



Synthèse d'analogues de nucléosides et d'hétérocycles visant l'inhibition des Mur ligases bactériennes

Vincent Hervin

► To cite this version:

Vincent Hervin. Synthèse d'analogues de nucléosides et d'hétérocycles visant l'inhibition des Mur ligases bactériennes. Chimie organique. Université d'Orléans, 2020. Français. NNT : 2020ORLE3110 . tel-03361400

HAL Id: tel-03361400

<https://theses.hal.science/tel-03361400>

Submitted on 1 Oct 2021

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

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

*ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT*

INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE ET ANALYTIQUE

THÈSE présentée par :
Vincent HERVIN

Soutenue publiquement le : **15 septembre 2020**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Chimie Organique

**Synthèse d'analogues de nucléosides et
d'hétérocycles visant l'inhibition
des Mur Ligases bactériennes**

THÈSE dirigée par :

Luigi A. Agrofoglio
Vincent Roy

Professeur, Université d'Orléans (co-directeur)
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Christine Gravier-Pelletier
Vincent Sol

Directeur de Recherche CNRS, Université Paris Descartes
Professeur, Université de Limoges

JURY:

Luigi A. Agrofoglio
Christine Gravier-Pelletier
Sylvie Pochet
Vincent Roy
Vincent Sol

Professeur, Université d'Orléans (co-directeur)
Directeur de Recherche CNRS, Université Paris Descartes
Directeur de Recherche CNRS, Institut Pasteur
Maître de conférences, HDR, Université d'Orléans
Professeur, Université de Limoges

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA UMR CNRS 7311) de l'Université d'Orléans sous la direction du docteur HDR Vincent Roy et du professeur Luigi Agrofoglio avec la participation du docteur Patrick Favetta.

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Christine Gravier-Pelletier et le Pr. Vincent Sol d'avoir accepté de juger mon travail de thèse ainsi que le Dr Sylvie Pochet pour avoir accepté d'examiner mon travail, et de siéger dans ce jury de thèse.

Je remercie sincèrement Vincent Roy pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse dans son laboratoire. Il a su témoigner d'une grande confiance à mon égard et m'a donné la liberté totale de conduire les projets qu'il m'a confiés. Ses conseils pratiques et sa bonne humeur ont permis de maintenir la passion du chimiste organicien au sein du laboratoire. Je le remercie aussi pour m'avoir confié l'enseignement des Travaux Pratiques à l'IUT d'Orléans pendant ces trois années de thèse.

Je souhaiterais remercier par la suite Luigi Agrofoglio pour son accueil dans son laboratoire et la confiance qu'il a fait part à mon égard. Son sens critique et ses conseils pertinents m'ont permis de progresser tout au long de cette thèse.

Je remercie particulièrement Patrick Favetta pour sa bonne et mauvaise humeur qui a fait de nos râleries de très bonnes rigolades. Ses conseils, ses remarques et son sarcasme au quotidien ont toujours été très appréciés pendant les instants caféinés du matin.

Je voudrais remercier tous le personnel administratif et technique que compte l'ICOA qui permettent quotidiennement de nous aider et d'avancer dans nos travaux. En particulier Marie Madeleine Le Floch, Sophie Nicourt et Christophe Dubois pour le côté administratif. De plus, Alain-Michel Croze, Pascal Mazabraud et Stéphane Rétif pour le côté technique, leur bonne humeur et leur disponibilité pour les diverses avaries du laboratoire.

Je remercie ensuite mes collègues et amis du labo 6 qui ont permis de rendre ces travaux de recherche plus agréables au quotidien. En commençant par Maxime Bessièrès (même si ce fût court), Florian Chevrier et Zahira Tber tout au long de ma première année pour votre gentillesse et nos bonnes rigolades. A Mohamed Ghazi Ayari avec qui j'ai partagé deux années de ma thèse entre le travail et les fous-rires. Je te remercie également pour m'avoir aidé pendant les douces périodes de grèves SNCF. Je remercie Tuniyazi Abuduaini, Ji-Seong Yoon pour leur gentillesse et nos discussions de tous les jours. Je remercie Nicolas Biteau pour m'avoir aussi aidé pendant les périodes difficiles de grèves et les rigolades que l'on a pu avoir. Enfin, je

remercie tous les stagiaires présents au labo 6 en particulier Ismaël Félix Dondasse et Martin Vuagnat que j'ai eu l'occasion d'encadrer.

Pour continuer, je remercie tous les collègues et amis voisins de notre labo en particulier le labo 10 avec qui on a partagé de bons moments. Un grand merci à Mazarine Laurent qui m'a hébergé pendant les derniers mois de ma thèse afin d'éviter mes allers-retours quotidiens entre Paris et Orléans. Cela a permis d'intensifier mon temps de travail et de découvrir tes passions culinaires avec un appétit sans fin. Je remercie aussi ton Sébastien avec son immense gentillesse et avec qui tu as su apprécier, je le pense, notre bonne camaraderie à ton égard. Je remercie aussi Agnieszka Zak et Clémentine Pescheteau avec qui on a formé durant les beaux jours le « club du déjeuner » à 11h30 au grand air. Enfin, du plus près au plus loin, je remercie chaque personne des laboratoires de l'ICOA de du LMBA pour leur sympathie en quotidien.

Je remercie également tous les autres membres permanents de l'ICOA pour leur bonne humeur et leur gentillesse. En particulier Marie Schuler, Patrice Carmona, Marie-Aude Hiebel, Pascal Bouyssou et Alexis pour le co-encadrement des étudiants pendant les séances de TP. Également, je remercie Cyril Nicolas pour sa sympathie et nos discussions de chimie.

Enfin, je souhaite remercier ma famille qui a été un pilier fondamental pour l'aboutissement de cette thèse. Je remercie tout d'abord ma belle-famille avec qui on a partagé discussions, rigolades et surtout pour supporter mes blagues dont l'inspiration m'est infinie. Un grand merci à Pascale et Jean-François qui m'ont donné l'occasion d'étaler mes mille et une publications ainsi que les spectres de tout genre chez eux afin de rédiger cette thèse comme si j'allais au boulot. Un autre grand merci à Pascale pour avoir su trouver chacune de mes fautes d'orthographe dans ce manuscrit.

Ensuite, je voudrais remercier mes parents qui ont toujours cru en moi depuis le début de mes études et qui m'ont toujours donné les moyens de m'aider pour quoi que ce soit. Leur soutien a été essentiel pour tenir le cap et surtout pour cette thèse. Je voudrais aussi remercier papi Raymond et tonton Michel pour leurs soutien dans mes études. Vous qui aviez l'habitude de dire que « *Le travail, c'est la santé !* », j'espère que vous êtes fiers de mon parcours. Même si vous n'êtes plus là pour le voir, vous m'avez toujours soutenu dans tout ce que j'ai entrepris et c'est aussi grâce à vous que je suis arrivé jusque-là. De même, je remercie mamie Francine pour le même soutien incessant et ses créations pâtisseries inoubliables.

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement ma femme Pauline qui a été vitale pour l'accomplissement de cette thèse. Grâce à toi, j'ai pu traverser les hauts et les bas de cette thèse et tu m'as donné le courage de continuer jusqu'au bout malgré les difficultés que j'ai rencontrées. Cette thèse aurait été autrement plus difficile sans ton soutien, ton encouragement et ton amour permanents qui m'ont aussi donné la force de faire les allers-retours de Paris à Orléans pendant presque deux ans et demi. Ma ténacité à cette thèse est grâce à toi et je suis heureux que l'on partage la fin de cette aventure avec notre enfant.

Sigles et Abréviations

A

Acétyl Coa : Co-enzyme A acétylée
Ac : Acétyle
ACN : Acétonitrile
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
Alr : Alanine racémase
Anh. : Anhydre
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
APTS : Acide *para*-toluènesulfonique
ASPRE : *Active site Serine recognizing enzymes*
Atm : Une atmosphère, unité de pression
ATP : Adénosine triphosphate

B

BacA : *Prephenate decarboxylase*
BDE : *Binding dissociation energy*
Boc : *tert*-Butoxycarbonyl
BMM : Basse masse moléculaire
BOP : (Benzotriazol-1-yloxy)*tris*(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate
BQ : Benzoquinone
br : *Broad*
BSA : *bis*Triméthylsilylacétamide
Bz : Benzoyle

C

C₅₅-P : Undécaprényl-phosphate
C₅₅-PP : Undécaprényl-pyrophosphate
CapA/CapB/CapC : Enzyme de la capsule bactérienne
Cat. : Catalyseur
CCM : Chromatographie sur couche mince
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMI₅₀ : Concentration minimale inhibitrice à 50%
CMI₉₀ : Concentration minimale inhibitrice à 90%
CoA : Co-enzyme A
CTP : Cytosine triphosphate
CuAAC : *Copper(I) azide-alkyne cycloaddition*

D

3D : Trois dimensions
DABCO : 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
D-Ala : D-Alanine
DAT : D-Aminotransférase
DAPE : Diaminopimelate épimérase
DCE : 1,2-Dichloroéthane
DCM : Dichlorométhane
Ddl : D-Ala-D-Ala ligase
DEAD : Diéthyle azodicarboxylate
DEM : Diéthoxyméthane
D-Glu : Acide D-glutamique
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DIPEA : Diisopropyl éthylamine
D-Lys : D-Lysine
DMA : Diméthylacétamide
DMF : *N,N*-Diméthylformamide
DMP : 2,2'-Diméthoxypropane
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DOS : *Diversited-oriented synthesis*
dTTP : Thymidine triphosphate

E

EA : *Ethyl Acetate*
E. coli : *Escherichia coli*
E. faecium : *Enterococcus faecium*
E. faecalis : *Enterococcus faecalis*
Et : Ethyle
ETMs : *Electron transfer mediators*
EtOH : Ethanol

F

FAD : Flavine adenine dinucléotide
F6P : Fructose-6-phosphate
FDA : *Food and Drug Administration*
FDTS : *Flavin-dependant thymidylate synthase*
FolC : Folylpolyglutamate synthase

FPP ou C₁₅PP : Farnésyl pyrophosphate
FstW : *Lipid II flippase*

G

GDP : Guanosine diphosphate
GEA : Groupement électro-attracteur
GlcNAc : Glucosamine *N*-acétylée
Glc-6-P : Glucosamine-6-phosphate
Glc-1-P : Glucosamine-1-phosphate
GlcNAc-1-P : *N*-acétyl-glucosamine-1-phosphate
GLmS : Glucosamine-6-phosphate synthase
GLmM : Glucosamine mutase
GlmU : Glucosamine-1-phosphate transferase
Glu : Acide glutamique
Gly : Glycine
GMP : Guanosine monophosphate
GP : Groupement protecteur
GSK : GlaxoSmithKline
GT : Glycosyltransférase
GTP : Guanosine triphosphate

H

His : Histidine
HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HMM : Haute masse moléculaire
HMPA : Hexaméthylphosphoramidate
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HPLC : *High-performance liquid chromatography*
HRMS : *High-resolution mass spectrometry*
HSAB : *Hard and Soft acids and bases*
HTS : *High-throughput screening*

I

IBX : 2-Iodoxybenzoic acid

IC₅₀ : Concentration requise pour avoir 50% d'inhibition d'une enzyme

Inhib. : Inhibition

iPr : *iso*Propyle

iPrOH : *iso*Propanol

IPP ou C₅PP : *Iso*Pentényl pyrophosphate

IR : Infra-rouge

K

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

L

L-Ala : L-Alanine

LC-MS : *Liquid chromatography with mass spectrometry*

LDA : Lithium diisopropylamide

L-Gln : L-Glutamine

L-Glu : Acide L-glutamique

L-Lys : L-Lysine

L-Ser : L-Sérine

LPS : Liposaccharides

M

m : *Medium*

M : Concentration molaire en mol.L⁻¹

M. bovis : *Mycobacterium bovis*

mDAP ou mAzpm : *méso*-Diaminopimélique

Me : Méthyle

MeOH : Méthanol

MGT : Monofunctional glycosyltransferase

M.O. : Micro-ondes

MraY : Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase

MurA : UDP-GlcNAc énoypyruvyltransférase

MurB : UDP-GlcNAc énoypyruvyl réductase

MurC : UDP-*N*-Acétyl muramate L-alanine ligase

MurD : UDP-*N*-Acétyl muramoyl-L-alanine-D-glutamate ligase

MurE : UDP-*N*-Acétyl muramoyl-L-alanine-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase

MurF : UDP-*N*-Acétyl muramoyl tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase
MurG : UDP-*N*-Acétyl glucosamine-*N*-acétylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undécaprenol *N*-acétylglucosamine transférase
MurI : Glutamate racémase
MurJ: *Lipid II flippase*
MurNAc : Acide muramique *N*-acétylé
Mpl : Enzyme peptide ligase
MS : Spectrométrie de masse
M. Tuberculosis (Mtb) : *Mycobacterium tuberculosis*

N

N₃ : Groupement azoture
NAG : *N*-Acétylglucosamine
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAM : *N*-Acétylmuramique
NBS : *N*-Bromosuccinimide
NOESY : *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*
Nū : Nucléophile

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Ox. : Oxydant

P

PAP2 : Enzyme phosphatase
PBPs : *Penicilin binding proteins*
PCC : Pyridinium chlorochromate
PDB : Base de données de protéines
PEP : Phosphoenol-pyruvate
Ph : Phényle
P_i : phosphate inorganique
P. mirabilis : *Proteus mirabilis*
POM : pivaloyl oxyméthyl
PP_i : Pyrophosphate inorganique
PPTS : Pyridinium *p*-toluènesulfonate
PT : Peptidotransférase

R

R&D : Recherche et développement
Rdt : Rendement
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RuAAC : *Ruthenium azide-alkyne cycloaddition*

S

s : *Strong*
SAR : *Structure activity Relationship*
S. Aureus : *Staphylococcus aureus*
S_N1 ou 2 : Substitution nucléophile d'ordre 1 ou 2
Sol. : Solution
S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

T

ta : Température ambiante
TBAF : Fluorure de *tert*-butylammonium
TBAB : Bromure de *tert*-butylammonium
TBDMS ou TBS : *tert*-Butyldiméthylsilane
TBDPS : *tert*-Butyldiphénylsilane
tBu : *tert*-Butyle
tBuOH : *tert*-Butanol
TES : Triéthylsilane
Temp. : Température (°C)
Tf : Triflate
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
THP : Tétrahydropyrane
TLC : *Thin-layer chromatography*
TMS : Triméthylsilane
TMSOTf : Triflate de triméthylsilane
Tps : Unité de temps en minutes, heures ou jours
T_R : Temps de rétention
Ts : Tosylate

U

UDP : Uridine diphosphate
UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine

UDP-MurNAc ou UDP sucre : Uridine diphosphate <i>N</i> -acétylmuramoyl	V
UDP-MurNAc (pentapeptide) : Uridine diphosphate <i>N</i> -acétylmuramoyl (pentapeptide)	VanX : amide ligase
UMP : Uridine monophosphate	W
UppS : Undécaprényl pyrophosphate synthase	
UppP : Undécaprényl pyrophosphate phosphatase	w : <i>Weak</i>
UTP : Uridine triphosphate	X
UV : Ultra-violet	
	X : Halogène

Table des matières

Remerciements	3
Sigles et Abréviations.....	5
Table des matières	9
Introduction Générale	12
Chapitre 1: Vers de nouvelles cibles bactériennes.....	17
I Les antibiotiques et l'antibiorésistance	17
A. Généralités sur les antibiotiques	17
1. Les débuts des antibiotiques	17
2. Quelques définitions	18
3. Structure de la bactérie	19
B. Les résistances bactériennes	21
1. Généralités	21
2. Principaux mécanismes de la résistance bactérienne	22
C. Les cibles bactériennes	23
D. La chaîne peptidoglycane	26
1. Structure de ce biopolymère	26
2. La biosynthèse de la chaîne peptidoglycane.....	27
II Les Mur Ligases : MurC-F, de nouvelles cibles innovantes.....	36
A. Leur rôle, leur topologie	36
B. Les paramètres enzymatiques et les données mécanistiques.....	37
C. La structure cristallographique des enzymes MurC-F	41
D. Inhibiteurs des MurC-F ligases.....	44
1. Inhibiteurs ciblant une seule Mur Ligase	44
2. Inhibiteurs multiples.....	54
III Objectifs de la thèse.....	59
Chapitre 2 : Synthèse orientée vers la diversité structurale.....	65
I Généralités	65
A. Objectifs	65
B. La réaction de Huisgen.....	69
II Rétrosynthèse de la Famille I	71
III Synthèse des analogues de la Famille I	72
A. Synthèse du 5'-azido-5'-déoxy-uridine	72
B. Mesure de l'activité inhibitrice des composés de la famille I sur des Mur ligases.....	82

1. Méthodologie des essais biologiques	82
2. Application aux analogues de la famille I	84
3. Identification des inhibiteurs multiples.....	87
4. Structure tridimensionnelle des composés 34 et 36 avec la MurE.....	87
IV Rétrosynthèse de la Famille II	89
V Synthèse des analogues de la Famille II	89
A. Synthèse du 5'-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-uridine	89
B. Synthèse des divers azotures 68-70	90
C. Synthèse des analogues de la Famille II.....	95
1. La réaction de CuAAC des divers azotures synthétiques.....	95
2. Un analogue contenant un phényle en position 5 de l'uridine	97
3. Synthèse des dérivés acide dicarboxyliques de la Famille II	99
D. Evaluations biologiques des analogues de la Famille II	101
1. Test one pot sur les MurA-F.....	101
2. Test one pot sur une enzyme ciblée.....	104
VI Synthèse d'un analogue de type cyclobutène-dione.....	105
VII Conclusion.....	107
Experimental part of Chapter 2	112
Chapitre 3: Nouvelle stratégie de synthèse d'analogues carbanucléosides visant les Mur Ligases ..	228
I Objectifs	228
II Etudes in silico de carbanucléosides potentiellement actifs des Mur ligases	229
III Etat de l'Art sur les voies d'accès aux carbanucléosides.....	232
A. Voies synthétiques convergentes.....	233
B. Voies synthétiques linéaires	235
C. Stratégies de synthèse du pseudo-sucre carbocyclique à 5 chaînons.....	235
D. Notre stratégie de synthèse	238
IV Rétrosynthèse proposée.....	241
V Synthèse du β -céto ester cyclopentanone vinylique	242
A. Synthèse du β -cétoester acyclique.....	242
B. La cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée	247
1. Généralités sur l'activation C-H	247
2. Généralités sur l'activation C-H allylique	248
3. Application de l'activation C-H allylique au laboratoire	253
C. Conclusion	258

VI Rétrosynthèse pour les molécules de la chimiothèque par la stratégie connue	258
VII Synthèse du composé 2 visant les Mur Ligases	259
A. La synthèse du cyclopentyl vinylique	259
B. La synthèse du carbanucléoside.....	261
C. Synthèse de l'alcène portant le motif ester 3,5-phénylique de méthyle.....	263
D. La métathèse croisée d'oléfines et l'étape de déprotection.....	264
E. Conclusion	267
V Conclusions	268
Experimental part of Chapter 3.....	270
Chapitre annexe : Synthèse d'analogues indoliques visant les Mur ligases.	296
I Principes et Généralités	296
II Synthèse des dérivés indoliques.....	298
A. Rétrosynthèse.....	298
B. Synthèse des dérivés indoliques.....	298
C. Evaluations biologiques	300
D. Conclusion	301
Experimental part of Chapter annexe	302
Conclusion Générale.....	310
Articles et communications de l'auteur	312
Résumé	314

Introduction Générale

Actuellement, le problème des résistances aux antibiotiques est devenu une urgence mondiale pour la santé publique. Les réels progrès de la médecine face aux infections bactériennes sont impressionnants, mais nombreuses sont les souches qui continuent de se développer malgré les traitements antibiotiques mis en œuvre. La communauté scientifique s'inquiète de l'efficacité des principes actifs antibactériens dont l'on dispose et du manque de ces derniers qu'il pourrait y avoir dans les prochaines années. Les bactéries nous mettent à mal. Leur développement est tel que des multirésistances apparaissent, dues à une mauvaise utilisation d'antibiotiques et cela de manière massive. Depuis le lancement de son plan d'action mondiale en 2015 sur les résistances antimicrobiennes, l'Organisation Mondiale de la Santé considère cette menace comme une des priorités pour la santé publique. Face à ce problème, de nombreuses stratégies existent pour endiguer ce phénomène. Parmi elles, le développement de nouveaux agents antibactériens contre des cibles innovantes peu explorées est un moyen efficace dans cette lutte.

Dans ce contexte, les enzymes responsables de la biosynthèse de la paroi bactérienne sont des cibles de choix pour la conception de nouvelles molécules actives. En effet, ces enzymes sont spécifiques, essentielles à la survie et sont présents uniquement dans les cellules procaryotes, idéal pour établir un profil d'inhibition ciblé.

Le laboratoire s'intéresse plus particulièrement à une petite famille d'enzymes appelés les Mur ligases (MurC-F). Ces enzymes catalysent les premières étapes cytoplasmiques de la biosynthèse de la chaîne peptidoglycane, principal constituant de la paroi bactérienne.

Dans la littérature, il existe plusieurs familles d'inhibiteurs des Mur ligases mais leurs propriétés antibactériennes sont parfois limitées et faibles. Par conséquent, nous avons envisagé diverses approches synthétiques pour de nouveaux analogues des substrats des Mur ligases et leurs propriétés ont été évaluées en collaboration avec l'équipe du Professeur Urmi Bajpai (Inde) sur les MurA-F. La stratégie envisagée repose donc sur la synthèse orientée vers la diversité moléculaire d'analogues du substrat naturels (UDP-MurNAc) *via* différentes étapes synthétiques clefs comme une réaction de cycloaddition entre un alcyne et un azoture, conduisant à des dérivés de type 1,2,3-triazole donnant ainsi accès à une large gamme de châssis moléculaire.

Le premier chapitre de cette thèse sera consacré d'une part à des généralités sur les antibiotiques avec l'apparition des résistances et les mécanismes associés. Les cibles des antibiotiques connus seront détaillées ainsi que celles responsable de la biosynthèse de la paroi bactérienne. D'autre part, ce chapitre sera dédié aux différentes Mur ligases. Leurs structures et leurs paramètres enzymatiques seront détaillées ainsi qu'un Etat de l'Art concernant les inhibiteurs de ces enzymes.

Un deuxième chapitre sera dédié à l'obtention des composés 5'-triazole-5'-deoxy-uridine substitués (Famille I) et 5'-O-methylethertriazole-uridine substitués (Famille II). Ce chapitre présentera la voie de synthèse des différents analogues des familles I et II. Une extension de ce

chapitre portera sur l'élaboration d'un analogue contenant un noyau cyclobutene-1,2-dione en tant que bioisostère d'un phosphate. Enfin, les résultats biologiques *in vitro* sur les MurA-F ligase issues de *Mycobacterium tuberculosis* pour les molécules synthétisées seront présentés.

Un troisième chapitre sera consacré au développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse donnant accès à des analogues carba-nucléosides dont une étape clé est la cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée. Une chimiothèque de carba-nucléosides a été criblée virtuellement visant les Mur Ligases en collaboration avec l'équipe du Professeur Andrzej Bojarski (Pologne) dont la synthèse d'un analogue de cette chimiothèque a été réalisée.

Un dernier chapitre annexe sera dédié à la synthèse d'une petite série de dérivés indoliques visant potentiellement la poche à ATP des Mur Ligases.

Chapitre 1

Chapitre 1: Vers de nouvelles cibles bactériennes.

I Les antibiotiques et l'antibiorésistance

A. Généralités sur les antibiotiques

1. Les débuts des antibiotiques

Au milieu du XVII^{ème} siècle, les premières formes de vie minuscules furent observées par Antoni Van Leeuwenhoek. Ses observations montrèrent pour la première fois des micro-organismes âgés de plusieurs millions d'années sur Terre.¹ Ses recherches marquèrent un point historique important car ils initièrent les disciplines de la microbiologie et de la bactériologie. Une succession d'événements créa un engouement avec de grandes avancées dans le domaine de la microbiologie. A l'époque, les savants observèrent plus en détail les micro-organismes qui sont pathogènes souvent lors de grande épidémie. En 1835, Agostino Bassi prouva l'origine microbienne (*Beauveria bassiana*) de la maladie des vers à soie appelée muscardine.² En 1854, les travaux de Filippo Pacini montrèrent qu'il avait pu isoler le bacille du choléra (*Vibrio cholerae*) et prouvèrent son rôle d'agent pathogène alors que la troisième pandémie de choléra (1852-1860) fit de nombreux morts.³ Par ces premières découvertes, la microbiologie a connu un véritable essor initié par plusieurs personnages marquants. Robert Koch, l'un des fondateurs de la bactériologie, prouva le rôle de plusieurs bactéries pathogènes et notamment celles responsables de la tuberculose en isolant des germes (appelé « bacille de Koch », *Mycobacterium Tuberculosis*), ce qui lui valut le prix Nobel en 1905.⁴ Au début du XX^{ème} siècle, la syphilis causée par la bactérie *Treponema pallidum* fit de nombreux morts en Europe. Paul Ehrlich, colauréat du prix Nobel de médecine en 1908 élaborait des composés arsenicaux contre la maladie.⁵ Ses premiers antibiotiques de synthèse bien qu'ils soient mieux tolérés que le traitement à base de mercure et d'iodure de potassium, restèrent très toxiques et nécessitèrent une recherche plus approfondie. Cette période est très importante dans l'histoire des antibiotiques car elle marqua la naissance du premier antibiotique produit de manière industrielle à travers le monde. En 1928, Alexander Fleming fit une découverte majeure en utilisant une nouvelle approche. Il observa qu'une souche de *Penicillium notatum* était capable d'inhiber la croissance d'une colonie de *Staphylococcus Aureus* au cours de son développement.⁶ En 1940, Howard Florey et Ernst Chain développèrent cette découverte afin d'isoler

¹ Porter, J.R. Anthony Van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria *Microbiol. Rev.* **1976**, 40, 260-269.

² Mazzarello, P. Bassi, Agostino, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, **2013**.

³ Pacini, F. Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Memoria del dott. Filippo Pacini: lettera alla Società medico-fisica di Firenze nella seduta tip.* Federigo Bencini **1854**, 397-405.

⁴ Koch, R. *Berliner klinische Wochenschrift* **1882**, 428-445.

⁵ Debue-Barazer, C. « A l'origine de la chimie thérapeutique française : La Chimiothérapie allemande » Les implications scientifiques et industrielles du succès de la stovaine®. Ernest Fourneau (1872-1949) et la chimie des médicaments en France, *Gesnerus* **2007**, 64, 24-53.

⁶ Brezinski, C. *Histoires de sciences : inventions, découvertes et savants*, L'Harmattan, **2006**.

la substance responsable de cette inhibition : la pénicilline G (Figure 1).⁷ Pour ces travaux, les trois scientifiques reçurent le prix Nobel de médecine en 1945.

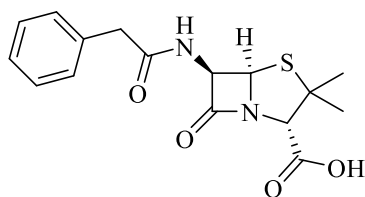


Figure 1 : Structure de la pénicilline G

La découverte de ces premiers antibiotiques a été un événement incontournable pour la médecine moderne et a permis d'établir les bases de la recherche actuelle de nouveaux médicaments. De 1940 jusque dans les années 60, cette ère était considérée comme l'âge d'or dans la découverte d'un grand nombre de familles d'antibiotiques de type bactériostatique (qui inhibent la croissance) ou bactéricides (qui tuent la bactérie).⁸ Au fil des années qui suivirent la mise sur le marché de ces antibiotiques, les bactéries s'adaptèrent et déployèrent les moyens nécessaires pour survivre. La sélection naturelle permit à certaines souches de muter en développant des mécanismes de résistances. Face aux agents antibactériens, les bactéries produisent de nouvelles générations résistantes. Dès l'utilisation massive de la pénicilline, on constata une augmentation du nombre de souches bactériennes résistantes. Ce phénomène a été amplifié par l'usage inadapté et abusif d'autres antibiotiques au cours de ces dernières années.⁹ Aujourd'hui, la communauté scientifique craint une crise sanitaire d'envergure due à des souches qui pourraient résister à tous les antibiotiques connus. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) considère cette problématique comme l'une des plus graves menaces sur la santé mondiale. Un plan d'action mondial a été lancé en 2015 se basant sur la surveillance,¹⁰ la prévention¹¹ et la recherche.

2. Quelques définitions

Les « **antibiotiques** » sont des substances naturelles ou synthétiques qui génèrent une toxicité sur les bactéries. Ils sont conçus contre les cellules procaryotes tout en minimisant les effets secondaires sur l'hôte infecté.¹² Les antibiotiques se divisent en deux catégories : les « **bactéricides** » capables de tuer une bactérie ; et les « **bactériostatiques** » qui inhibent la croissance bactérienne

⁷ Ligon, B.L. Penicillin: Its discovery and early development. *Sem. Pediatr. Infect. Dis.* **2004**, *15*, 52-57.

⁸ Walsh, C.T.; Wright, G. Introduction: Antibiotic Resistance *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 391-394.

⁹ Ventola, C.L. The antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and threats *Pharm. Therapeut.* **2015**, *40*, 277-283.

¹⁰ WHO Antimicrobial resistance *Global report on surveillance* **2014**.

¹¹ WHO Ranking of medically important antimicrobials of risks management of antimicrobial resistance due to non-human use *critically important antimicrobials for Human medicine 5th Revision* **2016**.

¹² (a) Vuillemin, J.-P. Compte-rendu de la 18^{ème} session, 2nd partie *Antibiose et symbiose Notes et Mémoires* **1890**, *11*, 525-543 ; (b) Bentley, R.; Bennet, J.W. What is an antibiotic? *Adv. Appl. Microbiol.* **2003**, *52*, 303-331.

mais ne tuent pas la bactérie. Un antibiotique est aussi caractérisé par quelques paramètres :

- Le **spectre d'activité** qui spécifie le nombre de différentes souches sur lesquelles il agit ;
- La **concentration minimale inhibitrice** (CMI) définie par la concentration minimale permettant d'inhiber la croissance bactérienne dans sa totalité. Il y a deux terminologies qui se déclinent : la « CMI₅₀ » qui est la plus faible concentration inhibant 50% des populations bactériennes et la « CMI₉₀ » qui est la plus faible concentration qui inhibe à 90%. On utilise un autre nom pour la CMI₅₀, l'IC₅₀ (pour *inhibition concentration at 50%*, en anglais) qui désigne la même chose mais peut être aussi utilisé pour évaluer une activité enzymatique.
- La **concentration minimale bactéricide** (CMB) est définie par la plus faible concentration qui détruit 99% des bactéries. Les CMI et les CMB sont spécifiques à un antibiotique pour une souche donnée.

3. Structure de la bactérie

Quelques soient leurs tailles ou leurs formes, les bactéries sont des espèces protozoaires ne contenant pas de noyaux ou d'organites tels que les mitochondries, les réticulums endoplasmiques ou les appareils de Golgi, ceci à la différence des espèces eucaryotes (Schéma 1).

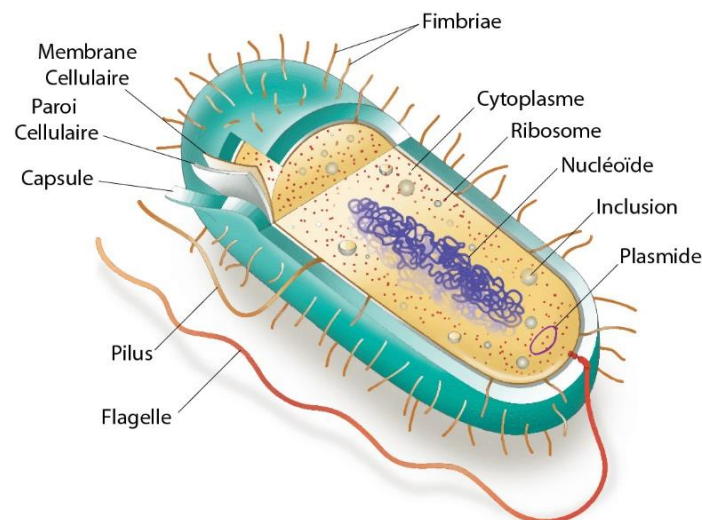


Schéma 1 : Structure générale d'une bactérie¹³

La synthèse des protéines et des acides nucléiques ont lieu dans le cytoplasme de la bactérie et le support du matériel génétique est stocké dans le **nucléoïde** : une zone dense contenant un long filament d'acide désoxyribonucléique (ADN). On retrouve le **plasmide**, un filament d'ADN circulaire double brin extra-chromosomique qui, par définition, est distinct de l'ADN chromosomique. Une des spécificités des bactéries repose sur leur protection du milieu extracellulaire par une paroi de structure complexe.¹³ Cette paroi externe est composée de trois couches : une **membrane plasmique**, une

¹³ Review of Medical Microbiology and Immunology, 14^e Edition, Edition Appleton & Lange, Warren Levinson, 2016.

paroi cellulaire et une **capsule**. Ceci confère à la bactérie plusieurs propriétés physiques telles qu'une bonne élasticité, une bonne rigidité et une protection contre la pression osmotique du milieu intracellulaire. Les bactéries ont des **flagelles** sur la paroi cellulaire nécessaires pour leurs mouvements. Il ne faut pas les confondre avec les **pili** ou les **fimbriae** qui ont pour rôle d'établir des interactions cellulaires avec d'autres cellules. On retrouve deux types d'enveloppes bactériennes basées sur une méthode de coloration appelée « la coloration de Gram » (Schéma 2).¹⁴

La paroi **Gram positive** (Gram+) possède une structure unimembranée. Elle contient une membrane plasmique avec un espace périplasmique et une épaisse couche d'un biopolymère appelée la chaîne peptidoglycane ou « muréine ».

La paroi **Gram négative** (Gram-) possède une structure bimembranée. Elle possède une membrane plasmique, un espace périplasmique et une chaîne peptidoglycane qui est plus fine. La paroi contient en plus une **membrane externe**. C'est cette membrane qui est en contact avec l'extérieur et qui confère à ces bactéries une pathogénicité parfois plus difficile à traiter.

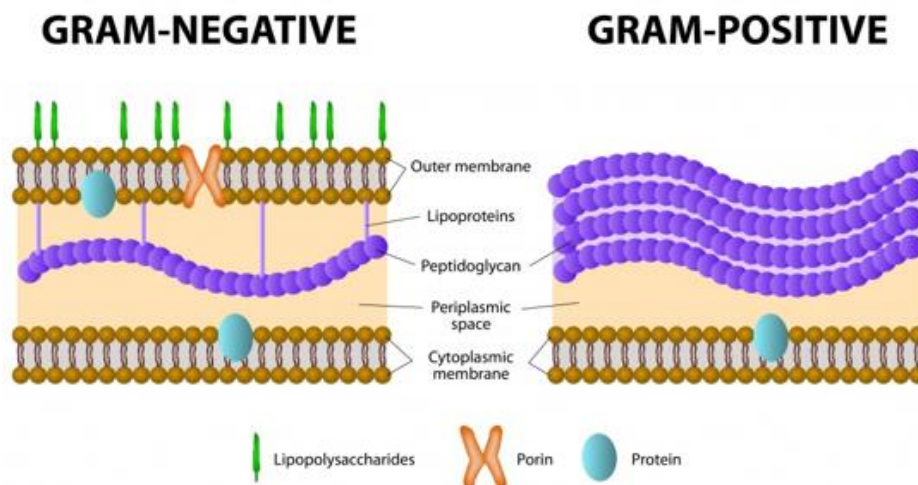


Schéma 2 : Enveloppes Gram négatives et Gram positives¹³

Chez les bactéries de type Mycobactéries, il y a une exception où leurs parois ne réagissent pas à la coloration de Gram.¹⁵ Elles sont constituées aussi du peptidoglycane mais attaché à une chaîne arabinogalactane, constituée d'acides mycoliques.

¹⁴ Ryan, K.J.; Ray, C.G. *Sherris Medical Microbiology*, 4th Edition, McGraw Hill Editors, 2004.

¹⁵ Abrahams, K.A.; Besra, G.S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target *Parasitology* 2018, 145, 116-133.

B. Les résistances bactériennes

1. Généralités

La prise d'antibiotiques va modifier le microbiome et contribuer à la croissance d'un réservoir de gènes de résistances.¹⁶ Cette résistance biologique n'est pas spécifique des bactéries responsables de maladie mais elle touche aussi les bactéries non pathogènes qui composent le microbiome de l'hôte. Ces bactéries peuvent transmettre par **transfert de gène**, la résistance à des bactéries pathogènes, ce qui rend parfois le traitement par antibiotiques plus compliqué.¹⁷ On distingue principalement trois lignes de défense chez les bactéries :¹⁸

- La résistance **extracellulaire** par les **biofilms bactériens** pour une souche donnée ou une communauté de souches vivant en symbiose. Ces biofilms servent de matrice protectrice ayant pour but d'empêcher ou de ralentir la diffusion de tous agents toxiques pour la/les bactérie(s). Cette première ligne de défense est une barrière physique contre son environnement extérieur grâce à une pénétration restreinte d'agents toxiques, un gradient physiologique ou encore un état phénotypique du biofilm qui permet à des cellules d'être persistantes ;
- La résistance **naturelle** ou « **innée** » d'une même souche et même espèce est définie par le fait qu'un antibiotique n'agit pas dès sa première utilisation. Cette propriété est due soit à l'absence de la cible vis-à-vis de l'antibiotique, soit à un obstacle qui empêche l'accès à la cible.
- La résistance **acquise** est spécifique d'une souche particulière. Elle résulte d'une mutation bactérienne c'est-à-dire de l'acquisition d'un gène de résistance à un ou plusieurs antibiotiques à cause de l'utilisation de ce(s) dernier(s). La résistance acquise peut être obtenue par différents facteurs de résistances dont nous allons détailler les plus répandus.¹⁹

La **résistance bactérienne** est l'aptitude d'une bactérie à continuer à se développer en présence d'un antibiotique alors que ce dernier devrait lui être fatal.²⁰ C'est une pression de sélection par l'action d'antibiotiques qui génère cette résistance selon un ensemble de mécanismes.

¹⁶ Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* **2010**, *74*, 417-433.

¹⁷ Zaman, S.B.; Hussain, M.A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K.T.; Hossain, N. A review on antibiotic resistance: Alarm Bells are ringing *Cureus* **2017**, *9*, 1-9.

¹⁸ (a) Zhou, G.; Shi, Q.-S.; Huang, X.-M.; Xie, X.-B. The three bacterial lines of defence against antimicrobial agents *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 21711-21733; (b) Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents *Nat. Rev. Drug Dis.* **2003**, *2*, 114-122; (c) Vega, N.M.; Gore, J. Collective antibiotic resistance: Mechanisms and implications *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *21*, 28-34; (d) Peterson, E.; Kaur, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens *Antimicrob. Resist. Chemo. Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1-21.

¹⁹ (a) Woodford, N.; Ellington, M.J. The emergence of antibiotics emergence by mutation *Clin. Microbiol. Inf.* **2007**, *13*, 5-18; (b) Richardson, L.A. Understanding and overcoming antibiotic resistance *PLoS Biol.* **2017**, *15*, 8, e2003775; (c) Hughes, D.; Andersson, D.I. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance *Ann. Rev. Microbiol.* **2017**, *71*, 579-596; (d) Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians *J. of Anaes. Clin. Pharm.* **2017**, *33*, 300-305.

²⁰ Jovetic, S.; Zhu, Y.; Marcone, G.L.; Marinelli, F.; Tramper, J. β -lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defence *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 596-604.

2. Principaux mécanismes de la résistance bactérienne

Les résistances acquises d'une bactérie causées par les antibiotiques sont la conséquence d'une ou plusieurs mutations (Schéma 3) :

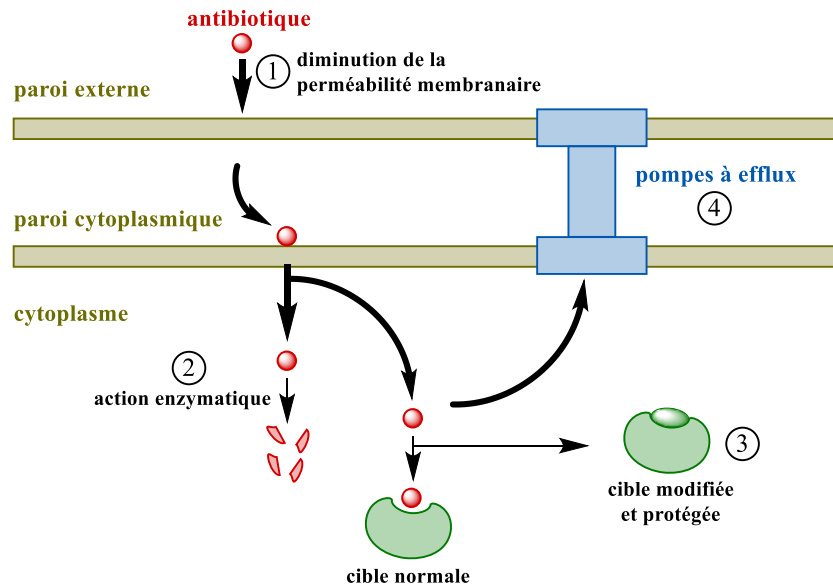


Schéma 3 : Les différents mécanismes de résistances¹⁸

- (1) Pour qu'un antibiotique agisse, il doit parfois atteindre sa cible en traversant les membranes bactériennes. Certaines bactéries contiennent des porines, des protéines membranaires sous la forme de canaux qui permettent le passage de différents nutriments et notamment le passage des antibiotiques du milieu extérieur. La bactérie peut développer une résistance en modifiant et/ou réduisant le nombre de ces canaux pour empêcher les antibiotiques de passer à travers la membrane.²¹ On retrouve souvent ce phénomène par exemple chez la bactérie *Escherichia Coli*.²²
- (2) Un des mécanismes de défense très connu de souches résistantes est de modifier l'antibiotique par une action enzymatique. Par exemple, les « β -lactamases » sont des enzymes qui hydrolysent le cycle des β -lactames (ex. la pénicilline G, Figure 1) rendant ces molécules inefficaces (Schéma 4).²³ Les β -lactames sont des antibiotiques qui ont pour rôle de stopper la biosynthèse de la paroi bactérienne mais leur forme dégradée n'a pas d'activité biologique sur la cible.

²¹ Pagès, J.M.; James, C.E.; Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 893-903.

²² Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, *1794*, 808-816.

²³ Frère, J.-M. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 385-395.

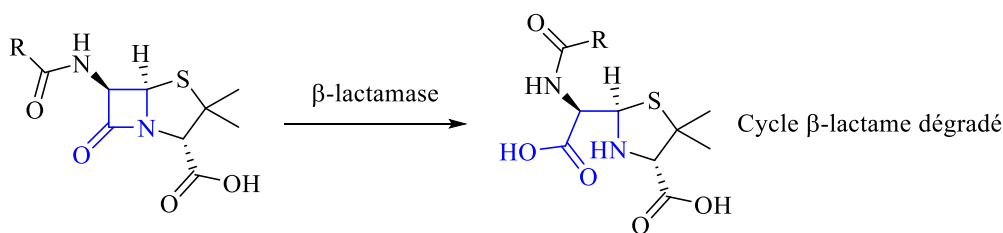


Schéma 4 : Hydrolyse par la β -lactamase¹⁸

- (3) Une bactérie exposée à l'action d'un antibiotique peut réagir en modifiant sa cible. Elle empêche l'antibiotique de se lier au site actif de la cible en modifiant son génome. Cette modification entraîne un changement de la séquence protéique de la cible qui diminue l'efficacité de l'antibiotique.
- (4) Une bactérie est capable de se défendre par excrétion de tous les composés toxiques hors de la cellule. Les protéines membranaires responsables de cet efflux sont appelés les **pompes à efflux**. La bactérie peut devenir résistante par ce phénomène en rejetant un antibiotique hors de la cellule, le rendant alors inefficace.²⁴ Ce mécanisme de résistance peut se cumuler; ce qui a pour conséquence l'apparition de nouvelles souches « *multi-résistantes* ».²⁵

L'émergence de souches résistantes nous pousse à la recherche de nouvelles cibles que nous allons présenter.²⁶

C. Les cibles bactériennes

La plupart de l'arsenal thérapeutique ne cible qu'une petite partie des processus biologiques (Schéma 5).²⁷ Elle se concentre autour de deux zones : les composants du cytoplasme et la paroi cellulaire. Ce sont précisément quatre processus biologiques qui sont ciblés :

²⁴ Poole, K. Efflux pumps as antimicrobials resistance mechanisms *Ann. Med.* **2007**, 39, 162-176.

²⁵ Chethana, G.S.; Hari Venkatesh, K.R.; Mirzaei, F.; Gopinath, S.M. Review on multi drug resistance bacteria and its implication in medical sciences *J. of Biol. & Scien. Op.* **2013**, 1, 32-37.

²⁶ (a) Brown, E.D.; Wright, G.D. Antibacterial drug discovery in the resistance era *Nature* **2016**, 529, 336-343; (b) Hards, K.; Cook, G.M. Targeting bacterial energetics to produce new antimicrobials *Drug Resist. Updat.* **2018**, 36, 1-12.

²⁷ Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 371-387.

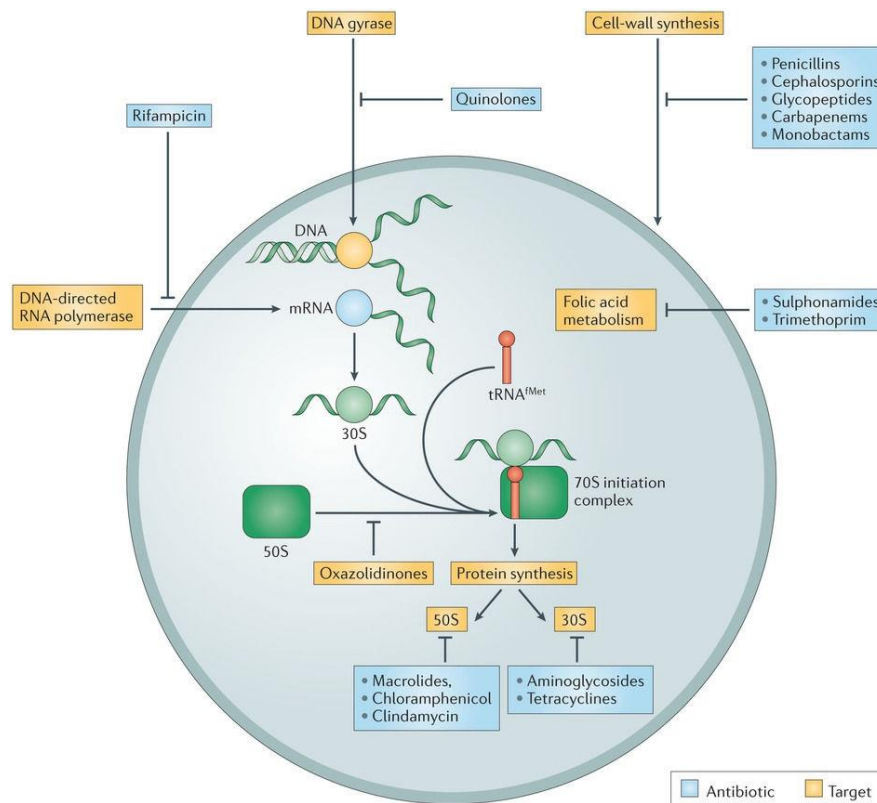


Schéma 5 : Les principales cibles bactériennes²⁷

(1) La réplication de l'ADN en inhibant l'ADN gyrase ou l'ARN polymérase

La réplication de l'ADN est un épisode important pour le développement et la division cellulaire. Elle est nécessaire pour la synthèse des protéines qui démarre avec la transcription de l'ADN bactérien suivi de la traduction de l'ARNm par le ribosome bactérien. Le surenroulement de l'ADN bactérien présent dans le cytoplasme fait intervenir une enzyme spécifique aux cellules procaryotes : l'**ADN gyrase**. C'est une enzyme qui participe au déroulement de l'ADN, ce qui rend possible la suite de la réplication par les autres enzymes de transcription. Elle est considérée comme une cible thérapeutique d'importance contre laquelle la recherche a développé plusieurs familles d'antibiotiques. Un autre épisode important dans la synthèse des protéines est la transcription de l'ADN bactérien par l'**ARN polymérase**. A la différence des cellules eucaryotes où l'on ne distingue pas moins de quatre enzymes jouant le rôle d'ARN polymérase, les bactéries n'en possèdent qu'une seule qui est spécifique, et donc une cible de choix dans la recherche d'antibiotiques.²⁸

(2) Le métabolisme de l'acide folique inhibant la croissance et la division cellulaire

Le **folate**, appelé vitamine B₉ ou acide folique est un cofacteur essentiel dans la synthèse des acides nucléiques qui est utilisé sous sa forme réduite c'est-à-dire en acide dihydrofolique ou en acide

²⁸ Chopra, L. Bacterial RNA polymerase: a promising target for the discovery of new antimicrobial agents *Curr. Opin. Investing. Drugs* **2007**, 8, 600-607.

tétrahydrofolique. Chez les mammifères, il n'y a pas les enzymes nécessaires pour la synthèse du dihydrofolate mais ceci est compensé par l'apport alimentaire.²⁹ A l'inverse, les bactéries sont entièrement capables de le synthétiser car elles possèdent les enzymes responsables de la biosynthèse dont la **dihydroptéroate synthase**.³⁰ Des études au sein de notre laboratoire ont été réalisées sur une nouvelle cible thérapeutique du cycle du folate appelée **thymidylate synthase flavine-dépendante** (FDTS) et ont permis de synthétiser plusieurs familles d'inhibiteurs.³¹

(3) La synthèse des protéines en inhibant l'action du ribosome ou sa forme active

Le **ribosome** est un acteur précieux dans la synthèse des protéines où il joue le rôle de traducteur de l'ARNm en protéine. Même si la variation structurelle est parfois minime, entre le ribosome procaryote et celle d'autres espèces, elle est suffisante pour avoir une bonne sélectivité et pour servir de cible bactérienne.³² Cette cible est grandement exploitée dans la recherche de nouveaux antibiotiques et a permis d'obtenir une grande variété des antibiotiques commercialisés.³³

(4) La biosynthèse de la paroi bactérienne en inhibant plusieurs étapes enzymatiques

La **paroi bactérienne** est une protection importante vis-à-vis de l'environnement extérieur chez les procaryotes. Cette enveloppe permet de garantir une stabilité contre les stress extérieurs.³⁴ Durant la croissance cellulaire, la biosynthèse de la paroi fait intervenir un certain nombre d'enzymes spécifiques qui constituent autant de cibles possibles pour des composés antibactériens. L'intérêt de ces derniers est la lyse bactérienne qui peut être provoquée par l'action d'antibiotiques contre les enzymes responsables de la synthèse de la paroi. Une paroi qui est endommagée ne peut maintenir son intégrité et engendre la mort cellulaire. Depuis la découverte de la pénicilline, une large diversité d'antibiotiques a été développée ciblant la formation des enveloppes bactériennes.

Ces quatre processus biologiques constituent en majorité les cibles bactériennes de nos antibiotiques où les récents développements en cours ont un enjeu déterminant contre les résistances.³⁵ Un des moyens dans la lutte contre ce phénomène de résistance aux antibiotiques est d'explorer de nouvelles

²⁹ Bertacine Dias, M.V.; Santos, J.C.; Libreros-Zúñiga, G.A.; Ribeiro, J.A.; Chavez-Pacheco, S.M. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases *Fut. Med. Chem.* **2018**, *10*, 935-959.

³⁰ Bourne, C.R. Utility of the biosynthetic folate pathway for targets in antimicrobial discovery *Antibiotics* **2014**, *3*, 1-28.

³¹ Chevrier, F. Synthèse d'analogues nucléotidiques visant l'inhibition de la Thymidylate synthase flavine-dépendante *Thèse de doctorat en chimie*, dirigé par Agrofoglio, L.A.; Université d'Orléans, **2018**.

³² Dunkle, J.A.; Xiong, L.; Mankin, A.S.; Cate, J.H.D. Structure of *Escherichia Coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action *PNAS U.S.A.* **2010**, *107*, 17152-17157.

³³ (a) Poehlsgaard, J.; Douthwaite, S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 870-881;

(b) Hong, W.; Zeng, J.; Xie, J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 258-265.

³⁴ (a) Silhavy, T.J.; Kahne, D.; Walker, S. The bacterial cell envelope *Co. Sp. Harb. Pers. Biol.* **2010**, *2*, a000414; (b) Radkov, A.D.; Hsu, Y.-P.; Booher, G.; VanNieuwenhze, M.S. Imaging bacterial cell wall biosynthesis *Ann. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 991-1014.

³⁵ Fernandes, P.; Martens, E. Antibiotics in late clinical development *Biochem. Pharm.* **2017**, *133*, 152-163.

cibles peu ou pas étudiées qui ne présentent pour le moment aucun mécanisme de résistance.³⁶ C'est le cas de certaines enzymes appelées **Mur ligases**, qui sont impliquées dans la biosynthèse de la chaîne peptidoglycane de la paroi bactérienne.

D. La chaîne peptidoglycane

1. Structure de ce biopolymère

Le **peptidoglycane** est un biopolymère présent dans toutes les bactéries qui assure une protection contre le milieu extérieur.³⁷ Une différence notable parmi les bactéries est que la paroi cellulaire est composée d'environ 95% de chaîne peptidoglycane pour les Gram+ et d'environ 20% pour les Gram-. Sa structure chimique complexe est définie par un réseau réticulé dans lequel s'enchaînent une unité répétitive contenant une *N*-acétylglycosamine (NAG) et un acide *N*-acétylmuramique (NAM) lié par une liaison β -1 $\rightarrow$ 4 (Schéma 6).³⁸ Ce peptidoglycane forme un réseau tridimensionnel lié par des réticulations composées de peptides; ici une pentaglycine. Cette réticulation est reliée de part et d'autre avec deux petits peptides qui sont greffés par la fonction acide carboxylique de la MurNAc. La nature chimique de ces deux peptides diffère selon les bactéries : on retrouve un acide aminé non naturel chez les Gram+ (métabolisé dans le cytoplasme), l'acide *méso*-diaminopimélique (*m*-DAP) alors que l'on a une *L*-lysine chez les Gram-.

³⁶ (a) Hughes, D.; Karlén, A. Discovery and preclinical development of new antibiotics *Up. J. of Med. Sci.* **2014**, *119*, 162-169; (b) Coates, A.R.M.; Hu, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections *Bri. J. of Pharm.* **2007**, *152*, 1147-1154.

³⁷ Typas, A.; Banzhaf, M.; Gross, C.A.; Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *10*, 123-136.

³⁸ Vollmer, W.; Blanot, D.; DePedro, M.A. Peptidoglycan structure and architecture *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149-167.

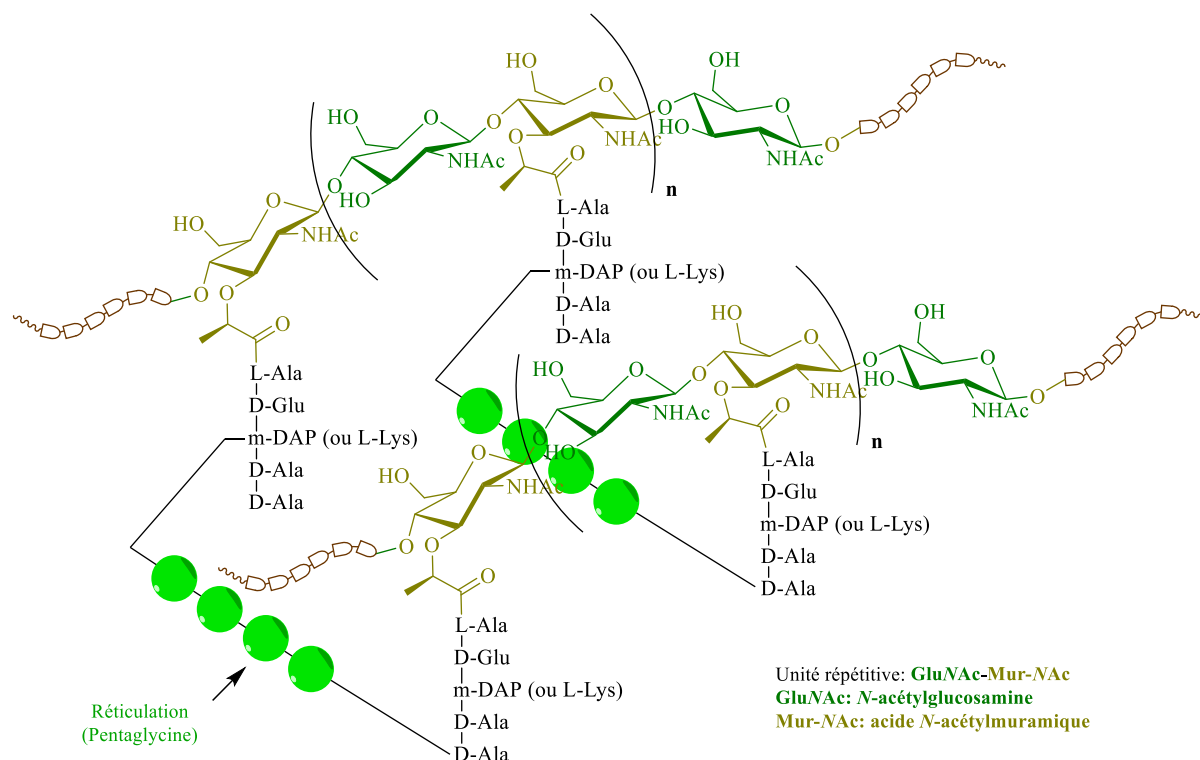


Schéma 6 : Structures du peptidoglycane^{37,38}

Cette structure présente une diversité chimique impressionnante et explique la solidité de la chaîne peptidoglycane chez les bactéries. Plusieurs éléments qui la composent en témoignent comme un saccharide non présent dans les cellules eucaryotes : la MurNAc et des acides aminés de la série D ou même spécifique avec le *m*-DAP. La biosynthèse nécessite donc plusieurs enzymes qui jouent un rôle important pour l'obtention de la muréine dont nous allons présenter chaque étape.

2. La biosynthèse de la chaîne peptidoglycane

La formation de la chaîne peptidoglycane est un processus complexe qui intervient dans chaque partie de la bactérie à savoir : le cytoplasme, la membrane plasmique et le périplasme.³⁹ Ce procédé biologique est commun à toutes les bactéries avec quelques variations mineures comme on peut le constater chez les mycobactéries.⁴⁰ Durant cette biosynthèse, la formation de plusieurs intermédiaires clés est obtenue dans chaque site de la bactérie (Schéma 7). Le point de départ de cette synthèse se trouve dans le cytoplasme avec la conversion du fructose-6-phosphate (**F6P**) en uridine diphosphate-*N*-acétylglucosamine (**UDP-GlcNAc**). Ensuite, une fonction lactoyle puis une chaîne pentapeptidique sont insérées pour former l'uridine diphosphate *N*-acétylmuramoyl-pentapeptide (**UDP-MurNAc-pentapeptide**). Cette entité est fixée sur l'undécaprénylphosphate (**C₅₅P**) de la

³⁹ Van Heijenoort, J. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 503-519.

⁴⁰ Maitra, A.; Munshi, T.; Healy, J.; Martin, L.T.; Vollmer, W.; Keep, N.H.; Bhakta, S. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: an Achilles' heel for the TB-causing pathogen *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43*, 548-575.

membrane plasmique puis est glycosylée pour obtenir le **lipide II**. L'action d'enzymes appelées **flippases** va permettre au lipide II de passer de la face interne vers la face externe de la membrane. Cette étape n'est pas clairement élucidée et continue à faire débats.⁴¹ Ce monomère est ensuite polymérisé par transglycosylation et transpeptidation pour obtenir le peptidoglycane mature. Pour chacune des étapes de cette biosynthèse, nous allons brièvement détailler leur fonctionnement. Le détail des étapes enzymatiques respecte l'ordre naturel de la biosynthèse : du cytoplasme vers le périplasme.

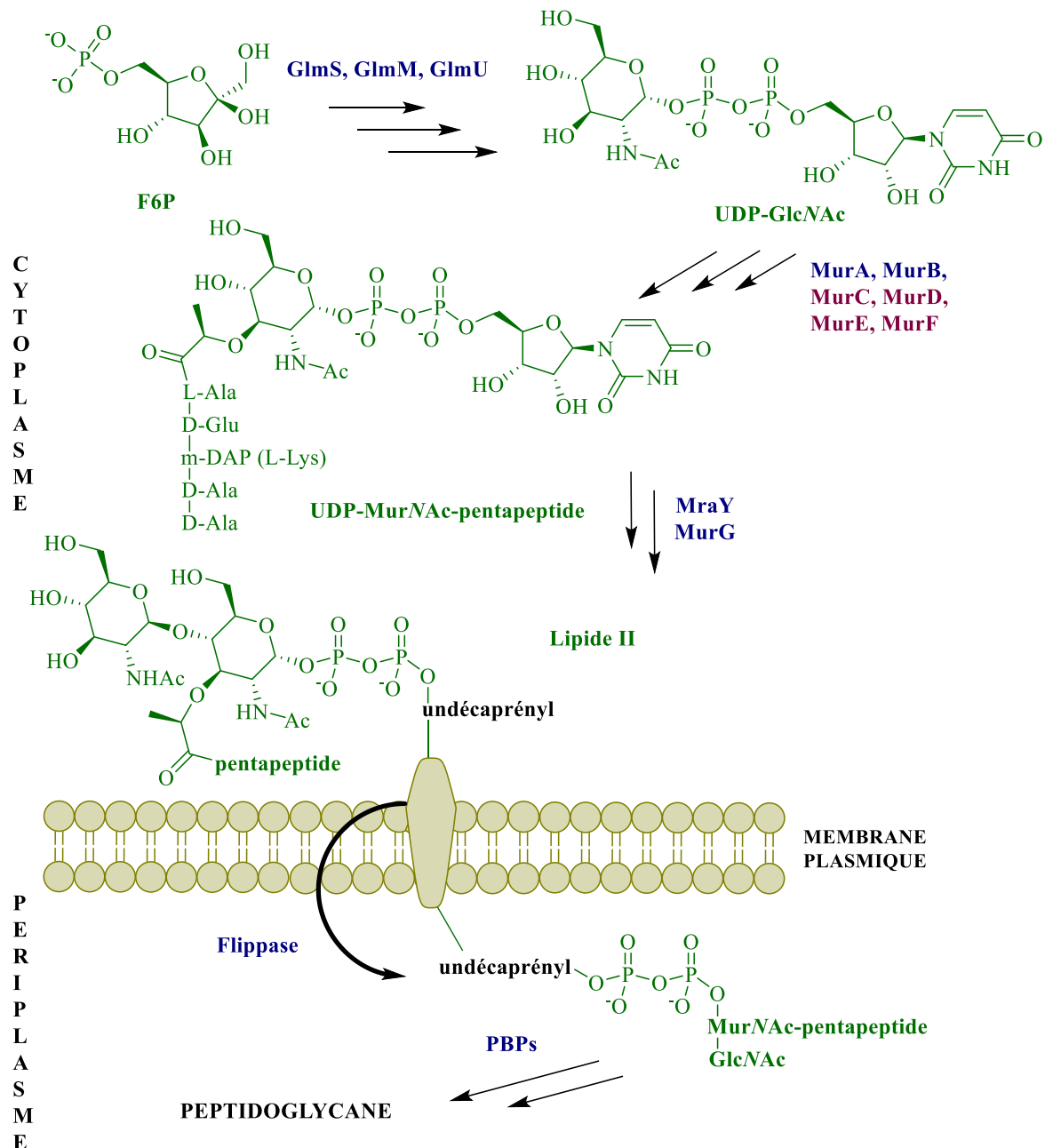


Schéma 7 : Les étapes clés de la biosynthèse du peptidoglycane^{39,44}

⁴¹ Ruiz, N. Lipid flippases for bacterial peptidoglycan biosynthesis *Lipid Insights* **2015**, *8*, 21-31.

i. Les étapes cytoplasmiques

La biosynthèse cytoplasmique est un processus complexe avec plusieurs étapes enzymatiques pour conduire au précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide.⁴² Cette voie biochimique reste similaire à diverses espèces avec de faibles variations, comme on peut le constater avec *Mycobacterium Tuberculosis*.⁴³ On distingue trois intermédiaires clés dans la biosynthèse cytoplasmique :

- La synthèse de l'UDP-*N*-acétylglucosamine à partir du fructose-6-phosphate.
- La synthèse de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique à partir de l'UDP-GlcNAc.
- La synthèse de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique pentapeptide à partir de l'UDP-MurNAc.

L'UDP-GlcNAc est présent aussi dans le métabolisme des eucaryotes puisque le GlcNAc est un important précurseur pour la plupart des biomolécules, mais les voies biochimiques sont différentes chez les procaryotes. Les bactéries mettent en jeu trois enzymes qui sont spécifiques : la **GlmS**, la **GlmM** et la **GlmU** (Schéma 8).

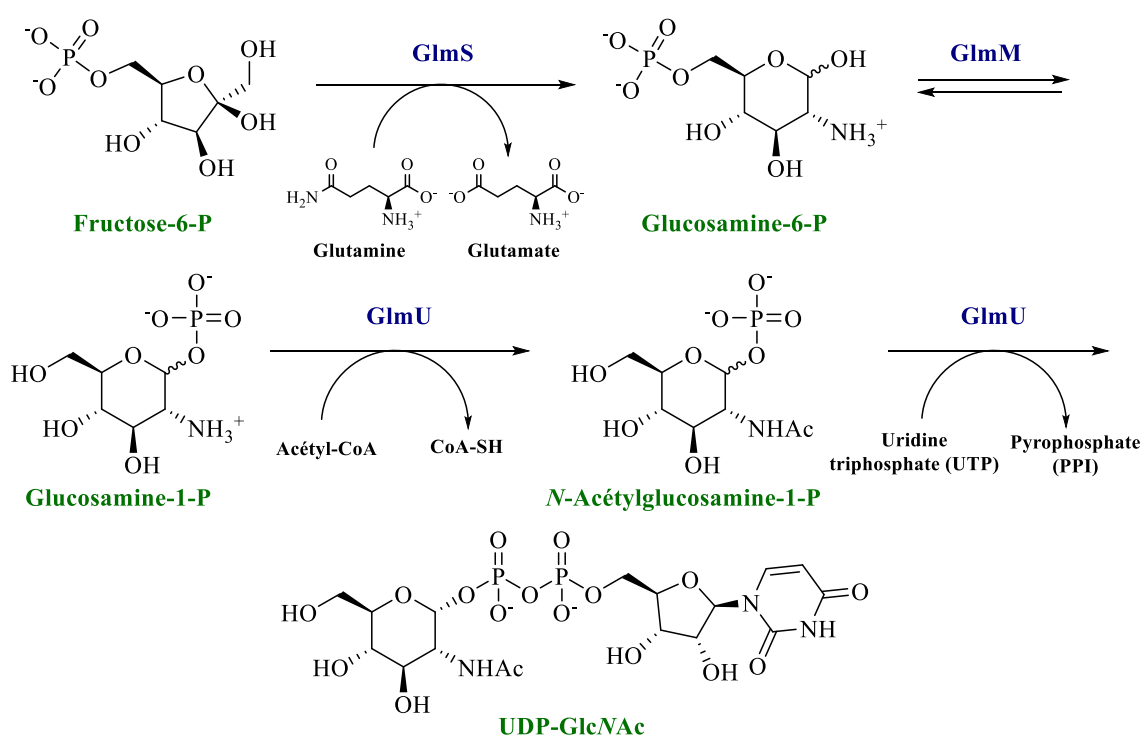


Schéma 8 : Synthèse enzymatique de l'UDP-GlcNAc^{42,44}

La prochaine étape cytoplasmique de la biosynthèse consiste à former l'UDP-MurNAc à partir de

⁴² Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 168-207.

⁴³ Leal Moraes, G.; Cardoso Gomes, G.; Robson Monteiro de Sousa, P.; Nahum Alves, C.; Govender, T.; Kruger, H.G.; Maguire, G.E.M.; Lamichhane, G.; Lamira, J. Structural and functional features of enzymes of *Mycobacterium Tuberculosis* peptidoglycan biosynthesis as targets for drug development *Tuberculosis* **2015**, *95*, 95-111.

l'UDP-GlcNAc grâce à deux enzymes : la **MurA** et la **MurB** (Schéma 9).

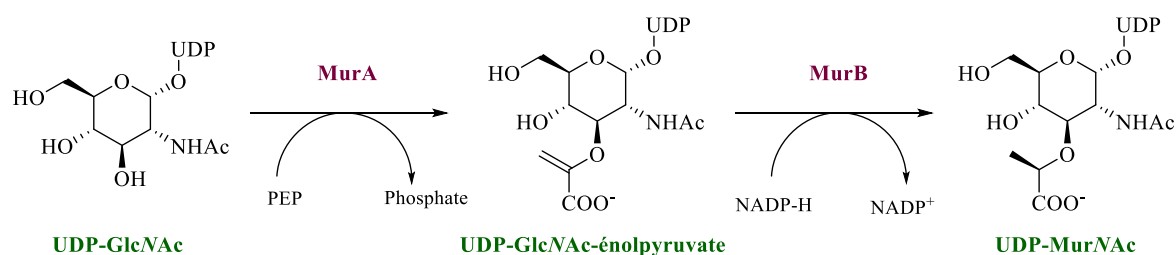


Schéma 9 : Formation de l'UDP-MurNAc catalysée par la MurA et la MurB^{42,44}

Les dernières étapes cytoplasmiques permettent d'obtenir l'UDP-MurNAc pentapeptide à partir de l'UDP-MurNAc grâce aux **Mur Ligases**.

Les enzymes **Mur Ligases (MurC, MurD, MurE et MurF)**⁴⁴ sont regroupées en une famille de quatre enzymes d'acide aminé ligase permettant de former une liaison peptidique en présence de l'acide aminé correspondant. Ces enzymes font l'objet de notre étude et les informations les concernant seront développées ultérieurement. Les étapes cytoplasmiques de la biosynthèse sont la source de récentes études en tant que nouvelles cibles pour développer des agents antibactériens.⁴⁵

ii. Les étapes membranaires

Ces étapes enzymatiques dans la biosynthèse sont particulières puisqu'elles font intervenir des enzymes membranaires. Il y a trois enzymes principales : la **MraY**, la **MurG** et les **flippases** (Schéma 10). Nous allons exposer brièvement leurs rôles ainsi que le **métabolisme de l'undécaprénylphosphate (C₅₅-P)** qui n'est pas entièrement résolu à ce jour.

⁴⁴ Koudmi, I.; Levesque, R.C.; Paradis-Bleau, C. The biology of Mur ligases as an antibacterial target *Mol. Microbio.* **2014**, *94*, 242-253.

⁴⁵ Jukič, M.; Gobec, S.; Sova, M. Reaching toward underexplored targets in antibacterial drug design *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 6-10.

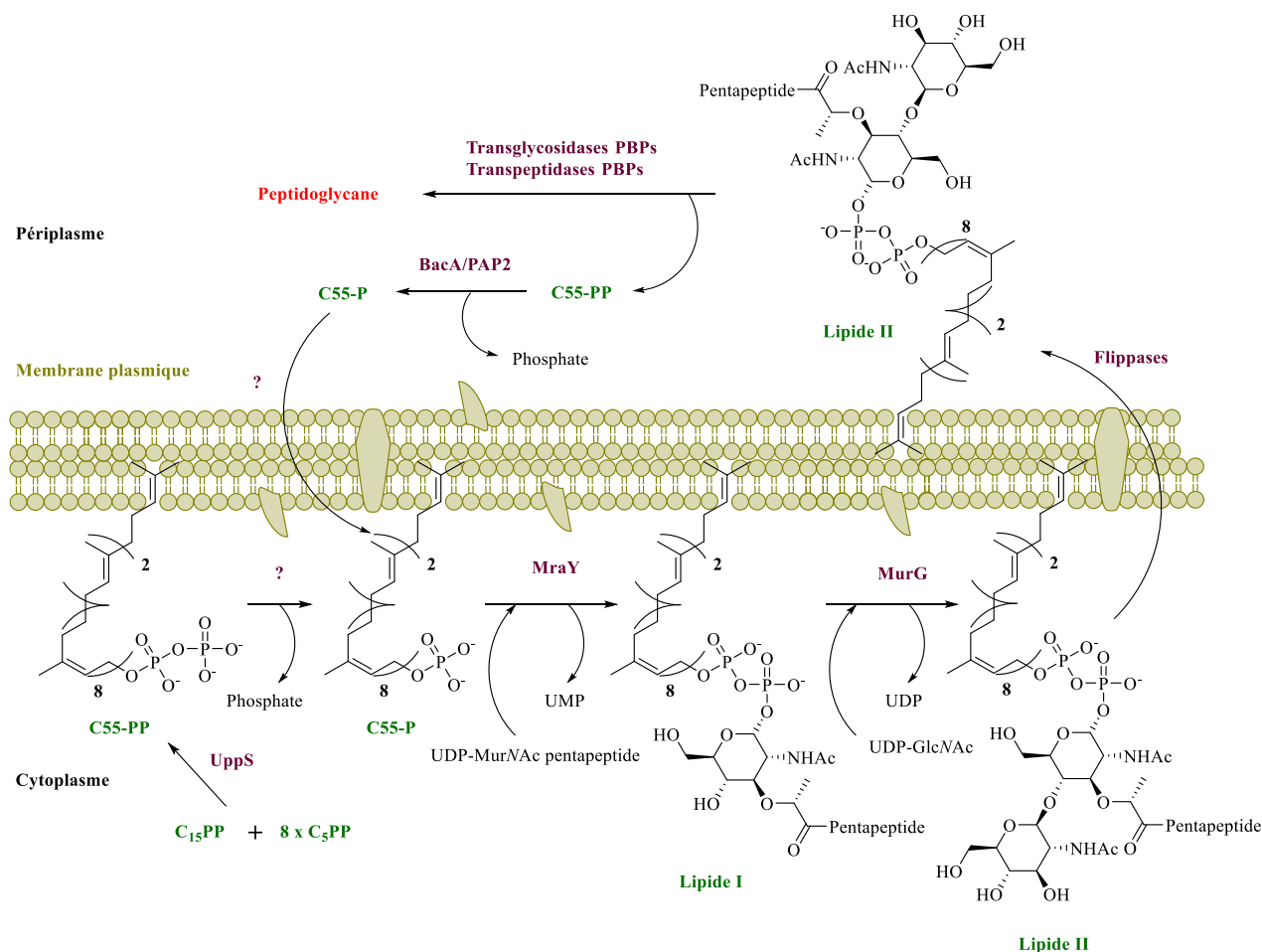


Schéma 10 : Synthèse enzymatique du Lipide II et sa translocalisation^{42,44}

Métabolisme du C55-P

L'undécaprénylphosphate (C55-P) est un transporteur lipidique utilisé dans la formation et la translocation de motifs monomériques disaccharides-pentapeptides au travers de la membrane plasmique.⁴⁶ Son métabolisme implique plusieurs enzymes selon deux manières. La première façon d'obtenir le C55-P est par la synthèse *de novo* où l'on ne connaît pas toutes les enzymes impliquées mais certaines d'entre elles ont été identifiées telle que l'**UppS**.⁴⁷ La deuxième manière est la réutilisation du C55-PP libéré après avoir effectué les dernières étapes périplasmiques de la biosynthèse. Ce recyclage a lieu au travers d'enzymes qui permettent la réinsertion du C55-P du côté cytoplasmique de la membrane.⁴⁸ Deux enzymes responsables de la formation du C55-P dans la face

⁴⁶ Kawakami, N.; Fujisaki, S. Undecaprenyl phosphate metabolism in Gram-negative and Gram-positive bacteria *Biosci., Biotechn., and Biochem.* **2018**, *82*, 940-946.

⁴⁷ Manat, G.; Roure, S.; Auger, R.; Bouhss, A.; Barreteau, H.; Mengin-Lecreux, D.; Touzé, T. Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate : the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier *Microb. Drug Resist.* **2014**, *20*, 199-214.

⁴⁸ Touzé, T.; Mengin-Lecreux, D. Undecaprenyl phosphate synthesis *EcoSal Plus* **2008**, *3*, 1-20.

périplasmique de la membrane, ont été identifiées : les enzymes phosphatases **BacA** et **PAP2**.⁴⁹ L'**undécaprénylpyrophosphate synthase** (UppS) est une enzyme qui catalyse plusieurs réactions de condensation de manière consécutive pour aboutir à la formation de l'undécaprénylpyrophosphate (C₅₅-PP) à partir d'un farnésyl pyrophosphate (FPP) et de huit unités d'*iso*-pentenyl pyrophosphates (IPP). Cette enzyme intervient dans la dernière étape non-membranaire du métabolisme du C₅₅-P. La dernière étape de ce métabolisme est la transformation du C₅₅PP en C₅₅P par les enzymes phosphatases : les **undécaprénylpyrophosphate phosphatases** (UppP). En partant du C₅₅PP préalablement obtenu par la voie de synthèse *de novo*, il n'y a à ce jour aucune enzyme identifiée. Cette étape est très complexe pour l'identification d'enzymes car il existe l'autre processus pour obtenir le C₅₅P en recyclant le C₅₅PP régénéré lors des étapes périplasmiques.⁵⁰ L'enzyme qui doit réintroduire le C₅₅P formé vers le cytoplasme n'a malheureusement pas été identifiée. Ce n'est que très récemment que l'on a pu élucider la structure cristallographique d'une des deux familles d'enzymes de phosphatases (**BacA**) identifiées comme enzymes responsables dans le recyclage du C₅₅PP.⁵¹

MraY

La MraY est une enzyme membranaire de la famille des polyprénylphosphate-*N*-acétylhexosamine-1-phosphate-transférases qui catalyse la formation du **Lipide I**.⁵² Sa structure cristallographique a été étudiée, ce qui a permis d'envisager un mécanisme réactionnel dans le site d'actif de l'enzyme.⁵³ Toutefois, d'autres mécanismes réactionnels ont été observés comme dans le cas d'enzyme transférase MraY mutée, issue de souche de *Bacillus subtilis*.⁵⁴

MurG

La MurG appartient à la famille des glycosyltransférases qui catalyse la glycosylation entre le Lipide I et une unité de GlcNAc provenant de l'UDP-GlcNAc pour former le **Lipide II**.⁵² Cette enzyme est très

⁴⁹ El Ghachi, M. Etude du métabolisme de l'undécaprényl-phosphate impliqué dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane chez *E. coli* Thèse de doctorat en ingénierie des protéines dirigée par Mengin-Lecreulx, D.; Université de Paris-Sud/Falcuté de pharmacie de Chatenay-Malabry, **2006**.

⁵⁰ Tatar, L.D.; Marolda, C.L.; Polischuk, A.N.; Van Leeuwen, D.; Valvano, M.A.; An *Escherichian coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated an undecaprenyl phosphate recycling *Microbiology* **2007**, *153*, 2518-2529.

⁵¹ El Ghachi, M.; Howe, N.; Huang, C.-Y.; Olieric, V.; Warshamanage, R.; Touzé, T.; Weichert, D.; Stansfeld, P.J.; Wang, M.; Ferff, F.; Caffrey, M. Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis *Nat. Comm.* **2018**, *9*, article 1078.

⁵² Liu, Y.; Breukink, E. The membrane steps of bacterial cell wall synthesis as antibiotic target *Antibiotics* **2016**, *5*, 1-22.

⁵³ (a) Lloyd, A.J.; Brandish, P.E.; Gilbey, A.M.; Bugg, T.D.H. Phospho-*N*-Acetyl-Muramyl-Pentapeptide Translocase from *Escherichia coli* : catalytic role of conserved aspartic acid residues *J. of Bacteriol.* **2004**, *186*, 1747-1757; (b) Chung, B.C.; Zhao, J.; Gillespie, R.; Yeon Kwon, D.; Guan, Z.; Hong, J.; Zhou, P.; Lee, S.-Y. Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis *Science* **2013**, *341*, 1012-1016.

⁵⁴ Al-Dabbagh, B.; Henry, X.; El Ghachi, M.; Auger, G.; Blanot, D.; Parquet, C.; Mengin-Lecreulx, D.; Bouhss, A. Active site mapping of MraY, a member of the polyprénylphosphate *N*-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily, catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis *Biochemistry* **2008**, *47*, 8919-8928.

conservée dans toutes les espèces bactériennes, ce qui en fait une cible privilégiée dans la recherche de nouveaux antibiotiques. Cependant, les glycosyltransférases sont présentes dans une grande majorité des cellules à la fois procaryotes et eucaryotes, ce qui nécessite une grande spécificité des inhibiteurs de la MurG lors du *drug design*.⁵⁵ La structure cristallographique de la MurG a été résolue ainsi que son mécanisme d'action.⁵⁶ D'autres équipes ont montré que la structure de la MurG était aussi capable d'interagir avec d'autres protéines telles que la MraY,⁵⁷ ou récemment prouvé avec le dimère MurE-MurF,⁵⁸ ce qui permet au substrat d'évoluer avec de faibles distances au sein de ce complexe protéines-protéines.

Flippase

Cette étape consiste à déplacer par translocation le **Lipide II** formé au sein du cytoplasme vers le périplasme. Toutefois, nous avons peu de données sur ces protéines. Leurs identifications restent très controversées et peuvent aussi varier selon les espèces bactériennes. En 2011, le professeur Sharom a pu classer différentes familles de flippases eucaryotes et procaryotes, même si ces dernières ne sont pas clairement élucidées.⁵⁹ Plus récemment, les études biologiques⁴¹ sur *Escherichia coli* ont permis d'isoler deux enzymes controversées : la **FstW**⁶⁰ et la **MurJ**⁶¹. Le professeur Ruiz conclut que ces enzymes pourraient bien être toutes les deux des flippases jouant chacune d'elles un rôle dans la translocation.

iii. Les étapes périplasmiques

Les deux dernières étapes de cette biosynthèse consistent à polymériser et à réticuler le **Lipide II**. Ceci est assuré par les enzymes appelées **PBPs** (*Penicilin binding proteins*, en anglais) qui ont une double activité enzymatique. Tout d'abord, une action de **glycosyltransférase** (GT) réalisée par le domaine

⁵⁵ Ha, S.; Gross, B.; Walker, S. *E. coli* MurG: a paradigm for a superfamily of glycosyltransferase *Curr. Drug Targ. Infect. Disord.* **2001**, *1*, 201-213.

⁵⁶ Ha, S.; Walker, D.; Shi, Y.; Walker, S. The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis *Prot. Sci.* **2000**, *9*, 1045-1052.

⁵⁷ Mohammadi, T.; Karczarek, A.; Crouvoisier, M.; Bouhss, A.; Mengin-Lecreux, D.; Den Blaauwen, T. The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved the lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli* *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 1106-1121.

⁵⁸ Laddomada, F.; Miyachiro, M.M.; Jessop, M.; Patin, D.; Job, V.; Megin-Lecreux, D.; Le Roy, A.; Ebel, C.; Breyton, C.; Gutsche, I.; Dessen, A. The MurG glycosyltransferase provides an oligomeric scaffold for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis in the human pathogen *Bordetella pertussis* *Scientific Rep.* **2019**, *9*, article 4656.

⁵⁹ Sharom, F.J. Flipping and flopping-lipids on the move *IUBMB Life*, **2011**, *63*, 736-746.

⁶⁰ Mohammadi, T.; Van Dam, V.; Sijbrandi, R.; Vernet, T.; Zapun, A.; Bouhss, A.; Diepeveen-de Bruin, M.; Nguyen-Distèche, M.; De Kruijff, B.; Breukink, E. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane *EMBO J.* **2011**, *30*, 1425-1432.

⁶¹ Sham, L.T.; Butler, E.K.; Lebar, M.D.; Kahne, D.; Bernhardt, T.G.; Ruiz, N. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis *Science* **2014**, *345*, 220-222.

N-terminal puis une activité de **peptidotransférase** (PT) effectuée par le domaine C-terminal.⁶² Les PBPs font partie de la grande famille des protéines appelée ASPRE pour « *Active-site Serine Penicillin Recognizing Enzymes* ». Les analyses structurales de ces PBPs sont complexes mais connues. Il est important de continuer à les analyser puisqu'elles permettent de mieux cibler les résistances bactériennes lors de l'utilisation d'antibiotiques.⁶³

L'**activité glycosyltransférase** assure la polymérisation des unités répétitives disaccharidiques dans la zone périplasmique. Il a été montré que dans les cellules en croissance, la polymérisation des monomères GlcNAc-MurNAc-pentapeptide se fait d'abord par transglycosylation suivi par la réticulation des parties peptidiques par la PT. La structure du domaine N-terminal des PBPs a été identifiée ainsi qu'un mécanisme commun (Schéma 11).⁶²

Dans le périplasme, le GlcNAc du Lipide II est activé par le Glu₂₉₀ du site actif des PBPs puis sa fonction alcool en position 4 peut ainsi réaliser une attaque nucléophile avec inversion de configuration sur la position anomérique du résidu MurNAc d'un autre Lipide II pour former une liaison glycosidique de type β -(1,4). Le Glu₂₃₃ du site actif va assister au départ de l'undécaprényl-pyrophosphate (C₅₅PP) formé pendant la réaction. Le domaine qui assure l'activité GT n'a pas de site de liaison des pénicillines. Cependant, on trouve des antibiotiques capables de viser spécifiquement ce site.⁶⁴ Il existe d'autres antibiotiques qui visent cette fois le substrat **Lipide II** en se liant sur la partie peptidique terminale (sur les acides aminés D-Ala-D-Ala) de ce dernier et/ou du peptidoglycane naissant. En effet, le lipide II est dans ce cas utilisé comme cible bactérienne où l'on retrouve plusieurs familles d'antibiotiques.⁶⁵

⁶² (a) Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.A.; Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 234-258; (b) Van Heijenoort, J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan *Glycobiology* **2001**, *11*, 25R-36R.

⁶³ (a) Sauvage, E.; Terrak, M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins : valuable targets for new antibacterials *Antibiotics* **2016**, *5*, 1-27; (b) Macheboeuf, P.; Contreras-Martel, C.; Job, V.; Dideberg, O.; Dessen, A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 673-691.

⁶⁴ Ostash, B.; Walker, S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1594-1617.

⁶⁵ Breukink, E.; De Kruijff, B. Lipid II as a target for antibiotics *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 321-323.

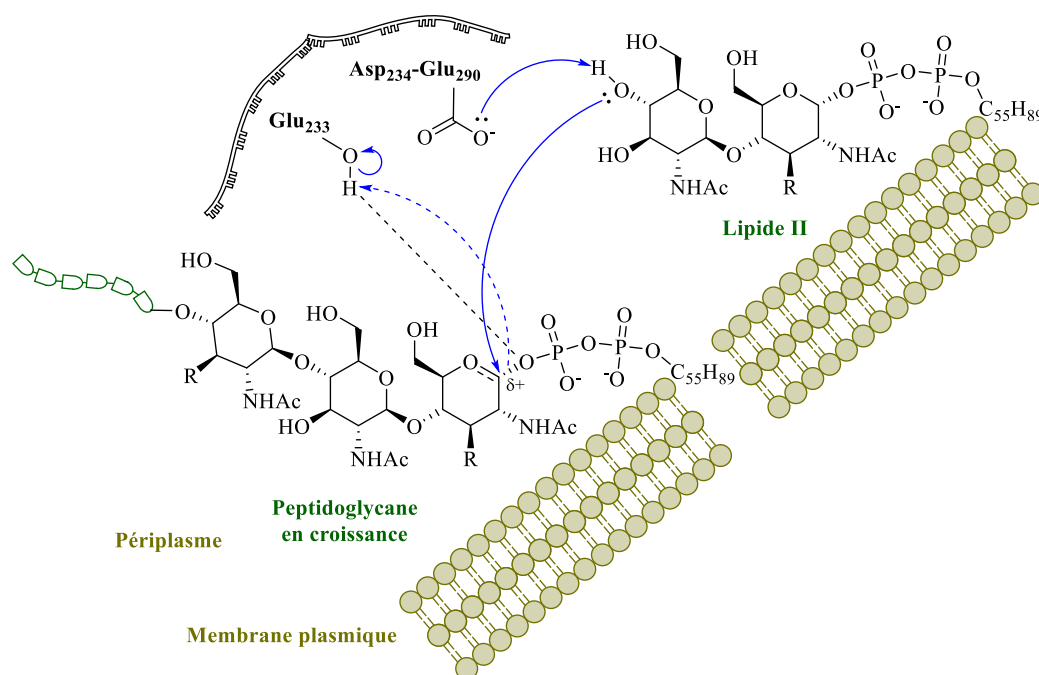


Schéma 11 : Mécanisme de la polymérisation catalysée par GT chez *E. coli* (d'après Van Heijenoort^{62b})

L'**activité peptidotransférase** consiste à créer des ponts peptidiques entre deux ramifications pentapeptides du polymère polysaccharidique formé précédemment afin d'établir la structure tridimensionnelle.

La structure du domaine C-terminal ainsi que son mécanisme réactionnel ont été élucidés ; le site actif fait intervenir la sérine qui catalyse la formation de la liaison peptidique (Schéma 12).^{62a}

Le mécanisme de la transpeptidation commence par la formation d'un **intermédiaire covalent** avec l'enzyme et le peptidoglycane naissant par l'action de la sérine du site actif. L'amine de l'acide aminé (*m*-DAP ou *L*-Lys) d'une autre chaîne peptidoglycane en croissance attaque l'intermédiaire complexe enzyme/substrat pour former une liaison peptidique et ceci se conclut par une réticulation finale entre deux chaînes muréiques. Le domaine C-terminal des PBPs est bien connu comme cible bactérienne puisqu'il est la cible des β -lactamines.

Dans cette première partie, nous avons donné un aperçu global des cibles et de la biosynthèse du peptidoglycane en ayant évoqué le phénomène naturel de la résistance bactérienne. Dans ce contexte, il existe bien des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi bactériennes qui ne présentent pas de résistances. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés aux **Mur Ligases** qui ont une activité plus en amont dans la biosynthèse. Ces enzymes possèdent de nombreux avantages qui font d'elles une cible thérapeutique innovante : elles sont indispensables à la survie de la bactérie, ubiquitaires au sein des procaryotes avec aucun équivalent chez les eucaryotes.⁴⁴ A ce jour, elles sont

décrites comme une cible pertinente dans l'élaboration de composés multi-inhibiteurs.^{45,66}

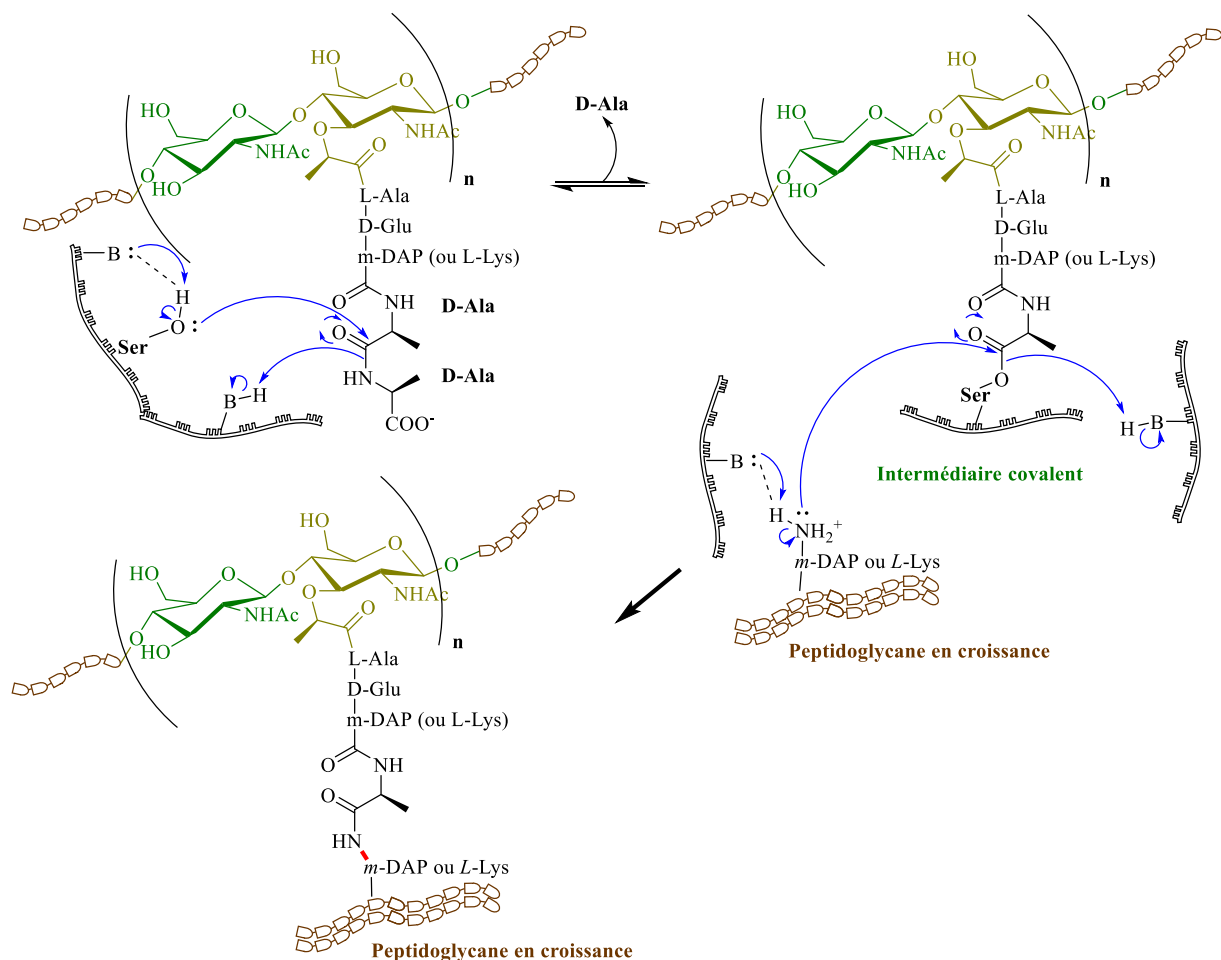


Schéma 12 : Mécanisme général de la réticulation catalysée par TP(d'après Van Heijenoort^{62b})

II Les Mur Ligases : MurC-F, de nouvelles cibles innovantes

A. Leur rôle, leur topologie

Le rôle des **Mur Ligases**, appelées **mur Synthetases**, est de catalyser la formation d'une liaison peptidique avec l'acide aminé correspondant sur le substrat qui est propre à chacune de ces enzymes. Ces enzymes ont toutes été identifiées comme des protéines non-ribosomales dépendantes de l'ATP.

Les **MurC-F** sont responsables de la formation du précurseur du Lipide I (UDP-MurNAc-pentapeptide), de manière successive pour les **MurC**, **MurD**, **MurE**, **MurF**.⁴⁴

La caractérisation des séquences protéiques d'enzymes **MurC-F** a été réalisée sur différentes souches bactériennes que ce soit Gram+ ou Gram-.^{42,67} On peut distinguer des différences séquentielles entre

⁶⁶ Belete, T.M. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents *Hum. Micro. J.* **2019**, *11*, 100052.

⁶⁷ Smith, C.A. Structure, function and dynamics in the *mur* family of bacterial cell wall ligases *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 640-655.

espèces ou seulement en comparant les enzymes mais chacune d'elles partagent la même topologie structurale à savoir une protéine divisée en trois domaines différents (que l'on appellera domaine 1, 2 et 3) avec une architecture du site actif très conservée.^{44,68} Une des différences dans les séquences protéiques des Mur ligases est que le site de liaison de l'acide aminé diffère selon l'enzyme.⁴² L'enzyme **MurC** catalyse l'addition du premier acide aminé de la chaîne peptidique lié à l'UDP-MurNAc. Cet acide aminé est généralement la **L-alanine**. La **MurD** catalyse l'addition du deuxième acide aminé sur le substrat. Hormis les quelques variations, l'acide aminé est un **acide D-glutamique** chez toutes les espèces. Des études ont montré l'importance d'avoir l'énantiomère *D* de l'acide glutamique car l'acide *L*-glutamique n'est pas substrat de la MurD. Pour la **MurE** qui catalyse la troisième addition d'acide aminé, ce dernier est soit un **acide méso-diaminopimélique** (*m*-A2pm) dans la plupart des bactéries Gram⁻ et chez les espèces *Bacilli*, tandis que pour les bactéries Gram⁺, l'acide aminé est une **L-lysine**. Enfin, la **MurF** catalyse l'addition d'un dipeptide non-naturel la **D-alanine-D-alanine** (*D*-Ala-*D*-Ala). A ce jour, chacune de ces enzymes a pu être purifiée et étudiée avec les substrats et les co-substrats correspondants.⁶⁹ Ceci a permis de proposer les sites actifs des Mur Ligases ainsi que le mécanisme réactionnel.

B. Les paramètres enzymatiques et les données mécanistiques

Les paramètres de stabilité des Mur ligases ont été analysés pour déterminer les paramètres de spécificités et de cinétiques qui en découlent.⁷⁰ Ces paramètres sont importants car ils permettent d'établir les meilleures conditions pour reproduire *in vitro* une activité enzymatique, très utilisées par exemple lors d'essais biologiques pour identifier un inhibiteur.

⁶⁸ Bertrand, J.A.; Auger, G.; Fanchon, E.; Martin, L.; Blanot, D.; Van Heijenoort, J.; Dideberg, O. Crystal structure of UDP-*N*-acetylmuramoyl-*L*-alanine: *D*-glutamate ligase from *Escherichia coli* *The EMBO J.* **1997**, *16*, 3416-3425.

⁶⁹ Patin, D.; Boniface, A.; Kovač, A.; Hervé, M.; Dementin, S.; Barreteau, H.; Mengin-Lecreulx, D.; Blanot, D. Purification and biochemical characterization of Mur ligases from *Staphylococcus aureus* *Biochimie* **2010**, *92*, 1793-1800.

⁷⁰ Munshi, T.; Gupta, A.; Evangelopoulos, D.; David Guzman, J.; Gibbons, S.; Keep, N.H.; Bhakta, S. Characterization of ATP-dependent Mur ligases involved in the biogenesis of cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis* *PLoS one* **2013**, *8*, e60143.

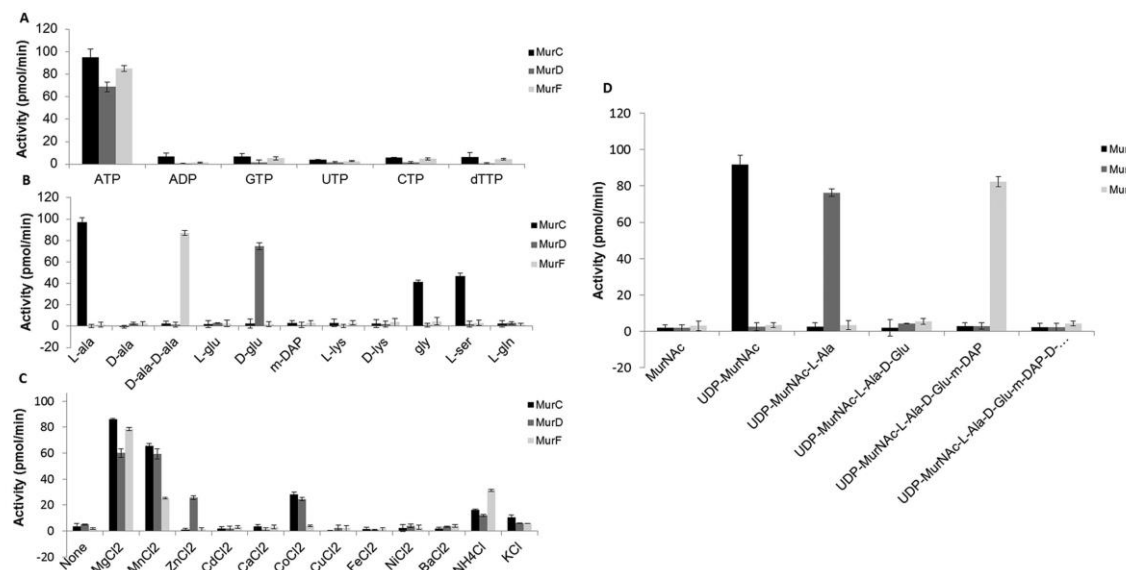


Figure 2 : Paramètres de spécificités des Mur Ligases A = Activité enzymatique en présence de divers nucléotides B = Activité enzymatique en présence de divers acides aminés C = Activité enzymatique en présence de divers cations mono- et divalents D = Activité enzymatique en présence de divers substrats⁷⁰

Les paramètres de spécificités ont été réalisés pour les MurC, MurD et MurF (Figure 2) exactement comme la MurE dans de précédents travaux.⁷¹ Les Mur Ligases ont montré être spécifiquement dépendant de l'ATP (Figure 2A). Pour ce qui est des acides aminés (Figure 2B), la MurD, la MurE et la MurF ont montré être spécifiques respectivement de la *D*-Glu, la *m*-A₂pm, et la *D*-Ala-*D*-Ala uniquement. La MurC a une activité moins spécifique car elle l'est avec la *L*-Ala mais aussi la Gly et la *L*-Ser. Enfin, chaque enzyme avec son acide aminé correspondant a également montré être très dépendante du cation Mg²⁺ (Figure 2C). La Figure 2D montre que chacune d'elles est spécifique d'un seul substrat : l'UDP-MurNAc pour la **MurC** ; l'UDP-MurNAc-*L*-Ala pour la **MurD** ; l'UDP-MurNAc-*L*-Ala-γ-*D*-Glu-*m*-A₂pm pour la **MurF** et l'UDP-MurNAc-*L*-Ala-γ-*D*-Glu pour la **MurE**. Aucune enzyme n'a comme substrat la MurNAc (d'où l'importance de la partie UDP) ou le substrat final UDP-NAc-pentapeptide. Les auteurs ont prouvé que le substrat UDP sucre a une plus grande affinité que l'ATP ou l'acide aminé.

Le mécanisme réactionnel des Mur Ligases utilisent l'énergie de la liaison phosphate pour catalyser la formation de la liaison amide d'acides aminés sur la chaîne peptidique en croissance (Schéma 13). Ce mécanisme commun aux quatre Mur Ligases commence par l'élaboration d'un complexe avec l'enzyme et ses substrats en procédant de la manière suivante : l'ATP se lie à l'enzyme puis le substrat UDP sucre vient s'y ajouter et enfin l'acide aminé. La première étape consiste à activer l'acide carboxylique du substrat UDP sucre avec l'ATP (Schéma 13A) pour former l'**intermédiaire acyle-**

⁷¹ Basavannacharya, C.; Robertson, G.; Munshi, T.; Keep, N.H.; Bhatka, S. ATP-dependent MurE in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical and structural characterization *Tuberculosis* **2010**, *90*, 16-24.

phosphate. Deux ions Mg^{2+} vont créer un pont entre les phosphates chargés négativement de l'ATP et du substrat UDP sucre afin de faciliter la phosphorylation du groupement carboxylate. La deuxième étape fait intervenir l'acide aminé qui vient déplacer le phosphate par une attaque nucléophile (S_N2) avec la formation de l'**intermédiaire tétraédrique** puis la libération du phosphate P_i permet d'obtenir le **substrat peptidique**. L'activité catalytique d'une base est nécessaire afin de récupérer le proton de l'amine. Des études ont montré que la base pourrait être remplacée par le phosphate de l'ATP ou l'enzyme puisque cela s'adapterait mieux à une échelle énergétique normale de la réaction.⁷² Par l'action des MurC-F, on peut donc introduire successivement la *L*-Ala, la *D*-Glu, la *m*-A2pm et la *D*-Ala-*D*-Ala (Schéma 13B).

⁷² Perdih, A.; Hodoscek, M.; Solmajer, T. MurD ligase from *E. coli*: Tetrahedral intermediate formation study by hybrid quantum mechanical/molecular mechanical replica path method *Proteins* **2009**, 74, 744-759.

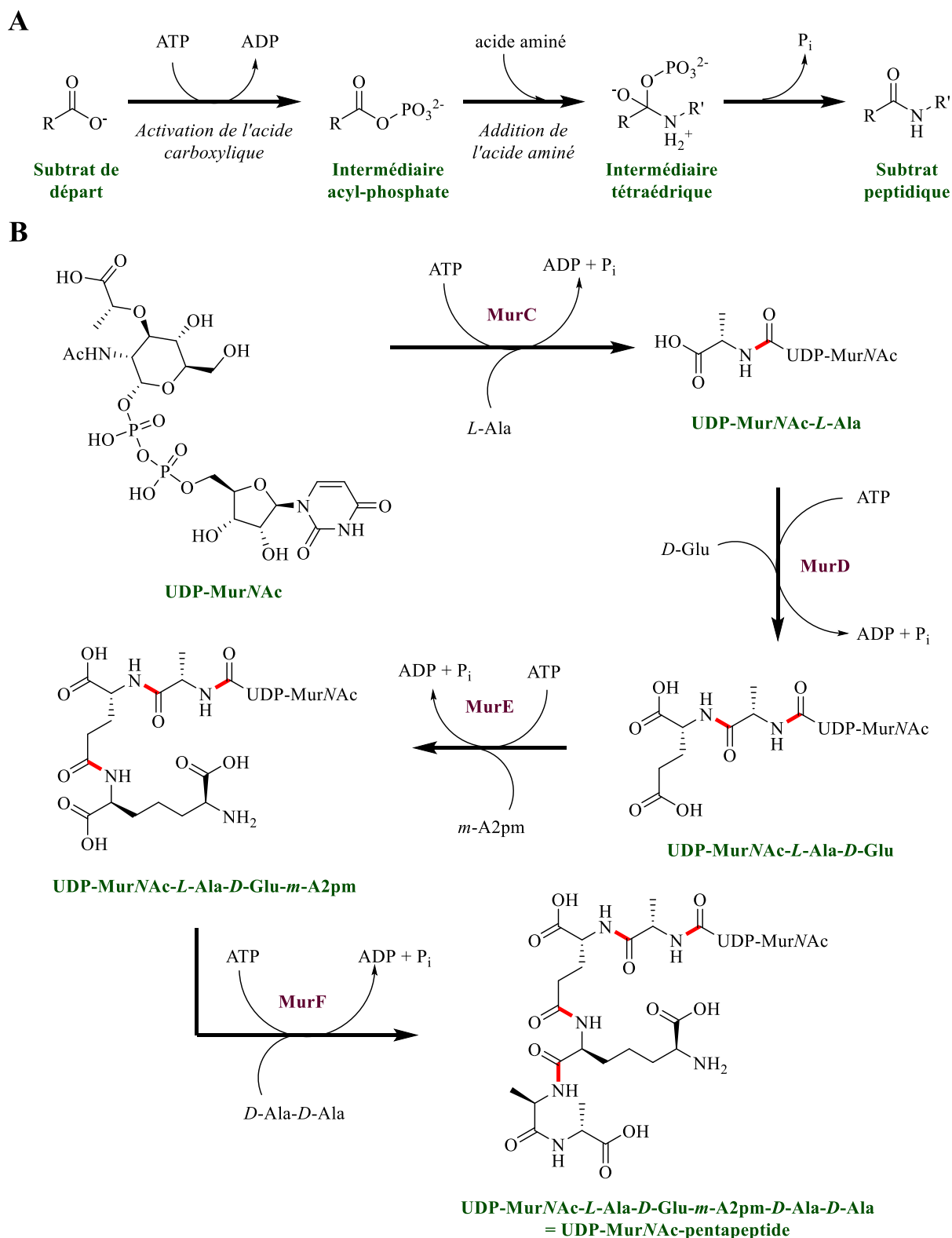


Schéma 13 : A) Formation de l'intermédiaire tétraédrique B) Formation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide⁴⁴

En plus des données mécanistiques de ces enzymes, les auteurs ont également proposé les structures cristallographiques des Mur ligases ainsi que les différentes conformations qu'elles adoptent en présence ou non des différents substrats.

C. La structure cristallographique des enzymes MurC-F

Les structures cristallographiques pour les enzymes MurC-F Ligases ont été élucidées pour plusieurs espèces différentes.⁴⁴ Ici, on a fait le choix de comparer les représentations tridimensionnelles issues d'une même espèce d'*Escherichia coli* (Figure 3) avec le substrat naturel.⁷³

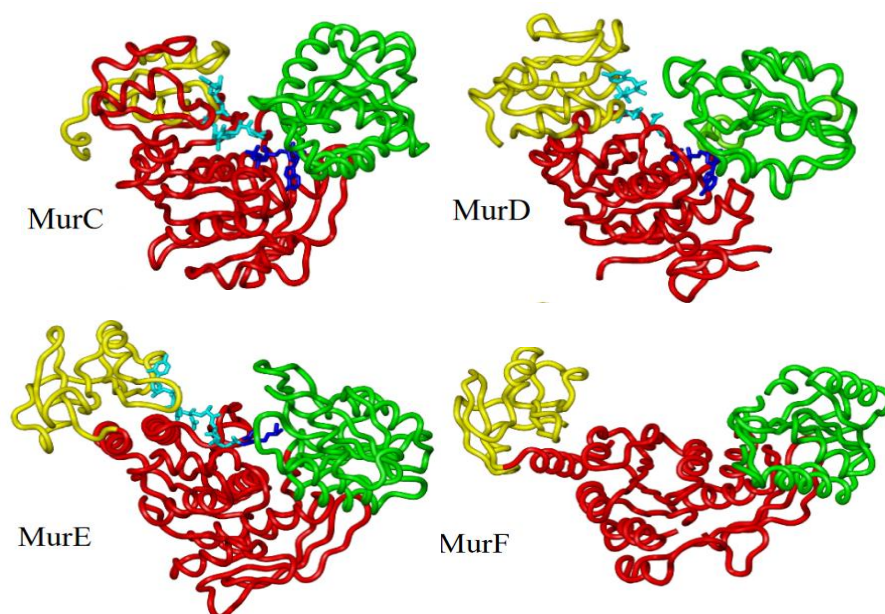


Figure 3 : Représentation cristallographique des structures tridimensionnelles des MurC, MurD, MurE, MurF avec le domaine 1 (jaune), le domaine 2 (rouge), le domaine 3 (vert), le substrat (bleu cyan) et l'ATP (bleu foncé)⁴⁴

Le **domaine 1** (jaune, Figure 3) est composé de cinq feuillets- β parallèles, entourés par deux hélices- α pour MurE, trois pour MurF et quatre pour MurC-D. Le domaine 1 est la partie N-terminale où il y a le site de liaison du substrat UDP sucre. Ceci est particulièrement le cas avec les MurC et MurD car la partie N-terminale ressemble fortement au pli de Rossmann qui lie habituellement les nucléotides et le NAD. Les MurC et MurD se lient au substrat avec sa partie UDP *via* une fente formée à partir de deux boucles hydrophobes et d'une poche liant le diphosphate. Le cycle uracile et les fonctions hydroxyles du ribose sont ancrés au travers de liaison hydrogène dans ce domaine tandis que la partie lactyl de l'acide muramique s'étend vers le centre catalytique et interagit avec l'ion Mg^{2+} (site actif : Figure 4). Pour la MurE et la MurF, elles reconnaissent également le substrat agrandi de peptide mais avec un pli α/β commun.

⁷³ (a) Deva, T.; Baker, E.N.; Squire, C.J.; Smith, C.A. Structure of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine (MurC) *Acta Cryst. D* **2006**, 62, 1466-1474; (b) Bertrand, J.A.; Auger, G.; Martin, L.; Fanchon, E.; Blanot, D.; Le Beller, D.; Van Heijenoort, J.; Dideberg, O. Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes *J. of Mol. Biol.* **1999**, 289, 579-590; (c) Gordon, E.; Flouret, B.; Chantalat, L.; Van heijenoort, J.; Mengin-Lecreulx, D.; Dideberg, O. Crystal structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: *meso*-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli* *The J. of Biol. Chem.* **2001**, 276, 10999-11006; (d) Yan, Y.; Munshi, S.; Leiting, B.; Anderson, M.S.; Chrzas, J.; Chen, Z. Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAC-tripeptide d-alanyl-d-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 435-445.

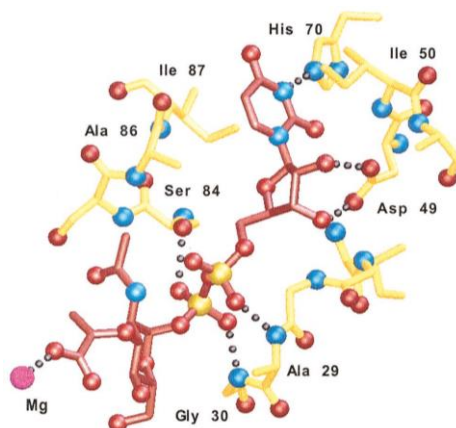


Figure 4 : Site actif du domaine 1 (en jaune) de la MurC avec le substrat UDP-MurNAc (en rouge)⁷⁴

Le **domaine 2** (rouge, Figure 3) central est constitué de six feuillets- β parallèles pour la MurD, la MurE, la MurF et de sept feuillets- β pour la MurC. Ces feuillets- β sont entourés par sept hélices- α pour la MurD et la MurE, quatre pour la MurC et huit pour la MurF. Ce domaine 2 présente une poche spécifique mono-nucléotide, responsable de la liaison de l'ATP (site actif : Figure 5). Il comprend également deux résidus de valeur : un Glu et une His puisqu'ils se coordonnent avec l'ion Mg^{2+} . Un autre résidu est utilisé : une Lys pour MurD, MurE et MurF ou un Glu pour MurC qui permet de stabiliser un deuxième ion Mg^{2+} .

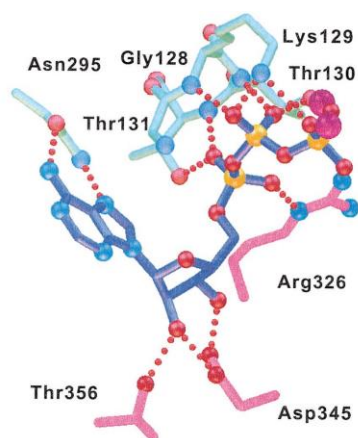


Figure 5 : Site actif du domaine 2 (bleu cyan) et du domaine 3 (rose) de la MurC avec le substrat ATP (bleu foncé) et l'ion Mg^{2+} (magenta)⁷⁴

Le **domaine 3** (vert, Figure 3) est bâti avec six feuillets- β dont cinq sont parallèles et un en antiparallèle où les feuillets- β sont enroulés de cinq hélices- α pour chacune des Mur Ligases. Le domaine 3 est celui qui contient la zone C-terminale et qui lie le substrat acide aminé. Ce domaine joue un rôle important avec le site de liaison de l'ATP car il présente un pli de Rossmann qui permet l'insertion de l'ATP dans

⁷⁴ Mol, C.D.; Brooun, A.; Dougan, D.R.; Hilgers, M.T.; Tari, L.W.; Wijnands, R.A.; Knuth, M.W.; McRee, D.E.; Swanson, R.V. Crystal structure of active fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-N-Acetylmuramic acid:L-Alanine ligase (MurC) from *Haemophilus influenza J. of Bacterio*. **2003**, *185*, 4152-4162.

la boucle du site actif de l'acide aminé. Le résidu Arg est particulièrement bien conservé car il interagit avec l'acide aminé et le phosphate en α de l'ATP (site actif : Figure 6). Des études ont montré un véritable changement de position de ce résidu une fois qu'il est lié avec l'ADP, ce qui présume de l'interaction avec l'acide aminé et son assistance dans l'attaque nucléophile avec ce dernier.

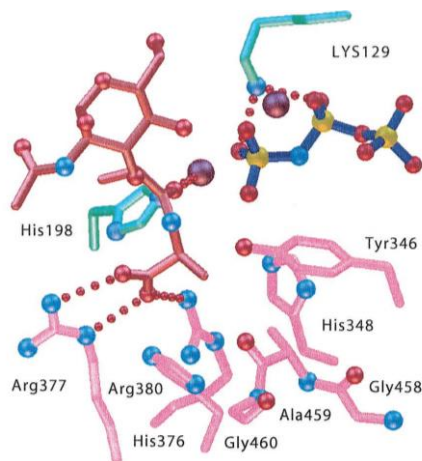


Figure 6 : Site actif du domaine 2 (bleu cyan) et du domaine 3 (rose) de la MurC avec le substrat ATP (bleu foncé), les ions Mg^{2+} (magenta) et le substrat formé UDP-MurNAc-L-Ala (rouge)⁷⁴

Pour former un site actif efficace, la Mur ligase qui est au départ sous forme « **ouverte** » lorsqu'elle n'est pas en présence de substrats, va subir d'importants réarrangements pour adopter une conformation « **fermée** » en présence des substrats, ce qui résulte d'un rapprochement des trois domaines. Tout d'abord, la liaison entre l'ATP avec le domaine 3 (présence d'un site d'ancrage, à ne pas confondre avec le domaine 2 qui lie l'ATP) induit un rapprochement des domaines et permet au domaine 3 de se lier à son tour avec le substrat UDP sucre et le substrat acide aminé. Lorsque les substrats sont bien positionnés dans leur domaine respectif, une rotation finale du domaine 3 permet d'avoir la conformation fermée de l'enzyme. On observe que cette rotation est plus prononcée pour les MurE et MurF que pour la MurC ou la MurD. La conformation fermée éloigne le substrat UDP sucre plus loin du site de liaison, ce qui permet d'insérer l'acide aminé qui va réagir dans le domaine 2. A ce niveau, le substrat UDP sucre avec l'ATP sont maintenant assez proches pour former l'intermédiaire acyle-phosphate. L'enzyme oriente correctement l'acide aminé pour l'attaque nucléophile puis stabilise l'intermédiaire tétraédrique formé pour avoir la plus petite barrière énergétique possible et ainsi accélère le départ du phosphate pour retrouver à la fin une forme ouverte de l'enzyme.

Pour former l'UDP-MurNAc-pentapeptide, les Mur ligases utilisent des acides aminés non-naturels comme cosubstrats qui sont obtenus par l'action de différentes enzymes bactériennes qui en font des cibles innovantes.⁷⁵

⁷⁵ Conti, P.; Tamborini, L.; Pinto, A.; Blondel, A.; Minoprio, P.; Mozzarelli, A.; De Micheli, C. Drug discovery targeting amino acid racemases *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6919-6946.

D. Inhibiteurs des MurC-F ligases

Les Mur ligases ont l'avantage de contenir plusieurs zones au sein du site actif pour confectionner un inhibiteur (domaines 1, 2 et 3). Leurs sites actifs sont de structures proches et sont conservés pour chacune des Mur ligases. Elles représentent désormais un ensemble de cibles pour un seul inhibiteur.

Nous allons présenter l'état de l'Art des inhibiteurs de Mur ligases. Une première partie montrera les inhibiteurs qui ciblent une seule Mur ligase. La deuxième partie présentera des composés multicibles (Schéma 14).

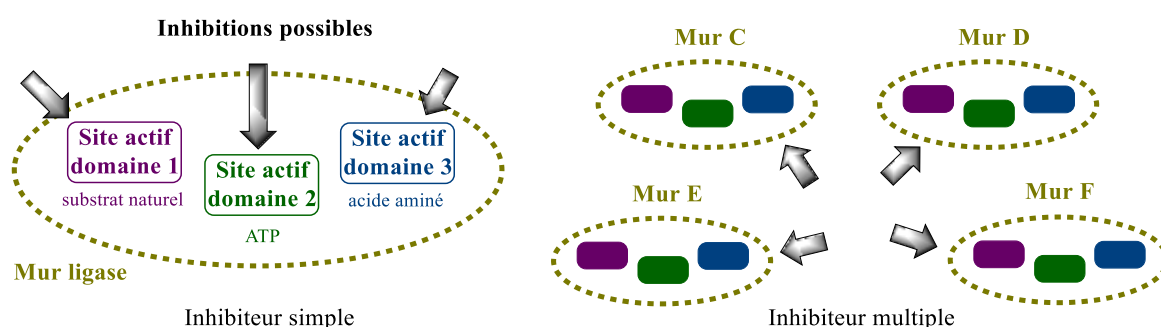


Schéma 14 : Approches conceptuelles des inhibiteurs

1. Inhibiteurs ciblant une seule Mur Ligase

Les premiers inhibiteurs qui ont été identifiés dans les années 1990, visent le domaine 3 des Mur ligases. Ce sont des analogues d'acides aminés correspondant à l'enzyme visée où les premières élucidations de structure cristallographique apparaissent.⁴²

- i. Le domaine 3
 - Analogues d'acides aminés

L'utilisation d'analogues d'acides aminés a commencé tôt pour inhiber les Mur ligases parfois sans avoir même élucidé la structure de l'enzyme. Pour la **MurC**, des analogues de la L-Alanine ont été identifiés. Takahashi *et coll.* ont montré que la glycine était capable d'inhiber l'addition de la L-Alanine sur le substrat UDP-MurNAc en tant qu'inhibiteur compétitif.⁷⁶ Quelques années plus tard, d'autres acides L-aminés inhibent la MurC sans que ces derniers soient incorporés au substrat naturel.⁷⁷ Ces dérivés de la L-Alanine ont une IC₅₀ de l'ordre du mM en moyenne. Pour la **MurD**, les analogues de l'acide D- ou L-Glutamique ou pour la **MurE** avec des dérivés de l'acide *méso*-Diaminopimélique,

⁷⁶ Hishinuma, F.; Izaki, K.; Takahashi, H. Inhibition of L-alanine adding enzyme by glycine *Agr. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 2050-2058.

⁷⁷ (a) Liger, D.; Masson, A.; Blanot, D.; Van Heijenoort, J.; Parquet, C. Over-production, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramate:L-alanine ligase from *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 80-87; (b) Emanuele, J.J.; Jin, H.; Jacobson, B.L.; Chang, C.Y.; Einspahr, H.M.; VillaFranca, J.J. Kinetic and crystallographic studies of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramate:L-alanine ligase *Prot. Sci.* **1996**, *5*, 2566-2574.

l'activité biologique est similaire que pour la MurC.⁷⁸ Pour la **MurF**, la littérature ne montre pas de résultats contenant des inhibiteurs avec un motif issu du dipeptide D-Ala-D-Ala.

- **Composés hétérocycliques**

En 2001, Gobec *et coll.* vont cibler la **MurD** et un état de transition tétraédrique pour élaborer des dérivés de type phosphino-alanine, cependant sans grande inhibition.⁷⁹ En 2007, ils publient avec la même idée des hétérocycles de type sulfonamide de l'acide D-glutamique. Le groupe co-cristallise des inhibiteurs tels que le composé **1** (Figure 7) au sein de la MurD, afin de mieux comprendre son site de liaison.⁸⁰ Ceci permet de développer par relation structure-activité (*SAR pour structure-activity relationship* en anglais) d'autres analogues présentant une meilleure activité tout en pouvant cristalliser les composés, comme le composé **2** (Figure 7) avec une IC_{50} de 85 μ M.⁸¹ L'étude cristallographique du complexe **2**/MurD montre des interactions possibles entre le composé **2** et le site de liaison du diphosphate du domaine 1.

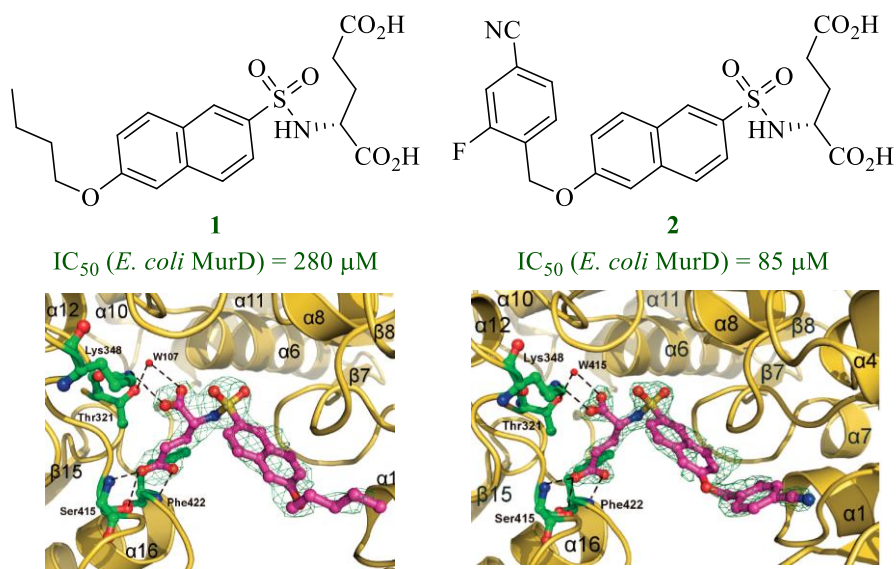


Figure 7 : Structure chimique et cristallographique d'analogues sulfonamides de l'acide D-glutamique^{80,81}

⁷⁸ (a) Pratviel-Sosa, F.; Acher, F.; Trigalo, F.; Blanot, D.; Azerad, R.; Van Heijenoort, J. Effect of various analogues of D-glutamic acid on the D-glutamate-adding enzyme from *Escherichia coli* *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *115*, 223-228; (b) Auger, G.; Van Heijenoort, J.; Vederas, J.C.; Blanot, D. Effect of analogues of diaminopimelic acid on the meso-diaminopimelate-adding enzyme from *Escherichia coli* *FEBS Lett.* **1996**, *391*, 171-174.

⁷⁹ Gobec, S.; Urleb, U.; Auger, G.; Blanot, D. Synthesis and biochemical evaluation of some novel N-acyl phosphono and phosphinoalanine derivatives as potential inhibitors of the D-glutamic acid-adding enzyme *Pharmazie* **2001**, *56*, 295-297

⁸⁰ Kotnik, M.; Humljan, J.; Contreras-Martel, C.; Oblak, M.; Kristan, K.; Hervé, M.; Blanot, D.; Urleb, U.; Gobec, S.; Dessen, A.; Solmajer, T. Structural and functional characterization of enantiomeric glutamic acid derivatives as potential transition state analogue inhibitors of MurD ligase *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 107-115.

⁸¹ Humljan, J.; Kotnik, M.; Contreras-Martel, C.; Blanot, D.; Urleb, U.; Dessen, A.; Solmajer, T.; Gobec, S. Novel naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7486-7494.

D'autres inhibiteurs de type sulfonamides avec des structures rigides d'acide dicarboxylique ont aussi été synthétisés et présentent des activités biologiques sur la MurD.⁸² Les dérivés **3** et **4** ont une IC₅₀ de 182 µM et de 8,4 µM respectivement contre la MurD (Figure 8). Ils ont été co-cristallisés avec l'enzyme et leurs structures ont montré que ces inhibiteurs se positionnent dans la position de l'acide D-glutamique où la partie 2-cyano-4-fluoro-phényl occupe la poche de l'uracile. Quelques d'inhibiteurs sulfonamides qui visent la **MurE** ont été synthétisés mais aucun pour la **MurC** et la **MurF**.⁸³

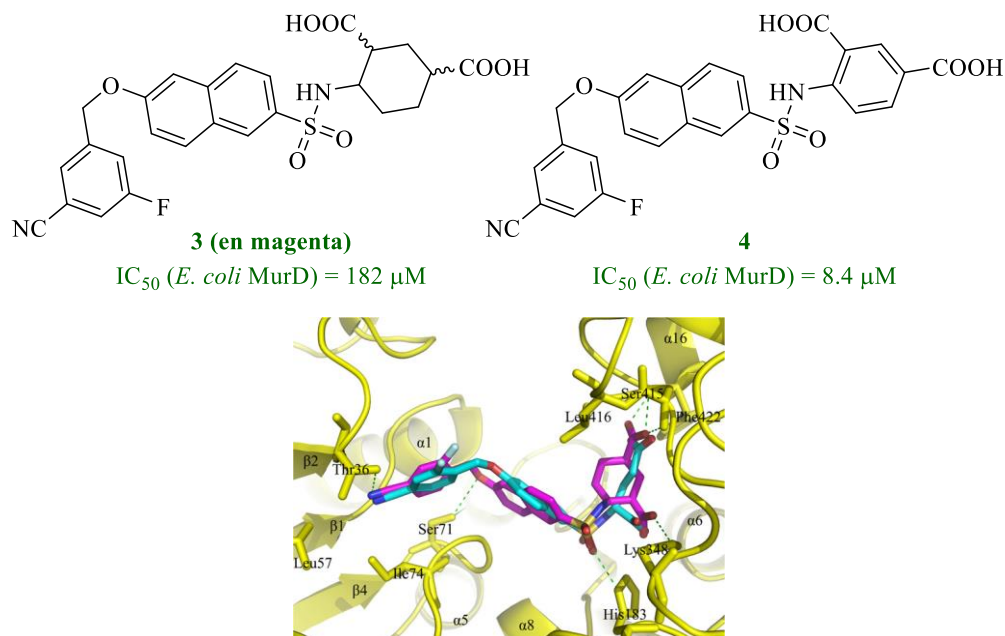


Figure 8 : Structures chimiques et cristallographiques des analogues **3** et **4** visant la MurD⁸²

Cette même équipe a réalisé des études de *ligand docking* et identifié des structures hétérocycliques de type rhodanine tel que l'analogue **5** actif avec une IC₅₀ de 45 µM (Figure 9).

⁸² Sosič, I.; Barreteau, H.; Simčič, M.; Šink, R.; Cesar, J.; Zega, A.; Golič Grdadolnik, S.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Amoroso, A.; Joris, B.; Blanot, D.; Gobec, S. Second-generation sulfonamide inhibitors of D-glutamic acid-adding enzyme: Activity optimization with conformationally rigid analogues of D-glutamic acid *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2880-2894.

⁸³ Humljan, J.; Kotnik, M.; Boniface, A.; Šolmajer, T.; Urleb, U.; Blanot, D.; Gobec, S.; a new approach towards peptidosulfonamides: synthesis of potential inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurE *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10980-10988.

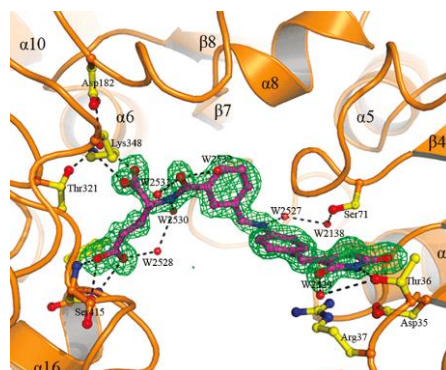
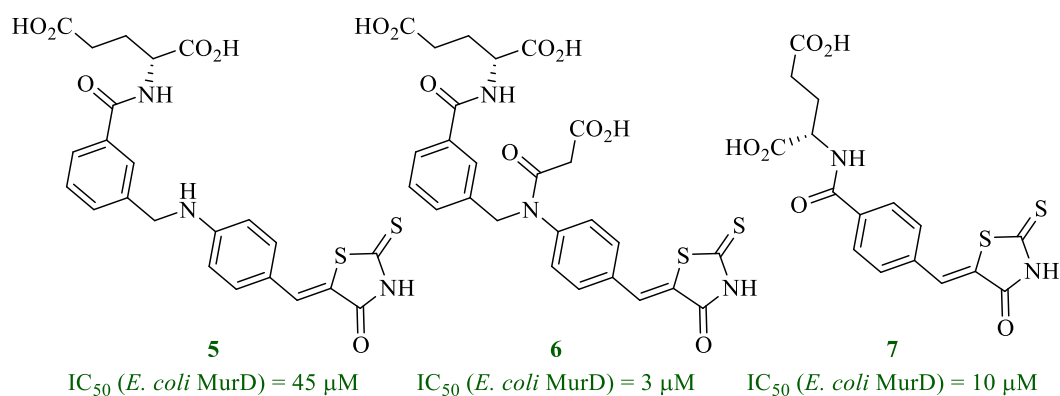


Figure 9 : Structures chimiques de 5, 6 et 7 et structure cristallographique de 5⁸⁴

Les études de SAR ont permis de développer les composés **6** et **7** avec des IC_{50} de l'ordre du μ M (Figure 9).⁸⁴ Ces recherches ont permis de synthétiser une grande bibliothèque de molécules hybrides capables de se lier à la fois dans le site actif de l'acide aminé du domaine 3 et à la poche du diphosphate du domaine 1. Certains dérivés benzylidène rhodanines ont été identifiés pour inhiber la **MurC** mais pas les **MurE** et **MurF**.⁸⁵ Aucun des hétérocycles de type sulfonamide ou de type rhodanine n'a présenté une activité bactérienne *in vivo* intéressante.

ii. Le domaine 1

• Inhibiteurs phosphiniques

Les composés de type « *phosphinique* » ciblent le site de liaison du substrat naturel du domaine 1 des Mur ligases. L'acide phosphinique contenu dans ces molécules procure une géométrie tétraédrique qui bloque la suite du mécanisme. L'idée d'insérer un groupement acide phosphinique dans la chaîne peptidique provient de différents travaux sur l'inhibition de dérivés peptide-

⁸⁴ (a) Zidar, N.; Tomašić, T.; Šink, R.; Rupnik, V.; Kovač, A.; Turk, S.; Patin, D.; Blanot, D.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Müller Premru, M.; Zega, A.; Gobec, S.; Pertelin Mašić, L.; Kikelj, D. Discovery of novel 5-benzylidenerhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitors of MurD ligase *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6584-6594; (b) Tomašić, T.; Kovač, A.; Simčič, M.; Blanot, D.; Golič Grdadolnik, S.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Pertelin Mašić, L. Novel 2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting D-glu and diphosphate-binding sites *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3964-3975.

⁸⁵ Sim, M.M.; Ng, S.B.; Buss, A.D.; Crasta, S.C.; Goh, K.L.; Lee, S.K. Benzylidene rhodanines as novel inhibitors of UDP-*N*-acetylmuramate/L-Alanine ligase *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 697-699.

phosphinique visant les enzymes Ddl et VanX.⁸⁶

Dans le cas de la **MurC**, le groupe *AstraZeneca* a publié la synthèse des deux inhibiteurs **8** et **9** (Figure 10) très actifs avec une IC₅₀ respective de 49 nM et de 60 µM.⁸⁷ Le mode d'inhibition de **8** a montré que le complexe enzyme/ATP/inhibiteur ou enzyme/ADP/inhibiteur est stable, ce qui stoppe l'activité enzymatique.⁸⁸

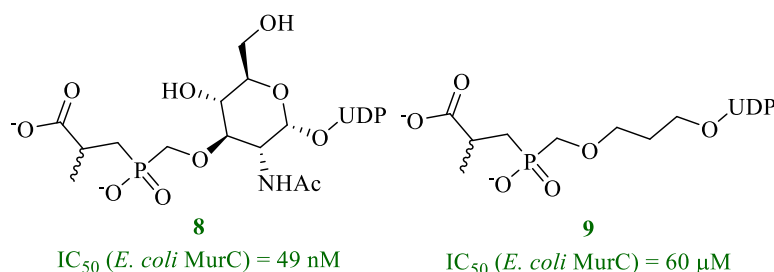


Figure 10 : Structure d'analogues phosphiniques de la MurC⁸⁷

Pour la **MurD**, le premier inhibiteur phosphinique présentant une bonne inhibition est le composé **10** actif avec une IC₅₀ de l'ordre du µM (Figure 11).⁸⁹ Le groupe *Merck* a publié d'autres inhibiteurs avec des structures similaires. L'ajout d'une partie glucosamine sur l'analogue **11** (Figure 11) a permis d'améliorer l'activité avec une IC₅₀ de l'ordre du nM.⁹⁰ Blanot *et coll.* ont publié des inhibiteurs simplifiés synthétiquement en gardant seulement la partie peptidique-acide phosphinique en se basant sur la structure du dérivé **12** avec une IC₅₀ de 20 nM (Figure 11).⁹¹ Ils publient également des composés sulfonamide peptide-phosphiniques comme le composé **13**, le plus actif avec une IC₅₀ de 78 µM (Figure 11).

⁸⁶ (a) Walsh, C.T.; Wu, Z. Phosphinate analogs of D-, D-dipeptides: slow-binding inhibition and proteolysis protection of VanX, a D-, D-dipeptidase required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* PNAS **1995**, 92, 11603-11607; (b) Ellsworth, B.A.; Tom, N.J.; Bartlett, P.A. Synthesis and evaluation of inhibition of bacterial D-alanine:D-alanine ligases Chem. & Biol. **1996**, 3, 37-44.

⁸⁷ Reck, F.; Marmor, S.; Fisher, S.; Wuonola, M.A. Inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurC Bioorg. Med. Chem. Lett. **2001**, 11, 1451-1454.

⁸⁸ Marmor, S.; Peterson, C.P.; Reck, F.; Yang, W.; Gao, N.; Fisher, S.L. Biochemical characterization of a phosphinate inhibitor of *Escherichia coli* MurC Biochemistry **2001**, 40, 12207-12214.

⁸⁹ Tanner, M.E.; Vaganay, S.; Van Heijenoort, J.; Blanot, D. Phosphinate inhibitors of the D-glutamic acid-adding enzyme of peptidoglycan biosynthesis J. Org. Chem. **1996**, 61, 1756-1760.

⁹⁰ Gegnas, L.D.; Waddell, S.T.; Chabin, R.M.; Reddy, S.; Wong, K.K. Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme Mur D Bioorg. Med. Chem. Lett. **1998**, 8, 1643-1648.

⁹¹ Štrancar, K.; Blanot, D.; Gobec, S. Design, synthesis and structure-activity relationship of new phosphinate inhibitors of MurD Bioorg. Med. Chem. Lett. **2006**, 16, 343-348.

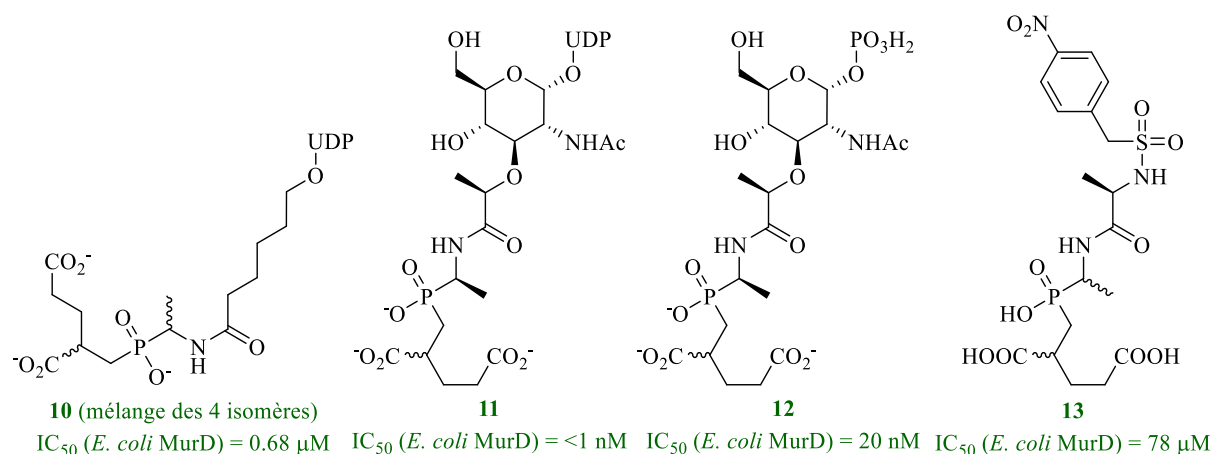


Figure 11 : Structure d'analogues phosphiniques de la MurD⁸⁹⁻⁹¹

Pour la **MurE**, le groupe Merk a synthétisé les analogues **14** et **15** avec une IC_{50} respective de 1,1 μ M et de 700 μ M (Figure 12).⁹² Gobec *et coll.* ont utilisé le composé **15** pour y ajouter divers substituants mais sans grande inhibition où le sulfonamine **16** présente la meilleure activité résiduelle avec 71% à 1 mM (Figure 12).⁹³ L'étude de *docking* d'un analogue de **16** a montré que ces molécules ne sont pas des inhibiteurs de l'état de transition mais plutôt des inhibiteurs compétitifs du substrat naturel. Pour la **MurF**, des analogues peptidiques phosphiniques de type Alkyl-Lys-PO₂H-Gly-Ala sont synthétisés avec un K_i compris entre 200 et 700 μ M.⁹⁴

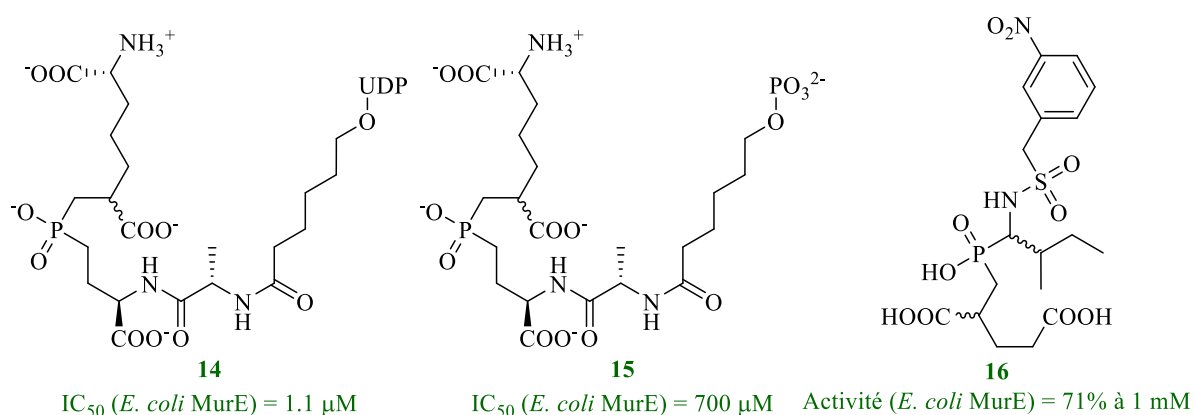


Figure 12 : Structure d'analogues phosphiniques de la MurE⁹²⁻⁹³

L'absence d'activité antibactérienne de ces analogues phosphiniques pourrait s'expliquer par leur faible pénétration au travers de la paroi cellulaire. Un point important que l'on doit retenir autour de la conception de ces dérivés est que la partie uridine est bénéfique pour conserver de bonnes IC_{50} pour

⁹² Zeng, B.; Wong, K.K.; Pompliano, D.L.; Reddy, S.; Tanner, M.E. A phosphinate inhibitor of the *meso*-diaminopimelic acid-adding enzyme (MurE) of peptidoglycan biosynthesis *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 10081-10086.

⁹³ Štrancar, K.; Boniface, A.; Blanot, D.; Gobec, S. Phosphinate inhibitors of UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: L-lysine ligase (MurE) *Arch. Pharm. Chem. Li. Sci.* **2007**, *340*, 127-134.

⁹⁴ Miller, D.J.; Hammond, S.M.; Anderluzzi, D.; Bugg, T.D. Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **1998**, *1*, 131-142.

chacune des Mur ligases. La synthèse totale de ces composés phosphiniques révèle être un challenge pour le rendement global et pour le nombre d'étapes.

- **Inhibiteurs peptidiques**

Il existe des petits peptides analogues du substrat naturel UDP sucre visant la **MurD**.⁹⁵ Le macrocycle peptidique **17** a été élaboré à partir de la structure cristallographique de l'enzyme et du *docking* de cet inhibiteur dans le site actif. Quelques analogues ont été synthétisés comme le composé **18** qui possède la meilleure activité avec une IC_{50} de 0,7 μ M (5,1 μ M pour **17**, Figure 13). Il existe quelques exemples où les auteurs ont élaboré des dérivés peptidiques visant la **MurE** mais aucun visant la **MurC** ou la **MurF**.⁹⁶

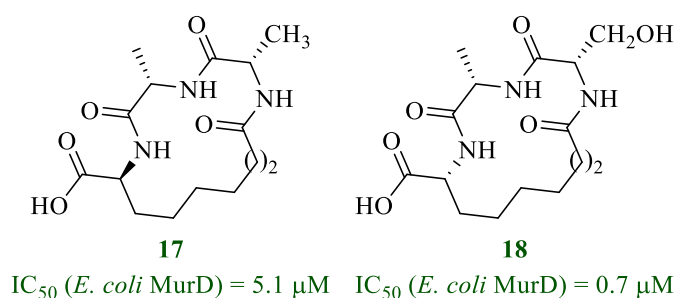


Figure 13 : Structure de peptides visant la MurD⁹⁶

Plusieurs groupes de biologistes se sont intéressés à la synthèse de peptides par utilisation de la technique du *phage display* de différentes banques de peptides. Cette technique met en évidence les interactions entre protéines, peptides ou ADN en se servant de bactériophages pour assembler les protéines aux gènes qui les codent. Le *phage display* identifie les peptides du phage qui se lient à la surface des Mur ligases en question. Par la suite, la synthèse de peptides identiques à ceux du phage en interaction est réalisée pour évaluer leurs inhibitions. Plusieurs études décrivent des grands peptides visant la **MurC**,⁹⁷ la **MurD**,⁹⁸ la **MurE**⁹⁹ et la **MurF**¹⁰⁰ mais avec de faible IC_{50} de l'ordre du mM.

⁹⁵ Horton, J.R.; Bostock, J.M.; Chopra, I.; Hesse, L.; Phillips, S.E.V.; Adams, D.J.; Peter Johnson, A.; Fishwick, C.W.G. Macrocyclic inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1557-1560.

⁹⁶ (a) Frlan, R.; Perdith, F.; Cirkvenič, N.; Pečar, S.; Obreza, A. Design and synthesis of novel UDP-Mur-NAC, UDP-Mur-NAC-L-Ala and UDP-Mur-NAC-L-Ala-D-Glu mimetics *Acta Chim. Slov.* **2009**, *56*, 580-590; (b) Zivec, M.; Turk, S.; Blanot, D.; Gobec, S. Design and synthesis of new peptidomimetics as potential inhibitors of MurE *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58*, 95-109.

⁹⁷ El Zoeiby, A.; Sanschagrín, F.; Darveau, A.; Brisson, J.-R.; Levesque, R.C. Identification of novel inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* MurC enzyme derived from phage-displayed peptide libraries *J. Anti. Chemo.* **2003**, *51*, 531-543.

⁹⁸ Paradis-Bleau, C.; Beaumont, M.; Boudreault, L.; Lloyd, A.; Sanschagrín, F.; Bugg, T.D.H.; Levesque, R.C. Selection of peptide inhibitors against the *Pseudomonas aeruginosa* MurC cell wall enzyme *Peptides* **2006**, *27*, 1693-1700.

⁹⁹ Paradis-Bleau, C.; Lloyd, A.; Sanschagrín, F.; Maaroufi, H.; Clarke, T.; Blewett, A.; Dowson, C.; Roper, D.I.; Bug, T.D.; Levesque, R.C. *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor *Biochem. J.* **2009**, *421*, 263-272.

¹⁰⁰ Paradis-Bleau, C.; Lloyd, A.; Sanschagrín, F.; Clarke, T.; Blewett, A.; Bug, T.D.; Levesque, R.C. Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF *BMC Biochem.* **2008**, *9*, 1-11.

- **Inhibiteurs hétérocycliques**

Le groupe *AstraZeneca* par un criblage à haut débit visant la **MurC** a identifié le sulfonamide **19** comme inhibiteur avec une IC_{50} de 2,3 μ M (Figure 14).¹⁰¹ Son action semble cibler le site de liaison du diphosphate. Cependant, le mode d'inhibition n'est pas clair et il semble avoir des affinités de liaison avec d'autres protéines.

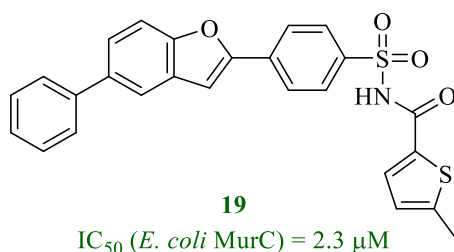


Figure 14 : Structure du composé **19** visant la MurC¹⁰¹

Pour la **MurD**, il existe des dérivés de type sulfono-hydrazone qui miment aussi le diphosphate du substrat UDP sucre.¹⁰² Le composé **20** montre la meilleure IC_{50} de 30 μ M sur l'enzyme mais aucune activité antibactérienne (Figure 15). D'autres analogues ont été conçus mais sans amélioration significative de l'activité biologique.¹⁰³ Gobec *et coll.* ont réalisé un criblage virtuel et identifié des inhibiteurs avec des structures de type xanthène visant la MurD et de type triazine visant la MurF mais aucun des hétérocycles ne visait la **MurE** pour le domaine 1.¹⁰⁴

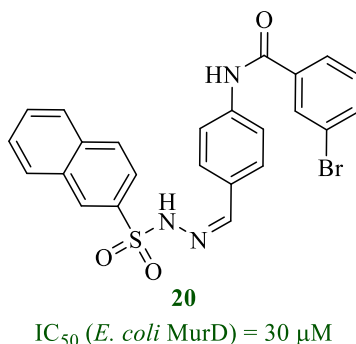


Figure 15 : Structure du composé **20** visant la MurD¹⁰²

Pour la **MurF**, d'autres criblages haut-débit de banque de molécules ont été réalisés, permettant

¹⁰¹ Ehmann, D.E.; Demeritt, J.E.; Hull, K.G.; Fisher, S.L. Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia coli* UDP-*N*-acetylmuramyl-L-alanine ligase *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1698*, 167-174.

¹⁰² Frlan, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Pečar, S.; Obreza, A. Design and synthesis of novel *N*-benzylidenesulfonohydrazide inhibitors of MurC and MurD as potential antibacterial agents *Molecules* **2008**, *13*, 11-30.

¹⁰³ Frlan, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Pečar, S.; Obreza, A. Design, synthesis and *in vitro* biochemical activity of novel amino acid sulfonohydrazide inhibitors of MurC *Acta Chim. Slov.* **2011**, *58*, 295-310.

¹⁰⁴ Turk, S.; Kovač, A.; Boniface, A.; Bostock, J.M.; Chopra, I.; Blanot, D.; Gobec, S. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1884-1889.

d'isoler la molécule **21** (Figure 16).¹⁰⁵ Les études enzymatiques ont révélé une IC₅₀ de 8 µM et ce résultat a été optimisé avec l'hétérocycle **22** avec une IC₅₀ de 22 nM (Figure 16). Les analyses structurales ont ensuite été réalisées en co-cristallisant le composé **21** avec la MurF.¹⁰⁶ Les auteurs ont conclu que ce dernier se fixe dans le site actif à la place du substrat UDP sucre naturel dans une conformation dite « fermée » de l'enzyme.¹⁰⁷ Ces composés n'ont pas d'activité antibactérienne même en présence de souches perméalisables. L'équipe de Gobec a alors décidé de reprendre le motif structural du composé **22** et d'en améliorer le profil. L'analogue hétérocyclique **23** montre une activité biologique contre des souches de *S. pneumoniae* avec une CMI de 16 µg/mL (Figure 16).¹⁰⁸ Néanmoins, la structure de la molécule **23** ou de ses analogues ne présentent pas d'activités sur d'autres souches bactériennes. D'autres travaux ont été publiés avec des dérivés de l'hétérocycle **23** actifs cette fois sur plusieurs souches.¹⁰⁹ Leur action antibactérienne résulte d'une dégradation de la membrane. D'autres analogues hétérocycliques ont été synthétisés mais sans grand succès.¹¹⁰

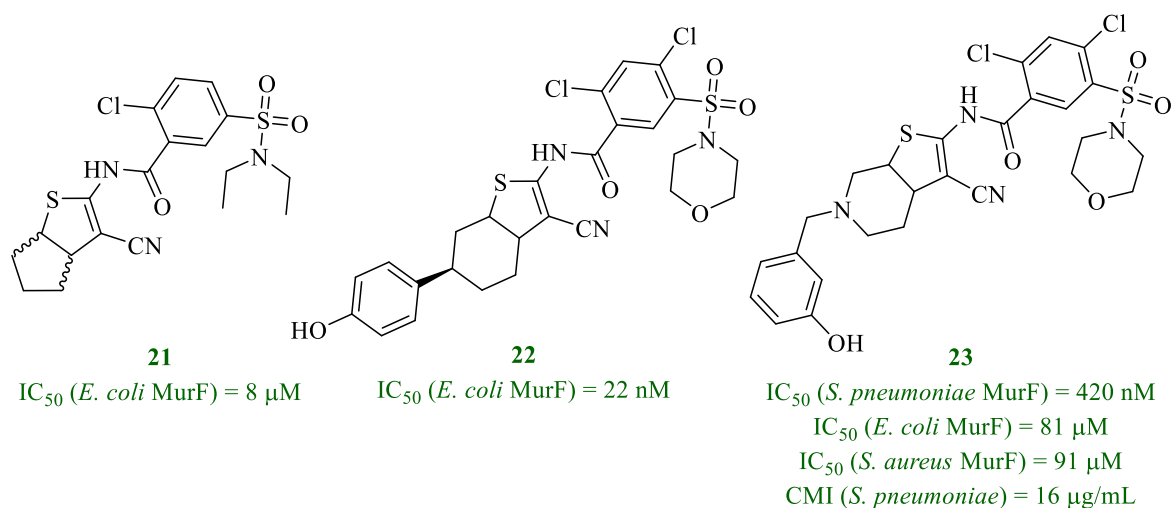


Figure 16 : Structure des composés **21**, **22** et **23** visant la MurF¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Le groupe *Johnson&Johnson* a élaboré des dérivés pyrimidiques inhibant la MurF mais sans activité *in*

¹⁰⁵ Comess, K.M.; Schurdak, M.E.; Voorbach, M.J.; Coen, M.; Trumbull, J.D.; Yang, H.; Gao, L.; Tang, H.; Cheng, X.; Lerner, C.G.; Owen McCall, J.; Burns, D.J.; Beutel, B.A. An ultraefficient affinity-based high-throughput screening process: application to bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurF *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 743-754.

¹⁰⁶ Longenecker, K.L.; Stamper, G.F.; Hajduk, P.J.; Fry, E.H.; Jakob, C.G.; Harlan, J.E.; Edalji, R.; Bartley, D.M.; Walter, K.A.; Solomon, L.R.; Holzman, T.F.; Gui Gu, Y.; Lerner, C.G.; Beutel, B.A.; Stoll, V.S. Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor interdomain closure *Prot. Sci.* **2005**, *14*, 3039-3047.

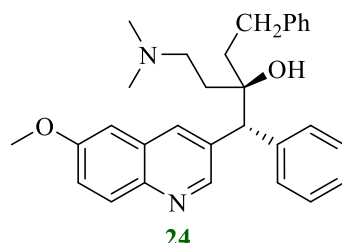
¹⁰⁷ Stamper, G.F.; Longenecker, K.L.; Fry, E.H.; Jakob, C.G.; Florjancic, A.S.; Gui Gu, Y.; Anderson, D.D.; Cooper, C.S.; Zhang, T.; Clark, R.F.; Cai, Y.; Black-Schaefer, C.L.; Owen McCall, J.; Lerner, C.G.; Hajduk, P.J.; Beutel, B.A.; Stoll, V.S. Structure-based optimization of MuF inhibitors *Chem. Biol. Drug Des.* **2005**, *67*, 58-65.

¹⁰⁸ Hrast, M.; Turk, S.; Sosič, I.; Knez, D.; Randall, C.P.; Barreateau, H.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; O'Neil, A.J.; Mengin-Lecreulx, D.; Blanot, D.; Gobec, S. Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 32-45.

¹⁰⁹ Hrast, M.; Anderluth, M.; Knez, D.; Randall, C.P.; Barreateau, H.; O'Neil, A.J.; Blanot, D.; Gobec, S. Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on cyanothiophene scaffold *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 83-96.

¹¹⁰ Turk, S.; Hrast, M.; Sosič, I.; Barreateau, H.; Mengin-Lecreulx, D.; Blanot, D.; Gobec, S. Biochemical characterization of MurF from *Streptococcus pneumoniae* and the identification of a new MurF inhibitor through ligand-based virtual screening *Acta Chim. Slov.* **2013**, *60*, 294-299.

vivo.¹¹¹ Ce n'est qu'à partir de 2007 que ce groupe a identifié par criblage des dérivés de type hydroxy-quinolines intéressants tel que le composé **24** qui possède une IC₅₀ de 29 µM (Figure 17). Ce composé est actif contre des souches bactériennes Gram+ et Gram-. Cependant, cette quinoline **24** semble réaliser des interactions avec d'autres protéines autres que la MurF.¹¹²



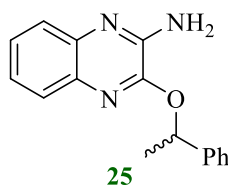
24

IC₅₀ (*E. coli* MurF) = 29 µM, CMI (*S. aureus*) = 8 µg/mL
CMI (*E. faecalis*) = 8 µg/mL, CMI (*E. faecium*) = 8 µg/mL

Figure 17 : Structure de **24** visant la MurF¹¹²

iii. Le domaine 2

Il existe très peu d'inhibiteurs du domaine 2 dans la littérature. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il existe beaucoup d'enzymes dépendantes de l'ATP comme les kinases et donc que le manque de sélectivité est très élevé. Le groupe *Pfizer* a réalisé un criblage de sa banque de molécules et a montré que le composé **25** est un inhibiteur compétitif de l'ATP visant sélectivement la **MurC** mais sans activité antibactérienne (Figure 18).¹¹³



25

IC₅₀ (*E. coli* MurC) = 30.2 µM, IC₅₀ (*P. mirabilis* MurC) = 41.4 µM
IC₅₀ (*K. pneumoniae* MurC) = 26.4 µM

Figure 18 : Structure du composé **25** visant la MurC¹¹³

iv. Les analogues naturels

Par criblage, deux composés naturels ont montré des activités biologiques contre la **MurE** : le composé **26** isolé d'une plante *Hypericum olympicum* et le composé **27** isolé d'un arbre *Rhodostemonodaphne crenaticupula* (Figure 19).¹¹⁴ Le composé **26** possède une IC₅₀ de 67 µM sur la

¹¹¹ Baum, E.Z.; Crespo-Carbone, S.M.; Abbanat, D.; Foleno, B.; Maden, A.; Goldschmidt, R.; Bush, K. Utility of mucopeptide ligase for identification of inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurF *Antimicrob. Ag. Chemother.* **2006**, *50*, 230-236.

¹¹² Baum, E.Z.; Crespo-Carbone, S.M.; Foleno, B.D.; Simon, L.D.; Guillemont, J.; Macielag, M.; Bush, K. MurF inhibitors with antibacterial activity: effect on mucopeptide levels *Antimicro. Ag. Chemother.* **2009**, *53*, 3240-3247.

¹¹³ Zawadzke, L.E.; Norcia, M.; Desbonnet, C.R.; Wang, H.; Freeman-Cook, K.; Dougherty, T.J. Identification of an inhibitor of the MurC enzyme, which catalyzes an essential step in the peptidoglycan precursor synthesis pathway *Assay Drug. Dev. Technol.* **2008**, *6*, 95-103.

¹¹⁴ (a) Shiu, W.K.P.; Malkinson, J.P.; Mukhlesur Rahman, M.; Curry, J.; Stapleton, P.; Gunaratnam, M.; Neidle, S.; Mushtaq, S.; Warner, M.; Livermore, D.M.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Bhakta, S.; Schindler, B.D.; Seo, S.M.; Coleman,

MurE issu de *M. tuberculosis*. Quant au composé **27**, il a une IC_{50} de 75 μ M contre la MuE et est actif contre plusieurs souches Gram+ et Gram–.

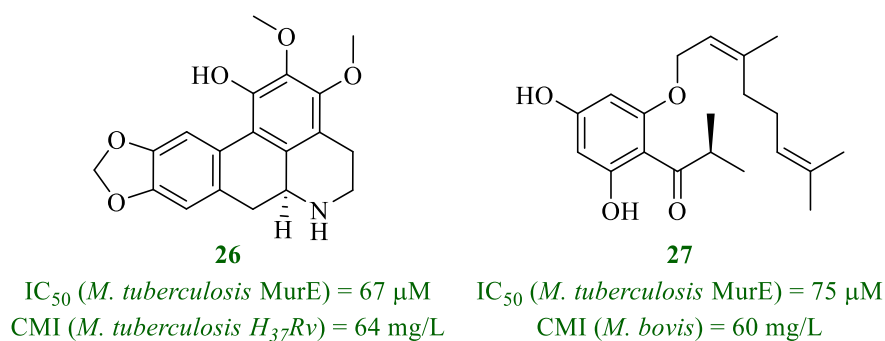


Figure 19 : Structure des composés naturels visant la MurE¹¹⁴

2. Inhibiteurs multiples

La conception d'inhibiteurs multiples consiste à synthétiser une molécule capable d'inhiber plusieurs Mur ligases en même temps.

i. Le domaine 3

Gobec *et coll.* a élaboré de nouvelles structures dérivées de l'acide D-glutamique en employant plusieurs approches *in silico* comme précédemment.⁸⁰⁻⁸⁴ Parmi ces précédentes études, ils ont pu identifier des composés multi-actifs.¹¹⁵ L'acide 3,5-phenylique dicarboxylique qui est le mime cyclique de l'acide D-glutamique semble jouer un rôle important dans la liaison avec chacune des Mur ligases. Dans un premier temps, ils développèrent des analogues de ce type visant la MurD et la MurE comme l'hétérocycle **28** avec une IC_{50} de 270 μ M sur la MurD et une IC_{50} de 32 μ M sur la MurE (Figure 20).¹¹⁶ Dans un deuxième temps, d'autres analogues modifiés sur la partie hétérocyclique qui se placent dans la poche du diphosphate tout en conservant l'acide 3,5-phenylique dicarboxylique ont été obtenus.¹¹⁷ Le composé **29** qui est le meilleur de la série, est capable d'inhiber les quatre Mur ligases avec des IC_{50} de 41 μ M (MurC), 60 μ M (MurD), 93 μ M (MurE), 89 μ M (MurF) (Figure 20).

D.; Kaatz, G.W.; Gibbons, S. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus* *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2013**, 42, 513-518; (b) Guzman, J.D.; Pesnot, T.; Barrera, D.A.; Davies, H.M.; MacMahon, E.; Evangelopoulos, D.; Mortazavi, P.N.; Munshi, T.; Maitra, A.; Lamming, E.D.; Angell, R.; Gershater, M.C.; Redmond, J.M.; Needham, D.; Ward, J.M.; Cuca, L.E.; Hailes, H.C.; Bhakta, S. Tetrahydroisoquinolines affect the whole-cell phenotype of *Mycobacterium tuberculosis* by inhibiting the ATP-dependent MurE ligase *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, 70, 1691-1703.

¹¹⁵ Tomašić, T.; Šink, R.; Zidar, N.; Fic, A.; Contreras-Martel, C.; Dessen, A.; Patin, D.; Blanot, D.; Müller-Premru, M.; Gobec, S.; Zega, A.; Kikelj, D.; Peterlin Mašič, L. Dual inhibitor of MurD and MurE ligases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 626-630.

¹¹⁶ Perdihi, A.; Kovač, A.; Wolber, G.; Blanot, D.; Gobec, S.; Solmajer, T. Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2668-2673.

¹¹⁷ Perdihi, A.; Hrast, M.; Barreateau, H.; Gobec, S.; Wolber, G.; Solmajer, T. Benzene 1,3-dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole derivatives as multiple inhibitors of bacterial Mur ligases (MurC-MurF) *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4124-4134.

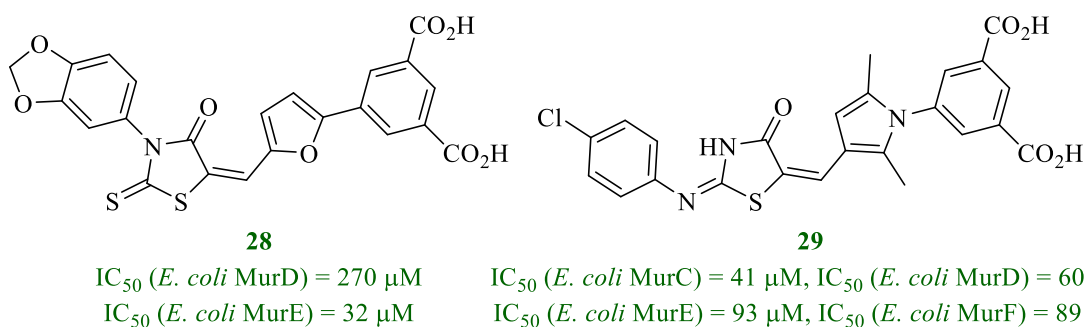


Figure 20 : Structure des composés multi-inhibiteurs 28 et 29 visant les MurC-F^{116,117}

Cette molécule **29** fait partie des meilleurs inhibiteurs multiples des Mur ligases. Même si les activités antibactériennes sont faibles,¹¹⁸ sa structure chimique est prometteuse car en la modifiant en faveur de meilleures propriétés physico-chimiques par d'autres pharmacophores, la pénétration cellulaire sera améliorée.

ii. Le domaine 1

• Inhibiteurs acide phosphonique

Gobec *et coll.* a développé une série d'analogues d'acide phosphorique d'hydroxy-éthylamine comme bioisostère de l'intermédiaire tétraédrique du substrat UDP sucre.¹¹⁹ Le composé **30** correspond au meilleur analogue de cette série, avec des IC_{50} de 26 μ M, 530 μ M, 160 μ M, 150 μ M pour respectivement la MurC à MurF, mais sans activité antibactérienne (Figure 21).

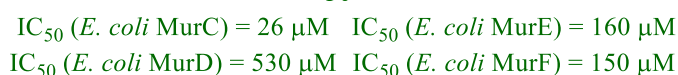
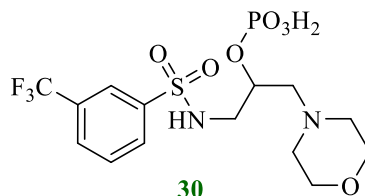


Figure 21 : Structure du composé multi-inhibiteur 30 visant les MurC-F¹¹⁹

• Inhibiteurs hétérocycliques

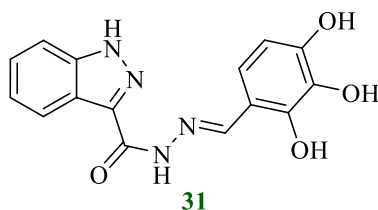
Gobec *et coll.* a synthétisé des analogues de structure *N*-acyl-hydrazone. Le composé **31** possède des IC_{50} de 123 μ M et 230 μ M contre respectivement la MurC et la MurD et a montré de faibles activités antibactériennes contre *E. coli* et *S. aureus* (Figure 22).¹²⁰ Les auteurs ont synthétisé d'autres

¹¹⁸ Tomašić, T.; Zidar, N.; Kovač, A.; Turk, S.; Simčič, M.; Blanot, D.; Müller-premru, M.; Filipič, M.; Golič Grdadolnik, S.; Zega, A.; Anderluh, M.; Gobec, S.; Kikelj, D.; Peterlin Mašič, L. 5-benzylidenethiazolidin-4-ones as multitarget inhibitors of bacterial Mur Ligases *ChemMedChem* **2010**, 5, 286-295.

¹¹⁹ Sova, M.; Kovač, A.; Turk, S.; Hrast, M.; Blanot, D.; Gobec, S. Phosphorylated hydroxyethylamines as novel inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzymes MurC to MurF *Bioorg. Chem.* **2009**, 37, 217-222.

¹²⁰ Šink, R.; Kovač, A.; Tomašić, T.; Rupnik, V.; Boniface, A.; Bostock, J.; Chopra, I.; Blanot, D.; Peterlin Mašič, L.; Gobec, S.; Zega, A. Synthesis and biological evaluation of *N*-acylhydrazones as inhibitors of MurC and MurD ligases *ChemMedChem* **2008**, 3, 1362-1370.

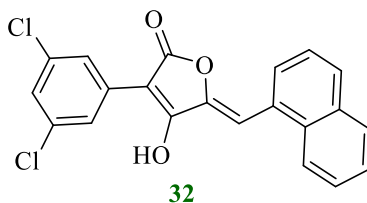
hétérocycliques afin d'adopter une conformation plus fermée dans l'enzyme qu'avec les substrats naturels des enzymes MurD et MurF.¹²¹



IC_{50} (*E. coli* MurC) = 123 μ M, IC_{50} (*E. coli* MurD) = 230 μ M
CMI (*E. coli*) = 128 μ M/mL, CMI (*S. aureus*) = 128 μ M/mL

Figure 22 : Structure du composé multi-inhibiteur **31** visant les MurC et D¹²⁰

Les hétérocycles de type benzylidenesulfono-hydrazine qui ont été synthétisés¹⁰²⁻¹⁰⁴ ont aussi montré que certains étaient des inhibiteurs multiples.¹²² Plusieurs structures sont multi-actives comme les pulvinones¹²³ ou le dihydro-thiènopirazolol phénylique¹²⁴. Récemment, une structure de type acide tetronique de naphthyle a montré être capable d'inhiber les quatre Mur ligases mais aussi la MurA et la MurB.¹²⁵ La molécule **32** a montré les meilleures activités de la série avec une IC_{50} de l'ordre de 20 μ M pour chaque enzyme et il est aussi capable d'inhiber la croissance bactérienne de souches d'*E. coli* et de *S. aureus* (Figure 23).



IC_{50} (*E. coli* MurA) = 39 μ M, IC_{50} (*E. coli* MurC) = 13 μ M
 IC_{50} (*E. coli* MurB) = 18 μ M, IC_{50} (*E. coli* MurD) = 44 μ M
 IC_{50} (*E. coli* MurE) = 16 μ M
CMI (*E. coli*) = 2 μ M/mL, CMI (*S. aureus*) = 1-2 μ M/mL

Figure 23 : Structure du composé multi-inhibiteur **32** visant les MurA-F¹²⁵

¹²¹ Turk, S.; Kovač, A.; Boniface, A.; Bostock, J.; Chopra, I.; Blanot, D.; Gobec, S. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1884-1889.

¹²² Frlan, R.; Kovač, A.; Blanot, D.; Gobec, S.; Pečar, S.; Obreza, A. Design and synthesis of novel *N*-benzylidenesulfonohydrazide inhibitors of MurC and MurD as potential antibacterial agents *Molecules* **2008**, *13*, 11-30.

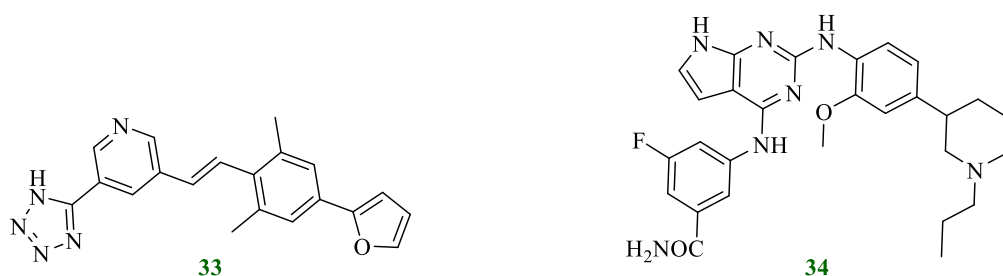
¹²³ Antane, S.; Caufield, C.E.; Hu, W.; Keeney, D.; Labthavikul, P.; Morris, K.; Naughton, S.M.; Peterson, P.J.; Rasmussen, B.A.; Singh, G.; Yang, Y. Pulvinones as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 176-180.

¹²⁴ Li, Z.; Francisco, G.D.; Hu, W.; Labthavikul, P.; Peterson, P.J.; Severin, A.; Singh, G.; Yang, Y.; Rasmussen, B.A.; Lin, Y.-I.; Skotnicki, J.S.; Mansour, T.S. 2-phenyl-5,6-dihydro-2*H*-thieno[3,2-*c*]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2591-2594.

¹²⁵ Mansour, T.S.; Caufield, C.E.; Rasmussen, B.A.; Chopra, R.; Krishnamurthy, G.; Morris, K.M.; Svenson, K.; Bard, J.; Smeltzer, C.; Naughton, S.; Antane, S.; Yang, Y.; Severin, A.; Quagliato, D.; Peterson, P.J.; Singh, G. Naphthyl tetronic acid as multi-target inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1414-1417.

iii. Le domaine 2

Zega *et coll.* a récemment publié des composés de structures différentes possédant des activités inhibitrices des MurC à MurF. Ces composés ont été obtenus par un criblage de molécules conçues initialement pour inhiber des kinases.¹²⁶ Les hétérocycles **33** et **34** sont des inhibiteurs des MurC-F avec une IC₅₀ comprise entre 10 et 368 µM (Figure 24). Cependant, les auteurs ont montré qu'en réalité ces derniers se lient sur le site de liaison de l'acide aminé.



IC₅₀ (*E. coli* MurC) = 368 µM, IC₅₀ (*E. coli* MurE) = 79 µM IC₅₀ (*E. coli* MurC) = 62 µM, IC₅₀ (*E. coli* MurE) = 58 µM
IC₅₀ (*E. coli* MurD) = 104 µM, IC₅₀ (*E. coli* MurF) = 59 µM IC₅₀ (*E. coli* MurD) = 32 µM, IC₅₀ (*E. coli* MurF) = 66 µM

Figure 24 : Structure des composés multi-inhibiteurs **33** et **34** visant les MurC-F¹²⁶

iv. Les analogues naturels

La feglymycine, isolée de souches de *Streptomyces*, est un inhibiteur naturel de la MurA et la MurC.¹²⁷ Ce 13-*mer* peptide possède une activité de l'ordre du µM sur la MurA et de l'ordre du mM sur la MurC (Figure 25).

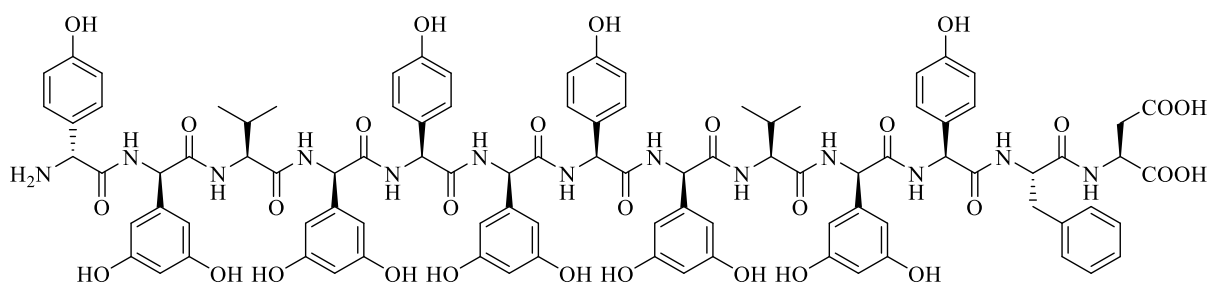


Figure 25 : Structure de la feglymycine visant les MurA et C¹²⁷

La recherche de structures innovantes continue afin de trouver des propriétés biologiques meilleures. Les techniques modernes restent très utilisées pour la conception des molécules potentiellement actives.¹²⁸ Après avoir présenté l'état de l'Art à propos des Mur ligases, nous allons définir les objectifs

¹²⁶ Hrast, M.; Rožman, K.; Ogris, I.; Škedelj, V.; Patin, D.; Sova, M.; Barreteau, H.; Gobec, S.; Golič Grdadolnik, S.; Zega, A. Evaluation of the published kinase inhibitor set to identify multiple inhibitors of bacterial ATP-dependent mur ligases *J. Enz. Inh. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1010-1017.

¹²⁷ Rausch, S.; Hänchen, A.; Denisiuk, A.; Löhken, M.; Schneider, T.; Süßmuth, R.D. Feglymycin is an inhibitor of the enzyme MurA and MurC of the peptidoglycan biosynthesis pathway *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1171-1173.

¹²⁸ Chakkyarath, V.; Natarajan, J. Identification of ideal multi-targeting bioactive compounds against Mur ligases of *Enterobacter aerogenes* and its bonding mechanism in comparison with chemical inhibitors *Int. Sci. Comp. Li. Sci.* **2019**, *11*, 135-144.

des travaux de cette thèse.

III Objectifs de la thèse

Les objectifs des travaux de thèse à réaliser au laboratoire s'intitulent :

Synthèse d'analogues de nucléosides et d'hétérocycles visant l'inhibition des Mur ligases bactériennes.

Synthesis of nucleosidic and heterocyclic analogues targeting the inhibition of bacterial Mur ligases.

L'état de l'Art autour des Mur ligases présente très peu d'inhibiteurs contenant des motifs nucléosidiques.

L'objectif de ces travaux de thèse est de concevoir de manière raisonnée de nouveaux analogues du substrat naturel des Mur ligases. Le défi de ces nouveaux composés, analogues de nucléosides, sera d'être inhibiteur multiple des Mur ligases.

Dans un deuxième chapitre, nous allons présenter la synthèse au laboratoire de deux familles de composés nucléosidique ayant deux rôles dans leur mode d'inhibition : soit de se lier dans la poche de l'uridine et du diphosphate (domaine 1 seul) ou soit de se lier en plus dans la poche de l'acide aminé (domaine 1 et 3) (Figure 26). L'accès de ces deux familles s'effectue selon une approche chimique orientée vers la diversité (DOS pour *diversity-oriented synthesis* en anglais).

La **Famille I** contiendra des analogues avec le motif uridine comme pour le substrat naturel où l'on sait que ce motif interagit fortement dans le site actif. Cette partie uridine sera attachée en position 5' par un groupement triazole qui pourra interagir dans la poche du diphosphate. L'objectif avec l'assemblage uridine-triazole est d'ajouter des groupements fonctionnels terminaux capables d'interagir soit dans la poche du diphosphate en plus du triazole soit plus loin vers le centre du site actif.

La **Famille II** contiendra aussi des analogues avec le motif uridine. Ce dernier sera lié en position 5' par un groupement éther-triazole qui pourra aussi interagir dans la poche du diphosphate. L'objectif avec cet assemblage uridine-éther-triazole est d'ajouter le groupement acide 3,5-phénylique dicarboxylique, potentiellement capable d'interagir avec chaque enzyme où la multi-inhibition a été observée dans certains hétérocycles issus de la littérature. Ce groupement sera lié par une chaîne carbonée de longueur et de nature que l'on modulera. D'autres variations seront réalisées à la place de ce motif acide 3,5-phénylique dicarboxylique. Une réaction clé de CuAAC sera utilisée pour obtenir ces familles. C'est l'objet du chapitre 2.

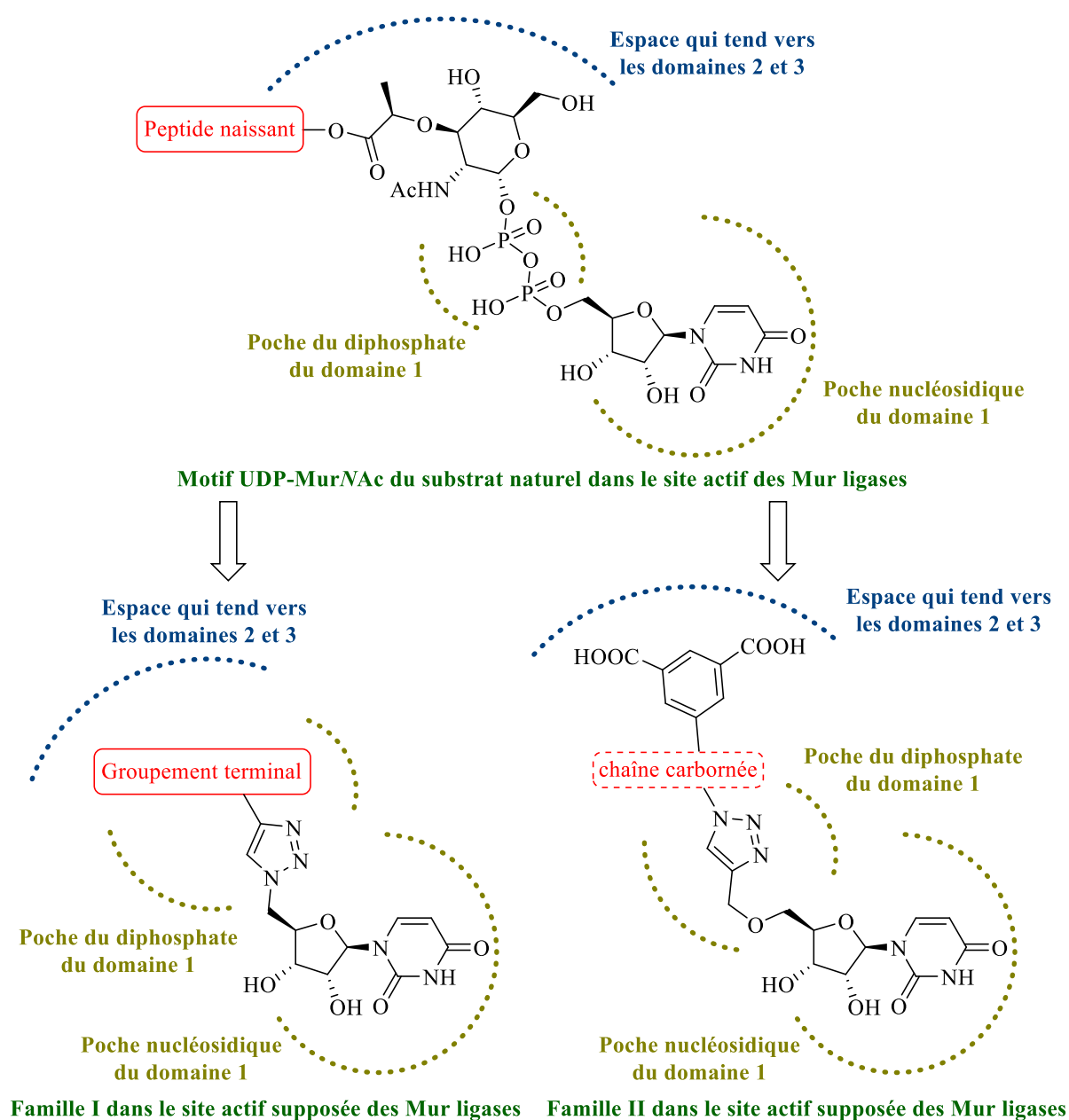


Figure 26 : Objectifs du chapitre 2

Dans un troisième chapitre, nous explorerons une nouvelle voie d'accès à des carbanucléosides via une étape clé de cyclisation par activation CH allylique catalysée au palladium (Figure 27).

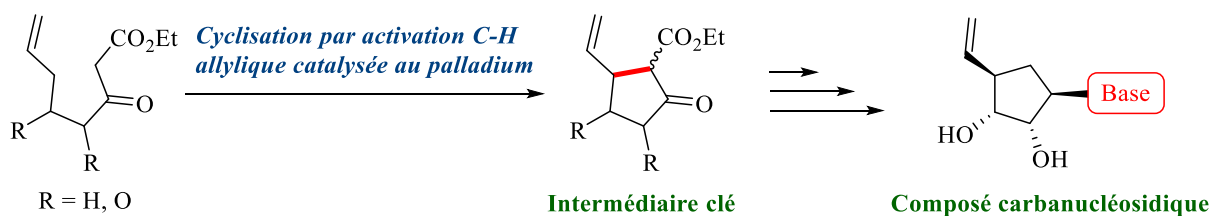


Figure 27 : Objectifs de l'exploration d'une nouvelle voie de synthèse du chapitre 3

Un criblage virtuel d'analogues carbocycliques de nucléosides, réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur Andrzej Bojarski de l'Académie des Sciences de Pologne, permettant l'obtention d'une

chimiothèque de carbanucléosides visant les Mur ligases sera présentée. La synthèse d'un de ces analogues nucléosidiques carbocycliques sera alors discutée (Figure 28). Cet analogue contient deux pharmacophores rationnels avec le motif nucléosidique modifié : le 4-*O*-carbauridine capable de se lier dans le site actif ; et le motif acide 3,5-phénylique dicarboxylique. Nous utiliserons deux réactions clé pour obtenir ce composé : avec la réaction de Mitsunobu et avec la réaction de métathèse croisée.

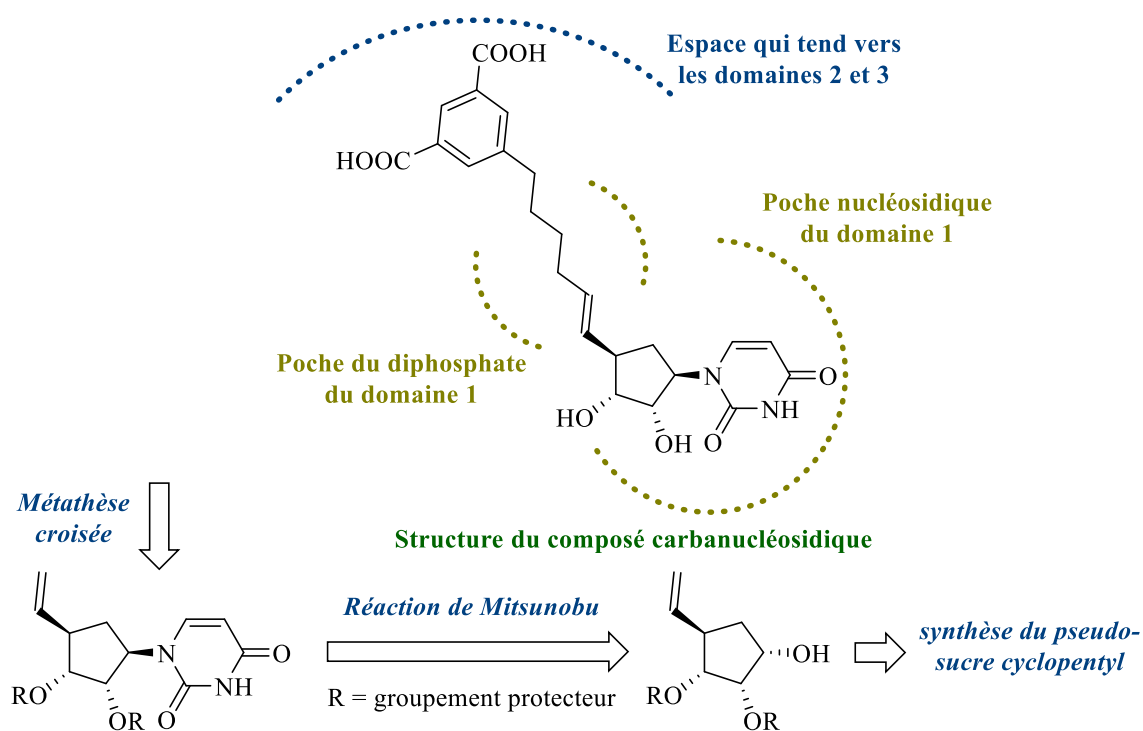


Figure 28 : Objectifs du chapitre 3

Dans un dernier chapitre annexe, nous avons synthétisé de petits hétérocycles portant un motif indole susceptibles de se lier dans le site de l'ATP des Mur ligases (Figure 29). Un composé similaire a été identifié comme inhibiteur des Mur ligases grâce à la collaboration avec le Professeur Urmi Bajpai de l'Université de New Delhi. Cet hétérocycle présente un groupement phényle substitué avec des fonctions nitro et c'est sur cette base que le motif indole sera modifié en position 3 par des groupements phényles substitués variés, contenant des fonctions nitro. La réaction clé pour obtenir ces dérivés est une activation C-H arylique.

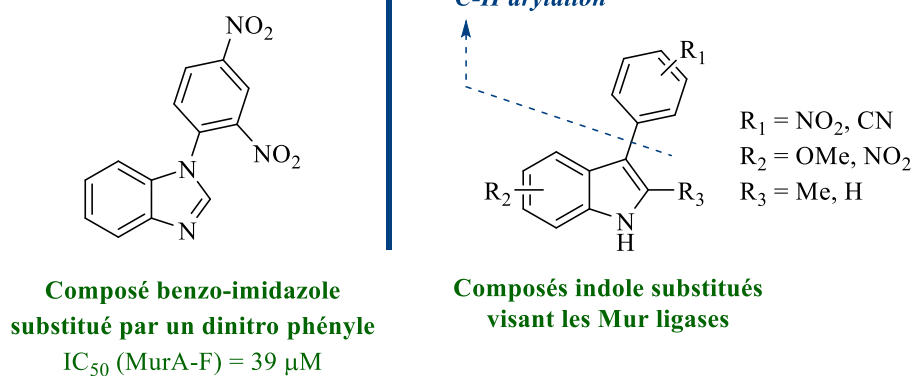


Figure 29 : Objectifs du chapitre 4

L'activité biologique des molécules synthétisées tout au long de ce travail de thèse a été évaluée sur un mélange d'enzymes MurA-F issues de souches de *Mycobacterium tuberculosis* par le professeur Urmi Bajpai du département de Sciences Médicales de l'Université de New Delhi en Inde. Ces composés seront aussi susceptibles d'être évalués sur chacune des Mur ligases pour évaluer la multi-inhibition. Les résultats des tests enzymatiques des différents composés seront analysés dans chaque chapitre correspondant.

Chapitre 2

Chapitre 2 : Synthèse orientée vers la diversité structurale

I Généralités

A. Objectifs

Dans une approche de diversité structurale, nous avons souhaité pouvoir accéder à une nouvelle chimiothèque de petits composés nucléosidiques contenant une diversité moléculaire et des points d'ancrages connus pour créer de nouveaux inhibiteurs multiples contre les Mur Ligases. La structure chimique de ces analogues nucléosidiques est basée sur une stratégie rationnelle au regard des substrats naturels des MurC, MurD, MurE et MurF. En effet, ces quatre substrats ont un point commun : le motif **UDP-MurNAc** (Schéma 1). Ce motif comporte un mode de liaison très similaire dans le site actif (domaine 1) pour chaque Mur ligase et permet d'envisager des inhibiteurs multiples pour bloquer le site de liaison du substrat naturel.

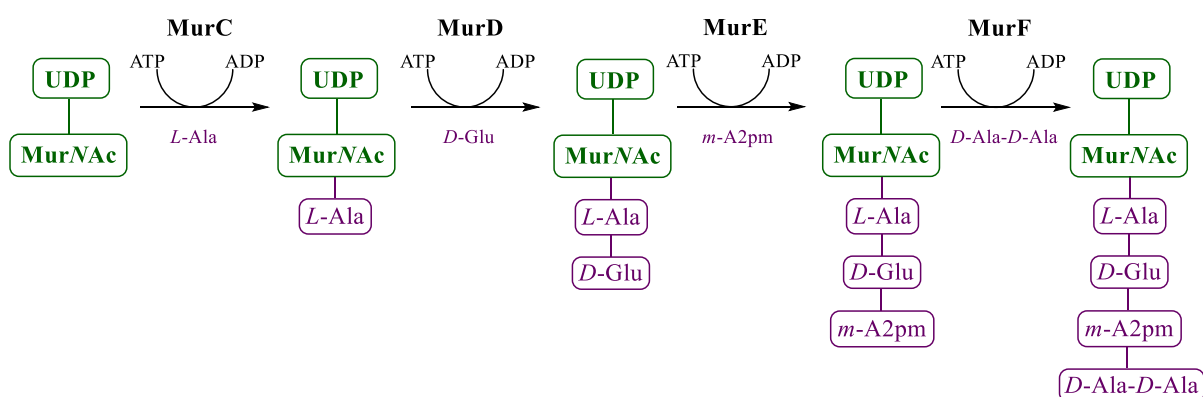


Schéma 1 : Biosynthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide des Mur ligases (d'après Kouidmi, Réf. 44, chapitre 1)

En s'intéressant de plus près à la structure de l'UDP-MurNAc, on constate qu'elle est constituée d'une glucosamine modifiée (acide muramique) liée à un groupement diphosphate en position 5' d'une uridine (Figure 1). Les parties uridine et diphosphate sont essentielles car elles sont capables de créer d'importantes liaisons hydrogènes dans le site actif (comme on peut le voir dans le site actif de la MurC avec le substrat UDP-MurNAc) ; tandis qu'au contraire, la partie acide muramique se situe plus au centre du site actif et se lie essentiellement à un ion magnésium. Cette partie acide muramique est intéressante puisqu'elle n'a pas d'importantes interactions avec l'enzyme. Elle peut être remplacée et/ou diversifiée pour combler les espaces chimiques tridimensionnelles inoccupés tout en conservant les parties uridine et diphosphates essentielles comme points d'ancrages au site actif.

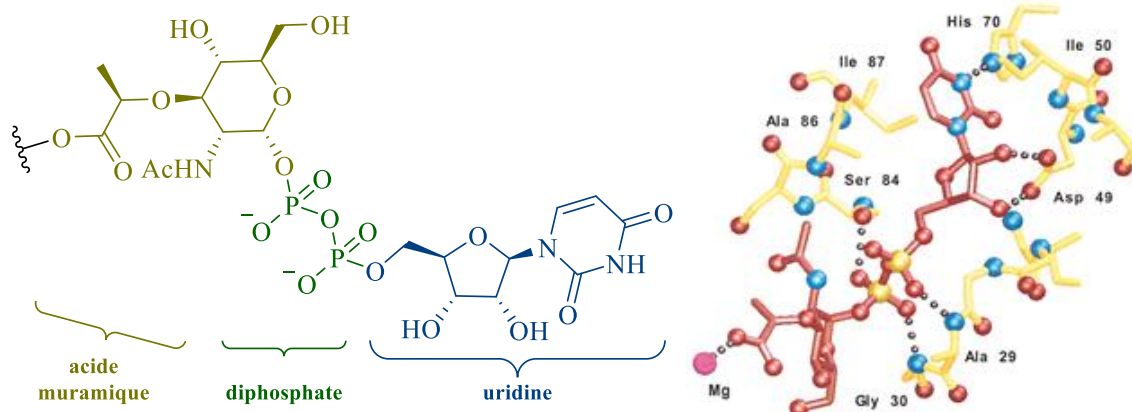


Figure 1 : Structure du motif UDP-MurNAc et structure du site actif de la MurC avec l'UDP-MurNAc (Réf. 74, chap. 1)

Cependant, l'intérêt d'obtenir une diversité moléculaire est de procéder avec une synthèse rapide (pour avoir le plus de molécules possibles), ce qui n'est pas vraiment réalisable avec une structure comme l'uridine diphosphate, car elle est moins accessible et montre plusieurs limitations. Du point de vue du chimiste, la synthèse des analogues de nucléotide-sucres ou de nucléoside diphosphate peut s'avérer être un vrai défi en terme de synthèse chimique avec la formation de la liaison diphosphate comme étape limitante.¹ C'est une synthèse non-triviale qui peut se compliquer par différents facteurs comme la faible solubilité dans les solvants organiques. De plus, le groupement diphosphate dans un milieu biologique extracellulaire n'est pas stable métaboliquement car il peut facilement être clivé par des phosphatases. C'est pourquoi, nous avons choisi de préserver la partie nucléosidique, avec l'uridine commune au substrat naturel, qui sera fonctionnalisée par un groupement plus accessible chimiquement et plus stable métaboliquement que le diphosphate. Notre choix du groupement remplaçant le diphosphate s'est porté sur l'hétérocycle [1,2,3]-triazole car il présente de nombreux avantages dont celui d'être compatible avec une synthèse débouchant vers une grande diversité structurale.

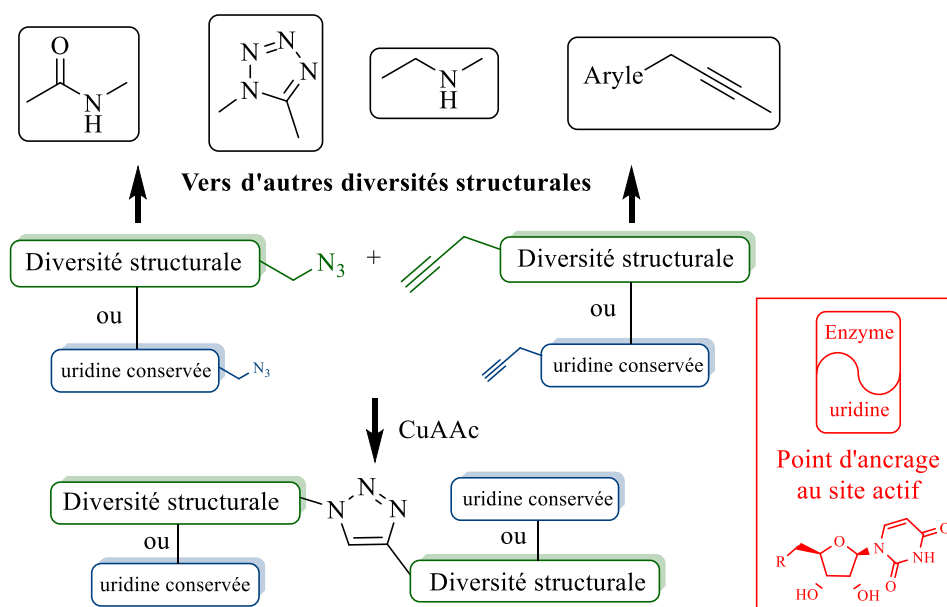
Couramment utilisé dans la chimie des nucléosides/tides, le 1,2,3-triazole dévoile aussi ses avantages dans le milieu biologique :²

¹ (a) Wagner, G.K.; Pesnot, T.; Field, R.A. A survey of chemical methods for sugar-nucleotide synthesis *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1172-1194; (b) Xu, Z. A review on the chemical synthesis of pyrophosphate bonds in bioactive nucleoside diphosphate analogs *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3777-3783.

² (a) Amblard, F.; Cho, J.H.; Schinazi, R.F. The Cu(I)-catalyzed Huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide and oligonucleotide chemistry *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207-4220; (b) Bonandi, E.; Christodoulou, M.S.; Fumagalli, G.; Perdicchia, D.; Rastelli, Passarella, D. The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry *Drug Dis. Tod.* **2017**, *22*, 1572-1581; (c) Wang, S.; Shen, D.L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Mortuaire, M.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebvre, T.; Pinto, B.M.; Vocadlo, D.; Vidal, S. Design of glycosyltransferase inhibitors targeting human O-GlcNAc transferase (OGT) *Med. Chem. Comm.* **2014**, *5*, 1172-1178; (d) Pastuch-Gawolek, G.; Plesniak, M.; Komor, R.; Byczek-Wyrostek, A.; Erfurt, K.; Szeja, W. Synthesis and preliminary biological assay of uridine glycoconjugate derivatives containing amide and/or 1,2,3-triazole linkers *Biorg. Chem.* **2017**, *72*, 80-88.

- Il est de charge neutre à pH physiologique à l'inverse du diphosphate qui est chargé négativement. Bien qu'il soit complexe de définir les principes pour la pénétration cellulaires,³ la charge neutre pourrait faciliter la pénétration des analogues car ils seront moins hydrophiles. De plus, l'hétérocycle triazole présente des sites accepteur (par l'azote) et des sites donneur (par le carbone) de liaison hydrogène qui permettent d'interagir avec la poche du site actif ou encore avec le cation Mg^{2+} divalent comme l'aurait fait le groupement diphosphate.
- Il est plus stable car sa forte stabilisation aromatique suggère une bonne résistance aux dégradations métaboliques.⁴

Ce cycle est obtenu par une cycloaddition 1,3-dipolaire (que nous allons rappeler ci-après) à partir de deux partenaires azotures et alcynes, et apporte la variation structurale aux analogues synthétiques (Figure 2).



Synthèse orientée vers une diversité structurale par l'hétérocycle [1,2,3]-triazole

Figure 2 : Approche synthétique du DOS avec l'hétérocycle triazole

L'uridine peut soit porter la fonction azoture (*via* le 5'-azido-5'-déoxyuridine), soit la fonction alcyne (sous la forme d'un 5'-O-propargyluridine).

La première diversité moléculaire, appelée **Famille I**, possède des analogues avec une structure chimique de type 5'-[1,2,3]-triazole-5'-déoxy-uridine, obtenus avec le partenaire 5'-azido-5'-déoxyuridine et le partenaire alcyne contenant la diversité structurale (Figure 3). La fonctionnalisation de ce motif va permettre d'insérer des groupements fonctionnels qui vont

³ Benedetto Tiz, D.; Kikelj, D.; Zidar, N. Overcoming problems of poor drug penetration into bacteria: challenges and strategies for medicinal chemists *Exp. Opin. Drug Dis.* **2018**, *13*, 497-507.

⁴ Tron, G.C.; Pirali, T.; Billington, R.A.; Canonico, P.L.; Sorba, G.; Genazzani, A.A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308.

s'étendre vers le centre du site actif de l'enzyme en gardant l'hypothèse que l'uridine et le triazole se fixent dans la poche du substrat naturel. Les fonctions chimiques ajoutées ont pour but d'explorer l'espace chimique tridimensionnel du site actif central en interagissant dans les domaines 1,2 ou 3 de chaque Mur ligase selon leurs natures chimiques.

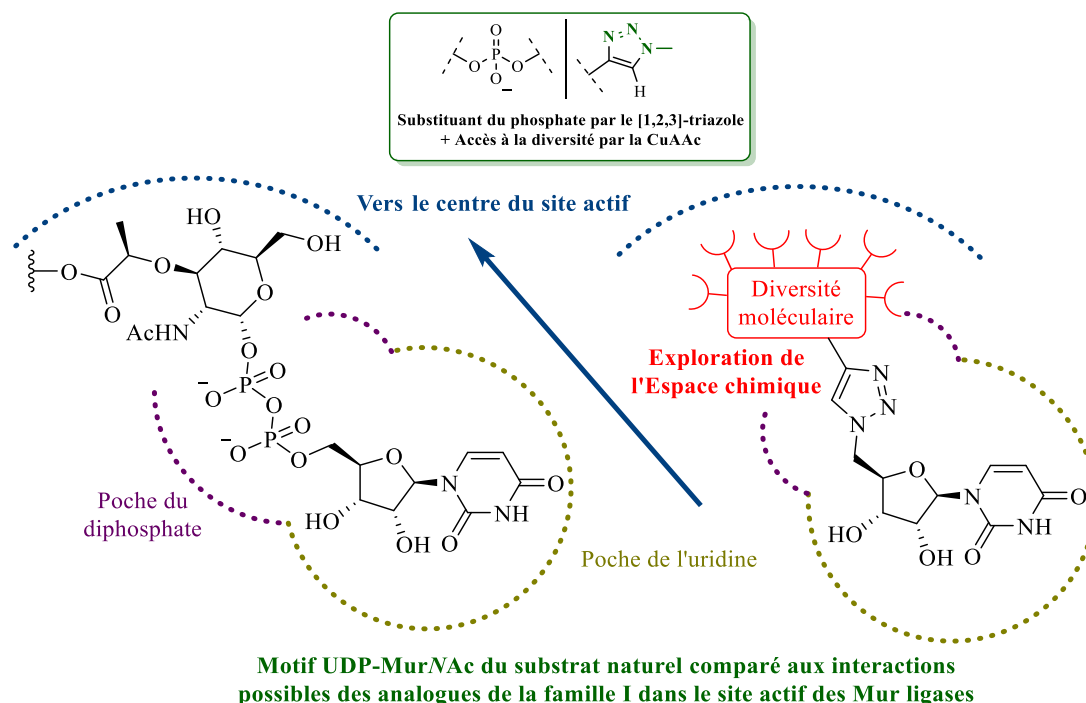


Figure 3 : Comparaison de structures du substrat naturel et des analogues de la famille I

La deuxième diversité moléculaire appelée **Famille II** comprend des analogues possédant une structure de base 5'-(*O*-méthyléther-[1,2,3]-triazole)-uridine obtenue à partir du partenaire alcyne 5'-*O*-propargyl-uridine et du partenaire azoture contenant la variété structurale. La fonctionnalisation du motif de base va également permettre d'insérer une diversité moléculaire de groupements fonctionnels qui vont s'étendre vers le centre du site actif de l'enzyme (Figure 4). Les fonctions chimiques ajoutées ont pour but d'explorer l'espace chimique tridimensionnel du site actif central notamment avec un groupement acide 3,5-phénylique dicarboxylique qui montre des propriétés d'inhibitions multiples présentes sur d'autres hétérocycles visant les Mur ligases (voir chapitre 1, page 54-55).

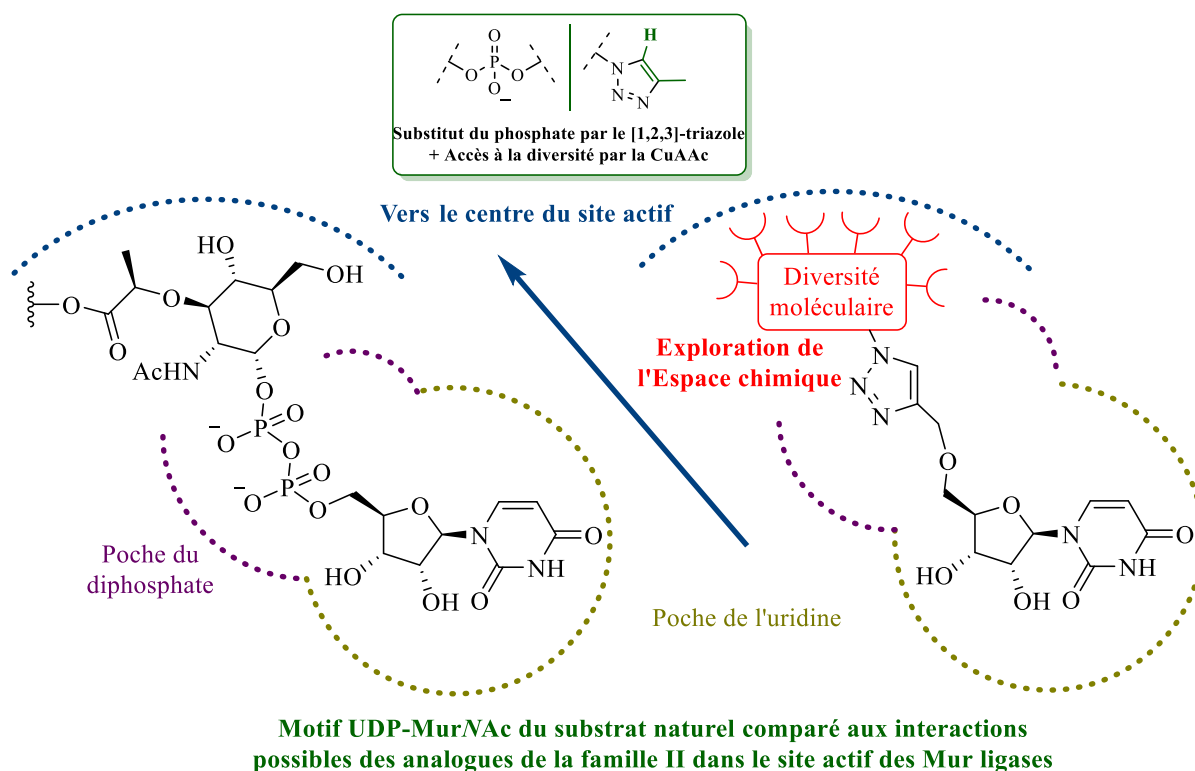


Figure 4 : Comparaison de structures du substrat naturel et des analogues de la famille II

B. La réaction de Huisgen

Rolf Huisgen a proposé une méthodologie pour construire des hétérocycles à cinq chaînons ; appelée « cycloaddition 1,3 dipolaire » comme les furanes, les isoxazoles, les pyrrolidines ou aussi les triazoles.⁵ Cette cycloaddition 1,3-dipolaire permet de former l'hétérocycle triazole avec la présence d'un dipôle de type azoture et un dipolarophile de type alcyne. Les conditions expérimentales de cette cyclisation peuvent être réalisées seulement en présence de l'azoture et de l'alcyne. Cependant, cette cycloaddition 1,3 dipolaire conduit à mélange de deux régioisomères 1,4 et 1,5 avec en proportion 1,6/1 (Schéma 2).⁶

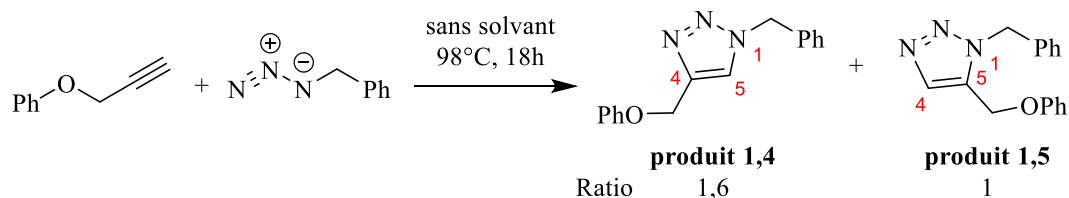


Schéma 2 : Régiosélectivité de la cycloaddition 1,3-dipolaire en condition thermique

⁵ (a) Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. Past and future *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598; (b) Hashimoto, T.; Maruoka, K. Recent advances of catalytic asymmetric 1,3-Dipolar cycloadditions *Chem. Rev.* **2015**, 115, 5366-5412.

⁶ Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.

Une avancée majeure à cette limitation a été apportée par les groupes de recherche de Meldal et de Sharpless qui ont développé une cycloaddition catalysée par le cuivre(I) qui permet d'obtenir sélectivement le régioisomère 1,4.⁷ Le terme utilisé sera la cycloaddition d'azido-alkyne catalysée par le cuivre(I) (CuAAC pour le terme anglais *Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*). L'utilisation d'autres métaux peuvent permettre la formation de l'autre régioisomère 1,5 comme avec le ruthénium (RuAAC).⁸ Dans des conditions de CuAAC, la source de cuivre(I) est couramment obtenue en présence du sulfate de cuivre(II) et d'un agent réducteur comme l'ascorbate de sodium. L'état d'oxydation du cuivre(II) est réduit *in situ* en cuivre(I). Le mécanisme réactionnel proposé par plusieurs groupes de recherche dont celui de Fokin et de Sharpless (Schéma 3)⁹ est décrit ci-dessous ; plus récemment, le groupe de Passerone a confirmé ce mécanisme et a proposé divers états de transition selon les substitutions utilisées.¹⁰

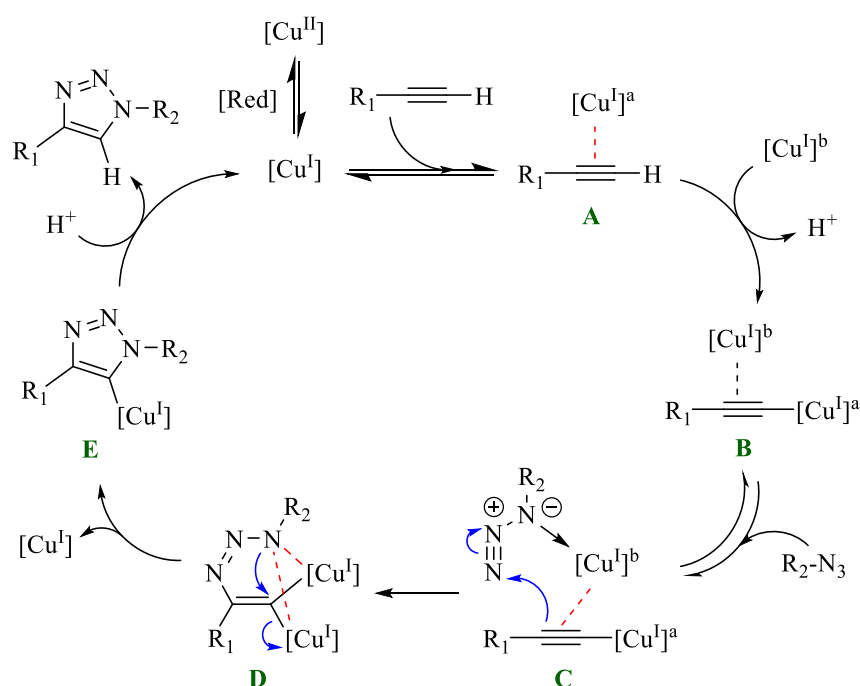


Schéma 3 : Mécanisme réactionnel d'une CuAAC

⁷ (a) Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064; (b) Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click chemistry : Diverse chemical function from a few good reactions *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

⁸ Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H.H.Y.; Williams, I.D.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.

⁹ (a) Rodionov, V.O.; Fokin, V.V.; Finn, M.G.; Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215; (b) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

¹⁰ Danese, M.; Bon, M.; Piccini, G.; Passerone, D. The reaction mechanism of the azide-alkyne Huisgen cycloaddition *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 19281-19287.

Le mécanisme débute par la réduction du cuivre(II) en cuivre(I) par l'ascorbate de sodium ([Red]). Le cuivre(I) va former un complexe- π avec l'alcyne terminal pour donner l'intermédiaire **A** (Schéma 3). Le proton acide de l'alcyne permet de former l'intermédiaire acétylure de cuivre **B**. Les études ont montré que la suite du mécanisme était du second ordre avec le cuivre et cela implique des intermédiaires avec deux atomes de cuivre.¹¹ Un second cuivre(I) vient donc effectuer un complexe- π avec **B** pour donner **C**. Un rapprochement de l'azoture permet par la coordination des électrons de l'azote de l'azoture sur le cuivre(I) et forme l'intermédiaire **D**. A ce niveau, la cyclisation a lieu par l'attaque de l'azote nucléophile coordonné au cuivre sur le carbone électrophile et provoque le départ d'un atome de cuivre(I) pour former l'intermédiaire **E**. Enfin, une protonation permet d'obtenir le produit final où le proton provient de l'alcyne vrai de départ. Cette réaction de Huisgen catalysée par le cuivre(I) entre un alcyne et un azoture (CuAAC) va nous permettre de synthétiser les analogues de la Famille I et II que nous allons montrer.

II Rétrosynthèse de la Famille I

La rétrosynthèse pour accéder aux molécules de la famille I repose sur une étape CuAAC comme étape clé, entre plusieurs alcynes vrais **A** et un azoture **B** préparé à partir du synthon **C** provenant de l'uridine commerciale (Schéma 4).

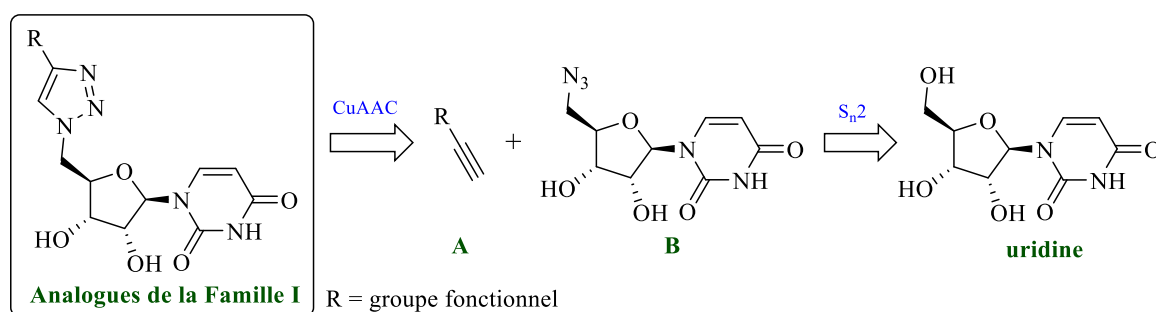


Schéma 4 : Rétrosynthèse envisagée pour les analogues de la Famille I

Le synthon **B** (5'-azido-5'-déoxyuridine) est obtenu par substitution nucléophile (S_N2) de l'uridine, préalablement activé sur la position 5'. Cette voie de synthèse montre la facilité d'apporter de la diversité moléculaire par des alcynes vrais de structures variées, disponibles commercialement ou par synthèse.

¹¹ Lacobucci, C.; Reale, S.; Gal, J.-F.; De Angelis, F. Dinuclear copper intermediates in copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition directly observed by electrospray ionization spectrometry *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3065-3068.

III Synthèse des analogues de la Famille I

A. Synthèse du 5'-azido-5'-déoxy-uridine

La synthèse de dérivé azoture en position 5' du ribofuranose est très utilisée dans la chimie des nucléosides.¹² Au laboratoire, nous avons choisi une méthode pour l'obtenir en une seule étape à partir de l'uridine commerciale **1**.¹³ Cette synthèse 'one-pot' s'effectue avec la formation de l'intermédiaire bromé **2** *in situ* qui est ensuite substitué sans l'isoler par les sels d'azoture présents dans le milieu réactionnel (Schéma 5). Cette procédure, similaire à la réaction d'Appel permet d'obtenir le 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** avec un rendement de 94% sur une grande échelle (>5 g). Pour confirmer la structure du 5'-azido-5'-déoxy-uridine **3** en plus de l'HRMS (*High-resolution mass spectrometry*) et de la RMN (*Résonance magnétique nucléaire*), l'analyse infra-rouge confirme bien la présence de la bande du N₃ vers 2100 cm⁻¹.

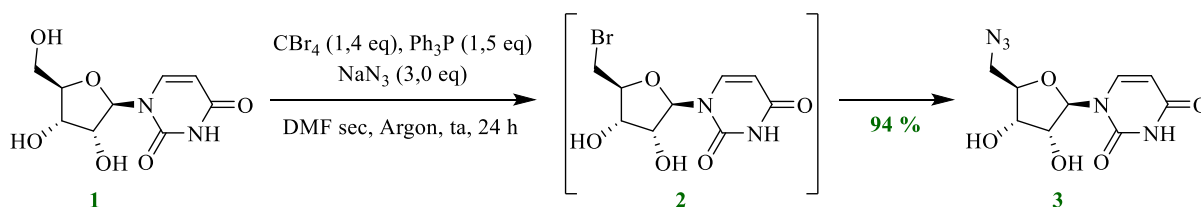


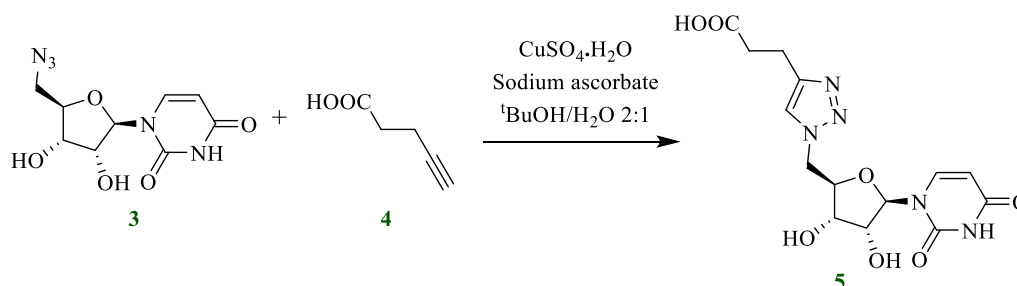
Schéma 5 : Préparation du composé 3

A) Synthèse des analogues nucléosidiques 1,2,3-triazoles

Nous avons tout d'abord réalisé des essais de réaction CuAAC entre le composé **3** et l'acide 4-pentynoïque **4** pour déterminer les meilleures conditions expérimentales (Tableau 1). Le composé **5** a été isolé avec un premier rendement de 22 % en présence de 5 mol% de CuSO₄ et de 0,3 équivalent d'ascorbate de sodium à température ambiante (entrée 1). En augmentant la température à 40°C, on obtient un rendement de 45 % (entrée 2) puis avec un autre test, on augmente les nombres d'équivalents de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium pour obtenir un rendement amélioré de 56 % (entrée 3). Nous n'observons pas forcément le proton de l'acide carboxylique sur le spectre RMN dans le DMSO-*d*₆ car il est labile et s'échange facilement avec un atome de deutérium. Mais l'analyse HRMS montre bien que nous obtenons très majoritairement l'ion [M+H]⁺ plutôt que l'ion [M+Na]⁺, ce qui semble montrer un échange peu favorable entre ce proton et un atome de sodium provenant de l'ascorbate de sodium.

¹² (a) Kheng Yeoh, K.; Butters, T.D.; Wilkinson, B.L.; Fairbanks, A.J. Probing replacement of pyrophosphate *via* click chemistry; synthesis of UPD-sugar analogues as potential glycosyl transferase inhibitors *Carb. Res.* **2009**, *344*, 586-591; (b) Blatt, L.M.; Beigelman, L.; Dyatkina, N.; Symons, J.A.; Smith, D.B. Preparation of substituted nucleosides, nucleotides and analogs thereof as antiviral agents *Patent US 20150366887 A1* **2015**.

¹³ Yamamoto, I.; Sekine, M.; Hata, T. One-step synthesis of 5'-azido-nucleosides *J. Chem. Soc. Perk. Trans. I* **1980**, 306-310.



Entrée	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sodium ascorbate	Temp.	Tps	Rdt
1	5 mol%	30 mol%	ta	4 h	22 %
2	5 mol%	30 mol%	40°C	4 h	45 %
3	10 mol%	60 mol%	40°C	2,5 h	56 %

Tableau 1 : Premiers essais de CuAAC avec l'azoture **3** et l'acide 4-pentynoïque **4**

La synthèse des autres analogues nucléosidiques contenant l'hétérocycle [1,2,3]-triazole est réalisée à partir de l'azoture **3** en présence d'alcynes vrais selon la réaction de CuAAC présentée précédemment (Tableau 2). La diversité moléculaire des alcynes utilisés montre des fonctions chimiques variées que l'on apporte aux produits finaux (Tableau 2, composés **5-24**). On considère l'hypothèse suivante selon laquelle la partie uridine avec le cycle triazole occupe le site actif du substrat naturel des Mur ligases et que les fonctions diverses sont composées de :

- Une **fonction acide carboxylique** portée par une chaîne carbonée saturée où l'on fait varier la longueur de la chaîne afin de donner au produit une flexibilité différente (composés **5,6** et **7**). L'acide carboxylique va se positionner au mieux vers le centre du site actif selon sa taille. Sous sa forme chargée, il pourrait interagir avec l'ion magnésium ou se fixer à l'enzyme bloquant le site actif.
- Une **fonction alcool** portée par une chaîne carbonée saturée où l'on fait aussi varier la longueur de la chaîne (composés **8, 9, 10** et **11**). L'alcool avec sa chaîne occupe l'espace et est capable d'interagir avec l'enzyme pour bloquer le site actif.
- Une **fonction amine** ou **amide** sans chaîne carbonée et donc très proche du cycle triazole (composés **12** et **13**). Ici, ces fonctions chimiques ont pour but de renforcer les interactions avec la poche du substrat naturel. De la même manière, les composés **14** et **15** (avec une **fonction amide substituée**) ont le même objectif et ils ont l'avantage d'apporter en plus une gêne stérique avec la présence d'une chaîne carbonée saturée flexible.
- Un groupement **hétérocyclique/cyclique aromatique ou non** permet d'apporter un encombrement stérique dans le site actif avec les composés **16, 17, 18, 19, 20** et **21**.
- Une **fonction diamino-pyrimidine** portée par une chaîne carbonée saturée comme le montre le composé **22**. Même si nous n'avons pas pu l'obtenir, la structure de ce composé **22** est particulière

puisqu'elle avait pour but de se fixer dans le pli de Rossman qui est présent dans le domaine 3 du site actif des Mur ligases (voir chapitre 1, page 41-42). Cette fonction pourrait empêcher le changement conformationnel de l'enzyme en maintenant une forme ouverte de l'enzyme avec cette interaction avec ce pli de Rossman.

- Une **fonction glucose modifiée**, très proche du substrat naturel avec les composés **23** et **24**. Cette fonction permet d'interagir avec l'enzyme et d'apporter un gêne stérique.

La synthèse des analogues **14**, **15** et **22** par la réaction de CuAAC nécessite une préparation au préalable de l'alcyne. Pour les composés **14** et **15**, la procédure s'effectue en une étape à partir de la propargylamine et du chlorure d'acyle en milieu basique (Schéma 6). Cette méthode permet d'obtenir les alcynes **25** et **26** avec un rendement de 99 % pour chacun.¹⁴ Pour le composé **22**, il a également fallu synthétiser l'alcyne **27** en effectuant une substitution nucléophile aromatique en milieu basique entre la 6-chloro-2,4-diaminopyrimidine et l'alcool 5-hexynoïque (Schéma 6).¹⁵

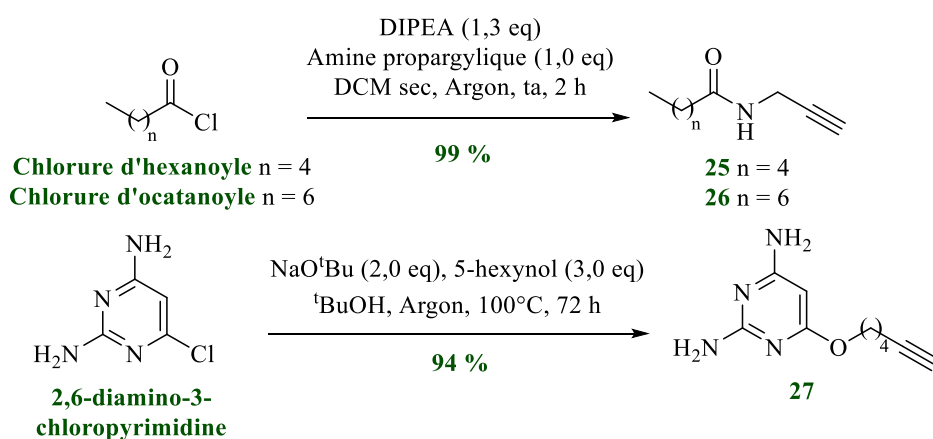


Schéma 6 : Préparation des alcynes **25**, **26** et **27**

Pour le composé **24**, l'alcyne 2-propynyl-*N*-acetyl- α -*D*-glucosamine **28** a été obtenu en une étape à partir de *N*-acétyle-*D*-glucosamine commerciale par la réaction de glycosylation de Fischer (Schéma 7).¹⁶ Cette glycosylation donne majoritairement l'anomère α qui est le produit thermodynamique le plus stable dû à l'effet anomérique en absence de groupement participatif sur le carbone 2 de la glucosamine.

¹⁴ Kögler, M.; Vanderhoydonck, B.; De Jonghe, S.; Rozenski, J.; Van Belle, K.; Herman, J.; Louat, T.; Parchina, A.; Sibley, C.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P. Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of Flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis* *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4847-4862.

¹⁵ Rega Stichting, V.Z.W.; Balzarini, J.M.R.; De Clercq, E.; Desire, A.; Holy, A. Preparation of phosphonate-substituted pyrimidine analogs as antiviral agents *Patent WO 2003002580 A1*.

¹⁶ Schmidt, M.S.; Götz, K.H.; Koch, W.; Grimm, T.; Ringwald, M. Studies toward the synthesis of linear triazole linked pseudo oligosaccharides and the use of ferrocene as analytical probe *Carb. Res.* **2016**, *425*, 28-34.

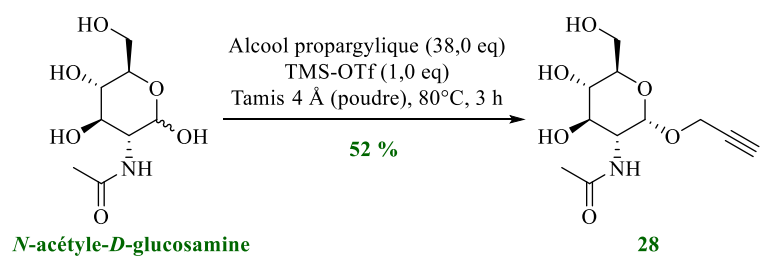
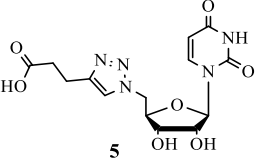
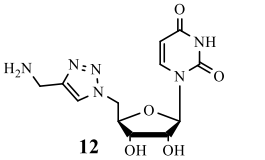
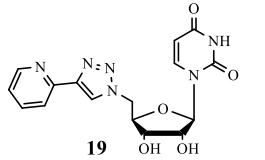
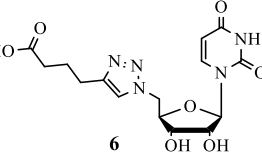
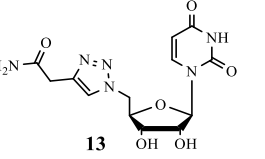
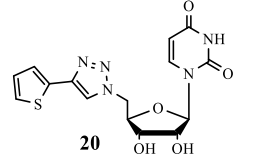
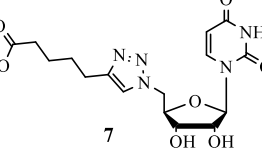
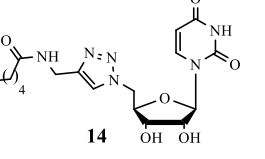
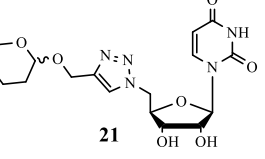
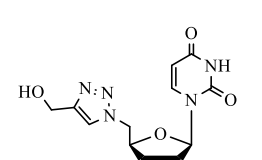
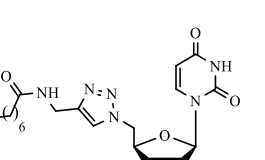
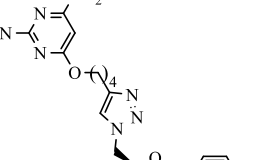
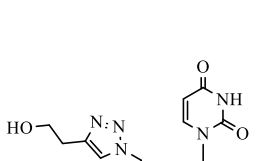
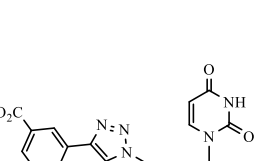
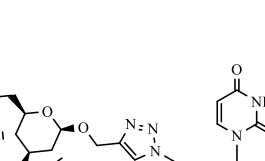
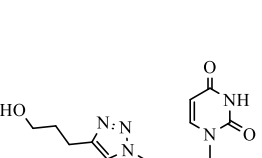
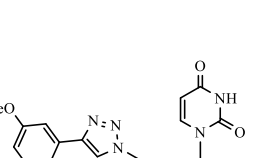
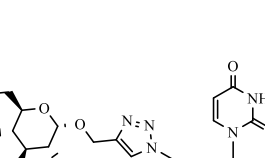


Schéma 7 : Préparation du composé 28



Analogues	Rdt	Analogues	Rdt	Analogues	Rdt
	56 %		46 %		50 %
	60 %		68 %		71 %
	63 %		99 %		43 %
	68 %		77 %		0 %
	57 %		71 %		60 %
	62 %		78 %		59 %

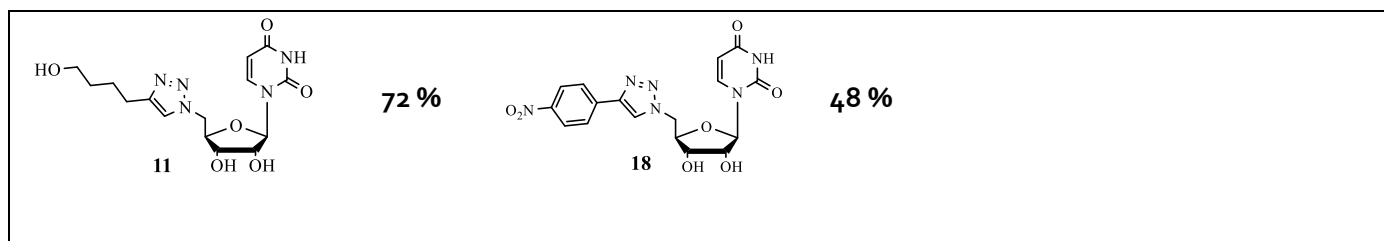


Tableau 2 : Réaction de CuAAC avec le composé **3** et une diversité d'alcynes

Cette conception raisonnée nous a permis d'obtenir une bibliothèque de molécules avec des fonctions variées par la réaction CuAAC, puisque les conditions réactionnelles sont très tolérantes vis-à-vis de cette diversité chimique. Cependant, le composé **22** n'a pas pu être obtenu même en forçant les conditions expérimentales. En effet, l'augmentation du nombre d'équivalents en CuSO_4 et en ascorbate de sodium, un temps de réaction prolongé et une température plus élevée n'ont pas suffi à rendre cette réaction possible. Hypothétiquement, il est fort possible que le cuivre(II) ou le cuivre(I) généré *in situ* soient complexés avec le cycle 2,6-diaminopyrimidine par les azotes sous forme monomérique ou dimérique (Figure 5). Ce complexe supposé stable empêcherait donc la réaction d'avoir lieu.

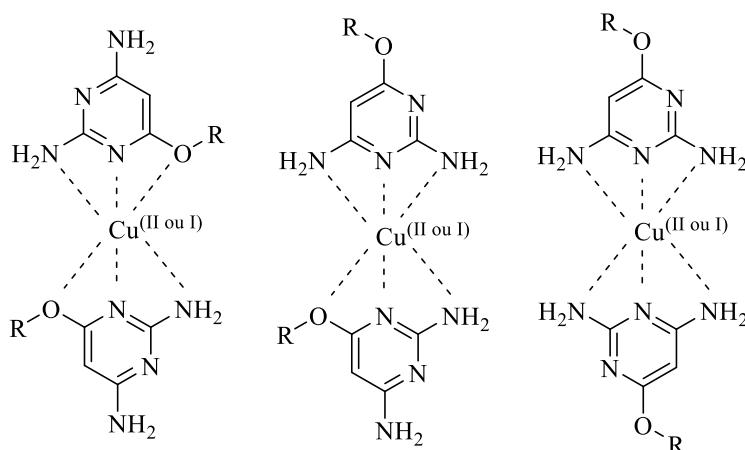


Figure 5 : Hypothèse de complexation du cuivre avec le motif 2,4-diaminopyrimidine

Les liaisons possibles avec le cuivre sont dessinées en pointillés et doivent respecter les règles de coordination (figure 34). Cette hypothèse de complexation n'est pas vérifiée mais reste plausible. L'utilisation d'un autre catalyseur ou avec la présence de ligands pourrait répondre à cette hypothèse.¹⁷

L'uridine-triazole-GlcNAc **24** structurellement proche du motif UDP-MurNAc des substrats naturels possède une *N*-acétyl-glucosamine. Ce sucre possède un groupement hydroxyle accessible en position 6 que l'on peut diversifier en utilisant la réaction de CuAAC.

¹⁷ Connell, T.U.; Schieber, C.; Silvestri, I.P.; White, J.M.; Williams, S.J.; Donnelly, P.S. Copper and silver complexes of Tris(triazole)amine and tris(benzimidazole)amine ligands: evidence that catalysis of an azide-alkyne cycloaddition ("click") reaction by a silver tris(triazole)amine complex arises from copper impurities *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 6503-6511

En se basant sur la structure de ce composé **24**, nous avons ajouté de la diversité moléculaire à une petite série d'analogues contenant l'assemblage uridine-triazole-glucosamine. Cet assemblage fonctionnalisé est intéressant car il permet d'avoir à la fois un encombrement stérique plus important ainsi que des interactions, de type liaison hydrogène, dans la poche enzymatique. Pour cela, il faut préparer l'azoture nucléosidique glucosamine **31** (Schéma 8).¹⁸ La préparation commence par l'activation de l'alcool en position 6 de la glucosamine **28** par un groupement tosylé pour accéder au composé **29** avec un rendement de 50 %. Ensuite, une réaction de CuAAC permet de former l'intermédiaire nucléosidique **30** avec un rendement de 82 %. La substitution par les ions azotures sur le carbone portant le groupement tosylate du composé **30** permet d'obtenir le composé **31** avec un rendement de 64 %. La présence de la bande du N₃ de l'azoture **31** est bien confirmée sur le spectre infra-rouge.

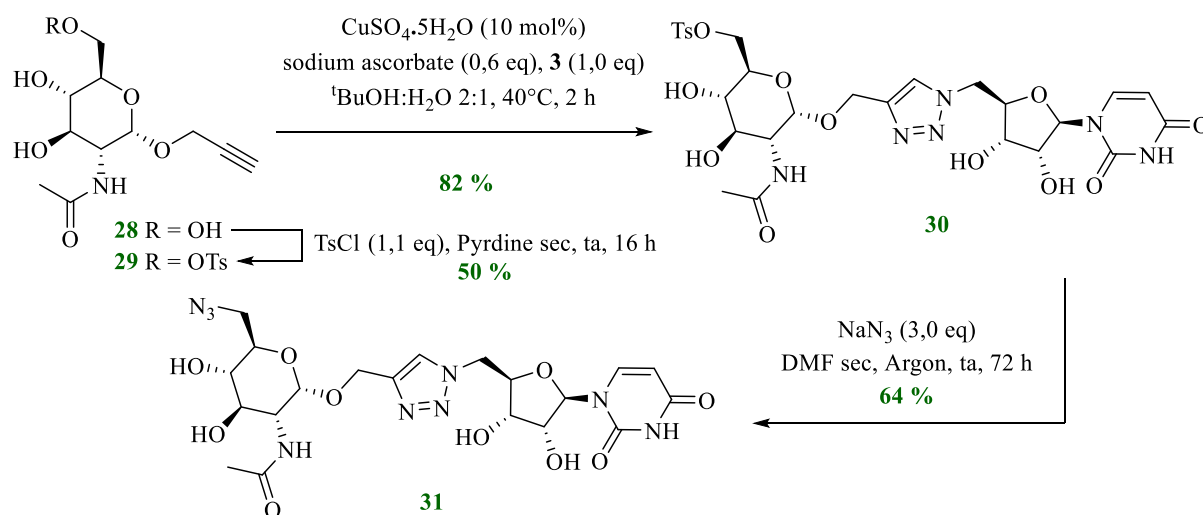
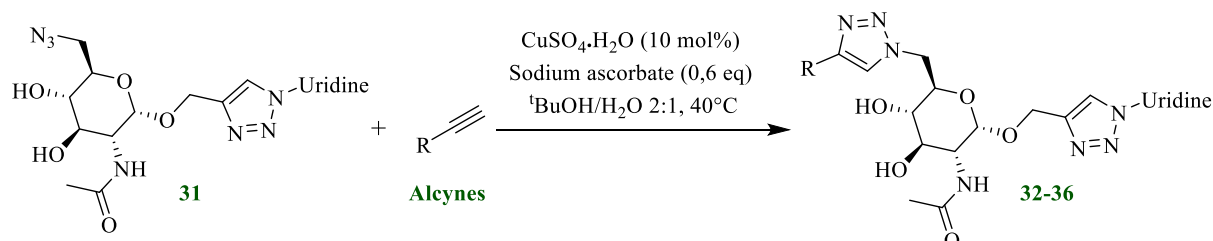


Schéma 8 : Préparation du composé **31**

On réalise ensuite la série d'analogues **32-36** à partir du composé **24** en modifiant la position 6 de la partie glucosamine par divers groupements fonctionnels par la réaction de CuAAC (Tableau 3). En gardant la même hypothèse selon laquelle l'uridine avec le triazole se fixe dans le site du substrat naturel avec un encombrement plus important généré par la glucosamine et les fonctions chimiques qui sont insérées avec :

- Une **fonction acide carboxylique** contenant une chaîne carbonée saturée flexible qui permet d'interagir au centre du site actif ou peut aussi se lier à l'ion magnésium présent (composé **32**).
- Une **fonction amine** ou **amide** qui peut interagir avec le pli de Rossman du domaine 3 du site actif ou simplement combler l'espace chimique de l'enzyme (les composés **33**, **34** et **35**).
- Une **fonction glucosamine** supplémentaire qui permet d'apporter un grand encombrement stérique avec des liaisons possibles dans le centre du site actif (composé **36**).

Cette série est obtenue avec des rendements corrects, excepté pour le composé **33** avec un rendement faible de 19 % dû à une purification sur colonne chromatographique de gel de silice en phase normale, rendue plus complexe à cause des impuretés provenant de la propargyle amine commerciale.



Analogues	Rdt	Analogues	Rdt	Analogues	Rdt
	82 %		90 %		77 %
	19 %		78 %		

Tableau 3 : Synthèse d'analogues nucléosidiques glucosamine par CuAAC

Nous avons également voulu évaluer l'influence d'un groupement peptidique sur l'un de nos analogues notamment à partir de l'analogue **7** qui contient une fonction acide carboxylique reliée par une chaîne carbonée saturée au motif triazole-uridine. Nous avons choisi la chaîne carbonée la plus longue, afin d'interagir le plus possible au centre du site actif et proche du site de liaison de l'acide aminé (Schéma 9). Le choix de l'acide aminé se porte sur la L-alanine puisque c'est le premier à être inséré lors de la biosynthèse.

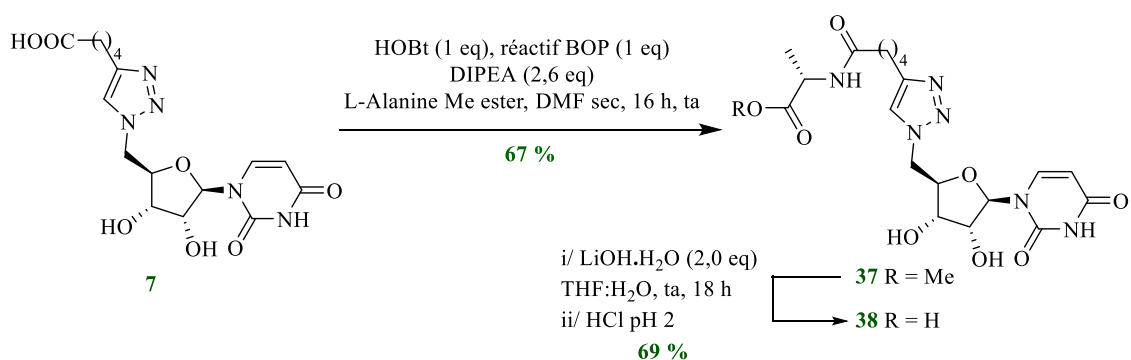


Schéma 9 : Synthèse de l'analogue peptidique **38**

Les conditions expérimentales du couplage peptidique pour la synthèse du composé **37** ont été réalisées de manière classique dans des conditions non racémisantes, en présence d'HOBT.¹⁸ On réalise ensuite une étape de déprotection en milieu alcalin avec l'hydroxyde de lithium qui permet d'obtenir le peptide **38** avec un rendement de 69 %. Par ailleurs, nous avons voulu évaluer l'influence d'autres groupements, ici de type « espaceur » situé entre le cycle triazole et le groupement diester 3,5-phényle méthylque de la structure de l'analogue **16** (Figure 6). En complément, les dérivés de **16** peuvent après saponification et acidification, conduire à de nouveaux analogues de type acide 3,5-phénylique dicarboxylique où l'on retrouve ce même motif sur d'autres hétérocycles qualifiés d'inhibiteurs multiples des MurC, MurD, MurE et MurF.

¹⁸ Sato, H.; Wada, T.; Inoue, Y. Synthesis and conformation control of peptide ribonucleic acid (PRNA) containing 5'-amino-5'-deoxyribopyrimidine and 5'-amino-5'-deoxyribopurine-nucleosides *J. Bio. Comp. Pol.* **2004**, *19*, 65-79.

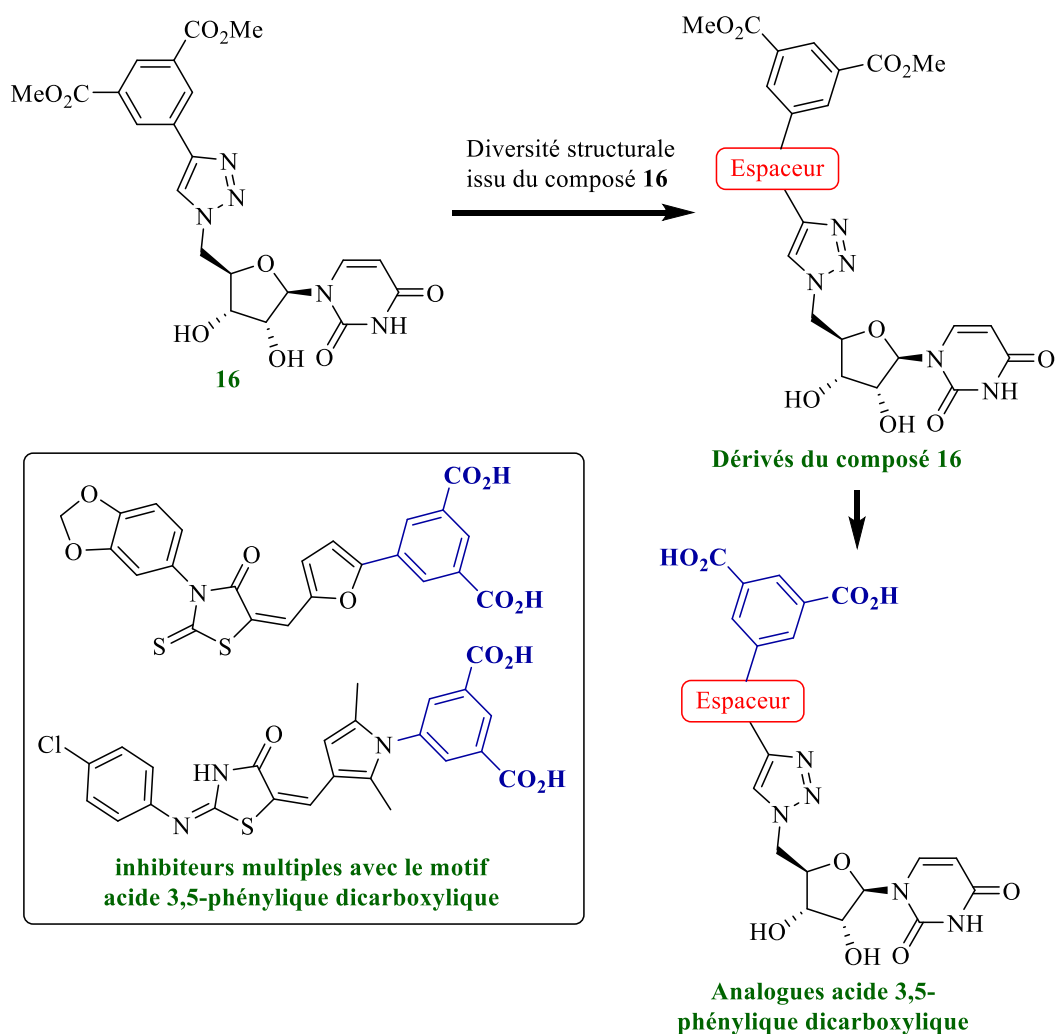


Figure 6 : Diversité structurale provenant de la structure du composé **16**

Nous avons entrepris de synthétiser un alcyne vrai contenant le motif diester 3,5-phényle méthylque séparé par une chaîne carbonée à partir de l'alcool correspondant **39**. Cependant, les premières tentatives n'ont pas été concluantes (Schéma 10). Tout d'abord, nous avons obtenu l'aldéhyde **40** à partir de l'alcool correspondant **39** dans les conditions oxydantes de Swern avec un rendement quantitatif. Ensuite, la première tentative pour obtenir l'alcyne **41** s'effectue suivant la réaction de Corey-Fuchs, mais cette dernière ne fonctionne pas. Les conditions sont trop réductrices pour les fonctions esters qui conduisent à la formation de sous-produits saponifiés. La deuxième tentative suit les conditions de l'homologation de Seyferth-Gilbert avec le réactif d'Ohira-Bestmann mais la réaction ne permet pas d'accéder à l'alcyne **41** souhaité. Un essai d'alkylation de l'alcoolate formé à partir de l'alcool **39** en présence d'hydruide de sodium avec le bromure propargylique n'a pas fonctionné et a montré la formation de sous-produits saponifiés alors qu'il n'y a pas d'excès de base.

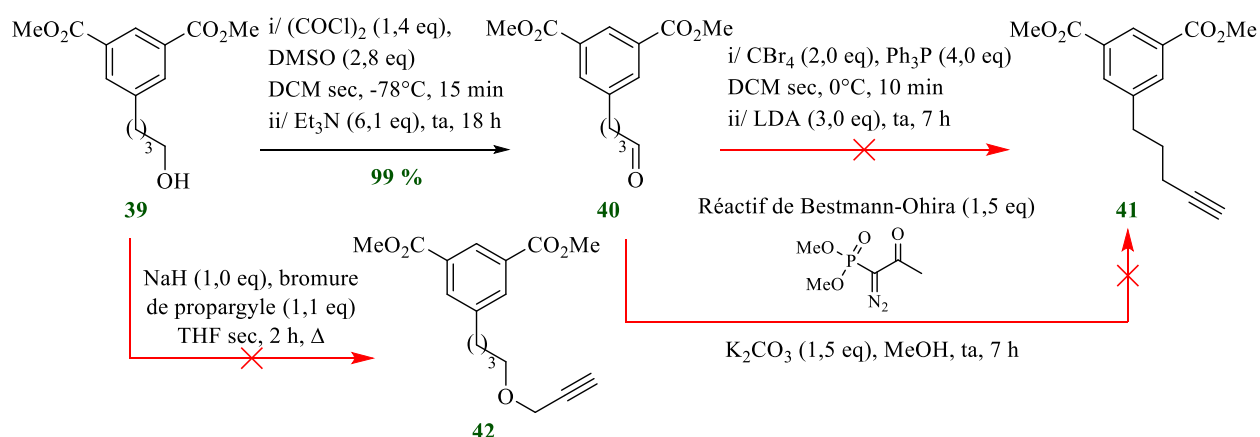


Schéma 10 : Tentative de synthèse des composés 41 et 42

Si nous n'avons pu obtenir les partenaires alcynes 41 et 42, nous avons réussi à insérer un azoture à la place de la triple liaison à partir de l'alcool 39 par halogénéation suivie d'une substitution avec des ions azotures.

Ce changement de stratégie (en inversant les partenaires alcynes et azotures) apporte toujours de la diversité moléculaire et conduit à une deuxième famille d'analogues nucléosidiques (cf. suite de ce chapitre).

B. Mesure de l'activité inhibitrice des composés de la famille I sur des Mur ligases

1. Méthodologie des essais biologiques

Les essais biologiques ont été réalisés par le professeur Urmi Bajpai et son équipe à l'Université de New Delhi en Inde.¹⁹ La méthodologie développée permet d'évaluer divers composés sur un pool de Mur ligases issues de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette méthode a l'avantage d'être capable de cribler une grande quantité de molécules, ce qui est en adéquation avec l'approche synthétique du DOS. Les auteurs ont mis au point la synthèse *in vitro* de l'UDP-MurNAc-pentapeptide : les six enzymes, MurA-F, sont incubées à 37°C en présence de cofacteurs, de co-substrats et de l'UDP-GlcNAc. Cette expérience permet la formation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide. Il n'est pas utile d'ajouter les intermédiaires nucléosidiques de chaque Mur Ligase puisqu'ils sont obtenus *in situ* durant l'expérience où leurs formations ont été prouvées par spectrométrie de masse (ESI-HRMS). Après avoir réalisé une étude d'optimisation permettant de connaître les meilleures conditions expérimentales, les auteurs ont mis au point deux tests *one-pot* d'identifications d'inhibiteurs : un test visant le mélange de Mur ligases et un autre visant une enzyme de choix parmi les MurA-F (Figure 7).

¹⁹ Eniyan, K.; Kumar, A.; Vani Rayasam, G.; Perdih, A.; Bajpai, U. Development of a one-pot assay for screening and identification of Mur pathway inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis* *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35134.

Pour réaliser les tests *one-pot*, les conditions expérimentales utilisent un volume total est de 100 μ L contenant un milieu tamponné à base de *bis*-tris propane (50 mM, pH 7) en présence de L-Alanine, D-Glutamate, *méso*-A2pm, D-Alanine-D-Alanine, (avec une concentration de 1 mM pour chacun), UDP-GlcNAc à 0,2 mM, PEP à 0,2 mM, NADPH à 0,2 mM, KCl à 10 mM, $MgCl_2$ à 10 mM, ATP à 2 mM, MurA à 125 nM, MurB à 60 nM, MurC à 100 nM, MurD à 93 nM, MurE à 135 nM et de MurF à 100 nM. Le milieu est incubé à 37°C et un blanc est fait en présence de tous les constituants exceptés de l'UDP-GlcNAc pour valider le test. Chaque Mur ligase est dépendante de l'ATP et un cycle catalytique qui fonctionne libère un phosphate P_i où sa concentration est mesuré avec l'addition d'un réactif appelé « Colorlock™ assay ». Cette mesure est faite en observant l'absorbance à 630 nm par spectroscopie UV. Une courbe d'étalonnage de l'absorbance du phosphate avec sa concentration est établie au préalable, ce qui permet de calculer la concentration du phosphate libérée et donc de l'inhibiteur. Chaque essai pour un inhibiteur donné est réalisé au moins en double pour confirmer la reproductibilité du test.

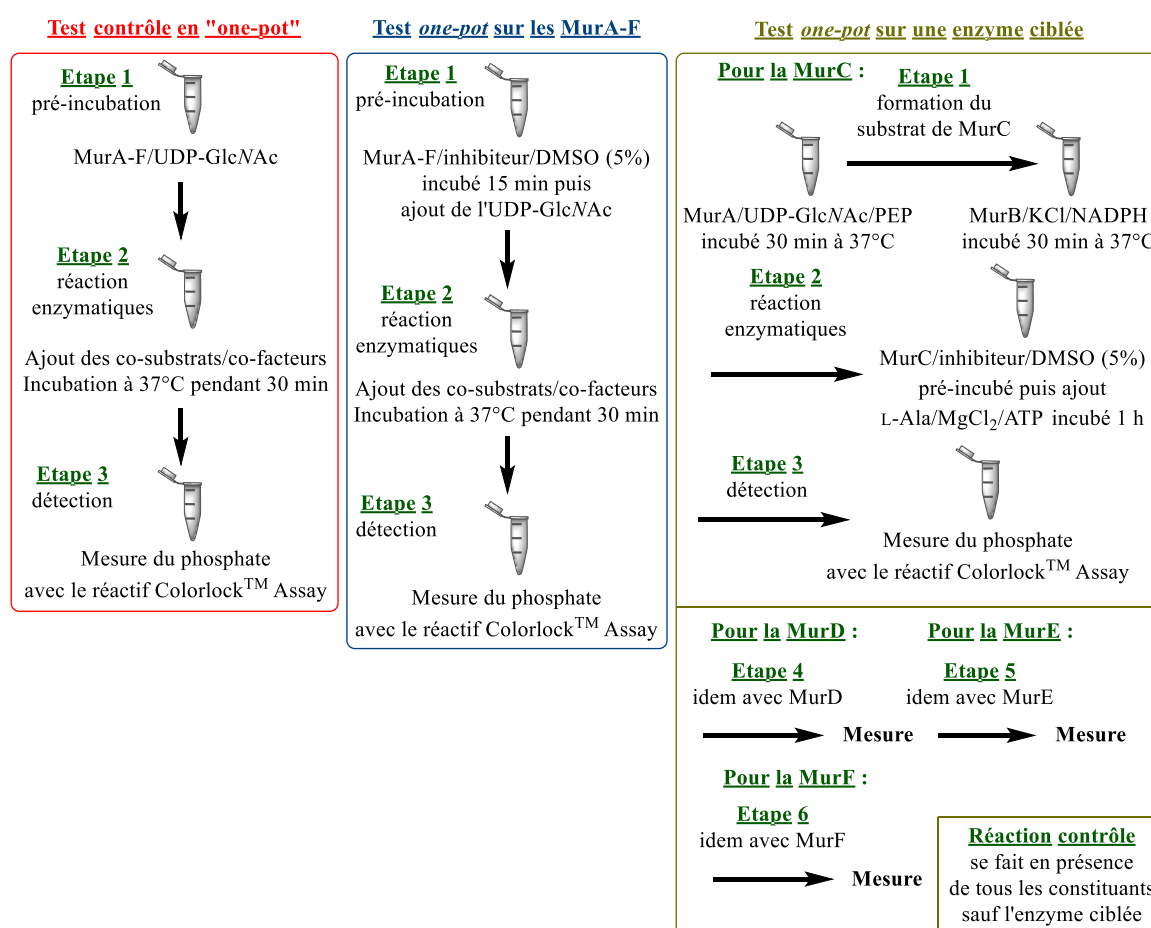


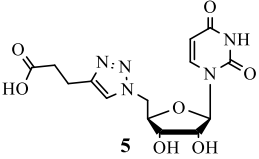
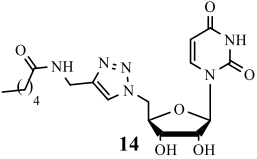
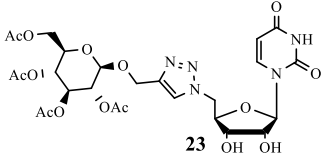
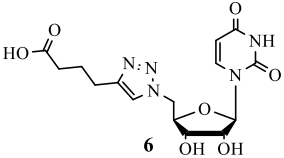
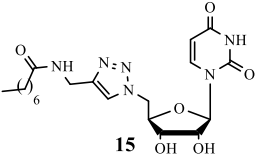
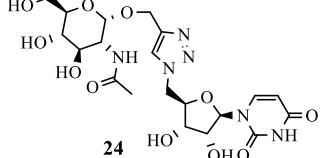
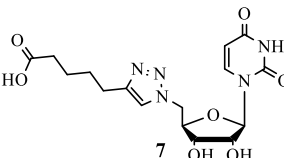
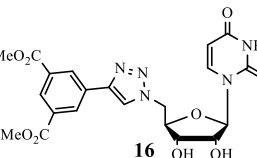
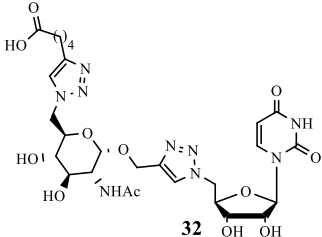
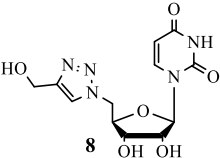
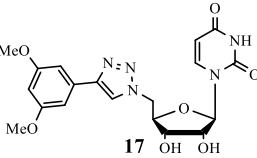
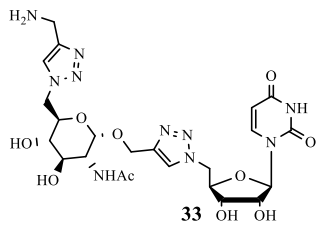
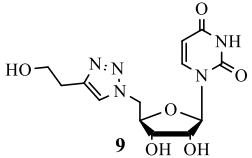
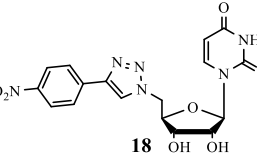
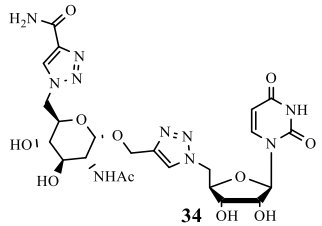
Figure 7 : Tests enzymatiques pour l'identification d'inhibiteurs

Le premier essai biologique est le test *one-pot* de contrôle (en rouge) qui permet de le comparer avec le deuxième test *one-pot* sur les MurA-F en présence de l'inhibiteur (en bleu) et de calculer l'activité

résiduelle ainsi que le pourcentage d'inhibition d'un composé à une concentration donnée. Ces deux premiers essais s'effectuent en trois étapes. La première étape est la pré-incubation des MurA-F avec l'UDP-GlcNAc pour le contrôle et les MurA-F avec l'inhibiteur/DMSO pour le test d'inhibition, pendant 15 minutes suivi de l'ajout de l'UDP-GlcNAc. La deuxième étape est la réaction enzymatique qui a lieu par l'addition des co-substrats et des cofacteurs suivis d'une incubation à 37°C pendant 30 min. Cette étape est la même pour le contrôle que pour le test d'inhibition. Enfin, la troisième étape est la détection de l'activité par mesure du phosphate P_i libéré. L'ajout du réactif Colorlock™ assay permet la mesure de l'absorbance du phosphate et donc du pourcentage d'inhibition. Si ce pourcentage d'inhibition se révèle être suffisamment intéressant, un autre essai est réalisé sur une enzyme ciblée. Ceci permet d'identifier quelle(s) enzyme(s) est/sont inhibée(s) par la molécule, afin d'identifier les inhibiteurs multiples. Ce test s'effectue en plusieurs étapes avec un test contrôle identique à l'essai d'inhibition en absence de l'enzyme que l'on veut étudier.

2. *Application aux analogues de la famille I*

Dans un premier temps, les essais biologiques sont réalisés sur tous les analogues de la Famille I avec le test *one-pot* sur le mélange des MurA-F en utilisant une concentration de 100 μ M. Le tableau 4 montre les activités biologiques obtenues pour ce test. Dans un second temps, nous avons sélectionné les composés avec les activités inhibitrices supérieures à 45% à 100 μ M des MurA-F pour identifier quelles enzymes visent ces inhibiteurs par le test *one-pot* sur une enzyme ciblée. Ce test va permettre d'identifier si ces composés sont des inhibiteurs multiples (tableau 5). De manière générale, ces composés ne présentent pas d'activités inhibitrices significatives ; cependant, nous avons tenté de définir une relation structure-activité.

Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.
 5	$11 \pm 6 \%$	 14	$36 \pm 1 \%$	 23	$30 \pm 15 \%$
 6	$17 \pm 4 \%$	 15	$20 \pm 3 \%$	 24	$21 \pm 3 \%$
 7	$29 \pm 0,2 \%$	 16	$21 \pm 7 \%$	 32	$25 \pm 1 \%$
 8	$19 \pm 1 \%$	 17	$3 \pm 2 \%$	 33	$30 \pm 1 \%$
 9	$14 \pm 1 \%$	 18	$5 \pm 3 \%$	 34	$56 \pm 2 \%$

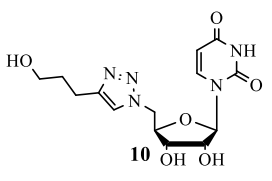
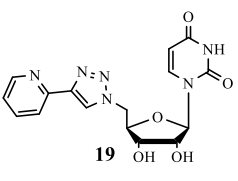
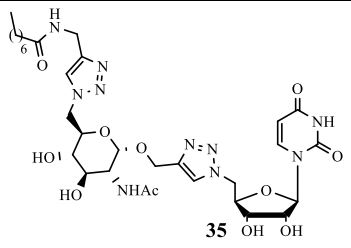
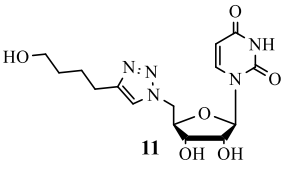
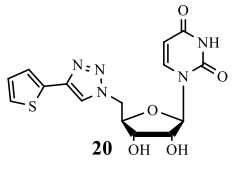
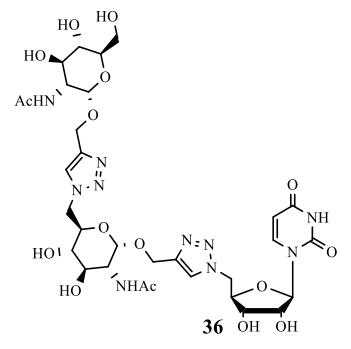
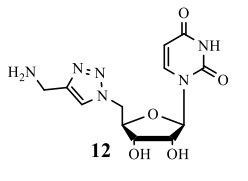
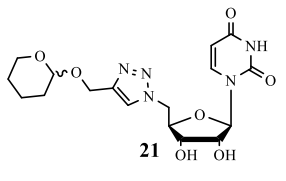
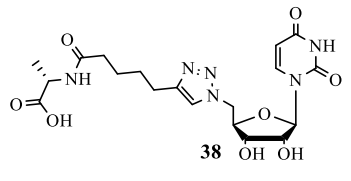
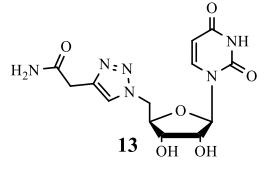
	15 ± 3 %		25 ± 17 %		39 ± 1 %
	2 ± 3 %		3 ± 0 %		50 ± 2 %
	39 ± 1 %		14 ± 4 %		21 ± 2 %
	5 ± 3 %				

Tableau 4 : Pourcentage d'inhibition à 100 µM des MurA-F des analogues de la famille I

Pour les composés avec une fonction acide carboxylique **5**, **6** et **7**, les pourcentages d'inhibitions sont respectivement de 11, 17 et 29 % à 100 µM. Le meilleur pourcentage d'entre eux est celui du composé **7** où la longueur de la chaîne est la plus longue ($n = 4$). Les composés avec une fonction alcool **8**, **9**, **10** et **11** montrent des pourcentages plus faibles qu'avec une fonction acide carboxylique avec respectivement 19, 14, 14 et 2 % à 100 µM. Cette fois, le meilleur résultat est avec le composé **8** qui a la plus petite longueur de chaîne ($n = 1$). Ceci montre que la fonction alcool est moins efficace que la fonction acide carboxylique. Le composé **12** avec une fonction amine a un pourcentage d'inhibition avec 39 % à 100 µM. L'amine libre semble favoriser les interactions avec le site du substrat naturel de l'enzyme. L'analogue **13** avec une fonction amide montre un faible pourcentage de 5 %. Les composés **14** et **15** ont un pourcentage de 36 % et 20 % à 100 µM. L'encombrement stérique qu'apporte leur longue chaîne carbonée ne semble pas participer à améliorer l'activité, comparé au composé **12** qui

est le plus proche structurellement sans la chaîne carbonée. Pour les composés cycliques aromatiques ou non **16**, **17**, **18**, **19**, **20** et **21** ; les pourcentages sont respectivement de 21, 3, 5, 25, 3 et 14 % à 100 μ M. Divers cycles y sont présents tels que des aromatiques substituées ou des hétérocycles afin de favoriser des interactions ou créer un encombrement stérique. On remarque que les deux meilleurs d'entre eux sont les composé **16** et **19** (**15** = 21 % et **18** = 25 %) avec les cycles 3,5- phénylique méthyl diester et pyridine. Le composé **23** qui a l'anomère β du glucose tétra-acétylé montre un pourcentage de 30 %. Ce pourcentage est légèrement mieux que le composé **24** qui est pourtant plus proche structurellement du substrat naturel avec une glucosamine *N*-acétylée (**23** = 30 % et **24** = 21 % à 100 μ M). Ensuite, la série de composés **32**, **33**, **34**, **35** et **36** issus du composé **24** montrent les divers groupements introduits en position 6 de la glucosamine. Leurs pourcentages sont respectivement de 25, 30, 56, 39 et 50 % à 100 μ M. Ces résultats sont meilleurs que le composé de base **24** sans diversification moléculaire à la position 6. Enfin, le composé peptidique **38** montre qu'une fonction L-Ala fait chuter nettement le pourcentage à 6 % à 100 μ M, comparé au composé **7** sans la L-Ala.

En résumé, on remarque que les pourcentages d'inhibitions des analogues de la Famille I ne dépassent pas les 60 % à 100 μ M pour le test *one-pot* des MurA-F. Les deux composés les plus actifs sont les composés **34** (avec 56 % à 100 μ M) et **36** (avec 50 % à 100 μ M). Ils sont choisis pour identifier les Mur ligases responsables de l'activité inhibitrice.

3. Identification des inhibiteurs multiples

Nous réalisons le test *one-pot* avec chaque Mur ligase à 100 μ M (Figure 7, encadré jaune), pour les composés **34** et **36** les plus actifs du premier test *one-pot* sur les MurA-F (Tableau 5).

Analogues	MurC	MurD	MurE	MurF
34	12 $\pm$ 2 %	23 $\pm$ 1 %	42 $\pm$ 1 %	6 $\pm$ 2 %
36	1 $\pm$ 1 %	5 $\pm$ 1 %	49 $\pm$ 3 %	13 $\pm$ 5 %

Tableau 5: Identification d'inhibiteurs multiples à 100 μ M

Les résultats montrent que les composés **34** et **36** ont un pourcentage d'inhibition respectivement de 42 % et de 49 % sur la MurE à 100 μ M. Les autres inhibitions ont des valeurs plus faibles pour les autres Mur ligases.

4. Structure tridimensionnelle des composés **34** et **36** avec la MurE

Des analyses computationnelles ont été réalisées suite aux résultats biologiques obtenus avec l'enzyme MurE et permettent de visualiser les interactions du site actif de la MurE avec sa structure

cristallographique connue et celles des analogues nucléosidiques **34** et **36** (Figure 8).²⁰ Les résidus du site actif responsables de l'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme sont visualisés grâce au logiciel Pymol. La poche de la MurE qui interagit avec le composé **34** contient les résidus : LEU67, ARG68, ALA69, GLN70, LYS157, ARG230, HIS248, SER222, THR195, et LEU194. Le composé **34** qui a une affinité de liaison de -9,9 kcal/mol forme des liaisons hydrogènes avec les résidus acides aminés : THR154, SER155, ARG377, TYR397, GLY502, THR180, THR195, HIS395, ARG230, ASN449, ASP448, et HIS248 de la Mtb MurE. Le composé **36** montre la même affinité de liaison avec -9,9 kcal/mol et il forme des liaisons hydrogènes avec les résidus acides aminés ARG230, SER222, THR196, ASP247, ASN243, SER155, GLY156, THR180, GLY156, ARG377 et SER402 de la Mtb MurE. La stabilité du complexe molécule/enzyme montre qu'elle est très proche du complexe ligand naturel/enzyme (-9,9 kcal/mol).

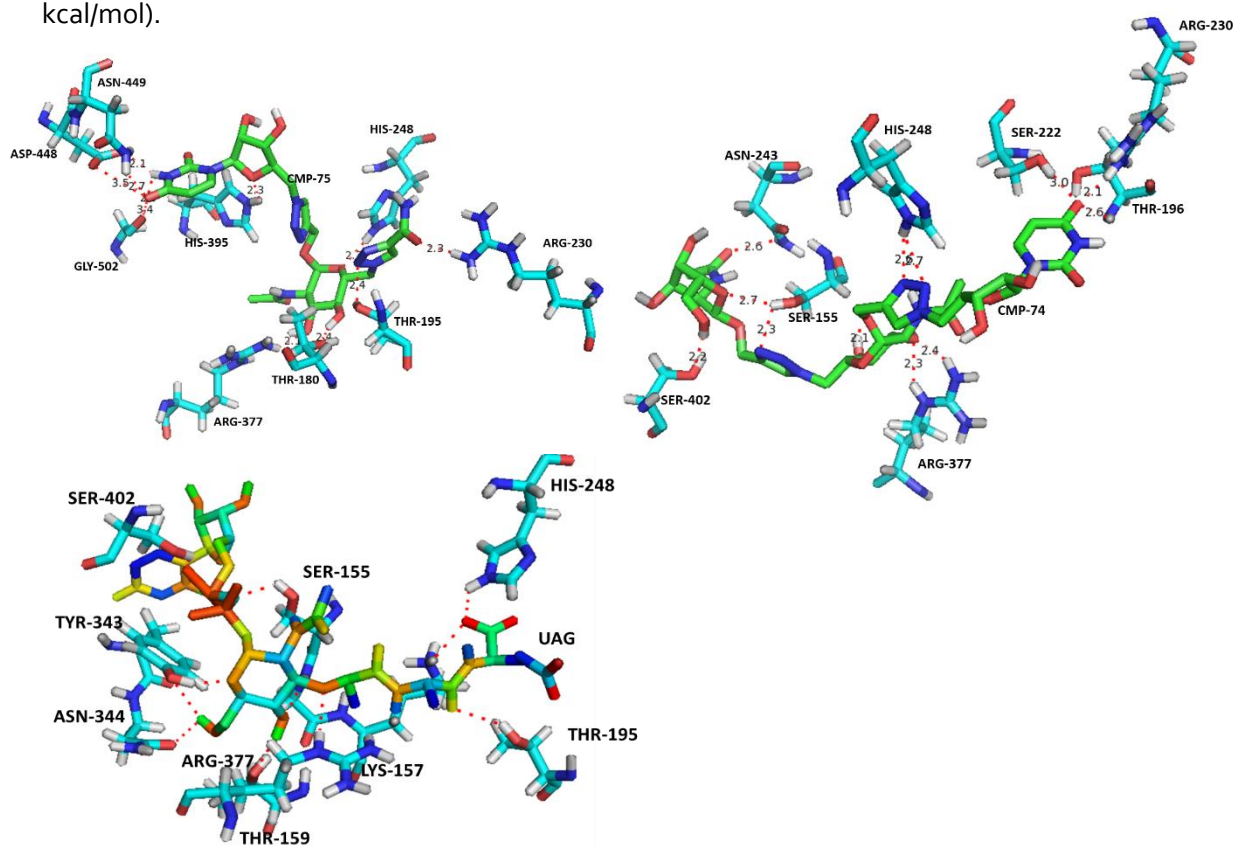


Figure 8 : Structures 3D du composé **34** (en haut à gauche), du composé **36** (au haut à droite) et du substrat naturel UAG (en bas) dans le site actif de la MurE

Les lignes en pointillés rouge représentent les liaisons hydrogènes entre les atomes des analogues nucléosidiques avec les résidus du site actif.

²⁰ Basavannacharya, C.; Robertson, G.; Munshi, T.; Keep, N.H.; Bhakta, S. ATP-dependent MurE ligase in *Mycobacterium tuberculosis*: biochemical and structural characterization *Tuberculosis* **2010**, *90*, 16-24

IV Rétrosynthèse de la Famille II

La rétrosynthèse pour accéder aux molécules de la famille II repose également sur la réaction clé de CuAAc. Elle est réalisée cette fois entre plusieurs azotures synthétiques **A** obtenus à partir des alcools **C**, et d'un alcyne **B** obtenu à partir de l'uridine commerciale (Schéma 11).

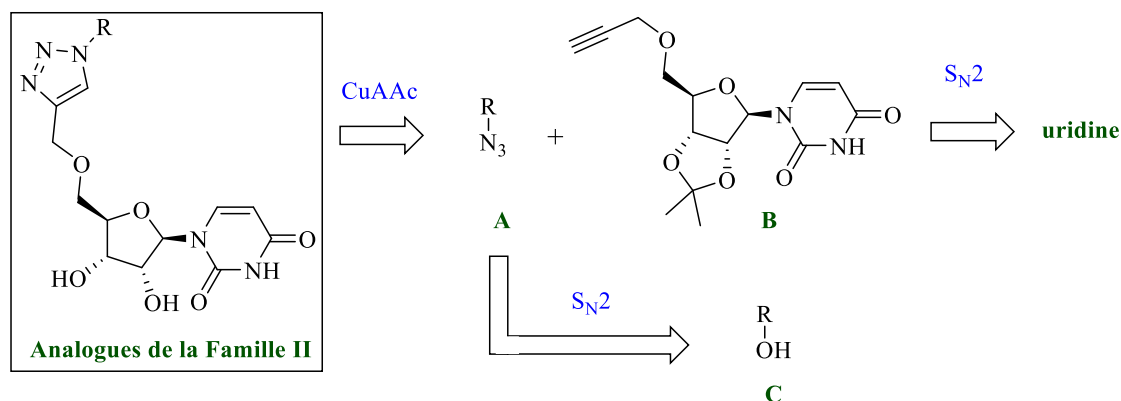


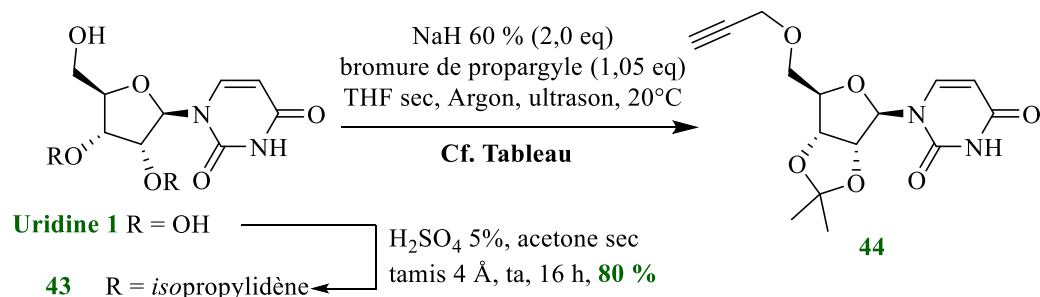
Schéma 11 : Rétrosynthèse envisagée pour les analogues de la Famille II

Le synthon **B** peut provenir par substitution nucléophile du 2',3'-*O*,*O'*-isopropylidène-uridine par le bromure de propargyle en milieu basique. Les dérivés azides sont accessibles en deux étapes : par l'halogénéation de l'alcool **C** suivie d'une substitution des ions azotures sur l'halogène formé. Cette fois, ce sont les composés azotures qui portent la diversité structurale que l'on va insérer aux analogues finaux dans des conditions de CuAAc.

V Synthèse des analogues de la Famille II

A. Synthèse du 5'-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-uridine

La synthèse du composé 5'-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-uridine **44** s'effectue en deux étapes à partir de l'uridine **1**, préalablement protégée pour former l'intermédiaire nucléosidique **43** (Tableau 6).²¹



²¹ Sun, J.; Liu, R.; Fu, Q.; Zang, J.; Tao, Q.; Wu, J.; Zhu, H. Synthesis and anti-HIV activity of triazolo-fused, medium-sized cyclic nucleoside analogs prepared by an intramolecular Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition *Helv. Chim. Acta* **2014**, 97, 733-743.

Entrée	Temp. (°C)	Tps (h)	Rdt (%)
1	20	1,0	28 %
2	20	2,5	81 %
3	20	3,5	50 %
4	55	3,5	50 %

Tableau 6 : Synthèse du précurseur alcyne sous activation ultrason

L'activation sous ultrasons permet de réaliser cette réaction avec un temps de réaction assez court. L'entrée 1 du tableau d'optimisation montre un rendement de 28 % pendant 1 heure à 20°C. L'entrée 2 montre un rendement de 81 % lorsque l'on augmente le temps de la réaction. Un temps réactionnel encore plus long à température ambiante montre que cette fois le rendement diminue à 50 % (entrée 3). Une augmentation de la température à 55°C ne permet pas d'améliorer le rendement (entrée 4). Les meilleures conditions sont donc celles de l'entrée 2 qui permettent d'accéder au partenaire alcyne **44** portant l'uridine protégée avec le meilleur rendement.

B. Synthèse des divers azotures **68-70**

Comme nous l'avons évoqué sur la figure 6 pour la famille I, nous souhaitons au départ ajouter une diversité moléculaire avec un espaceur entre un groupement acide 3,5-phénylique dicarboxylique et le cycle triazole porté par l'uridine. N'ayant pu obtenir le partenaire alcyne, nous avons inversé les fonctions chimiques alcyne et azoture pour obtenir le partenaire azoture avec une diversité d'espaceur (Figure 9) et l'alcyne avec la partie uridine comme on vient de le montrer avec le composé **44**.

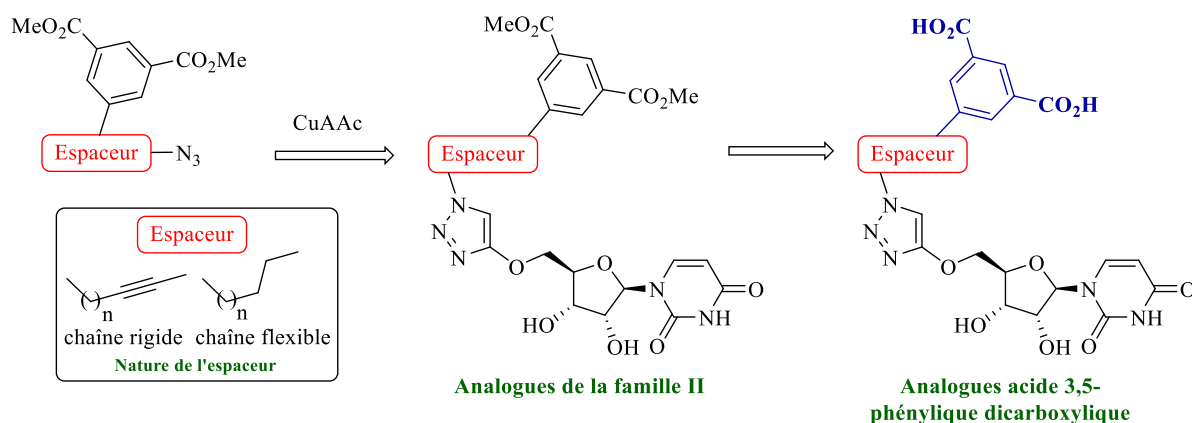


Figure 9 : Partenaire azoture donnant accès aux analogues de la famille II

La nature de l'espaceur sera évaluée avec deux structures différentes : une chaîne **plus rigide** contenant une triple liaison comme insaturation et une chaîne **plus flexible** avec que des carbones saturés. La longueur de l'espaceur sera aussi évaluée avec un nombre différent de carbones sur la chaîne.

Pour synthétiser les précurseurs azotures avec le motif acide 3,5-phénylique dicarboxylique et les différents espaceurs, nous commençons la synthèse par l'halogénéation de l'amine isophthalate diméthylque **45** commerciale,²² par une réaction de Sandmeyer en passant par la formation d'un sel de diazonium suivie de l'action du KI sur le sel de diazonium pour former le produit iodé **46** souhaité (Schéma 12). Une optimisation a été réalisée (Tableau 7). Le couplage de Sonogashira permet d'obtenir avec de très bons rendements les différents alcools **47-50**.²³ La triéthylamine est utilisée en large excès, à la fois en tant que base et solvant. De plus, elle est facilement éliminable par évaporation sous pression réduite. Ensuite, nous accédons en trois étapes aux *espaceurs flexibles* par une réduction de la triple liaison par hydrogénation en présence de Pd/C pour obtenir les composés **51-54**, une bromation de l'alcool terminal en présence de NBS et de Ph₃P conduit aux composés bromés **55-58**, respectivement, qui par substitution par des sels d'azotures donneront les azotures **59-62**. Durant la réduction de la triple liaison, un barbotage avec un flux constant de dihydrogène doit se faire avec une durée d'au moins vingt minutes lorsque le milieu est à pression atmosphérique. En effet, il a été observé qu'un barbotage trop rapide (< 20 min) donne le produit souhaité avec l'intermédiaire alcénique en tant que sous-produit.

Pour avoir les *espaceurs rigides*, la méthode est similaire avec deux étapes à partir des alcools **47-50** avec une bromation qui donne les composés bromés **63-66** suivie d'une substitution par des sels d'azotures pour avoir accès aux dérivés **68-70**. L'azoture **67** avec n = 1 n'a pas été obtenu car nous avons utilisé une irradiation sous micro-ondes qui a dégradé le produit souhaité d'où le changement des conditions expérimentales de la substitution avec une simple agitation à température ambiante.

²² Zhou, H.-C.; Liu, T.-F.; Lian, X.; Zou, L.; Feng, D. Chromium metal organic frameworks and synthesis of metal organic frameworks *Patent WO 2015173553 A1*.

²³ Lee, J.R.I.; Han, Y.-J.; Willey, T.M.; Nielsen, M.H.; Klivansky, L.M.; Liu, Y.; Chung, S.; Terminello, L.J.; Van Buuren, T.; De Yoreo, J.J. Cooperative reorganization of mineral and template during directed nucleation of calcium carbonate *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 11076-11085.

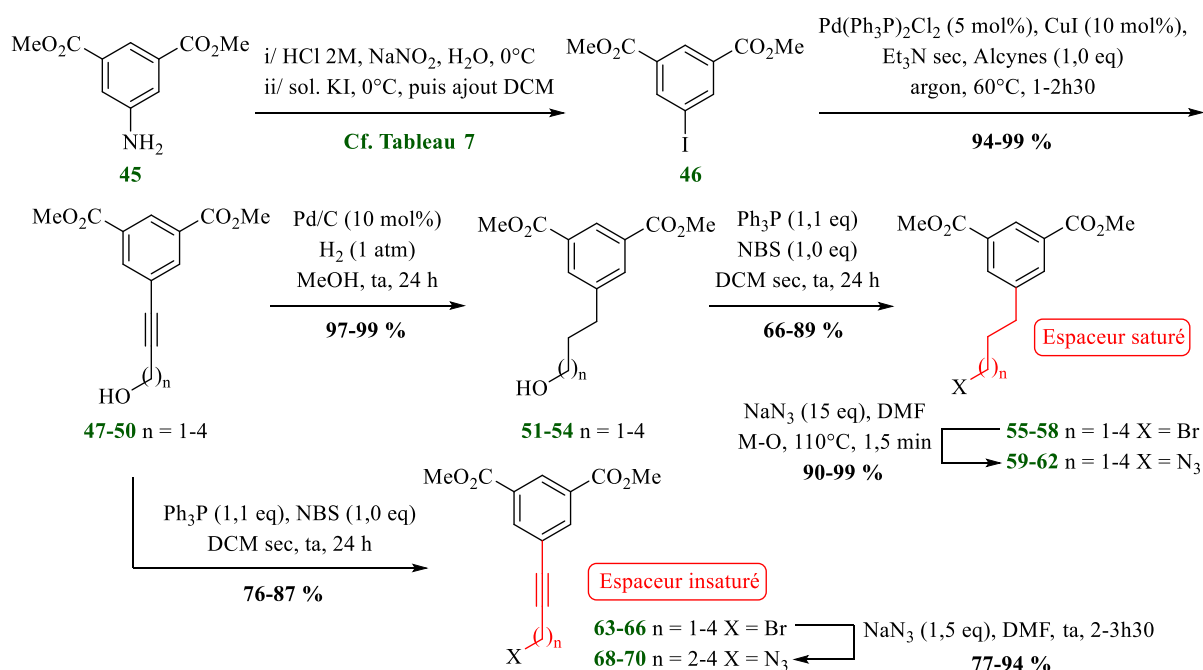


Schéma 12 : Préparation des azotures saturés 59-62 et des azotures insaturés 68-70

Entrée	HCl	NaNO ₂	KI	1 ^{er} Tps à 0°C	2 ^e Tps à ta	Rdt
1	1,9 eq	1,2 eq	3,0 eq	0,75 h	4 h	27 %
2	5,9 eq	1,1 eq	1,1 eq	1,0 h	24 h	57 %
3	7,5 eq	1,5 eq	1,5 eq	1,0 h	72 h	76 %
4	10,0 eq	1,5 eq	1,5 eq	1,0 h	72 h	63 %
5	8,4 eq	1,5 eq	1,5 eq	1,0 h	72 h	71 %

Tableau 7 : Optimisation de la réaction d'iodation du composé 46

L'entrée 1 du tableau 7 d'optimisation montre un premier essai avec les conditions expérimentales trouvées dans la littérature avec un rendement de 27 %. C'est en augmentant le nombre d'équivalents de la solution d'HCl que l'on observe une amélioration avec un rendement de 57 % (entrée 2). Si l'on ré-augmente l'excès de NaNO₂ et de KI, l'entrée 3 montre un plus grand rendement de 76 % avec 7,5 équivalents d'HCl. En continuant d'augmenter l'excès d'HCl, le rendement retombe à 63 % (entrée 4). En ajustant l'excès d'HCl à 8 équivalents, le rendement est similaire à l'entrée 3 avec 71 % (entrée 5). Cette réaction nécessite un excès d'HCl dans le milieu réactionnel qui ne doit pas dépasser les 8 équivalents environ. En appliquant cette méthodologie de synthèse donnant accès à une diversité d'azotures, nous pouvons évaluer l'influence d'autres fonctions chimiques en modifiant les substitutions du noyau aromatique (Figure 10).

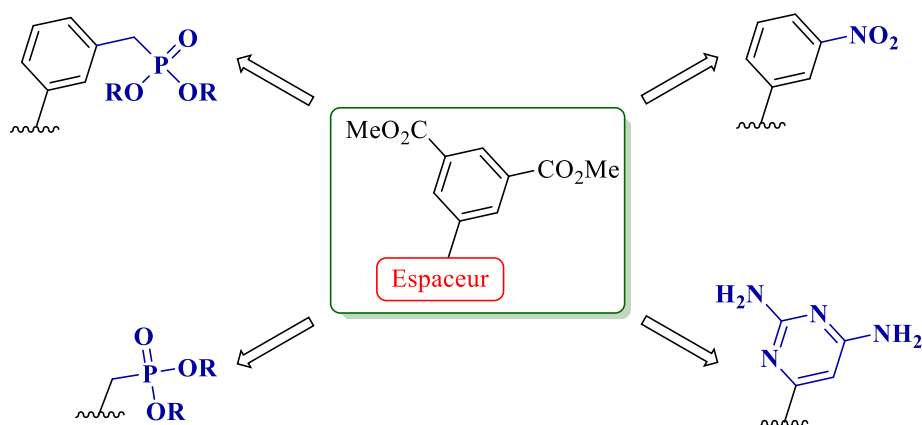


Figure 10 : Modifications apportées à la place du 3,5-phényl diester méthylique

Nous avons choisi d'évaluer l'influence du groupement bioisostère de l'ester qu'est le phosphonate. Le groupement nitro sera aussi évalué car il est susceptible de se lier au centre du site actif des enzymes. Nous commencerons par évaluer l'influence d'un seul groupement modifié à la place de deux groupements esters par soucis d'accessibilité. De manière à pouvoir comparer les résultats biologiques, nous avons utilisé le même espaceur que ceux des dérivés phényles diester avec la chaîne rigide pour éviter d'exposer les conditions réductrices en présence de dihydrogène aux groupements sensibles tel que le groupement nitro. Cette synthèse des dérivés azotures avec principalement trois étapes (couplage de Sonogashira, halogénéation et substitution) permet d'accéder aux composés que l'on souhaite (Schéma 13). Pour obtenir les azotures phosphonates **77**, **78** et **81**, une étape supplémentaire a été réalisée dans des conditions de Michaelis-Arbuzov à partir du bromure de départ.

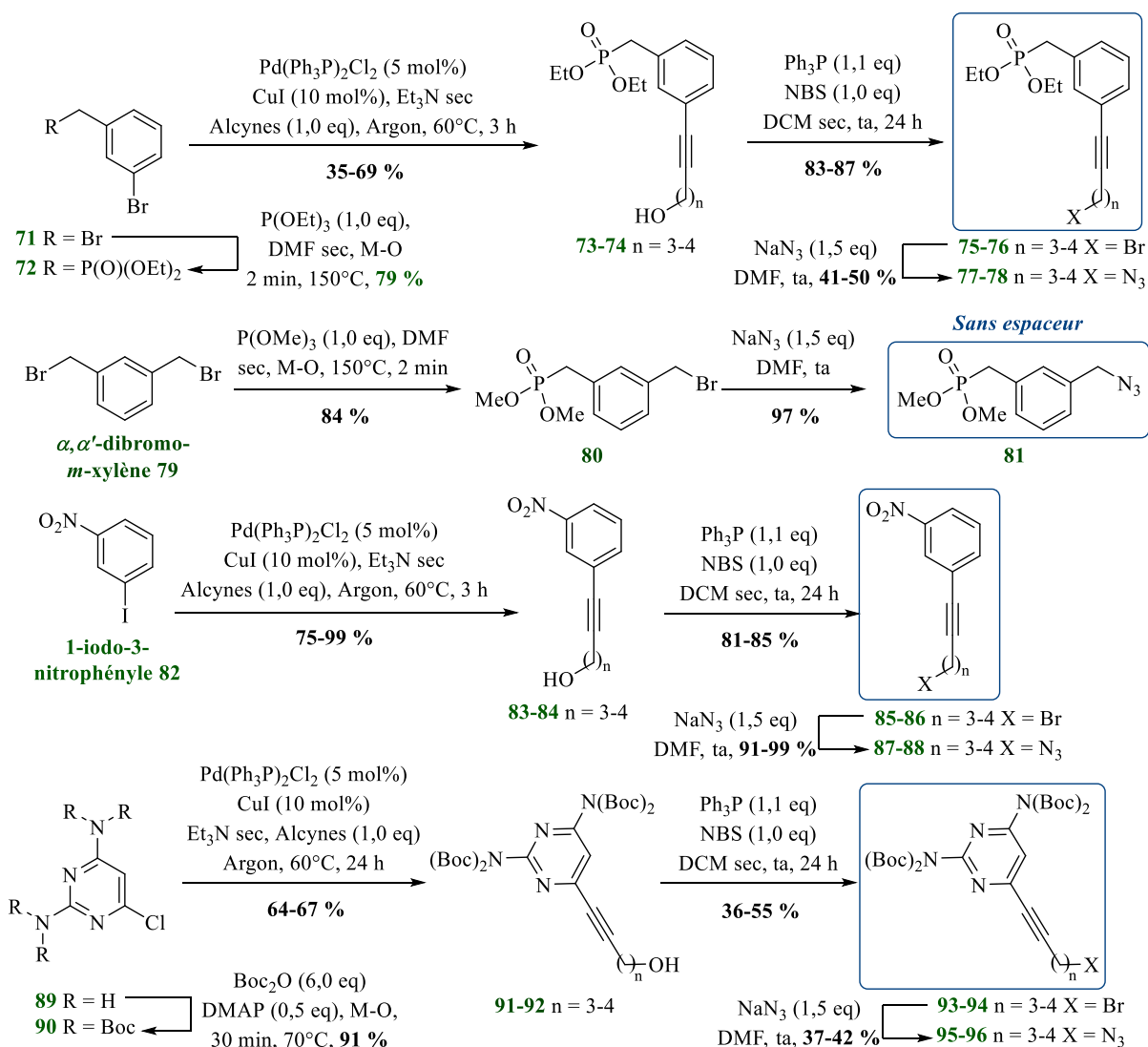


Schéma 13 : Préparation des azotures 77, 78, 81, 87, 88, 95 et 96

Pour accéder à des composés plus lipophiles, nous avons synthétisé des dérivés phosphonates portant deux groupements POM (pour *Pivaloyloxymethyle*) à partir du phosphite diméthylque en trois étapes avec des rendements corrects (Schéma 14). Par ailleurs, le groupement POM, plutôt volumineux, pourrait bien occuper l'espace chimique du site actif de l'enzyme.

La première étape est l'addition d'un groupement allylique sur le phosphore du phosphite **97** en milieu basique pour former le composé **98** avec un rendement de 75 %. Ensuite, l'addition du groupement POM par substitution permet de former le produit **99** avec un rendement de 72 %. L'utilisation d'iodure de sodium permet de faire l'échange d'halogènes pour rendre l'halogénure d'alkyle plus électrophile. On réalise ensuite une métathèse croisée avec le dibromobutène catalysée par le catalyseur de Grubbs seconde génération qui donne le composé bromé **100** avec un rendement de 85 %. Enfin, la dernière étape est réalisée avec des sels d'azotures pour substituer le brome et ainsi former l'azoture **101** avec un rendement de 69 %.

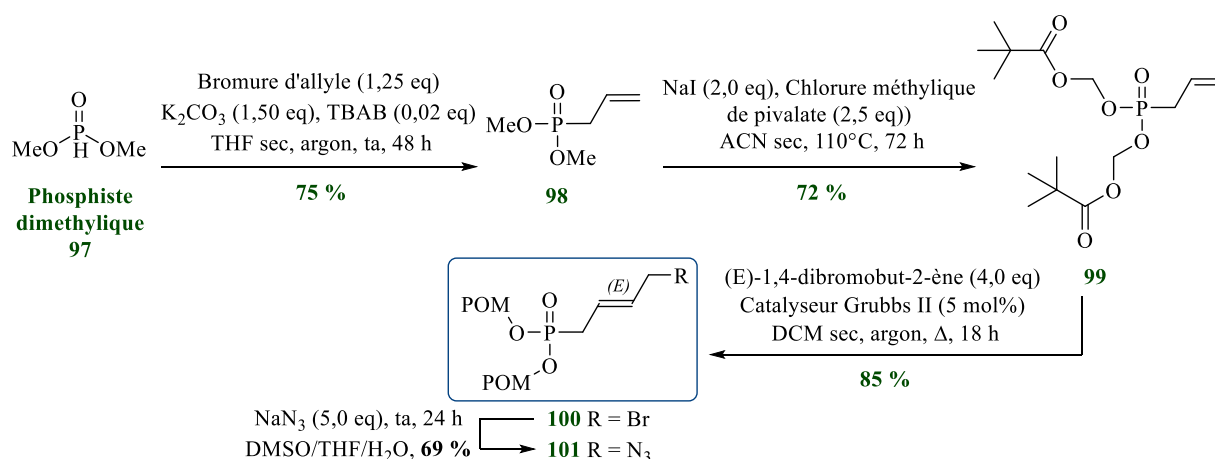
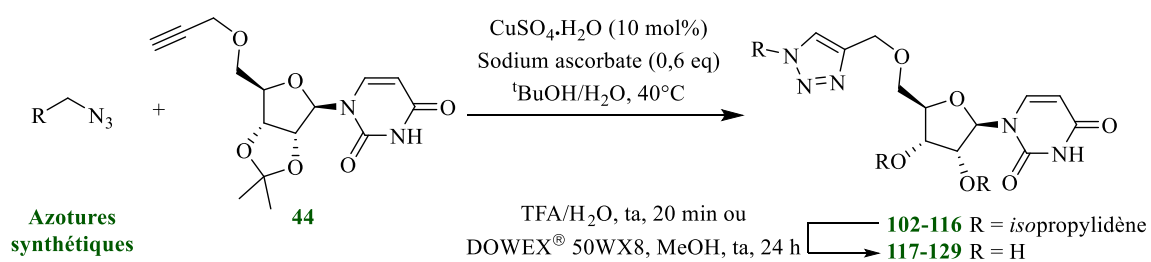


Schéma 14 : Préparation de l'azoture 101

C. Synthèse des analogues de la Famille II

1. La réaction de CuAAC des divers azotures synthétiques

On réalise la réaction de CuAAC avec les divers azotures synthétiques en main, suivie d'une étape de déprotection du groupement *isopropylidène* qui permet d'accéder aux analogues de la Famille II (Tableau 8). La réaction de CuAAC ne fonctionne pas pour les composés **113** et **114**. En effet, on observe de la dégradation par CCM (*chromatographie sur couche mince*) avec la présence de plusieurs spots parmi les produits de départ majoritaires après 10 h de réaction à 40°C. Un ajout en plus du système catalytique (0,1 équivalent de CuSO₄ et 0,6 équivalent d'ascorbate) dans le milieu et un chauffage supplémentaire au four à micro-ondes pendant 5 h à 100°C ne montre qu'une dégradation plus prononcée sans l'apparition de nouveaux produits. Un chauffage plus prolongé à de fortes températures est un non-sens car la réaction pourrait donner un mélange de régioisomères (1,4) et (1,5). Une CCM en deux dimensions montre que les azotures de départ **95** et **96** se décomposent sur silice avec l'apparition d'autres spots, ce qui nous limite pour les récupérer après colonne chromatographique. Ce résultat reprend la même hypothèse que pour la famille I où le cycle pyrimidique bloquerait la catalyse en chélatant le cuivre par les azotes. Nous ne pouvons pas accéder aux composés **113** et **114** par cette voie de synthèse.

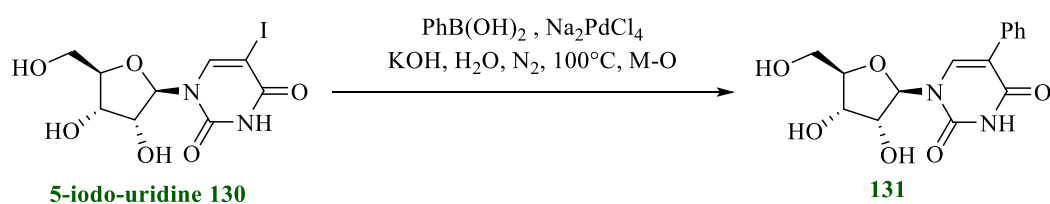


Structure		Structure		Structure			
Analogues	Rdt global	Analogues	Rdt global	Analogues	Rdt CuAAC		
117 n=3	91 %	124 n=3	72 %	113 n=3	0 %		
118 n=4	84 %						
119 n=5	81 %	125 n=4	41 %	114 n=4	0 %		
120 n=6	74 %						
Structure		Structure		Analogues	Rdt global		
					56 %		
Analogues	Rdt global	Analogues	Rdt global		45 %		
121 n=2	87 %	126 n=3	55 %				
122 n=3	83 %	127 n=4	54 %				
123 n=4	72 %						

Tableau 8 : Réaction de CuAAC entre les divers azotures et l'alcyne 44

2. Un analogue contenant un phényle en position 5 de l'uridine

La synthèse de cet analogue suit la même approche que celle des composés précédents avec une étape supplémentaire qui permet d'introduire un groupement phényle en position 5 de l'uracile. En effet, l'intérêt est de déterminer s'il est possible d'induire des interactions non-covalentes par π -stacking par le cycle aromatique du phényle pour augmenter la stabilité du complexe enzyme/ligand afin d'améliorer l'activité biologique. Pour insérer le phényle, nous avons réalisé la synthèse à partir de la 5-iodo-uridine **130** commerciale par le couplage dans des conditions de Suzuki-Miyaura dans l'eau pure (Tableau 9).²⁴



Entrée	PhB(OH) ₂	Na ₂ PdCl ₄	KOH	Purge N ₂	Tps	Rdt
1	1,3 eq	1 mol%	2 eq	5 min	25 min	37 %
2	1,5 eq	10 mol%	3 eq	5 min	30 min	13 %
3	1,5 eq	10 mol%	3 eq	20 min	30 min	57 %

Tableau 9 : Préparation du composé **131**

Le premier essai de couplage de Suzuki-Miyaura (entrée 1) a permis d'obtenir le composé **131** avec un rendement de 37 %. L'entrée 2 montre que même si on augmente le nombre d'équivalent de chaque réactif (PhB(OH)₂, Na₂PdCl₄ et KOH) ainsi que le temps de réaction, le rendement chute à 13 %, ce qui n'est pas très logique. C'est pourquoi, nous avons réalisé un autre essai dans les mêmes conditions avec un dégazage plus long sous azote au préalable dans le solvant (entrée 3). On obtient un meilleur rendement de 57 % (entrée 3). Ceci montre que l'oxygène présent dans l'air peut nuire à la catalyse. Par la suite, nous avons tenté de réaliser une O-alkylation sélective, par addition du groupement propargylique en 5' de la 5-phényluridine **131** non protégée pour éviter les étapes de protection et de déprotection. En effet, le phényle présent en position 5 donne au nucléoside **131** une meilleure solubilité que l'uridine dans les solvants organiques ce qui permet d'envisager cet essai (Schéma 15).

²⁴ Lussier, T.; Hervé, G.; Enderlin, G.; Len, C. Original access to 5-aryluracils from 5-iodo-2'-deoxyuridine via a microwave assisted Suzuki-Miyaura cross-coupling/deglycosylation sequence in pure water *RSC Adv.* **2014**, 4, 46218-46223.

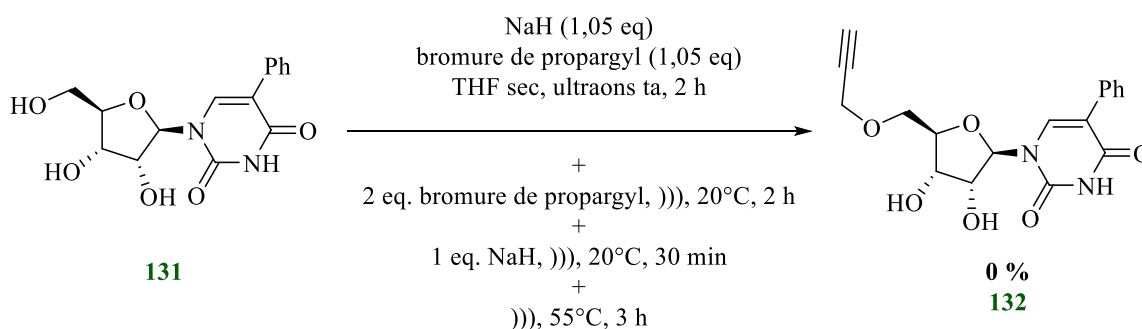


Schéma 15 : Tentative d'alkylation directe en position 5' du 5-phényluridine 131

Malgré cette tentative en modifiant des conditions expérimentales, la réaction ne permet pas d'accéder au composé **132**. L'ajout supplémentaire d'hydrure de sodium a provoqué l'apparition d'un grand nombre de produits sur CCM. On en conclut que le premier équivalent de base déprotone l'azote en position N3 de l'uracile mais l'anion formé ne substitue pas le brome porté par le propargyle. L'ajout du deuxième équivalent de base déprotone arbitrairement les groupements hydroxy présents sur la molécule puis substitue le brome du propargyle d'où l'apparition de plusieurs spots sur CCM. L'analyse d'un échantillon dilué et neutralisé du brut réactionnel par LC-MS (*Liquid chromatography with mass spectrometry*) montre tout de même la présence très majoritaire du produit de départ. N'ayant pas réussi à trouver les conditions nécessaires, nous avons alors réalisé une étape de protection des positions 2' et 3' sous la forme d'un isopropylidène **133** avec un rendement de 86 % ; l'addition du groupement propargylique conduit à l'alcyne **134** avec un rendement de 96 % (Schéma 16).

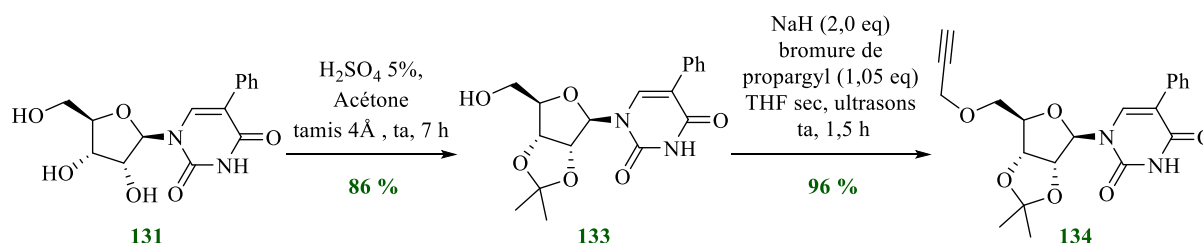


Schéma 16 : Préparation du composé 134

On réalise la réaction de CuAAC à partir de l'alcyne **134** avec l'azoture **60** pour obtenir le composé nucléosidique **135** avec un rendement de 99 % suivie de la déprotection qui conduit au composé **136** avec un rendement de 83 % (Schéma 17). Le choix de l'azoture a été guidé par les activités biologiques intéressantes de l'analogue **118** sans phényle (structure identique que **136** sans le phényle).

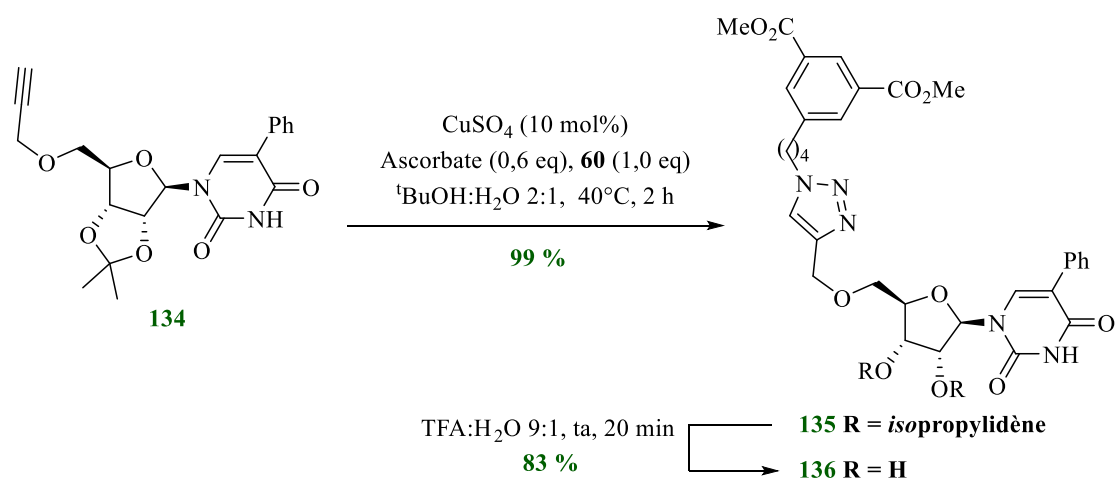


Schéma 17 : Préparation du composé **136**

3. Synthèse des dérivés acide dicarboxyliques de la Famille II

La dernière étape pour obtenir les analogues nucléosidiques contenant le motif souhaité de départ avec l'acide 3,5-phénylique dicarboxylique consiste en une réaction de saponification puis acidification des groupements esters. Un premier essai a été réalisé avec le diester **118** en présence d'une solution aqueuse d'hydroxyde de lithium (Schéma 18). La réaction montre la disparition totale du produit de départ après 1h30 d'agitation. Cependant, le composé attendu, après acidification et purification, correspond au produit monosaponifié **138** avec un rendement de 65 % au lieu du composé disaponifié attendu.

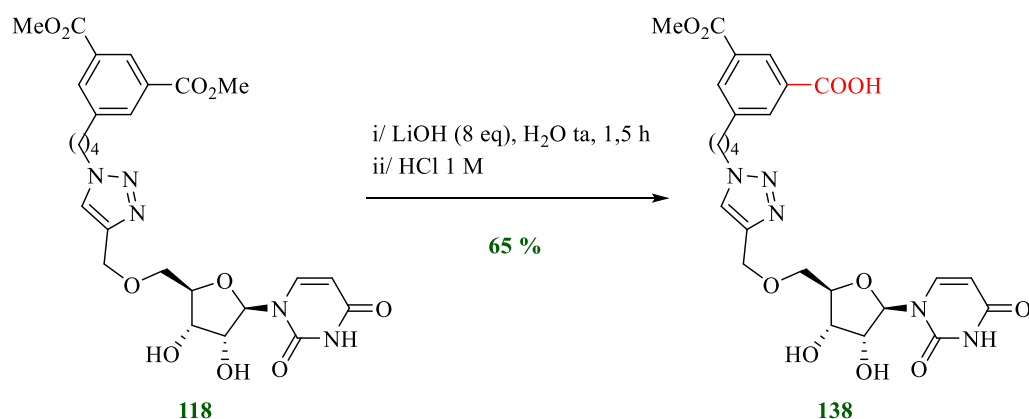
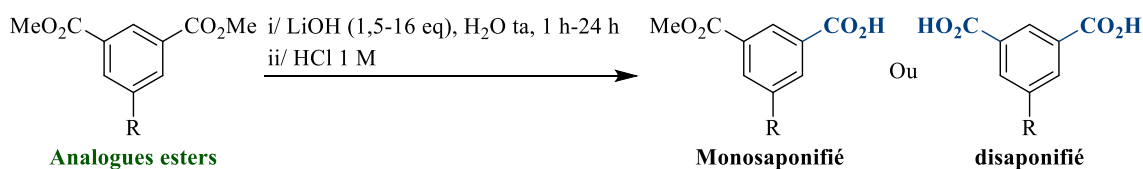


Schéma 18 : Premier essai de saponification du composé **118**

Cet essai est intéressant puisqu'il met en évidence d'autres analogues « mixtes » contenant une fonction acide carboxylique et une fonction ester. Une solution aqueuse plus concentrée en LiOH est nécessaire pour saponifier les deux esters.

Ainsi, nous avons obtenu d'une part les composés acides monocarboxyliques **137-144** et d'autre part les composés acides dicarboxyliques **145-152** (Tableau 10).



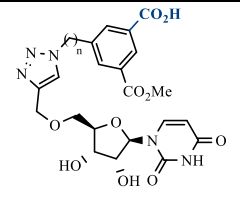
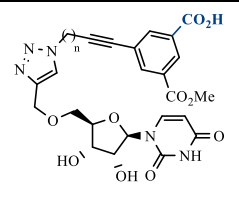
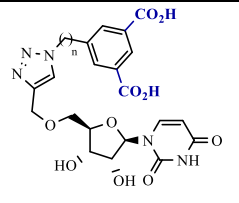
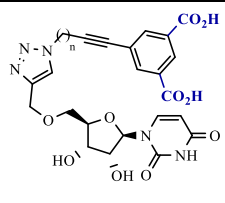
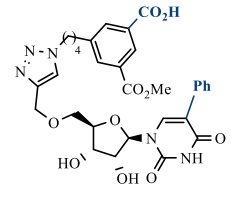
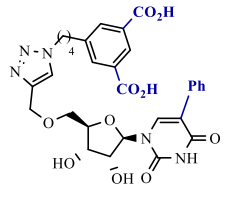
Analogues acide monocarboxylique				Analogues acide dicarboxylique			
							
Analogues	Rdt	Analogues	Rdt	Analogues	Rdt	Analogues	Rdt
137 n=3	82 %	141 n=2	47 %	145 n=3	98 %	149 n=2	70 %
138 n=4	65 %	142 n=3	74 %	146 n=4	78 %	150 n=3	94 %
139 n=5	88 %	143 n=4	99 %	147 n=5	99 %	151 n=4	99 %
140 n=6	99 %			148 n=6	97 %		
							
Analogues		Rdt		Analogues		Rdt	
144		18 %		152		90 %	

Tableau 10 : Préparations des analogues acide mono- et dicarboxyliques 137-152

La présence de l'acide carboxylique rend possible des couplages peptidiques. Afin d'évaluer l'influence de l'ajout d'un peptide sur les analogues **137**, **139** et **140**, nous avons réalisé des liaisons peptidiques avec la L-alanine pour être plus proche structuellement du substrat naturel et évaluer les activités biologiques (Schéma 19). Une saponification/acidification a été réalisée avec le composé peptidique **154** et a conduit au dérivé **156** avec un rendement de 68 %.

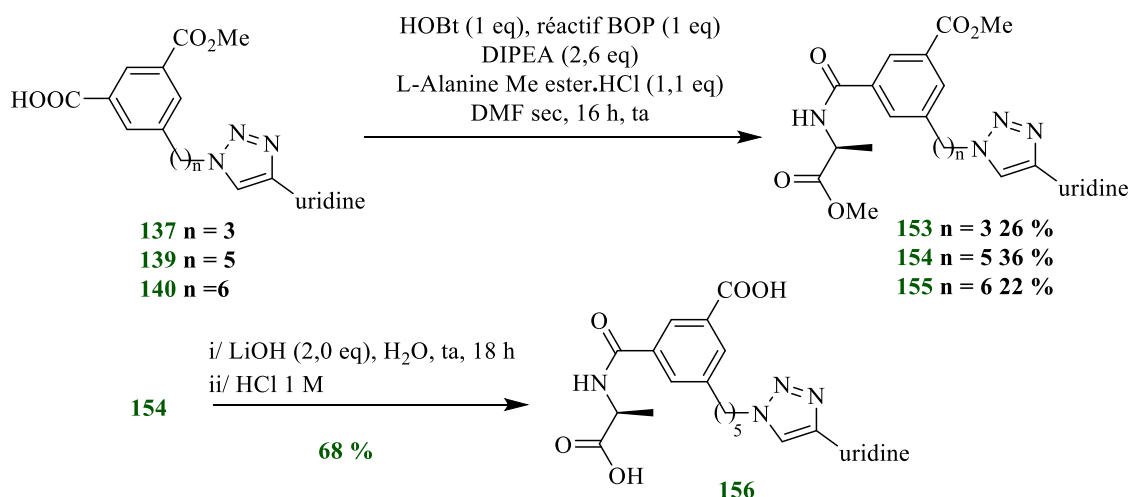


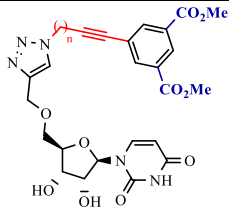
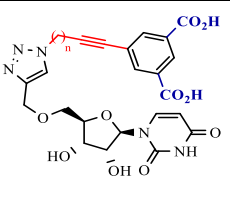
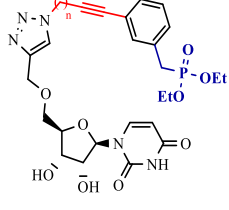
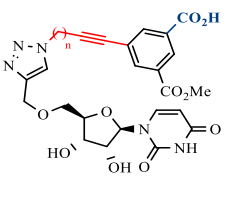
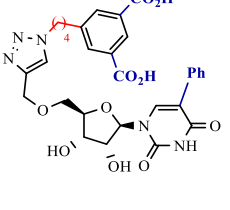
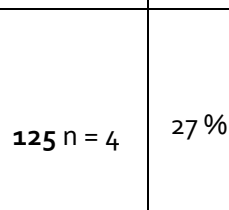
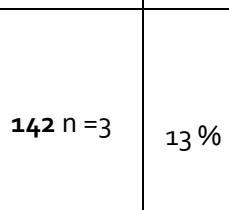
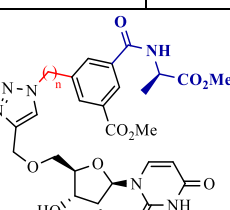
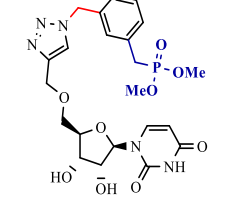
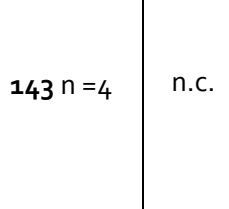
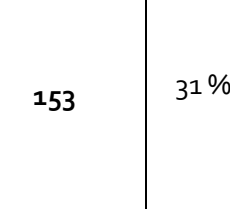
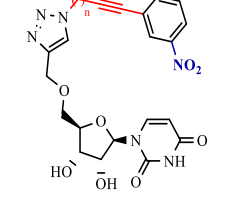
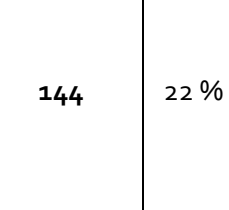
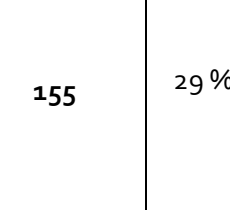
Schéma 19 : Préparation des composés 153-156

D. Evaluations biologiques des analogues de la Famille II

1. Test *one pot* sur les MurA-F

Après avoir synthétisé les différents analogues nucléosidiques, les composés ont été évalués de la même façon que la famille I avec le test *one-pot* sur le mélange des MurA-F avec une concentration de 100 μM (Tableau 11).

Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.
117 n = 3	31 %	129	9 %	145 n = 3	38 %
118 n = 4	16 %			146 n = 4	50 %
119 n = 5	19 %	136	0 %	147 n = 5	48 %
120 n = 6	43 %			148 n = 6	41 %

		137 n = 3	0 %		
121 n = 2	25 %	138 n = 4	56 %	149 n = 2	40 %
122 n = 3	36 %	139 n = 5	0 %	150 n = 3	23 %
123 n = 4	17 %	140 n = 6	0 %	151 n = 4	18 %
					
124 n = 3	28 %	141 n = 2	17 %	152	31 %
					
125 n = 4	27 %	142 n = 3	13 %	153	31 %
					
128	31 %	143 n = 4	n.c.	154	10 %
					
		144	22 %	155	29 %

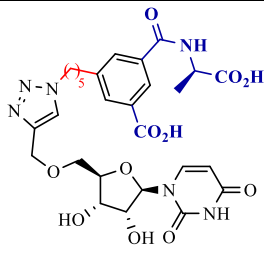
126 n = 3	40 %				
127 n = 4	35 %			156	12 %

Tableau 11 : Résultats biologiques du test à 100 μ M sur les MurA-F

Les analogues nucléosidiques diester méthyliques avec une chaîne flexible **117-120** (sans la triple liaison) et ceux avec une chaîne rigide **121-123** (avec de la triple liaison) sont réalisés et leurs pourcentages d'inhibitions peuvent être comparés sauf pour le dérivé **117** puisque son homologue rigide n'a pas été synthétisé. On constate que l'écart du pourcentage d'inhibition entre les nucléosides **118-120** et **121-123** augmente d'autant plus que la longueur de la chaîne est grande (**118** : 16 % vs **121** : 25 % et $\Delta\% = 9$; **119** : 19 % vs **122** : 36 % et $\Delta\% = 15$; **120** : 43 % vs **123** : 17 % et $\Delta\% = 26$). Cette observation montre que plus la longueur de la chaîne augmente, plus l'inhibition est grande en faveur des analogues avec la chaîne flexible. D'autres nucléosides avec une longueur différente devront être analysés pour confirmer cette hypothèse avec l'activité biologique résultante.

Les analogues phosphonates **124**, **125**, **128** et **129** montrent des activités biologiques ne dépassant pas les 35 % d'inhibition à 100 μ M (**124** = 28 % ; **125** = 27 % ; **128** = 31 % ; et **129** = 9 %). Alors que les analogues portant le groupe nitro **126** et **127** montrent des activités biologiques plus élevées en atteignant ou dépassant les 35 % d'inhibition à 100 μ M (**126** = 35 % et **127** = 40 %). L'analogues **136** avec le groupement phényle en position 5 de l'uracile n'a aucune activité (0 % à 100 μ M). Comparé à son homologue sans le phényle **118** qui a 16 % à 100 μ M, la présence du phényle n'est pas du tout favorable pour améliorer l'activité. Par la suite, les analogues nucléosidiques d'acide 3,5-benzoïque d'ester méthylque **137-140** avec une chaîne flexible peuvent être comparés aux diester **117-120**. Cependant, le dérivé **138** avec $n = 4$ est le seul à montrer une activité biologique avec 56 % à 100 μ M plus importante que le diester **118** (56 % vs 16 %). Les autres analogues **117**, **119** et **120** n'ont pas d'activité biologique apparente et nous n'avons pas de justification évidente. En ce qui concerne les analogues d'acide 3,5-benzoïque d'ester méthylque **141-143** avec une chaîne rigide, les activités biologiques sont plus faibles comparées aux diester **121-123** (**141** : 17 % vs **121** : 25 % ; **142** : 13 % vs **122** : 36 % et pour le **123** le résultat reste en cours). Ensuite, l'analogue **144** contenant le phényle en position 5 de l'uracile montre une activité de 22 % à 100 μ M plus faible comparée au dérivé **138** (**144** : 22 % vs **138** : 56 %). Enfin, les analogues nucléosidiques acides 3,5-phényliques dicarboxyliques **145-148** avec une chaîne flexible ou ceux avec une chaîne rigide **149-151** peuvent être comparés aux

diester **117-120** et aux esters **137-140**. De manière générale, leurs activités sont soit similaires ou soit plus élevées ce qui montre que la fonction acides 3,5-phénylique dicarboxylique est plus favorable pour l'activité biologique que les autres fonctions. Cette hypothèse semble se confirmer avec le composé **152** qui contient le phényle où ce dernier retrouve une activité avec 31 % à 100 μ M avec cette fonction diacide. Enfin, l'influence de la L-Alanine des composés **153-156** montre que cela n'améliore pas l'activité biologique. Dans ce tableau, on a choisi deux composés **120** et **146** pour les premières évaluations d'activité multi-inhibitrice contre les Mur ligases puisqu'ils font partie des plus actifs des analogues de la Famille II.

2. Test one pot sur une enzyme ciblée

Les composés les plus actifs ont été évalués afin de déterminer leurs inhibitions multiples (Tableau 12).

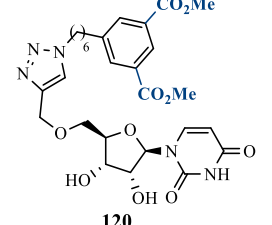
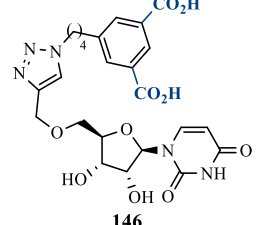
 120		 146	
Mur Ligases	Inhib.	Mur Ligases	Inhib.
MurC	13 %	MurC	2 %
MurD	17 %	MurD	4 %
MurE	39 %	MurE	49 %
MurF	4 %	MurF	41 %

Tableau 12 : Activité biologique des composés **120** et **146** visant chaque Mur Ligase à 100 μ M

Le composé **120** a révélé être essentiellement actif sur la MurE (39 % à 100 μ M). Plus faiblement, il montre une activité sur la MurC et la MurD avec 13 % et 17 % à 100 μ M respectivement. Le composé **146** est actif sur la MurE et la MurF avec 49 % et 41 % à 100 μ M respectivement.

VI Synthèse d'un analogue de type cyclobutène-dione

L'amide squarique, également appelé 3,4-diaminocyclobut-3-ène-1,2-dione, est un bioisostère connu du phosphate.²⁵ Ce groupement a déjà été utilisé avec des nucléosides tels que l'uridine en position 5' pour réaliser des molécules inhibant des glycosyl-transférases.²⁶ En effet, il a été prouvé que les pK_a du cycle squarimique et du groupement phosphate étaient proches (pK_a proche de 2).²⁷ En gardant les mêmes objectifs que les analogues de la Famille II, nous allons montrer que notre approche synthétique du DOS permet d'élaborer une diversité moléculaire élargie avec la synthèse d'un analogue contenant ce motif en plus du cycle triazole. La rétrosynthèse montre trois étapes importantes : la réduction de l'azoture en amine libre, l'addition du groupement 3,4-diaminocyclobut-3-ène-1,2-dione, et enfin une réaction de CuAAC qui donne accès au produit **157** souhaité (Schéma 20).

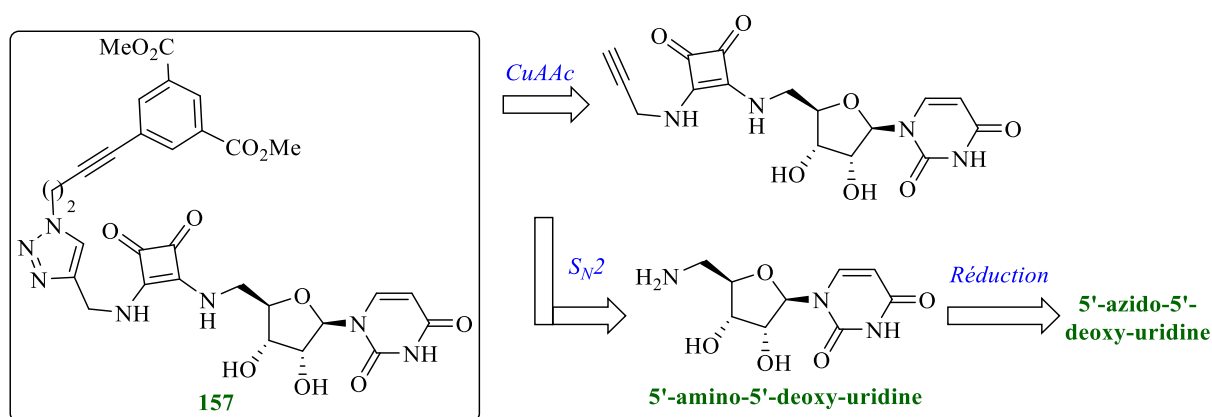


Schéma 20 : Rétrosynthèse envisagée

Les premiers essais de réduction de l'azoture du composé **3** s'effectuent avec les conditions réductrices pallado-catalysées (Schéma 21). On obtient des rendements faibles dûs à la formation d'un sous-produit hydrogéné sur le cycle de l'uracile que l'on observe sur CCM avant même que l'azoture de départ ne soit consommé entièrement. Une autre approche consiste en la réduction directe de la 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** dans des conditions de Staudinger (schéma 21).

²⁵ Saha, A.; Panda, S.; Paul, S.; Manna, D. Phosphate bioisostere containing amphiphiles: a novel class of squaramide-based lipids *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9438-9441.

²⁶ Niewiadomski, S.; Beebejaum, Z.; Denton, H.; Smith, T.K.; Morris, R.J.; Wagner, G.K. rationally designed squaryldiamides – a novel class of sugar-nucleotide mimics? *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3488-3499.

²⁷ Seio, K.; Miyashita, T.; Sato, K.; Sekine, M.; Synthesis and properties of new analogues possessing squaramide moieties as new phosphate isosters *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5163-5170.

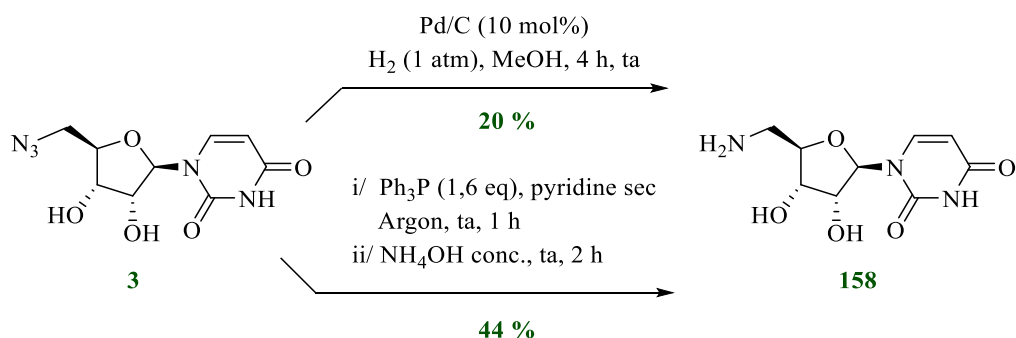


Schéma 21 : Préparation du 5'-amino-5'-deoxy-uridine **158**

La réaction de Staudinger fonctionne mieux et a permis d'isoler le composé **158** avec un rendement de 44 %. L'isostère squarique a été introduit en effectuant deux additions nucléophiles successives (Schéma 22). La première substitution a conduit au composé **159** avec un excellent rendement de 83 %. Cependant, la deuxième substitution avec l'amine propargylique a permis d'accéder à l'amide squarique **160** avec cette fois un rendement plus faible de 19 %. Ce rendement s'explique par des pertes de produits lors de l'étape de filtration du tamis moléculaire dû à sa faible solubilité dans le méthanol. Enfin, la dernière étape est la réaction de CuAAC du composé **160** avec l'azoture **68** pour obtenir le composé **157** avec un rendement de 92 %. L'azoture **68** a aussi été utilisé pour la synthèse du composé **122** où ce dernier montre une activité enzymatique, ce qui va permettre de les comparer.

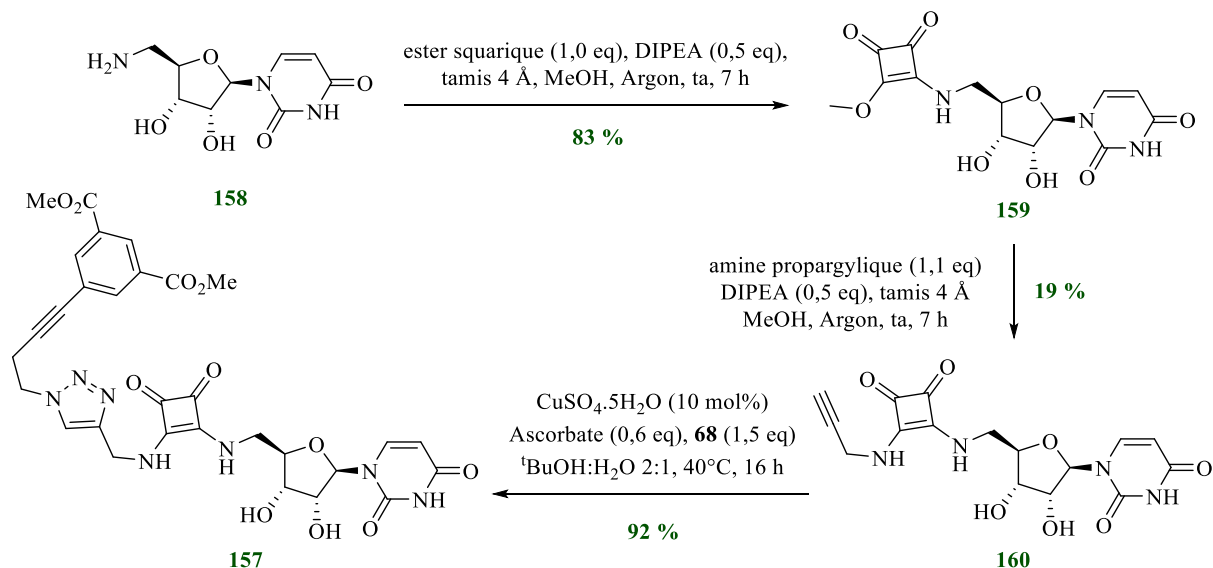
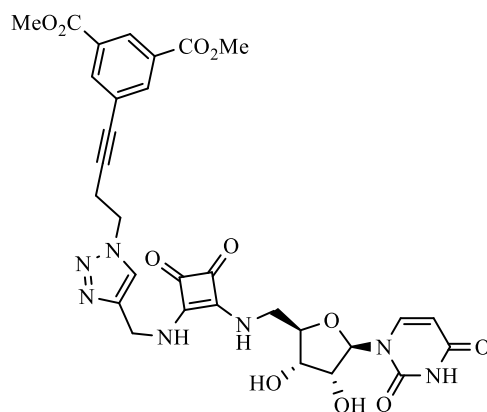


Schéma 22 : Préparation de l'amide squarique **157**

L'activité biologique du composé **157** est de 22 % sur 100 μM (Figure 11). Similaire au composé **122** sans le groupement cyclobutènedione, l'activité du bioisostère de phosphate en plus du cycle triazole n'améliore pas l'activité contre les Mur ligases.



157 Inhibition = 22 % (100 μ M sur les MurA-F)

Figure 11 : Activité biologique du composé 157 sur les Mur A-F

VII Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé 59 molécules ; 25 de type 5'-triazole-5'-déoxyuridine (Famille I) et 34 de type 5'-O-triazolo-méthylether-uridine (Famille II). Chacune des molécules de la Famille I montre une activité inhibitrice contre les Mur ligases à 100 μ M qui reste cependant faible. Pour la Famille II, 29 molécules qui ont une activité inhibitrice contre les Mur ligases avec 4 composés qui ne sont pas du tout actifs.

Le schéma 23 ci-dessous permet d'apprécier l'approche convergente conduisant à une petite librairie (*via* DOS). D'une part, le dérivé qui contient un acide carboxylique a pu être utilisé pour le couplage peptidique. D'autre part, l'intermédiaire **31** a permis de synthétiser d'autres dérivés 1,2,3-triazoles contenant une glucosamine *N*-acétylée.

En résumé, cette synthèse comporte entre 2 et 9 étapes selon les composés et conduit à des rendements globaux entre 6 et 93 %. Les composés **34** et **36** qui sont les plus actifs ont une activité de 56 % et de 50 % à 100 μ M sur le mélange des Mur ligases MurA-F et une activité de 42 % et de 49 % à 100 μ M spécifiquement de la MurE en tant qu'enzyme cible.

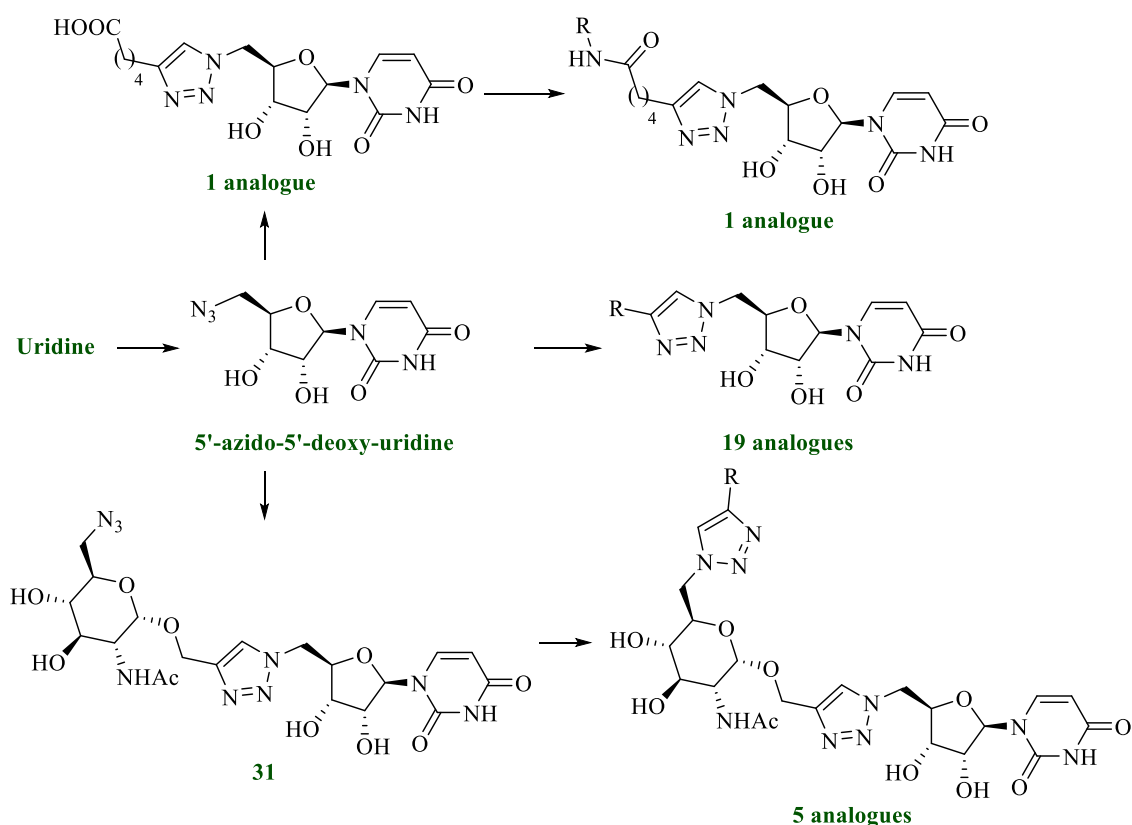


Schéma 23 : Récapitulatif des analogues de la Famille I

Dans le Schéma 24 ci-dessous, un récapitulatif synthétique de la Famille II est présenté. Au départ de l'uridine, le précurseur alcyne a pu être obtenu. La réaction de CuAAC a permis l'obtention d'analogues 1,2,3-triazoles parmi lesquelles les dérivés qui contiennent l'acide 3,5-phénylique dicarboxylique en présence de deux types de chaînes avec une longueur modulable. Ceux qui contiennent une seule fonction acide carboxylique ont pu être utilisés pour le couplage peptidique avec la L-Alanine. Cette synthèse met en jeu entre 6 et 12 étapes selon les composés souhaités et s'effectue avec des rendements globaux entre 11 et 59 %. Les deux dérivés les plus actifs sont le composé **138** avec une activité de 56 % sur 100 μ M et le composé **146** avec une activité de 50 % sur 100 μ M avec le mélange des Mur ligases MurA-F et une activité de 49 % sur la MurE et 41 % sur la MurF en tant qu'enzyme cible. Il peut être considéré comme un inhibiteur multiple de la MurE-F.

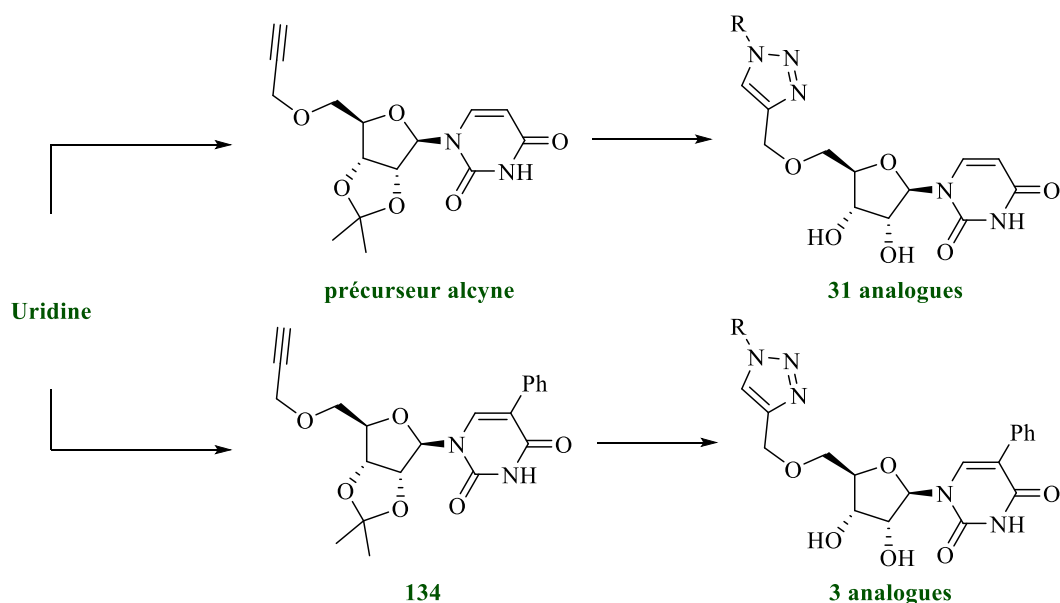


Schéma 24 : Récapitulatif des analogues de la Famille II

Une autre solution pour obtenir le dérivé contenant le cycle diaminopyrimidique que nous n'avons pas obtenu lors de la réaction de CuAAC serait d'utiliser une autre approche synthétique en réalisant la réaction de CuAAC sans l'hétérocycle pyrimidique. Pour obtenir le nucléoside **22** de la famille I, on pourrait envisager d'utiliser directement l'analogue **11** déjà obtenu et de réaliser la substitution nucléophile aromatique avec le chloro-diaminopyrimidine (Schéma 25). Si l'essai ne fonctionne pas, on pourrait aussi l'envisager en protégeant les positions hydroxyle 2' et 3', de même pour l'azote en N1.

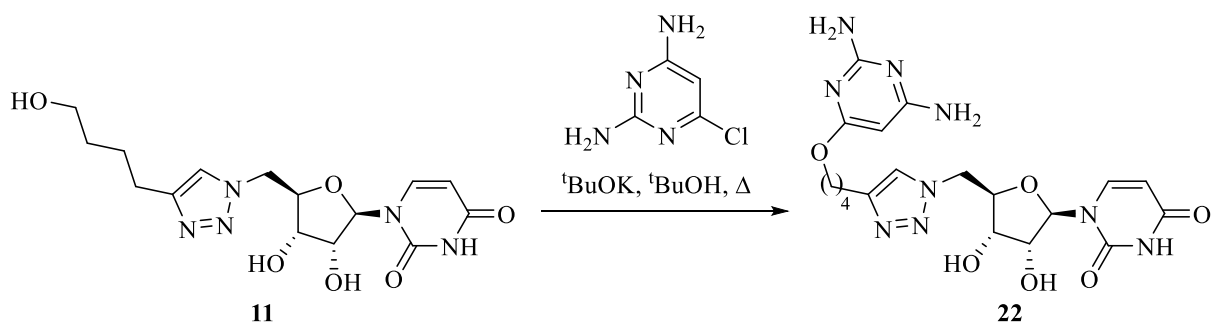


Schéma 25 : Alternative synthétique pour obtenir le nucléoside **11**

Pour obtenir les nucléosides **113** et **114** de la famille II à partir de l'alcyne **44**, on pourrait envisager d'effectuer une réaction de CuAAC avec l'azoture **157** accessible avec le dérivé bromé (Schéma 26). Après avoir obtenu l'alcool **158**, ce dernier serait engagé dans une réaction d'oxydation de sa fonction alcool terminal pour obtenir l'aldéhyde **159**. Ensuite, une réaction de Fuchs-Corey donnerait le composé alcyne **160** qui serait directement engagé avec le 6-chloro-2,4-diaminopyrimidine dans un couplage de Sonogashira pour finalement donner le produit **161** similaire aux composés **113** et **114** sans les groupements protecteurs.

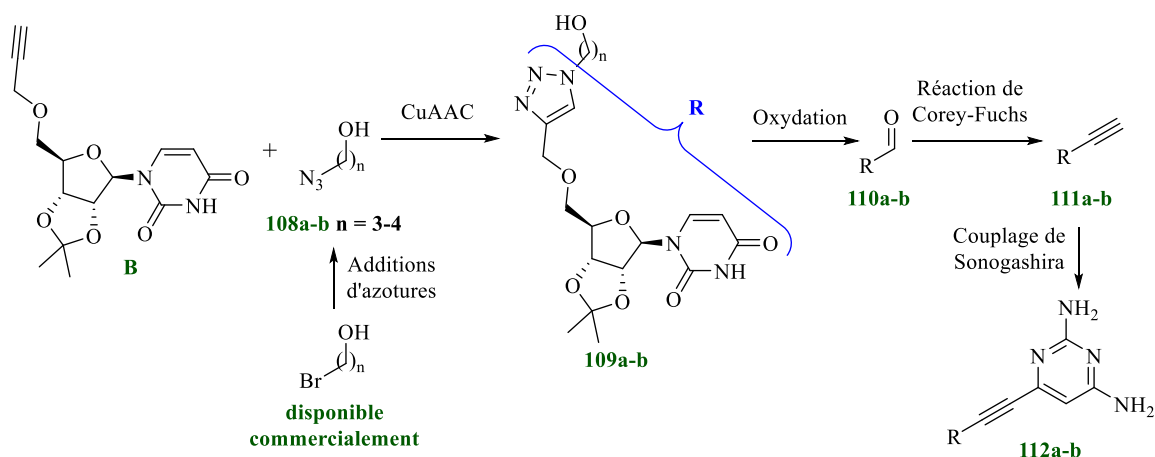


Schéma 26 : Autre voie synthétique donnant accès aux composés 99a-b

Il est possible d'envisager d'autres modifications pour améliorer l'activité biologique contre les Mur ligases en respectant toujours l'approche de type DOS (Schéma 27).²⁸

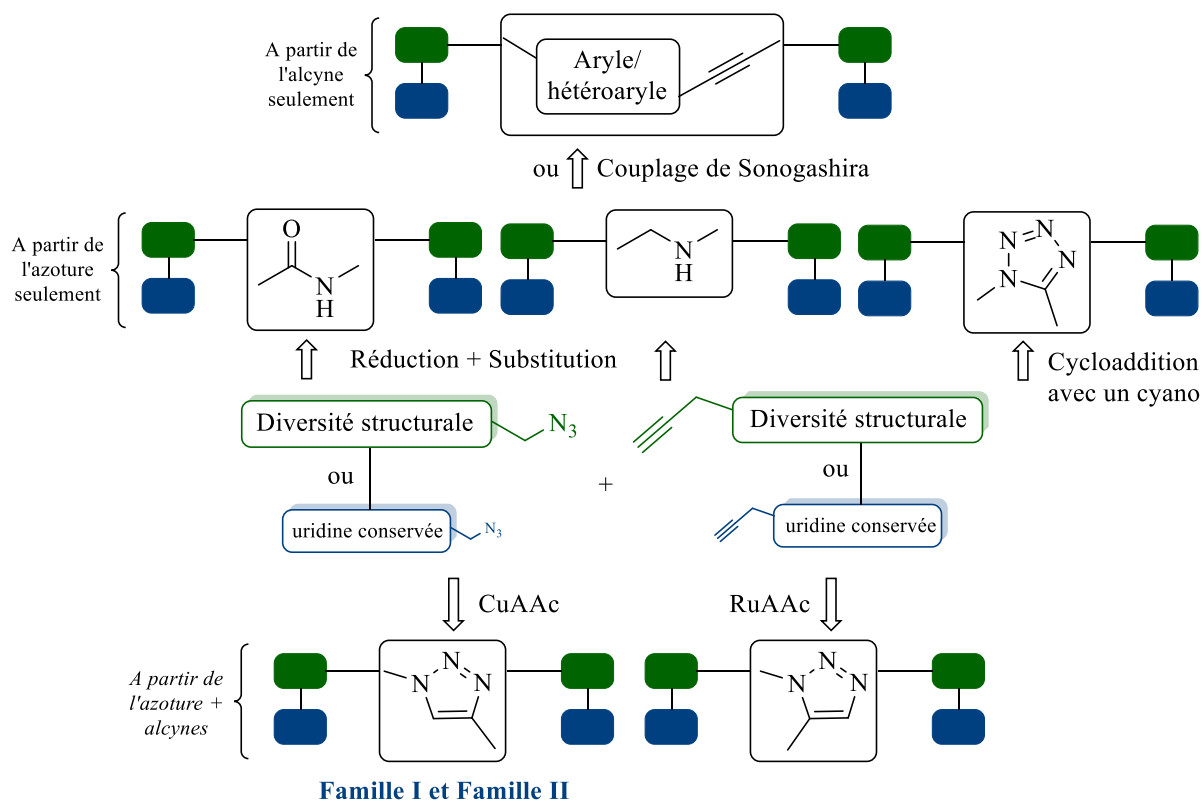


Schéma 27 : Extension d'analogues nucléosidiques

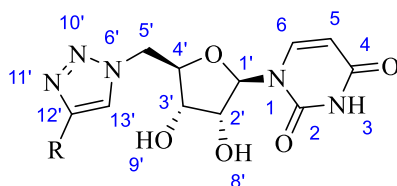
La réaction clé de CuAAC peut devenir une réaction de RuAAC pour former le régiomère (1,5) à partir de l'alcyne et de l'azoture. De plus, le cycle [1,2,3]-triazole peut être remplacé par d'autres fonctions chimiques portant la diversité moléculaire, ce qui aurait pour but d'évaluer l'influence de ce lien entre

²⁸ (a) Burés, J.; Martín, M.; Urpí, F.; Vilarrasa J. Catalytic StaudingersVilarrasa Reaction for the Direct Ligation of Carboxylic Acids and Azides *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2203–2206; (b) Scriven, E.F.V.; Turnbull, K. Azides: Their Preparation and Synthetic Uses *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297–368.

l'uridine et les divers châssis insérés dans le site actif du substrat naturel. A partir de l'azoture seul, on pourrait, par exemple, réaliser d'autres liens tels qu'une liaison amide, amine disubstituée ou encore former le cycle tétrazole avec un dérivé cyano. A partir de l'alcyne seul d'autres liens peuvent aussi être créés en réalisant par exemple un couplage de Sonogashira avec divers groupements aryliques ou hétéroaryliques.

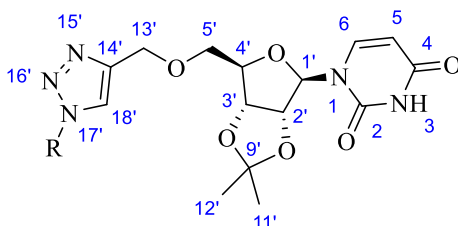
Experimental part of Chapter 2

General procedure A: CuAAc reaction



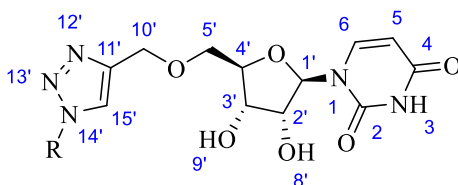
To a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (1.0 eq) in ^tBuOH:H₂O (2:1) (10 mL/0.5 mmol), the corresponding alkyne (1.0 eq), copper sulfate pentahydrate (10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (0.6 eq) was sequentially added. Then the reaction mixture was stirred at 40°C and monitored by TLC. When the starting material was completely converted, the reaction was stopped and co-evaporated twice with MeOH (20 mL/0.5 mmol). The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3 or DCM/MeOH 9/1) and then the residue was co-evaporated several times with MeOH (x × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1 or AE/MeOH 9/1) was used to give a pure product. All analysis are described according to each alkyne used.

General procedure B: CuAAc reaction



To a solution of 5'-O-propargyl-uridine **44** (1.0 eq) in ^tBuOH:H₂O (2:1) (10 mL/0.5 mmol), the corresponding azide (1.0 eq), copper sulfate pentahydrate (10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (0.6 eq) was sequentially added. Then the reaction mixture was stirred at 40°C and monitored by TLC. When the starting material was completely converted, the reaction was stopped and co-evaporated twice with MeOH (20 mL/0.5 mmol). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 98/2) to give a pure product. All analysis are described according to each azide used.

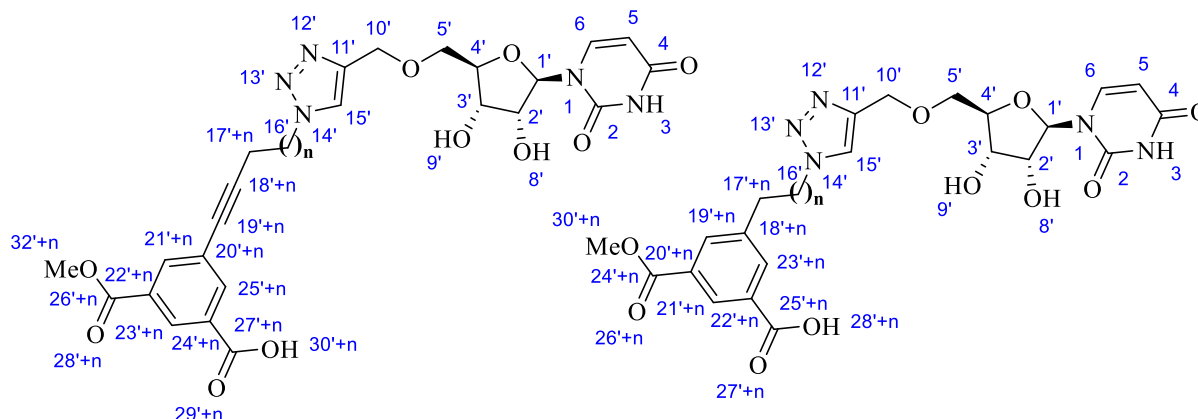
General procedure C: Deprotection



To substituted 5'-O-methyltriazole-2'-3'-O,O'-isopropylidene-uridine (1.0 eq), a solution of TFA:H₂O (9:1) (10 mL/ 0.5 mmol) was added and was stirred at room temperature until the conversion is complete (monitoring by TLC). The reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* and co-evaporated one time with MeOH (20 mL/0.5 mmol). Then, the residue was directly purified by flash

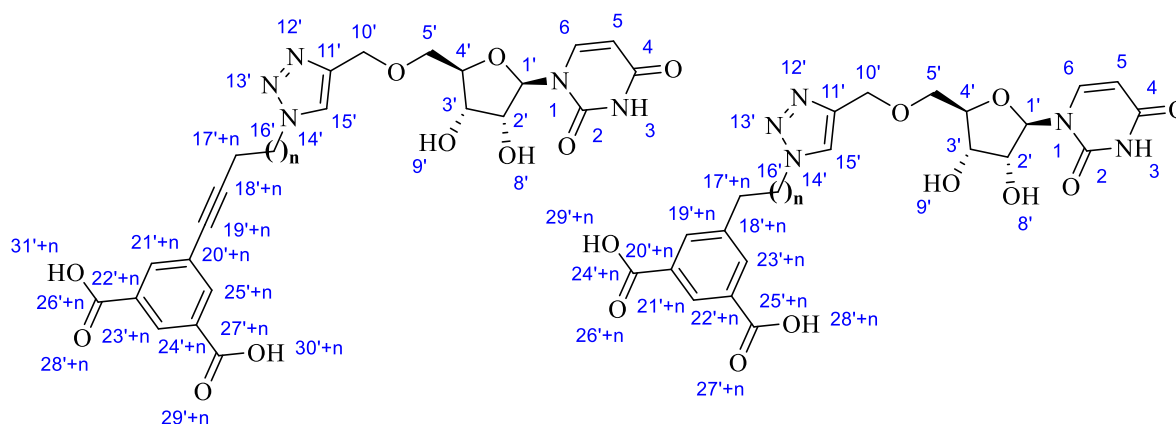
chromatography ($\text{H}_2\text{O}/\text{PrOH}/\text{EA}$ 1/6/3) and then the residue was co-evaporated several times with MeOH ($x \times 15$ mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) was used to give a pure product. All analysis are described according to each substituted uridine used.

General procedure D: Mono-saponification



To a solution of dimethyl-ester substituted 5'-*O*-methyltriazole-uridine (1.0 eq) in THF: H_2O (3:1) (5 mL/ 0.25 mmol), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 2h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL/ 0.25 mmol) to pH 1 and was concentrated to dryness with at least one co-evaporation with MeOH ($x \times 15$ mL). The residue was directly purified by flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}/\text{PrOH}/\text{EA}$ 0.5/6.5/3) and then the residue was co-evaporated several times with MeOH ($x \times 15$ mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 95/5 to 90/10) was used to give a pure product. All analysis are described according to each substituted uridine used.

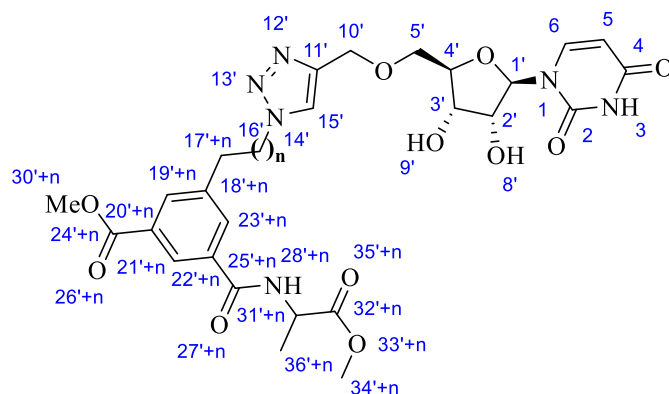
General procedure E: Saponification



To a solution of dimethyl-ester substituted 5'-*O*-methyltriazole-uridine (1.0 eq) in THF: H_2O (3:1) (5 mL/ 0.15 mmol), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M

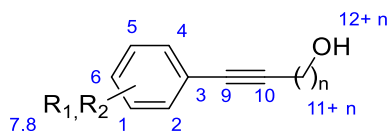
solution (10 mL/ 0.25 mmol) to pH 1 and was concentrated to dryness *in vacuo* with at least one co-evaporation with MeOH ($x \times 15$ mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 1/6/3) and then the residue was co-evaporated several times with MeOH ($x \times 15$ mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) was used to give a pure product. All analysis are described according to each substituted uridine used.

General procedure F: Peptidic coupling



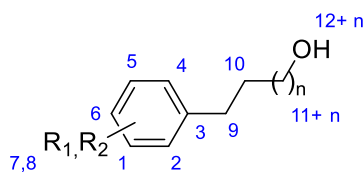
To a flame-dried round-bottom flask, monocarboxylic acid substituted 5'-*O*-methyltriazole-uridine (1.0 eq) was solubilized with anhydrous DMF (5 mL/ 0.10 mmol) under argon atmosphere at 0°C. Then, BOP reagent (1.0 eq), HOBT (1.0 eq), DIPEA (3.0 eq) and molecular sieves 4 Å (one spatula) were successively added and stirred for 10 min at 0°C. Thus, *L*-alanine methyl ester hydrochloride (1.1 eq) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 16 h. The reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with several co-evaporation with *n*-heptane ($x \times 15$ mL) to remove residual DMF. The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 0.5/6.5/3). Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 99/1) was used to give a pure product. All analysis are described according to each substituted uridine used.

General procedure G: Sonogashira coupling



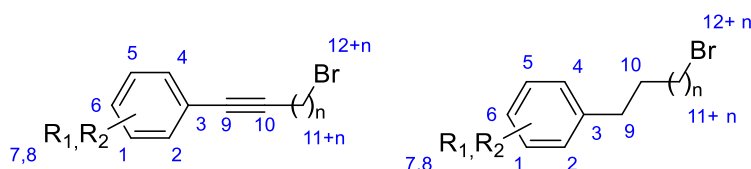
In a flame dried round-bottom flask, Aryl halide (1.0 eq), copper iodide (10 mol%) and Pd(Ph₃P)₂Cl₂ (5 mol%) was sequentially added under argon atmosphere. Then, triethylamine (42 eq) was added and the resulting solution was stirred at 60°C. After 30 min, the corresponding alkyne (1.0 eq) was added and the reaction was stirred at 60°C and monitored by TLC. When the reaction was completely finished, this one was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was directly purified by a flash chromatography. Each eluent was used according to the TLC reaction. All analysis are described according to each aryl halide and alkyne used.

General procedure H: Hydrogenation



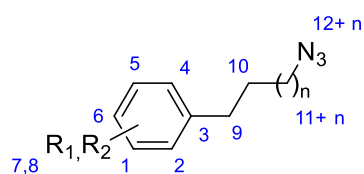
In a flame dried round-bottom flask, alkyne-aryl alcohol (1.0 eq) was added to a MeOH (50 mL/8 mmol) under argon atmosphere. Then, palladium on carbon (10 wt%) was added and a fine bubble stream of H₂ gas on the dark solution was established for 20 min and this one was stirred at room temperature for 24 h under 1 atm of H₂. When the reaction was finished, this was stopped, filtered on celite pad, washed with MeOH and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure product without further purification.

General procedure I: Bromation



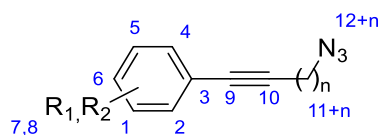
In a flame dried round-bottom flask, the corresponding alcohol (1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (25 mL/2 mmol) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, this was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography to give a pure product. Each eluent was used according to the TLC reaction. All analysis are described according to each alcohol used.

General procedure J: Azide formation



In a flame dried micro-wave tube, the corresponding alkyl bromide (1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (10 mL/1 mmol) under argon atmosphere. Then, sodium azide (15 eq) was added and the solution was heated at 110°C under microwave irradiation for 1.5 min. Thus, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure product without further purification. All analysis are described according to each alkyl bromide used.

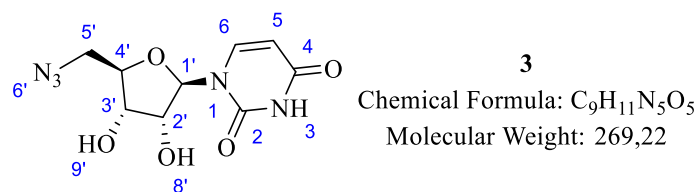
General procedure K: Azide formation



In a flame dried round-bottom flask, the corresponding alkyl bromide (1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (10 mL/1 mmol) under argon atmosphere. Then, sodium azide (1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature (monitored by TLC). When the reaction was finished, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography to give a pure product. Each eluent was used according to the TLC reaction. All analysis are described according to each alkyl bromide used.

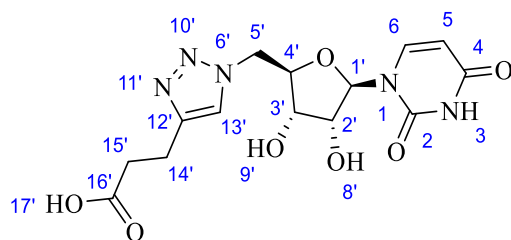
5'-azido-5'-deoxy-uridine (3)

CAS: 39483-48-2



To a flame-dried round-bottom flask, tetrabromomethane (10.2 g, 30.8 mmol, 1.5 eq) was added to a solution of uridine **1** (5.0 g, 20.5 mmol, 1.0 eq), triphenylphosphine (7.68 g, 29.3 mol, 1.43 eq) and sodium azide (4.0 g, 61.5 mmol, 3.0 eq) with dry DMF (50 mL) at room temperature under argon atmosphere. Then, the solution was stirred for 24 hours. The reaction mixture became a slightly yellow pale solution. This was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) to give a white solid (5.20 g, 94 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 10.0 (1H, s, N-H₃); 7.66 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.07 Hz, H₆); 5.86 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 4.43 Hz, H_{1'}); 5.62 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.11 Hz, H₅); 4.73 (1H, m, H₈); 4.45 (1H, m, H₉); 4.32 (1H, m, H_{2'}); 4.18 (1H, m, H_{3'}); 4.04 (1H, m, H_{4'}); 3.60-3.72 (2H, m, H_{5'}). ¹³C NMR (100 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 162.5 (C₄); 150.5 (C₂); 140.7 (C₆); 102.1 (C₅); 90.2 (C_{1'}); 82.4 (C_{4'}); 73.4 (C_{2'}); 70.7 (C_{3'}); 52.0 (C_{5'}). ESI-HRMS calculated for [C₉H₁₂N₅O₅]⁺ m/z 270.0832 and found m/z 270.0832. IR (neat, cm⁻¹): 3368.4br; 3100.2m; 3060.1m; 2101.6s; 1662.9s; 1463.2m; 1385.7m; 1264.7m; 1100.2m; 1034.2m; 811.5w; 764.4w. [α]_D²⁰ = + 27.4 (C = 0.02 M, MeOH). LC-MS purity 98.9 %, t_R = 3.51 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid)

5'-[17'-H-(6',10',11'-triazol-13'-yl)propanoic acid]-5'-deoxy-uridine (5)



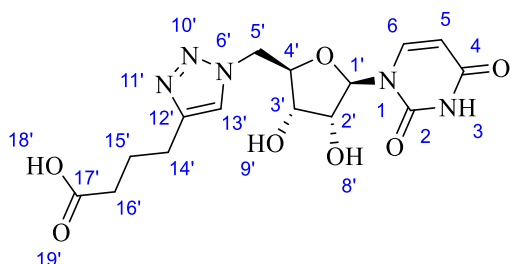
5

Chemical Formula: C₁₄H₁₇N₅O₇

Molecular Weight: 367,32

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and 4-pentynoic acid **4** (24 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 2h30 at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (50 mg, 56 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.30. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.37 (1H, s, *N*-H₃); 7.81 (1H, s, H_{13'}); 7.49 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 7.95 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.03 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 7.95 Hz, H₅); 4.56-4.68 (2H, m, H_{5'}); 4.12 (1H, m, H_{4'}); 4.01 (1H, m, H_{2'}); 3.94 (1H, m, H_{3'}); 2.82 (2H, t, *J*_{H15'-H14'} = 7.79 Hz, H_{15'}), 2.52 (2H, t, *J*_{H14'-H15'} = 7.72 Hz, H_{14'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 174.5 (C_{16'}); 163.5 (C₄); 151.1 (C₂); 146.6 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 123.2 (C_{13'}); 102.5 (C₅), 89.1 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.6 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 51.5 (C_{5'}); 34.3 (C_{14'}); 21.4 (C_{15'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₁₈N₅O₇]⁺ m/z 368.1200 and found m/z 368.1201. IR (neat, cm⁻¹): 3201.0br; 2928.7m; 1682.4s; 1462.7w; 1384.5m; 1261.4m; 1100.6m; 1056.1m; 813.1w. [α]_D²⁰ = +32.7 (C = 0.017 M, MeOH). LC-MS purity 97.2 %, t_R = 3.23 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[18'-H-(6',10',11'-triazol-13'-yl)butanoic acid]-5'-deoxy-uridine (6)



6

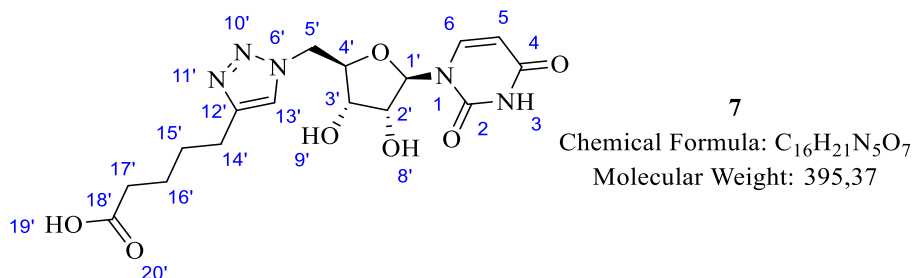
Chemical Formula: C₁₅H₁₉N₅O₇

Molecular Weight: 381,35

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and 5-hexynoic acid (27 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 2h30 at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (55 mg, 60 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.41. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.38 (1H, s, *N*-H₃); 7.85 (1H, s, H_{13'}); 7.50 (1H, d,

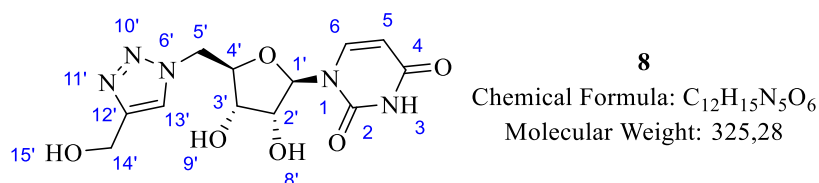
$J_{H6-H5} = 7.80$ Hz, H₆); 5.74 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 5.66$ Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, $J_{H5-H6} = 7.80$ Hz, H₅); 4.63 (2H, qd, $J_{H5'-H3'} = 4.53$ Hz, $J_{H5'-H4'} = 14.46$ Hz, H_{5'}); 4.13 (1H, m, H_{4'}); 4.03 (1H, t, $J_{H2'-H3'} = 5.37$ Hz, H_{2'}); 3.96 (1H, t, $J_{H3'-H2'} = 4.78$ Hz, H_{3'}); 2.62 (2H, t, $J_{H14'-H15'} = 7.53$ Hz, H_{14'}), 2.25 (2H, t, $J_{H16'-H15'} = 7.37$ Hz, H_{16'}), 1.80 (2H, q, $J_{H15'-H14'/H16'} = 7.58$ Hz, H_{15'}). ¹³C NMR (100 MHz DMSO-d₆) δ (ppm): 174.8 (C_{17'}); 163.4 (C₄); 151.1 (C₂); 146.9 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 123.2 (C_{13'}); 102.5 (C₅), 89.1 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.5 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 51.5 (C_{5'}); 33.7 (C_{14'}); 24.9 (C_{16'}); 24.8 (C_{15'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₂₀N₅O₇]⁺ m/z 382.1357 and found m/z 382.1356. IR (neat, cm⁻¹): 3139.1br; 2925.2m; 1682.3s; 1462.2w; 1385.6m; 1261.9m; 1223.7m; 1100.5m; 1055.7m; 812.8w. [α]_D²⁰ = +86.0 (C = 0.025 M, MeOH). LC-MS purity 95.5 %, t_R = 3.87 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[19'-H-(6',10',11'-triazol-13'-yl)pentanoic acid]-5'-deoxy-uridine (7)



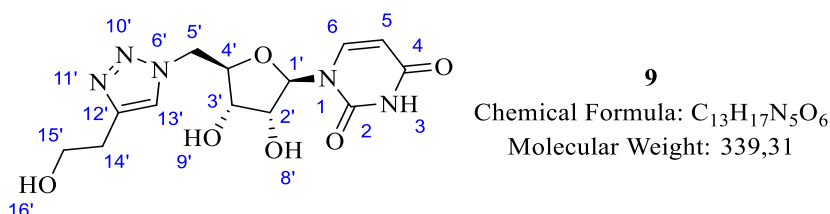
According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and 6-heptynoic acid (34 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (60 mg, 63 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.49. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.35 (1H, s, N-H₃); 7.81 (1H, s, H_{13'}); 7.50 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.02$ Hz, H₆); 5.73 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 5.29$ Hz, H_{1'}); 5.62 (1H, d, $J_{H5-H6} = 8.00$ Hz, H₅); 4.62 (2H, m, H_{5'}); 4.12 (1H, m, H_{4'}); 4.04 (1H, t, $J_{H2'-H1'} = 5.28$ Hz, H_{2'}); 3.95 (1H, t, $J_{H3'-H4'} = 4.80$ Hz, H_{3'}); 2.60 (2H, t, $J_{H14'-H15'} = 6.80$ Hz, H_{14'}); 2.22 (2H, t, $J_{H17'-H16'} = 7.26$ Hz, H_{17'}); 1.48-1.63 (4H, m, H_{15'/H16'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 174.9 (C_{18'}); 163.4 (C₄); 151.1 (C₂); 147.2 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 123.1 (C_{13'}); 102.5 (C₅); 89.2 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.5 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 51.5 (C_{5'}); 33.9 (C_{17'}); 28.9 (C_{14'}); 25.1 (C_{15'}); 24.6 (C_{16'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₂₂N₅O₇]⁺ m/z 396.1513 and found m/z 396.1512. IR (neat, cm⁻¹): 3142.7br; 2929.3m; 1682.5s; 1461.3w; 1384.1m; 1261.9m; 1222.6m; 1100.1m; 1052.0m; 811.7w. [α]_D²⁰ = +44.5 (C = 0.015 M, MeOH). LC-MS purity 95.2 %, t_R = 4.51 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[15'-hydroxymethyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (8)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and propargyl alcohol (14 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 40 min at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 0.1:6.9:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (54 mg, 68 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.64. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, *N*-H₃); 7.92 (1H, s, H₁₃); 7.50 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.05 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.43 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 7.97 Hz, H₅); 5.50 (1H, m, *O*-H₈); 5.39 (1H, m, *O*-H₉); 5.18 (1H, m, *O*-H₁₅); 4.66 (2H, m, H_{5'}); 4.50 (2H, m, H_{14'}); 4.14 (1H, m, H_{4'}); 4.03 (1H, m, H_{2'}); 3.97 (1H, m, H_{3'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.4 (C₄); 151.3 (C₂); 148.5 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 124.0 (C_{13'}); 102.6 (C₅); 89.0 (C_{1'}); 82.3 (C_{4'}); 72.5 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 55.4 (C_{14'}); 51.6 (C_{5'}). ESI- HRMS calculated for [C₁₂H₁₆N₅O₆]⁺ *m/z* 326.1095 and found *m/z* 326.1096. IR (neat, cm⁻¹): 3436.5*br*; 3044.1*w*; 2922.1*w*; 1689.7*s*; 1459.5*w*; 1419.4*m*; 1390.6*m*; 1282.4*m*; 1081.1*m*; 1015.3*m*; 993.0*m*; 792.2*w*. [α]_D²⁰ = + 47.6 (C = 0.015 M, MeOH). LC-MS purity 90.2 %, *t*_R = 8.36 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

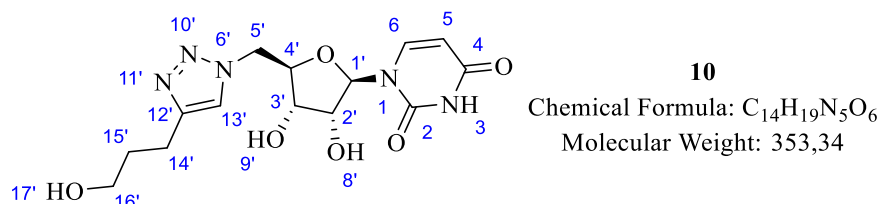
5'-[16'-hydroxyethyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (9)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and 3-butyn-1-ol (17 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 35 min at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/MeOH 9/8/2) to give the desired product as white solid (47 mg, 57 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.61. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, *N*-H₃); 7.82 (1H, s, H₁₃); 7.47 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.08 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.23 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.02 Hz, H₅); 4.63 (2H, m, H_{5'}); 4.13 (1H, m, H_{4'}); 4.00 (1H, m, H_{2'}); 3.96 (1H, m, H_{3'}); 3.62 (2H, t, *J*_{H15'-H14'} = 6.82 Hz, H_{15'}); 2.76 (2H, t, *J*_{H14'-H15'} = 6.85 Hz, H_{14'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.4 (C₄); 151.1 (C₂);

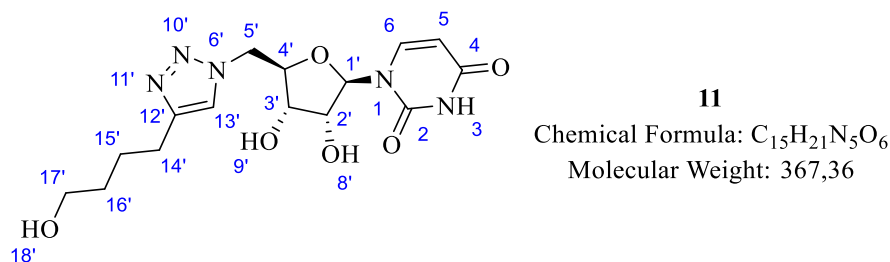
145.0 ($C_{12'}$); 141.5 (C_6); 123.7 ($C_{13'}$); 102.6 (C_5); 89.0 ($C_{1'}$); 82.2 (C_4'); 72.5 (C_2'); 70.9 (C_3'); 60.8 ($C_{15'}$); 51.5 (C_5); 29.6 ($C_{14'}$). ESI-HRMS calculated for $[C_{13}H_{18}N_5O_6]^+$ m/z 340.1251 and found m/z 340.1254. IR (neat, cm^{-1}): 3424.1 br ; 2921.2 w ; 1691.5 s ; 1461.8 w ; 1422.2 m ; 1382.2 m ; 1279.1 m ; 1233.6 m ; 1044.1 m ; 1018.1 m ; 995.7 m ; 809.7 w . $[\alpha]_D^{20} = +29.2$ ($C = 0.03$ M, MeOH). LC-MS purity 94.2 %, $t_R = 2.58$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[17'-hydroxypropyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (**10**)



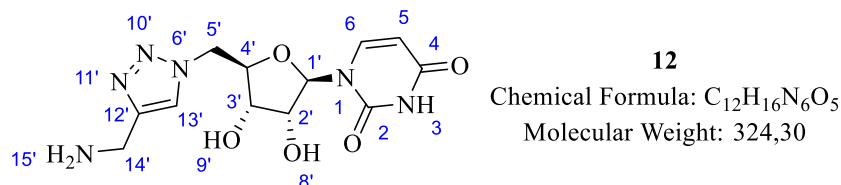
According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (30 mg, 0.16 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (70 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) and 4-pentyn-1-ol (22 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) with t BuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 45 min at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ i PrOH/AcOEt 0.1:6.9:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (57 mg, 62 %). R_f (H₂O/ i PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.63. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N -H₃); 7.81 (1H, s, H_{13'}); 7.48 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.03$ Hz, H₆); 5.74 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 5.55$ Hz, H_{1'}); 5.62 (1H, d, $J_{H5-H6} = 8.01$ Hz, H₅); 5.49 (1H, m, O -H_{8'}); 5.36 (1H, m, O -H_{9'}); 4.62 (2H, m, H_{5'}); 4.47 (1H, m, O -H_{17'}); 4.13 (1H, m, H_{4'}); 4.03 (1H, m, H_{2'}); 3.96 (1H, m, H_{3'}); 3.42 (2H, m, H_{16'}); 2.63 (2H, t, $J_{H14'-H15'} = 7.57$ Hz, H_{14'}); 1.72 (2H, q, $J_{H15'-H16'} = 6.77$ Hz, H_{15'}). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 163.5 (C_4); 151.1 (C_2); 147.3 ($C_{12'}$); 141.5 (C_6); 123.1 ($C_{13'}$); 102.5 (C_5); 89.1 ($C_{1'}$); 82.2 (C_4'); 72.5 (C_2'); 71.0 (C_3'); 60.5 ($C_{16'}$); 51.5 (C_5'); 32.7 ($C_{15'}$); 22.1 ($C_{14'}$). ESI-HRMS calculated for $[C_{14}H_{20}N_5O_6]^+$ m/z 354.1408 and found m/z 354.1408. IR (neat, cm^{-1}): 3367.9 br ; 2945.1 m ; 1673.9 s ; 1462.5 m ; 1422.9 m ; 1384.7 m ; 1263.2 m ; 1224.0 m ; 1100.2 m ; 1051.8 m ; 811.9 w . $[\alpha]_D^{20} = +58.0$ ($C = 0.026$ M, MeOH). LC-MS purity 93.4 %, $t_R = 3.24$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[18'-hydroxybutyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (**11**)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (30 mg, 0.16 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (70 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) and 5-hexyn-1-ol (26 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (4 mL). The reaction mixture was stirred for 45 min at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 0.1:6.9:3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 96/4) to give the desired product as white solid (69 mg, 72 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.66. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, *N*-H₃); 7.80 (1H, s, H_{13'}); 7.49 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.08 Hz); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.50 Hz, H_{1'}); 5.62 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.10 Hz, H₅); 5.48 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.65 Hz, *O*-H_{8'}); 5.35 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.42 Hz, *O*-H_{9'}); 4.62 (2H, m, H_{5'}); 4.36 (1H, t, *J*_{H18'-H17'} = 4.88 Hz, H_{18'}); 4.12 (1H, m, H_{4'}); 4.03 (1H, m, H_{2'}); 3.95 (1H, m, H_{3'}); 3.40 (2H, m, H_{17'}); 2.60 (2H, t, *J*_{H14'-H15'} = 7.52 Hz, H_{14'}); 1.60 (2H, m, H_{15'}); 1.45 (2H, m, H_{16'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.4 (C₄); 151.1 (C₂); 147.5 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 123.1 (C_{13'}); 102.5 (C₅); 89.1 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.5 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 60.9 (C_{17'}); 51.5 (C_{5'}); 32.5 (C_{16'}); 26.0 (C_{15'}); 25.3 (C_{14'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₂₂N₅O₆]⁺ *m/z* 368.1564 and found *m/z* 368.1562. IR (neat, cm⁻¹): 3241.6*br*; 2940.4*m*; 1673.6*s*; 1461.3*m*; 1423.2*m*; 1384.3*m*; 1262.2*m*; 1100.2*m*; 1049.2*m*; 811.5*w*. [α]_D²⁰ = + 113.8 (C = 0.04 M, MeOH). LC-MS purity 97.8 %, t_R = 3.92 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

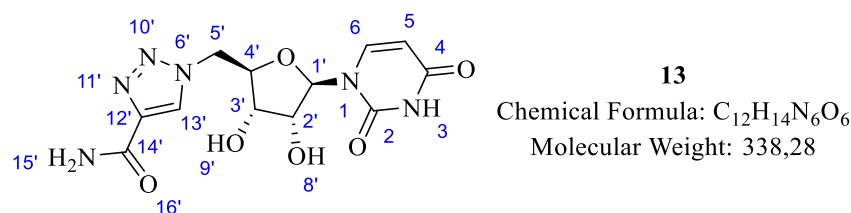
5'-[15'-aminomethyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (**12**)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88.3 mg, 0.45 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and propargylamine (61 mg, 1.10 mmol, 1.5 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (CHCl₃:MeOH:AcOH 1:1:1) followed by a second flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH:AcOEt:AcOH 1:6:2:1) to give the desired product as white solid (110 mg, 46 %). R_f (CHCl₃:MeOH:AcOH 1:1:1) = 0.28. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.88 (1H, s, H_{13'}); 7.52 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 7.87 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 4.90 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 7.91 Hz, H₅); 4.64 (2H, m, H_{5'}); 4.12 (1H, m, H_{4'}); 4.01 (1H, m, H_{2'}); 3.94 (1H, m, H_{3'}); 3.77 (2H, m, H_{14'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.5 (C₄); 151.1 (C₂); 149.1 (C_{12'}); 141.6 (C₆); 123.3 (C_{13'}); 102.5 (C₅); 89.3 (C_{1'}); 82.3 (C_{4'}); 72.7 (C_{2'}); 71.1 (C_{3'}); 51.7 (C_{5'}); 37.2 (C_{14'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₇N₆O₅]⁺ *m/z* 325.1254 and found *m/z* 325.1254. IR (neat, cm⁻¹): 3150.4*br*; 1673.9*s*; 1462.5*m*; 1385.5*m*; 1263.1*m*; 1099.7*m*; 1050.8*m*; 812.3*w*.

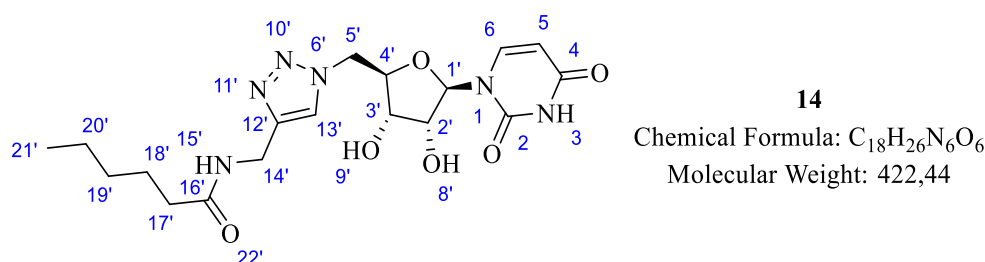
$[\alpha]_D^{20} = +96.0$ (C = 0.04 M, MeOH). LC-MS purity 92.1 %, $t_R = 0.72$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

5'-[15'-amidomethyl-(6',10',11'-triazol-13'-yl)]-5'-deoxy-uridine (13)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88.3 mg, 0.45 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and propiolamide (51 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 19 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/MeOH 9/1) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (0.17 g, 68 %). R_f (AcOEt:MeOH 9:1) = 0.21. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.37 (1H, s, *N*-H₃); 8.47 (1H, s, H₁₃); 7.85 (1H, s, *N*-H₁₆); 7.56 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.19$ Hz, H₆); 7.46 (1H, s, *N*-H₁₆); 5.74 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 5.55$ Hz, H₁); 5.63 (1H, d, $J_{H5-H6} = 8.14$ Hz, H₅); 5.52 (1H, d, $J_{H8'-H2'} = 5.62$ Hz, *O*-H₈); 5.40 (1H, d, $J_{H9'-H3'} = 5.34$ Hz, *O*-H₉); 4.74 (2H, m, H₅); 4.18 (1H, m, H₄); 4.11 (1H, m, H₂); 3.98 (1H, m, H₃); 3.77 (2H, m, H₁₄). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.0 (C₁₄); 161.5 (C₄); 151.6 (C₂); 142.9 (C₁₂); 141.2 (C₆); 127.2 (C₁₃); 102.1 (C₅); 88.9 (C₁); 81.6 (C₄); 72.1 (C₂); 70.6 (C₃); 51.5 (C₅). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₅N₆O₆]⁺ m/z 339.1047 and found m/z 339.1048. IR (neat, cm⁻¹): 3192.8br; 1690.5s; 1652.1s; 1466.2w; 1393.9w; 1266.7w; 1100.0w; 1045.7w; 819.8w; 779.5w. $[\alpha]_D^{20} = +37.9$ (C = 0.04 M, MeOH). LC-MS purity 95.2 %, $t_R = 1.94$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

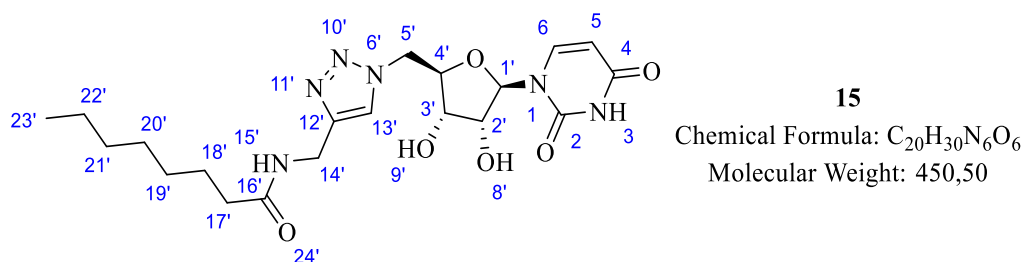
5'-[*N*-15'-*H*-((6',10',11'-triazol-13'-yl)methyl)hexanamide]-5'-deoxy-uridine (14)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and *N*-(prop-2-yn-1-yl)hexanamide **25** (37 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (3 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 0.1:6.9:3) to give the desired product as white solid (99

mg, 99 %). Rf (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.78. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.38 (1H, m, *N*-H₃); 8.27 (1H, t, *J*_{H15'-H14'} = 5.68 Hz, H_{15'}); 7.85 (1H, s, H_{13'}); 7.51 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 5.75 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.24 Hz, H_{1'}); 5.65 (1H, dd, *J*_{H5'-H3} = 2.19 Hz, *J*_{H5'-H6} = 8.06 Hz, H_{5'}); 5.51 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.70 Hz, *O*-H_{9'}); 5.39 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.22 Hz, *O*-H_{8'}); 4.66 (2H, qd, *J*_{H5'-H3'} = 4.38 Hz, *J*_{H5'-H4'} = 14.49 Hz, H_{5'}); 4.27 (2H, d, *J*_{H14'-H15'} = 5.70 Hz, H_{14'}); 4.13 (1H, m, H_{4'}); 4.05 (1H, m, H_{2'}); 3.96 (1H, m, H_{3'}); 2.07 (2H, t, *J*_{H17'-H18'} = 7.41 Hz, H_{17'}); 1.49 (2H, q, *J*_{H18'-H17'} = 7.55 Hz, H_{18'}), 1.16-1.30 (4H, m, H_{19'}/H_{20'}); 0.84 (3H, t, *J*_{H21'-H20'} = 6.78 Hz, H_{21'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 172.6 (C_{16'}); 163.4 (C₄); 151.1 (C₂); 145.6 (C_{12'}); 141.5 (C₆); 124.0 (C_{13'}); 102.6 (C₅); 89.0 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.5 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 51.6 (C_{5'}); 35.6 (C_{17'}); 34.5 (C_{14'}); 31.3 (C_{20'}); 26.0 (C_{18'}); 22.3 (C_{19'}); 14.3 (C_{21'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₈H₂₇N₆O₆]⁺ m/z 423.1986 and found m/z 423.1985. IR (neat, cm⁻¹): 3295.5br; 2930.2m; 2871.3m; 1682.4s; 1538.6m; 1462.0m; 1424.0m; 1381.3m; 1258.8m; 1101.1m; 1051.7m; 813.0w. [α]_D²⁰ = + 42.1 (C = 0.02 M, MeOH). LC-MS purity 95.0 %, t_R = 5.71 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

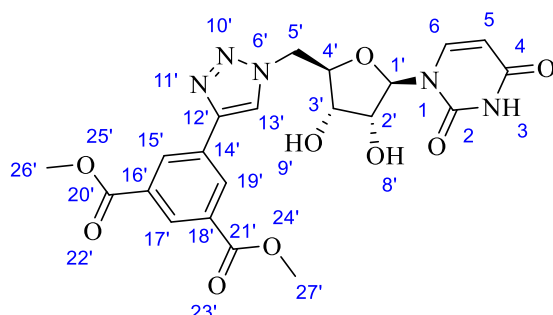
5'-[*N*-15'-*H*-((6',10',11'-triazol-13'-yl)methyl)octanamide]-5'-deoxy-uridine (**15**)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (6 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (28 mg, 0.14 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (65 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) and *N*-(prop-2-yn-1-yl)octanamide **26** (44 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (3 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/PrOH/AcOEt 0.1:6.9:3) to give the desired product as white solid (85 mg, 77 %). Rf (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.81. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.38 (1H, m, *N*-H₃); 8.27 (1H, t, *J*_{H15'-H14'} = 5.56 Hz, H_{15'}); 7.85 (1H, s, H_{13'}); 7.51 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.02 Hz, H₆); 5.75 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.24 Hz, H_{1'}); 5.65 (1H, dd, *J*_{H5'-H3} = 2.14 Hz, *J*_{H5'-H6} = 8.08 Hz, H_{5'}); 5.51 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.67 Hz, *O*-H_{8'}); 5.38 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.24 Hz, *O*-H_{9'}); 4.66 (2H, qd, *J*_{H5'-H4'} = 4.23 Hz, *J*_{H5'-H3'} = 14.17 Hz, H_{5'}); 4.27 (2H, d, *J*_{H14'-H15'} = 5.46 Hz, H_{14'}); 4.13 (1H, m, H_{4'}); 4.05 (1H, m, H_{2'}); 3.96 (1H, m, H_{3'}); 2.07 (2H, t, *J*_{H17'-H18'} = 7.34 Hz, H_{17'}); 1.48 (2H, m, H_{18'}), 1.23 (8H, m, H_{19'}/H_{20'}/H_{21'}/H_{22'}); 0.85 (3H, t, *J*_{H23'-H22'} = 6.31 Hz, H_{23'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 172.6 (C_{16'}); 163.4 (C₄); 151.1 (C₂); 145.6 (C_{12'}); 141.4 (C₆); 124.0 (C_{13'}); 102.6 (C₅); 89.1 (C_{1'}); 82.2 (C_{4'}); 72.6 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 51.6 (C_{5'}); 35.7 (C_{17'}); 34.5 (C_{14'}); 31.6 (C_{21'}); 29.1 (C_{19'}); 28.9 (C_{20'}); 25.7 (C_{18'}); 22.5 (C_{22'}); 14.4 (C_{23'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₀H₃₁N₆O₆]⁺ m/z 451.2299 and found m/z 451.2299. IR (neat, cm⁻¹): 3293.4br; 2927.2m; 2855.8m; 1682.3s; 1538.7m; 1462.1m; 1381.7m;

1263.1m; 1101.0m; 1052.4m; 812.0w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +61.4$ (C = 0.02 M, MeOH). LC-MS purity 98.3 %, $t_{\text{R}} = 7.63$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

dimethyl 5-(1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)isophthalate (16)



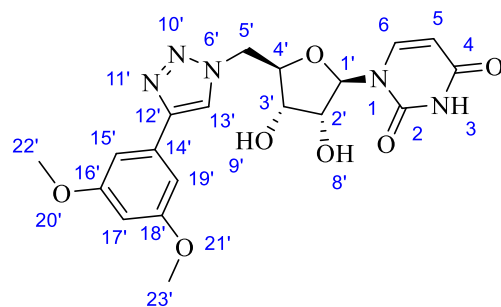
16

Chemical Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_9$

Molecular Weight: 487.43

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (29 mg, 0.11 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (136 mg, 0.69 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (310 mg, 1.14 mmol, 1.0 eq) and dimethyl-5-ethynylisophthalate (250 mg, 1.14 mmol, 1.0 eq) with $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5h30 at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 93/7 to 90/10) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 99/1) to give the desired product as white solid (0.40 g, 71 %). R_{f} (DCM/MeOH 9:1) = 0.45. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 11.36 (1H, s, $N\text{-H}_3$); 8.91 (1H, s, $\text{H}_{13'}$); 8.63 (2H, s, $\text{H}_{15'}/\text{H}_{19'}$); 8.39 (1H, m, $\text{H}_{17'}$); 7.56 (1H, d, $J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8.12$ Hz, H_6); 5.77 (1H, d, $J_{\text{H}_{1'}-\text{H}_{2'}} = 5.06$ Hz, $\text{H}_{1'}$); 5.59 (1H, d, $J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8.07$ Hz, H_5); 5.52 (1H, d, $J_{\text{H}_{8'}-\text{H}_{2'}} = 5.58$ Hz, $\text{O-H}_{8'}$); 5.41 (1H, d, $J_{\text{H}_{9'}-\text{H}_{3'}} = 5.46$ Hz, $\text{O-H}_{9'}$); 4.76 (2H, m, H_5); 4.25 (1H, m, H_4); 4.11 (1H, m, H_2); 4.03 (1H, m, H_3); 3.92 (6H, s, $\text{H}_{26'}/\text{H}_{27'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 165.2 ($\text{C}_{20'}/\text{C}_{21'}$); 163.0 (C_4); 150.6 (C_2); 144.6 ($\text{C}_{12'}$); 141.2 (C_6); 132.0 ($\text{C}_{14'}$); 131.0 ($\text{C}_{16'}/\text{C}_{18'}$); 129.7 ($\text{C}_{15'}/\text{C}_{19'}$); 128.6 ($\text{C}_{17'}$); 123.4 ($\text{C}_{13'}$); 102.1 (C_5); 89.0 ($\text{C}_{1'}$); 82.5 (C_4); 72.1 (C_2); 70.5 (C_3); 52.6 ($\text{C}_{26'}/\text{C}_{27'}$); 51.6 (C_5). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_9]^+$ m/z 488.1412 and found m/z 488.1411. IR (neat, cm^{-1}): 3136.9br; 2955.2m; 1704.9s; 1467.1m; 1432.7m; 1302.5m; 1242.4s; 1204.8m; 1093.5m; 1057.2m; 996.4w; 819.5w; 753.7w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.5$ (C = 0.03 M, MeOH). LC-MS purity 98.4 %, $t_{\text{R}} = 7.21$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

1-((2R,3R,4S,5R)-5-((4-(3,5-dimethoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (17)



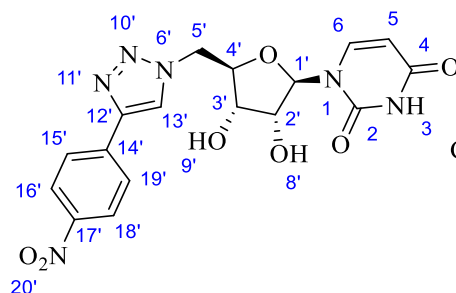
17

Chemical Formula: C₁₉H₂₁N₅O₇

Molecular Weight: 431.41

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88 mg, 0.46 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and 3,5-dimethoxyphenyl-1-ethynyl (120 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 17 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.25 g, 78 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, d, *J*_{H3-H5} = 1.97 Hz, *N*-H₃); 8.60 (1H, s, H₁₃); 7.53 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.13 Hz, H₆); 7.02 (2H, d, *J*_{H15'/H19'-H17'} = 2.29 Hz, H_{15'}/H_{19'}); 6.47 (1H, t, *J*_{H17'-H15'/H19'} = 2.24 Hz, H_{17'}); 5.76 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.32 Hz, H_{1'}); 5.58 (2H, dd, *J*_{H5-H3} = 2.15 Hz, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.51 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.56 Hz, *O*-H_{8'}); 5.40 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.45 Hz, *O*-H_{9'}); 4.73 (2H, qd, *J*_{H5'-H4'} = 4.40 Hz, *J*_{H5'-H5''} = 14.41 Hz, H_{5'}); 4.21 (1H, m, H_{4'}); 4.09 (1H, m, H_{2'}); 4.02 (1H, m, H_{3'}); 3.79 (6H, s, H_{22'}/H_{23'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 163.0 (C₄); 160.9 (C_{16'}/C_{18'}); 150.6 (C₂); 146.3 (C_{12'}); 141.2 (C₆); 132.5 (C_{14'}); 122.5 (C_{13'}); 103.1 (C_{15'}/C_{19'}); 102.0 (C₅); 100.0 (C_{17'}); 88.9 (C_{1'}); 81.6 (C_{4'}); 72.1 (C_{2'}); 70.5 (C_{3'}); 55.3 (C_{22'}/C_{23'}); 51.4 (C_{5'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₉H₂₂N₅O₇]⁺ *m/z* 432.1513 and found *m/z* 432.1512. IR (neat, cm⁻¹): 3233.9*br*; 2943.7*w*; 2840.0*w*; 1682.2*s*; 1596.2*s*; 1556.9*w*; 1456.1*m*; 1423.2*m*; 1370.5*m*; 1265.4*m*; 1203.5*m*; 1153.1*m*; 1100.2*m*; 1043.8*m*; 925.4*w*; 809.6*w*; 685.8*w*. [α]_D²⁰ = +74.7 (C = 0.04 M, MeOH). LC-MS purity 99.5 %, *t*_R = 6.94 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-((4-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (18)



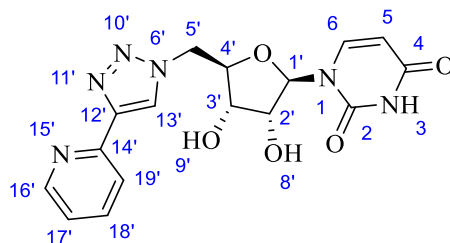
18

Chemical Formula: C₁₇H₁₆N₆O₇

Molecular Weight: 416.35

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88 mg, 0.46 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and 1-ethynyl-4-nitrophenyl (110 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 17 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 92/8 to 90/10) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 9/1) to give the desired product as white solid (0.15 g, 48 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.26. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.46 (1H, s, N-H₃); 9.11 (1H, s, H₁₃); 8.77 (2H, d, *J*_{H16'/H18'-H15'/H19'} = 8.45 Hz, H_{16'/H18'}); 8.63 (2H, d, *J*_{H15'/H19'-H16'/H18'} = 8.47 Hz, H_{15'/H19'}); 7.88 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.08 Hz, H₆); 6.27 (1H, m, H₁); 5.97 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.09 Hz, H₅); 5.35 (2H, m, H_{5'}); 5.23 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 4.28 Hz, O-H_{8'}); 5.08 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.73 Hz, O-H_{9'}); 4.71-4.85 (3H, m, H_{4'/H2'/H3'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.9 (C₄); 150.8 (C₂); 147.3 (C_{14'}); 145.6 (C_{12'}); 141.6 (C₆); 138.1 (C_{17'}); 126.6 (C_{15'/C19'}); 124.6 (C_{16'/C18'}); 124.2 (C_{13'}); 102.6 (C₅); 92.1 (C₁); 82.1 (C_{4'}); 73.4 (C_{2'}); 71.4 (C_{3'}); 51.9 (C_{5'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₇H₁₇N₆O₇]⁺ m/z 417.1153 and found m/z 417.1153. IR (neat, cm⁻¹): 3104.2br; 2938.7w; 1674.4s; 1606.1m; 1514.7m; 1461.2m; 1378.7m; 1335.0s; 1238.2m; 1107.0m; 1043.4m; 853.4w; 813.0w; 756.0w. [α]_D²⁰ = + 57.7 (C = 0.02 M, MeOH). LC-MS purity 99.5 %, t_R = 6.49 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-((4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (19)



19

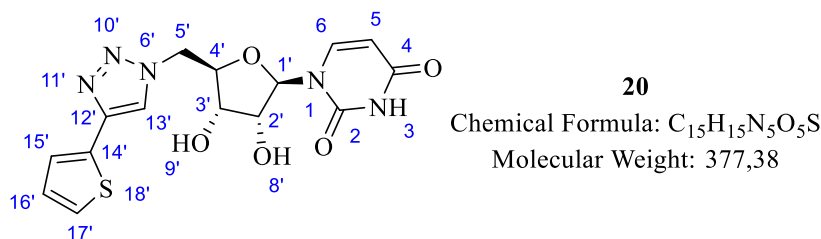
Chemical Formula: C₁₆H₁₆N₆O₅

Molecular Weight: 372,34

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88 mg, 0.46 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and 2-ethynylpyridine (0.11 mL, 1.11 mmol, 1.5 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 19 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 95/5 to 90/10) to give the desired product as white solid (0.14 g, 50 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.15. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.36 (1H, d, *J*_{H3-H5} = 1.95 Hz, N-H₃); 8.58 (1H, d, *J*_{H18'-H17'} = 4.71 Hz, H_{18'}); 8.56 (1H, s, H₁₃); 8.03 (1H, d, *J*_{H15'-H16'} = 7.77 Hz, H_{15'}); 7.89 (1H, td, *J*_{H16'-H15'} = 7.67 Hz, *J*_{H16'-H17'} = 1.75 Hz, H_{16'}); 7.60 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 7.34 (1H, dd, *J*_{H17'-H16'} = 1.15 Hz, *J*_{H17'-H8'} = 4.86 Hz, H_{17'}); 5.76 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.57 Hz, H_{1'}); 5.60 (1H, dd, *J*_{H5-H3} = 2.17 Hz, *J*_{H5-H6} = 8.03 Hz, H₅); 5.51 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.67 Hz, O-H_{8'}); 5.40 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.30 Hz, O-H_{9'}); 4.77 (2H, qd, *J*_{H5'-H5''} = 14.26 Hz, *J*_{H5'-H4'} = 4.54 Hz, H_{5'});

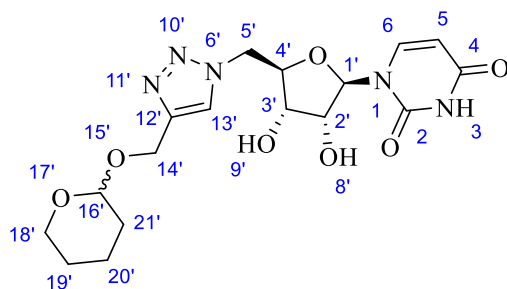
4.23 (1H, q, $J_{H_4'-H_5'} = 4.39$ Hz, H_4'); 4.11 (1H, q, $J_{H_2'-H_1'} = 5.52$ Hz, H_2'); 4.02 (1H, q, $J_{H_3'-H_2'} = 5.06$ Hz, H_3'). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 162.9 (C_4); 150.6 (C_2); 149.8 ($C_{14'}$); 149.6 ($C_{18'}$); 147.3 ($C_{12'}$); 141.1 (C_6); 137.2 ($C_{16'}$); 124.0 ($C_{13'}$); 123.0 ($C_{17'}$); 119.4 ($C_{15'}$); 102.0 (C_5); 88.7 ($C_{1'}$); 81.7 (C_4'); 72.0 (C_2'); 70.6 (C_3'); 51.4 (C_5'). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_5]^+$ m/z 373.1254 and found m/z 373.1254. IR (neat, cm^{-1}): 3527.6w; 3433.8m; 3139.4w; 3067.3w; 2929.8w; 1764.0w; 1710.2s; 1686.9s; 1613.8s; 1555.9w; 1488.4w; 1464.3m; 1423.5w; 1379.6w; 1350.0w; 1325.4w; 1279.6w; 1250.8m; 1211.3w; 1191.3w; 1104.3w; 1062.1m; 1045.7w; 1027.9w; 943.4w; 898.5w; 859.7w; 814.5w; 788.3w; 717.7w; 628.5w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +46.4$ ($C = 0.04$ M, MeOH). LC-MS purity 95.8 %, $t_{\text{R}} = 4.33$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-((4-(thiophen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (20)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (18.5 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (88 mg, 0.46 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (200 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq) and 2-ethynylthiophene (0.18 mL, 1.86 mmol, 2.5 eq) with $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (10 mL). The reaction mixture was stirred for 19 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.20 g, 71 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.26. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.36 (1H, d, $J_{H_3-H_5} = 1.92$ Hz, $N\text{-H}_3$); 8.46 (1H, s, $H_{13'}$); 7.54 (1H, d, $J_{H_6-H_5} = 8.26$ Hz, H_6); 7.53 (1H, dd, $J_{H_{17'}-H_{15'}} = 1.17$ Hz, $J_{H_{17'}-H_{16'}} = 5.15$ Hz, $H_{17'}$); 7.43 (1H, dd, $J_{H_{15'}-H_{16'}} = 3.55$ Hz, $J_{H_{15'}-H_{17'}} = 1.18$ Hz, $H_{15'}$); 7.12 (1H, dd, $J_{H_{16'}-H_{15'}} = 3.56$ Hz, $J_{H_{16'}-H_{17'}} = 5.05$ Hz, $H_{16'}$); 5.76 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}} = 5.33$ Hz, $H_{1'}$); 5.59 (1H, dd, $J_{H_5-H_3} = 2.20$ Hz, $J_{H_5-H_6} = 8.07$ Hz, H_5); 5.51 (1H, d, $J_{H_{8'}-H_{2'}} = 5.65$ Hz, $O\text{-H}_{8'}$); 5.39 (1H, d, $J_{H_{9'}-H_{3'}} = 5.46$ Hz, $O\text{-H}_{9'}$); 4.72 (2H, qd, $J_{H_5'-H_5''} = 14.42$ Hz, $J_{H_5'-H_4'} = 4.44$ Hz, H_5'); 4.20 (1H, q, $J_{H_4'-H_5'} = 4.42$ Hz, H_4'); 4.10 (1H, q, $J_{H_2'-H_3'} = 5.45$ Hz, H_2'); 4.00 (1H, q, $J_{H_3'-H_2'} = 5.10$ Hz, H_3'). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 162.9 (C_4); 150.6 (C_2); 141.8 ($C_{12'}$); 141.1 (C_6); 132.8 ($C_{14'}$); 127.9 ($C_{16'}$); 125.4 ($C_{17'}$); 124.2 ($C_{15'}$); 121.4 ($C_{13'}$); 102.0 (C_5); 88.9 ($C_{1'}$); 81.6 (C_4'); 72.1 (C_2'); 70.5 (C_3'); 51.4 (C_5'). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}]^+$ m/z 378.0866 and found m/z 378.0866. IR (neat, cm^{-1}): 3280.9br; 3108.2m; 2951.7w; 2900.9w; 1675.3s; 1634.1m; 1461.2m; 1418.2w; 1391.3w; 1356.5w; 1275.5m; 1226.6w; 1210.1w; 1138.1w; 1102.6m; 1064.0m; 1040.9w; 996.7w; 935.7w; 823.2w; 685.7w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24.3$ ($C = 0.04$ M, MeOH). LC-MS purity 99.5 %, $t_{\text{R}} = 5.84$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(((4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (21)

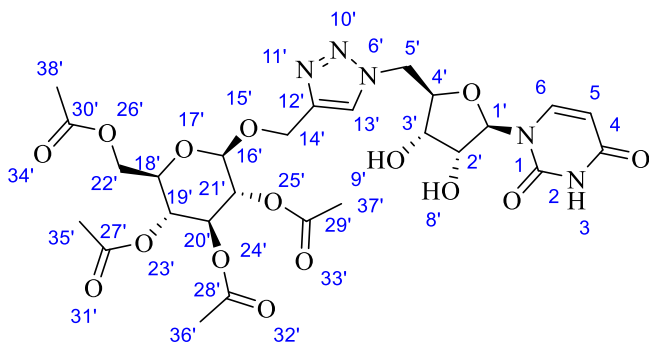


21

Chemical Formula: $C_{17}H_{23}N_5O_7$
Molecular Weight: 409,40

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (12.4 mg, 0.05 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (60 mg, 0.30 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine **3** (135 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) and 2-propynyloxytetrahydrofuran (0.21 mL, 1.50 mmol, 3.0 eq) with t BuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 19 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) followed by a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (91 mg, 43 %). *R_f* (DCM/MeOH 9:1) = 0.24. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, d, $J_{H_3-H_5}$ = 1.98 Hz, *N*-H₃); 8.05 (1H, s, H₁₃); 7.50 (1H, dd, $J_{H_6-H_{1'}}$ = 1.41 Hz, $J_{H_6-H_5}$ = 8.14 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}}$ = 5.47 Hz, H₁); 5.63 (1H, d, $J_{H_5-H_6}$ = 8.15 Hz, H₅); 5.49 (1H, d, $J_{H_{8'}-H_{2'}}$ = 5.59 Hz, *O*-H₈); 5.37 (1H, d, $J_{H_{9'}-H_{3'}}$ = 5.28 Hz, *O*-H₉); 4.48-4.74 (5H, m, H₅/H₁₆/H₁₄); 4.15 (1H, m, H₄); 4.07 (1H, m, H₂); 3.98 (1H, m, H₃); 3.43-3.81 (2H, m, H₁₈); 1.39-1.75 (6H, m, H₂₀/H₂₁/H₁₉). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 162.9 (C₄); 150.6 (C₂); 143.9 (C₁₂); 141.1 (C₆); 124.8 (C₁₃); 102.1 (C₅); 97.2 (C₁₆); 88.7 (C₁); 81.7 (C₄); 72.0 (C₂); 70.5 (C₃); 61.3 (C₁₈); 59.5 (C₁₄); 51.1 (C₅); 30.0 (C₂₁); 24.9 (C₁₉); 18.9 (C₂₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₇H₂₄N₅O₇]⁺ *m/z* 410.1670 and found *m/z* 410.1670. IR (neat, cm⁻¹): 3270.3*br*; 2945.4*w*; 2869.9*w*; 1677.6*s*; 1461.2*w*; 1417.4*w*; 1392.7*w*; 1357.4*w*; 1310.6*w*; 1276.3*w*; 1201.7*w*; 1183.7*w*; 1137.0*w*; 1118.5*w*; 1103.8*w*; 1032.6*m*; 980.9*w*; 902.9*w*; 869.5*w*; 813.5*w*. [α]_D²⁰ = + 45.1 (C = 0.03 M, MeOH). LC-MS purity 96.8 %, *t_R* = 5.58 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoxymethyl)-6-(((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (23)



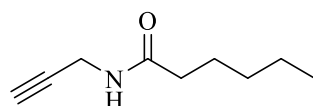
23

Chemical Formula: $C_{26}H_{33}N_5O_{15}$
Molecular Weight: 655,57

(H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1/6/3) = 0.28. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N-H₃); 8.08 (1H, s, H₁₃); 7.68 (1H, d, *J*_{H25'-H21'} = 8.17 Hz, N-H₂₅); 7.58 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.38 Hz, H₁); 5.65 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.51 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.64 Hz, O-H₈); 5.40 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.38 Hz, O-H₉); 4.99 (1H, d, *J*_{H23'-H19'} = 5.34 Hz, O-H₂₃); 4.75 (1H, d, *J*_{H16'-H21'} = 3.57 Hz, H₁₆); 4.60-4.74 (4H, m, O-H₂₄/H₅/H₁₄); 4.46-4.54 (2H, m, O-H₂₆/H₁₄); 4.06-4.17 (2H, m, H₄/H₂); 3.97 (1H, m, H₃); 3.61-3.69 (2H, m, H₂₁/H₂₂); 3.41-3.53 (3H, m, H₂₂/H₂₀/H₁₈); 3.14 (1H, m, H₁₉); 1.78 (3H, s, H₂₉). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.4 (C₂₇); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 143.7 (C₁₂); 141.2 (C₆); 124.6 (C₁₃); 102.1 (C₅); 96.2 (C₁₆); 88.9 (C₁); 81.7 (C₄); 73.0 (C₁₈); 72.0 (C₂); 70.8 (C₁₉); 70.5 (C₂₀/C₃); 60.8 (C₂₂); 59.8 (C₁₄); 53.7 (C₂₁); 51.3 (C₅); 22.5 (C₂₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₀H₂₉N₆O₁₁]⁺ m/z 529.1888 and found m/z 529.1883. IR (neat, cm⁻¹): 3307.1br; 3099.6m; 2929.3m; 2833.5w; 1674.1s; 1548.6w; 1462.6w; 1423.5w; 1380.9w; 1320.9w; 1263.0w; 1101.1m; 1019.8s; 951.2w; 897.4w; 814.1w; 765.3w; 708.8w. [α]_D²⁰ = + 152.0 (C = 0.03 M, H₂O).

N-(prop-2-yn-1-yl)hexanamide (25)

CAS: 363624-46-8



25

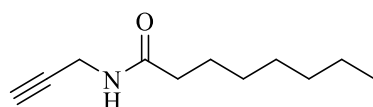
Chemical Formula: C₉H₁₅NO

Molecular Weight: 153.23

Commercially available propargylamine (0.51 ml, 8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in anhydrous DCM (20 ml), DIPEA (1.80 mL, 10.4 mmol, 1.3 eq) was added and the solution was cooled to 0 °C. Then, hexanoyl chloride (1.22 mL, 8.8 mmol, 1.1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was quenched through dropwise addition of H₂O (1 ml), then diluted with DCM (20 ml) and washed with saturated NaHCO₃ solution (40 mL) and brine (40 ml), dried over MgSO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The obtained white solid was used as pure product (1.19 g, 99 %) without further purification. This product was also directly used for the next step without further characterization.

N-(prop-2-yn-1-yl)octanamide (26)

CAS: 422284-34-2



26

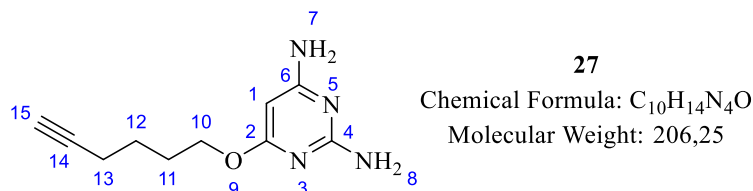
Chemical Formula: C₁₁H₁₉NO

Molecular Weight: 181.28

Commercially available propargylamine (0.51 ml, 8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in anhydrous DCM (20 ml), DIPEA (1.80 mL, 10.4 mmol, 1.3 eq) was added and the solution was cooled to 0 °C. Then, octanoyl chloride (1.50 mL, 8.8 mmol, 1.1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction was quenched through dropwise addition of H₂O (1 ml), then diluted with DCM (20 ml) and washed with saturated NaHCO₃ solution (40 mL) and brine (40 ml),

dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The obtained white solid was used as pure product (1.43 g, 99 %) without further purification. This product was also directly used for the next step without further characterization.

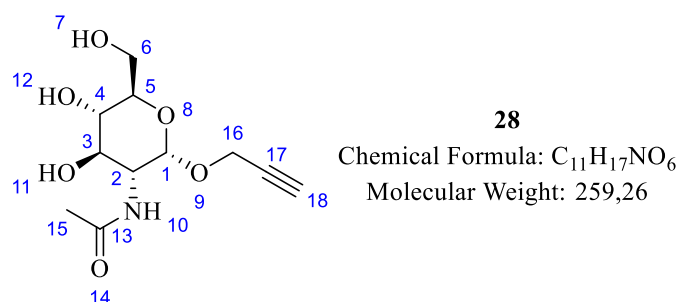
6-(hex-5-yn-1-yloxy)pyrimidine-2,4-diamine (27)



In a flame dried round-bottom flask, 2,6-diamino-3-chloropyrimidine (1.0 g, 6.9 mmol, 1.0 eq) and 5-hexyn-1-ol (2.29 mL, 20.7 mmol, 3.0 eq) were stirred with *ter*-butanol (40 mL) under argon atmosphere. Sodium *ter*-butoxide (1.33 g, 13.8 mmol, 2.0 eq) was added to the solution and this was stirred at the reflux temperature for 3 days. After fully conversion of starting materials, the reaction mixture was cooled down at room temperature and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a first flash chromatography (DCM/MeOH 96/4 to 90/10) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 3/7 to 0/100) to give a white solid (1.35 g, 94 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.67. ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 5.51 (4H, m, $N\text{-H}_7/N\text{-H}_8$); 5.16 (1H, s, H_1); 4.16 (2H, t, $J_{\text{H}_{10}\text{-H}_{11}} = 6.45$ Hz, H_{10}); 2.18 (2H, m, H_{12}); 2.01 (1H, m, H_{15}); 1.77 (2H, q, $J_{\text{H}_{11}\text{-H}_{10}} = 6.57$ Hz, H_{11}); 1.69 (2H, m, H_{13}). ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 171.8 (C_2); 167.3 (C_4); 164.3 (C_6); 78.9 (C_{14}); 77.8 (C_1); 76.3 (C_{15}); 64.5 (C_{10}); 29.5 (C_{11}); 15.9 (C_{12}); 13.2 (C_{13}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}]^+ m/z$ 207.1240 and found m/z 207.1238. IR (neat, cm^{-1}): 3483.1m; 3441.2s; 3326.6s; 3181.5s; 2953.9w; 1651.5m; 1620.2m; 1557.2s; 1487.0m; 1455.6m; 1413.8s; 1382.3s; 1355.8m; 1286.0w; 1213.5s; 1191.8m; 1135.9m; 1050.8m; 1025.2m; 1003.5w; 908.1w; 791.5m; 683.5w.

N-((2S,3R,4R,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (28)

CAS: 1000593-95-2

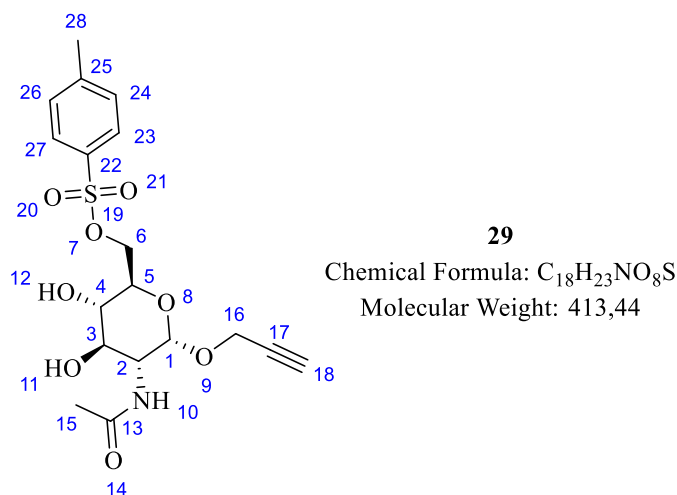


To a suspension of commercially *N*-acetyl-*D*-glucosamine (1.0 g, 4.52 mmol, 1.0 eq) in propargylic alcohol (10 mL), 4 Å molecular sieves (one spatula) was added under argon atmosphere. At 0°C, trimethylsilyl triflate (0.82 mL, 4.52 mmol, 1.0 eq) was added drop by drop and the mixture was stirred at 0°C for an additional 5 min (until the fully solubilization of starting material). Then, the solution was

stirred at 80°C for 3 h. Thus, the reaction was cooled at 0°C and quenched with addition of solid NaHCO₃ (3 g). The suspension was filtrated by celite pad and this was washed with methanol several times. The filtrate was concentrated to dryness *in vacuo* and the resulting residue was directly purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) to give a brown solid. Then, the purified residue was dispersed with acetone (10 mL) and this was stirred at 50°C for 1 h. After, the suspension was cooled at 0°C for 1 h and this was filtrated and washed with cold acetone (twice) to give a clean white solid (0.61 g, 52 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.17. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.75 (1H, d, *J*_{H10-H2} = 8.25 Hz, *N*-H₁₀); 5.01 (1H, d, *J*_{H12-H4} = 5.62 Hz, *O*-H₁₂); 4.81 (1H, d, *J*_{H1-H2} = 3.54 Hz, H₁); 4.73 (1H, d, *J*_{H11-H3} = 5.74 Hz, *O*-H₁₁); 4.51 (1H, t, *J*_{H7-H6} = 6.02 Hz, *O*-H₇); 4.18 (2H, qd, *J*_{H16-H18} = 2.44 Hz, *J*_{H16-H16'} = 15.95 Hz, H₁₆); 3.60-3.73 (2H, m, H₂/H₆); 3.43-3.50 (2H, m, H₆/H₃); 3.42 (1H, t, *J*_{H18-H16} = 2.39 Hz, H₁₈); 3.32-3.37 (1H, m, H₅); 3.11-3.18 (1H, m, H₄); 1.83 (3H, s, H₁₅). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.4 (C₁₃); 95.2 (C₁); 79.7 (C₁₇); 77.3 (C₁₈); 73.2 (C₅); 70.7 (C₄); 70.5 (C₃); 60.6 (C₆); 53.4 (C₂/C₁₆); 22.6 (C₁₅). ESI-HRMS calculated for [C₁₁H₁₈NO₆]⁺ *m/z* 260.1128 and found *m/z* 260.1126. IR (neat, cm⁻¹): 3585.7w; 3284.0s; 3079.5w; 2921.1w; 1632.5s; 1546.7s; 1412.9w; 1378.4w; 1320.1w; 1248.6w; 1113.0m; 1094.9m; 1029.0s; 1000.8s; 950.0w; 886.8w; 845.7w; 663.6w. [α]_D²⁰ = + 186.6 (C = 0.06 M, MeOH).

((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-5-acetamido-3,4-dihydroxy-6-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (29)

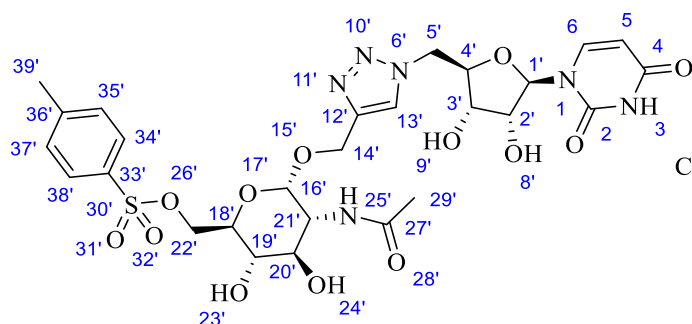
CAS: 1895096-35-1



To a solution of 2-propynyl-*N*-acetyl-α-*D*-glucosamine **28** (1.0 g, 3.86 mmol, 1.0 eq) in dry pyridine (15 mL) at 0°C under argon atmosphere, TsCl (0.81 g, 4.24 mmol, 1.1 eq) was added and the reaction was stirred at room temperature for 16 h. After total conversion of starting material, the reaction mixture was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (50 mL) and once with cyclohexane (50 mL). The resulting residue was directly purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) followed by a second chromatography (AcOEt 100%) to give a white solid (0.79 g, 50 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.78 (2H, d, *J*_{H23/H27-H24/H26} =

8.39 Hz, H_{23}/H_{27}); 7.77 (1H, m, $N-H_{10}$); 7.48 (2H, d, $J_{H_{24}/H_{26}-H_{23}/H_{27}} = 8.27$ Hz, H_{24}/H_{26}); 5.31 (1H, d, $J_{H_{12}-H_4} = 5.93$ Hz, $O-H_{12}$); 4.86 (1H, d, $J_{H_{11}-H_3} = 6.06$ Hz, $O-H_{11}$); 4.74 (1H, d, $J_{H_1-H_2} = 3.55$ Hz, H_1); 4.18 (2H, qd, $J_{H_6-H_5} = 1.92$ Hz, $J_{H_6-H_6'} = 10.75$ Hz, H_6); 4.11 (2H, qd, $J_{H_{16}-H_{18}} = 2.44$ Hz, $J_{H_{16}-H_{16'}} = 16.11$ Hz, H_{16}); 3.65 (1H, m, H_2); 3.55 (1H, m, H_5); 3.44 (1H, t, $J_{H_{18}-H_{16}} = 2.43$ Hz, H_{18}); 3.41 (1H, m, H_3); 3.11 (1H, m, H_4); 2.43 (3H, s, H_{28}); 1.82 (3H, s, H_{15}). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 169.4 (C_{13}); 144.9 (C_{25}); 132.4 (C_{22}); 130.1 (C_{24}/C_{26}); 127.6 (C_{23}/C_{27}); 95.4 (C_1); 79.4 (C_{17}); 77.5 (C_{18}); 70.1 (C_3/C_4); 70.0 (C_5); 69.9 (C_6); 53.9 (C_{16}); 53.2 (C_2); 22.5 (C_{15}); 21.1 (C_{28}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_8\text{S}]^+$ m/z 414.1217 and found m/z 414.1219. IR (neat, cm^{-1}): 3282.0br; 2921.7w; 1651.6m; 1597.1w; 1538.1m; 1441.4w; 1353.7m; 1293.0w; 1189.4w; 1173.7s; 1122.2w; 1095.9w; 1032.0m; 996.2w; 969.2w; 929.4w; 891.5w; 813.4w; 664.8w. $[\alpha]_D^{20} = +122.2$ ($C = 0.07$ M, MeOH).

((2R,3S,4R,5R,6S)-5-acetamido-6-((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (30)



30

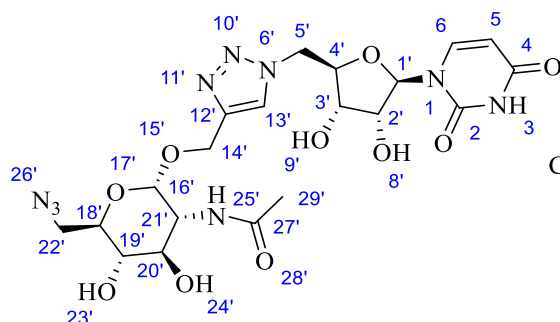
Chemical Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S}$

Molecular Weight: 682.66

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (47 mg, 0.19 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (220 mg, 1.12 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxyuridine (500 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq) and 6-tosylate-2-propynyl- N -acetyl- α - D -glucosamine **29** (770 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq) with $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (25 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/ H_2O 98/2) followed by a second flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}/\text{AcOEt}$ 0.5/6.5/3) to give the desired product as colorless oil (1.04 g, 82 %). R_f ($\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}/\text{AcOEt}$ 1/6/3) = 0.68. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.36 (1H, s, $N-H_3$); 8.06 (1H, s, $H_{13'}$); 7.79 (2H, d, $J_{H_{35'}/H_{37'}-H_{34'}/H_{38'}} = 8.32$ Hz, $H_{35'}/H_{37'}$); 7.70 (1H, d, $J_{H_{25'}/H_{21'}} = 8.12$ Hz, $N-H_{25'}$); 7.58 (1H, d, $J_{H_6-H_5} = 8.12$ Hz, H_6); 7.47 (2H, d, $J_{H_{34'}/H_{38'}-H_{35'}/H_{37'}} = 8.39$ Hz, $H_{34'}/H_{38'}$); 5.74 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}} = 5.31$ Hz, $H_{1'}$); 5.64 (1H, dd, $J_{H_5-H_3} = 1.38$ Hz, $J_{H_5-H_6} = 8.12$ Hz, H_5); 5.51 (1H, d, $J_{H_{8'}-H_{2'}} = 5.63$ Hz, $O-H_{8'}$); 5.40 (1H, d, $J_{H_{9'}-H_{3'}} = 5.44$ Hz, $O-H_{9'}$); 5.30 (1H, d, $J_{H_{23'}-H_{19'}} = 5.84$ Hz, $O-H_{23'}$); 4.83 (1H, d, $J_{H_{24'}-H_{20'}} = 6.01$ Hz, $O-H_{24'}$); 4.70 (1H, d, $J_{H_{16'}-H_{21'}} = 3.39$ Hz, $H_{16'}$); 4.60-4.74 (2H, qd, $J_{H_{5'}-H_{5''}} = 14.47$ Hz, $J_{H_{5'}-H_{4'}} = 7.77$ Hz, $H_{5'}$); 4.40-4.60 (2H, m, $H_{14'}$); 4.24 (1H, m, $H_{22'}$); 4.10-4.17 (3H, m, $H_{22'}/H_{4'}/H_{2'}$); 3.98 (1H, m, $H_{3'}$); 3.57-3.67 (2H, m, $H_{18'}/H_{21'}$); 3.36-3.44 (1H, m, $H_{20'}$); 3.06-3.14 (1H, m, $H_{19'}$); 2.41 (3H, s, $H_{39'}$); 1.76 (3H, s, $H_{29'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 169.5 ($C_{27'}$); 163.0 (C_4); 150.6 (C_2); 144.9 ($C_{36'}$); 143.5 ($C_{12'}$); 141.2 (C_6); 132.4

(C_{33'}); 130.1 (C_{34'/C38'}); 127.6 (C_{35'/C37'}); 124.6 (C_{13'}); 102.1 (C₅); 96.2 (C_{16'}); 88.9 (C_{1'}); 81.8 (C_{4'}); 72.0 (C_{2'}); 70.6 (C_{3'}); 70.2 (C_{20'/C19'}); 70.0 (C_{22'}); 69.8 (C_{18'}); 60.1 (C_{14'}); 53.4 (C_{21'}); 51.4 (C_{5'}); 22.5 (C_{29'}); 21.1 (C_{39'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₅N₆O₁₃S]⁺ m/z 683.1977 and found m/z 683.1963. IR (neat, cm⁻¹): 3303.8br; 2929.2m; 2832.7w; 1682.4s; 1598.0w; 1548.6w; 1461.8w; 1427.3w; 1379.5w; 1351.8m; 1265.7w; 1189.5w; 1174.0s; 1123.3m; 1096.8m; 1020.2m; 998.7m; 969.6w; 931.0w; 813.2w; 768.8w; 666.1w. [α]_D²⁰ = + 91.7 (C = 0.02 M, MeOH).

N-((2S,3R,4R,5S,6R)-6-(azidomethyl)-2-(((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (31)

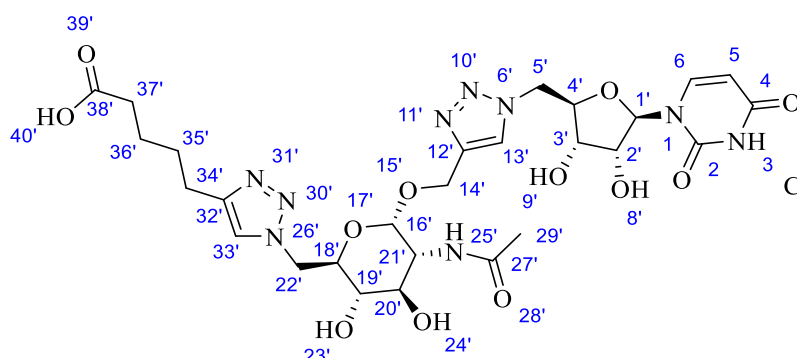


31

Chemical Formula: C₂₀H₂₇N₉O₁₀
Molecular Weight: 553.49

To flame dried round-bottom flask, compound **30** (0.91 g, 1.33 mmol, 1.0 eq) was stirred with dry DMF (10 mL) at room temperature under argon atmosphere. Then, sodium azide (0.26 g, 3.99 mmol, 3.0 eq) was added to the solution and this was stirred for 72 h. Thus, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane to remove residual DMF. The residue was purified by a flash chromatography (Acetonitrile/H₂O 9/1) to give the desired product as white solid (0.47 g, 64 %). R_f (Acetonitrile/H₂O 9/1) = 0.36. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N-H₃); 8.08 (1H, s, H_{13'}); 7.74 (1H, d, J_{H25'-H21'} = 8.12 Hz, N-H_{25'}); 7.59 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.13 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.37 Hz, H_{1'}); 5.65 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.07 Hz, H₅); 5.52 (1H, d, J_{H8'-H2'} = 5.63 Hz, O-H_{8'}); 5.40 (1H, d, J_{H9'-H3'} = 5.33 Hz, O-H_{9'}); 5.28 (1H, m, O-H_{23'}); 4.82 (1H, d, J_{H24'-H20'} = 5.97 Hz, O-H_{24'}); 4.80 (1H, d, J_{H16'-H21'} = 3.54 Hz, H_{16'}); 4.61-4.75 (2H, qd, J_{H5'-H5''} = 14.40 Hz, J_{H5'-H4'} = 4.28 Hz, H_{5'}); 4.51-4.70 (2H, m, H_{14'}); 4.09-4.18 (2H, m, H_{4'/H2'}); 3.98 (1H, m, H_{3'}); 3.61-3.72 (2H, m, H_{20'/H21'}); 3.37-3.50 (3H, m, H_{18'/H22'}); 3.15 (1H, m, H_{19'}); 1.78 (3H, s, H_{29'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.5 (C_{27'}); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 143.5 (C_{12'}); 141.2 (C₆); 124.6 (C_{13'}); 102.1 (C₅); 96.5 (C_{16'}); 88.9 (C_{1'}); 81.7 (C_{4'}); 72.0 (C_{2'}); 71.5 (C_{19'}); 71.4 (C_{20'}); 70.6 (C_{3'}); 70.2 (C_{18'}); 60.2 (C_{14'}); 53.5 (C_{21'}); 51.3 (C_{14'}); 51.1 (C_{22'}); 22.5 (C_{29'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₀H₂₈N₉O₁₀]⁺ m/z 554.1953 and found m/z 554.1949. IR (neat, cm⁻¹): 3289.0br; 3258.4m; 3193.2m; 3151.7m; 3077.0m; 2929.4br; 2722.4w; 2595.2w; 2101.1s; 1682.3s; 1577.6w; 1529.9w; 1546.7w; 1463.2w; 1421.5w; 1381.5w; 1318.7w; 1267.5w; 1234.2w; 1121.0m; 1098.4m; 1053.8s; 897.3w; 839.9w; 815.0w; 767.8w. [α]_D²⁰ = + 72.8 (C = 0.01 M, MeOH).

5-(1-(((2R,3S,4R,5R,6S)-5-acetamido-6-((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoic acid (**32**)



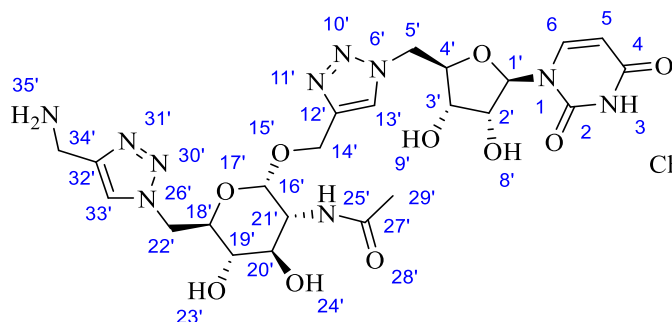
32

Chemical Formula: C₂₇H₃₇N₉O₁₂

Molecular Weight: 679,64

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.9 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (18.5 mg, 0.09 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of compound **31** (86 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) and 6-heptynoic acid (26.1 mg, 0.19 mmol, 1.2 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40°C. The reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of methanol several times. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1/6/3) to give the desired product as white solid (87 mg, 82 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1/6/3) = 0.23. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.35 (1H, s, *N*-H₃); 7.93 (1H, s, H₁₃); 7.84 (1H, s, H₃₃); 7.77 (1H, d, *J*_{H25'-H21'} = 8.17 Hz, *N*-H_{25'}); 7.59 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.73 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.43 Hz, H_{1'}); 5.64 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.08 Hz, H₅); 4.71 (1H, d, *J*_{H16'-H21'} = 3.42 Hz, H_{16'}); 4.58-4.73 (3H, m, H_{5'/H22'}); 4.37-4.45 (1H, m, H_{22'}); 4.18-4.28 (2H, m, H_{14'}); 4.15 (1H, m, H_{4'}); 4.06 (1H, t, *J*_{H2'-H1'/H3'} = 5.38 Hz, H_{2'}); 3.93 (1H, m, H_{3'}); 3.82 (1H, m, H_{18'}); 3.66 (1H, m, H_{21'}); 3.47 (1H, m, H_{20'}); 3.07 (1H, m, H_{19'}); 2.58 (2H, t, *J*_{H34'-H35'} = 7.01 Hz, H_{34'}); 2.05 (2H, t, *J*_{H37'-H36'} = 7.05 Hz, H_{37'}); 1.76 (3H, s, H_{29'}); 1.41-1.61 (4H, m, H_{35'/H36'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 175.7 (C_{38'}); 169.5 (C_{27'}); 163.0 (C_{4'}); 150.6 (C_{2'}); 146.8 (C_{32'}); 143.0 (C_{12'}); 141.2 (C_{6'}); 124.6 (C_{13'}); 122.6 (C_{33'}); 102.1 (C_{5'}); 95.9 (C_{16'}); 89.0 (C_{1'}); 81.8 (C_{4'}); 72.1 (C_{2'/C19'}); 70.8 (C_{18'}); 70.6 (C_{3'}); 70.3 (C_{20'}); 59.4 (C_{14'}); 53.5 (C_{21'}); 51.3 (C_{5'}); 50.6 (C_{22'}); 35.0 (C_{37'}); 28.8 (C_{35'}); 24.9 (C_{34'}); 24.7 (C_{36'}); 22.5 (C_{29'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₈N₉O₁₂]⁺ *m/z* 680.2634 and found *m/z* 680.2627. IR (neat, cm⁻¹): 3294.2*br*; 3149.3*m*; 2927.8*br*; 2858.9*m*; 1689.3*s*; 1549.6*m*; 1461.5*m*; 1423.2*m*; 1380.5*m*; 1262.9*m*; 1224.5*m*; 1101.7*m*; 1053.1*m*; 1037.5*m*; 896.2*w*; 813.3*w*; 774.4*w*; 720.7*w*. [α]_D²⁰ = +44.2 (C = 0.01 M, MeOH).

N-((2S,3R,4R,5S,6R)-6-((4-(aminomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (33)



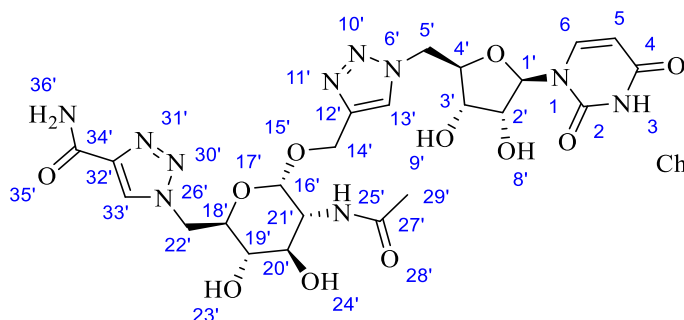
33

Chemical Formula: C₂₃H₃₂N₁₀O₁₀

Molecular Weight: 608,57

According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.9 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (18.5 mg, 0.09 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of compound **31** (86 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) and propargylamine (12.8 mg, 0.23 mmol, 1.5 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40°C. The reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of methanol several times. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5) to give the desired product as pale yellow solid (18 mg, 19 %). R_f (Acetone/H₂O 95/5) = 0.25. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11;34 (1H, s, *N*-H₃); 8.79 (1H, s, H₃₃); 8.01 (1H, s, H₁₃); 7.74 (1H, d, *J*_{H25'-H21'} = 8.13 Hz, *N*-H_{25'}); 7.58 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 5.73 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.24 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.07 Hz, H₅); 5.57 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.13 Hz, *O*-H_{8'}); 5.52 (1H, d, *J*_{H23'-H19'} = 5.33 Hz, *O*-H_{23'}); 5.42 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 4.92 Hz, *O*-H_{9'}); 4.92 (1H, d, *J*_{H24'-H20'} = 5.74 Hz, *O*-H_{24'}); 4.73 (1H, d, *J*_{H16'-H21'} = 3.43 Hz, H_{16'}); 4.57-4.82 (3H, m, H_{22'}/H_{5'}); 4.37-4.51 (1H, m, H_{22'}); 4.22-4.36 (2H, m, H_{14'}); 4.05-4.18 (4H, m, *N*-H_{35'}/H_{4'}/H_{2'}); 3.97 (1H, m, H_{3'}); 3.88 (1H, m, H_{18'}); 3.62 (1H, m, H_{21'}); 3.48 (1H, m, H_{20'}); 3.17 (1H, d, *J*_{H34'-H35'} = 5.03 Hz, H_{34'}); 3.05 (1H, m, H_{19'}); 1.76 (3H, s, H_{29'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.5 (C_{27'}); 163.0 (C_{4'}); 150.6 (C_{2'}); 146.7 (C_{32'}); 144.1 (C_{12'}); 141.2 (C_{6'}); 129.3 (C_{33'}); 124.5 (C_{13'}); 102.1 (C_{5'}); 96.4 (C_{16'}); 89.0 (C_{1'}); 81.7 (C_{4'}); 72.0 (C_{2'}); 71.9 (C_{19'}); 70.6 (C_{3'}/C_{18'}); 70.1 (C_{20'}); 59.9 (C_{14'}); 55.8 (C_{21'}); 51.3 (C_{5'}/C_{22'}); 48.6 (C_{34'}); 22.4 (C_{29'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₃H₃₀N₉O₁₁]⁺ *m/z* 608.2059 and found *m/z* 608.2053. IR (neat, cm⁻¹): 3275.5*br*; 2953.8*m*; 2922.9*s*; 2852.8*m*; 1688.6*s*; 1537.8*w*; 1463.0*w*; 1428.3*w*; 1379.6*w*; 1260.0*w*; 1231.2*w*; 1187.8*w*; 1126.1*w*; 1102.0*m*; 1083.0*m*; 1050.1*s*; 816.0*w*; 776.8*w*; 719.3*w*. [α]_D²⁰ = + 43.3 (C = 0.03 M, H₂O).

1-(((2R,3S,4R,5R,6S)-5-acetamido-6-((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide (34)



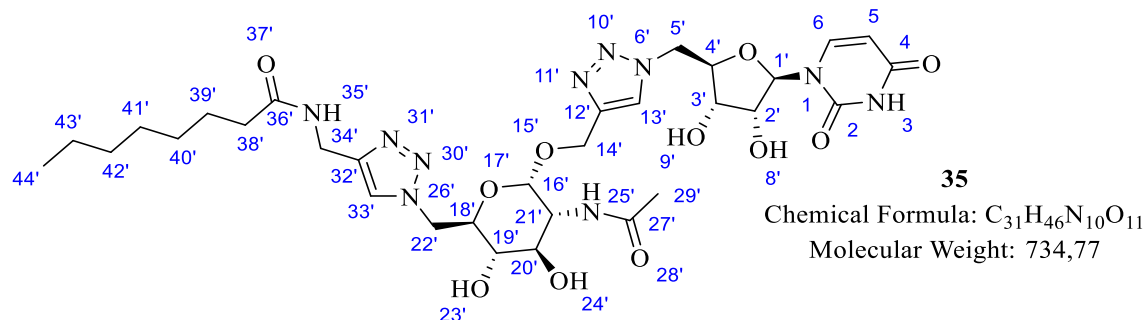
34

Chemical Formula: C₂₃H₃₀N₁₀O₁₁

Molecular Weight: 622,55

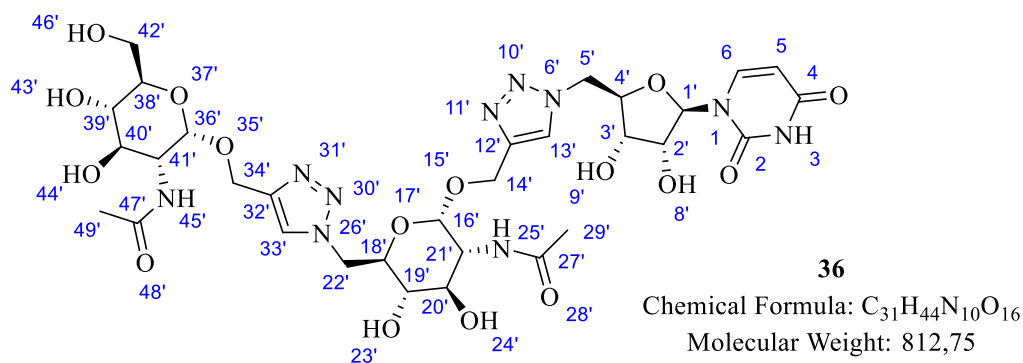
According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.9 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (18.5 mg, 0.09 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of compound **31** (86 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) and propiolamide (12 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40°C. The reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of methanol several times. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1/6/3) to give the desired product as white solid (87 mg, 90 %). R_f (Acetone/H₂O 95/5) = 0.31. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N-H₃); 8.45 (1H, s, H_{33'}); 8.02 (1H, s, H_{13'}); 7.84 (1H, s, N-H_{36'}); 7.75 (1H, d, *J*_{H25'-H21'} = 8.06 Hz, N-H_{25'}); 7.59 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.06 Hz, H₆); 7.43 (1H, s, N-H_{36'}); 5.74 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.32 Hz, H_{1'}); 5.65 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.04 Hz, H₅); 4.74 (1H, d, *J*_{H16'-H21'} = 3.38 Hz, H_{16'}); 4.53-4.78 (4H, m, H_{22'/H5'}); 4.24-4.37 (2H, m, H_{14'}); 4.10-4.18 (2H, m, H_{4'/H2'}); 3.98 (1H, m, H_{3'}); 3.89 (1H, m, H_{18'}); 3.63 (1H, m, H_{21'}); 3.49 (1H, m, H_{20'}); 3.04 (1H, t, *J*_{H19'-H18'/H20'} = 9.22 Hz, H_{19'}); 1.76 (3H, s, H_{29'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.5 (C_{27'}); 163.0 (C₄); 161.6 (C_{34'}); 150.6 (C₂); 143.3 (C_{12'}); 142.7 (C_{32'}); 141.3 (C₆); 127.6 (C_{33'}); 124.5 (C_{13'}); 102.1 (C₅); 96.3 (C_{16'}); 89.0 (C_{1'}); 81.8 (C_{4'}); 72.0 (C_{2'}); 71.9 (C_{19'}); 70.6 (C_{3'}); 70.2 (C_{18'/C20'}); 59.9 (C_{14'}); 53.5 (C_{21'}); 51.4 (C_{22'}); 50.9 (C_{5'}); 22.5 (C_{29'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₃H₃₁N₁₀O₁₁]⁺ *m/z* 623.2168 and found *m/z* 623.2164. IR (neat, cm⁻¹): 3304.7*br*; 2922.8*m*; 2851.5*w*; 1667.0*s*; 1556.8*m*; 1463.0*m*; 1423.1*m*; 1382.1*m*; 1322.8*w*; 1263.2*m*; 1232.2*m*; 1101.2*m*; 1049.8*s*; 1019.6*s*; 896.1*w*; 814.8*w*; 773.3*w*. [α]_D²⁰ = + 62.8 (C = 0.02 M, MeOH).

N-((1-(((2R,3S,4R,5R,6S)-5-acetamido-6-((1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,4-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)octanamide (35)



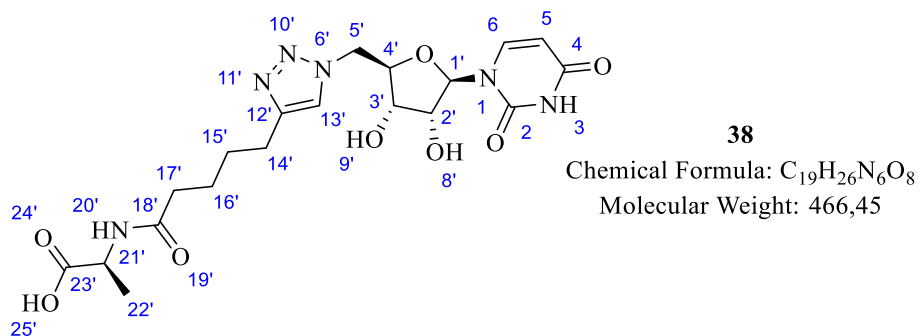
According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.9 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (18.5 mg, 0.09 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of compound **31** (86 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) and *N*-(prop-2-yn-1-yl)octanamide (31 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40°C. The reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of methanol several times. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5) to give the desired product as white solid (88 mg, 78 %). R_f (Acetone/H₂O 95/5) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.35 (1H, d, *J*_{H₃-H₅} = 1.30 Hz, *N*-H₃); 8.23 (1H, t, *J*_{H₃₅'-H₃₄'} = 5.64 Hz, *N*-H₃₅); 7.99 (1H, s, H₁₃); 7.84 (1H, s, H₃₃); 7.72 (1H, d, *J*_{H₂₅'-H₂₁'} = 8.16 Hz, *N*-H₂₅); 7.59 (1H, d, *J*_{H₆-H₅} = 8.10 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, *J*_{H₁'-H₂'} = 5.35 Hz, H₁); 5.64 (1H, dd, *J*_{H₅-H₃} = 1.30 Hz, *J*_{H₅-H₆} = 8.05 Hz, H₅); 5.51 (1H, d, *J*_{H₈'-H₂'} = 5.63 Hz, *O*-H₈); 5.47 (1H, d, *J*_{H₂₃'-H₁₉'} = 5.79 Hz, *O*-H₂₃); 5.40 (1H, d, *J*_{H₉'-H₃'} = 5.43 Hz, *O*-H₉); 4.88 (1H, d, *J*_{H₂₄'-H₂₀'} = 5.79 Hz, *O*-H₂₄); 4.71 (1H, d, *J*_{H₁₆'-H₂₁'} = 3.57 Hz, H₁₆); 4.60-4.74 (3H, m, H₂₂/H₅); 4.44-4.51 (1H, m, H₂₂); 4.22-4.37 (4H, m, H₃₄/H₁₄); 4.07-4.18 (2H, m, H₄/H₂); 3.98 (1H, m, H₃); 3.83 (1H, m, H₁₈); 3.63 (1H, m, H₂₁); 3.47 (1H, m, H₂₀); 3.05 (1H, m, H₁₉); 2.03 (3H, t, *J*_{H₃₈'-H₃₉'} = 7.35 Hz, H₃₈); 1.76 (3H, s, H₂₉); 1.44 (2H, m, H₃₉); 1.15-1.28 (8H, m, H₄₀/H₄₁/H₄₂/H₄₃); 0.84 (3H, t, *J*_{H₄₄'-H₄₃'} = 6.70 Hz, H₄₄). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 172.1 (C₃₆); 169.5 (C₂₇); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 144.9 (C₃₂); 143.2 (C₁₂); 141.2 (C₆); 124.6 (C₁₃); 123.7 (C₃₃); 102.1 (C₅); 96.1 (C₁₆); 88.9 (C₁); 81.7 (C₄); 72.0 (C₂); 71.9 (C₁₉); 70.6 (C₃); 70.5 (C₁₈); 70.2 (C₂₀); 59.8 (C₁₄); 53.4 (C₂₁); 51.4 (C₅); 50.5 (C₂₂); 35.2 (C₃₈); 34.1 (C₃₄); 31.1 (C₄₀); 28.6 (C₄₁/C₄₂); 28.4 (C₄₁/C₄₂); 25.2 (C₃₉); 22.5 (C₂₉); 22.0 (C₄₃); 13.9 (C₄₄). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₄₇N₁₀O₁₁]⁺ *m/z* 735.3420 and found *m/z* 735.3421. IR (neat, cm⁻¹): 3291.1*br*; 2928.4*s*; 2855.8*m*; 1682.8*s*; 1540.6*m*; 1461.6*m*; 1427.5*m*; 1379.1*m*; 1264.0*m*; 1227.8*m*; 1102.8*m*; 1052.8*s*; 814.2*w*; 776.8*w*; 720.7*w*. [α]_D²⁰ = +79.0 (C = 0.02 M, MeOH).

N-((2S,3R,4R,5S,6R)-6-(((4-((((2S,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-2-(((1-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-4,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide (36)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.9 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (18.5 mg, 0.09 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of compound **31** (86 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) and 2-propynyl-*N*-acetyl- α -*D*-glucosamine **28** (44.3 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) with ^tBuOH:H₂O (10 mL). The reaction mixture was stirred for 5 h at 40°C. The reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of methanol several times. The residue was purified by a flash chromatography (Acetone/H₂O 9/1) to give the desired product as white solid (97 mg, 77 %). R_f (Acetone/H₂O 9/1) = 0.26. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.35 (1H, s, N-H₃); 8.04 (1H, s, H₁₃/H₃₃); 8.00 (1H, s, H₁₃/H₃₃); 7.74 (1H, d, $J_{H_{25}/H_{45'}-H_{21}/H_{41'}} = 8.21$ Hz, N-H₂₅/N-H_{45'}); 7.70 (1H, d, $J_{H_{25}/H_{45'}-H_{21}/H_{41'}} = 8.24$ Hz, N-H₂₅/N-H_{45'}); 7.59 (1H, d, $J_{H_6-H_5} = 8.14$ Hz, H₆); 5.74 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}} = 5.37$ Hz, H_{1'}); 5.65 (1H, d, $J_{H_5-H_6} = 8.09$ Hz, H₅); 5.53 (1H, m, O-H₈); 5.49 (1H, m, O-H₂₃/O-H₄₃); 5.42 (1H, m, O-H₉); 4.99 (1H, m, O-H₂₄/O-H₄₄); 4.90 (1H, m, O-H₂₄/O-H₄₄); 4.74 (1H, d, $J_{H_{16}/H_{36'}-H_{21}/H_{41'}} = 3.46$ Hz, H₁₆/H_{36'}); 4.72 (1H, d, $J_{H_{16}/H_{36'}-H_{21}/H_{41'}} = 3.39$ Hz, H₁₆/H_{36'}); 4.59-4.74 (4H, m, H₂₂/H₃₄/H₅); 4.46-4.57 (3H, m, H₂₂/H₃₄/H₃₈/H₁₈); 4.25-4.35 (2H, m, H₁₄); 4.10-4.18 (2H, m, H₄/H₂); 4.09 (1H, m, O-H₂₃/O-H₄₃); 3.98 (1H, m, H₃); 3.86 (1H, m, H₃₈/H₁₈); 3.60-3.70 (3H, m, H₂₁/H₄₁/H₄₂); 3.40-3.53 (4H, m, H₂₀/H₄₀/H₄₂/H₄₆); 3.15 (1H, t, $J_{H_{19}/H_{39'}-H_{18}/H_{20}/H_{30}/H_{40'}} = 10.28$ Hz, H₁₉/H₃₉); 3.05 (1H, t, $J_{H_{19}/H_{39'}-H_{18}/H_{20}/H_{30}/H_{40'}} = 9.08$ Hz, H₁₉/H₃₉); 1.80 (3H, s, H₄₉/H₂₉); 1.76 (3H, s, H₄₉/H₂₉). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.5 (C₂₇/C₄₇); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 143.5 (C₁₂/C₃₂); 143.4 (C₁₂/C₃₂); 141.2 (C₆); 125.1 (C₁₃/C₃₃); 124.4 (C₁₃/C₃₃); 102.1 (C₅); 96.4 (C₁₆/C₃₆); 96.1 (C₁₆/C₃₆); 88.9 (C₁); 81.8 (C₄); 73.0 (C₂₀/C₄₀); 72.0 (C₂); 71.9 (C₁₉/C₃₉); 70.8 (C₁₉/C₃₉); 70.6 (C₃); 70.5 (C₁₈/C₃₈); 70.4 (C₁₈/C₃₈); 70.3 (C₂₀/C₄₀); 60.8 (C₄₂); 60.0 (C₁₄); 59.8 (C₅); 53.6 (C₂₁/C₄₁); 53.5 (C₂₁/C₄₁); 51.4 (C₂₂/C₃₄); 50.6 (C₂₂/C₃₄); 22.6 (C₂₉/C₄₉); 22.5 (C₂₉/C₄₉). ESI-⁺HRMS calculated for [C₃₁H₄₅N₁₀O₁₆]⁺ *m/z* 813.3009 and found *m/z* 813.3006. IR (neat, cm⁻¹): 3306.8br; 2923.4br; 1682.6s; 1548.2m; 1461.6w; 1428.0w; 1378.4w; 1318.5w; 1263.6w; 1229.9w; 1103.2m; 1022.6s; 949.6w; 841.3w; 811.3w; 759.8w. $[\alpha]_D^{20} = +113.5$ (C = 0.01 M, MeOH).

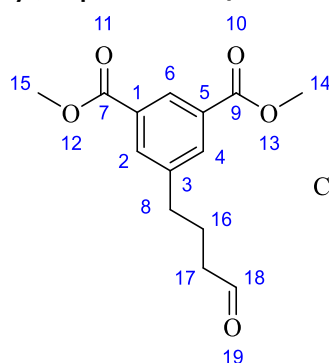
(5-(1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pentanoyl)-L-alanine (38)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (23 mg, 0.09 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (112 mg, 0.56 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (254 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq) and 6-heptynoic acid (132 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq) with ^tBuOH:H₂O (8 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) to give the desired product as white solid. The pure compounds were dried under reduced pressure to remove residual water. Then, according to the general procedure F, to a flame-dried round-bottom flask, the corresponding monocarboxylic acid substituted 5'-triazole-5'-deoxy-uridine **7** (373 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq) was stirred with anhydrous DMF (10 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, BOP reagent (417 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq), HOBT (127 mg, 0.94 mmol, 1.0 eq), DIPEA (0.43 mL, 2.46 mmol, 3.0 eq) and molecular sieves 4 Å (one spatula) were successively added and stirred for 10 min at 0°C. Thus, L-alanine methyl ester hydrochloride (107 mg, 1.04 eq, 1.1 eq) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 16 h. The reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with several co-evaporation with *n*-heptane (3 × 15 mL) to remove residual DMF. The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.1/6.9/3) followed by a second flash chromatography (Acetone/MeOH 96/4 to 90/10) to give a white solid. Then, the desired compound was directly deprotected without further characterization. Thus, this compound **37** (40 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq) was stirred with THF:H₂O 3:1 and lithium hydroxide monohydrate (7 mg, 0.17 mmol, 2.0 eq) was added to the reaction which was stirred for 18 hours at room temperature. Then, the reaction was quenched with 1 M HCl aqueous solution to pH 2. The reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the residue was purified by a flash chromatography SiO₂-C₁₈ (H₂O 100%) to give the desired product as white solid (27 mg, 29 % in three steps). R_f (SiO₂-C₁₈-H₂O 100%) = 0.18. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.34 (1H, d, *J*_{H3-H5} = 1.51 Hz, N-H₃); 8.14 (1H, d, *J*_{H20'-H21'} = 7.25 Hz, N-H_{20'}); 7.83 (1H, s, H_{13'}); 7.55 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.16 Hz, H₆); 5.73 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.36 Hz, H_{1'}); 5.60 (1H, dd, *J*_{H5-H3} = 1.90 Hz, *J*_{H5-H6} = 8.00 Hz, H₅); 4.64 (2H, qd, *J*_{H5'-H5''} = 14.44 Hz, *J*_{H5'-H4'} = 4.28 Hz, H_{5'}); 4.10-4.22 (1H, m, H_{21'/H4'}); 4.06 (1H, t, *J*_{H2'-H1'} = 5.38 Hz, H_{2'}); 3.96 (1H, t, *J*_{H3'-H4'} = 4.92 Hz, H_{3'}); 2.59 (2H, t, *J*_{H14'-H15'} = 6.84 Hz, H_{14'}); 2.12 (2H, t, *J*_{H17'-H16'} = 7.06 Hz,

H_{17'}); 1.45-1.61 (4H, m, H_{15'}/H_{16'}); 1.23 (3H, d, $J_{H_{22}'-H_{21}'}$ = 7.31 Hz, H_{22'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 174.2 (C_{23'}); 171.9 (C_{18'}); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 146.8 (C_{12'}); 141.2 (C₆); 122.6 (C_{13'}); 102.0 (C₅); 88.7 (C_{1'}); 81.8 (C_{4'}); 72.1 (C_{2'}); 70.5 (C_{3'}); 51.1 (C_{5'}); 47.4 (C_{21'}); 34.7 (C_{17'}); 28.5 (C_{15'}); 24.8 (C_{16'}); 24.7 (C_{14'}); 17.2 (C_{22'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₉H₂₇N₆O₈]⁺ m/z 467.1884 and found m/z 467.1882. IR (neat, cm⁻¹): 3366.2br; 3079.2w; 2942.8w; 2867.3w; 1686.6m; 1551.7w; 1460.3w; 1415.8w; 1384.4w; 1261.4w; 1217.1w; 1129.9w; 1102.5w; 1050.0s; 1022.8s; 998.9s; 825.5m; 764.6m; 630.7w. [α]_D²⁰ = + 20.6 (C = 0.01 M, MeOH). LC-MS purity 88.9 %, t_R = 4.37 min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

dimethyl 5-(hex-5-en-1-yl)isophthalate (40)



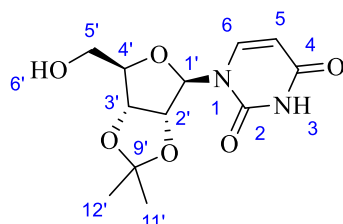
40

Chemical Formula: C₁₄H₁₆O₅
Molecular Weight: 264,28

To a flame-dried round-bottom flask, oxalyl chloride (0.55 mL, 6.54 mmol, 1.4 eq) was stirred with dry DCM (30 mL) under argon atmosphere at -78°C. Then, dry DMSO (0.93 mL, 13.1 mmol, 2.8 eq) was added to the solution and this was stirred at -78°C for 15 min. Thus, a solution of dimethyl 3-(5-hydroxybutyl)isophthalate **39** (1.31 g, 4.67 mmol, 1.0 eq) with dry DCM (10 mL) and triethylamine (3.97 mL, 28.5 mmol, 6.1 eq) were successively added. The reaction was stirred at room temperature for 16 h. When starting material was fully converted, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, water (30 mL) was added and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 30 mL). The combined organic layer was washed once with saturated Na₂CO₃ aqueous solution (30 mL), once with brine (30 mL), then was dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness to give a slightly brown oil (1.30 g, 99 %) as aldehyde product. The corresponding aldehyde was directly used without further purification and without further characterization.

2', 3'-O,O'-isopropylidene-uridine (43)

CAS: 362-43-6



43

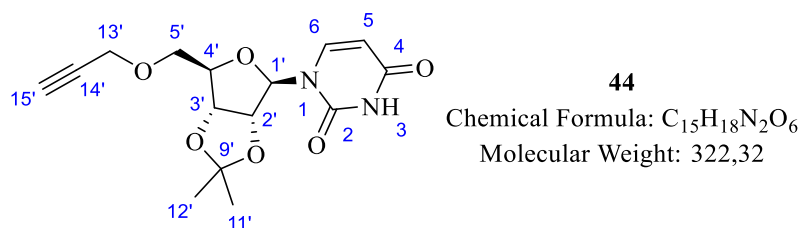
Chemical Formula: C₁₂H₁₆N₂O₆
Molecular Weight: 284,27

To a suspension of commercially uridine **1** (21.3 g, 0.087 mol, 1.0 eq) in dry acetone (350 mL), 4 Å molecular sieves (2-3 g) and pure H₂SO₄ (10.2 mL, 0.19 mol, 2.2 eq) were added. This reaction mixture

was stirred at room temperature for 16 hours. The white suspension became a clearly red-dark solution. After 5 hours, the solution was quenched with Et₃N (48.6 mL, 0.35 mol, 4 eq) and then was concentrated to dryness. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 96/4) to give a white solid (19.9 g, 80 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.50. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N-H₃); 7.79 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.14 Hz, H₆); 5.83 (1H, m, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.14 Hz, H₅); 5.07 (1H, m, O-H_{6'}); 4.90 (1H, m, H_{2'}); 4.74 (1H, m, H_{3'}); 4.06 (1H, m, H_{4'}); 3.57 (2H, m, H_{5'}); 1.48 (3H, s, H_{12'}); 1.29 (3H, s, H_{11'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.6 (C₄); 150.8 (C₂); 142.4 (C₆); 113.4 (C₉); 102.2 (C₅); 91.6 (C_{1'}); 87.0 (C_{4'}); 84.1 (C_{2'}); 80.9 (C_{3'}); 61.7 (C_{5'}); 27.5 (C_{12'}); 25.7 (C_{11'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₇N₂O₆]⁺ m/z 285.1081 and found m/z 285.1082. IR (neat, cm⁻¹): 3240.9*br*; 1698.9*s*; 1659.6*s*; 1464.8*m*; 1372.0*w*; 1273.7*m*; 1116.3*m*; 1074.7*m*; 856.3*w*; 801.4*w*. [α]_D²⁰ = - 34.2 (C = 0.05 M, MeOH).

2',3'-O,O'-isopropylidene-5'-O-propargyl-uridine (**44**)

CAS: 140391-30-6

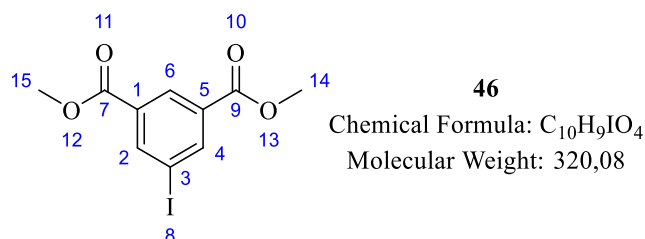


To a 100 mL flame-dried round-bottom flask, 2',3'-O,O'-isopropylidene-uridine **43** (2.0 g; 7.04 mmol; 1.0 eq) was added in anhydrous THF (50 mL) under argon atmosphere at 0°C. NaH (60 % in mineral oil) (0.56 g; 14.1 mmol; 2.0 eq) was added to a cold solution and was stirred for 30 min at 0°C. Then, a solution of propargylic bromide 80 % in toluene (0.8 mL; 7.4 mmol; 1.05 eq) was added and the reaction mixture was placed under ultrasonic irradiation for 2h30. The temperature was stabilized at room temperature with addition of ice. The resulting brown suspension was quenched with a solution of 1:5 MeOH/H₂O (45 mL) and was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved with ethyl acetate (40 mL). A distilled water (30 mL) was added to the solution and then the aqueous layer was extracted twice with ethyl acetate (2 × 30 mL). The organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting yellow oil was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 97/3) to give a white solid (1.84 g; 81 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.70. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.73 (1H, s, N-H₃); 7.56 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.89 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 2.38 Hz, H_{1'}); 5.71 (1H, dd, *J*_{H5-H6} = 8.13 Hz, *J*_{H5-H3} = 1.98 Hz, H₅); 4.80 (2H, m, H_{2'}, H_{3'}); 4.41 (1H, m, H_{4'}); 4.19 (2H, m, H_{13'}); 3.78 (2H, dd, *J*_{H5'-H4'} = 10.33, *J*_{H5'-H3'} = 2.78 Hz, H_{5'}); 2.48 (1H, t, *J*_{H15'-H13'} = 2.36 Hz, H_{15'}); 1.59 (3H, s, H_{12'}); 1.36 (3H, s, H_{11'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.1 (C₂); 150.0 (C₄); 141.2 (C₆); 114.3 (C₉); 102.2 (C₅); 93.1 (C_{1'}); 85.4 (C_{4'}); 85.0 (C_{2'}); 81.0 (C_{3'}); 78.7 (C_{14'}); 75.4 (C_{15'}); 69.8 (C_{13'}); 58.7 (C_{5'}); 27.2 (C_{12'});

25.3 (C_{11}). ESI-HRMS calculated for $[C_{15}H_{19}N_2O_6]^+$ m/z 323.1237 and found m/z 323.1239. IR (neat, cm^{-1}): 3253.9 br ; 3063.2 w ; 2988.2 w ; 2937.3 w ; 1674.4 s ; 1456.1 m ; 1380.0 m ; 1269.6 m ; 1213.3 m ; 1080.4 s ; 850.1 w ; 810.1 w . $[\alpha]_D^{20} = -27.8$ ($C = 0.07$ M, MeOH). LC-MS purity 98.8 %, $t_R = 6.53$ min water/methanol (70:30 vol/vol, 0.1 % of formic acid).

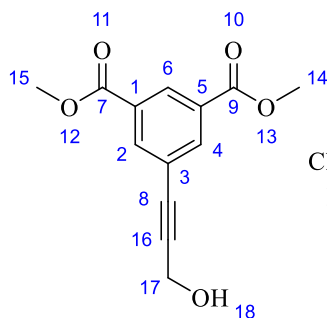
Dimethyl 3-iodoisophthalate (**46**)

CAS: 51839-15-7



In a large round-bottom flask (1 L), to a beige suspension of commercially dimethyl 5-aminoisophthalate **45** (10 g, 48 mmol, 1.0 eq) in 50 mL of cooled and distilled water, an aqueous solution of HCl 2 M (180 mL) was added at 0°C. When the mixture became a yellow pale solution, an aqueous solution (30 mL) of sodium nitrite (4.95 g, 72 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at 0°C for 1 h (be careful during this step, a nitrogen dioxide can be formed as brown gas). Then, a cooled aqueous solution of potassium iodide (11.9 g, 72 mmol, 1.5 eq in 40 mL of H_2O) was prepared and this was added carefully to the reaction mixture at 0°C (be careful during this addition, a powerful nitrogen degassing can be occurred). Thus, 200 mL of dichloromethane was added and the reaction was stirred at room temperature. The solution became a green-dark solution. After 3 days, the organic phase was separated and the aqueous phase was extracted 4 times with DCM (4 × 100 mL). The combined organic phase was sequentially washed once with a solution of $Na_2S_2O_3$ 4 M (200 mL) and once with brine (100 mL). Then, this was dried over $MgSO_4$ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a flash chromatography (PE/EA 95/5) to give a white solid (11.7 g, 76 %). R_f (EP/AcOEt 95:5) = 0.29. ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 8.52 (1H, m, H_6); 8.50 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, H_{14}/H_{15}). ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ (ppm): 205.2 (C_7/C_9); 164.2 (C_3); 142.0 (C_1/C_5); 132.5 (C_2); 129.2 (C_4); 93.2 (C_6); 52.1 (C_{14}/C_{15}). ESI-HRMS calculated for $[C_{10}H_{10}IO_4]^+$ m/z 320.9618 and found m/z 320.9614. IR (neat, cm^{-1}): 3084.9 w ; 2951.6 w ; 1711.9 s ; 1570.2 w ; 1438.3 s ; 1292.5 s ; 1239.2 s ; 1101.1 m ; 993.9 m ; 871.2 w ; 745.0 m .

Dimethyl 3-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)isophthalate (**47**)



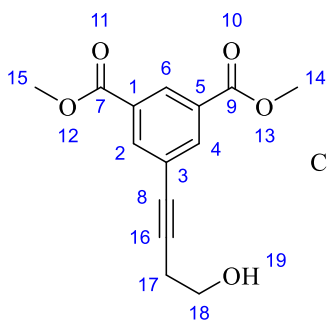
47

Chemical Formula: C₁₃H₁₂O₅

Molecular Weight: 248,23

According to the general procedure G, propargyl alcohol (0.54 mL, 9.37 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of dimethyl 5-iodoisophthalate **46** (3.0 g, 9.37 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.18 g, 0.94 mmol, 10 mol%), Pd(Ph₃P)₂Cl₂ (0.33 g, 0.47 mmol, 5 mol%) and Et₃N (54.9 mL, 394 mmol, 42 eq). The reaction mixture became red-dark solution and was stirred for 2 h at 60°C. Then, the residue was directly purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a beige solid (2.31 g, 99 %). R_f (EP/AcOEt 1:1) = 0.61. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.58 (1H, m, H₆); 8.22 (2H, m, H₂/H₄); 4.51 (2H, d, J_{H17-H18} = 6.19 Hz); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 2.09 (1H, t, J_{H18-H17} = 6.09 Hz, O-H₁₇). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.5 (C₇/C₉); 136.6 (C₂/C₄); 130.9 (C₁/C₅); 130.3 (C₆); 123.7 (C₃); 89.3 (C₁₆); 83.6 (C₈); 52.6 (C₁₄/C₁₅); 51.4 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₃H₁₃O₅]⁺ m/z 249.0757 and found m/z 249.0757. IR (neat, cm⁻¹): 3309.3br; 3078.6w; 2952.1w; 1724.3s; 1596.7w; 1435.2m; 1335.7m; 1227.1s; 1125.3m; 1040.3m; 998.3m; 910.0w; 873.6w; 750.2m.

Dimethyl 3-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)isophthalate (**48**)



48

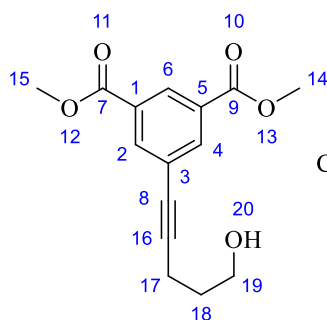
Chemical Formula: C₁₄H₁₄O₅

Molecular Weight: 262,26

According to the general procedure G, 3-butyn-1-ol (1.0 mL, 13.1 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of dimethyl 5-iodoisophthalate **46** (4.2 g, 13.1 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.25 g, 1.31 mmol, 10 mol%), Pd(Ph₃P)₂Cl₂ (0.46 g, 0.66 mmol, 5 mol%) and Et₃N (77 mL, 551 mmol, 42 eq). The reaction mixture became brown-dark solution and was stirred for 1 h at 60°C. Then, the residue was directly purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a beige solid (3.32 g, 97 %). R_f (EP/AcOEt 1:1) = 0.51. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.55 (1H, m, H₆); 8.22 (2H, m, H₂/H₄); 3.93 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.83 (2H, t, J_{H18-H17} = 6.32 Hz, H₁₈); 2.70 (1H, t, J_{H19-H18} = 6.30 Hz, O-H₁₉). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.6 (C₇/C₉); 136.6 (C₂/C₄); 130.8 (C₁/C₅); 129.8 (C₆); 124.5 (C₃); 88.9 (C₁₆); 80.5 (C₈); 61.0 (C₁₈); 52.5 (C₁₄/C₁₅); 23.8 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₁₅O₅]⁺ m/z 263.0914 and found

m/z 263.0914. IR (neat, cm^{-1}): 3253.1br; 2952.6m; 1726.9s; 1597.0w; 1439.0m; 1343.2m; 1231.4s; 1125.6w; 1034.6m; 1000.0m; 905.5w; 877.3w; 751.2m.

Dimethyl 3-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)isophthalate (49)



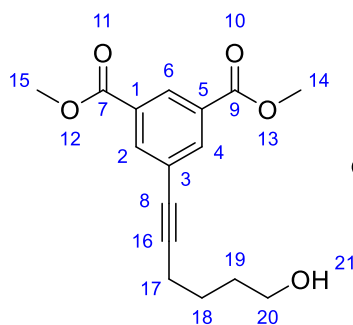
49

Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$

Molecular Weight: 276,29

According to the general procedure G, 4-pentyn-1-ol (0.68 mL, 7.31 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of dimethyl 5-iodoisophthalate **46** (2.34 g, 7.31 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.14 g, 0.73 mmol, 10 mol%), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ (0.26 g, 0.37 mmol, 5 mol%) and Et_3N (43.0 mL, 307 mmol, 42 eq). The reaction mixture became red-dark solution and was stirred for 1 h at 60°C. Then, the residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a pale brown oil (1.90 g, 94 %). Rf (EP/AcOEt 1:1) = 0.46. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.58 (1H, m, H_6); 8.21 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$); 3.83 (2H, m, H_{19}); 2.46 (2H, t, $J_{\text{H}_{17}-\text{H}_{18}} = 6.85$ Hz, H_{17}); 1.87 (2H, p, $J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{17}} = 6.69$ Hz, H_{18}); 1.54 (1H, m, $\text{O}-\text{H}_{20}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.7 (C_7/C_9); 136.6 (C_2/C_4); 130.8 (C_1/C_5); 129.6 (C_6); 124.9 (C_3); 91.7 (C_{16}); 79.3 (C_8); 61.6 (C_{19}); 52.5 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); 31.2 (C_{17}); 15.9 (C_{18}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_5]^+$ m/z 277.1070 and found m/z 277.1069. IR (neat, cm^{-1}): 3435.5br; 2952.4w; 1723.7s; 1597.0w; 1437.6m; 1339.5m; 1239.6s; 1126.4w; 999.0m; 911.2w; 753.7m.

Dimethyl 3-(5-hydroxyhex-1-yn-1-yl)isophthalate (50)



50

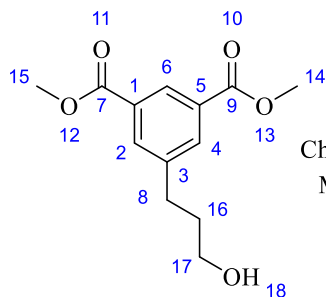
Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$

Molecular Weight: 290,32

According to the general procedure G, 5-hexyn-1-ol (1.03 mL, 9.37 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of dimethyl 5-iodoisophthalate **46** (3.0 g, 9.37 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.18 g, 0.94 mmol, 10 mol%), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ (0.33 g, 0.47 mmol, 5 mol%) and Et_3N (54.9 mL, 393.7 mmol, 42 eq). The reaction mixture became red-dark solution and was stirred for 1h30 at 60°C. Then, the residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a pale brown oil (2.66 g, 98 %). Rf (EP/AcOEt 1:1) = 0.45. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.55 (1H, m, H_6); 8.21 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$); 3.72 (2H, m, H_{20}); 2.48 (2H, t, $J_{\text{H}_{17}-\text{H}_{18}} = 6.73$ Hz, H_{17}); 1.67-1.80 (4H, m, $\text{H}_{18}/\text{H}_{19}$); 1.40 (1H,

t , $J_{H_{20}-H_{19}} = 5.23$ Hz, $O-H_{20}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.7 (C_7/C_9); 136.6 (C_2/C_4); 130.8 (C_1/C_5); 129.5 (C_6); 125.0 (C_3); 92.2 (C_{16}); 79.2 (C_8); 62.4 (C_{20}); 52.5 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); 31.9 (C_{17}); 24.8 (C_{19}); 19.2 (C_{18}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_5]^+$ m/z 291.1227 and found m/z 291.1225. IR (neat, cm^{-1}): 3434.7 br ; 2950.8 w ; 1725.5 s ; 1597.2 w ; 1437.9 m ; 1340.7 m ; 1240.6 s ; 1126.1 w ; 1045.0 w ; 998.9 w ; 911.8 w ; 753.8 m .

Dimethyl 3-(3-hydroxypropyl)isophthalate (51)



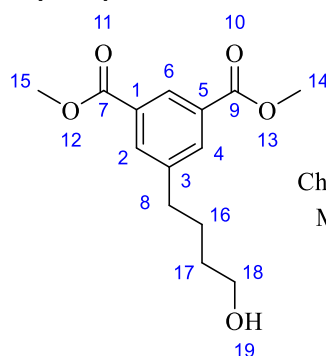
51

Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$

Molecular Weight: 252.27

According to the general procedure H, palladium on carbon (0.08 g, 0.8 mmol, 0.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(3-hydroxyprop-1-yn-1-yl)isophthalate **47** (1.89 g, 7.64 mmol, 1.0 eq) with MeOH (40 mL) under Argon. Then, H_2 bubble stream was established for 20 min and the reaction was stirred for 24 h. The reaction was filtrated on Celite pad and concentrated to dryness to give a pure yellow pale oil (1.99 g, 99 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.05. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.51 (1H, m, H_6); 8.07 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$); 3.68 (2H, t, $J_{H_{17}-H_{16}} = 6.31$ Hz, H_{17}); 2.82 (2H, t, $J_{H_8-H_{16}} = 7.53$ Hz, H_8); 1.93 (2H, q, $J_{H_{16}-H_{17}} = 6.29$ Hz, H_{16}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.4 (C_7/C_9); 142.8 (C_3); 133.9 (C_2/C_4); 130.7 (C_1/C_5); 128.4 (C_6); 61.8 (C_{17}); 52.3 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); 33.9 (C_8); 31.7 (C_{16}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5]^+$ m/z 253.1070 and found m/z 253.1072. IR (neat, cm^{-1}): 3266.2 br ; 2946.3 m ; 2874.2 w ; 1719.6 s ; 1454.4 w ; 1435.1 m ; 1335.4 w ; 1205.5 m ; 1106.8 m ; 1000.7 m ; 915.1 w ; 752.1 m ; 721.3 w .

Dimethyl 3-(4-hydroxybutyl)isophthalate (52)



52

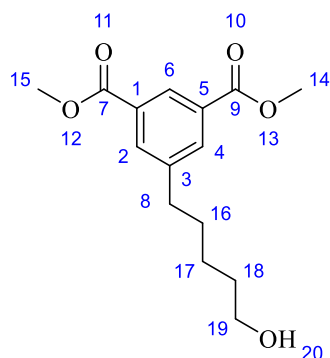
Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$

Molecular Weight: 266.29

According to the general procedure H, palladium on carbon (0.08 g, 0.8 mmol, 0.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)isophthalate **48** (1.98 g, 7.55 mmol, 1.0 eq) with MeOH (40 mL) under Argon. Then, H_2 bubble stream was established for 20 min and the reaction was stirred for 24 h. The reaction was filtrated on Celite pad and concentrated to dryness to give a pure yellow pale oil (1.97 g, 98 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.06. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.50 (1H, m, H_6);

8.05 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.67 (2H, t, $J_{H18-H17} = 6.41$ Hz, H₁₈); 2.75 (2H, t, $J_{H8-H16} = 7.57$ Hz, H₈); 1.75 (2H, m, H₁₆); 1.63 (2H, m, H₁₇); 1.35 (1H, s, O-H₁₉). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.4 (C₇/C₉); 143.2 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.6 (C₁/C₅); 128.4 (C₆); 62.6 (C₁₈); 52.3 (C₁₄/C₁₅); 35.2 (C₈); 32.1 (C₁₇); 27.4 (C₁₆). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₁₉O₅]⁺ m/z 267.1227 and found m/z 267.1226. IR (neat, cm⁻¹): 3400.8br; 2949.8m; 2861.8w; 1720.4s; 1433.2w; 1321.7m; 1238.3m; 1204.3m; 1127.1m; 1062.4w; 999.9w; 753.4m; 721.5w.

Dimethyl 3-(5-hydroxypentyl)isophthalate (53)



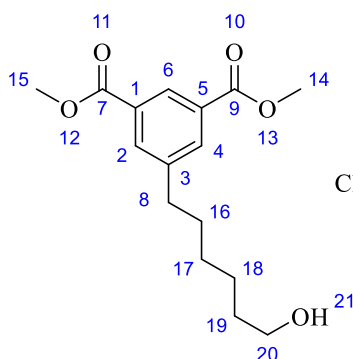
53

Chemical Formula: C₁₅H₂₀O₅

Molecular Weight: 280,32

According to the general procedure H, palladium on carbon (0.09 g, 0.9 mmol, 0.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)isophthalate **49** (2.35 g, 8.51 mmol, 1.0 eq) with MeOH (40 mL) under Argon. Then, H₂ bubble stream was established for 20 min and the reaction was stirred for 24 h. The reaction was filtrated on Celite pad and concentrated to dryness to give a pure yellow pale oil (2.30 g, 97 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.06. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.49 (1H, m, H₆); 8.04 (2H, m, H₂/H₄); 3.93 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.63 (2H, t, $J_{H19-H18} = 6.54$ Hz, H₁₉); 2.72 (2H, t, $J_{H8-H16} = 7.59$ Hz, H₈); 1.69 (2H, p, $J_{H16-H8} = 7.59$ Hz, H₁₆); 1.60 (2H, p, $J_{H18-H19} = 6.79$ Hz, H₁₈); 1.36-1.44 (3H, m, H₁₇/O-H₂₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C₇/C₉); 143.4 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.6 (C₁/C₅); 128.3 (C₆); 62.8 (C₁₉); 52.3 (C₁₄/C₁₅); 35.5 (C₈); 32.5 (C₁₈); 31.0 (C₁₆); 25.3 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₂₁O₅]⁺ m/z 281.1383 and found m/z 281.1384. IR (neat, cm⁻¹): 3430.0br; 2934.1m; 2859.0w; 1720.6s; 1433.2m; 1320.4w; 1237.2s; 1203.7m; 1126.7w; 1000.4m; 753.3m; 721.4w.

Dimethyl 3-(6-hydroxyhexyl)isophthalate (54)



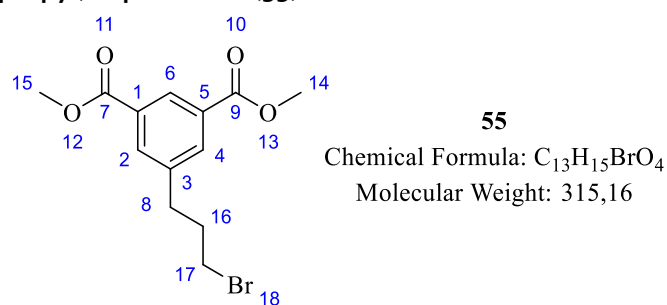
54

Chemical Formula: C₁₆H₂₂O₅

Molecular Weight: 294,35

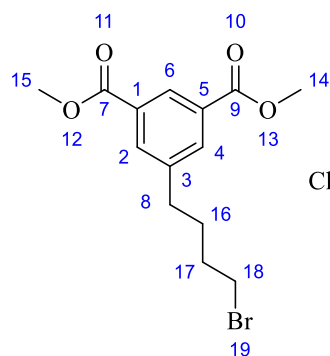
According to the general procedure H, palladium on carbon (0.1 g, 0.9 mmol, 0.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(6-hydroxyhex-1-yn-1-yl)isophthalate **50** (2.66 g, 9.16 mmol, 1.0 eq) with MeOH (40 mL) under Argon. Then, H₂ bubble stream was established for 20 min and the reaction was stirred for 24 h. The reaction was filtrated on Celite pad and concentrated to dryness to give a pure colorless oil (2.69 g, 99 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.07. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.50 (1H, m, H₆); 8.04 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.63 (2H, t, *J*_{H20-H19} = 6.53 Hz, H₂₀); 2.71 (2H, t, *J*_{H8-H16} = 7.58 Hz, H₈); 1.67 (2H, m, H₁₆); 1.57 (2H, m, H₁₉); 1.33-1.44 (4H, m, H₁₇/H₁₈); 1.30 (1H, m, O-H₂₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C₇/C₉); 143.6 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.6 (C₁/C₅); 128.2 (C₆); 62.9 (C₂₀); 52.3 (C₁₄/C₁₅); 35.4 (C₈); 32.6 (C₁₉); 31.1 (C₁₆); 28.8 (C₁₈); 25.5 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₂₃O₅]⁺ m/z 295.1540 and found m/z 295.1540. IR (neat, cm⁻¹): 3431.5*br*; 2931.4*m*; 2857.3*w*; 1721.3*s*; 1433.3*m*; 1322.8*m*; 1237.6*s*; 1000.6*m*; 914.5*w*; 753.6*m*.

Dimethyl 3-(3-bromopropyl)isophthalate (**55**)



According to the general procedure I, Ph₃P (0.57 g, 2.18 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(3-hydroxypropyl)isophthalate **51** (0.50 g, 1.98 mmol, 1.0 eq) with DCM_{anh} (25 mL) under Argon at 0°C. Then, NBS (0.35 g, 1.98 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. Then, the reaction was concentrated to dryness and purified by a flash chromatography (PE/EA 95/5) to give a white solid (0.41 g, 66 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.43. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.55 (1H, m, H₆); 8.09 (2H, m, H₂/H₄); 3.96 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.41 (2H, t, *J*_{H17-H16} = 6.51 Hz, H₁₇); 2.91 (2H, t, *J*_{H8-H16} = 7.35 Hz, H₈); 2.23 (2H, q, *J*_{H16-H17} = 6.41 Hz, H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.3 (C₇/C₉); 141.5 (C₃); 133.9 (C₂/C₄); 130.9 (C₁/C₅); 128.7 (C₆); 52.4 (C₁₄/C₁₅); 33.8 (C₁₆); 33.7 (C₈); 32.5 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₃H₁₆BrO₄]⁺ m/z 315.0226 and found m/z 315.0224. IR (neat, cm⁻¹): 2952.9*m*; 1724.3*s*; 1599.5*w*; 1433.2*m*; 1251.3*s*; 1104.5*w*; 1019.2*s*; 1001.4*s*; 948.5*w*; 909.7*w*; 748.0*m*; 719.5*w*.

Dimethyl 3-(4-bromobutyl)isophthalate (**56**)



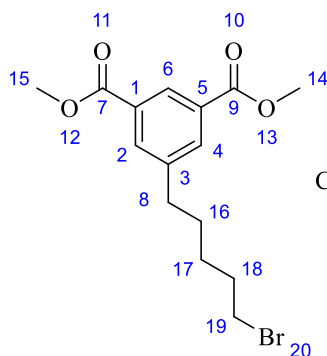
56

Chemical Formula: $C_{14}H_{17}BrO_4$

Molecular Weight: 329,19

According to the general procedure I, Ph_3P (0.54 g, 2.07 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(4-hydroxybutyl)isophthalate **52** (0.50 g, 1.88 mmol, 1.0 eq) with DCM_{anh} (25 mL) under Argon at $0^\circ C$. Then, NBS (0.33 g, 1.88 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. Then, the reaction was concentrated to dryness and purified by a flash chromatography (PE/EA 9/1) to give a white solid (0.47 g, 74 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.48. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.52 (1H, m, H_6); 8.05 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, H_{14}/H_{15}); 3.42 (2H, t, $J_{H_{18}-H_{17}} = 6.36$ Hz, H_{18}); 2.75 (2H, t, $J_{H_8-H_{16}} = 7.59$ Hz, H_8); 1.78-1.94 (4H, m, H_{16}/H_{17}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.4 (C_7/C_9); 142.7 (C_3); 133.8 (C_2/C_4); 130.7 (C_1/C_5); 128.5 (C_6); 52.4 (C_{14}/C_{15}); 34.6 (C_8); 33.2 (C_{18}); 32.1 (C_{17}); 29.6 (C_{16}). ESI-HRMS calculated for $[C_{14}H_{18}BrO_4]^+$ m/z 329.0382 and found m/z 329.0385. IR (neat, cm^{-1}): 2950.8m; 2870.5w; 1725.0s; 1603.4w; 1431.7s; 1250.3s; 1103.3w; 999.0m; 906.6w; 751.1m; 719.5w.

Dimethyl 3-(5-bromopentyl)isophthalate (**57**)



57

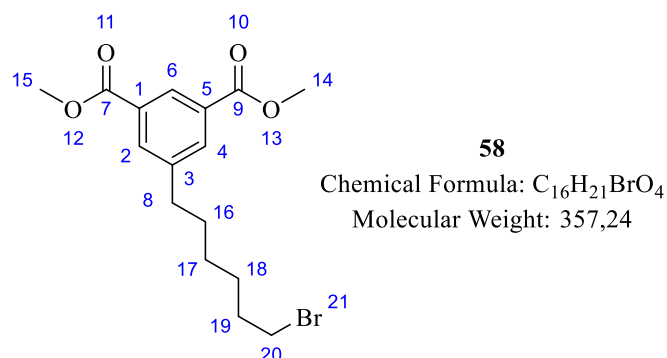
Chemical Formula: $C_{15}H_{19}BrO_4$

Molecular Weight: 343,22

According to the general procedure I, Ph_3P (0.51 g, 1.96 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(4-hydroxybutyl)isophthalate **53** (0.50 g, 1.78 mmol, 1.0 eq) with DCM_{anh} (25 mL) under Argon at $0^\circ C$. Then, NBS (0.32 g, 1.78 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. Then, the reaction was concentrated to dryness and purified by a flash chromatography (PE/EA 95/5) to give a white solid (0.45 g, 74 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.48. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.51 (1H, s, H_6); 8.04 (2H, s, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, H_{14}/H_{15}); 3.40 (2H, t, $J_{H_{19}-H_{18}} = 6.79$ Hz, H_{19}); 2.73 (2H, t, $J_{H_8-H_{16}} = 7.57$ Hz, H_8); 1.89 (2H, p, $J_{H_{18}-H_{19}} = 6.91$ Hz, H_{18}); 1.69 (2H, p, $J_{H_{16}-H_8} = 7.69$ Hz, H_{16}); 1.49 (2H, m, H_{17}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.4 (C_7/C_9); 143.2 (C_3); 133.8 (C_2/C_4); 130.7 (C_1/C_5); 128.4 (C_6); 52.3 (C_{14}/C_{15}); 35.3 (C_8); 33.5 (C_{19}); 32.5 (C_{18}); 30.3 (C_{16}); 27.7 (C_{17}). ESI-

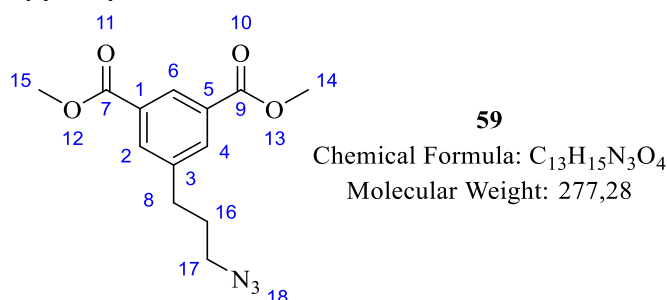
HRMS calculated for $[C_{15}H_{20}BrO_4]^+$ m/z 343.0539 and found m/z 343.0541. IR (neat, cm^{-1}): 2948.1 m ; 2862.7 w ; 1723.4 s ; 1599.9 w ; 1433.0 s ; 1245.6 s ; 1102.8 w ; 1004.5 m ; 752.3 m ; 719.0 w , 637.7 w .

Dimethyl 3-(6-bromohexyl)isophthalate (58)



According to the general procedure I, Ph_3P (0.49 g, 1.87 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of dimethyl 3-(6-hydroxyhexyl)isophthalate **54** (0.50 g, 1.70 mmol, 1.0 eq) with DCM_{anh} (25 mL) under Argon at $0^\circ C$. Then, NBS (0.30 g, 1.70 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction was stirred for 24 h at room temperature. Then, the reaction was concentrated to dryness and purified by a flash chromatography (PE/EA 95/5) to give a colorless oil (0.54 g, 89 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.51. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.50 (1H, m, H_6); 8.04 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, H_{14}/H_{15}); 3.40 (2H, t, $J_{H_{20}-H_{19}} = 6.80$ Hz, H_{20}); 2.72 (2H, t, $J_{H_8-H_{16}} = 7.61$ Hz, H_8); 1.85 (2H, p, $J_{H_{19}-H_{20}} = 6.81$ Hz, H_{19}); 1.67 (2H, p, $J_{H_{16}-H_8} = 7.54$ Hz, H_{16}); 1.47 (2H, m, H_{18}); 1.36 (2H, m, H_{17}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.5 (C_7/C_9); 143.4 (C_3); 133.8 (C_2/C_4); 130.6 (C_1/C_5); 128.3 (C_6); 52.3 (C_{14}/C_{15}); 35.4 (C_8); 33.8 (C_{20}); 32.7 (C_{19}); 31.0 (C_{16}); 28.3 (C_{18}); 28.0 (C_{17}). ESI-HRMS calculated for $[C_{16}H_{22}BrO_4]^+$ m/z 357.0695 and found m/z 357.0701. IR (neat, cm^{-1}): 2933.3 m ; 2857.2 w ; 1721.4 s ; 1599.9 w ; 1432.7 m ; 1318.4 m ; 1235.9 s ; 1125.7 w ; 1001.2 w ; 754.1 m ; 721.3 w .

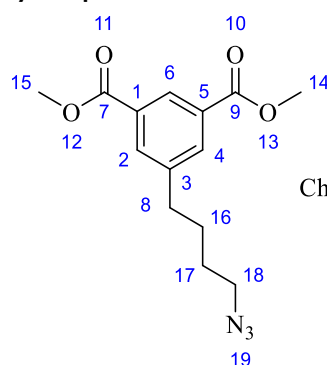
Dimethyl 3-(3-azidopropyl)isophthalate (59)



According to the general procedure J, in a flame dried micro-wave tube, dimethyl 3-(3-bromopropyl)isophthalate **55** (0.30 g, 0.95 mmol, 1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere. Then, sodium azide (0.93 g, 14.3 mmol, 15 eq) was added and the solution was heated at $110^\circ C$ under microwave irradiation for 1.5 min. Thus, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added, the organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na_2SO_4 anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure yellow pale

oil (0.24 g, 90 %) without further purification. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.40. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.53 (1H, m, H₆); 8.06 (2H, m, H₂/H₄); 3.95 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.32 (2H, t, *J*_{H17-H16} = 6.71 Hz, H₁₇); 2.82 (2H, t, *J*_{H8-H16} = 7.42 Hz, H₈); 1.95 (2H, q, *J*_{H16-H7} = 6.74 Hz, H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.3 (C₇/C₉); 141.8 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.9 (C₁/C₅); 128.7 (C₆); 52.4 (C₁₄/C₁₅); 50.5 (C₁₇); 32.4 (C₈); 30.2 (C₁₆). ESI-HRMS calculated for [C₁₃H₁₆N₃O₄]⁺ m/z 278.1135 and found m/z 278.1135. IR (neat, cm⁻¹): 2952.1m; 2093.8s; 1720.1s; 1601.7w; 1433.3m; 1318.8w; 1236.2s; 1203.1s; 1126.4w; 1109.5w; 997.7m; 912.1w; 753.3m; 721.3w.

Dimethyl 3-(4-azidobutyl)isophthalate (60)

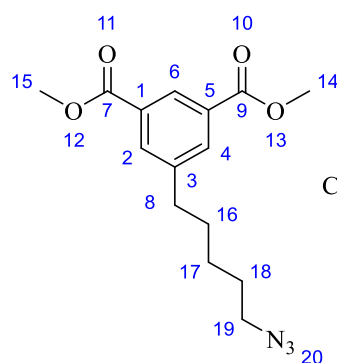


60

Chemical Formula: C₁₄H₁₇N₃O₄
Molecular Weight: 291,31

According to the general procedure J, in a flame dried micro-wave tube, dimethyl 3-(4-bromobutyl)isophthalate **56** (0.10 g, 0.31 mmol, 1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (5 mL) under argon atmosphere. Then, sodium azide (0.30 g, 4.6 mmol, 15 eq) was added and the solution was heated at 110°C under microwave irradiation for 1.5 min. Thus, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added, the organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure yellow pale oil (0.09 g, 99 %) without further purification. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.45. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.52 (1H, m, H₆); 8.05 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.22 (2H, t, *J*_{H18-H17} = 6.52 Hz, H₁₈); 2.75 (2H, t, *J*_{H8-H16} = 7.67 Hz, H₈); 1.76-1.93 (4H, m, H₁₆/H₁₇). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.4 (C₇/C₉); 142.7 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.7 (C₁/C₅); 128.5 (C₆); 52.4 (C₁₄/C₁₅); 34.5 (C₈); 51.5 (C₁₈); 30.0 (C₁₇); 27.8 (C₁₆). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₁₈N₃O₄]⁺ m/z 292.1203 and found m/z 292.1203. IR (neat, cm⁻¹): 2950.6m; 2093.5s; 1720.3s; 1600.9w; 1433.2m; 1320.5m; 1236.3s; 1203.1s; 1000.2m; 753.7m.

Dimethyl 3-(6-azidohexyl)isophthalate (61)

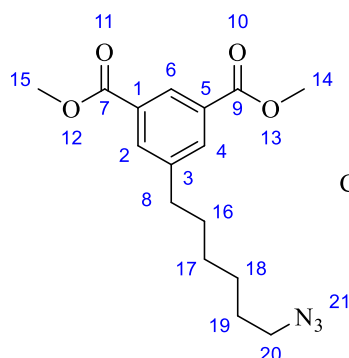


61

Chemical Formula: $C_{15}H_{19}N_3O_4$
Molecular Weight: 305,33

According to the general procedure J, in a flame dried micro-wave tube, dimethyl 3-(5-bromopentyl)isophthalate **57** (0.40 g, 1.16 mmol, 1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere. Then, sodium azide (1.14 g, 17.5 mmol, 15 eq) was added and the solution was heated at $110^{\circ}C$ under microwave irradiation for 1.5 min. Thus, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added, the organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na_2SO_4 anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure yellow pale oil (0.35 g, 99 %) without further purification. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.50. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.51 (1H, m, H₆); 8.04 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.26 (2H, t, $J_{H19-H18}$ = 6.86 Hz, H₁₉); 2.73 (2H, t, J_{H8-H16} = 7.66 Hz, H₈); 1.59-1.73 (4H, m, H₁₆/H₁₈); 1.42 (2H, m, H₁₇). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.4 (C₇/C₉); 143.2 (C₃); 133.8 (C₂/C₄); 130.7 (C₁/C₅); 128.4 (C₆); 52.3 (C₁₄/C₁₅); 51.3 (C₁₉); 35.4 (C₈); 30.7 (C₁₆); 28.7 (C₁₈); 26.3 (C₁₈). ESI-HRMS calculated for $[C_{15}H_{20}N_3O_4]^+$ m/z 306.1448 and found m/z 306.1451. IR (neat, cm^{-1}): 2939.1 m ; 2859.7 w ; 2093.0 s ; 1718.8 s ; 1601.7 w ; 1433.2 m ; 1318.3 m ; 1235.8 s ; 1125.8 w ; 1001.3 w ; 871.9 w ; 753.8 m ; 721.2 w .

Dimethyl 3-(6-azidohexyl)isophthalate (**62**)



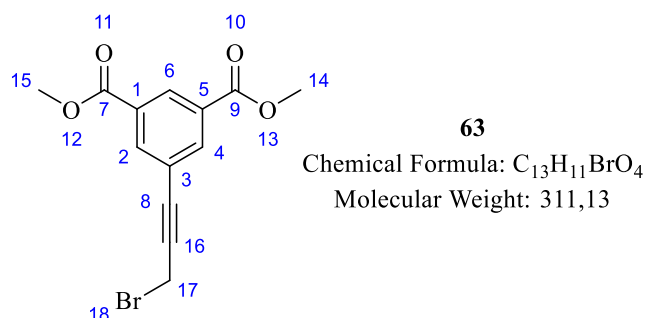
62

Chemical Formula: $C_{16}H_{21}N_3O_4$
Molecular Weight: 319,36

According to the general procedure J, in a flame dried micro-wave tube, dimethyl 3-(6-bromohexyl)isophthalate **58** (0.40 g, 1.11 mmol, 1.0 eq) was added to a DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere. Then, sodium azide (1.10 g, 16.8 mmol, 15 eq) was added and the solution was heated at $110^{\circ}C$ under microwave irradiation for 1.5 min. Thus, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added, the organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na_2SO_4 anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a pure colorless

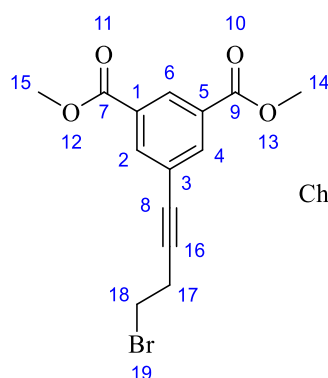
oil (0.35 g, 98 %) without further purification. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.49. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.51 (1H, m, H_6); 8.04 (2H, m, H_2/H_4); 3.94 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$); 3.25 (2H, t, $J_{\text{H}_{20}-\text{H}_{19}} = 6.84$ Hz, H_{20}); 2.72 (2H, t, $J_{\text{H}_8-\text{H}_{16}} = 7.53$ Hz, H_8); 1.67 (2H, m, H_{16}); 1.60 (2H, m, H_{19}); 1.32-1.46 (4H, m, $\text{H}_{18}/\text{H}_{17}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.5 (C_7/C_9); 143.4 (C_3); 133.8 (C_2/C_4); 130.6 (C_1/C_5); 128.3 (C_6); 52.3 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); 51.4 (C_{20}); 35.4 (C_8); 31.0 (C_{16}); 28.7 (C_{19}); 28.6 (C_{18}); 26.5 (C_{17}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4]^+$ m/z 320.1604 and found m/z 320.1604. IR (neat, cm^{-1}): 2934.0m; 2858.1w; 2092.9s; 1719.2s; 1600.9w; 1433.3m; 1317.4m; 1236.0s; 1125.8m; 1000.7w; 912.3w; 754.1m; 721.3w.

dimethyl 3-(3-bromoprop-1-yn-1-yl)isophthalate (63)



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(4-hydroxyprop-1-yn-1-yl)isophthalate **47** (1.0 g, 4.03 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (50 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (1.16 g, 4.43 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C . After 10 min, NBS (0.72 g, 4.03 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C . The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a yellow pale solid (1.08 g, 87 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.51. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.61 (1H, m, H_6); 8.27 (2H, m, H_2/H_4); 4.15 (2H, s, H_{17}); 3.95 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.4 (C_7/C_9); 136.8 (C_2/C_4); 131.0 (C_1/C_5); 130.7 (C_6); 123.2 (C_3); 86.1 (C_{16}); 84.5 (C_8); 52.6 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); 14.3 (C_{17}). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrO}_4]^+$ m/z 310.9913 and found m/z 310.9912. IR (neat, cm^{-1}): 3079.6w; 3013.5w; 2965.3w; 2951.2w; 1731.8s; 1598.0w; 1443.3s; 1338.6s; 1235.9s; 1120.9m; 1044.4m; 1002.7m; 904.1w; 876.3w; 748.2m; 722.3w.

dimethyl 3-(4-bromobut-1-yn-1-yl)isophthalate (64)



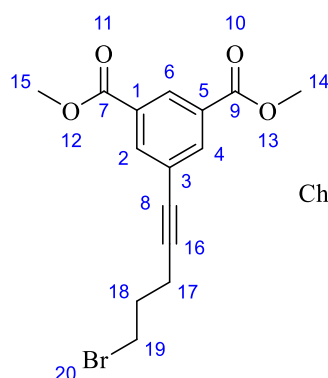
64

Chemical Formula: $C_{14}H_{13}BrO_4$

Molecular Weight: 325,16

According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)isophthalate **48** (1.0 g, 3.81 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (50 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (1.10 g, 4.19 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at $0^\circ C$. After 10 min, NBS (0.68 g, 3.81 mmol, 1.0 eq) was added at $0^\circ C$. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a white solid (0.94 g, 76 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.44. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.59 (1H, m, H_6); 8.25 (2H, m, H_2/H_4); 3.95 (6H, s, H_{14}/H_{15}); 3.53 (2H, t, $J_{H_{18}-H_{17}} = 7.19$ Hz, H_{18}); 3.00 (2H, t, $J_{H_{17}-H_{18}} = 7.13$ Hz, H_{17}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 165.7 (C_7/C_9); 136.8 (C_2/C_4); 131.0 (C_1/C_5); 130.1 (C_6); 124.4 (C_3); 88.9 (C_{16}); 80.8 (C_8); 52.7 (C_{14}/C_{15}); 29.3 (C_{18}); 24.0 (C_{17}). ESI-HRMS calculated for $[C_{14}H_{14}BrO_4]^+$ m/z 325.0069 and found m/z 325.0070. IR (neat, cm^{-1}): 3083.0w; 3037.4w; 2956.8w; 1715.8s; 1595.6w; 1440.2m; 1339.1m; 1246.4s; 1212.7s; 1124.2m; 1108.0m; 1017.7m; 996.1m; 957.9w; 916.6w; 877.6w; 754.1w; 723.3w.

dimethyl 3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)isophthalate (65)



65

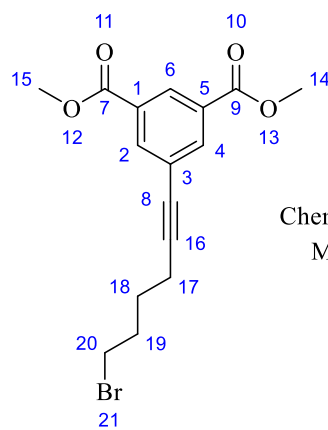
Chemical Formula: $C_{15}H_{15}BrO_4$

Molecular Weight: 339,19

According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)isophthalate **49** (1.0 g, 3.62 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (50 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (1.04 g, 3.98 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at $0^\circ C$. After 10 min, NBS (0.64 g, 3.62 mmol, 1.0 eq) was added at $0^\circ C$. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The

resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a colorless oil (1.05 g, 85 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.52. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.57 (1H, m, H₆); 8.22 (2H, m, H₂/H₄); 3.95 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.59 (2H, t, *J*_{H19-H18} = 6.43 Hz, H₁₉); 2.64 (2H, t, *J*_{H17-H18} = 6.76 Hz, H₁₇); 2.15 (2H, q, *J*_{H18-H19} = 6.56 Hz, H₁₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.8 (C₇/C₉); 136.7 (C₂/C₄); 131.0 (C₁/C₅); 129.8 (C₆); 124.8 (C₃); 90.4 (C₁₆); 80.0 (C₈); 52.6 (C₁₄/C₁₅); 32.4 (C₁₉); 31.5 (C₁₈); 18.2 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₁₆BrO₄]⁺ m/z 339.0226 and found m/z 339.0225. IR (neat, cm⁻¹): 2952.2w; 2842.8w; 1724.3s; 1597.5w; 1436.8m; 1338.7m; 1239.2s; 1125.1w; 1105.3w; 1039.7w; 999.5w; 912.3w; 875.3w; 753.7m; 722.8w.

dimethyl 3-(6-bromohex-1-yn-1-yl)isophthalate (66)



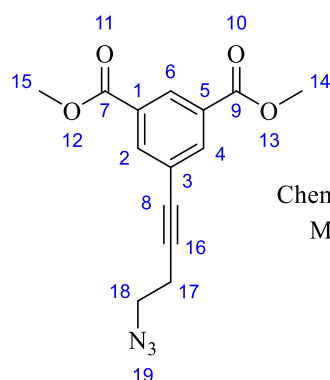
66

Chemical Formula: C₁₆H₁₇BrO₄

Molecular Weight: 353.21

According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(6-hydroxyhex-1-yn-1-yl)isophthalate **50** (1.0 g, 3.44 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (50 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.99 g, 3.79 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.61 g, 3.44 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a white solid (1.01 g, 83 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.54. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.56 (1H, m, H₆); 8.21 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.47 (2H, t, *J*_{H20-H19} = 6.56 Hz, H₂₀); 2.48 (2H, t, *J*_{H17-H18} = 6.96 Hz, H₁₇); 2.05 (2H, q, *J*_{H19-H20} = 6.79 Hz, H₁₉); 1.78 (2H, q, *J*_{H18-H17} = 7.14 Hz, H₁₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.8 (C₇/C₉); 136.7 (C₂/C₄); 130.9 (C₁/C₅); 129.7 (C₆); 125.0 (C₃); 91.6 (C₁₆); 79.6 (C₈); 52.6 (C₁₄/C₁₅); 33.2 (C₂₀); 31.8 (C₁₉); 27.1 (C₁₈); 18.7 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₈BrO₄]⁺ m/z 353.0382 and found m/z 353.0382. IR (neat, cm⁻¹): 3075.1w; 2998.6w; 2952.7w; 2853.9w; 1731.2s; 1595.0m; 1437.1s; 1340.7w; 1245.7s; 1127.6w; 1103.3w; 1003.7m; 970.9m; 908.7w; 833.5w; 751.8m; 721.3w.

dimethyl 3-(4-azidobut-1-yn-1-yl)isophthalate (68)



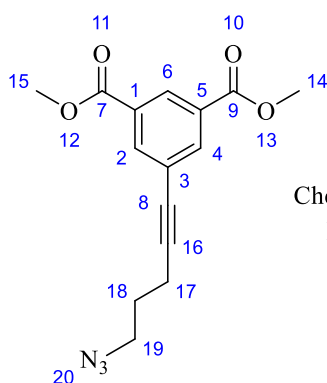
68

Chemical Formula: $C_{14}H_{13}N_3O_4$

Molecular Weight: 287,28

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(4-bromobut-1-yn-1-yl)isophthalate **64** (0.92 g, 2.82 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (0.28 g, 4.38 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 2 h. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na_2SO_4 anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 92:8) to give a colorless oil (0.62 g, 77 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.45. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.59 (1H, m, H_6); 8.24 (2H, m, H_2/H_4); 3.95 (6H, s, H_{14}/H_{15}); 3.50 (2H, t, $J_{H18-H17} = 6.78$ Hz, H_{18}); 2.73 (2H, t, $J_{H17-H18} = 6.72$ Hz, H_{17}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 165.8 (C_7/C_9); 136.8 (C_2/C_4); 131.0 (C_1/C_5); 130.1 (C_6); 124.4 (C_3); 88.2 (C_{16}); 80.9 (C_8); 52.6 (C_{14}/C_{15}); 49.9 (C_{18}); 20.7 (C_{17}). ESI-HRMS calculated for $[C_{14}H_{14}N_3O_4]^+ m/z$ 288.0978 and found m/z 288.0977. IR (neat, cm^{-1}): 2953.1w; 2091.7s; 1724.0s; 1597.4w; 1438.1m; 1339.9m; 1239.7s; 1125.8w; 1105.7w; 1049.4w; 999.4w; 912.5w; 753.8m; 722.8w.

dimethyl 3-(5-azidopent-1-yn-1-yl)isophthalate (69)



69

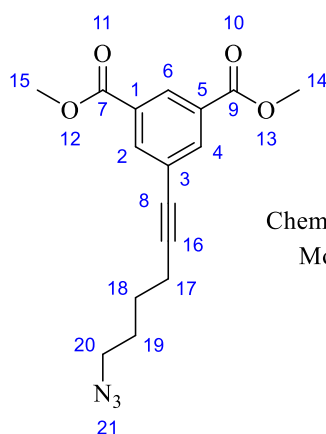
Chemical Formula: $C_{15}H_{15}N_3O_4$

Molecular Weight: 301,30

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)isophthalate **65** (0.80 g, 2.36 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (0.23 g, 3.54 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 3h30. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL)

were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 9:1) to give a colorless oil (0.61 g, 86 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.46. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.57 (1H, m, H₆); 8.23 (2H, m, H₂/H₄); 3.95 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.49 (2H, t, *J*_{H19-H18} = 6.60 Hz, H₁₉); 2.56 (2H, t, *J*_{H17-H18} = 6.83 Hz, H₁₇); 1.89 (2H, q, *J*_{H18-H19} = 6.66 Hz, H₁₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.8 (C₇/C₉); 136.7 (C₂/C₄); 131.0 (C₁/C₅); 129.8 (C₆); 124.8 (C₃); 90.6 (C₁₆); 80.0 (C₈); 52.6 (C₁₄/C₁₅); 50.4 (C₁₉); 27.9 (C₁₈); 16.6 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₁₆N₃O₄]⁺ m/z 324.0954 and found m/z 324.0953. IR (neat, cm⁻¹): 2952.7m; 2095.1s; 1724.3s; 1597.2w; 1437.6m; 1339.1m; 1239.2s; 1125.6w; 1105.4w; 1042.9w; 999.9w; 912.7w; 874.9w; 753.9m; 722.8w.

dimethyl 3-(6-azidohex-1-yn-1-yl)isophthalate (70)



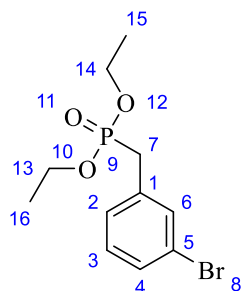
70

Chemical Formula: C₁₆H₁₇N₃O₄
Molecular Weight: 315.33

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, dimethyl 3-(5-bromohex-1-yn-1-yl)isophthalate **66** (0.80 g, 2.26 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (0.22 g, 3.40 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 3h30. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 9:1) to give a colorless oil (0.67 g, 94 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.46. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.57 (1H, m, H₆); 8.22 (2H, m, H₂/H₄); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 3.36 (2H, t, *J*_{H20-H19} = 6.33 Hz, H₂₀); 2.48 (2H, t, *J*_{H17-H18} = 6.84 Hz, H₁₇); 1.79 (2H, m, H₁₉); 1.71 (2H, m, H₁₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.9 (C₇/C₉); 136.7 (C₂/C₄); 131.0 (C₁/C₅); 129.7 (C₆); 125.0 (C₃); 91.7 (C₁₆); 79.6 (C₈); 52.6 (C₁₄/C₁₅); 51.2 (C₂₀); 28.2 (C₁₉); 25.8 (C₁₈); 19.1 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₈N₃O₄]⁺ m/z 316.1291 and found m/z 316.1294. IR (neat, cm⁻¹): 2951.5m; 2867.2w; 2093.6s; 1725.0s; 1597.4w; 1437.8m; 1340.9m; 1239.1s; 1125.4w; 1105.4w; 999.8m; 912.5w; 875.4w; 753.9m; 722.9w.

Diethyl (5-bromobenzyl) phosphonate (**72**)

CAS: 128833-03-4



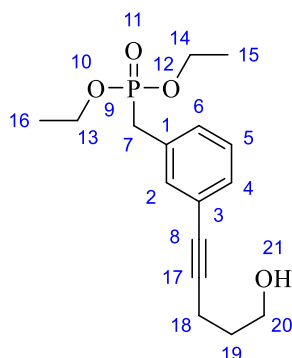
72

Chemical Formula: $C_{11}H_{16}BrO_3P$

Molecular Weight: 307,12

In a microwave sealed tube, a commercially available 3-bromobenzyl bromide **71** (4.26 g, 17.0 mmol, 1.3 eq) was dissolved in 10 mL of anhydrous DMF under argon atmosphere. Then, triethyl phosphite (2.42 mL, 14.1 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred under microwave irradiation at 150°C for 2 min. The resulting reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane (4 × 40 mL). The residue was purified by a flash chromatography (PE/EA 1/1) to give a yellow pale oil (4.11 g, 79 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.65. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.43 (1H, m, H₆); 7.37 (1H, m, H₄); 7.23 (1H, m, H₂); 7.17 (1H, m, H₃); 4.02 (4H, q, $J_{H_{13}/H_{14}} = 7.16$ Hz, H₁₃/H₁₄); 3.09 (2H, d, $J_{H_7-P_9} = 21.72$ Hz, H₇); 1.25 (6H, t, $J_{H_{15}/H_{16}-H_{13}/H_{14}} = 7.10$ Hz, H₁₅/H₁₆). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 134.1 (d, $J = 9.14$ Hz, C₁); 132.9 (d, $J = 6.73$ Hz, C₆); 130.2 (d, $J = 2.26$ Hz, C₄); 130.1 (d, $J = 1.73$ Hz, C₃); 128.6 (d, $J = 6.43$ Hz, C₂); 122.6 (d, $J = 3.58$ Hz, C₅); 62.4 (d, $J = 6.75$ Hz, C₁₃/C₁₄); 33.5 (d, $J = 138.7$ Hz, C₇); 16.5 (d, $J = 5.95$ Hz, C₁₅/C₁₆). ^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 25.4 (P₉). ESI-HRMS calculated for $[C_{11}H_{17}BrO_3P]^+$ m/z 307.0093 and found m/z 307.0091. IR (neat, cm^{-1}): 3476.2w; 2980.8m; 2906.6w; 1591.1w; 1567.6w; 1474.1w; 1427.5w; 1391.4w; 1245.5m; 1163.0w; 1050.0s; 1020.7s; 958.9s; 860.8w; 800.7w; 774.4w, 689.2w.

Diethyl (3-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (**73**)



73

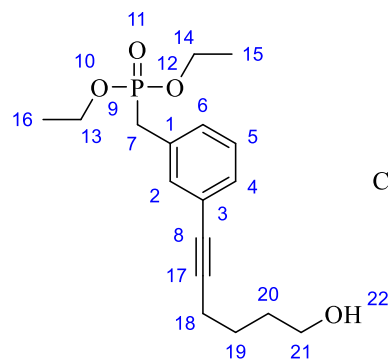
Chemical Formula: $C_{16}H_{23}O_4P$

Molecular Weight: 310,33

According to the general procedure G, 4-pentyn-1-ol (0.47 mL, 4.88 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of diethyl (5-bromobenzyl) phosphonate **72** (1.5 g, 4.88 mmol, 1.0 eq), copper iodide (93 mg, 0.48 mmol, 10 mol%), $Pd(Ph_3P)_2Cl_2$ (0.17 g, 0.24 mmol, 5 mol%) and Et_3N (28.6 mL, 205 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 24 h at 60°C. Then, the residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give a yellow pale oil (1.04 g, 69

%). Rf (DCM/MeOH 9:1) = 0.46. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.37 (1H, s, H_2); 7.32 (1H, m, H_4); 7.27 (1H, m, H_6); 7.26 (1H, m, H_5); 4.06 (4H, m, $\text{H}_{13}/\text{H}_{14}$); 3.86 (2H, q, $J_{\text{H}_{20}-\text{H}_{19}} = 5.84$ Hz, H_{20}); 3.14 (2H, d, $J_{\text{H}_7-\text{P}_9} = 21.42$ Hz, H_7); 2.58 (2H, t, $J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{19}} = 6.98$ Hz, H_{18}); 1.90 (2H, q, $J_{\text{H}_{19}-\text{H}_{18}} = 6.57$ Hz, H_{19}); 1.63 (1H, t, $J_{\text{H}_{21}-\text{H}_{20}} = 5.36$ Hz, $\text{O}-\text{H}_{21}$); 1.29 (6H, t, $J_{\text{H}_{15}/\text{H}_{16}-\text{H}_{14}/\text{H}_{13}} = 6.99$ Hz, $\text{H}_{15}/\text{H}_{16}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 133.0 (d, $J = 7.03$ Hz, C_2); 131.9 (d, $J = 9.05$ Hz, C_1); 130.2 (d, $J = 3.59$ Hz, C_4); 129.3 (d, $J = 6.22$ Hz, C_6); 128.6 (d, $J = 3.11$ Hz, C_5); 124.2, (d, $J = 2.99$ Hz, C_3); 89.7 (C_{17}); 81.0 (C_8); 62.3 (d, $J = 7.00$ Hz, $\text{C}_{13}/\text{C}_{14}$); 61.9 (C_{20}); 33.7 (d, $J = 138.02$ Hz, C_7); 31.5 (C_{19}); 16.5 (d, $J = 6.06$ Hz, $\text{C}_{15}/\text{C}_{16}$). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.0 (P_9). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{P}]^+$ m/z 311.1406 and found m/z 311.1406. IR (neat, cm^{-1}): 3404.8br; 2981.5w; 2929.7w; 1599.9w; 1579.0w; 1482.9w; 1429.7w; 1391.6w; 1227.6m; 1163.3w; 1049.5s; 1020.5s; 962.6s; 806.9w; 696.1w.

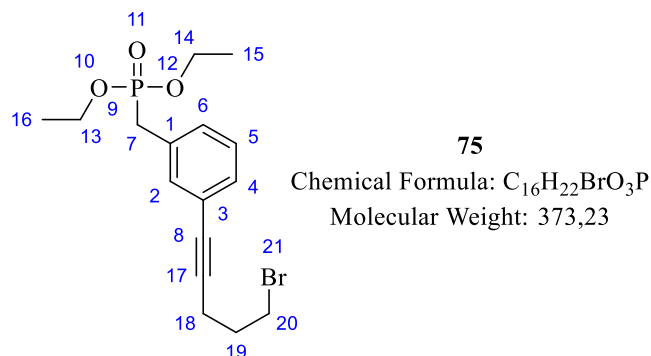
Diethyl (3-(5-hydroxyhex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (74)



74
Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{P}$
Molecular Weight: 324,36

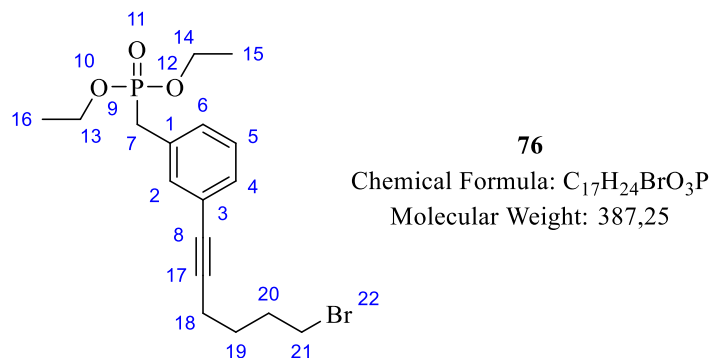
According to the general procedure G, 5-hexyn-1-ol (0.56 mL, 4.88 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of diethyl (5-bromobenzyl) phosphonate **72** (1.5 g, 4.88 mmol, 1.0 eq), copper iodide (93 mg, 0.48 mmol, 10 mol%), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ (0.17 g, 0.24 mmol, 5 mol%) and Et_3N (28.6 mL, 205 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 24 h at 60°C. Then, the residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give a yellow pale oil (0.53 g, 35 %). Rf (DCM/MeOH 9:1) = 0.53. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.35 (1H, s, H_2); 7.30 (1H, m, H_4); 7.25 (1H, m, H_6); 7.24 (1H, m, H_5); 4.04 (4H, m, $\text{H}_{13}/\text{H}_{14}$); 3.74 (2H, q, $J_{\text{H}_{21}-\text{H}_{20}} = 5.81$ Hz, H_{21}); 3.13 (2H, d, $J_{\text{H}_7-\text{P}_9} = 21.63$ Hz, H_7); 2.47 (2H, t, $J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{19}} = 6.84$ Hz, H_{18}); 1.66-1.82 (4H, m, $\text{H}_{20}/\text{H}_{19}$); 1.38 (1H, t, $J_{\text{H}_{22}-\text{H}_{21}} = 5.39$ Hz, $\text{O}-\text{H}_{22}$); 1.27 (6H, t, $J_{\text{H}_{15}/\text{H}_{16}-\text{H}_{14}/\text{H}_{13}} = 7.08$ Hz, $\text{H}_{15}/\text{H}_{16}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 132.9 (d, $J = 6.60$ Hz, C_2); 131.8 (d, $J = 8.18$ Hz, C_1); 130.0 (d, $J = 3.66$ Hz, C_4); 129.1 (d, $J = 6.55$ Hz, C_6); 128.4 (d, $J = 3.27$ Hz, C_5); 124.2, (d, $J = 3.09$ Hz, C_3); 90.1 (C_{17}); 80.7 (C_8); 62.5 (C_{21}); 62.2 (d, $J = 6.86$ Hz, $\text{C}_{13}/\text{C}_{14}$); 61.9 (C_{20}); 33.5 (d, $J = 138.31$ Hz, C_7); 31.9 (C_{20}); 25.0 (C_{19}); 19.2 (C_{18}); 16.4 (d, $J = 5.96$ Hz, $\text{C}_{15}/\text{C}_{16}$). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.0 (P_9). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{P}]^+$ m/z 325.1563 and found m/z 325.1562. IR (neat, cm^{-1}): 3408.3br; 2981.3w; 2934.5w; 2865.6w; 1598.7w; 1482.9w; 1430.0w; 1228.9m; 1163.1w; 1050.2s; 1020.7s; 961.9s; 807.0w; 695.6w.

Diethyl (3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (75)



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, diethyl (3-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **73** (0.25 g, 0.81 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (15 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.23 g, 0.89 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.14 g, 0.81 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 1:1) to give a white solid (0.26 g, 87 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.75. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.32 (1H, s, H₂); 7.27 (1H, m, H₄); 7.23 (1H, m, H₆); 7.22 (1H, m, H₅); 4.02 (4H, m, H₁₃/H₁₄); 3.57 (2H, t, *J*_{H₂₀-H₁₉} = 6.53 Hz, H₂₀); 3.11 (2H, d, *J*_{H₇-P₉} = 21.67 Hz, H₇); 2.59 (2H, t, *J*_{H₁₈-H₁₉} = 6.76 Hz, H₁₈); 2.12 (2H, q, *J*_{H₁₉-H₂₀} = 6.32 Hz, H₁₉); 1.24 (6H, t, *J*_{H₁₅/H₁₆-H₁₄/H₁₃} = 7.01 Hz, H₁₅/H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 133.0 (d, *J* = 6.95 Hz, C₂); 132.3 (d, *J* = 9.64 Hz, C₁); 129.4 (d, *J* = 6.32 Hz, C₄); 128.7 (C₆); 128.6 (d, *J* = 2.63 Hz, C₅); 123.9, (d, *J* = 3.02 Hz, C₃); 88.3 (C₁₇); 81.5 (C₈); 62.4 (d, *J* = 6.68 Hz, C₁₃/C₁₄); 33.6 (d, *J* = 138.23 Hz, C₇); 32.5 (C₂₀); 31.7 (C₁₉); 18.3 (C₁₈); 16.5 (d, *J* = 5.88 Hz, C₁₅/C₁₆). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.0 (P₉). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₂₃BrO₃P]⁺ *m/z* 373.0562 and found *m/z* 373.0560. IR (neat, cm⁻¹): 3151.3*br*; 3074.1*br*; 2983.5*m*; 1770.5*m*; 1710.5*s*; 1685.6*s*; 1429.5*w*; 1369.9*m*; 1291.2*m*; 1239.0*m*; 1182.3*s*; 1051.3*m*; 1022.8*m*; 964.2*w*; 935.9*w*; 846.0*w*; 817.6*m*; 637.8*w*.

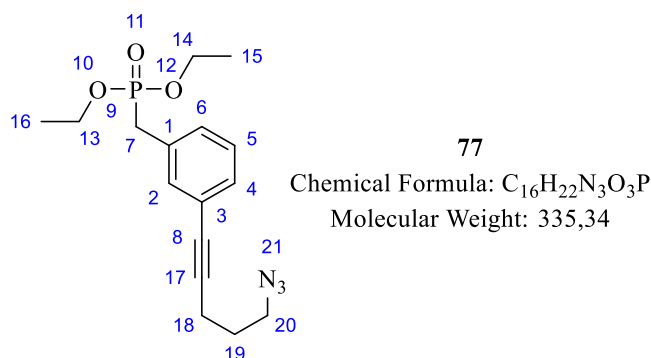
Diethyl (3-(5-bromohex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (76)



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, diethyl (3-(5-hydroxyhex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **74** (0.20 g, 0.62 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (15 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.18 g, 0.68 mmol, 1.1 eq) was added and the solution

was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.11 g, 0.62 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 1:1) to give a white solid (0.20 g, 83 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.73. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36 (1H, s, H₂); 7.31 (1H, m, H₄); 7.27 (1H, m, H₆); 7.26 (1H, m, H₅); 4.06 (4H, m, H₁₃/H₁₄); 3.52 (2H, t, *J*_{H21-H20} = 6.81 Hz, H₂₁); 3.15 (2H, d, *J*_{H7-P9} = 21.63 Hz, H₇); 2.50 (2H, t, *J*_{H18-H19} = 6.90 Hz, H₁₈); 2.09 (2H, q, *J*_{H20-H21} = 6.69 Hz, H₂₀); 1.80 (2H, *J*_{H19-H18} = 7.09 Hz, H₁₉); 1.29 (6H, t, *J*_{H15/H16-H14/H13} = 7.01 Hz, H₁₅/H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 133.0 (d, *J* = 7.01 Hz, C₂); 131.9 (d, *J* = 9.13 Hz, C₁); 130.2 (d, *J* = 3.50 Hz, C₄); 129.3 (d, *J* = 6.38 Hz, C₆); 128.6 (d, *J* = 3.26 Hz, C₅); 124.1, (d, *J* = 3.00 Hz, C₃); 89.6 (C₁₇); 81.1 (C₈); 62.4 (d, *J* = 7.03 Hz, C₁₃/C₁₄); 33.7 (d, *J* = 138.50 Hz, C₇); 33.4 (C₂₁); 31.9 (C₂₀); 27.2 (C₁₉); 18.7 (C₁₈); 16.5 (d, *J* = 6.09 Hz, C₁₅/C₁₆). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.0 (P₉). ESI-HRMS calculated for [C₁₇H₂₅BrO₃P]⁺ m/z 387.0719 and found m/z 387.0715. IR (neat, cm⁻¹): 3149.7br; 3072.6br; 2985.1m; 2958.6m; 2800.0w; 1770.4s; 1711.6s; 1682.6s; 1429.5w; 1370.9m; 1291.3m; 1239.0m; 1183.2s; 1051.6m; 1022.6m; 964.7w; 936.4w; 846.7m; 817.5m; 638.2m.

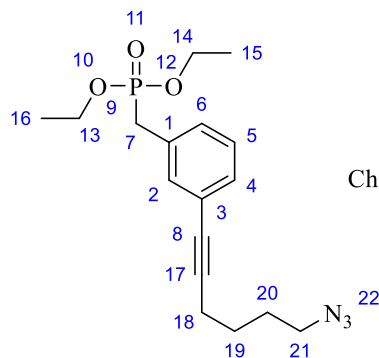
Diethyl (3-(5-azidopent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (77)



According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, diethyl (3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **75** (0.24 g, 0.64 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (84 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 7 h. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 3:7) to give a colorless oil (0.11 g, 50 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.77. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.33 (1H, s, H₂); 7.28 (1H, m, H₄); 7.24 (1H, m, H₆); 7.23 (1H, m, H₅); 4.02 (4H, m, H₁₃/H₁₄); 3.48 (2H, t, *J*_{H20-H19} = 6.76 Hz, H₂₀); 3.10 (2H, d, *J*_{H7-P9} = 21.71 Hz, H₇); 2.53 (2H, t, *J*_{H18-H19} = 6.92 Hz, H₁₈); 1.87 (2H, q, *J*_{H20-H21} = 6.81 Hz, H₁₉); 1.25 (6H, t, *J*_{H15/H16-H14/H13} = 7.02 Hz, H₁₅/H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 133.1 (d, *J* = 6.84 Hz, C₂); 132.0 (d, *J* = 8.91 Hz, C₁); 130.2 (d, *J* = 3.54 Hz, C₄); 129.4 (d, *J* = 6.38 Hz, C₆); 128.6 (d, *J* = 2.99 Hz, C₅); 124.0, (d, *J* = 3.21 Hz, C₃); 88.5 (C₁₇); 81.5 (C₈); 62.3 (d, *J* = 6.87 Hz, C₁₃/C₁₄); 50.4 (C₂₀); 33.7

(d, $J = 138.95$ Hz, C_7); 28.1 (C_{19}); 16.9 (C_{18}); 16.5 (d, $J = 5.93$ Hz, C_{15}/C_{16}). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 25.9 (P_9). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}]^+$ m/z 336.1471 and found m/z 336.1467. IR (neat, cm^{-1}): 3459.7w; 2981.0w; 2095.8s; 1715.0w; 1600.2w; 1579.1w; 1482.9w; 1430.7w; 1391.3w; 1366.8w; 1248.5m; 1163.6w; 1096.8w; 1051.1s; 1021.8s; 960.2m; 844.8w; 806.3w; 695.7w.

Diethyl (3-(5-azidohex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (78)



78

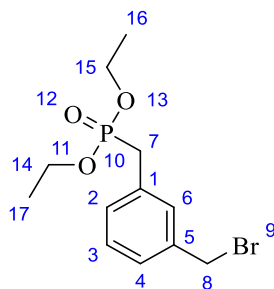
Chemical Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}$

Molecular Weight: 349.37

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, diethyl (3-(5-bromohex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **76** (0.18 g, 0.48 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (62 mg, 1.08 mmol, 2.0 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 7 h. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na_2SO_4 anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 3:7) to give a colorless oil (70 mg, 41 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.73. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.32 (1H, s, H_2); 7.31 (1H, m, H_4); 7.23 (1H, m, H_6); 7.21 (1H, m, H_5); 4.01 (4H, m, $\text{H}_{13}/\text{H}_{14}$); 3.34 (2H, t, $J_{\text{H}_{21}-\text{H}_{20}} = 6.61$ Hz, H_{21}); 3.10 (2H, d, $J_{\text{H}_7-\text{P}_9} = 21.59$ Hz, H_7); 2.45 (2H, t, $J_{\text{H}_{18}-\text{H}_{19}} = 6.87$ Hz, H_{18}); 1.78 (2H, m, H_{20}); 1.69 (2H, m, H_{19}); 1.24 (6H, t, $J_{\text{H}_{15}/\text{H}_{16}-\text{H}_{14}/\text{H}_{13}} = 7.02$ Hz, $\text{H}_{15}/\text{H}_{16}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 133.0 (d, $J = 6.79$ Hz, C_2); 131.9 (d, $J = 8.96$ Hz, C_1); 130.2 (d, $J = 3.71$ Hz, C_4); 129.3 (d, $J = 6.52$ Hz, C_6); 128.6 (d, $J = 3.08$ Hz, C_5); 124.2, (d, $J = 3.07$ Hz, C_3); 89.6 (C_{17}); 81.1 (C_8); 62.3 (d, $J = 6.83$ Hz, $\text{C}_{13}/\text{C}_{14}$); 51.2 (C_{21}); 33.7 (d, $J = 138.39$ Hz, C_7); 28.2 (C_{20}); 25.9 (C_{19}); 19.1 (C_{18}); 16.5 (d, $J = 5.93$ Hz, $\text{C}_{15}/\text{C}_{16}$). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26.0 (P_9). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}]^+$ m/z 350.1628 and found m/z 350.1631. IR (neat, cm^{-1}): 3441.7w; 2980.7m; 2933.7m; 2868.3w; 2093.7s; 1600.2w; 1579.3w; 1483.0w; 1430.5w; 1391.3w; 1247.3m; 1163.6w; 1051.4s; 1022.1s; 959.5m; 806.3w; 695.9w.

Diethyl (5-(bromomethyl)benzyl)phosphonate (**80**)

CAS: 120667-42-7



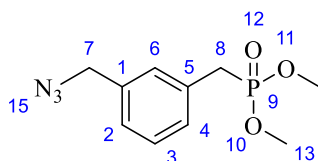
80

Chemical Formula: C₁₂H₁₈BrO₃P

Molecular Weight: 321,15

In a microwave sealed tube, a commercially available α,α' -dibromo-*m*-xylene **79** (3.62 g, 13.7 mmol, 2.0 eq) was dissolved in 7 mL of anhydrous DMF under argon atmosphere. Then, triethyl phosphite (1.18 mL, 6.9 mmol, 1.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred under microwave irradiation at 150°C for 2 min. The resulting reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane (4 × 40 mL). The residue was purified by a flash chromatography (PE/EA 2/8) to give a colorless oil (1.85 g, 84 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.73. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.33 (1H, m, H₆); 7.22-7.32 (3H, m, H₂/H₄/H₃); 4.48 (2H, s, H₈); 4.02 (4H, q, $J_{H_{14}/H_{15}-H_{17}/H_{16}} = 7.17$ Hz, H₁₄/H₁₅); 3.15 (2H, d, $J_{H_7-P_{10}} = 21.66$ Hz, H₇); 1.25 (6H, t, $J_{H_{17}/H_{16}-H_{14}/H_{15}} = 7.05$ Hz, H₁₆/H₁₇). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 138.0 (d, $J = 3.15$ Hz, C₅); 132.4 (d, $J = 9.13$ Hz, C₁); 130.4 (d, $J = 6.64$ Hz, C₆); 129.9 (d, $J = 6.48$ Hz, C₂); 129.0 (d, $J = 3.12$ Hz, C₃); 127.6 (d, $J = 3.61$ Hz, C₄); 62.2 (d, $J = 6.65$ Hz, C₁₄/C₁₅); 33.6 (d, $J = 138.26$ Hz, C₇); 33.3 (C₈); 16.4 (d, $J = 5.96$ Hz, C₁₆/C₁₇). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 25.8 (P₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₉BrO₃P]⁺ m/z 321.0249 and found m/z 321.0249. IR (neat, cm⁻¹): 3466.6br; 2980.1m; 2906.4w; 1735.4w; 1606.9w; 1488.5w; 1444.2w; 1391.2w; 1246.2m; 1161.7w; 1049.9s; 1021.3s; 959.5m; 844.9w; 806.4w; 786.7w, 689.4w.

dimethyl (1-(azidomethyl)benzyl)phosphonate (**81**)



81

Chemical Formula: C₁₀H₁₄N₃O₃P

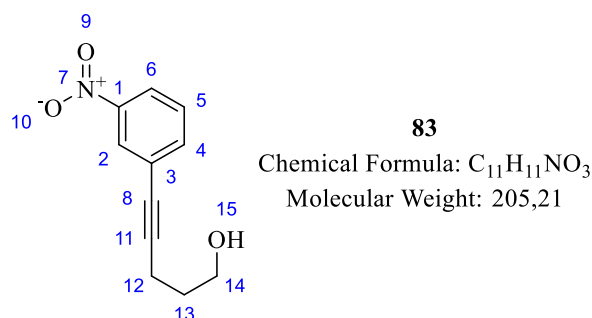
Molecular Weight: 255,21

In a flame dried round-bottom flask, dimethyl (1-(bromomethyl)benzyl)phosphonate **80** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (5 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (50 mg, 0.78 mmol, 2.3 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 24 h. Then, ethyl acetate (30 mL) and water (10 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (20 mL), once with brine (20 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo* to give a colorless oil (84 mg, 97 %) without further purification. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.32. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.35 (1H, m, H₆); 7.29 (1H, m, H₄); 7.25 (1H, m, H₃); 7.22 (1H, m, H₂); 4.33 (2H, s, H₇); 3.69 (3H, s, H₁₃/H₁₄);

3.66 (3H, s, H₁₃/H₁₄); 3.18 (2H, d, $J_{H8-P9} = 21.76$ Hz, H₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 136.0 (d, $J = 3.00$ Hz, C₁); 132.2 (d, $J = 9.19$ Hz, C₅); 129.9 (d, $J = 6.34$ Hz, C₄); 129.7 (d, $J = 6.59$ Hz, C₃); 129.3 (d, $J = 3.09$ Hz, C₂); 127.1 (d, $J = 3.53$ Hz, C₆); 54.7 (C₇); 53.1 (C₁₃/C₁₄); 33.0 (d, $J = 138.57$ Hz, C₈). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.0 (P₉). ESI-HRMS calculated for [C₁₀H₁₅N₃O₃P]⁺ m/z 256.0845 and found m/z 256.0842. IR (neat, cm⁻¹): 3459.1br; 2954.4w; 2851.7w; 2094.6s; 1698.0w; 1489.4w; 1446.7w; 1406.5w; 1345.5w; 1243.0s; 1182.8m; 1023.6s; 910.5w; 855.2m; 808.3m; 750.8w; 707.4w.

3-(1-nitrophenyl)pent-4-yn-1-ol (**83**)

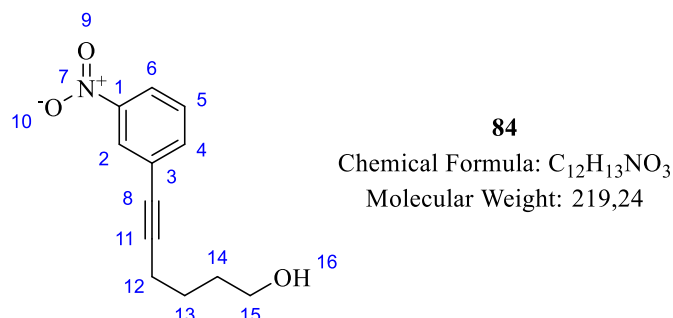
CAS: 500709-67-1



According to the general procedure G, 4-pentyn-1-ol (0.93 mL, 10.0 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of commercially available 1-iodo-3-nitrophenyl **82** (2.5 g, 10.0 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.19 g, 0.10 mmol, 10 mol%), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.35 g, 0.5 mmol, 5 mol%) and Et₃N (59 mL, 422 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 3 h at 60°C. Then, the residue was purified by a triple flash chromatography. The first using (EP/AcOEt 7/3 to 6/4), thus the second using (DCM/MeOH 99/1) and the last one chromatography using (Pentane/Acetone 8/2) to give a yellow pale oil (1.54 g, 75 %). Store on the refrigerator at 2-8°C. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.13. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (1H, m, H₂); 8.12 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.36$ Hz, H₆); 7.68 (1H, d, $J_{H4-H5} = 7.72$ Hz, H₄); 7.46 (1H, t, $J_{H5-H4} = 7.94$ Hz, H₅); 3.83 (2H, q, $J_{H14-H13} = 5.85$ Hz, H₁₄); 2.57 (2H, t, $J_{H12-H13} = 6.99$ Hz, H₁₂); 1.88 (2H, q, $J_{H13-H12} = 6.51$ Hz, H₁₃); 1.46 (1H, t, $J_{H15-H14} = 5.11$ Hz, O-H₁₅). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.2 (C₁); 137.4 (C₄); 129.3 (C₅); 126.6 (C₂); 125.8 (C₃); 122.6, (C₆); 92.7 (C₁₁); 79.1 (C₈); 62.7 (C₁₄); 31.3 (C₁₃); 16.1 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₁H₁₂NO₃]⁺ m/z 206.0811 and found m/z 206.0806. IR (neat, cm⁻¹): 3338.0br; 3082.4w; 2946.9w; 2226.4w; 1524.8s; 1476.2w; 1428.7w; 1347.4s; 1166.5w; 1051.7w; 897.9w; 805.0w; 734.6m; 673.1w.

3-(1-nitrophenyl)hex-4-yn-1-ol (**84**)

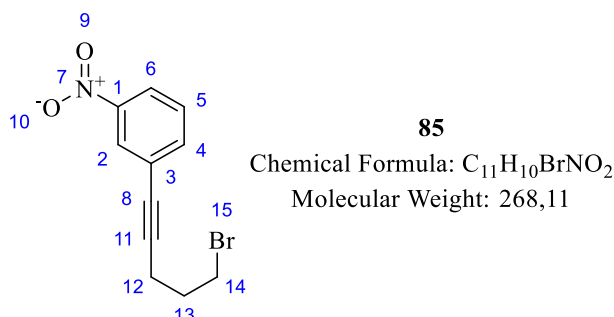
CAS: 872188-87-9



According to the general procedure G, 5-hexyn-1-ol (1.11 mL, 10.0 mmol, 1.0 eq) was added to the yellow solution of commercially available 1-iodo-3-nitrophenyl **82** (2.5 g, 10.0 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.19 g, 0.10 mmol, 10 mol%), Pd(PH₃P)₂Cl₂ (0.35 g, 0.5 mmol, 5 mol%) and Et₃N (59 mL, 422 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 3 h at 60°C. Then, the residue was purified by a triple flash chromatography. The first using (EP/AcOEt 7/3 to 6/4), thus the second using (DCM/MeOH 99/1) and the last one chromatography using (Pentane/Acetone 8/2) to give a yellow pale oil (2.06 g, 99 %). Store on the refrigerator at 2-8°C. R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.12. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.22 (1H, m, H₂); 8.11 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.58 Hz, H₆); 7.68 (1H, d, J_{H4-H5} = 7.69 Hz, H₄); 7.45 (1H, t, J_{H5-H4} = 7.99 Hz, H₅); 3.73 (2H, q, J_{H15-H14} = 5.67 Hz, H₁₅); 2.49 (2H, t, J_{H12-H13} = 6.78 Hz, H₁₂); 1.68-1.80 (2H, m, H₁₄/H₁₃); 1.33 (1H, t, J_{H16-H15} = 4.93 Hz, O-H₁₆). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.2 (C₁); 137.4 (C₄); 129.3 (C₅); 126.5 (C₂); 125.9 (C₃); 122.5, (C₆); 93.2 (C₁₁); 79.0 (C₈); 62.5 (C₁₅); 32.0 (C₁₄); 24.9 (C₁₃); 19.3 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₄NO₃]⁺ m/z 220.0968 and found m/z 220.0968. IR (neat, cm⁻¹): 3341.2br; 3082.6w; 2939.0m; 2866.1w; 2229.1w; 1525.4s; 1476.2w; 1428.3w; 1347.4s; 1059.9w; 897.3w; 805.0w; 757.9w; 734.8m; 673.3w.

3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene (**85**)

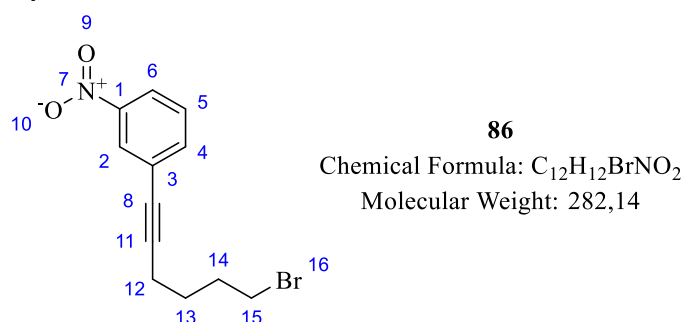
CAS: 2142427-10-7



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, 3-(1-nitrophenyl)pent-4-yn-1-ol **83** (0.25 g, 1.22 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (15 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.35 g, 1.34 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.22 g, 1.22 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature

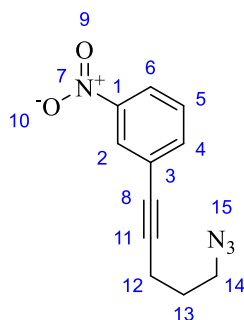
for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 97:3) to give a white solid (0.28 g, 85 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.66. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (1H, m, H₂); 8.13 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 7.69 (1H, d, *J*_{H4-H5} = 8.30 Hz, H₄); 7.47 (1H, t, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 3.58 (2H, t, *J*_{H14-H13} = 6.41 Hz, H₁₄); 2.65 (2H, t, *J*_{H12-H13} = 7.08 Hz, H₁₂); 2.16 (2H, q, *J*_{H13-H12} = 6.66 Hz, H₁₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.3 (C₁); 137.5 (C₄); 129.4 (C₅); 126.6 (C₂); 125.6 (C₃); 122.7, (C₆); 91.2 (C₁₁); 79.6 (C₈); 32.3 (C₁₄); 31.4 (C₁₃); 18.3 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₁H₁₁BrNO₂]⁺ m/z 267.9967 and found m/z 267.9958. IR (neat, cm⁻¹): 3081.3w; 2962.9w; 2230.2w; 1525.4s; 1476.4w; 1429.0w; 1348.2s; 1300.3w; 1271.9w; 1246.1w; 1096.1w; 1079.5w; 898.9w; 804.9w; 734.3m; 673.2w.

3-(5-bromohex-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene (86)



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, 3-(1-nitrophenyl)hex-4-yn-1-ol **84** (0.25 g, 1.14 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (15 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.33 g, 1.25 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.20 g, 1.14 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 97:3) to give a white solid (0.26 g, 81 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.68. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (1H, m, H₂); 8.12 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.12 Hz, H₆); 7.68 (1H, d, *J*_{H4-H5} = 7.52 Hz, H₄); 7.46 (1H, t, *J*_{H5-H6} = 8.05 Hz, H₅); 3.48 (2H, t, *J*_{H15-H14} = 6.55 Hz, H₁₅); 2.49 (2H, t, *J*_{H12-H13} = 7.13 Hz, H₁₂); 2.06 (2H, q, *J*_{H14-H13} = 6.98 Hz, H₁₄); 1.80 (2H, q, *J*_{H13-H12} = 7.23 Hz, H₁₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.3 (C₁); 137.5 (C₄); 129.3 (C₅); 126.6 (C₂); 125.8 (C₃); 122.6, (C₆); 92.5 (C₁₁); 79.3 (C₈); 33.2 (C₁₅); 31.9 (C₁₄); 27.0 (C₁₃); 18.8 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₃BrNO₂]⁺ m/z 282.0124 and found m/z 282.0125. IR (neat, cm⁻¹): 3080.9w; 2944.2w; 2231.3w; 1525.6s; 1476.5w; 1429.5w; 1347.8s; 1301.6w; 1249.4w; 1095.5w; 898.2w; 804.7w; 734.6m; 673.4w.

3-(5-azidopent-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene (87)



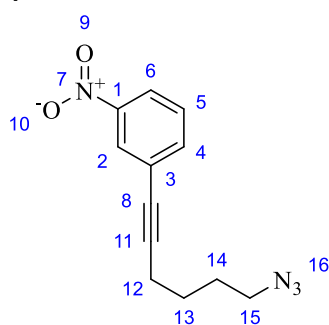
87

Chemical Formula: C₁₁H₁₀N₄O₂

Molecular Weight: 230,23

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, 3-(5-bromopent-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene **85** (0.26 g, 0.97 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (95 mg, 1.45 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 7 h. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a yellow pale oil (0.20 g, 91 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.56. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.24 (1H, m, H₂); 8.13 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.37 Hz, H₆); 7.69 (1H, d, *J*_{H4-H5} = 7.58 Hz, H₄); 7.47 (1H, t, *J*_{H5-H6} = 8.05 Hz, H₅); 3.49 (2H, t, *J*_{H14-H13} = 6.58 Hz, H₁₄); 2.57 (2H, t, *J*_{H12-H13} = 6.82 Hz, H₁₂); 1.90 (2H, q, *J*_{H13-H12} = 6.77 Hz, H₁₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.3 (C₁); 137.5 (C₄); 129.4 (C₅); 126.6 (C₂); 125.5 (C₃); 122.7, (C₆); 91.5 (C₁₁); 79.6 (C₈); 50.4 (C₁₄); 27.9 (C₁₃); 16.9 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₁H₁₀N₄O₂]⁺ m/z 231.0876 and found m/z 231.0875. IR (neat, cm⁻¹): 3083.1w; 2935.7w; 2871.4w; 2233.1w; 2094.7s; 1526.0s; 1476.8w; 1450.8w; 1347.9s; 1297.8w; 1254.1m; 1095.9w; 1079.1w; 899.2w; 805.3w; 734.9m; 673.6w.

3-(5-azidohex-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene (88)



88

Chemical Formula: C₁₂H₁₂N₄O₂

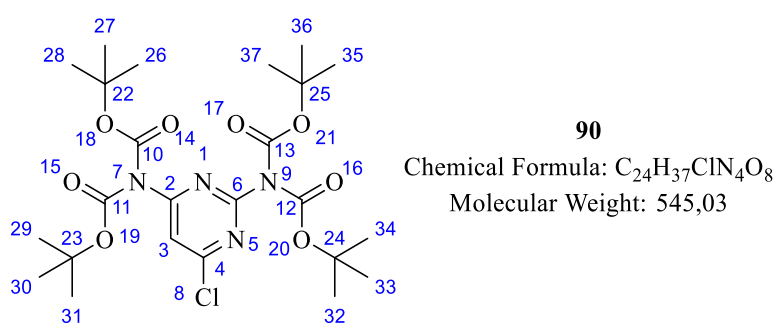
Molecular Weight: 244,25

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, 3-(5-bromohex-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene **86** (0.25 g, 0.89 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (86 mg, 1.33 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 7 h. Then, ethyl acetate (80 mL) and water (30 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (30 mL), once with brine (30 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*.

The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 95:5) to give a yellow pale oil (0.22 g, 99 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.59. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.23 (1H, m, H₂); 8.13 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.42 Hz, H₆); 7.68 (1H, d, J_{H4-H5} = 7.69 Hz, H₄); 7.46 (1H, t, J_{H5-H6} = 8.03 Hz, H₅); 3.36 (2H, t, J_{H15-H14} = 6.41 Hz, H₁₅); 2.49 (2H, t, J_{H12-H13} = 6.81 Hz, H₁₂); 1.68-1.84 (4H, m, H₁₄/H₁₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.3 (C₁); 137.4 (C₄); 129.3 (C₅); 126.6 (C₂); 125.8 (C₃); 122.6, (C₆); 92.5 (C₁₁); 79.3 (C₈); 51.1 (C₁₅); 28.2 (C₁₄); 25.7 (C₁₃); 19.1 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₁₃N₄O₂]⁺ m/z 245.1033 and found m/z 245.1032. IR (neat, cm⁻¹): 3083.9w; 2942.6w; 2867.9w; 2229.4w; 2092.9s; 1571.4w; 1526.5s; 1476.6w; 1455.2w; 1347.8s; 1276.5w; 1095.8w; 1079.5w; 898.5w; 805.3w; 735.1m; 673.9w.

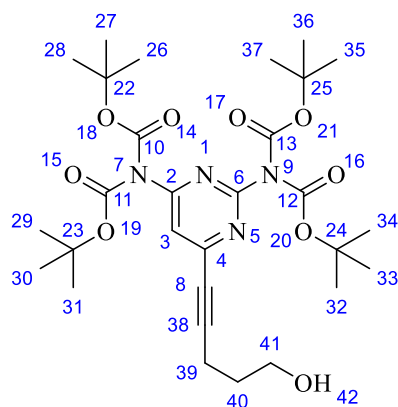
Di-tert-butyl (6-chloropyrimidine-2,4-diyl)bis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) (90)

CAS: 1378039-31-6



In microwave sealed-tube, 2,4-diamino-6-chloropyrimidine **89** (0.5 g, 3.45 mmol, 1.0 eq) was dissolved to a solution of dry THF (20 mL) under atmosphere. Dimethylaminopyridine (0.15 g, 1.21 mmol, 0.35 eq) and di-*ter*-butyl dicarbonate (4.05 g, 20.7 mmol, 6.0 eq) were added to this solution. The reaction mixture was stirred under microwave irradiation at 70°C for 30 min. After the fully conversion of the starting material, all volatiles was concentrated under reduce pressure *in vacuo*. Then, the residue was purified by flash chromatography using (EP/AcOEt 95/5) to give a pure white solid (3.40 g, 91 %). R_f (EP/ AcOEt 95/5) = 0.28. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.76 (1H, s, H₃); 1.54 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.41 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). This product was directly used for the next step without further more characterizations.

di-*tert*-butyl (6-4-hydroxypent-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((*tert*-butoxycarbonyl)carbamate) (91)

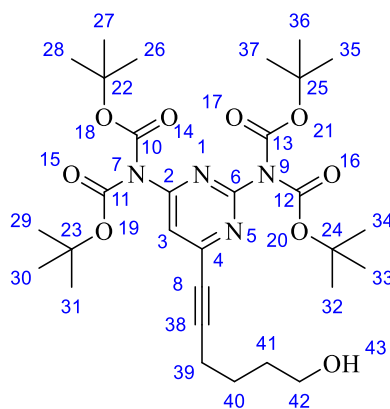


91

Chemical Formula: C₂₉H₄₄N₄O₉
Molecular Weight: 592,69

According to the general procedure G, 4-pentyn-1-ol (0.53 mL, 5.50 mmol, 1.0 eq) was added to the green solution of di-*tert*-butyl (6-chloropyrimidine-2,4-diyl) bis((*tert*-butoxycarbonyl) carbamate) **90** (3.0 g, 5.50 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.11 g, 0.55 mmol, 10 mol%), Pd(Ph₃P)₂Cl₂ (0.19 g, 0.27 mmol, 5 mol%) and Et₃N (32.2 mL, 231 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 24 h at 60°C. Then, the residue was purified by one flash chromatography using (DCM/MeOH 98/2) and by a second one using (PE/AcOEt 6:4) to give a yellow pale oil (2.20 g, 67 %). R_f (DCM/MeOH) = 0.68. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.68 (1H, s, H₃); 3.79 (2H, q, *J*_{H41-H40} = 5.64 Hz, H₄₁); 2.58 (2H, t, *J*_{H39-H40} = 7.01 Hz, H₃₉); 1.88 (2H, q, *J*_{H40-H41} = 6.60 Hz, H₄₀); 1.53 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.49 (1H, m, O-H₄₂); 1.41 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.9 (C₆); 157.5 (C₂); 153.2 (C₄); 150.3 (C₁₂/C₁₃); 149.8 (C₁₀/C₁₁); 111.6 (C₃); 95.7 (C₃₈); 84.8 (C₂₄/C₂₅); 83.4 (C₂₂/C₂₃); 79.2 (C₈); 61.5 (C₄₁); 30.9 (C₄₀); 28.0 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.8 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 16.1 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₄₅N₄O₉]⁺ m/z 593.3181 and found m/z 593.3178. IR (neat, cm⁻¹): 3450.1*br*; 2979.9*m*; 2935.9*w*; 2237.0*w*; 1737.5*s*; 1574.1*s*; 1531.7*m*; 1394.2*s*; 1293.8*s*; 1241.8*s*; 1153.9*s*; 1119.0*s*; 1045.5*m*; 985.0*w*; 849.5*m*; 793.2*w*.

di-*tert*-butyl (6-4-hydroxyhex-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((*tert*-butoxycarbonyl)-carbamate) (92)

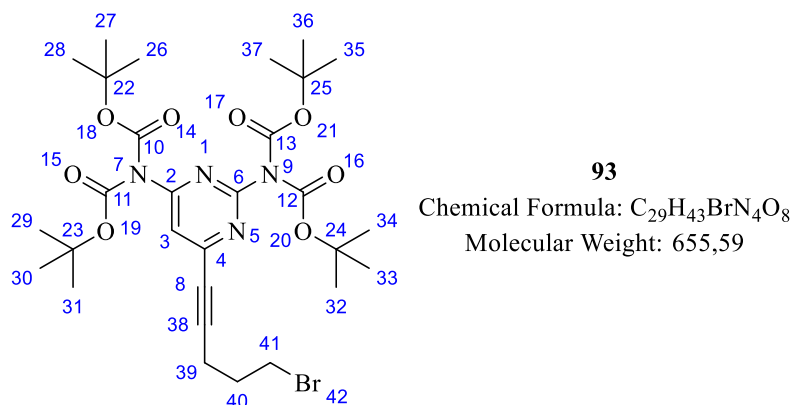


92

Chemical Formula: C₃₀H₄₆N₄O₉
Molecular Weight: 606,72

According to the general procedure G, 5-hexyn-1-ol (0.63 mL, 5.50 mmol, 1.0 eq) was added to the green solution of di-*tert*-butyl (6-chloropyrimidine-2,4-diyl) bis((*tert*-butoxycarbonyl) carbamate) **90** (3.0 g, 5.50 mmol, 1.0 eq), copper iodide (0.11 g, 0.55 mmol, 10 mol%), Pd(Ph₃P)₂Cl₂ (0.19 g, 0.27 mmol, 5 mol%) and Et₃N (32.2 mL, 231 mmol, 42 eq). The reaction mixture became dark suspension and was stirred for 24 h at 60°C. Then, the residue was purified by one flash chromatography using (DCM/MeOH 98/2) and by a second one using (PE/AcOEt 6:4) to give a yellow pale oil (2.14 g, 64 %). R_f (PE/AcOEt 8:2) = 0.14. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.68 (1H, s, H₃); 3.69 (2H, m, H₄₂); 2.50 (2H, m, H₃₉); 1.73 (4H, m, H₄₁/H₄₀); 1.53 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.41 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁); 1.34 (1H, m, O-H₄₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.9 (C₆); 157.5 (C₂); 153.3 (C₄); 150.3 (C₁₂/C₁₃); 149.8 (C₁₀/C₁₁); 111.7 (C₃); 96.3 (C₃₈); 84.8 (C₂₄/C₂₅); 83.4 (C₂₂/C₂₃); 79.2 (C₈); 62.4 (C₄₂); 32.0 (C₄₁); 28.0 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.8 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 24.5 (C₄₀); 19.4 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₄₇N₄O₉]⁺ m/z 607.3337 and found m/z 607.3338. IR (neat, cm⁻¹): 3441.5br; 2980.0m; 2935.5w; 2237.7w; 1737.3s; 1573.9s; 1531.7m; 1394.2m; 1294.2s; 1241.6s; 1154.1s; 1119.2s; 1045.5m; 985.6w; 849.2m; 791.5w.

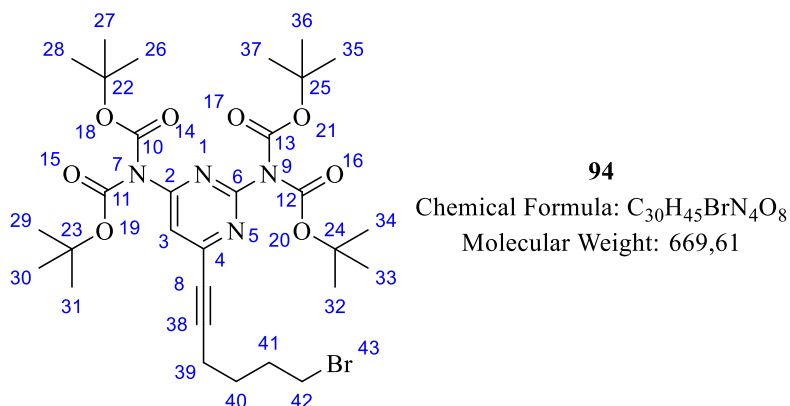
di-*tert*-butyl (6-4-bromopent-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((*tert*-butoxycarbonyl)carbamate) (93**)**



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, di-*tert*-butyl (6-4-hydroxypent-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((*tert*-butoxycarbonyl)carbamate) **91** (0.40 g, 0.67 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (30 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.19 g, 0.74 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.12 g, 0.67 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 85:15) to give a colorless oil (0.24 g, 55 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.34. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.70 (1H, s, H₃); 3.55 (2H, q, *J*_{H₄₁-H₄₀} = 6.27 Hz, H₄₁); 2.66 (2H, t, *J*_{H₃₉-H₄₀} = 6.81 Hz, H₃₉); 2.16 (2H, q, *J*_{H₄₀-H₃₉} = 6.90 Hz, H₄₀); 1.53 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.42 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.9 (C₆); 157.6 (C₂); 152.9 (C₄); 150.3

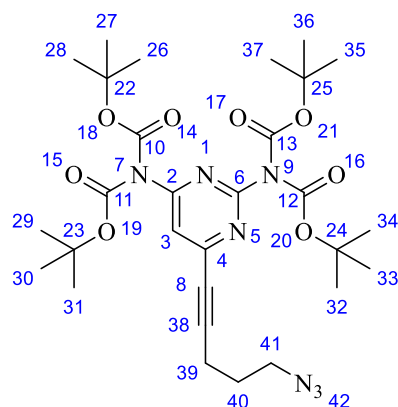
(C₁₂/C₁₃); 149.8 (C₁₀/C₁₁); 111.6 (C₃); 94.1 (C₃₈); 84.9 (C₂₄/C₂₅); 83.4 (C₂₂/C₂₃); 79.7 (C₈); 32.2 (C₄₁); 31.0 (C₄₀); 28.0 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.9 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 18.3 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₄₄BrN₄O₈]⁺ m/z 655.2337 and found m/z 655.2335. IR (neat, cm⁻¹): 2979.6m; 2934.9w; 2240.7w; 1737.9s; 1573.4s; 1533.0w; 1457.6w; 1394.0w; 1368.0m; 1293.1s; 1245.2s; 1153.8s; 1118.3s; 985.4w; 849.7m; 792.8w.

di-tert-butyl (6-4-bromohex-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) (94)



According to the general procedure I, in a flame dried round-bottom flask, di-tert-butyl (6-4-hydroxyhex-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diyl)bis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) **92** (0.40 g, 0.66 mmol, 1.0 eq) was added to a DCM_{anh} (30 mL) under argon atmosphere. Then, triphenylphosphine (0.19 g, 0.73 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred at 0°C. After 10 min, NBS (0.12 g, 0.66 mmol, 1.0 eq) was added at 0°C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 85:15) to give a colorless oil (0.16 g, 36 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.35. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.69 (1H, s, H₃); 3.45 (2H, t, J_{H42-H41} = 6.67 Hz, H₄₂); 2.50 (2H, t, J_{H39-H40} = 7.01 Hz, H₃₉); 2.03 (2H, q, J_{H41-H40} = 7.05 Hz, H₄₁); 1.80 (2H, q, J_{H40-H41} = 7.22 Hz, H₄₀); 1.53 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.42 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.9 (C₆); 157.5 (C₂); 153.1 (C₄); 150.3 (C₁₂/C₁₃); 149.8 (C₁₀/C₁₁); 111.6 (C₃); 95.4 (C₃₈); 84.9 (C₂₄/C₂₅); 83.4 (C₂₂/C₂₃); 79.5 (C₈); 33.1 (C₄₂); 31.8 (C₄₁); 31.0 (C₄₀); 28.0 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.9 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 18.8 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₄₆BrN₄O₈]⁺ m/z 669.2493 and found m/z 669.2488. IR (neat, cm⁻¹): 2979.5m; 2935.3w; 2238.6w; 1763.6s; 1735.5s; 1701.6m; 1573.4s; 1532.5w; 1457.6w; 1367.2m; 1291.0s; 1243.3s; 1154.5s; 1120.1s; 986.0w; 848.0m; 793.4w.

di-tert-butyl (6-4-azidopent-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diylbis((tert-butoxycarbonyl)carbamate)
(95)

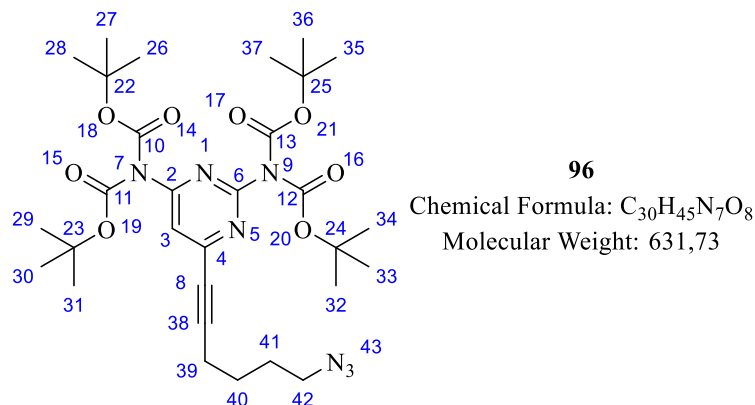


95

Chemical Formula: C₂₉H₄₃N₇O₈
Molecular Weight: 617,70

According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, di-tert-butyl (6-4-bromopent-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diylbis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) **93** (0.21 g, 0.32 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (31 mg, 0.48 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 h. Then, ethyl acetate (50 mL) and water (15 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (15 mL), once with brine (15 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 85:15) to give a colorless oil (55 mg, 42 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.34. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.70 (1H, s, H₃); 3.47 (2H, q, *J*_{H₄₁-H₄₀} = 6.55 Hz, H₄₁); 2.57 (2H, t, *J*_{H₃₉-H₄₀} = 6.99 Hz, H₃₉); 1.90 (2H, q, *J*_{H₄₀-H₃₉} = 6.68 Hz, H₄₀); 1.54 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.42 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.9 (C₆); 157.6 (C₂); 152.9 (C₄); 150.3 (C₁₂/C₁₃); 149.8 (C₁₀/C₁₁); 111.6 (C₃); 94.1 (C₃₈); 84.9 (C₂₄/C₂₅); 83.4 (C₂₂/C₂₃); 79.7 (C₈); 51.2 (C₄₁); 29.5 (C₄₀); 28.0 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.9 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 16.9 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₄₄N₇O₈]⁺ *m/z* 618.3245 and found *m/z* 618.3241. IR (neat, cm⁻¹): 2979.7*m*; 2935.2*w*; 2238.9*w*; 2097.9*m*; 1738.2*s*; 1573.6*s*; 1532.8*w*; 1457.6*w*; 1394.0*w*; 1368.1*s*; 1292.9*s*; 1248.4*s*; 1154.1*s*; 1119.1*s*; 985.8*w*; 849.9*w*; 793.4*w*.

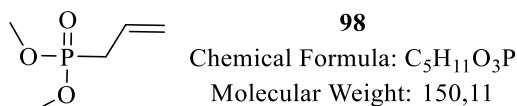
di-tert-butyl (6-4-azidohex-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diylbis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) (96)



According to the general procedure K, in a flame dried round-bottom flask, di-tert-butyl (6-4-bromohex-1-yn-1-yl)pyrimidine-1,5-diylbis((tert-butoxycarbonyl)carbamate) **94** (0.16 g, 0.24 mmol, 1.0 eq) was stirred with DMF_{anh} (10 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, sodium azide (23 mg, 0.36 mmol, 1.5 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 h. Then, ethyl acetate (50 mL) and water (15 mL) were added to the reaction mixture. This organic phase was washed five times with water (15 mL), once with brine (15 mL); then this was dried over Na₂SO₄ anhydrous and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 85:15) to give a colorless oil (55 mg, 37 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.35. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.69 (1H, s, H₃); 4.43 (2H, t, *J*_{H42-H41} = 6.11 Hz, H₄₂); 2.50 (2H, t, *J*_{H39-H40} = 6.86 Hz, H₃₉); 2.03 (2H, m, H₄₁); 1.80 (2H, m, H₄₀); 1.54 (18H, s, H₃₂/H₃₃/H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇); 1.43 (18H, s, H₂₆/H₂₇/H₂₈/H₂₉/H₃₀/H₃₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.7 (C₆); 157.4 (C₂); 153.8 (C₄); 150.1 (C₁₂/C₁₃); 150.0 (C₁₀/C₁₁); 111.5 (C₃); 95.3 (C₃₈); 84.8 (C₂₄/C₂₅); 83.3 (C₂₂/C₂₃); 80.0 (C₈); 51.0 (C₄₂); 32.7 (C₄₁); 28.1 (C₄₀); 27.9 (C₂₆/C₂₇/C₂₈/C₂₉/C₃₀/C₃₁); 27.8 (C₃₂/C₃₃/C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇); 19.7 (C₃₉). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₄₆N₇O₈]⁺ m/z 632.3402 and found m/z 632.3396. IR (neat, cm⁻¹): 2979.6m; 2935.2w; 2238.8w; 2096.1m; 1765.8m; 1737.7s; 1573.2s; 1532.5w; 1457.5w; 1368.0s; 1293.2s; 1245.7s; 1154.1s; 1118.8s; 985.6w; 850.0m; 792.1w.

dimethyl allylphosphonate (98)

CAS: 757-54-0

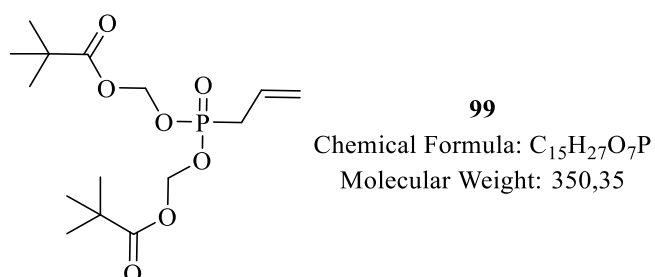


In a flame dried round-bottom flask, a commercially available allyl bromide (51 mL, 0.57 mol, 1.25 eq) was dissolved in anhydrous THF (400 mL) under argon atmosphere. Then, potassium carbonate (94 g, 0.68 mmol, 1.5 eq), *tert*-butylammonium bromide (2.9 g, 9.1 mmol, 2 mol%), dimethylphosphite **97** (41.2 mL, 0.45 mol, 1.0 eq) were added to this reaction mixture and this was stirred at room

temperature for 48 hours. Then, the resulting suspension was filtered and this filtrate was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting crude was purified by distillation at 130°C under reduce pressure (40 mm/Hg) to give a colorless liquid (53 g, 75 %). This product was directly used for the next step without further characterization.

((allylphosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (99)

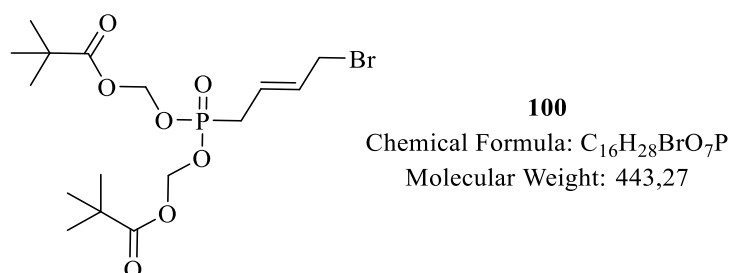
CAS: 1258789-63-7



In a flame dried round-bottom flask, dimethyl allylphosphonate **98** (4.78 mL, 33.31 mmol, 1.0 eq), sodium iodide (9.99 g, 66.6 mmol, 2.0 eq) and chloromethyl pivalate (12.1 mL, 83.28 mmol, 2.5 eq) were dissolved in anhydrous acetonitrile (40 mL) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred at 110°C for 72 hours. Then, the resulting reaction was stopped and diluted with Et₂O (150 mL), washed with water (30 mL) followed by another wash with Na₂S₂O₃ (30 mL), this was dried over MgSO₄, filtrated and was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting crude was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 8:2 to 7:3) to give a colorless oil (8.38 g, 72 %). This product was directly used for the next step without further characterization.

(E)-(((4-bromobut-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (100)

CAS: 1365350-40-8

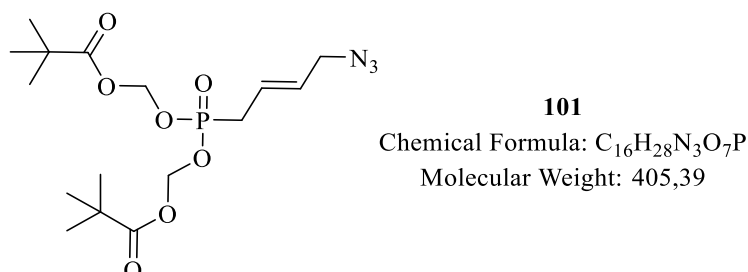


In a flame dried round-bottom flask, *bis*-(POM) allylphosphonate **99** (1.5 g, 4.3 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a solution of (*E*)-1,4-dibromobut-2-ene (3.66 g, 17.1 mmol, 4.0 eq) and Grubbs II catalyst (68.6 mg, 0.08 mmol, 0.05 eq) with anhydrous DCM (25 mL) under argon atmosphere. Then, the reaction mixture was stirred at reflux temperature for 18 hours. Then, the resulting reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting crude was purified by a flash

chromatography (PE/AcOEt 8:2) to give a light brown oil (1.61 g, 85 %). This product was directly used for the next step without further characterization.

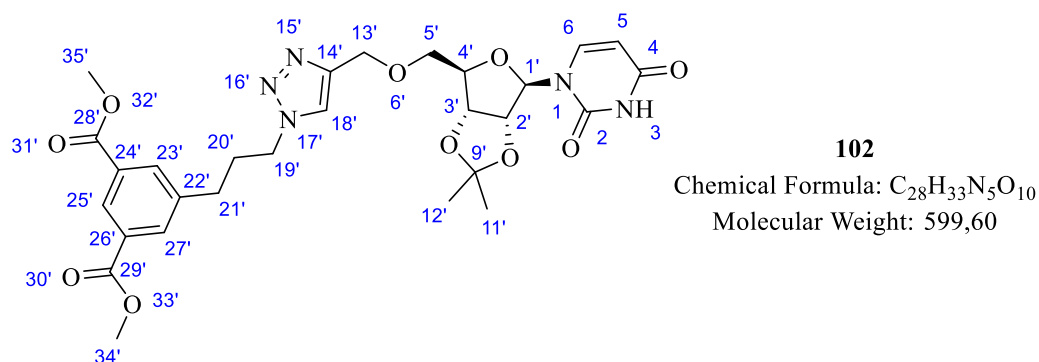
(E)-(((4-azidobut-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (101)

CAS: 1365350-63-5



Compound **100** (0.91 g, 2.05 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a solution of DMSO (20 mL), THF (8 mL) and H₂O (4 mL). Then, sodium azide (0.67 g, 10.3 mmol, 5.0 eq) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Then, the resulting reaction was stopped and diluted with Et₂O (50 mL) and H₂O (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (5 × 50 mL), washed with brine (20 mL) and dried over MgSO₄. Residuals solvents were dried to dryness *in vacuo*. The resulting crude was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 8:2) to give a light yellow oil (0.14 g, 69 %). This product was directly used for the next step without further characterization.

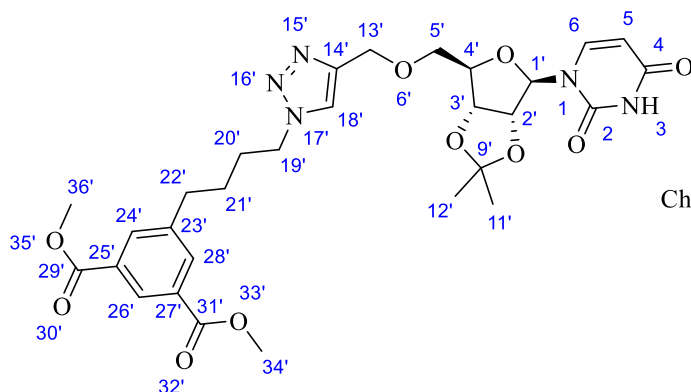
dimethyl 5-(4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl) (102)



According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (21 mg, 0.08 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (99 mg, 0.50 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 3-(4-azidopropyl)isophthalate **59** (230 mg, 0.83 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (267 mg, 0.83 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 3 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 97/3) to give the desired product as white solid (493 mg, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.51. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.54 (1H, m, H_{25'}); 8.21 (1H, s, N-H₃); 8.06

(2H, m, $H_{23'}/H_{27'}$); 7.57 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.09$ Hz, H_6); 7.48 (1H, s, $H_{18'}$); 5.86 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 2.25$ Hz, $H_{1'}$); 5.65 (1H, dd, $J_{H5-H6} = 8.06$ Hz, $J_{H5-H3} = 1.88$ Hz, H_5); 4.74-4.82 (2H, m, $H_3'/H_{2'}$); 4.62-4.71 (2H, m, $H_{13'}$); 4.35-4.42 (3H, m, $H_4'/H_{19'}$); 3.95 (6H, s, $H_{34'}/H_{35'}$); 3.78 (2H, qd, $J_{H5'-H5''} = 2.35$ Hz, $J_{H5'-H4'} = 10.56$ Hz, $H_{5'}$); 2.78 (2H, t, $J_{H21'-H20'} = 7.55$ Hz, $H_{21'}$); 2.30 (2H, q, $J_{H20'-H19'} = 7.21$ Hz, $H_{20'}$); 1.57 (3H, s, $H_{11'}/H_{12'}$); 1.33 (3H, s, $H_{11'}/H_{12'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.2 ($\text{C}_{28'}/\text{C}_{29'}$); 163.1 (C_2); 150.9 (C_4); 144.4 ($\text{C}_{14'}$); 144.1 ($\text{C}_{23'}$); 141.3 (C_6); 133.7 ($\text{C}_{23'}/\text{C}_{27'}$); 131.0 ($\text{C}_{24'}/\text{C}_{26'}$); 128.9 ($\text{C}_{25'}$); 122.4 ($\text{C}_{18'}$); 114.2 (C_9); 102.0 (C_5); 93.1 ($\text{C}_{1'}$); 85.6 (C_4); 85.1 (C_2); 81.0 (C_3); 70.4 (C_5); 64.6 ($\text{C}_{13'}$); 52.5 ($\text{C}_{34'}/\text{C}_{35'}$); 49.5 ($\text{C}_{19'}$); 32.2 ($\text{C}_{21'}$); 31.4 ($\text{C}_{20'}$); 27.2 ($\text{C}_{11'}/\text{C}_{12'}$); 25.3 ($\text{C}_{11'}/\text{C}_{12'}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ m/z 600.2300 and found m/z 600.2289. IR (neat, cm^{-1}): 3061.7br; 2989.3w; 2952.0w; 1710.8s; 1686.4s; 1455.2m; 1381.1m; 1326.6w; 1242.7s; 1157.3w; 1081.4m; 1000.5w; 852.8w; 812.9w; 754.2m. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.6$ ($\text{C} = 0.009$ M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl) (103)



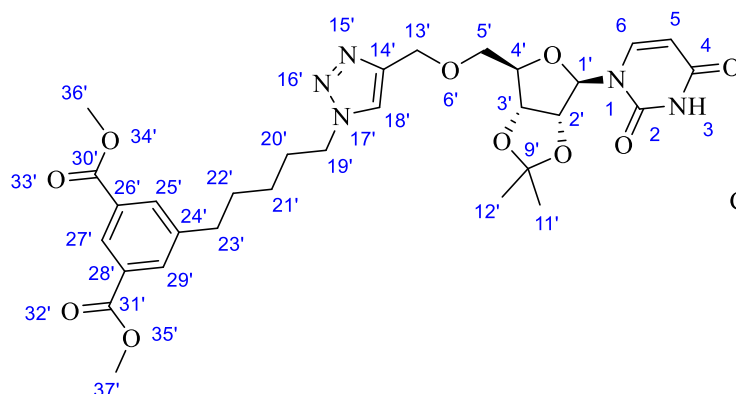
103

Chemical Formula: $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{10}$
Molecular Weight: 613,62

According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (6.4 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (31 mg, 0.15 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 3-(4-azidobutyl)isophthalate **60** (75 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (83 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) in 5 mL of $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1). After 2h30 at 40°C , the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 $\times$ 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 97/3) to give the desired product as white solid (135 mg, 85 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.57. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.51 (1H, m, $H_{26'}$); 8.05 (1H, s, $N\text{-H}_3$); 8.03 (2H, m, $H_{24'}/H_{28'}$); 7.57 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.12$ Hz, H_6); 7.45 (1H, s, $H_{18'}$); 5.88 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 2.56$ Hz, $H_{1'}$); 5.62 (1H, dd, $J_{H5-H6} = 8.08$ Hz, $J_{H5-H3} = 2.30$ Hz, H_5); 4.71-4.81 (2H, m, $H_3'/H_{2'}$); 4.61-4.69 (2H, m, $H_{13'}$); 4.35-4.40 (3H, m, $H_4'/H_{19'}$); 3.94 (6H, s, $H_{35'}/H_{36'}$); 3.78 (2H, qd, $J_{H5'-H5''} = 2.67$ Hz, $J_{H5'-H4'} = 10.69$ Hz, $H_{5'}$); 2.77 (2H, t, $J_{H22'-H21'} = 7.63$ Hz, $H_{22'}$); 1.91-1.99 (2H, m, $H_{20'}$); 1.67-1.76 (2H, m, $H_{21'}$); 1.57 (3H, s, $H_{11'}/H_{12'}$); 1.33 (3H, s, $H_{11'}/H_{12'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.3 ($\text{C}_{29'}/\text{C}_{30'}$); 163.8 (C_2); 153.5 (C_4); 143.7 ($\text{C}_{14'}$); 142.3 ($\text{C}_{23'}$); 141.3 (C_6); 133.8 ($\text{C}_{24'}/\text{C}_{28'}$); 130.8 ($\text{C}_{25'}/\text{C}_{27'}$); 128.6 ($\text{C}_{26'}$); 124.4 ($\text{C}_{18'}$); 114.2 (C_9); 102.0 (C_5); 92.9 ($\text{C}_{1'}$); 85.5 (C_4); 85.0 (C_2); 81.6 (C_3); 70.4 (C_5); 64.6 ($\text{C}_{13'}$); 52.4 ($\text{C}_{35'}/\text{C}_{36'}$); 50.1 ($\text{C}_{19'}$); 34.7 ($\text{C}_{22'}$);

29.7 (C_{20'}); 28.0 (C_{11'}/C_{12'}); 27.2 (C_{21'}); 25.3 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₃₆N₅O₁₀]⁺ m/z 614.2456 and found m/z 614.2449. IR (neat, cm⁻¹): 3063.1br; 2951.1w; 2865.3w; 1687.0s; 1454.9m; 1380.3m; 1332.9w; 1242.0s; 1156.9w; 1108.4m; 1081.2s; 1000.6w; 853.3w; 813.8w; 754.7m. [α]_D²⁰ = + 9.9 (C = 0.013 M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl) (104)

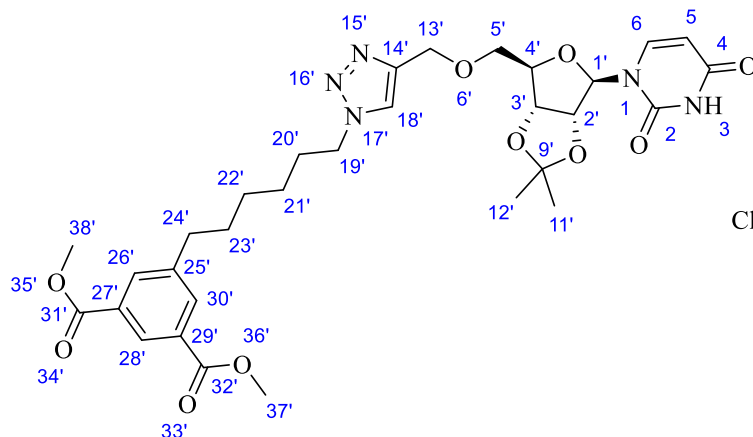


104

Chemical Formula: C₃₀H₃₇N₅O₁₀
Molecular Weight: 627,65

According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (29.4 mg, 0.12 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (140 mg, 0.71 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 3-(6-azidopentyl)isophthalate **61** (360 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (380 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of tBuOH:H₂O (2:1). After 3 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 98/2) to give the desired product as white solid (661 mg, 89 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.56. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.51 (1H, m, H_{27'}); 8.11 (1H, s, N-H₃); 8.03 (2H, m, H_{25'}/H_{29'}); 7.58 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 7.46 (1H, s, H_{18'}); 5.89 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 2.57 Hz, H_{1'}); 5.63 (1H, dd, J_{H5-H6} = 8.15 Hz, J_{H5-H3} = 2.28 Hz, H₅); 4.73-4.81 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.61-4.69 (2H, m, H_{13'}); 4.39 (1H, m, H_{4'}); 4.34 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.32 Hz, H_{19'}); 3.95 (6H, s, H_{36'}/H_{37'}); 3.78 (2H, qd, J_{H5'-H5''} = 2.58 Hz, J_{H5'-H4'} = 10.55 Hz, H_{5'}); 2.72 (2H, t, J_{H23'-H22'} = 7.65 Hz, H_{23'}); 1.95 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.22 Hz, H_{20'}); 1.71 (2H, q, J_{H22'-H23'} = 7.74 Hz, H_{22'}); 1.58 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.38 (2H, m, H_{21'}); 1.34 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.4 (C_{30'}/C_{31'}); 162.6 (C₂); 153.2 (C₄); 143.9 (C_{14'}); 142.9 (C_{24'}); 141.2 (C₆); 133.8 (C_{25'}/C_{29'}); 130.7 (C_{26'}/C_{28'}); 128.4 (C_{27'}); 122.3 (C_{18'}); 114.2 (C_{9'}); 102.0 (C₅); 92.8 (C_{1'}); 85.5 (C_{4'}); 85.0 (C_{2'}); 80.9 (C_{3'}); 70.4 (C_{5'}); 64.6 (C_{13'}); 52.4 (C_{36'}/C_{37'}); 50.2 (C_{19'}); 35.2 (C_{23'}); 30.5 (C_{22'}); 30.1 (C_{20'}); 27.2 (C_{11'}/C_{12'}); 26.0 (C_{21'}); 25.4 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₃₈N₅O₁₀]⁺ m/z 628.2613 and found m/z 628.2603. IR (neat, cm⁻¹): 2989.9w; 2946.0w; 2862.7w; 1712.8s; 1686.9s; 1455.0w; 1380.7w; 1331.1w; 1242.3s; 1156.6w; 1080.4m; 1000.6w; 853.4w; 812.6w; 754.9m. [α]_D²⁰ = - 28.3 (C = 0.038 M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl) (105)



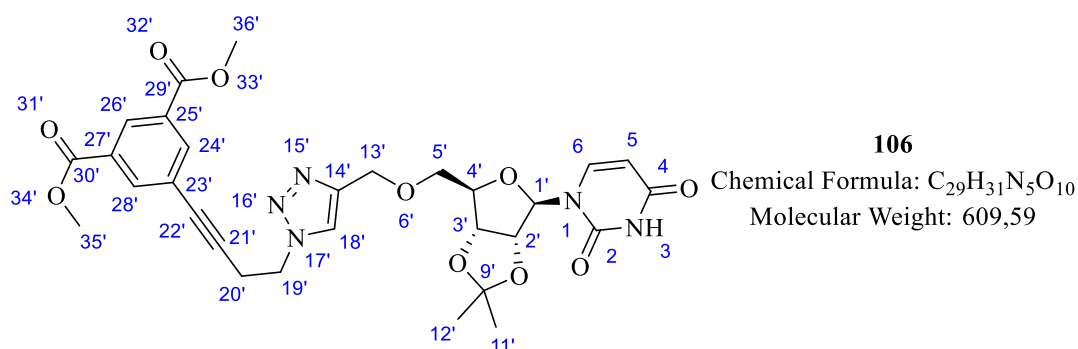
105

Chemical Formula: $C_{31}H_{39}N_5O_{10}$

Molecular Weight: 641,68

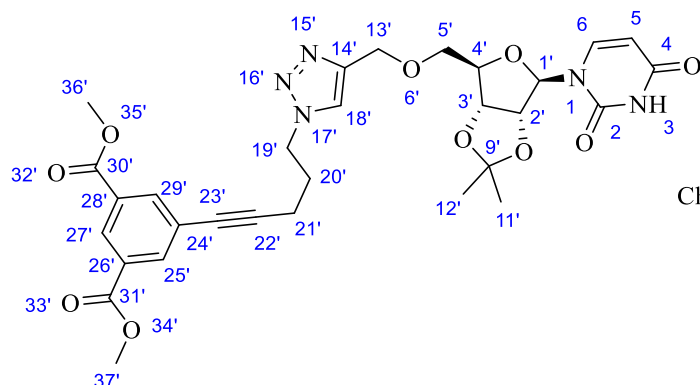
According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (26.6 mg, 0.11 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (127 mg, 0.64 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 3-(6-azidohexyl)isophthalate **62** (340 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (343 mg, 1.06 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of t BuOH:H₂O (2:1). After 3 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 98/2) to give the desired product as white solid (544 mg, 80 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.68. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.50 (1H, m, H_{28'}); 8.16 (1H, s, N-H₃); 8.03 (2H, m, H_{26'}/H_{30'}); 7.58 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 7.47 (1H, s, H_{18'}); 5.90 (1H, d, $J_{H1'-H2'}$ = 2.56 Hz, H_{1'}); 5.62 (1H, dd, J_{H5-H6} = 8.11 Hz, J_{H5-H3} = 2.18 Hz, H₅); 4.72-4.81 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.62-4.70 (2H, m, H_{13'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 4.34 (2H, t, $J_{H19'-H20'}$ = 7.13 Hz, H_{19'}); 3.94 (6H, s, H_{37'}/H_{38'}); 3.78 (2H, qd, $J_{H5'-H5''}$ = 2.72 Hz, $J_{H5'-H4'}$ = 10.66 Hz, H_{5'}); 2.70 (2H, t, $J_{H24'-H23'}$ = 7.45 Hz, H_{24'}); 1.90 (2H, m, H_{20'}); 1.65 (2H, m, H_{23'}); 1.57 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.43-1.42 (4H, m, H_{21'}/H_{22'}); 1.33 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C_{31'}/C_{32'}); 162.6 (C₂); 155.7 (C₄); 143.9 (C_{14'}); 143.3 (C_{25'}); 141.2 (C₆); 133.8 (C_{26'}/C_{30'}); 130.6 (C_{27'}/C_{29'}); 128.3 (C_{28'}); 122.3 (C_{18'}); 114.2 (C_{9'}); 102.1 (C₅); 92.7 (C_{1'}); 85.5 (C_{4'}); 85.0 (C_{2'}); 80.9 (C_{3'}); 70.4 (C_{5'}); 64.6 (C_{13'}); 52.4 (C_{37'}/C_{38'}); 50.3 (C_{19'}); 35.3 (C_{24'}); 30.9 (C_{23'}); 30.2 (C_{20'}); 28.5 (C_{21'}); 27.2 (C_{11'}/C_{12'}); 26.3 (C_{22'}); 25.3 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₄₀N₅O₁₀]⁺ m/z 642.2769 and found m/z 642.2761. IR (neat, cm⁻¹): 2990.1w; 2937.6m; 2858.8w; 1713.6s; 1687.3s; 1455.0m; 1380.3w; 1331.9w; 1241.6s; 1156.3w; 1080.6m; 1001.5w; 852.9w; 812.9w; 754.7w. [α]_D²⁰ = -18.9 (C = 0.021 M, MeOH).

dimethyl 5-(5-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-1-yn-1-yl)iso-phthalate (106)



According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (12 mg, 0.05 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (55 mg, 0.28 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 5-(5-azidobut-1-yn-1-yl)isophthalate **68** (0.13 g, 0.48 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (0.15 g, 0.48 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 4 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 97/3) to give the desired product as colorless oil (0.28 g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.57. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.59 (1H, m, H_{26'}); 8.18 (2H, m, H_{24'}/H_{28'}); 8.09 (1H, s, N-H₃); 7.66 (1H, s, H_{18'}); 7.56 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.14 Hz, H₆); 5.87 (1H, m, H_{1'}); 5.63 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.24 Hz, H₅); 4.70-4.79 (2H, m, H₃/H_{2'}); 4.65-4.70 (2H, m, H_{13'}); 4.62 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 6.59 Hz, H_{19'}); 4.35 (1H, m, H_{4'}); 3.95 (6H, s, H_{35'}/H_{36'}); 3.71-3.84 (2H, m, H_{5'}); 2.45 (2H, t, J_{H20'-H19'} = 6.73 Hz, H_{20'}); 1.56 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.31 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.7 (C_{29'}/C_{30'}); 162.8 (C₂); 150.0 (C₄); 144.2 (C_{14'}); 141.4 (C₆); 136.7 (C_{24'}/C_{28'}); 131.2 (C_{25'}/C_{27'}); 130.3 (C_{26'}); 123.9 (C_{23'}); 123.1 (C_{18'}); 114.3 (C₉); 102.2 (C₅); 92.9 (C_{1'}); 87.0 (C_{21'}); 85.6 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.9 (C_{22'}); 81.0 (C_{3'}); 70.5 (C_{5'}); 64.7 (C_{13'}); 52.7 (C_{35'}/C_{36'}); 49.0 (C_{19'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}); 21.7 (C_{20'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₃₂N₅O₁₀]⁺ m/z 610.2143 and found m/z 610.2136. IR (neat, cm⁻¹): 3059.6br; 2990.3w; 2952.9w; 1715.8s; 1686.1s; 1439.5m; 1381.8m; 1337.7m; 1245.7s; 1157.9w; 1106.9m; 1081.9m; 1049.4m; 999.4w; 913.0w; 853.0w; 813.6w; 755.3m, 732.6m. [α]_D²⁰ = +16.3 (C = 0.02 M, MeOH).

dimethyl 5-(5-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)isophthalate (107)

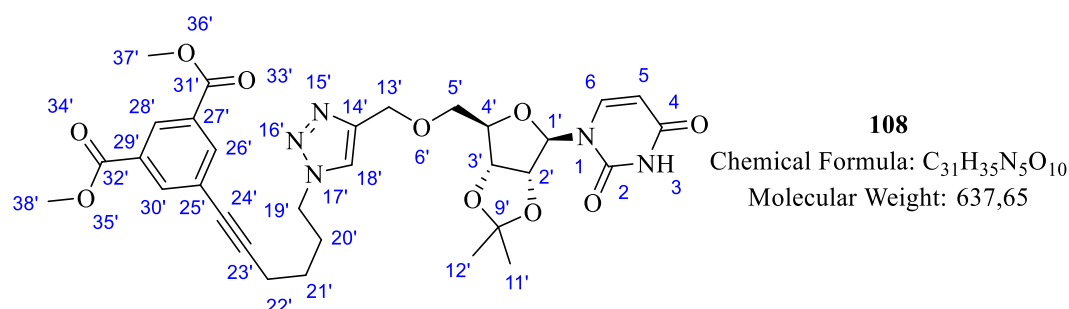


107

Chemical Formula: C₃₀H₃₃N₅O₁₀
Molecular Weight: 623,62

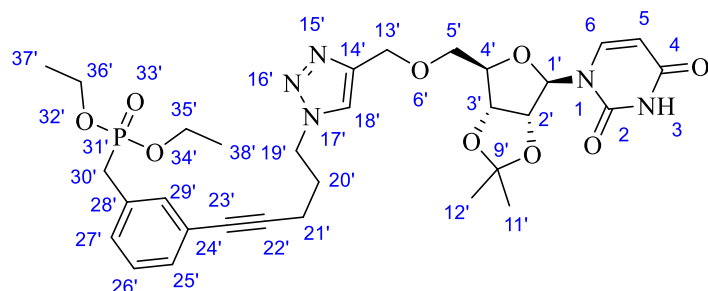
According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (23 mg, 0.09 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (110 mg, 0.56 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 5-(5-azidopent-1-yn-1-yl)isophthalate **69** (0.28 g, 0.93 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (0.30 g, 0.93 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 4 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 97/3) to give the desired product as pale yellow oil (0.58 g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.46. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.58 (1H, m, H_{27'}); 8.30 (1H, s, N-H₃); 8.23 (2H, m, H_{25'}/H_{29'}); 7.57 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.07 Hz, H₆); 7.56 (1H, s, H_{18'}); 5.87 (1H, m, H_{1'}); 5.64 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.09 Hz, H₅); 4.74-4.81 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.63-4.70 (2H, m, H_{13'}); 4.56 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 6.79 Hz, H_{19'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 3.95 (6H, s, H_{36'}/H_{37'}); 3.71-3.85 (2H, m, H_{5'}); 2.50 (2H, t, J_{H21'-H20'} = 6.76 Hz, H_{21'}); 2.24 (2H, q, J_{H20'-H21'} = 6.78 Hz, H_{20'}); 1.56 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.8 (C_{30'}/C_{31'}); 162.9 (C₂); 150.0 (C₄); 144.2 (C_{14'}); 141.5 (C₆); 136.7 (C_{25'}/C_{29'}); 131.1 (C_{26'}/C_{28'}); 130.0 (C_{27'}); 124.4 (C_{24'}); 123.0 (C_{18'}); 114.4 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 93.0 (C_{1'}); 89.7 (C_{22'}); 85.7 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.1 (C_{3'}); 80.6 (C_{23'}); 70.5 (C_{5'}); 64.7 (C_{13'}); 52.7 (C_{36'}/C_{37'}); 49.2 (C_{19'}); 28.9 (C_{20'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}); 16.8 (C_{21'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₃₄N₅O₁₀]⁺ m/z 624.2300 and found m/z 624.2291. IR (neat, cm⁻¹): 3065.6br; 2989.7w; 2953.2w; 1708.5s; 1688.8s; 1439.0m; 1342.2m; 1245.6s; 1221.9s; 1157.9w; 1083.1m; 999.8w; 912.4w; 853.7w; 814.0w; 755.5m; 722.8w. [α]_D²⁰ = + 7.4 (C = 0.02 M, MeOH).

dimethyl 5-(5-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)iso-phthalate (108)



According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (12 mg, 0.05 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (57 mg, 0.29 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 5-(5-azidohex-1-yn-1-yl)isophthalate **70** (0.15 g, 0.48 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (0.15 g, 0.48 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 5 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 97/3) to give the desired product as white solid (0.22 g, 73 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.58. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.57 (1H, m, H_{28'}); 8.22 (2H, m, H_{26'}/H_{30'}); 7.96 (1H, s, N-H₃); 7.58 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.07 Hz, H₆); 7.52 (1H, s, H_{18'}); 5.88 (1H, m, H_{1'}); 5.64 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.19 Hz, H₅); 4.72-4.82 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.62-4.72 (2H, m, H_{13'}); 4.44 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.08 Hz, H_{19'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 3.95 (6H, s, H_{37'}/H_{38'}); 3.71-3.86 (2H, m, H_{5'}); 2.51 (2H, t, J_{H22'-H21'} = 6.67 Hz, H_{22'}); 2.12 (2H, q, J_{H20'-H21'} = 6.91 Hz, H_{20'}); 1.66 (2H, q, J_{H21'-H20'} = 6.91 Hz, H_{21'}); 1.57 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.9 (C_{31'}/C_{32'}); 162.7 (C₂); 150.0 (C₄); 144.2 (C_{14'}); 141.4 (C₆); 136.7 (C_{26'}/C_{30'}); 131.0 (C_{27'}/C_{29'}); 129.8 (C_{28'}); 124.8 (C_{25'}); 122.5 (C_{18'}); 114.4 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 93.0 (C_{1'}); 91.2 (C_{23'}); 85.6 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.1 (C_{3'}); 79.9 (C_{24'}); 70.5 (C_{5'}); 64.7 (C_{13'}); 52.7 (C_{37'}/C_{38'}); 50.1 (C_{19'}); 29.5 (C_{20'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}/C_{21'}); 19.0 (C_{22'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₃₆N₅O₁₀]⁺ m/z 638.2456 and found m/z 638.2449. IR (neat, cm⁻¹): 3066.8br; 2987.8w; 2951.7w; 1715.9s; 1687.8s; 1439.5m; 1380.8m; 1342.5m; 1245.9s; 1157.2w; 1082.9m; 1047.4w; 1000.0w; 914.1w; 853.4w; 812.6w; 755.1m; 722.9w. [α]_D²⁰ = + 10.4 (C = 0.02 M, MeOH).

diethyl (3-(6-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (**109**)



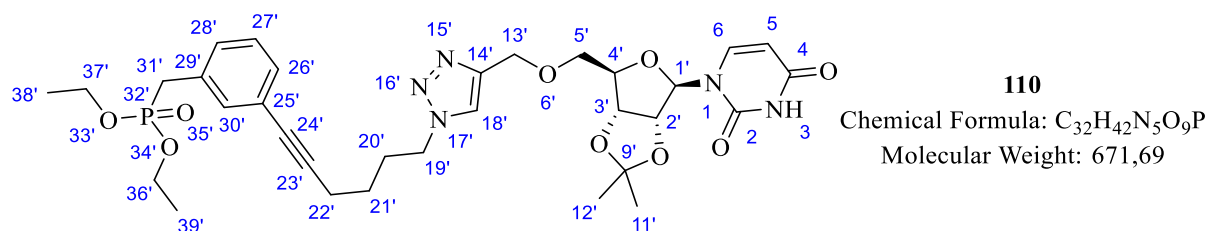
109

Chemical Formula: $C_{31}H_{40}N_5O_9P$

Molecular Weight: 657.66

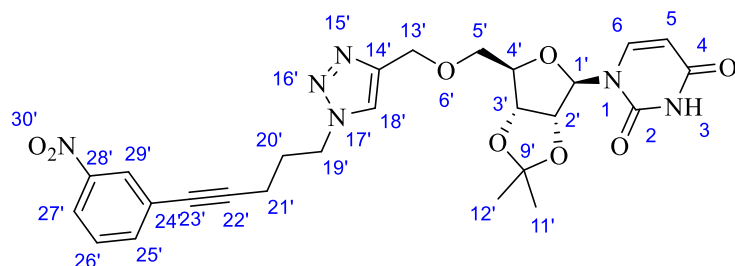
According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (8.2 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (39 mg, 0.20 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of diethyl (3-(5-azidopent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **77** (110 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) and 5'-*O*-propargyl-uridine **44** (110 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of t BuOH:H₂O (2:1). After 1h30 at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as colorless oil (0.16 g, 73 %). *R*_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.49. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.39 (1H, s, *N*-H₃); 7.57 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.26 Hz, H₆); 7.56 (1H, s, H_{18'}); 7.39 (1H, s, H_{29'}); 7.29 (1H, m, H_{25'}); 7.25 (1H, m, H_{27'}); 7.24 (1H, m, H_{26'}); 5.88 (1H, m, H_{1'}); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.12 Hz, H₅); 4.73-4.81 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.62-4.70 (2H, m, H_{13'}); 4.56 (2H, t, *J*_{H19'-H20'} = 6.85 Hz, H_{19'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 3.96-4.09 (4H, m, H_{35'}/H_{36'}); 3.71-3.85 (2H, m, H_{5'}); 3.13 (2H, d, *J*_{H30'-P31'} = 21.72 Hz, H_{30'}); 2.45 (2H, t, *J*_{H21'-H20'} = 6.72 Hz, H_{21'}); 2.21 (2H, q, *J*_{H20'-H19'} = 6.95 Hz, H_{20'}); 1.58 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.25 (6H, t, *J*_{H37'/H36'-H38'/H35'} = 6.93 Hz, H_{37'}/H_{38'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.9 (C₂); 149.9 (C₄); 144.1 (C_{14'}); 141.3 (C₆); 133.2 (d, *J* = 6.96 Hz, C_{29'}); 131.3 (d, *J* = 7.08 Hz, C_{28'}); 130.3 (d, *J* = 3.76 Hz, C_{25'}); 129.0 (d, *J* = 6.27 Hz, C_{27'}); 128.6 (d, *J* = 3.13 Hz, C_{26'}); 125.9 (d, *J* = 4.10 Hz, C_{24'}); 123.1 (C_{18'}); 114.3 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 93.0 (C_{1'}); 87.6 (C_{22'}); 85.7 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 82.3 (C_{23'}); 81.1 (C_{3'}); 70.5 (C_{5'}); 64.7 (C_{13'}); 62.4 (d, *J* = 6.41 Hz, C_{35'}/C_{36'}); 49.2 (C_{19'}); 33.5 (d, *J* = 138.64 Hz, C_{30'}); 29.1 (C_{20'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}); 16.7 (C_{21'}); 16.5 (d, *J* = 6.30 Hz, C_{37'}/C_{38'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.0 (P_{31'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₄₁N₅O₉P]⁺ *m/z* 658.2636 and found *m/z* 658.2628. IR (neat, cm⁻¹): 3060.9w; 2985.5m; 2936.2w; 1687.5s; 1456.4m; 1381.2m; 1217.8m; 1158.6w; 1083.2m; 1049.0s; 1021.5s; 965.3m; 850.0w; 808.5w; 697.2w. [α]_D²⁰ = + 77.8 (C = 0.03 M, MeOH).

diethyl (3-(6-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (**110**)



According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (7.9 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (37 mg, 0.19 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of diethyl (3-(5-azidohex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate **78** (110 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 1h30 at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as colorless oil (93 mg, 44 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.25 (1H, s, N-H₃); 8.03 (2H, m, H_{26'}/H_{30'}); 7.57 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 7.52 (1H, s, H_{18'}); 7.34 (1H, s, H_{30'}); 7.25 (1H, m, H_{26'}); 7.23 (1H, m, H_{28'}); 7.22 (1H, m, H_{27'}); 5.88 (1H, m, H_{1'}); 5.63 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.03 Hz, H₅); 4.73-4.82 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.62-4.70 (2H, m, H_{13'}); 4.43 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.11 Hz, H_{19'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 3.96-4.07 (4H, m, H_{36'}/H_{37'}); 3.70-3.85 (2H, m, H_{5'}); 3.11 (2H, d, J_{H31'-P32'} = 21.61 Hz, H_{31'}); 2.47 (2H, t, J_{H22'-H21'} = 6.56 Hz, H_{22'}); 2.11 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.23 Hz, H_{20'}); 1.63 (2H, q, J_{H21'-H22'} = 6.91 Hz, H_{21'}); 1.57 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.25 (6H, t, J_{H36'/H37'-H39'/H38'} = 7.18 Hz, H_{38'}/H_{39'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.8 (C₂); 150.0 (C₄); 144.2 (C_{14'}); 141.4 (C₆); 133.1 (d, J = 6.86 Hz, C_{30'}); 131.3 (d, J = 7.82 Hz, C_{29'}); 130.2 (d, J = 3.75 Hz, C_{26'}); 128.9 (d, J = 6.13 Hz, C_{28'}); 128.6 (d, J = 3.11 Hz, C_{27'}); 126.0 (d, J = 2.87 Hz, C_{25'}); 122.6 (C_{18'}); 114.4 (C_{9'}); 102.3 (C₅); 92.9 (C_{1'}); 89.1 (C_{23'}); 85.6 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.2 (C_{24'}); 81.1 (C_{3'}); 70.5 (C_{5'}); 64.7 (C_{13'}); 62.4 (d, J = 6.87 Hz, C_{36'}/C_{37'}); 50.1 (C_{19'}); 33.7 (d, J = 138.58 Hz, C_{31'}); 29.5 (C_{20'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.6 (C_{21'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}); 19.0 (C_{22'}); 16.5 (d, J = 6.16 Hz, C_{38'}/C_{39'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.0 (P_{32'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₂H₄₃N₅O₉P]⁺ m/z 672.2792 and found m/z 672.2785. IR (neat, cm⁻¹): 2985.6w; 2934.2w; 2868.4w; 1687.2s; 1456.2m; 1381.1m; 1215.6m; 1157.9w; 1082.9s; 1021.5s; 965.6m; 849.6w; 808.6w; 697.4w. [α]_D²⁰ = + 27.7 (C = 0.021 M, MeOH).

1-((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-dimethyl-6-(((1-(6-(3-nitrophenyl)pent-5-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (111)

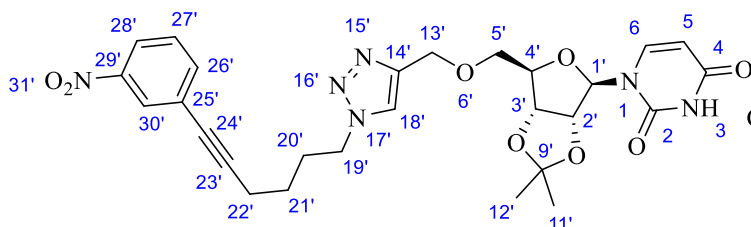


111

Chemical Formula: C₂₆H₂₈N₆O₈
Molecular Weight: 552,54

According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (22 mg, 0.09 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (100 mg, 0.52 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 3-(5-azidopent-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene **87** (0.20 g, 0.90 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (0.28 g, 0.90 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 3 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 98/2) to give the desired product as colorless oil (0.27 g, 56 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.55. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.24 (1H, s, H_{29'}); 8.17 (1H, s, N-H₃); 8.15 (1H, m, H_{27'}); 7.71 (1H, m, H_{25'}); 7.59 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.12 Hz, H₆); 7.58 (1H, s, H_{18'}); 7.51 (1H, m, H_{26'}); 5.87 (1H, m, H_{1'}); 5.63 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.08 Hz, H₅); 4.73-4.81 (2H, m, H_{3'/H2'}); 4.61-4.71 (2H, m, H_{13'}); 4.46 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.11 Hz, H_{19'}); 4.37 (1H, m, H_{4'}); 3.72-3.85 (2H, m, H_{5'}); 2.51 (2H, t, J_{H22'-H21'} = 7.02 Hz, H_{21'}); 2.25 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.35 Hz, H_{20'}); 1.57 (3H, s, H_{11'/H12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'/H12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.9 (C₂); 150.2 (C₄); 148.1 (C_{28'}); 144.2 (C_{14'}); 141.3 (C₆); 137.7 (C_{25'}); 129.4 (C_{26'}); 126.5 (C_{29'}); 125.6 (C_{24'}); 122.6 (C_{27'}); 122.5 (C_{18'}); 114.5 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 93.0 (C_{1'}); 89.9 (C_{22'}); 85.7 (C₄); 85.1 (C_{2'}); 81.2 (C_{3'}); 80.5 (C_{23'}); 70.5 (C_{5'}); 64.8 (C_{13'}); 49.9 (C_{19'}); 29.1 (C_{21'}); 27.4 (C_{11'/C12'}); 25.5 (C_{11'/C12'}); 18.0 (C_{20'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₂₉N₆O₈]⁺ m/z 553.2041 and found m/z 553.2032. IR (neat, cm⁻¹): 3078.2w; 2988.2w; 2936.6w; 2871.5w; 1686.4s; 1528.0s; 1456.3m; 1380.7s; 1349.6m; 1270.3m; 1219.0m; 1157.6w; 1080.7s; 852.6w; 808.9w; 736.5m; 675.0w. [α]_D²⁰ = + 44.5 (C = 0.02 M, MeOH).

1-((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-dimethyl-6-(((1-(6-(3-nitrophenyl)hex-5-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (112)



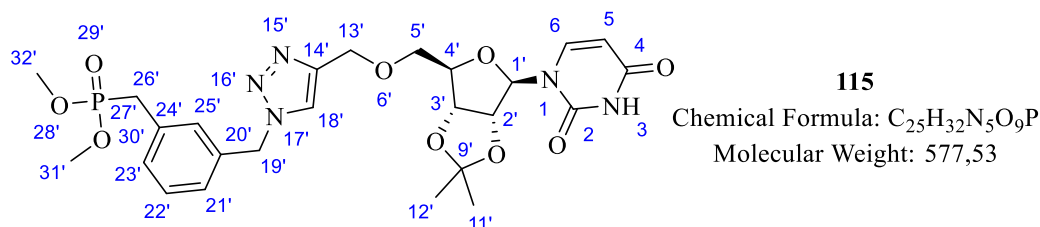
112

Chemical Formula: C₂₇H₃₀N₆O₈
Molecular Weight: 566,57

According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (22 mg, 0.09 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (110 mg, 0.54 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of 3-(5-azidohex-1-yn-1-yl)-1-nitrobenzene **88** (0.22 g, 0.90 mmol, 1.0 eq) and 5'-O-propargyl-uridine **44** (0.29 g, 0.90 mmol,

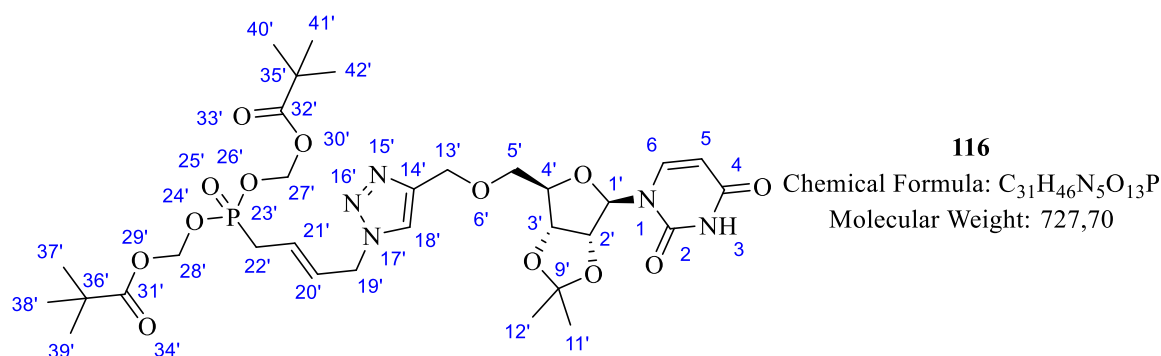
1.0 eq) in 15 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 3 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM:MeOH 98/2) to give the desired product as colorless oil (0.35 g, 69 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.57. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.22 (1H, s, H_{30'}); 8.14 (1H, s, N-H₃); 8.12 (1H, m, H_{28'}); 7.68 (1H, d, J_{H26'-H27'} = 7.73, H_{26'}); 7.57 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.13 Hz, H₆); 7.52 (1H, s, H_{18'}); 7.47 (1H, t, J_{H27'-H28'} = 8.01 Hz, H_{27'}); 5.87 (1H, m, H_{1'}); 5.64 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.14 Hz, H₅); 4.73-4.81 (2H, m, H_{3'/H2'}); 4.62-4.71 (2H, m, H_{13'}); 4.44 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.03 Hz, H_{19'}); 4.38 (1H, m, H_{4'}); 3.72-3.85 (2H, m, H_{5'}); 2.51 (2H, t, J_{H22'-H21'} = 6.98 Hz, H_{22'}); 2.12 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.38 Hz, H_{20'}); 1.67 (2H, q, J_{H21'-H22'} = 7.07 Hz, H_{21'}); 1.57 (3H, s, H_{11'/H12'}); 1.33 (3H, s, H_{11'/H12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.8 (C₂); 150.0 (C₄); 148.2 (C_{29'}); 144.2 (C_{14'}); 141.5 (C₆); 137.5 (C_{26'}); 129.4 (C_{27'}); 126.6 (C_{30'}); 125.6 (C_{25'}); 122.7 (C_{28'}); 122.5 (C_{18'}); 114.4 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 93.1 (C_{1'}); 92.0 (C_{23'}); 85.7 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.1 (C_{3'}); 79.6 (C_{24'}); 70.6 (C_{5'}); 64.8 (C_{13'}); 50.0 (C_{19'}); 29.6 (C_{20'}); 27.4 (C_{11'/C12'}); 25.5 (C_{11'/C12'}); 25.4 (C_{21'}); 19.0 (C_{22'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₁N₆O₈]⁺ m/z 567.2197 and found m/z 567.2191. IR (neat, cm⁻¹): 3079.5w; 2987.2w; 2936.7w; 2868.2w; 1686.5s; 1527.8s; 1456.2m; 1380.7w; 1349.3s; 1270.7m; 1218.4m; 1157.0w; 1080.5s; 1023.6w; 853.4w; 808.7w; 736.6m; 675.0w. [α]_D²⁰ = -36.7 (C = 0.03 M, MeOH).

dimethyl (3-(((4-((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzyl)phosphonate (115)



NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.0 (C₂); 150.1 (C₄); 144.2 (C_{14'}); 141.6 (C₆); 135.0 (d, J = 3.17 Hz, C_{25'}); 132.7 (d, J = 8.39 Hz, C_{24'}); 130.5 (d, J = 6.49 Hz, C_{21'}); 129.7 (d, J = 6.36 Hz, C_{23'}); 127.1 (d, J = 3.62 Hz, C_{22'}); 126.6 (d, J = 1.49 Hz, C_{20'}); 122.6 (C_{18'}); 114.2 (C_{9'}); 102.1 (C₅); 93.8 (C_{1'}); 85.9 (C_{4'}); 85.1 (C_{2'}); 81.1 (C_{3'}); 70.5 (C_{5'}); 64.9 (C_{13'}); 54.2 (C_{19'}); 53.2 (d, J = 6.79 Hz, C_{31'/C32'}); 32.9 (d, J = 113.22 Hz, C_{26'}); 27.4 (C_{11'/C12'}); 25.5 (C_{11'/C12'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.6 (P_{27'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₃₃N₅O₉P]⁺ m/z 578.2010 and found m/z 578.2002. IR (neat, cm⁻¹): 3054.0w; 2989.3w; 2953.9w; 1686.4s; 1456.7m; 1381.7m; 1268.1m; 1239.4m; 1215.9m; 1157.4w; 1026.1s; 853.9m; 809.7m; 731.3m; 699.6w. $[\alpha]_D^{20}$ = -23.1 (C = 0.03 M, MeOH).

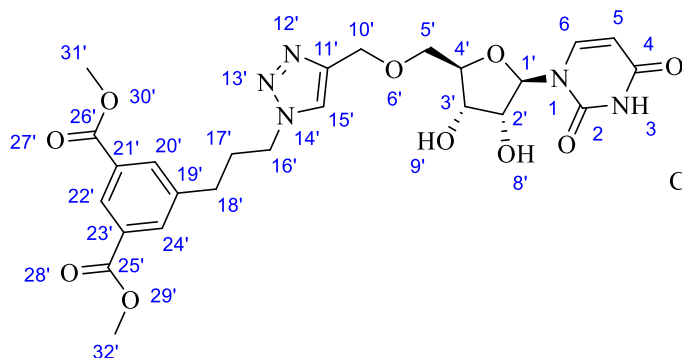
(((E)-4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-2-en-1-yl)-phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (116)



According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (9.0 mg, 0.04 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (44 mg, 0.22 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of (*E*)-(((4-azidobut-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))bis(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) **101** (150 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) and 5'-*O*-propargyl-uridine **44** (120 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq) in 10 mL of ^tBuOH:H₂O (2:1). After 24 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as pale brown oil (0.22 g, 81 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.56. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.76 (1H, s, *N*-H₃); 7.54 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 7.52 (1H, s, H_{18'}); 5.89 (1H, m, H_{20'}); 5.81 (1H, m, H_{1'}); 5.79 (2H, s, H_{27'/H28'}); 5.74 (1H, m, H_{21'}); 5.69 (2H, s, H_{27'/H28'}); 5.62 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.11 Hz, H₅); 4.96 (2H, m, H_{19'}); 4.81 (2H, m, H_{3'/H2'}); 4.65 (2H, m, H_{13'}); 4.42 (1H, m, H_{4'}); 3.71-3.84 (2H, m, H_{5'}); 2.78 (2H, dd, $J_{H22'-H21'}$ = 7.51 Hz, $J_{H22'-P23'}$ = 23.12 Hz, H_{22'}); 1.57 (3H, s, H_{11'/H12'}); 1.34 (3H, s, H_{11'/H12'}); 1.23 (18H, s, H_{37'/H38'/H39'/H40'/H41'/H42'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.4 (C_{31'/C32'}); 163.1 (C₂); 150.8 (C₄); 144.5 (C_{14'}); 141.6 (C₆); 123.9 (C_{18'}); 114.1 (C_{9'}); 107.3 (d, J = 14.16 Hz, C_{21'}); 107.0 (d, J = 5.84 Hz, C_{20'}); 101.9 (C₅); 93.9 (C_{1'}); 85.5 (C_{4'}); 85.3 (C_{2'}); 81.8 (C_{27'/C28'}); 81.2 (C_{3'}); 70.6 (C_{5'}); 64.3 (C_{13'}); 50.2 (d, J = 11.43 Hz, C_{19'}); 38.9 (C_{35'/C36'}); 30.8 (d, J = 87.91 Hz, C_{22'}); 27.4 (C_{11'/C12'}); 27.0 (C_{37'/C38'/C39'/C40'/C41'/C42'}); 25.5 (C_{11'/C12'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.6 (P_{23'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₄₇N₅O₁₃P]⁺ m/z

728.2902 and found m/z 728.2893. IR (neat, cm^{-1}): 3058.9 br ; 2979.9 m ; 2936.9 w ; 2873.6 w ; 1750.5 m ; 1688.0 s ; 1480.8 w ; 1458.6 m ; 1381.9 m ; 1268.1 m ; 1215.9 m ; 1132.3 m ; 1081.1 m ; 1023.8 m ; 960.7 m ; 852.8 w ; 767.3 w ; 733.1 w . $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +54.2$ ($C = 0.02$ M, MeOH).

dimethyl 5-(6-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)isophthalate (117)

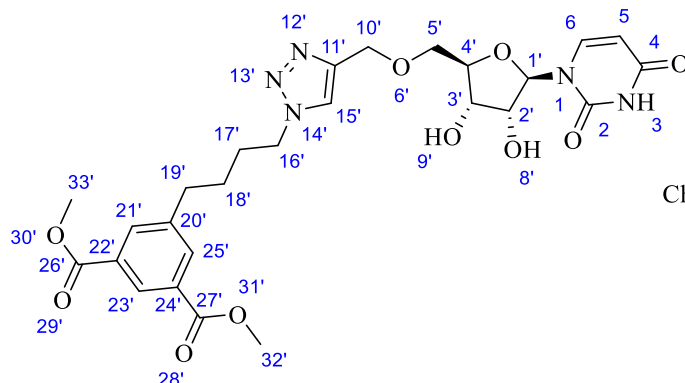


117

Chemical Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{10}$
Molecular Weight: 559.53

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **102** (366 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/ H_2O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (314 mg, 92 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8.95 (1H, s, N-H_3); 8.52 (1H, m, H_{22}); 8.02 (2H, m, $\text{H}_{20'}/\text{H}_{24'}$); 7.81 (1H, d, $J_{\text{H6-H5}} = 8.26$ Hz, H_6); 7.50 (1H, s, $\text{H}_{15'}$); 5.84 (1H, m, $\text{H}_{1'}$); 5.60 (1H, d, $J_{\text{H5-H6}} = 8.22$ Hz, H_5); 4.68 (2H, s, $\text{H}_{10'}$); 4.41 (1H, m, H_8); 4.39 (2H, t, $J_{\text{H16'-H17'}} = 6.92$ Hz, $\text{H}_{16'}$); 4.23-4.29 (3H, m, $\text{H}_4'/\text{H}_3'/\text{H}_2'$); 3.94 (6H, s, $\text{H}_{31'}/\text{H}_{32'}$); 3.73-3.91 (2H, m, H_5'); 3.43 (1H, m, H_9); 2.75 (2H, t, $J_{\text{H18'-H17'}} = 7.09$ Hz, $\text{H}_{18'}$); 2.30 (2H, q, $J_{\text{H17'-H16'}} = 6.85$ Hz, $\text{H}_{17'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166.3 ($\text{C}_{25'}/\text{C}_{26'}$); 163.2 (C_2); 151.0 (C_4); 145.1 ($\text{C}_{11'}$); 141.1 ($\text{C}_{19'}$); 140.4 (C_6); 133.8 ($\text{C}_{20'}/\text{C}_{24'}$); 131.0 ($\text{C}_{21'}/\text{C}_{23'}$); 128.9 ($\text{C}_{22'}$); 122.4 ($\text{C}_{15'}$); 102.0 (C_5); 91.0 ($\text{C}_{1'}$); 84.4 (C_4'); 75.8 (C_2'); 71.2 (C_3'); 69.6 (C_5'); 64.5 ($\text{C}_{10'}$); 52.5 ($\text{C}_{31'}/\text{C}_{32'}$); 49.5 ($\text{C}_{16'}$); 32.1 ($\text{C}_{18'}$); 31.3 ($\text{C}_{17'}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ m/z 560.1987 and found m/z 560.1980. IR (neat, cm^{-1}): 3390.6 br ; 2953.5 m ; 2863.2 w ; 1678.9 s ; 1455.8 m ; 1433.8 m ; 1384.0 w ; 1325.0 w ; 1244.2 s ; 1207.2 m ; 1108.6 m ; 1061.0 m ; 999.5 w ; 816.0 w ; 753.6 m ; 721.2 w . $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +38.9$ ($C = 0.013$ M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isophthalate (**118**)



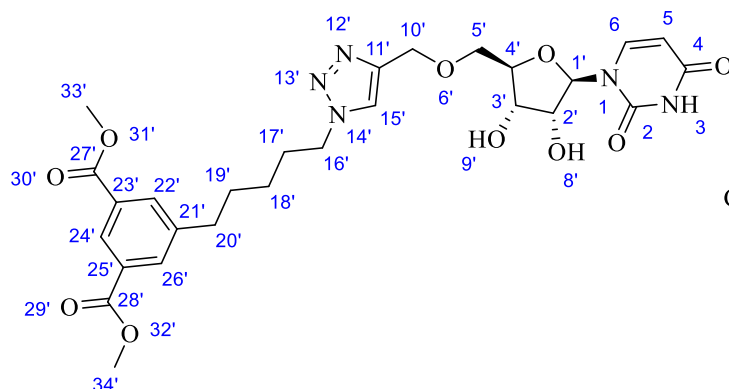
118

Chemical Formula: C₂₆H₃₁N₅O₁₀

Molecular Weight: 573,56

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **103** (120 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (5 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (10 mL), once cyclohexane (10 mL) and once methanol (10 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (112 mg, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.43. ¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm): 8.43 (1H, m, H_{23'}); 8.03 (2H, m, H_{21'}/H_{25'}); 8.02 (1H, s, H_{15'}); 7.88 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 5.86 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 4.32 Hz, H_{1'}); 5.50 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.09 Hz, H₅); 4.66 (2H, q, J_{H10'-H15'} = 11.99 Hz, H_{10'}); 4.47 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.88 Hz, H_{16'}); 4.09-4.16 (3H, m, H_{4'/H2'/H3'}); 3.93 (6H, s, H_{32'/H33'}); 3.79 (2H, qd, J_{H5'-H5''} = 2.30 Hz, J_{H5'-H4'} = 10.93 Hz, H_{5'}); 2.77 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 7.77 Hz, H_{19'}); 1.97 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 6.84 Hz, H_{17'}); 1.64 (2H, m, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm): 166.2 (C_{26'/C27'}); 164.7 (C₂); 151.0 (C₄); 144.0 (C_{11'}); 143.2 (C_{20'}); 141.1 (C₆); 133.3 (C_{21'/C25'}); 130.6 (C_{22'/C24'}); 127.8 (C_{23'}); 123.7 (C_{15'}); 101.1 (C₅); 89.1 (C_{1'}); 83.4 (C_{4'}); 74.5 (C_{2'}); 70.0 (C_{3'}); 69.1 (C_{16'}); 63.5 (C_{10'}); 51.5 (C_{32'/C33'}); 49.7 (C_{5'}); 34.2 (C_{19'}); 29.3 (C_{17'}); 27.8 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₃₂N₅O₁₀]⁺ m/z 574.2143 and found m/z 574.2139. IR (neat, cm⁻¹): 3400.3br; 2927.5m; 1671.4s; 1455.8m; 1433.7m; 1331.3w; 1243.6s; 1108.3m; 1061.8m; 1000.4w; 811.4w; 753.9m. [α]_D²⁰ = + 22.0 (C = 0.006 M, MeOH).

dimethyl 5-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)isophthalate (**119**)



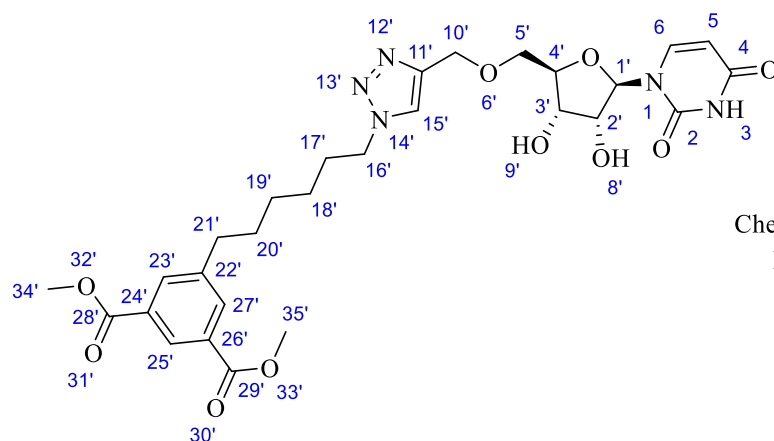
119

Chemical Formula: C₂₇H₃₃N₅O₁₀

Molecular Weight: 587,59

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **104** (488 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (417 mg, 91 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.39. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.60 (1H, s, *N*-H₃); 8.49 (1H, m, H_{24'}); 8.02 (2H, m, H_{22'}/H_{26'}); 7.83 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.14 Hz, H₆); 7.51 (1H, s, H_{15'}); 5.86 (1H, m, H_{1'}); 5.60 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 4.82 (1H, m, *O*-H_{8'}); 4.66 (2H, s, H_{10'}); 4.35 (2H, t, *J*_{H16'-H17'} = 7.22 Hz, H_{16'}); 4.20-4.27 (3H, m, H_{4'}/H_{3'}/H_{2'}); 3.93 (6H, s, H_{33'}/H_{34'}); 3.71-3.90 (3H, m, H_{5'}/*O*-H_{9'}); 2.70 (2H, t, *J*_{H20'-H19'} = 7.55 Hz, H_{20'}); 1.94 (2H, q, *J*_{H17'-H16'} = 7.34 Hz, H_{17'}); 1.66-1.74 (2H, m, H_{19'}); 1.31-1.40 (2H, m, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C_{27'}/C_{28'}); 163.6 (C₂); 151.2 (C₄); 144.1 (C_{11'}); 142.9 (C_{21'}); 140.6 (C₆); 133.8 (C_{22'}/C_{26'}); 130.7 (C_{23'}/C_{25'}); 128.4 (C_{24'}); 122.4 (C_{15'}); 102.1 (C₅); 90.5 (C_{1'}); 84.0 (C_{4'}); 75.4 (C_{2'}); 70.6 (C_{3'}); 69.3 (C_{5'}); 64.4 (C_{10'}); 52.4 (C_{33'}/C_{34'}); 50.3 (C_{16'}); 35.1 (C_{20'}); 30.4 (C_{19'}); 30.1 (C_{17'}); 25.9 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₄N₅O₁₀]⁺ *m/z* 588.2300 and found *m/z* 588.2290. IR (neat, cm⁻¹): 3381.1*br*; 2948.0*m*; 2861.5*w*; 1679.1*s*; 1455.7*m*; 1433.7*m*; 1383.3*w*; 1327.9*w*; 1242.3*s*; 1108.8*m*; 1061.7*m*; 999.7*w*; 815.6*w*; 754.0*m*; 721.1*w*. [α]_D²⁰ = + 20.7 (C = 0.005 M, MeOH).

dimethyl 5-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)isophthalate (**120**)



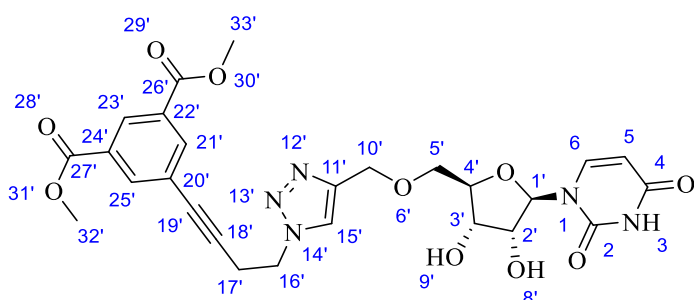
120

Chemical Formula: $C_{28}H_{35}N_5O_{10}$

Molecular Weight: 601,61

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **105** (391 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/ H_2O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (336 mg, 92 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.37. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.33 (1H, s, $N-H_3$); 8.49 (1H, m, $H_{25'}$); 8.02 (2H, m, $H_{23'}/H_{27'}$); 7.83 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.13$ Hz, H_6); 7.50 (1H, s, $H_{15'}$); 5.85 (1H, m, $H_{1'}$); 5.61 (1H, d, $J_{H5-H6} = 8.42$ Hz, H_5); 4.67 (2H, s, $H_{10'}$); 4.64 (1H, m, $O-H_8$); 4.34 (2H, t, $J_{H16'-H17'} = 7.26$ Hz, $H_{16'}$); 4.20-4.27 (3H, m, $H_{4'}/H_{3'}/H_{2'}$); 3.94 (6H, s, $H_{34'}/H_{35'}$); 3.72-3.91 (2H, m, H_5); 3.56 (1H, m, $O-H_9$); 2.69 (2H, t, $J_{H21'-H20'} = 7.74$ Hz, $H_{21'}$); 1.86-1.94 (2H, m, $H_{17'}$); 1.60-1.68 (2H, m, $H_{20'}$); 1.30-1.42 (4H, m, $H_{18'}/H_{19'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.5 ($C_{28'}/C_{29'}$); 163.3 (C_2); 151.1 (C_4); 144.0 ($C_{11'}$); 143.3 ($C_{22'}$); 140.5 (C_6); 133.8 ($C_{23'}/C_{27'}$); 130.6 ($C_{24'}/C_{26'}$); 128.3 ($C_{25'}$); 122.4 ($C_{15'}$); 102.1 (C_5); 90.7 ($C_{1'}$); 84.1 (C_4); 75.6 ($C_{2'}$); 70.7 ($C_{3'}$); 69.3 (C_5); 64.5 ($C_{10'}$); 52.4 ($C_{34'}/C_{35'}$); 50.4 ($C_{16'}$); 35.3 ($C_{21'}$); 30.9 ($C_{20'}$); 30.1 ($C_{17'}$); 28.5 ($C_{19'}$); 26.3 ($C_{18'}$). ESI-HRMS calculated for $[C_{28}H_{36}N_5O_{10}]^+$ m/z 602.2456 and found m/z 602.2447. IR (neat, cm^{-1}): 3392.8br; 2934.4m; 2859.3w; 1675.3s; 1455.4m; 1433.5m; 1383.4w; 1331.5w; 1242.0s; 1109.2m; 1061.6m; 1000.6w; 814.5w; 754.0m; 721.0w. $[\alpha]_D^{20} = +27.6$ ($C = 0.005$ M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-1-yn-1-yl)isophthalate (**121**)



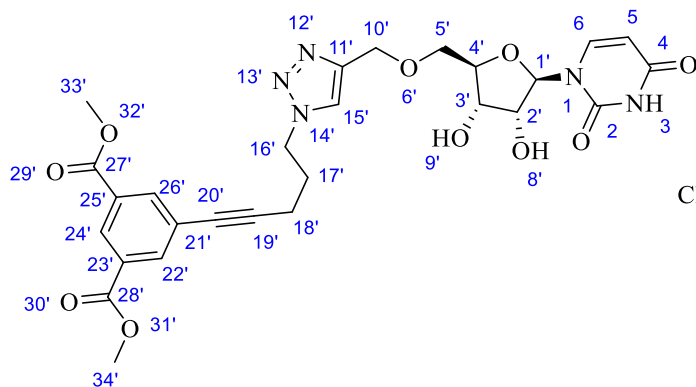
121

Chemical Formula: $C_{26}H_{27}N_5O_{10}$

Molecular Weight: 569,53

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **106** (0.27 g, 0.44 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.22 g, 88 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.41. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.20 (1H, s, N-H₃); 8.50 (1H, t, $J_{H_{23'}-H_{21'}/H_{25'}} = 1.54$ Hz, H_{23'}); 8.10 (2H, d, $J_{H_{21'}/H_{25'}-H_{23'}} = 1.55$ Hz, H_{21'/H_{25'}}); 7.81 (1H, s, H_{15'}); 7.79 (1H, d, $J_{H_6-H_5} = 8.18$ Hz, H₆); 5.84 (1H, m, H_{1'}); 5.55 (1H, d, $J_{H_5-H_6} = 8.08$ Hz, H₅); 5.18 (1H, s, O-H_{8'}); 4.67 (2H, m, H_{10'}); 4.62 (2H, t, $J_{H_{16'}-H_{17'}} = 6.72$ Hz, H_{16'}); 4.32 (1H, s, O-H_{9'}); 4.21 (2H, m, H_{3'/H_{2'}}); 4.14 (1H, m, H_{4'}); 3.90 (6H, s, H_{32'/H_{33'}}); 3.76 (2H, m, H_{5'}); 3.05 (2H, t, $J_{H_{17'}-H_{18'}} = 6.70$ Hz, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.6 (C_{26'/C_{27'}}); 164.2 (C₄); 151.3 (C₂); 144.2 (C_{11'}); 141.0 (C₆); 136.6 (C_{21'/C_{25'}}); 131.0 (C_{23'}); 130.1 (C_{22'/C_{24'}}); 123.9 (C_{15'}); 123.5 (C_{20'}); 102.3 (C₅); 89.9 (C_{1'}); 87.3 (C_{18'}); 83.7 (C_{4'}); 81.6 (C_{19'}); 75.1 (C_{2'}); 70.5 (C_{3'}); 69.5 (C_{5'}); 64.4 (C_{10'}); 52.7 (C_{32'/C_{33'}}); 48.9 (C_{16'}); 21.6 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₂₈N₅O₁₀]⁺ m/z 570.1830 and found m/z 570.1827. IR (neat, cm⁻¹): 3404.7br; 3067.9w; 2951.9w; 1682.8s; 1438.6m; 1385.9w; 1338.1m; 1246.1s; 1155.4m; 1108.5m; 1078.8m; 1049.7m; 999.4w; 913.3w; 876.0w; 815.2w; 754.7m; 722.9w. [α]_D²⁰ = +8.5 (C = 0.01 M, MeOH).

dimethyl 5-(5-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)isophthalate (122)



122

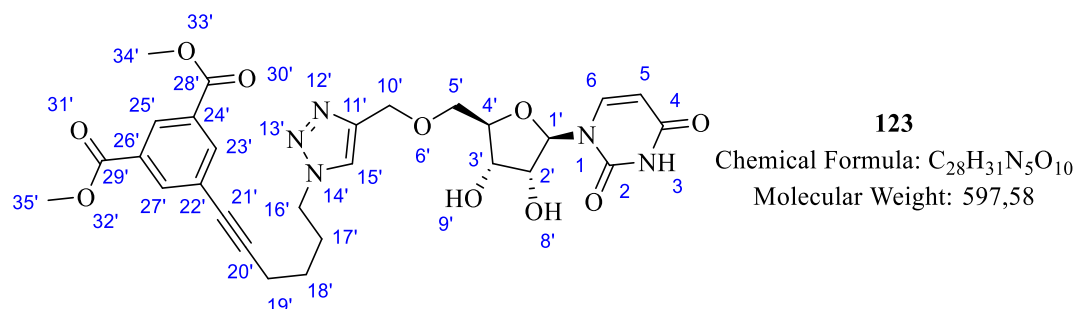
Chemical Formula: C₂₇H₂₉N₅O₁₀

Molecular Weight: 583,55

According to the general procedure C, the protected substituted uridine **107** (0.54 g, 0.87 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.43 g, 84 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.31. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.84 (1H, s, N-H₃); 8.55 (1H, t, $J_{H_{24'}-H_{22'}/H_{26'}} = 1.57$ Hz, H_{24'}); 8.20 (2H, d, $J_{H_{22'}/H_{26'}-H_{24'}} = 1.60$ Hz, H_{22'/H_{26'}}); 7.82 (1H, d, $J_{H_6-H_5} = 8.17$ Hz, H₆); 7.65 (1H, s, H_{15'}); 5.86 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}} = 2.37$ Hz, H_{1'}); 5.60 (1H, d, $J_{H_5-H_6} = 8.24$ Hz, H₅); 4.98 (1H, s, O-H_{8'}); 4.67 (2H, s, H_{10'}); 4.57 (2H, t, $J_{H_{16'}-H_{17'}} = 6.80$ Hz, H_{16'}); 4.24 (2H, m, H_{3'/H_{2'}}); 4.20 (1H, m, H_{4'}); 3.94 (6H, s, H_{33'/H_{34'}}); 3.90 (1H, s, O-H_{9'}); 3.72-3.89 (2H, m, H_{5'}); 2.49

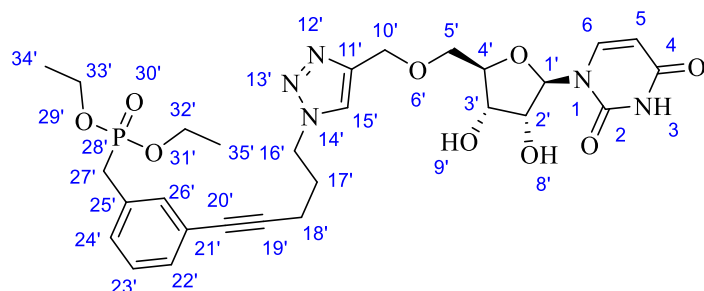
(2H, t, $J_{H18'-H17'} = 6.80$ Hz, $H_{18'}$); 2.23 (2H, q, $J_{H17'-H16'}/H19' = 6.73$ Hz, $H_{17'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.8 ($\text{C}_{27}/\text{C}_{28}$); 163.9 (C_4); 151.3 (C_2); 144.3 (C_{11}); 140.8 (C_6); 136.7 ($\text{C}_{22'}/\text{C}_{26'}$); 131.0 ($\text{C}_{23'}/\text{C}_{25'}$); 130.0 ($\text{C}_{24'}$); 124.5 ($\text{C}_{21'}$); 123.2 ($\text{C}_{15'}$); 102.3 (C_5); 90.4 ($\text{C}_{1'}$); 89.8 ($\text{C}_{19'}$); 84.0 (C_4); 80.5 ($\text{C}_{20'}$); 75.4 (C_2); 70.7 (C_3); 69.5 (C_5); 64.6 ($\text{C}_{10'}$); 52.7 ($\text{C}_{33'}/\text{C}_{34'}$); 49.3 ($\text{C}_{16'}$); 28.9 ($\text{C}_{17'}$); 16.7 ($\text{C}_{18'}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ m/z 584.1987 and found m/z 584.1985. IR (neat, cm^{-1}): 3399.5br; 3306.4w; 3273.1w; 3092.1w; 2953.0w; 1682.1s; 1600.2w; 1438.9m; 1385.2w; 1342.6w; 1246.9s; 1108.2m; 1061.7m; 1045.5m; 998.5w; 911.7w; 874.9w; 816.1w; 754.5m, 722.8w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19.8$ ($\text{C} = 0.02$ M, MeOH).

dimethyl 5-(6-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)isophthalate (123)



According to the general procedure C, the protected substituted uridine **108** (0.21 g, 0.33 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/ H_2O solution (8 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.20 g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.36. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.13 (1H, s, $N\text{-H}_3$); 8.55 (1H, t, $J_{H25'-H23'}/H27' = 1.57$ Hz, $H_{25'}$); 8.20 (2H, d, $J_{H23'}/H27'-H25' = 1.59$ Hz, $H_{23'}/H_{27'}$); 7.83 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.13$ Hz, H_6); 7.55 (1H, s, $H_{15'}$); 5.83 (1H, d, $J_{H1'-H2'} = 3.23$ Hz, $H_{1'}$); 5.63 (1H, dd, $J_{H5-H3} = 1.42$ Hz, $J_{H5-H6} = 8.08$ Hz, H_5); 4.68 (2H, s, $H_{10'}$); 4.52 (1H, d, $J_{H8'-H2'} = 3.01$ Hz, $O\text{-H}_8'$); 4.45 (2H, t, $J_{H16'-H17'} = 7.12$ Hz, $H_{16'}$); 4.21-4.29 (3H, m, $H_4'/H_3'/H_{2'}$); 3.94 (6H, s, $H_{34'}/H_{35'}$); 3.72-3.91 (2H, m, H_5'); 3.45 (1H, d, $J_{H9'-H3'} = 2.70$ Hz, $O\text{-H}_9'$); 2.50 (2H, t, $J_{H19'-H18'} = 6.86$ Hz, $H_{19'}$); 2.11 (2H, q, $J_{H17'-H16'} = 7.14$ Hz, $H_{17'}$); 1.65 (2H, q, $J_{H18'-H19'} = 6.93$ Hz, $H_{18'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.9 ($\text{C}_{28'}/\text{C}_{29'}$); 163.3 (C_4); 151.2 (C_2); 144.3 ($\text{C}_{11'}$); 140.6 (C_6); 136.7 ($\text{C}_{23'}/\text{C}_{27'}$); 131.0 ($\text{C}_{24'}/\text{C}_{26'}$); 129.8 ($\text{C}_{25'}$); 124.8 ($\text{C}_{22'}$); 122.5 ($\text{C}_{15'}$); 102.2 (C_5); 91.3 ($\text{C}_{20'}$); 91.0 ($\text{C}_{1'}$); 84.4 (C_4); 79.9 ($\text{C}_{21'}$); 75.8 (C_2); 71.0 (C_3); 69.5 (C_5); 64.6 ($\text{C}_{10'}$); 52.7 ($\text{C}_{34'}/\text{C}_{35'}$); 50.1 ($\text{C}_{16'}$); 29.5 ($\text{C}_{17'}$); 25.5 ($\text{C}_{18'}$); 19.0 ($\text{C}_{19'}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ m/z 598.2143 and found m/z 598.2141. IR (neat, cm^{-1}): 3400.7br; 3091.3w; 2952.0w; 2872.0w; 1682.0s; 1438.8m; 1384.3w; 1342.5m; 1246.1s; 1107.9m; 1062.3m; 998.3w; 911.4w; 874.8w; 814.8w; 754.2m, 722.7w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.7$ ($\text{C} = 0.01$ M, MeOH).

diethyl (3-(5-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (124)



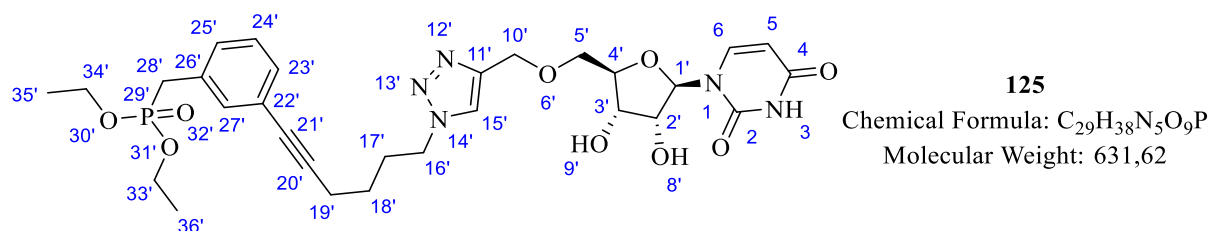
124

Chemical Formula: $C_{28}H_{36}N_5O_9P$

Molecular Weight: 617,60

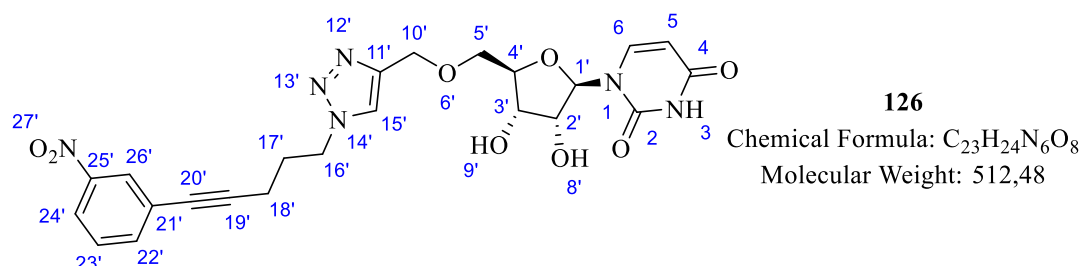
According to the general procedure C, the protected substituted uridine **109** (0.15 g, 0.23 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/ H_2O solution (6 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 90/10) to give the desired product as colorless oil (0.14 g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.27. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.19 (1H, s, $N-H_3$); 7.76 (1H, d, $J_{H6-H5} = 8.17$ Hz, H_6); 7.67 (1H, s, $H_{15'}$); 7.31 (1H, m, $H_{26'}$); 7.21-7.26 (1H, m, $H_{22'}$); 7.16-7.21 (2H, m, $H_{24'}/H_{23'}$); 5.86 (1H, m, $H_{1'}$); 5.56 (1H, d, $J_{H5-H6} = 8.09$ Hz, H_5); 5.17 (1H, s, $O-H_8$); 4.64 (2H, m, $H_{10'}$); 4.52 (2H, t, $J_{H16'-H17'} = 6.78$ Hz, $H_{16'}$); 4.48 (1H, s, $O-H_9$); 4.16-4.21 (2H, m, $H_3'/H_{2'}$); 4.14 (1H, m, H_4'); 3.93-4.04 (4H, m, $H_{32'}/H_{33'}$); 3.65-3.84 (2H, m, H_5'); 3.09 (2H, d, $J_{H27'-P28'} = 21.59$ Hz, $H_{27'}$); 2.40 (2H, t, $J_{H18'-H17'} = 6.79$ Hz, $H_{18'}$); 2.16 (2H, q, $J_{H17'-H18'} = 6.76$ Hz, $H_{17'}$); 1.21 (6H, t, $J_{H34'/H35'-H33'/H32'} = 7.05$ Hz, $H_{34'}/H_{35'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 164.1 (C_4); 151.2 (C_2); 144.2 ($C_{11'}$); 140.9 (C_6); 133.0 (d, $J = 6.86$ Hz, $C_{26'}$); 131.8 (d, $J = 8.97$ Hz, $C_{25'}$); 130.3 (d, $J = 3.60$ Hz, $C_{22'}$); 129.5 (d, $J = 6.52$ Hz, $C_{24'}$); 128.6 (d, $J = 2.97$ Hz, $C_{23'}$); 123.7 (d, $J = 3.10$ Hz, $C_{21'}$); 123.4 ($C_{15'}$); 102.3 (C_5); 89.9 ($C_{1'}$); 87.9 ($C_{19'}$); 83.6 (C_4'); 82.0 ($C_{20'}$); 75.0 (C_2); 70.5 (C_3); 69.5 (C_5'); 64.5 ($C_{10'}$); 62.5 (d, $J = 6.98$ Hz, $C_{32'}/C_{33'}$); 49.2 ($C_{16'}$); 33.4 (d, $J = 138.07$ Hz, $C_{27'}$); 29.0 ($C_{17'}$); 16.6 ($C_{18'}$); 16.4 (d, $J = 5.95$ Hz, $C_{34'}/C_{35'}$). ^{31}P NMR (162 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 26.2 ($P_{28'}$). ESI-HRMS calculated for $[C_{28}H_{37}N_5O_9P]^+ m/z$ 618.2323 and found m/z 618.2314. IR (neat, cm^{-1}): 3390.9br; 3061.9w; 2982.8w; 2910.7w; 2871.3w; 1682.2s; 1600.8w; 1579.4w; 1461.3w; 1428.4w; 1386.1w; 1222.8m; 1162.5w; 1111.0m; 1047.5s; 1020.5s; 966.7m; 874.8w; 844.1w; 810.6w; 776.1w; 697.3w. $[\alpha]_D^{20} = +97.2$ ($C = 0.1$ M, MeOH).

diethyl (3-(6-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)benzyl)phosphonate (125)



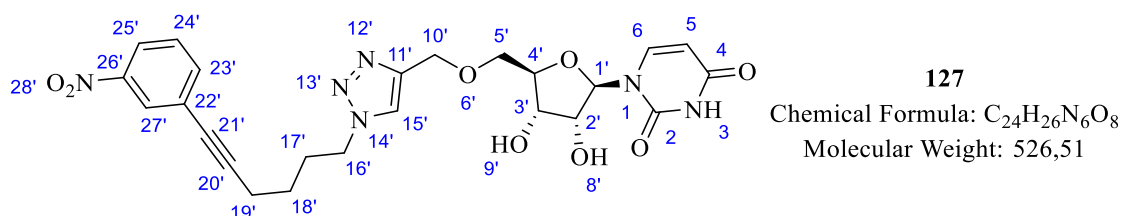
According to the general procedure C, the protected substituted uridine **110** (88 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (6 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 90/10) to give the desired product as colorless oil (77 mg, 93 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.37. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.26 (1H, s, N-H₃); 7.77 (1H, d, J_{H6-H5} = 7.97 Hz, H₆); 7.65 (1H, s, H_{15'}); 7.28 (1H, m, H_{27'}); 7.23 (1H, m, H_{23'}); 7.21 (1H, m, H_{25'}); 7.18 (1H, m, H_{24'}); 5.86 (1H, m, H₁); 5.57 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.01 Hz, H₅); 5.24 (1H, s, O-H_{8'}); 4.64 (2H, m, H_{10'}); 4.56 (1H, s, O-H_{9'}); 4.40 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.99 Hz, H_{16'}); 4.10-4.23 (3H, m, H_{4'/H3'/H2'}); 3.92-4.03 (4H, m, H_{33'/H34'}); 3.64-3.83 (2H, m, H_{5'}); 3.08 (2H, d, J_{H28'-P29'} = 21.64 Hz, H_{28'}); 2.41 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 6.83 Hz, H_{19'}); 2.05 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 7.00 Hz, H_{17'}); 1.57 (2H, q, J_{H18'-H19'} = 6.86 Hz, H_{18'}); 1.21 (6H, t, J_{H35'/H36'-H33'/H34'} = 7.08 Hz, H_{35'/H36'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.2 (C₂); 151.3 (C₄); 144.2 (C_{11'}); 141.0 (C₆); 132.9 (d, J = 6.83 Hz, C_{27'}); 131.7 (d, J = 9.10 Hz, C_{26'}); 130.2 (d, J = 3.60 Hz, C_{23'}); 129.3 (d, J = 6.51 Hz, C_{25'}); 128.5 (d, J = 3.05 Hz, C_{24'}); 124.0 (d, J = 2.97 Hz, C_{22'}); 123.0 (C_{15'}); 102.3 (C₅); 89.8 (C_{20'}); 89.4 (C_{1'}); 83.6 (C_{4'}); 81.2 (C_{21'}); 75.0 (C_{2'}); 70.4 (C_{3'}); 69.5 (C_{5'}); 64.5 (C_{10'}); 62.5 (d, J = 1.10 Hz, C_{33'/C34'}); 62.4 (d, J = 1.11 Hz, C_{33'/C34'}); 50.0 (C_{16'}); 33.4 (d, J = 138.24 Hz, C_{28'}); 29.4 (C_{17'}); 25.5 (C_{18'}); 18.9 (C_{19'}); 16.4 (d, J = 5.97 Hz, C_{35'/C36'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.2 (P_{29'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₉H₃₉N₅O₉P]⁺ m/z 632.2479 and found m/z 632.2473. IR (neat, cm⁻¹): 3062.3br; 2982.4w; 2929.2w; 2869.3w; 1682.0s; 1462.2w; 1386.9w; 1219.9m; 1161.8w; 1111.2m; 1048.1s; 1021.0s; 968.1m; 910.0w; 810.8w; 726.7w; 697.4w. [α]_D²⁰ = +115.8 (C = 0.1 M, MeOH).

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(((1-(5-(3-nitrophenyl)pent-4-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (126)



According to the general procedure C, the protected substituted uridine **111** (0.26 g, 0.45 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (8 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.23 g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.32. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.14 (1H, s, N-H₃); 8.17 (1H, m, H_{15'}); 8.09 (1H, d, *J*_{H26'-H24'} = 8.16 Hz, H_{26'}); 7.79 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 7.80 Hz, H₆); 7.63-7.74 (2H, m, H_{24'}/H_{22'}); 7.45 (1H, t, *J*_{H23'-H22'} = 7.98 Hz, H_{23'}); 5.84 (1H, m, H_{1'}); 5.64 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 7.83 Hz, H₅); 5.15 (1H, s, O-H₈); 4.65 (2H, s, H_{10'}); 4.56 (2H, m, H_{16'}); 4.29 (1H, s, O-H₉); 4.12-4.27 (3H, m, H_{3'}/H_{2'}/H_{4'}); 3.67-3.87 (2H, m, H_{5'}); 2.49 (2H, t, *J*_{H18'-H17'} = 6.50 Hz, H_{18'}); 2.22 (2H, q, *J*_{H17'-H18'} = 6.29 Hz, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.2 (C₄); 151.4 (C₂); 148.2 (C_{25'}); 144.3 (C_{11'}); 141.0 (C₆); 137.6 (C_{22'}); 129.5 (C_{23'}); 126.5 (C_{15'}); 125.2 (C_{21'}); 123.4 (C_{24'}); 122.8 (C_{26'}); 102.3 (C₅); 90.8 (C_{19'}); 90.0 (C_{1'}); 83.8 (C_{4'}); 80.0 (C_{20'}); 75.2 (C_{2'}); 70.6 (C_{3'}); 69.5 (C_{5'}); 64.5 (C_{10'}); 49.3 (C_{16'}); 28.9 (C_{17'}); 16.8 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₃H₂₅N₆O₈]⁺ m/z 513.1728 and found m/z 513.1723. IR (neat, cm⁻¹): 3369.6br; 3207.2br; 3088.1m; 2929.5w; 2869.2w; 1674.8s; 1526.1s; 1462.2m; 1427.1w; 1385.5w; 1349.2s; 1271.4m; 1110.4m; 1061.3m; 898.1w; 809.3w; 736.0m; 673.8w. [α]_D²⁰ = + 11.8 (C = 0.02 M, MeOH).

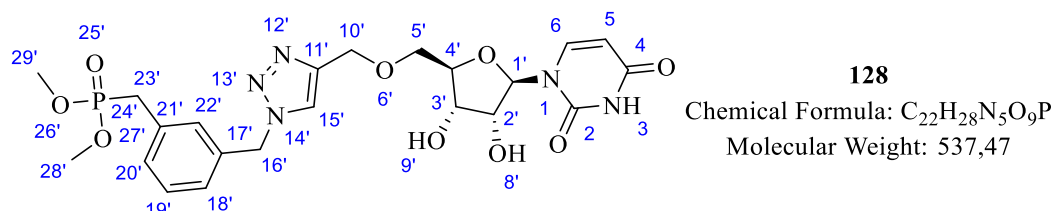
1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(((1-(6-(3-nitrophenyl)hex-5-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (127**)**



According to the general procedure C, the protected substituted uridine **112** (0.34 g, 0.60 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (8 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as white solid (0.25 g, 78 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.34. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.16 (1H, s, N-H₃); 8.16 (1H, s, H_{15'}); 8.08 (1H, d, *J*_{H27'-H25'} = 8.25, H_{27'}); 7.81 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 6.63 Hz, H₆); 7.60-7.71 (2H, m, H_{25'}/H_{23'}); 7.44 (1H, t, *J*_{H24'-H25'/H23'} = 7.98 Hz, H_{24'}); 5.85 (1H, m, H_{1'}); 5.57 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 6.40 Hz, H₅); 5.18 (1H, s, O-H₈); 4.66 (2H, s, H_{10'}); 4.44 (2H, m, H_{16'}); 4.10-4.36 (4H, m, O-H₉/H_{3'}/H_{2'}/H_{4'}); 3.66-3.89 (2H, m, H_{5'}); 2.48 (2H, t, *J*_{H19'-H18'} = 6.68 Hz, H_{19'}); 2.09 (2H, m, H_{17'}); 1.63 (2H, m, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.2 (C₄); 151.4 (C₂); 148.2 (C_{26'}); 144.3 (C_{11'}); 141.1 (C₆); 137.5 (C_{23'}); 129.4 (C_{24'}); 126.5 (C_{15'}); 125.6 (C_{22'}); 123.0 (C_{25'}); 122.6 (C_{27'}); 102.3 (C₅); 92.2 (C_{20'}); 90.0 (C_{1'}); 83.8 (C_{4'}); 79.4 (C_{21'}); 75.2 (C_{2'}); 70.6 (C_{3'}); 69.5 (C_{5'}); 64.5 (C_{10'}); 50.1 (C_{16'}); 29.5 (C_{17'}); 25.4 (C_{18'}); 19.0

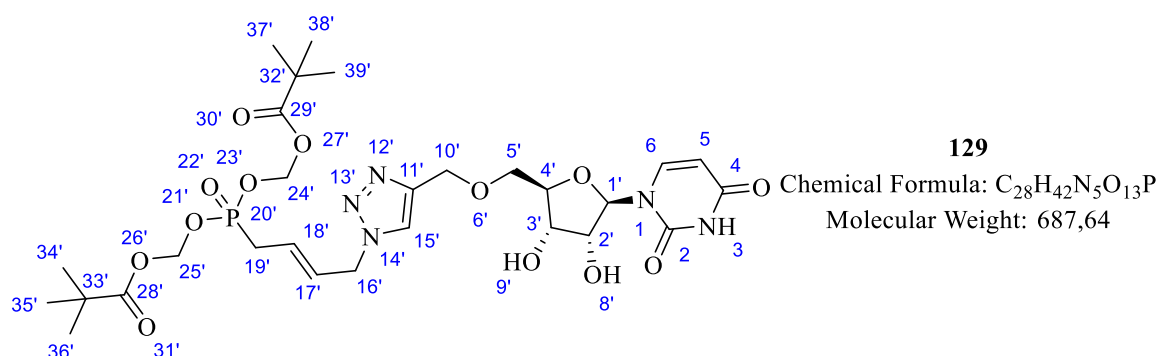
(C₁₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₄H₂₇N₆O₈]⁺ m/z 527.1884 and found m/z 527.1880. IR (neat, cm⁻¹): 3391.9br; 3086.7br; 2929.6w; 2867.1w; 2227.7w; 1675.0s; 1570.8w; 1526.2s; 1462.3w; 1426.3w; 1385.1w; 1348.9s; 1271.8m; 1110.5m; 1061.3m; 897.9w; 809.1w; 736.1m; 674.1w. [α]_D²⁰ = + 31.7 (C = 0.02 M, MeOH).

dimethyl (3-((4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)benzyl)phosphonate (128)



According to the general procedure C, the protected substituted uridine **115** (0.11 g, 0.19 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (6 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 90/10) to give the desired product as white solid (83 mg, 83 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.22. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.76 (1H, s, N-H₃); 7.72 (1H, d, J_{H6-H5} = 7.81 Hz, H₆); 7.56 (1H, s, H_{15'}); 7.31 (1H, m, H_{22'}); 7.23 (1H, m, H_{18'}); 7.21 (1H, m, H_{20'}); 7.18 (1H, m, H_{19'}); 5.89 (1H, m, H_{1'}); 5.52 (1H, m, H₅); 5.51 (2H, s, H_{16'}); 5.12 (1H, s, O-H_{8'}); 4.64 (2H, m, H_{10'}); 4.30 (1H, s, O-H_{9'}); 4.10-4.21 (3H, m, H_{4'/H3'/H2'}); 3.74 (2H, m, H_{5'}); 3.65 (3H, d, J_{H28'/H29'-P24'} = 4.11 Hz, H_{28'/H29'}); 3.62 (3H, d, J_{H28'/H29'-P24'} = 4.10 Hz, H_{28'/H29'}); 3.13 (2H, d, J_{H23'-P24'} = 21.76 Hz, H_{23'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.8 (C₂); 151.2 (C₄); 144.9 (C_{11'}); 140.9 (C₆); 135.2 (d, J = 3.14 Hz, C_{22'}); 132.3 (d, J = 9.05 Hz, C_{21'}); 130.3 (d, J = 6.71 Hz, C_{18'}); 129.6 (d, J = 2.92 Hz, C_{19'}); 129.5 (d, J = 6.54 Hz, C_{20'}); 127.1 (d, J = 3.20 Hz, C_{17'}); 122.8 (C_{15'}); 102.3 (C₅); 89.7 (C_{1'}); 84.0 (C_{4'}); 75.1 (C_{2'}); 71.2 (C_{3'}); 69.9 (C_{5'}); 64.7 (C_{10'}); 54.1 (C_{16'}); 53.3 (d, J = 3.68 Hz, C_{28'/C29'}); 53.2 (d, J = 3.61 Hz, C_{28'/C29'}); 32.4 (d, J = 138.64 Hz, C_{23'}). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.9 (P_{24'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₂H₂₉N₅O₉P]⁺ m/z 538.1697 and found m/z 538.1693. IR (neat, cm⁻¹): 3093.9br; 3060.1m; 2955.6m; 2920.7w; 2858.8w; 1678.3s; 1461.6m; 1385.1w; 1329.5w; 1224.0m; 1112.3m; 1086.0m; 1023.9s; 909.8w; 856.3w; 811.9m; 780.8w; 717.4w. [α]_D²⁰ = - 7.1 (C = 0.02 M, MeOH).

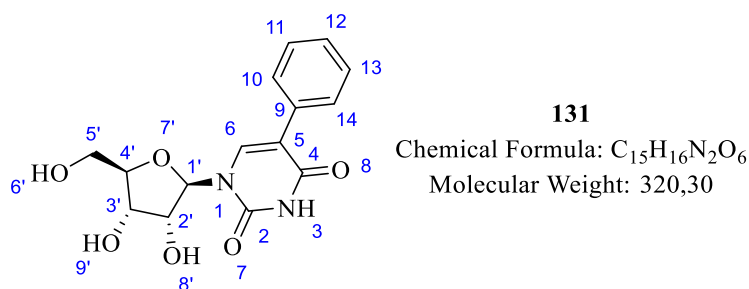
(((E)-4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-2-en-1-yl)phosphoryl)bis(oxy))bis-(methylene) bis(2,2-dimethylpropanoate) (**129**)



According to the slightly modified procedure C, the protected substituted uridine **116** (0.17 g, 0.23 mmol, 1.0 eq) was added to the MeOH solution (6 mL) of DOWEX® 50X8 H⁺ form (0.15 g). After 24 h, the reaction mixture was filtrated to remove acidic resin and was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) to give the desired product as colorless oil (89 mg, 56 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.41. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.93 (1H, s, N-H₃); 7.80 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 7.64 (1H, s, H₁₅); 5.83-5.93 (2H, m, H₁₇/H₁); 5.59-5.75 (5H, m, H₁₈/H₂₄/H₂₅); 5.57 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.07 (1H, s, O-H₈); 4.97 (2H, m, H₁₆); 4.67 (2H, m, H₁₀); 4.13-4.31 (4H, m, O-H₉/H₃/H₂/H₄); 3.69-3.88 (2H, m, H₅); 2.74 (2H, dd, *J*_{H19'-H18'} = 7.32 Hz, *J*_{H19'-P20'} = 22.67 Hz, H₁₉); 1.21 (18H, s, H₃₄/H₃₅/H₃₆/H₃₇/H₃₈/H₃₉). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.1 (d, *J* = 2.53 Hz, C₂₈/C₂₉); 164.0 (C₄); 151.3 (C₂); 144.7 (C₁₁); 140.9 (C₆); 129.4 (d, *J* = 15.41 Hz, C₁₇); 124.6 (d, *J* = 11.60 Hz, C₁₈); 122.7 (C₁₅); 102.3 (C₅); 90.0 (C₁); 84.0 (C₄); 81.9 (d, *J* = 3.29 Hz, C₂₄/C₂₅); 81.8 (d, *J* = 3.29 Hz, C₂₄/C₂₅); 75.4 (C₂); 71.0 (C₃); 69.7 (C₅); 64.6 (C₁₀); 51.9 (C₁₆); 38.9 (C₃₂/C₃₃); 30.7 (d, *J* = 140.16 Hz, C₁₉); 27.0 (C₃₄/C₃₅/C₃₆/C₃₇/C₃₈/C₃₉). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.7 (P₂₀). ESI-HRMS calculated for [C₂₈H₄₃N₅O₁₃P]⁺ m/z 688.2589 and found m/z 688.2583. IR (neat, cm⁻¹): 3392.1br; 3063.1br; 2974.6m; 2933.7w; 2873.2w; 1750.2s; 1682.5s; 1480.5w; 1461.4m; 1395.7w; 1261.6m; 1130.3s; 1054.0m; 1023.7m; 997.9m; 958.6s; 853.0w; 767.1w; 718.6w. [α]_D²⁰ = + 44.5 (C = 0.1 M, MeOH).

5-phenyl-uridine (**131**)

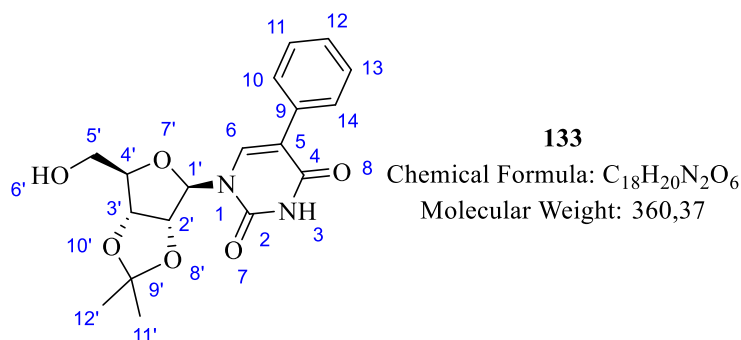
CAS: 75759-66-9



To microwave sealed tube, a solution of 5-iodo-uridine **130** (0.50 g, 1.35 mmol, 1.0 eq) in pure water (10 mL) was bubbled with a fine nitrogen stream for 20 min. Then, potassium hydroxide (0.27 g, 4.05 mmol, 3.0 eq) and phenylboronic acid (0.25 g, 2.03 mmol, 1.5 eq) were added to the reaction mixture. Thus, an aqueous solution (5 mL) of sodium tetrachloropalladate (110 mg, 0.13 mmol, 10 mol%) under nitrogen atmosphere, was added. The reaction was irradiated with microwave at 100°C for 20 min. The reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation of MeOH (5 × 20 mL). The residue was directly purified by a flash chromatography (Acetone/H₂O 93/7). The purified residue was then purified by a second flash chromatography (DCM/MeOH 93/7) to give a white solid (0.24 g, 57 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.25. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.51 (1H, s, *N*-H₃); 8.27 (1H, s, H₆); 7.55 (2H, m, H₁₀/H₁₄); 7.36 (2H, m, H₁₁/H₁₃); 7.30 (1H, m, H₁₂); 5.86 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 4.68 Hz, H_{1'}); 5.41 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.62 Hz, *O*-H_{8'}); 5.20 (1H, t, *J*_{H6'-H5'} = 4.77 Hz, *O*-H_{6'}); 5.07 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.28 Hz, *O*-H_{9'}); 4.15 (1H, q, *J*_{H2'-H3'} = 5.03 Hz, H_{2'}); 4.04 (1H, q, *J*_{H3'-H2'} = 4.99 Hz, H_{3'}); 3.89 (1H, m, H_{4'}); 3.63 (2H, m, H_{5'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162.1 (C₄); 150.2 (C₂); 138.1 (C₆); 133.1 (C₉); 128.1 (C₁₁/C₁₃); 127.9 (C₁₀/C₁₄); 127.2 (C₁₂); 113.4 (C₅); 88.3 (C_{1'}); 84.7 (C_{4'}); 74.0 (C_{2'}); 69.6 (C_{3'}); 60.4 (C_{5'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₁₇N₂O₆]⁺ *m/z* 321.1081 and found *m/z* 321.1080. IR (neat, cm⁻¹): 3196.3*br*; 1671.3*s*; 1443.6*s*; 1281.4*m*; 1192.9*m*; 1101.4*m*; 786.1*m*; 750.9*w*. [α]_D²⁰ = - 3.2 (C = 0.01 M, MeOH).

2', 3'-*O*,*O'*-isopropylidene-5-phenyl-uridine (**133**)

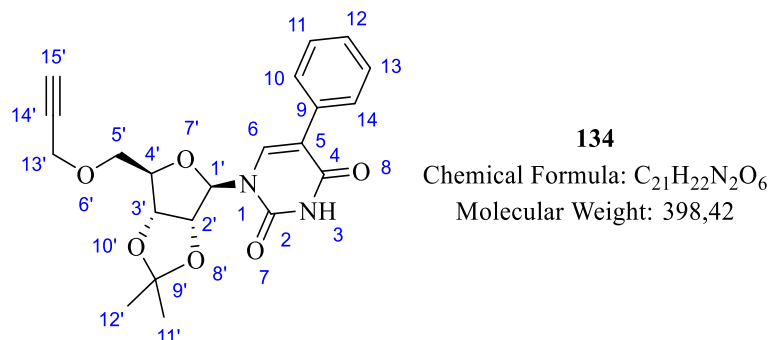
CAS: 75759-65-8



To a suspension of 5-phenyl-uridine **131** (0.25 g, 0.78 mmol, 1.0 eq) in dry acetone (10 mL), 4 Å molecular sieves (one spatula) and pure H₂SO₄ (0.5 mL, 9.4 mmol, 12.0 eq) were added. This reaction mixture was stirred at room temperature for 7 hours. The white suspension became a clearly light brown solution. Then, the solution was quenched with Et₃N (1.5 mL, 10.8 mmol, 14 eq) and then was concentrated to dryness. The residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 96/4) to give a white solid (0.24 g, 86 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.54. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.44 (1H, s, *N*-H₃); 7.54 (1H, s, H₆); 7.49 (2H, m, H₁₁/H₁₃); 7.39 (2H, m, H₁₀/H₁₄); 7.35 (1H, m, H₁₂); 5.66 (1H, m, H_{1'}); 5.11 (1H, m, H_{2'}); 4.99 (1H, m, H_{3'}); 4.32 (1H, m, H_{4'}); 3.79-3.98 (2H, m, H_{5'}); 2.69 (1H, m, *O*-H_{6'}); 1.59 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.37 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 161.7 (C₄); 149.9 (C₂); 140.2 (C₆); 131.9 (C₅); 128.8 (C₁₀/C₁₄); 128.5 (C₁₂); 128.3 (C₁₁/C₁₃); 115.9 (C₉); 114.7 (C₉); 96.5 (C_{1'}); 87.0 (C_{4'}); 83.8

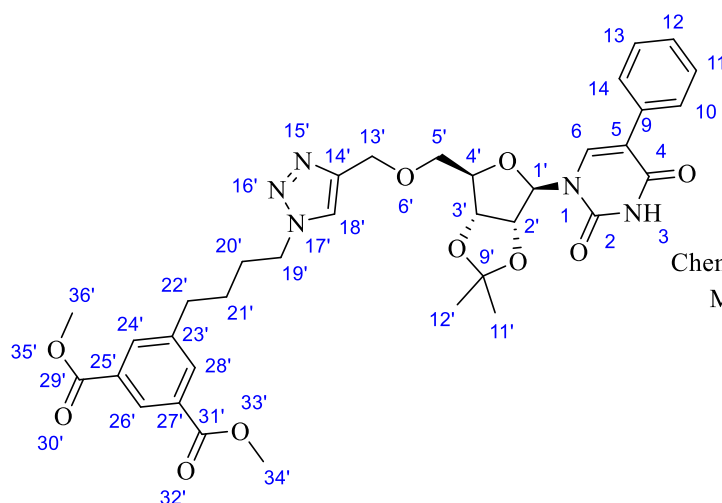
(C_{2'}); 80.5 (C_{3'}); 62.9 (C_{5'}); 27.5 (C_{11'}/C_{12'}); 25.4 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₈H₂₁N₂O₆]⁺ m/z 361.1394 and found m/z 361.1396. IR (neat, cm⁻¹): 3436.8br; 3211.1br; 3060.3w; 2988.9w; 1671.4s; 1495.2w; 1461.0w; 1444.1w; 1374.2w; 1272.2w; 1212.8w; 1155.7w; 1068.9m; 851.7w; 787.4w; 752.0w; 696.9w. [α]_D²⁰ = - 8.8 (C = 0.02 M, MeOH).

2', 3'-O,O'-isopropylidene-5'-(prop-2-yn-1-yloxy)-5-phenyl-uridine (134)



To a 100 mL flame-dried round-bottom flask, 2',3'-O,O'-isopropylidene-5-phenyluridine **133** (0.23 g; 0.64 mmol; 1.0 eq) was added in anhydrous THF (10 mL) under argon atmosphere at 0°C. NaH (60 % in mineral oil) (51 mg; 1.28 mmol; 2.0 eq) was added to a cold solution and was stirred for 30 min at 0°C. Then, a solution of propargyl bromide 80 % in toluene (0.07 mL; 0.67 mmol; 1.05 eq) was added and the reaction mixture was placed under ultrasonic irradiation for 1h30 at room temperature. The resulting brown suspension was quenched with a solution of 1:5 MeOH/H₂O (15 mL) and was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved with ethyl acetate (20 mL). A distilled water (15 mL) was added to the solution and then the aqueous layer was extracted twice with ethyl acetate (2 × 15 mL). The organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting yellow oil was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a pale yellow oil (0.24 g; 96 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.71. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.33 (1H, s, N-H₃); 7.79 (1H, s, H₆); 7.53 (2H, m, H₁₁/H₁₃); 7.39 (2H, m, H₁₀/H₁₄); 7.34 (1H, m, H₁₂); 6.05 (1H, m, H_{1'}); 4.83 (2H, m, H₂/H₃); 4.43 (1H, m, H₄); 4.12 (2H, m, H₁₃); 3.72-3.89 (2H, m, H₅); 2.38 (1H, m, H₁₅); 1.61 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.37 (3H, s, H₁₁/H₁₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 161.8 (C₄); 149.7 (C₂); 138.4 (C₆); 132.5 (C₅); 128.7 (C₁₀/C₁₄); 128.3 (C₁₁/C₁₃); 128.2 (C₁₂); 115.5 (C₉); 114.5 (C₉); 92.6 (C_{1'}); 85.4 (C₄); 85.2 (C₂); 81.0 (C₃); 78.6 (C₁₄); 75.7 (C₁₅); 69.7 (C₅); 58.8 (C₁₃); 27.4 (C₁₁/C₁₂); 25.5 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₂₁H₂₃N₂O₆]⁺ m/z 399.1550 and found m/z 399.1548. IR (neat, cm⁻¹): 3255.1br; 3064.4br; 2988.2w; 2936.9w; 1678.1s; 1602.0w; 1494.9w; 1459.4m; 1443.0m; 1373.6w; 1282.2m; 1215.7m; 1156.2w; 1082.6s; 1037.9m; 909.8w; 851.1w; 787.6w; 751.8w; 697.0w. [α]_D²⁰ = - 15.2 (C = 0.02 M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioxo-5-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isophthalate (135)



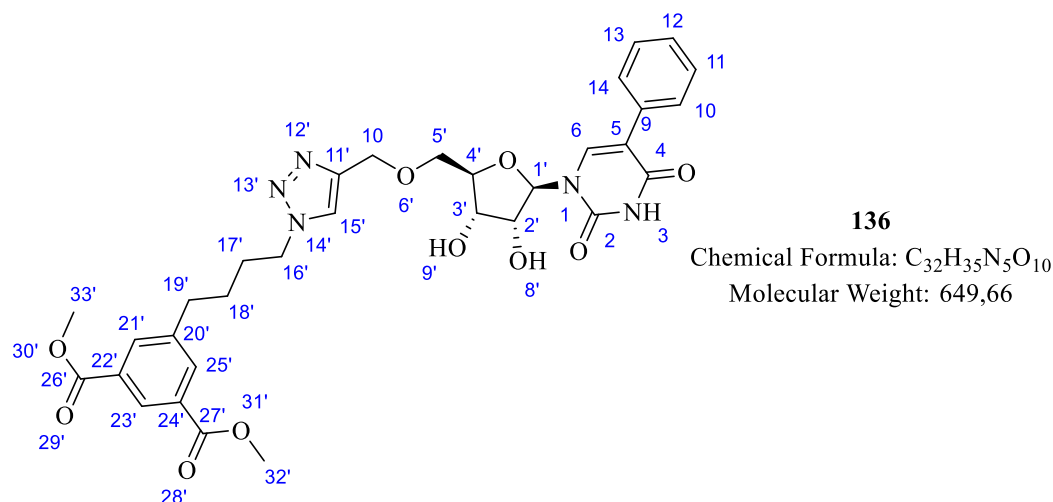
135

Chemical Formula: C₃₅H₃₉N₅O₁₀

Molecular Weight: 689,72

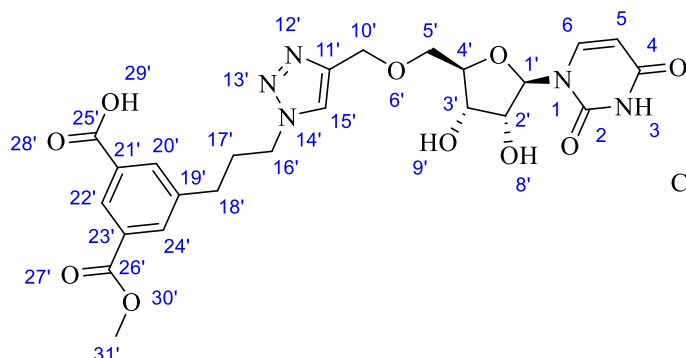
According to the general procedure B, copper sulfate pentahydrate (14 mg, 0.06 mmol, 10 mol%) and (+)-sodium ascorbate (66 mg, 0.33 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of dimethyl 3-(4-azidobutyl)isophthalate **6a** (0.16 g, 0.55 mmol, 1.0 eq) and 2',3'-O'-isopropylidene-5'-(prop-2-yn-1-yloxy)-5-phenyl-uridine **134** (0.22 g, 0.55 mmol, 1.0 eq) in 15 mL of tBuOH:H₂O (2:1). After 2 h at 40°C, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH (2 × 10 mL). The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 98/2) to give the desired product as colorless oil (0.38g, 99 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.66. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.52 (1H, s, H_{26'}); 8.22 (1H, s, N-H₃); 8.02 (2H, m, H_{24'}/H_{28'}); 7.84 (1H, s, H₆); 7.52 (2H, m, H₁₁/H₁₃); 7.39 (2H, t, J_{H10/H14-H11/H13} = 7.63 Hz, H₁₀/H₁₄); 7.31 (1H, m, H₁₂); 6.83 (1H, s, H_{18'}); 5.99 (1H, m, H_{1'}); 4.81 (2H, m, H_{3'}/H_{2'}); 4.59 (2H, m, H_{13'}); 4.41 (1H, m, H_{4'}); 4.21 (2H, t, J_{H19'-H20'} = 7.10 Hz, H_{19'}); 3.95 (6H, s, H_{35'}/H_{36'}); 3.67-3.85 (1H, m, H₅); 2.73 (2H, t, J_{H22'-H21'} = 7.55 Hz, H_{22'}); 1.84 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.04 Hz, H_{20'}); 1.64 (2H, q, J_{H21'-H22'} = 7.93 Hz, H_{21'}); 1.59 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.34 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C_{29'}/C_{30'}); 161.7 (C₂); 149.5 (C₄); 144.0 (C_{14'}); 142.4 (C_{23'}); 138.5 (C₆); 133.9 (C_{24'}/C_{28'}); 132.5 (C₉); 131.0 (C_{25'}/C_{27'}); 128.8 (C_{26'}); 128.3 (C₁₀/C₁₁/C₁₃/C₁₄); 128.2 (C₁₂); 122.4 (C_{18'}); 115.1 (C₅); 114.4 (C₉); 92.9 (C_{1'}); 85.5 (C_{4'}); 85.2 (C_{2'}); 81.1 (C_{3'}); 70.3 (C_{5'}); 64.8 (C_{13'}); 52.6 (C_{35'}/C_{36'}); 50.1 (C_{19'}); 34.9 (C_{22'}); 29.7 (C_{20'}); 28.1 (C_{21'}); 27.4 (C_{11'}/C_{12'}); 25.5 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₅H₄₀N₅O₁₀]⁺ m/z 690.2769 and found m/z 690.2763. IR (neat, cm⁻¹): 3057.9br; 2990.1w; 2951.0w; 2864.2w; 1713.4s; 1680.1s; 1601.7w; 1495.0w; 1456.9m; 1441.5m; 1332.7w; 1242.2s; 1207.5m; 1155.7w; 1081.2m; 1002.9w; 853.7w; 788.1w; 754.5w; 732.5m; 698.6w. [α]_D²⁰ = -19.7 (C = 0.02 M, MeOH).

dimethyl 5-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-5-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isophthalate (**136**)



According to the general procedure C, the protected substituted uridine **135** (0.37 g, 0.54 mmol, 1.0 eq) was added to TFA/H₂O solution (10 mL). After 20 min, the reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation once with toluene (20 mL), once cyclohexane (20 mL) and once methanol (20 mL). The resulting residue was purified by a flash chromatography (DCM/MeOH 95/5 to 90/10) to give the desired product as white solid (0.29 g, 83 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.60. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.00 (1H, s, N-H₃); 8.49 (1H, t, *J*_{H23'-H21'/H25'} = 1.51 Hz, H_{23'}); 8.07 (1H, s, H₆); 7.98 (2H, d, *J*_{H21'/H25'-H23'} = 1.49 Hz, H_{21'}/H_{25'}); 7.42-7.47 (2H, m, H₁₀/H₁₄); 7.20-7.30 (3H, m, H₁₁/H₁₃/H₁₂); 6.88 (1H, s, H_{15'}); 6.00 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 3.98 Hz, H_{1'}); 5.09 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 4.91 Hz, O-H_{8'}); 4.53-4.63 (2H, m, H_{10'}); 4.33 (1H, m, H_{2'}); 4.28 (1H, m, H_{3'}); 4.21 (1H, m, H_{4'}); 4.16 (2H, t, *J*_{H16'-H17'} = 7.05 Hz, H_{16'}); 4.04 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.02 Hz, O-H_{9'}); 3.92 (6H, s, H_{32'}/H_{33'}); 3.63-3.87 (1H, m, H₅); 2.68 (2H, t, *J*_{H19'-H18'} = 7.71 Hz, H_{19'}); 1.79 (2H, q, *J*_{H17'-H16'} = 7.10 Hz, H_{17'}); 1.57 (2H, q, *J*_{H18'-H19'} = 7.74 Hz, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C_{26'}/C_{27'}); 162.5 (C₄); 150.9 (C₂); 144.1 (C_{11'}); 142.5 (C_{20'}); 138.0 (C₆); 133.9 (C_{21'}/C_{25'}); 132.8 (C₉); 130.9 (C_{22'}/C_{24'}); 128.7 (C_{23'}); 128.5 (C₁₁/C₁₃); 128.3 (C₁₀/C₁₄); 128.0 (C₁₂); 122.5 (C_{15'}); 115.1 (C₅); 90.2 (C_{1'}); 84.0 (C_{4'}); 75.6 (C_{2'}); 70.6 (C_{3'}); 69.1 (C_{5'}); 64.6 (C_{10'}); 52.6 (C_{32'}/C_{33'}); 50.1 (C_{16'}); 34.8 (C_{19'}); 29.7 (C_{17'}); 28.0 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₂H₃₆N₅O₁₀]⁺ m/z 650.2456 and found m/z 650.2452. IR (neat, cm⁻¹): 3403.7br; 3234.7br; 3065.6w; 2949.2w; 2864.5w; 1713.7s; 1678.5s; 1601.6w; 1495.3w; 1458.0m; 1441.6m; 1332.0w; 1243.2s; 1206.8m; 1156.3m; 1049.6m; 999.6m; 885.2w; 788.1w; 753.7m; 721.5w; 699.0w; 583.5w. [α]_D²⁰ = - 25.9 (C = 0.02 M, MeOH).

3-(4-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (137)



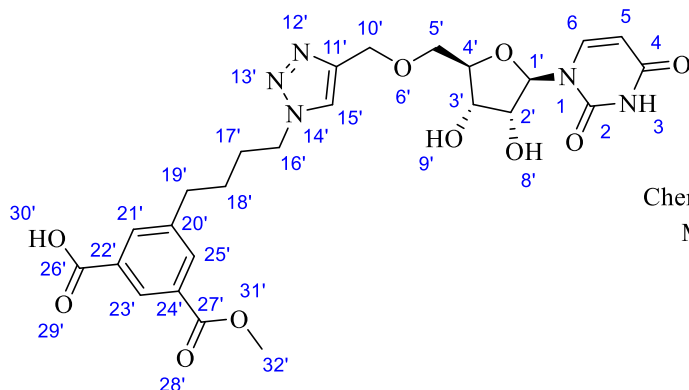
137

Chemical Formula: C₂₄H₂₇N₅O₁₀

Molecular Weight: 545,51

According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **117** (82 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (5 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 0.5/6.25/3.25) to give a white solid (66 mg, 82 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.46. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.26 (1H, s, N-H₃); 8.35 (1H, s, H_{22'}); 8.19 (1H, s, H_{15'}); 8.01 (1H, s, H_{20'}); 7.88 (1H, s, H_{24'}); 7.78 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.76 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.21 Hz, H_{1'}); 5.54 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.09 Hz, H₅); 4.58 (2H, m, H_{10'}); 4.40 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 7.14 Hz, H_{16'}); 3.92-4.02 (3H, m, H_{2'/H3'/H4'}); 3.86 (3H, s, H_{31'}); 3.67 (2H, m, H_{5'}); 2.68 (2H, m, H_{18'}); 2.17 (2H, m, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 166.5 (C_{25'}); 166.0 (C_{26'}); 163.7 (C₂); 151.1 (C₄); 144.1 (C_{11'}); 144.0 (C_{19'}); 141.6 (C₆); 141.1 (C_{21'}); 134.0 (C_{20'}); 131.8 (C_{23'}); 131.5 (C_{24'}); 128.2 (C_{22'}); 124.2 (C_{15'}); 102.1 (C₅); 88.5 (C_{1'}); 83.4 (C_{4'}); 73.9 (C_{2'}); 70.7 (C_{3'}); 70.6 (C_{5'}); 64.1 (C_{10'}); 52.5 (C_{31'}); 49.5 (C_{16'}); 31.9 (C_{18'}); 31.7 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₄H₂₈N₅O₁₀]⁺ m/z 546.1830 and found m/z 546.1825. IR (neat, cm⁻¹): 3351.5br/s; 2924.3m; 1682.2s; 1567.9m; 1455.5m; 1408.1m; 1292.9m; 1215.4m; 1112.5m; 1064.5m; 763.0m. [α]_D²⁰ = + 26.7 (C = 0.006 M, MeOH).

3-(4-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (138)



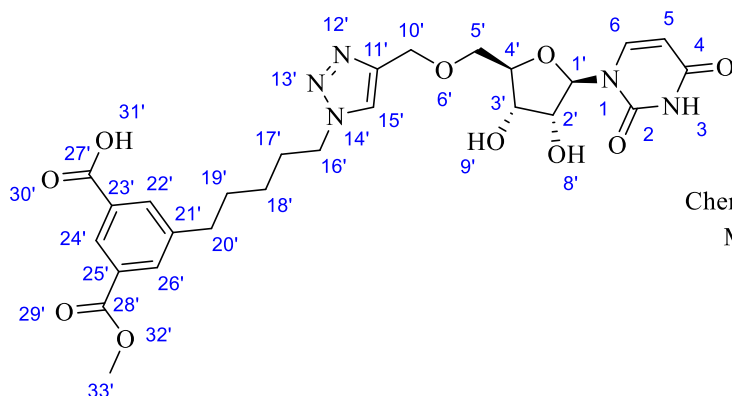
138

Chemical Formula: C₂₅H₂₉N₅O₁₀

Molecular Weight: 559,53

According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **118** (129 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (10 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 1h30. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 0.5/6.25/3.25) to give a white solid (79 mg, 64 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.28. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.23 (1H, s, H_{23'}); 8.06 (1H, s, H_{15'}); 7.77 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 7.92 (1H, s, H_{21'}); 7.70 (1H, s, H_{25'}); 5.78 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.75 Hz, H_{1'}); 5.56 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.15 Hz, H₅); 4.55 (2H, m, H_{10'}); 4.47 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.72 Hz, H_{16'}); 3.95-4.01 (2H, m, H_{2'/H4'}); 3.89 (1H, m, H_{3'}); 3.62 (2H, m, H_{5'}); 3.17 (3H, s, H_{32'}); 2.62 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 7.38 Hz, H_{19'}); 1.79 (2H, m, H_{18'}); 1.46 (2H, m, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.8 (C_{26'}); 168.2 (C_{27'}); 163.5 (C₂); 151.2 (C₄); 144.9 (C_{11'}); 144.1 (C_{20'}); 141.3 (C₆); 140.4 (C_{22'}); 131.2 (C_{25'}); 129.6 (C_{21'}); 129.3 (C_{24'}); 128.3 (C_{23'}); 124.2 (C_{15'}); 102.4 (C₅); 88.4 (C_{1'}); 83.5 (C_{4'}); 73.9 (C_{2'}); 71.1 (C_{3'}); 70.2 (C_{5'}); 64.2 (C_{10'}); 49.5 (C_{16'}); 49.1 (C_{32'}); 34.6 (C_{19'}); 29.7 (C_{18'}); 28.3 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₃₀N₅O₁₀]⁺ m/z 560.1987 and found m/z 560.1981. IR (neat, cm⁻¹): 3217.4br; 2924.2m; 2863.3m; 1682.3s; 1614.7m; 1562.7s; 1371.7s; 1270.5m; 1215.9w; 1111.3m; 1063.0m; 814.8w; 768.7w; 716.7w. [α]_D²⁰ = - 4.1 (C = 0.009 M, MeOH).

3-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (139)



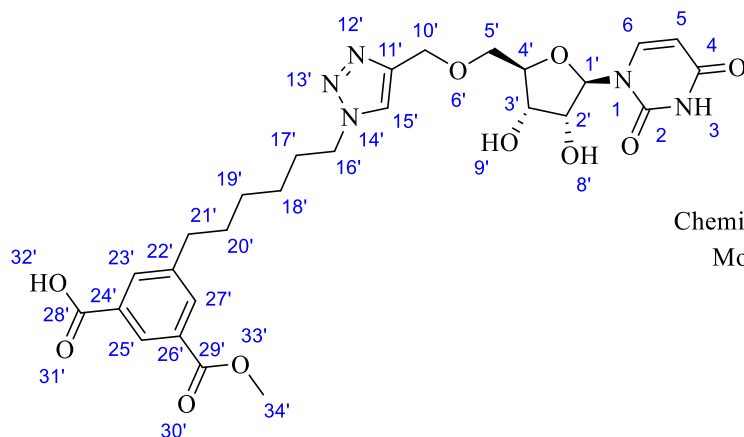
139

Chemical Formula: C₂₆H₃₁N₅O₁₀

Molecular Weight: 573.56

According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **119** (120 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (6 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (Acetone/H₂O 98/2 to 95/5) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.5/6.25/3.25) was used to give a white solid (103 mg, 88 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.51. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.27 (1H, s, N-H₃); 8.33 (1H, s, H_{24'}); 8.13 (1H, s, H_{15'}); 7.99 (1H, s, H_{22'}); 7.87 (1H, s, H_{26'}); 7.78 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 5.76 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.12 Hz, H_{1'}); 5.52 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.06 Hz, H₅); 4.56 (2H, q, J_{H10'-H5'} = 11.86 Hz, H_{10'}); 4.35 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.98 Hz, H_{16'}); 3.95-4.00 (2H, m, H_{2'/H3'}); 3.93 (1H, m, H_{4'}); 3.86 (3H, s, H_{33'}); 3.66 (2H, qd, J_{H5'-H5'} = 2.67 Hz, J_{H5'-H4'} = 10.70 Hz, H_{5'}); 2.67 (2H, t, J_{H20'-H19'} = 7.38 Hz, H_{20'}); 1.85 (2H, q, J_{H17'-H18'} = 7.29 Hz, H_{17'}); 1.61 (2H, q, J_{H19'-H18'} = 7.69 Hz, H_{19'}); 1.24 (2H, m, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 170.3 (C_{27'}); 166.6 (C_{28'}); 163.5 (C₂); 151.2 (C₄); 143.6 (C_{11'}); 143.3 (C_{21'}); 141.2 (C₆); 139.9 (C_{23'}); 134.1 (C_{22'}); 131.9 (C_{26'}); 130.3 (C_{25'}); 127.7 (C_{24'}); 124.3 (C_{15'}); 102.1 (C₅); 88.5 (C_{1'}); 83.4 (C_{4'}); 73.9 (C_{2'}); 70.9 (C_{3'}); 70.1 (C_{5'}); 64.2 (C_{10'}); 52.6 (C_{33'}); 49.7 (C_{16'}); 34.9 (C_{20'}); 30.6 (C_{19'}); 30.0 (C_{17'}); 25.9 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₃₂N₅O₁₀]⁺ m/z 574.2143 and found m/z 574.2137. IR (neat, cm⁻¹): 3369.1br/s; 2929.7m; 2860.9m; 1682.3s; 1558.1m; 1456.1m; 1405.8m; 1269.7m; 1213.7m; 1112.8m; 1063.8m; 762.4m. [α]_D²⁰ = +19.2 (C = 0.006 M, MeOH).

3-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (140**)**



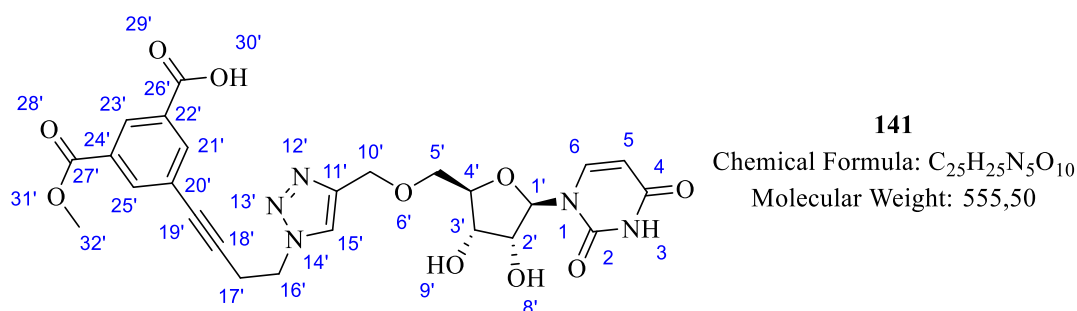
140

Chemical Formula: C₂₇H₃₃N₅O₁₀

Molecular Weight: 587,59

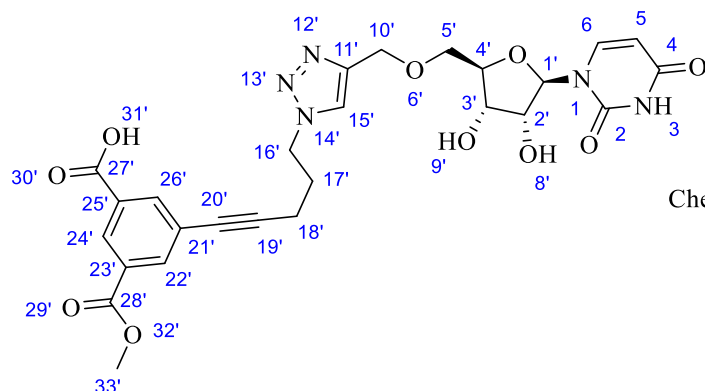
According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **120** (120 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (6 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.5/6.25/3.25) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 98/2 to 95/5) was used to give a white solid (117 mg, 99 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.55. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.29 (1H, s, N-H₃); 8.31 (1H, s, H₂₅); 8.16 (1H, s, H₁₅); 7.99 (1H, s, H₂₃); 7.90 (1H, s, H₂₇); 7.78 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.06 Hz, H₆); 5.76 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.13 Hz, H_{1'}); 5.53 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.07 Hz, H₅); 4.57 (2H, q, J_{H10'-H5'} = 11.89 Hz, H_{10'}); 4.34 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 7.06 Hz, H_{16'}); 3.91-4.00 (3H, m, H₂/H₃/H₄); 3.87 (3H, s, H₃₄); 3.66 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.75 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.81 Hz, H_{5'}); 2.67 (2H, t, J_{H21'-H20'} = 7.52 Hz, H_{21'}); 1.80 (2H, q, J_{H17'-H18'} = 7.43 Hz, H_{17'}); 1.57 (2H, q, J_{H20'-H21'} = 7.64 Hz, H_{20'}); 1.22-1.34 (4H, m, H₁₈/H₁₉). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 170.0 (C₂₈); 166.5 (C₂₉); 163.5 (C₂); 151.2 (C₄); 143.1 (C₁₁); 143.0 (C₂₁); 141.1 (C₆); 139.7 (C₂₄); 134.1 (C₂₃); 132.3 (C₂₇); 131.8 (C₂₆); 127.8 (C₂₅); 124.3 (C₁₅); 102.2 (C₅); 88.6 (C₁); 83.4 (C₄); 73.9 (C₂); 70.7 (C₃); 70.1 (C₅); 64.2 (C₁₀); 52.7 (C₃₄); 49.4 (C₁₆); 34.6 (C₂₁); 31.0 (C₂₀); 29.8 (C₁₇); 27.9 (C₁₈); 26.1 (C₁₉). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₄N₅O₁₀]⁺ m/z 588.2300 and found m/z 588.2290. IR (neat, cm⁻¹): 3390.6br/s; 2930.3m; 2859.0m; 1682.6s; 1462.9m; 1402.2m; 1270.1m; 1215.1m; 1113.0m; 1064.6m; 759.0m. [α]_D²⁰ = + 32.5 (C = 0.007 M, MeOH).

3-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-1-yn-1-yl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (**141**)



According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **121** (72.8 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (5 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 2 h30. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.5/6.5/3) to give a white solid (33.4 mg, 47 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.37. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.26 (1H, s, N-H₃); 8.41 (1H, m, H₂₃); 8.30 (1H, s, H₁₅); 8.06 (1H, m, H₂₁); 7.87 (1H, m, H₂₅); 7.78 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.09 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 4.87 Hz, H₁); 5.54 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.45 (1H, s, O-H₈); 4.55-4.67 (4H, m, H₁₀/H₁₆); 4.41 (1H, s, O-H₉); 3.90-4.01 (3H, m, H₂/H₃/H₄); 3.86 (3H, s, H₃₂); 3.66 (2H, m, H₅); 3.07 (2H, t, J_{H17-H18} = 6.33 Hz, H₁₇). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 167.8 (C₂₆); 165.5 (C₂₇); 163.1 (C₄); 150.7 (C₂); 143.5 (C₁₁); 140.8 (C₆); 136.1 (C₂₁); 133.1 (C₂₅); 129.8 (C₂₂); 129.5 (C₂₃); 129.1 (C₂₄); 124.3 (C₁₅); 122.6 (C₂₀); 101.8 (C₅); 88.0 (C₁); 87.6 (C₁₈); 82.9 (C₄); 81.2 (C₁₉); 73.4 (C₂); 70.2 (C₃); 69.6 (C₅); 63.8 (C₁₀); 52.4 (C₃₂); 48.0 (C₁₆); 20.7 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₂₆N₅O₁₀]⁺ m/z 556.1674 and found m/z 556.1669. IR (neat, cm⁻¹): 3368.8br/s; 3061.2m; 2969.3m; 2925.8m; 1678.6s; 1568.3m; 1441.0m; 1402.3m; 1299.9m; 1237.0m; 1112.4m; 1063.9m; 816.4w; 763.7m, 718.7w. [α]_D²⁰ = + 20.1 (C = 0.01 M, MeOH).

3-(5-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (**142**)

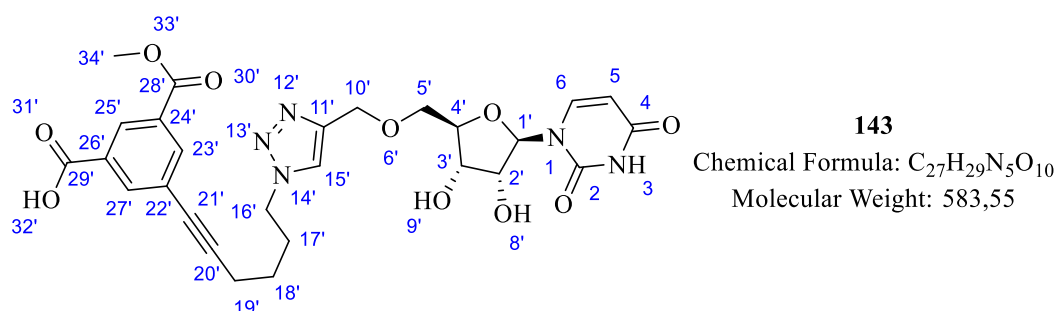


142

Chemical Formula: C₂₆H₂₇N₅O₁₀
Molecular Weight: 569,53

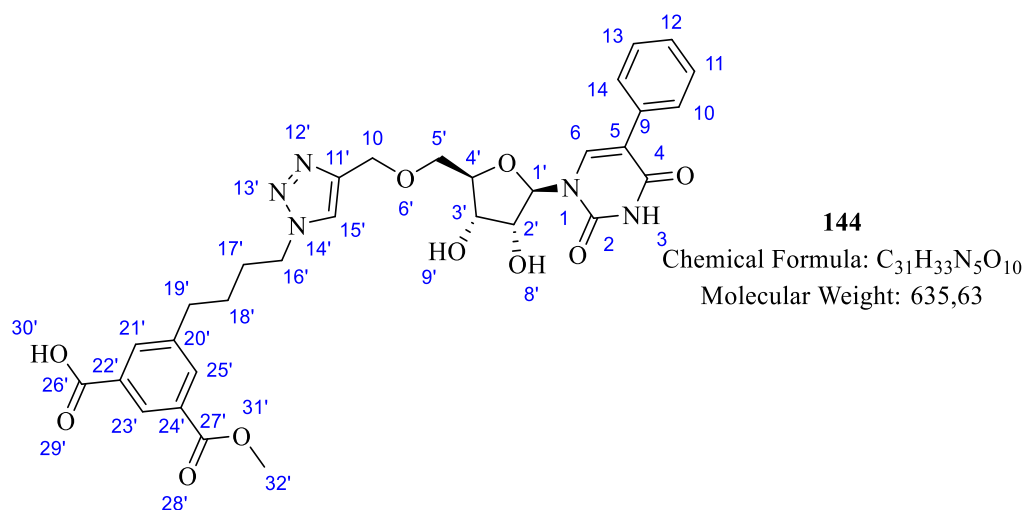
According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **122** (70.8 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (5 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 2h30. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 0.5/6.5/3) to give a white solid (51.3 mg, 74 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.51. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.36 (1H, s, N-H₃); 8.39 (1H, m, H_{24'}); 8.27 (1H, s, H_{15'}); 8.11 (1H, m, H_{26'}); 8.04 (1H, m, H_{22'}); 7.77 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.33 Hz, H_{1'}); 5.53 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.13 Hz, H₅); 4.49-4.61 (4H, m, H_{10'}/H_{16'}); 3.91-4.01 (3H, m, H_{2'}/H_{3'}/H_{4'}); 3.87 (3H, s, H_{33'}); 3.65 (2H, dd, J_{H5'-H5''} = 10.84 Hz, J_{H5'-H4'} = 2.79 Hz, H_{5'}); 2.47 (2H, t, J_{H18'-H17'} = 6.76 Hz, H_{18'}); 2.12 (2H, q, J_{H17'-H18'/H16'} = 6.87 Hz, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 167.7 (C_{27'}); 165.2 (C_{28'}); 163.1 (C₂); 150.7 (C₄); 143.6 (C_{11'}); 140.9 (C₆); 136.1 (C_{26'}); 135.1 (C_{22'}); 134.6 (C_{23'}); 130.4 (C_{25'}); 129.4 (C_{21'}); 129.1 (C_{24'}); 124.2 (C_{15'}); 101.8 (C₅); 91.0 (C_{19'}); 88.0 (C_{1'}); 83.0 (C_{4'}); 79.5 (C_{20'}); 73.4 (C_{2'}); 70.3 (C_{3'}); 69.7 (C_{5'}); 63.8 (C_{10'}); 52.6 (C_{16'}); 48.5 (C_{33'}); 28.6 (C_{18'}); 16.1 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₂₈N₅O₁₀]⁺ m/z 570.1830 and found m/z 570.1831. IR (neat, cm⁻¹): 3393.9br/s; 2953.6m; 2923.9m; 2872.2m; 2853.6w; 1682.5s; 1568.0w; 1466.5m; 1439.7m; 1393.6m; 1312.3w; 1262.3m; 1237.4m; 1113.2m; 1063.8m; 912.2w; 818.4w; 758.2m, 718.1w. [α]_D²⁰ = -2.3 (C = 0.02 M, MeOH).

3-(6-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (**143**)



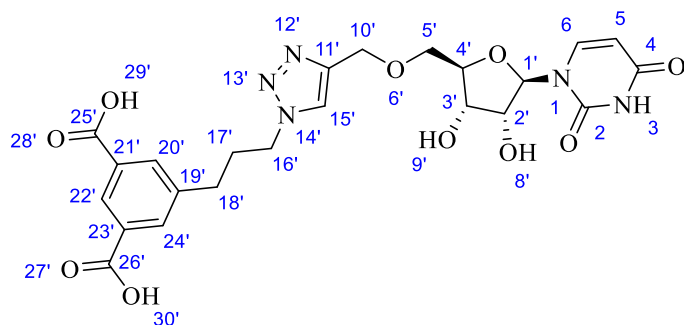
According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **123** (56.5 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (5 mL), lithium hydroxide solution (0.06 M) was added and then was stirred at room temperature for 7 h. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.1/6.5/3.4) to give a white solid (53 mg, 99 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.50. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.41 (1H, m, H_{25'}); 8.22 (1H, s, H_{15'}); 8.12 (1H, m, H_{27'}); 7.89 (1H, m, H_{23'}); 7.77 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.15 Hz, H₆); 5.74 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.20 Hz, H_{1'}); 5.52 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.18 Hz, H₅); 4.56 (2H, m, H_{10'}); 4.43 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 7.01 Hz, H_{16'}); 3.91-4.00 (3H, m, H_{2'/H3'/H4'}); 3.85 (3H, s, H_{34'}); 3.65 (2H, qd, J_{H5'-H5''} = 10.96 Hz, J_{H5'-H4'} = 2.78 Hz, H_{5'}); 2.47 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 7.04 Hz, H_{19'}); 1.97 (2H, q, J_{H17'-H18'} = 7.14 Hz, H_{17'}); 1.50 (2H, q, J_{H18'-H17'} = 7.12 Hz, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.1 (C_{29'}); 165.7 (C_{28'}); 163.2 (C₄); 150.8 (C₂); 143.6 (C_{11'}); 140.9 (C₆); 136.3 (C_{27'}); 135.7 (C_{26'}); 132.9 (C_{23'}); 130.9 (C_{24'}); 129.7 (C_{25'}); 129.3 (C_{22'}); 124.1 (C_{15'}); 101.8 (C₅); 91.2 (C_{20'}); 88.1 (C_{1'}); 83.0 (C_{4'}); 79.9 (C_{21'}); 73.5 (C_{2'}); 70.3 (C_{3'}); 69.7 (C_{5'}); 63.8 (C_{10'}); 52.5 (C_{34'}); 48.9 (C_{16'}); 29.1 (C_{17'}); 25.1 (C_{18'}); 18.1 (C_{19'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₇H₃₀N₅O₁₀]⁺ m/z 584.1987 and found m/z 584.1981. IR (neat, cm⁻¹): 3376.1br/s; 2991.1m; 2952.2w; 1682.0s; 1573.7m; 1439.8m; 1404.2m; 1301.0w; 1235.4m; 1112.5m; 1063.7m; 911.4w; 820.2w; 758.1m; 720.7w. [α]_D²⁰ = +106.0 (C = 0.02 M, MeOH).

3-(4-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-5-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)-5-(methoxycarbonyl)benzoic acid (**144**)



According to the general procedure D, to a solution of dimethyl ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **136** (63 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq) of THF:H₂O (5 mL), lithium hydroxide monohydrate (10 mg, 0.24 mmol, 1.5 eq) was added and then was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and was concentrated to dryness with co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by a flash chromatography (H₂O/ⁱPrOH/EA 0.1/6.5/3.4) to give a white solid (11 mg, 18 %). R_f (H₂O/ⁱPrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.66. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.24 (1H, s, H₂₃); 8.09 (1H, s, H₁₅); 7.92 (1H, s, H₂₁); 7.82 (1H, s, H₆); 7.72 (1H, s, H₂₅); 7.50 (2H, m, H₁₁/H₁₃); 7.39 (2H, t, J_{H10/H14-H11/H13} = 7.52 Hz, H₁₀/H₁₄); 7.29 (1H, m, H₁₂); 5.77 (1H, m, H₁); 4.56 (2H, m, H₁₀); 4.49 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.65 Hz, H₁₆); 3.94-4.01 (2H, m, H₂/H₄); 3.87 (1H, m, H₃); 3.59 (2H, m, H₅); 3.43 (3H, s, H₃₂); 2.66 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 7.34 Hz, H₁₉); 1.76 (2H, m, H₁₈); 1.43 (2H, m, H₁₇). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.2 (C₂₆); 168.8 (C₂₇); 163.1 (C₂); 151.2 (C₄); 144.4 (C₁₁); 142.5 (C₂₀); 140.9 (C₂₂); 139.6 (C₆); 132.0 (C₂₅); 133.1 (C₅); 131.0 (C₂₁); 129.7 (C₂₄); 128.4 (C₂₃); 128.2 (C₁₀/C₁₁/C₁₃/C₁₄); 128.1 (C₁₂); 122.4 (C₁₅); 114.8 (C₉); 88.6 (C₁); 83.3 (C₄); 73.2 (C₂); 71.2 (C₃); 70.2 (C₅); 64.2 (C₁₀); 51.6 (C₃₂); 50.2 (C₁₆); 34.4 (C₁₉); 29.7 (C₁₈); 27.9 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₃₄N₅O₁₀]⁺ m/z 636.2300 and found m/z 636.2293. IR (neat, cm⁻¹): 3363.1br/s; 2926.5m; 2853.5m; 1634.7s; 1496.4w; 1445.7m; 1333.1m; 1250.7m; 1204.4m; 1155.1m; 1100.8m; 1006.5m; 911.9m. [α]_D²⁰ = + 3.1 (C = 0.02 M, MeOH).

5-(3-(4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)isophthalicacid (145)



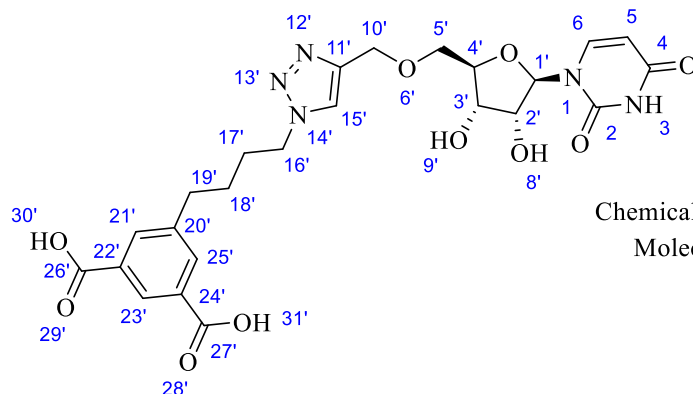
145

Chemical Formula: $C_{23}H_{25}N_5O_{10}$

Molecular Weight: 531,48

According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **117** (120 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq) with 6 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5 to 90/10) was used to give a pure product as a white solid (87 mg, 84 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.25. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.25 (1H, s, H_{22'}); 8.14 (1H, s, H_{15'}); 7.78 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.05 Hz, H₆); 7.72 (2H, s, H_{20'}/H_{24'}); 5.77 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.54 Hz, H_{1'}); 5.55 (1H, d, *J*_{H5'-H6} = 7.99 Hz, H₅); 4.58 (2H, s, H_{10'}); 4.38 (2H, t, *J*_{H16'-H17'} = 6.55 Hz, H_{16'}); 3.92-4.03 (3H, m, H_{2'}/H_{4'}/H_{3'}); 3.65 (2H, qd, *J*_{H5'-H4'} = 3.04 Hz, *J*_{H5'-H5''} = 11.06 Hz, H_{5'}); 2.55 (2H, m, H_{18'}); 2.14 (2H, m, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 168.8 (C_{25'}/C_{26'}); 163.2 (C₂); 151.1 (C₄); 144.1 (C_{11'}); 141.7 (C_{19'}); 141.2 (C₆); 131.5 (C_{20'}/C_{24'}); 128.5 (C_{21'}/C_{23'}); 128.0 (C_{22'}); 124.3 (C_{15'}); 102.4 (C₅); 88.3 (C_{1'}); 83.5 (C_{4'}); 73.9 (C_{2'}); 71.0 (C_{3'}); 70.1 (C_{5'}); 64.3 (C_{10'}); 49.3 (C_{16'}); 31.9 (C_{18'}); 31.2 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₃H₂₆N₅O₁₀]⁺ m/z 532.1674 and found m/z 532.1668. IR (neat, cm⁻¹): 3235.1br; 2926.8m; 1682.2s; 1614.8m; 1563.1m; 1372.5m; 1268.9m; 1213.9m; 1111.6m; 1062.6m; 814.0m; 765.8m; 686.3m. [α]_D²⁰ = + 136.5 (C = 0.03 M, H₂O).

5-(3-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydro-furan-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isophthalic acid (146**)**



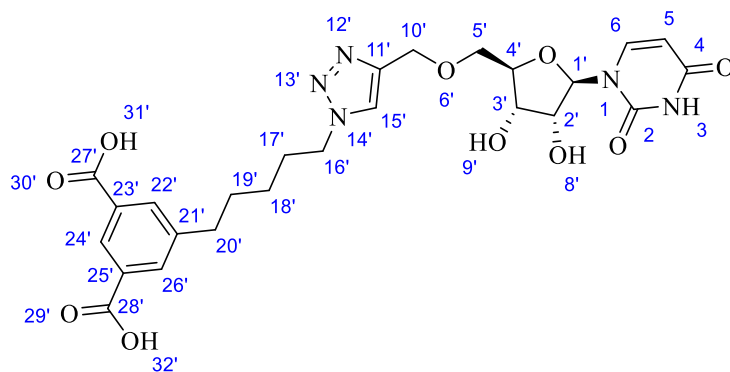
146

Chemical Formula: C₂₄H₂₇N₅O₁₀

Molecular Weight: 545,51

According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **118** (47.2 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (5 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 1/6/3) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5 to 90/10) was used to give a pure product as a white solid (35 mg, 78 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.35. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.28 (1H, s, H_{23'}); 8.10 (1H, s, H_{15'}); 7.79 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.16 Hz, H₆); 7.76 (2H, m, H_{21'}/H_{25'}); 5.78 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.39 Hz, H_{1'}); 5.55 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.08 Hz, H₅); 4.56 (2H, m, H_{10'}); 4.37 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.71 Hz, H_{16'}); 3.96-4.02 (2H, m, H_{2'/H3'}); 3.93 (1H, m, H_{4'}); 3.64 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.99 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.95 Hz, H_{5'}); 2.63 (2H, t, J_{H19'-H18'} = 6.90 Hz, H_{19'}); 1.81 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 6.85 Hz, H_{17'}); 1.51 (2H, q, J_{H18'-H19'} = 7.30 Hz, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.6 (C_{26'}/C_{27'}); 163.1 (C₄); 150.8 (C₂); 143.5 (C_{11'}); 140.8 (C₆); 140.3 (C_{20'}); 136.5 (C_{22'}/C_{24'}); 131.0 (C_{21'}/C_{25'}); 127.9 (C_{23'}); 123.8 (C_{15'}); 101.8 (C₅); 88.1 (C₁); 83.0 (C_{4'}); 73.5 (C_{2'}); 70.4 (C_{3'}); 69.7 (C_{5'}); 63.7 (C_{10'}); 49.1 (C_{16'}); 34.2 (C_{19'}); 29.4 (C_{17'}); 27.8 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₄H₂₈N₅O₁₀]⁺ m/z 546.1830 and found m/z 546.1821. IR (neat, cm⁻¹): 3368.6br; 3235.3br; 2924.3m; 2856.7m; 1682.3s; 1614.1m; 1557.2m; 1463.0m; 1434.6m; 1362.8m; 1270.6m; 1212.8m; 1111.9m; 1063.7m; 907.9m; 814.6m; 767.4m; 717.0m; 690.5m. [α]_D²⁰ = + 6.6 (C = 0.01 M, H₂O).

5-(3-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)isophthalic acid (**147**)



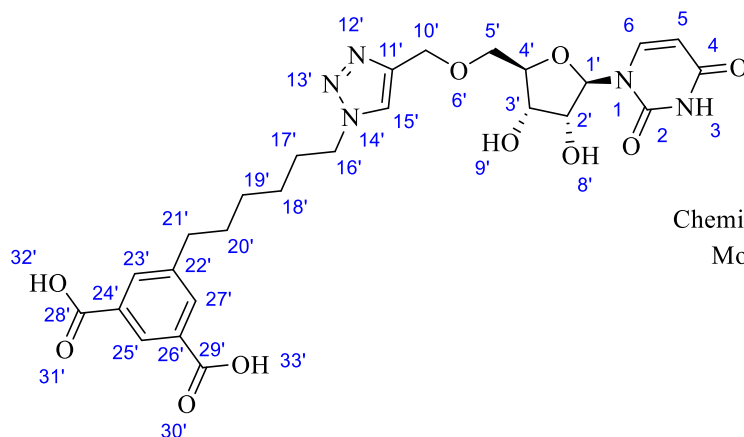
147

Chemical Formula: C₂₅H₂₉N₅O₁₀

Molecular Weight: 559,53

According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **119** (90 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/ EA 1/6/3) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5 to 90/10) was used to give a pure product as a white solid (89 mg, 99 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.28 (1H, s, N-H₃); 8.28 (1H, s, H_{24'}); 8.06 (1H, s, H_{15'}); 7.75-7.82 (3H, m, H_{22'}/H_{26'}/H₆); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.06 Hz, H_{1'}); 5.52 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.03 Hz, H₅); 4.54 (2H, m, H_{10'}); 4.34 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.81 Hz, H_{16'}); 3.92-4.01 (3H, m, H_{2'/H3'/H4'}); 3.65 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.11 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.66 Hz, H_{5'}); 2.62 (2H, t, J_{H20'-H19'} = 7.01 Hz, H_{20'}); 1.84 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 6.67 Hz, H_{17'}); 1.61 (2H, q, J_{H19'-H18'} = 7.36 Hz, H_{19'}); 1.21 (2H, m, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.1 (C₂₇/C_{28'}); 163.5 (C₄); 151.2 (C₂); 143.9 (C_{11'}); 141.5 (C_{21'}); 141.3 (C₆); 132.1 (C_{23'}/C_{25'}); 131.9 (C_{22'}/C_{26'}); 128.3 (C_{24'}); 124.2 (C_{15'}); 102.2 (C₅); 88.6 (C_{1'}); 83.3 (C_{4'}); 74.0 (C_{2'}); 70.7 (C_{3'}); 70.1 (C_{5'}); 64.2 (C_{10'}); 49.7 (C_{16'}); 35.1 (C_{20'}); 30.5 (C_{17'}); 29.9 (C_{19'}); 25.7 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₃₀N₅O₁₀]⁺ m/z 560.1987 and found m/z 560.1981. IR (neat, cm⁻¹): 3139.8br; 2926.1m; 2860.1m; 1682.4s; 1563.3m; 1366.0m; 1268.9m; 1211.5m; 1112.1m; 1062.9m; 813.6m; 766.0m; 685.4m. [α]_D²⁰ = + 126.1 (C = 0.03 M, H₂O).

5-(3-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)isophthalic acid (148**)**



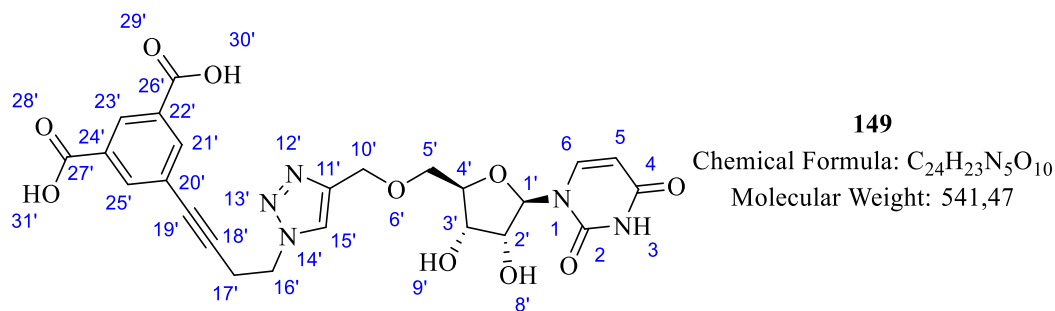
148

Chemical Formula: C₂₆H₃₁N₅O₁₀

Molecular Weight: 573.56

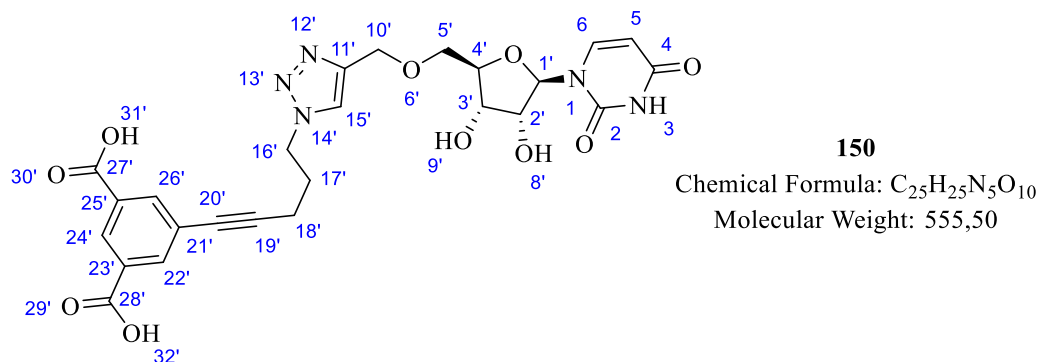
According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **120** (90 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water. Next, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 95/5 to 90/10) was used to give a pure product as a white solid (83 mg, 97 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.49. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.32 (1H, s, N-H₃); 8.26 (1H, s, H_{25'}); 8.13 (1H, s, H_{15'}); 7.75-7.80 (3H, m, H_{23'}/H_{27'}/H₆); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.21 Hz, H_{1'}); 5.55 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.04 Hz, H₅); 4.56 (2H, s, H_{10'}); 4.32 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.95 Hz, H_{16'}); 3.91-4.02 (3H, m, H_{2'}/H_{3'}/H_{4'}); 3.65 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.25 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.74 Hz, H_{5'}); 2.60 (2H, t, J_{H21'-H20'} = 7.34 Hz, H_{21'}); 1.79 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 6.68 Hz, H_{17'}); 1.55 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 6.90 Hz, H_{20'}); 1.25 (4H, m, H_{18'}/H_{19'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 169.2 (C_{28'}/C_{29'}); 163.5 (C₂); 151.2 (C₄); 144.0 (C_{11'}); 141.5 (C_{22'}); 141.2 (C₆); 133.6 (C_{24'}/C_{26'}); 131.6 (C_{23'}/C_{27'}); 128.2 (C_{25'}); 124.2 (C_{15'}); 102.2 (C₅); 88.5 (C_{1'}); 83.4 (C_{4'}); 74.0 (C_{2'}); 70.8 (C_{3'}); 70.1 (C_{5'}); 64.2 (C_{10'}); 49.8 (C_{16'}); 35.1 (C_{21'}); 30.8 (C_{20'}); 30.0 (C_{17'}); 28.1 (C_{19'}); 26.0 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₆H₃₂N₅O₁₀]⁺ m/z 574.2130 and found m/z 574.2138. IR (neat, cm⁻¹): 3197.5; 2929.1; 2857.3; 1683.2; 1612.3; 1561.2; 1366.9; 1268.4; 1212.4; 1111.4; 1062.4; 812.2; 766.4; 687.7. [α]_D²⁰ = - 27.1 (C = 0.02 M, H₂O).

5-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-1-yn-1-yl)isophthalic acid (149**)**



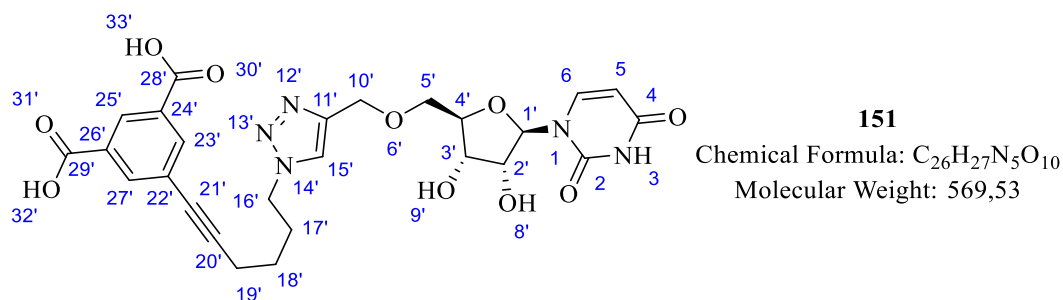
According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **121** (52.5 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water to give a pure product as a white solid (35 mg, 70 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.18. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.31 (1H, s, N-H₃); 8.38 (1H, m, H₂₃); 8.23 (1H, m, H₁₅); 7.83 (2H, m, H₂₁/H₂₅); 7.79 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.13 Hz, H₆); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.17 Hz, H_{1'}); 5.57 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.15 Hz, H₅); 4.54-4.66 (4H, m, H₁₀/H₁₆); 3.98 (2H, m, H₃/H₂); 3.60-3.71 (2H, m, H₅); 3.04 (2H, t, J_{H17'-H16'} = 6.45 Hz, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.8 (C₂₆/C₂₇); 163.2 (C₄); 150.8 (C₂); 143.5 (C₁₁); 140.9 (C₆); 138.3 (C₂₂/C₂₄); 133.1 (C₂₁/C₂₅); 130.1 (C₂₃); 124.3 (C₁₅); 120.8 (C₂₀); 101.9 (C₅); 88.1 (C₁); 85.4 (C₁₈); 83.0 (C₄); 82.9 (C₁₉); 73.5 (C₂); 70.3 (C₃); 69.7 (C₅); 63.8 (C₁₀); 48.2 (C₁₆); 20.8 (C₁₇). ESI-HRMS calculated for [C₂₄H₂₄N₅O₁₀]⁺ m/z 542.1517 and found m/z 542.1513. IR (neat, cm⁻¹): 3365.7br/s; 2972.7m; 2930.1m; 2873.1m; 1674.1s; 1613.6m; 1563.2s; 1468.8m; 1412.0m; 1362.1s; 1270.7m; 1237.8w; 1112.6m; 1064.6m; 948.5w; 912.9w; 814.4w; 783.4m, 716.6w. [α]_D²⁰ = - 13.3 (C = 0.01 M, H₂O).

5-(5-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pent-1-yn-1-yl)isophthalic acid (150**)**



According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **122** (81.5 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water to give a pure product as a white solid (73 mg, 94 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.31. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.34 (1H, s, N-H₃); 8.42 (1H, m, H_{24'}); 8.20 (1H, s, H_{15'}); 7.93 (2H, m, H_{22'}/H_{26'}); 7.80 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.12 Hz, H₆); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.15 Hz, H_{1'}); 5.55 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.10 Hz, H₅); 4.57 (2H, m, H_{10'}); 4.52 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.83 Hz, H_{16'}); 3.93-4.03 (3H, m, H₃/H₂/H₄); 3.61-3.72 (2H, m, H_{5'}); 2.45 (2H, t, J_{H18'-H17'} = 6.76 Hz, H_{18'}); 2.12 (2H, q, J_{H17'-H18'} = 6.73 Hz, H_{17'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.0 (C_{27'}/C_{28'}); 163.2 (C₄); 150.8 (C₂); 143.7 (C_{11'}); 140.9 (C₆); 137.8 (C_{23'}/C_{25'}); 133.4 (C_{22'}/C_{26'}); 130.0 (C_{24'}); 124.1 (C_{15'}); 121.4 (C_{21'}); 101.8 (C₅); 88.1 (C_{19'}/C_{1'}); 83.0 (C_{4'}); 81.6 (C_{20'}); 73.6 (C_{2'}); 70.3 (C_{3'}); 69.7 (C_{5'}); 63.8 (C_{10'}); 48.5 (C_{16'}); 28.9 (C_{17'}); 16.1 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₂₆N₅O₁₀]⁺ m/z 556.1674 and found m/z 556.1672. IR (neat, cm⁻¹): 3352.1br; 3229.8br; 3152.9m; 2929.5m; 2872.7m; 1682.3s; 1614.4m; 1564.1s; 1557.8s; 1463.5w; 1416.9m; 1366.0s; 1268.8m; 1111.4m; 1063.1m; 914.6w; 814.6w; 782.8w, 717.7w. [α]_D²⁰ = + 7.4 (C = 0.02 M, H₂O).

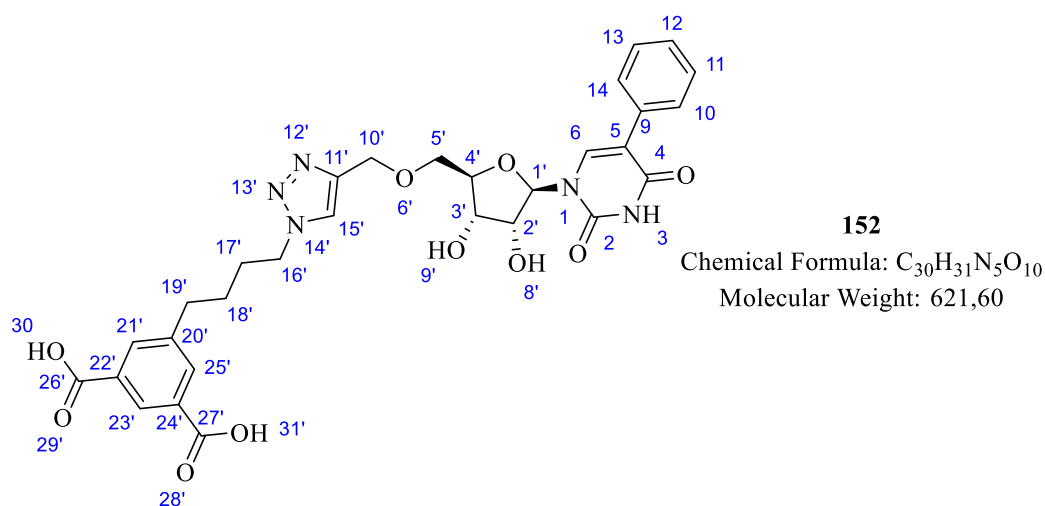
5-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hex-1-yn-1-yl)isophthalic acid (151**)**



According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **123** (50.8 mg, 0.09 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 15 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water to give a pure product as a white solid (48 mg, 99 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.36. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.33 (1H, s, N-H₃); 8.41 (1H, m, H_{25'}); 8.17 (1H, s, H_{15'}); 7.90 (2H, m, H_{23'}/H_{27'}); 7.79 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.10 Hz, H₆); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.08 Hz, H_{1'}); 5.54 (1H, d, J_{H5-}

$H_6 = 8.08$ Hz, H_5); 4.57 (2H, m, $H_{10'}$); 4.43 (2H, t, $J_{H_{16'}-H_{17'}} = 6.82$ Hz, $H_{16'}$); 3.92-4.02 (3H, m, $H_3/H_2/H_4$); 3.60-3.73 (2H, m, H_5); 2.46 (2H, t, $J_{H_{19'}-H_{20'}} = 6.76$ Hz, $H_{19'}$); 1.98 (2H, q, $J_{H_{17'}-H_{16'}} = 6.94$ Hz, $H_{17'}$); 1.50 (2H, q, $J_{H_{18'}-H_{17'}} = 7.03$ Hz, $H_{18'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169.1 ($\text{C}_{28'}/\text{C}_{29'}$); 163.2 (C_4); 150.8 (C_2); 143.6 ($\text{C}_{11'}$); 140.9 (C_6); 137.8 ($\text{C}_{24'}/\text{C}_{26'}$); 133.3 ($\text{C}_{23'}/\text{C}_{27'}$); 129.8 ($\text{C}_{25'}$); 123.9 ($\text{C}_{15'}$); 121.5 ($\text{C}_{22'}$); 101.8 (C_5); 89.2 ($\text{C}_{20'}$); 88.1 ($\text{C}_{1'}$); 83.0 ($\text{C}_{4'}$); 81.3 ($\text{C}_{21'}$); 73.6 (C_2); 70.3 (C_3); 69.7 (C_5); 63.8 ($\text{C}_{10'}$); 48.9 ($\text{C}_{16'}$); 29.1 ($\text{C}_{17'}$); 25.2 ($\text{C}_{18'}$); 18.1 ($\text{C}_{19'}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_{10}]^+$ m/z 570.1830 and found m/z 570.1826. IR (neat, cm^{-1}): 3338.5br; 3267.1br; 3058.1m; 2928.7m; 2872.3m; 1693.3s; 1614.4m; 1564.4s; 1464.0w; 1417.2m; 1366.4s; 1269.3m; 1111.8m; 1063.5m; 952.3w; 913.1w; 814.8w; 783.2w; 769.7w; 719.1w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20.5$ ($\text{C} = 0.01$ M, H_2O).

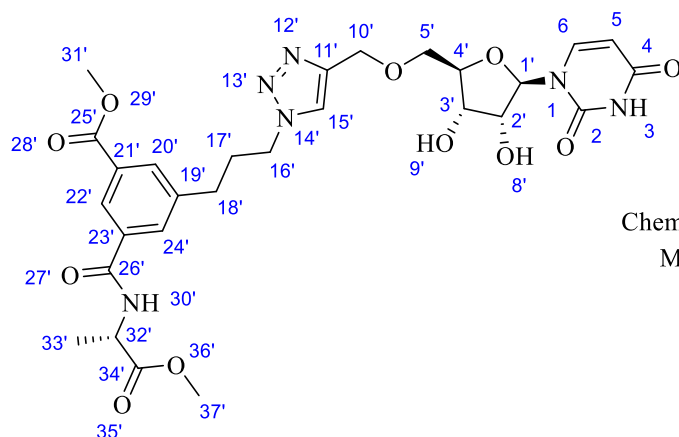
5-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-5-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)isophthalic acid (152**)**



According to the general procedure E, to a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **136** (51.2 mg, 0.08 mmol, 1.0 eq) with 5 mL of THF: H_2O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was quenched with aqueous HCl 1 M solution (10 mL) to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 $\times$ 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}/\text{EA}$ 1/6/3) and was co-evaporated several times with MeOH (3 $\times$ 15 mL) to remove residual water to give a pure product as a white solid (44 mg, 90 %). R_f ($\text{H}_2\text{O}/i\text{PrOH}/\text{AcOEt}$ 1:6:3) = 0.44. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 11.54 (1H, s, $N\text{-H}_3$); 8.30 (1H, m, $\text{H}_{23'}$); 8.02 (1H, s, H_6); 7.82 (1H, s, $\text{H}_{15'}$); 7.75 (2H, m, $\text{H}_{21'}/\text{H}_{25'}$); 7.50 (2H, m, $\text{H}_{10'}/\text{H}_{14'}$); 7.34 (2H, m, $\text{H}_{11'}/\text{H}_{13'}$); 7.27 (1H, m, $\text{H}_{12'}$); 5.86 (1H, d, $J_{H_{1'}-H_{2'}} = 5.20$ Hz, $\text{H}_{1'}$); 4.52 (2H, m, $\text{H}_{10'}$); 4.27 (2H, t, $J_{H_{16'}-H_{17'}} = 6.89$ Hz, $\text{H}_{16'}$); 4.17 (1H, t, $J_{H_{2'}-H_{1'}/H_{3'}} = 4.94$ Hz, $\text{H}_{2'}$); 3.96-4.02 (2H, m, H_3/H_4); 3.54-3.72 (2H, m, H_5); 2.61 (2H, t, $J_{H_{19'}-H_{18'}} = 7.02$ Hz, $\text{H}_{19'}$); 1.74 (2H, q, $J_{H_{17'}-H_{18'}} = 7.29$ Hz, $\text{H}_{17'}$); 1.48 (2H, q, $J_{H_{18'}-H_{17'}} = 7.46$ Hz, $\text{H}_{18'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 169.7 ($\text{C}_{26'}/\text{C}_{27'}$); 162.1 (C_4); 150.2 (C_2); 143.5 ($\text{C}_{11'}$); 140.2 ($\text{C}_{22'}/\text{C}_{24'}$);

137.9 (C₆); 136.7 (C_{20'}); 133.1 (C₅); 130.9 (C_{21'}/C_{25'}); 128.2 (C_{23'}/C₁₁/C₁₃); 127.9 (C₁₀/C₁₄); 127.3 (C₁₂); 123.5 (C_{15'}); 113.7 (C₉); 88.5 (C_{1'}); 83.2 (C_{4'}); 73.8 (C_{2'}); 70.2 (C_{3'}); 69.1 (C_{5'}); 63.9 (C_{10'}); 49.1 (C_{16'}); 34.3 (C_{19'}); 29.3 (C_{17'}); 27.8 (C_{18'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₃₂N₅O₁₀]⁺ m/z 622.2143 and found m/z 622.2140. IR (neat, cm⁻¹): 3367.1br; 3065.5m; 2929.8m; 2866.1m; 1678.9s; 1614.6m; 1557.1m; 1496.0w; 1462.9m; 1444.0m; 1368.2m; 1284.1m; 1217.8w; 1110.7m; 1063.2m; 998.9w; 855.3w; 786.6w; 698.4w. [α]_D²⁰ = -27.5 (C = 0.02 M, H₂O).

methyl 3-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)-5-(((S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)benzoate (153)



153

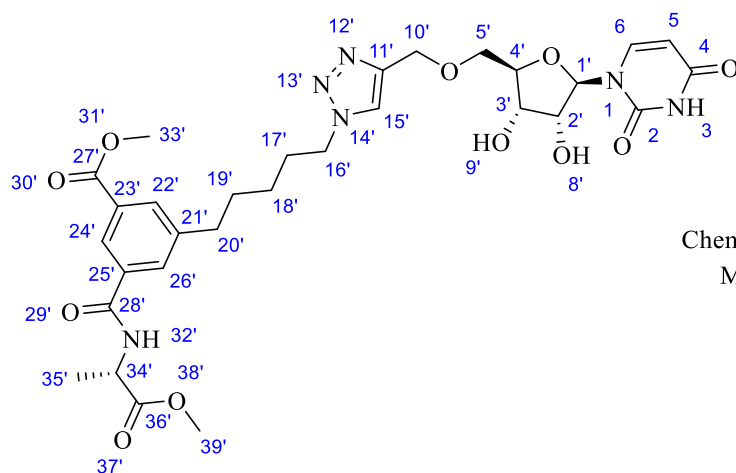
Chemical Formula: C₂₈H₃₄N₆O₁₁

Molecular Weight: 630,61

To a flame-dried round-bottom flask, monocarboxylic acid substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **137** (57 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq) was solubilized with anhydrous DMF (5 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, BOP reagent (46 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq), HOBT (14.0 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq), DIPEA (0.05 mL, 0.27 mmol, 3.0 eq) and molecular sieves 4 Å (one spatula) were successively added and stirred for 10 min at 0°C. Thus, L-Alanine methyl ester hydrochloride (16.0 mg, 0.12 mmol, 1.1 eq) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 16 h. The reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane (4 × 15 mL) to remove residual DMF. The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.1/6.95/3.95). Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 99/1) was used to give a colorless oil (17 mg, 26 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.35. ¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 9.88 (1H, s, N-H₃); 8.34 (1H, s, H_{22'}); 8.22 (1H, d, J_{H30'-H32'} = 6.98 Hz, N-H_{30'}); 8.06 (1H, s, H_{15'}); 8.00 (2H, m, H_{20'}/H_{24'}); 7.93 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.19 Hz, H₆); 5.93 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 2.79 Hz, H₁); 5.54 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.14 Hz, H₅); 4.61-4.72 (4H, m, H_{32'}/H_{10'}/O-H₈); 4.52 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.97 Hz, H_{16'}); 4.32 (1H, m, O-H_{9'}); 4.22 (2H, m, H₂/H₃); 4.12 (1H, m, H₄); 3.90 (3H, s, H_{31'}); 3.81 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.03 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.76 Hz, H_{5'}); 3.70 (3H, s, H_{37'}); 2.80 (2H, m, H_{18'}); 2.31 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 6.99 Hz, H_{17'}); 1.48 (3H, d, J_{H33'-H32'} = 7.23 Hz, H_{33'}). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 172.0 (C_{34'}); 164.9 (C_{25'}); 164.7 (C_{26'}); 161.8 (C₂); 149.7 (C₄); 143.1 (C_{11'}); 141.1 (C_{19'}); 139.7 (C₆); 134.0 (C_{21'}); 131.0 (C_{24'}); 130.8 (C_{20'}); 129.7 (C_{23'}); 125.2 (C_{22'}); 122.3 (C_{15'}); 100.7 (C₅); 87.8 (C_{1'});

82.7 (C_{4'}); 73.6 (C_{2'}); 69.9 (C_{3'}); 68.6 (C_{5'}); 63.3 (C_{10'}); 50.7 (C_{31'}); 50.5 (C_{37'}); 48.2 (C_{16'}); 47.7 (C_{32'}); 31.1 (C_{18'}); 30.7 (C_{17'}); 15.7 (C_{33'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₈H₃₅N₆O₁₁]⁺ m/z 631.2358 and found m/z 631.2347. IR (neat, cm⁻¹): 3337.9br; 3056.9w; 2927.5m; 1698.0s; 1666.6s; 1537.5m; 1451.8m; 1380.5w; 1265.8; 1215.4m; 1111.4m; 1064.1m; 993.1w; 806.4w; 758.9w. [α]_D²⁰ = + 4.5 (C = 0.02 M, MeOH).

methyl 3-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)-5-(((S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)benzoate (154)



154

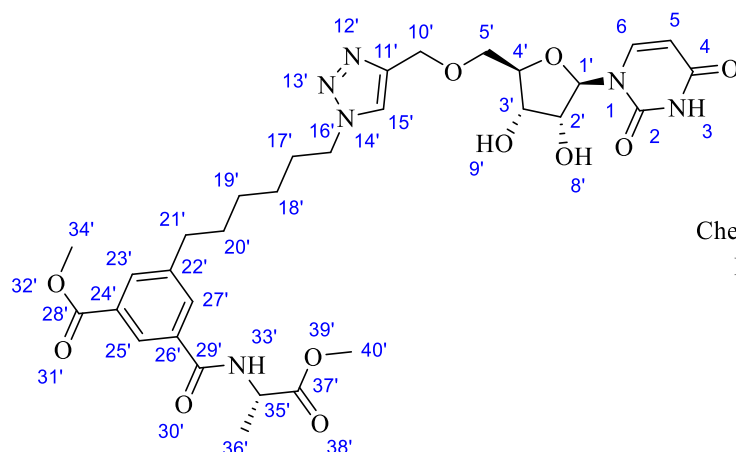
Chemical Formula: C₃₀H₃₈N₆O₁₁

Molecular Weight: 658.67

To a flame-dried round-bottom flask, monocarboxylic acid substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **139** (91 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq) was solubilized with anhydrous DMF (6 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, BOP reagent (70 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq), HOBT (21.4 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq), DIPEA (0.07 mL, 0.41 mmol, 3.0 eq) and molecular sieves 4 Å (one spatula) were successively added and stirred for 10 min at 0°C. Thus, L-Alanine methyl ester hydrochloride (24.4 mg, 0.17 mmol, 1.1 eq) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 16 h. The reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane (4 × 15 mL) to remove residual DMF. The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.1/6.95/3.95). Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 99/1) was used to give a colorless oil (39 mg, 36%). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.39. ¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 9.96 (1H, s, N-H₃); 8.33 (1H, s, H_{24'}); 8.24 (1H, d, J_{H32'-H34'} = 7.14 Hz, N-H_{32'}); 8.01 (1H, s, H_{15'}); 8.00 (1H, s, H_{26'}); 7.97 (1H, s, H_{22'}); 7.93 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.14 Hz, H₆); 5.94 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 4.12 Hz, H_{1'}); 5.54 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.13 Hz, H_{5'}); 4.60-4.71 (4H, m, H_{34'}/H_{10'}/O-H_{8'}); 4.45 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 7.01 Hz, H_{16'}); 4.38 (1H, m, O-H_{9'}); 4.21 (2H, m, H_{2'/H3'}); 4.12 (1H, m, H_{4'}); 3.90 (3H, s, H_{33'}); 3.80 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.24 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.79 Hz, H_{5'}); 3.70 (3H, s, H_{39'}); 2.73 (2H, t, J_{H20'-H19'} = 7.70 Hz, H_{20'}); 1.97 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 7.16 Hz, H_{17'}); 1.70 (2H, q, J_{H19'-H20'} = 7.69 Hz, H_{19'}); 1.49 (3H, d, J_{H35'-H34'} = 7.30 Hz, H_{35'}); 1.38 (2H, q, J_{H18'-H19'} = 7.37 Hz, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 172.1 (C_{36'}); 165.0 (C_{27'}); 164.8 (C_{28'}); 161.9 (C₂); 149.7 (C₄); 143.0 (C_{11'}); 142.5 (C_{21'}); 139.8 (C₆); 133.8 (C_{23'}); 130.9 (C_{26'}); 130.8 (C_{22'}); 129.5 (C_{25'}); 124.9 (C_{24'}); 122.2 (C_{15'}); 100.7 (C₅); 87.7 (C_{1'}); 82.7 (C_{4'});

73.7 (C_{2'}); 69.9 (C_{3'}); 68.6 (C_{5'}); 63.2 (C_{10'}); 50.7 (C_{33'}); 50.5 (C_{39'}); 48.6 (C_{16'}); 47.7 (C_{34'}); 34.0 (C_{20'}); 29.5 (C_{19'}); 28.9 (C_{17'}); 24.8 (C_{18'}); 15.7 (C_{35'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₃₉N₆O₁₁]⁺ m/z 659.2671 and found m/z 659.2664. IR (neat, cm⁻¹): 3324.9br; 3065.4w; 2929.1m; 2860.3w; 1682.1s; 1603.4w; 1537.1m; 1454.4m; 1381.3w; 1261.7m; 1211.6m; 1167.7w; 1111.9m; 1057.6m; 993.8w; 757.7w. [α]_D²⁰ = + 10.1 (C = 0.03 M, MeOH).

methyl 3-(6-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxy tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-5-(((S)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)benzoate (155)



155

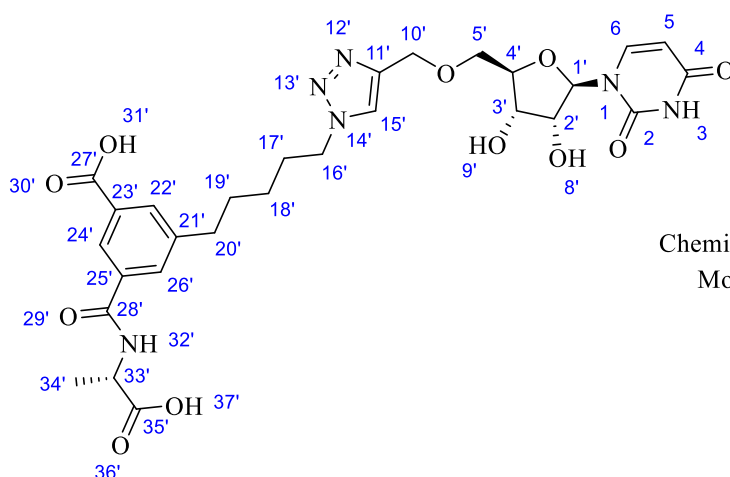
Chemical Formula: C₃₁H₄₀N₆O₁₁

Molecular Weight: 672,69

To a flame-dried round-bottom flask, monocarboxylic acid substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **140** (115 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) was solubilized with anhydrous DMF (10 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, BOP reagent (87 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq), HOBT (26.4 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq), DIPEA (0.09 mL, 0.51 mmol, 3.0 eq) and molecular sieves 4 Å (one spatula) were successively added and stirred for 10 min at 0°C. Thus, L-Alanine methyl ester hydrochloride (30 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 16 h. The reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with *n*-heptane (4 × 15 mL) to remove residual DMF. The residue was purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 0.1/6.95/3.95). Next, a second flash chromatography (Acetone/MeOH 99/1) was used to give a colorless oil (29 mg, 22 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 9.93 (1H, s, N-H₃); 8.33 (1H, s, H_{25'}); 8.22 (1H, d, J_{H33'-H35'} = 6.85 Hz, N-H_{33'}); 8.02 (1H, s, H_{15'}); 8.00 (1H, s, H_{27'}); 7.97 (1H, s, H_{23'}); 7.92 (1H, d, J_{H6'-H5} = 8.10 Hz, H₆); 5.93 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 4.38 Hz, H_{1'}); 5.54 (1H, d, J_{H5'-H6} = 8.17 Hz, H₅); 4.59-4.72 (4H, m, H_{35'}/H_{10'}/O-H_{8'}); 4.43 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.95 Hz, H_{16'}); 4.34 (1H, m, O-H_{9'}); 4.16-4.23 (2H, m, H_{2'}/H_{3'}); 4.11 (1H, m, H_{4'}); 3.90 (3H, s, H_{34'}); 3.80 (2H, qd, J_{H5'-H4'} = 2.21 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.77 Hz, H_{5'}); 3.70 (3H, s, H_{40'}); 2.72 (2H, t, J_{H21'-H20'} = 7.66 Hz, H_{21'}); 1.92 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 7.02 Hz, H_{17'}); 1.64 (2H, q, J_{H20'-H19'} = 7.26 Hz, H_{20'}); 1.49 (3H, d, J_{H36'-H35'} = 7.34 Hz, H_{36'}); 1.31-1.45 (4H, m, H_{18'}/H_{19'}). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆) δ (ppm): 173.1 (C_{37'}); 166.0 (C_{28'}); 165.8 (C_{29'}); 162.7 (C₂); 150.7 (C₄); 143.9 (C_{11'}); 143.7 (C_{22'}); 140.7 (C₆);

134.8 (C_{24'}); 131.9 (C_{27'}); 131.8 (C_{23'}); 130.5 (C_{26'}); 125.8 (C_{25'}); 123.1 (C_{35'}); 101.7 (C_{5'}); 88.7 (C_{1'}); 83.7 (C_{4'}); 74.6 (C_{2'}); 70.9 (C_{3'}); 69.6 (C_{5'}); 64.2 (C_{10'}); 51.6 (C_{34'}); 51.5 (C_{40'}); 49.7 (C_{16'}); 48.6 (C_{35'}); 35.1 (C_{21'}); 31.0 (C_{20'}); 30.0 (C_{17'}); 28.4 (C_{18'}); 26.0 (C_{19'}); 16.6 (C_{36'}). ESI-HRMS calculated for [C₃₁H₄₁N₆O₁₁]⁺ m/z 673.2827 and found m/z 673.2819. IR (neat, cm⁻¹): 3297.9br; 2928.2m; 2856.5m; 1682.0s; 1536.7m; 1454.4m; 1261.9m; 1211.2m; 1112.8m; 1058.1m; 816.0w; 757.4w. [α]_D²⁰ = + 4.3 (C = 0.02 M, MeOH).

3-(((S)-1-carboxyethyl)carbamoyl)-5-(5-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pentyl)benzoic acid (156**)**



156

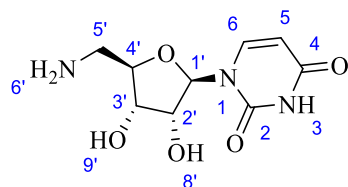
Chemical Formula: C₂₈H₃₄N₆O₁₁
Molecular Weight: 630,61

To a solution of dimethyl-ester substituted 5'-O-methyltriazole-uridine **154** (23 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq) with 2.5 mL of THF:H₂O (3:1), lithium hydroxide solution (0.3 M) was added and then was stirred at room temperature for 24 h (monitoring by TLC). The reaction mixture was concentrated to dryness *in vacuo* with two co-evaporation with MeOH (2 × 20 mL). The residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/PrOH/EA 1/6/3) and then the purified residue was co-evaporated several times with MeOH (3 × 15 mL) to remove residual water to give a pure product as a white solid (15 mg, 68 %). R_f (H₂O/PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.17. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.26 (1H, s, N-H₃); 8.13 (1H, m, H_{24'}); 8.10 (1H, s, H_{15'}); 8.03 (1H, d, J_{H32'-H34'} = 5.63 Hz, N-H_{32'}); 7.83 (1H, m, H_{26'}); 7.78 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 7.60 (1H, m, H_{22'}); 5.77 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.16 Hz, H_{1'}); 5.52 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.14 Hz, H₅); 4.50-4.60 (2H, m, H_{10'}); 4.34 (2H, t, J_{H16'-H17'} = 6.80 Hz, H_{16'}); 3.92-4.06 (4H, m, H_{33'}/H_{2'}/H_{3'}/H_{4'}); 3.65 (2H, qd, J_{H5'-H4''} = 2.80 Hz, J_{H5'-H5''} = 10.91 Hz, H_{5'}); 2.60 (2H, t, J_{H20'-H19'} = 7.16 Hz, H_{20'}); 1.84 (2H, q, J_{H17'-H16'} = 7.19 Hz, H_{17'}); 1.60 (2H, q, J_{H19'-H20'} = 7.87 Hz, H_{19'}); 1.30 (3H, d, J_{H34'-H33'} = 6.55 Hz, H_{34'}); 1.21 (2H, q, J_{H18'-H19'} = 7.51 Hz, H_{18'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 174.6 (C_{35'}); 169.0 (C_{27'}); 165.1 (C_{28'}); 163.1 (C₄); 150.7 (C₂); 143.4 (C_{11'}); 141.2 (C_{23'}); 140.8 (C₆); 134.2 (C_{25'}); 131.6 (C_{22'}); 128.0 (C_{26'}); 125.0 (C_{24'}); 123.8 (C_{15'}); 118.1 (C_{21'}); 101.7 (C_{5'}); 88.1 (C_{1'}); 82.9 (C_{4'}); 73.5 (C_{2'}); 70.2 (C_{3'}); 69.6 (C_{5'}); 63.7 (C_{10'}); 50.1 (C_{33'}); 49.2 (C_{16'}); 34.7 (C_{20'}); 30.1 (C_{19'}); 29.5 (C_{17'}); 25.3 (C_{18'}); 19.0 (C_{34'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₈H₃₅N₆O₁₁]

$^+m/z$ 631.2358 and found m/z 631.2353. IR (neat, cm^{-1}): 3306.5 br ; 2923.5 s ; 2853.3 m ; 2325.3 w ; 1979.7 w ; 1685.8 s ; 1608.1 m ; 1544.3 m ; 1456.6 m ; 1390.4 m ; 1261.5 m ; 1215.7 m ; 1113.5 m ; 1024.1 m ; 999.8 m ; 804.1 w ; 761.7 w ; 723.2 w . $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.4$ ($C = 0.02 \text{ M}$, H_2O).

5'-amino-5'-deoxy-uridine (158)

CAS: 34718-92-8



158

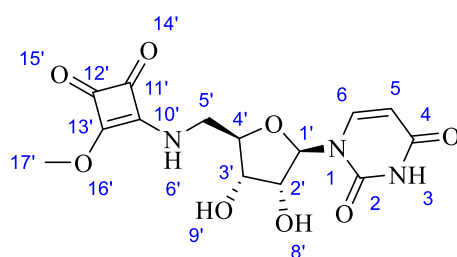
Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$

Molecular Weight: 243,22

To a flame-dried round-bottom flask, 5'-azido-5'-deoxy-uridine **3** (1.13 g, 4.20 mmol, 1.0 eq) was stirred with dry pyridine (30 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, triphenylphosphine (1.76 g, 6.72 mmol, 1.6 eq) was added and the solution was stirred for 1 h. Then, concentrated ammonium hydroxide (28 % NH_3 in H_2O , 30 mL) was added and the reaction was stirred for 2 h. Thus, the reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. After, the white solid was removed by filtration and washed several times with water. The resulting aqueous layer was washed once with toluene (20 mL) and once with diethyl ether (20 mL) to remove residual triphenylphosphine or triphenylphosphine oxide. Then, the aqueous layer was dried under reduced pressure to give a yellow pale solid. Then, the residue was purified by flash chromatography (Acetone/ H_2O 9/1) to give a white solid (0.44 g, 43 %). R_f (Acetone/ H_2O 9/1) = 0.16. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7.87 (1H, d, $J_{\text{H}_6-\text{H}_5} = 8.14 \text{ Hz}$, H_6); 5.74 (1H, d, $J_{\text{H}_1'-\text{H}_2'} = 5.57 \text{ Hz}$, H_1'); 5.62 (1H, d, $J_{\text{H}_5-\text{H}_6} = 8.05 \text{ Hz}$, H_5); 5.31 (1H, s, $N\text{-H}_3$); 5.05 (2H, s, $N\text{-H}_6$); 4.05 (1H, t, $J_{\text{H}_2'-\text{H}_3'} = 5.63 \text{ Hz}$, H_2'); 3.92 (1H, t, $J_{\text{H}_3'-\text{H}_4'} = 4.77 \text{ Hz}$, H_3'); 3.74 (1H, q, $J_{\text{H}_4'-\text{H}_3'} = 4.57 \text{ Hz}$, H_4'); 2.75 (2H, qd, $J_{\text{H}_5'-\text{H}_5''} = 13.43 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}_5'-\text{H}_4'} = 4.55 \text{ Hz}$, H_5'). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 163.1 (C_4); 150.7 (C_2); 141.3 (C_6); 101.8 (C_5); 87.9 (C_1'); 85.3 (C_4'); 73.0 (C_2'); 70.3 (C_3'); 43.2 (C_5'). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_5]^+$ m/z 244.0927 and found m/z 244.0931. IR (neat, cm^{-1}): 3099.3 br ; 1674.1 s ; 1633.4 s ; 1505.3 m ; 1455.1 m ; 1384.1 m ; 1262.4 m ; 1103.2 m ; 1042.7 m ; 876.2 w ; 812.8 w ; 763.1 w . $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.4$ ($C = 0.07 \text{ M}$, MeOH).

5'-amino-5'-N-(2-methoxy-3,4-dioxocyclobuten-1-yl)-5'-deoxy-uridine (159)

CAS: 876131-71-4



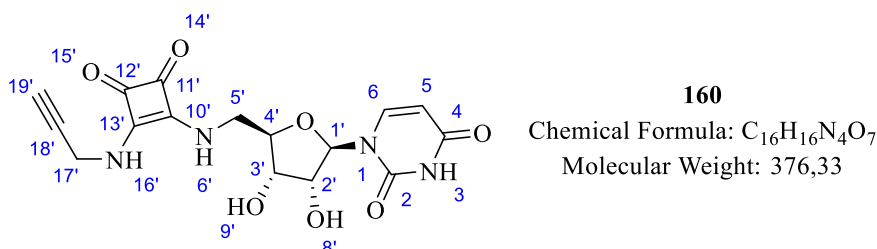
159

Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_8$

Molecular Weight: 353,29

To a flame-dried round-bottom flask, 5'-amino-5'-deoxy-uridine **158** (0.25 g, 1.03 mmol, 1.0 eq) and *N,N*-diisopropylethylamine (90 μ L, 0.51 mmol, 0.5 eq) were stirred with dry methanol (15 mL) with 4 Å molecular sieves (one spatula) under argon atmosphere at room temperature. Then, 3,4-dimethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione (0.15 g, 1.03 mmol, 1.0 eq) was added and the solution was stirred for 7 h at room temperature. After fully conversion of starting materials, the molecular sieves was removed by filtration and washed with methanol. The filtrate was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the resulting residue was purified by flash chromatography (Acetone/H₂O 99/1) to give a yellow pale solid (0.30 g, 83 %). *R_f* (Acetone/H₂O 95:5) = 0.24. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.35 (1H, s, *N*-H₃); 8.67-8.98 (1H, m, *N*-H₆); 7.59 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.15 Hz, H₆); 5.72 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.44 Hz, H₁); 5.63 (1H, m, H₅); 5.44 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.71 Hz, *O*-H₃); 5.23 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 5.34 Hz, *O*-H₉); 4.27 (3H, s, H₁₇); 4.08 (1H, m, H₂); 3.83-3.94 (2H, m, H₃/H₄); 3.42-3.80 (2H, m, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 189.2 (C₁₁/C₁₂); 182.5 (C₁₁/C₁₂); 177.2 (C₁₃); 172.5 (C₁₀); 163.0 (C₄); 150.6 (C₂); 141.2 (C₆); 101.9 (C₅); 88.6 (C₁); 82.5 (C₄); 72.2 (C₂); 70.4 (C₃); 60.1 (C₁₇); 45.8 (C₅). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₁₆N₃O₈]⁺ *m/z* 354.0931 and found *m/z* 354.0932. IR (neat, cm⁻¹): 3234.1*br*; 3057.7*m*; 2928.3*m*; 1805.6*w*; 1682.3*s*; 1592.4*s*; 1537.4*m*; 1499.8*m*; 1466.3*m*; 1466.3*m*; 1433.9*m*; 1375.6*m*; 1264.5*m*; 1097.6*m*; 1041.8*m*; 925.5*w*; 819.2*w*; 764.1*w*; 716.8*w*. [α]_D²⁰ = + 43.1 (C = 0.04 M, MeOH).

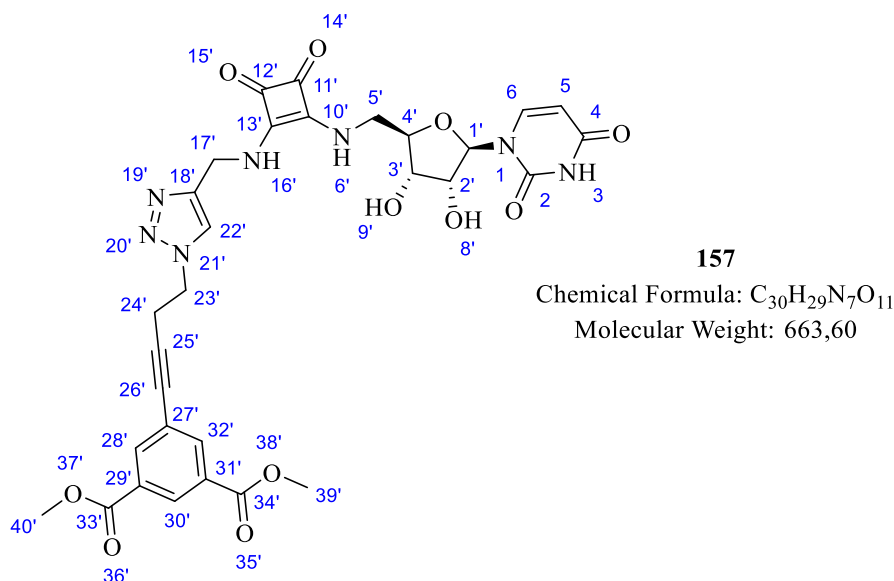
5'-amino-5'-*N*-((3,4-dioxo-2-(prop-2-yn-1-ylamino)cyclobut-1-en-1-yl)-5'-deoxy-uridine (**160**)



To a flame-dried round-bottom flask, 5'-amino-5'-*N*-(2-methoxy-3,4-dioxocyclobuten-1-yl)-5'-deoxy-uridine **159** (0.29 g, 0.82 mmol, 1.0 eq) and *N,N*-diisopropylethylamine (71 μ L, 0.41 mmol, 0.5 eq) were stirred with dry methanol (15 mL) with 4 Å molecular sieves (one spatula) under argon atmosphere at room temperature. Then, propargyl amine (58 μ L, 0.90 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred for 4 h at room temperature. After fully conversion of starting materials, the molecular sieves was removed by filtration and washed with methanol. The filtrate was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the resulting residue was purified by flash chromatography (Acetone/H₂O 99/1 to 97/3) to give a white solid (60 mg, 19 %). *R_f* (Acetone/H₂O 95:5) = 0.14. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.35 (1H, s, *N*-H₃); 8.81 (1H, s, *N*-H₁₆); 7.57-7.73 (2H, s + d, *J*_{H6-H5} = 8.11 Hz, *N*-H₆+H₆); 5.77 (1H, d, *J*_{H1'-H2'} = 5.65 Hz, H₁); 5.63 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.09 Hz, H₅); 5.46 (1H, d, *J*_{H8'-H2'} = 5.72 Hz, *O*-H₈); 5.27 (1H, d, *J*_{H9'-H3'} = 4.59 Hz, *O*-H₉); 4.36 (2H, m, H₁₇); 4.09 (1H, m, H₂); 3.84-3.96 (3H, m, H₃/H₄/H₅); 3.68 (1H, m, H₅); 3.35 (1H, m, H₁₉). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 182.9 (C₁₁/C₁₂); 182.4 (C₁₁/C₁₂); 167.9

(C_{10'}); 167.1 (C_{13'}); 163.0 (C₄); 150.7 (C₂); 141.1 (C₆); 102.0 (C₅); 88.4 (C_{1'}); 82.8 (C_{4'}); 80.6 (C_{18'}); 75.2 (C_{19'}); 72.3 (C_{2'}); 70.3 (C_{3'}); 45.4 (C_{5'}); 32.7 (C_{17'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₇N₄O₇]⁺ m/z 377.1091 and found m/z 377.1088. IR (neat, cm⁻¹): 3323.0br; 3232.8m; 3139.7br; 3054.5br; 2945.3m; 2918.7m; 1806.0w; 1676.4s; 1633.8m; 1565.4s; 1460.7m; 1412.3m; 1391.8m; 1322.4m; 1276.2m; 1257.6m; 1126.3m; 1101.7m; 1082.9w; 1046.7w; 1029.9w; 1006.0w; 970.3w; 871.4w; 773.0w; 711.6w. [α]_D²⁰ = + 42.2 (C = 0.01 M, DMSO).

Dimethyl 5-(4-(4-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)but-1-yn-1-yl)isophthalate (157)



According to the general procedure A, copper(II) sulfate pentahydrate (3.3 mg, 0.01 mmol, 10 mol%) and sodium ascorbate (15.8 mg, 0.08 mmol, 0.6 eq) were added to a solution of the alkyne nucleoside **160** (50 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) and dimethyl 3-(4-azidobut-1-yn-1-yl)isophthalate **69** (57.2 mg, 0.20 mmol, 1.5 eq) with ^tBuOH:H₂O (8 mL). The reaction mixture was stirred for 16 h at 40°C. The residue was purified by a flash chromatography (ACN/H₂O 97/3) to give the desired product as white solid (81 mg, 92 %). R_f (ACN/H₂O 95/5) = 0.17. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.34 (1H, s, N-H₃); 8.37 (1H, t, J_{H30'-H28'/H32'} = 1.70 Hz, H_{30'}); 8.32 (1H, t, J_{H16'-H17'} = 5.67 Hz, N-H_{16'}); 8.16 (1H, s, H_{22'}); 8.06 (2H, d, J_{H28'/H32'-H30'} = 1.48 Hz, H_{28'/H32'}); 8.02 (1H, m, N-H_{6'}); 7.67 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.11 Hz, H₆); 5.76 (1H, d, J_{H1'-H2'} = 5.68 Hz, H_{1'}); 5.54 (1H, d, J_{H5-H6} = 8.08 Hz, H₅); 5.47 (1H, d, J_{H8'-H2'} = 4.09 Hz, O-H_{8'}); 5.29 (1H, m, O-H_{9'}); 4.80 (2H, m, H_{17'}); 4.63 (2H, t, J_{H23'-H24'} = 6.57 Hz, H_{23'}); 4.08 (1H, m, H_{2'}); 3.80-3.95 (9H, m, H_{39'/H40'/H3'/H4'/H5'}); 3.71 (1H, m, H_{5'}); 3.07 (2H, t, J_{H24'-H23'} = 6.63 Hz, H_{24'}). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 182.6 (C_{11'}/C_{12'}); 168.0 (C_{10'}); 167.5 (C_{13'}); 163.0 (C₄); 150.7 (C₂); 144.4 (C_{18'}); 141.2 (C₆); 135.6 (C_{28'}/C_{32'}); 130.8 (C_{29'}/C_{31'}); 128.9 (C_{30'}); 123.9 (C_{27'}); 123.3 (C_{22'}); 102.0 (C₅); 89.3 (C_{25'}); 88.1 (C_{1'}); 82.9 (C_{4'}); 80.2 (C_{26'}); 72.4 (C_{2'}); 70.2 (C_{3'}); 52.7 (C_{39'/C40'}); 47.9 (C_{23'}); 45.2 (C_{5'}); 38.5 (C_{17'}); 20.7 (C_{24'}). ESI-HRMS

calculated for $[\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_{11}]^+$ m/z 664.1997 and found m/z 664.1993. IR (neat, cm^{-1}): 3245.8br/s; 3078.4m; 2951.3m; 1802.0w; 1678.4s; 1587.8s; 1537.7s; 1462.5s; 1435.4m; 1386.2m; 1337.6m; 1246.9s; 1125.7m; 1104.4m; 1048.7m; 997.5w; 938.3w; 911.7w; 872.3w; 754.6m; 722.2w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +151.7$ (C = 0.02 M, H_2O).

Chapitre 3

Chapitre 3: Nouvelle stratégie de synthèse d'analogues carbanucléosides visant les Mur Ligases

I Objectifs

Dans ce chapitre, nous avons choisi d'explorer l'influence d'analogues nucléosidiques en série cyclopentane sur l'activité des Mur ligases (MurC-F). Les **carbanucléosides** dans lequel l'oxygène de l'ose est remplacé par un groupe méthylène sont plus stables aux enzymes de dégradation d'un nucléoside (hydrolases). La liaison *N*-glycosidique entre la base et le sucre étant remplacée par une liaison N-C. La structure chimique de l'analogue carbanucléosidique que nous avons synthétisé est issu d'un résultat rationnel combiné entre nos résultats obtenus en série osidique et d'une approche computationnelle. Nous avons donc conservé les fonctions chimiques les plus importantes issues du substrat naturel qui interagissent avec le site actif des Mur ligases. En effet, le motif uridine des substrats est essentiel dans la reconnaissance et l'interaction avec le domaine 1 du site actif des enzymes. Le carbauridine permet d'élaborer le premier critère structural qui est le motif 4-*O*-carbauridine (Figure 1). Puis, le deuxième critère est une fonction acide 3,5-phénylique dicarboxylique importante puisqu'elle a révélé être capable de se fixer avec les MurC-F avec différents inhibiteurs multiples hétérocycliques (voir chapitre 1, page 54-55). Ici, on considère les interactions de la fonction diphosphate et la fonction acide muramique du motif UDP-MurNAc avec l'enzyme comme secondaires. Ce raisonnement rationnel nous a conduit à identifier ces deux pharmacophores et de les utiliser comme paramètres importants pour l'approche computationnelle *in silico*. Nous avons utilisé pour cela un protocole de criblage virtuel orienté vers l'identification d'une chimiothèque de nouveaux inhibiteurs multiples des Mur ligases avec les pharmacophores carbauridine et acide 3,5-phénylique dicarboxylique.

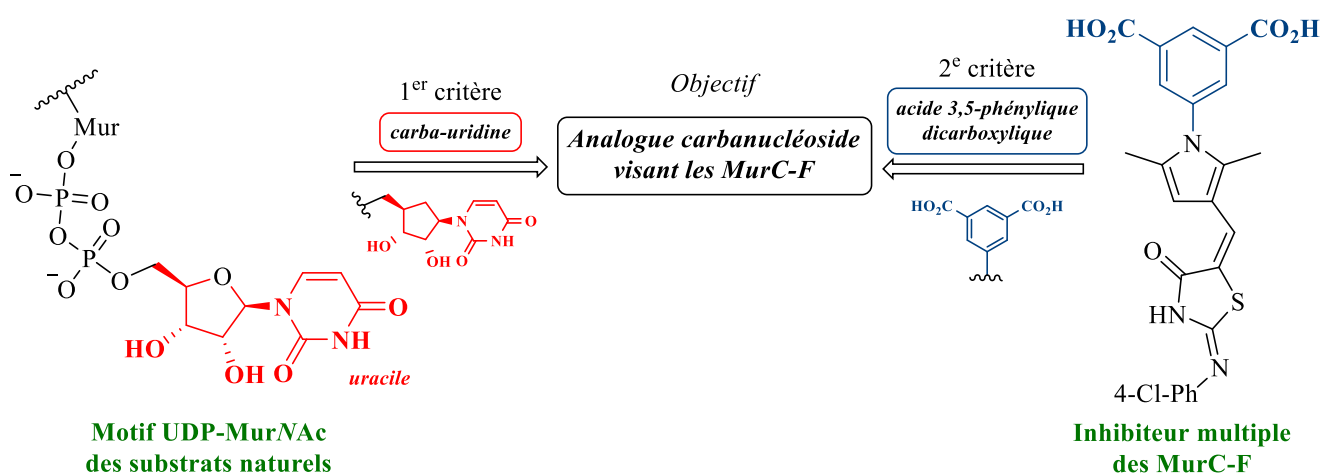


Figure 1 : Critères rationnels pour l'analogue carbanucléosidique

Ce chapitre aborde donc les voies d'accès aux carbanucléosides, la nouvelle stratégie de synthèse pour accéder au pseudo-sucre cyclopentyle et la synthèse d'un analogue carbanucléosidique provenant de nos résultats préliminaires en série osidique (analogue du composé **146**), d'un criblage virtuel et d'une étude *in silico* de structures proposées.

II Etudes in silico de carbanucléosides potentiellement actifs des Mur ligases

Le criblage virtuel est une technique qui regroupe plusieurs méthodes informatiques visant à sélectionner un ou plusieurs châssis moléculaires d'une chimiothèque répondant au cahier des charges préalablement établis autour des propriétés physicochimiques (ex. solubilité), pharmacocinétiques (ex. perméation membranaire) et pharmacologiques (ex. interactions protéine/ligand).¹ Dans le contexte des Mur ligases, nous avons réalisé une chimiothèque virtuelle de châssis moléculaires qui n'ont jamais été synthétisés avec les deux pharmacophores rationnels de départ (la carbauridine et l'acide 3,5-phénylique dicarboxylique) par une procédure combinatoire avec la structure cristallographique de la MurD (Figure 2).² On considère que les sites actifs des Mur ligases sont conservés et donc que l'analyse computationnelle avec la MurD est similaire pour les autres Mur ligases. L'atout d'une chimiothèque virtuelle est qu'elle permet d'explorer l'espace chimique de la protéine bien mieux qu'avec une chimiothèque de composés réels. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec le Dr Dawid Warszycki et le Pr Andrzej Bojarski de l'Institut de Pharmacologie de la Polish Academy of Sciences à Cracovie. La chimiothèque obtenue par ciblage virtuel est filtrée par plusieurs opérations afin de ne garder que les molécules d'intérêts. Le filtre physicochimique permet de ne retenir que les composés avec les meilleurs paramètres révélateurs d'une bonne biodisponibilité. Le filtre ADME/Tox permet de quantifier l'effet de la molécule sur l'organisme à travers cinq critères : l'**A**bsorption, la **D**istribution, le **M**étabolisme, l'**E**xcrétion et la **T**oxicité (surnommé profil ADME/Tox). Le profil ADME/Tox idéal d'une molécule-candidate montre que cette dernière est capable d'être absorbée oralement, transportée facilement vers la cible visée, métabolisée en produits non toxiques et être excrétée rapidement sans provoquer d'accumulation de produits qui seraient responsables d'effets indésirables. Le dernier critère tient compte de la toxicité potentielle ou réelle de la molécule en évaluant directement l'index thérapeutique et la dose létale médiane (LD₅₀ pour *lethal dose at 50%* en anglais). Le filtre *pharmacophore mapping* permet de mettre en relation les éléments pharmacophores choisis ou non et la conformation 3D possible entre la

¹ Rognan, D.; Bonnet, P. Chemical databases and virtual screening *Med.Sci. (Paris)* **2014**, *30*, 1152-1160

² Warszycki, D.; Mordalski, S.; Kristiansen, K.; Kafel, R.; Sylte, I.; Chilmonczyk, Z.; Bojarski, A.J. A linear combination of pharmacophore hypotheses as a new tool in search of new active compounds – an application for 5-HT_{1A} receptor ligands *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84510

molécule et la MurD. Le filtre *docking* est d'appliquer les trois modèles à la fois avec la MurD pour optimiser le résultat.

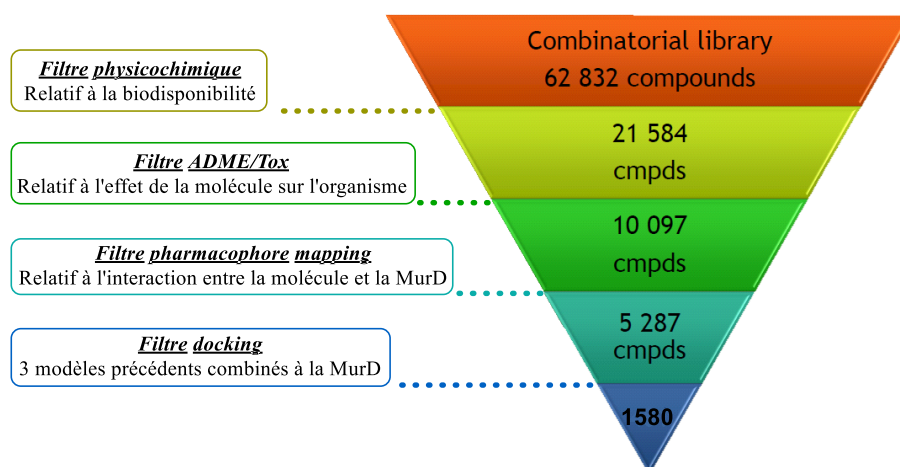
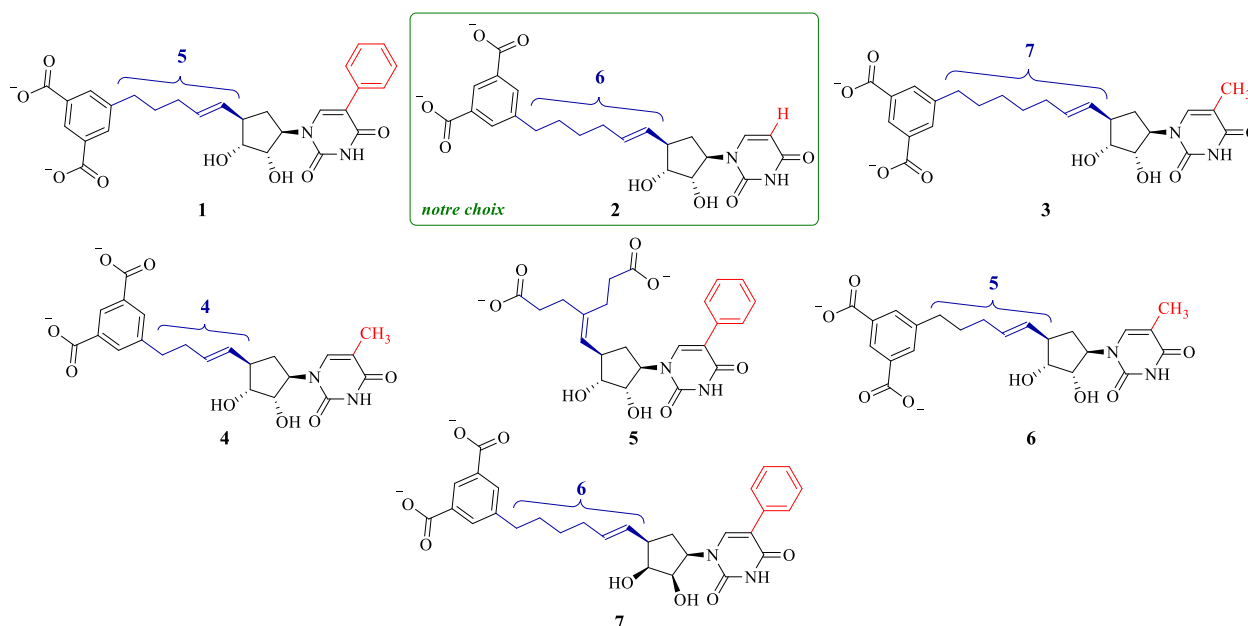


Figure 2 : Criblage virtuel d'une chimiothèque visant la MurD

On obtient après les différentes opérations une chimiothèque virtuelle de 1580 composés à partir du logiciel Pymol. Afin de sélectionner le meilleur composé-candidat, nous nous reportons sur les composés avec différents *docking score* et nous regardons leurs profils ADME (Tableau 1).



		PROFIL ADME/Tox								
	Docking score	#stars	QPlogPo/w	QPlogKhsa	QPlogHERG	QPPCaco	QPPMDCK	Percent Human Oral Absorption	Rule of five	Rule of three
Ranged values	lower	0-5	-2.0-6.5	-1.5-1.5	Below -5	<25 poor, >500 great	<25 poor, >500 great	<25 poor, >80% high	Max 3	Max 4
1	-9.091	4	2.631	-0.195	-3.223	0.131	0.051	13.597	1	2
2	-9.030	3	1.656	-0.441	-2.367	0.083	0.031	17.305	0	1
3	-8.951	4	2.099	-0.355	-2.597	0.105	0.040	21.734	0	2
4	-7.937	3	0.963	-0.582	-2.064	0.070	0.026	11.904	0	1
5	-6.950	3	1.336	-0.629	-1.377	0.230	0.094	23.346	0	2
6	-5.858	3	1.253	-0.846	-2.015	1.023	0.487	34.458	0	1
7	-5.512	6	3.102	-0.090	-3.649	0.146	0.057	17.178	0	1
						Valeurs en dehors de la gamme recommandée				

Tableau 1 : Propriétés pharmacocinétiques par le profil ADME

Analyse du tableau :

- Le **docking score** représente l'affinité de l'enzyme avec le ligand par les interactions possibles dans le site actif. Sa valeur s'exprime en kcal/mol et plus elle est faible plus l'affinité sera grande. Dans notre chimiothèque, l'étendue de cette valeur se situe entre -4.808 et -9.091 (du plus élevée au plus faible). Nous choisissons de retenir les composés **1-3** avec les plus faibles valeurs et donc une meilleure affinité.
- Le paramètre **#stars** est le plus révélateur de la capacité d'une molécule à être un médicament. Le composé idéal est celui avec un nombre d'étoile de 0. Dans notre cas, la grande majorité de notre chimiothèque montre des valeurs d'étoiles dans la gamme préconisée entre 0 et 5. Le composé **2** est la molécule de premier choix puisqu'il montre un des meilleurs *docking score* avec un nombre d'étoiles intéressant de 3.
- L'indice **QPlogPo/W** est un coefficient de partition octanol/eau caractéristique de l'hydrophilie de nos composés. Cet indice est situé dans la bonne gamme pour les composés de notre chimiothèque.

- Le critère **QPlogK_{hsa}** influe sur la distribution du composé sur l'affinité avec le sérum d'albumines humaines. Ici, la gamme est respectée pour nos composés.
- Le paramètre **QPlogHERG** est un critère *in silico* de la cytotoxicité induite par les molécules évaluées.
- Les paramètres **QPPCaco** et **QPPMDCK** sont des modèles de la barrière intestinale et de la barrière hémato-encéphalique. Toute la chimiothèque montre des valeurs faibles pour nos composés, ils sont sous la gamme recommandée y compris les composés **1-7**.
- **Rule of five** et **Rule of three**. Ces critères représentent la règle de Lipinski (Rule of five) et la règle de Jogensen qui révèlent la biodisponibilité des composés.³

Le profil ADME/Tox montre des valeurs assez proches entre les composés de cette chimiothèque. Seuls le *docking score* et le paramètre *#stars* varient de manière plus prononcée. Notre choix se porte donc sur le composé **2** car ce dernier est un bon compromis entre le *docking score* et le paramètre de *#stars*. Les composés **1** et **3** ne sont pas retenus car ils ont un *#stars* plus élevé de 4. Les composés **4-7** ne sont pas retenus non plus car les *docking score* sont moins intéressants.

III Etat de l'Art sur les voies d'accès aux carbanucléosides

La modification de la structure d'un nucléoside/tide peut se faire sur quatre zones différentes (Figure 3). On retrouve la base hétérocyclique, la liaison glycosidique, la partie phosphate d'un nucléotide et enfin la partie osidique qui nous intéresse. Dans la chimie des nucléosides, l'obtention du nucléoside s'effectue par une étape clé de la formation de cette liaison glycosidique.

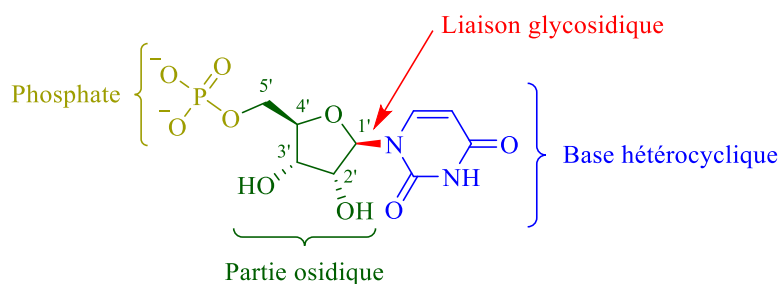


Figure 3 : Les différentes zones modulables d'un nucléoside/tide

Pour un nucléoside classique avec un ribofuranose, le couplage de la base hétérocyclique à la partie osidique peracylaté en présence d'un acide de lewis, dans les conditions de Vorbrüggen, s'effectue *via* une S_N1 avec la formation de l'intermédiaire ion oxonium dont la présence de groupement participatif en position 2' permet de régir la stéréosélectivité de cette glycosylation. La base hétérocyclique pose souvent problème car elle est faiblement nucléophile et peu soluble dans les solvants organiques, mais l'utilisation de dérivés silylés suffit à résoudre cette limitation (Schéma 1).

³ Ntie-Kang, F. An *in silico* evaluation of the ADMET profile of the StreptomeDB database. *Springerplus* **2013**, 2, 353

En revanche pour obtenir les carbanucléosides, l'attachement de la base hétérocyclique au pseudo-sucre carbocyclique utilise une procédure S_N2 qui est aussi limitée par la faible nucléophilie de la base, même silylée (Schéma 1). C'est pourquoi, l'utilisation de réactions en présence de faibles nucléophiles est envisagée ; telles que la réaction de Mitsunobu, une amination allylique pallado-catalysée ou encore la construction de la base hétérocyclique à partir de l'amine cyclopentyle.⁴ Dans ce contexte, la synthèse de carbanucléosides implique deux approches classiques : l'une est **une synthèse convergente** où le pseudo-sucre carbocyclique (dérivés cyclopentyle) est condensé directement avec la base déjà construite ; l'autre approche est **une voie linéaire** qui implique la construction de la base hétérocyclique à partir d'un dérivé amine cyclopentyle.

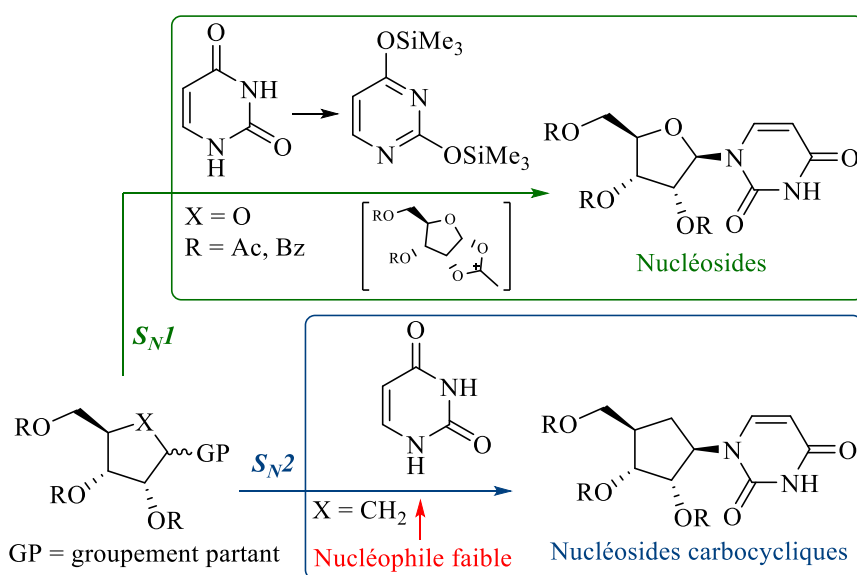


Schéma 1 : Attachement de la base hétérocyclique des nucléosides vs des carbanucléosides

A. Voies synthétiques convergentes

Dans la littérature, on considère quatre procédures basées sur l'addition/substitution nucléophile qui permettent d'accéder aux carbanucléosides :⁴

- **La réaction de S_N2** limitée aux bases hétérocycles de type purine puisque les bases pyrimidiques ne sont pas assez nucléophiles. Cette réaction permet de substituer le groupement partant (halogène, OTs, OTf, etc...) avec une inversion de configuration du carbone (Schéma 2).

⁴ (a) Boutureira, O.; Matheu, M.I.; Díaz, Y.; Castellón, S. Advances in the enantio-selective synthesis of carbocyclic nucleosides *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5056-5072; (b) Rodríguez, J.B.; Comin, M.J. New progresses in the enantioselective synthesis and biological properties of carbocyclic nucleosides *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 95-114.

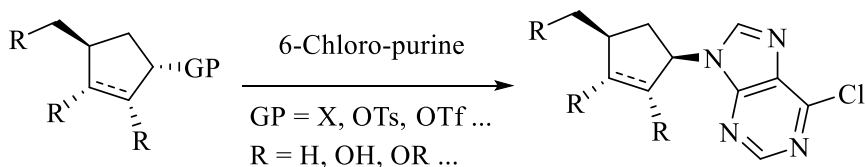


Schéma 2 : Réaction de S_N2

- La réaction de Mitsunobu en revanche, n'est pas limitée aux purines et permet de substituer un alcool en présence d'azodicarboxylate d'ester (DEAD ou DIAD) et de triphénylphosphine avec une inversion de configuration (Schéma 3).

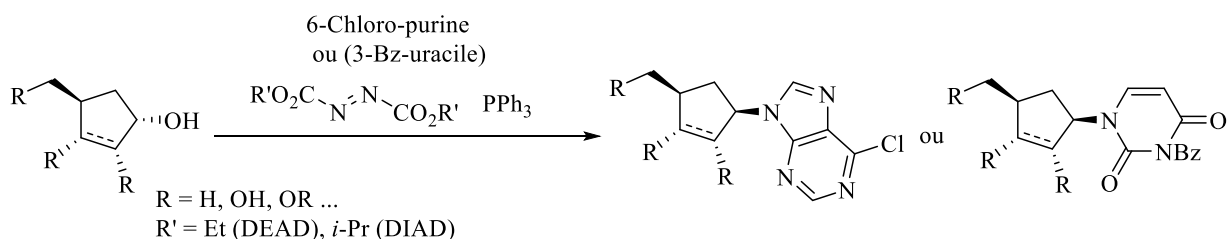


Schéma 3 : Réaction de Mitsunobu

- La réaction de Tsuji-Trost qui permet de réaliser une substitution allylique catalysée au palladium en présence d'une base et d'un pseudo-sucre de type cyclopentène contenant un groupement ester, carbonate ou ditosylimide en position allylique (Schéma 4). L'effet stérique, la nature du catalyseur et la nature du nucléophile gouvernent la régiosélectivité de la réaction. Le mécanisme de double inversion permet d'avoir une rétention de configuration de la base hétérocyclique (Schéma 4).

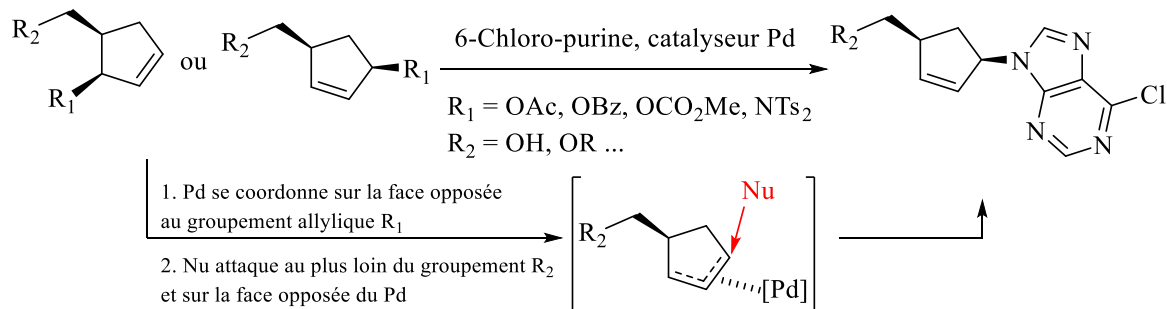


Schéma 4 : Substitution allylique de type Tsuji-Trost

- L'addition de Michaël permet de réaliser une addition conjuguée en présence de la base avec des alcènes activés (Schéma 5). On retrouve seulement quelques exemples dans la littérature.⁴

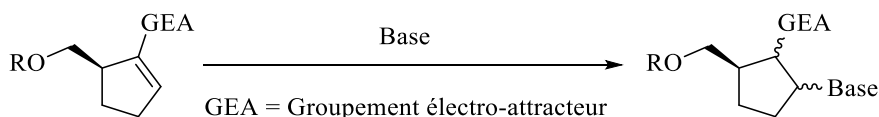


Schéma 5 : Addition de Michaël

B. Voies synthétiques linéaires

Ces voies de synthèse sont basées sur la construction de la base hétérocyclique à partir du cyclopentylamine préalablement obtenu. Ce dernier contient donc une amine qui peut devenir l'azote *N*-9 de la base purine ou l'azote *N*-1 de la base pyrimidine du carbanucléoside final :

- **Pour les bases pyrimidiques**, la stratégie de construction est basée sur la substitution de l'amine du cyclopentyle sur un carbamate substitué (généralement avec un acylisocyanate) pour former un intermédiaire urée qui peut être cyclisé en présence d'un acide ou d'une base (Schéma 6).⁵

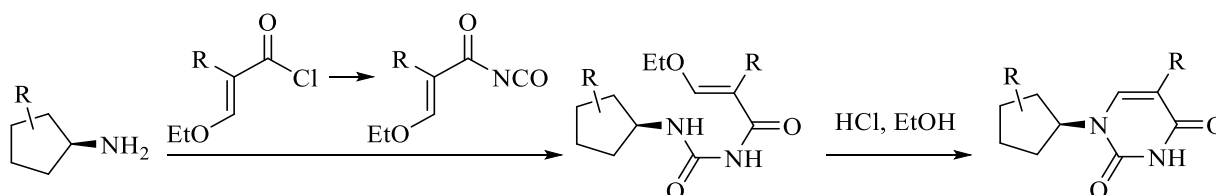


Schéma 6 : Construction de la base pyrimidique

- **Pour les bases purines**, la méthode typique est de substituer la 5-amino-4,6-dichloropyrimidine avec la cyclopentylamine, suivie de la formation du cycle imidazole par une réaction avec l'orthoformate triéthylique (Schéma 7).⁶ Cette méthode permet de réaliser des analogues d'adénosine avec une procédure similaire aux analogues de la guanosine.

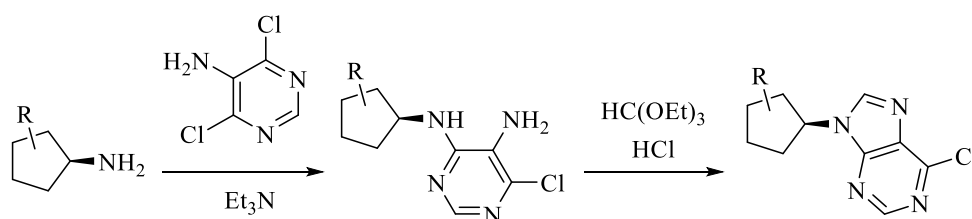


Schéma 7 : Construction de la base purine

Dans la littérature, ces voies de synthèses convergentes et linéaires permettent donc d'accéder en majorité aux analogues nucléosidiques carbocycliques. Cependant elles nécessitent un intermédiaire clé indispensable : le cyclopentane correctement fonctionnalisé de manière énantiomériquement pur.

C. Stratégies de synthèse du pseudo-sucre carbocyclique à 5 chaînons

L'état de l'Art montre un épais catalogue qui explique environ 50 ans de chimie sur la construction de ce petit cycle à cinq chaînons avec différentes approches énantiosélectives, souvent appliquées à différents analogues de substances naturelles comme historiquement avec les dérivés

⁵ Tietze, L.F.; Schneider, C.; Pretor, M. Improved synthesis of (*E*)-3-alkoxy- and (*E*)-3-phenoxyacryloyl chlorides *Synthesis* **1993**, *11*, 1079-1080.

⁶ Katagiri, N.; Nomura, M.; Sato, H.; Kaneko, C.; Yusa, K.; Tsuruo, T. Synthesis and anti-HIV activity of 9-[*c*-4,*t*-5-bis(hydroxymethyl)cyclopent-2-en-*r*-1-yl]-9*H*-adenine *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1882-1886.

de la prostaglandine.⁷ Dans la chimie des nucléosides carbocycliques, il existe deux approches pour obtenir ce cyclopentyle basé sur deux réactions clés : l'une est la réaction de **cyclisation** (Figure 4) afin de former le cycle à partir de précurseurs chiraux et l'autre est la **fonctionnalisation du cyclopentadiène** commerciale (Figure 5).

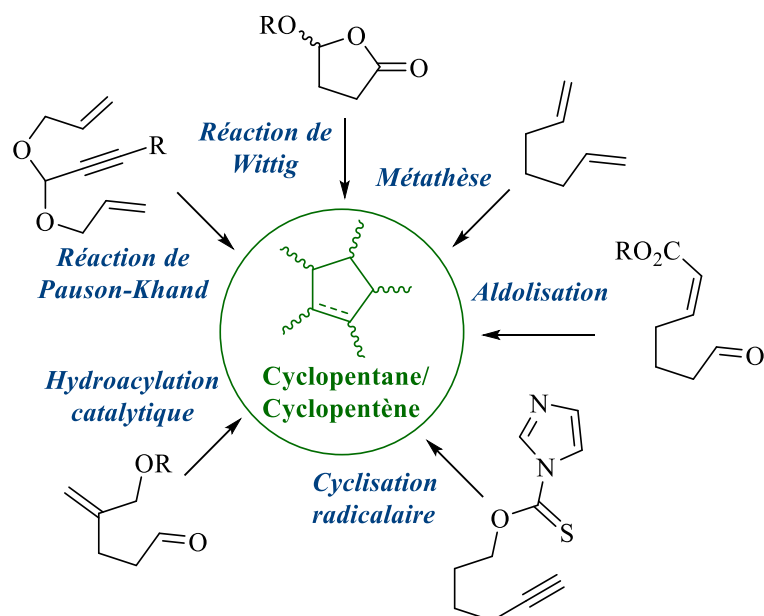


Figure 4 : Approche synthétique pour la formation du cycle cyclopentane/cyclopentène

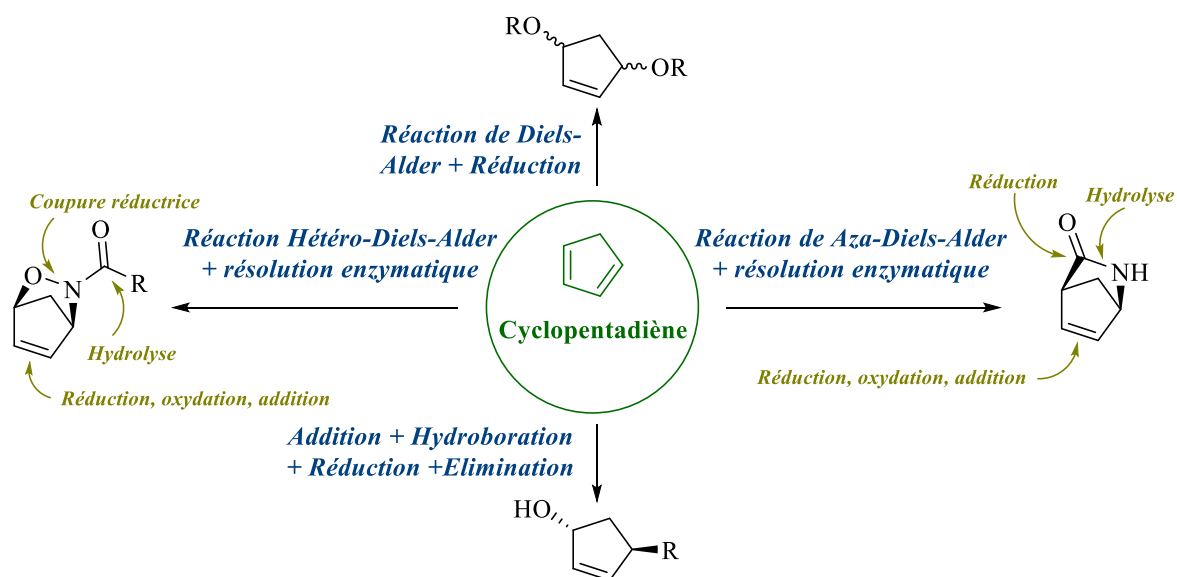


Figure 5 : Fonctionnalisation du cyclopentadiène

⁷ (a) Jeong, L.S.; Lee, J.A. Recent advances in the synthesis of the carbocyclic nucleosides as potential antiviral agents *Antiviral Chem. & Chemother.* **2004**, *15*, 235-250; (b) Temburnikar, K.; Seley-Radtke, K.L. Recent advances in synthetic approaches for medicinal chemistry of C-nucleosides *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 772-785; (c) Kurteva, V.B.; Afonso, C.A.M. Synthesis of cyclopentitols by ring-closing approaches *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6809-6857; (d) Simeonov, S.P.; Nunes, J.P.M.; Guerra, K.; Kurteva, V.B.; Afonso, C.A.M. Synthesis of chiral cyclopentenones *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5744-5893.

La stratégie par cyclisation est celle qui est la plus utilisée pour obtenir le pseudo-sucre donnant accès à une multitude d'analogues carbanucléosidiques. Néanmoins, on retrouve dans la littérature seulement quelques intermédiaires synthétiques utiles à leurs synthèses.⁸ Ces intermédiaires optiquement actifs présentent des fonctions chimiques diverses permettant une large fonctionnalisation du squelette carbocyclique. C'est le cas de la (-)-cyclopenténone α,β -insaturée **8** (obtenu à partir de sucre voir chap VII.a) qui est certainement l'un des intermédiaires le plus polyvalent et le plus utilisé pour former des analogues de type carbanucléosides 2',3'-hydroxylés (Figure 6).⁹ Son utilisation a conduit à de nombreuses séries d'analogues du composé **9** avec des hétérocycliques divers, de l'aristéromycine **10**, de la noraristéromycine **11**, du *normucléoside* **12** avec des hétérocycliques divers ou encore des néoplanocine F **13** et néoplanocine A **14**. Malgré le nombre d'étapes importants pour obtenir cette cyclopenténone **8**, son utilisation demeure largement employée.

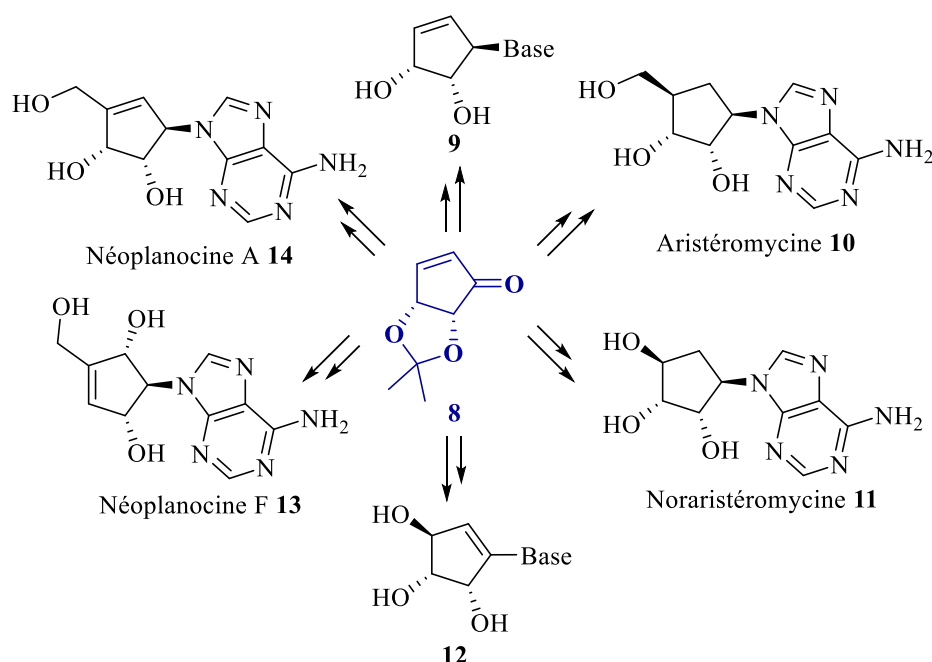


Figure 6 : Analogues carbanucléosidiques provenant de la cyclopenténone **8**

⁸ (a) Marquez, V.E.; Lim, M.I. Carbocyclic nucleosides. *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1-40. (b) Agrofoglio, L.A.; Suhas, E.; Farese, A.; Condom, R.; Challand, S.R.; Earl, R.A.; Guedj, R. Synthesis of carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10611-10684. (c) Crimmins, M.T. New developments in the enantioselective synthesis of cyclopentyl carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9229-9272. (d) Ludek, O.R.; Meier, C. New convergent synthesis of carbocyclic nucleoside analogues. *Synthesis* **2003**, *13*, 2101-2109.

⁹ (a) Bestmann, H.J.; Roth, D. Total synthesis of (-)-aristeromycin. *Synlett* **1990**, 751-752. (b) Borcherdig, D.R.; Scholtz, S.A.; Borchardt, R.T. Synthesis of analogs of neplanocin A: utilization of optically active dihydroxycyclopentenones derived from carbohydrates. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5457-5461. (c) Bodenteich, M.; Marquez, V.E. Total synthesis of ($\pm$)-neplanocin F. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4909-4912. (d) Yin, X.-Q.; Schneller, S.W. 5'-Noraristeromycin possessing a C-1'cyclopentyl double bond: a new carbanucleoside structural prototype. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3451-3455. (e) Yang, M.; Schneller, S.W. 5'- homoaristeromycin. Synthesis and antiviral activity against orthopox viruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 149-151.

D. Notre stratégie de synthèse

Notre point de départ pour l'élaboration d'une nouvelle méthode de synthèse a déjà été initié avec l'étude bibliographique autour de la synthèse du squelette carbanucléosidique 2',3'-hydroxylés comme évoqué précédemment avec le composé **8**. De manière générale, la construction du carbanucléoside **A** est obtenue par une coupure oxydante du composé *exo*-vinylique **B** (Schéma 8). La base qui est introduite par une substitution ou par sa construction, s'effectue après la réduction de la cétone du cyclopenténone **C** résultant d'une addition 1,4 sur l'intermédiaire clé **D**.

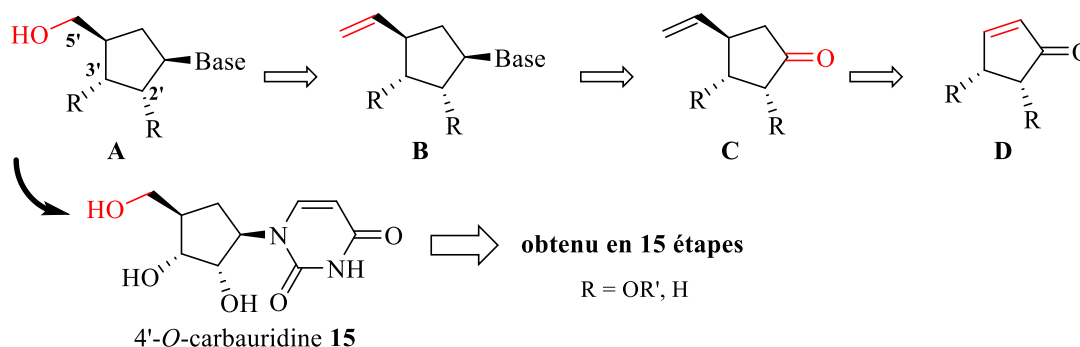


Schéma 8 : Approche synthétique pour accéder aux carbanucléosides 2',3'-hydroxylés

Dans notre cas, les molécules ciblées nécessitent aussi un carbanucléoside de type 2',3'-hydroxylés que nous souhaitons obtenir de manière plus accessible afin d'élaborer le plus d'analogues possibles. L'approche rétrosynthétique du schéma 8 révèle une méthodologie longue et linéaire comme on peut le voir avec le 4'-O-carburidine **15** accessible en 15 étapes.¹⁰ C'est pourquoi, nous souhaitons explorer d'autres approches synthétiques pour obtenir le synthon **C**. On remarque qu'avec un groupement R hydroxylé, il n'existe pas vraiment de méthodologie de synthèse pour obtenir cette cyclopentanone vinylique **C** autrement qu'à partir de la cyclopenténone **D** par la réaction d'addition 1,4 (Schéma 8). En généralisant ce groupement R avec des atomes d'hydrogènes, la méthode s'appuie aussi principalement par cette réaction d'addition 1,4¹¹ mais, dans ce cas, il existe d'autres méthodes qui sont moins exploitées (Schéma 9).

Parmi ces approches alternatives, on retrouve la réaction tandem d'addition 1,4 d'un cuprate suivi d'une cyclisation par une condensation de Dieckmann.¹² L'approche de Kreye utilise une copule chirale dérivée du menthol qui est introduit en trois étapes pour conduire à l'ester α,β -insaturé **16**

¹⁰ Rao, J.R.; Jha, A.K.; Rawal, R.K.; Sharon, A.; Day, C.W.; Barnard, D.L.; Smee, D.F.; Chu, C.K. (-)-Carboline: Enantiomeric synthesis and *in vitro* antiviral activity against various strains of influenza virus including H5N1 (avian influenza) and novel 2009 H1N1 (swine flu) Bioorg. Med. Chem. Lett. **2010**, 20, 2601–2604

¹¹ (a) Naeemi, Q.; Robert, T.; Kranz, D.P.; Velder, J.; Schmalz, H.-G. Chiral phosphine–phosphite ligands in the enantioselective 1,4-addition of Grignard reagents to α,β -unsaturated carbonyl compounds *Tetrahedron: Asymm.* **2011**, 22, 887–892 (b) Macke, J.D. Benzenesulfinyl chloride *e-EROS Encyclopedia of reagents for organic synthesis* **2001**, Wiley&Sons, UK, Coden: 69KUH1

¹² Groth, U.; Halbrodt, W.; Kalogerakis, A.; Köhler, T.; Kreye, P. 3-substituted and 2,3-disubstituted cyclopentanones via an asymmetric tandem 1,4-addition/Dieckmann cyclization *Synlett* **2004**, 2, 291–294.

(Schéma 9-1-). Ensuite, la réaction tandem est réalisée en commençant par l'addition 1,4 sélective pour former l'intermédiaire **17** suivie de la condensation qui donne stéréosélectivement la cyclopentanone **18**. Pour finir, la copule chirale est retirée par méthanolyse puis le produit **19** est obtenu par décarboxylation. Cette approche s'est inspirée de celle de Hobbs qui a aussi montré être capable de former la cyclopentanone sans la copule chirale avec des composés *trans* majoritaires.¹³ Une approche différente est celle de Kates par cyclisation radicalaire en présence d'acétate de manganèse(III) et d'acétate de cuivre(II) (Schéma 9-2-).¹⁴ Le dérivé chloré **20** est cyclisé en passant par l'espèce radicalaire **21** formé en présence de Mn(OAc)₃/Cu(OAc)₂ pour obtenir le cyclopentanone chloré **22**. Ce dernier est ensuite réduit pour conduire au mélange d'isomère *cis-trans* avec un ratio de 3:2. Cette synthèse montre une stéréosélectivité moins contrôlée avec le composé **23** en mélange *cis-trans*. L'approche d'Ikegami utilise une réaction d'insertion C-H intramoléculaire énantiosélective d'un α-diazo β-céto ester (Schéma 9-3-).¹⁵ Les auteurs élaborent un catalyseur chiral à base de dirhodium(II) carboxylate capable d'effectuer la cyclisation du composé diazo **24**. Le β-céto ester **25** obtenu est ensuite décarboxylé pour conduire à la cyclopentanone **19** avec un excès énantiomérique de 53%. Enfin, la dernière approche de Pfaltz utilise la réaction de Tsuji-Trost en présence de palladium(0).¹⁶ Les auteurs utilisent un ligand chiral afin d'induire une stéréosélectivité. Cette cyclisation allylique en présence du dérivé **26** conduit à un mélange des régioisomères **27** et **23** avec un ratio de 3:7 et un excès énantiomérique de 42% sur le produit décarboxylé. Les auteurs se sont inspirés des travaux antérieurs de Tsuji où il réalise le même type de réaction mais de manière non-stéréosélective.¹⁷

¹³ Nugent, W.A.; Hobbs, F.W. Improved Route to 3-Vinyl-Substituted Cyclopentanones. Synthesis of (±)-Mitsugashiwalactone *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3376-3378.

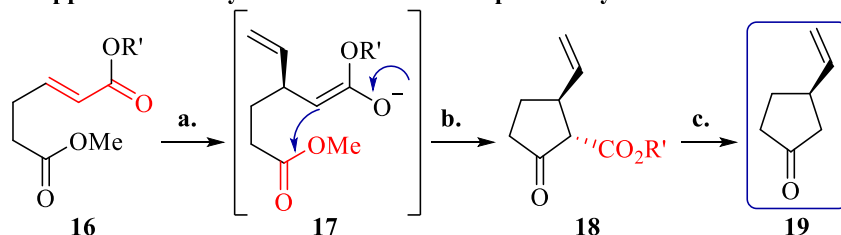
¹⁴ Snider, B.B.; Patricia, J.J.; Kates, S.A. Mechanism of Manganese(III)-Based Oxidation of β-Keto Esters *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2137-2143.

¹⁵ Ashimoto, S.-I.; Watanabe, N.; Sate, T.; Shiro, M.; Ikegami, S. Enhancement of Enantioselectivity in Intramolecular C-H Insertion Reactions of α-Diazo β-Keto Esters Catalyzed by Chiral Dirhodium(II) Carboxylate *Tet. Lett.* **1993**, *34*, 5109-5112.

¹⁶ Koch, G.; Pfaltz, A. Chiral Phosphinooxazolines as Ligands in Asymmetric Catalysis: intramolecular Pd-Catalyzed Allylic Alkylation *Tetrahedron: Asymm.* **1996**, *7*, 2213-2216.

¹⁷ Tsuji, J. Catalytic reactions via π-allylpalladium complexes *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 197-206.

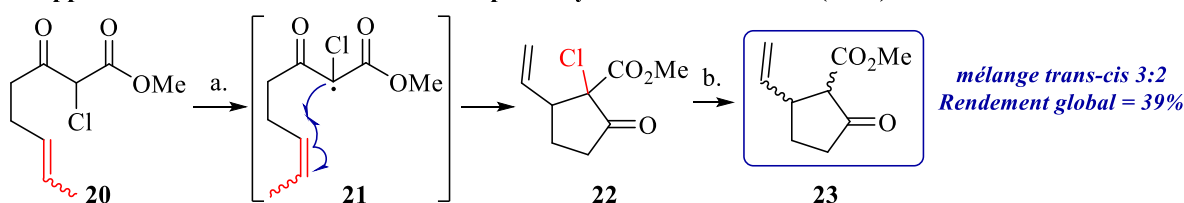
1- Approche de Kreye et ses collaborateurs par une cyclisation de Dieckmann stéréosélective (2004)



R' = (-)-8-Ph-menthol

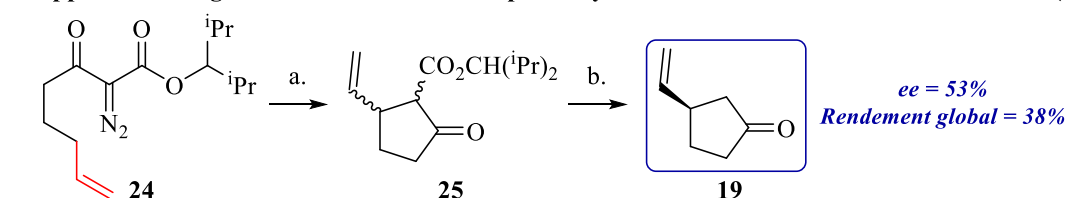
a. Addition sélective du cuprate b. Condensation sélective cyclisante de Dieckmann c. Méthanolys + décarboxylation

2- Approche de Kates et ses collaborateurs par la cyclisation radicalaire (1988)



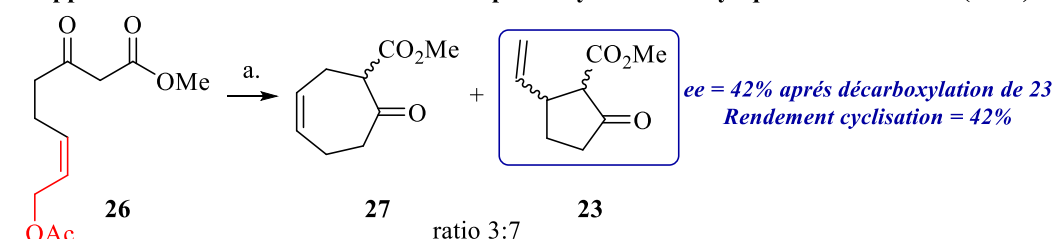
a. Cyclisation radicalaire avec $\text{Mn}(\text{OAc})_3/\text{Cu}(\text{OAc})_2$ b. Réduction

3- Approche d'Ikegami et ses collaborateurs par la cyclisation du dérivé diazo stéréosélective (1993)



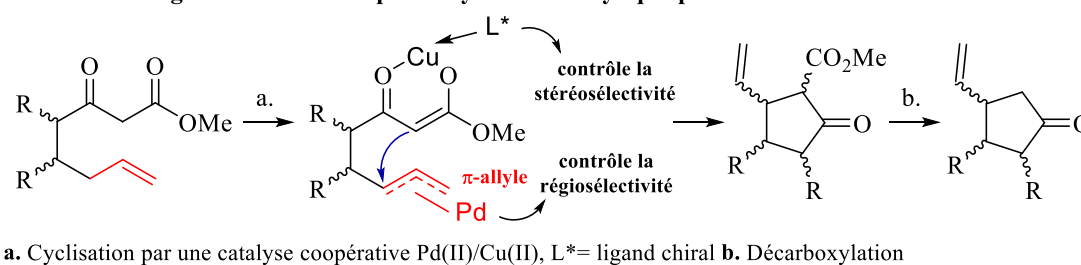
a. Cyclisation catalysée par le dirhodium(II) carboxylate chiral b. Décarboxylation

4- Approche de Pfaltz et ses collaborateurs par la cyclisation allylique stéréosélective (1996)



a. Cyclisation catalysée par le complexe $\{[\text{Pd}(\eta^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2 + \text{Phosphino-oxazoline chiral}\}$

5- Notre stratégie au laboratoire par la cyclisation allylique par activation C-H



a. Cyclisation par une catalyse coopérative Pd(II)/Cu(II), L* = ligand chiral b. Décarboxylation

1^{er} Objectif avec R = H

Preuve de concept

Optimiser Rendement + Régiosélectivité + Stéréosélectivité

2^e Objectif

Entendre la réaction avec R = O-R'

Schéma 9 : Alternative synthétique et Stratégie visée au laboratoire

Ces approches montrent qu'il est possible de synthétiser la cyclopentanone par une cyclisation autrement qu'avec l'approche de l'intermédiaire connu **8**. Quelque soit la réaction employée, la cyclisation est un vrai défi en terme de régiosélectivité et de stéréosélectivité. Notre stratégie s'inspire de la cyclisation sur l'espèce π -allylique palladiée mais qui serait obtenue non pas par la réaction de Tsuji-Trost mais par une **activation C-H allylique palladocatalysée (Pd(II))**. L'avantage est que les précurseurs alcéniques sont facilement accessibles avec un groupement R modulables selon nos choix. Pour résoudre les défis de cette cyclisation, nous souhaitons utiliser une catalyse coopérative qui permet de contrôler la régiosélectivité et la stéréosélectivité avec un système en duo catalytique comme avec le catalyseur au palladium et le catalyseur à base de cuivre. L'objectif de cette méthode est de réaliser une première preuve de concept avec un précurseur simple (R=H) en optimisant les conditions réactionnelles en faveur du meilleur rendement possible pour l'isomère souhaité. Puis le second objectif est d'appliquer cette méthode pour former le pseudo-sucres des carbanucléosides 2',3'-hydroxylés issus de notre chimiothèque avec les précurseurs alcènes O-substitués (R = OR').

IV Rétrosynthèse proposée

Notre nouvelle stratégie permet d'envisager la rétrosynthèse suivante qui a pour but d'accéder aux analogues carbanucléosidiques de notre chimiothèque virtuelle de manière plus rapide *via* une cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée (Schéma 10).

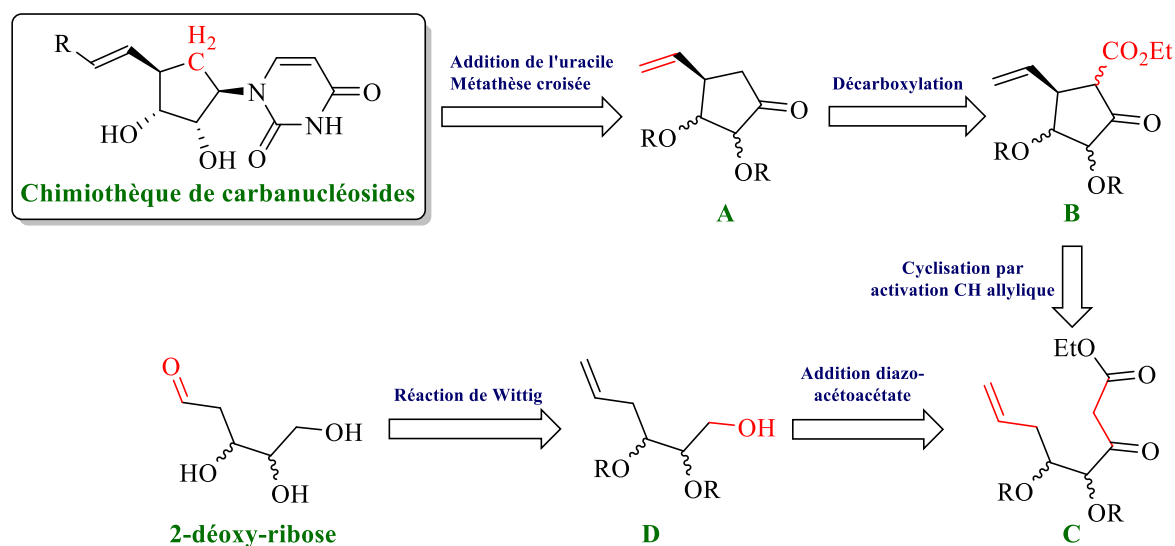


Schéma 10 : Rétrosynthèse envisagée pour la formation du cyclopentanone

Les analogues de la chimiothèque sont obtenus par deux étapes clés : la métathèse croisée avec l'alcène correspondant obtenue par l'addition de l'uracile protégé en N_3 après réduction stéréosélective de la cétone du cyclopentanone vinylique **A** qui est obtenu par une décarboxylation en présence du synthon **B**. Ce dernier est obtenu par l'étape innovante de cyclisation par activation C-

H allylique pallado-catalysée à partir du précurseur **C**. Lui-même obtenu en réalisant une addition du réactif diazoacétoacétate sur le dérivé **D** préalablement oxydé en aldéhyde. Cet alcool **D** est synthétisé à partir du 2-déoxy-ribose par la réaction de Wittig où l'on aura protégé les alcools secondaires. Pour réaliser cette approche rétrosynthétique, nous nous focalisons sur la synthèse du β -céto ester acyclique **C** et en parallèle sur les premiers essais de cyclisation par activation C-H avec des précurseurs simples non substitués.

V Synthèse du β -céto ester cyclopentanone vinylique¹⁸

A. Synthèse du β -cétoester acyclique

Pour accéder aux β -céto ester cycliques, nous avons choisi d'utiliser le 2-déoxy-(L ou D)-ribose commercial, respectivement, qui offre la possibilité de réaliser les deux énantiomères acycliques avec la configuration L et D en seulement quatre étapes réactionnelles avec : la protection des alcools secondaires, la réaction de Wittig sur la forme ouverte du sucre, l'oxydation de l'alcool primaire et l'addition du réactif diazo sur l'aldéhyde (Schéma 11).

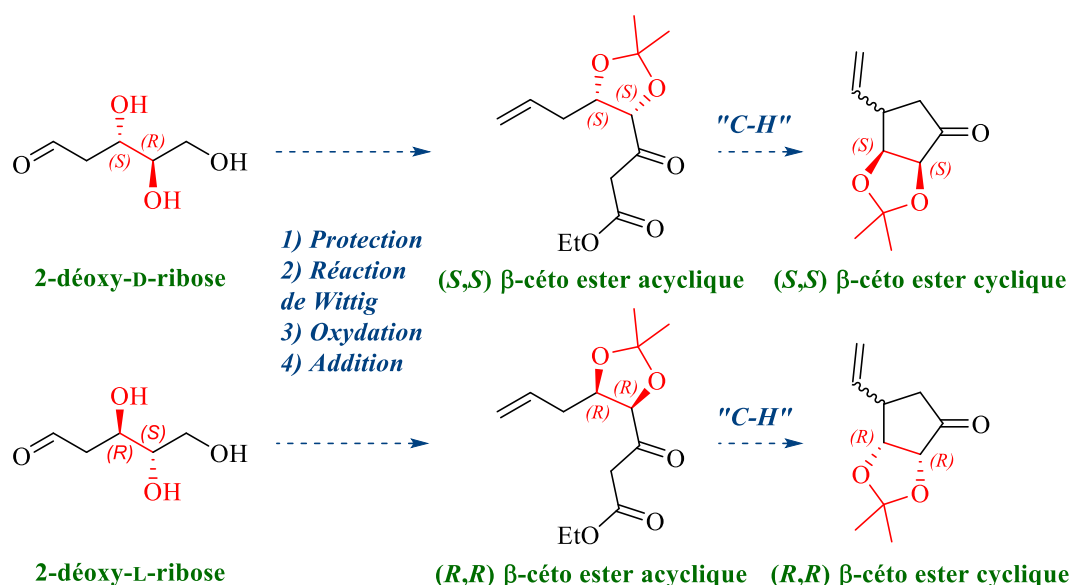
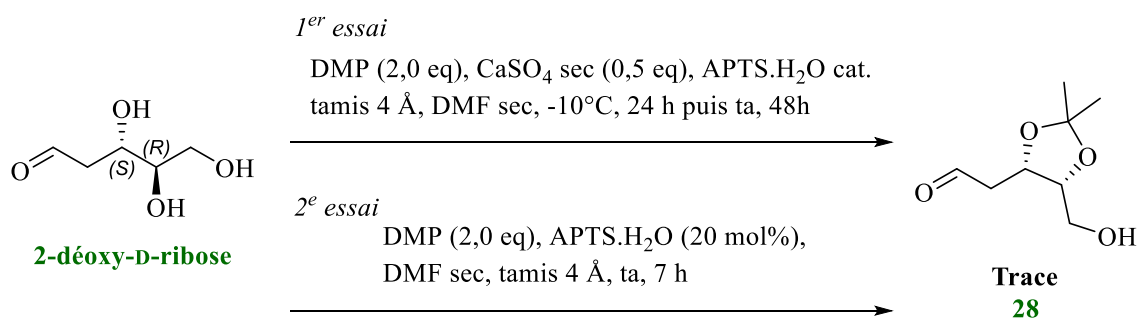


Schéma 11 : Voie d'accès envisagée des énantiomères acycliques et cycliques à partir du 2-déoxy-(L ou D)-ribose

Nous commençons par une première étape de protection par un groupement *isopropylidène* sur la forme ouverte du 2-déoxy-D-ribose.¹⁹ Cependant, les premiers essais pour obtenir le composé protégé **28** dans des conditions classiques, n'ont pas été très concluants (Schéma 12).

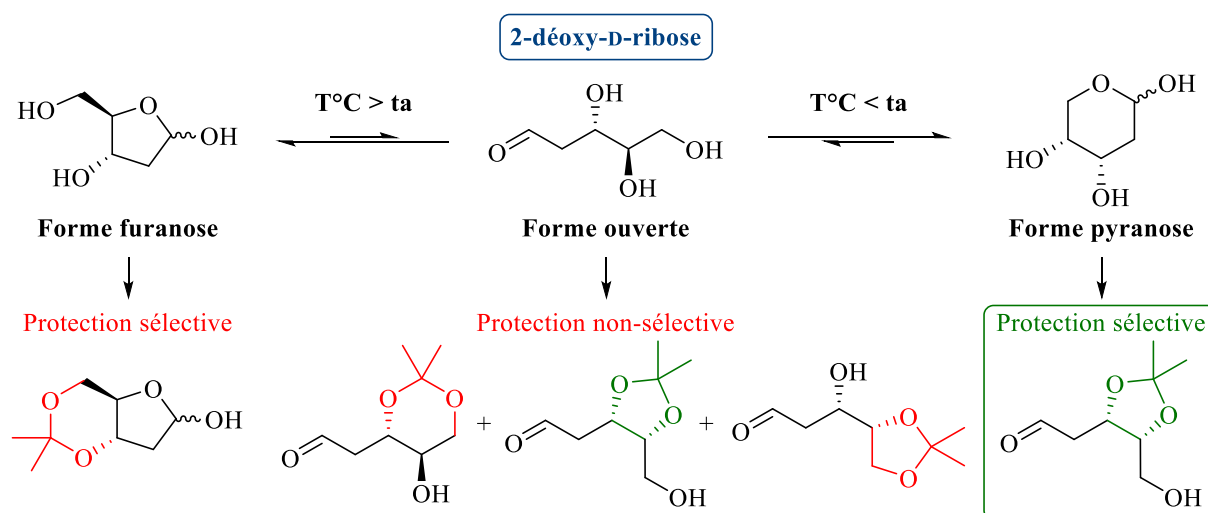
¹⁸ Ce projet s'appuie sur des résultats préliminaires obtenus par les Drs M. Hamada, O. Sari, C. De Schutter au cours de leurs séjours au sein de notre équipe.

¹⁹ (a) Wood, J.M.; Furkert, D.P.; Brimble, M.A.; Synthesis of the 2-formylpyrrole spiroketal pollenopyrroside A and structural elucidation of xylapyrroside A, shensongine A and capparisine B *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7659-7664; (b) Bolte, B.; Basutto, J.A.; Bryan, C.S.; Garson, M.J.; Banwell, M.G.; Ward, J.S. Modular Total Syntheses of the Marine-Derived Resorcylic Acid Lactones Cochliomycins A and B Using a Late-Stage Nozaki-Hiyama-Kishi Macrocyclization Reaction *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 460-470.

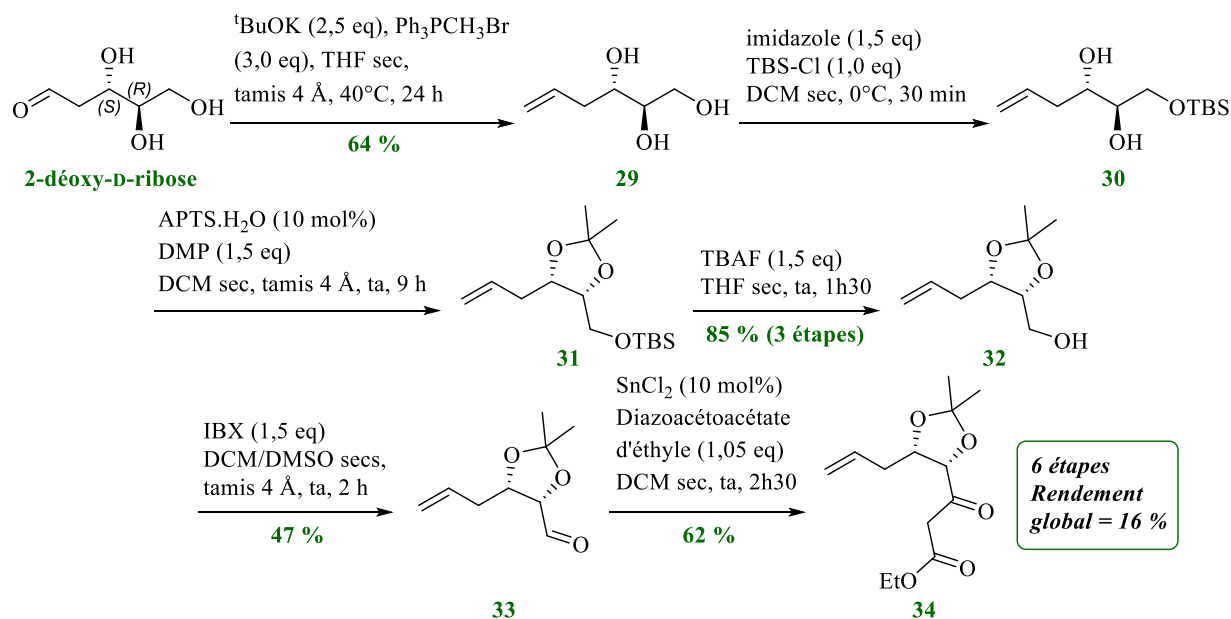


La première tentative utilise les conditions expérimentales que l'on retrouve dans la littérature.¹⁸ La réaction a montré une conversion très faible du produit de départ après 24 h à -10°C en présence d'une quantité catalytique d'APTS. C'est pourquoi, à température ambiante, nous avons ajouté 5 mol% d'APTS sur une longue période afin d'augmenter la cinétique de la réaction. Malheureusement nous n'avons pas observé d'amélioration de la conversion du produit de départ. Nous avons réalisé un autre essai en utilisant des conditions similaires mais en présence de 20 mol% d'APTS dès le départ. Une conversion totale a été observée par CCM après 7 h à température ambiante. Après traitement, nous avons observé d'énormes pertes de matière du brut réactionnel pendant l'évaporation du solvant d'extraction, dû à brut très volatil avec seulement des traces du produit **28**. La protection directe du 2-déoxy-ribose n'est pas si simple car il faut que la réaction soit régiosélective sachant qu'il existe plusieurs formes du 2-déoxy-D-ribose (Schéma 13). La forme ouverte du 2-déoxyribose est en équilibre avec les deux formes furanose et pyranose.²⁰ Pour obtenir le bon régioisomère, il faut avoir une forme pyranose majoritaire d'où l'importance d'une basse température. La simple présence de trace d'eau peut aussi suffire à déplacer cet équilibre d'où la nécessité de conditions strictement anhydre.

²⁰ (a) Barbat, J.; Gelas, J.; Horton, D. Acetonation of L-fucose, L-rhamnose, and 2-deoxy-D-erythro-pentose under kinetically controlled conditions *Carb. Res.* **1983**, *116*, 312-316; (b) Lemieux, R.U.; Anderson, L.; Conner, A.H.; The mutarotation of 2-deoxy-β-D-erythro-pentose ("2-deoxy-β-D-erythro-ribose"), conformations, kinetics, and equilibria *Carb. Res.* **1971**, *20*, 59-72.



Pour contourner ce problème de régiosélectivité qui peut faire chuter le rendement, nous avons changé notre approche avec une synthèse plus longue pour introduire le groupement *isopropylidène* préalable à la conversion du carbonyle en alcène par une réaction de Wittig suivi d'une protection l'alcool primaire (Schéma 14).²¹



La réaction de Wittig réalisée en présence du 2-déoxy-D-ribose a conduit à l'alcène **29** avec un rendement de 64 %. A noter que pour les étapes de purification, il ne faut pas réaliser d'extraction du mélange réactionnel car le composé est partiellement soluble dans l'eau. La filtration directe sur verre fritté de porosité P2 (taille des pores de 40 à 100 μm) permet d'éliminer à la fois les sels et le tamis

²¹ Urosa, A.; Marcos, I.S.; Díez, D.; Padrón, J.M.; Basabe, P. Synthesis of luffarin L and 16-*epi*-luffarin L using a temporary silicon-tethered ring-closing metathesis reaction *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6447-6455.

moléculaire du mélange. Cependant, il est nécessaire de réaliser deux colonnes chromatographiques sur silice phase normale avec des éluants orthogonaux pour obtenir le composé **29** pur. L'insertion du groupement *isopropylidène* s'effectue en trois étapes : la première est la protection de l'alcool primaire qui donne accès à l'éther silylé **30**;²² puis l'addition du groupement *isopropylidène* s'effectue dans des conditions classiques pour donner le composé **31** ; enfin une dernière étape de déprotection de l'alcool primaire en présence de TBAF²³ conduit au dérivé **32** avec un rendement de 85 % sur trois étapes. La formation de l'aldéhyde **33** s'effectue par oxydation en présence d'IBX en tant qu'agent oxydant avec un rendement de 47 %. La dernière étape est l'addition du réactif diazoacétoacétate d'éthyle sur l'aldéhyde catalysée par les sels d'étain en tant qu'acide de Lewis pour former le β -céto ester acyclique **34** avec un rendement de 62 %.²⁴ Le précurseur acyclique **34** a été obtenu avec un rendement global de 16 % en six étapes à partir du 2-déoxy-D-ribose.

A partir du 2-déoxy-L-ribose, nous avons réalisé la même synthèse en commençant par la réaction de Wittig conduisant à l'alcène **35** avec un rendement de 64 % (Schéma 15). L'alcool primaire a été protégé avec un éther silylé pour conduire au dérivé **36** avec un rendement de 89 %. La protection par un *isopropylidène* du diol produit le composé **37** avec un rendement faible de 23 % (*rdt non significatif car erreur dans le temps réactionnel*). Après déprotection de l'alcool primaire, l'alcool **38** a été isolé avec un rendement quantitatif. L'oxydation avec IBX procure l'aldéhyde **39** avec un rendement de 50 % qui par addition du réactif diazo nous a permis d'isoler le composé **40** avec un rendement de 65 %.

²² Mohapatra, D.K.; Reddy, S.; Mallampudi, N.A.; Yadav, J.S. Stereoselective total syntheses of paecilomycins E and F through a protecting group directed diastereoselective intermolecular Nozaki-Hiyama-Kishi (NHK) reaction *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 5023-5032.

²³ Rajesh, K.; Suresh, V.; Selvam, J.J.P.; Rao, C.B.; Venkateswarlu, Y. Stereoselective total synthesis of cladospolide A *Synthesis* **2010**, 8, 1381-1385.

²⁴ Dudley, M.E.; Morshed, M.M.; Brennan, C.L.; Islam, S.; Ahmad, S.; Atuu, M.-R.; Branstetter, B.; Hossain, M. Acid-catalyzed reactions of aromatic aldehyde with ethyl diazoacetate: an investigation on the synthesis of 3-hydroxy-2-arylacrylic acid ethyl esters *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7599-7608.

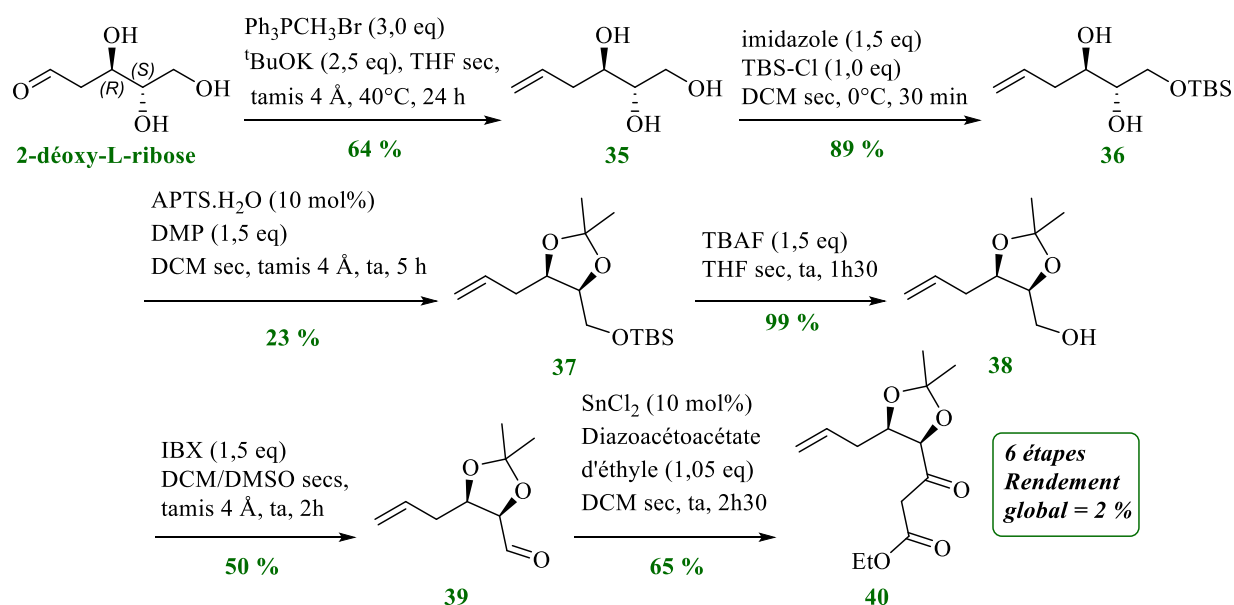


Schéma 15 : Préparation du composé acyclique 40

Pour optimiser la synthèse du précurseur acyclique, nous avons choisi à partir du 2-déoxy-D-ribose de modifier l'étape de protection avec un groupement protecteur éther silylé et l'étape d'oxydation directement à partir de l'éther silylé obtenu (Schéma 16).²⁵

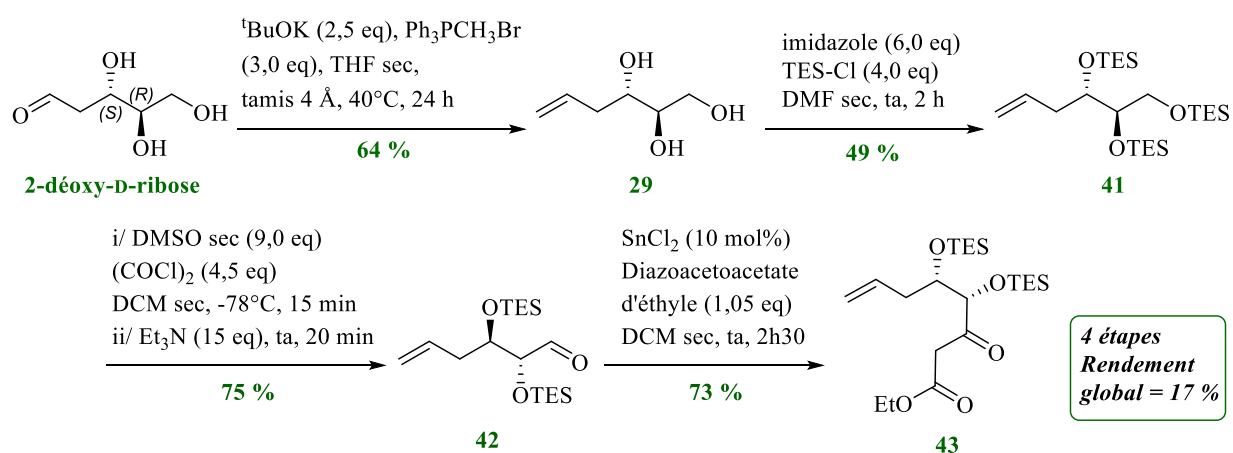


Schéma 16 : Préparation du composé 43

A partir de l'alcène **29** déjà obtenu, une protection avec un éther silylé des fonctions alcools a permis d'accéder au dérivé **41** avec un rendement de 49 %. L'aldéhyde a été obtenu par oxydation de Swern sélective de l'alcool primaire silylé (*l'oxydation sélective d'ethers silylés primaires dans des conditions de Swern est supposée provenir de l'hydrolyse de cet éther par des traces accessoires d'HCl*).²⁶ Cette

²⁵ Rodríguez, A.; Nomen, M.; Spur, B.W.; Godfroid, J.J. Selective oxidation of primary silyl ethers and its application to the synthesis of natural products *Tett. Lett.* **1999**, *40*, 5161-5164.

²⁶ (a) Shimizu, H.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Nakatani, M. Asymmetric synthesis of (–) and (+)-eutipoxide B using a base-catalyzed Diels-Alder reaction *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1903-1908; (b) Rodríguez, A.; Nomen, M.; Spur, B.W.; Godfroid, J.J.; Lee, T.H. Total synthesis of 12(R)-HETE, 12(S)-HETE, ²H₂-12(R)-HETE and LTB₄ from racemic glycidol via hydrolytic kinetic

oxydation permet de former l'aldéhyde **42** avec un rendement de 75 %. La dernière étape pour obtenir le dérivé β -cétoester **43** a été réalisée en présence de diazoacétoacétate d'éthyle catalysée par les sels d'étain avec un rendement de 73 %. Le composé **43** a donc été obtenu avec un rendement global de 17 % en quatre étapes. Le rendement de l'oxydation de l'éther silylé s'avère être meilleur qu'avec l'oxydation de l'alcool **32** en présence d'IBX. Cependant, la protection des alcools en éther silylés montre un rendement plus faible, ce qui explique le rendement global similaire.

B. La cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée

Avant de présenter les essais de cyclisations, nous allons rapidement exposer quelques généralités sur l'activation C-H.

1. Généralités sur l'activation C-H

La plupart des molécules organiques synthétisées par le chimiste organicien sont obtenues à partir de matières premières avec peu de valeurs ajoutées. Ces nouvelles molécules impliquent donc de couper et de créer de nouvelles liaisons carbone-carbone (C-C) ou encore de transformer une liaison carbone-hydrogène (C-H) en un groupe fonctionnel souhaité jusqu'à obtenir la structure voulue. Traditionnellement, le chimiste organicien utilise des approches synthétiques multi-étapes.²⁷ L'activation d'une liaison C-H avec une fonctionnalisation *in situ* procure une nouvelle approche pour introduire des fonctions chimiques. La synthèse multi-étape peut ainsi être transformée en une synthèse *one-step* (une étape en anglais) en générant moins de déchets et une bonne économie d'atomes.²⁸ Dans la nature, un exemple connu d'une activation C-H est celle de la biotine catalysée par une enzyme appelée la *biotin synthase*.²⁹ Cependant, les catalyseurs synthétiques en synthèse organique n'ont pas la même chémosélectivité qu'une enzyme. Le développement de ces catalyseurs reste un challenge et ils sont directement reliés à un paramètre appelé *BDE* en kcal/mol (*bond dissociation energy* en anglais) qui est l'énergie nécessaire pour la coupure d'une liaison C-H.³⁰ La liaison C-H est une liaison difficile à couper mais la *BDE* n'est pas identique pour toutes les molécules et elle varie selon les fonctions chimiques présentes dans la molécule. Ces différentes valeurs de *BDE* permettent de sélectionner les fonctionnalisations possibles des liaisons C-H dites « activées ». Cette stratégie a été appliquée pour beaucoup de substrats différents où la fonctionnalisation d'une liaison

resolution *Tetrahedron* **2001**, 25-37; (c) Lambert, W.T.; Burke, S.D. Halichondrin B: synthesis of a C₁-C₁₄ model via desymmetrization of (+)-conduiritol E *Org. Lett.* **2003**, 5, 515-518.

²⁷ Davies, H.M.L.; Du Bois, J.; Yu, J.Q. C-H functionalization in organic synthesis *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1855-1856.

²⁸ *C-H bond activation in organic synthesis* 1st edition, Li, J.J., CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton London New York **2017**.

²⁹ Booker, S.J. Anaerobic functionalization of unactivated C-H bonds *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 58-73.

³⁰ Xue, X.-S.; Ji, P.; Zhou, B.; Cheng, J.-P. The essential role of bond energetics in C-H activation/Functionalization *Chem. Rev.* **2017**, 117, 8622-8648.

C-H est catalysée par différents métaux.³¹ Cette fonctionnalisation s'étend avec l'incorporation de divers hétéroatomes³², différentes cyclisations par l'activation C-H radicalaire³³ ou encore très utile dans la création d'une liaison C-C³⁴.

2. Généralités sur l'activation C-H allylique

L'exploration de nouvelles méthodes de fonctionnalisation d'une liaison C-H a conduit à la description de nouvelles réactions.²⁶ En particulier, l'utilisation du groupement allylique a ouvert la voie à diverses fonctionnalisations grâce à un intermédiaire important qui est le carbo-palladium électrophile, appelé aussi complexe palladium- π -allyle. Cette entité électrophile permet la création de nouvelles liaisons C-hétéroatome ou C-C par l'ajout d'un nucléophile.³⁵ Traditionnellement, la formation de cette entité π -allylique peut s'effectuer au travers de la réaction de Tsuji-Trost où le composé palladium π -allylique est obtenu avec un précurseur allylique contenant un groupement partant en présence de Pd(o).³⁶ Cependant, les avantages de l'activation C-H est qu'il ne nécessite pas de groupement partant en α d'un allyle et que la fonctionnalisation C-H allylique peut tolérer la présence de diverses fonctions chimiques. La différence du point de vue mécanistique de la formation du complexe palladium π -allyle entre la réaction de Tsuji-Trost avec du palladium(o) et l'activation C-H avec du palladium(II) est reportée dans le schéma 17.³⁷

³¹ Roudesly, F.; Oble, J.; Poli, G. Metal-catalyzed C-H activation/functionalization: The fundamentals *J. Mol. Cat. A: Chemical* **2017**, *426*, 275-296.

³² Hummel, J.R.; Boerth, J.A.; Ellman, J.A. Transition-metal-catalyzed C-H bond addition to carbonyls, imines, and related polarized π bonds *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9163-9227.

³³ Yi, H.; Zhang, G.; Wang, H.; Huang, Z.; Wang, J.; Singh, A.K.; Lei, A. Recent advances in radical C-H activation/Radical cross-coupling *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9016-9085.

³⁴ (a) He, J.; Wasa, M.; Chan, K.S.L.; Shao, Q.; Yu, J.-Q. Palladium-catalyzed transformations of alkyl C-H bonds *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8754-8786; (b) Dong, Z.; Ren, Z.; Thompson, S.J.; Xu, Y.; Dong, G. Transition-metal-catalyzed C-H alkylation using alkenes *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9333-9403; (c) Kim, D.-S.; Park, W.-J.; Jun, C.-H. Metal-organic cooperative catalysis in C-H and C-C bond activation *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8977-9015.

³⁵ (a) Fernandes, R.A.; Nallasivam, J.L. Catalytic allylic functionalization via π -allyl palladium chemistry *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8647-8672; (b) Bayeh, L.; Tambar, U.K. Catalytic asymmetric intermolecular allylic functionalization of unactivated internal alkenes *ACS Catalysis* **2017**, *7*, 8533-8543; (c) Qi, X.; Chen, P.; Liu, G. Advances and challenges in palladium-catalyzed intermolecular selective allylic C-H functionalization of alkenes *Sci. China Chem.* **2015**, *58*, 1249-1251; (d) Wang, R.; Luan, Y.; Ye, M. Transition metal-catalyzed allylic C(sp³)-H functionalization via η^3 -allylmatal intermediate *Chin. J. Chem.* **2019**, *37*, 720-743.

³⁶ Trost, B.M.; Fullerton, T.J. New synthetic reactions. Allylic alkylation *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 292-294.

³⁷ (a) Liron, F.; Oble, J.; Lorion, M.M.; Poli, G. Direct allylic functionalization through Pd-catalyzed C-H activation *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 5863-5883; (b) Engelin, C.J.; Fristrup, P. Palladium catalyzed allylic C-H alkylation: A mechanistic perspective *Molecules* **2011**, *16*, 951-969.

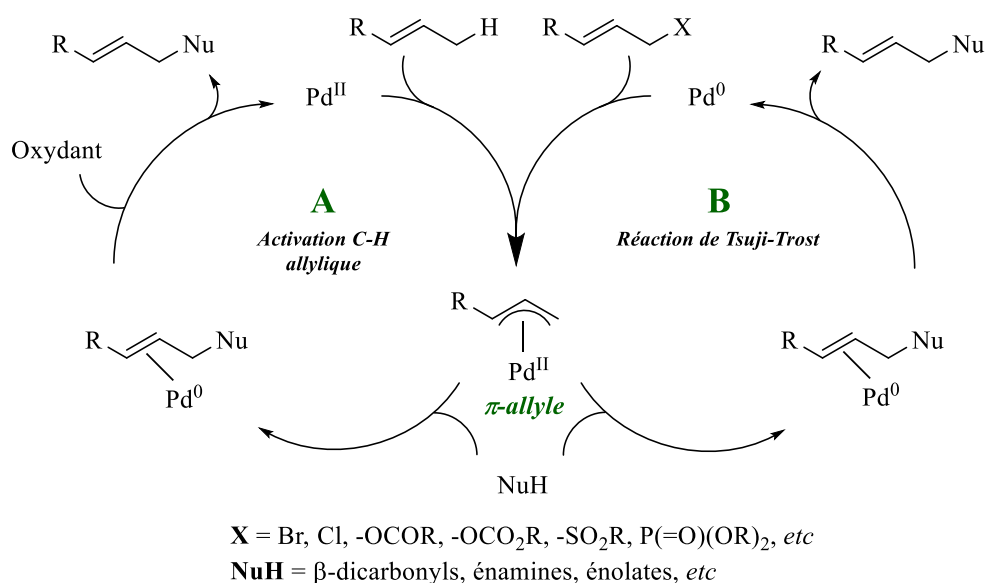


Schéma 17 : Mécanisme d'une fonctionnalisation nucléophile catalysée par le Pd(0) et le Pd(II)

Dans le mécanisme **A**, le cycle catalytique commence par une activation C-H initiée avec la coordination de la liaison C-H et le site vacant du Pd(II) pour conduire à la formation des liaisons C-Pd et Pd-H sans changement de degré d'oxydation. Ce début de mécanisme est typiquement utilisé dans le cas où les métaux de transitions sont électroniquement riches et lorsque le haut degré d'oxydation et le changement de géométrie ne sont pas favorables énergétiquement. D'autres mécanismes restent possibles selon le métal utilisé pour l'activation C-H.³⁸ Le complexe η^3 palladium- π -allyle est une espèce électrophile qui est substituée en présence d'un nucléophile avec la formation du complexe Pd(0) coordonné au produit substitué. Pour cette étape, il existe deux types d'attaques nucléophiles selon la nature du nucléophile « dur » ou « mou » (selon la théorie HSAB).³⁹ Un nucléophile dur attaque d'abord le métal puis cela est suivi par une élimination réductrice qui donne le produit. Le nucléophile mou attaque directement la partie allylique. Pour finir le cycle catalytique, une décomplexation procure le produit souhaité ainsi que le Pd(0) qui est réoxydé en Pd(II) en présence d'un oxydant dans le milieu. Dans le cycle catalytique **B**, le mécanisme est proche de **A** à la différence de la formation du complexe η^3 palladium- π -allyle qui utilise les conditions réactionnelles de Tsuji-Trost avec le Pd(0) qui se coordonne à la double liaison pour donner le complexe η^2 palladium- π -allyle puis l'addition oxydante procure le complexe η^3 palladium- π -allyle grâce au groupement partant présent sur la molécule. Dans le cycle **A**, il existe deux types d'activation C-H pour former le produit final (Schéma 18).^{35a}

³⁸ Balcells, D.; Clot, E.; Eisenstein, O. C-H bond activation in transition metal species from a computational perspective *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 749-823.

³⁹ Trost, B.M.; Van Vranken, D.L. Asymmetric transition metal-catalyzed allylic alkylations *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395-422.

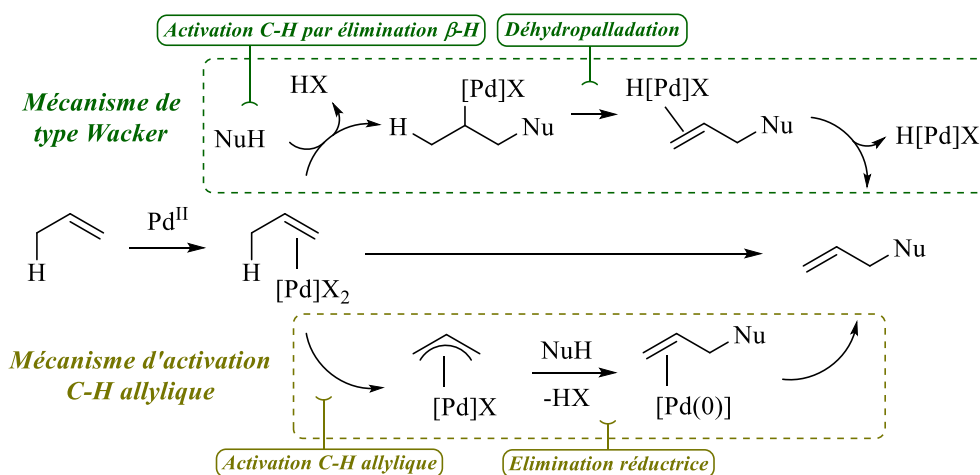


Schéma 18 : Voies possibles pour l'addition nucléophile du Pd (II) complexé à l'alcène

L'une des voies possibles est celle qui nous intéresse avec la formation du complexe η^3 palladium- π -allyle par une activation C-H allylique suivi d'une élimination réductrice qui forme le produit coordonné au Pd(o). La décomplexation conduit au produit souhaité où le Pd(o) est réoxydé. L'autre voie plus formelle implique une nucléopalladation par une activation C-H au travers d'une élimination β -H suivie d'une déhydropalladation. La décomplexation procure également le produit souhaité. A l'exception de l'unique cas pour l'éthylène où la nucléopalladation est la seule possibilité mécanistique (procédé Wacker),⁴⁰ les deux voies sont possibles pour de telles réactions.³⁵ L'exemple de l'acétylation du but-1-ène décrit par Young *et coll.* prouve la possibilité de ces deux types d'additions (Schéma 19).⁴¹ Les composés **44** et **45** sont obtenus par une réactivité de type Wacker (par acétoxypalladation suivie d'une déhydropalladation) tandis que le composé **46** est obtenu par une réactivité d'oxydation allylique directe (par l'intermédiaire η^3 palladium- π -allyle).

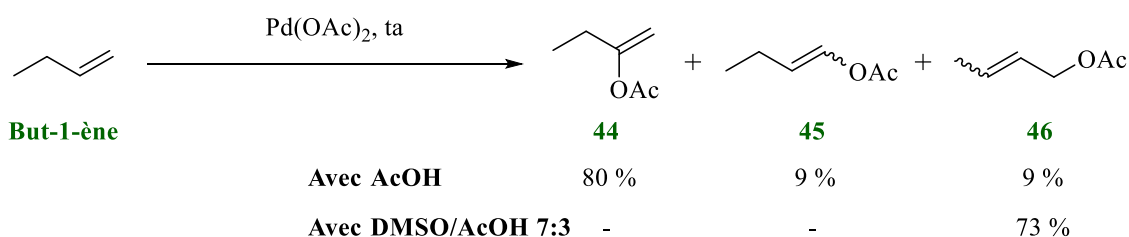


Schéma 19 : Acétylation du but-1-ène pallado-catalysée

Les auteurs ont mentionné qu'en présence d'acide acétique pur, les produits **44** et **45** issus du mécanisme de type de Wacker sont obtenus majoritairement. Toutefois, la réaction en présence de DMSO en tant que co-solvant favorise sélectivement la formation du composé **46** issu d'un mécanisme d'activation C-H allylique. Cette réaction montre l'importance de la présence et de la

⁴⁰ Jira, R. Acetaldehyde from ethylene – a retrospective on the discovery of the Wacker process *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9034-9037.

⁴¹ Kitching, W.; Rappoport, Z.; Winstein, S.; Young, W.G. Allylic oxidation of olefins by palladium acetate *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2054-2055.

nature du ligand ou d'un solvant tel qu'un sulfoxyde (DMSO) pour influencer la réaction vers un mécanisme par une activation C-H allylique. White *et coll.* a publié des résultats similaires (Schéma 20).⁴²

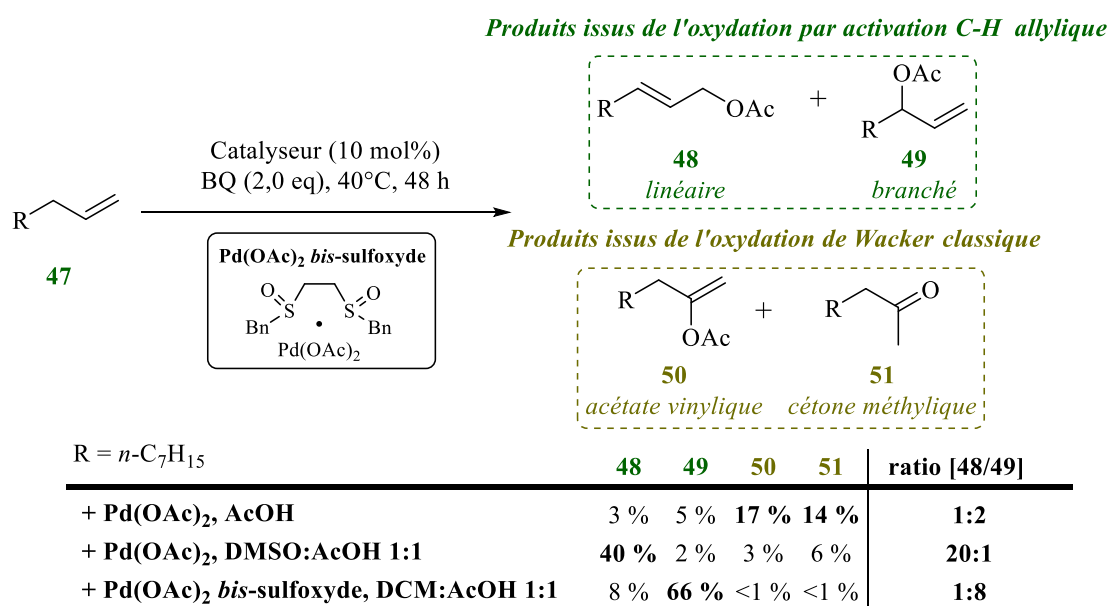


Schéma 20 : Influence du DMSO et d'un ligand *bis*-sulfoxyde sur l'acétylation pallado-catalysée

L'acétylation montre que les produits **50** et **51** de type Wacker sont majoritaires sans la présence de sulfoxyde. Au contraire, la réaction en présence de DMSO montre que les composés **48** et **49** sont majoritaires. Le DMSO est considéré comme un solvant qui stabilise les intermédiaires du cycle catalytique mais il n'existe pas de corrélations entre la polarité du solvant et l'habilité à promouvoir l'activation C-H. Les auteurs ont conclu cela en réalisant des essais avec des solvants de différentes polarités. Par la suite, la réaction a été réalisée en présence d'un sulfoxyde en tant que ligand avec le catalyseur *bis*-sulfoxyde palladié. Ce catalyseur en absence de DMSO procure majoritairement le composé **49** avec une bonne régiosélectivité et un rendement de 66 %. Le potentiel de ce type de ligand afin d'optimiser le ratio entre les produits branchés et linéaires a été largement exploré par le groupe de M Christina White⁴³ qui a montré que la régiosélectivité ne dépend pas que du catalyseur *bis*-sulfoxyde mais aussi des propriétés électroniques de l'alcène et de l'effet stérique.⁴⁴ En ce qui

⁴² Chen, M.S.; White, C. A sulfoxide-promoted, catalytic method for the regioselective synthesis of allylic acetates from monosubstituted olefins via C-H oxidation *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1346-1347.

⁴³ Chen, M.S.; Prabakaran, N.; Labenz, N.A.; White, M.C. Serial ligand catalysis: A highlyselective allylic C-H oxidation *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6970-6971.

⁴⁴ (a) Young, A.J.; White, M.C. Catalytic intermolecular allylic C-H alkylation *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14090-14091; (b) Young, A.J.; White, M.C. Allylic C-H alkylation of unactivated α -olefins: serial ligand catalysis resumed *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6824-6827; (c) Howell, J.M.; Liu, W.; Young, A.J.; White, M.C. General allylic C-H alkylation with tertiary nucleophiles *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5750-5754.

concerne l'énantiosélectivité de l'activation C-H allylique, les mêmes auteurs ont montré que l'utilisation d'acides de Lewis chiraux permet d'accéder à des produits énantio-enrichis (Schéma 21).⁴⁵

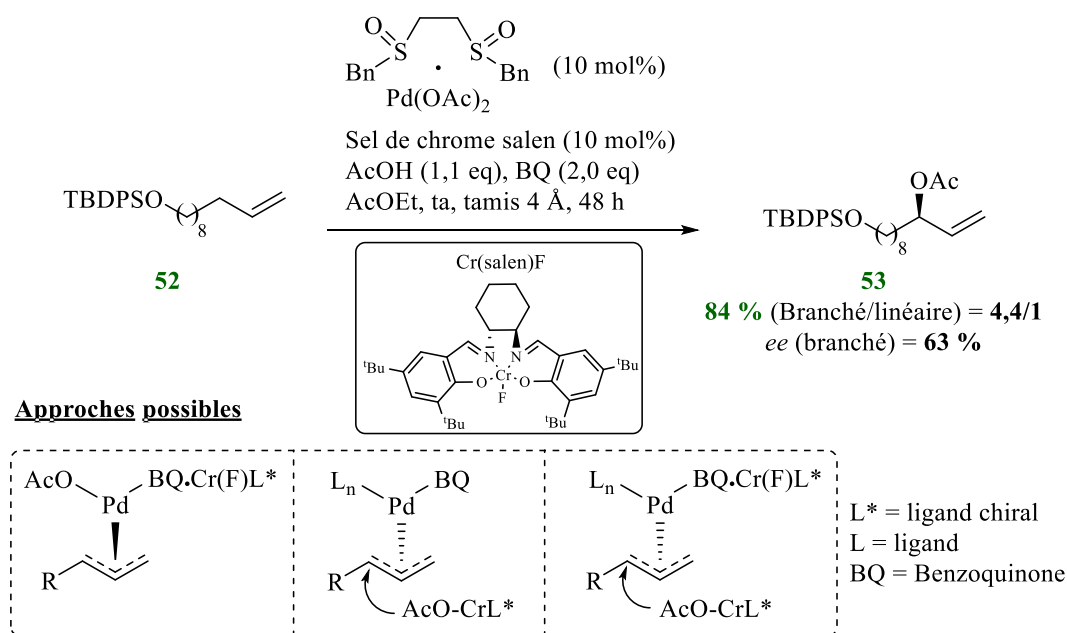


Schéma 21 : Oxydation asymétrique intermoléculaire par activation C-H allylique

Le composé **53** est obtenu à partir de l'alcène **52** dans les conditions d'oxydation par activation C-H allylique avec un rendement de 84 %, une régiosélectivité branchée majoritaire et une énantiosélectivité. Plusieurs scénarios mécanistiques ont été avancés. Le premier est que les sels de chrome se coordonnent à la benzoquinone pour promouvoir et contrôler la sélectivité faciale de l'élimination réductrice de l'acétate à partir du complexe $\eta^3 \text{Pd-}\pi\text{-allyle(BQ)OAc}$. La deuxième possibilité est l'addition de l'acétate sur le complexe $\eta^3 \text{Pd-}\pi\text{-allyle(BQ)L}_n$ avec l'intermédiaire [(salen)Cr-OAc]. La dernière possibilité est l'activation du complexe $\eta^3 \text{Pd-}\pi\text{-allyle(BQ)L}_n$ avec le sel de chrome suivi de l'ajout de l'acétate à partir de l'intermédiaire [(salen)Cr-OAc].

Un autre point important d'une réaction d'activation C-H est la réoxydation du métal, qui ferme la boucle catalytique. Il existe beaucoup de ligands différents capables de réoxyder le Pd(0) en Pd(II).^{35a,46} Les conditions en présence de dioxygène (*aerobic conditions* en anglais) sont très utilisées pour la réoxydation du palladium. L'avantage de ces conditions est que le dioxygène est une molécule verte à faible coût avec la libération d'une molécule d'eau comme sous-produit. Cependant, l'inconvénient de son utilisation est que même si son potentiel rédox $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ est thermodynamiquement favorable pour régénérer le Pd(II) à partir du Pd(0), sa cinétique est très lente et donne la possibilité à d'autres

⁴⁵ Covell, D.J.; White, M.C. A chiral lewis acid strategy for enantioselective allylic C-H oxidation *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *47*, 1-5.

⁴⁶ (a) Wang, D.; Weinstein, A.B.; White, P.B.; Stahl, S.S. Ligand-promoted palladium-catalyzed aerobic oxidation reactions *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2636-2679; (b) Campbell, A.N.; Stahl, S.S. Overcoming the 'oxidant problem': strategies to use O_2 as the oxidant in organometallic C-H oxidation reactions catalyzed by Pd (and Cu) *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 851-863.

sous-réactions telles que l'agrégation du Pd(0). Ce problème peut être résolu par différents points : (i) une forte pression de dioxygène et/ou de températures, (ii) l'utilisation de ligands particuliers qui rendent l'étape rédox plus appropriée, ou (iii) l'utilisation catalytique de ce l'on appelle un *ETMs* (*Electron transfer mediators* en anglais) qui est souvent un autre métal capable de s'insérer entre le Pd(0) et l'O₂ et qui diminue l'écart énergétique (*energetic span* en anglais) pour cette transformation. D'autres composés tels que les quinones sont capables de réoxyder le palladium et c'est souvent le cas avec le système Pd(OAc)₂/Benzoquinone. Les deux mécanismes ci-dessous montrent comment le palladium est réoxydé par cette étape finale du cycle catalytique parfois considérée comme l'étape limitante (Schéma 22).^{35a}

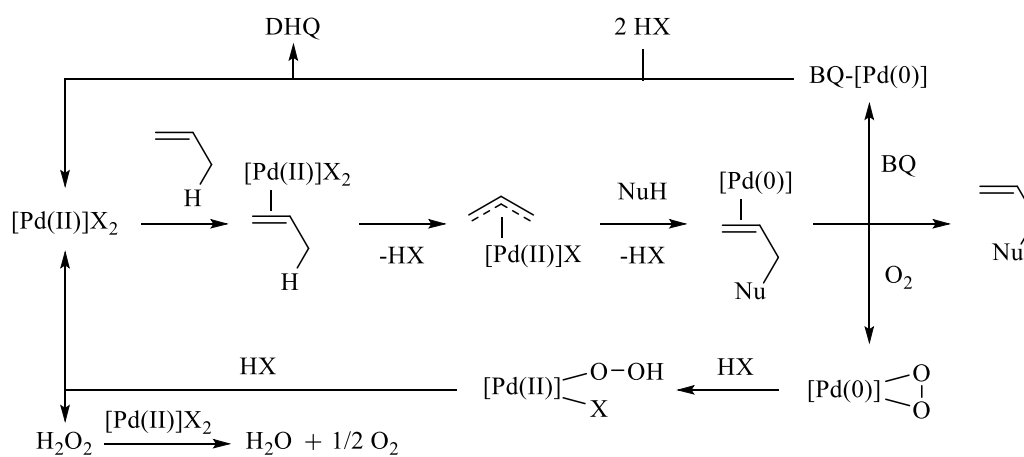
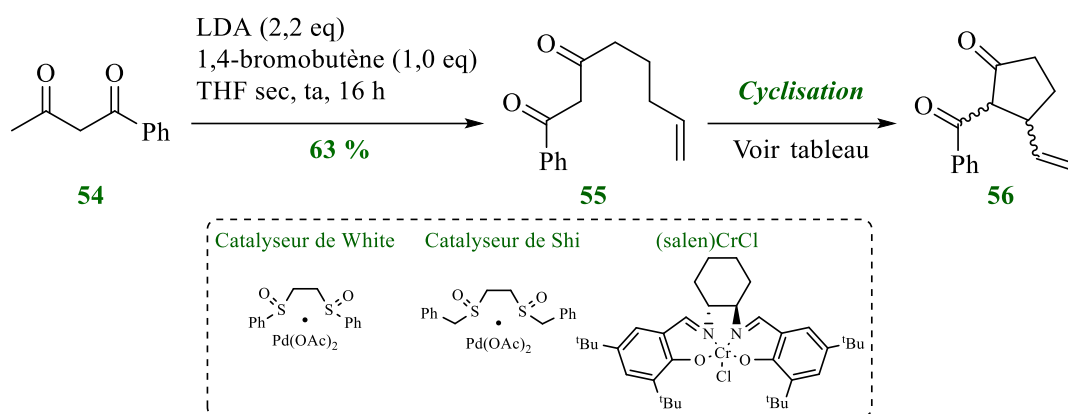


Schéma 22 : Mécanismes de réoxydation du Pd(0) en Pd(II) après l'activation C-H allylique

3. Application de l'activation C-H allylique au laboratoire

Dans un premier temps, nous avons commencé à explorer les essais de cyclisation avec des réactifs accessibles permettant de faire une première mise au point pour la recherche des meilleures conditions expérimentales sans consommer nos précurseurs acycliques synthétisés précédemment. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Shi *et coll.* décrivant une cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée.⁴⁷ Le composé **55** a été testé ; il peut être obtenu avec un rendement de 63 % à partir du benzoyle d'acétone **54** en milieu basique. Le tableau 2 montre les essais les plus pertinents de cette cyclisation pour accéder à la cyclopentanone **56**. Chaque essai a été réalisé sur une échelle de 0,3 mmol de produit de départ à l'air ambiant. Le catalyseur de White est un catalyseur au palladium commercial tandis que le catalyseur de Shi est synthétisé au laboratoire selon la procédure décrite par les auteurs.⁴⁵

⁴⁷ Lin, S.; Song, C.-X.; Cai, G.-X.; Wang, W.-H.; Shi, Z.-J. Intra/Intermolecular direct allylic alkylation via Pd(II)-catalyzed allylic C-H activation *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12901-12903.



Entrée	Cat. (15 mol%)	Ox. (1,3 eq)	Additif	Solvant	Tps (h)	T (°C)	Rdt (%) ^a
1	Cat. White	BQ	-	PhMe	48	60	Trace
2	Cat. White	BQ	O ₂	PhMe	48	60	Trace
3	Cat. White	BQ	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	Trace
4	Cat. Shi	BQ	O ₂	PhMe	48	60	Trace
5	Cat. White	BQ ^b	[Cr] ^c	PhMe	48	60	42 %
6	Cat. White	BQ ^b	[Cr] ^c	PhMe	48	60	41 % ^d
7	Cat. White	BQ ^b	[Cr] ^c	DCE	72	60	27 %
8	Cat. Shi	BQ ^b	[Cr] ^c	PhMe	72	60	52 %
9	Cat. Shi	BQ ^b	[Cr] ^c +O ₂	PhMe ^e	72	60	47 %

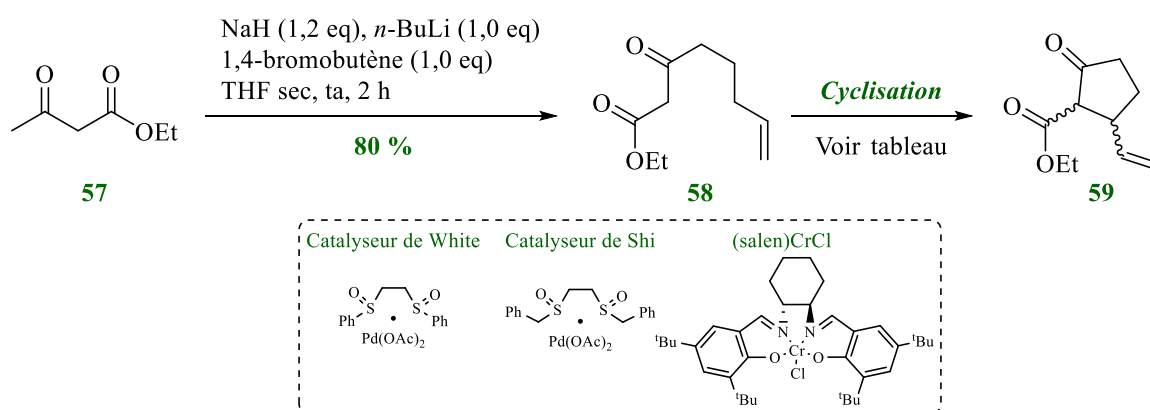
^aRdt isolé; ^b3 × 0,43 eq; ^c[Cr] = (salen)CrCl (10 mol%); ^dscale-up (0,6 mmol); ^ePhMe:AcOH 1:1

Tableau 2 : Cyclisation par activation C-H allylique

L'entrée 1 montre un essai en présence du catalyseur de White et de la benzoquinone utilisant les conditions expérimentales de la publication mais nous n'avons obtenu que des traces de produits et, même si l'on a une atmosphère de dioxygène (entrée 2).⁴⁵ L'entrée 3 a lieu dans des conditions anhydres mais la réaction ne donna que des traces de produits. L'entrée 4 utilise le catalyseur de Shi mais cela n'a pas amélioré le résultat. L'entrée 5 utilise une quantité catalytique de l'acide de Lewis (salen)CrCl ainsi que des ajouts fractionnés de benzoquinone (1^{er} ajout à t = 0 h, 2^e ajout à t = 4 h et 3^e ajout à t = 24 h). Cette fois, on a isolé le composé **56** avec un rendement de 42 %. L'entrée 6 correspond à une petite montée en échelle (0,6 mmol au lieu de 0,3 mmol) avec un rendement conservé de 41 % pour le composé **56**. L'entrée 7 utilise un autre solvant (DCE au lieu de PhMe) mais le rendement de

56 a diminué à 27 %. L'entrée 8 reprend les mêmes conditions que l'entrée 6 en changeant le catalyseur de White par le catalyseur de Shi. Ce catalyseur permet d'accéder au composé **56** avec un meilleur rendement de 52 %. Enfin, l'entrée 9 a repris les conditions de l'entrée 8 avec la présence en plus d'une atmosphère de dioxygène et d'acide acétique mais ceci ne permet pas d'augmenter le rendement. Pour résumer ce tableau 3, les conditions aérobies seules de la littérature ne montrent pas la formation du composé souhaité et même en présence d'oxydant en plus tel que la BQ. C'est avec l'utilisation d'un acide de Lewis en plus que nous avons accès au produit **56**.

En même temps que les essais du tableau 2, nous avons utilisé un autre précurseur accessible : l'ester **58**, car il est plus proche structuellement du composé β -céto ester acyclique de notre rétrosynthèse et il peut être décarboxylé (Tableau 3). Le composé **58** a été obtenu en présence de l'acétoacétate d'éthyle **57** en milieu basique avec un rendement de 80 %.⁴⁸



⁴⁸ Zhang, Y.; Jiao, J.; Flowers, R.A. Mild conversion of β -ketoesters to carboxylic acids *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 4516-4520.

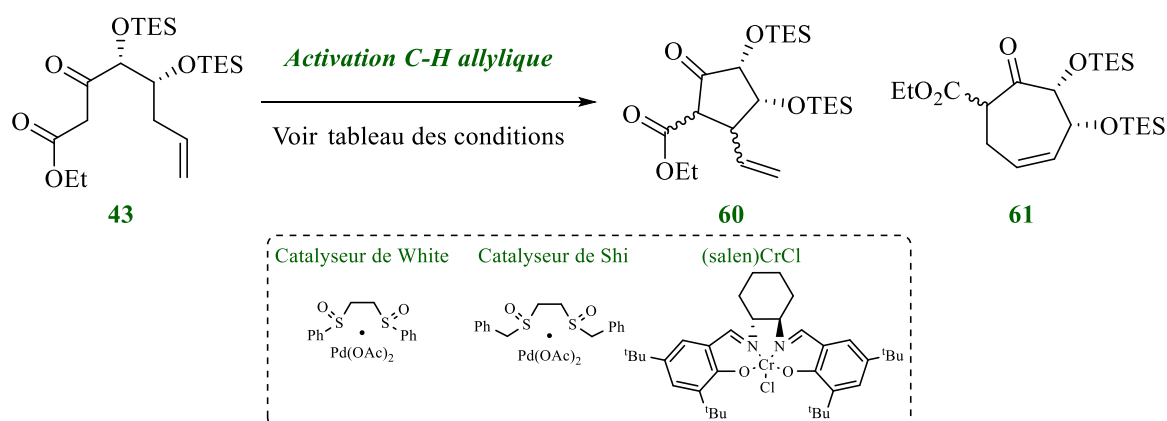
Entrée	Cat. (15 mol%)	Ox. (1,3 eq)	Additif	Solvant	Tps (h)	T (°C)	Rdt (%) ^a
1	Cat. White	BQ	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	9 %
2	Cat. White	BQ	O ₂	PhMe	48	60	3 %
3	Cat. White	BQ ^b	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	Trace
4	-	-	O ₂	PhMe _{sec}	72	60	- ^c
5	-	BQ	O ₂	PhMe _{sec}	72	60	- ^c
6	Cat. White	-	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	6 %
7	Cat. White	BQ-	-	PhMe _{sec}	48	60	15 %
8	Cat. White	Ag ₂ O (2 eq)	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	10 %
9	Cat. White	K ₂ S ₂ O ₈	O ₂	PhMe _{sec}	48	60	15 %
10	Cat. White	BQ	[Cr] ^d	PhMe	48	60	16 %
11	Cat. Shi	BQ ^e	[Cr] ^d	PhMe	48	60	34 %
12	Cat. Shi	BQ ^e	[Cr] ^d	PhMe ^f	48	60	14 %
13	Cat. Shi	BQ ^e	Cu(OAc) ₂ ^g	PhMe ^f	48	60	Trace
^a Rdt isolé; ^b 2 eq; ^c Dégradation; ^d [Cr] = (salen)CrCl (10 mol%); ^e 3 x 0,43 eq; ^f PhMe:AcOH 1:1; ^g 1 eq							

Tableau 3 : Tentatives de cyclisation par activation C-H allylique

L'entrée 1 montre que le produit **59** a été obtenu avec un rendement de 9 % en utilisant le système White/BQ/O₂. L'entrée 2 montre une petite diminution du rendement en milieu non anhydre. L'entrée 3 utilise un excès plus important de benzoquinone (2 eq) mais cela n'était pas favorable puisque nous n'avons observé que des traces de produit. Les entrées 4 et 5 montrent la stabilité du produit de départ en présence de dioxygène et de la benzoquinone dans le milieu. On a observé que le composé **58** se dégrade après 72 h car il y a 40 % de perte du composé **58** et 50 % de perte avec la benzoquinone en plus. L'entrée 6 utilise des conditions aérobies sans benzoquinone et on a obtenu un rendement de 6 %. A l'inverse, l'entrée 7 se fait en présence de benzoquinone et en absence de dioxygène et on a observé un rendement de 15 % du composé **59**. Ceci montre que la benzoquinone réoxyde mieux le palladium que le dioxygène. Les entrées 8 et 9 utilisent des conditions avec un oxydant différent de la benzoquinone : les sels d'Ag₂O et de K₂S₂O₈. Les tests ont fonctionné mais pas avec un meilleur

rendement. L'entrée 10 reprend les conditions avec l'acide de Lewis (salen)CrCl qui s'est déjà montré efficace (Tableau 2) et on a obtenu un rendement de 16 %. Ce rendement est amélioré à 34 % lorsque la benzoquinone est ajoutée par plusieurs portions à différents temps de réaction (entrée 11). L'entrée 12 s'effectue avec la présence d'acide acétique mais ce dernier a diminué le rendement à 14 %. L'entrée 13 utilisent le Cu(OAc)₂ à la place la benzoquinone comme oxydant en tant que système catalytique en duo mais l'essai n'a pas fonctionné. En résumé, l'entrée 11 permet d'accéder au composé **59** avec le meilleur rendement de 34 %.

A présent, nous pouvons appliquer les conditions expérimentales de la cyclisation que nous avons obtenues au précurseur **43** synthétisé précédemment par nos soins (Tableau 4).



Entrée	Cat. (15 mol%)	Ox. (1,3 eq)	Additif	Solvant	Tps (h)	T (°C)	Rdt (%) ^a
1	Cat. White	BQ ^b	[Cr] ^c	PhMe	72	60	10 % 60 9 % 61
2	Cat. Shi	BQ ^b	[Cr] ^c	PhMe	72	60	16 % 60 20 % 61
^a Rendement isolé; ^b 3 × 0,43 eq; ^c (salen)CrCl (10 mol%)							

Tableau 4 : Tentatives de cyclisation par activation C-H allylique du composé **43**

L'entrée 1 utilise le système catalytique Cat. White/BQ/(salen)CrCl et a montré que nous obtenons deux produits cyclisés : le produit branché **60** et le produit linéaire **61** avec un rendement respectif de 10 % et de 9 %. L'entrée 2 utilise le catalyseur de Shi à la place de celui de White et a montré un rendement amélioré avec 16 % pour le composé **60** et 20 % pour le composé **61**.

En résumé, le résultat avec le composé **43** montre que nous pouvons cycliser par activation C-H allylique. Cependant, ces conditions qui au départ étaient décrites comme des conditions prouvant une régiosélectivité branchée, ne sont ici pas vérifiées puisque le ratio entre les deux régioisomères **60** (cycle à 5 chaînons) et **61** (cycle à 7 chaînons) est d'environ 1 pour 1 si l'on arrondit. L'emploi d'un

acide de Lewis semble tout de même essentiel pour cette cyclisation. Les tentatives de cyclisation avec les autres β -céto ester acycliques **34** et **40** n'ont pas été réalisées par manque de temps.

C. Conclusion

Dans cette première partie du chapitre, l'élaboration de la nouvelle voie de synthèse des carbanucléosides par une méthodologie de cyclisation par CH allylique pallado-catalysée n'a pas abouti. La première étape qui consistait à synthétiser les précurseurs β -céto ester acyclique *O*-substitués a été réalisée avec succès, permettant l'obtention en quatre étapes du dérivé **43** avec un rendement global de 17 %. La deuxième étape qui est la cyclisation clé par activation C-H allylique reste encore à optimiser en dépit de quelques résultats encourageants, notamment avec les composés **34** et **40**. Pour avancer vers l'obtention d'analogues carbanucléosides ciblant les Mur Ligases, nous avons alors suivi une approche « plus conventionnelle » utilisant la cyclopenténone **8**.

VI Rétrosynthèse pour les molécules de la chimiothèque par la stratégie connue

La rétrosynthèse rendant compte du composé souhaité **2** se base sur la réaction clé de métathèse croisée entre l'alcène terminal **A** contenant le diester 3,5-phénylique de méthyle et l'alcène carbanucléosidique **B** obtenu (Schéma 23). L'alcène **A** est un analogue de certains intermédiaires que nous avons déjà synthétisés. Il peut donc facilement être obtenu à partir l'alcool primaire en réalisant une oxydation suivie d'une réaction de Wittig pour former la double liaison. Le synthon **B** quant à lui, est obtenu par une approche convergente à partir de la réaction de Mitsunobu entre l'uracile protégée en position *N*-3 et la cyclopentanone **C**, préalablement réduite en alcool. Ce dernier est obtenu par une addition 1,4 en présence de la cyclopenténone **8** qui est obtenu à partir de voies de synthèse multi-étapes. En effet, une métathèse clé cyclisante permet la formation du cycle cyclopenténone. A partir du D-ribose ou de l' α -D-mannopyranoside commerciaux, deux voies de synthèses ont été réalisées et donné accès au dérivé **8**.

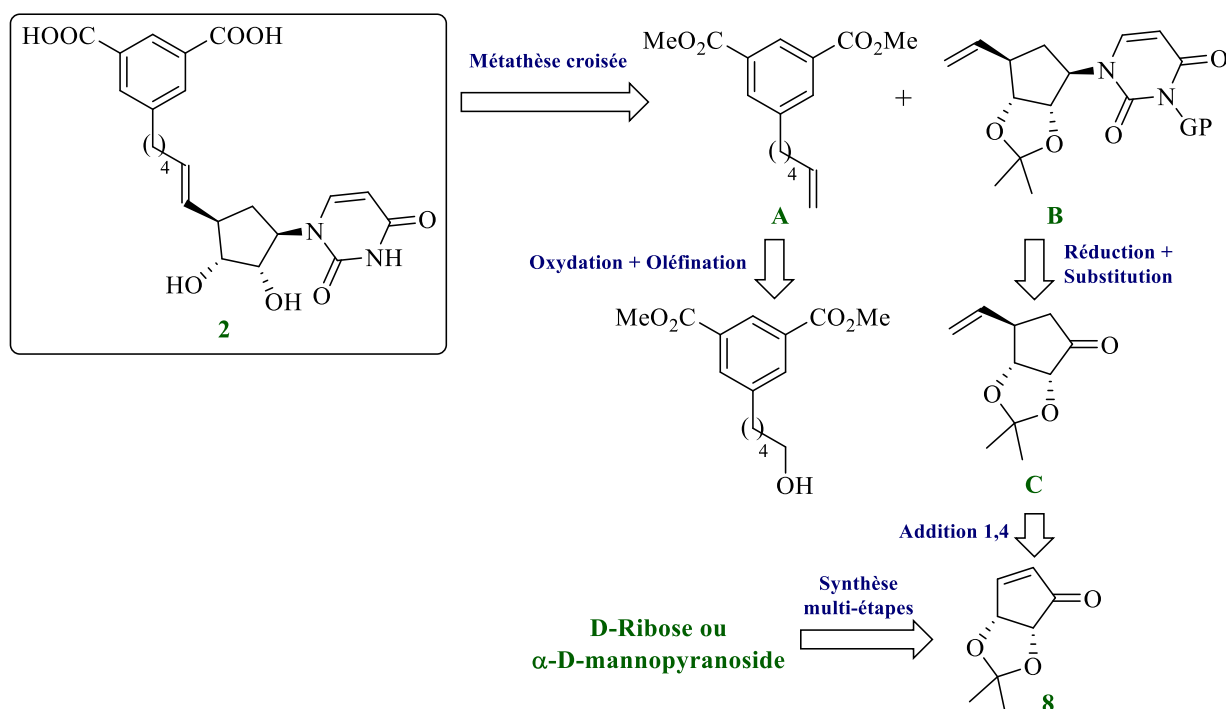


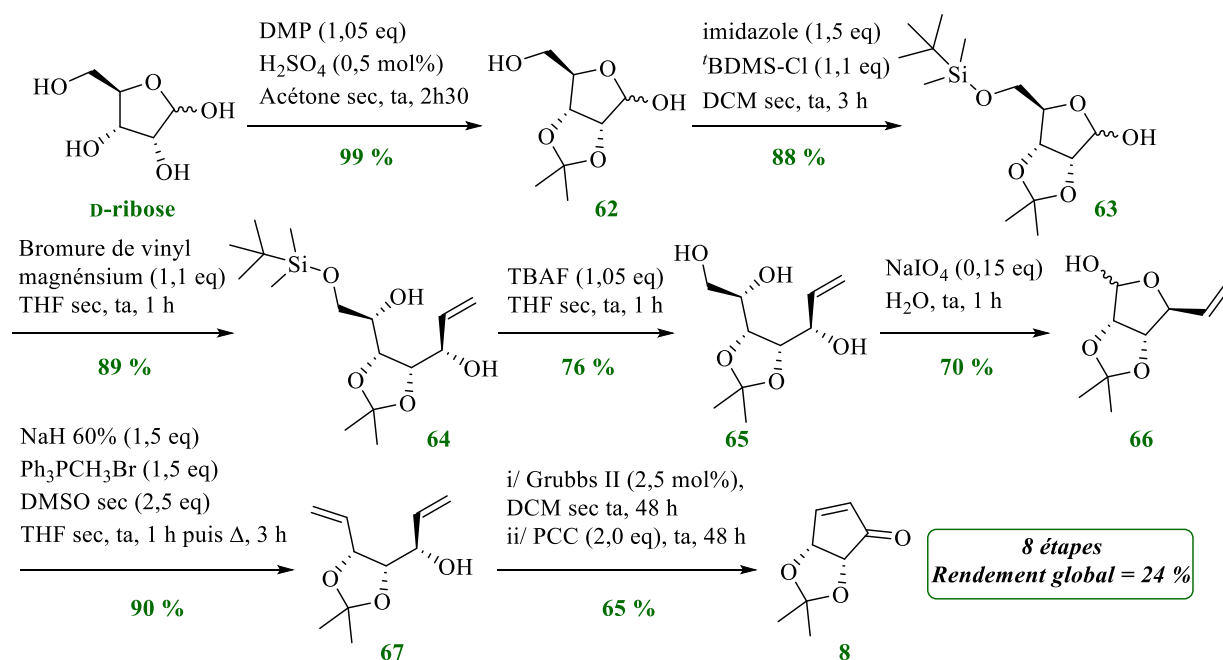
Schéma 23 : Rétrosynthèse du composé 2

VII Synthèse du composé 2 visant les Mur Ligases

A. La synthèse du cyclopentyl vinylique

La synthèse du carbanucléoside se fait dans un premier temps avec la synthèse de l'intermédiaire cyclopenténone **8**. Cette stratégie est basée sur l'approche convergente avec la métathèse qui permet de former le cycle à cinq chaînons (Schéma 24).⁴⁹ Partant du D-ribose, on a réalisé la protection des alcools secondaires sous forme d'un isopropylidène **62** avec un rendement de 99 %. La protection sous forme d'un éther silylé de l'alcool primaire a conduit à l'alcool **63** avec un rendement de 88 %. L'addition du groupement vinylique sur l'aldéhyde de la forme ouverte du composé **63** a permis l'obtention du composé **64** avec un rendement de 89 %. La déprotection de l'alcool primaire a donné le triol **65** avec un rendement de 76 %. La suite de la synthèse implique la formation de l'aldéhyde par clivage oxydant du diol, qui se cyclise en **66** avec un rendement de 70 %. Une réaction de Wittig conduit au dérivé **67** avec un rendement de 90 % en présence d'ylure méthylique de triphényl-phosphonium. Enfin, la dernière réaction consiste à réaliser une double étape en *one-pot* avec l'étape clé de métathèse cyclisante suivie d'une oxydation en présence de sels de chromes pour conduire au cyclopenténone **8** avec un rendement de 65 %.

⁴⁹ Jin, Y.H.; Liu, P.; Wang, J.; Baker, R.; Huggins, J.; Chu, C.K. Practical synthesis of D- and L-2-cyclopentenone and their utility for the synthesis of carbocyclic antiviral nucleosides against orthopox viruses (Smallpox, Monkeypox, and cowpox virus) *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 9012-9018.



Cette synthèse permet d'obtenir le dérivé **8** avec un rendement de 24 % à partir du ribose en huit étapes. Dans la littérature, on retrouve une voie de synthèse optimisée par le Professeur Tanaka et coll. qui est aussi basée sur la métathèse cyclisante d'oléfines (Schéma 25).⁵⁰ Partant du composé pyranoside de départ **68**, nous avons réalisé une double réaction *one-pot* avec une étape d'halogénéation par le diiode de l'alcool primaire suivi d'une protection par un *isopropylidène* des alcools secondaires. Le composé **69** a été isolé avec un rendement de 72 % en deux étapes. Une étape de contraction de cycle en présence de zinc solide nous a permis d'obtenir le composé **66** avec un rendement de 99 %. La suite de la synthèse est ensuite similaire à ce que l'on a déjà réalisé avec la réaction de Wittig suivie de la métathèse et enfin l'oxydation pour finir avec la cyclopenténone **8**. Nous avons réalisé une réaction d'addition 1,4 stéréosélective catalysée au cuivre pour obtenir le composé **70** avec un rendement de 74 % suivi de la formation du composé **71** par une réduction stéréosélective en présence de sels d'hydruure d'aluminium avec un rendement de 96 %. L'utilisation du cuivre lors de l'addition en 1,4 sur la cétone α,β insaturée permet de former un cuprate vinylique.⁵¹ La cétone est alors réduite de manière stéréocontrôlée par chélation de l'aluminium avec les atomes d'oxygène de l'*isopropylidène*. Ceci donne donc majoritairement le composé en α . Les traces de sous-produit β sont éliminées par la purification sur colonne flash en phase normale. L'inversion de configuration du carbone a été confirmé par NOESY (*Nuclear overhauser effect spectroscopy* en anglais) où les protons

⁵⁰ Kumamoto, H.; Deguchi, K.; Wagata, T.; Furuya, Y.; Odanaka, Y.; Kitade, Y.; Tanaka, H. Radical-mediated stannylation of vinyl sulfones: access to novel 4'-modified neplanocin A analogues *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8007-8013.

⁵¹ (a) Johnson, C.R.; Chen, Y.-F. Development of a triply convergent aldol approach to prostanoids *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3344-3351; (b) Yang, M.; Ye, W.; Schneller, S.W. Preparation of carbocyclic S-adenosylazamethionine accompanied by a practical synthesis of (-)-Aristeromycin *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3993-3996.

H₁-H₂ corrélient bien pour l'isomère α , ce qui n'est pas possible pour le sous-produit β .⁵² Cette voie de synthèse optimisée permet d'avoir un rendement du dérivé **8** plus élevé avec 42 % en six étapes à partir du sucre **68** de départ et un rendement global de 30 % pour le cyclopentyl vinylique **71**.

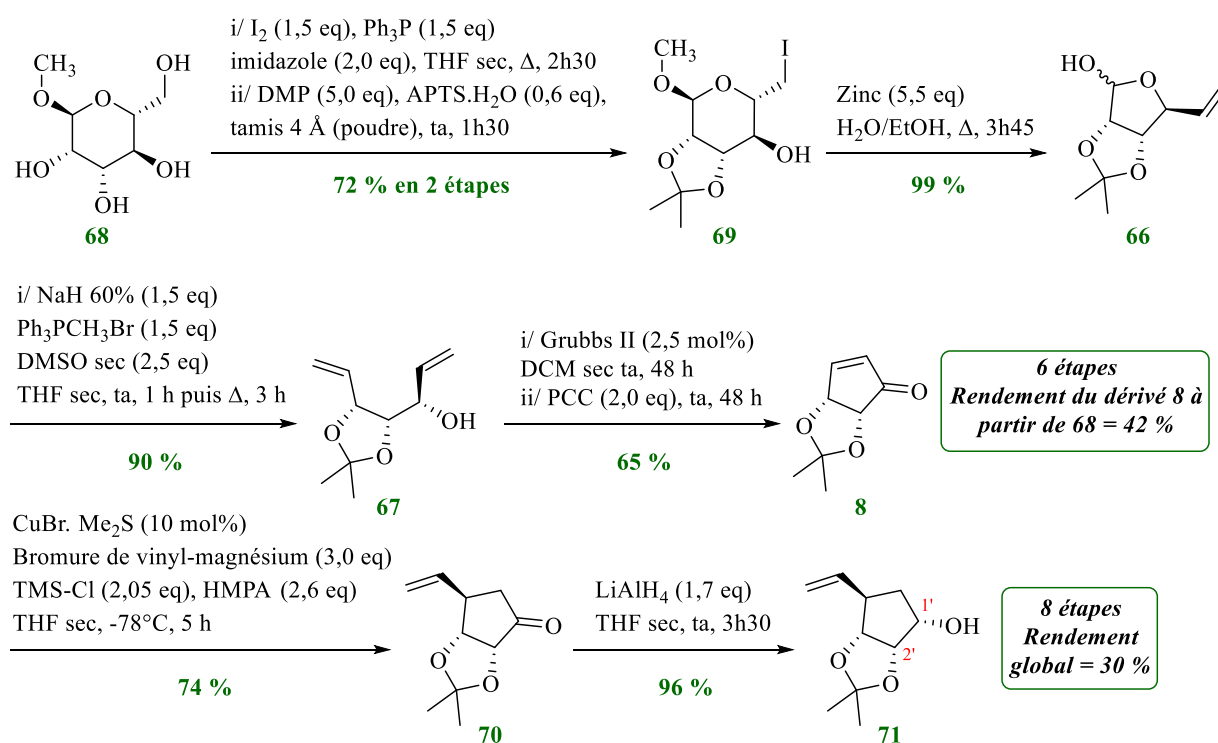


Schéma 25 : Autre préparation du composé **8**⁴⁸ et synthèse du cyclopentyl vinylique **71**

B. La synthèse du carbanucléoside

L'introduction de l'uracile a été effectuée sur **71** dans des conditions de Mitsunobu. Il est nécessaire de protéger l'azote en position N₃ afin de ne pas obtenir un mélange de composés substitués en position N₁ et N₃ (Schéma 26).⁵³ Le premier essai réalisé entre **71** et **72** dans les conditions de la littérature n'a malheureusement pas montré de conversion du produit de départ à température ambiante ni au bout de 72 heures.⁵⁴ Le mélange réactionnel a par la suite été chauffé à reflux du solvant pendant 24 heures. Dans ce cas, nous avons observé par CCM la disparition du produit de départ **71** et la formation de nombreux nouveaux produits, compliquant ainsi la purification sur colonne de silice en phase normale.

⁵² Pradere, U. Synthèse métallo-catalysée d'analogues de nucleosides et d'oxazolo[4,5-d]pyrimidines à visée thérapeutique *Thèse de doctorat en chimie*, dirigé par Agrofiglio, L.A.; Université d'Orléans, **2009**.

⁵³ Frieden, M.; Giraud, M.; Reese, C.B.; Song, Q. Synthesis of 1-[cis-3-(hydroxymethyl)cyclobutyl]-uracil, -thymidine and -cytosine *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1* **1998**, 2827-2832.

⁵⁴ Song, G.Y.; Paul, V.; Choo, H.; Morrey, J.; Sidwell, R.W.; Schinazi, R.F.; Chu, C.K. Enantiomeric synthesis of D- and L-cyclopentenyl nucleosides and their antiviral activity against HIV and West Nile virus *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3985-3993.

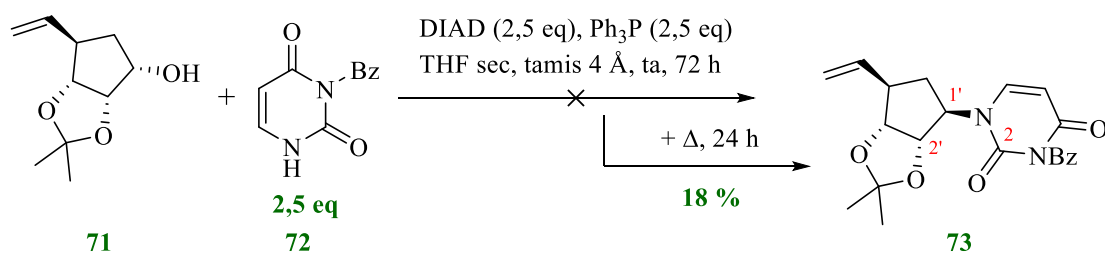


Schéma 26 : Préparation du composé 73

Après deux colonnes chromatographiques complexes en utilisant des éluants orthogonaux, nous avons obtenu le composé **73** pur avec un rendement de 18 %. L'analyse RMN montre bien que nous avons le bon produit souhaité et l'analyse 2D HMBC confirme que nous avons créé une liaison carbone-azote et non une liaison carbone-oxygène car il n'existe pas de corrélation entre le carbone 2 de la base et le proton 1' du cyclopentane. De plus, l'analyse NOESY montre bien l'inversion de configuration du carbone 1' puisque le couplage entre les protons H_{1'} et H_{2'} n'est pas observable tandis qu'il est, au contraire, visible pour le composé **71**. Pour optimiser cette réaction, nous avons réalisé d'autres essais (Tableau 5).

Entrée	72 (eq)	DIAD (eq)	Ph ₃ P (eq)	Solvant	T (°C)	Tps (h)	Chauffage	Rdt
1	2,5 ^c	2,5	2,5	DMF	100	72	classique	- ^a
2	2,5 ^c	2,5	2,5	THF	55	72	ultrasons	- ^b
3	3,5 ^c	2,5	2,5	THF	Δ	72	classique	- ^a
4	2,0 ^c	1,5	1,5	THF	Δ	72	classique	- ^b
5	2,5	2,5	2,5	THF	Δ	72	classique	14 %
^a trace de produits ; ^b pas de conversion ; ^c dernier réactif ajouté								

Tableau 5 : Essais de la réaction de Mitsunobu

L'entrée 1 montre un essai en changeant le solvant avec le DMF qui a permis d'augmenter la température du chauffage. On a chauffé donc à 100°C pendant 72 h. Nous n'avons pas observé la disparition totale sur plaque CCM du composé **71**. Une colonne chromatographique a tout de même été effectuée mais nous avons obtenu seulement des traces de produit souhaité en mélange avec l'excès de triphenylphosphine. L'entrée 2 montre un essai sous activation par irradiation aux ultrasons, ce qui pourrait accélérer la réaction mais nous n'avons observé aucune conversion sur CCM. L'entrée 3 montre un essai en augmentant le nombre d'équivalent de la base **72** sans changer le reste avec 3,5 équivalents mais nous n'avons réussi qu'à isoler des traces de produit souhaité. L'entrée 4 est

d'au contraire diminuer l'excès des réactifs. On a utilisé donc 2,0 équivalents de la base **72** et 1,5 équivalent de DIAD et de Ph_3P . Cependant, la réaction n'a montré aucune conversion. L'entrée 5 utilise les mêmes conditions que le tout premier essai mais en changeant l'ordre d'addition des réactifs. Dans le premier essai, le dernier réactif à être ajouté est le composé cyclopentane **71** tandis qu'avec cet essai, le dernier sera la base uracile **72**. La base uracile **72** a un pKa proche de 10 tandis que l'alcool **71** a un pKa proche de 14. Ceci pourrait favoriser la formation de l'intermédiaire phosphonium avec le DIAD. Cependant, le résultat final a été le même que pour le premier essai avec un rendement similaire de 14 %.

Après avoir effectué la réaction de Mitsunobu avec un rendement faible, on constate qu'il est plus judicieux de remplacer le groupement benzoyle en N_3 de l'uracile par un groupement Boc pour qu'il n'y ait qu'une seule étape de déprotection, puisque le Boc et l'*isopropylidène* se retire en milieu acide. Nous réalisons donc la synthèse de l'uracile N_3 -boc protégée **74** que le laboratoire a récemment développé avec un rendement de 82 % dans des conditions légèrement modifiées, suivi de la réaction de Mitsunobu pour obtenir le composé **75** avec un rendement de 22 % (Schéma 27).⁵⁵

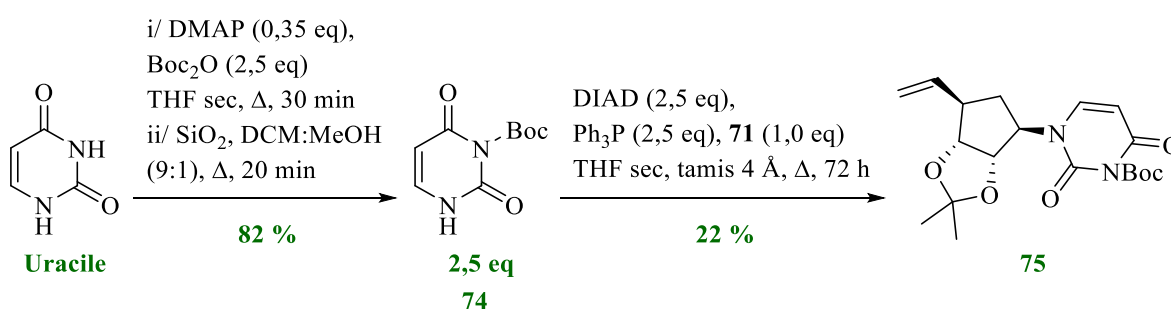


Schéma 27 : Préparation du carbanucléoside **75**

C. Synthèse de l'alcène portant le motif ester 3,5-phénylique de méthyle

La préparation du synthon **A** se fait donc en deux étapes à partir du composé alcool déjà synthétisé (voir Chapitre 2). Une étape d'oxydation par la réaction de Swern permet de former l'aldéhyde **76** sans étape de purification avec une conversion totale suivie de la formation de la double liaison par la réaction de Wittig qui donne le composé **77** souhaité avec un rendement de 83 % en deux étapes (Schéma 28).

⁵⁵ Bessières, M.; Roy, V.; Agrofoglio, L.A. A convenient, highly selective and eco-friendly *N*-Boc protection of pyrimidines under microwave irradiation *RSC Adv.* **2014**, 4, 59747-59749.

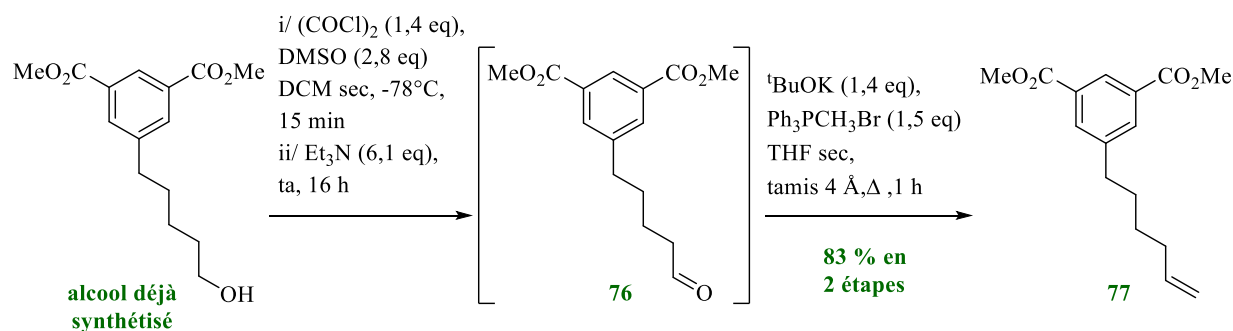


Schéma 28 : Préparation de l'alcène 77

D. La métathèse croisée d'oléfines et l'étape de déprotection

Cet outil synthétique très puissant qu'est la métathèse croisée d'oléfines mène à la formation de liaisons C-C et permet dans notre approche convergente d'assembler le carbanucléoside **75** et l'alcène **77** selon le mécanisme réactionnel suivant (Schéma 29).

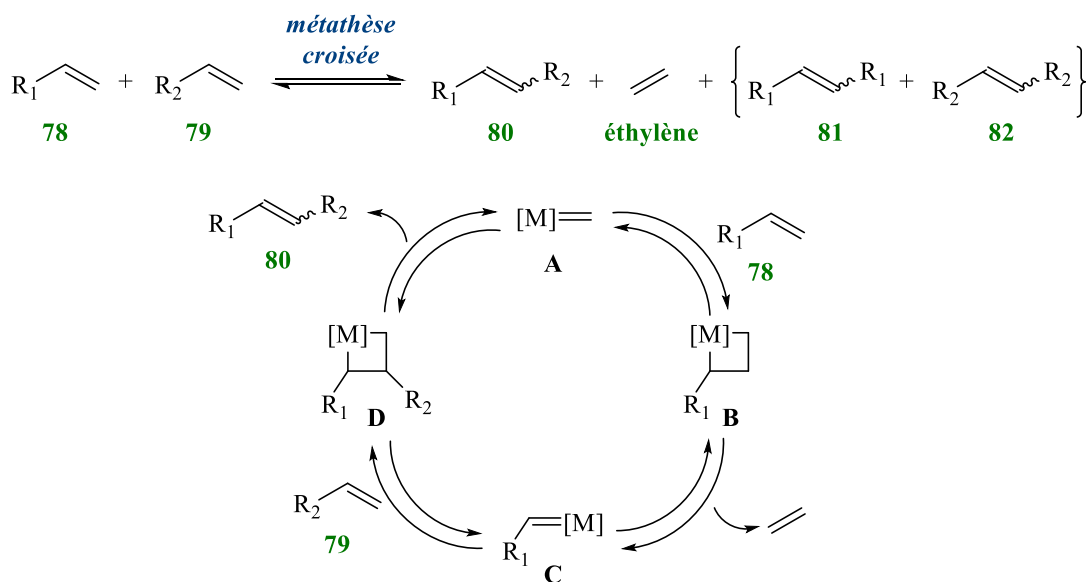


Schéma 29 : Mécanisme de la métathèse croisée

Le mécanisme général de cette métathèse croisée commence par la coordination du métal **A** avec le substrat **78** vers la formation du métallocyclobutane **B**. Ce cycle à quatre chaînons va se réarranger et libérer de l'éthylène. Ce carbène **C** formé va se coordonner avec le deuxième substrat **79** pour former le second métallocyclobutane **D**, qui après réarrangement libère l'oléfine d'intérêt **80**. Cette métathèse permet également la formation d'autres produits homodimériques tels que les oléfines **81** et **82**. L'une des contraintes majeures de cette réaction réside dans l'équilibre entre l'hétérodimère souhaité et les homodimères possibles où l'enjeu principal est de faire basculer cet équilibre vers l'hétérodimère. La recherche du meilleur métal de transition a fait l'objet de nombreuses études pour

catalyser cette réaction de métathèse croisée.⁵⁶ En effet, l'équilibre hétéromère/homodimère va dépendre de la réactivité des oléfines envers le catalyseur employé. Les travaux de Grubbs et de ses collaborateurs ont permis de proposer un classement empirique de réactivité suivant la nature des substrats en fonction du catalyseur auquel il est associé.⁵⁷ Le tableau 6 suivant montre les règles générales de sélectivité selon la nature des deux oléfines utilisées. Les types d'oléfines sont catégorisés du type I vers le type IV (du plus au moins réactif) en fonction du nombre de substitutions sur l'oléfine ainsi que la nature de la substitution.

	Type I	Type II	Type III	Type IV
Type I	Statistique	Sélective	Sélective	Pas de réaction
Type II	Sélective	Non sélective	Sélective	Pas de réaction
Type III	Sélective	Sélective	Non sélective	Pas de réaction
Type IV	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction
Homodimérisation rapide (Type I), lente (Type II) et pas possible (Type III et Type IV)				

Tableau 6 : Règles générales de sélectivité d'après Grubbs et coll.⁵⁷

A noter que ce tableau se base sur des données expérimentales et non théoriques. Il est donc possible d'observer des variations de sélectivité selon la nature des substitutions des oléfines (groupement encombrant, fonction chimique diverses...). La métathèse croisée entre des oléfines de type I/II et de type I/III ont montré qu'elle était réalisable.⁵⁸ Dans notre cas, l'oléfine **77** de type I avec l'oléfine **75** supposé de type III est donc possible. Au laboratoire, nous avons accès à plusieurs méthodologies de synthèses pour réaliser une métathèse croisée.⁵⁹ Nous avons choisi une méthode qui fonctionne généralement bien avec un couple d'oléfines de type I/III en présence de catalyseur au ruthénium d'Hoveyda-Grubbs de seconde génération avec l'alcène de type I en excès en utilisant une activation sous ultrasons (Schéma 30). Notre choix de catalyseur s'est porté sur celui d'Hoveyda-Grubbs car il

⁵⁶ Vougioukalakis, G.C.; Grubbs, R.H. Ruthenium-based heterocyclic carbene-coordinated olefin metathesis catalyst *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1746-1787.

⁵⁷ Chatterjee, A.K.; Choi, T.-L.; Sanders, D.P.; Grubbs, R.H. A general model for selectivity in olefin cross metathesis *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360-11370.

⁵⁸ Bessières, M. Synthèse métallo-catalysée de phosphonates *trans*-but-2'-ényl de nucléosides sous forme prodrogue *Thèse de doctorat en chimie*, dirigé par Agrofoglio, L.A.; Roy, V. Université d'Orléans, **2016**.

⁵⁹ (a) Bessières, M.; Hervin, V.; Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohier, J.-F.; Agrofoglio, L.A. Highly convergent synthesis and antiviral activity of (*E*)-but-2-enyl nucleoside phosphonoamidates *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 678-686; (b) Chevrier, F.; Chamas, Z.; Lequeux, T.; Pfund, E.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Roy, V.; Agrofoglio, L.A. Synthesis of 5,5-difluoro-5-phosphonopent-2-en-1-yl nucleosides as potential antiviral agents *RSC Adv.* **2017**, *7*, 32282-32287; (c) Bessières, M.; Sari, O.; Roy, V.; Warszycki, D.; Bojarski, A.J.; Nolan, S.P.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Schinazi, R.F.; Agrofoglio, L.A. Sonication-assisted synthesis of (*E*)-2-methyl-but-2-enyl nucleoside phosphonate prodrugs *Chem. Select* **2016**, *1*, 3108-3113.

possède un groupement chélatant *ortho*-isopropoxy attaché au cycle phénylique qui permet de faciliter le passage de l'espèce de 16 électrons vers l'espèce active à 14 électrons qui rend ce catalyseur très réactif. Son ajout a été effectué en plusieurs portions à différents temps de réaction car il se dégrade un peu avec le temps sous l'effet des ultrasons. L'excès d'un des réactifs est important car il permet de favoriser la formation de l'hétéromère voulu. Nous avons choisi de mettre en excès l'oléfine de type I qui va rapidement s'homodimériser et permettre d'augmenter la proportion de l'hétérodimère. Le choix du mode d'activation s'est porté sur l'irradiation sous ultrasons.⁵⁹

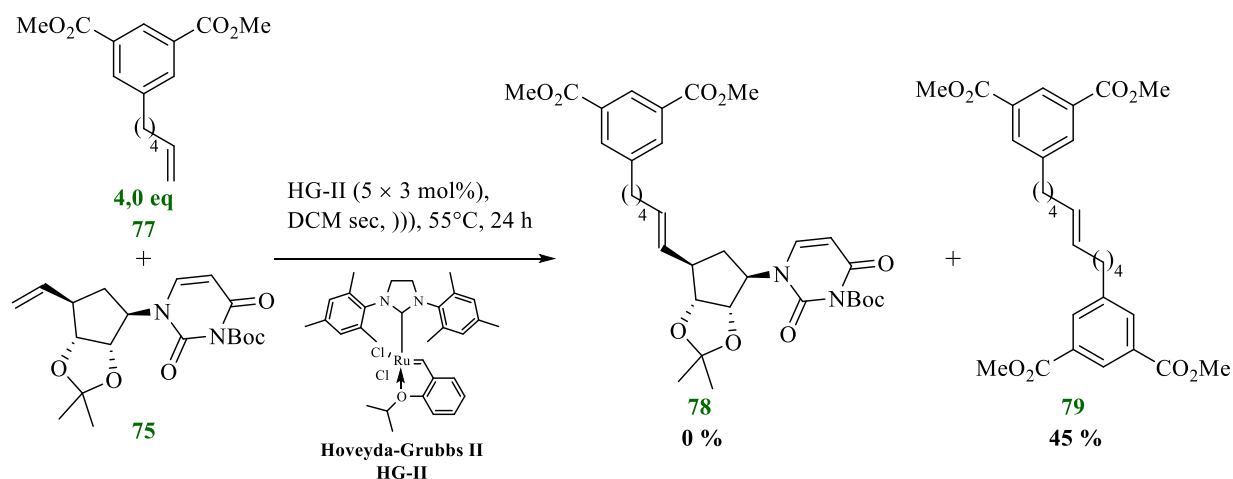


Schéma 30 : Métathèse croisée avec l'oléfine 77 et l'oléfine 75

Ce premier essai montre que nous n'avons pas obtenu la formation de l'hétérodimère souhaité **78** mais plutôt de l'homodimère **79** avec un rendement isolé de 45 %. L'activation sous ultrasons combinée à un excès d'équivalent de l'oléfine **77** de type I nous a permis de former l'homodimère **79**. Cependant, ce dernier ne semble pas réagir avec l'oléfine **75** présent dans le milieu. De plus, l'excès de l'alcène **77** est diminué ce qui ne favorise pas la réaction vers la formation de l'hétérodimère **78**. En revanche, nous n'avons pas observé la formation de l'homodimère du carbanucléosides **75** durant cet essai, ce qui montre bien qu'il s'agit plutôt d'une oléfine de type III. Nous avons réalisé un second essai avec cette fois une autre approche. Pour favoriser la formation vers l'hétérodimère **78**, nous avons utilisé un équivalent de l'oléfine carbanucléosidique **75** en présence de 0,1 équivalent de l'oléfine **77** afin d'obtenir un ratio 10:1 (Schéma 31). Statistiquement, ces conditions poussent l'oléfine carbanucléosidique **75** à réagir avec l'oléfine **77**. Au fur et à mesure que l'alcène **77** se consomme (disparition du produit de départ sur CCM), nous ajoutons 0,1 équivalent de l'alcène **77** jusqu'à avoir atteint un équivalent. Dans ce cas précis, la réaction a été réalisée sur plusieurs jours en observant la formation progressive de l'hétérodimère **78** avec l'absence d'homodimère **79**. A noter qu'après 5 jours de réaction, nous n'avons plus observé d'évolution sur CCM et toujours la présence des réactifs de départ **75** et **77**. Lors des étapes de purifications, nous avons réalisé deux colonnes chromatographiques sur silice en phase normale avec deux systèmes d'éluant orthogonaux. On a

obtenu un rendement brut de 29 % car la pureté n'est pas suffisante pour réaliser les caractérisations complètes du composé. Après déprotection au TFA:H₂O, le carbanucléoside déprotégé **8o** pur a été isolé avec un rendement de 62 %.

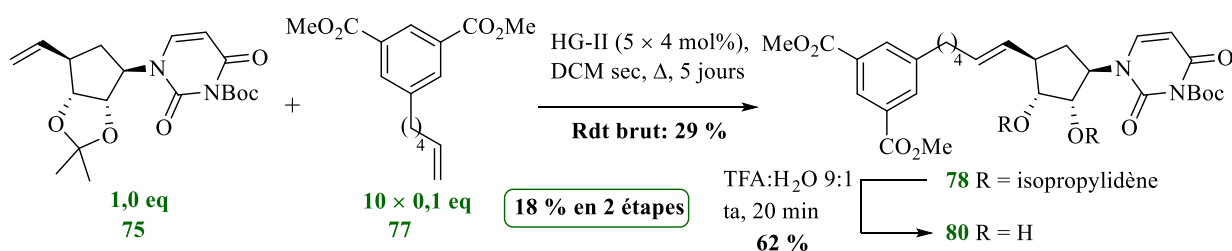


Schéma 31 : Métathèse croisée suivie de la déprotection

Ces conditions expérimentales sont assez fastidieuses mais elles permettent d'isoler le produit **8o** attendu. Nous pouvons confirmer qu'il s'agit bien de l'isomère (*E*) car nous observons sur le spectre RMN une constante de couplage entre les deux protons alcènes de $J = 13,5$ Hz, typique d'une constante de couplage en *trans*, ce qui signifie bien que c'est l'isomère (*E*). Pour l'isomère (*Z*), la constante de couplage est en *cis* avec un J entre 5 et 12 Hz. De plus, le spectre infrarouge (IR) confirme également ce résultat par la présence d'une bande faible à 968 cm^{-1} , typique d'une vibration de déformation de la liaison *trans* « =C-H » d'un système R-CH=CH-R'. Pour un système R-CH=CH-R' *cis*, la vibration de la liaison « =C-H » se situe entre 675 et 730 cm^{-1} . Nous n'avons pu réaliser d'autres essais au laboratoire par manque de temps mais il est tout à fait possible d'envisager d'autres tentatives. En modifiant le catalyseur, le ratio ou encore le type de double liaison.

Après avoir formé le carbanucléoside **8o**, nous avons réalisé la dernière étape de synthèse qui est la saponification et acidification des groupements esters pour donner le composé final **2** avec un rendement de 41 % (Schéma 32).

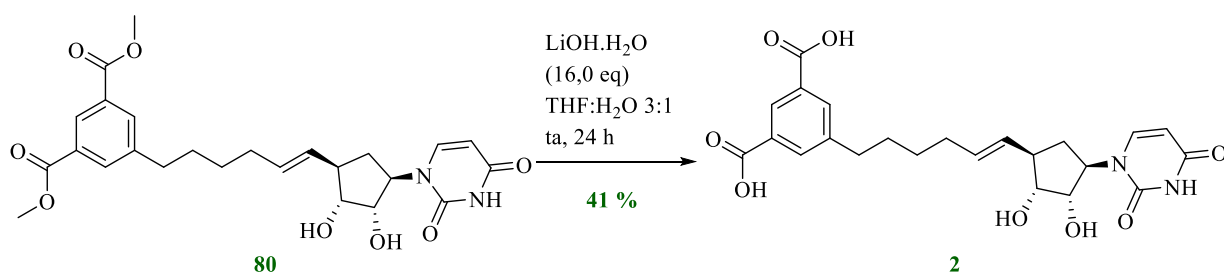


Schéma 32 : Préparation du carbanucléoside final **2**

E. Conclusion

Pour conclure cette deuxième partie, nous avons réalisé avec succès la synthèse d'un analogue carbanucléosidique visant les Mur Ligases: le composé **2** souhaité a été isolé avec un minimum de douze étapes réactionnelles. Les essais biologiques du composé **8o** et du composé **2** sur les Mur Ligases sont en cours.

V Conclusions

Pour conclure ce chapitre, nous avons exploré dans un premier temps une nouvelle voie de synthèse innovante donnant accès au cyclopentanone vinylique : un précurseur essentiel dans la synthèse des carbanucléosides. Cependant, cette approche synthétique n'a pu aboutir et nécessiterait des travaux de méthodologie. Le rendement faible de cyclisation est la principale limitation ainsi que la perte de régiosélectivité comme c'est le cas avec la formation des β -céto ester cyclique à 5 et à 7 chaînons. Les récents travaux de Shi ou White ont montré que ce type de cyclisation est rendu possible en présence d'acide de Lewis à base de sels de chromes en présence de benzoquinone avec un rendement faible. De même, le système catalytique coopératif en duo avec le palladium(II)/cuivre(II) n'a pas fonctionné mais pourrait être modifié sur le même principe avec par exemple une catalyse synergétique en présence du catalyseur de Shi et d'un intermédiaire énamine à la place du cuivre(II) (Schéma 33).⁶⁰

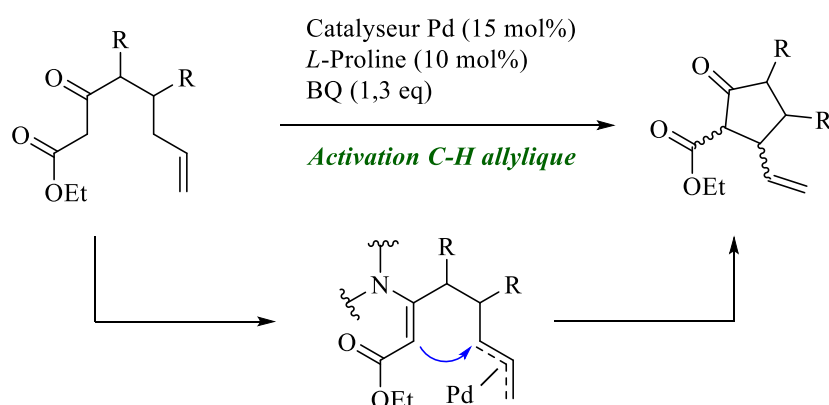


Schéma 33 : Autres tentatives possibles de cyclisation par activation C-H

Une deuxième perspective possible serait de trouver une réaction alternative (ou plusieurs) à la cyclisation par activation C-H allylique en gardant le β -céto ester acyclique en tant que produit de départ. Une autre solution avec une étape supplémentaire est de réaliser une acétylation oxydative par activation C-H allylique en présence d'acide acétique (créer une liaison C-O) suivie d'une réaction de Tsuji-trost qui permettrait de cycliser l'intermédiaire acétylé (Schéma 34).

⁶⁰ Tang, S.; Wu, X.; Liao, W.; Liu, K.; Liu, C.; Luo, S.; Lei, A. Synergistic Pd/enamine catalysis: a strategy for the C-H/C-H oxidative coupling of allylarenes with unactivated ketones *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3584-3587.

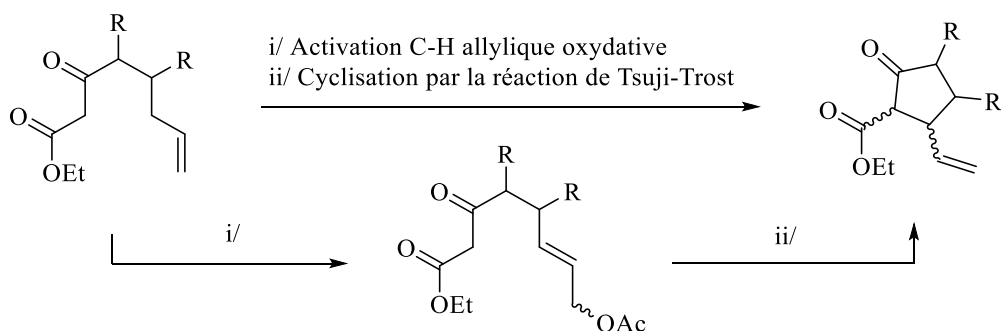


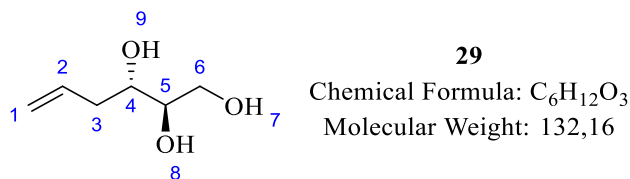
Schéma 34 : Alternative réactionnelle en deux étapes

Sur la base d'une chimie plus conventionnelle, la synthèse du nucléoside carbocyclique **2** a été réalisée avec succès et les tests biologiques permettant d'évaluer son activité sur les Mur ligases sont en cours. En parallèle, d'autres essais biologiques en complément des essais enzymatiques directement sur des souches bactériennes seront aussi envisagés afin d'évaluer son potentiel antibactérien. Des optimisations réactionnelles devront être réalisées surtout pour la réaction de Mitsunobu et pour la réaction de métathèse croisée qui ont les rendements les plus faibles.

Experimental part of Chapter 3

(2*R*,3*S*)-hex-5-ene-1,2,3-triol (29)

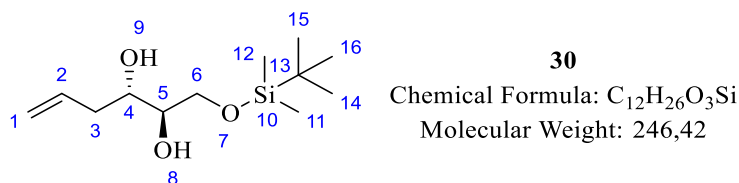
CAS : 79364-36-6



To a suspension of methyltriphenylphosphonium bromide (25.9 g, 0.073 mol, 1.0 eq) in dry THF (250 mL), 4 Å molecular sieves (2~3 g) was added under argon atmosphere. This white suspension was cooled at 0°C and a solution of potassium *ter*-butoxide (1 M in THF, 60.5 mL, 0.061 mol, 1.5 eq) was added and this reaction mixture was stirred for 2h at 0°C. Then, commercially available 2-deoxy-*D*-ribose (6.49 g, 0.048 mol, 1.0 eq) was added to the solution and this was stirred for 24 h at 35°C. Thus, the reaction was quenched with NH₄Cl solid (8 g) and this was stirred for 18h at room temperature. The suspension was filtered and washed with THF and the filtrate was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a first flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) and a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 97/3) to give a white solid (4.09 g, 64 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.84 (1H, m, H₂); 5.18 (2H, m, H₁); 3.74-3.85 (3H, m, H₆/H₄); 3.63 (1H, m, H₅); 2.87 (1H, d, *J*_{H8-H5} = 5.82 Hz, *O*-H₈); 2.46 (1H, t, *J*_{H7-H6} = 5.88 Hz, *O*-H₇); 2.43 (1H, d, *J*_{H9-H4} = 4.43 Hz, *O*-H₉); 2.22-2.42 (2H, m, H₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.3 (C₂); 118.8 (C₁); 73.5 (C₅); 72.5 (C₄); 63.5 (C₆); 37.9 (C₃). ESI-HRMS calculated for [C₆H₁₃O₃]⁺ *m/z* 133.0859 and found *m/z* 133.0856. IR (neat, cm⁻¹): 3300.6*br*; 3082.6*m*; 3002.7*w*; 2971.4*w*; 2901.9*m*; 1643.8*w*; 1463.7*m*; 1306.5*w*; 1063.8*s*; 1027.8*s*; 998.2*m*; 982.0*m*; 915.4*m*; 868.9*m*; 667.8*w*, 618.2*w*. [α]_D²⁰ = - 3.2 (C = 0.12 M, MeOH).

(2*R*,3*S*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)hex-5-ene-2,3-diol (30)

CAS : 1628535-41-0

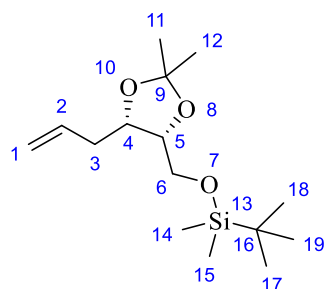


To a solution of (2*R*,3*S*)-hex-5-ene-1,2,3-triol **29** (2.0 g, 15.1 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (40 mL), imidazole (1.55 g, 22.7 mmol, 1.5 eq) and TBDMS-Cl (2.28 g, 15.1 mmol, 1.0 eq) were added at 0°C under argon atmosphere. The reaction was stirred at 0°C for 30 min. Then, this was quenched with water (40 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 40 mL) and the combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 95/5 to 80/20) to give a colorless oil (3.54 g, 95 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.86 (1H, m, H₂); 5.16 (2H, m, H₁); 3.78 (2H, m, H₆); 3.72 (1H, m, H₄); 3.55 (1H, m, H₅); 2.67 (1H, m, *O*-H₈); 2.32 (1H, m, *O*-H₉); 2.23-2.43 (2H, m, H₃); 0.91 (9H, s,

$H_{14}/H_{15}/H_{16}$; 0.09 (6H, s, H_{11}/H_{12}). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 134.7 (C_2); 118.3 (C_1); 73.1 (C_5); 72.0 (C_4); 64.1 (C_6); 38.0 (C_3); 26.0 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}/\text{C}_{16}$); 18.4 (C_{13}); -5.2 ($\text{C}_{11}/\text{C}_{12}$); -5.3 ($\text{C}_{11}/\text{C}_{12}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{Si}]^+$ m/z 247.1723 and found m/z 247.1724. IR (neat, cm^{-1}): 3425.6br; 3077.3w; 2953.5m; 2928.9m; 2884.7m; 2857.5m; 1641.5w; 1471.7w; 1389.9w; 1361.6w; 1253.5m; 1050.6m; 1005.1m; 912.9w; 834.0s; 776.0s, 670.3w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.9$ ($\text{C} = 0.058 \text{ M}$, MeOH).

(((4*R*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)(tert-butyl)dimethylsilane (31**)**

CAS : 1071212-07-1



31

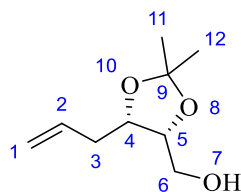
Chemical Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Si}$

Molecular Weight: 286.49

To a solution of (2*R*,3*S*)-1-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)hex-5-ene-2,3-diol **31** (3.5 g, 14.2 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (10 mL), 2,2-dimethoxypropane (2.6 mL, 21.3 mmol, 1.5 eq), PTSA. H_2O (34 mg, 2.84 mmol, 20 mol%) and 4 Å molecular sieves (one spatula) were added at room temperature under argon atmosphere. The reaction was stirred for 9 h. Then, the molecular sieves was filtrated and washed with DCM and water (15 ml) was added to the filtrate. The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 20 mL) and the combined organic layer was washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 100/0 to 97/3) to give a colorless liquid (3.69 g, 91 %). R_f (EP/AcOEt 9:1) = 0.67. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.90 (1H, m, H_2); 5.10 (2H, m, H_1); 4.20 (2H, m, H_4); 4.11 (1H, m, H_5); 3.66 (1H, qd, $J_{\text{H6-H5}} = 7.39 \text{ Hz}$, $J_{\text{H6-H5}} = 10.39 \text{ Hz}$, H_6); 2.28-2.45 (2H, m, H_3); 1.43 (3H, s, $\text{H}_{11}/\text{H}_{12}$); 1.34 (3H, s, $\text{H}_{11}/\text{H}_{12}$); 0.89 (9H, s, $\text{H}_{17}/\text{H}_{18}/\text{H}_{19}$); 0.07 (6H, s, $\text{H}_{14}/\text{H}_{15}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 135.4 (C_2); 116.9 (C_1); 108.1 (C_9); 77.9 (C_5); 77.2 (C_4); 62.0 (C_6); 34.0 (C_3); 28.3 ($\text{C}_{11}/\text{C}_{12}$); 26.0 ($\text{C}_{17}/\text{C}_{18}/\text{C}_{19}$); 25.7 ($\text{C}_{11}/\text{C}_{12}$); 18.4 (C_{16}); -5.2 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$); -5.3 ($\text{C}_{14}/\text{C}_{15}$). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{Si}]^+$ m/z 287.2036 and found m/z 287.2035. IR (neat, cm^{-1}): 3078.1w; 2985.3w; 2954.4m; 2930.0m; 2857.9m; 1744.0w; 1642.6w; 1472.2w; 1379.1w; 1368.3w; 1251.5m; 1216.5m; 1169.0w; 1097.0s; 1005.3w; 912.4w; 833.3s; 775.0s; 666.3w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11.5$ ($\text{C} = 0.05 \text{ M}$, MeOH).

((4*R*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (32**)**

CAS : 663176-89-4

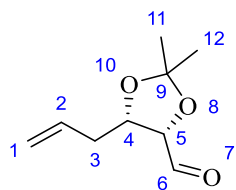
**32**Chemical Formula: C₉H₁₆O₃

Molecular Weight: 172,22

To a solution of (((4*R*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)(tert-butyl)dimethylsilane **31** (3.65 g, 12.7 mmol, 1.0 eq) in dry THF (10 mL) at 0°C under argon atmosphere, TBAF 1 M in THF (19.1 mL, 19.1 mmol, 1.5 eq) was added and the reaction was stirred at room temperature for 1h30. After fully conversion of starting material, the reaction was quenched with water (50 mL) and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layer was washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 8/2) to give a colorless liquid (2.14 g, 98 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.26. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.84 (1H, m, H₂); 5.08-5.18 (2H, m, H₁); 4.25 (2H, q, *J*_{H4-H5} = 5.01 Hz, H₄); 4.18 (1H, q, *J*_{H5-H6} = 5.78 Hz, H₅); 3.65 (1H, t, *J*_{H6-H5} = 5.75 Hz, H₆); 2.24-2.45 (2H, m, H₃); 1.91 (1H, t, *J*_{H7-H6} = 6.14 Hz, O-H₇); 1.48 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.37 (3H, s, H₁₁/H₁₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.4 (C₂); 117.5 (C₁); 108.4 (C₉); 77.9 (C₅); 76.4 (C₄); 61.8 (C₆); 33.8 (C₃); 28.3 (C₁₁/C₁₂); 25.6 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₉H₁₆NaO₃]⁺ m/z 195.0991 and found m/z 195.0988. IR (neat, cm⁻¹): 3465.8br; 3077.8w; 2985.1m; 2935.1m; 2876.9m; 1739.0w; 1642.5w; 1456.1w; 1369.9m; 1244.8m; 1216.4s; 1166.2m; 1039.7s; 996.6m; 914.6m; 861.2w; 835.9m; 787.1w. [α]_D²⁰ = - 18.9 (C = 0.07 M, MeOH).

(4*S*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde (33**)**

CAS : 1009565-74-5

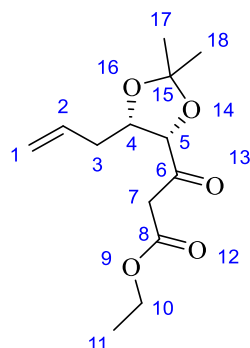
**33**Chemical Formula: C₉H₁₄O₃

Molecular Weight: 170,21

To a solution of (((4*R*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol **32** (200 mg, 1.16 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere, 4 Å molecular sieves (1 spatula) in powder and a solution of IBX (1.08 g, 1.74 mmol, 1.5 eq) with dry DMSO were added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, the reaction was filtrated and was quenched with water (20 mL). Thus, the aqueous layer was extracted with DCM (3 × 30 mL). The combined organic layer was washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 9/1) to give a colorless liquid (93 mg, 47 %).

Other procedure: To a dried-flame round bottom flask, oxalyl chloride (0.21 mL, 2.52 mmol, 1.4 eq) was added to a dry DCM at -78°C under argon atmosphere. Then, dry DMSO (0.36 mL, 5.04 mmol, 2.8 eq) was added to the reaction and this was stirred 20 min at -78°C. A solution ((4*R*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol **32** (0.31 g, 1.80 mmol, 1.0 eq) in dry DCM and triethylamine (1.53 mL, 10.9 mmol, 6.1 eq) were successively added to the reaction mixture. Then, the reaction was stirred 16 h at room temperature. After fully conversion of starting material, the reaction was quenched with water (20 mL) and the aqueous layer was extracted three times with DCM (3×20 mL). The combined organic layer was washed once with saturated Na₂CO₃ solution (20 mL), once with brine (20 mL) and then was dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. This crude can be used directly without further purification. R_f (EP/AcOEt 9:1) = 0.32. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.68 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 3.16 Hz, H₆); 5.83 (1H, m, H₂); 5.12-5.18 (2H, m, H₁); 4.42 (1H, m, H₄); 4.31 (1H, dd, *J*_{H5-H4} = 7.17 Hz, *J*_{H5-H6} = 3.16 Hz, H₅); 2.26-2.42 (2H, m, H₃); 1.60 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.42 (3H, s, H₁₃/H₁₄). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 202.0 (C₆); 133.4 (C₂); 118.4 (C₁); 110.8 (C₉); 82.0 (C₅); 78.1 (C₄); 34.3 (C₃); 27.7 (C₁₁/C₁₂); 25.4 (C₁₃/C₁₄). ESI-HRMS calculated for [C₉H₁₅O₃]⁺ *m/z* 171.1015 and found *m/z* 171.1013. IR (neat, cm⁻¹): 3080.7w; 2987.0m; 2936.8m; 1732.5s; 1643.3w; 1456.2w; 1381.6m; 1251.0m; 1216.6s; 1161.5m; 1064.0s; 995.6w; 919.2w; 858.0w; 833.7w; 789.4w. [α]_D²⁰ = -9.6 (C = 0.05 M, MeOH).

Ethyl 3-((4*S*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-oxopropanoate (**34**)



34

Chemical Formula: C₁₃H₂₀O₅

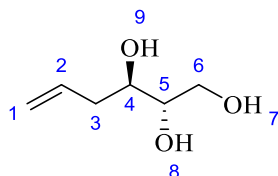
Molecular Weight: 256,30

To a solution of anhydrous tin(II) chloride (8.9 mg, 0.05 mmol, 10 mol%) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere at room temperature, ethyl diazoacetoacetate (60 μL, 0.49 mmol, 1.05 eq) and (4*S*,5*S*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde **33** (80 mg, 0.47 mmol, 1.0 eq) were added and the reaction was stirred at room temperature for 2h30. Then, the reaction was quenched by addition of brine (20 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (3 × 30 mL). The combined organic layer was dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 95/5) to give a yellow pale oil (74 mg, 62 %). R_f (EP/AcOEt 9:1) = 0.39. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.83 (1H, m, H₂); 5.08-5.15 (2H, m, H₁); 4.40-4.58 (2H, m, H₄/H₅); 4.20 (2H, q, *J*_{H10-H11} = 7.12 Hz, H₁₀); 3.45-3.70 (2H, m, H₇); 2.09-2.38 (2H, m, H₃); 1.59 (3H, s, H₁₇/H₁₈); 1.37 (3H, s, H₁₃/H₁₄); 1.27 (3H, t, *J*_{H11-H10} = 7.16 Hz, H₁₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ

(ppm): 204.3 (C₆); 167.1 (C₈); 133.9 (C₂); 118.0 (C₁); 110.4 (C₁₅); 82.2 (C₅); 77.8 (C₄); 61.4 (C₁₀); 47.8 (C₇); 34.6 (C₃); 26.9 (C₁₇/C₁₈); 24.7 (C₁₇/C₁₈); 14.2 (C₁₁). ESI-HRMS calculated for [C₁₃H₂₁O₅]⁺ m/z 257.1383 and found m/z 257.1385. IR (neat, cm⁻¹): 3077.4w; 2984.5m; 2938.2m; 1747.1s; 1719.8s; 1643.3m; 1429.2w; 1382.4m; 1371.6m; 1314.8m; 1263.3m; 1213.9s; 1162.9m; 1066.8m; 1034.5m; 919.2w; 848.4w. [α]_D²⁰ = - 2.5 (C = 0.04 M, MeOH).

(2*S*,3*R*)-hex-5-ene-1,2,3-triol (35)

CAS : 817621-84-4

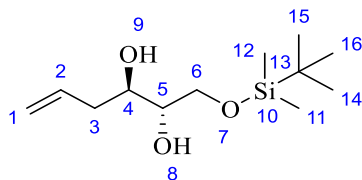


35

Chemical Formula: C₆H₁₂O₃
Molecular Weight: 132,16

To a suspension of potassium *ter*-butoxide (6.27 g, 55.9 mmol, 1.5 eq) in dry THF (250 mL), methyltriphenylphosphonium bromide (26.6 g, 74.6 mmol, 2.0 eq) and 4 Å molecular sieves (2–3 g) were added under argon atmosphere at 0°C. This yellow suspension was stirred at 0°C for 30 min. Then, commercially available 2-deoxy-L-ribose (5.0 g, 37.3 mol, 1.0 eq) was added to the solution and this was stirred for 24 h at 40°C. Thus, the reaction was quenched with NH₄Cl solid (8 g) and this was stirred for 18 h at room temperature. The suspension was filtered and washed with THF and the filtrate was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a first flash chromatography (DCM/MeOH 95/5) and a second flash chromatography (AcOEt/MeOH 98/2) to give a white solid (3.17 g, 64 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.84 (1H, m, H₂); 5.18 (2H, m, H₁); 3.73–3.85 (3H, m, H₆/H₄); 3.63 (1H, m, H₅); 2.94 (1H, m, O-H₈); 2.54 (1H, m, O-H₇); 2.48 (1H, m, O-H₉); 2.21–2.43 (2H, m, H₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.3 (C₂); 118.8 (C₁); 73.6 (C₅); 72.5 (C₄); 63.5 (C₆); 37.9 (C₃). ESI-HRMS calculated for [C₆H₁₃O₃]⁺ m/z 133.0859 and found m/z 133.0857. IR (neat, cm⁻¹): 3302.0br; 3082.2m; 3002.7w; 2980.1w; 2902.1m; 1643.7w; 1463.3m; 1306.3w; 1063.8s; 1027.6s; 998.1m; 981.9m; 915.3m; 868.8m; 667.5w, 617.0w. [α]_D²⁰ = + 5.5 (C = 0.11 M, MeOH).

(2*S*,3*R*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)hex-5-ene-2,3-diol (36)



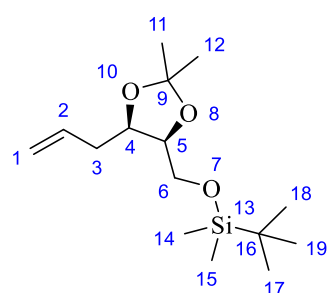
36

Chemical Formula: C₁₂H₂₆O₃Si
Molecular Weight: 246,42

To a solution of (2*S*,3*R*)-hex-5-ene-1,2,3-triol **35** (3.06 g, 23.2 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (60 mL), imidazole (2.36 g, 34.7 mmol, 1.5 eq) and TBDMS-Cl (3.49 g, 23.2 mmol, 1.0 eq) were added at 0°C under argon atmosphere. The reaction was stirred at 0°C for 30 min. Then, this was quenched with water (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 20 mL) and the combined organic layer

was dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt 9/1) to give a colorless oil (5.07 g, 89 %). R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.86 (1H, m, H₂); 5.16 (2H, m, H₁); 3.78 (2H, m, H₆); 3.72 (1H, m, H₄); 3.55 (1H, m, H₅); 2.68 (1H, d, *J*_{H8-H5} = 5.29 Hz, O-H₈); 2.32 (1H, d, *J*_{H9-H4} = 5.14 Hz, O-H₉); 2.23-2.45 (2H, m, H₃); 0.91 (9H, s, H₁₄/H₁₅/H₁₆); 0.09 (6H, s, H₁₁/H₁₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.7 (C₂); 118.3 (C₁); 73.1 (C₅); 72.0 (C₄); 64.1 (C₆); 38.0 (C₃); 26.0 (C₁₄/C₁₅/C₁₆); 18.4 (C₁₃); -5.2 (C₁₁/C₁₂); -5.3 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₁₂H₂₇O₃Si]⁺ m/z 247.1723 and found m/z 247.1719. IR (neat, cm⁻¹): 3435.1br; 3077.5w; 2953.6s; 2928.8s; 2884.8s; 2857.6s; 1641.5w; 1471.7w; 1389.8w; 1361.7w; 1253.5m; 1049.6m; 1005.1w; 938.1w; 912.9w; 834.1s; 776.0s, 669.9w. [α]_D²⁰ = + 5.5 (C = 0.05 M, MeOH).

(((4*S*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)(tert-butyl)dimethylsilane (37)



37

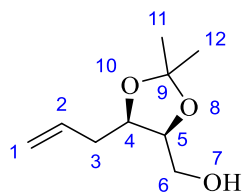
Chemical Formula: C₁₅H₃₀O₃Si

Molecular Weight: 286,49

To a solution of (2*S*,3*R*)-1-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)hex-5-ene-2,3-diol **36** (2.41 g, 9.8 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (10 mL), 2,2-dimethoxypropane (1.80 mL, 14.7 mmol, 1.5 eq), PTSA.H₂O (0.37 g, 1.95 mmol, 20 mol%) and 4 Å molecular sieves (one spatula) were added at room temperature under argon atmosphere. The reaction was stirred for 24 h. Then, the molecular sieves was filtrated and washed with DCM and water (10 ml) was added to the filtrate. The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 10 mL) and the combined organic layer was washed with brine (10 mL), dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (Pentane/AcOEt 100/0 to 98/2) to give a colorless liquid (0.65 g, 23 %). R_f (Pentane/AcOEt 9:1) = 0.67. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.90 (1H, m, H₂); 5.10 (2H, m, H₁); 4.20 (2H, m, H₄); 4.11 (1H, m, H₅); 3.67 (1H, qd, *J*_{H6-H5} = 7.41 Hz, *J*_{H6-H5} = 10.36 Hz, H₆); 2.28-2.44 (2H, m, H₃); 1.43 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.34 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 0.89 (9H, s, H₁₇/H₁₈/H₁₉); 0.08 (6H, s, H₁₄/H₁₅). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 135.4 (C₂); 116.8 (C₁); 108.2 (C₉); 77.9 (C₅); 77.2 (C₄); 62.1 (C₆); 34.0 (C₃); 28.3 (C₁₁/C₁₂); 26.0 (C₁₇/C₁₈/C₁₉); 25.7 (C₁₁/C₁₂); 18.4 (C₁₆); -5.2 (C₁₄/C₁₅); -5.3 (C₁₄/C₁₅). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₃₁O₃Si]⁺ m/z 287.2036 and found m/z 287.2035. IR (neat, cm⁻¹): 3077.2w; 2985.3w; 2954.9s; 2930.1s; 2886.0m; 2858.1m; 1744.8w; 1642.6w; 1472.4w; 1379.0w; 1369.4w; 1253.2s; 1215.7m; 1072.6s; 1004.5m; 913.0m; 833.4s; 775.0s; 719.2w; 678.6w. [α]_D²⁰ = + 5.6 (C = 0.05 M, MeOH).

((4*S*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol (38**)**

CAS : 1374332-46-3



38

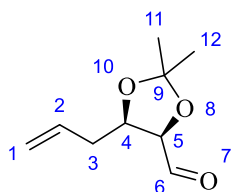
Chemical Formula: C₉H₁₆O₃

Molecular Weight: 172,22

To a solution of (((4*S*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)(tert-butyl)dimethylsilane **37** (0.60 g, 2.1 mmol, 1.0 eq) in dry THF (5 mL) at 0°C under argon atmosphere, TBAF 1 M in THF (3.14 mL, 3.14 mmol, 1.5 eq) was added and the reaction was stirred at room temperature for 1 h 30. After fully conversion of starting material, the reaction was quenched with water (50 mL) and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layer was washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 8/2) to give a colorless liquid (0.38 g, 99 %). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.26. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.84 (1H, m, H₂); 5.07-5.17 (2H, m, H₁); 4.25 (2H, q, *J*_{H₄-H₅} = 5.04 Hz, H₄); 4.18 (1H, q, *J*_{H₅-H₆} = 5.67 Hz, H₅); 3.65 (1H, t, *J*_{H₆-H₅} = 5.71 Hz, H₆); 2.25-2.45 (2H, m, H₃); 1.91 (1H, t, *J*_{H₇-H₆} = 6.01 Hz, O-H₇); 1.48 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.37 (3H, s, H₁₁/H₁₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 134.4 (C₂); 117.5 (C₁); 108.5 (C₉); 77.9 (C₅); 76.4 (C₄); 61.8 (C₆); 33.8 (C₃); 28.3 (C₁₁/C₁₂); 25.6 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₉H₁₆NaO₃]⁺ m/z 195.0991 and found m/z 195.0990. IR (neat, cm⁻¹): 3465.8br; 3078.1m; 2985.1m; 2935.0s; 2877.7m; 1739.0w; 1642.5w; 1456.1w; 1369.0m; 1245.1m; 1216.4m; 1166.2w; 1039.7m; 999.1m; 914.6s; 861.2s; 835.9m; 787.1w. [α]_D²⁰ = + 10.0 (C = 0.05 M, MeOH).

((4*R*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde (39**)**

CAS : 1374332-47-4



39

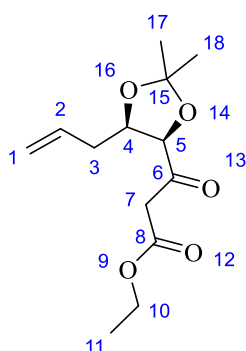
Chemical Formula: C₉H₁₄O₃

Molecular Weight: 170,21

To a solution of ((4*S*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol **38** (330 mg, 1.70 mmol, 1.0 eq) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere, 4 Å molecular sieves (1 spatula) in powder and a solution of IBX (1.58 g, 2.55 mmol, 1.5 eq) with dry DMSO were added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, the reaction was filtrated and was quenched with water (20 mL). Thus, the aqueous layer was extracted with DCM (3 × 30 mL). The combined organic layer was washed with brine (30 mL), dried over Na₂SO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 9/1) to give a colorless liquid (144 mg, 50 %). R_f

(EP/AcOEt 9:1) = 0.33. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.69 (1H, d, $J_{\text{H6-H5}} = 3.21$ Hz, H₆); 5.84 (1H, m, H₂); 5.12-5.18 (2H, m, H₁); 4.42 (1H, m, H₄); 4.31 (1H, dd, $J_{\text{H5-H4}} = 7.16$ Hz, $J_{\text{H5-H6}} = 3.15$ Hz, H₅); 2.26-2.42 (2H, m, H₃); 1.59 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.44 (3H, s, H₁₁/H₁₂). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 202.2 (C₆); 133.4 (C₂); 118.4 (C₁); 110.7 (C₉); 82.2 (C₅); 78.1 (C₄); 34.3 (C₃); 27.2 (C₁₁/C₁₂); 25.1 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3]^+$ m/z 171.1015 and found m/z 171.1014. IR (neat, cm^{-1}): 3080.7w; 2987.0m; 2936.8m; 1732.5s; 1643.3w; 1456.2w; 1381.6m; 1251.0m; 1216.6s; 1161.5m; 1064.0s; 995.6w; 919.2w; 858.0w; 833.7w; 789.4w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +5.5$ (C = 0.02 M, MeOH).

Ethyl 3-((4*R*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-3-oxopropanoate (**40**)



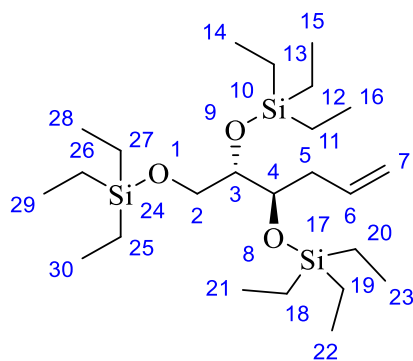
40

Chemical Formula: $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_5$

Molecular Weight: 256.30

To a solution of anhydrous tin(II) chloride (10.4 mg, 0.06 mmol, 10 mol%) in dry DCM (10 mL) under argon atmosphere at room temperature, ethyl diazoacetoacetate (76 μL , 0.62 mmol, 1.05 eq) and (4*R*,5*R*)-5-allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-carbaldehyde **39** (100 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq) were added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h 30. Then, the reaction was quenched by addition of brine (20 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (3 $\times$ 30 mL). The combined organic layer was dried over Na_2SO_4 and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 95/5) to give a yellow pale oil (98 mg, 65 %). R_f (EP/AcOEt 9:1) = 0.39. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.84 (1H, m, H₂); 5.09-5.16 (2H, m, H₁); 4.40-4.59 (2H, m, H₄/H₅); 4.20 (2H, q, $J_{\text{H10-H11}} = 7.21$ Hz, H₁₀); 3.45-3.70 (2H, m, H₇); 2.09-2.38 (2H, m, H₃); 1.59 (3H, s, H₁₇/H₁₈); 1.37 (3H, s, H₁₇/H₁₈); 1.25 (3H, t, $J_{\text{H11-H10}} = 7.18$ Hz, H₁₁). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 204.4 (C₆); 167.3 (C₈); 133.9 (C₂); 118.4 (C₁); 110.6 (C₁₅); 82.2 (C₅); 77.9 (C₄); 61.1 (C₁₀); 47.8 (C₇); 34.6 (C₃); 27.0 (C₁₇/C₁₈); 24.7 (C₁₇/C₁₈); 14.2 (C₁₁). ESI-HRMS calculated for $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_5]^+$ m/z 257.1383 and found m/z 257.1385. IR (neat, cm^{-1}): 3077.4w; 2984.5m; 2938.2w; 1747.1s; 1719.8s; 1643.3m; 1429.2w; 1382.4m; 1371.6m; 1314.8m; 1263.3m; 1213.9s; 1162.9m; 1066.8m; 1034.5m; 919.2w; 848.4w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.9$ (C = 0.04 M, MeOH).

(5*R*,6*S*)-5-allyl-3,3,9,9-tetraethyl-6-((triethylsilyl)oxy)-4,8-dioxa-3,9-disilaundecane (41)



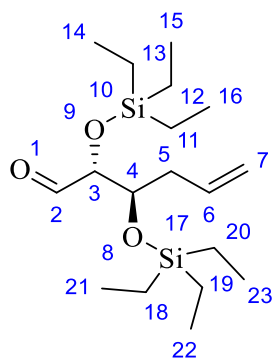
41

Chemical Formula: C₂₄H₅₄O₃Si₃

Molecular Weight: 474,95

To a solution of (2*S*,3*R*)-hex-5-ene-1,2,3-triol **29** (1.13 g, 8.56 mmol, 1.0 eq) with dry DMF (12 mL) under argon atmosphere, chlorotriethyl silane (5.8 mL, 34.24 mmol, 4.0 eq) and imidazole (3.5 g, 51.36 mmol, 6.0 eq) were added at room temperature and the reaction mixture was stirred for 2 h. Thus, the reaction was quenched with an aqueous solution of saturated NaHCO₃ (50 mL) then the aqueous layer was extracted with diethyl ether (4 × 50 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 98/2) to give a colorless oil (2.0 g, 49 %). R_f (EP/AcOEt 9/1) = 0.90. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.85 (1H, m, H₆), 5.04 (2H, m, H₇), 3.75 (1H, td, *J*_{H₃-H₄} = 3.02 Hz, *J*_{H₃-H₂} = 5.95 Hz, H₃); 3.66 (2H, m, H₅); 3.47 (1H, m, H₄); 2.28 (1H, m, H₂); 0.95 (27H, m, H₁₄/H₁₅/H₁₆/H₂₁/H₂₂/H₂₃/H₂₈/H₂₉/H₃₀); 0.61 (18H, m, H₁₁/H₁₂/H₁₃/H₁₈/H₁₉/H₂₀/H₂₅/H₂₆/H₂₇). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 136.2 (C₆); 116.7 (C₇); 77.1 (C₃); 74.3 (C₄); 64.7 (C₂); 37.8 (C₅); 7.1 (C₁₄/C₁₅/C₁₆/C₂₁/C₂₂/C₂₃); 6.9 (C₂₈/C₂₉/C₃₀); 5.2 (C₁₁/C₁₂/C₁₃/C₁₈/C₁₉/C₂₀); 4.5 (C₂₅/C₂₆/C₂₇). ESI-HRMS calculated for [C₂₄H₅₄O₃Si₃]⁺ 474.9400 and found 474.9403. IR (neat, cm⁻¹): 1643.7*s*; 1463.3*s*; 1306.3*m*; 1063.8*s*; 1027.6*m*; 998.1*m*; 981.9*m*; 915.3*w*; 868.8*w*; 667.5*w*, 617.0*w*. [α]_D²⁰ = + 4.0 (C = 0.1 M, MeOH).

(2*R*,3*R*)-2,3-bis((triethylsilyl)oxy)hex-5-enal (42)



42

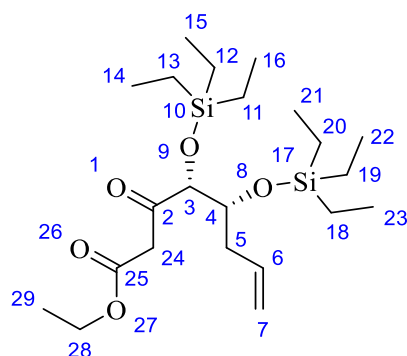
Chemical Formula: C₁₈H₃₈O₃Si₂

Molecular Weight: 358,67

To a flame dried round-bottom flask, dry DMSO (0.27 mL, 3.78 mmol, 9.0 eq) with dry DCM (2 mL) were stirred under argon atmosphere at -78 °C. Oxalyl chloride (0.16 mL, 1.89 mmol, 4.5 eq) with dry DCM (1 mL) was added to the solution and this was stirred for 15 min at -78 °C. Then, a solution of tri(triethylsilyl)-O-protected alkene **41** (200 mg, 0.42 mmol, 1.0 eq) with dry DCM (2 mL) was added,

next the reaction was stirred for 20 min at -78 °C and an additional 20 min at -40 °C. The reaction mixture was cooled at -78 °C and triethylamine (0.88 mL, 6.3 mmol, 15 eq) was added. Thus, the reaction was slowly warmed at room temperature and this was quenched with water (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 15 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 99/1) to give a colorless oil (0.11 g, 75 %). R_f (EP/AcOEt 98/2) = 0.45. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.58 (1H, d, *J*_{H2-H3} = 1.92 Hz, H₂); 5.63-5.81 (1H, m, H₆), 5.03-5.15 (2H, m, H₇), 3.87-3.98 (2H, m, H₄/H₃); 2.21-2.44 (2H, m, H₅); 0.95 (18H, m, H₁₄/H₁₅/H₁₆/H₂₁/H₂₂/H₂₃); 0.61 (12H, m, H₁₁/H₁₂/H₁₃/H₁₈/H₁₉/H₂₀). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 204.2 (C₂); 136.3 (C₆); 117.7 (C₇); 78.7 (C₃); 75.5 (C₄); 38.0 (C₅); 7.1 (C₁₄/C₁₅/C₁₆/C₂₁/C₂₂/C₂₃); 5.2 (C₁₁/C₁₂/C₁₃/C₁₈/C₁₉/C₂₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₈H₃₉O₃Si₂]⁺ 359.2400 and found 359.2403. IR (neat, cm⁻¹): 1643.95; 1463.3*m*; 1306.3*m*; 1063.8*s*; 1027.6*m*; 998.1*m*; 981.9*m*; 915.3*w*; 868.8*w*; 667.5*w*, 617.0*w*. [α]_D²⁰ = + 2.9 (C = 0.1 M, MeOH).

ethyl (4*R*,5*R*)-3-oxo-4,5-bis((triethylsilyl)oxy)oct-7-enoate (**43**)



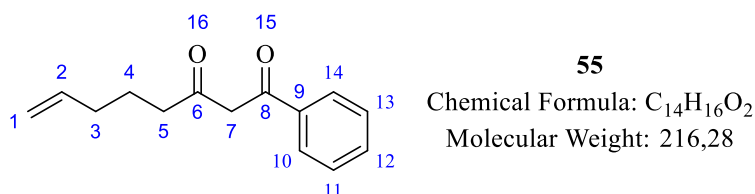
43
Chemical Formula: C₂₂H₄₄O₅Si₂
Molecular Weight: 444.76

To a solution of anhydrous tin(II) chloride (5.5 mg, 0.03 mmol, 10 mol%) in dry DCM (5 mL) under argon atmosphere at room temperature, ethyl diazoacetoacetate (32 μL, 0.30 mmol, 1.05 eq) and the corresponding aldehyde **42** (104 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) with dry DCM (2 mL) were added and the reaction was stirred at room temperature for 2 h30. Then, the reaction was quenched by addition of brine (20 mL) and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3 × 30 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and then concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 99/1) to give a colorless oil (94 mg, 73 %). R_f (EP/AcOEt 98:2) = 0.58. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.71 (1H, m, H₆), 5.02-5.16 (2H, m, H₇), 4.16 (2H, q, *J*_{H28-H29} = 7.22 Hz, H₂₈); 4.08 (1H, d, *J*_{H3-H4} = 2.48 Hz, H₃); 3.91 (1H, m, H₄); 3.47-3.81 (2H, m, H₂₄), 2.13-2.38 (2H, m, H₅), 1.25 (3H, t, *J*_{H29-H28} = 7.12 Hz, H₂₉); 0.95 (18H, m, H₁₄/H₁₅/H₁₆/H₂₁/H₂₂/H₂₃); 0.62 (12H, m, H₁₁/H₁₂/H₁₃/H₁₈/H₁₉/H₂₀). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): 204.2 (C₂); 167.5 (C₂₅); 134.1 (C₆); 118.8 (C₇); 79.0 (C₃); 76.6 (C₄); 61.1 (C₂₈); 52.2 (C₂₄); 37.9 (C₅); 16.4 (C₂₉) 7.0 (C₁₄/C₁₅/C₁₆/C₂₁/C₂₂/C₂₃); 5.2 (C₁₁/C₁₂/C₁₃/C₁₈/C₁₉/C₂₀). ESI-HRMS calculated for [C₂₂H₄₅O₅Si₂]⁺ 445.2722 and found 445.2723. IR

(neat, cm^{-1}): 1643.75; 1463.35; 1306.3m; 1063.8m; 1027.6m; 998.1m; 981.9w; 915.3w; 868.8w; 667.5w, 617.0w. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.3$ (C = 0.1 M, MeOH).

1-phenyloct-7-ene-1,3-dione (**55**)

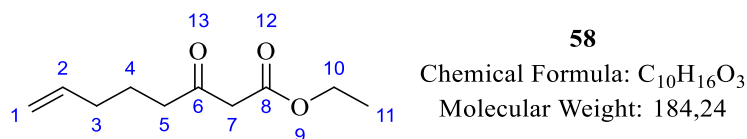
CAS : 131223-44-4



To a suspension of LDA (2 M in solution in THF, 6.77 mL, 13.55 mmol, 2.2 eq) in dry THF (20 mL) at 0°C under argon atmosphere, benzoylacetone **54** (1.0 g, 6.16 mmol, 1.0 eq) in solution in THF (5 mL) was added at 0°C and this was stirred for 30 min at 0°C . Thus, a solution of 4-bromo-1-butene (0.74 mL, 7.39 mmol, 1.2 eq) in solution with dry THF (10 mL) was added to the reaction mixture and this was stirred for 16 h at room temperature. After fully conversion of starting materials, the reaction was quenched with a mixture of water /HCl 37 % 4/5 to pH 1 and this was concentrated to remove THF. Then, the aqueous layer was extracted three times with Et_2O (3×15 mL). Thus, the combined organic layer was washed once with water (15 mL), once with brine (15 mL) and this was dried over MgSO_4 and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (Pentane/AcOEt 100/0 to 99/1) followed by a second flash chromatography (Pentane/AcOEt 99.5/0.5) to give a pale yellow oil (0.83 g, 63 %). Rf (Pentane/AcOEt 99:1) = 0.86. This product was directly used for the next step without further characterization.

ethyl 3-oxooct-7-enoate (**58**)

CAS : 111711-06-9

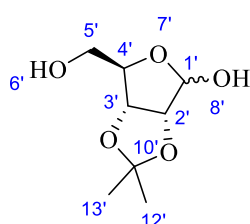


To a suspension of sodium hydride (60 % in mineral oil) (3.0 g, 75 mmol, 1.2 eq) in dry THF (160 mL) at 0°C under argon atmosphere, ethyl acetoacetate **57** (7.9 mL, 62.5 mmol, 1.0 eq) was added drop by drop and this was stirred for 10 min at 0°C . Then, *n*-butyllithium (2.5 M, 25.0 mL, 62.5 mmol, 1.0 eq) was added to the reaction mixture and this was stirred for 20 min at 0°C . Thus, a solution of 4-bromo-1-butene (6.9 mL, 69.0 mmol, 1.1 eq) in dry THF (20 mL) was added to the reaction mixture and this was stirred for 2h at room temperature. After fully conversion of starting materials, the reaction was quenched with a mixture of water /HCl 37 % 4/5 to pH 1 and this was concentrated to remove THF. Then, the aqueous layer was extracted three times with Et_2O (3×30 mL). Thus, the combined organic layer was washed once with water (20 mL), once with brine (20 mL) and this was dried over MgSO_4

and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 98/2 to 95/5) to give a pale yellow oil (9.18 g, 80 %). *R*_f (EP/AcOEt 9:1) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.75 (1H, m, H₂); 4.95-5.05 (2H, m, H₁); 4.19 (2H, q, *J*_{H10-H11} = 7.17 Hz, H₁₀); 3.42 (2H, s, H₇); 2.54 (2H, t, *J*_{H5-H4} = 7.32 Hz, H₅); 2.06 (2H, m, H₃); 1.70 (2H, q, *J*_{H4-H5} = 7.44 Hz, H₄); 1.27 (3H, t, *J*_{H11-H10} = 7.12 Hz, H₁₁). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 202.8 (C₆); 167.3 (C₈); 137.9 (C₂); 115.5 (C₁); 61.5 (C₁₀); 49.5 (C₇); 42.2 (C₅); 33.0 (C₃); 22.6 (C₄); 14.2 (C₁₁). ESI-HRMS calculated for [C₁₀H₁₇O₃]⁺ *m/z* 185.1172 and found *m/z* 185.1169. IR (neat, cm⁻¹): 3077.8w; 2980.1m; 2937.1m; 1740.7s; 1714.6s; 1640.7m; 1445.0w; 1411.1w; 1367.4m; 1311.7m; 1236.0m; 1153.1m; 1095.2w; 1028.9m; 913.0m; 847.9w.

(3*aR*,6*R*,6*aR*)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (62)

CAS: 4099-68-0



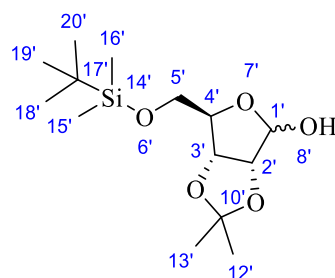
62

Chemical Formula: C₈H₁₄O₅
Molecular Weight: 190,20

To a suspension of commercially available *D*-ribose (75.0 g, 0.50 mol, 1.0 eq) in dry acetone (1.6 L), 2,2-dimethoxypropane (65 mL, 0.52 mol, 1.05 eq) was added and the white suspension was cooled at 0 °C. Then, concentrated H₂SO₄ (0.13 mL, 2.5 mmol, 0.5 mol%) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2h30. Thus, the reaction was quenched with Na₂CO₃ (8.0 g, 75.0 mmol, 0.15 eq), this was filtrated over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 60/40 to 45/55) to give a pale yellow oil (95.1 g, 99 %). *R*_f (PE/AcOEt 1:1) = 0.28. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3*aR*,6*R*,6*aR*)-6-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (63)

CAS : 217309-46-1



63

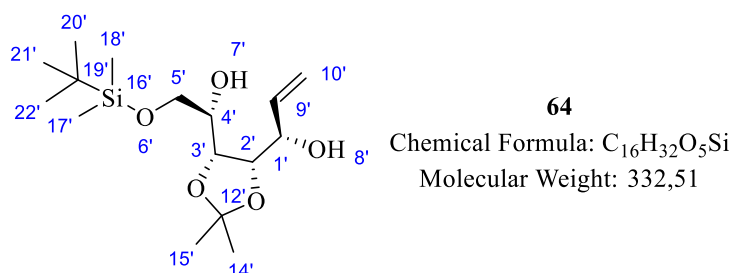
Chemical Formula: C₁₄H₂₈O₅Si
Molecular Weight: 304,46

To a solution of 2',3'-*O*,*O'*-isopropylidene-*D*-ribose **62** (25.3 g, 0.13 mol, 1.0 eq) in dry DCM (500 mL), imidazole (13.6 g, 0.2 mol, 1.5 eq) and *ter*-butyldimethylsilyl chloride (22.1 g, 0.15 mol, 1.1 eq) were added at 0°C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. Then, the reaction

was quenched with H₂O (500 mL) and the aqueous layer was extracted with DCM (4 × 100 mL). The combined organic layer was washed with brine (200 mL), dried over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 95/5 to 80/20) to give pale yellow oil (35.5 g, 88 %). R_f (PE/AcOEt 9:1) = 0.23. This product was directly used for the next step without further characterization.

1-((4*S*,5*R*)-5-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)prop-2-en-1-ol (64)

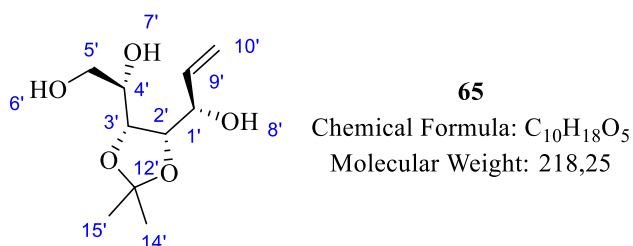
CAS : 138127-55-6



To a solution of 5'-*O*-silylated protected-2',3'-*O*,*O'*-isopropylidene-*D*-ribose **63** (61.3 g, 0.20 mol, 1.0 eq) in dry THF (500 mL) at -78°C, a solution of 1 M of vinylmagnesium bromide in dry THF (600 mL, 0.60 mol, 3.0 eq) was added dropwise at -78°C and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, the reaction was cooled at -78°C and was quenched with a saturated solution of NH₄Cl (800 mL). The aqueous layer was extracted with AcOEt (3 × 200 mL). The combined organic layer was washed with brine (400 mL), dried over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 95/5) to give a colorless oil (59.5 g, 89 %). R_f (PE/AcOEt 9:1) = 0.38. This product was directly used for the next step without further characterization.

1-((4*R*,5*S*)-5-(1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethane-1,2-diol (65)

CAS : 126113-84-6

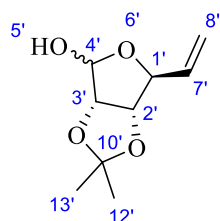


To a solution of diol **64** (59.5 g, 0.18 mol, 1.0 eq) in dry THF (500 mL) at room temperature, a solution of 1 M of TBAF in dry THF (190 mL, 0.19 mol, 1.05 eq) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo* and the resulting residue was directly purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 7/3) to give a white solid

(29.8 g, 76 %). Rf (PE/AcOEt 7:3) = 0.30. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3a*S*,6*S*,6a*S*)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (66)

CAS : 1429612-42-9



66

Chemical Formula: C₉H₁₄O₄

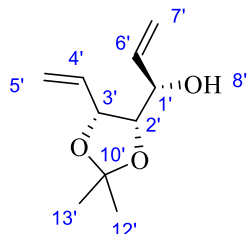
Molecular Weight: 186,21

To a solution of triol **65** (29.8 g, 0.14 mol, 1.0 eq) in water (350 mL) at 0°C, NaIO₄ (43.9 g, 0.02 mol, 0.15 eq) was added portion wise and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then, this reaction was extracted with AcOEt (3 × 150 mL), the combined organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was directly purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 9/1) to give a colorless oil (17.8 g, 70 %). Rf (PE/AcOEt 9:1) = 0.25. This product was directly used for the next step without further characterization.

Other procedure To a solution of 5-iodo-2,3-*O*′-isopropylidene-methyl- α -*D*-manno pyranoside **69** (31.7 g, 90 mmol, 1.0 eq) with H₂O/EtOH (55 mL:110 mL), dust zinc (33.2 g, 510 mmol, 5.5 eq) was added and the reaction mixture was stirred at the reflux temperature for 3h45. Thus, the reaction was filtrated over a celite pad, washed several times with EtOH and this was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, this was dissolved with DCM and a saturated solution of NaHCO₃ was added. The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 75 mL) and the combined organic layer was washed with brine (100 mL). Then, this was dried over MgSO₄, concentrated to dryness *in vacuo* and the resulting residue was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 8/2) to give a white solid (17.1 g, 99 %). Rf (PE/AcOEt 9:1) = 0.25.

1-((4*S*,5*R*)-2,2-dimethyl-5-vinyl-1,3-dioxolan-4-yl)prop-2-en-1-ol (67)

CAS : 503302-88-3



67

Chemical Formula: C₁₀H₁₆O₃

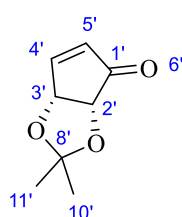
Molecular Weight: 184,24

To a suspension of sodium hydride (6.0 g, 0.15 mol, 1.5 eq, 60 % in mineral oil) in dry THF (300 mL) at 0°C, dry DMSO (17.7 mL, 0.25 mol, 2.5 eq) was added and the suspension was stirred for 30 min at room temperature. Thus, the reaction mixture was re-cooled at 0°C and methyltriphenylphos-

phonium bromide (53.6 g, 0.15 mol, 1.5 eq) was added. After stirring at room temperature for 1 h, the reaction was cooled at 0°C and a solution of the lactol **66** (17.8 g, 0.10 mol, 1.0 eq) in dry THF (100 mL) was added at 0°C. Then, the reaction was heated at the reflux temperature for 3 h. Thus, the reaction was stopped at room temperature and diethyl ether (300 mL). The organic layer was washed once with water (100 mL) and once with brine (100 mL). Then, this was dried over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was directly purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 9/1) to give a colorless oil (15.9 g, 90 %). R_f (PE/AcOEt 9:1) = 0.27. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3aR,6aR)-2,2-dimethyl-3a,6a-dihydro-4H-cyclopenta[d][1,3]dioxol-4-one (8)

CAS : 115509-13-2



8

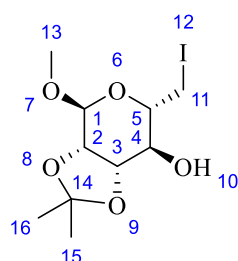
Chemical Formula: C₈H₁₀O₃

Molecular Weight: 154,17

To a solution of alcohol diene **67** (15.9 g, 0.09 mol, 1.0 eq) in dry DCM (200 mL) at room temperature under argon atmosphere, Grubb's catalyst second generation (1.91 g, 2.25 mmol, 2.5 mol%) was added and the solution was stirred for 2 days at room temperature. Thus, PCC (37.9 g, 0.18 mol, 2.0 eq) was added and the reaction was stirred for an additional 2 days at room temperature. Then, the reaction was stopped, filtrated over a silica gel pad, washed several times with AcOEt and was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was directly purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 8/2) to give a pale brown solid (8.6 g, 65 %). R_f (PE/AcOEt 9:1) = 0.34. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3aS,4S,6S,7S,7aS)-6-(iodomethyl)-4-methoxy-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-7-ol (69)

CAS : 22932-34-9



69

Chemical Formula: C₁₀H₁₇IO₅

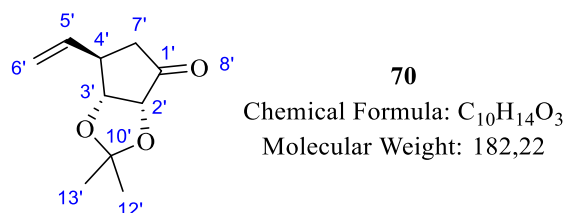
Molecular Weight: 344,15

To a flame dried round bottom-flask, methyl- α -D-mannopyranoside **68** (25 g, 129 mmol, 1.0 eq), imidazole (17.5 g, 257 mmol, 2.0 eq) and triphenylphosphine (50.7 g, 193 mmol, 1.5 eq) were stirred with dry THF (330 mL) under argon atmosphere at room temperature. Then, iodine (49.0 g, 193.0

mmol, 1.5 eq) was added portionwise and the reaction was stirred for 2h30 at reflux temperature. Then, the reaction was cooled at room temperature and this was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was dissolved with dry acetone (750 mL) and dimethoxypropane (79.8 mL, 644 mmol, 5.0 eq) was added at 0°C. 4 Å molecular sieves (3 g) and APTS.H₂O (14.7 g, 77 mmol, 0.6 eq) were added and the reaction was stirred for 1h30 at room temperature. When the starting material was fully converted, the molecular sieves was removed by filtration and washed several times with THF. Then, the resulting filtrate was quenched with triethylamine (80 mL) and this was concentrated to dryness *in vacuo*. Thus, the residue was dissolved with DCM (200 mL) and water (200 mL) was added. The aqueous layer was extracted with DCM (3 × 100 mL) and the combined organic layer was washed once with saturated NaHCO₃ (100 mL), once with Na₂S₂O₃ (100 mL), once with brine (100 mL), next this was dried over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 8/2) to give a yellow solid (31.7 g, 72 %). R_f (PE/AcOEt 7:3) = 0.49. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3aR,6R,6aR)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4H-cyclopenta[d][1,3]dioxol-4-one (70)

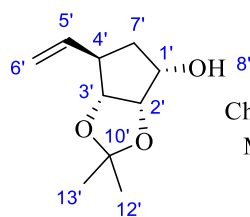
CAS : 698999-19-8



To a flame dried round bottom-flask, a suspension of dry CuBr.Me₂S (1.13 g, 5.51 mmol, 0.1 eq) was stirred with dry THF (100 mL) under argon atmosphere at -78°C. A solution of 1 M of vinylmagnesium bromide in THF (165.4 mL, 165.4 mmol, 3.0 eq) was added dropwise at -78°C and the reaction was stirred for 10 min at -78°C. Then, a dry solution of the corresponding cyclopentenone **8** (8.5 g, 55.1 mmol, 1.0 eq), chlorotrimethylsilane (14.3 mL, 113.0 mmol, 2.05 eq), HMPA (24.9 mL, 143.3 mmol, 2.6 eq) were added dropwise sequentially at -78°C and the reaction mixture was stirred for 5 h at -78°C. After a fully conversion of starting material, the reaction was quenched with saturated NH₄Cl solution (100 mL) at 0°C and the aqueous solution was adjusted to pH 7 with addition of saturated NaHCO₃ (100 mL) at 0°C. Thus, the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 × 70 mL). The combined organic layer was dried over MgSO₄ and was concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting residue was directly purified by a flash chromatography (PE/AcOEt 95/5) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 93/7) to give a pale yellow oil (7.4 g, 74 %). R_f (PE/AcOEt 9:1) = 0.32. This product was directly used for the next step without further characterization.

(3a*S*,4*S*,6*R*,6a*R*)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-ol (71)

CAS : 698999-23-4



71

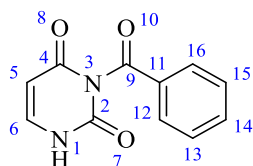
Chemical Formula: C₁₀H₁₆O₃

Molecular Weight: 184,24

To a flame dried round bottom-flask, a suspension of LiAlH₄ (2.62 g, 67.2 mmol, 1.7 eq) was stirred with dry THF (100 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, a solution of vinylcyclopentanone **70** (7.2 g, 39.5 mmol, 1.0 eq) was added dropwise at 0°C and the reaction was stirred for 3h30 at room temperature. When the starting material was fully converted, the reaction was quenched with water (3 mL) at 0°C and the reaction mixture was stirred for 10 min at 0°C. Then, an aqueous solution of 15 % of NaOH (10 mL) and water (10 mL) were added at 0°C until we see a white suspension appears. Thus, the resulting aluminium salts was removed by filtration and washed several times with THF. The filtrate was concentrated to dryness *in vacuo* to give a colorless oil (7.0 g, 96 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.29. This product was directly used for the next step without further characterization.

3-benzoylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (72)

CAS: 2775-87-3



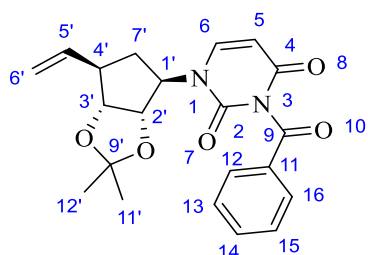
72

Chemical Formula: C₁₁H₈N₂O₃

Molecular Weight: 216,20

To a solution of commercially available uracil (1 g, 8.92 mmol, 1.0 eq) in a 2/5 mixture of dry pyridine and dry acetonitrile (20 mL) was added benzoylchloride (3,10 mL, 26,8 mmol, 3 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred 24 h at room temperature and then was concentrated *in vacuo* under reduced pressure. The residue was partitioned between dichloromethane and water. Thus, the organic layer was separated and then evaporated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a mixture of aqueous potassium carbonate 0.5 M (20 mL) and 1,4-dioxane (40 mL) and stirred at 70 °C until fully conversion of starting material (typically 2 h). The solution was cooled down to room temperature and the pH was lowered to 5 by addition of glacial acetic acid. The volatiles were evaporated under reduced pressure to initiate precipitation. The aqueous mixture was filtered and the residue was washed several times with cold water and diethyl ether to obtain the desired N₃-benzoylated compound **72** as a white solid. This product was directly used for the next step without further characterization.

3-benzoyl-1-((3aS,4R,6R,6aR)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4H-cyclopenta[d][1,3]dioxol-4-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (73)



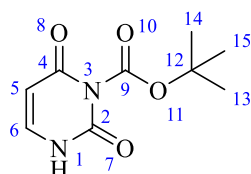
73

Chemical Formula: $C_{21}H_{22}N_2O_5$

Molecular Weight: 382,42

To a flame-dried round-bottom flask, *N*₃-Benzoyl-uracil **72** (0.88 g; 4.07 mmol; 2.5 eq), triphenylphosphine (1.07 g, 4.07 mmol, 2.5 eq) and 4 Å molecular sieves (in powder) were added to an anhydrous THF (20 mL) under argon atmosphere at 0°C. DIAD (0.85 mL; 4.07 mmol; 2.5 eq) was added to the reaction and was stirred for 30 min at room temperature. Then, a solution of (3a*S*,4*S*,6*R*,6a*R*)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-ol **71** (0.3 g; 1.63 mmol; 1.0 eq) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred at reflux temperature for 24 h. The resulting yellow suspension was filtered and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was directly purified by flash chromatography (EP/AcOEt 1/1) followed by a second flash chromatography (DCM/MeOH 99/1) to give a pale brown oil (0.11 g; 18 %). *R*_f (DCM/MeOH 99:1) = 0.27. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.94 (2H, m, H₁₂/H₁₆); 7.66 (1H, m, H₁₄); 7.51 (2H, m, H₁₃/H₁₅); 7.27 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.28 Hz, H₆); 5.84 (1H, m, H₅); 5.83 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.10 Hz, H₅); 5.07-5.17 (2H, m, H_{6'}); 4.91 (1H, dd, *J*_{H2'-H1'} = 4.34 Hz, *J*_{H2'-H3'} = 7.15 Hz, H_{2'}); 4.46 (1H, t, *J*_{H3'-H4'} = 6.97 Hz, H_{3'}); 4.32-4.39 (1H, m, H_{1'}); 2.66 (1H, m, H_{4'}); 2.23-2.33 (2H, m, H₇); 1.53 (3H, s, H₁₁/H₁₂); 1.30 (3H, s, H₁₁/H₁₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.8 (C₉); 162.2 (C₄); 149.7 (C₂); 143.8 (C₆); 137.4 (C₅); 135.4 (C₁₄); 131.5 (C₁₁); 130.7 (C₁₂/C₁₆); 129.4 (C₁₃/C₁₅); 116.3 (C_{6'}); 114.0 (C_{9'}); 102.6 (C₅); 83.9 (C_{3'}); 82.4 (C_{2'}); 66.9 (C_{1'}); 48.4 (C_{4'}); 35.2 (C₇); 27.8 (C₁₁/C₁₂); 25.5 (C₁₁/C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₂₁H₂₃N₂O₅]⁺ *m/z* 383.1601 and found *m/z* 383.1605. IR (neat, cm⁻¹): 3085.3*w*; 2984.9*w*; 2936.4*w*; 1745.2*s*; 1702.1*s*; 1660.8*s*; 1598.4*w*; 1445.9*m*; 1372.0*m*; 1238.1*m*; 1178.6*w*; 1157.6*w*; 1068.4*m*; 984.5*w*; 920.9*w*; 864.0*w*; 802.1*w*; 760.0*w*; 696.9*w*; 682.9*w*. [α]_D²⁰ = + 3.5 (C = 0.04 M, MeOH).

tert-butyl 2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidine-1(2*H*)-carboxylate (74)



74

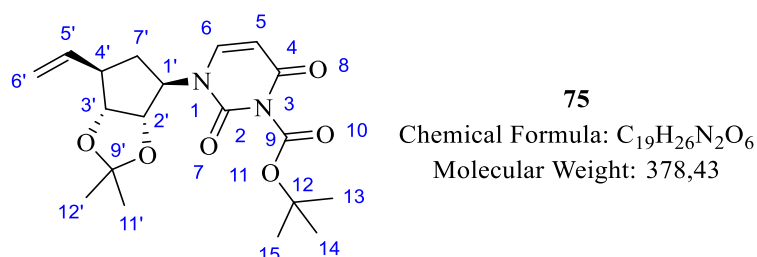
Chemical Formula: $C_9H_{12}N_2O_4$

Molecular Weight: 212,21

To a flame dried-round bottom flask, uracil (5.14 g, 45.8 mmol, 1.0 eq) and 4-(dimethylamino)pyridine (1.96 g, 16.0 mmol, 0.35 eq) were added to dry THF solution under argon atmosphere at room temperature. Then, Boc₂O (25.0 g, 114.5 mmol, 2.5 eq) was added and the reaction mixture was stirred

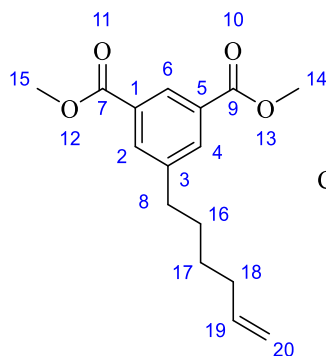
at reflux temperature for 30 min. Then, this resulting pale brown solution was concentrated to dryness *in vacuo*. Thus, the resulting oil was dissolved with a mixture of DCM:MeOH (9:1) and silica gel was added (~30 g). This suspension was stirred at reflux temperature for 20 min. Then, this was concentrated *in vacuo* and was directly purified by flash chromatography (Cyclohexane/AcOEt 4/6) to give a white solid (8.01 g, 82 %). *R*_f (DCM:MeOH 95:5) = 0.45. This product was directly used for the next step without further characterization.

tert-butyl-3-((3a*S*,4*R*,6*R*,6a*R*)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-yl)-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidine-1(2*H*)-carboxylate (75**)**



To a flame-dried round-bottom flask, *N*₃-Boc-uracil **74** (1.15 g; 5.43 mmol; 2.5 eq), triphenylphosphine (1.42 g, 5.43 mmol, 2.5 eq) and 4 Å molecular sieves (in powder) were added to an anhydrous THF (100 mL) under argon atmosphere at 0°C. DIAD (1.07 mL; 5.43 mmol; 2.5 eq) was added to the reaction and was stirred for 30 min at room temperature. Then, a solution of (3a*S*,4*S*,6*R*,6a*R*)-2,2-dimethyl-6-vinyltetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-ol **71** (0.4 g; 2.17 mmol; 1.0 eq) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred at reflux temperature for 72 h. The resulting yellow suspension was filtered and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was directly purified by flash chromatography (EP/AcOEt 7/3) to give a colorless oil (0.18 g; 22 %). *R*_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.24. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.15 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.18 Hz, H₆); 5.85 (1H, m, H_{5'}); 5.72 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.06-5.16 (2H, m, H_{6'}); 4.87 (1H, dd, *J*_{H2'-H1'} = 4.64 Hz, *J*_{H2'-H3'} = 7.32 Hz, H_{2'}); 4.47 (1H, t, *J*_{H3'-H4'} = 7.05 Hz, H_{3'}); 4.31-4.38 (1H, m, H_{1'}); 2.63 (1H, m, H_{4'}); 2.19-2.27 (2H, m, H_{7'}); 1.59 (9H, s, H₁₃/H₁₄/H₁₅); 1.51 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}); 1.28 (3H, s, H_{11'}/H_{12'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 160.5 (C₄); 148.8 (C₂); 147.8 (C₉); 143.2 (C₆); 137.5 (C_{5'}); 116.2 (C_{6'}); 113.9 (C_{9'}); 102.2 (C₅); 87.1 (C₁₂); 83.7 (C_{3'}); 82.2 (C_{2'}); 66.4 (C_{1'}); 48.2 (C_{4'}); 35.2 (C_{7'}); 27.7 (C_{11'}/C_{12'}); 27.6 (C₁₃/C₁₄/C₁₅); 25.3 (C_{11'}/C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₁₉H₂₇N₂O₆]⁺ *m/z* 379.1863 and found *m/z* 379.1869. IR (neat, cm⁻¹): 3086.4w; 2983.0w; 2936.9w; 1780.5s; 1715.5s; 1667.4s; 1628.7m; 1446.7m; 1371.1s; 1251.2s; 1206.8m; 1144.3s; 1068.4m; 993.9w; 918.1w; 864.0w; 840.9w; 800.0w; 770.5w; 735.2w; 658.6w. [α]_D²⁰ = + 60.8 (C = 0.3 M, MeOH).

dimethyl 5-(hex-5-en-1-yl)isophthalate (77)



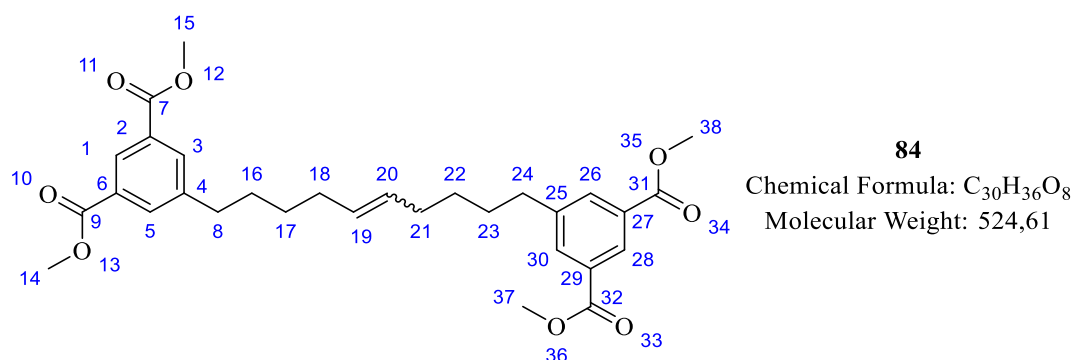
77

Chemical Formula: C₁₆H₂₀O₄

Molecular Weight: 276,33

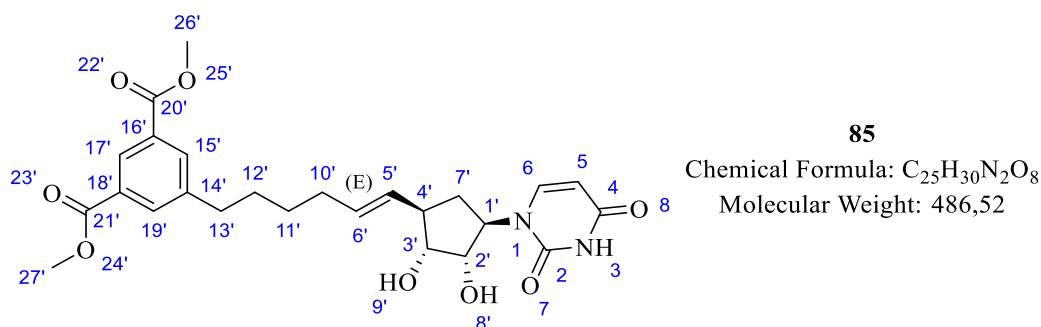
To a flame-dried round-bottom flask, oxalyl chloride (0.55 mL, 6.54 mmol, 1.4 eq) was stirred with dry DCM (30 mL) under argon atmosphere at -78°C. Then, dry DMSO (0.93 mL, 13.1 mmol, 2.8 eq) was added to the solution and this was stirred at -78°C for 15 min. Thus, a solution of dimethyl 3-(5-hydroxypentyl)isophthalate (1.31 g, 4.67 mmol, 1.0 eq) with dry DCM (10 mL) and triethylamine (3.97 mL, 28.5 mmol, 6.1 eq) were successively added. The reaction was stirred at room temperature for 16 h. When starting material was fully converted, the reaction was concentrated to dryness *in vacuo*. Then, water (30 mL) was added and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3 × 30 mL). The combined organic layer was washed once with saturated Na₂CO₃ aqueous solution (30 mL), once with brine (30 mL), then was dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness to give a slightly brown oil (1.33 g) as aldehyde product. The corresponding aldehyde **76** was directly used without further purification. To a flame-dried round-bottom flask, potassium *tert*-butoxide (0.73 g, 6.54 mmol, 1.4 eq) and 4 Å molecular sieves (small spatula) were stirred with dry THF (30 mL) under argon atmosphere at 0°C. Then, Ph₃PCH₃Br (2.50 g, 7.00 mmol, 1.5 eq) was added and the reaction was stirred at 0°C for 30 min. Thus, a solution of the corresponding aldehyde **76** (1.30 g, 4.67 mmol, 1.0 eq) in dry THF (10 mL) was added and the yellow solution was stirred at the reflux temperature for 1 h. When starting material was fully converted, the reaction was quenched at 0°C with the addition of NH₄Cl (3 g) and this was stirred for 10 min at 0°C. Thus, the reaction mixture was filtrated, washed several times with THF and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 95/5) to give a colourless oil (1.07 g, 83 % in two steps). R_f (EP/AcOEt 8:2) = 0.29. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.50 (1H, t, *J*_{H6-H2/H4} = 1.54 Hz, H₆); 8.04 (2H, d, *J*_{H2/H4-H6} = 1.55 Hz, H₂/H₄); 5.79 (1H, m, H₁₉); 4.93-5.03 (2H, m, H₂₀); 3.94 (6H, s, H₁₄/H₁₅); 2.71 (2H, t, *J*_{H8-H16} = 7.69 Hz, H₈); 2.08 (2H, q, *J*_{H17-H18} = 7.08 Hz, H₁₇); 1.67 (2H, q, *J*_{H16-H8} = 7.62 Hz, H₁₆); 1.43 (2H, q, *J*_{H18-H17} = 7.18 Hz, H₁₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.6 (C₇/C₉); 143.7 (C₃); 138.7 (C₁₉); 134.0 (C₂/C₄); 130.7 (C₁/C₅); 128.4 (C₆); 114.8 (C₂₀); 52.4 (C₁₄/C₁₅); 35.6 (C₈); 33.7 (C₁₇); 30.8 (C₁₆); 28.5 (C₁₈). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₂₁O₄]⁺ m/z 277.1434 and found m/z 277.1434. IR (neat, cm⁻¹): 3432.2w; 3077.2w; 2932.7m; 2858.4w; 1722.6s; 1640.2w; 1602.0w; 1433.6m; 1318.7m; 1236.0s; 1202.9s; 1125.9w; 1046.8w; 998.6m; 912.8w; 754.0m; 721.4w.

tetramethyl 5,5'-(dec-5-ene-1,10-diyl)diisophthalate (homodimer side product) (84)



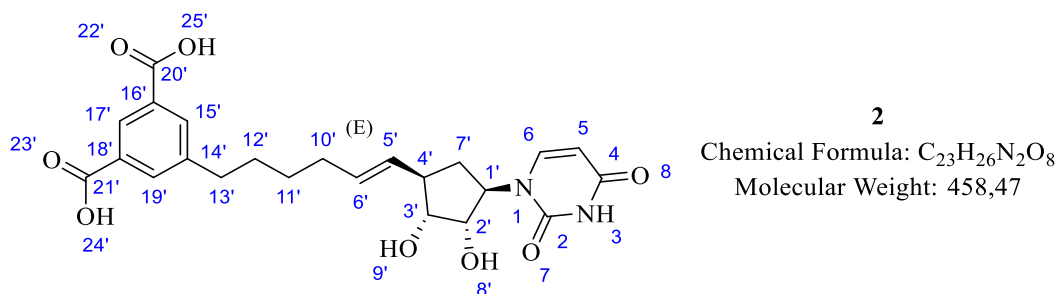
To a flame-dried round-bottom flask, *N*₃-Boc-5'-vinyl-5'-deoxy-uridine **75** (73 mg; 0.19 mmol; 1.0 eq) was stirred with dry DCM (10 mL) under argon atmosphere. Then, dimethyl 5-(hex-5-en-1-yl)isophthalate **77** (213 mg, 0.77 mmol, 4.0 eq) and one portion of hoveyda-grubbs second generation catalyst (5 × 4.6 mg, 0.04 mmol, 20 mol%) were added to the reaction and this was activated with ultrasonic irradiation at 55 °C. Then, every additional 2 hours, one portion of HG-II catalyst was added to the reaction mixture. After 24 h, the reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was directly purified by flash chromatography (EP/AcOEt 8/2) followed by a second flash chromatography (DCM/pentane 6/4 to 8/2) to give a colorless oil (91 mg, 45 %) as homodimer side product from dimethyl 5-(hex-5-en-1-yl)isophthalate. *R*_f (EP/AcOEt 8/2) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.47 (2H, t, *J*_{H1/H28-H3/H5/H26/H30} = 1.57 Hz, H₁/H₂₈); 8.02 (4H, d, *J*_{H3/H5/H26/H30-H1/H28} = 1.58 Hz, H₃/H₅/H₂₆/H₃₀); 5.31-5.41 (2H, m, H₁₉/H₂₀); 2.68 (2H, t, *J*_{H8/H24-H16/H23} = 7.52 Hz, H₈/H₂₄); 2.00 (4H, m, H₁₈/H₂₁); 1.63 (4H, m, H₁₆/H₂₃); 1.37 (4H, m, H₁₇/H₂₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.5 (C₇/C₉/C₃₁/C₃₂); 143.7 (C₄/C₂₅); 133.9 (C₃/C₅/C₂₆/C₃₀); 130.6 (C₂/C₆/C₂₇/C₂₉); 130.4 (C₁₉/C₂₀); 128.3 (C₁/C₂₈); 52.5 (C₁₄/C₁₅/C₃₇/C₃₈); 35.5 (C₈/C₂₄); 32.4 (C₁₈/C₂₁); 30.8 (C₁₆/C₂₃); 29.1 (C₁₇/C₂₂). ESI-HRMS calculated for [C₃₀H₃₈O₈]⁺ *m/z* 525.2482 and found *m/z* 525.2473. IR (neat, cm⁻¹): 3432.2w; 3077.2w; 2932.7m; 2858.4w; 1722.6s; 1640.2w; 1602.0w; 1433.6m, 1318.7m; 1236.0s; 1202.9s; 1125.9w; 1046.8w; 998.6m; 912.8w; 786.3w; 754.0m; 721.4w.

Dimethyl-5-((E)-6-((1*R*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-2,3-dihydroxy-cyclopentyl)hex-5-en-1-yl)isophthalate (85)



To a flame-dried round-bottom flask, *N*₃-Boc-5'-vinyl-5'-deoxy-uridine **75** (70 mg; 0.18 mmol; 1.0 eq) was stirred with dry DCM (10 mL) under argon atmosphere at reflux temperature. A solution of dimethyl 5-(hex-5-en-1-yl)isophthalate **77** (51.1 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq) with dry DCM (10 mL) was prepared and this solution was divided into ten portion (10 × 1 mL) and one portion was added to the reaction mixture at the beginning and every additional 2 hours. At the beginning of this reaction, one portion of Hoveyda-Grubbs second generation catalyst (5 × 4.6 mg, 0.04 mmol, 20 mol%) was added to the reaction. Then, every additional 4 hours, one portion of HG-II catalyst was added to the reaction. After 5 days, the reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The residue was directly purified by flash chromatography (EP/AcOEt 7/3) to give a pale brown oil with some impurities. This impure compound was directly used for the next deprotection step. This residue was stirred with a solution of TFA/H₂O 9:1 (4 mL) for 20 min. Then, the reaction was stopped and concentrated to dryness *in vacuo*. The resulting crude was directly purified by flash chromatography (DCM/MeOH 9/1) to give a white solid (16.2 mg; 18 % in two steps). *R*_f (DCM/MeOH 9/1) = 0.33. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.57 (1H, s, *N*-H₃); 8.48 (1H, t, *J*_{H17'-H15'/H19'} = 1.56 Hz, H_{17'}); 8.03 (2H, d, *J*_{H15'/H19'-H17'} = 1.55 Hz, H_{15'}/H_{19'}); 7.24 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.22 Hz, H₆); 5.71 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.06 Hz, H₅); 5.55 (1H, dd, *J*_{H6'/H5'} = 13.5 Hz, *J*_{H6'/H10'} = 8.35 Hz, H_{6'}); 5.44 (1H, m, H_{5'}); 4.45 (1H, s, *O*-H₉); 4.23 (1H, s, *O*-H₈); 3.93 (6H, s, H_{26'/H27'}); 2.70 (2H, t, *J*_{H13'-H12'} = 7.68 Hz, H_{13'}); 2.60 (1H, m, H_{4'}); 2.34 (1H, t, *J*_{H1'-H2'/H7'} = 7.53 Hz, H_{1'}); 2.19 (1H, m, H_{3'}); 2.07 (2H, m, H_{10'}); 1.58-1.74 (4H, m, H_{7'/H12'}); 1.41 (2H, m, H_{11'}); 1.29 (1H, m, H_{2'}). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.7 (C_{20'/C21'}); 163.8 (C₄); 151.5 (C₂); 143.7 (C_{14'}); 143.3 (C₆); 134.0 (C_{15'/C19'}); 132.1 (C_{6'}); 130.7 (C_{16'/C18'}); 130.5 (C_{5'}); 128.4 (C_{17'}); 102.6 (C₅); 52.5 (C_{26'/C27'}); 46.4 (C_{4'}); 35.3 (C_{13'}); 34.0 (C_{1'}); 32.2 (C_{10'}); 31.3 (C_{3'}); 30.5 (C_{7'}); 29.2 (C_{2'}); 28.5 (C_{11'}); 24.9 (C_{12'}). ESI-HRMS calculated for [C₂₅H₃₂N₂O₈]⁺ *m/z* 487.2074 and found *m/z* 487.2071. IR (neat, cm⁻¹): 3404.2*br*; 3190.0*br*; 2953.8*m*; 2916.2*s*; 2848.7*s*; 1693.9*s*; 1462.8*m*, 1432.7*m*; 1379.3*w*; 1313.1*w*; 1241.2*m*; 1205.1*m*; 1124.0*w*; 1036.8*w*; 999.4*w*; 967.8*w*; 913.7*w*; 810.6*w*; 754.7*m*. [α]_D²⁰ = + 49.3 (C = 0.2 M, MeOH).

5-((*E*)-6-((1*R*,2*R*,3*S*,4*R*)-4-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-2,3-dihydroxycyclopentyl)hex-5-en-1-yl)isophthalic acid (2**)**



To a solution of dimethyl ester substituted uridine **85** (35 mg; 0.07 mmol; 1.0 eq) with THF:H₂O 3:1 (3 mL), lithium hydroxide monohydrate (48.3 mg, 1.15 mmol, 16.0 eq) was added and the reaction

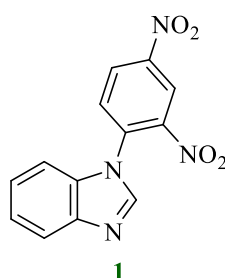
mixture was stirred at room temperature for 24 h. The reaction was then quenched with aqueous HCl 1 M solution to pH 1 and this was concentrated to dryness *in vacuo* with co-evaporation with MeOH. The resulting residue was directly purified by flash chromatography (H₂O/*i*PrOH/AcOEt 1:6:3) followed by a co-evaporation with MeOH of the purified product to remove residual water. Thus, a second flash chromatography (Acetone/H₂O 95:5 to 90:10) was used to give a pure product as a white solid (13.6 mg; 41 %). R_f (H₂O/*i*PrOH/AcOEt 1:6:3) = 0.38. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 11.27 (1H, s, *N*-H₃); 8.28 (1H, s, H₁₇); 7.79 (2H, s, H₁₅/H₁₉); 7.74 (1H, d, *J*_{H6-H5} = 8.18 Hz, H₆); 5.67 (1H, d, *J*_{H5-H6} = 8.14 Hz, H₅); 5.33-5.50 (2H, m, H₅/H₆); 2.71 (2H, t, *J*_{H13'-H12'} = 7.61 Hz, H₁₃); 2.51 (1H, m, H₄); 2.23 (1H, t, *J*_{H1'-H2'/H7'} = 7.49 Hz, H₁); 2.09 (1H, m, H₃); 1.98 (2H, m, H₁₀); 1.40-1.59 (4H, m, H₇/H₁₂); 1.29 (2H, m, H₁₁); 1.20 (1H, m, H₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.7 (C₂₀/C₂₁); 163.7 (C₄); 151.3 (C₂); 144.9 (C₁₄); 142.0 (C₆); 132.1 (C₁₅/C₁₉); 132.0 (C₁₆/C₁₈); 131.2 (C₆); 130.6 (C₅); 128.4 (C₁₇); 102.6 (C₅); 46.0 (C₄); 35.2 (C₁₃); 32.1 (C₁); 32.2 (C₁₀); 31.2 (C₃); 30.5 (C₇); 29.1 (C₂); 28.6 (C₁₁); 24.9 (C₁₂). ESI-HRMS calculated for [C₂₃H₂₇N₂O₈]⁺ *m/z* 458.1712 and found *m/z* 458.1713. IR (neat, cm⁻¹): 3330.1*br*; 2929.4*br*; 2936.8*m*; 2879.2*s*; 1672.8*s*; 1599*w*; 1458.3*m*; 1432.7*m*; 1381.1*w*; 1319.5*w*; 1237.5*m*; 1206.7*m*; 1133.1*w*; 1022.9*w*; 1006.4*w*; 909.2*w*; 824.1*w*; 754.7*m*; 720.1*w*. [α]_D²⁰ = + 11.2 (C = 0.1 M, H₂O).

Chapitre annexe

Chapitre annexe : Synthèse d'analogues indoliques visant les Mur ligases.

I Principes et Généralités

La collaboration avec le professeur Urmi Bajpai de l'Université de New Delhi nous a permis de mettre à jour un composé chimique **1** actif contenant des groupements nitros (Figure 1). Son activité biologique a été évaluée très encourageante avec une IC₅₀ de 39 µM contre le mélange de Mur ligases (« one-pot » de MurA-F). Les évaluations biologiques complémentaires sont en cours afin de l'évaluer sur chaque enzyme Mur ligases sa potentielle multi-inhibition. En complément, cet hétérocycle **1** est également en train d'être évalué sur des souches bactériennes.



IC₅₀ (*Mycobacterium tuberculosis* MurA-F) = 39 µM

Figure 1 : Structure de composé **1**

Cette structure de type phényle-benzimidazole est considéré comme un substrat sélectif du site de liaison de l'ATP sur certaines enzymes.¹ Compte tenu de la structure du dérivé **1**, notre choix s'est porté sur une structure très proche du benzo-imidazole de structure indolique. En effet, l'indole est une structure présente dans nombreux produits naturels et sa synthèse est connue depuis plus de 70 ans.² A l'heure actuelle, plusieurs structures indoliques ont été développées contre des infections

¹ Palmer, B.D.; Smaill, J.B.; Boyd, M.; Boschelli, D.H.; Doherty, A.M.; Hamby, J.M.; Khatana, S.S.; Kramer, J.B.; Kraker, A.J.; Panek, R.L.; Lu, G.H.; Dahring, T.K.; Winters, R.T.; Hollis Showalter, H.D.; Denny, W.A. Structure-activity relationships for 1-phenylbenzimidazoles as selective ATP site inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5457-5465.

² (a) Van Order, R.B.; Lindwall, H.G. Indole. *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 69-96; (b) Taber, D.F.; Tirunahari, P.K. Indole synthesis: a review and proposed classification *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7195-7210; (c) Ziarani, G.M.; Moradi, R.; Ahmadi, T.; Lashgari, N. Recent advances in the application of indoles in multicomponent reactions *RSC Adv.* **2018**, *8*, 12069-12103.

virales,³ en thérapie tumorale,⁴ anti vasculaire⁵ mais aussi contre les infections bactériennes⁶. De récentes études ont montré que certains analogues indoliques ont des propriétés antibactériennes contre des souches bactériennes multi-résistantes.⁷ Sur cette base, nous avons décidé d'élaborer une librairie de molécules pour les tester contre les Mur ligases. L'optimisation de la synthèse n'est ici absolument pas prioritaire, seule la facilité d'obtention des composés compte avec une synthèse très courte. Structuellement, nous nous sommes basé sur une conception raisonnée proche de la structure de l'hétérocycle **1** (Figure 2).

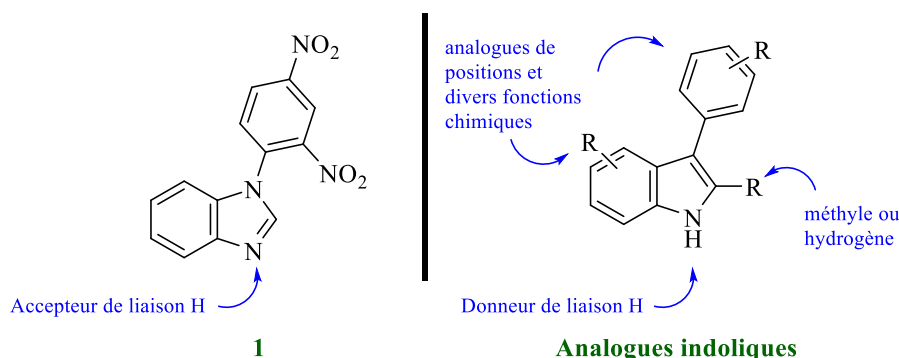


Figure 2 : Principe rationnel de fonctionnalisations des analogues indoliques

Pour les dérivés indoliques, nous avons effectué trois variations sur la structure chimique. La première est de modifier la position 1 de l'azote de par la structure de l'indole de base qui devient donneur de liaison H au lieu d'accepteur de liaison d'hydrogène. Ce changement a pour but d'évaluer après les

³ (a) Zhang, X.; Zhang, G.-N.; Wang, Y.; Zhu, M.; Wang, J.; Li, Z.; Li, D.; Cen, S.; Wang, Y. Synthesis and biological evaluation of substituted indole and its analogs as influenza A virus inhibitors *Chem. Biodiv.* **2018**, *16*, e1800577; (b) Olgen, S. Recent development of new substituted indole and azaindole derivatives as anti-HIV agents *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1700-1708.

⁴ (a) MacDonough, M.T.; Strecker, T.E.; Hamel, E.; Hall, J.J.; Chaplin, D.J.; Trawick, M.L.; Pinney, K.G. Synthesis and biological evaluation of indole-based, anti-cancer agents inspired by the vascular disrupting agent 2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-3-(3'', 4'', 5''-trimethoxybenzoyl)-6-methoxyindole (OXi8006) *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6831-6843; (b) Zhao, F.; Li, J.; Chen, Y.; Tian, Y.; Wu, C.; Xie, Y.; Zhou, Y.; Wang, J.; Xie, X.; Liu, H. Design, synthesis, and biological evaluation of indoline and indole derivatives as potent and selective α_{1A} -adrenoceptor antagonists *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3826-3839; (c) Li, W.; Shuai, W.; Sun, H.; Xu, F.; Bi, Y.; Xu, J.; Ma, C.; Yao, H.; Zhu, Z.; Xu, S. Design, synthesis, and biological evaluation of quinolone-indole derivatives as anti-tubulin agents targeting the colchicine binding site *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 428-442.

⁵ (a) Segaooula, Z.; Leclercq, J.; Verones, V.; Flouquet, N.; Lecoœur, M.; Ach, L.; Renault, N.; Barczyk, A.; Melnyk, P.; Berthelot, P.; Thuru, X.; Lebegue, N. Synthesis and biological evaluation of *N*-[2-(4-hydroxyphenylamino)-pyridin-3-yl]-4-methoxybenzenesulfonamide (ABT-751) tricyclic analogues as antimetabolic and antivascular agents with potent *in vivo* antitumor activity *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8422-8440; (b) Ty, N.; Dupeyre, G.; Chabot, G.G.; Seguin, J.; Tillequin, F.; Scherman, D.; Michel, S.; Cachet, X. Synthesis and biological evaluation of new disubstituted analogues of 6-methoxy-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-1*H*-indole (BPRoLo75), as potential antivascular agents *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7494-7503.

⁶ (a) Yuan, W.; Yu, Z.; Song, W.; Li, Y.; Fang, Z.; Zhu, B.; Li, X.; Wang, H.; Hong, W.; Sun, N. Indole-core based novel antibacterial agent targeting FtsZ *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2283-2296; (b) Ashraf, K.; Yasrebi, K.; Adeniyi, E.T.; Hertlein, T.; Ohlsen, K.; Lalk, M.; Erdmann, F.; Hilgeroth, A. Antistaphylococcal evaluation of indole-naphthalene hybrid analogs *Drug Des. Dev. Ther.* **2019**, *13*, 275-283; (c) Sayed, M.; El-dean, A.M.K.; Ahmed, M.; Hassanien, R. Synthesis of some heterocyclic compounds derived from indole as antimicrobial agents *Syn. Comm.* **2018**, *48*, 413-421; (d) Altuntas, T.G.; Yilmaz, N.; Ece, A.; Altanlar, N.; Olgen, S. *In vitro* antibacterial and antifungal activity and computational evaluation of novel indole derivatives containing 4-substituted piperazine moieties *Lett. Drug Des. Discov.* **2018**, *15*, 1079-1086.

⁷ Hong, W.; Li, J.; Chang, Z.; Tan, X.; Yang, H.; Ouyang, Y.; Yang, Y.; Kaur, S.; Paterson, I.C.; Ngeow, Y.F.; Wang, H. Synthesis and biological evaluation of indole core-based derivatives with potent antibacterial activity against resistant bacterial pathogens *The J. of Antibiotics* **2017**, *70*, 832-844.

essais biologiques si cette modification favorise l'inhibition de ces analogues. Ensuite, le deuxième changement est de moduler les positions 2 et 3 qui sont assez réactives, notamment pour réaliser des arylations par activation C-H. L'ajout d'un méthyle permet d'être plus sélectif de la position 3 sur la structure de l'indole. Et enfin, la dernière modification consiste à faire varier les positions ou la nature des groupements que l'on apporte sur la molécule avec au moins un groupement nitro sur la structure.

II Synthèse des dérivés indoliques

A. Rétrosynthèse

La synthèse des analogues indoliques suit la rétrosynthèse ci-dessous (Schéma 1). A partir de dérivés indoles **A** et de nitro-arènes **B**, on réalise en une étape d'arylation C-H par le couplage oxydant intermoléculaire pour créer une liaison C-C.

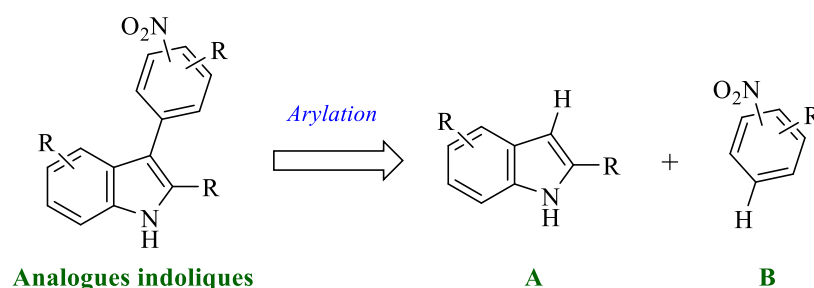


Schéma 1 : Rétrosynthèse des analogues indoliques

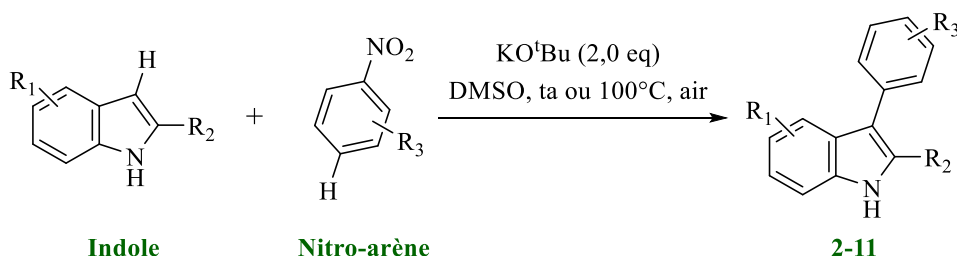
La plupart des méthodes de synthèse utilisent une catalyse par un métal de transition pour obtenir ce type de composés finaux. Cependant, l'équipe de recherche de Kumar a récemment développé une méthode plus simple sans métaux de transition à l'air ambiant capable de synthétiser ce type d'indoles contenant des nitro-aryles.⁸

B. Synthèse des dérivés indoliques

Cette synthèse a donc été appliquée aux divers nitro-arènes substitués que nous avons à disposition au sein du laboratoire (Tableau 1). Les diverses substitutions sur le phényle de la structure de l'indole et le choix des nitro-arènes avaient pour but d'explorer les possibilités d'interactions avec le site actifs des Mur ligases en particulier avec le domaine 2 responsable de la reconnaissance de l'ATP. Les rendements obtenus des dérivés indoliques **2-11** sont plutôt faibles à modestes (13-59 %). Pour obtenir les composés purs, nous avons effectués deux colonnes chromatographiques sur silice en phase normale car la séparation était assez complexe avec seulement une seule colonne. A noter qu'il est possible que la réaction forme d'autres sous-produits tels que des régioisomères avec une

⁸ Kumar, S.; Rathore, V.; Verma, A.; Prasad, C.D.; Kumar, A.; Yadav, A.; Jana, S.; Sattar, M.; Meenakshi, Kumar, S. KO^tBu-mediated aerobic transition-metal-free regioselective β -arylation of indoles: synthesis of β -(2-/4-nitroaryl)-indoles *Org. Lett.* **2015**, 17, 82-85.

position différente sur le nitro-arène. Le groupement nitro favorise plutôt un couplage C-C en position *para* du nitro mais il est possible, quand le nitro-arène le permet, de former d'autres produits comme en position *ortho* par exemple. En effet, Kumar et coll. ont montré qu'il était possible de favoriser la formation d'une liaison C-C en position *ortho* avec un groupement CF₃ en *para* d'un nitro-phényle. Cependant, nous avons isolé dans notre cas que le produit majoritaire sur CCM.



Analogues	Rdt	Analogues	Rdt	Analogues	Rdt
	16 %		24 %		51 %
	21 %		34 %		
	37 %		26 %		59 %
	13 %		56 %		

Tableau 1 : Synthèse des dérivés indoliques 2-11

Ci-dessous, les auteurs proposent un mécanisme plausible pour ce type de réaction en milieu basique (Schéma 2). L'indole **A** est déprotoné en présence de *tert*-butoxyde de potassium pour former l'anion **B**. La migration par résonance de la charge négative de l'anion **B** s'effectue de la position 1 vers la

position 3 indolique. Ensuite, l'attaque nucléophile conduit au composé substitué **C** en *para* si le nitro-arène n'est pas substitué en cette position, auquel cas le composé obtenu sera substitué en position *ortho*. La charge négative présente sur le cycle va migrer sur le groupement nitro. Ensuite, l'intermédiaire **D** qui interagit avec le dioxygène de l'air ambiant présent dans le milieu, va transférer un atome d'hydrogène sur le dioxygène par la formation d'un radical hydropéroxyde qui se lie ensuite vers l'intermédiaire **E**. La charge négative présente sur le groupement nitro va subir une cascade électronique qui permet de réaromatiser le cycle pour conduire à la structure de **F**. Enfin, le composé souhaité **G** est obtenu par une dernière tautomérisation *via* une migration 1,3 de l'hydrogène sur l'intermédiaire **F**. Les auteurs ont montré que la réaction à un rendement diminué lorsque le milieu est sous atmosphère inerte. La réaction fonctionne tout de même puisque le DMSO peut aussi jouer le rôle d'oxydant.

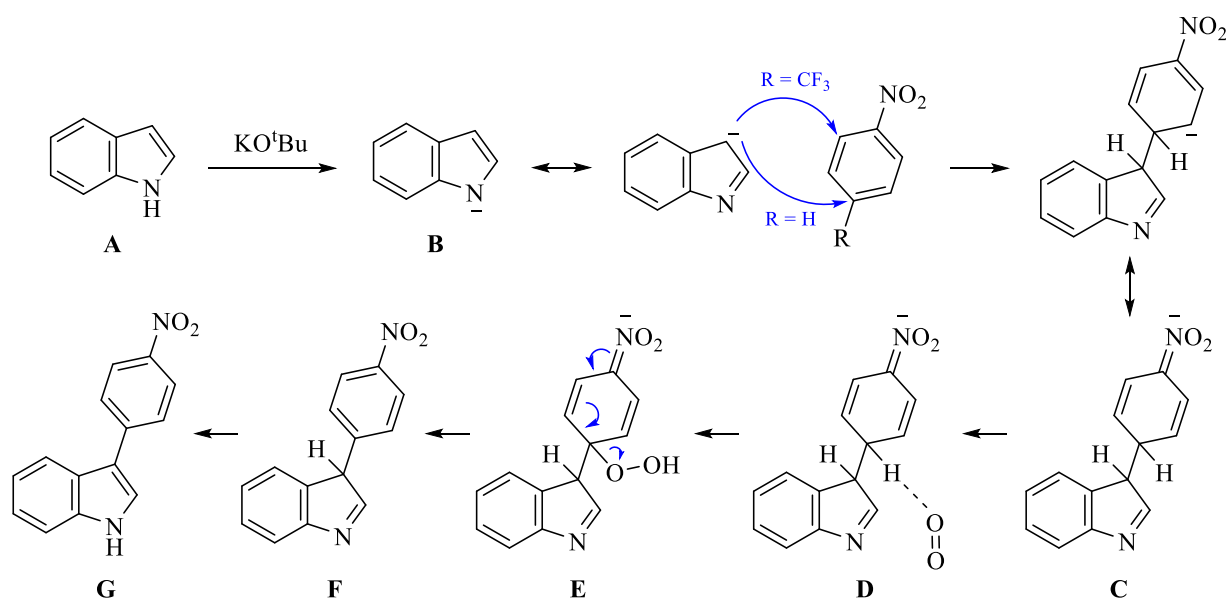


Schéma 2 : Mécanisme plausible de l'arylation par activation C-H

C. Evaluations biologiques

Après avoir obtenu une série d'analogues indoliques, nous avons réalisé un test enzymatique pour chaque analogue **2-11** sur le mélange de MurA-F avec une concentration de 100 μ M comme pour les familles I et II précédentes (Tableau 2). Cependant, les résultats d'inhibitions obtenus sont faussés par une interférence durant la mesure d'absorbance et ne sont donc pas interprétable. En effet, les dérivés indoliques sont des composés colorés et ne permettent pas une lecture correcte d'absorbance en présence du réactif utilisé « Colorlock™ » utilisé pour la détection du phosphate inorganique libéré.

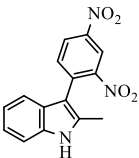
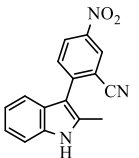
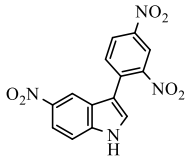
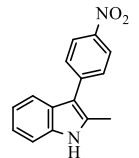
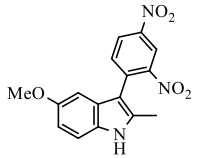
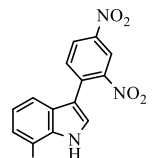
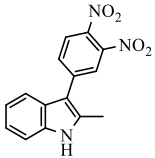
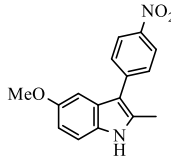
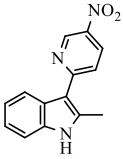
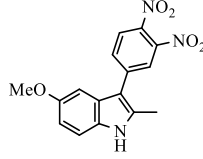
Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.	Analogues	Inhib.
	0 %		14 %		0 %
	1 %		0 %		0 %
	0 %		0 %		
	3 %		0 %		

Tableau 2 : Activité biologiques sur le mélange MurA-F à 100µM

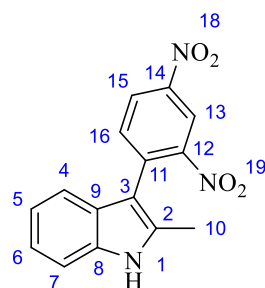
D. Conclusion

Nous avons donc synthétisé dix composés avec un rendement de 13 à 59 % en une seule étape. Le potentiel de ces composés contre les Mur ligases nécessiterait d'autres essais biologiques sans interférence.

Experimental part of Chapter annexe

3-(2,4-dinitrophenyl)-2-methyl-1H-indole (2)

CAS : 857776-33-1



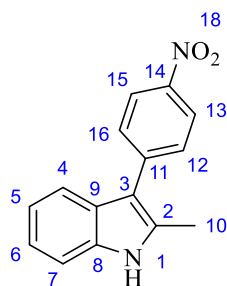
2

Chemical Formula: $C_{15}H_{11}N_3O_4$
Molecular Weight: 297,27

Potassium *ter*-butoxide (513 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 2-methylindole (300 mg, 2.28 mmol, 1.0 eq) and 1,3-dinitrobenzene (769 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) in DMSO (4 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-purple solution was stirred for 5 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated $NaHCO_3$ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 1/1) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 8/2) to give a red solid (0.11 g, 16 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.21. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.84 (1H, m, H_{13}); 8.48 (1H, d, $J_{H_{15}-H_{16}} = 8.65$ Hz, H_{15}); 8.21 (1H, s, $N-H_1$); 7.78 (1H, d, $J_{H_{16}-H_{15}} = 8.65$ Hz, H_{16}); 7.37 (1H, d, $J_{H_7-H_6} = 8.07$ Hz, H_7); 7.30 (1H, d, $J_{H_4-H_5} = 7.91$ Hz, H_4); 7.22 (1H, t, $J_{H_6-H_5} = 7.10$ Hz, H_6); 7.14 (1H, t, $J_{H_5-H_4} = 7.59$ Hz, H_5); 2.39 (3H, s, H_{10}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 149.6 (C_{12}); 146.1 (C_{11}); 136.9 (C_{14}); 135.4 (C_9); 134.6 (C_{16}); 134.1 (C_2); 127.2 (C_8); 126.5 (C_{15}); 122.8 (C_6); 121.3 (C_5); 120.7 (C_{13}); 117.8 (C_4); 111.1 (C_7); 108.7 (C_3); 12.7 (C_{10}). ESI-HRMS calculated for $[C_{15}H_{12}N_3O_4]^+$ m/z 298.0822 and found m/z 298.0821. IR (neat, cm^{-1}): 3383.1s; 3077.7w; 2926.1w; 2851.7w; 1594.5m; 1555.5w; 1519.9s; 1487.1w; 1462.2m; 1426.0w; 1396.4w; 1337.6s; 1263.8w; 1244.2w; 1185.3w; 1146.1w; 1125.9w; 1070.9w; 1022.2w; 987.2w; 905.8w; 832.4w; 745.0m; 711.5w.

2-methyl-3-(4-nitrophenyl)-1H-indole (3)

CAS : 2013-84-5



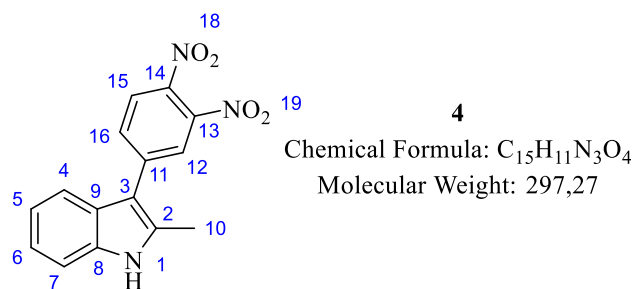
3

Chemical Formula: $C_{15}H_{12}N_2O_2$
Molecular Weight: 252,27

Potassium *ter*-butoxide (513 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 2-methylindole (300 mg, 2.28 mmol, 1.0 eq) and nitrobenzene (0.47 mL, 4.57 mmol, 2.0 eq) in DMSO (4 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-purple solution was stirred for 7 h. The

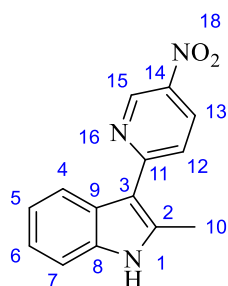
reaction mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 8/2) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/DCM 1/1) to give an orange solid (0.12 g, 21 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.18. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.32 (2H, m, H₁₃/H₁₅); 8.14 (1H, s, *N*-H₁); 7.67 (3H, m, H₄/H₁₂/H₁₆); 7.37 (1H, m, H₇); 7.14-7.25 (2H, m, H₆/H₅); 2.57 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 145.7 (C₁₁); 143.1 (C₁₄); 135.5 (C₉); 133.2 (C₂); 129.5 (C₁₂/C₁₆); 127.2 (C₈); 124.1 (C₁₃/C₁₅); 122.5 (C₆); 121.0 (C₅); 118.5 (C₄); 113.1 (C₃); 110.8 (C₇); 13.0 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₁₃N₂O₂]⁺ m/z 253.0971 and found m/z 253.0969. IR (neat, cm⁻¹): 3362.8s; 1588.3s; 1545.1m; 1503.2s; 1481.1m; 1458.9s; 1428.0m; 1316.6s; 1262.4s; 1178.1m; 1105.4m; 1026.7m; 987.2m; 920.9w; 849.4m; 740.4m; 701.9m; 629.6w.

3-(3,4-dinitrophenyl)-2-methyl-1H-indole (4)



Potassium *ter*-butoxide (513 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 2-methylindole (300 mg, 2.28 mmol, 1.0 eq) and 1,2-dinitrobenzene (769 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) in DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark solution was stirred for 8 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 1/1) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 8/2) to give a red solid (0.25 g, 37 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.16. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.25 (1H, s, *N*-H₁); 8.09 (1H, d, *J*_{H16-15} = 8.44 Hz, H₁₆); 7.94 (1H, m, H₁₂); 7.83 (1H, d, *J*_{H15-H16} = 8.46 Hz, H₁₅); 7.65 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 7.66 Hz, H₇); 7.39 (1H, d, *J*_{H4-H5} = 7.77 Hz, H₄); 7.26 (1H, t, *J*_{H6-H5} = 7.68 Hz, H₆); 7.22 (1H, t, *J*_{H5-H4} = 7.68 Hz, H₅); 2.60 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 144.4 (C₁₃); 143.3 (C₁₁); 139.0 (C₁₄); 135.4 (C₉); 134.3 (C₂); 132.1 (C₁₅); 126.6 (C₈); 125.9 (C₁₆); 124.4 (C₁₂); 123.1 (C₆); 121.6 (C₅); 118.0 (C₇); 111.3 (C₃); 111.1 (C₄); 13.1 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₅H₁₂N₃O₄]⁺ m/z 298.0822 and found m/z 298.0821. IR (neat, cm⁻¹): 3418.4m; 3381.7m; 1600.5m; 1583.8w; 1573.3w; 1538.6m; 1513.6s; 1456.7m; 1426.8m; 1334.6s; 1264.2m; 1185.6m; 1141.8w; 1069.4w; 1033.6w; 997.9w; 879.7w; 843.2m; 739.6m; 692.0w.

2-methyl-3-(5-nitropyridin-2-yl)-1H-indole (5)



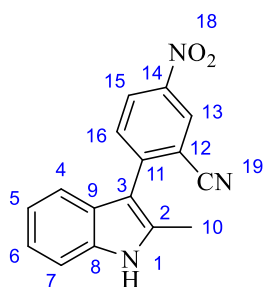
5

Chemical Formula: $C_{14}H_{11}N_3O_2$

Molecular Weight: 253,26

Potassium *ter*-butoxide (257 mg, 2.29 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 2-methylindole (150 mg, 1.14 mmol, 1.0 eq) and 3-nitropyridine (212 mg, 1.71 mmol, 1.5 eq) in DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-brown solution was stirred for 5 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated $NaHCO_3$ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 1/1 to 3/7) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 8/2) to give an orange solid (38 mg, 13 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.15. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.51 (1H, d, $J_{H_{15}-H_{13}} = 2.19$ Hz, H_{15}); 8.49 (1H, dd, $J_{H_{13}-H_{15}} = 2.30$ Hz, $J_{H_{13}-H_{12}} = 8.79$ Hz, H_{13}); 8.31 (1H, s, $N-H_1$); 8.04 (1H, m, H_4); 7.78 (1H, d, $J_{H_{12}-H_{13}} = 8.86$ Hz, H_{12}); 7.38 (1H, m, H_7); 7.22-7.26 (2H, m, H_6/H_5); 2.79 (3H, s, H_{10}). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 161.4 (C_{15}); 145.5 (C_{15}); 140.6 (C_3); 138.5 (C_{14}); 135.4 (C_9); 131.3 (C_{13}); 126.9 (C_8); 122.8 (C_6); 121.8 (C_5); 121.4 (C_{12}); 119.7 (C_4); 112.6 (C_2); 111.0 (C_7); 14.7 (C_{10}). ESI-HRMS calculated for $[C_{14}H_{12}N_3O_2]^+$ m/z 254.0924 and found m/z 254.0923. IR (neat, cm^{-1}): 3323.8s; 1586.8s; 1572.0s; 1532.9m; 1490.1s; 1468.8s; 1454.8s; 1433.6s; 1316.7s; 1278.7s; 1262.2s; 1184.8m; 1157.9w; 1119.4m; 1106.5m; 1037.3w; 992.6m; 827.6w; 774.7w; 747.8m; 717.3m; 666.3w.

2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-5-nitrobenzonitrile (6)



6

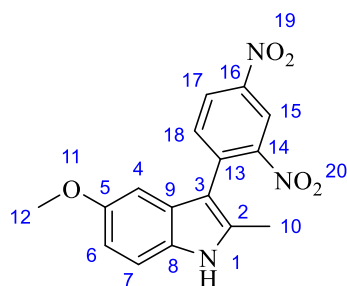
Chemical Formula: $C_{16}H_{11}N_3O_2$

Molecular Weight: 277,28

Potassium *ter*-butoxide (513 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 2-methylindole (300 mg, 2.28 mmol, 1.0 eq) and 3-nitrobenzonitrile (677 mg, 4.57 mmol, 2.0 eq) in DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark solution was stirred for 6 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated $NaHCO_3$ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over

Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 35/65) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 8/2) to give an orange solid (0.15 g, 24 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.18. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.67 (1H, d, *J*_{H13-H15} = 1.89 Hz, H₁₃); 8.49 (1H, dd, *J*_{H15-H13} = 1.89 Hz, *J*_{H15-H16} = 8.65 Hz, H₁₅); 8.30 (1H, s, *N*-H₁); 7.83 (1H, d, *J*_{H16-H15} = 8.77 Hz, H₁₆); 7.45 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 7.80 Hz, H₇); 7.40 (1H, d, *J*_{H4-H5} = 8.03 Hz, H₄); 7.25 (1H, t, *J*_{H6-H7} = 7.87 Hz, H₆); 7.18 (1H, t, *J*_{H5-H6} = 7.55 Hz, H₅); 2.53 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 146.3 (C₁₄); 145.9 (C₁₁); 135.5 (C₉); 135.1 (C₂); 132.7 (C₁₆); 129.1 (C₁₃); 127.3 (C₈); 127.2 (C₁₅); 123.0 (C₆); 121.3 (C₅); 118.2 (C₇); 117.3 (C₂₀); 114.0 (C₁₂); 111.0 (C₄); 110.5 (C₃); 13.7 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₂N₃O₂]⁺ m/z 278.0924 and found m/z 278.0922. IR (neat, cm⁻¹): 3329.8s; 2234.7m; 1605.2m; 1572.0m; 1554.6m; 1515.1s; 1494.3s; 1455.7s; 1427.0w; 1342.0s; 1266.9w; 1245.0m; 1191.2w; 1179.6w; 1019.3w; 987.4w; 896.2w; 792.7w; 764.8m; 742.8w; 726.0w; 679.3w.

3-(2,4-dinitrophenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole (7)



7

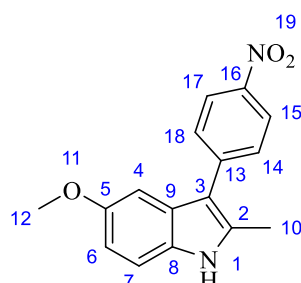
Chemical Formula: C₁₆H₁₃N₃O₅
Molecular Weight: 327,30

Potassium *ter*-butoxide (417 mg, 3.72 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 5-methoxy-2-methylindole (300 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq) and 1,2-dinitrobenzene (626 mg, 3.72 mmol, 2.0 eq) in DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-purple solution was stirred for 24 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 4/6 to 3/7) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 75/25) to give a red solid (0.21 g, 34 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.15. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.82 (1H, d, *J*_{H15-H17} = 1.52 Hz, H₁₅); 8.47 (1H, dd, *J*_{H17-H15} = 1.62 Hz, *J*_{H17-H18} = 8.56 Hz, H₁₇); 8.14 (1H, s, *N*-H₁); 7.76 (1H, d, *J*_{H18-H17} = 8.51 Hz, H₁₈); 7.24 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 8.78 Hz, H₇); 6.85 (1H, dd, *J*_{H6-H4} = 1.52 Hz, *J*_{H6-H7} = 8.70 Hz, H₆); 6.72 (1H, d, *J*_{H4-H6} = 1.44 Hz, H₄); 3.78 (3H, s, H₁₂); 2.37 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 155.4 (C₅); 149.6 (C₁₄); 146.0 (C₁₃); 137.0 (C₁₆); 134.7 (C₂); 134.5 (C₁₈); 130.3 (C₉); 127.6 (C₈); 126.6 (C₁₇); 120.7 (C₁₅); 112.6 (C₆); 111.8 (C₇); 108.6 (C₃); 99.9 (C₄); 55.9 (C₁₂); 12.7 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₄N₃O₅]⁺ m/z 328.0927 and found m/z 328.0929. IR (neat, cm⁻¹): 3416.6s; 2930.3w; 2832.7w; 1594.2s; 1512.1w;

1487.8s; 1442.1m; 1422.4m; 1331.3s; 1280.6w; 1245.4w; 1217.7m; 1145.0m; 1115.8w; 1069.5w; 1029.9w; 988.5w; 960.9w; 901.7w; 834.0w; 814.0w; 796.0w; 734.6w; 707.8w; 680.2w.

5-methoxy-2-methyl-3-(4-nitrophenyl)-1H-indole (8)

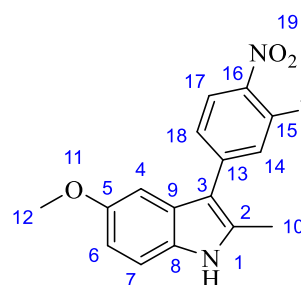
CAS : 1639940-33-2



8
Chemical Formula: C₁₆H₁₄N₂O₃
Molecular Weight: 282,30

Potassium *ter*-butoxide (417 mg, 3.72 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 5-methoxy-2-methylindole (300 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq) and nitrobenzene (0.38 mL, 3.72 mmol, 2.0 eq) in DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-purple solution was stirred for 24 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/DCM 4/6) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 75/25) to give an orange solid (0.14 g, 26 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.18. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.32 (2H, d, *J*_{H15/H17-H14/H18} = 8.39 Hz, H₁₅/H₁₇); 8.09 (1H, s, *N*-H₁); 7.65 (2H, d, *J*_{H14/H18-H15/H17} = 8.21 Hz, H₁₄/H₁₈); 7.26 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 8.71 Hz, H₇); 7.13 (2H, s, H₄); 6.87 (1H, d, *J*_{H6-H7} = 8.71 Hz, H₆); 3.84 (3H, s, H₁₂); 2.54 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 155.2 (C₅); 145.6 (C₁₃); 143.3 (C₁₆); 134.0 (C₂); 130.5 (C₉); 129.3 (C₁₄/C₁₈); 127.7 (C₈); 124.2 (C₁₅/C₁₇); 112.9 (C₃); 112.0 (C₆); 111.5 (C₇); 101.0 (C₄); 56.1 (C₁₂); 13.1 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₅N₂O₃]⁺ *m/z* 283.1077 and found *m/z* 283.1076. IR (neat, cm⁻¹): 3353.6s; 1593.3s; 1499.8s; 1447.6m; 1323.0s; 1221.2m; 1147.5m; 1109.6m; 1026.1w; 991.6w; 852.9w; 807.9w; 759.9m; 703.7w.

3-(3,4-dinitrophenyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole (9)

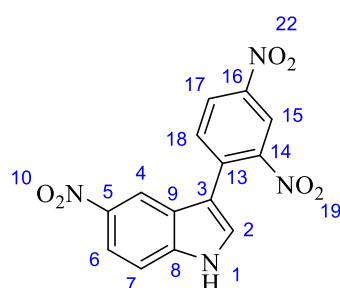


9
Chemical Formula: C₁₆H₁₃N₃O₅
Molecular Weight: 327,30

Potassium *ter*-butoxide (417 mg, 3.72 mmol, 2.0 eq) was added to a solution of 5-methoxy-2-methylindole (300 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq) and 1,2-dinitrobenzene (626 mg, 3.72 mmol, 2.0 eq) in

DMSO (5 mL) under room atmosphere at room temperature (flask open to air). The dark-blue solution was stirred for 24 h. The reaction mixture was quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/CHCl₃ 4/6 to 0/100) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 7/3) to give a red solid (0.14 g, 56 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.10. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.16 (1H, s, *N*-H₁); 8.09 (1H, d, *J*_{H17-H18} = 8.41 Hz, H₁₇); 7.91 (1H, s, H₁₄); 7.81 (1H, d, *J*_{H18-H17} = 8.33 Hz, H₁₈); 7.28 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 8.22 Hz, H₇); 7.09 (1H, s, H₄); 6.90 (1H, d, *J*_{H6-H7} = 8.75 Hz, H₆); 3.85 (3H, s, H₁₂); 2.57 (3H, s, H₁₀). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 155.7 (C₅); 144.3 (C₉); 143.4 (C₁₆); 139.0 (C₁₃); 134.9 (C₂); 131.9 (C₁₈); 130.4 (C₁₅); 127.2 (C₈); 126.0 (C₁₇); 124.3 (C₁₄); 112.5 (C₆); 111.9 (C₇); 111.2 (C₃); 100.4 (C₄); 56.1 (C₁₂); 13.2 (C₁₀). ESI-HRMS calculated for [C₁₆H₁₄N₃O₅]⁺ *m/z* 328.0927 and found *m/z* 328.0931. IR (neat, cm⁻¹): 3310.7s; 2837.6w; 1592.8s; 1516.5m; 1457.3m; 1425.4m; 1338.3s; 1281.3s; 1154.0m; 1112.7m; 1068.5m; 967.1w; 849.6w; 790.7w; 692.7w.

3-(2,4-dinitrophenyl)-5-nitro-1H-indole (10)



10

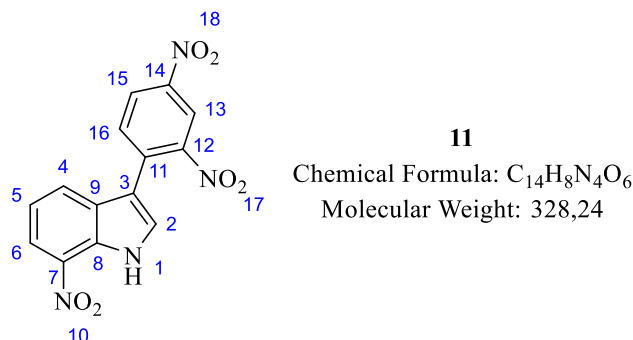
Chemical Formula: C₁₄H₈N₄O₆

Molecular Weight: 328,24

To a flame-dried round bottom flask, 5-nitroindole (300 mg, 1.85 mmol, 1.0 eq) was stirred with dry DMSO (10 mL) under nitrogen atmosphere. The yellow solution was heated at 100°C and potassium *ter*-butoxide (415 mg, 3.70 mmol, 2.0 eq) was added. After 5 min at 100°C, 1,3-dinitrophenyl (622 mg, 3.70 mmol, 2.0 eq) was added to the orange-red solution. The resulting dark-purple mixture was stirred at 100°C for 7 h. After fully conversion of starting materials, the reaction mixture was cooled at room temperature and quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (cyclohexane/AcOEt 1/1) followed by a second flash chromatography (cyclohexane/Acetone 6/4) to give a red solid (0.31g, 51 %). R_f (cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.05. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12.4 (1H, s, *N*-H₁); 8.87 (1H, d, *J*_{H15-H17} = 2.73 Hz, H₁₅); 8.58 (1H, dd, *J*_{H17-H15} = 2.41 Hz, *J*_{H17-H16} = 8.55 Hz, H₁₇); 8.32 (1H, d, *J*_{H4-H6} = 2.12 Hz, H₄); 8.11 (1H, dd, *J*_{H6-H4} = 2.17 Hz, *J*_{H6-H7} = 9.04 Hz, H₆); 8.04 (1H, d, *J*_{H18-H17} = 8.63 Hz, H₁₈); 8.01 (1H, s, H₂); 7.71 (1H, d, *J*_{H7-H6} = 9.07 Hz, H₇). ¹³C

NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148.3 (C₁₄); 145.8 (C₁₆); 141.7 (C₅); 139.5 (C₁₃); 133.7 (C₉); 133.5 (C₁₈); 130.1 (C₂); 127.1 (C₁₇); 124.5 (C₈); 120.1 (C₁₅); 117.6 (C₆); 115.0 (C₄); 113.1 (C₇); 111.8 (C₃). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₉N₄O₆]⁺ m/z 329.0516 and found m/z 329.0517. IR (neat, cm⁻¹): 3386.7s; 3097.8w; 2924.5w; 2854.6w; 1602.9m; 1519.5s; 1504.2s; 1462.6s; 1423.9m; 1327.3s; 1239.8m; 1148.3m; 1126.2w; 1079.1w; 1061.1w; 974.4w; 904.6w; 834.9w; 812.7w; 788.3w; 739.6w; 686.7w.

3-(2,4-dinitrophenyl)-7-nitro-1H-indole (11)



To a flame-dried round bottom flask, 7-nitroindole (300 mg, 1.85 mmol, 1.0 eq) was stirred with dry DMSO (10 mL) under nitrogen atmosphere. The yellow solution was heated at 100°C and potassium *ter*-butoxide (415 mg, 3.70 mmol, 2.0 eq) was added. After 5 min at 100°C, 1,3-dinitrophenyl (622 mg, 3.70 mmol, 2.0 eq) was added to the orange-red solution. The resulting dark-purple mixture was stirred at 100°C for 7 h. After fully conversion of starting materials, the reaction mixture was cooled at room temperature and quenched with aqueous saturated NaHCO₃ solution (40 mL). Then, the aqueous layer was extracted three times ethyl acetate (30 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness *in vacuo*. Then, the crude was directly purified by a flash chromatography (EP/AcOEt 8/2 to 7/3) followed by a second flash chromatography (DCM/cyclohexane 7/3) to give a yellow solid (0.36g, 59 %). R_f(cyclohexane/AcOEt 8:2) = 0.19. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.28 (1H, s, N-H₁); 8.79 (1H, d, $J_{H13-H15}$ = 2.33 Hz, H₁₃); 8.52 (1H, dd, $J_{H15-H13}$ = 2.35 Hz, $J_{H15-H16}$ = 8.52 Hz, H₁₅); 8.27 (1H, d, J_{H6-H5} = 8.14 Hz, H₆); 7.84 (1H, d, $J_{H16-H15}$ = 8.51 Hz, H₁₆); 7.80 (1H, d, J_{H4-H5} = 7.91 Hz, H₄); 7.66 (1H, d, J_{H2-H1} = 2.63 Hz, H₂); 7.33 (1H, t, J_{H5-H8} = 8.00 Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 149.5 (C₁₂); 146.8 (C₁₁); 134.3 (C₁₄); 133.8 (C₁₆); 130.1 (C₇); 129.7 (C₉); 129.4 (C₈); 126.8 (C₂); 126.7 (C₁₅); 126.6 (C₄); 121.1 (C₅); 120.7 (C₆); 120.3 (C₁₃); 112.7 (C₃). ESI-HRMS calculated for [C₁₄H₉N₄O₆]⁺ m/z 329.0516 and found m/z 329.0517. IR (neat, cm⁻¹): 3379.1s; 3107.0w; 2875.0w; 1606.2w; 1588.4w; 1551.7w; 1504.1s; 1483.3m; 1414.2w; 1357.4s; 1340.9s; 1259.2w; 1241.5m; 1145.9w; 1112.5w; 1072.7w; 998.8w; 935.4w; 905.4w; 856.2w; 835.5w; 792.2w; 735.0m.

Conclusion Générale

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques contre des cibles innovantes peu explorées est un moyen efficace dans la lutte contre les résistances bactériennes. Les enzymes responsables de la biosynthèse de la paroi bactérienne, dont les Mur ligases, restent des cibles de choix pour la conception de nouvelles molécules actives face à des bactéries de plus en plus résistantes. En effet, ces enzymes sont spécifiques, essentielles à la survie et sont présentes uniquement dans les cellules procaryotes, idéal pour établir un profil d'inhibition ciblé. Les Mur Ligases ont une similarité structurale qui permet d'être regroupées dans un groupe d'enzymes cibles d'une unique molécule considérée comme « inhibiteur multiple ». Cette inhibition multiple est un enjeu crucial pour aller vers des composés multi-inhibiteurs qui pourrait empêcher l'apparition de résistances bactériennes.

Sur la base de substrat naturel et dans une approche de type DOS, nous avons, au cours de cette thèse, décrit la synthèse d'analogues de l'uridine comportant en 5' une partie [1,2,3]-triazole diversement substituée (Famille I et Famille II). Ces composés ont été obtenus par une approche convergente basée sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, catalysée au Cu(I). Nous avons ainsi, de manière raisonnée, exploré l'espace chimique des Mur ligases par approche DOS. Par la suite, une évaluation biologique a été effectuée avec ces deux familles de molécules sur un mélange d'enzymes de Mur ligases (MurA-F). Ces essais biologiques se sont étendus avec des tests enzymatiques individuellement sur chaque enzyme pour les composés les plus actifs.

Dans le troisième chapitre, nous avons entrepris d'explorer une nouvelle voie de synthèse donnant accès à des analogues visant les Mur Ligases de type carbanucléosides. L'exploration d'une nouvelle approche de carbasucre par cyclisation par activation C-H allylique pallado-catalysée nécessiterait encore des travaux de méthodologie de synthèse avant de pouvoir conclure sur l'intérêt de cette approche. Nous avons alors synthétisé, par une approche plus conventionnelle, un analogue carbanucléoside sur la base d'une chimiothèque obtenue par un criblage virtuelle contre les Mur ligases avec deux pharmacophores rationnels : une partie carba-uridine et une partie acide 3,5-phénylique dicarboxylique reliée entre elles par une chaîne carbonée insaturée.

Dans le dernier chapitre annexe, nous avons décrit la synthèse, sur la base de méthodologies publiées, de petits hétérocycles de type indole contenant un motif nitro arylique pour l'évaluation biologique contre les Mur ligases.

L'ensemble de ces travaux pave la voie vers la recherche de nouveaux inhibiteurs sélectifs des Mur Ligases.

Articles et communications de l'auteur

Publications

Hervin, V.; Narendra, A.; Agrofoglio, L. A.; Bajpai, U.; Roy, V. Synthesis of 5'-(1,2,3-triazol-1-yl)-5'-deoxyuridine analogues as new substrates for *Mycobacterium Tuberculosis* Mur-ligase for biological investigations *Molecules* **2020**, *submitted*

Bessieres, M.; **Hervin, V.;** Roy, V.; Chartier, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Lohier, J-F.; Agrofoglio, L. A. Highly convergent synthesis and antiviral activity of (E)-but-2-enyl nucleoside phosphonoamidates, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *146*, 678-686

Chapitre d'ouvrage

Hervin, V.; Biteau, N.; Roy, V.; Agrofoglio, L.A. Chapter 3: Suzuki-Miyaura Cross-Coupling as a Synthetic Tool for Nucleoside and Nucleotide Modification Palladium-Catalyzed modification of Nucleosides, *Nucleotides and Oligonucleotides 1st Edition* **2018** Ed. Kapdi, A.; Maiti, D.; Sanghvi, Y. ISBN 9780128112939

Communications

Orales

Diversity-oriented synthesis of Mur Ligase inhibitors for antibacterial activity, Journée scientifique du LABEX SynOrg, 12-13 septembre **2019**, Colleville-sur-Mer, France

Conception of Mur ligase analogues for antibacterial activity, Chemistry for a new frontiers, 257th ACS national meeting & exposition, 31 march- 4 april **2019**, Orlando, Florida, United-States

Posters

Synthesis and evaluation of Mur Ligase inhibitors for antibacterial activity, 50th General assembly & 47th IUPAC world chemistry congress, 5-12 july **2019**, Paris, France

Synthèse d'inhibiteurs de Mur-Ligases à visée antibactérienne, 31^e Colloque Biotechnocentre, 11-12 octobre **2018**, Seillac, France

Conception d'inhibiteurs de Mur-Ligases à visée antibactérienne, Journée d'animation scientifique de la fédération de recherche en infectiologie (FÉRI), 2-3 juillet **2018**, Tours, France

Cross Metathesis with phosphoramidate synthon assisted by ultrasound on water, 18th Tetrahedron Symposium: Challenges in Organic Chemistry, 28-30 June **2017**, Budapest, Hungary

Vincent HERVIN

Synthèse d'analogues nucléosidiques et hétérocyclique visant les Mur ligases bactériennes.

Résumé

Actuellement, le problème des résistances aux antibiotiques est devenu une inquiétude majeure pour la santé publique. Leur développement depuis l'âge d'or des antibiotiques a contribué à la mise sur le marché d'une grande variété de familles d'antibiotiques notamment dans la lutte contre les souches bactériennes de type mycobactérie, pneumocoques, staphylocoques etc. Les infections bactériennes pathogènes représentent cependant toujours un souci urgent de santé publique dû à l'apparition de résistances aux principes actifs que l'on utilise contre elles. Il devient donc vital d'explorer de nouveaux antibiotiques capables de rester efficace même contre des infections bactériennes résistantes ou multi-résistantes. Dans ce manuscrit, il est décrit la synthèse d'analogues nucléosidiques innovants selon l'approche du DOS pour explorer l'espace chimique des Mur ligases en tant que nouvelles cibles multiples. Le développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse pour accéder au pseudo-sucre cyclopentanone des carbanucléosides a été initié ainsi que la synthèse d'un analogue carbocyclique issu d'une chimiothèque virtuelle. Une autre chimiothèque d'hétérocycliques de type indolique a été synthétisée contre les Mur ligases. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des réactions de cycloaddition catalysées au cuivre (CuAAC) permettant une synthèse orientée vers la diversité moléculaire. De même, l'exploration synthétique pour obtenir le pseudo-sucre carbanucléosidiques, nous avons utilisé la réaction de cyclisation par une activation C-H allylique catalysée au palladium. Ces nouveaux composés se sont révélés être inhibiteurs multiples de Mur Ligases issues de *Mycobacterium tuberculosis*.

Mots clés: nucléosides, Mur Ligases, Nucléosides, cycloaddition 1,3-dipolaire (CuAAC), carbanucléosides, Approche du DOS, activation C-H allylique, dérivés nitro-indoliques.

Synthesis of nucleosidic and heterocyclic analogues against bacterial Mur ligase.

Abstract:

Last decade, a growing problem of antibiotic resistance has become true worries for public health. Since the golden age of antibiotics, their development contributed to improve new marketing active compounds with large broad structural varieties, especially against mycobacteria, pneumococcal or staphylococcal strains. However, pathogenic bacterial infections, still an urgent public health concern because of bacterial resistance, remove the efficacy of employed antibiotics. Therefore, the development of new structural compounds for new antibiotics is a most potent pathway to improve their biological powerful against multi- and/or resistant bacterial strains. This manuscript describes new nucleosidic analogues obtained by diversity-oriented synthesis (DOS) approach. Thus, new synthetic methodology for carbocyclic nucleosides cyclopentanone moiety was investigated and carba-nucleoside from virtual screening was synthesized. Small library of heterocyclic compounds containing an indole structure was developed. Key reactions was used like 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC) allowing to develop a diversity-oriented synthesis approach (DOS). Furthermore, new methodology for pseudo-sugar of carbanucleoside synthesis use an allylic C-H activation cyclization palladium-catalyzed as C(sp³)-C(sp³) bond formation. These molecules have been shown to be active against Mur ligases from *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: nucleosides, Mur Ligases, 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC), carbocyclic nucleosides, diversified-oriented synthesis (DOS), allylic C-H activation, nitro-indoles analogues.



ICOA, Institut de Chimie Organique et Analytique
UMR 7311 - UFR Sciences - BP 6759 - rue de Chartres
45067 Orléans cedex 2

