, 4.1 Hz, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 1H), 4.31 – 4.24 (m, 1H), 3.91 (app dq, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 3.36 – 3.26 (m, 2H), 1.35 – 1.30 (m, 3H), 1.20 – 1.16 (m, 9H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.6 Hz), 156.4, 155.8, 154.9, 152.2 (d, *J* = 7.5 Hz), 150.8, 141.2, 139.9, 130.8, 129.6, 128.8, 128.3, 126.2 (d, *J* = 1.6 Hz), 121.5, 121.4, 119.0, 96.9 (d, *J* = 195.5 Hz), 85.5 (d, *J* = 16.3 Hz), 84.6 (d, *J* = 7.9 Hz), 70.1, 67.7 (dd, *J* = 6.1, 3.1 Hz), 51.6, 48.9, 45.2, 32.5 (d, *J* = 7.7 Hz), 21.93, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.3 Hz), 14.2 (d, *J* = 11.2 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₃₂H₃₇ClFN₁₀NaO₆P [*M*+Na]⁺: 765.2200; found: 765.2197 (–0.33 ppm).

(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-((1*H*-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(2-chloro-6-methoxy-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl diethyl phosphate (7.45)



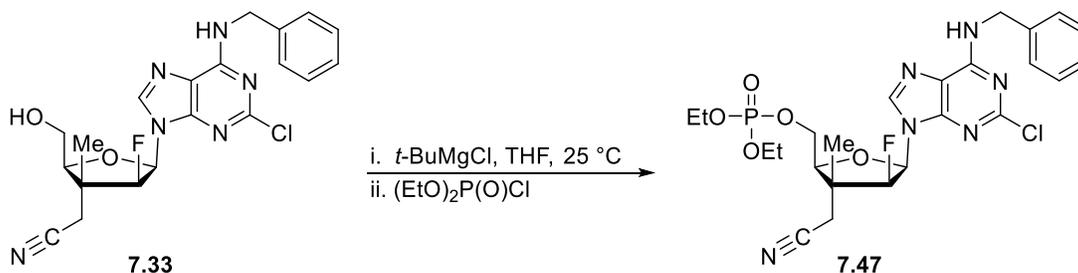
To a solution of **7.36** (94 mg, 0.24 mmol) in anhydrous THF (3.0 mL, 0.08 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.40 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of diethyl chlorophosphate (60 μ L, 0.42 mmol). After 5 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.45** (24 mg, 19 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ +61 (*c* 1.1, MeOH); **Formula**: C₁₈H₂₅ClFN₈O₆P; **MW**: 534.87 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 2984, 1595, 1472, 1387, 1320, 1237, 1164, 1029 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.48 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 20.9, 3.3 Hz, 1H), 5.29 (dd, *J* = 52.7, 3.3 Hz, 1H), 4.57 (dd, *J* = 7.8, 3.8 Hz, 1H), 4.38 – 4.30 (m, 1H), 4.27 – 4.21 (m, 1H), 4.20 (s, 3H), 4.17 – 4.08 (m, 4H), 3.38 – 3.26 (m, 2H), 1.32 (app dt, *J* = 14.1, 7.1 Hz, 6H), 1.22 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 162.6, 156.0, 154.6, 153.8, 143.9 (d, *J* = 5.2 Hz), 120.8, 97.0 (d, *J* = 195.2 Hz), 86.1 (d, *J* = 16.4 Hz), 84.9 (d, *J* = 7.6 Hz), 68.5 (app dd, *J* = 6.1, 3.2 Hz), 65.7 (app dd, *J* = 6.3, 3.2 Hz), 55.7, 48.9, 32.9 (d, *J* = 7.4 Hz), 16.4 (app dd, *J* = 6.7, 3.1 Hz), 14.2 (d, *J* = 10.8 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₈H₂₅ClFN₈NaO₆P [M+Na]⁺: 557.1199; found: 557.1201 (+0.32 ppm).

(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3-((1*H*-tetrazol-5-yl)methyl)-5-(6-amino-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl diethyl phosphate (7.46)



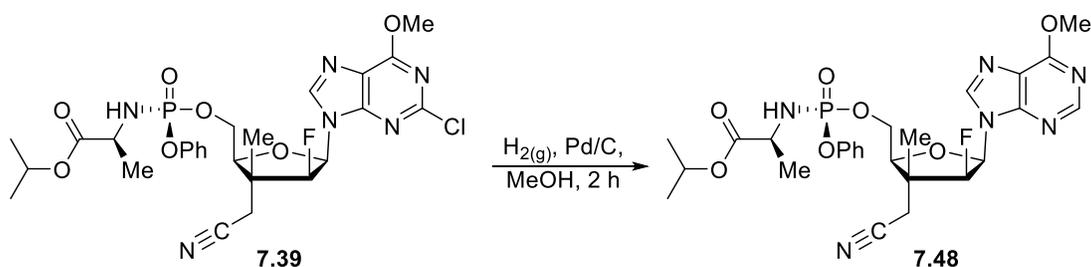
To a solution of **7.37** (53 mg, 0.14 mmol) in anhydrous THF (1.7 mL, 0.08 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.22 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 45 minutes before the addition of diethyl chlorophosphate (30 μ L, 0.21 mmol). After 3 hours and 15 minutes at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.46** (11 mg, 15 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ +68 (*c* 0.81, MeOH); **Formula:** C₁₇H₂₄ClFN₉O₅P; **MW:** 519.86 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 2990, 1617, 1465, 1349, 1309, 1241, 1166, 1029 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.31 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 21.2, 3.2 Hz, 1H), 5.23 (dd, *J* = 52.6, 3.2 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 7.8, 3.7 Hz, 1H), 4.39 – 4.30 (m, 1H), 4.27 – 4.20 (m, 1H), 4.19 – 4.08 (m, 4H), 3.40 – 3.26 (m, 2H), 1.37 – 1.28 (m, 6H), 1.23 (d, *J* = 2.6 Hz, 3H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 158.2, 155.6, 155.2, 151.5, 141.6 (d, *J* = 5.3 Hz), 118.6, 96.9 (d, *J* = 195.2 Hz), 85.7 (d, *J* = 16.5 Hz), 84.7 (d, *J* = 7.5 Hz), 68.5 (app dd, *J* = 6.1, 3.2 Hz), 65.7 (app dd, *J* = 6.5, 3.4 Hz), 48.9, 32.5 (d, *J* = 7.5 Hz), 16.4 (app dd, *J* = 6.9, 3.9 Hz), 14.1 (d, *J* = 10.7 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₁₇H₂₄ClFN₉NaO₅P [M+Na]⁺: 542.1203; found: 542.1219 (+2.97 ppm).

(+)-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-5-(6-(benzylamino)-2-chloro-9*H*-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methyl diethyl phosphate (7.47)



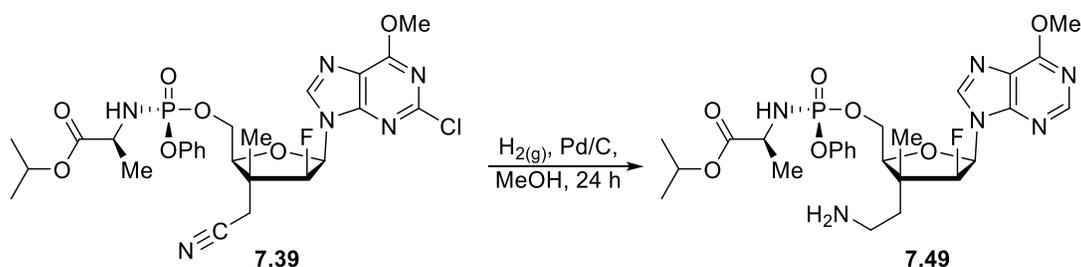
To a solution of **7.33** (62 mg, 0.14 mmol) in anhydrous THF (2.9 mL, 0.05 M) at 25 °C, *t*-BuMgCl (0.24 mL, 1 M solution in THF) was added. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes before the addition of diethyl chlorophosphate (35 μ L, 0.24 mmol). After 16 hours at 25 °C, MeOH (0.3 mL) was added and the mixture was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.47** (39 mg, 48 %). R_f = 0.79 (DCM/MeOH, 9:1); $[\alpha]_D^{25} +52$ (*c* 0.60, MeOH); **Formula**: C₂₄H₂₉ClFN₆O₅P; **MW**: 566.96 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2981, 2247, 1605, 1474, 1357, 1324, 1247, 1030 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.26 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 21.0, 3.2 Hz, 1H), 5.09 (dd, *J* = 52.4, 3.1 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.39 – 4.28 (m, 3H), 4.20 – 4.10 (m, 4H), 2.97 (app q, *J* = 17.1 Hz, 2H), 1.42 (d, *J* = 2.7 Hz, 3H), 1.38 – 1.29 (m, 6H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 156.5, 155.9, 150.7, 141.1 (d, *J* = 6.2 Hz), 139.8, 129.6, 128.8, 128.3, 119.0, 118.0, 96.3 (d, *J* = 196.2 Hz), 85.4 (d, *J* = 16.4 Hz), 84.4 (d, *J* = 7.6 Hz), 68.2 (app dd, *J* = 6.0, 3.1 Hz), 65.8 (app dd, *J* = 6.7, 3.4 Hz), 47.9 (d, *J* = 19.4 Hz), 45.2, 27.1 (d, *J* = 7.7 Hz), 16.4 (app dd, *J* = 7.1, 4.0 Hz), 14.4 (d, *J* = 10.6 Hz) ppm (*J* values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible); **HRMS** calcd for: C₂₄H₂₉ClFN₆NaO₅P [M+Na]⁺: 589.1502; found: 589.1489 (–2.12 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-5-(6-methoxy-9H-purin-9-yl)-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.48)



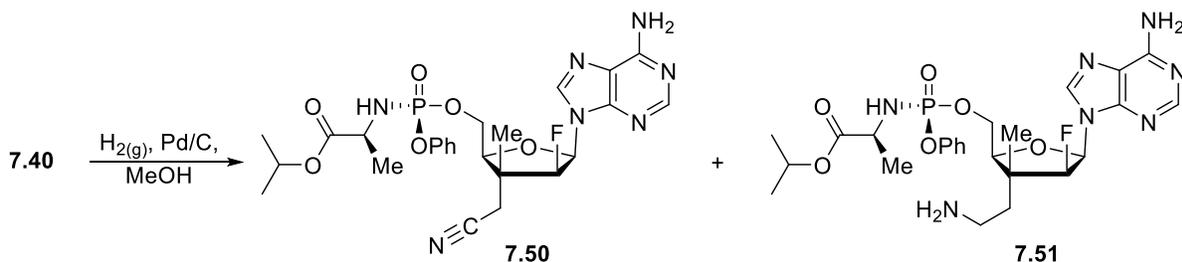
To a solution of **7.39** (140 mg, 224 μ mol) in MeOH (11 mL, 0.02 M), Pd on activated carbon (75 mg, wt/wt, Pd 10 wt. %) was added. Inert gas atmosphere was purged by 3 cycles of vacuum–H₂ gas before stirring the reaction mixture at 25 °C. After 2 hours, the mixture was filtered on a pad of Celite[®], washed thoroughly with MeOH and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.48** (100 mg, 76 %). *R_f* = 0.46 (DCM/MeOH, 9:1); [α]²⁵_D +34 (*c* 1.5, MeOH); **Formula**: C₂₆H₃₂FN₆O₇P; **MW**: 590.55 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 2984, 2244, 1732, 1600, 1478, 1351, 1306, 1212, 1106, 1060 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.57 (s, 1H), 8.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 20.3, 3.4 Hz, 1H), 5.15 (dd, *J* = 52.5, 3.4 Hz, 1H), 5.02 – 4.91 (m, 1H), 4.43 – 4.34 (m, 2H), 4.29 (dd, *J* = 6.9, 4.7 Hz, 1H), 4.22 (s, 3H), 3.94 (app dq, *J* = 10.0, 7.2 Hz, 1H), 3.01 – 2.89 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (app t, *J* = 6.5 Hz, 6H) ppm (*labile proton was not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.3 (d, *J* = 5.5 Hz), 162.3, 153.7, 152.6, 152.2 (d, *J* = 7.1 Hz), 143.3 (d, *J* = 5.1 Hz), 130.8, 126.2 (d, *J* = 1.7 Hz), 121.5, 121.4, 118.0, 96.4 (d, *J* = 196.8 Hz), 85.5 (d, *J* = 16.6 Hz), 84.2 (d, *J* = 8.3 Hz), 67.2 (app dd, *J* = 5.8, 2.9 Hz), 55.0, 51.7 (d, *J* = 1.3 Hz), 47.8 (d, *J* = 19.4 Hz), 27.0 (d, *J* = 7.0 Hz), 21.93, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.6 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.2 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₆H₃₂FN₆NaO₇P [M+Na]⁺: 613.1946; found: 613.1960 (+2.17 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-3-(2-aminoethyl)-4-fluoro-5-(6-methoxy-9H-purin-9-yl)-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (7.49)



To a solution of **7.39** (254 mg, 406 μmol) in MeOH (20 mL, 0.02 M), Pd on activated carbon (150 mg, wt/wt, Pd 10 wt. %) was added. Inert gas atmosphere was purged by 3 cycles of vacuum–H₂ gas before stirring the reaction mixture at 25 °C. After 24 hours, the mixture was filtered on a pad of Celite[®], washed thoroughly with MeOH and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH, gradient) followed by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.49** (174 mg, 72 %). **R_f** = 0.27 (DCM/MeOH, 8:2); [α]²⁵_D +38 (*c* 0.99, MeOH); **Formula**: C₂₆H₃₆FN₆O₇P; **MW**: 594.58 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3387, 2982, 1731, 1602, 1478, 1306, 1234, 1152, 1105, 1023 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.57 (s, 1H), 8.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 20.0, 3.5 Hz, 1H), 5.12 (dd, *J* = 52.7, 3.5 Hz, 1H), 5.00 – 4.92 (m, 1H), 4.42 – 4.30 (m, 2H), 4.27 (dd, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 1H), 4.22 (s, 3H), 3.92 (app dq, *J* = 9.6, 6.8 Hz, 1H), 3.18 – 3.10 (m, 2H), 2.03 – 1.95 (m, 2H), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.25 (d, *J* = 2.7 Hz, 3H), 1.19 (dd, *J* = 10.4, 6.3 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.3 (d, *J* = 5.4 Hz), 162.2, 153.6, 152.6, 152.1 (d, *J* = 7.1 Hz), 143.4 (d, *J* = 7.8 Hz), 130.8, 126.2, 121.7, 121.5, 121.4, 97.0 (d, *J* = 195.7 Hz), 85.7 (d, *J* = 16.4 Hz), 85.0 (d, *J* = 7.7 Hz), 70.1, 67.7, 55.0, 51.7, 48.0 (d, *J* = 17.9 Hz), 36.6, 36.2 (d, *J* = 6.3 Hz), 21.94, 21.86, 20.5 (d, *J* = 6.8 Hz), 13.2 (d, *J* = 10.0 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₆H₃₆FN₆NaO₇P [M+Na]⁺: 617.2259; found: 617.2291 (+5.07 ppm).

(+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(cyanomethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (**7.50**) & (+)-Isopropyl ((S)-(((2S,3R,4S,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-(2-aminoethyl)-4-fluoro-3-methyltetrahydrofuran-2-yl)methoxy)(phenoxy)phosphoryl)-L-alaninate (**7.51**)



To a solution of **7.40** (69 mg, 0.11 mmol) in MeOH (4.0 mL, 0.03 M), Pd on activated carbon (50 mg, wt/wt, Pd 10 wt. %) was added. Inert gas atmosphere was purged by 3 cycles of vacuum–H₂ gas before stirring the reaction mixture at 25 °C. After 48 hours, the mixture was filtered on a pad of Celite[®], washed thoroughly with MeOH and the filtrate was condensed under reduced pressure. Purification by C18 reverse flash chromatography (H₂O/MeOH, gradient) provided **7.50** (15 mg, 23 %) and **7.51** (8 mg, 12 %).

Nitrile 7.50: [α]²⁵_D +44 (*c* 0.23, MeOH); **Formula:** C₂₅H₃₁FN₇O₆P; **MW:** 575.54 g/mol; **IR** (neat) ν_{\max} 3181, 2981, 2244, 1733, 1646, 1598, 1474, 1375, 1210, 1153 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 20.4, 3.3 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 52.5, 3.5 Hz, 1H), 4.99 – 4.91 (m, 1H), 4.41 – 4.32 (m, 2H), 4.27 (dd, *J* = 7.0, 4.4 Hz, 1H), 3.94 (app dq, *J* = 9.5, 7.0 Hz, 1H), 2.99 – 2.89 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H), 1.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.21 (dd, *J* = 7.5, 6.4 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.4 Hz), 157.4, 154.2, 152.2 (d, *J* = 7.4 Hz), 150.3, 141.2 (d, *J* = 5.4 Hz), 130.8, 126.3 (d, *J* = 1.5 Hz), 121.51, 121.47, 119.7, 118.0, 96.4 (d, *J* = 196.5 Hz), 85.3 (d, *J* = 16.5 Hz), 84.1 (d, *J* = 8.4 Hz), 70.2, 67.2 (app dd, *J* = 7.2, 3.5 Hz), 51.7, 47.8 (d, *J* = 19.5 Hz), 27.0 (d, *J* = 7.0 Hz), 21.93, 21.87, 20.5 (d, *J* = 6.6 Hz), 14.4 (d, *J* = 11.1 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₅H₃₂FN₇O₆P [M+H]⁺: 576.2130; found: 576.2146 (+2.73 ppm).

Amine 7.51: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +29$ (*c* 0.60, MeOH); **Formula:** C₂₅H₃₅FN₇O₆P; **MW:** 579.57 g/mol; **IR** (neat) ν_{max} 3403, 2981, 1733, 1646, 1596, 1489, 1211, 1105, 1023 cm⁻¹; **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 8.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 20.3, 3.3 Hz, 1H), 5.06 (dd, *J* = 52.8, 3.3 Hz, 1H), 4.98 – 4.90 (m, 1H), 4.41 – 4.29 (m, 2H), 4.25 (dd, *J* = 7.9, 4.2 Hz, 1H), 3.93 (app dq, *J* = 10.0, 7.4 Hz, 1H), 3.19 – 3.09 (m, 2H), 2.04 – 1.88 (m, 2H), 1.35 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.25 (d, *J* = 2.6 Hz, 3H), 1.20 (dd, *J* = 10.5, 6.3 Hz, 6H) ppm (*labile protons were not observed due to exchange with deuterated solvent*); **¹³C NMR** (125 MHz, CD₃OD) δ 174.4 (d, *J* = 5.7 Hz), 160.9, 155.0, 152.2 (d, *J* = 7.1 Hz), 150.0, 141.9 (d, *J* = 3.8 Hz), 130.8, 126.3 (d, *J* = 1.6 Hz), 121.5, 121.4, 119.8, 96.9 (d, *J* = 195.8 Hz), 85.6 (d, *J* = 16.7 Hz), 85.1 (d, *J* = 7.4 Hz), 70.2, 67.7 (app dd, *J* = 6.0, 3.6 Hz), 51.7, 48.0 (d, *J* = 18.1 Hz), 36.6, 36.2 (d, *J* = 6.3 Hz), 21.94, 21.87, 20.4 (d, *J* = 6.6 Hz), 13.2 (d, *J* = 11.2 Hz) ppm (*J values result from ¹³C–F and ¹³C–P coupling and were assigned when possible*); **HRMS** calcd for: C₂₅H₃₅FN₇NaO₆P [M+Na]⁺: 602.2263; found: 602.2253 (–1.64 ppm).

Références de la partie expérimentale

1. Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
2. Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis*; John Wiley & Sons : New York, 2001.
3. Schärer, O. D.; Verdine, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10781-10782.
4. Mackman, R. L.; Ray, A. S.; Hui, H. C.; Zhang, L.; Birkus, G.; Boojamra, C. G.; Desai, M. C.; Douglas, J. L.; Gao, Y.; Grant, D.; Laflamme, G.; Lin, K.-Y.; Markevitch, D. Y.; Mishra, R.; McDermott, M.; Pakdaman, R.; Petrakovsky, O. V.; Vela, J. E.; Cihlar, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3606-3617.
5. Howell, H. G.; Brodfuehrer, P. R.; Brundidge, S. P.; Benigni, D. A.; Sapino, C., Jr. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 85-88.
6. Bhattacharya, B. K.; Rao, T. S.; Revankar, G. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1995**, *12*, 1543-1550.
7. Xu, Z.; Yin, W.; Martinelli, L. K.; Evans, J.; Chen, J.; Yu, Y.; Wilson, D. J.; Mizrahi, V.; Qiao, C.; Aldrich, C. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1726-1735.
8. Bockman, M. R.; Kalinda, A. S.; Petrelli, R.; De la Mora-Rey, T.; Tiwari, D.; Liu, F.; Dawadi, S.; Nandakumar, M.; Rhee, K. Y.; Schnappinger, D.; Finzel, B. C.; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7349-7369.
9. Bouillon, M. E.; Pyne, S. G. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 475-478.
10. Dostie, S., *Diastereoselective Synthesis of Nucleoside Analogues via Cyclization of Acyclic Precursors*. Thèse de doctorat (Université McGill), 2016.
11. Murakami, M.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1983**, *12*, 1733-1736.
12. Diaz, R. R.; Melgarejo, C. R.; Cubero, I. I.; Plaza López-Espinosa, M. T. *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 375-380.

13. Dostie, S.; Prévost, M.; Mochirian, P.; Tanveer, K.; Andrella, N.; Rostami, A.; Tambutet, G.; Guindon, Y. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10769-10790.
14. Furuya, T.; Strom, A. E.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1662-1663.
15. Yuan, G.; Wang, F.; Stephenson, N. A.; Wang, L.; Rotstein, B. H.; Vasdev, N.; Tang, P.; Liang, S. H. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 126-129.
16. Ross, B. S.; Reddy, P. G.; Zhang, H.-R.; Rachakonda, S.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8311-8319.