



**HAL**  
open science

# Synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférases d'ARN

Colette Atdjian

► **To cite this version:**

Colette Atdjian. Synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférases d'ARN. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB090 . tel-04269134

**HAL Id: tel-04269134**

**<https://theses.hal.science/tel-04269134>**

Submitted on 3 Nov 2023

**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.



**Ecole doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries**

Université Paris Descartes

**Thèse**

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité : **Chimie Organique**

Par

**Colette ATDJIAN**

**Synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de  
méthyltransférases d'ARN**

Laboratoire de Chimie & Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques  
CNRS UMR 8601 - Université Paris Descartes

Directeurs de thèse : Dr. Emmanuelle Braud et Pr. Mélanie Éthève-Quelquejeu

*Vendredi 30 novembre 2018*

**Composition du jury :**

*Rapporteurs*

**Mr Alain BURGER**

Professeur des Universités – Université de Nice  
Sophia Antipolis

**Mr Jean-Marc ESCUDIER**

Directeur de recherche – Université de Toulouse II

*Examineurs*

**Mme Dominique GUIANVARC'H**

Professeur des Universités – Université Paris Sud

**Mr Marcel HOLLENSTEIN**

Chargé de recherche, HDR – Institut Pasteur

**Mme Emmanuelle BRAUD**

Maître de conférence, HDR – Université Paris  
Descartes

**Mme Mélanie ETHEVE-  
QUELQUEJEU**

Professeur des Universités - Université Paris  
Descartes



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Pr Alain Burger et Dr Jean-Marc Escudier pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et je remercie également Pr Dominique Guianvarc'h et Dr Marcel Hollenstein pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont aussi à nos collaborateurs : l'équipe du Dr Carine Tisné pour avoir testé nos composés sur différentes méthyltransférases, l'ingénieur Marjorie Catala pour avoir réalisé la cristallisation des complexes enzymes-bisubstrats et les tests de DSF, le Dr Stéphanie Orum pour avoir analysé les données cristallographiques. Je remercie également le Dr Gildas Bertho pour son aide dans l'analyse de spectre RMN.

J'aimerais remercier chaleureusement mes directrices de thèse. Merci Mélanie pour m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire. Tu m'as fait confiance pour mener ce projet le plus loin possible et ça a bien pris 3 ans pour aboutir ! Merci pour tes conseils avisés, et la bonne ambiance de travail que tu instaures au labo. Je te suis reconnaissante pour toutes les belles opportunités que tu as mis à ma portée et pour tous les congrès auxquels j'ai pu participé...de Paris à San Diego ! Rendez-vous au prochain IRT ;)

Merci Emmanuelle pour ces 3 années de travail à tes côtés. Je me rappelle de notre rencontre en entretien pour le stage de M2, je t'avais dit que je ne voulais pas faire de thèse. Tu m'as répondu : « C'est pas grave, tu auras le temps de changer d'avis. » Et oui, tu avais raison ! Ta diplomatie et ton tact y sont certainement pour quelque chose ! J'aimerais te remercier pour m'avoir orientée sur ce projet au quotidien et surtout pour tes encouragements quand rien ne fonctionnait. J'espère que les futurs doctorants profiteront de ta supervision comme j'en ai profité.

Je remercie le Dr Laura Iannazzo. Ça fait maintenant 3 ans et demi que nous partageons le même bureau, qui sera l'heureux élu pour me remplacer ? Tu as aussi largement participé au bon déroulement de cette thèse ! Merci pour m'avoir supporté pendant ces 3 années. Pour toutes les conversations chimie, TD de PACES (les joies de la thermo) et pour les

conversations de la vie aussi, merci ! Je sais que mon manque de sport actuel doit te décevoir mais promis, quand j'aurais pondu, je retourne courir !

J'aimerais remercier les docteurs Expédite Yen-Pon et Nicolas Sakkas qui m'ont chaperonné pendant le début de ma thèse et montré les ficelles. Merci pour m'avoir permis de m'intégrer à l'équipe et pour m'avoir guidé dans les méandres de l'UMR. Dans le cas où ma carrière dans la recherche n'aboutit pas, je garde en tête l'option élevage de chiens... Expédite ! Un merci à Marie-Léonie, alias Mario ou MLD pour les RMNistes qui cherchent encore à qui appartiennent les tubes trop courts ! Tu as été ma voisine du deuxième, celle chez qui j'allais râlé quand j'avais déjà trop râlé auprès de Laura ! Merci pour être venu discuter potins autour de notre mafia lunch hebdomadaire ! Et merci d'être venu bouger ton popotin à la parisienne ces deux dernières années ! Je remercie aussi tous les doctorants et stagiaires qui ont participé à l'ambiance détendu du labo Bobo, Camélia, Saïd, Flavie, Manon, Léa, Justine, et tous ceux que j'oublie. Camélia, futur docteur Cak ! La Staudinger n'aura bientôt plus de secret pour toi !

Merci à mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études. Merci de m'avoir supportée à la maison jusqu'à mes ... 24 ans !!!! Et aussi pendant mon été de rédaction ! Vous avez la palme d'or des meilleurs parents c'est sûr. Merci à ma sœur, Marion, qui n'oublie jamais de m'envoyer des photos de plages alors que je suis coincée dans la grisaille de Paris ! Tu m'as fait découvrir des coins exotiques durant ces deux derniers Noël qui m'ont permis de faire une vraie pause dépaysante ! Il te manque encore quelques continents ! Merci à toute ma famille qui tente régulièrement de comprendre ce que je fais depuis 3 ans. J'aimerais aussi remercier particulièrement Mélissa et Fannie qui ont toujours été là pour les voyages, les fêtes et compagnie. Que ça ne change jamais ! Et merci à Thibaud, mon homme et mon antidépresseur ! C'est 4 dernières années auraient été bien différentes sans toi. Merci pour tes encouragements, ton amour et tes bons petits plats !





## Table des matières

<b>Abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>19</b>
1. L'ARN dans le biologie cellulaire.....	19
1.1. Structure de l'ARN et comparaison à celle de l'ADN.....	19
1.2. Fonctions centrales de l'ARN chez les eucaryotes.....	20
2. Modifications chimiques des ARN.....	21
2.1. Les modifications recensées.....	22
2.2. Rôles des modifications sur les ARNt, ARNr et ARNm.....	24
2.2.1. Modifications des ARNt.....	24
2.2.2. Modifications des ARNr.....	25
2.2.3. Modifications des ARNm.....	27
3. Méthylation et méthyltransférases.....	29
3.1. Généralités.....	29
3.2. Classification structurale des MTases.....	30
3.3. Classification des MTases en fonction des substrats.....	33
3.3.1. Les MTases d'ADN (DNMT) .....	33
3.3.2. Les MTases de protéines.....	34
3.3.3. Les MTases d'ARN (RNMT) .....	36
3.3.4. Les MTases de petites molécules.....	38
3.4. Implication des MTases dans les pathologies.....	38
4. Les outils comportant le motif SAM/SAH développés pour l'étude des MTases.....	40
4.1. Les pan-inhibiteurs.....	40
4.2. Les outils chimiques.....	41
4.2.1. Les cofacteurs synthétiques.....	41
4.2.1.1. Les aziridinoadénosines.....	41
4.2.1.2. Les analogues de SAM à double activation.....	44
4.2.2. Les analogues photoactivables et fluorescents.....	46
4.3. Les analogues de type bisubstrat.....	46



4.3.1. Généralités.....	46
4.3.2. État de l'art.....	47
4.3.2.1. Les bisubstrats de petites molécules.....	47
4.3.2.1.1. Les bisubstrats de la COMT.....	47
4.3.2.1.2. Bisubstrats de la N-méthyltransférase de nicotinamide...	49
4.3.2.2. Les bisubstrats des MTases de protéines.....	50
4.3.2.3. Les bisubstrats de DNMT.....	53
4.3.2.4. Les bisubstrats de RNMT.....	56
5. Objectifs de la thèse.....	57
5.1. Les RNMT m <sup>6</sup> A : cibles potentielles encore peu explorée.....	57
5.2. RNMT m <sup>6</sup> A et données structurales.....	58
5.3. Conception de bisubstrats potentiels pour les RNMT m <sup>6</sup> A.....	59
<b>Chapitre I : Synthèse de conjugués SAM-adénosine à espaceurs alkyles et urée.....</b>	<b>65</b>
<b>Partie A : Synthèse des bisubstrats comportant un lien alkyle.....</b>	<b>65</b>
1. Stratégie de synthèse.....	65
1.1. Amination de dérivés purines en position C6.....	65
1.2. Schéma rétrosynthétique.....	68
2. Synthèse des analogues de SAM.....	69
2.1. Formation d'amines secondaires et tertiaires en position 5' d'une adénosine.....	69
2.2. Synthèse de la 5'-hydroxy-adénosine <b>3</b> .....	70
2.3. Synthèse des espaceurs .....	71
2.4. Synthèse de l'acide aminé.....	72
2.5. Synthèse de dérivés 5'-amino-adénosines.....	72
3. Formation des conjugués SAM-adénosine.....	74
3.1. L'intermédiaire O <sup>6</sup> -benzotriazolyle de l'inosine dans la littérature .....	74
3.2. Couplage des deux fragments.....	76
4. Déprotection des bisubstrats.....	77
4.1. Déprotection en milieu acide.....	77
4.2. Méthode de déprotection en milieu basique.....	79
4.3. Déprotection des bisubstrats par un acide de Lewis.....	80
5. Conclusion.....	82

## **Partie B : Synthèse des conjugués avec un espaceur comportant une fonction urée.....83**

1. Schéma rétrosynthétique.....	83
2. Synthèse des bisubstrats.....	84
2.1. Synthèse des amines.....	84
2.2 Synthèse des intermédiaires électrophiles et formation des urées.....	85
2.2.1. Utilisation d’analogues de phosgène.....	85
2.2.2. Synthèse d’intermédiaires carbamates et formation des bisubstrats de type urée.....	86
2.2.2.1. Utilisation du carbamate d’éthyle.....	86
2.2.2.2. Synthèse du carbamate d’isopropényle et des bisubstrats urée.....	87
3. Étapes de déprotection.....	89
4. Conclusion et perspectives.....	90

## **Chapitre II : Synthèse de conjugués SAM-oligonucléotides.....95**

1. Introduction.....	95
1.1. Méthodes de couplage pour la formation d’un lien phosphodiester.....	96
1.1.1. Évolution des méthodes de couplages.....	96
1.1.2. Synthèse d’oligoribonucléotides.....	98
1.1.2.1. Les groupements silylés.....	99
1.1.2.2. Le groupement bis(2-acétoxy)méthyle (ACE) .....	99
1.1.2.3. Le groupement thiomorpholine-4-carbothioate (TC) .....	100
1.2. Fonctionnalisation des oligonucléotides.....	100
1.2.1. Approche pré-synthétique.....	100
1.2.2. Approche post-synthétique.....	102
1.2.1.1. Réactions de post-fonctionnalisation d’ARN.....	102
1.2.1.2. Les nucléosides électrophiles convertibles.....	103
2. Preuve de concept.....	108
2.1. Méthode proposée.....	109
2.2. Synthèse du dinucléotide post-fonctionnalisé.....	109
2.2.1. Préparation de l’inosine-OBT <b>41</b> .....	109
2.2.2. Synthèse et fonctionnalisation du dinucléotide dC-I <sup>OBT</sup> <b>42</b> .....	110

3. Fonctionnalisation d'un dinucléotide par l'analogue de SAM.....	111
4. Fonctionnalisation sur une position interne d'un oligonucléotide.....	112
4.1. Voie de synthèse proposée.....	112
4.2. Synthèse de l'inosine-OBT phosphoramidite <b>51</b> .....	113
4.2.1. Voie A.....	114
4.2.2. Voie B.....	114
5. Conclusion et perspectives.....	116

### **Chapitre III : Synthèse de conjugués comportant un lien triazole.....119**

1. Objectifs du chapitre.....	119
2. Introduction à la chimie click.....	119
2.1. Le principe de la chimie click.....	119
2.2. La réaction de cycloaddition alcyne-azoture.....	120
2.3. Les propriétés physico-chimiques du cycle triazole.....	122
3. Adénosine substituée en N1.....	123
3.1. Alkylation de la position N1 de l'adénosine.....	123
3.2. Réarrangement de Dimroth.....	126
4. Synthèse des conjugués à lien triazole.....	127
4.1. Rétrosynthèse.....	127
4.2. Synthèse des alcynes.....	128
4.3. Synthèse des conjugués.....	131
4.4. Déprotection finale des bisubstrats.....	132
4.4.1. Déprotection du bisubstrat avec un espaceur en N6.....	132
4.4.2. Déprotection du bisubstrat avec un espaceur en N1.....	133
5. Conclusion et perspectives.....	135

### **Chapitre IV : Résultats des études structurales.....139**

1. Introduction.....	139
2. Études d'interactions RlmJ/bisubstrats.....	140
2.1. La méthode DSF.....	140
2.2. Résultats.....	141
3. Études structurales du complexe RlmJ:bisubstrat <b>24</b> .....	143

3.1. La conformation (1) du conjugué <b>24</b> au site actif.....	<b>143</b>
3.2. La conformation (2) du conjugué <b>24</b> au site actif.....	<b>144</b>
4. Conclusion.....	<b>145</b>
 <b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>149</b>
 <b>Partie expérimentale.....</b>	<b>155</b>



## Abréviations

ACE	Bis(2-acétoxy)méthyle	COMT	Catéchol O-méthyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique	CpG	Cytosine-phosphate-guanine
ALKBH5	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5	Dam	Déoxyadénosine méthyltransférase
Am	2'-O-méthyladénosine	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
ARN	Acide ribonucléique	DCC	N,N'-Dicylohexyl carbodiimide
ARNm	Acide ribonucléique messenger	DCM	Dichlorométhane
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique	DMA	Diméthylacétamide
ARNsno	Petit acide ribonucléique nucléolaire	DMAP	4-Diméthylamino pyridine
ARNt	Acide ribonucléique de transfert	DMF	Diméthylformamide
ARNt <sup>Lys</sup>	Acide ribonucléique de transfert de lysine	DMP	Dess Martin périodinane
ARNt <sup>Phe</sup>	Acide ribonucléique de transfert de phénylalanine	DMTCI	Chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle
BOP	Hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium	DNMT	Méthyltransférase d'ADN
BSA	N,O-Bis(triméthylsilyl)acétamide	DNMT1, 3a, 3b	Méthyltransférases d'ADN humaines
Ccrm	<i>Caulobacter crescentus</i> methyltransferase	Dot1	Méthyltransférase de lysine
CE <sub>50</sub>	Concentration efficace 50	DSF	Differential scanning fluorometry
Cfr	C-terminal fragment of computationally designed novel-topology protein Top	FDA	Food and drug administration
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50		

FTO	Fat mass and obesity-associated protein	MTaqI	Méthyltransférase bactérienne d'ADN
Gm	2'-O-méthylguanosine	MTase	Méthyltransférase
HEDD	Human epigenetic drug database	NNMT	N-Méthyltransférase de nicotinamide
hm <sup>5</sup> C	5-hydroxyméthyl cytidine	NTMT	N-Méthyltransférase de protéines
HNRNPC	Ribonucléoprotéines C nucléaires hétérogènes	PKMT	Méthyltransférase de lysines
m <sup>1</sup> A	1-méthyladénosine	PRMT	Méthyltransférases d'arginines
m <sup>6</sup> A	6-méthyladénosine	PyBOP	Hexafluorophosphate (benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium
m <sup>5</sup> C	5-méthylcytidine	RlmJ	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J
m <sup>7</sup> G	7-méthylguanosine	RlmF	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase F
MetH	5-Methylhydrofolate-homocysteine methyltransferase	RlmN	Dual-specificity RNA methyltransferase
METTL3/ METTL14	Méthyltransférase d'ARN chez les mammifères	RNMT	Méthyltransférase d'ARN
METTL16	Méthyltransférase de pré-ARNm chez les mammifères	SAH	S-adénosine-L-homocystéine
M.HhaI	Méthyltransférase bactérienne d'ADN	SAM (AdoMet)	S-adénosine-L-méthionine
mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U	5-méthylamino-2-thiouridine	SET	Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax
MSNT	3-nitro-1,2,4-triazolide	SET 7/9	Méthyltransférase de lysine humaine
MTA	Méthylthioadénosine	S <sub>N</sub> Ar	Substitution nucléophile aromatique
mTAG	Methyltransferase-directed transfer of activated groups	SN <sub>2</sub>	Substitution nucléophile 2

SMILing	Sequence-specific methyltransferase induced labeling
SPOUT	Transfer RNA methyltransferase with a SpoU-TrmD
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TC	Thiomorpholine-4-carbothioate
TFA	Acide trifluoroacétique
TOM	Triisopropylsilyloxyméthyle
T <sub>m</sub>	Melting temperature
YTHDF1	YTH domain protein family 1
YTHDF2	YTH domain protein family 2
yW	Wybutosine
Ψ	Pseudouridine





## Introduction générale



# Introduction générale

## 1. L'ARN dans la biologie cellulaire

### 1.1. Structure de l'ARN et comparaison à celle de l'ADN

Les acides nucléiques, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN), sont des macromolécules construites par liaisons covalentes entre des monomères nucléotides pour former des chaînes de taille variable (Figure 1).

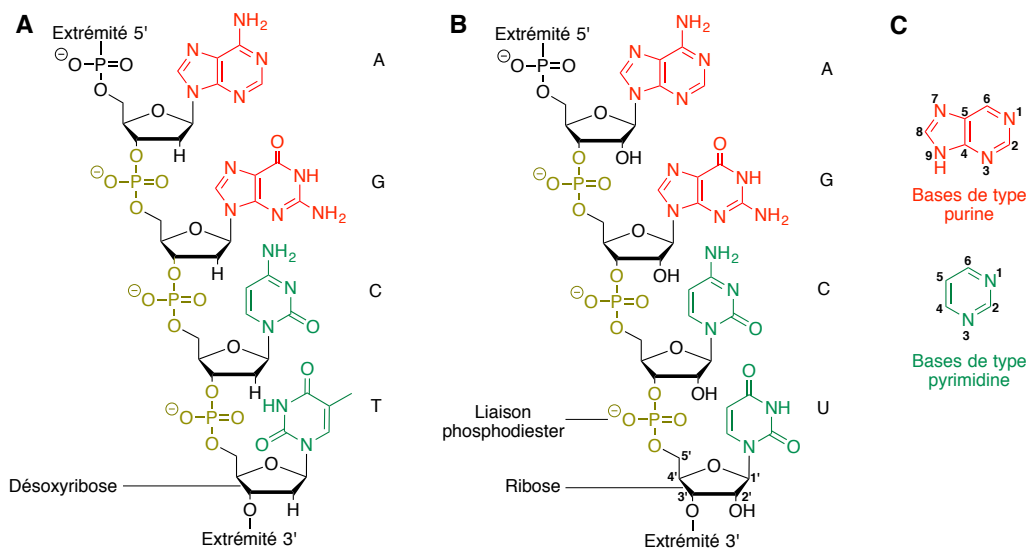


Figure 1 : Acides nucléiques ; A. Brin d'ADN avec les quatre nucléotides de base : adénosine, guanosine, cytosine, thymidine ; B. Brin d'ARN avec les quatre nucléotides de base : adénosine, guanosine, cytosine, uridine ; C. Types de base

Les nucléotides sont reliés par des liaisons phosphodiester entre les atomes 5' et 3' des pentoses. Chaque nucléotide est composé d'une base hétérocyclique de type purine ou pyrimidine reliée par une liaison N-glycosidique au pentose qui lui-même porte les groupements phosphodiester. La composition chimique de l'ADN et de l'ARN se différencie en deux points. L'une de leurs bases pyrimidines est différente : l'ADN comporte de la thymine alors que l'ARN comporte de l'uracile. De plus, l'ARN est composé de riboses portant un groupement hydroxyle en position 2' du sucre tandis que l'ADN comporte des unités 2'-désoxyriboses. Cette modification confère à l'ARN des caractéristiques

conformationnelles, une hydratation et des propriétés électrostatiques différentes de l'ADN. L'hydroxyle en position 2' constitue une fonction à la fois donneuse et accepteuse de liaisons hydrogène. Celle-ci rend aussi l'ARN plus fragile que l'ADN en milieu basique, une hydrolyse du lien phosphodiester étant alors possible. Alors que l'ADN a pour fonction principale le stockage de l'information génétique dans la cellule, l'ARN a des rôles très variés.<sup>1</sup>

## 1.2. Fonctions centrales de l'ARN chez les eucaryotes

L'ARN est la macromolécule la plus polyvalente de la cellule. Sa séquence linéaire encode transitoirement les informations génétiques nécessaires à la synthèse de protéines. Cette séquence peut aussi contenir les informations suffisantes pour produire des structures ARN complexes capables de transporter d'autres molécules ou de catalyser des réactions (Figure 2).

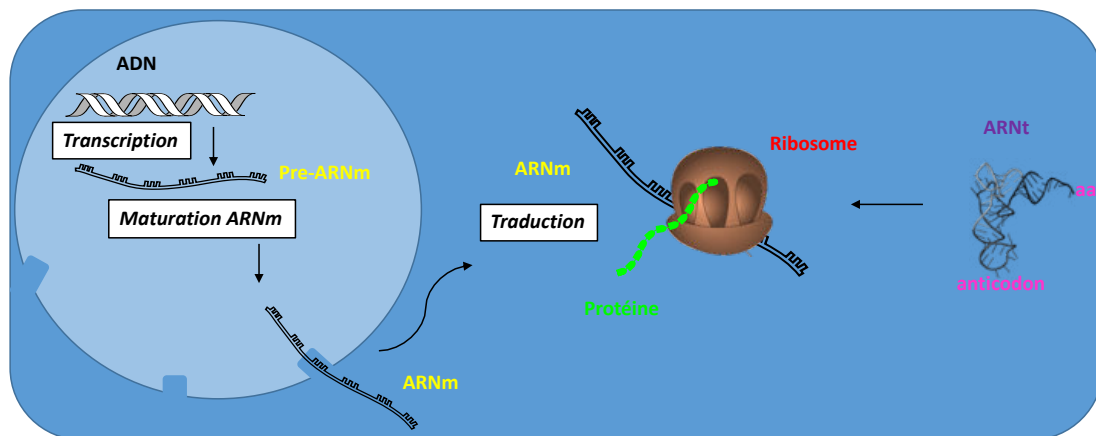


Figure 2 : Dogme central de la biologie cellulaire chez les eucaryotes.

Les molécules d'ARN sont transcrites à partir de l'ADN par les enzymes ARN polymérases. Le brin d'ADN est utilisé comme modèle par l'enzyme pour synthétiser les ARN dans le sens 5'→3'. Cependant, après l'étape de transcription, un ARN n'est pas fonctionnel. Des étapes de maturation sont nécessaires telles que l'ajout de modifications, l'élimination d'une partie de sa séquence ou encore une modification de la séquence elle-même. C'est seulement après

<sup>1</sup> a) G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology 3rd Edition*, Chap.7 *RNA Structure and Function*, RSC Publishing **2006**, 253-290 ; b) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Biologie moléculaire de la cellule 5<sup>ème</sup> Edition*, Chap. 6 *Les cellules lisent le génome : de l'ADN aux protéines*, Lavoisier **2011**, 329-410

cette maturation que l'ARN est transporté dans le compartiment cellulaire approprié pour jouer son rôle.

Les ARN messagers (ARNm) portent le code génétique sous forme de codons et sont traduits en séquences peptidiques. La traduction s'effectue au niveau du ribosome et nécessite la présence des ARN de transfert (ARNt) chargés avec les acides aminés correspondants. La fixation des ARNt se fait par reconnaissance moléculaire entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. Le ribosome catalyse alors l'ajout de chaque acide aminé à la chaîne polypeptidique naissante. De plus, ce sont les ARN ribosomiques (ARNr) contenus dans le ribosome qui catalysent la formation de la liaison peptidique.<sup>2</sup> Finalement, les ARNt jouent le rôle de molécules adaptatrices et font le lien entre la séquence nucléotidique et peptidique.

Ceci n'est qu'un aperçu des différents rôles de l'ARN. En effet cette macromolécule est également impliquée dans les processus de maturations de différents ARN<sup>3</sup>, dans la régulation de l'expression des gènes<sup>4</sup> ou encore dans le transport de protéines vers les différents compartiments cellulaires.<sup>5</sup>

L'ARN a un rôle central au sein des cellules et une maturation correcte de chaque type d'ARN est nécessaire à leur bon fonctionnement. L'altération des bases naturelles de l'ARN constitue une modification abondante chez les ARN. Nous allons voir plus en détail ces processus.

## 2. Modifications chimiques des ARN

Les molécules d'ARN sont particulièrement riches en modifications. Il est maintenant clair que la diversité chimique établie par les quatre nucléosides canoniques n'est pas suffisante pour expliquer les fonctions complexes et variées des différents types d'ARN. La structure chimique ainsi que la position et la fréquence de ces modifications constituent un niveau supplémentaire d'informations d'une grande importance pour la fonction d'un ARN.

---

<sup>2</sup> M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Curr Opin Struct Biol* **2003**, *13*, 334-340

<sup>3</sup> a) H. Madhani, C. Guthrie, *Ann Rev Genet* **1994**, *28*, 1-26 ; b) C. M. Smith, J. A. Steitz, *Cell* **1997**, *89*, 669-672 ; c) J. C. Kurz, C. A. Fierke, *Curr Opin Chem Biol* **2000**, *4*, 553-558

<sup>4</sup> a) P. Nelson, M. Kiriakidou, A. Sharma, E. Maniatakis, Z. Mourelatos, *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 534-540 ; b) G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244-251

<sup>5</sup> K. Nagai, C. Oubridge, A. Kuglstatter, E. Menichelli, C. Isel, L. Jovine, *EMBO J* **2003**, *22*, 3479-3485

## 2.1. Les modifications recensées

A ce jour, plus d'une centaine de modifications des nucléosides ont été recensées. Les modifications peuvent avoir lieu sur les bases nucléiques ou le ribose (Tableau 1).

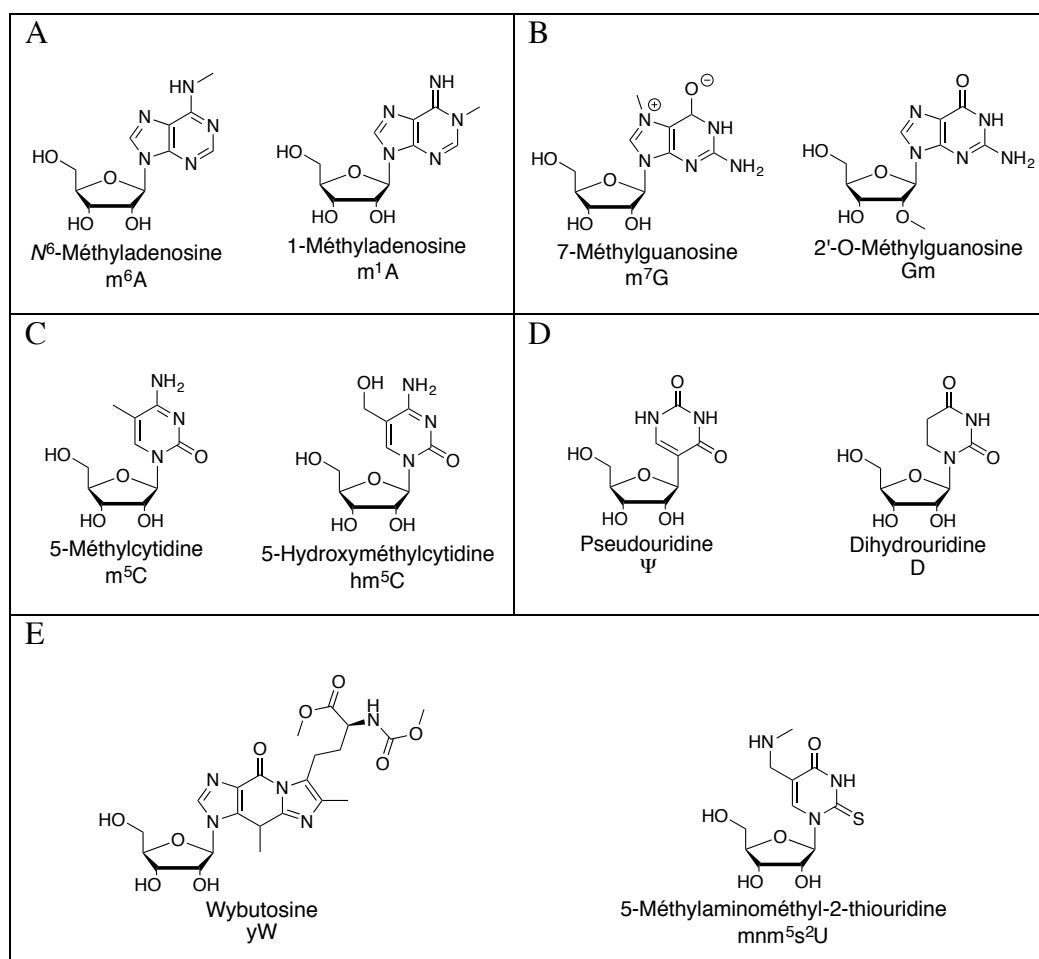


Tableau 1 : Exemples de modifications des bases nucléiques ou du ribose des ARN. A. adénosine modifiée ; B. guanosine modifiée ; C. cytidine modifiée ; D. uridine modifiée ; E. bases hypermodifiées.

Il existe des modifications très simples telles que la méthylation des bases nucléiques ou du ribose<sup>6</sup> comme on peut le voir dans les exemples du tableau 1. La 5-méthylcytidine peut aussi être oxydée pour donner la 5-hydroxyméthylcytidine.<sup>7</sup> La pseudouridine est une modification particulière : la base est connectée au ribose par le carbone C5 au lieu de l'azote N1 et résulte

<sup>6</sup> Y. Motorin, M. Helm, *WIREs RNA* **2011**, 2, 611-631

<sup>7</sup> L. Fu, C. R. Guerrero, N. Zhong, N. J. Amato, Y. Liu, S. Liu, Q. Cai, D. Ji, S ; G. Jin, L. J. Niedernhofer, G. P. Pfeifer, G. L. Xu, Y. Wang, *J Am Chem Soc* **2014**, 136, 11582-11585

de l'isomérisation de la base uracile.<sup>8</sup> La dihydrouridine est obtenue par réduction de la double liaison C5-C6 de l'uracile.<sup>9</sup> D'autres nucléosides présentent des structures plus complexes avec des bases nucléiques hypermodifiées. La wybutosine, dérivée de la guanine<sup>10</sup> ou encore la 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine<sup>11</sup> sont formés *via* des biosynthèses multi-étapes pour modifier entièrement leurs squelettes hétérocycliques.

La grande diversité des modifications d'ARN a conduit au développement de bases de données dédiées qui sont régulièrement mises à jour.<sup>12</sup> Ces sites recensent toutes les modifications existantes et la littérature associée. Une nomenclature permet de désigner les différents nucléosides modifiés. Comme on peut le voir dans le tableau 1, un code d'une ou de deux lettres désigne le type de modification. Puis la position de cette modification chimique sur une base pyrimidine ou purine est donnée en exposant. Le nombre de modifications est indiqué en indice et les modifications sur le sucre sont notées après le nom de la base. Quelques bases hypermodifiées telle que la wybutosine sont décrites par une lettre.

Des modifications post-transcriptionnelles ont été identifiées sur toutes les classes d'ARN, les ARNt comportant la plus grande diversité chimique ainsi que le plus grand nombre de modifications. Environ un tiers des bases modifiées sont présentes dans l'ARNr et presque 10 % dans les ARNm. Jusqu'à maintenant, quatorze modifications ont été découvertes sur les autres types d'ARN, principalement sur les petits ARN non-codants.<sup>13</sup>

---

<sup>8</sup> X. Li, S. Ma, C. Yi, *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *33*, 108-116

<sup>9</sup> J. J. Dalluge, T. Hashizume, A. E. Sopchik, J. A. McCloskey, D. R. Davis, *Nucleic Acids Res* **1996**, *15*, 1073-1079

<sup>10</sup> A. Noma, Y. Kirino, Y. Ikeuchi, T. Suzuki, *EMBO J* **2006**, *25*, 2142-2154

<sup>11</sup> H. Vorbrüggen, K. Kroliekiewicz, *Angew Chem Int Ed* **1975**, *14*, 255-256

<sup>12</sup> a) <http://mods.rna.albany.edu>; b) <http://modomics.genesilico.pl>

<sup>13</sup> W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. P. Vendeix, D. Fabris, P. F. Agris, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, D195-D201



## 2.2. Rôles des modifications sur les ARNt, ARNr et ARNm

### 2.2.1. Modifications des ARNt

Comme évoqué plus tôt, ce sont les ARNt qui comportent le plus de modifications. Un nucléoside sur cinq est modifié sur les ARNt de mammifères et plus de cinquante modifications ont été identifiées uniquement sur les ARNt chez les eucaryotes (Figure 3).<sup>14</sup>

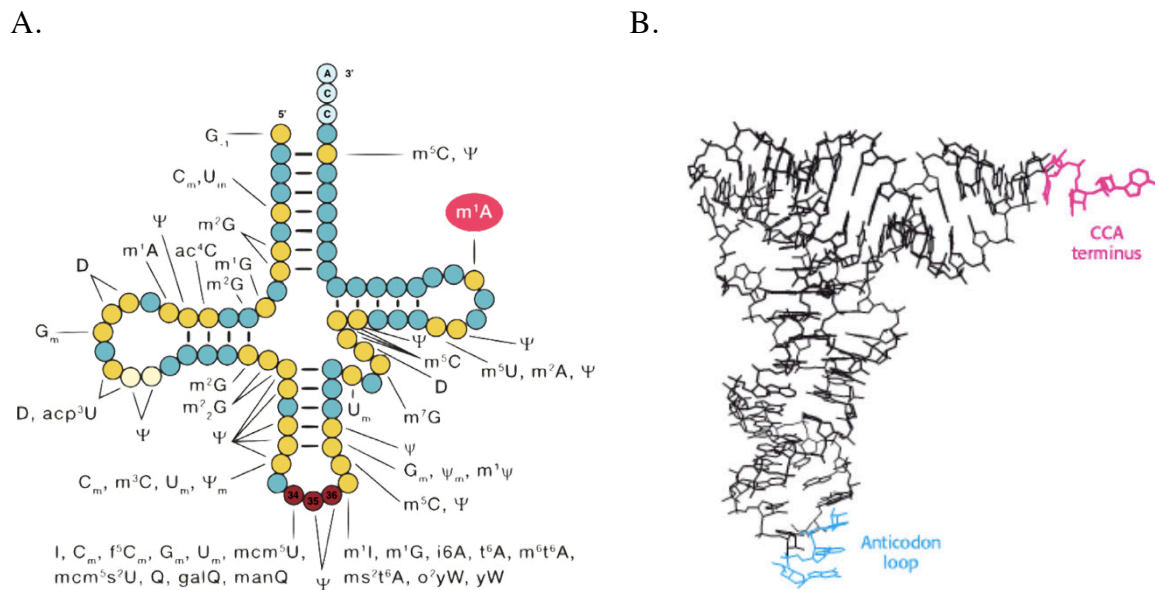


Figure 3 : A. Modifications des ARNt chez les mammifères. En bleu : les bases sans modification. En jaune : les bases modifiées. En rouge : l'anticodon ;<sup>15</sup> B. Structure tertiaire des ARNt en forme de L.<sup>16</sup>

Les modifications sur les ARNt peuvent être classées en trois catégories suivant leurs fonctions.<sup>17</sup>

Le premier groupe est présent sur, ou est adjacent à l'anticodon (Figure 2A). Ces modifications aident à la traduction en évitant un déplacement du cadre de lecture et peuvent aussi renforcer les interactions codon-anticodon.<sup>18</sup> Les positions 34 et 37 portent le plus

<sup>14</sup> S. Kirchner, Z. Ignatova, *Nat Rev Genet* **2015**, *16*, 98-112

<sup>15</sup> I. A. Roundtree, M. E. Evans, T. Pan, C. He, *Cell* **2017**, *169*, 1187-1200

<sup>16</sup> J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry Fifth Edition, Transfer RNA molecules have a common design* **2002**, *29.1.2*

<sup>17</sup> T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Muller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51*, 7110-7131

<sup>18</sup> P. F. Agris, *EMBO Rep* **2008**, *9*, 629-635

souvent ces modifications. Un exemple est la présence de la wybutosine en position 37 de l'ARNt<sup>Phe</sup>. Son système aromatique élargit lui permet d'établir des interactions de type stacking supplémentaires avec la première base du codon et confère une plus grande stabilité à la boucle anticodon en évitant l'appariement à la base uracile présente en position 33.<sup>19</sup>

Le deuxième groupe de modifications est positionné à l'extérieur de l'anticodon et contrôle la stabilité et le bon repliement de la molécule d'ARNt en forme de L (Figure 2B).<sup>20</sup> L'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial chez l'humain en est un exemple frappant. En effet, lorsque la modification m<sup>1</sup>A9 est absente, l'ARNt<sup>Lys</sup> ne se replie pas en feuille de trèfle mais il adopte une structure étirée due à l'appariement des bases A9 et U64. La méthylation de A9 suffit à induire le bon repliement de la séquence.<sup>21</sup>

Le troisième groupe de modifications détermine l'identité de l'ARNt. Ces modifications sont requises pour qu'une aminoacyl ARNt synthétase charge son acide aminé sur le bon ARNt. Par exemple, l'ARNt<sup>Ile</sup> chez une bactérie est modifié en position 34 par une lysidine.<sup>22</sup> Cet ARNt est reconnu sélectivement par l' aminoacyl ARNt synthétase correspondante tandis que l'ARNt ne portant pas cette modification est chargé avec une méthionine par une autre aminoacyl ARNt synthétase.<sup>23</sup>

### 2.2.2. Modifications des ARNr

Approximativement 2% des nucléotides contenus dans l'ARNr sont modifiés, ce qui représente environ 100 sites chez la levure et 200 sites chez l'Homme. La diversité des modifications est moindre que pour les ARNt. En effet, la grande majorité correspond à des méthylations du ribose en position 2' (Am) et des pseudouridines. Ces modifications ne sont pas distribuées de façon homogène mais plutôt regroupées en clusters dans des régions importantes à la fonction du ribosome. On les retrouve donc principalement au site de fixation

---

<sup>19</sup> J. W. Stuart, K. M. Koshlap, R. Guenther, P. F. Agris, *J Mol Biol* **2003**, *334*, 901-918

<sup>20</sup> Y. Motorin, M. Helm, *Biochemistry* **2010**, *49*, 4934-4944

<sup>21</sup> M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13338-13346

<sup>22</sup> T. Muramatsu, S. Yokoyama, N. Horie, A. Matsuda, T. Ueda, Z. Yamaizumi, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa, *J Biol Chem* **1988**, *263*, 9261-9267

<sup>23</sup> T. Muramatsu, K. Nishikawa, F. Nemoto, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *Nature* **1988**, *336*, 179-181

de l'ARNt, au site peptidyltransférase et à l'interface des deux sous-unités du ribosome (Figure 4).<sup>24</sup>

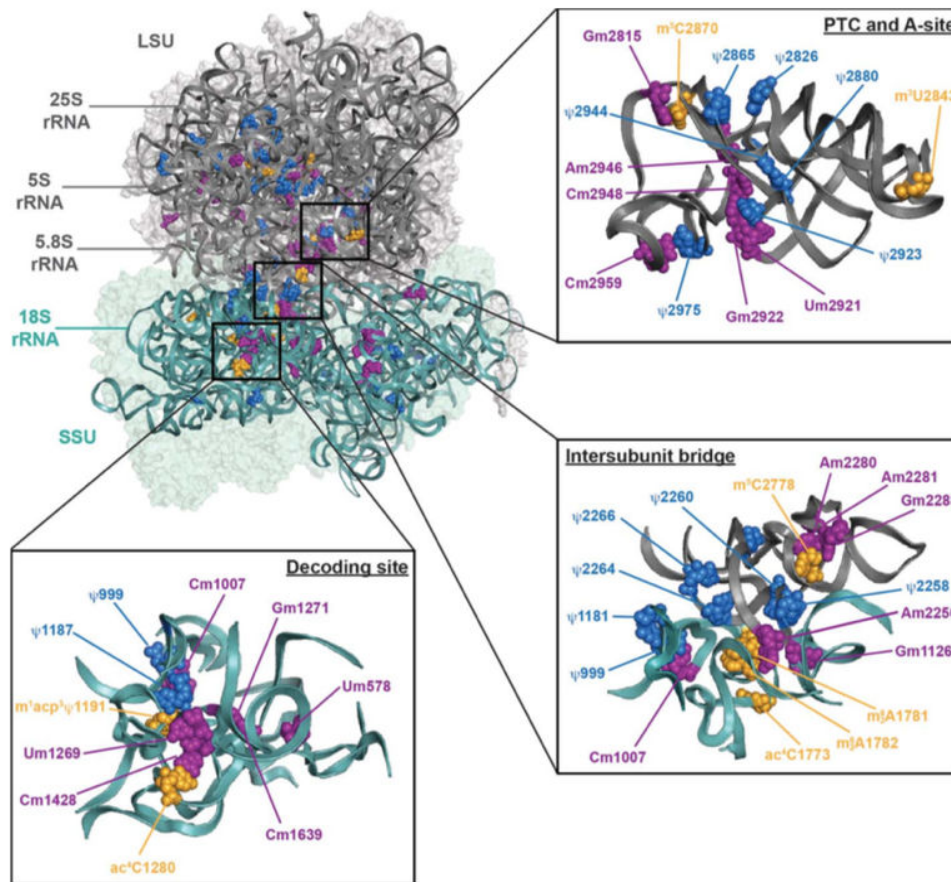


Figure 4 : Distribution des modifications de l'ARNr sur le ribosome de levure *S. cerevisiae*. En gris : la grande sous-unité. En vert : la petite sous-unité. En violet : la modification Am. En bleu :  $\Psi$ . En orange : autres modifications.<sup>25</sup>

Des études fonctionnelles de ces modifications dans le ribosome de levure ont démontré que la délétion d'une seule modification avait rarement un effet sur la croissance cellulaire. Par exemple, une étude a été menée pour étudier le phénotype de délétions individuelles des différents gènes d'ARNsno impliqués dans l'installation de méthylation en position 2'.<sup>26</sup> L'étude révèle des phénotypes différents suivant les gènes mais en général la croissance des cellules n'est que légèrement impactée. A l'inverse, empêcher la formation de plusieurs

<sup>24</sup> W. A. Decatur, M. J. Fournier, *Trends Biochem* **2002**, 27, 344-351

<sup>25</sup> K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma, K. D. Entian, D. L. J. Lafontaine, M. T. Bohnsack, *RNA Biol* **2016**, 14, 1138-1152

<sup>26</sup> J. Esguerra, J. Warringer, A. Blomberg, *RNA* **2008**, 14, 649-656

modifications dans un cluster donné impacte plus sérieusement la fidélité de la traduction.<sup>27</sup> Les modifications sur les ARNr participent donc de façon générale au maintien de l'efficacité et de la fidélité de la synthèse des protéines. Il est généralement admis qu'elles servent à stabiliser la structure secondaire et tertiaire du ribosome.

### 2.2.3. Modifications d'ARNm

Une des modifications les plus étudiées chez les ARNm est celle de la coiffe positionnée à l'extrémité 5' : la 7-méthylguanosine.<sup>28</sup> Elle est impliquée dans la stabilité de l'ARNm et sa traduction. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons surtout aux modifications internes des transcrits. La m<sup>6</sup>A est la modification la plus abondante dans les ARNm eucaryotes. Elle se retrouve principalement dans la région codante et les régions 3' non traduites, avec un enrichissement important en amont du codon stop.<sup>29</sup> La m<sup>1</sup>A, moins abondante, a été observée uniquement près du site de début de traduction.<sup>30</sup> Il est intéressant de noter que la base adjacente à la coiffe est souvent méthylée en position 2', et peut être une adénosine diméthylée m<sup>6</sup>Am. La m<sup>5</sup>C a été identifiée dans des régions non-traduites<sup>31</sup> tandis que son produit d'oxydation la hm<sup>5</sup>C est observée dans des exons et des introns.<sup>32</sup> La pseudouridine, qu'on retrouve dans la plupart des ARN a aussi été détectée sur les ARNm dans des conditions de stress.<sup>33</sup> Enfin l'inosine est présente sur des ARNm principalement dans des régions non codantes (Figure 5).<sup>34</sup>

---

<sup>27</sup> A. Baudin-Baillieu, C. Fabret, X. H. Liang, D. Piekna-Przybylska, M. J. Fournier, J. P. Rousset, *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 7665-7677

<sup>28</sup> I. Topisirovic, Y. V. Svitkin, N. Sonenberg, A. J. Shatkin, *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011, *2*, 277-298

<sup>29</sup> a) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kiupec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* **2012**, *485*, 201-206 ; b) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C.E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* **2012**, *149*, 1635-1646

<sup>30</sup> X. Li, X. Xiong, K. Wang, L. Wang, X. Shu, S. Ma, C. Yi, *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 311-316

<sup>31</sup> J. E. Squires, H. R. Patel, M. Nusch, T. Sibbritt, D. T. Humphreys B. J. Parker, C. M. Suter, T. Preiss, *RNA Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 5023-5033

<sup>32</sup> B. Delatte, F. Wang, L. V. Ngoc, E. Collignon, E. Bovin, R. Deplus, E. Calonne, B. Hassabi, P. Putmans, S. Awe, C. Wetzel, J. Kreher, R. Soin, C. Creppe, P. A. Limbach, C. Guezdan, V. Kruys, A. Brehm, S. Minkhina, M. Defrance, R. Steward, F. Fuks, *Science* **2016**, *351*, 282-285

<sup>33</sup> T. M. Carlile, M. F. Rojas-Duran, B. Zinshteyn, H. Shin, K. M. Bartoli, W. V. Gilbert, *Nature* **2014**, *515*, 143-146

<sup>34</sup> E. Y. Levanon, E. Eisenberg, R. Yelin, S. Nemzer, M. Halleger, R. Shemesh, Z. Y. Fligelman, A. Shoshan, S. R. Pollock, D. Sztybel, M. Olshansky, G. Rechavi, M. F. Jantsch, *Nat Biotechnol* **2014**, *515*, 143-146

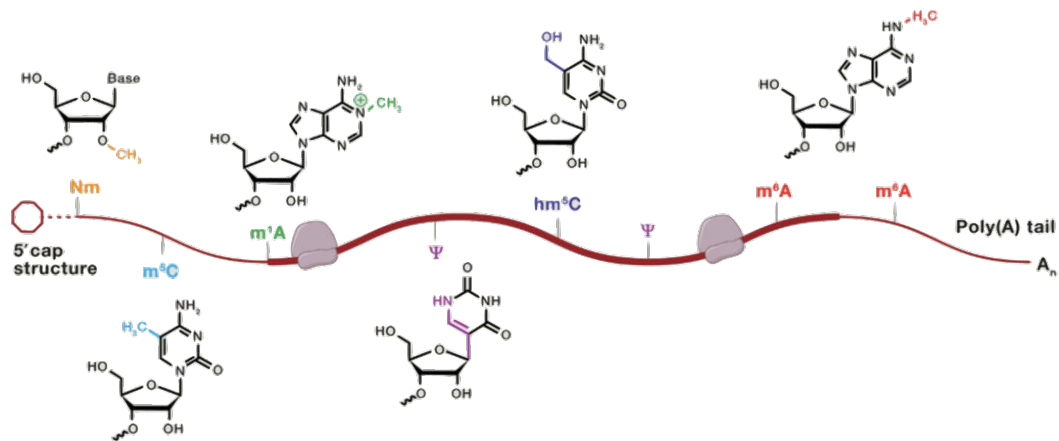


Figure 5 : Modifications présentes sur les ARNm des eucaryotes. Région codante en gras.<sup>35</sup>

Les différentes bases modifiées observées en interne des ARNm participent à la régulation de la traduction. La méthylation m<sup>6</sup>A a été la modification la plus étudiée, elle affecte presque tous les aspects du métabolisme des ARNm. En effet, la présence de m<sup>6</sup>A peut influencer la maturation des ARNm à différents niveaux en induisant un épissage alternatif<sup>36</sup> ou une polyadénylation alternative.<sup>37</sup> La méthylation impacterait aussi le transport de l'ARNm mature vers le cytoplasme en accélérant le processus.<sup>38</sup> De plus, il existe une relation étroite entre la m<sup>6</sup>A et la dégradation des ARNm. En effet, les protéines YTHDF2 se lient sélectivement à des ARNm portant la m<sup>6</sup>A pour les acheminer vers des centres de dégradation de l'ARN.<sup>39</sup> Une régulation complexe de la traduction découle également de la présence de m<sup>6</sup>A sur l'ARNm. D'un côté, l'absence de la méthylation dans des cellules souches embryonnaires de souris améliore légèrement l'efficacité de la traduction suggérant un effet régulateur négatif de la m<sup>6</sup>A.<sup>40</sup> En revanche une autre étude a montré que dans le cytoplasme, les ARNm méthylés sont reconnus spécifiquement par l'enzyme YTHDF1, un marqueur qui

<sup>35</sup> I. A. Roundtree, M. E. Evans, T. Pan, C. He, *Cell* **2017**, *169*, 1187-1200

<sup>36</sup> C. R. Alarcon, H. Goodarzi, H. Lee, X. Liu, S. Tavazoie, S. F. Tavazoie, *Cell* **2015**, *162*, 1299-1308

<sup>37</sup> S. Ke, E. A. Alemu, C. Mertens, E. C. Gantman, J. J. Fak, A. Mele, B. Haripal, I. Zucker-Scharff, M. J. Moore, C.Y. Park, C. B. Vagbo, A. Kussnierczyk, A. Klungland, J. E. Darnell, R. B. Darnell, *Genes Dev* **2015**, *29*, 2037-2053

<sup>38</sup> G. Zheng, J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C. M. Huang, C. J. Li, C. B. Vagbo, Y. Shi, W. L. Wang, S. H. Song, Z. Lu, R. P. Bosmans, Q. Dai, Y. J. Hao, X. Yang, W. M. Zhao, W.M Tong, X. J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. E. Krokan, A. Klungland, Y. G. Yang, C. He, *Mol Cell* **2013**, *49*, 18-29

<sup>39</sup> X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, *Nature* **2014**, *505*, 117-120

<sup>40</sup> S. Geula, S. Moshitch-Moshkovitz, D. Dominissini, A. A. Mansour, N. Kol, M. Salmon-Divon, V. Hershkovitz, E. Peer, N. Mor, Y. S. Manor, M. S. Ben-Haim, E. Eyal, S. Yunger, Y. Pinto, D. A. Jaitin, S. Viukov, Y. Rais, V. Krupalnik, E. Chomsky, M. Zerbib, I. Maza, Y. Rechavi, R. Massarwa, S. Hanna, I. Amit, E. Y. Levanon, N. Amariglio, N. Stern-Ginossar, N. Novershtern, G. Rechavi, J. H. Hanna, *Science* **2015**, *347*, 1002-1006

permet une traduction préférentielle de l'ARNm.<sup>41</sup> Ceci n'est qu'un aperçu non exhaustif des processus biologiques dans lesquels la m<sup>6</sup>A est impliquée.

Nous avons vu que les ARN jouent un rôle central dans la biologie de la cellule. De plus, les différentes modifications post-transcriptionnelles, reliées les unes aux autres, affectent tous les ARN. La méthylation est la modification la plus répandue et la plus simple chimiquement. Cependant, l'addition d'un groupement méthyle à des biomolécules actives telles que les acides nucléiques mais aussi les protéines, les neurotransmetteurs... entraîne un changement des propriétés physico-chimiques de ces molécules. Nous allons maintenant nous intéresser aux acteurs de la méthylation : les méthyltransférases.

### 3. Méthylation et méthyltransférases

#### 3.1. Généralités

Les méthyltransférases (MTases) catalysent le transfert d'un groupement méthyle du cofacteur S-adénosyl-L-méthionine (SAM), aussi appelé AdoMet, vers leur substrat. Après transfert du groupement méthyle sur le substrat, la SAM est convertie en S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) (Schéma 1).<sup>42</sup>

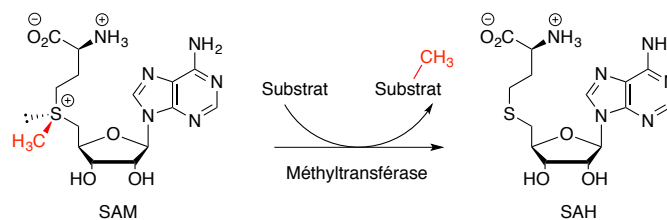


Schéma 1 : Processus général de méthylation catalysé par les MTases.

La SAM est le principal cofacteur utilisé par les MTases. C'est une molécule hybride composée d'un groupement adénosyle lié en position 5' à l'atome de soufre chargé positivement de la L-méthionine. L'atome de soufre est chiral, il possède une géométrie pyramidale avec trois substituants différents et un doublet non liant. Le cofacteur est

<sup>41</sup> X. Wang, B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 1388-1399

<sup>42</sup> M. Fontecave, M. Atta, E. Mulliez, *Trends in Biochemical Sciences* **2004**, *29*, 243-249

biosynthétisé à partir de l'ATP et de la méthionine par une réaction catalysée par la SAM synthétase. Cette réaction génère la SAM sous la configuration absolue S de l'atome de soufre.<sup>43</sup>

La SAM doit sa réactivité à la présence du groupement sulfonium. En effet, les atomes de carbone adjacents ont un caractère électrophile et peuvent être impliqués dans des réactions de substitution nucléophile. La grande majorité des MTases SAM-dépendantes utilisent cette réactivité de la SAM pour effectuer le transfert du méthyle sur divers substrats nucléophiles.<sup>44</sup> D'autres MTases de type « radical SAM » utilisent un mécanisme radicalaire.<sup>45</sup>

Enfin, il existe d'autres cofacteurs donneurs de méthyle tel que le méthyltétrahydrofolate,<sup>46</sup> mais nous nous intéresserons dans ce travail uniquement aux MTases utilisant le cofacteur SAM.

### 3.2. Classification structurale des MTases

Les MTases SAM-dépendantes sont classées selon 5 familles structurellement distinctes (I-V).

- La classe I contient le plus grand nombre de MTases. La première structure à avoir été déterminée est celle de l'ADN MTase bactérienne M.HhaI en 1993.<sup>47</sup> La structure des MTases de cette famille possède un repliement de Rossmann, composée de sept feuillets  $\beta$  avec un feuillet renversé caractéristique à l'extrémité C-terminale, entourées de 6 hélices  $\alpha$  de chaque côté (Figure 6). La SAM se fixe dans le sillon central adjacent à la première hélice  $\alpha$  en position N-terminale.

La classe I catalyse la majorité des réactions de méthylation par un mécanisme de type  $SN_2$  principalement sur des atomes d'azote, d'oxygène ou des carbones activés. On y trouve en

---

<sup>43</sup> G. D. Markham, E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *J Biol Chem* **1980**, 255, 9082-9092

<sup>44</sup> J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr Opin Struct Biol* **2002**, 12, 783-793

<sup>45</sup> J. B. Broderick, B. R. Duffus, K. S. Duschene, E. M. Shepard, *Chem Rev* **2014**, 114, 4229-4317

<sup>46</sup> S. W. Ragsdale, *Vitam Horm Chap 10 : Catalysis of Methyl Group Transfers Involving Tetrahydrofolate and B<sub>12</sub>* **2008**, 79, 293-317

<sup>47</sup> a) X. Cheng, S. Kumar, J. Posfai, J.W. Pflugrath, R.J. Roberts, *Cell* **1993**, 74, 299-307 ; b) J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr Opin Struct Biol* **2002**, 12, 783-793

majorité des MTases d'ADN et de protéines mais également quelques MTases d'ARN et de petites molécules telles que la O-MTase de catéchol (COMT).<sup>48</sup>

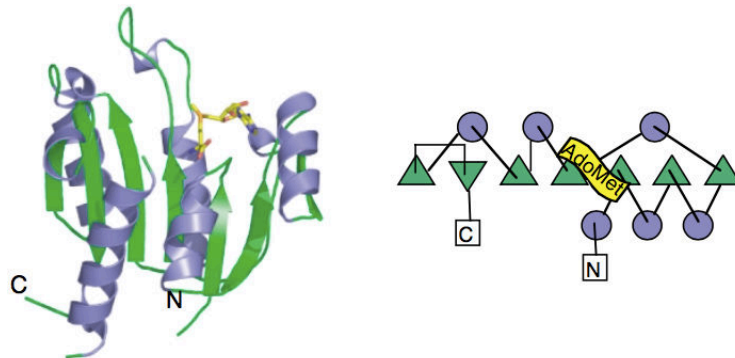


Figure 6 : A gauche : structure tertiaire représentative de la classe I des MTases (enzyme M.HhaI, code PDB : 6MHT). A droite : diagramme topologique de l'enzyme.<sup>48</sup>

- La classe II dont fait partie le domaine de réactivation de la méthionine synthase (MetH) ne ressemble en rien à la classe I. Sa structure comporte un long feuillet  $\beta$  central entouré d'hélices  $\alpha$  à chaque extrémité. La SAM se lie dans une conformation étirée à une poche superficielle proche du feuillet central (Figure 7)

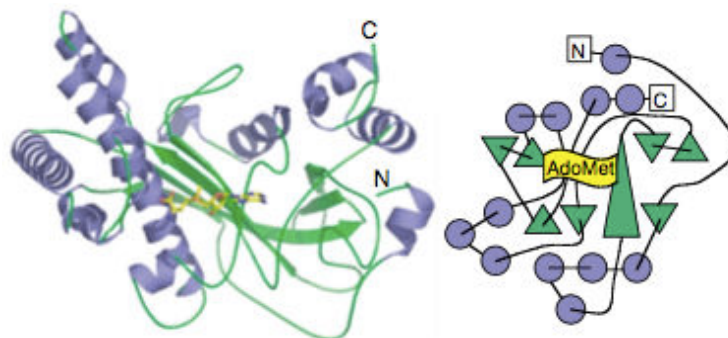


Figure 7 : A gauche : structure tertiaire représentative de la classe II des MTases (enzyme MetH, code PDB : 1MSK). A droite : diagramme topologique de l'enzyme.

- La classe III dont fait partie la MTase de precorrin-4 comporte un site actif replié entre deux domaines  $\alpha\beta\alpha$  composés de 5 feuillets et 4 hélices. La SAM se lie entre les deux domaines (Figure 8). Les deux familles structurales classes II et III sont rarement rencontrées.

<sup>48</sup> H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, 28, 329-335



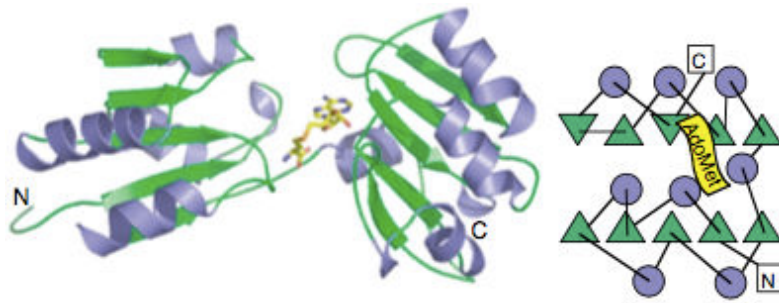


Figure 8 : A gauche : structure tertiaire représentative de la classe II des MTases (enzyme CbiF, code PDB : 1CBF). A droite : diagramme topologique de l'enzyme.

- La famille SPOUT (classe IV) est uniquement composée de MTases d'ARN généralement trouvées chez les bactéries et les archées.<sup>49</sup> La structure tertiaire est composée de 6 feuillets  $\beta$  entourés de 7 hélices  $\alpha$  dont les trois premiers feuillets forment une moitié de motif Rossmann. La SAM se fixe au-dessus du feuillet 4 dans une conformation repliée. Une portion de 30 résidus de la partie C-terminale est rabattue vers la structure sous la forme d'un nœud caractéristique (Figure 9).

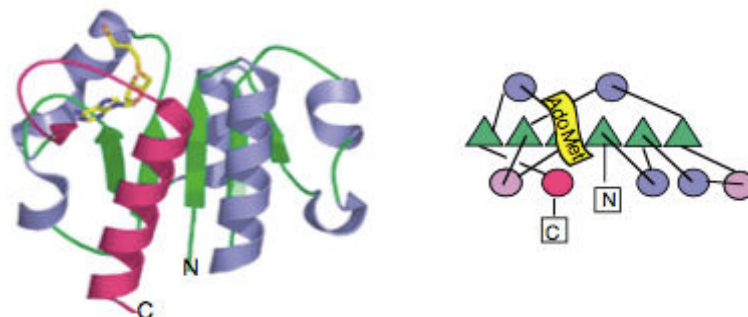


Figure 9 : A gauche : structure tertiaire représentative de la classe II des MTases (enzyme YibK, code PDB : 1MXI). A droite : diagramme topologique de l'enzyme.

- La classe V, la famille à domaine SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax), comporte le groupe des MTases responsables de la méthylation des lysines des protéines. La structure est formée de 8 feuillets  $\beta$  courbés avec l'extrémité C-terminale formant un nœud similaire à la classe IV. Il est intéressant de noter que pour ces enzymes, les sites de fixation du cofacteur et du substrat sont situés sur des faces opposées du domaine SET. Les deux sites sont liés par un canal étroit où a lieu la méthylation (Figure 10).

<sup>49</sup> V. Anantharaman, E. V. Koonin, L. Aravind, *J Mol Microbiol Biotechnol* **2002**, 4, 71-75

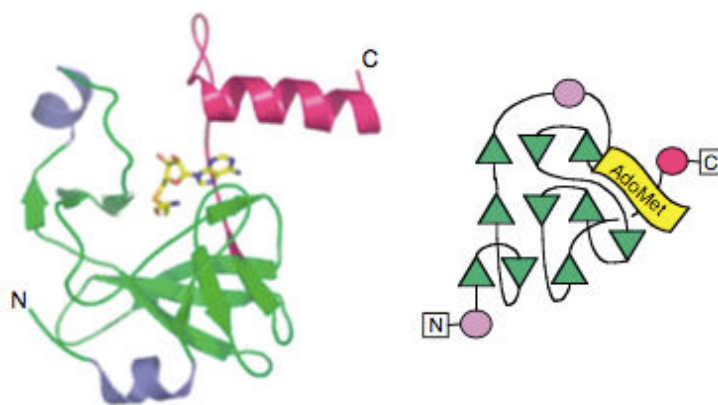


Figure 10 : A gauche : structure tertiaire représentative de la classe II des MTases (enzyme Set7/9, code PDB : IO9S). A droite : diagramme topologique de l'enzyme.

### 3.3. Classification des MTases en fonction des substrats

Les MTases SAM-dépendantes méthylent un large panel de biomolécules dont l'ADN, l'ARN, les protéines, mais aussi les polysaccharides, les lipides, les neurotransmetteurs et d'autres petites molécules.

#### 3.3.1. Les MTases d'ADN (DNMT)

Les MTases d'ADN (DNMT) catalysent trois types de méthylation : la méthylation des amines exocycliques de la cytosine et de l'adénosine<sup>50</sup> ainsi que la méthylation de la position C5 de la cytosine, la plus courante.<sup>51</sup> Il est à noter que la présence de la modification m<sup>6</sup>A sur l'ADN est restée incertaine jusqu'à récemment en raison de sa faible occurrence.<sup>52</sup>

Chez les eucaryotes, trois DNMT sont impliquées dans le processus de méthylation en position C5 de la cytosine. La DNMT1 catalyse la méthylation des séquences CpG durant la réplication de l'ADN pour copier le motif de méthylation du brin parent sur le brin nouvellement synthétisé. Elle permet le maintien du motif de méthylation sur l'ADN. En revanche, la DNMT3a et la DNMT3b permettent la méthylation de l'ADN non modifié établissant un motif de méthylation *de novo*.

<sup>50</sup> A. Jeltsch, *Biol Chem* **2001**, 382, 707-710

<sup>51</sup> L. D. Moore, T. Le, G. Fan, *Neuropsychopharmacology Rev* **2013**, 38, 23-38

<sup>52</sup> N. C. Parashar, G. Parashar, H. Nayyar, R. Sandhir, *Biochimie* **2018**, 144, 56-62

Pour que les DNMT puissent méthyler l'ADN, il s'effectue un basculement de la base cible en dehors de la double hélice de l'ADN. La base se lie alors à une poche hydrophobe du site catalytique de la MTase pour être méthyliée. Un mécanisme de méthylation du carbone en position 5 de la cytosine a été proposé pour DNMT1. Dans un premier temps, le carbone C5 est activé par attaque nucléophile de la cystéine 1226 de DNMT1 en position C6 de la cytosine. Le carbone C5 réagit alors avec le méthyle de la SAM. Finalement, une  $\beta$ -élimination du proton H5 permet la réaromatisation du cycle et la formation de la m<sup>5</sup>C (Schéma 2).<sup>53</sup>

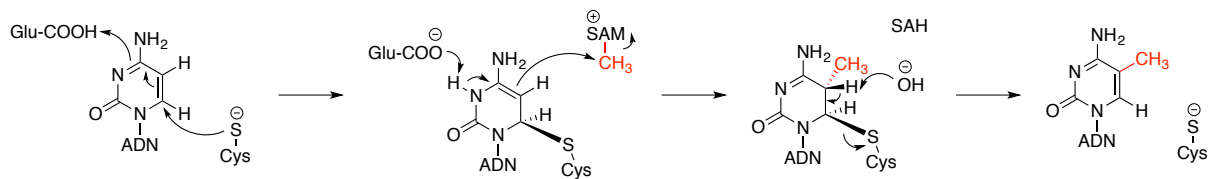


Schéma 2 : Proposition de mécanisme pour la catalyse de la méthylation par DNMT1.<sup>53</sup>

La méthylation de l'ADN aux sites CpG est impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X et la répression de l'expression des gènes.<sup>54</sup>

### 3.3.2. Les MTases des protéines

La méthylation des protéines a lieu principalement sur des résidus arginine, lysine, histidine, méthionine et les groupements carboxyles des résidus aspartate et glutamate ainsi que les groupements NH<sub>2</sub> et COOH terminaux.

Parmi les modifications citées précédemment les plus étudiées sont les méthylations d'histones par les méthyltransférases de lysines (PKMT) et d'arginines (PRMT). Les enzymes impliquées dans la méthylation de ces résidus ont pour la plupart été isolées et caractérisées.

Les PKMT font partie de la classe V à domaine SET excepté Dot1 qui appartient à la classe I des MTases. Ces MTases ajoutent un ou plusieurs groupements méthyles sur l'amine  $\epsilon$  de la

<sup>53</sup> Q. Du, Z. Wang, V. L. Schramm, *PNAS* **2016**, *113*, 2916-2921

<sup>54</sup> P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat Rev Genet* **2002**, *3*, 415-428

lysine. Des lysines mono-, di-, et triméthylées sont alors formées. La méthylation des lysines augmente progressivement l'encombrement et l'hydrophobicité du résidu ce qui peut perturber la formation de liaisons hydrogène ou créer de nouveaux sites de fixation pour des enzymes spécifiques (Schéma 3).<sup>55</sup>

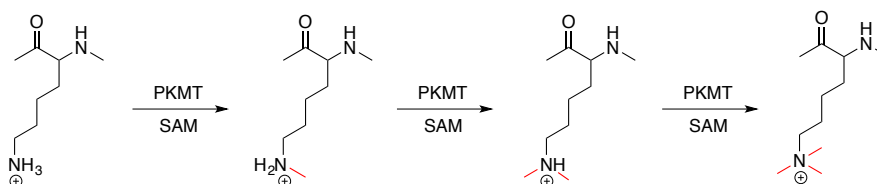


Schéma 3 : Méthylation des lysines par les PKMT.

La méthylation de résidus arginines est aussi une modification courante chez les eucaryotes et les cibles principales des PRMT sont les queues N-terminales des histones. Elles appartiennent à la classe I. Il existe 3 types de PKMT capables de méthyler le groupement guanidinium. Les enzymes de type I forment la monométhylarginine et la diméthylarginine asymétrique. Les types II catalysent aussi la formation de la monométhylarginine et la diméthylarginine symétrique. Enfin, le type III assure uniquement la monométhylation des arginines (Schéma 4).<sup>56</sup>

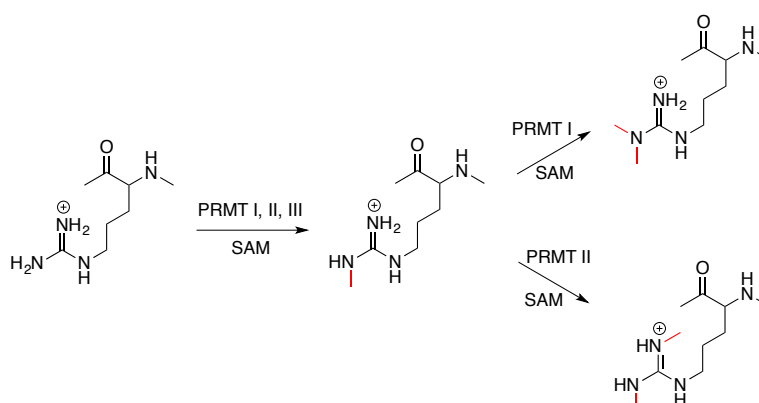


Schéma 4 : Méthylation des arginines par les PRMT.

<sup>55</sup> a) D. Y. Lee, C. Teyssier, B. D. Strahl, M. R. Stallcup, *Endocrine Reviews* **2005**, 26, 147-170, b) J. Murn, Y. Shi, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, 18, 517-527

<sup>56</sup> A. Di Lorenzo, M. T. Bedford, *FEBS Letters* **2011**, 585, 2024-2031

### 3.3.3. Les MTases d'ARN (RNMT)

Environ deux tiers des centaines de modifications post-transcriptionnelles présentes sur les ARN impliquent un transfert de méthyle. En comparaison à l'ADN, l'ARN présente une plus grande diversité des sites de méthylation. La majorité des atomes méthylés sont des azotes et jusqu'à maintenant seuls les azotes impliqués dans le lien glycosidique ainsi que les azotes en positions N3 et N7 de l'adénosine n'ont pas été identifiés comme des sites de méthylation. La position 2' du ribose et les carbones en position C5 des pyrimidines et en position C2 et C8 de l'adénosine peuvent également être méthylés. De plus, certains nucléotides peuvent subir plusieurs modifications successives menant à la formation de bases hypermodifiées. La réaction de méthylation peut donc avoir lieu sur un nucléotide déjà modifié (Figure 11).<sup>57</sup>

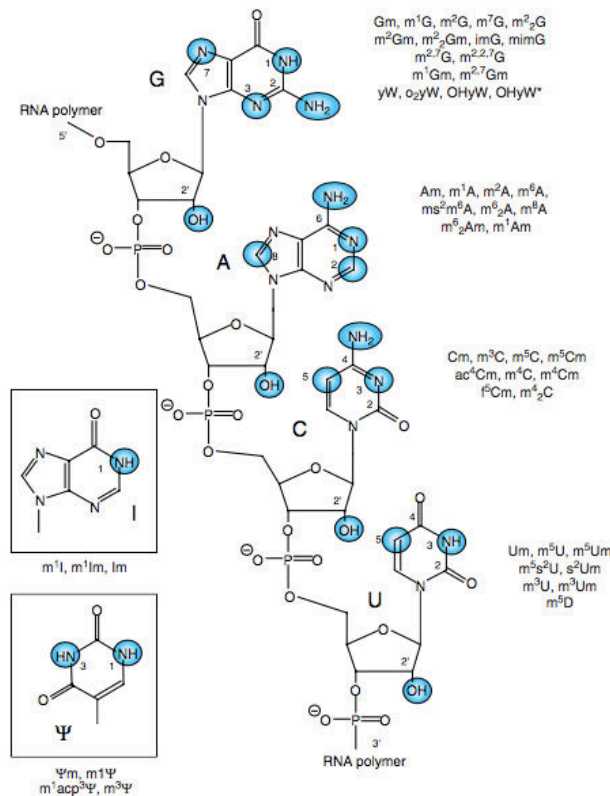


Figure 11 : Sites connus de méthylation de l'ARN.<sup>57</sup>

Cette diversité de substrats se retrouve dans les MTases impliquées. En effet, trois classes de RNMT, comptant plus de 60 membres, participent à la méthylation des ARN. Ces RNMT

<sup>57</sup> Y. Motorin, M. Helm, *Advanced Review* **2011**, 2, 611-631

appartiennent principalement aux classes I et IV. La troisième famille fait partie des enzymes à SAM-radical. Seulement deux RNMT ont été identifiées dans cette dernière catégorie, Cfr et RlmN qui méthylent les carbones C8 et C2 respectivement d'adénosines sur des ARNr bactériens.

La méthylation de la position N6 de l'adénosine est la modification actuellement la plus étudiée. La m<sup>6</sup>A a été découverte il y a plus de 40 ans et a été identifiée chez les bactéries, l'homme et les virus. Cependant, elle n'est devenue un sujet de recherche brûlant dans le domaine de l'épitranscriptomique qu'au cours de ces six dernières années.<sup>58</sup> La m<sup>6</sup>A a longtemps été considérée comme étant une modification statique et inaltérable. C'est en 2011 que la première protéine déméthylante a été découverte : la protéine associée à la masse grasseuse et à l'obésité (FTO), et a ainsi ravivé l'intérêt pour la méthylation des ARNm. La m<sup>6</sup>A est installée de façon réversible par les « writers » (METTL3/METTL14) qui correspondent aux méthyltransférases et est retirée par les « erasers » (FTO, ALKBH5), des enzymes déméthylantes. Les « readers » (HNRNPC, YTHDF1, eIF3, YTHDF2) se fixent sélectivement aux ARNm portant la m<sup>6</sup>A et influencent le destin des ARNm (Figure 12).

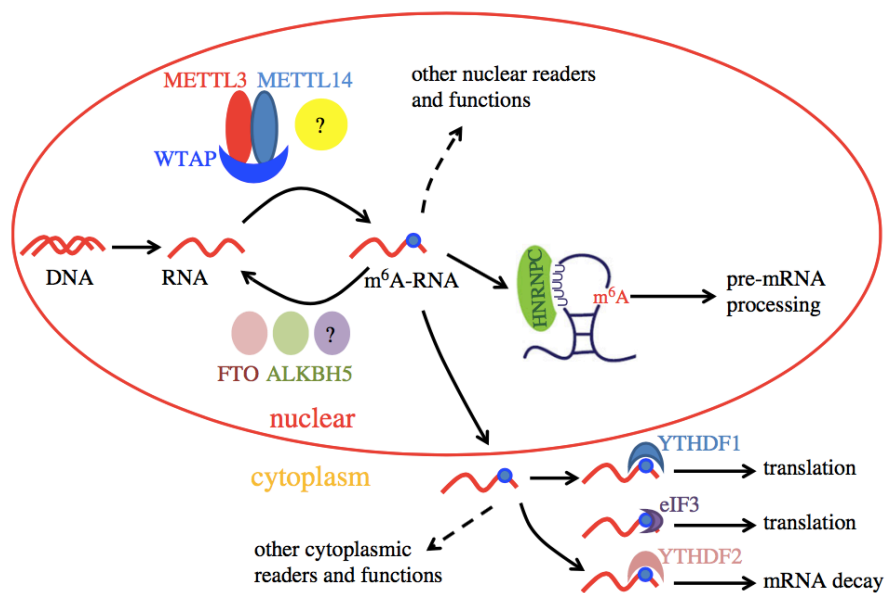


Figure 12 : Protéines impliquées dans la régulation de m<sup>6</sup>A dans une cellule eucaryote.<sup>59</sup>

<sup>58</sup> J. Huang, P. Yin, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2018**, *16*, 85-98

<sup>59</sup> G. Cao, H. B. Li, Z. Yin, R. A. Flavell, *Open Biol* **2016**, *6*, 160003

La méthylation des ARNm chez les mammifères est catalysée par le complexe METTL3/METTL14.<sup>60</sup> Des structures cristallographiques ont été obtenues par plusieurs groupes. Elles révèlent que seul METTL3 a un site actif fonctionnel pour catalyser la méthylation. Cependant, METTL14 est impliqué dans la reconnaissance de la séquence ARN spécifique à méthyler et est requis pour que METTL3 ait une activité normale.<sup>61</sup> Différentes études ont mis en avant l'existence d'une séquence consensus : RRACH où R représente A ou G et H peut soit être A, C ou U, reconnue par les RNMT pour introduire le groupement méthyle.<sup>62</sup> Le mécanisme de méthylation n'est toujours pas complètement élucidé.

### 3.3.4. Les MTases de petites molécules

Ces MTases peuvent être divisées selon deux catégories : i. les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation d'amines bioactives, telles que la phényléthanolamine N-MTase ou la catéchol O-MTase ; ii. les enzymes impliquées dans des transformations métaboliques comme la glycine-MTase ou la guanidinoacétate-MTase.<sup>63</sup> La majorité de ces enzymes appartient à la classe I des MTases.<sup>64</sup>

La catéchol O-MTase (COMT) est l'une des plus étudiées. Elle catalyse le transfert du groupement méthyle sur un groupement hydroxyle du motif catéchol du substrat. Cette enzyme possède un large spectre de substrats qui ont en commun le motif catéchol. Parmi eux, on trouve des neurotransmetteurs comme la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline.<sup>65</sup>

### 3.4. Implication des MTases dans les pathologies

Comme nous l'avons vu, les MTases ont des rôles importants dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques. Leur dérégulation est associée au développement de

---

<sup>60</sup> J. Liu, Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen, C. He, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 93-95

<sup>61</sup> a) P. Sledz, M. Jinek, *eLife* **2016**, *5*, e18434 ; b) P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam, *Mol Cell* **2016**, *63*, 306-317

<sup>62</sup> a) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* **2012**, *149*, 1635-1646 ; b) T. Csepány, A. Lin, C. J. Baldick, K. Beemon, *J Biol Chem* **1990**, *265*, 20117-20122 ; c) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kiupec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* **2012**, *485*, 201-206

<sup>63</sup> M. Fujioka, *Int J Biochem* **1992**, *24*, 1917-1924

<sup>64</sup> H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, *28*, 329-335

<sup>65</sup> E. Nissinen, P. T. Mannisto, *Int Rev Neurobiol* **2010**, *95*, 73-118

pathologies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, ou encore les maladies liées au métabolisme.<sup>66</sup>

Elles ont donc fait l'objet d'études en tant que cibles thérapeutiques dans des programmes de recherche de chimie médicinale. Des efforts considérables ont été réalisés plus particulièrement afin de moduler l'activité des MTases d'ADN, de protéines et de neurotransmetteurs. Il existe aujourd'hui plusieurs médicaments inhibiteurs de MTases sur le marché ou en étude clinique.

Par exemple, la COMT constitue une cible importante pour le développement de traitement dans la maladie de Parkinson. Deux inhibiteurs de la COMT, le tolcapone et l'entacapone (Figure 13) sont chacun utilisés en combinaison avec le levopoda, un précurseur de dopamine, pour contrer l'insuffisance en dopamine chez les patients. En effet, le levopoda est rapidement dégradé par différentes enzymes dont la COMT. Il a été prouvé qu'ils améliorent le temps d'action et réduisent les doses nécessaires en levodopa. Ces deux drogues ont été approuvées par la « Food and Drug Administration » (FDA).<sup>67</sup>

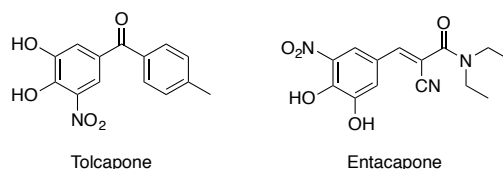


Figure 13: Inhibiteurs de COMT.

Deux inhibiteurs de DNMT sont également utilisés dans le traitement du syndrome myélodysplasique, une maladie de la moelle osseuse. La 5-azacytidine (VIDAZA) et la 5-aza-2'-désoxycytidine (decitabine) sont des analogues de nucléosides qui sont incorporés dans l'ADN et entraînent l'inactivation des DNMT (Figure 14). Cela conduit à une hypométhylation de l'ADN, une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs et une restauration de leurs fonctions.<sup>68</sup>

<sup>66</sup> P. J. Batista, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2017**, *15*, 154-163

<sup>67</sup> C. Waters, *J Am Geriat Soc* **2000**, *48*, 692-698

<sup>68</sup> a) X. C. Cai, K. Kapilashrami, M ; Luo, *Methods in enzymology Chap 11 Synthesis and Assays of Inhibitors of methyltransferases* **2016**, 574



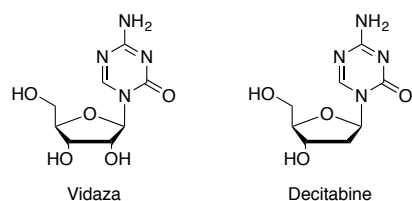


Figure 14 : Inhibiteurs de DNMT.

Une base de données, la Human Epigenetic Drug Database (HEDD), recense tous les médicaments épigénétiques actuellement approuvés ou encore à l'étude.<sup>69</sup> De nombreux inhibiteurs de MTases d'histones sont encore en phase de tests.

Concernant les RNMT, une cible potentielle chez le virus de la Dengue a été identifiée. Il s'agit de la RNMT SN5 qui participerait à la méthylation de la coiffe de l'ARN viral. Plusieurs inhibiteurs ont déjà été synthétisés mais aucun n'est actuellement sur le marché.<sup>70</sup>

#### 4. Les outils comportant le motif SAM/SAH développés pour l'étude des MTases

De nombreux analogues de SAM/SAH ont été synthétisés en tant qu'inhibiteurs de MTases. Plus récemment, ces analogues ont trouvé des fonctions plus variées et sont utilisés comme outils d'étude pour explorer les fonctions des MTases. Nous discuterons des inhibiteurs les plus connus de MTases et de l'utilisation d'analogues de SAM/SAH pour différentes applications. Nous verrons ensuite plus en détail l'emploi d'analogues de type bi-substrats.

##### 4.1. Les pan-inhibiteurs

Les pan-inhibiteurs tels que la SAH, la sinefungine et la méthylthioadénosine (MTA) inhibent de façon non spécifique différentes MTases (Figure 15).

<sup>69</sup> <http://hedds.org/index.jsp>

<sup>70</sup> Y. S. Tian, Y. Zhou, T. Takagi, M. Kameoka, N. Kawashita, *Chem Pharm Bul* **2018**, 3, 191-206

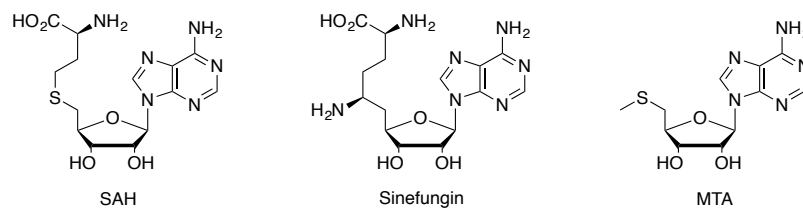


Figure 15 : Pan-inhibiteurs de MTases.

La SAH, sous-produit de la réaction de méthylation, est un inhibiteur naturel des MTases. Elle peut cependant être rapidement dégradée par la SAH hydrolase en adénosine et homocystéine dans les cellules.<sup>71</sup> La sinefungine est un analogue naturel de SAH, isolée à partir de culture de *Streptomyces griseolus*.<sup>72</sup> Elle inhibe de façon similaire à la SAH les MTases avec des  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire et ne présente pas de sélectivité. La MTA est un métabolite naturellement présent chez de nombreux organismes. Il a été décrit comme un pan-inhibiteur de MTases mais le mécanisme d'inhibition n'a pas encore été élucidé.<sup>73</sup> Contrairement à la sinefungine, la MTA possède une bonne perméabilité membranaire et est donc un inhibiteur de choix pour des tests cellulaires.

## 4.2. Les outils chimiques

### 4.2.1. Les cofacteurs synthétiques

Des analogues de SAM ont été développés afin de marquer les substrats naturels des MTases. Deux types principaux de cofacteurs synthétiques existent : les aziridinoadénosines et les analogues de SAM à double activation. Nous expliquerons ici le principe du marquage et présenterons quelques exemples.<sup>74</sup>

#### 4.2.1.1. Les aziridinoadénosines

Ces analogues portent en position 5' un groupement aziridine, un cycle à trois chaînons avec un atome d'azote, hautement réactif. Le cycle aziridine peut être formé *in situ* à partir d'un

<sup>71</sup> V. M. Richon, D. Johnston, C. J. Sneeringer, L. Jin, C. R. Majer, K. Ellinston, L. F. Jerva, M. P. Scott, R. A. Copeland, *Biol Drug Des* **2011**, 78, 199-210

<sup>72</sup> R. L. Hamil, M. M. Hoelm, *J Antibiot* **1973**, 26, 463-465

<sup>73</sup> H. G. Williams-Ashman, J. Seidenfeld, P. Galletti, *Bio Pharma* **1982**, 31, 277-288

<sup>74</sup> a) J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew Chem Int Ed* **2017**, 19, 5182-52000 ; b) J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem Biol* **2016**, 11, 583-597

précurseur appelé N-mustard. En présence de la MTase, le substrat nucléophile attaque l'aziridinium, ce qui provoque l'ouverture du cycle pour lier de façon covalente le substrat et l'analogue du cofacteur (Schéma 5). Cette méthode, appelée « marquage d'une séquence spécifique induit par une MTase » (SMILING), permet de marquer le substrat par différents groupements d'intérêt.

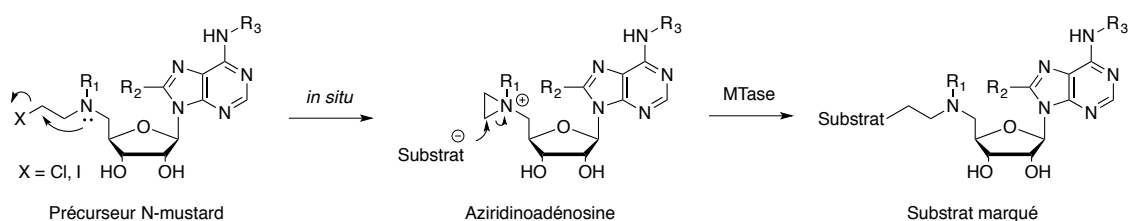


Schéma 5 : Marquage d'une séquence spécifique induit par une MTase (SMILING).

Entrée	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	H	H	H
2	H		H
3	H	H	
4	H		H
5	H	-N <sub>3</sub> ou	H
6		H	H
7		ou	H
8		H	1, 2, 4 ou  3, 4

Tableau 2 : Structures des aziridinoadénosines.

C'est le groupe de Weinhold qui utilise pour la première fois cette méthode.<sup>75</sup> Dans ses travaux, la 5'-aziridinoadénosine (Tableau 2, entrée 1) est mise en présence de MTAqI, une DNMT m<sup>6</sup>A bactérienne, et d'un oligonucléotide double brin. Un conjugué est alors obtenu par liaison de l'aziridinoadénosine à la position N6 de l'adénosine substrat. Par la suite, plusieurs groupements d'intérêt tels que des fluorophores (entrées 2 et 3)<sup>76</sup>, et une biotine (entrée 4)<sup>77</sup> ont été introduits en position C8 et N6 des dérivés aziridines.

Un second groupement réactif peut également être introduit sur l'analogue de SAM pour ajouter au conjugué obtenu une fonctionnalisation supplémentaire. Par exemple, le groupe de Rajski a introduit en position C8 un groupement azoture (entrée 5) qui après conjugaison réagit *via* une ligation de Staudinger pour introduire une biotine sur le conjugué ADN-analogue de SAM.<sup>78</sup> La molécule d'ADN est ainsi modifiée sur un site spécifique déterminé par l'enzyme, ce qui a conduit à l'identification de nouveaux substrats de MTases.

Le précurseur d'aziridine, le N-mustard, a été synthétisé par Rajski pour permettre la formation de l'aziridine *in situ*.<sup>79</sup> En effet, les dérivés aziridines souffrent d'une synthèse longue et les rendements sont faibles. Le N-mustard a été utilisé pour introduire des fonctions alcyne ou azoture (entrées 6 et 7) en position C8, N6 ou 5' de l'adénine.<sup>80</sup> Cette méthode a aussi été appliquée à la fonctionnalisation de protéines.<sup>81</sup> De plus, l'analogue synthétisé dans l'exemple 7 porte la fonction acide aminé et permet une meilleure reconnaissance de l'enzyme.

Cependant, une des limites de cette méthode est la formation d'un produit conjugué pouvant agir comme un inhibiteur de MTases. Les expériences nécessitent donc l'utilisation d'une quantité stœchiométrique de ces enzymes. Les analogues à double activation permettent de s'affranchir de cet inconvénient.

---

<sup>75</sup> M. Pignot, C. Siethoff, M. Linscheid, E. Weinhold, *Angew Chem Int Ed* **1998**, *37*, 2888-2891

<sup>76</sup> a) G. Pljevaljic, M. Pignot, E. Weinhold, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 3486-3492 ; b) F. H. Schmidt, M. Huben, B. Giber, F. Renault, M. P. Teulade-Fichou, E. Weinhold, *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 40-48

<sup>77</sup> G. Plevaljic, F. Schmidt, A. J. Scheidig, R. Lurz, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1516-1519

<sup>78</sup> L. R. Comstock, S. R. Rajski, *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 1644-1652

<sup>79</sup> R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org Lett* **2005**, *7*, 2141-2144

<sup>80</sup> a) Y. Du, C. E. Hendrick, K. S. Frye, L. R. Comstock, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2225-2233 ; b) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291-5297

<sup>81</sup> S. J. Hymbaugh Bergman, L. R. Comstock, *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 5050-5055

#### 4.2.1.2. Les analogues de SAM à double activation

Cette approche permet de marquer facilement une cible spécifique par un groupement fonctionnel qui réagit dans un deuxième temps avec des motifs plus complexes. Ici, on joue sur la capacité des MTases à transférer à leurs substrats d'autres groupements que le méthyle. Cette approche de marquage est appelée « transfert de groupement activé dirigé par une MTase » (mTAG) (Schéma 6).

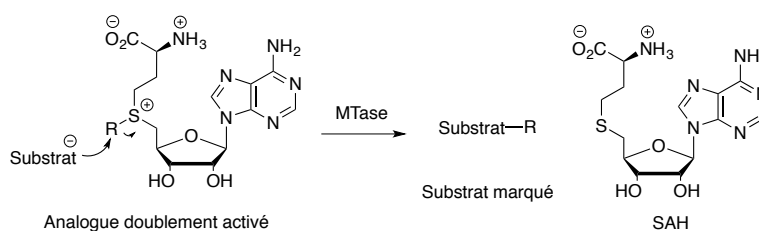


Schéma 6 : Transfert de groupement activé dirigé par une MTase (mTAG).

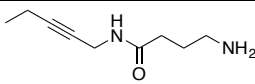

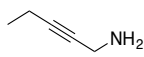
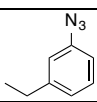
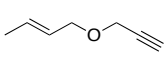
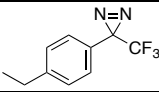
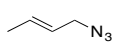
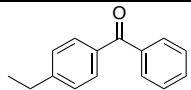
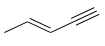
Entrée	R	Entrée	R
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5			

Tableau 3 : Structures des analogues de SAM à double activation.

Par exemple, le groupe de Klimasauskas a utilisé cette stratégie pour transférer une fonction amine sur la position C5 d'une cytosine avec la M.HhaI et sur la position N6 d'une adénosine avec M.TaqI (Tableau 3, entrée 1).<sup>82</sup> L'amine transférée réagit ensuite avec un dérivé N-

<sup>82</sup> a) G. Lukinavicius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 2758-2759

hydroxysuccinimide pour introduire un fluorophore sur un plasmide d'ADN *via* la formation d'une liaison amide. Dans une autre étude, la même méthode est appliquée à des ARNm et ARNs. Ils sont fonctionnalisés par une amine (entrée 2) en position 2' d'un ribose avec la MTase HEN1 ce qui permet un marquage spécifique de ces duplexes d'ARN.<sup>83</sup>

Des groupements alcyne (entrée 3)<sup>84</sup> et azoture (entrée 4)<sup>85</sup> ont également été incorporés pour réaliser des réactions de cycloadditions sur le substrat. Après avoir introduit un bras alcyne sur les substrats de PRMT3, le groupe de Luo a entré un fluorophore par une réaction de cycloaddition catalysée au cuivre. L'équipe a ainsi identifié plus de 80 protéines comme substrats potentiels de PRMT3.

Cependant, certains composés comme l'alcyne vrai sont peu stables. Plusieurs nouveaux analogues ont alors été synthétisés pour palier à ce problème. Ainsi des composés portant une fonction ènyne (entrée 5)<sup>86</sup> ou encore des analogues de SAM dont l'atome de soufre a été remplacé par un atome de sélénium ont été proposés.<sup>87</sup>

Les cétones sont d'autres fonctions réactives intéressantes à utiliser. Dans la littérature, l'analogue portant la fonction cétone (entrée 6) a été utilisé pour transférer cette fonction sur de l'ADN qui a ensuite réagit avec une hydroxylamine portant un fluorophore.<sup>88</sup>

Plus récemment, l'équipe de Rentmeister a décrit l'utilisation d'analogues de SAM portant des fonctions photo-activables : un azoture aryle (entrée 7), une diaziridine (entrée 8) et une benzophénone (entrée 9). Ces fonctions ont été transférées sur la coiffe d'un ARNm ce qui a permis la capture d'une protéine entrant en interaction avec la coiffe.<sup>89</sup>

---

<sup>83</sup> A. Plotnikova, A. Osipenko, V. Masevicius, G. Vilkaitis, S. Klimasauskas, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 13550-13553

<sup>84</sup> a) H. Guo, R. Wang, W. Zheng, Y. Chen, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 476-484

<sup>85</sup> K. Islam, I. Bothwell, Y. Chen, C. Sengelaub, R. Wang, H. Deng, M. Luo, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 5909-5915

<sup>86</sup> a) Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koynov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, 1943-1952 ; b) K. Islam, Y. Chen, H. Wu, I. R. Bothwell, G. J. Blum, H. Zeng, A. Dong, W. Zheng, J. Min, H. Deng, M. Luo, *PNAS* **2013**, *110*, 16778-16783

<sup>87</sup> a) M. Tomkuvienne, B. Clouet-d'Orval, I. Cerniauskas, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 6765-6773 ; b) S. Willnow, M. Martin, B. Luscher, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1167-1173

<sup>88</sup> B. W. K. Lee, H. G. Sun, T. Zang, B. J. Kim, J. F. Alfaro, Z. S. Zhou, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 3642-3643

<sup>89</sup> F. Muttach, F. Masing, A. Studer, A. Rentmeister, *Chem Eur J* **2017**, *23*, 5988-5993

## 4.2.2. Les analogues photoactivables et fluorescents

Des analogues photoactivables et fluorescents ont été synthétisés pour étudier des MTases. Ici, les analogues portent des fonctions qui ne sont pas transférables aux substrats. Les analogues portant une fonction photoactivable servent de « composé piégeant ». Ils se composent de trois parties : une fonction photoactivable, un motif permettant d'analyser et/ou de purifier l'échantillon (biotine ou fluorophore) et un motif pour la reconnaissance spécifique de l'enzyme.

Par exemple, la molécule donnée en figure 16 a conduit après irradiation UV à la formation d'un lien covalent avec des MTases d'un lysat cellulaire d'*E. coli*.<sup>90</sup>

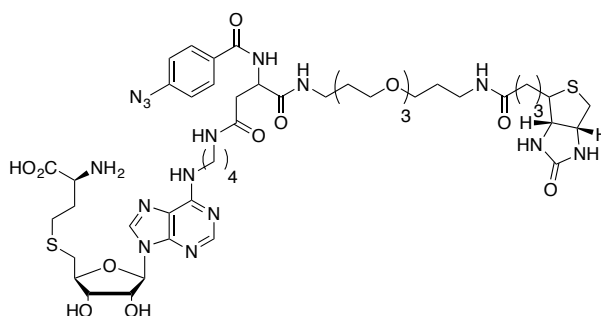


Figure 16 : Analogue de SAM photoactivable.<sup>90</sup>

## 4.3. Les analogues de type bisubstrat

### 4.3.1 Généralités

L'inconvénient des analogues de SAM ou SAH est leur manque de sélectivité pour une MTase spécifique en raison de la forte homologie structurale du domaine de fixation de la SAM. Pour parer à ce manque de sélectivité, des analogues de type bisubstrat ont été développés. Ainsi, une partie de la molécule cible le site de fixation du cofacteur SAM tandis que l'autre fragment interagit avec le site de reconnaissance du substrat. Le bisubstrat idéal doit comporter un espaceur optimisé entre les deux éléments pour mimer l'état de transition

<sup>90</sup> T. Lenz, P. Poot, E. Weinhold, M. Dreger, *Methods Bio Mol* **2012**, 803, 97-125

du mécanisme  $SN_2$  de la réaction de transfert du méthyle. La nature du linker est importante car il doit permettre un placement correct des deux éléments aux deux sites (Figure 17).<sup>91</sup>

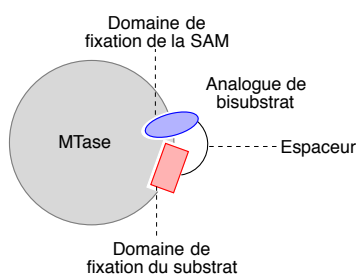


Figure 17 : Mode de fixation d'un analogue de type bisubstrat.

#### 4.3.2. État de l'art

A ce jour, les études se sont principalement concentrées sur le développement d'analogues de bisubstrats de COMT et de MTases de protéines.

##### 4.3.2.1. Les bisubstrats de petites molécules

###### 4.3.2.1.1. Les bisubstrats de la COMT

Le groupe de Diederich a publié les premiers bisubstrats inhibiteurs de l'enzyme COMT en 2000.<sup>92</sup> Une conception rationnelle a été effectuée à partir de la structure cristallographique de COMT en complexe avec la SAM, l'ion  $Mg^{2+}$  et le 3,5-dinitrocatéchol. Le bras méthionine a été omis pour simplifier les structures chimiques et la nature de l'espaceur a été optimisée par modélisation. Ainsi, un lien alkyle comportant deux atomes de carbone attaché par une fonction amide relie les deux éléments du bisubstrat. Différents cycles aromatiques ont été testés pour mimer l'adénine de la SAM (Figure 18). Des tests d'inhibition ont montré une  $CI_{50}$  de  $2 \mu M$  pour le composé portant la base adénine.

<sup>91</sup> J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 583-597

<sup>92</sup> B. Masjost, P. Ballmer, E. Borroni, G. Zurcher, F. K. Winkler, R. Jakob-Roetner, F. Diederich, *Chem Eur J* **2000**, *6*, 971-982



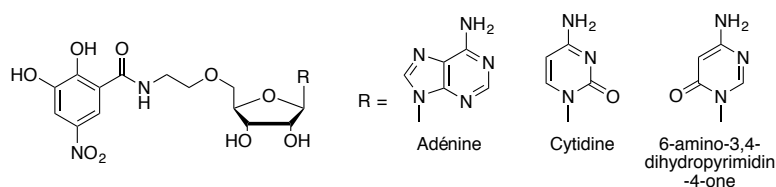


Figure 18 : Premier bisubstrats inhibiteurs de COMT.

Par la suite, le groupe a cherché à améliorer le pouvoir inhibiteur du bisubstrat en modifiant le lien unissant les deux fragments (Figure 19). Ce travail a conduit à la molécule comportant une chaîne alkyle insaturée avec une  $CI_{50}$  de 9 nM.<sup>93</sup> La co-cristallisation de ce composé avec l'enzyme a confirmé le mode de fixation de type bisubstrat.

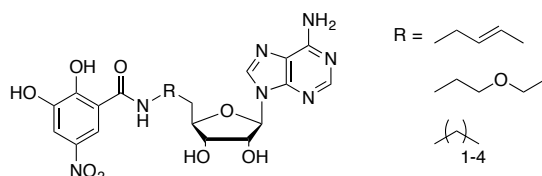


Figure 19 : Bisubstrats inhibiteurs de COMT, variation de l'espaceur.

Trois séries de dérivés ont ensuite été développées. Le groupement nitro qui serait à l'origine d'effets hépatotoxiques a été supprimé (Figure 20, série 1).<sup>94</sup> Des variations sur le ribose (série 2)<sup>95</sup> et des modifications sur le groupement adénine (série 3)<sup>96</sup> ont été effectuées. Les composés obtenus ont montré des  $CI_{50}$  intéressantes mais ils restent moins puissants que la molécule de  $CI_{50}$  de 9 nM.

<sup>93</sup> C. Lerner, B. Masjost, A. Ruf, V. Gramlich, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 42-49

<sup>94</sup> R. Paulini, C. Lerner, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1270-1274

<sup>95</sup> R. Paulini, C. Trindler, C. Lerner, L. Brandli, W. B. Schweizer, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 340-357

<sup>96</sup> a) M. Ellermann, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Schlatter, D. Roth, A. Ehler, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 9092-9096 ; b) M. Ellermann, R. Paulini, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Roth, A. Ehler, W. B. Schweizer, D. Schlatter, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Chem Eur J* **2011**, *17*, 6369-6381

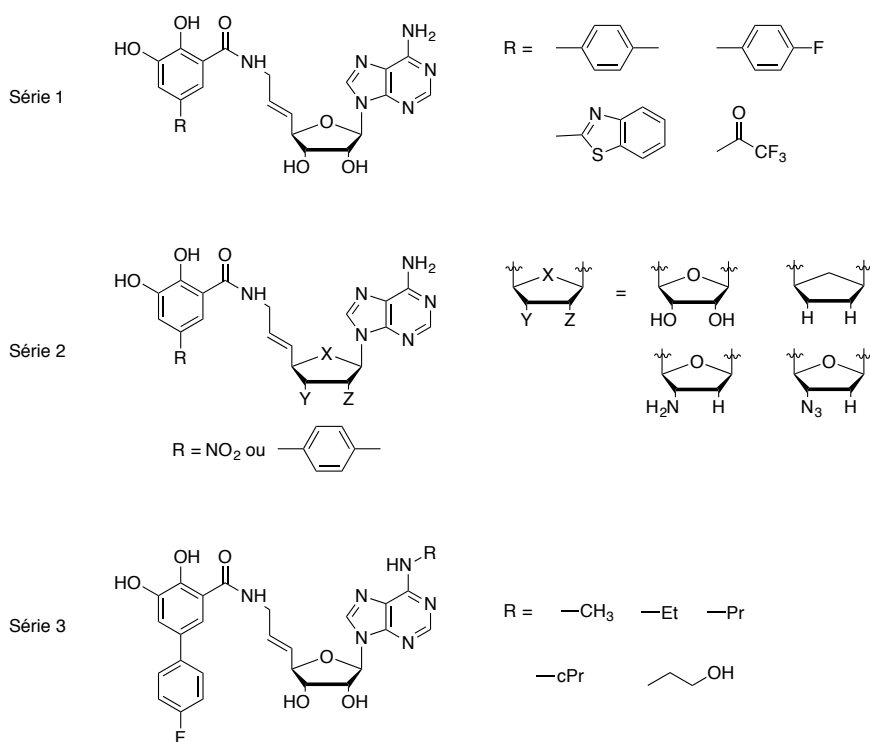


Figure 20: Bisubstrats inhibiteurs de COMT.

#### 4.3.2.1.2. Les bisubstrats de la N-méthyltransférase de nicotinamide

Les premiers dérivés de type bisubstrat inhibiteurs de N-méthyltransférase de nicotinamide (NNMT) ont été développés par le groupe de Martin.<sup>97</sup> En observant l'état de transition de la réaction de méthylation du nicotinamide, les chercheurs ont pris en compte 3 motifs : le nicotinamide, la partie méthionine et l'adénosyle du SAM. Le groupe a synthétisé différentes séries de bisubstrats comportant au moins 2 de ces motifs. Seules les molécules comportant une partie analogue de nicotinamide et un analogue de l'acide aminé ont montré une inhibition de l'enzyme (Figure 21, série 1). Un bisubstrat comportant les trois motifs a été synthétisé et s'est révélé être le meilleur inhibiteur de NNMT de l'étude avec le bisubstrat amide de la série 1. Toutes deux ont une CI<sub>50</sub> modeste d'environ 30  $\mu$ M. La sélectivité des composés n'a pas été testée.

<sup>97</sup> M. J. van Haren, R. Taig, J. Kuppens, J. Sastre Torano, E. E. Moret, R. B. Parsons, D. Sartini, M. Emanuelli, N. I. Martin, *Org Biomol Chem* **2017**, *15*, 6656-6667

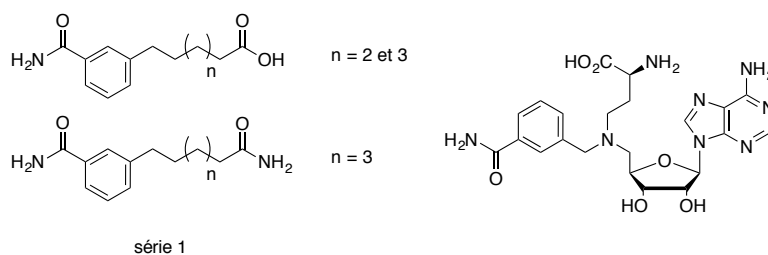


Figure 21 : Bisubstrats inhibiteurs de NNMT.

Peu de temps après, la première structure cristallographique d'un complexe NNMT/bisubstrat a été publiée par le groupe de Jin<sup>98</sup> avec une molécule composée des trois motifs comportant des espaceurs plus longs (Figure 22).

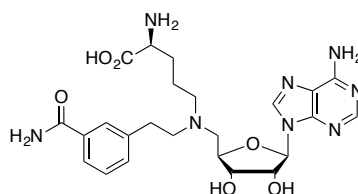


Figure 22 : Bisubstrat inhibiteur de NNMT.

#### 4.3.2.2. Les bisubstrats des MTases de protéines

Les premiers inhibiteurs bisubstrats testés sur PRMT1 ont été publiés par le groupe de Ward.<sup>99</sup> PRMT1 catalysent la méthylation de résidus arginine. L'atome de soufre de la SAM a été remplacé par un atome d'azote pour plus de stabilité et pour conserver le bras méthionine. Après étude de la structure cristallographique du site actif de l'enzyme, les auteurs ont choisi de mimer l'arginine méthylée par un motif guanidinium lié de façon covalente au motif 5'-aza- adénosine *via* des espaceurs alkyles de longueur variable ainsi qu'un lien triazole (Figure 23).

<sup>98</sup> N. Babault, A. Allali-Hassani, F. Li, J. Fan, A. Yue, K. Ju, F. Liu, M. Vedadi, J. Liu, J. Jin, *J Med Chem* **2018**, 61, 1541-1551

<sup>99</sup> J. Dowden, W. Wong, R. V. Parry, R. A. Pike, S. G. Ward, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 2103-2105

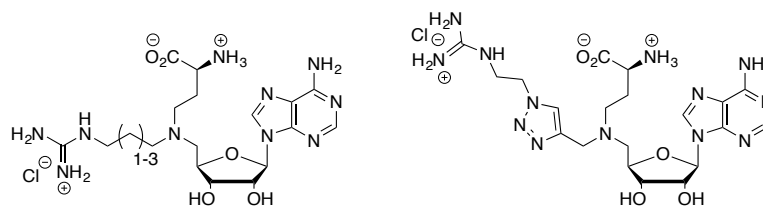


Figure 23 : Bisubstrats inhibiteurs de PRMT1.

Le bisubstrat à espaceur alkyle avec quatre atomes de carbone montre le meilleur résultat d'inhibition avec une  $CI_{50}$  de  $2.9 \mu\text{M}$  pour PRMT1. Une autre étude du même groupe a démontré que cette même molécule est sélective de PRMT1 et ne montre aucune activité pour PRMT4 (CARM1).<sup>100</sup>

Plus récemment, un bisubstrat portant un espaceur alkyle et une fonction thioéther en position 5' du motif adénosine a été synthétisé. Dans ce cas, un motif urée a été utilisé pour mimer le résidu arginine (Figure 24).<sup>101</sup> La molécule a été testée sur un panel de 29 MTases humaines et s'est révélée sélective de PRMT5 et PRMT7 avec des  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire. Cependant, le mode de fixation de la molécule n'a pas été établi et les auteurs de l'étude n'ont pas réussi à expliquer la sélectivité observée pour PRMT5 et PRMT7.

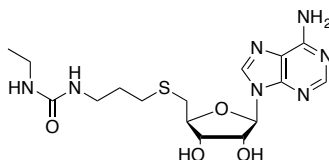


Figure 24 : Bisubstrat inhibiteur de PRMT5 et PRMT7.

D'autres structures ont été développées toujours sans le bras méthionine, en faisant varier la nature de l'espaceur. Ces molécules ont été testées sur différentes PRMT et une PKMT (G9a). Les auteurs ont comparé l'effet d'un changement d'atome en position 5' de l'analogue de SAM sur la reconnaissance des bisubstrats par les MTases.<sup>102</sup> Tandis que la molécule soufrée (Figure 25) inhibe sélectivement la PKMT avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $3.18 \pm 2.67 \mu\text{M}$ , le

<sup>100</sup> J. Dowden, R. A. Pike, R. V. Parry, W. Hong, U. A. Muhsen, S.G. Ward, *Org Biomol Chem* **2011**, 9, 7814-7821

<sup>101</sup> D. Smil, M. S. Eram, F. Li, S. Kennedy, M. M. Szewczyk, P. J. Brown, D. Barsyte-Lovejoy, C. H. Arrowsmith, M. Vedadi, M. Schapira, *ACS Med Chem Lett* **2015**, 6, 408-412

<sup>102</sup> M. van Haren, L. Q. van Ufford, E. E. Moret, N. I. Martin, *Org Biomol Chem* **2015**, 13, 549-560

composé portant un azote n'a aucun effet sur cette enzyme et au contraire inhibe sélectivement PRMT6 avec une  $CI_{50}$  de  $3.20 \mu M$ . Ce résultat souligne l'impact de petites modifications de la structure sur la sélectivité et l'efficacité des composés.

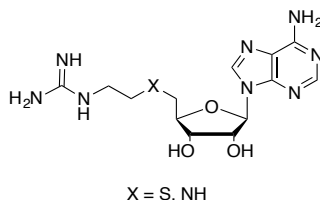


Figure 25 : Bisubstrats inhibiteurs de PRMT ou de PKMT.

La conception de bisubstrats a été aussi utilisée pour des PKMT. Le motif 5'-aza-adénosine a été lié de façon covalente à une amine substituée qui mime le résidu lysine (Figure 26).<sup>103</sup> Ces molécules ont des inhibitions de 10 % contre SET7/9 à une concentration de  $100 \mu M$ .

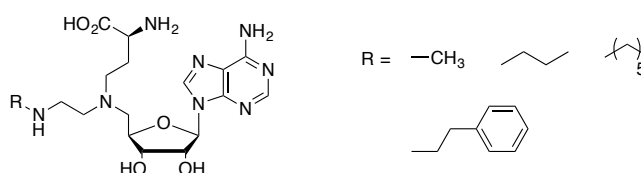


Figure 26 : Bisubstrats inhibiteurs de PKMT.

L'équipe de Huang a développé des inhibiteurs bisubstrats ciblant la N-terminal methyltransferase (NTMT1) responsable de la méthylation de l'azote N-terminal de protéines. L'analogue de SAM a été lié à un peptide avec deux types d'espaces, un triazole<sup>104</sup> ou une chaîne alkyle (Figure 27).<sup>105</sup> Contrairement aux bisubstrats précédents, le mime du substrat ne se limite pas ici au guanidinium ou à une amine substituée mais à un hexapeptide. L'analogie avec le substrat naturel est donc meilleure ce qui laisse supposer une meilleure reconnaissance et un gain de sélectivité. Le bisubstrat à lien triazole présente une  $CI_{50}$  de  $0.81 \mu M$  vis-à-vis de NTMT1 et est sélectif de l'enzyme. Cette étude démontre aussi que l'utilisation d'un lien triazole est valable pour l'élaboration de bisubstrats inhibiteurs efficaces. Les bi-substrats à lien alkyle ont également montré des  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire.

<sup>103</sup> S. Mori, K. Iwase, N. Iwanami, Y. Tanaka, H. Kagechika, T. Hirano, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 8158-8166

<sup>104</sup> G. Zhang, S. L. Richardson, Y. Mao, R. Huang, *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 4149-4154

<sup>105</sup> G. Zhang, R. Huang, *RSC Adv* **2016**, *6*, 6768-6771

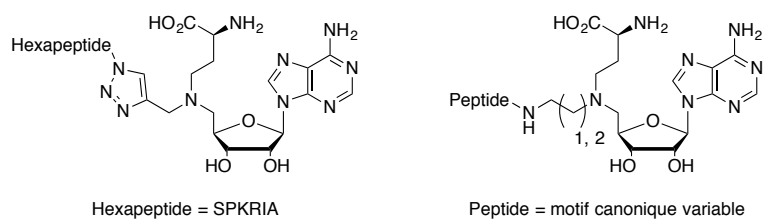


Figure 27 : Bisubstrats inhibiteurs de NTMT1.

Enfin, l'utilisation du N-mustard en présence de PRMT1 et d'un peptide substrat de PRMT1, ici une séquence de 15 acides aminés de la queue N-terminale de l'histone 4, a conduit à la formation d'un bisubstrat inhibiteur *in situ* (Figure 28).<sup>106</sup> La formation du conjugué est régiospécifique puisque l'enzyme PRMT1 greffe l'analogue préférentiellement sur son substrat naturel. La  $CI_{50}$  du bisubstrat généré est de l'ordre du micromolaire.

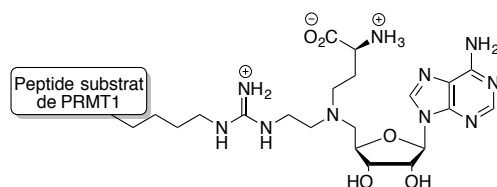


Figure 28 : Bisubstrat inhibiteur de PRMT1 généré *in situ*.

#### 4.3.2.3. Les bisubstrats de DNMT

Le groupe de Benkovic a synthétisé deux bisubstrats inhibiteurs de la DNMT  $m^6A$  Ccrn présente chez la bactérie *Brucella abortus* (Figure 29).<sup>107</sup> Les deux molécules comportent une adénosine complète pour mimer le substrat et un analogue de méthionine. Toutes les deux présentent une inhibition de Ccrn comparable à celle de la sinefungine. L'activité de ces composés a aussi été testée sur HhaI, une DNMT  $m^5C$  bactérienne. Les molécules n'inhibent pas HhaI, ceci démontre une sélectivité des bisubstrats pour Ccrn.

<sup>106</sup> T. Osborne, R. L. Weller Roska, S. R. Rajski, P. R. Thompson, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 4574-4575

<sup>107</sup> D. C. Wahnou, V. K. Shier, S. J. Benkovic, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 976-977

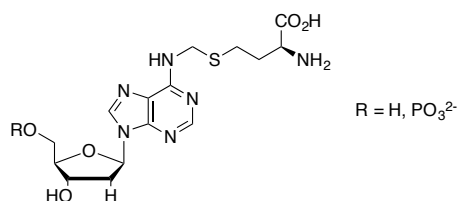


Figure 29 : Bisubstrats inhibiteurs de CcrM chez *Brucella abortus*.

Dans une autre publication, des bisubstrats ciblant la DNMT m<sup>6</sup>A, Dam, présente chez plusieurs bactéries pathogènes, ont été synthétisés à partir du motif 5'-aza-adénosine.<sup>108</sup> L'analogue de SAM est relié par des liens alkyles de taille variable à différents hétérocycles mimant la base adénine (Figure 30).

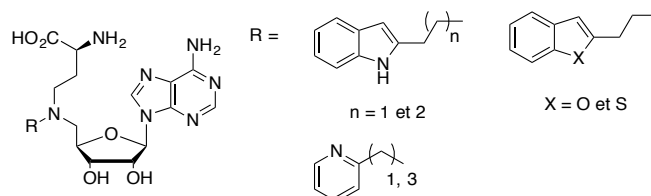


Figure 30 : Bisubstrats inhibiteurs de Dam.

Les dérivés indoles sont les meilleurs inhibiteurs avec une CI<sub>50</sub> de l'ordre de 13 μM et présentent une bonne sélectivité pour la DNMT bactérienne par rapport à la DNMT1 humaine.

A l'inverse, le groupe d'Arimondo a développé des inhibiteurs bisubstrats pour les DNMT humaines. Une première étude publiée en 2017 décrit la synthèse de bisubstrats à partir de conjugués quinazoline-quinoline pour l'inhibition de DNMT3A et DNMT1 (Figure 31).<sup>109</sup> La conception des bisubstrats s'appuie sur la structure de l'état de transition de la méthylation.

<sup>108</sup> G. Hobley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. F. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 3079-3082

<sup>109</sup> L. Halby, Y. Menon, E. Rilova, D. Pechalrieu, V. Masson, C. Faux, M. Amine Bouhlef, M. H. David-Cordonnier, N. Novosad, Y. Aussagues, A. Samson, L. Lacroix, F. Ausseil, L. Fleury, D. Guianvarc'h, C. Ferroud, P. B. Arimondo, *J Med Chem* **2017**, 60, 4665-4679

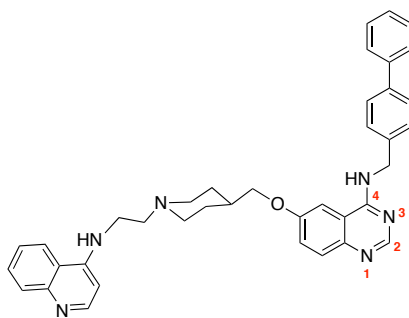


Figure 31 : Bisubstrat inhibiteurs de DNMT.

Un motif quinazoline a été choisi pour mimer la base adénine du cofacteur SAM et le cycle quinoline mime le substrat. En effet, le motif cytosine utilisé dans un premier temps pour mimer le substrat n'a montré aucune inhibition. Concernant l'espaceur, le groupement pipéridine donne les meilleurs résultats. La modification du substituant hydrophobe en position C4 de l'aminoquinazoline a aussi été explorée. Un lien de 2 ou 3 carbones entre l'amine exo-cyclique de la quinazoline et le groupement hydrophobe est nécessaire pour conserver l'activité de la molécule. De plus, en variant le groupement hydrophobe, l'équipe a pu obtenir des composés sélectifs de la DNMT1 ou DNMT3a.

Par exemple, le composé de la figure 31 portant un biphenyle en position N4 de la quinazoline inhibe spécifiquement DNMT3a avec le meilleur  $CE_{50}$  de  $1.1 \mu M$ .

Le groupe d'Arimondo développe la synthèse de bisubstrats inhibiteurs des DNMT  $m^5C$ .<sup>110</sup> Ici, le motif 5'-aza-adénosine est conjugué à une cytosine et un groupement méthoxyméthyle est utilisé comme mime du désoxyribose. Des structures ont été synthétisées avec et sans acide aminé, la longueur de l'espaceur a été modulée et la position d'attache du lien sur la cytosine explorée (Figure 32).

<sup>110</sup> L. Halby, N. Marechal, D. Pechalrieu, V. Cura, D. M. Franchini, C. Faux, F. Alby, N. Troffer-Charlier, S. Kudithipudi, A. Jeltsch, W. Aouadi, E. Decroly, J. C. Guillemot, P. Page, C. Ferroud, L. Bonnefond, D. Guianvarc'h, J. Cavarelli, P. B. Arimondo, *Phil Trans R Soc* **2018**, 373, 1-15



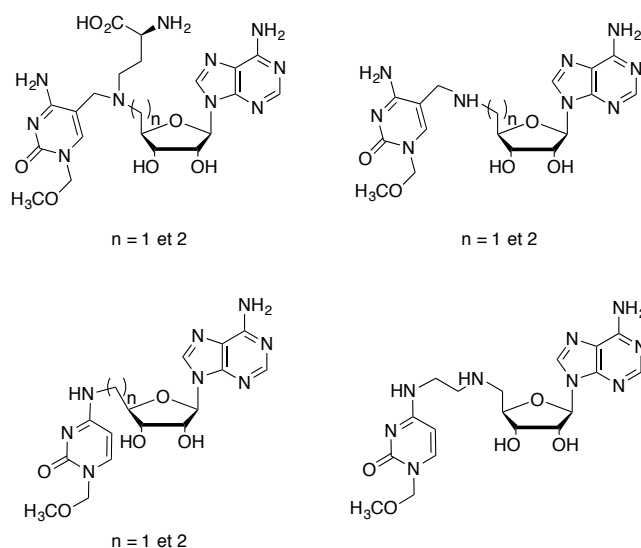


Figure 32 : Bisubstrats inhibiteurs de PRMT.

Les structures développées se sont toutes avérées inactives contre les DNMT. Cependant, les molécules avec un espaceur alkyle ( $n = 2$ ), branchés en position C5 de la cytosine, testées pour leur activité inhibitrice sur PRMT4 ont montré une inhibition micromolaire. Plusieurs complexes cristallographiques ont été obtenus avec les MTases de protéines PRMT4 et PRMT6, montrant bien un mode de fixation de type bisubstrat.

#### 4.3.2.4. Les bisubstrats de RNMT

Concernant les RNMT, une seule publication de 1986 décrit la synthèse de bisubstrats pour l'inhibition de la guanine 7-méthyltransferase chez le *Vaccinia virus*.<sup>111</sup> Dans cet exemple, des analogues de guanine ont été liés *via* leur position C7 ou C8 à un analogue de SAM par un thioéther ou seulement à la fonction acide aminé (Figure 33). Le meilleur inhibiteur est la molécule composée d'une base guanine avec l'espaceur positionné en C8, avec une  $CI_{50}$  modeste de  $93 \mu\text{M}$ .

<sup>111</sup> E. Benghiat, P. A. Crooks, R. Goodwin, F. Rottman, *J Pharm Sci* **1986**, 75, 142-145

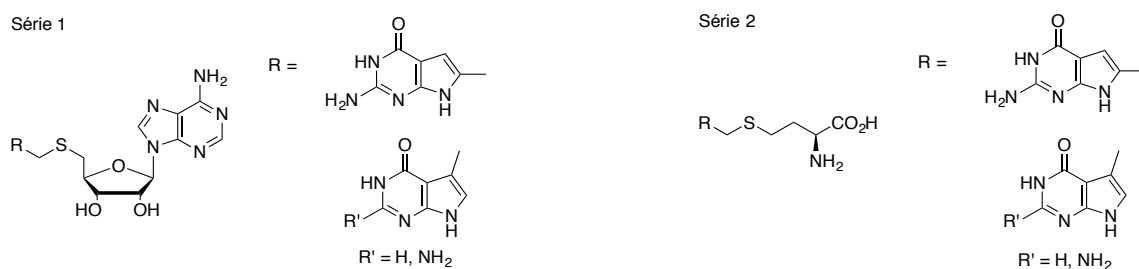


Figure 33 : Bisubstrats inhibiteurs de le RNMT m<sup>7</sup>A chez Vaccinia virus.

Il est intéressant de noter que les structures de bisubstrats des DNMT et RNMT sont incomplètes vis-à-vis de la structure du mime du substrat. En effet, le substrat est mimé en général uniquement par la base nucléique. En ce qui concerne l'analogue de SAM, certaines molécules ne comportent que la partie acide aminé ou alors que la partie adénine. Les molécules développées sont des analogues tronqués de l'état de transition.

En conclusion, ces composés même s'ils ne représentent pas de nouvelles molécules thérapeutiques, fournissent toutefois des données structurales importantes pour le développement de futures molécules efficaces.

## 5. Objectifs de la thèse

### 5.1. Les RNMT m<sup>6</sup>A : cibles potentielles encore peu explorées

Comme nous avons pu le voir plus tôt, la méthylation m<sup>6</sup>A d'ARN joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que le maintien de la structure tertiaire des ARN, l'épissage ou l'implication dans des mécanismes épitranscriptomiques liés à la régulation de l'expression des gènes. La dérégulation de cette modification est liée à de nombreuses affections chez l'Homme telles que l'infertilité, l'obésité, des troubles du développement ou neurologiques,<sup>112</sup> et certains cancers.<sup>113</sup>

Les RNMT représentent des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes encore peu explorées. Pourtant aucun inhibiteur efficace et spécifique des RNMT m<sup>6</sup>A n'a jusqu'à

<sup>112</sup> a) S. Blanco, M. Frye, *Curr Opin Cell Biol* **2014**, *31*, 1-7 ; b) N. Liu, T. Pan, *Transl Res* **2015**, *165*, 28-35 ; c) P. J. Batista, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2017**, *15*, 154-163

<sup>113</sup> P. A. Boriack-Sjodin, S. Ribich, R. A. Copeland, *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 435-453

maintenant été développé et une seule étude datant de 1986 décrit la synthèse de bisubstrats inhibiteurs d'une RNMT virale.<sup>114</sup> Ces enzymes possèdent un site de fixation du substrat qui communique avec la poche du cofacteur ce qui est optimal pour la conception de bisubstrats spécifiques.<sup>115</sup>

## 5.2. RNMT m<sup>6</sup>A et données structurales

A ce jour, plusieurs RNMT catalysant la méthylation de la position N6 de l'adénosine ont été identifiées. Chez la bactérie *E. coli*, les RNMT RlmF et RlmJ méthylent l'ARNr 23S en position A1618 et A2030 respectivement. TrmB6 est une MTase qui méthyle la position A37 de l'ARNt<sup>Val</sup>.<sup>116</sup> Le complexe enzymatique METTL3/METTL14 qui méthyle l'ARNm en position N6 des adénosines chez les eucaryotes a été étudié en détail. Plus récemment, METTL16, une RNMT humaine, a été identifiée pour la méthylation de pré-ARNm et de différents ARN non codant.<sup>117</sup> Ces RNMT appartiennent à la classe I des MTases.

A ce jour, des structures cristallographiques de RlmJ,<sup>118</sup> METTL3/METTL14<sup>119</sup> et METTL16<sup>120</sup> ont été publiées, certaines avec le cofacteur SAM ou la SAH. Cependant aucune structure ne contient le substrat ARN. Concernant le mécanisme, il est admis que les MTases procèdent par un transfert direct du groupement méthyle de la SAM vers le substrat *via* un mécanisme SN<sub>2</sub> (Figure 34).

---

<sup>114</sup> E. Benghiat, P. A. Crooks, R. Goodwin, F. Rottman, *J Pharm Sci* **1986**, 75, 142-145

<sup>115</sup> M. Schapira, *ACS Chem Biol* **2016**, 11, 575-582

<sup>116</sup> P. V. Sergiev, A. Y. Golovina, I. A. Osterman, M. V. Nesterchuk, O. V. Sergeeva, A. A. Chugunova, S. A. Evfratov, E. S. Andreianova, P. I. Pletnev, I. G. Laptev, K. S. Petriukov, T. I. Navalayeu, V. E. Koteliansky, A. A. Bogdanov, O. A. Dontsova, *J Mol Biol* **2016**, 428, 2134-2145

<sup>117</sup> A. S. Warda, J. Kretschmer, P. Hackert, C. Lenz, H. Urlaub, C. Hobartner, K. E. Sloan, M. Bohnsack, *EMBO Rep* **2017**, 18, 2004-2014

<sup>118</sup> A. S. Punekar, J. Liljeruhm, T. R. Shepherd, A. C. Forster, M. Selmer, *Nucleic Acids Res* **2013**, 41, 9537-9548

<sup>119</sup> a) P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam, *Molecular Cell* **2016**, 63, 306-317 ; b) P. Sledz, M. Jinek, *eLife* **2016**, 5, 1-16 ; c) X. Wang, J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou, P. Yin, *Nature* **2016**, 534, 575-579

<sup>120</sup> A. Ruzkowska, M. Ruzkowski, Z. Dauter, J. A. Brown, *Sci Rep* **2018**, 28, 5311

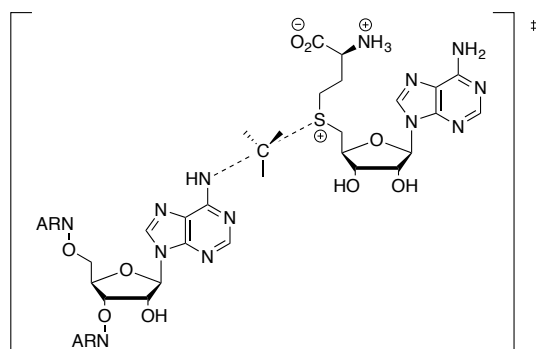


Figure 34 : Hypothèse de l'état de transition de la réaction de méthylation catalysée par une m<sup>6</sup>A RNMT.

Concernant les N-MTases, telles que les m<sup>6</sup>A RNMT, une séquence de résidus conservés se lie au substrat : [D/N/S]PP[Y/F]. On retrouve ce motif aux sites actifs des RNMT cristallisées. Les résidus conservés sont <sub>395</sub>DPPW<sub>398</sub> chez METTL3, <sub>184</sub>NPPF<sub>187</sub> chez METTL16 et <sub>164</sub>DPPY<sub>167</sub> chez RlmJ. Cette séquence est sélective des substrats azotés conjugués à un système plan.<sup>121</sup>

### 5.3. Conception de bisubstrats potentiels pour les m<sup>6</sup>A RNMT

L'objectif de ma thèse a consisté à mettre au point une voie de synthèse pour accéder à des analogues de bisubstrats spécifiques des m<sup>6</sup>A RNMT. Ces outils seront utilisés pour obtenir les premières structures cristallographiques d'une enzyme en complexe avec un analogue synthétisé et donc des données structurales sur les RNMT.

En nous basant sur la structure de l'état de transition, nous avons choisi dans un premier temps de mimer le substrat ARN par une adénosine et le SAM par un analogue 5'-aza-adénosine comportant ou pas le bras acide aminé (Figure 35). Les deux fragments sont reliés par des espaceurs alkyles, urée.

<sup>121</sup> H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Bio Sci* **2003**, 28, 329-335

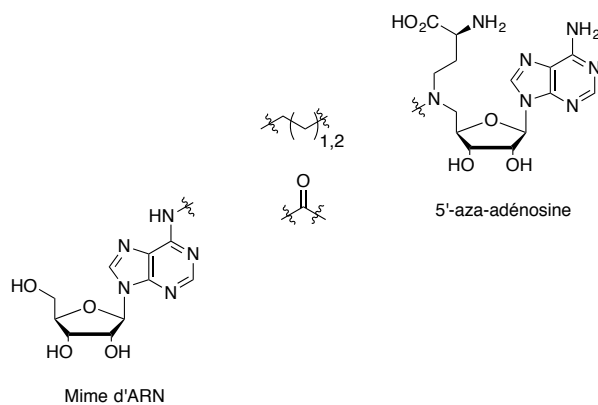


Figure 35 : Structures générales des analogues de bisubstrats

Dans un deuxième temps, la partie mimant le substrat ARN sera élargie à des oligonucléotides correspondant à la séquence consensus RRACH des m<sup>6</sup>A RNMT (Figure 36). En augmentant l'analogie au substrat, nous espérons ainsi observer des interactions ARN-RNMT supplémentaires puis éclaircir le mécanisme de méthylation de la position N6 des adénosines.

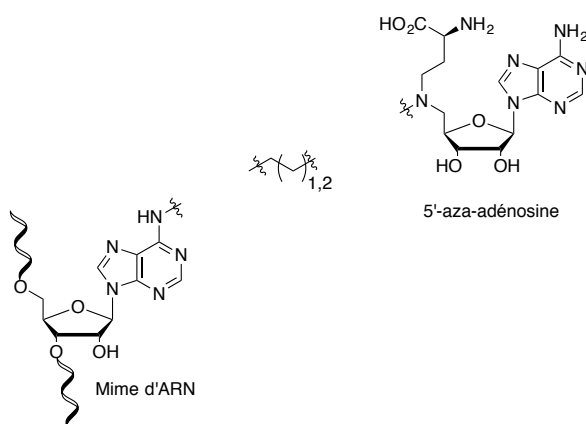


Figure 36 : Conjugués SAM-ARN.

Pour élargir la diversité moléculaire de nos conjugués, nous avons choisi d'introduire un lien triazole entre les deux fragments du conjugué. De plus, un branchement de l'espaceur en position N6 et N1 de l'adénosine sera exploré (Figure 37).

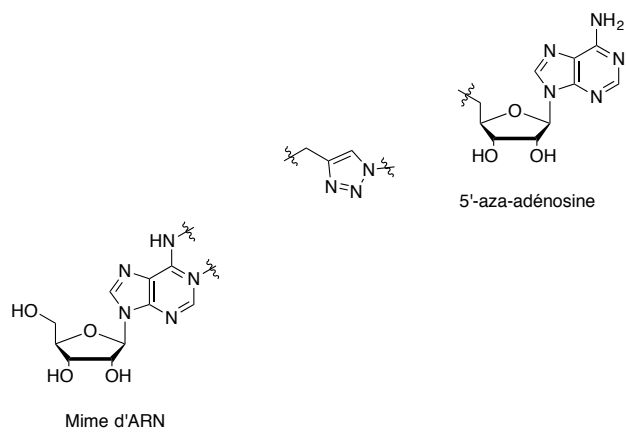


Figure 37 : Conjugués à lien trazole.



# Chapitre I





### Partie A : Synthèse des bisubstrats comportant un lien alkyle

L'objectif de ma thèse est la synthèse de bisubstrats comportant une adénosine comme mime de l'ARN fixé de façon covalente à un analogue du cofacteur SAM. Dans cette première partie, je décrirai la synthèse des bisubstrats pour lesquels les linkers choisis pour relier ces deux unités sont des chaînes alkyles à 2 et 3 atomes de carbone (Figure 38). Afin d'augmenter la diversité moléculaire et de déterminer la contribution éventuelle de la partie « méthionine » du cofacteur SAM lors de l'interaction avec les protéines, nous avons également choisi de synthétiser des analogues ne contenant pas le bras acide aminé.

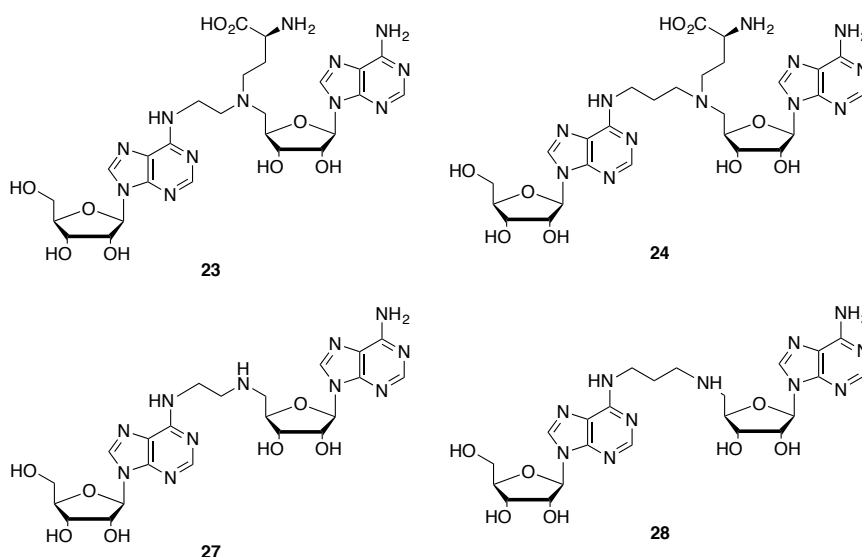


Figure 38 : Bisubstrats à lien alkyles.

### 1. Stratégie de synthèse

#### 1.1. Amination de dérivés purines en position C6

L'étape-clé de la synthèse est l'alkylation de la position N6 de l'adénosine. La diversité des activités biologiques des nucléosides de type purines substitués en position N6 a conduit au

développement de plusieurs stratégies de synthèse pour créer une liaison carbone-azote sur cette position.<sup>122</sup>

La méthode la plus utilisée est la substitution nucléophile aromatique (Schéma 7, voie a). Les précurseurs électrophiles les plus répandus sont les purines halogénées,<sup>123</sup> et plus particulièrement la chloropurine dont on trouve de nombreux exemples dans la littérature.<sup>124</sup> La 6-chloroadénosine trisylilée est généralement synthétisée en quatre étapes à partir de l'inosine : i. l'acétylation des hydroxyles du sucre, ii. la 6-chloration, iii. une étape de déprotection des acétates, iv. un étape de protection des hydroxyles par des TBS.<sup>125</sup> L'étape de chloration se fait sous des conditions dures et acides par l'utilisation de SOCl<sub>2</sub>, POCl<sub>2</sub> ou PCl<sub>5</sub>. Cette étape peut causer la dégradation de fonctions ou la perte de groupements protecteurs.<sup>126</sup> La 6-chloropurine ribose est également commerciale, elle coûte 212 € le gramme, ce qui est dix fois plus cher que l'inosine. D'autres types d'activation de la position N6 ont été développés, où le nucléofuge est un dérivé de type imidazolyles,<sup>127</sup> triazolyles,<sup>128</sup> phénoxyes,<sup>129</sup> sulfonyles<sup>130</sup> ou pyridyles.<sup>131</sup>

---

<sup>122</sup> H. Roemeyer, *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 361-401

<sup>123</sup> Bromopurine : E. A. Véliz, P. A. Peter, *J Org Chem* **2001**, *66*, 8592-8598 ; Iodopurine : J. Wolf, V. Dombos, B. Appel, S. Muller, *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 899-907 ; Fluoropurine : M. J. Robins, B. Uznanski, *Nucleic acid related compounds* **1981**, *34*, 2608-2611

<sup>124</sup> Chloropurine : R. Ottria, S. Casati, E. Baldoli, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 8396-8402 ; J. Yu, L. X. Zhao, J. Park, H. W. Lee, P. K. Sahu, M. Cui, S. M. Moss, E. Hammes, E. Warnick, Z. G. Gao, M. Noh, S. Choi, H. C. Ahn, J. Choi, K. A. Jacobson, L. S. Jeong, *J Med Chem* **2017**, *60*, 3422-3437 ; W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka, G. Cholewinski, M. Gensicka, A. Skladanowski, *RSC Adv* **2016**, *6*, 42794-42806 ; S. Mahajan, R. Manetsch, D. J. Merkler, S. M. Stevens Jr., *PLoS One* **2015**, *10*, e0115644

<sup>125</sup> T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, *61*, 49-58

<sup>126</sup> Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, *72*, 10194-10210

<sup>127</sup> Imidazolyle : Z. Janeba, X. Lin, M. Robins, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2004**, *23*, 137-147

<sup>128</sup> Triazolyle : A. Kovalovs, I. Novosjolova, E. Bizdena, I. Bizane, L. Shardziute, K. Kazlauskas, S. Jursenas, M. Turks, *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 850-853

<sup>129</sup> Phénoxye : a) H. Gao, R. Fathi, B. L. Gaffney, B. Goswami, P. Kung, Y. Rhee, R. Jin, R. A. Jones, *J Org Chem* **1992**, *57*, 6954-6959 ; b) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 7423-7433

<sup>130</sup> Sulfonyle : a) N. A. Golubeva, A. V. Shipitsyn, *R J Bioorg Chem* **2007**, *33*, 562-568 ; b) D. Vrantza, P. Kaloudis, L. Leondiadis, T. Gimisis, G. C. Vougioukalakis, M. Orfanopoulos, D. Gasparutto, J. Cadet, S. Encinas, C. Paris, M. A. Miranda, *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 2371-2386 ; c) X. Lin, M. J. Robins, *Org Lett* **2000**, *2*, 3497-3499

<sup>131</sup> Pyridyle : R. Fathi, B. Goswami, P. Kung, B. L. Gaffney, R.A. Jones *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 319-322

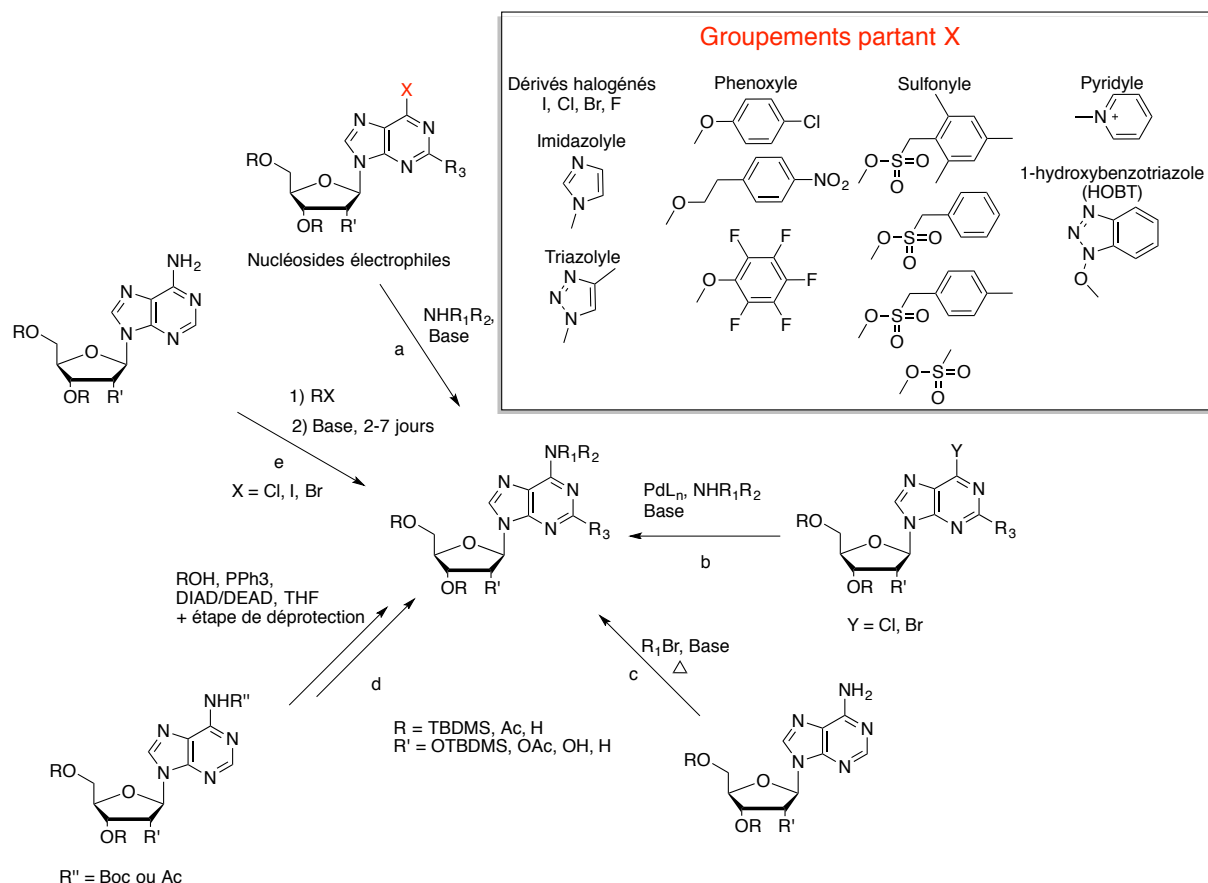


Schéma 7 : Liste non exhaustive des réactions permettant l'amination de purines en position C6.

La synthèse de ces dérivés activés est généralement difficile à réaliser et plusieurs intermédiaires sont instables. C'est pour cette raison que l'utilisation de sels de phosphonium s'est développée. En particulier, l'utilisation de l'hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium (BOP) a permis la découverte par le groupe de Lakshman de la O<sup>6</sup>-(benzotriazolyl)inosine.<sup>132</sup> C'est un nucléoside électrophile efficace, stable et isolable qui peut remplacer les autres nucléosides activés plus difficiles à obtenir.<sup>133</sup>

Plusieurs équipes ont aussi développé l'amination de Buchwald-Hartwig sur des nucléosides à partir de 6-chloro et 6-bromopurines (voie b).<sup>134</sup> Cette méthode de couplage organométallique

<sup>132</sup> S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 782-789

<sup>133</sup> a) W. Hong, J. Dowden, *Chinese Chemical Letters* **2011**, *22*, 1439-1442 ; b) T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, *61*, 49-58 ; c) Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, *72*, 10194-10210 ; d) Z. K. Wan, E. Binnun, D. P. Wilson, J. Lee, *Org Lett* **2005**, *7*, 5877-5880

<sup>134</sup> a) J. Barends, J. B. Van Der Linden, F. L. Van Delft, G. Koomen, *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 2121-2126 ; b) P. F. Thomson, P. Lagisetty, J. Balzarini, E. De Clercq, M. K. Lakshman, *Adv Synth Catal* **2010**, *352*,

permet d'introduire des arylamines dans des conditions douces, elle a été appliquée à des nucléosides protégés et non protégés. Une alternative est la substitution nucléophile sur des alkyles bromés avec l'amine exo-cyclique de l'adénosine en présence d'une base (voie c).<sup>135</sup> Deux autres voies de synthèses, moins utilisées, sont également décrites. La réaction de Mitsunobu a permis l'alkylation de l'amine exo-cyclique préalablement protégée par un groupement Boc ou acétyle (voie d).<sup>136</sup> Enfin, l'alkylation en N1 de l'adénosine par un halogénure d'alkyle, suivie d'un réarrangement de Dimroth en milieu basique permet d'obtenir l'adénosine correspondante alkylée en N6 (voie e).<sup>137</sup>

Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser la voie **a** impliquant la formation d'un nucléoside activité. Notre choix s'est porté sur une activation de l'inosine *via* l'utilisation de l'hydroxybenzotriazole tripyrrolidinophosphonium (PyBOP). Ainsi, le dérivé O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-1-ylinosine est obtenu *in situ* lors de la réaction d'amination. Cet intermédiaire réactionnel permet la fonctionnalisation de purines en une étape dans des conditions douces.

## 1.2. Schéma rétrosynthétique

La stratégie de synthèse envisagée pour obtenir nos quatre analogues de bisubstrats est décrite dans le schéma 8. La réaction d'alkylation que nous envisageons est une substitution nucléophile aromatique du O<sup>6</sup>-(benzotriazolyl-1-yl)inosine par l'analogue de SAM comportant une amine primaire. La synthèse des analogues de SAM s'effectuera *via* des réactions d'aminations réductrices à partir de l'adénosine 5'-aldéhyde. L'aldéhyde sera formé par oxydation de l'alcool 5' de l'adénosine correctement protégée.

---

1728-1735 ; c) S. S. M. Bandaru, S. Bhilare, N. Chrysochos, V. Gayakhe, I. Trentin, C. Schulzke, A. R. Kapdi, *Org Lett* **2018**, *20*, 473-476

<sup>135</sup> H. Paritala, Y. Suzuki, K. S. Carroll, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 199-220

<sup>136</sup> S. Fletcher, *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 2948-2950

<sup>137</sup> V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499

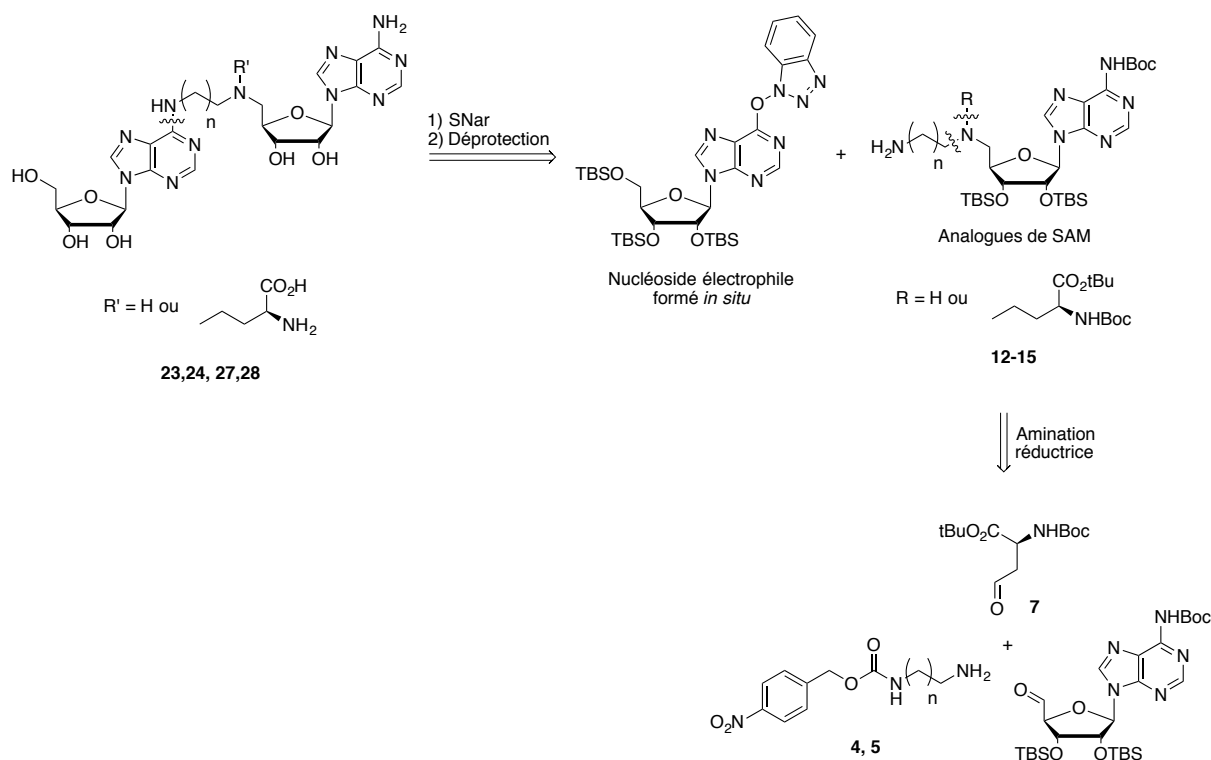


Schéma 8 : Schéma rétrosynthétique pour la synthèse des bisubstrats.

La synthèse des analogues de SAM sera tout d'abord présentée puis je décrirai la réaction d'alkylation en position N6 du nucléoside électrophile et enfin les étapes de déprotections pour accéder aux bisubstrats attendus.

## 2. Synthèse des analogues de SAM

### 2.1. Formation d'amines secondaires et tertiaires en position 5' d'une adénosine

La formation d'amine secondaire ou tertiaire à partir de l'alcool libre en 5' d'une adénosine a déjà été décrite dans la littérature (Schéma 9). La méthode la plus répandue est la synthèse de la 5'-amino-adénosine via la synthèse de Gabriel<sup>138</sup> ou une réaction de Mitsunobu.<sup>139</sup> L'introduction des substituants se fait ensuite par N-alkylation ou amination réductrice. Une autre méthode consiste à activer la 5'-hydroxy-adénosine avec un meilleur groupement partant

<sup>138</sup> a) W. Hong, J. Dowden, *Chinese Chemical Letters* **2011**, 22, 1439-1442 ; b) A. Reeve, C. A. Townsend, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15959-15974 ; c) V. Mai, L. R. Comstock, *J Org Chem* **2011**, 76, 10319-10324

<sup>139</sup> a) C. Joce, J. Caryl, P. G. Stockley, S. Warriner, A. Nelson, *Org Biomol Chem* **2009**, 7, 635-638 ; b) S. G. Petersen, S. R. Rajski, *J Org Chem* **2005**, 70, 5833-5839

tels que le mésylate, le tosylate ou un chlore pour ensuite introduire le premier substituant par substitution nucléophile.<sup>140</sup> Une troisième voie de synthèse décrit l'oxydation en aldéhyde du groupement hydroxyle en position 5' d'une adénosine pour permettre ensuite la formation d'une amine secondaire par amination réductrice.<sup>141</sup>

Nous avons choisi cette dernière stratégie car elle paraissait plus rapide et plus efficace pour former des amines di ou trisubstituées en position 5'.

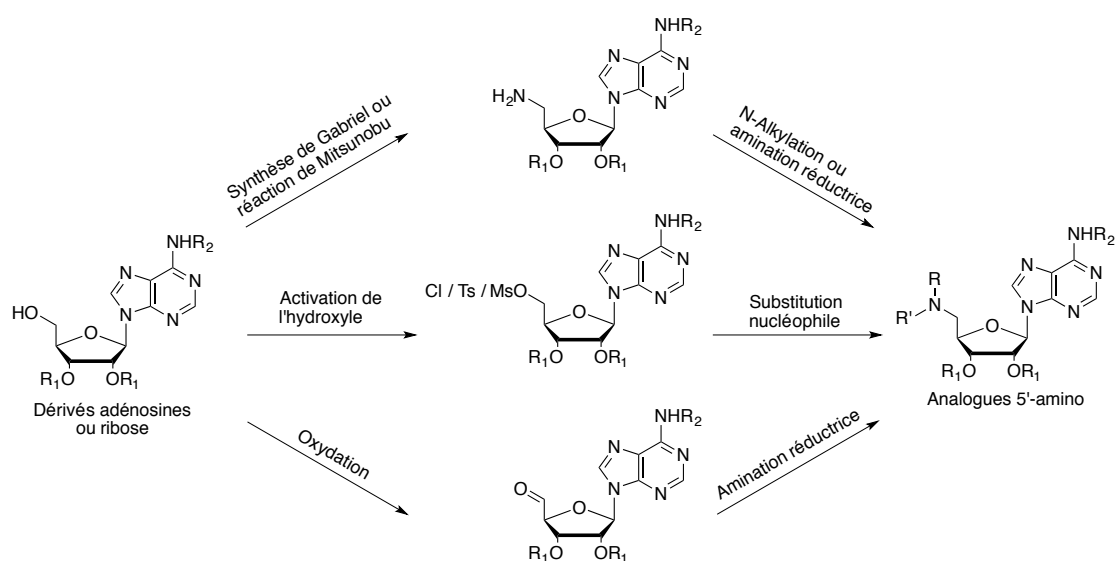


Schéma 9 : Principales voies de synthèse pour la formation d'amines substituées en 5' de l'adénosine.

## 2.2. Synthèse de la 5'-hydroxy-adénosine **3**

L'adénosine **3** correctement protégée a été obtenue en 3 étapes selon le schéma 10. L'adénosine commerciale est protégée en positions 2', 3' et 5' par des groupements *tert*-butyldiméthylsilyle pour conduire à l'adénosine **1** avec un rendement de 92%. L'amine exo-cyclique de l'adénine est ensuite protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle. La mono-protection de l'amine exo-cyclique se fait en deux temps. Tout d'abord l'adénosine trisilylée **1** réagit avec le

<sup>140</sup> a) M. J. Thompson, A. Mekhalfia, D. P. Hornby, G. M. Blackburn, *J Org Chem* **1999**, *64*, 7467-7473 ; b) G. Ceulemans, F. Vandendriessche, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 11 ; c) A. P. Townsend, S. Roth, H. E. L. Williams, E. Stylianou, N. R. Thomas, *Org Lett* **2009**, *11*, 2976-2979 ; d) J. L. Anglin, L. Deng, Y. Yao, G. Cai, Z. Liu, H. Jiang, G. Cheng, P. Chen, S. Dong, Y. Song, *J Med Chem* **2012**, *55*, 8066-8074

<sup>141</sup> G. S. Gibbons, H. D. Showalter, Z. Nikolovska-Coleska, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 348-360

dicarbonate de di-*tert*-butyle en présence d'une quantité catalytique de DMAP, pour conduire à l'adénosine protégée par deux groupements Boc. Le brut de la réaction est ensuite engagé dans une étape de mono-déprotection en conditions basiques. La réaction est effectuée avec une solution aqueuse de méthylamine, l'adénosine mono-protégée est obtenue avec un rendement quantitatif.<sup>142</sup> La position 5' de l'adénosine est ensuite déprotégée sélectivement par une solution de TFA aqueux à 0 °C pour donner le composé **3** avec un rendement de 91 %. Le précurseur **3** est finalement obtenu en 3 étapes avec un rendement global de 84 %.

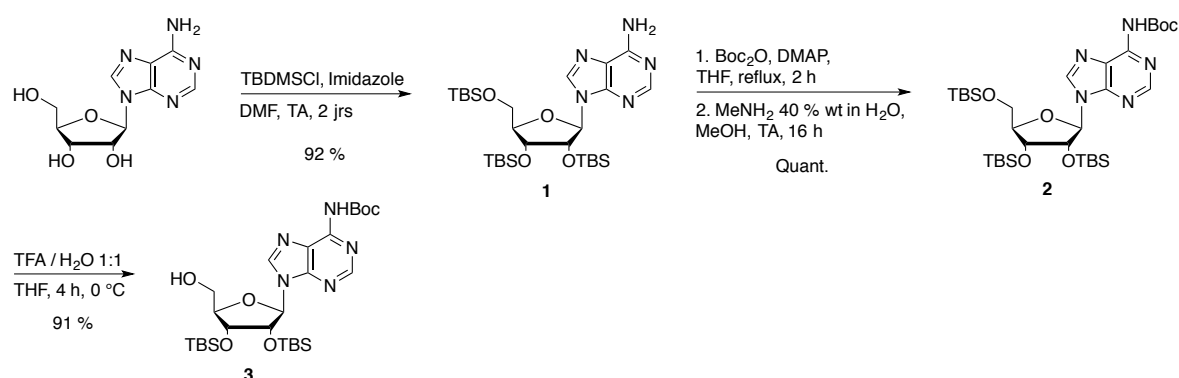


Schéma 10 : Synthèse de l'adénosine **3**.

### 2.3. Synthèse des espaceurs

Les espaceurs dont nous avons besoin pour la conception de nos conjugués seront obtenus à partir de diamines monoprotégées. Le 1,2-diaminoéthane et le 1,3-diaminopropane ont été mono-protégés par un groupement *p*-nitrobenzyloxycarbonyle suivant un mode opératoire modifié de la littérature (Schéma 11).<sup>143</sup> Les deux carbamates sont obtenus après réaction entre les amines commerciales de départ et le chloroformate *p*-nitrobenzyle en présence d'un excès de diamine. Le composé **4** (n=1) est obtenu avec un rendement de 85 % et le composé **5** (n=2) avec un rendement de 70 %.

<sup>142</sup> X. Lu, H. Zhang, P. J. Tonge, D. S. Tan, *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 5963-5966

<sup>143</sup> S. Picard, M. Le Roch, J. Renault, P. Uriac, *Org Lett* **2004**, *6*, 4711-4714.



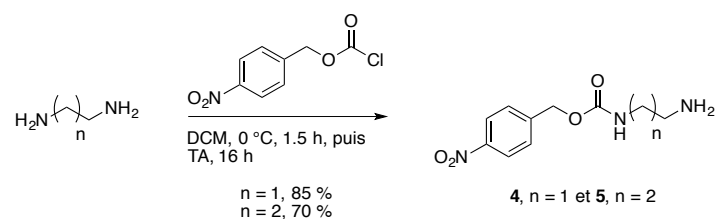


Schéma 11 : Mono-protection des diamines.

## 2.4. Synthèse de l'acide aminé

Pour obtenir des bisubstrats comportant la partie méthionine du SAM nous avons besoin de synthétiser le composé **7** qui mimera cet acide aminé. La synthèse du résidu acide aminé est présentée ici en utilisant une méthodologie déjà décrite dans la littérature (Schéma 12).<sup>144</sup> L'acide aminé Boc-Asp-*Or*Bu est mis en réaction avec de l'éthanethiol en présence de DCC et de DMAP pour conduire au thioester **6** avec un rendement de 93 %. La fonction thioester est ensuite réduite par la méthode de Fukuyama<sup>145</sup> par du triéthylsilane en présence de Pd/C pour donner l'aldéhyde attendu **7** avec un rendement de 89 %.

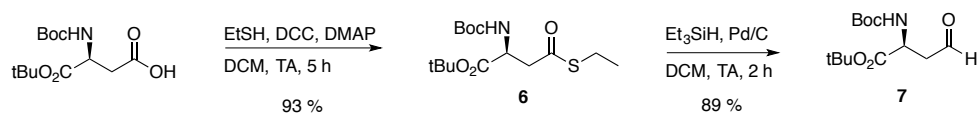


Schéma 12 : Synthèse du bras acide aminé.

## 2.5. Synthèse des dérivés 5'-amino-adénosines

La 5'-hydroxyl-adénosine **3** est oxydée par le périodinate de Dess Martin (DMP) pour donner l'aldéhyde correspondant (Schéma 13). Ce composé étant instable, il est directement engagé après filtration sur célite dans la première amination réductrice en présence de cyanoborohydrure de sodium pour conduire aux amines secondaires **8** et **9** avec des rendements de 54 % et 48 % respectivement pour ces deux étapes. Une deuxième amination réductrice est

<sup>144</sup> G. Hobley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 3079-3082

<sup>145</sup> T. Fukuyama, H. Tokuyama, *Aldrichimica Acta* **2004**, *37*, 87-102

effectuée avec les amines **8** et **9** en présence de l'aldéhyde **7**. Les amines tertiaires **10** et **11** sont alors obtenues avec des rendements de 90 % et 71 % respectivement.

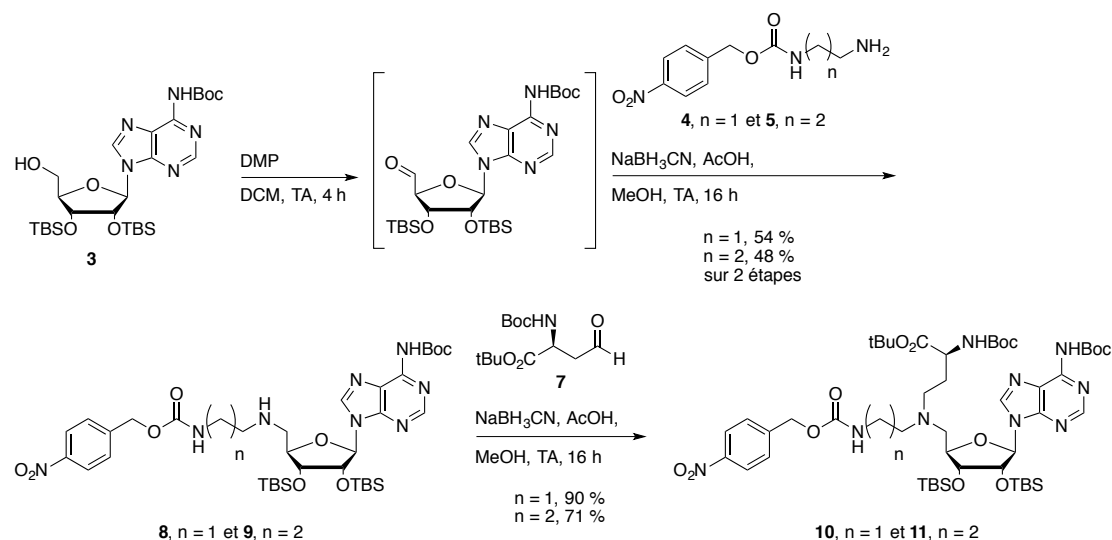


Schéma 13 : Synthèse des amines secondaires et tertiaires.

Finally, in order to perform the nucleophilic aromatic substitution at position C6 of the activated inosine, the primary amine functions of the spacers are deprotected by hydrogenolysis (Scheme 14). The amines **12** to **15** are obtained with good yields ranging from 81 % to 93 %.

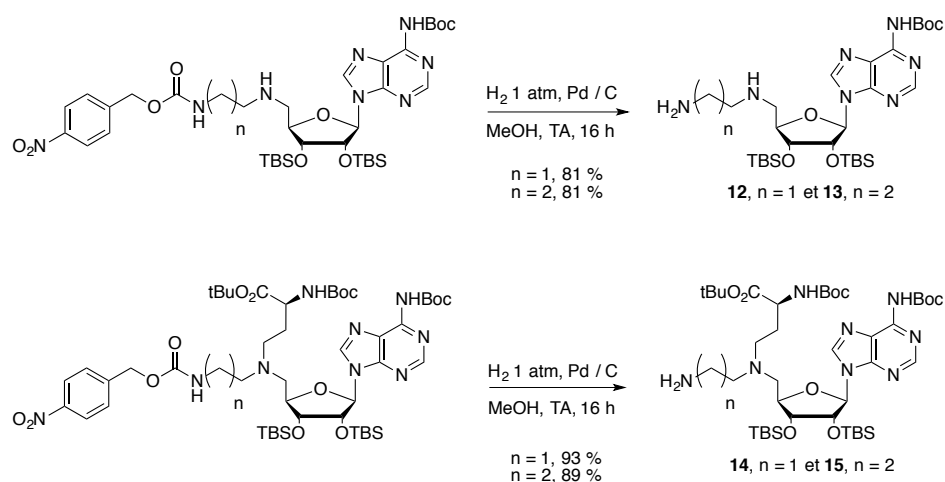


Schéma 14 : Déprotection des fonctions amine primaire des analogues de SAM.

### 3. Formation des conjugués SAM-adénosine

#### 3.1. L'intermédiaire O<sup>6</sup>-benzotriazole de l'inosine dans la littérature

Comme mentionné dans le paragraphe 1 présentant notre stratégie de synthèse, nous avons décidé d'utiliser le dérivé O<sup>6</sup>-benzotriazole de l'inosine pour effectuer la connexion entre le dérivé SAM et la position C6 de l'adénosine (Schéma 15).

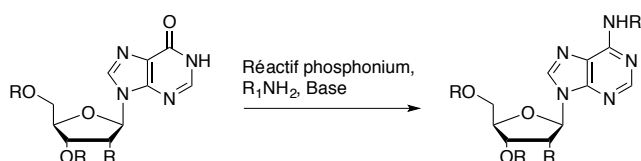


Schéma 15 : Réaction d'amination d'une inosine en position C6.

Dans la littérature, l'inosine est traitée par un phosphonium tel que le (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) ou le (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) en présence d'une base non nucléophile et de l'amine d'intérêt pour former l'adénosine fonctionnalisée en position C6.<sup>146</sup> La réaction a l'avantage de se faire en une étape avec la formation du nucléoside électrophile *in situ* (Schéma 16).

<sup>146</sup> a) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, 70, 5291-5297 ; b) Z. Wan, E. Binnun, D. P. Wilson, J. Lee, *Org Lett* **2005**, 7, 5877-5880 ; c) W. Hong, J. Dowden *Chinese Chemical Letters*, **2011**, 22, 1439-1442 ; d) T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, 61, 49-58 ;

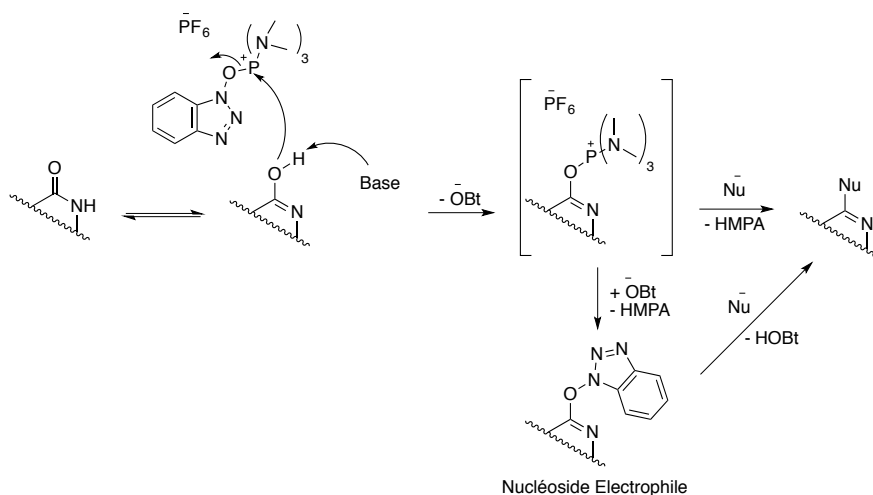


Schéma 16 : Mécanisme d'activation de l'inosine par le BOP.<sup>147</sup>

L'inosine traitée par le BOP en présence d'une base conduit à la formation d'un intermédiaire phosphonium. Ce dernier réagit alors directement avec l'amine nucléophile d'intérêt ou avec l'anion  $\text{OBt}^-$ , lui-même déplacé par l'amine nucléophile pour donner le produit final. Les études mécanistiques du groupe de Mansour<sup>147</sup> mettent en avant l'importance de l'anion  $\text{OBt}^-$ , présent dans les réactions au BOP et au PyBOP, qui facilite la formation de la liaison C-N par rapport à d'autres réactifs de phosphonium tels que le BrOP, PyAOP et PYBrOP qui ne comportent pas cet anion.

Dans le cas où il n'y a pas ajout d'un nucléophile, le nucléoside électrophile O<sup>6</sup>-(benzotriazol-1-yl)inosine est isolable. C'est un composé stable qui peut réagir avec un large panel de nucléophiles. Une des applications décrite par le groupe de Lakshman est son incorporation dans un oligonucléotide d'ADN pour effectuer une modification à un site spécifique du brin.<sup>148</sup> C'est le principe des nucléosides convertibles, et nous discuterons ce point en détail dans le deuxième chapitre.

<sup>147</sup> Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, 72, 10194-10210

<sup>148</sup> S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 782-789

### 3.2. Couplage des deux fragments

La première étape de la synthèse est la protection des fonctions hydroxyles de l'inosine par le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (Schéma 17). L'inosine protégée est obtenue avec un rendement de 94%.

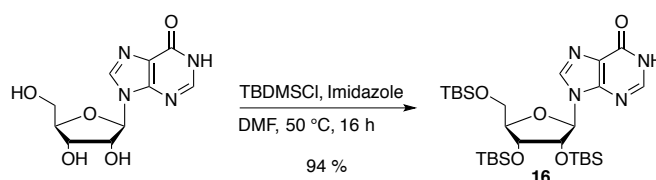
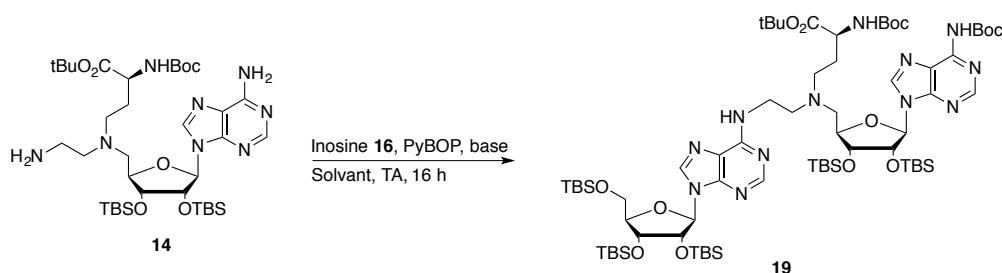


Schéma 17 : Trisilylation de l'inosine.

Une optimisation a été nécessaire afin de mettre au point les conditions réactionnelles pour effectuer la substitution nucléophile aromatique (Tableau 4). Un premier essai a été conduit dans l'acétonitrile en présence de DIPEA. Il a conduit à un rendement de 25 % dû certainement à la faible solubilité de l'inosine trisilylée **16** dans l'acétonitrile. Le DMF a ensuite été utilisé et le rendement augmenté puisque le produit désiré est obtenu avec 48 % de rendement. Enfin, le remplacement de la DIPEA par la DBU a permis d'obtenir l'adénosine souhaitée avec un rendement de 80 %.



Solvant	Base	Rendement
CH <sub>3</sub> CN	DIPEA	25 %
DMF	DIPEA	48 %
DMF	DBU	80 %

Tableau 4 : Optimisation des conditions de S<sub>N</sub>Ar.

Les conditions sont alors appliquées pour la synthèse des autres conjugués SAM-adénosine (Schéma 18). Les molécules **17** à **20** sont obtenus avec des rendements compris entre 80 et 85 %.

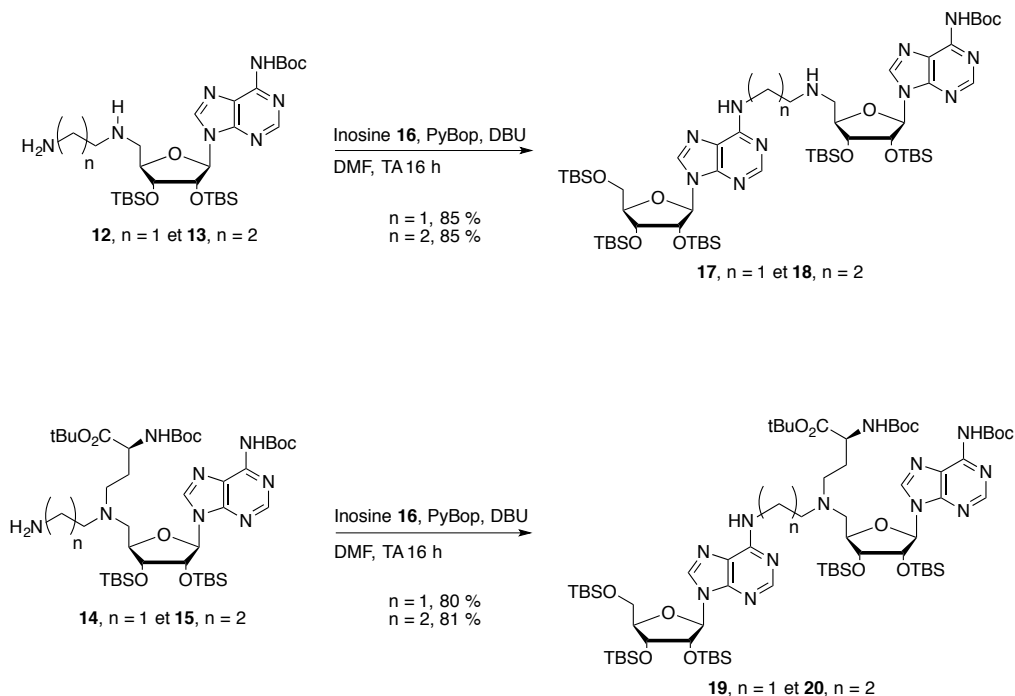


Schéma 18 : Synthèse des bisubstrats protégés.

#### 4. Déprotection des bisubstrats

Pour accéder aux molécules finales, les groupements protecteurs TBS, Boc et *t*Bu doivent être éliminés.

##### 4.1. Déprotection en milieu acide

Dans un premier temps, un essai de déprotection en milieu acide a été effectué avec des conditions déjà utilisées au laboratoire (Schéma 19).<sup>149</sup>

<sup>149</sup> M. Chemama, M. Fonvielle, M. Arthur, J. Valéry, M. Ethève-Quelquejeu, *Chem Eur J* **2009**, *15*, 1929-1938

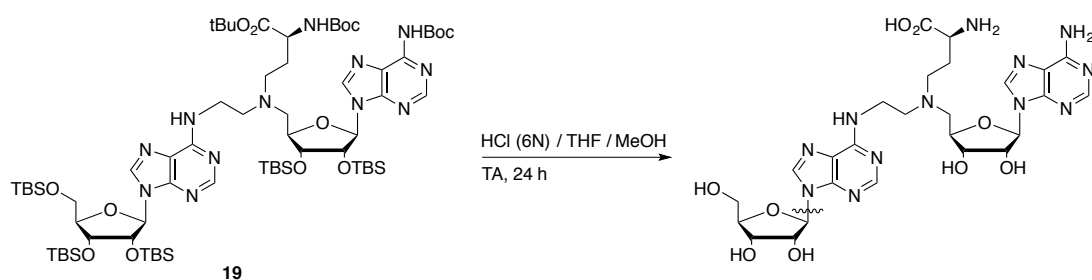


Schéma 19 : Essai de déprotection en milieu acide.

A la suite de cet essai, l'analyse du brut réactionnel par spectrométrie de masse n'a révélé aucune trace du produit attendu. On observe par contre la présence sur le spectre d'un pic  $m/z = 529$  qui pourrait correspondre au bisubstrat déprotégé ayant perdu un ribose. Il semble donc que dans ces conditions, une hydrolyse de la liaison N-glycosidique s'effectue.

Un deuxième essai de déprotection des groupements TBS par un traitement du composé au fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) a été tenté. L'intermédiaire **21** est obtenu avec un rendement de 56%. Pour éliminer les groupements *t*Bu et Boc, nous avons utilisé cette fois des conditions décrites dans la littérature lors d'une synthèse d'analogues de SAM comportant les mêmes groupements protecteurs (Schéma 20).<sup>150</sup> Les conditions utilisées dans cette étude sont des conditions acides dans du dioxane (HCl 4N/dioxane). Après analyse du brut réactionnel par masse, le pic  $m/z = 529$  est présent. La réaction de dépurination est observée là aussi.

<sup>150</sup> M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291-5297

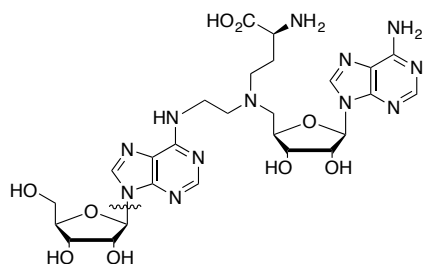
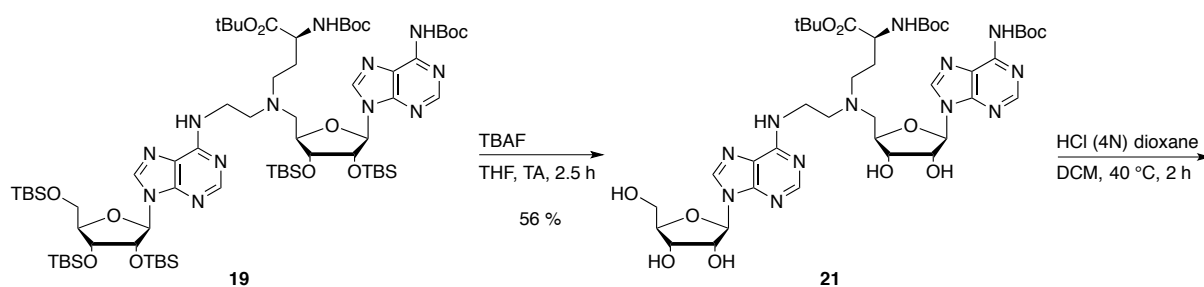


Schéma 20 : Essai de déprotection en deux étapes du bisubstrat **19**.

#### 4.2. Méthode de déprotection en milieu basique

La fragilité de la liaison N-glycosidique en milieu acide, nous a poussés à essayer une alternative pour déprotéger le groupement Boc en milieu basique. Cet essai a été effectué à partir du composé **18** en présence de  $K_2CO_3$ , dans du méthanol à 50 °C pendant 20 h (Schéma 21).

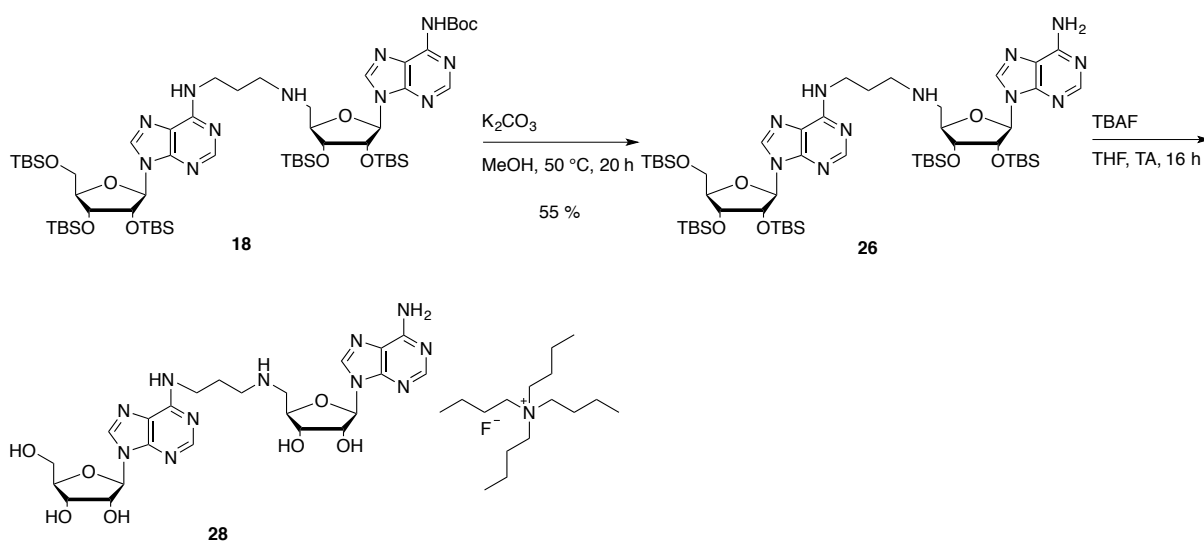


Schéma 21 : Déprotection en deux étapes du bisubstrat **18**.



La réaction conduit au produit intermédiaire **26** avec un rendement de 55 %. De l'adénosine trisilylée **1** est isolée lors de la purification ce qui montre qu'une partie du produit s'est dégradée. L'étape de déprotection par le TBAF nous permet d'obtenir le produit final en clivant les groupements TBS restant. Cependant après purification sur HPLC, des sels de TBAF sont toujours présents en grande quantité avec le produit final **28**. Cette voie de déprotection n'est pas idéale et une autre voie est alors explorée.

#### 4.3. Déprotection des bisubstrats par un acide de Lewis.

Nous nous sommes alors tournés vers une méthode de déprotection *via* un acide de Lewis pour cliver les groupements Boc et *t*Bu. De plus, le fluorure d'ammonium plus volatil est utilisé pour éviter la présence de sels de TBAF avec le produit final (Schéma 22).

Pour les bisubstrats **19** et **20**, une première étape en présence d'un excès de fluorure d'ammonium a permis de cliver les groupements TBS pour obtenir les intermédiaires **21** et **22** avec 61 et 73% de rendement respectivement. Après purification, ces intermédiaires sont alors mis en présence de bromure de zinc puis d'eau pour permettre la déprotection complète des bisubstrats.<sup>151</sup> Les bisubstrats **23** et **24** sont obtenus avec des rendements de 16 et 23% après purification par HPLC.

---

<sup>151</sup> R. Kaul, Y. Brouillette, Z. Sajjadi, K. A. Hansford, W. D. Lubell, *J Org Chem* **2004**, 69, 6131-6133

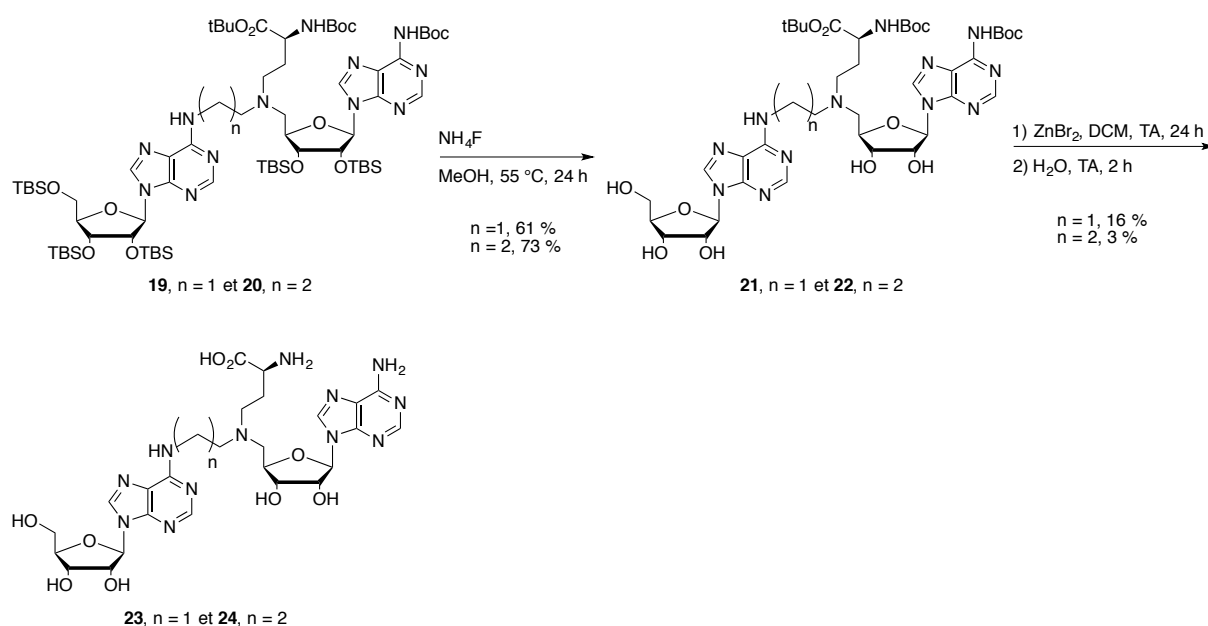


Schéma 22 : Déprotection finale des bisubstrats **19** et **20**.

Pour les bisubstrats **17** et **18**, la même méthode a été utilisée en commençant par la déprotection de l'amine exo-cyclique (Schéma 23).

Dans ce cas, le groupement Boc est d'abord éliminé par le bromure de zinc. Les intermédiaires **25** et **26** sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice. Puis, la déprotection des groupements silyles est réalisée par le fluorure d'ammonium pour donner les produits finaux **27** et **28** avec des rendements de 50 et 15 % après purification par HPLC.

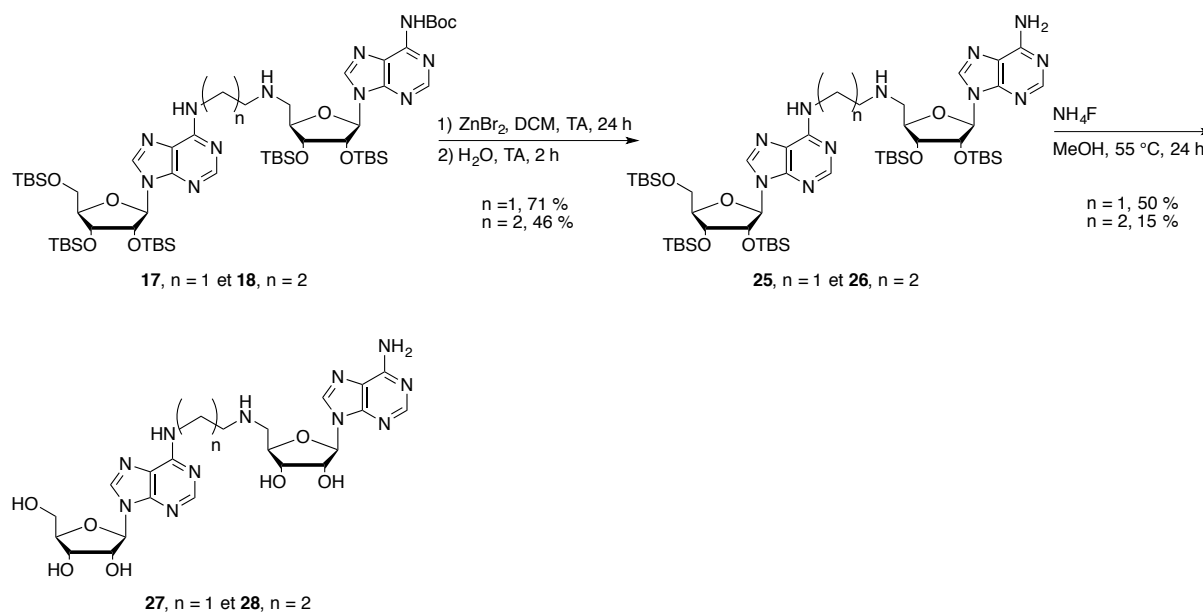


Schéma 23 : Déprotection finale des bisubstrats **17** et **18**.

## 5. Conclusion

Dans cette partie nous avons décrit la synthèse d'une série de 4 molécules analogues de bisubstrats portant un espaceur de type alkyle à 2 ou 3 atomes de carbone. L'oxydation de l'hydroxyle en position 5' de l'adénosine a permis de former des amines secondaires et tertiaires par aminations réductrices successives. L'amination d'une inosine activée, la O<sup>6</sup>-(benzotriazolyl)inosine rend possible la création du lien entre les deux fragments de bisubstrat. Nous avons rencontré au cours des étapes de déprotections des difficultés dues notamment à la fragilité de la liaison N-glycosidique lorsque la position N6 de l'adénosine est alkylée. Nous avons trouvé une alternative, deux étapes successives de déprotection ont été réalisées. Tout d'abord, le fluorure d'ammonium clive les groupements TBS, puis le bromure de zinc a permis de déprotéger les fonctions amines et acide carboxylique de nos conjugués.

## Partie B : Synthèse des conjugués avec un espaceur comportant une fonction urée

Pour mimer de façon plus précise l'état de transition de la réaction de transfert du méthyle du cofacteur SAM vers la position N6 de l'adénosine, nous avons cherché à réduire la taille du lien entre l'analogue de SAM et l'adénosine. L'idéal est d'avoir un seul atome. L'utilisation d'un atome de carbone aurait été l'idéal, mais aurait donné lieu à l'utilisation d'un aminoacétal or cette fonction est beaucoup trop instable et n'est pas compatible avec les méthodes de synthèse utilisées et l'application envisagée dans le cadre de ce travail. Nous nous sommes donc intéressées à l'utilisation de la fonction urée.

### 1. Schéma rétrosynthétique

La stratégie de synthèse est décrite dans le schéma 24. Dans cette synthèse, l'étape clef est l'introduction d'une fonction urée en position N6 de l'adénosine. L'une des méthodes décrite dans la littérature est la condensation de l'amine exo-cyclique d'une adénosine avec un dérivé de type isocyanate.<sup>152</sup> Cependant, dans notre cas, cette méthode ne sera pas applicable pour l'obtention des bisubstrats comportant la partie « méthionine » du SAM. Deux autres méthodes ont été développées dans la littérature, la première concerne l'introduction de la fonction isocyanate directement sur l'adénosine en position C6<sup>153</sup> et la deuxième est le passage par un intermédiaire carbamate.<sup>154</sup> Nous avons choisi d'explorer ces deux stratégies.

Pour ces deux approches, les conjugués seront formés par condensation d'un nucléoside isocyanate ou carbamate avec une amine. Il est donc nécessaire de synthétiser de nouveaux analogues de SAM comportant en position 5' une fonction amine, portant ou non la partie méthionine. Ces analogues seront obtenus à partir du composé **3** décrit dans la partie A.

---

<sup>152</sup> a) J. R. Shelton, J. Balzarini, M. A. Peterson, *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 5107-5110 ; b) V. Mhatre, V. Joshi, *Indian J Chem* **2002**, *41B*, 2667-2675 ; c) R. Rayala, P. Theard, H. Ortiz, S. Yao, J. D. Young, J. Balzarini, M. J. Robins, S. F. Wnuk, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2186-2192

<sup>153</sup> a) S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 2683-2704 ; b) V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83*, 152-161

<sup>154</sup> a) K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 994-1006 ; b) G. Leszczynska, J. Pieta, B. Sproat, A. Malkiewicz, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 4443-4447 ; c) A. C. Bajji, D. R. Davis, *J Org Chem* **2002**, *67*, 5352-5358 ; d) M. Matuszewski, K. Debiec, E. Sochacka, *Chem Commun* **2017**, *53*, 7945-7948 ; e) M. Sundaram, P. F. Crain, D. R. Davis, *J Org Chem* **2000**, *65*, 5609-5614 ; f) D. Martin, E. Schlimme, *Z. Naturforsch* **1994**, *49c*, 834-842

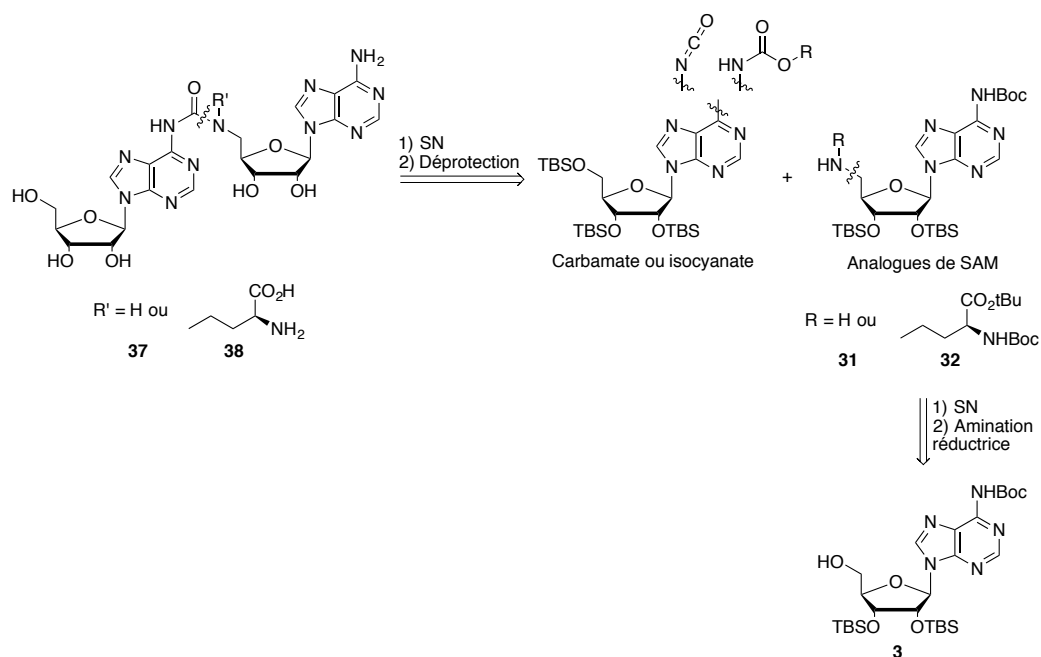


Schéma 24 : Schéma rétrosynthétique envisagé.

## 2. Synthèse des bisubstrats

Tout d'abord, la synthèse des amines **31** et **32** sera décrite. J'expliquerai ensuite les différents essais pour obtenir la formation d'une urée en position N6 de l'adénosine avant de décrire les étapes de déprotection.

### 2.1 Synthèse des amines

La synthèse des amines **31** et **32** est décrite dans le schéma 25. La 5'-hydroxyle adénosine **3** est activée sous forme d'un mésylate **29** avec un rendement de 91 %. Une substitution nucléophile est ensuite effectuée avec de l'azoture de sodium pour obtenir la molécule **30** avec un rendement de 67 % suivie d'une hydrogénolyse qui conduit à l'amine **31** avec un rendement de 83%. Cette amine **31** sera utilisée pour l'obtention d'un bisubstrat comportant un lien urée sans la partie acide aminé. Afin d'obtenir le bisubstrat comportant la partie acide aminé, l'amine secondaire requise **32** est obtenue après une réaction d'amination réductrice entre l'acide aminé **7** et l'amine **31**. Elle est obtenue avec un rendement de 72%.

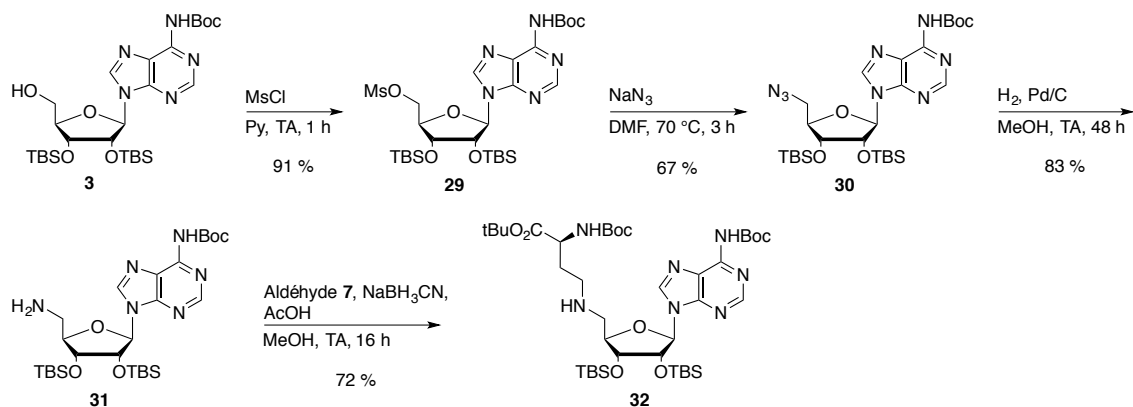


Schéma 25 : Synthèse des amines **31** et **32**.

## 2.2. Synthèse des intermédiaires électrophiles et formation des urées

### 2.2.1. Utilisation d'analogues de phosgène

Le phosgène est un composé extrêmement toxique qui a servi à la synthèse d'urées.<sup>155</sup> Des alternatives moins dangereuses ont été développées pour éviter d'utiliser le phosgène (Figure 39). Dans la littérature plusieurs équipes ont décrit l'utilisation du 1,1'-carbonyl-bis[1*H*-(1,2,4-triazole)]<sup>156</sup> et du triphosgène<sup>157</sup> pour la synthèse d'urée en position N6 d'une adénosine.

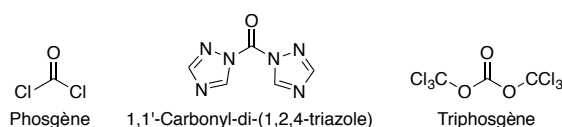


Figure 39 : Réactifs utilisés pour la synthèse d'urées.

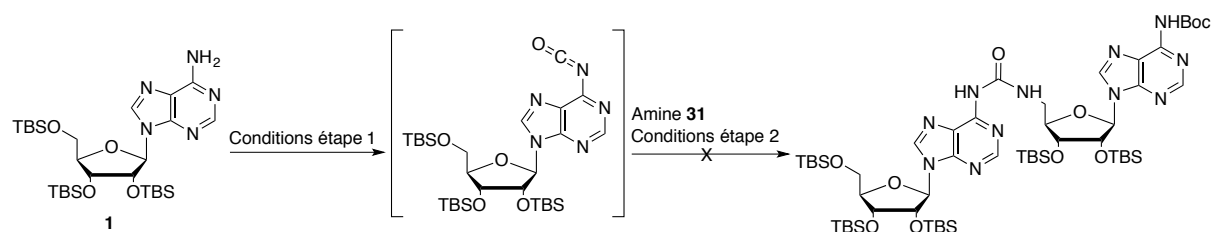
La réaction *via* le triphosgène se fait en deux étapes (Tableau 5). Tout d'abord, l'adénosine réagit avec le triphosgène pendant 4h dans du THF pour former l'intermédiaire isocyanate qui sera mis ensuite en présence de l'amine **31** pour permettre la formation de l'urée. Dans un premier essai, des conditions utilisées au laboratoire ont été testées. Le produit attendu n'a pas été obtenu (Tableau 5, conditions 1). Un deuxième essai a été tenté, en utilisant les conditions

<sup>155</sup> J. S. Nowick, N. A. Powell, T. M. Nguyen, G. Noronha, *J Org Chem* **1992**, *57*, 7364-7366

<sup>156</sup> S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 2683-2704

<sup>157</sup> V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83*, 152-161

décrites dans la littérature sur une adénosine.<sup>158</sup> La réaction est réalisée en présence d'un excès de triphosgène au reflux du toluène. Après ajout de l'amine, la réaction est agitée une nuit à 80 °C. Un suivi par chromatographie sur couche mince ne montre aucune évolution de la réaction. La purification révèle une dégradation du produit de départ sans formation du produit attendu (Tableau 5, conditions 2).



Conditions étape 1	Conditions étape 2	Résultat
Triphosgène (0,5 éq.), DIPEA (2,5 éq.), THF, TA, 4 h	DIPEA (3 éq.), TA, 16 h	Produit de départ
Triphosgène (2 éq.), DIPEA (10 éq.), toluène, 120 °C, 4 h	DIPEA (3 éq.), 80 °C, 16 h	Dégradation

Tableau 5 : Essais de formation d'une urée par un intermédiaire isocyanate

## 2.2.2. Synthèse d'intermédiaires carbamates et formation des bisubstrats de type urée.

### 2.2.2.1. Utilisation du carbamate d'éthyle

La synthèse du phénoxy-carbamate<sup>159</sup> et du carbamate d'éthyle<sup>160</sup> en position C6 de l'adénosine a déjà été réalisée dans la littérature pour donner une urée. Nous avons décidé de synthétiser le carbamate d'éthyle à partir de l'adénosine trisilylée **1** (Schéma 26).

Le carbamate est synthétisé à partir de l'adénosine trisilylée **1** qui réagit avec du chloroformate d'éthyle. Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 51 %. Puis le carbamate **33** est mis en présence de l'amine **31** au reflux de la pyridine pendant une nuit. Le bisubstrat **34** est

<sup>158</sup> V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, 83, 152-161

<sup>159</sup> a) K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org Biomol Chem* **2012**, 10, 994-1006 ; b) G. Leszczynska, J. Pieta, B. Sproat, A. Malkiewicz, *Tetrahedron Letters* **2011**, 52, 4443-4447 ; c) A. C. Bajji, D. R. Davis, *J Org Chem* **2002**, 67, 5352-5358

<sup>160</sup> a) M. Matuszewski, K. Debiec, E. Sochacka, *Chem Commun* **2017**, 53, 7945-7948 ; b) M. Sundaram, P. F. Crain, D. R. Davis, *J Org Chem* **2000**, 65, 5609-5614 ; c) D. Martin, E. Schlimme, *Z. Naturforsch* **1994**, 49c, 834-842

obtenu avec un rendement de 37 % et 66 % du produit de départ sous forme d'adénosine trisilylée est récupéré. Il semble donc qu'une dégradation de l'intermédiaire carbamate a lieu au cours de la réaction. On peut noter aussi, qu'une perte concomitante du groupement protecteur Boc a lieu au cours de cette deuxième étape. Le rendement global de la formation de l'urée sur 2 étapes est de 19 %.

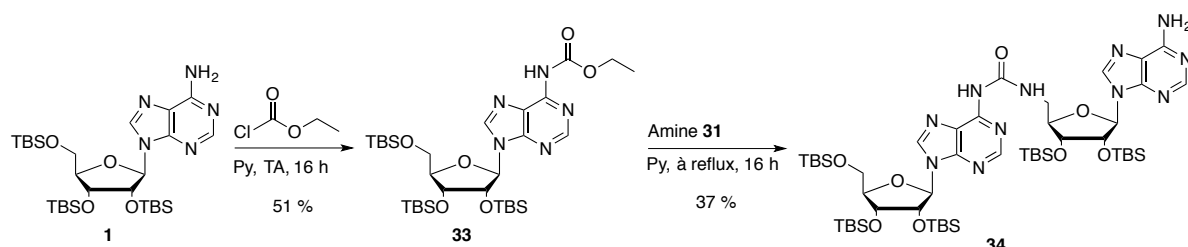


Schéma 26 : Synthèse du conjugué urée **34**.

### 2.2.2.2. Synthèse du carbamate d'isopropényle et des bisubstrats urée

Le carbamate d'isopropényle a plus récemment été décrit dans la littérature comme méthode de synthèse efficace pour la synthèse d'urées asymétriques.<sup>161</sup> Nous avons alors proposé une alternative et synthétisé ce carbamate qui n'est pas décrit dans la littérature en position C6 de l'adénosine.

Le carbamate d'isopropényle est synthétisé dans les mêmes conditions que le carbamate d'éthyle en utilisant le chloroformate d'isopropényle (Schéma 27). Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 34 %. Au cours de cette réaction, on observe la formation du bis-carbamate avec 48 % de rendement et il reste de l'adénosine de départ **1** qui n'a pas réagi. Le carbamate est ensuite mis en réaction avec l'amine **31**, dans au reflux de la pyridine pendant 16 h. Le composé **34** attendu est obtenu avec un rendement de 74 %.

<sup>161</sup> I. Gallou, M. Eriksson, X. Zeng, C. Senanayake, V. Farina, *J Org Chem* **2005**, 70, 6960-6963



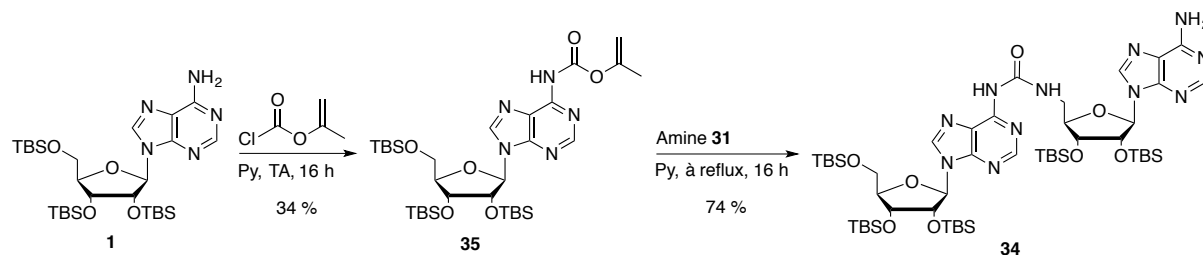
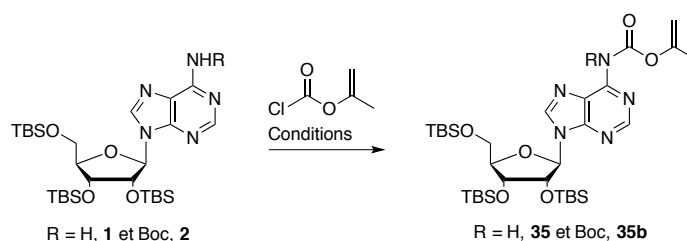


Schéma 27 : Synthèse du carbamate d'isopropényle et formation du composé **34**.

Le passage par un intermédiaire de type carbamate d'isopropényle semble plus efficace que le carbamate d'éthyle. Cependant, les conditions utilisées pour former le carbamate entraîne la formation majoritaire du dérivé « bis-carbamate » et cette expérience manque de reproductibilité. Des efforts ont donc été faits pour améliorer cette étape.

Différentes conditions ont été testées et sont reportées dans le tableau 6. L'utilisation de bases tel que NaOH ou la N-méthylmorpholine à partir de l'adénosine trisilylée **1** ont conduit à la formation de l'intermédiaire carbamate **35** avec de faibles rendements de 10 et 9% alors que l'utilisation de la pyridine a permis d'augmenter ce rendement à 34%.



R	Conditions	Rendement
H	Py, TA, 16 h	34 %
H	NaOH, H <sub>2</sub> O, AcOEt, TA, 3 h	10 %
H	N-méthylmorpholine, THF, TA, 16 h	9 %
Boc	Py, TA, 16 h	70 %
H	N-méthylimidazole, DCM, TA, 20 h	75 %

Tableau 6 : Synthèse du carbamate d'isopropényle.

Lorsque l'amine exo-cyclique est protégée par un groupement Boc pour ensuite réagir avec le chloroformate d'isopropényle dans la pyridine, le carbamate **35b** est obtenu avec un rendement de 70 %. Cependant, ce carbamate protégé ne réagit pas en présence d'une amine, probablement en raison de l'encombrement stérique du groupement Boc.

Finalement, les conditions décrites par Cho<sup>162</sup> utilisant la N-méthylimidazole dans du dichlorométhane pendant 20 h a permis d'obtenir le carbamate **35** avec un rendement de 75 % sans trace du bis-carbamate.

Cette dernière méthode a donc été retenue et le deuxième bissubstrat possédant un espaceur urée et le motif acide aminé a été synthétisé (Schéma 28). Le carbamate réagit avec l'amine secondaire **32** à 50 °C dans la pyridine. Il est obtenu avec un rendement de 85%. On peut noter ici, que ces nouvelles conditions expérimentales (50 °C dans la pyridine et non au reflux) sont compatibles avec la présence des groupements protecteurs Boc.

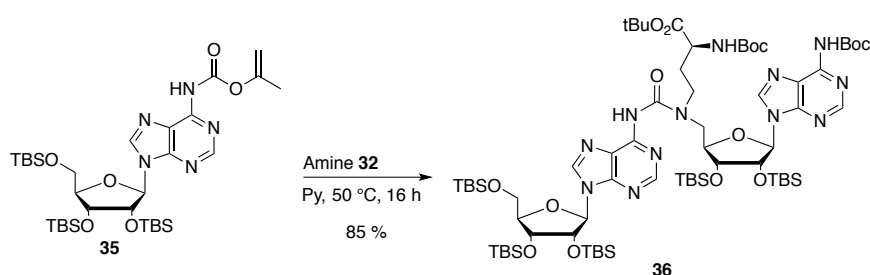


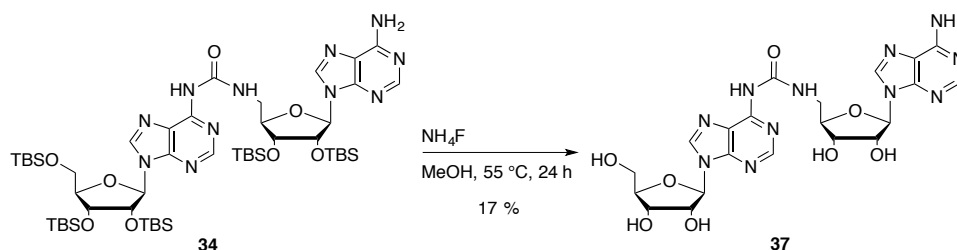
Schéma 28 : Formation du composé **36** comportant le motif acide aminé.

### 3. Étapes de déprotection

Pour pouvoir utiliser nos molécules pour des études biologiques, il est bien sûr nécessaire d'avoir les molécules totalement déprotégées. Les deux composés **34** et **36** sont alors déprotégés selon les conditions déjà décrites pour la première famille de bissubstrats (Schéma 30). Le dérivé **34** est mis en présence de fluorure d'ammonium pour éliminer les groupements silylés. Après purification par HPLC, on obtient le composé final **37** avec 17 % de rendement (Schéma 29A). Pour le dérivé **36**, une première étape au fluorure d'ammonium permet de déprotéger les hydroxyles et l'intermédiaire **38** est ensuite mis en présence de bromure de zinc pour cliver les groupements Boc et *t*Bu. Le produit attendu **39** est obtenu après purification sur HPLC avec un rendement de 47 % (Schéma 29B).

<sup>162</sup> J. H. Cho, S. J. Coats, R. F. Schinazi, *Org Lett* **2012**, *14*, 2488-2491

A.



B.

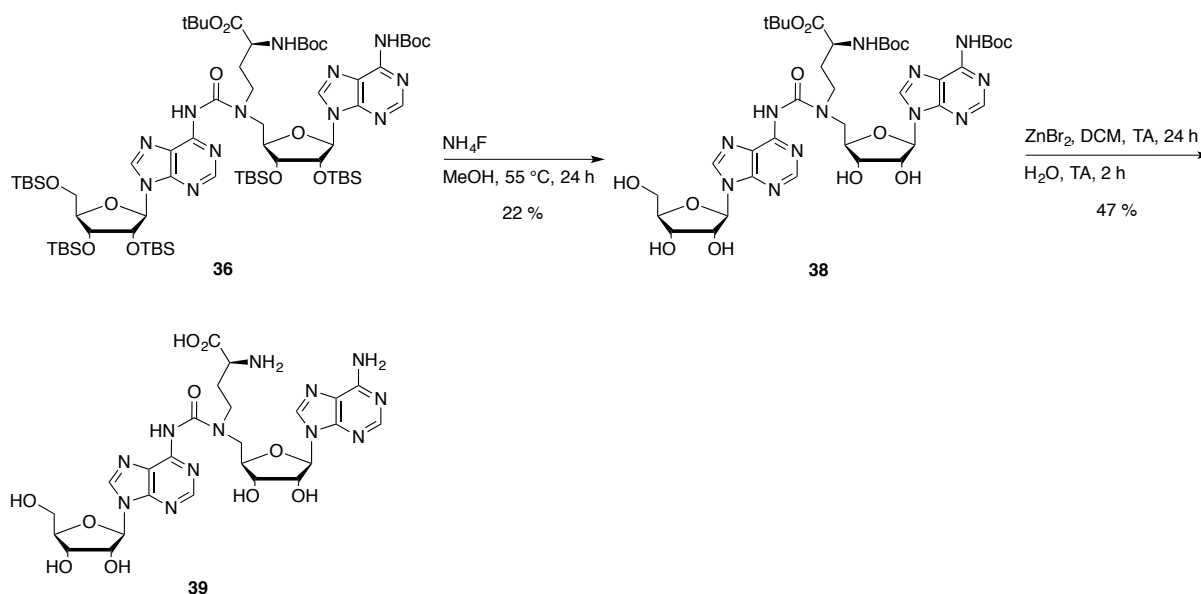


Schéma 29 : Etapes de déprotection des composés **34** et **36**.

#### 4. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons décrit la synthèse de deux séries de conjugués SAM-adénosine proposés comme étant des molécules de type bisubstrats dans la réaction de transfert d'un méthyle sur la position m<sup>6</sup>A d'un ARN. Tout d'abord, des conjugués à lien alkyle à 2 et 3 carbones ont été synthétisés par réaction de  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  en position C6 d'un dérivé d'inosine activée. Puis des conjugués portant un espaceur plus court, de type urée ont été obtenus (Figure 40).

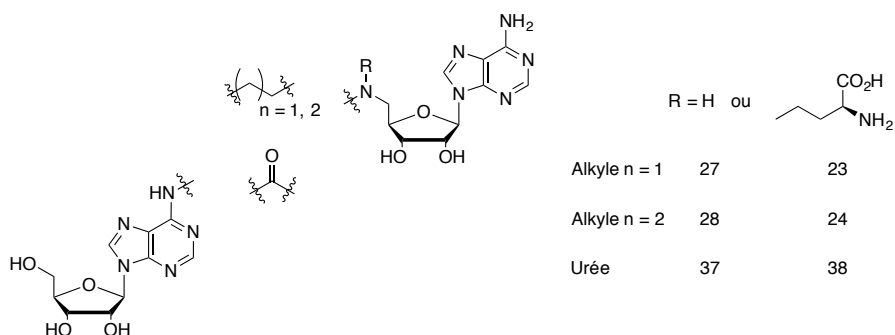


Figure 40 : Les 6 conjugués SAM-adénosine synthétisés.

Durant ces synthèses, une nouvelle méthode a été mise au point pour la formation d'urées asymétriques en position C6 d'une adénosine : la synthèse du carbamate isopropényle et la formation de l'urée ont été optimisées.

Par la suite, il serait intéressant d'explorer différentes structures en position 5' des analogues de SAM. Des éthers ou thioéthers seraient des alternatives aux amines. La nature du lien pourrait également être modifiée avec des liaisons amides ou squarates.



## Chapitre II



## Chapitre II : Synthèses de conjugués SAM-oligonucléotides

### 1. Introduction

Dans cette partie, nous avons pour objectif de synthétiser des conjugués SAM-ARN, dans le but d'obtenir des molécules de type bisubstrats, où le substrat ARN, comportant une adénosine, sera de taille et de séquence variable. (Figure 41).

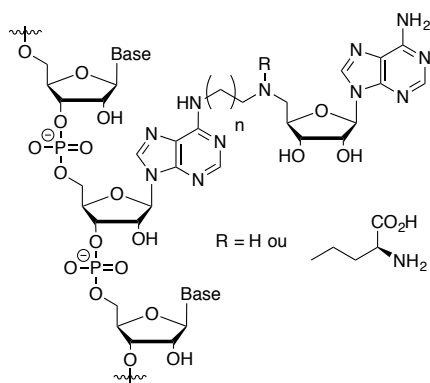


Figure 41 : Structure générale des conjugués SAM-oligonucléotide.

La stratégie utilisée consiste à post-fonctionnaliser un oligoribonucléotide par un analogue de SAM. La séquence du brin pourra être spécifique à l'étude d'une MTase. Nous pensons que ces nouveaux conjugués devraient avoir une meilleure analogie structurale avec les substrats naturels et nous espérons obtenir un meilleur positionnement au site actif en augmentant les interactions ARN-protéines. Nous allons dans un premier temps présenter les méthodes permettant la formation de liens phosphodiester nécessaires à la synthèse. Nous proposerons ensuite une stratégie de synthèse générale et nous l'appliquerons à la synthèse de nouveaux conjugués.



## 1.1. Méthodes de couplage pour la formation d'un lien phosphodiester

Le développement d'une méthode efficace pour la formation d'un lien phosphodiester 3'→5' internucléotidique a été pendant plusieurs années une problématique importante pour la synthèse d'oligonucléotides.<sup>164</sup>

### 1.1.1. Évolution des méthodes de couplages

Todd et Michelson sont les premiers à avoir synthétisés un dinucléotide en série désoxy en 1955 (Schéma 30).<sup>165</sup> Leur approche est basée sur la synthèse d'un intermédiaire phosphorochloridate obtenu par activation du H-phosphonate. Cet intermédiaire réagit avec la 3'-O-acetylthymidine en présence d'une base pour former le dinucléoside phosphotriester avec un rendement global de 14 %. Cependant, aucune stratégie pour allonger la chaîne nucléotidique n'est décrite.

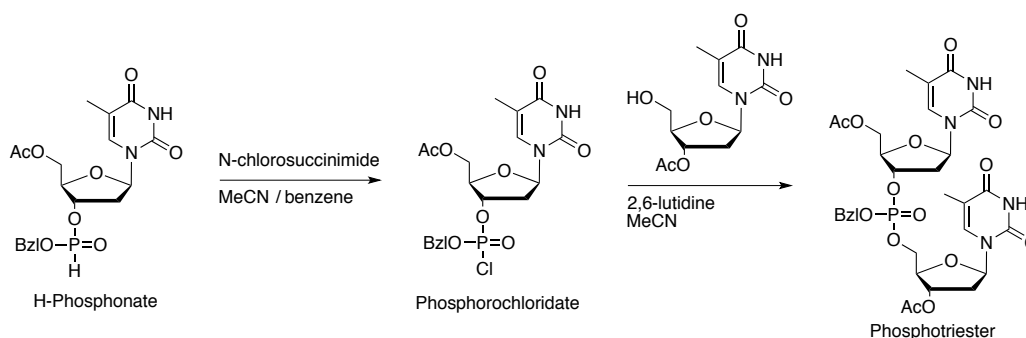


Schéma 30 : Méthode décrite par Michelson et Todd.

A la même époque, l'approche du phosphodiester est développée par Khorana et ses collègues (Schéma 31). La réaction consiste en la condensation d'un nucléoside portant une fonction 3'-hydroxyle libre, avec un nucléoside 5'-phosphate. La réaction s'effectue en présence d'un agent de couplage tel que le chlorure de triisopropylbenzenesulfonyl<sup>166</sup> permettant l'obtention du dinucléotide phosphodiester avec des rendements supérieurs à 80 %. Le groupement protecteur en position 3' peut ensuite être éliminé pour allonger la chaîne en

<sup>164</sup> a) C. B. Collin, *Org Biomol Chem* **2005**, 3, 3851-3868 ; b) G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* **2006**, 4, 147-150

<sup>165</sup> A. M. Michelson, A. R. Todd, *J Chem Soc* **1955**, 0, 2632-2638

<sup>166</sup> R. Lohrmann, H. G. Khorana, *J Am Chem Soc* **1966**, 88, 829-833

répétant l'étape de couplage. Cependant, la fonction phosphodiester non protégée est sensible à la phosphorylation et peut générer divers produits de couplage.

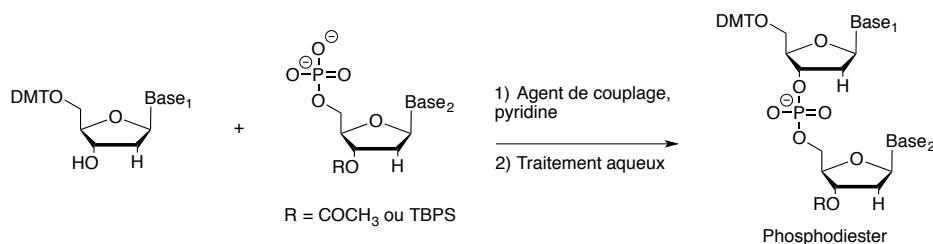


Schéma 31 : Méthode du phosphodiester.<sup>167</sup>

Plusieurs équipes développent alors la méthode phosphotriester en protégeant la fonction phosphodiester (Schéma 32).<sup>168</sup> Un nucléoside 5'-O-chlorophényl phosphate est couplé à un nucléoside fixé en position 3' à un support solide. Le mésitylènesulfonyl 3-nitro-1,2,4-triazolide (MSNT) est utilisé comme agent de couplage et le dinucléotide est isolé avec un rendement de 79 %.<sup>169</sup> Après clivage du groupement DMT, la chaîne oligonucléotidique peut être allongée. En fin de réaction, les phosphodiesters sont déprotégés en présence d'oximes.<sup>170</sup>

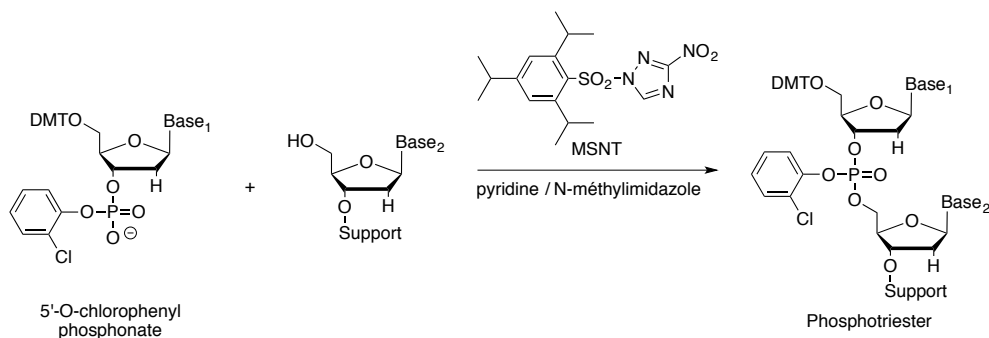


Schéma 32 : Méthode au phosphotriester sur support solide.

Par la suite, l'utilisation du phosphore de degré d'oxydation III plus réactif que le phosphore V se développe. La méthode du phosphite triester est d'abord décrite par l'équipe de

<sup>167</sup> H. G. Khorana, *Science* **1979**, *203*, 614-625

<sup>168</sup> a) R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J Am Chem Soc* **1965**, *87*, 3526-3527 ; b) C. B. Collin, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 3851-3868

<sup>169</sup> S. S. Jones, B. Rayner, C. B. Reese, A. Ubasawa, M. Ubasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3075-3080

<sup>170</sup> C. B. Reese, L. Zard, *Nucleic Acids Res* **1981**, *9*, 4611-4626

Letsinger.<sup>171</sup> Cependant les intermédiaires phosphorochloridites sont très réactifs et difficile à manipuler. C'est pourquoi Beaucage et Caruthers développent l'approche phosphoramidite.<sup>172</sup> Cette nouvelle classe de nucléosides phosphites est plus facile à préparer. De plus, les composés sont plus stables et peuvent être isolés et stockés sous forme de solide. Cette méthode a par la suite été optimisée pour être adaptée à la synthèse sur support solide automatisée, à chaque cycle un nucléotide est ajouté à la chaîne avec un rendement quantitatif.<sup>173</sup> (Schéma 33).

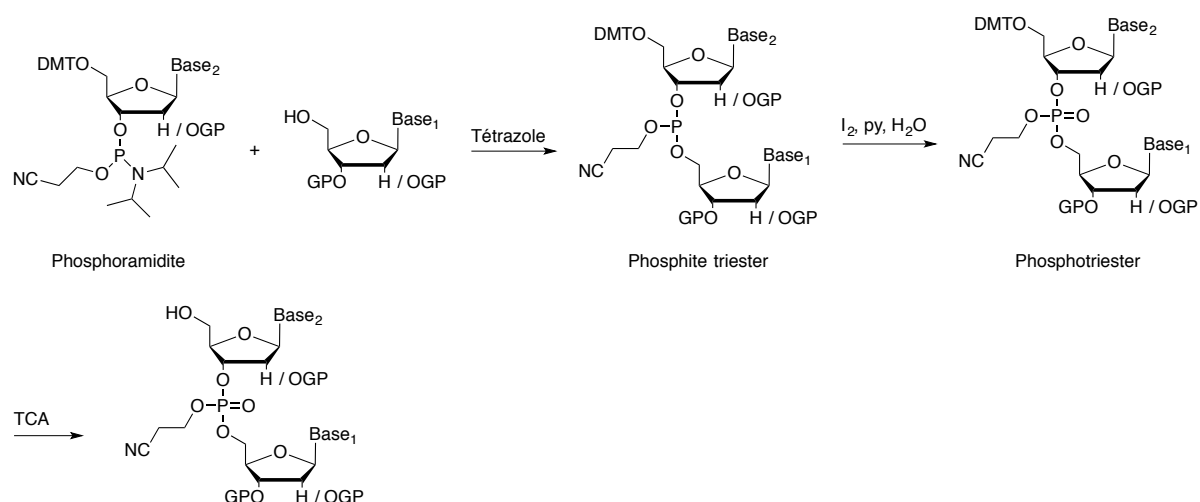


Schéma 33 : Méthode au phosphoramidite.

Tout d'abord, le monomère phosphoramidite est activé par l'addition de tétrazole et le 5'-hydroxyle libre du nucléoside réagit sur le phosphore pour former un lien phosphite triester. Ensuite, la fonction phosphite triester est oxydée par une solution d'iode pour conduire au phosphodiester protégée par un groupement cyanoéthyle. Enfin, la déprotection du diméthoxytrityle (DMT) en position 5' s'effectue en milieu acide.

### 1.1.2. Synthèse d'oligoribonucléotides

Le développement de la synthèse d'oligoribonucléotides a avancé en parallèle de la synthèse d'oligodésoxyribonucléotides. Les méthodes décrites précédemment ont été appliquées avec

<sup>171</sup> R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J Am Chem Soc* **1976**, 98, 3655

<sup>172</sup> S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron* **1981**, 22, 1859-1862

<sup>173</sup> M. H. Caruthers, *Acc Chem Res* **1991**, 24, 278-284

succès pour leurs synthèses<sup>174</sup> mais le véritable enjeu a été de développer une protection adéquate pour la position 2' du ribose. En effet, le groupement protecteur en position 2' doit rester stable durant les différentes phases de la synthèse de l'oligonucléotide et être déprotégé à la fin. Il ne doit pas empêcher le couplage en position 3', et donc avoir un encombrement stérique moindre. Enfin, cette protection doit permettre d'éviter la migration du phosphate de la position 3' vers la position 2' ou le clivage du phosphodiester lors de la synthèse. Les groupements protecteurs les plus utilisés à ce jour sont donnés en figure 42.<sup>175</sup>

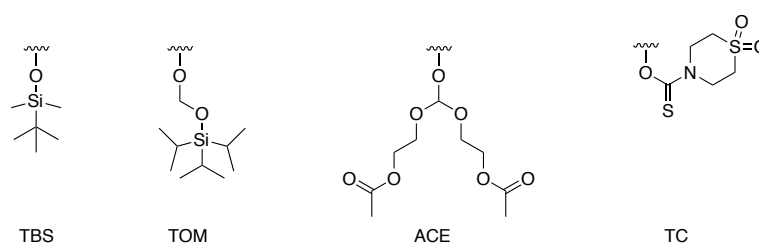


Figure 42 : Groupements protecteurs les plus utilisés pour la position 2' du ribose.

#### 1.1.2.1. Les groupement silylés

Le groupement *tert*-butyldiméthylsilyl (TBS) reste le plus utilisé. C'est un groupement facile à introduire et les monomères phosphoramidites commercialisés portant un TBS en 2' sont les moins chers. Le groupement triisopropylsilyloxyméthyl (TOM) est une alternative au groupement TBS. L'espaceur entre la position 2' et le groupement silyl permet de minimiser l'encombrement stérique et diminue le temps de couplage. La fonction acétal prévient la migration du silyl de la position 2' vers 3' en milieu basique. Ces deux groupements protecteurs sont enlevés en présence d'une source de fluor.

#### 1.1.2.2. Le groupement bis(2-acétoxy)méthyle (ACE)

Il est éliminé en milieu acide. C'est une alternative possible lorsque la position 5' du ribose doit être protégée par un groupement silyl. Ainsi la déprotection des positions 2' et 5' reste orthogonale. L'avantage principale de cette méthode est la possibilité de purifier l'ARN

<sup>174</sup> a) R. Lohrmann, D. Soll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka, H. G. Khorana, *J Am Chem Soc* **1966**, 88, 819-829 ; b) J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegaal, G. Wille, *Nucleic Acids Res* **1977**, 4, 1047-1063 ; c) K. K. Ogilvie, N. Theriault, K. L. Sadana, *J Am Chem Soc* **1997**, 99, 7741-7743

<sup>175</sup> <https://www.atdbio.com/content/22/RNA-oligonucleotide-synthesis>

encore protégé en position 2'. L'oligonucléotide est résistant à la dégradation par les RNases et peut être conservé pendant de longues périodes avant d'être déprotégé.

### 1.1.2.3. Le groupement thiomorpholine-4-carbothioate (TC)

Il est clivable en milieu basique, dans les mêmes conditions de déprotection que les nucléobases. Contrairement aux autres méthodes proposées, la déprotection de l'oligonucléotide peut s'effectuer en une étape en milieu basique.

## 1.2. Fonctionnalisation des oligonucléotides

Les découvertes récentes des nombreuses fonctions biologiques des ARN, leurs synthèses et l'introduction de modifications sur des positions spécifiques se sont développées ces dernières années.<sup>176</sup> Une modification ou une fonctionnalisation peut être introduite sur la base, sur le phosphate ou sur le sucre, en position interne ou aux extrémités 5' et 3' du brin. Deux stratégies permettent l'incorporation de modifications : pré-synthétique et post-synthétique.

### 1.2.1. Approche pré-synthétique

La stratégie pré-synthétique consiste à synthétiser un monomère nucléotide portant le motif d'intérêt et les groupements protecteurs adéquates à la méthode d'oligomérisation. Ensuite l'oligomérisation est effectuée par synthèse sur support solide (SPS) ou par des méthodes enzymatiques avec l'utilisation de polymérases ou de ligases (Schéma 34).

---

<sup>176</sup> a) T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson, *Modified RNAs as Tools in RNA Biochemistry*, in *Handbook of RNA Biochemistry, Second Edition* **2014**, 151-171, eds R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof ; b) M. Arthur, M. Ethève-Quelquejeu, *Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids*, in *Chemistry of Organo-Hybrids : Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects, First Edition* **2015**, 272-298, eds B. Charleux, C. Copéret, E. Lacôte

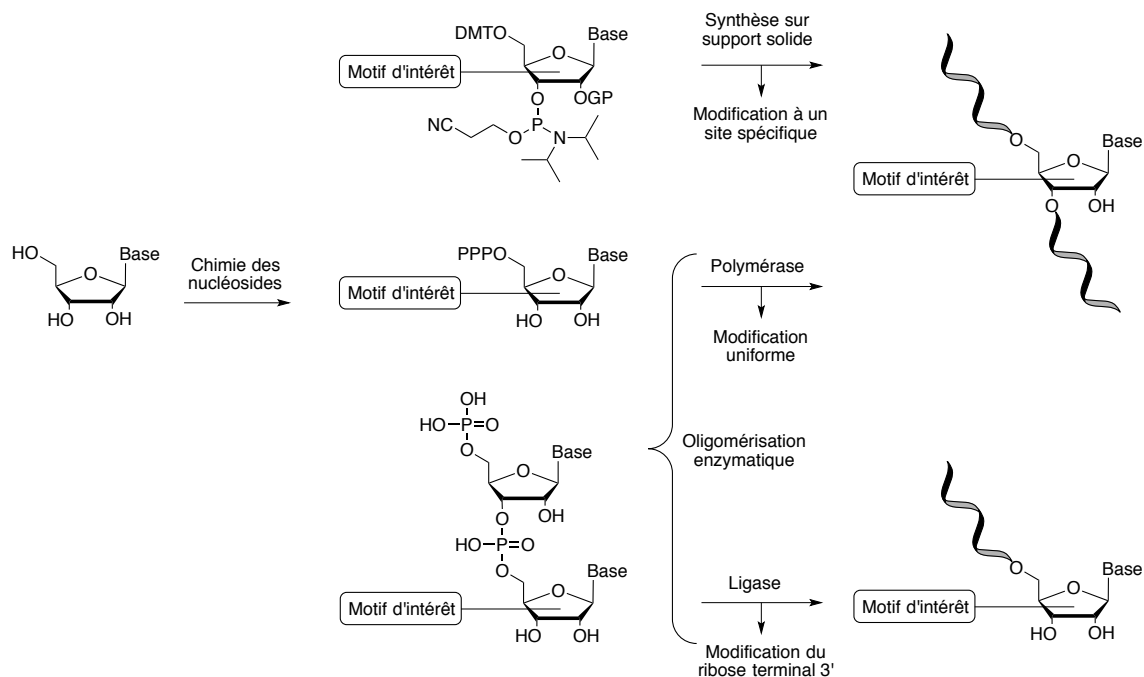


Schéma 34 : Stratégie pré-synthétique pour la fonctionnalisation d'ARN.

La synthèse sur support solide a pour avantage d'incorporer la modification à un site spécifique dans un brin d'ARN.<sup>177</sup> Le motif d'intérêt introduit doit être stable en condition de couplage et ne pas interférer avec les réactifs. Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle requiert une quantité importante de monomère modifié souvent obtenu par synthèse multi-étapes. De plus, cette méthode permet la synthèse de brin d'une centaine de nucléotides. Pour obtenir des brins plus longs, il faut employer les méthodes enzymatiques.

La synthèse enzymatique d'ARN modifié s'effectue principalement avec la polymérase ARN bactériophage T7.<sup>178</sup> Elle implique la synthèse de monomères triphosphates parfois compliqués à obtenir et la spécificité de l'enzyme peut ne pas tolérer la modification. De plus, l'incorporation du nucléotide modifié se fait uniformément sur tous les sites du brin. Il n'est pas possible d'effectuer une modification sur un site spécifique.

Dans le cas des ligases, il est possible, par exemple, d'incorporer le monomère modifié à un dinucléotide via la chimie des phosphoramidites. Par la suite, le di-nucléotide est lié à l'extrémité d'un brin d'ARN plus long par une T4 ARN ligase. Cette méthode est

<sup>177</sup> N. Venkatesan, S. J. Kim, B. H. Kim, *Curr Med Chem* **2003**, *10*, 1973-1991

<sup>178</sup> N. Milisavljevic, P. Perlikova, R. Pohl, M. Hocek, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 5800-5807

principalement utilisée pour des modifications en positions 2' ou 3' du ribose terminal. Plusieurs analogues d'ARNt ont déjà été synthétisés avec succès par cette méthode au laboratoire.<sup>179</sup>

### 1.2.2. Approche post-synthétique

La méthode post-synthétique consiste à incorporer un monomère nucléotide portant une fonction réactive dans un oligonucléotide. Ce nucléotide convertible est ensuite modifié sélectivement par réaction chimique pour introduire le motif d'intérêt après l'étape d'oligomérisation (Schéma 35).

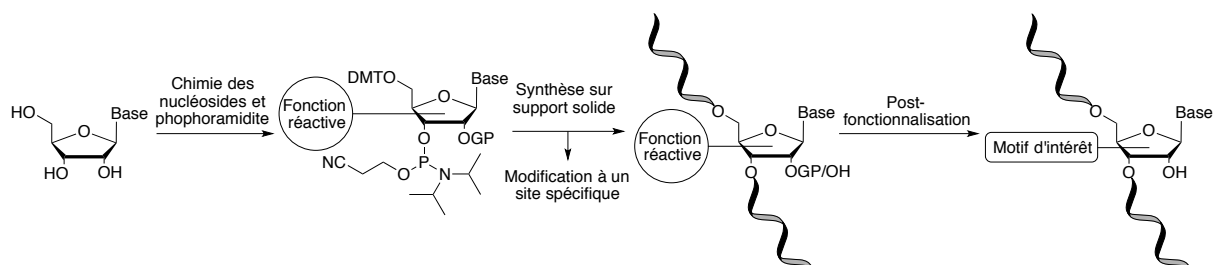


Schéma 35 : Stratégie post-synthétique pour la fonctionnalisation d'ARN.

Cette réaction doit être compatible avec la réactivité intrinsèque d'un ARN, et sa stabilité. Elle doit donc être chimiosélective. Une grande variété de motifs d'intérêt peut être introduit en utilisant ce type de post-fonctionnalisation. De plus, dans le cas où le motif d'intérêt n'est pas compatible avec les méthodes d'oligomérisation, la méthode post-synthétique reste la méthode de choix.

#### 1.2.1.1. Réactions de post-fonctionnalisation d'ARN

Un large éventail de réactions existent aujourd'hui pour l'approche post-synthétique.<sup>180</sup> En effet différentes catégories de réactions sont appliquées à la post-fonctionnalisation des ARN :

<sup>179</sup> a) M. Chemama, M. Fonvielle, R. Villet, M. Arthur, J. Valéry, M. Ethève-Quelquejeu, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 12642-12643 ; b) M. Santarem, M. Fonvielle, N. Sakkas, G. Laisné, M. Chemama, J. Herbeuval, E. Braud, M. Arthur, M. Ethève-Quelquejeu, *Bioorg Med Chem* **2014**, *24*, 3231-3233

<sup>180</sup> Y. Yu, W. Weiming, *Post-synthetic chemical functionalization of oligonucleotides*, *Comprehensive Organic Synthesis (2<sup>nd</sup> Edition)*, eds P. Knochel, G. A. Molander, **2014**, *9*, 463-493

i. la formation d'un lien thioéther par substitution nucléophile<sup>181</sup> ou réaction de Michael<sup>182</sup> ; ii. la synthèse d'un pont disulfure<sup>183</sup> ; iii. la formation d'un lien amide par réaction de Staudinger<sup>184</sup>, par « native chemical ligation »<sup>185</sup>, ou encore *via* la réaction d'une amine avec un ester activé<sup>186</sup> ; iv. les réactions de cycloadditions telles que la réaction de Huisgen-Sharpless<sup>187</sup> ou la réaction de Diels Alder<sup>188</sup> ; v. la condensation d'un carbonyle avec différentes amines<sup>189</sup> ; vi. les réactions pallado-catalysées telles que le couplage de Stille<sup>190</sup>, de Sonogashira<sup>191</sup> ou plus récemment de Suzuki Miyaura.<sup>192</sup> Ceci est une liste non exhaustive des réactions appliquées aux ARN mais donne un aperçu de la diversité des liens formés.

Malgré le large panel de réactions existantes adaptés à la fonctionnalisation d'ARN, aucune de ces réactions ne permet la post-fonctionnalisation d'une adénosine en position N6 avec un espaceur alkyle. L'utilisation de nucléosides convertibles permet de former ce lien.

### 1.2.1.2. Les nucléosides électrophiles convertibles

Les nucléosides électrophiles convertibles représentent une classe supplémentaire de groupements post-fonctionnalisables. L'incorporation de monomères phosphoramidites portant des substituants activés en position C4 de pyrimidines et en position C2 ou C6 de purines dans un oligonucléotide permet la fonctionnalisation des bases par la formation de liaisons C-X, avec X = N, O, S sur le cycle aromatique de la base (Schéma 36).

---

<sup>181</sup> G. P. G. Grant, N. Boyd, D. Herschlag, P. Z. Qin, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 3136-3137

<sup>182</sup> M. Raouane, D. Desmaele, M. Gilbert-Sirieix, C. Gueutin, F. Zouhiri, C. Bourgaux, E. Lepeltier, R. Gref, R. Ben Salah, G. Clayman, L. Massaad-Massade, P. Couvreur, *J Med Chem* **2011**, *54*, 4067-4076

<sup>183</sup> J. W. Park, E. Bang, E. M. Jeon, B. H. Kim, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 96-102

<sup>184</sup> A. A. Sawant, A. A. Tanpure, P. P. Mukherjee, S. Athavale, A. Kelkar, S. Galande, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Research* **2015**, *44*, e16

<sup>185</sup> A. Geiermann, R. Micura, *Curr Prot Nuc Acid Chem* **2015**, *62*, 4.64.1-4.64.36

<sup>186</sup> J. G. Aaronson, L. J. Klein, A. A. Momose, A. M. O'Brien, A. W. Shaw, T. J. Tucker, Y. Yuan, D. M. Tellers, *Bioconjugate Chem* **2011**, *22*, 1723-1728

<sup>187</sup> J. Imig, A. Brunschweigern A. Brummer, B. Guennewig, N. Mittal, S. Kishore, P. Tsikrika, A. P. Gerber, M. Zavolan, J. Hall, *Nat Chem Biol* **2015**, *11*, 107-114

<sup>188</sup> A. Maria, Pyka, C. Domnick, F. Braun, S. Kath-Schorr, *Bioconjugate Chem* **2014**, *25*, 1438-1443

<sup>189</sup> a) J. Yamamoto, S. Ebisuda, L. Kong, H. Yamago, S. Iwai, *Chem Lett* **2017**, *46*, 767-770 ; b) T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, A. A. Arzumanov, E. A. Romanova, M. J. Gait, T. Oretskaya, *Bioconjug Chem* **2002**, *13*, 822-830

<sup>190</sup> L. Wicke, J. W. Engels, *Bioconjug Chem* **2012**, *23*, 627-642

<sup>191</sup> N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, 3128-3143

<sup>192</sup> M. B. Walunj, A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, e65



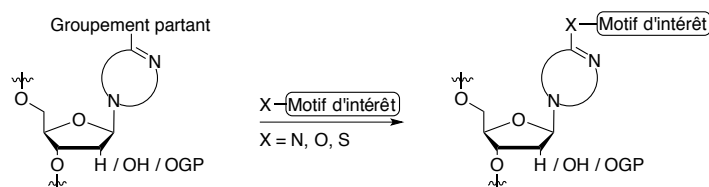


Schéma 36 : Post-fonctionnalisation d'oligonucléotide avec un nucléotide convertible électrophile.

Après oligomérisation, la chaîne nucléotidique réagit en présence d'un nucléophile par une réaction de substitution nucléophile aromatique. Le motif d'intérêt est alors positionné directement sur la base.

Plusieurs groupements partant ont été développés. Le groupe de Verdine a proposé des groupements O<sup>6</sup>-phényles sur des purines et pyrimidines en série désoxyribose et ribose (Figure 43).

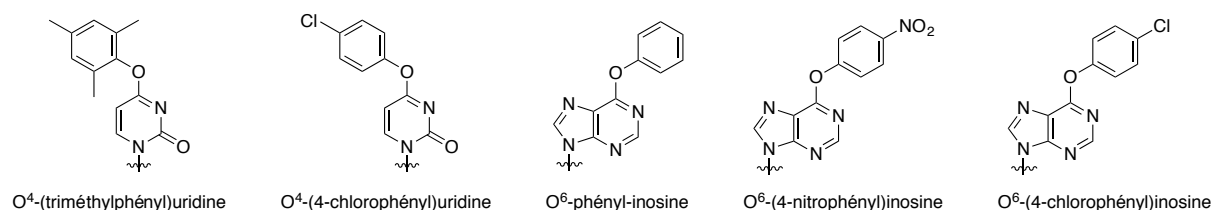


Figure 43 : Pyrimidines et purines convertibles électrophiles.

Le nucléoside électrophile le plus couramment utilisé pour la formation de liaisons C-N sur les pyrimidines est la O<sup>4</sup>-(4-chlorophényl)uridine.<sup>193</sup> Celle-ci a été incorporée à un oligomère d'ARN par SPS. L'oligoribonucléotide encore liée à la résine et protégée est soumise au traitement de différentes amines (Schéma 37).

<sup>193</sup> a) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem* **1997**, *119*, 7423-7433 ; b) K. Wawrzyniak-Turek, C. Hobartner, *Methods Enzymol* **2014**, *549*, 85-104 ; c) L. Buttner J. Seikowski, K. Wawrzyniak, A. Ochmann, C. Hobartner, *Biorg Med Chem* **2013**, *21*, 6171-6180

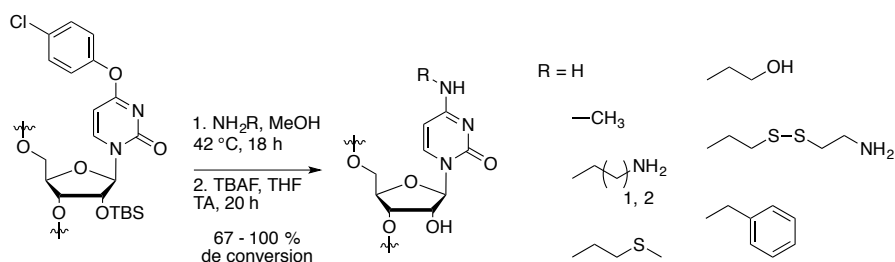


Schéma 37 : Post-fonctionnalisation d'ARN avec la O<sup>4</sup>-(4-chlorophényl)uridine.

La déprotection des phosphodiesteres, des bases et le clivage de la résine sont concomitants. Une dernière étape de déprotection de la position 2' du ribose est réalisée en présence de TBAF pour obtenir l'oligomère fonctionnalisé complètement déprotégé. L'obtention du produit est comprise entre 67 et 100 % de rendement.

Le groupe de Verdine a aussi développé des purines électrophiles. La réactivité et la stabilité en conditions d'oligomérisation de la O<sup>6</sup>-phényl-inosine et la O<sup>6</sup>-(4-nitrophényl)inosine ont été testé ce qui valide leur utilisation en tant que nucléosides convertibles.<sup>194</sup> La O<sup>6</sup>-phényl-inosine a été incorporée dans un oligomère d'ADN sur support solide. L'oligonucléotide est déprotégé et clivé de la résine avant d'être post-fonctionnalisé avec des amines primaires (Schéma 38).<sup>195</sup> La fonctionnalisation sur l'oligonucléotide déprotégé s'effectue dans l'eau à 65 °C. Les produits sont obtenus avec des rendements quasi quantitatifs.

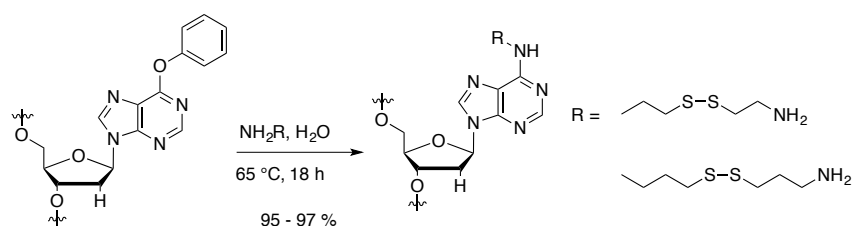


Schéma 38 : Post-fonctionnalisation d'ADN avec la O<sup>6</sup>-phényl-inosine.

D'autre part, la O<sup>6</sup>-(4-chlorophényl)inosine a aussi montré des résultats intéressants. Une fois incorporé dans un oligomère d'ARN, la fonctionnalisation est opérée de la même manière que

<sup>194</sup> A. E. Ferentz, G. L. Verdine, *Nucleosides and Nucleotides* **1992**, 11, 1749-1763

<sup>195</sup> A. E. Ferentz, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1991**, 113, 4000-4003

pour le dérivé d'uridine. Cependant, il est à noter que la synthèse des monomères de purines phosphoramidites souffre de mauvais rendements.

Le groupe de Swann a travaillé sur la synthèse de la O<sup>4</sup>-triazolo-thymidine. Cette purine activée est incorporée dans une chaîne nucléotidique d'ADN. L'oligonucléotide est alors fonctionnalisé avec différents nucléophiles en milieu basique (Schéma 39).<sup>196</sup>

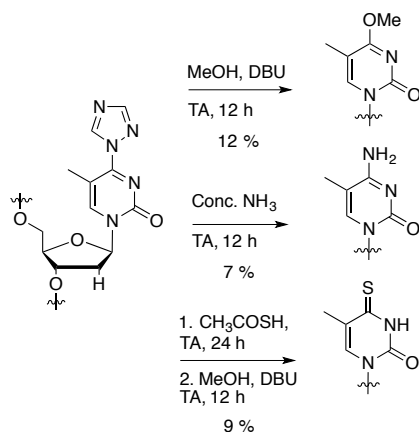


Schéma 39 : Post-fonctionnalisation d'ADN avec la O<sup>4</sup>-triazolo-thymidine.

Le groupe de Swann a également développé des purines activées.<sup>197</sup> Le groupe propose d'incorporer la 6-(dinitrophényl)thioguanine et la 6-(dinitrophényl)thioinosine dans un oligonucléotide d'ADN par SPS. Cependant la formation d'un sous-produit de réaction a été observé en raison de la présence de deux sites électrophiles ce qui s'explique par le fait que le thio-dinitrophényle et le dinitrophényle sont tous deux de bons groupements partants. (Schéma 40).<sup>198</sup>

<sup>196</sup> Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *J Org Chem* **1992**, 57, 3839-3845

<sup>197</sup> a) Y. Z. Xu, Q. Zheng, G. Urwin, P. F. Swann, *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, 16, 1559-1562 ; b) Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *Tetrahedron* **1992**, 48, 1729-1740 ; c) Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *Tetrahedron Lett* **1992**, 33, 5837-5840

<sup>198</sup> Y. Z. Xu, *Tetrahedron* **1996**, 32, 10737-10750

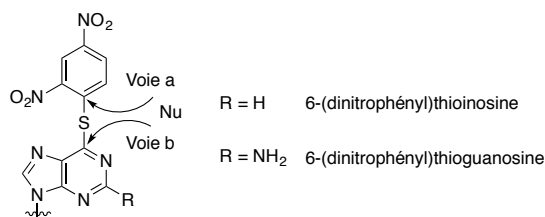


Schéma 40 : Post-fonctionnalisation d'ADN avec la 6-(dinitrophényl)thioguanine.

Pour éviter ce problème le groupement dinitrophényle doit être remplacé par un groupement moins électro-attracteur. L'utilisation des formes oxydées de thioalkylpurines, sulfoxyde ou sulfone est une bonne alternative. Le groupe de Kierzek a réalisé la synthèse d'oligoribonucléotides modifiés par cette méthode.<sup>199</sup> La 6-méthylthiopurine est incorporée dans un oligonucléotide. L'oligonucléotide protégé est d'abord oxydé. Le mélange des dérivés sulfoxyde et sulfone obtenu réagit ensuite avec une amine primaire (Schéma 41).

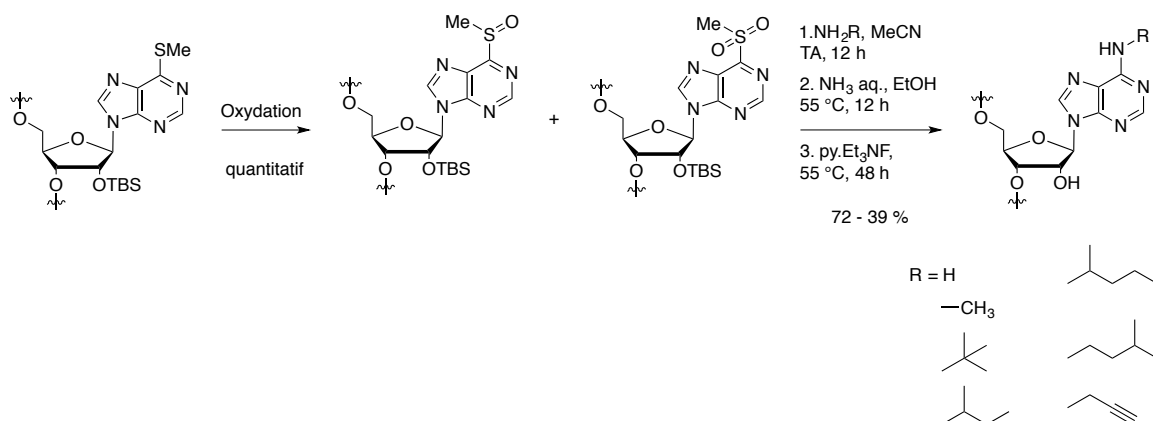


Schéma 41 : Post-fonctionnalisation d'ARN avec la 6-méthylthiopurine.

La fonctionnalisation de la guanosine en position C2 a été développée avec l'utilisation de la O<sup>6</sup>-(*p*-nitrophényl)éthyl-2-fluoroinosine. Le groupement (*p*-nitrophényl)éthyle sert de protection à la fonction amide de la base et évite les réactions secondaires.<sup>200</sup> Le dérivé de guanosine a été utilisé pour la fonctionnalisation d'ADN<sup>201</sup> et d'ARN.<sup>202</sup> En effet récemment,

<sup>199</sup> E. Kierzek, R. Kierzek, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 4461-4471

<sup>200</sup> T. Trichtinger, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett* **1983**, *24*, 711-714

<sup>201</sup> D. A. Erlanson, L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 12583-12584

<sup>202</sup> a) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem* **1997**, *119*, 7423-7433 ; b) G. Sicoli, F. Wachowius, M. Bennati, C. Hobartner, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 6443-6447

le groupe de Höbartner décrit l'introduction d'une sonde radicalaire dans l'ARN par post-fonctionnalisation (Schéma 42).

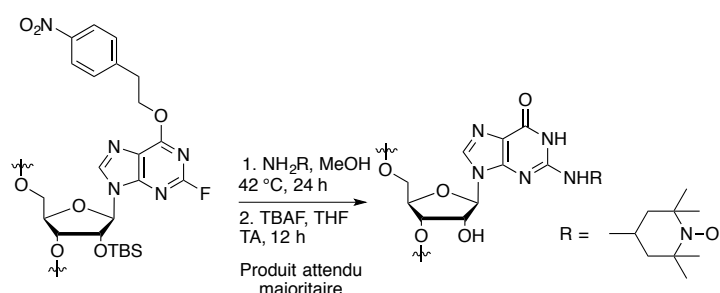


Schéma 42 : Post-fonctionnalisation d'ARN avec la O<sup>6</sup>-(*p*-nitrophényl)éthyl-2-fluorinosine.

Comme mentionné dans le premier chapitre, le nucléoside électrophile O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine est une alternative proposée par le groupe de Lakshman.<sup>203</sup> La fonctionnalisation est réalisée sur la chaîne nucléotidique protégée et encore attachée à la résine par réaction avec la morpholine à température ambiante (Schéma 43). Puis une étape standard de déprotection et clivage du support solide est effectuer. Aucun produit dû à la réaction de l'ammoniac avec l'inosine activée n'a été observé ce qui démontre une conversion quantitative. Le groupe de Lakshaman met en évidence le potentiel de ce nucléotide électrophile.

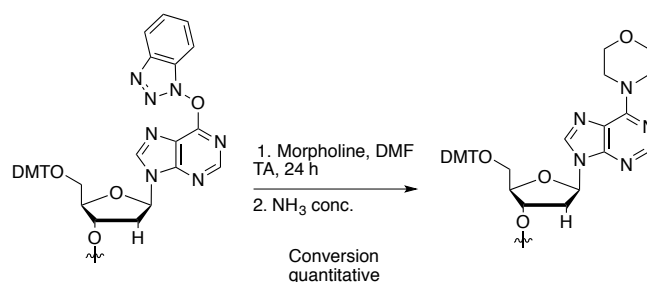


Schéma 43 : Post-fonctionnalisation d'ADN avec la O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine.

## 2. Preuve de concept

L'objectif de cette partie a consisté à mettre au point les conditions de fonctionnalisation d'un dinucléotide modèle. J'ai choisi d'appliquer la chimie des phosphoramidites pour synthétiser

<sup>203</sup> S. Bae, M. K. Lakshman *J Am Chem Soc*, **2007**, 129, 782-789

le dinucléotide. Ce dernier sera composé d'une cytidine en série désoxy à l'extrémité 5'. C'est un phosphoramidite commercial couramment utilisé au laboratoire. L'inosine activée sera positionnée à l'extrémité 3' du dinucléotide. Nous avons choisi d'utiliser la O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine comme nucléoside convertible. Une amine modèle, l'amine **4**, a été choisi pour la fonctionnalisation.

## 2.1. Méthode proposée

Nous proposons la stratégie de synthèse suivante décrite dans le schéma 44. Le dinucléotide dC-A **43** fonctionnalisé serait obtenu par réaction entre le dinucléotide dC-I<sup>OBT</sup> **42** et l'amine primaire **4**. Le dinucléotide **42** est synthétisé classiquement en utilisant un couplage au phosphoramidites à partir de la désoxycytidine dC et de l'inosine activée **41**.

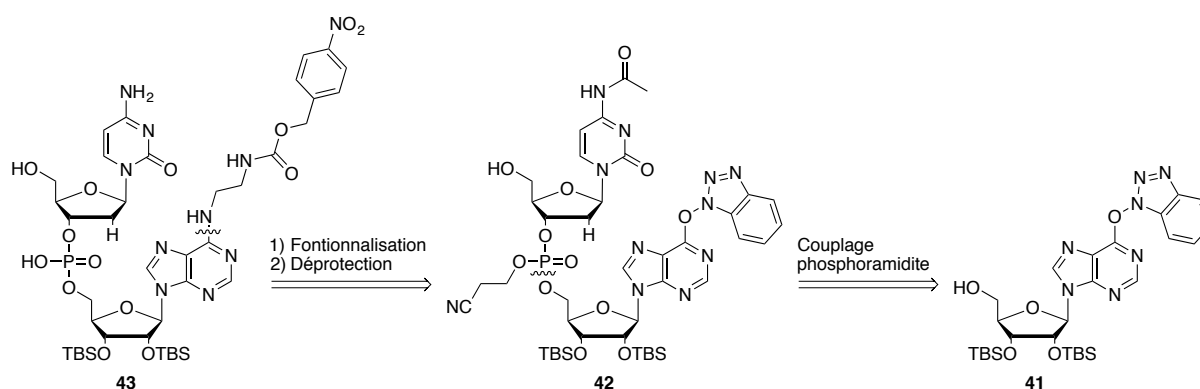


Schéma 44 : Schéma rétrosynthétique.

## 2.2. Synthèse du dinucléotide post-fonctionnalisé

### 2.2.1 Préparation de l'inosine-OBT **41**

Le schéma de synthèse débute par la déprotection sélective de la position 5' de l'inosine trisilylée **16** par une solution aqueuse de TFA (Schéma 45). Le composé **40** réagit ensuite avec le réactif (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) en présence de DBU pour conduire au dérivé O<sup>6</sup>-benzotriazole **41** avec un rendement de 93 %. Le dérivé de benzotriazole est obtenu avec un rendement global de 79 %.

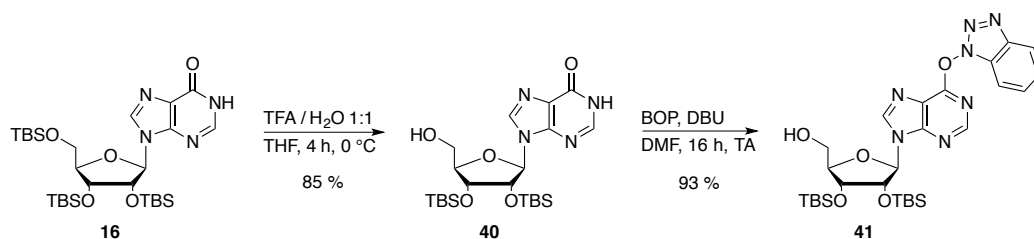


Schéma 45 : Synthèse du précurseur O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine.

### 2.2.2. Synthèse et fonctionnalisation du dinucléotide modèle dC-I<sup>OBT</sup> **42**

Le dinucléotide fonctionnalisé **43** est obtenu en 2 étapes en suivant le schéma réactionnel suivant (Schéma 46).

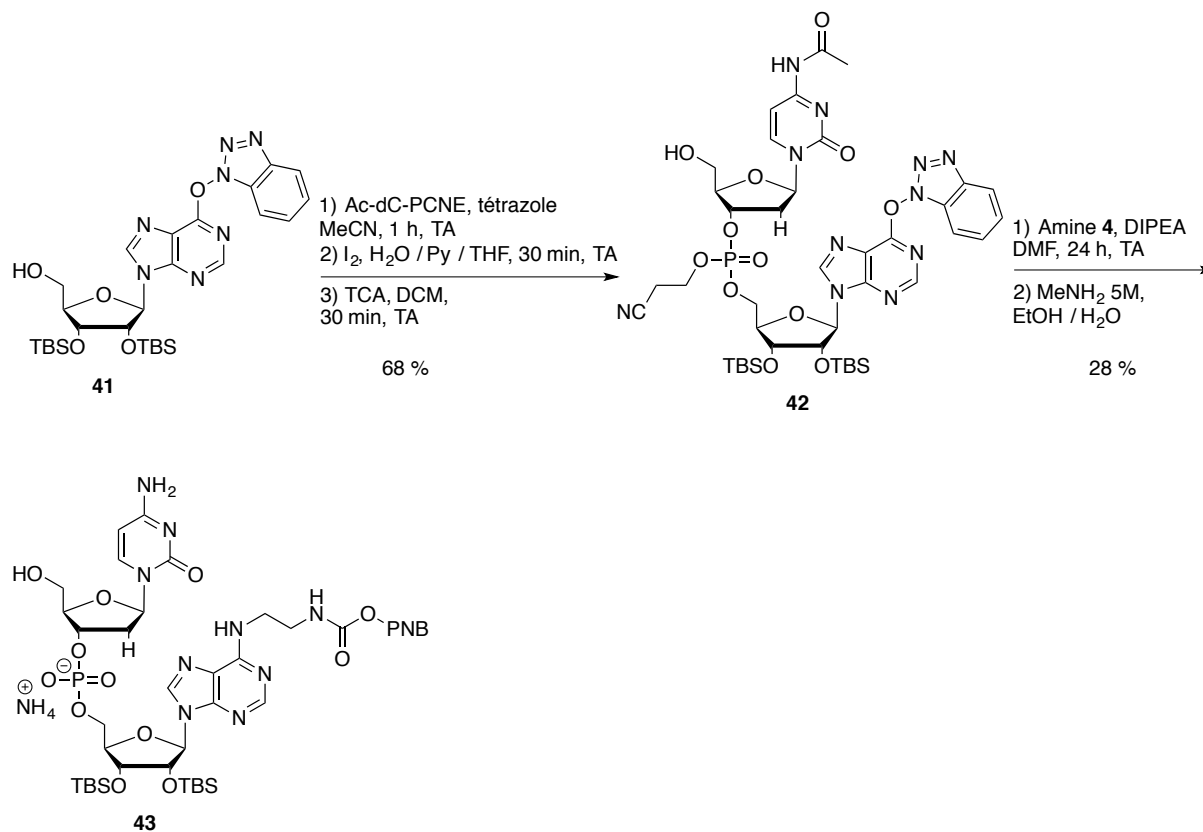


Schéma 46 : Synthèse du di-nucléotide modèle dC-I<sup>OBT</sup> et sa fonctionnalisation par une amine primaire.

L'inosine activée **41** réagit avec le phosphoramidite protégé de la désoxycytidine (Ac-dC-PCNE). Le tétrazole catalyse la réaction de couplage pour donner le dinucléotide phosphite. Cet intermédiaire est directement soumis à des conditions oxydantes dans une solution d'iode

pour donner le phosphotriester correspondant. Enfin, un traitement à l'acide trichloroacétique permet de cliver le groupement 4,4-diméthoxytrityle en position 5' de la cytidine. Le dinucléotide modèle **42** est isolé avec un rendement de 68 %. Nous appliquons alors les conditions pour déplacer la fonction O<sup>6</sup>-benzotriazolyle. Une analyse par spectroscopie de masse du brut réactionnel révèle la formation du produit attendu. Cependant, on observe un mélange de produits partiellement déprotégés.

Le brut réactionnel est alors repris dans une solution de méthylamine dans l'éthanol pour conduire au dinucléotide fonctionnalisé complètement déprotégé. Le produit est obtenu après purification sur HPLC avec un rendement de 28 %.

### 3. Fonctionnalisation d'un dinucléotide par l'analogue de SAM

Les conditions mises au point sur le dinucléotide **42** sont ensuite appliquées pour introduire l'amine portée par l'analogue de SAM sur un dinucléotide d'ARN. Pour ce premier essai, nous avons choisi de synthétiser le dinucléotide GA présent dans la séquence consensus reconnue par les RNMT.

Comme précédemment décrit, le dinucléotide G-I<sup>OBT</sup> **44** est synthétisé par la méthode au phosphoramidite et obtenu avec un rendement de 57 % (Schéma 47). La réaction de S<sub>N</sub>Ar est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, et suivie du traitement à la méthylamine. Les caractérisations du composé formé sont encore en cours de réalisation.



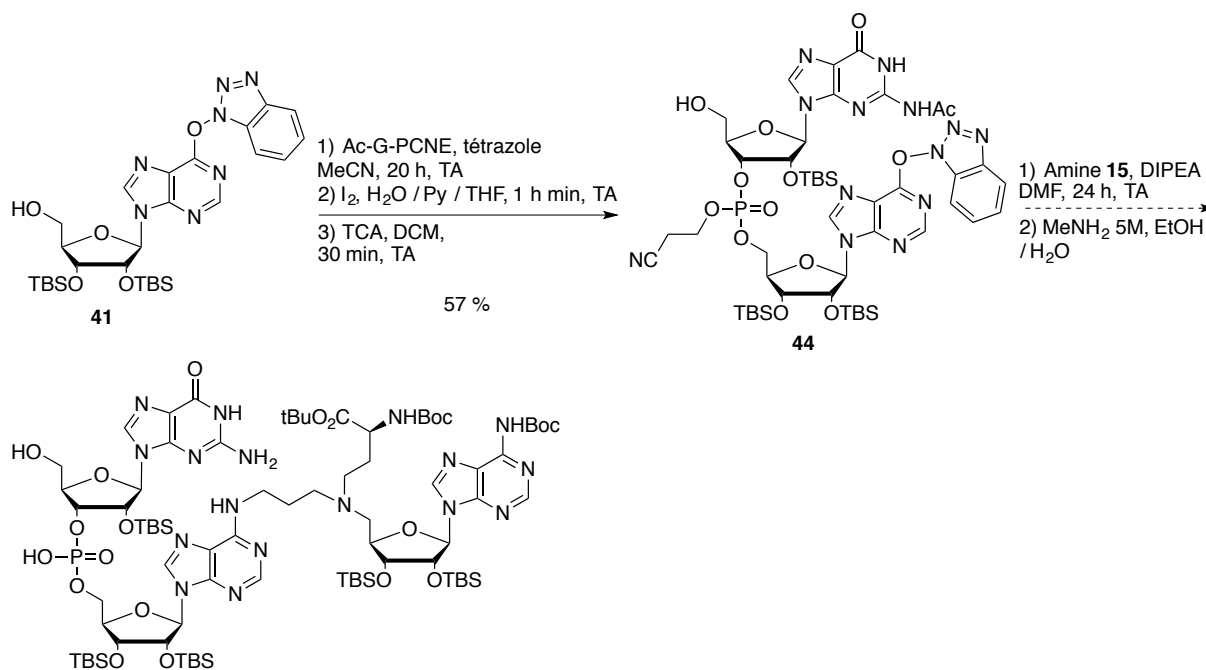


Schéma 47 : Synthèse d'un bi-substrats dinucléotide.

Afin de valider l'approche, il reste à éliminer l'ensemble des groupements protecteurs.

#### 4. Fonctionnalisation sur une position interne d'un oligonucléotide

##### 4.1. Voie de synthèse proposée

Comme précédemment, les différentes amines d'intérêt seraient introduites par  $S_NAr$  sur l'oligonucléotide portant le nucléotide convertible électrophile. L'oligonucléotide serait synthétisé par SPS ce qui implique ici la préparation du phosphoramidite du dérivé O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine (Schéma 48).

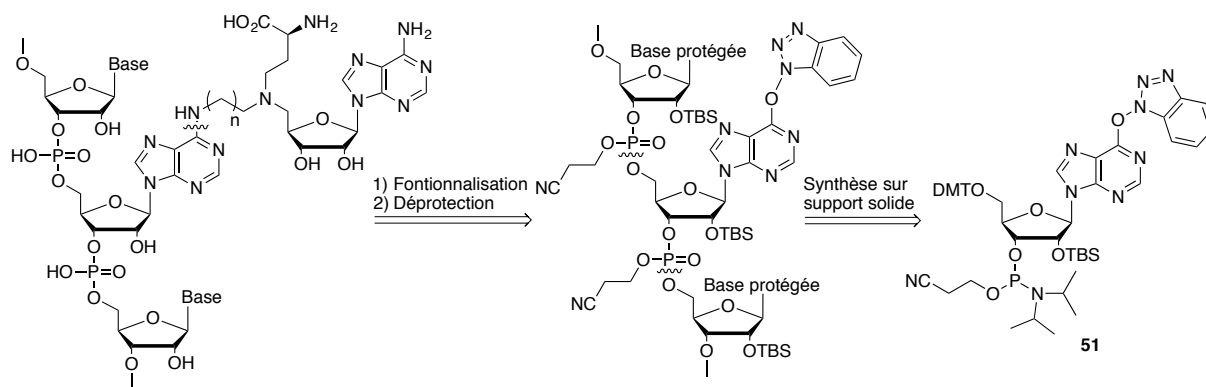


Schéma 48 : Stratégie de fonctionnalisation d'un oligonucléotide en position interne.

#### 4.2. Synthèse de l'inosine-OBT phosphoramidite **51**

L'inosine-OBT phosphoramidite a déjà été synthétisée par le groupe de Lakshman en série désoxyribose.<sup>204</sup> Nous avons exploré, en parallèle, deux voies de synthèse pour obtenir l'inosine-OBT phosphoramidite **51** en série ribose à partir de l'inosine protégée **46**.

Pour cette synthèse, nous avons appliqué des conditions modifiées de la littérature.<sup>205</sup> La fonction 3' et 5' de l'inosine sont tout d'abord protégées sélectivement par le chlorure de ditertiobutylsilyle puis la fonction hydroxyle en position 2' est protégée par un TBS (Schéma 49). L'inosine **46** est obtenue avec un rendement quantitatif.

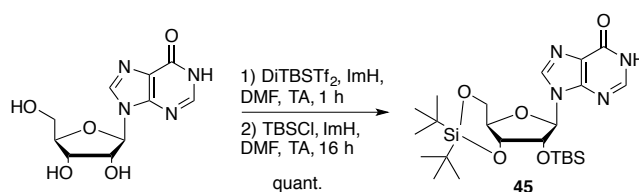


Schéma 49 : Protection du ribose de l'inosine.

<sup>204</sup> S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 782-789

<sup>205</sup> A. Dallmann, A. V. Beribisky, F. Gnerlich, M. Rubbelke, S. Schiesser, T. Carell, M. Sattler, *Chem Eur J* **2016**, *22*, 1-11

### 4.2.1 Voie A

Puis, le groupement benzotriazolyl est introduit, dans les conditions décrites précédemment, avec un rendement de 71 % (Schéma 50). Les positions 3' et 5' sont déprotégées sélectivement par une solution de HF.pyridine par une méthode décrite pour d'autres dérivés d'inosine.<sup>206</sup> L'inosine **47** partiellement déprotégée est isolée avec un rendement de 91 %. Finalement le groupement 4,4-diméthoxytrityle est introduit en position 5' avec un rendement de 33 % pour cette dernière étape.

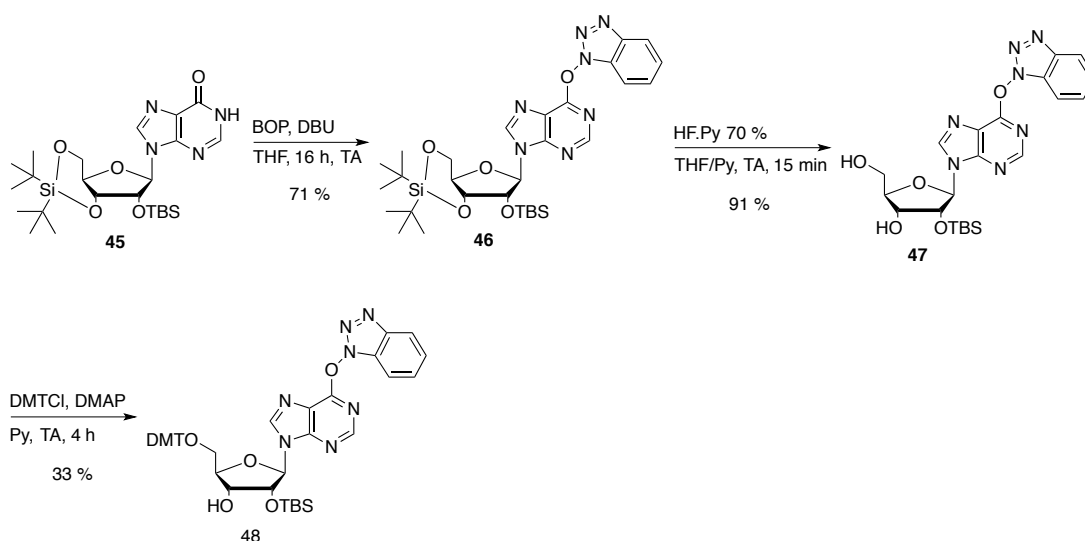


Schéma 50 : Voie synthétique A pour l'obtention de l'inosine activée **48**.

### 4.2.2. Voie B

Ici, le groupement benzotriazolyl est introduit lors de la dernière étape (Schéma 51). L'inosine **45** est sélectivement déprotégée en position 3' et 5' avec un rendement de 78 % puis le 4,4-diméthoxytrityle est introduit en position 5' avec un rendement de 79 %. Le benzotriazolyl est finalement introduit sur la base avec un rendement de 60 %. Pour cette dernière étape, on observe la migration du groupement silyle de la position 2' en position 3' du ribose. Pour limiter cette migration, un seul équivalent de DBU a été utilisé.

<sup>206</sup> Q. Dai, G. Zheng, M. H. Schwartz, W. C. Clark, T. Pan, *Angew Chem Int Ed* **2017**, 56, 1-5

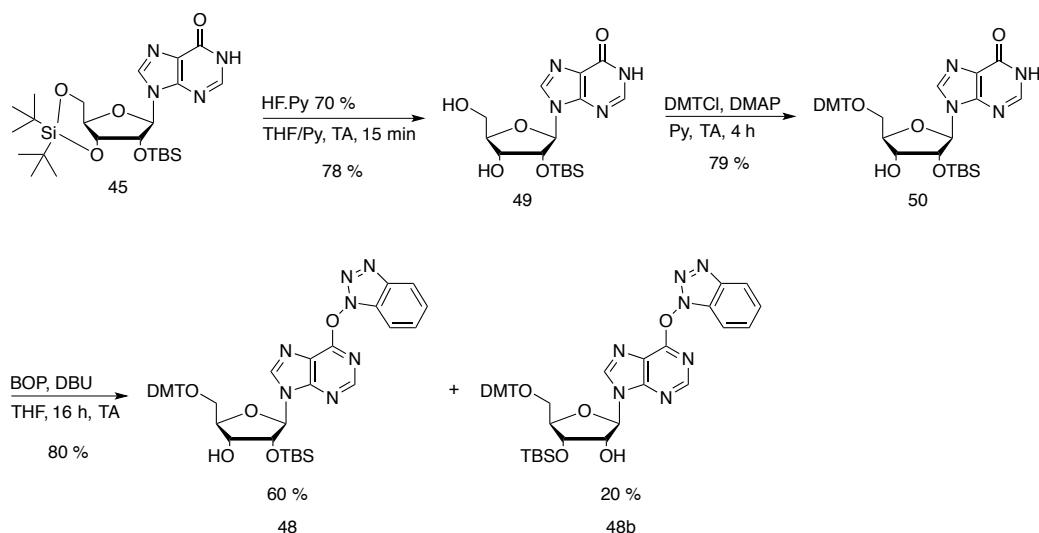


Schéma 51 : Voie synthétique A pour l'obtention de l'inosine activée **48**.

La voie A conduit à un rendement global de 21 % contre 37 % pour la voie B. Cependant, la formation de l'isomère 3'-OTBS par la voie B rend la purification longue et compliquée. C'est pourquoi, il serait intéressant d'optimiser la voie A et plus particulièrement la dernière étape de tritylation.

L'étape finale pour obtenir le phosphoramidite est décrite dans le schéma 52 suivant. L'inosine **48** réagit avec un excès de chlorophosphoramidite en milieu basique. Après purification sur gel de silice, le phosphoramidite convertible **51** est isolé avec un rendement de 79 %.

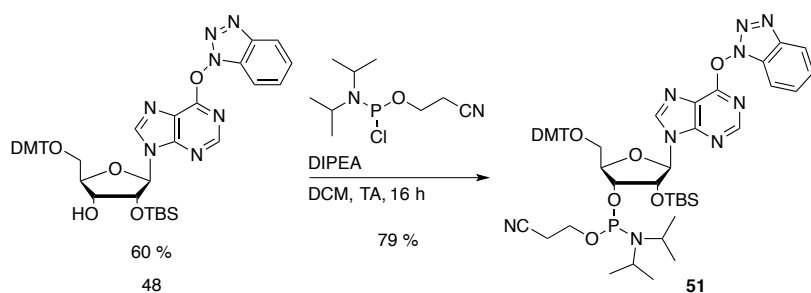


Schéma 52 : Formation du phosphoramidite convertibles.

## 5. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons développé une méthode de post-fonctionnalisation d'oligoribonucléotide. Un dinucléotide modèle a pu être fonctionnalisé avec succès avec une amine simple. Cependant, afin de valider notre approche, il reste à effectuer les étapes de déprotection du dinucléotide fonctionnalisé avec un analogue de SAM.

Nous envisageons par la suite d'introduire nos différents analogues de SAM sur des penta-oligonucléotides synthétisés par synthèse sur support solide (en collaboration avec le Dr Hollenstein, de l'Institut Pasteur). La séquence de ces oligonucléotides est choisie en fonction de la RNMT étudiée et sera dérivée de la séquence consensus RRACH où R = A ou G et H = A, C ou U.

## Chapitre III

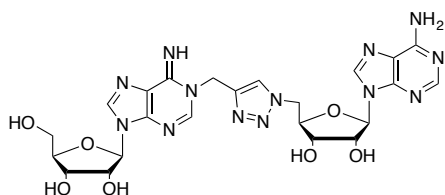


## Chapitre III : Synthèse de conjugués comportant un lien triazole

### 1. Objectifs du chapitre

Dans cette partie, la synthèse de deux conjugués possédant un noyau triazole 1,4-disubstitué est décrite. Ici, le triazole est utilisé dans l'objectif de conserver un lien relativement court entre l'analogue de SAM et l'adénosine, mîme de l'ARN. La 1,4-disubstitution ne nous permet pas, dans un premier temps, d'inclure le bras acide aminé présent dans l'analogue de SAM. Enfin, cette approche permet d'élargir la diversité structurale des bisubstrats envisagés et va nous permettre en une étape d'obtenir des dérivés d'adénosines modifiées sur les positions N1 et N6 (Schéma 53).

A.



B.

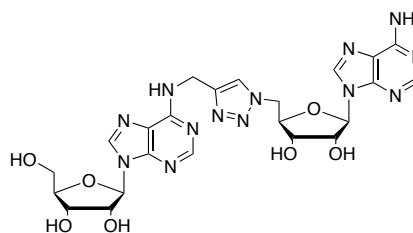


Schéma 53 : Conjugués comportant un lien triazole. A. Adénosine modifiée en position N1, B. Adénosine modifiée en position N6.

### 2. Introduction à la chimie click

#### 2.1. Le principe de la chimie click

Le concept de chimie click a été introduit en 2001 par l'équipe de Sharpless.<sup>207</sup> Il traduit le développement de réactions efficaces, hautement reproductibles et sélectives pour effectuer la synthèse rapide de séries de composés *via* la formation de liens hétéroatomiques (C-X-C). Ces réactions doivent être:

- modulables,
- compatibles avec une grande variété de fonctions,

<sup>207</sup> H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2001**, 40, 2004-2021



- à rendements élevés,
- simples à purifier avec des produits secondaires inertes éliminés par des techniques non chromatographiques,
- faciles à mettre en œuvre c'est-à-dire tolérante vis-à-vis de l'oxygène et de la lumière,
- stéréo et/ou régiospécifiques.

Parmi ces réactions, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen-Sharpless constitue l'un des meilleurs exemples.

## 2.2. La réaction de cycloaddition alcyne-azoture

A l'origine, la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen unit un dipôle 1,3 avec un système à double ou triple liaison, aussi appelé dipolarophile, pour conduire à une grande diversité d'hétérocycles à 5 chaînons.<sup>208</sup> Dans le cas de la réaction entre un azoture et un alcyne vrai, l'hétérocycle obtenu est un triazole. Cette réaction non catalysée nécessite un temps de réaction long, des températures élevées et conduit à la formation d'un mélange de deux triazoles régioisomères 1,4- et 1,5-disubstitués (schéma 54).<sup>209</sup>

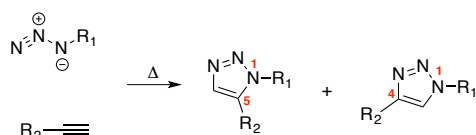


Schéma 54 : Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen.

Cette réaction de cycloaddition a connu un regain d'intérêt lorsque les groupes de Sharpless<sup>210</sup> et de Meldal<sup>211</sup> rapportent chacun indépendamment les avantages de la catalyse au Cu<sup>I</sup>. En effet, cette catalyse permet d'obtenir exclusivement le régioisomère 1,4, diminue le temps de réaction et permet de s'affranchir des températures élevées. La réaction représente alors parfaitement les idéaux de la chimie click et est utilisée pour un grand nombre d'applications

<sup>208</sup> a) R. Huisgen, *Angew Chem Int Ed* **1963**, 2, 633-696 ; b) R. Huisgen, *Angew Chem Int Ed* **1963**, 2, 565-632

<sup>209</sup> V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur J Org Chem* **2006**, 51-68

<sup>210</sup> V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, 41, 2596-2599

<sup>211</sup> C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, 67, 3057-3064

comme par exemple la bioconjugaison,<sup>212</sup> le marquage de biomolécules dans des cellules<sup>213</sup>, la chimie combinatoire<sup>214</sup> ou encore la chimie des matériaux.<sup>215</sup>

Différents mécanismes sont proposés dans la littérature.<sup>216</sup> Les dernières études suggèrent un mécanisme impliquant deux atomes de cuivre. L'intermédiaire clef est un acétylure  $\sigma$ - et  $\pi$ -coordonné à deux atomes de cuivres. Le cuivre  $\sigma$ -coordonné se lie alors à l'azote et permet la formation de la première liaison C-N (Schéma 55).<sup>217</sup>

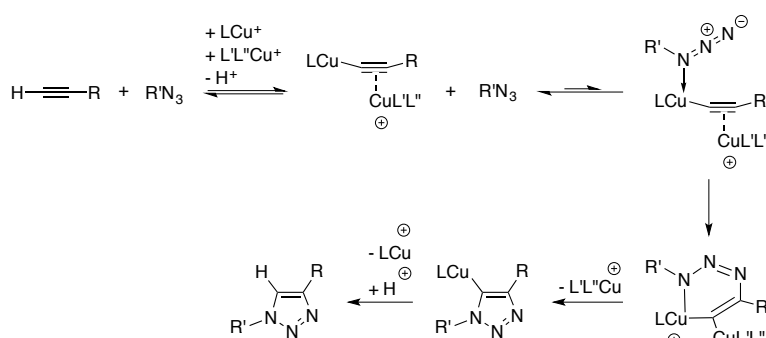


Schéma 55 : Mécanisme proposé pour la formation de triazoles 1,4-disubstitués par cycloaddition catalysée au Cu<sup>I</sup>.

En 2005, de nouveaux catalyseurs à base de ruthénium tels que le chlorure de pentaméthylcyclopentadiényl bis(triphenylphosphine)ruthénium(II): Cp\*<sup>\*</sup>RuCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ont été découverts pour catalyser la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.<sup>218</sup> A l'inverse de la catalyse au cuivre, la réaction permet d'obtenir les triazoles 1,5-disubstitués et fonctionne sur des alcynes vrais et internes.<sup>219</sup> Le mécanisme de la réaction a fait l'objet de plusieurs études et une proposition de cycle catalytique est décrite sur le schéma 56.<sup>220</sup> Après coordination de

<sup>212</sup> a) C. S. McKay, M. G. Finn, *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 1075-1101 ; b) J. D. Castillo Gomez, A. Hagenbach, U. Abram, *Eur J Inorg Chem* **2016**, 5427-5434

<sup>213</sup> V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem* **2010**, *21*, 1912-1916

<sup>214</sup> a) T. Irie, I. Fujii, M. Sawa, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 591-596 ; b) X. Wang, B. Huang, X. Liu, P. Zhan, *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 118-132

<sup>215</sup> W. Xi, T. F. Scott, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *Adv Funct Mater* **2014**, *24*, 2572-2590

<sup>216</sup> a) V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599 ; b) A. Makarem, R. Berg, F. Rominger, B. F. Straub, *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54*, 7431-7435 ; c) I. Kalvet, J. Tammiku-Taul, U. Maeorg, K. Tamm, P. Burk, L. Sikk, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1804-1808

<sup>217</sup> A. Makarem, R. Berg, F. Rominger, B. F. Straub, *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54*, 7431-7435

<sup>218</sup> L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 15998-15999

<sup>219</sup> M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J Org Chem* **2006**, *71*, 8680-8683

<sup>220</sup> a) B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8923-8930 ; b) E. Boz, N. S. Tuzun, *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *724*, 167-176 ; c) D. Hou, T. Kuan, Y. Li, R. Lee, K. Huang, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9415-9420

l'azoture et de l'alcyne au centre ruthénium, une étape d'addition oxydante mène à l'intermédiaire clef, le ruthénocycle. Une liaison C-N se forme entre le carbone de l'alcyne et l'azote terminal de l'azoture et une étape d'élimination réductive conduit à la formation du triazole.

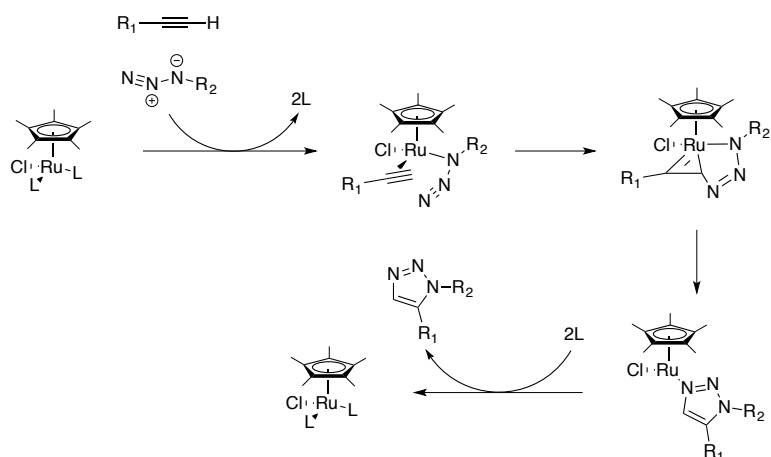


Schéma 56 : Cycle catalytique proposé pour la synthèse des triazoles 1,5-disubstitués par cycloaddition catalysée au ruthénium.<sup>221</sup>

Le groupe de Bertozzi a aussi développé une version sans catalyseur de la réaction de cycloaddition rendue possible par la tension de cycle des cyclooctynes (Schéma 57).<sup>222</sup>

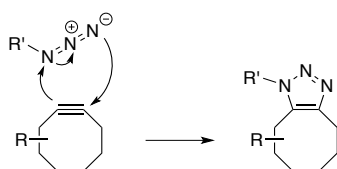


Schéma 57 : Cycloaddition sur un cyclooctyne.

### 2.3. Les propriétés physico-chimiques du cycle triazole

Le triazole est un hétérocycle aromatique à la structure petite, rigide et plane avec la capacité de former plusieurs interactions faibles (Figure 44). En effet, les trois atomes d'azotes du cycle induisent une forte polarisation du système. Les atomes d'azote 2 et 3 sont partiellement

<sup>221</sup> B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8923-8930

<sup>222</sup> J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1272-1279

chargés négativement alors que l'azote 1 et les carbones sont partiellement chargés positivement. Cela se traduit par un moment dipolaire important d'environ 4,5 debye. Le cycle triazole peut donc intervenir dans des interactions de type dipôle-dipôle. La liaison C-H est ainsi fortement polarisée ce qui fait du triazole un donneur potentiel de liaison hydrogène. Les azotes 2 et 3 possèdent chacun un doublet non liant qui n'est pas délocalisable sur le cycle et qui peut donc être accepteur de liaisons hydrogène.<sup>223</sup> Enfin, la distance entre les deux substituants  $R_1$  et  $R_2$  varie du simple au double suivant une fonctionnalisation 1,5 ou 1,4 avec respectivement 2.4 Å et 5.0 Å.<sup>224</sup>

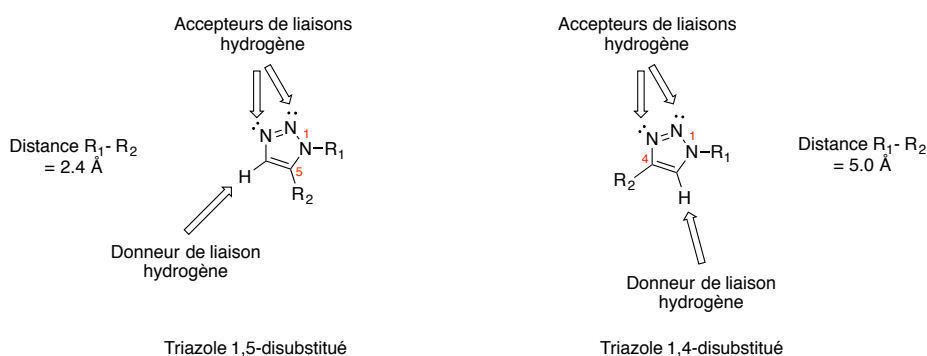


Figure 44 : Propriétés physico-chimiques des triazoles 1,4- et 1,5-disubstitués.

### 3. Adénosine substituée en N1

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la conception de conjugués SAM-adénosine connecté par la position N1. Nous nous sommes donc penchés sur les méthodes d'alkylation de la position N1 de l'adénosine.

#### 3.1. Alkylation de la position N1 de l'adénosine

L'utilisation d'halogénure de méthyle dans le DMF ou le DMA à température ambiante a déjà été décrite dans la littérature pour méthyler l'adénosine en position N1 avec de bons

<sup>223</sup> B. Schulze, U. Schubert, *Chem Soc Rev* **2014**, *43*, 2522-2571

<sup>224</sup> G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. Genazzani, *Med Res Rev* **2008**, *28*, 278-308

rendements.<sup>225</sup> Par exemple, le groupe de Broom décrit la méthylation d'une adénosine en présence d'iodure de méthyle à température ambiante avec un bon rendement (Schéma 58).<sup>226</sup>

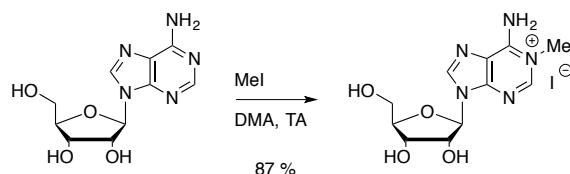


Schéma 58 : Méthylation en position N1 de l'adénosine.<sup>226</sup>

En revanche, la N1-alkylation de l'adénosine par d'autres groupements alkyles fonctionne moins bien.<sup>227</sup> Les meilleurs résultats sont obtenus avec des halogénures d'alkyle ayant un groupement méthylène adjacent à l'atome d'halogène et à une fonction aromatique ou une chaîne insaturée.<sup>228</sup> Le groupe de Fujii décrit l'alkylation d'adénosine avec les dérivés bromés benzyle, 2-méthylpent-2-ène, et allyle. Ils obtiennent des rendements bons à modérés (Schéma 59).<sup>229</sup>

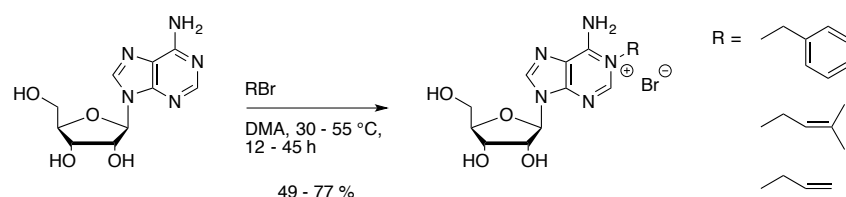


Schéma 59 : Alkylation en position N1 de l'adénosine.<sup>229</sup>

Plus récemment, l'utilisation de carbonate de barium pour éviter l'acidification du milieu réactionnel et l'addition de sels d'iodure tels que KI ou NaI ont permis d'améliorer les rendements de la réaction d'alkylation.<sup>230</sup> Néanmoins, le groupe de Mikhailov précisent qu'ils

<sup>225</sup> a) J. W. Jones, R. K. Robins, *J Am Chem Soc* **1963**, 85, 193-201 ; b) S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, 88, 2683-2704 ; c) J. Uzawa, K. Anzai, *Can J Chem* **1987**, 65, 2691-2693 ; d) V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, 34, 475-499

<sup>226</sup> T. Aboul-Fadl, G. Rajeev, A. D. Broom, *J Heterocyclic Chem* **2008**, 45, 445-451

<sup>227</sup> a) K. Tishinov, D. Gillingham, *Synlett* **2015**, 26, 2720-2723 ;

<sup>228</sup> a) R. Ottria, S. Casati, A. Manzocchi, E. Baldoli, M. Mariotti, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, 18, 4249-4254 ; b) W. A. H. Grimm, N. J. Leonard, *Biochemistry* **1967**, 6, 3625-3631

<sup>229</sup> T. Itaya, F. Tanaka, T. Fujii, N. J. Leonard, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1977**, 25, 1449-1452

<sup>230</sup> J. Buter, D. Heijnen, I. C. Wan, F. M. Bickelhaupt, D. C. Young, E. Otten, D. Branch Moody, A. J. Minaard, *J Org Chem* **2016**, 81, 6686-6696

ne sont pas parvenus à introduire le groupement propargyle en position N1 par cette méthode.<sup>231</sup>

Dans la même étude, de nouvelles conditions sont proposées. Le groupement propargyle est alors introduit en position N1 sur une N<sup>6</sup>-acétyl-tri-O-acétyladénosine en présence d'un agent silylant : le N,O-bis-silylacétamide (BSA). Selon les auteurs, la silylation transitoire en position N6 de l'adénosine faciliterait la N1 alkylation avec la formation simultanée de bromure de triméthysilyle. La réaction avec le bromure de propargyle mène exclusivement à l'adénosine correspondante alkylée en N1 avec un rendement de 14% (Schéma 60).

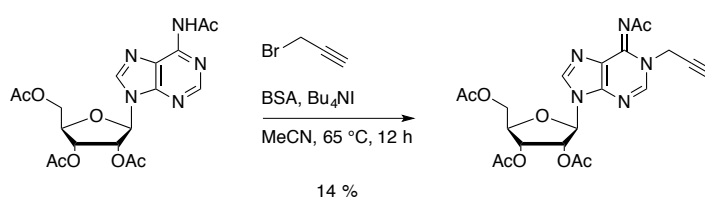


Schéma 60 : Alkylation en position N1 d'une adénosine par le bromure de propargyle.<sup>231</sup>

Le groupe de Sekine a recours à une catalyse par transfert de phase pour effectuer la réaction d'alkylation sur une adénosine N<sup>6</sup>-benzoyl-adénosine. Un mélange de deux régioisomères alkylés en N1 et N6 est obtenu (Schéma 61).<sup>232</sup>

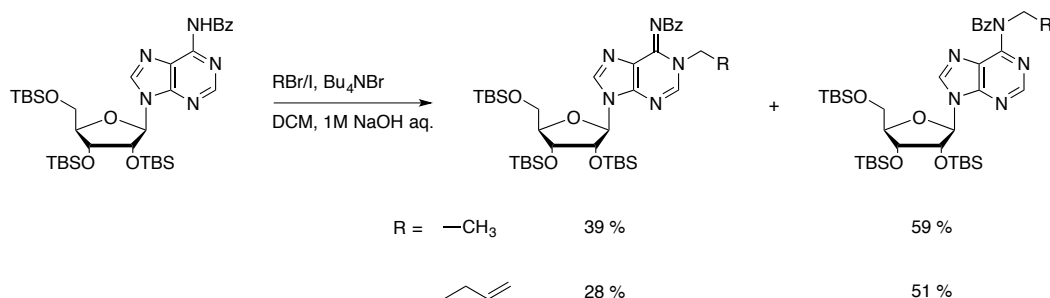


Schéma 61 : Alkylation en position N1 et N6 de l'adénosine N6-benzoylée.<sup>232</sup>

<sup>231</sup> V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499

<sup>232</sup> K. Arimoto, T. Wada, M. Sekine, *J Chem Soc, Perkin Trans I* **1995**, 1837-1844

Des adénosines avec différents groupements acyles ont subi le même traitement. Seul le dérivé benzoylé a mené à un mélange des produits alkylés avec l'iodure de méthyle et le bromure d'allyle. On peut observer un ratio N1/N6 d'environ 4 : 6 pour les deux substituants.

### 3.2. Réarrangement de Dimroth

Il est important de noter que les adénosines alkylées en N1 sont des composés peu stables. En effet, l'alkylation de l'adénosine en position N1 induit un changement drastique des propriétés physico-chimiques de la base. La N1-méthyladénosine de pKa = 8.69 est une base bien plus forte que l'adénosine (pKa = 3.64) (Schéma 62).<sup>233</sup> A pH physiologique, la N1-méthyladénosine est donc chargée positivement. En conséquence, elle ne participe pas à l'appariement canonique Watson-Crick et son hydrophobicité ainsi que ses propriétés de chélation en sont modifiées. Cette base peut alors participer à l'établissement de liaisons hydrogène non-canoniques et à des interactions électrostatiques. Du fait du réarrangement de Dimroth, son utilisation dans une synthèse est un exercice délicat.<sup>234</sup> Dans plusieurs publications, ces molécules servent uniquement d'intermédiaires de synthèse pour accéder au composé correspondant alkylé en N6 via le réarrangement de Dimroth (Schéma 9 voie e et Schéma 62).<sup>235</sup>

---

<sup>233</sup> L. E. Kapinos, B. P. Operschall, E. Larsen, H. Sigel, *Chem Eur J* **2011**, *17*, 8156-8164

<sup>234</sup> S. N. Mikhailov, J. Rozenski, E. V. Efintseva, R. Busson, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 1124-1131

<sup>235</sup> a) K. K. Palaniappan, Z. Gao, A. A. Ivanov, R. Greaves, H. Adachi, P. Besada, H. O. Kim, A. Y. Kim, S. A. Choe, L. S. Jeong, K. A. Jacobson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7437-7448 ; b) K. S. Toti, S. M. Moss, S. Paoletta, Z. Gao, K. A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *Bioorg Med Chem* **2014**, *22*, 4257-4268 ; c) R. Ottria, S. Casati, A. Manzocchi, E. Baldoli, M. Mariotti, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 4249-4254 ; d) J. Buter, D. Heijnen, I. C. Wan, F. M. Bickelhaupt, D. C. Young, E. Otten, D. Branch Moody, A. J. Minaard, *J Org Chem* **2016**, *81*, 6686-6696 ; e) K. A. Jacobson, M. Ohno, H. T. Duong, S. Kim, S. Tchilibon, M. Cesnek, A. Holy, Z. Gao, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 237-247

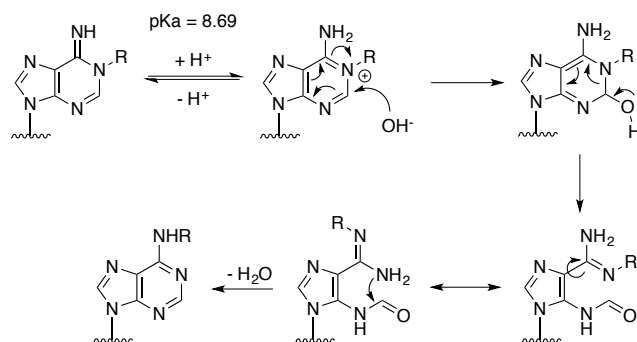


Schéma 62 : Mécanisme du réarrangement de Dimroth sur une adénosine.<sup>236</sup>

Ce réarrangement, catalysé en milieu basique, a été publié pour la première fois par Dimroth en 1909 sur des dérivés triazoles.<sup>237</sup> Le bilan de cette réaction est une isomérisation d'hétérocycles par la translocation d'hétéroatomes exo- et endocycliques qui implique une ouverture du cycle. Elle est aussi appelée réarrangement d'amidine et concerne une large gamme d'hétérocycles.<sup>238</sup> Pour les dérivés d'adénines, il a été démontré que l'anion hydroxyde attaque la position C2 du cycle pyrimidine et conduit à l'ouverture de cycle. Le réarrangement est alors possible suite à la rotation de la liaison C5-C6 suivit de la fermeture du cycle.<sup>239</sup>

#### 4. Synthèse des conjugués à lien triazole

##### 4.1. Rétrosynthèse

Dans le schéma suivant, nous proposons une stratégie de synthèse pour obtenir les deux conjugués comportant le cycle triazole (Schéma 63). J'ai choisi d'introduire la fonction alcyne sur l'adénosine mime de l'ARN et la fonction azoture sur l'analogue de SAM.

<sup>236</sup> E. S. H. El Ashry, S. Nadeem, M. R. Shah, Y. El Kilany, *Advances in Heterocyclic Chemistry* **2010**, *101*, 161-228

<sup>237</sup> Dimroth Otto, *Ann* **1909**, *364*, 183-226

<sup>238</sup> E. S. El Ashry, Y. El Kilany, N. Rashed, H. Assafir, *Advances in Heterocycles Chemistry* **2000**, *75*, 79-165

<sup>239</sup> T. Fujii, T. Itaya, *Heterocycles* **1998**, *48*, 359-390



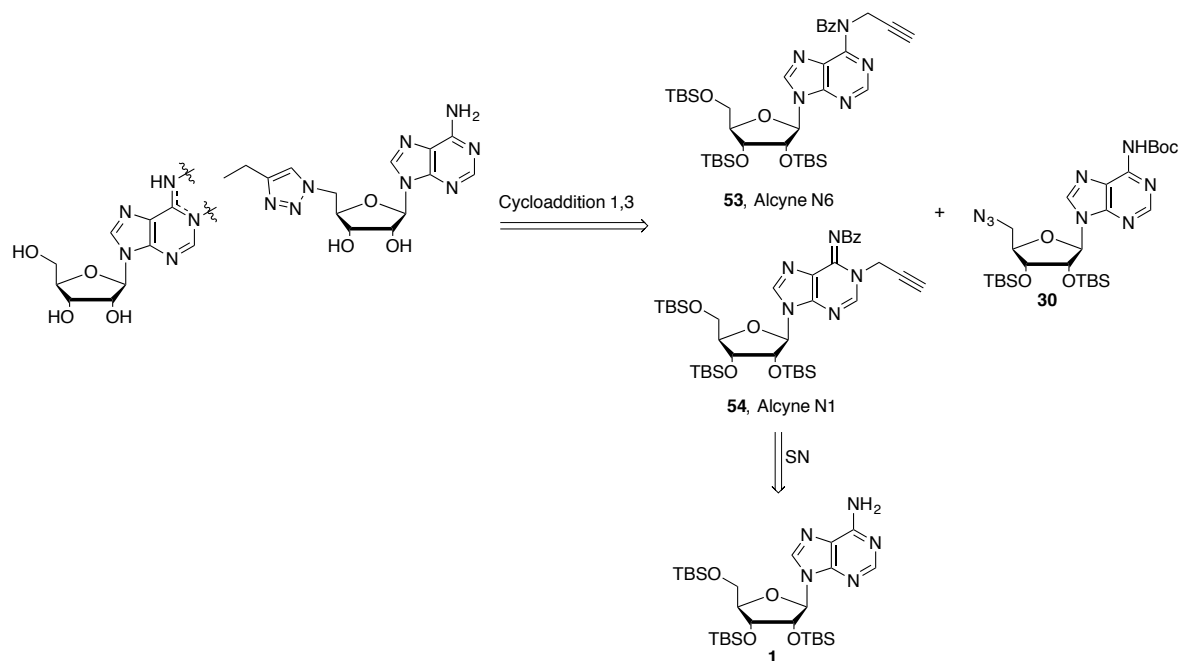


Schéma 63 : Stratégie de synthèse des composés à lien triazole.

Ce schéma rétrosynthétique comporte deux étapes clef, i) la réaction de cycloaddition de Huisgen/Sharpless entre l'azoture **30** déjà décrit et les alcynes N1 ou N6 de l'adénosine et ii) l'introduction du groupement propargyle en position N1 et N6 de l'adénosine trisilylée **1**.

#### 4.2. Synthèse des alcynes

Après examen des différentes méthodes présentées plus haut, nous avons décidé de protéger l'amine exocyclique par un groupement benzoyle pour tenter d'obtenir les deux produits d'alkylation en N1 et en N6. L'adénosine trisilylée **1** réagit avec du chlorure de benzoyle en excès dans la pyridine. On obtient l'adénosine di-benzoylée non isolée qui est ensuite monodéprotégée par la méthylamine. L'adénosine monobenzoylée **52** est obtenue avec un rendement global de 89 % (Schéma 64).

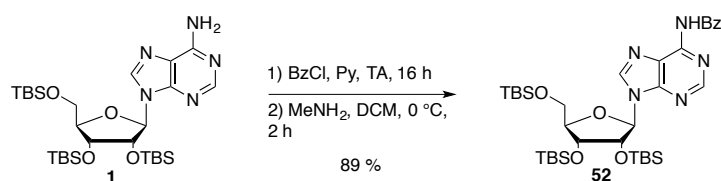
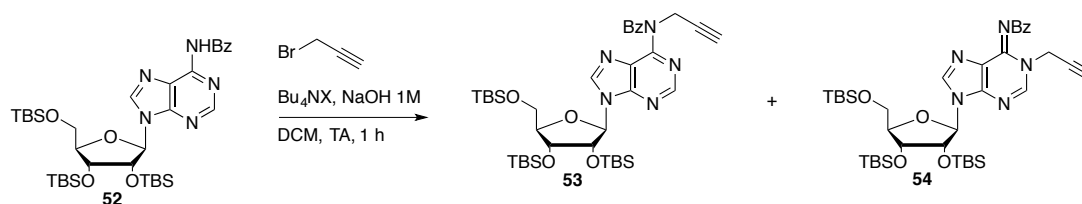


Schéma 64 : Protection de l'amine exocyclique par un benzoyle.

Le tableau 7 décrit la synthèse des précurseurs alcynes **53** et **54**. Deux agents de transfert de phase sont testés pour réaliser la réaction d'alkylation. Le précurseur benzoylé est engagé dans la réaction d'alkylation en catalyse par transfert de phase en présence de bromure de propargyle. Les deux produits d'alkylation N6 et N1 sont alors isolés et obtenus avec des rendements respectifs de 50 et 27 % pour le Bu<sub>4</sub>NBr, et 57 et 28 % pour le Bu<sub>4</sub>NOH. Le Bu<sub>4</sub>NBr, utilisé par le groupe de Sekine donne un rendement globale de 77 % tandis qu'on observe un meilleur rendement de 85 % avec le Bu<sub>4</sub>NOH. Dans les deux cas, nous avons observé un ratio N1/N6 d'environ 4 : 6 comme décrit dans la littérature.



Agents de transfert de phase	N6	N1	Rendement global
TBABr	50 %	27 %	77 %
TBAOH	57 %	28 %	85 %

Tableau 7 : Synthèse des alcynes.

Pour confirmer la position de la fonction propargylique sur l'adénosine nous avons effectué des expériences 2D-HMBC. Pour le composé **54** comportant l'alcyne en N1, les protons aromatiques et leurs carbones correspondants sur l'adénine ont pu être attribués grâce à l'exploitation du spectre HMBC. Nous pouvons alors observer une corrélation entre le proton H2 et le carbone propargylique C<sup>P</sup> ainsi que deux corrélations entre les protons H<sup>P</sup> et les carbones C2 et C6. Ces données RMN confirment l'alkylation en position N1 (Figure 45).

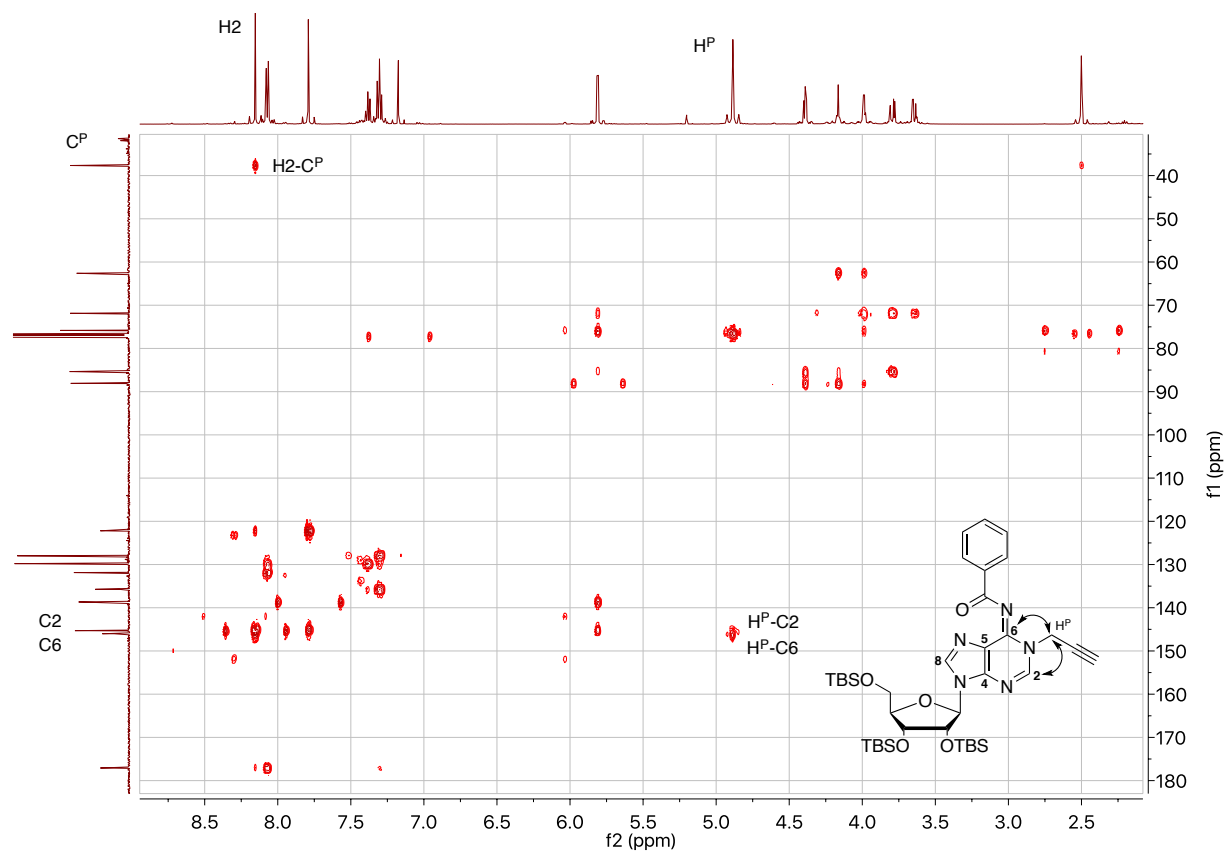


Figure 45 : Spectre RMN 2D-HMBC réalisé sur l'alcyne **54** dans  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Pour le composé **53** avec l'alcyne en position N6, nous pouvons observer une corrélation entre les protons H<sup>P</sup> et les carbones C6 et le carbonyle C=O du benzoyle. Ces données RMN confirment l'alkylation en position N6 (Figure 46).

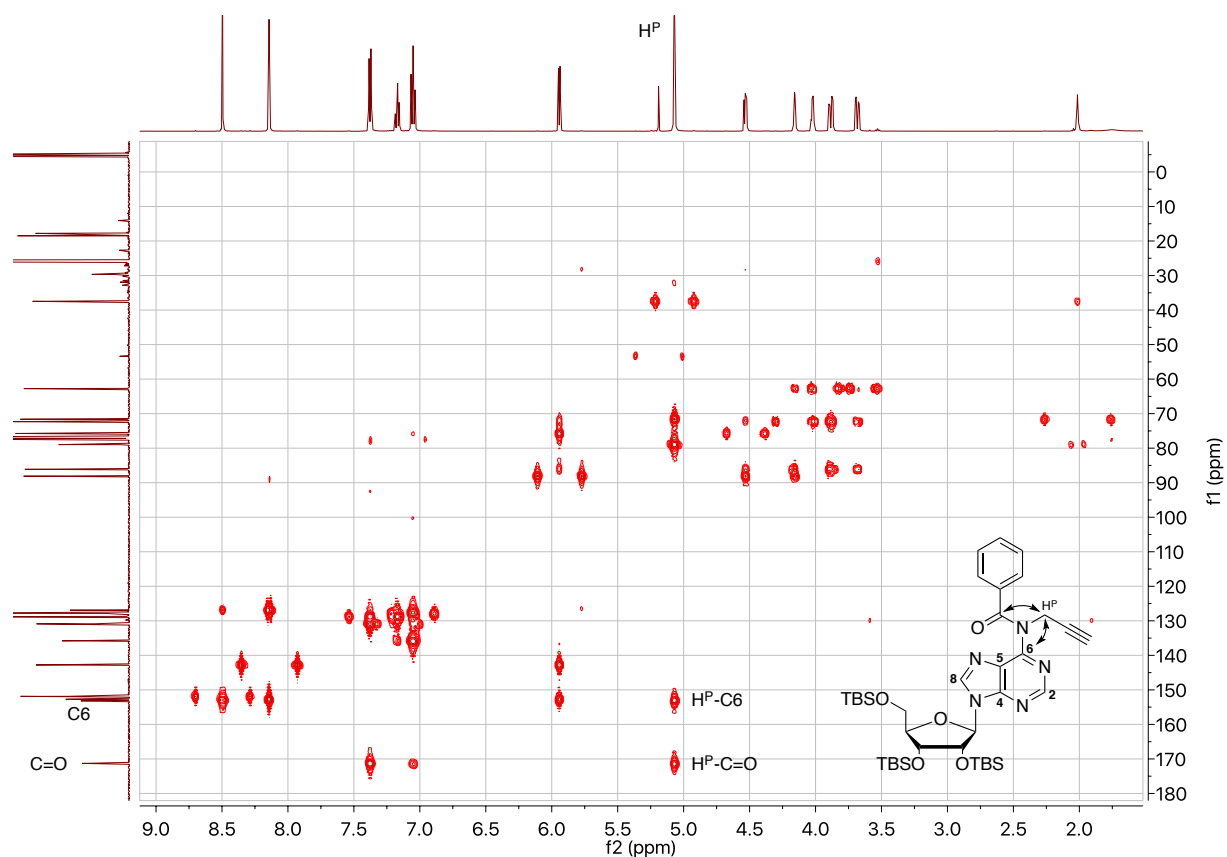


Figure 46 : Spectre RMN 2D-HMBC réalisé sur l'alcyne **53** dans  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).

Pour chaque intermédiaire de la synthèse, une HMBC a été faite pour confirmer le positionnement de l'alcyne en N1 ou N6.

### 4.3. Synthèse des conjugués

Les réactions de cycloaddition catalysées par le cuivre ont ensuite été effectuées entre les alcynes précédemment obtenus et l'adénosine possédant le groupement azoture en position 5' (Schéma 65).

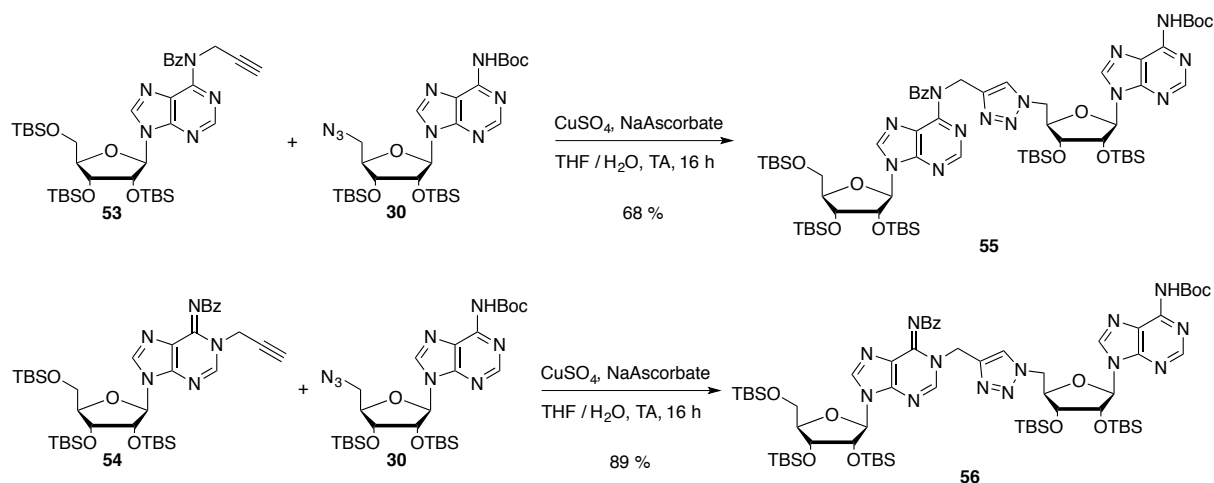


Schéma 65 : Réactions de cycloaddition entre les alcynes et l'azoture de l'adénosine.

Les alcynes N6 **53** et N1 **54** ont chacun réagit avec l'azoture **30** en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans un mélange THF/H<sub>2</sub>O. Les produits de cycloaddition **55** et **56** sont obtenus avec des rendements de 68 et 89% respectivement.

#### 4.4. Déprotection finale des bisubstrats

##### 4.4.1. Déprotection du bisubstrat avec un espaceur en N6

Trois étapes de déprotection sont nécessaires afin d'accéder au composés totalement déprotégés (Schéma 66). Le groupement benzoyle est tout d'abord éliminé en milieu basique par une solution de méthylamine. Après simple filtration sur colonne de silice, le brut obtenu est traité par du ZnBr<sub>2</sub> puis hydrolysé pour cliver le groupement Boc. A nouveau, après une simple filtration sur silice, les groupements silylés sont éliminés en présence de fluorure de césium. Le composé final **57** est purifié par HPLC et est obtenu avec un rendement global de 5 %.

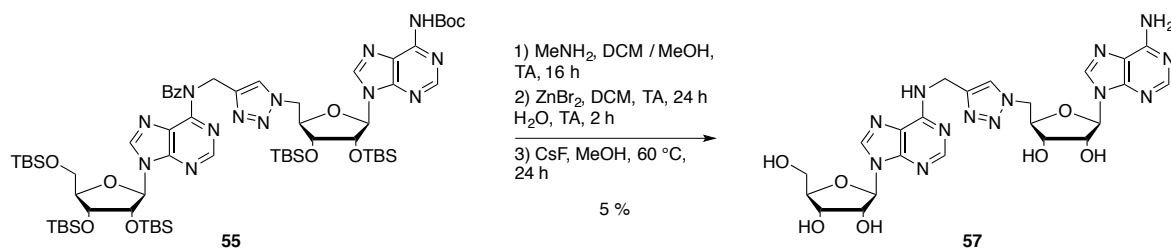


Schéma 66 : Déprotection du composé **55**.

#### 4.4.2. Déprotection du bissubstrat comportant l'espaceur en N1

Dans un premier temps, nous avons envisagé d'appliquer les mêmes conditions de déprotections utilisées pour le composé **55** branché en N6, et de dissoudre le dérivé **56** dans une solution de méthylamine pendant 16 heures. Le produit attendu n'est pas obtenu. Nous observons la formation de 15 % du produit de départ et 31 % du composé comportant un groupement méthyl en position N6. Le reste du produit de départ s'est dégradé dans la réaction, un mononucléoside non identifié est isolé (Schéma 67).

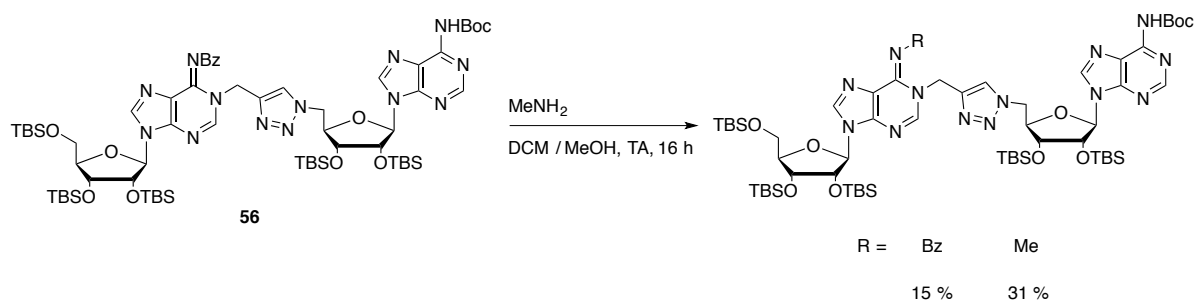


Schéma 67 : Essai de déprotection du groupement benzyle.

La formation du produit méthylé peut s'expliquer par l'attaque nucléophile de la méthylamine sur la position C6 de l'adénine alkylée en N1. Le benzylamide est ensuite éliminé.

Plusieurs méthodes de déprotection en milieu basique ont été testées (Tableau 8). Dans un premier temps, le composé est traité par une base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, une nuit à température ambiante. Il se forme un mélange complexe de nucléosides sans formation du produit attendu. Dans un deuxième temps, le composé **56** est mis en présence d'ammoniac aqueux à température

ambiante, avec agitation du mélange réactionnel 7 jours. Dans ce cas, aucune réaction n'est observée et le produit de départ est récupéré.

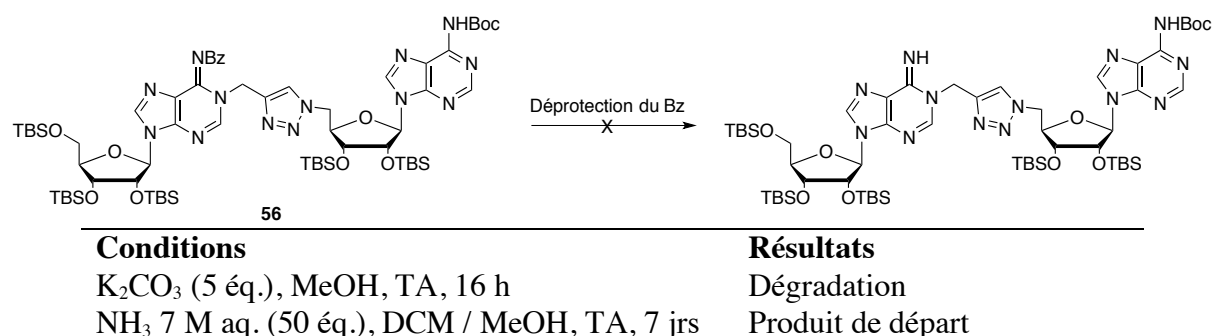


Tableau 8 : Essais de déprotection du groupement benzoyle.

Une déprotection à l'ammoniac en milieu anhydre est envisagée pour compléter les essais de déprotection du benzoyle.

Le groupement benzoyle pourrait aussi être remplacé par une autre fonction acyle. Cependant, la réaction d'alkylation en N1 et N6 devra être réétudiée car dans les conditions décrites, seule l'adénosine benzoylée a mené à l'obtention des deux dérivés propargyles.<sup>240</sup>

Nous avons alors décidé d'éliminer les autres groupements protecteurs suivant les méthodes décrites pour le composé **55** (Schéma 68). Une première étape utilisant du ZnBr<sub>2</sub> a permis d'éliminer le groupement Boc. L'intermédiaire **58** est obtenu avec 50 % de rendement. Finalement les fonctions hydroxyles des sucres sont déprotégées en présence de CsF. Le produit final **59** est obtenu avec un rendement de 25 % après purification HPLC.

<sup>240</sup> K. Arimoto, T. Wada, M. Sekine, *J Chem Soc, Perkin Trans I* **1995**, 1837-1844

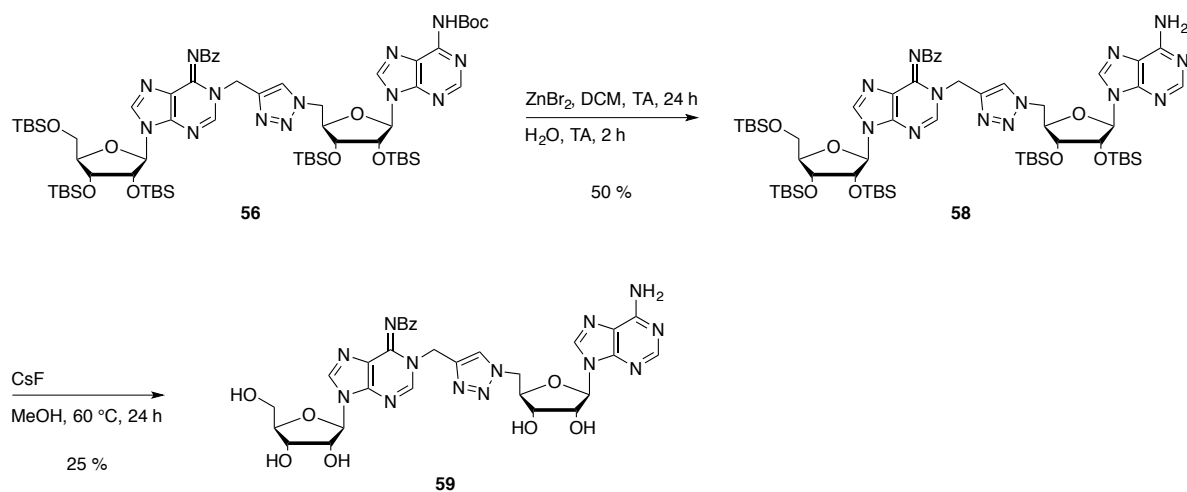


Schéma 68 : Déprotection du composé **56**.

## 5. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre nous avons synthétisé des analogues de type bisubstrats possédant un espaceur triazole 1,4-disubstitué (Figure 47).

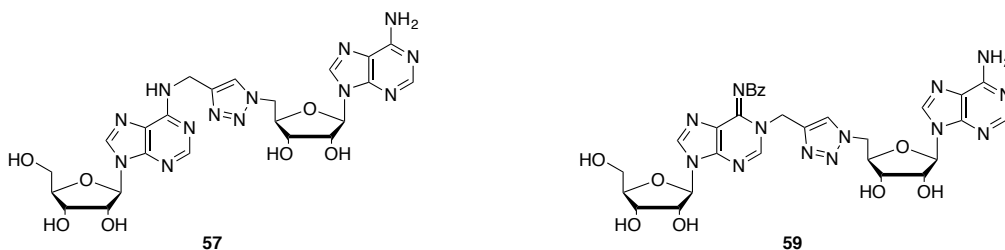


Figure 47 : Deux conjugué synthétisés.

Cette synthèse nous a permis de modifier le lien entre les deux fragments SAM et adénosine de nos conjugués. Nous avons également exploré une substitution en position N1 de la base nucléique qui est en général assez délicate du fait de l'existence de réarrangement.

Durant ce travail, une nouvelle réaction d'alkylation a été réalisé pour l'introduction d'un motif propargylique en position N6 et N1 d'une adénosine. De plus, nous avons décrit la première réaction de cycloaddition de Huisgen en position N1 d'une adénosine.



La déprotection complète du bissubstrat branché en N1 n'a pas pu être effectuée. En revanche une déprotection partielle a été possible. Par la suite d'autres essais de déprotection en milieu anhydre seront tentés ou alors, un autre groupement protecteur pour l'amine exocyclique sera envisagé. Le groupement acétyle pourrait être une bonne alternative comme décrit par le groupe de Mikhailov.<sup>241</sup>

En perspective, la synthèse d'analogues de type bissubstrat portant un lien triazole 1,5-disubstitués permettrait de varier la distance entre les deux fragments de la molécule. On peut aussi envisager la synthèse d'un triazole 1,4,5-trisubstitué portant le bras acide aminé qui a été omis dans les molécules **57** et **59**.<sup>242</sup>

Enfin, nous savons qu'il est possible de post-fonctionnaliser des ARN par la réaction de cycloaddition de Huisgen-Schäppl.<sup>243</sup> Les dérivés alcynes pourraient être incorporés dans un oligoribonucléotide pour réaliser une fonctionnalisation avec le motif analogue de SAM.

De plus, nous avons réussi à alkyler la position N1 de l'adénosine. Nous avons donc des conjugués SAM-adénosine mimant l'état de transition du transfert de méthyle sur la position N1 de l'adénosine d'ARN. Nous envisageons de développer une famille de conjugués pour l'étude de MTases catalysant la m<sup>1</sup>A sur l'ARN.

---

<sup>241</sup> V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499

<sup>242</sup> a) F. Wei, W. Wang, Y. Ma, C. Tung, Z. Xu, *Chem Commun* **2016**, *52*, 14188-14199 ; b) S. Ferrini, J. Z. Chandanshive, S. Lena, M. C. Franchini, G. Giannini, A. Tafi, M. Taddei, *J Org Chem* **2015**, *80*, 2562-2572

<sup>243</sup> V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599

## Chapitre IV



## Chapitre IV : Résultats des études structurales

### 1. Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons synthétisé des analogues de bisubstrats de méthyltransférases d'ARN responsables de la méthylation d'adénosine en position N6. Pour rappel, ces analogues ont été conçus en liant par différents bras espaceurs des analogues du cofacteur SAM à l'adénosine, nucléotide modifié par l'enzyme (Figure 48).

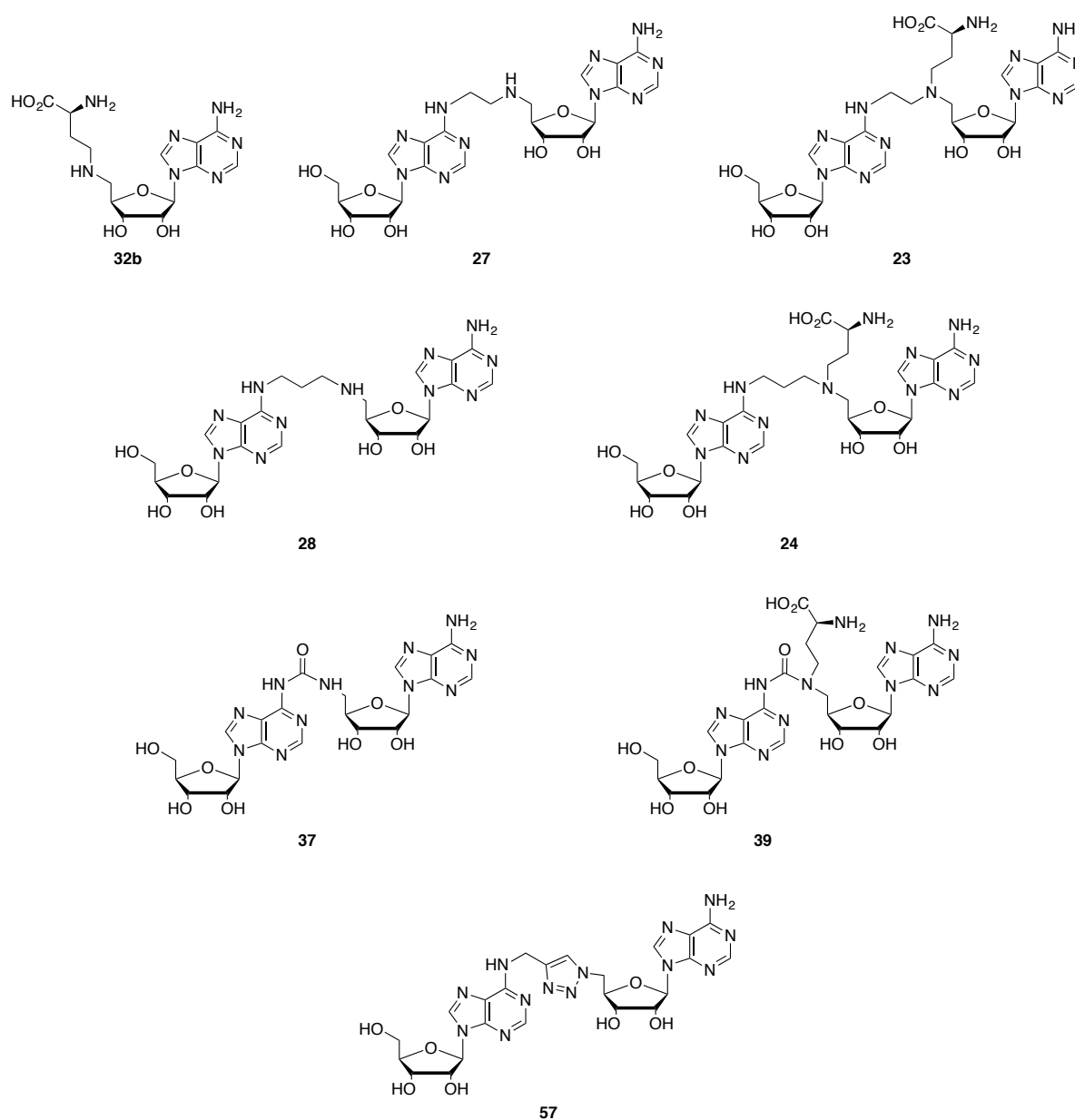


Figure 48 : Bisubstrats des m<sup>6</sup>A MTases synthétisés dans ce travail.

Parmi les m<sup>6</sup>A méthyltransférases, RlmJ méthyle la position A2030 de la sous-unité 23S de l'ARN ribosomique d'*E. coli*. La modification de cette position semble impliquer dans la stabilité de l'ARNr.<sup>243</sup>

Nous présentons ici les résultats des études structurales et d'interactions obtenus par l'équipe de C. Tisné (IBPC-UMR 8261 CNRS/Paris Diderot) avec nos composés en présence de la méthyltransférase ribosomale RlmJ. Pour comprendre ces résultats, je ferais tout d'abord un rappel succinct d'une méthode utilisées : la méthode DSF.

## 2. Études d'interactions RlmJ/bisubstrats

### 2.1. La méthode DSF

Le DSF (Differential Scanning Fluorimetry) est une méthode qui permet d'identifier des ligands de bas poids moléculaire liés à une protéine en induisant un effet de stabilisation de la protéine testée. Elle permet de suivre en temps réel la dénaturation d'une protéine en présence d'un fluorophore et du ligand à tester (Figure 49).<sup>244</sup>

La fluorescence du fluorophore est quenchée en milieu aqueux et est forte en milieu apolaire, tel que dans les poches hydrophobes d'une protéine dénaturée. Au début de l'expérience, les protéines sont stables en solution et le fluorophore a une fluorescence faible. Lorsque la température augmente, les protéines vont se dénaturer progressivement et le fluorophore va pouvoir entrer en interaction avec des sites hydrophobes des protéines. La fluorescence va donc augmenter.

---

<sup>243</sup> A. S. Punekar, J. Liljeruhm, T. R. Shepherd, A.C. Forster, M. Selmer, *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, 9537-9548

<sup>244</sup> F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nature Protocoles* **2007**, *2*, 2212-2221

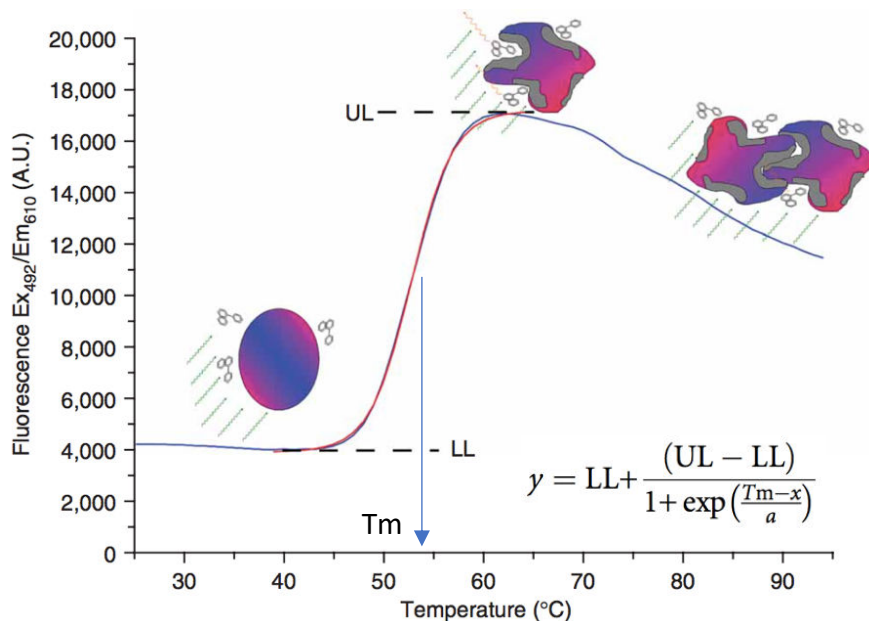


Figure 49 : Enregistrement type de la fluorescence en fonction de la température lors de la dénaturation d'une protéine en présence d'un fluorophore. Encart : équation de Boltzmann.<sup>243</sup>

L'intensité de la fluorescence est mesurée en fonction de la température, ce qui génère une courbe de transition sigmoïdale comme on peut le voir sur la figure 49. Le point d'inflexion de la courbe de transition est calculé par l'équation de Boltzmann et permet d'obtenir le  $T_m$  de la protéine. Le  $T_m$  représente la température à laquelle la concentration en protéines repliées est égale à la concentration en protéines dénaturées. LL et UL sont les valeurs minimum et maximum d'intensité et  $a$  représente la pente de la courbe.

En présence d'un ligand, si celui-ci se lie suffisamment à la protéine, il peut induire une stabilisation de la structure de la protéine et ainsi augmenter son  $T_m$ .

## 2.2. Résultats

La stabilisation de RlmJ en présence de nos bisubstrats ainsi que de l'analogue de SAH **32b** a été évaluée par DSF. Le cofacteur SAM, le sous-produit de la réaction de méthylation la SAH et le pan-inhibiteur de MTases, la sinefungine (Sin), ont également été testés (Figure 50).

### *E. coli*. RlmJ

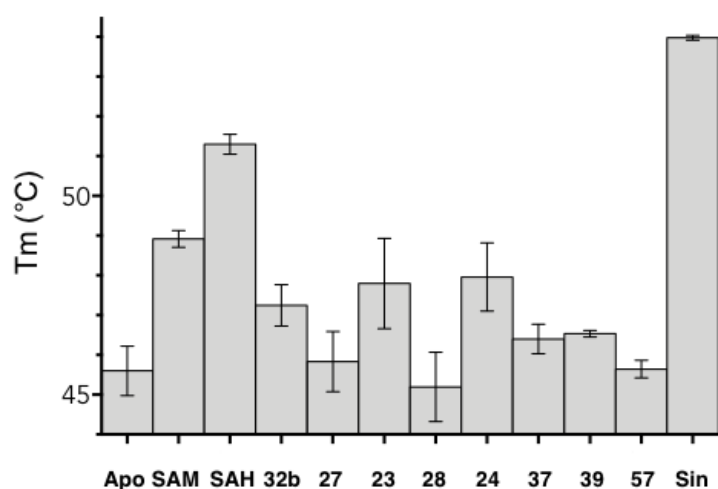


Figure 50 : Détermination du Tm de RlmJ en présence des molécules d'intérêt.

Tout d'abord, la SAM, la SAH et la sinefungine induisent une augmentation du Tm en comparaison à l'apoenzyme avec des valeurs respectives de  $\Delta T_m$  de  $3.32 \pm 0.13$  °C,  $5.70 \pm 0.13$  °C et  $8.38 \pm 0.12$  °C respectivement. Parmi ces trois molécules, la sinefungine est le meilleur ligand de RlmJ avec le  $\Delta T_m$  le plus important. Ce résultat confirme l'interaction des trois composés à l'enzyme.

Pour les huit autres composés nouvellement synthétisés, les expériences donnent des valeurs de Tm supérieures à celle de l'apoenzyme pour 3 molécules : **32b**, **23** et **24**. Les  $\Delta T_m$  sont respectivement de  $1.65 \pm 0.15$  °C,  $2.20 \pm 0.18$  °C et  $2.36 \pm 0.17$  °C. Ces valeurs restent cependant inférieures à celles de la SAM, la SAH et la sinefungine. A l'inverse, les molécules **27**, **28**, **37**, **39** et **57** ont un  $\Delta T_m$  faible par rapport à celui de l'apoenzyme. Ces molécules ne stabilisent donc pas significativement l'enzyme.

Les composés portant le motif acide aminé (SAH, SAM, sinefungine, **32b**, **23**, **24**) ont de façon générale une valeur de  $\Delta T_m$  positive. On peut en déduire que cette partie des bisubstrats est importante pour l'interaction avec l'enzyme. La molécule **32b** est structuralement très proche de la SAH, le soufre étant remplacé par une amine secondaire. Ce changement provoque une diminution significative du  $\Delta T_m$  ce qui souligne l'importance de l'atome de soufre pour la reconnaissance du cofacteur.

Parmi les composés que j'ai synthétisés, les molécules **23** et **24** ont induit la variation la plus importante de T<sub>m</sub>. Ils ont donc été choisis pour poursuivre les études structurales.

### 3. Études structurales du complexe RlmJ:Bisubstrat **24**

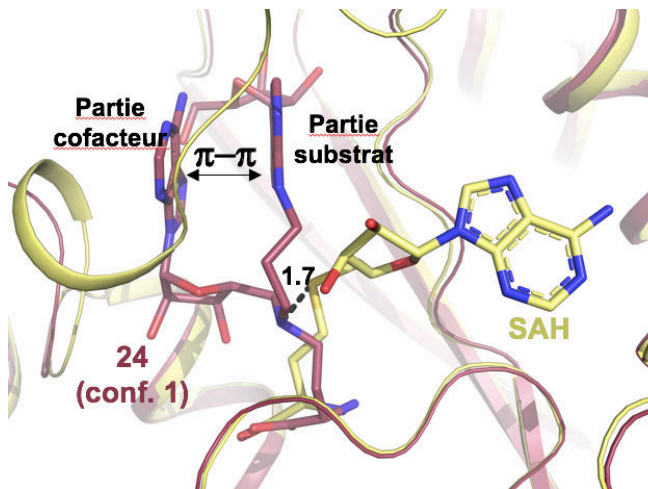
Une structure cristallographique du complexe RlmJ/Conjugué **24** a été obtenue (Figures 51 et 52). Dans cette structure, nous observons 4 molécules de RlmJ dans l'unité asymétrique. Deux protéines comportent le dérivé **24** dans leur site actif. Nous avons observé que notre bisubstrat **24** se place au site actif dans deux conformations différentes que nous appellerons conformations **24**(1) et **24**(2).

#### 3.1. La conformation (1) du conjugué **24** au site actif

La conformation (1) au site actif présente une structure repliée de la molécule **24** (Figure 51 A). Les deux motifs adénines de la molécule entrent en interaction par  $\pi$ - $\pi$  stacking. Ces interactions imposent un repliement de la molécule au sein de l'enzyme et les adénosines se retrouvent toutes les deux dans la poche du substrat. Ceci induit un déplacement de l'atome d'azote en 5' de 1.7 Å par rapport à l'atome de soufre de SAH. L'atome d'azote se retrouve ainsi en dehors du site de fixation du cofacteur. La partie mimant le cofacteur SAM de **24** établit des liaisons hydrogène avec les résidus K18, H19, H42 et D164 de la MTase (Figure 51B).



A



B

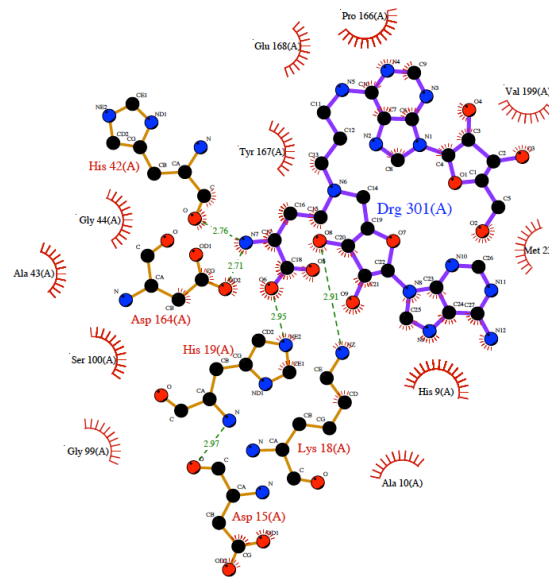


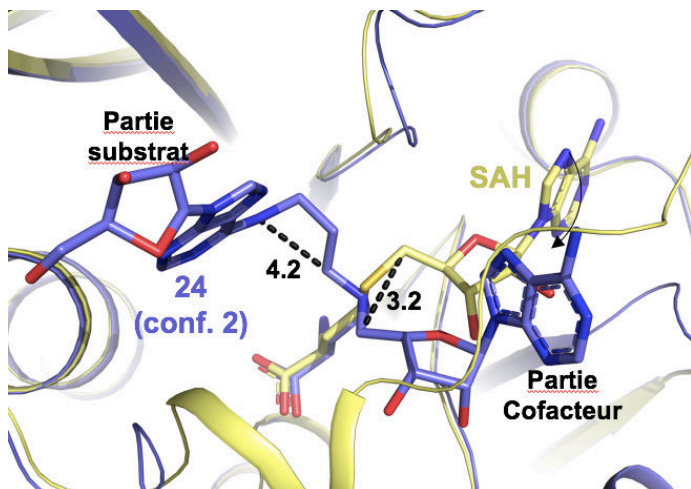
Figure 51 : A. Superposition des complexes RlmJ:**24**(1) (rouge), et du complexe RlmJ:SAH (jaune). B. Carte des interactions au site catalytique de RlmJ en présence de **24**(1).

### 3.2. La conformation (2) du conjugué **24** au site actif

La molécule **24** au sein du deuxième complexe présente une conformation plus étendue de la molécule (Figure 52A). L'atome d'azote porté en 5' par la partie mimant le cofacteur de **24** possède une configuration absolue bloquée (R) (la configuration du soufre pour le cofacteur SAM est (S)). Le motif acide aminé de **24** occupe le même site de fixation au site actif que le motif correspondant de la SAH. Cependant, nous pensons qu'en raison de la configuration inversée de l'atome d'azote, comparé à celui de la SAM, le motif adénosine de la partie cofacteur de **24** est positionné en dehors de la poche du cofacteur par une rotation de 121°.

Dans ce complexe, K18 établit une liaison hydrogène avec les atomes N1 et N6 de l'adénine du substrat (Figure 52B). K18 est stabilisée par le résidu catalytique D164 qui forme aussi une liaison hydrogène avec l'atome N6. La liaison entre K18 et D164 augmente la densité électronique de l'atome N6 de la base et positionne le doublet non liant de l'atome d'azote pour la catalyse du transfert de méthyle. Les résidus K18 et D164 contribuent ainsi à l'activation du nucléophile. Ici, l'atome N6 est situé à 2.8 Å du carbone mimant le méthyle de la SAM. Distance à laquelle le transfert direct du méthyle est possible. Ces résultats semblent indiquer que l'adénosine se fixe dans la poche de liaison à l'ARN.

A.



B.

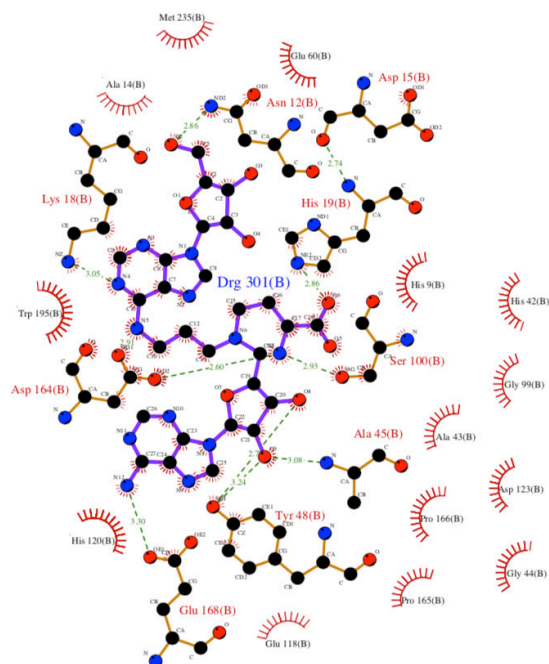


Figure 52 : A. Superposition des complexe RlmJ:**24**(2) (bleu), et complexe RlmJ:SAH (jaune). B. Carte des interactions au site catalytique de RlmJ en présence de **24**(2).

#### 4. Conclusion

L'étude d'interaction par DSF nous a permis d'identifier 3 molécules capables d'interagir avec RlmJ. Parmi celles-ci, on trouve les bisubstrats contenant la partie mime de la méthionine et une chaîne alkyle comme espaceur. Enfin, l'analogue de SAH, **32b**, possédant un atome d'azote à la place du soufre interagit également avec l'enzyme.

Dans un deuxième temps, nous avons obtenu la première structure cristallographique entre RlmJ et le bisubstrat dont le linker contient 3 atomes de carbone. Ce résultat nous ouvre des perspectives favorables pour la co-cristallisation de bisubstrats comportant des oligonucléotides comme mimes de l'ARN.



## Conclusion générale



## Conclusion générale et perspectives

Les ARN jouent un rôle central dans le fonctionnement d'une cellule. Ils participent à la synthèse de protéines, au processus de maturation des ARN, à la régulation de l'expression des gènes ou encore au transport de protéines. Chaque ARN subit des modifications post-transcriptionnelles indispensables à son bon fonctionnement. La diversité chimique établie par les nucléosides canoniques n'est pas suffisante pour expliquer la diversité des rôles des ARN. Les modifications chimiques de ces macromolécules constituent un niveau supplémentaire d'informations pour la fonction des ARN.

La méthylation est la modification la plus répandue sur les molécules d'ARN. Cette modification est catalysée par les MTases qui transfèrent le groupement méthyle du cofacteur SAM vers leurs substrats. La méthylation en position N6 d'une adénosine a récemment suscité une grande attention en raison de sa régulation dynamique. Les RNMT responsables de cette méthylation représentent des cibles potentielles intéressantes encore peu étudiées. En effet, si de nombreux outils moléculaires analogues de SAM/SAH ont été développés pour les MTases, une seule étude a été consacrée aux m<sup>6</sup>A RNMT. Dans ce contexte, nous avons cherché à développer des outils pour l'étude structurale des RNMT responsables de la méthylation m<sup>6</sup>A.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a porté sur le développement de voies de synthèses pour l'obtention de quatre familles d'analogues de bisubstrats mimant l'état de transition de la réaction de méthylation en position N6 d'une adénosine.

Dans un premier temps, j'ai décrit la synthèse de deux séries de conjugués SAM-adénosine (Figure 53). Tout d'abord, des conjugués comportant des chaînes alkyles à 2 et 3 carbones ont été synthétisés par réaction de S<sub>N</sub>Ar en position C6 d'un dérivé d'inosine activée. Puis des conjugués portant un espaceur plus court, de type urée, ont été obtenus. La synthèse d'un nouveau carbamate isopropényle intermédiaire a conduit efficacement à la formation d'urée en position C6 de l'adénosine.

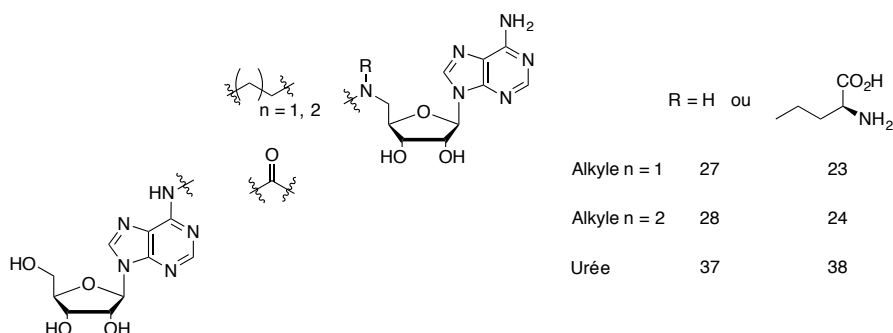


Figure 53 : Les 6 conjugués SAM-adénosine synthétisés à liens alkyles et urée.

Dans le chapitre II, l'objectif était de synthétiser des conjugués SAM-ARN et d'obtenir un mime du substrat ARN de taille et de séquence variable. Une méthode de post-fonctionnalisation d'oligoribonucléotide a alors été explorée. Un dinucléotide modèle a été fonctionnalisé avec succès par une amine simple (Figure 54). L'application de cette méthode pour fonctionnaliser un dinucléotide d'ARN par un analogue de SAM est en cours au laboratoire.

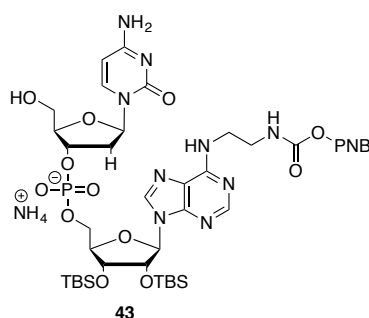


Figure 54 : Dinucléotide fonctionnalisé.

Ces dinucléotides ont nécessité la synthèse d'une O<sup>6</sup>-benzotriazolyl-inosine : un nucléoside convertible qui a permis la fonctionnalisation par une amine primaire. Le phosphoramidite correspondant a également été préparé.

Dans le chapitre III, la synthèse de deux conjugués possédant un espaceur triazole 1,4-disubstitué est décrite. La réaction de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (I) a conduit à la formation en une étape des deux nouvelles structures (Figure 55).

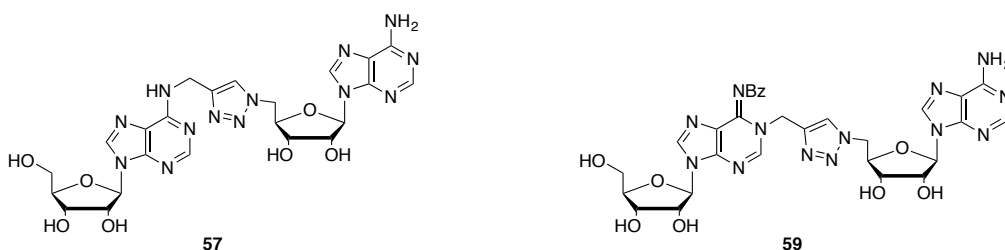


Figure 55 : Conjugués à lien triazole 1,4-disubstitué.

L'adénosine analogue de substrat ARN a pu être fonctionnalisée en position N1 et N6 par une nouvelle réaction d'alkylation pour l'introduction de la fonction propargylique. Puis, l'application de la chimie click à nos composés a permis d'élargir la diversité structurale de nos conjugés. De plus, nous avons décrit la première réaction de cycloaddition de Huisgen-Sharpless en position N1 d'une adénosine.

La déprotection du groupement benzoyle sur le bissubstrat branché en N1 n'a pas pu être effectuée. D'autres méthodes de déprotection sont actuellement à l'étude au laboratoire. D'autre part, une méthode alternative de protection est envisagée.

Dans le dernier chapitre, nous présentons les résultats des études structurales réalisées par nos collaborateurs sur la RNMT RlmJ. Le DSF a été utilisée dans un premier temps pour étudier la stabilisation de l'enzyme RlmJ induite par les différents composés testés. La SAH et la sinefungine qui sont des pan-inhibiteurs connus de MTases ont servi de point de comparaison dans ces mesures. On a pu observer que la présence du motif acide aminé améliore les interactions enzyme-bissubstrat. De plus, ce sont les conjugés à lien alkyle **23** et **24** (Figure 56) qui présentent les meilleures interactions avec l'enzyme avec des  $T_m$  supérieurs. Ces molécules ont alors été choisies pour effectuer des études de cristallographie.

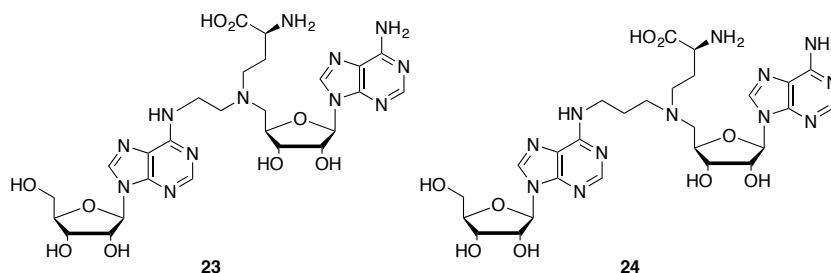


Figure 56 : Bisubstrats à lien alkyles **23** et **24**.



La première structure cristallographique de RlmJ en complexe avec un bisubstrat, la molécule **24**, a été obtenue. Deux conformations de la molécule au site actif de l'enzyme ont été observées. La conformation (2) confirme un mode de fixation de type bisubstrat de notre molécule.

En perspective, nous envisageons d'explorer de nouveaux espaceurs entre les deux fragments du conjugué pour augmenter la diversité chimique de nos analogues. Ainsi, des bisubstrats comportant des liens de type éther ou thioéther en position 5' de l'analogue de SAM en alternative aux amines ou des fonctions amide et squarate pourront être synthétisés.

En ce qui concerne les oligonucléotides, nos différents analogues de SAM seront introduits sur des penta-oligonucléotides synthétisés par synthèse sur support solide. Ici, la séquence sera choisie en fonction de la RNMT étudiée et sera dérivée de la séquence consensus RRACH où R = A ou G et H = A, C ou U.

Enfin, nous envisageons la synthèse de conjugués avec un lien triazole 1,5-disubstitué pour varier la distance entre les deux fragments. Une autre perspective est la synthèse d'un triazole 1,4,5-trisubstitué portant le bras acide aminé qui a été omis dans les molécules à lien triazole décrites dans ce travail. De plus, les dérivés alcynes pourront être incorporés dans un oligoribonucléotide qui pourra être post-fonctionnalisé par chimie click.

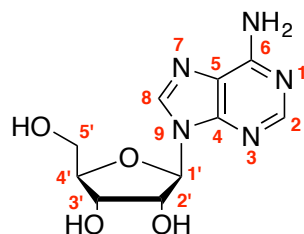
## Partie expérimentale



## Partie expérimentale

**General experimental methods:** Unless otherwise specified, materials were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Reagents and solvents were dried using standard methods and distilled before use. TLC: precoated silica gel thin layer sheets 60 F254 (Merck) and detection by UV lamp or if needed by charring with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol followed by heating. Flash chromatography: silica gel 60 Å, 180–240 mesh from Merck. Spectra were recorded using Bruker spectrometers ARX 250 for <sup>1</sup>H (250.13 MHz) and <sup>13</sup>C (62.89 MHz) and Bruker Avance II for <sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C (125 MHz). Chemical shifts (δ) are expressed in ppm relative to residual CHCl<sub>3</sub> (δ 7.26), CD<sub>3</sub>OD (δ 3.31) or D<sub>2</sub>O (δ 4.79) for <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub> (δ 77.16) or CD<sub>3</sub>OD (δ 49.00) for <sup>13</sup>C as internal references. Signals were assigned based on COSY, HSQC and when needed HMBC (<sup>13</sup>C). Mass spectra (MS) were recorded with an ion trap mass analyzer under electrospray ionization (ESI) in positive ionization (unless specified otherwise) mode detection. High-resolution mass spectroscopy (HRMS) was recorded using a Bruker micrOTOF spectrometer. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a HPLC system with a reverse phase C-18 column (250 mm × 21.2 mm; NUCLEOSIL C18; Macherey-Nagel) using a solvent system consisting of 50 mM aqueous NH<sub>4</sub>OAc–CH<sub>3</sub>CN (linear gradient from 100 : 0 to 0 : 100 in 30 min) at a flow rate of 15 mL.min<sup>-1</sup> and UV detection at 254 nm.

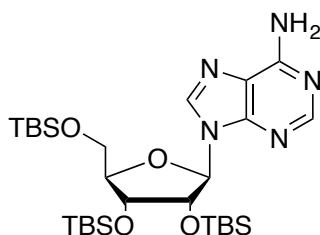
Characterizations of the synthesized compounds are indicated according to the following numbering of atoms :



Adenosine derivatives

**9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-amine (1)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 610.03 g.mol<sup>-1</sup>

To a solution of adenosine (3.0 g, 11.2 mmol, 1 eq) and imidazole (3.82 g, 56.1 mmol, 5 eq) in DMF (56 mL) was added TBDMSCl (6.76 g, 44.9 mmol, 4 eq) at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 2 days. DMF was evaporated and the residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic phase was washed 5 times with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired compound **1** as a white foam (6.3 g, 92 %).

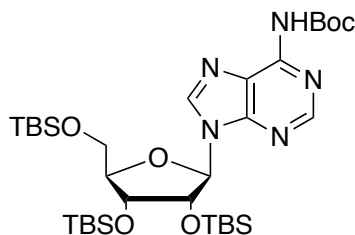
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.34 (s, 1H, H2 or H8), 8.15 (s, 1H, H2 or H8), 6.02 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H1'), 5.75 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.70-4.69 (m, 1H, H2'), 4.33-4.31 (m, 1H, H3'), 4.14-4.11 (m, 1H, H4'), 4.03 (dd, *J* = 4.3 and 11.4 Hz, 1H, H5'a), 3.79 (dd, *J* = 2.9 and 11.4 Hz, 1H, H5'b), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.79 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.22 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.5 (C6), 153.0 (C2 or C8), 150.1 (C4), 139.8 (C2 or C8), 120.2 (C5), 88.4 (C1'), 85.6 (C4'), 75.9 (C2'), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 610.3640; found: 610.3625.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (2)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>33</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 710.15 g.mol<sup>-1</sup>

Adenosine **1** (6.24 g, 10.23 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (102 mL) and Boc<sub>2</sub>O (6.70 g, 30.69 mmol, 3 eq) and DMAP (250.4 mg, 2.05 mmol, 0.2 eq) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude was dissolved in methanol (79 mL) and a solution of methylamine 40 % wt. in H<sub>2</sub>O (3.54 mL, 40.92 mmol, 4 eq) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature then concentrated and purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 7:3) to provide the desired compound **2** as a white foam (7.80 g, quantitative yield).

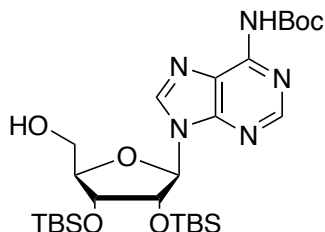
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.73 (s, 1H, H2 or H8), 8.30 (s, 1H, H2 or H8), 8.00 (s, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 6.07 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1'), 4.66-4.64 (m, 1H, H2'), 4.29 (m, 1H, H3'), 4.14-4.12 (m, 1H, H4'), 4.01 (dd, *J* = 4.0, 11.4 Hz, 1H, H5'), 3.79 (dd, *J* = 2.7, 11.4 Hz, 1H, H5'), 1.55 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.14 (m, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (m, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.29 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.9 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 149.7 (Cq), 149.6 (Cq), 141.3 (C2 or C8), 122.0 (C5), 88.3 (C1'), 85.7 (C4'), 82.1 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 76.0 (C2'), 72.0 (C3'), 62.5 (C5'), 28.1 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.6 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.5 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>33</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 710.4164; found: 710.4157.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran -2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**3**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>27</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 595.89 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **2** (1.89 g, 2.67 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (27 mL). Aqueous TFA 1:1 (10.2 mL, 133.5 mmol, 50 eq of TFA) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired adenosine **3** as a white foam (1.46 g, 91 %).

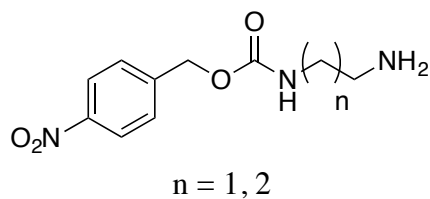
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.73 (s, 1H, H2 or H8), 8.06 (s, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 7.95 (s, 1H, H2 or H8), 6.18 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, OH), 5.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H1'), 5.03-5.01 (m, 1H, H2'), 4.32 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H3'), 4.16 (s, 1H, H4'), 3.96-3.93 (m, 1H, H5'), 3.73-3.68 (m, 1H, H5'), 1.56 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.72 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.16 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.67 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.6 (C2 or C8), 150.8 (Cq), 149.7 (Cq), 149.4 (Cq), 142.9 (C2 or C8), 123.4 (C5), 91.2 (C1'), 89.8 (C4'), 82.7 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 74.1 (C2'), 74.0 (C3'), 63.1 (C5'), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.7 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 596.3300; found: 596.3293.

## Mono-protection of diamines: General procedure<sup>1</sup>

---



The diamine (5 eq) was dissolved in DCM (5.2 mL/mmol) then 4-nitrobenzyl chloroformate (1 eq) was added dropwise in DCM (5.2 mL/mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 1 h 30 at 0 °C then overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered through celite and evaporated. A work up was performed with DCM and brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 50:50:1.5) to afford the desired compounds.

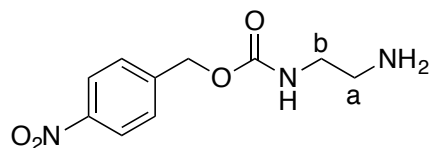
---

<sup>1</sup> S. Picard, M. Le Roch, J. Renault, P. Uriac, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4711-4714.



#### 4-Nitrobenzyl (2-aminoethyl)carbamate (4)

---



**Chemical Formula:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
**Molecular Weight:** 239.23 g.mol<sup>-1</sup>

The product **4** (1.42 g, 85 %) was obtained from ethylenediamine (2.32 mL, 34.79 mmol, 5 eq), and 4-nitrobenzyl chloroformate (1.5 g, 6.95 mmol, 1 eq) as a yellow powder.

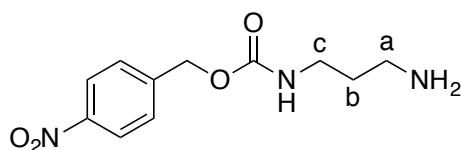
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.29 (bs, 1H, NH), 5.19 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.27-3.24 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 2.84 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 1.18 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 156.2 (C=O), 147.7 (C<sub>q</sub>), 144.2 (C<sub>q</sub>), 128.2 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.8 (2C, C<sup>Ar</sup>), 65.2 (CH<sub>2</sub>O), 43.9 (C<sub>b</sub>), 41.6 (C<sub>a</sub>).

**HRMS:** calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 240.0984; found: 240.0986.

#### 4-Nitrobenzyl (3-aminopropyl)carbamate (**5**)

---



**Chemical Formula:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
**Molecular Weight:** 253,25 g.mol<sup>-1</sup>

The product **5** (910 mg, 70 %) was obtained from 1,3-diaminopropane (2.13 mL, 25.51 mmol, 5 eq), and 4-nitrobenzyl chloroformate (1.1 g, 5.10 mmol, 1 eq) as a yellow oil.

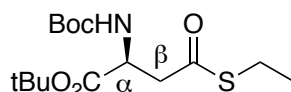
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.63 (bs, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.33-3.29 (m, 2H, H<sub>c</sub>), 2.80 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 1.67-1.62 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 1.39 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 156.1 (C=O), 147.7 (C<sub>q</sub>), 144.3 (C<sub>q</sub>), 128.2 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.8 (2C, C<sup>Ar</sup>), 65.1 (CH<sub>2</sub>O), 40.1 (C<sub>a</sub>), 39.7 (C<sub>c</sub>), 32.7 (C<sub>b</sub>).

**MS:** calcd for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 254.11; found: 254.13.

***tert*-Butyl (*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-(ethylthio)-4-oxobutanoate (**6**)<sup>2</sup>**

---



**Chemical Formula:** C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>S  
**Molecular Weight:** 333,4430 g.mol<sup>-1</sup>

Boc-Asp-OtBu (3.00 g, 10.37 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM (20 mL). DCC (2.57 g, 12.44 mmol, 1.2 eq), ethanethiol (2.30 mL, 31.11 mmol, 3 eq), and DMAP (253 mg, 2.074 mmol, 0.2 eq) were added and the reaction was stirred at room temperature for 5 h. The mixture was then filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 7:3) to provide the desired compound **6** as a translucent oil (3.21 g, 93 %).

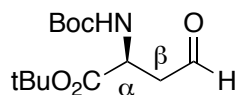
**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5.43-5.39 (m, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 4.45-4.38 (m, 1H, H<sub>α</sub>), 3.15 (dd, *J* = 4.7, 16.3 Hz, 1H, H<sub>β</sub>), 3.03 (dd, *J* = 4.6, 16.2 Hz, 1H, H<sub>β</sub>), 2.93-2.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 1.45 (s, 9H, *t*Bu), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.25 (t, *J* = 14.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

---

<sup>2</sup> G. Hobley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 3079-3082

***tert*-butyl (S)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-4-oxobutanoate (7)<sup>3</sup>**

---



**Chemical Formula:** C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>  
**Molecular Weight:** 273,32 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **6** (3.11 g, 9.32 mmol, 1 eq) and Pd/C 10 % (199 mg, 0.186 mmol, 0.02 eq) were dissolved in DCM (26 mL). The reaction was cooled down at 15 to 20 °C and triethylsilane (4.5 mL, 27.98 mmol, 3 eq) was added. The reaction was kept at 15 to 20 °C for 20 min and stirred 2 additional hours at room temperature. The reaction was filtered through a celite pad and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Pentane/EtOAc 6:4) to provide the desired aldehyde **7** as a translucent solid (2.28 g, 89 %).

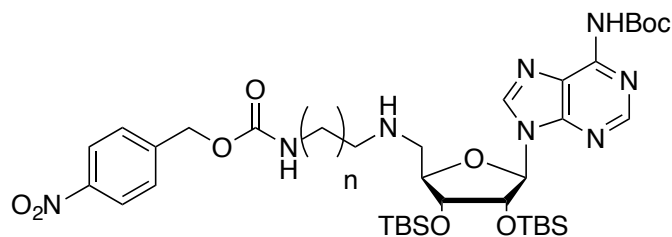
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.73 (s, 1H, CHO), 5.36-5.33 (m, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 4.51-4.44 (m, 1H, H<sub>α</sub>), 2.99-2.94 (m, 2H, H<sub>β</sub>), 1.45 (s, 9H, *t*Bu), 1.43 (s, 9H, *t*Bu).

---

<sup>3</sup> G. Hobley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, 22, 3079-3082

## Formation of the secondary amines: General procedure

---

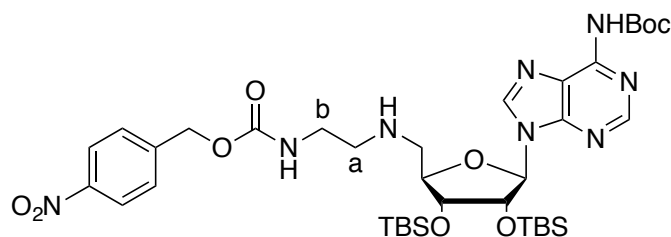


$$n = 1, 2$$

The alcohol **3** (1 eq) was dissolved in DCM (12 mL/mmol). Dess Martin periodinane (1.2 eq) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was filtered through celite and concentrated. The crude was dissolved in MeOH (4.4 mL/mmol) and the appropriate amine **4** or **5** (1.5 eq) was added. NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 eq) and acetic acid (1 eq) were then added and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction medium was diluted with ethyl acetate and washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 3:7) to afford the desired compound as white foams.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-(((2-(((4-nitrobenzyl)oxy) carbonyl)amino)ethyl)amino)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**8**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>37</sub>H<sub>60</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 817.10 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **8** (280 mg, 54%) was obtained from the adenosine **3** (375 mg, 0.629 mmol, 1 eq), and the amine **4** (225 mg, 0.943 mmol, 1.5 eq).

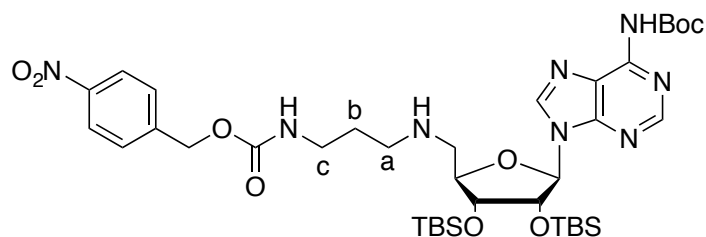
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.69 (s, 1H, H2 or H8), 8.18 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H<sup>Ar</sup>), 8.06 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 7.98 (s, 1H, H2 or H8), 7.47 (d, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.83 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H1'), 5.33 (bs, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 5.08-5.06 (m, 1H, H2'), 4.22-4.19 (m, 2H, H3' and H4'), 3.40-3.29 (m, 2H, Hb), 2.97-2.90 (m, 2H, H5'), 2.89-2.84 (m, 1H, Ha), 2.80-2.76 (m, 1H, Ha), 1.56 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.16 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.48 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 156.0 (C=O), 152.7 (C2 or C8), 150.5 (Cq), 150.3 (Cq), 149.6 (Cq), 147.7 (Cq), 144.1 (Cq), 142.9 (C2 or C8), 128.3 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.8 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.0 (C5), 90.2 (C1'), 86.0 (C4'), 82.5 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 74.0 (C3'), 73.6 (C2'), 65.2 (CH<sub>2</sub>O), 50.9 (C5'), 49.0 (Ca), 40.9 (Cb), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 817.4100; found: 817.4105.

***tert*- Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-(((3-(((4-nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)propyl)amino)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (9)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>38</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 831.13 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **9** (1.04 g, 48%) was obtained from the adenosine **3** (1.5 g, 2.6 mmol, 1 eq), and the amine **5** (987 mg, 3.9 mmol, 1.5 eq).

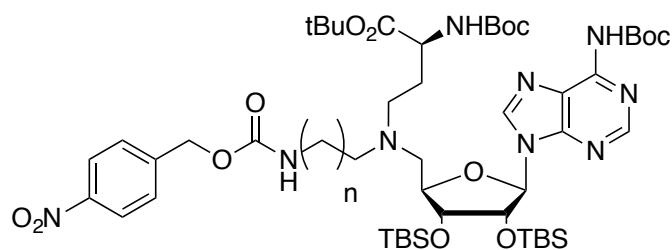
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.68 (s, 1H, H2 or H8), 8.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 8.10 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 8.01 (s, 1H, H2 or H8), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.83 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H1'), 5.54 (bs, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 5.04-5.02 (m, 1H, H2'), 4.22-4.20 (m, 2H, H3' and H4'), 3.32-3.28 (m, 2H, Hc), 2.92-2.91 (m, 2H, H5'), 2.79-2.75 (m, 1H, Ha), 2.72-2.67 (m, 1H, Ha), 1.73-1.71 (m, 2H, Hb), 1.55 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.47 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.9 (C=O), 152.6 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.3 (Cq), 149.6 (Cq), 147.6 (Cq), 144.4 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 128.2 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.8 (2C, C<sup>Ar</sup>), 122.9 (Cq), 90.1 (C1'), 85.8 (C4'), 82.4 (Cq<sup>Boc</sup>), 73.9 (C3'), 73.7 (C2'), 65.0 (CH<sub>2</sub>O), 51.5 (C5'), 48.0 (Ca), 40.0 (Cc), 29.7 (Cb), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>38</sub>H<sub>63</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 831.4257; found: 831.4234.

## Formation of the tertiary amines: General procedure

---

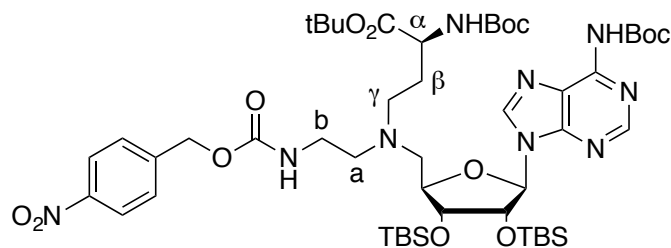


The secondary amine **8** or **9** (1.1 eq) was dissolved in MeOH (3.4 mL/mmol). The aldehyde **7** (1eq), NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 eq) and acetic acid (1 eq) were added to the solution at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated and a work up was performed with ethyl acetate and a saturated solution of aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 6:4) to afford the desired compounds as white foams.



***tert*-Butyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)(2-(((4-nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)butanoate (**10**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>50</sub>H<sub>83</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 1074.43 g.mol<sup>-1</sup>

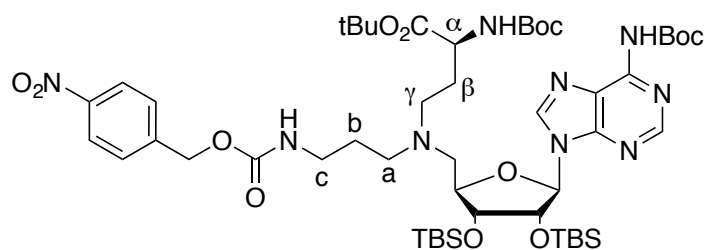
The compound **10** (454 mg, 90%) was obtained from the adenosine **8** (505 mg, 0.618 mmol, 1.1 eq), and the aldehyde **7** (154 mg, 0.562 mmol, 1 eq).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.67 (s, 1H, H2 or H8), 8.24 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 8.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.99 (s, 1H, H2 or H8), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.83 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H1'), 5.67 (bs, 1H, NH), 5.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.10-5.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.94 (s, 1H, H2'), 4.17 (m, 2H, H<sub>α</sub> and H4'), 4.0 (m, 1H, H3'), 3.17 (bs, 2H, H<sub>b</sub>), 2.93-2.81 (m, 2H, H5'), 2.66-2.57 (m, 4H, H<sub>a</sub> and H<sub>γ</sub>), 1.91-1.87 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.66-1.62 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.51 (s, 9H, *t*Bu), 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 1.35 (s, 9H, *t*Bu), 0.88 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.35 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.9 (C=O), 156.0 (C=O), 155.6 (C=O), 152.9 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 147.6 (Cq), 144.5 (Cq), 142.4 (C2 or C8), 128.1 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.7 (2C, C<sup>Ar</sup>), 122.8 (Cq), 90.1 (C1'), 83.7 (C4'), 82.4 (Cq, *t*Bu), 82.0 (Cq, *t*Bu), 79.8 (Cq, *t*Bu), 74.4 (C3'), 73.7 (C2'), 64.9 (CH<sub>2</sub>O), 56.5 (C5'), 54.0 (Ca or C<sub>γ</sub>), 52.8 (C<sub>α</sub>), 50.7 (Ca or C<sub>γ</sub>), 39.1 (Cb), 29.8 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3C, *t*Bu), 28.2 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>50</sub>H<sub>84</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1074.5727; found: 1074.5749.

***tert*-Butyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-((((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)(3-((((4-nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)propyl)amino)butanoate (**11**)**



**Chemical Formula:** C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 1088.46 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **11** (430 mg, 71%) was obtained from the adenosine **9** (506 mg, 0.609 mmol, 1.1 eq), and the aldehyde **7** (152 mg, 0.554 mmol, 1 eq).

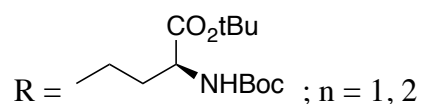
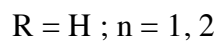
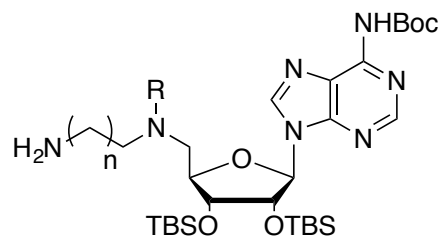
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.71 (s, 1H, H2 or H8), 8.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.96 (s, 1H, H2 or H8), 7.84 (s, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 7.44-7.42 (d, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.86-5.85 (m, 1H, H1'), 5.81 (bs, 1H, NH), 5.55 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 5.14-5.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.99 (s, 1H, H2'), 4.24-4.20 (m, 2H, H<sub>α</sub> and H4'), 4.09 (m, 1H, H3'), 3.22-3.19 (m, 2H, H<sub>c</sub>), 2.94-2.89 (m, 1H, H5'), 2.80-2.78 (m, 1H, H5'), 2.61-2.54 (m, 4H, H<sub>γ</sub> and H<sub>a</sub>), 1.96-1.93 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.72-1.69 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.62-1.61 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 1.56 (s, 9H, *t*Bu), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.41 (s, 9H, *t*Bu), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.32 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.9 (C=O), 156.0 (C=O), 155.6 (C=O), 152.9 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.6 (Cq), 147.6 (Cq), 144.6 (Cq), 142.4 (C2 or C8), 127.9 (2C, C<sup>Ar</sup>), 123.8 (2C, C<sup>Ar</sup>), 122.8 (Cq), 90.2 (C1'), 84.0 (C4'), 82.5 (Cq, *t*Bu), 82.0 (Cq, *t*Bu), 79.7 (Cq, *t*Bu), 74.5 (C3'), 73.7 (C2'), 64.8 (CH<sub>2</sub>O), 56.5 (C5'), 53.1 (C<sub>a</sub> or C<sub>γ</sub>), 52.2 (C<sub>a</sub> or C<sub>γ</sub>), 51.0 (C<sub>α</sub>), 39.3 (C<sub>c</sub>), 29.8 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 28.1 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.8 (C<sub>b</sub>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1088.5884; found: 1088.5869.

## Hydrogenolysis: General procedure

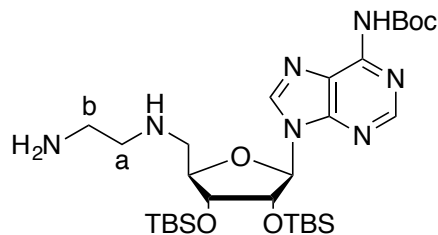
---



The compounds **8**, **9**, **10** or **11** (1 eq) were dissolved in MeOH (10 mL/mmol) and 10 % wt Pd/C (0.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred under 1 atm hydrogen atmosphere for 16 h. The mixture was then filtered over celite and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 9:1) to afford the desired compounds as white foams.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(((2-aminoethyl)amino)methyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**12**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>29</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 637.97 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **12** (470 mg, 81%) was obtained from the adenosine **8** ( 737 mg, 0.902 mmol).

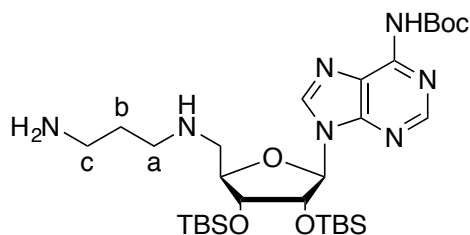
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.64 (s, 1H, H2 or H8), 8.00 (s, 1H, H2 or H8), 5.77 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H1'), 4.94-4.92 (m, 1H, H2'), 4.13-4.12 (m, 2H, H3' and H4'), 2.89-2.81 (m, 2H, H5'), 2.80-2.78 (m, 2H, Hb), 2.75-2.71 (m, 1H, Ha), 2.68-2.63 (m, 1H, Ha), 1.44 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.85 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.65 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.00 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.22 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.50 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.5 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.9 (Cq), 142.5 (C2 or C8), 122.7 (C5), 89.6 (C1'), 85.5 (C4'), 81.8 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 73.8 (C2'), 73.7 (C3'), 51.7 (Ca), 51.0 (C5'), 41.3 (Cb), 28.1 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.5 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.7 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>29</sub>H<sub>56</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 638.3881; found: 638.3875.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(((3-aminopropyl)amino)methyl)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**13**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>30</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 652.00 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **13** (264 mg, 81 %) was obtained from the adenosine **9** (417 mg, 0.502 mmol).

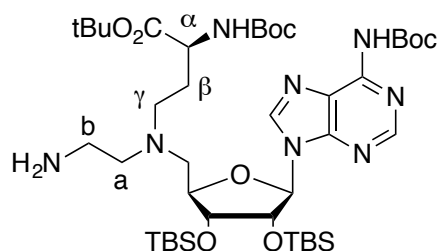
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.75 (s, 1H, H2 or H8), 8.04 (s, 1H, H2 or H8), 5.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H1'), 5.06-5.04 (m, 1H, H2'), 4.24-4.22 (m, 2H, H3' and H4'), 2.97-2.90 (m, 2H, H5'), 2.82-2.79 (m, 2H, Hc), 2.78-2.68 (m, 2H, Ha), 1.74-1.68 (m, 2H, Hb), 1.56 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.43 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 122.9 (C5), 90.1 (C1'), 86.1 (C4'), 82.4 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 74.0 (C3'), 73.9 (C2'), 51.6 (C5'), 48.2 (Ca), 40.5 (Cc), 33.7 (Cb), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>30</sub>H<sub>58</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 652.4038; found: 652.4020.

***tert*-Butyl 4-((2-aminoethyl)((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl) amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl) amino)butanoate (**14**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>42</sub>H<sub>78</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 895.30 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **14** (181 mg, 93 %) was obtained from the adenosine **10** (233 mg, 0.215 mmol).

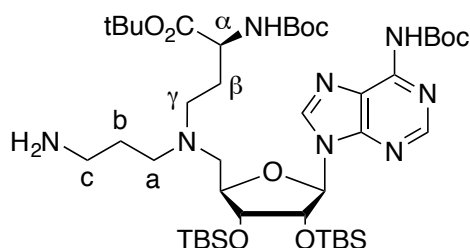
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.65 (s, 1H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 5.83-5.82 (m, 1H, H1'), 5.53 (bs, 1H, NH), 4.91-4.90 (m, 1H, H2'), 4.13-4.09 (m, 3H, H<sub>α</sub>, H3' and H4'), 2.87-2.79 (m, 2H, H5'), 2.73-2.71 (m, 2H, H<sub>β</sub>), 2.61-2.50 (m, 4H, H<sub>γ</sub> and H<sub>α</sub>), 1.91-1.85 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.69-1.64 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.47 (s, 9H, *t*Bu), 1.36 (s, 9H, *t*Bu), 1.33 (s, 9H, *t*Bu), 0.86 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.70 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.36 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.6 (C=O), 155.4 (C=O), 152.5 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.9 (Cq), 142.6 (C2 or C8), 122.7 (C5), 89.7 (C1'), 83.6 (C4'), 82.0 (Cq, *t*Bu), 81.7 (Cq, *t*Bu), 79.5 (Cq, *t*Bu), 74.1 (C3'), 73.8 (C2'), 56.7 (C5'), 55.9 (C<sub>α</sub> or C<sub>γ</sub>), 52.7 (C<sub>α</sub>), 51.0 (C<sub>α</sub> or C<sub>γ</sub>), 39.0 (C<sub>β</sub>), 29.7 (C<sub>β</sub>), 28.3 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 27.9 (3C, *t*Bu), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.6 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>42</sub>H<sub>79</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 895.5509; found: 895.5506.

***tert*-Butyl 4-((3-aminopropyl)(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl) amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl) amino)butanoate (**15**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>43</sub>H<sub>80</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 909.33 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **15** (361 mg, 89 %) was obtained from the adenosine **11** (484 mg, 0.445 mmol).

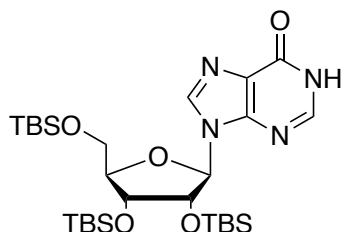
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.71 (s, 1H, H2 or H8), 8.10 (s, 1H, H2 or H8), 5.90-5.89 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H1'), 5.57-5.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.99 (s, 1H, H2'), 4.19-4.15 (m, 3H, H<sub>α</sub>, H3' and H4'), 2.85-2.76 (m, 2H, H5'), 2.71-2.68 (m, 2H, H<sub>c</sub>), 2.65-2.57 (m, 2H, H<sub>γ</sub>), 2.53-2.48 (m, 2H, H<sub>a</sub>), 1.97-1.91 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.74-1.70 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.59-1.55 (m, 11H, H<sub>b</sub> and *t*Bu), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.40 (s, 9H, *t*Bu), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.30 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.8 (C=O), 155.6 (C=O), 152.8 (C2 or C8), 150.6 (C<sub>q</sub>), 150.1 (C<sub>q</sub>), 149.7 (C<sub>q</sub>), 142.7 (C2 or C8), 122.9 (C5), 90.0 (C1'), 83.9 (C4'), 82.3 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 81.8 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 79.6 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 74.5 (C3'), 73.8 (C2'), 56.8 (C5'), 53.1 (C<sub>α</sub>), 52.6 (C<sub>a</sub> or C<sub>γ</sub>), 51.0 (C<sub>a</sub> or C<sub>γ</sub>), 40.4 (C<sub>c</sub>), 30.3 (C<sub>b</sub>), 29.7 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3C, *t*Bu), 28.2 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>43</sub>H<sub>81</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 909.5665; found: 909.5683.

**9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (**16**)<sup>4</sup>**

---



**Chemical Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 611.01 g.mol<sup>-1</sup>

To a solution of inosine (1.0 g, 3.7 mmol, 1 eq) and imidazole (2.03 g, 29.8 mmol, 8 eq) in DMF (11.00 mL) was added TBDMSCl (2.25 g, 14.9 mmol, 4 eq) at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at 50 °C for 16 h. DMF was evaporated and the residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic phase was washed 5 times with brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired compound **16** as a white powder (2.1 g, 94%).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 12.92 (bs, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H8), 8.10 (s, 1H, H2), 6.02 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H1'), 4.53-4.51 (m, 1H, H2'), 4.31-4.30 (m, 1H, H3'), 4.14 (s, 1H, H4'), 4.01-3.98 (m, 1H, H5'), 3.81-3.79 (m, 1H, H5'), 0.96 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.81 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.15-0.14 (m, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11-0.10 (m, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.02 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.18 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 159.4 (Cq), 149.0 (Cq), 144.6 (C2), 139.2 (C8), 125.2 (Cq), 88.4 (C1'), 85.6 (C4'), 76.7 (C2'), 71.9 (C3'), 62.6 (C5'), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.7 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 611.3480; found: 611.3482.

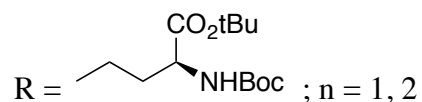
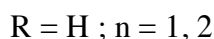
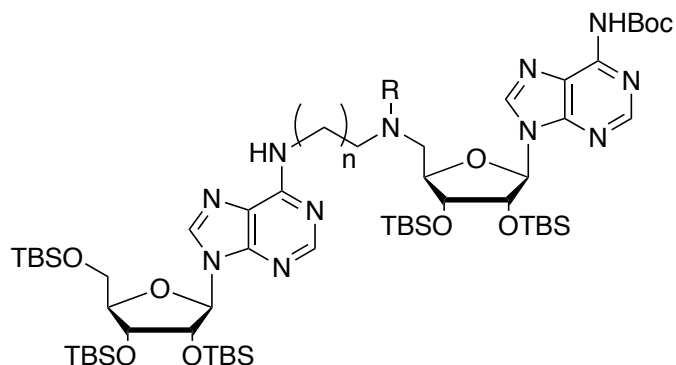
---

<sup>4</sup> B. Gadakh, G. Vondenhoff, E. Lescrinier, J. Rozenski, M. Froeyen, A. Van Aerschot, *Bioorg Med Chem* **2014**, *22*, 2875-2886



## PyBop coupling: General procedure

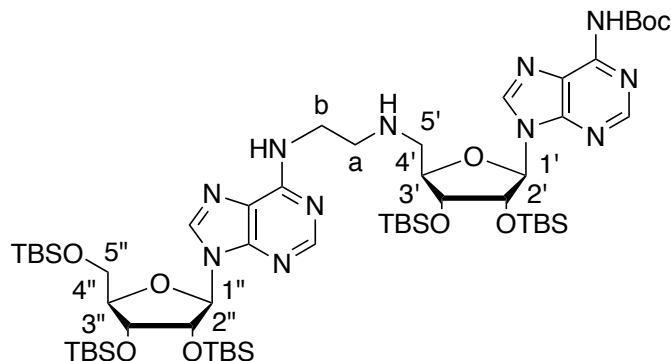
---



The inosine **16** (1 eq) was dissolved in DMF (5 mL/mmol) with PyBop (1.5 eq). DBU (2 eq) was then added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The primary amines **12**, **13**, **14** or **15** (2 eq) dissolved in DMF (5 mL/mmol) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. A work up was performed with ethyl acetate and brine. The organic layer was repeatedly washed with brine to remove DMF, dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 6:4) to afford the desired compounds as white foams.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(((2-((9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)ethyl) amino)methyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**17**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>57</sub>H<sub>107</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1230.97 g.mol<sup>-1</sup>

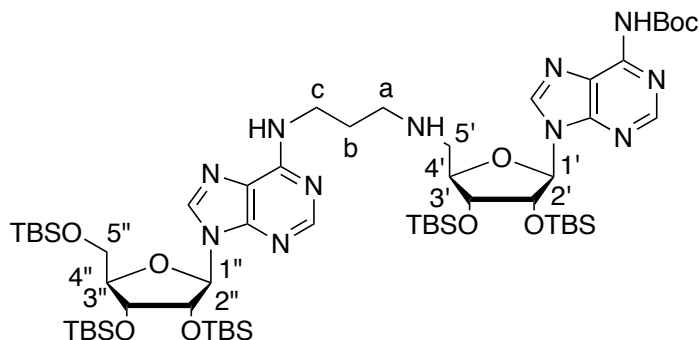
The compound **17** (273 mg, 85 %) was obtained from the inosine **16** (158 mg, 0.259 mmol, 1 eq), and the amine **12** (331 mg, 0.518 mmol, 2 eq).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.71 (s, 1H, H2 or H8), 8.28 (s, 1H, H2 or H8), 8.02 (s, 1H, H2 or H8), 8.01 (s, 1H, H2 or H8), 6.31 (bs, 1H, NH), 5.97 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H1'), 5.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H1''), 5.05-5.03 (m, 1H, H2''), 4.68 (bs, 1H, H2'), 4.30-4.26 (m, 2H, H3' and H4''), 4.24-4.22 (m, 1H, H3''), 4.12-4.10 (m, 1H, H4'), 4.02 (dd, *J* = 4.4, 11.2 Hz, 1H, H5'), 3.78-3.75 (m, 3H, H5' and Hb), 3.07-2.97 (m, 4H, H5'' and Ha), 1.54 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 9H, 3 Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.25 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.49 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 154.8 (Cq), 153.0 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.5 (Cq), 150.1 (Cq), 149.9 (Cq), 149.0 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 120.2 (Cq), 90.1 (C1''), 88.4 (C1'), 85.5 (2C, C4' and C4''), 82.5 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 75.7 (C2'), 73.9 (C2''), 73.8 (C3''), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 51.0 (C5''), 49.4 (Ca), 40.4 (Cb), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>57</sub>H<sub>108</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1230.7178; found: 1230.7169.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(((3-((9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl) amino)methyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**18**)**



**Chemical Formula:** C<sub>58</sub>H<sub>109</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1245.00 g.mol<sup>-1</sup>

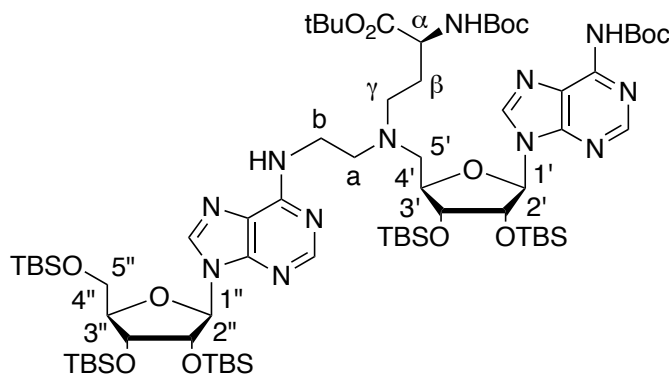
The compound **18** (212 mg, 85 %) was obtained from the inosine **16** (122 mg, 0.199 mmol, 1 eq), and the amine **13** (259 mg, 0.397 mmol, 2 eq).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.65 (s, 1H, H2 or H8), 8.25 (s, 1H, H2 or H8), 8.13 (s, 1H, H2 or H8), 8.05 (s, 1H, H2 or H8), 6.48 (bs, 1H, NH), 5.99 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H1'), 5.88 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H1''), 4.95-4.89 (m, 1H, H2''), 4.61 (bs, 1H, H2'), 4.31-4.30 (m, 3H, H3', H3'' and H4''), 4.13-4.11 (m, 1H, H4'), 4.04-4.01 (m, 1H, H5'), 3.80-3.77 (m, 1H, H5'), 3.71 (bs, 2H, Hc), 3.07-3.05 (m, 2H, H5''), 2.97 (bs, 2H, Ha), 2.04-1.94 (m, 2H, Hb), 1.54 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.18 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.46 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.2 (Cq), 152.8 (C2 or C8), 152.5 (C2 or C8), 150.2 (Cq), 150.2 (Cq), 150.1 (Cq), 150.0 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 122.5 (Cq), 120.06 (Cq), 90.3 (C1''), 88.4 (C1'), 85.3 (C4' or C4''), 84.4 (C4' or C4''), 82.6 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 76.0 (C2'), 74.1 (C2''), 73.8 (C3''), 71.8 (C3'), 62.5 (C5'), 50.8 (C5''), 46.99 (Ca), 38.1 (Cc), 28.9 (Cb), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>58</sub>H<sub>110</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1244.7334; found: 1244.7336.

***tert*-Butyl 4-((2-((9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)ethyl) (((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxy carbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl) amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoate (**19**)**



**Chemical Formula:** C<sub>70</sub>H<sub>130</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1488.30 g.mol<sup>-1</sup>

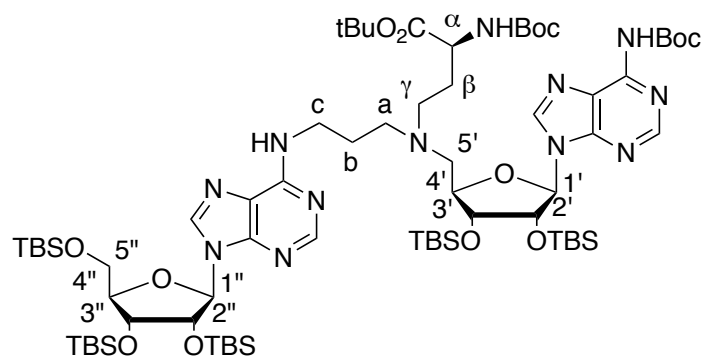
The compound **19** (66 mg, 80 %) was obtained from the inosine **16** (33 mg, 0.055 mmol, 1 eq), and the amine **14** (100 mg, 0.111 mmol, 2 eq).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.70 (s, 1H, H2 or H8), 8.2 (s, 1H, H2 or H8), 8.03 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 8.01 (s, 1H, H2 or H8), 7.97 (s, 1H, H2 or H8), 6.30 (s, 1H, NHCb), 5.96 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1''), 5.92-5.86 (m, 1H, H1'), 5.42-5.35 (m, 1H, NH), 5.02-4.96 (m, 1H, H2'), 4.73-4.68 (m, 1H, H2''), 4.30 (m, 1H, H3''), 4.25-4.08 (m, 4H, H4', H3', H<sub>α</sub> and H4''), 4.03 (dd, *J* = 11.3, 4.7 Hz, 1H, H5''), 3.76 (dd, *J* = 3.1, 11.2 Hz, 1H, H5'), 3.72-3.56 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 2.97-2.87 (m, 2H, H5'), 2.87-2.78 (m, 2H, H<sub>a</sub>), 2.77-2.61 (m, 2H, H<sub>γ</sub>), 2.02-1.90 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.81-1.71 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 1.54 (s, 9H, *t*Bu), 1.40 (s, 9H, *t*Bu), 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.90 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.07 (bs, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.36 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.7 (C=O<sup>ester</sup>), 155.5 (C<sub>q</sub>), 154.7 (C<sub>q</sub>), 153.0 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.5 (C<sub>q</sub>), 150.0 (C<sub>q</sub>), 149.7 (C<sub>q</sub>), 148.9 (C<sub>q</sub>), 142.6 (C2 or C8), 138.9 (C2 or C8), 122.8 (C<sub>q</sub>), 120.3 (C<sub>q</sub>), 90.0 (C1'), 88.4 (C1''), 85.5 (C4''), 83.7 (C4'), 82.2 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 81.9 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 79.6 (C<sub>q</sub>, *t*Bu), 75.4 (C2''), 74.2 (C3'), 73.7 (C2'), 72.2 (C3''), 62.7 (C5''), 56.5 (C5'), 53.5 (C<sub>a</sub>), 52.7 (C<sub>α</sub>), 50.9 (C<sub>γ</sub>), 38.4 (C<sub>b</sub>), 29.8 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3C, *t*Bu), 28.2 (3C, *t*Bu), 28.0 (3C, *t*Bu), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (6C, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (6C, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (3C, 3 Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>70</sub>H<sub>131</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1487.8805; found: 1487.8796.

***tert*-Butyl 4-((3-((9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl) (((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxy carbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl) amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoate (**20**)**



**Chemical Formula:** C<sub>71</sub>H<sub>132</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1502.33 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **20** (211 mg, 81 %) was obtained from the inosine **16** (104 mg, 0.171 mmol, 1 eq), and the amine **15** (310 mg, 0.341 mmol, 2 eq).

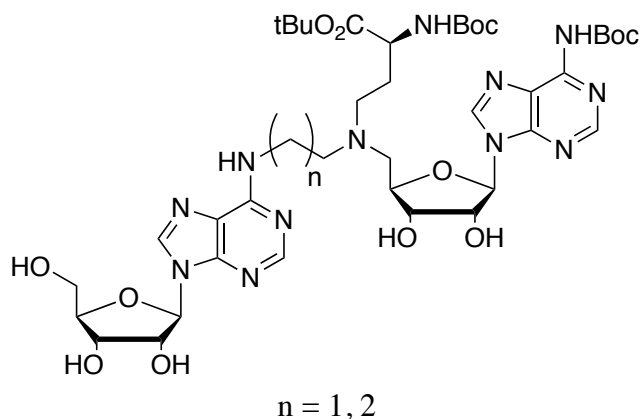
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.73 (s, 1H, H2 or H8), 8.31 (s, 1H, H2 or H8), 8.08 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 7.99 (s, 1H, H2 or H8), 7.92 (s, 1H, H2 or H8), 6.16 (bs, 1H, NH-Cb), 5.99-5.96 (m, 2H, H1' and H1''), 5.66-5.64 (m, 1H, NH-Cα), 5.01 (bs, 1H, H2'), 4.77-4.75 (m, 1H, H2''), 4.33-4.32 (m, 1H, H3''), 4.25-4.22 (m, 1H, H4'), 4.16 (bs, 2H, H3', Hα), 4.12-4.10 (m, 1H, H4''), 4.05-4.02 (m, 1H, H5''), 3.78-3.75 (m, 1H, H5''), 3.64 (bs, 2H, Hc), 2.91-2.83 (m, 2H, H5'), 2.64-2.46 (m, 4H, Ha and Hγ), 1.95 (bs, 1H, Hβ), 1.81-1.79 (m, 3H, Hβ and Hb), 1.56 (s, 9H, *t*Bu), 1.42 (s, 9H, *t*Bu), 1.39 (s, 9H, *t*Bu), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.79 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.12-0.10 (bs, 18H, 6 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.25 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.8 (C=O), 155.6 (Cq), 155.0 (Cq), 153.1 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.7 (Cq), 149.3 (Cq), 142.7 (C2 or C8), 138.9 (C2 or C8), 122.9 (Cq), 120.4 (Cq), 90.1 (C1'), 88.5 (C1''), 85.5 (C4''), 83.9 (C4'), 82.3 (Cq, *t*Bu), 81.7 (Cq, *t*Bu), 79.5 (Cq, *t*Bu), 75.5 (C2''), 74.5 (C3'), 73.8 (C2'), 72.3 (C3''), 62.8 (C5''), 56.7 (C5'), 53.2 (Cα), 52.2 (Ca), 51.1 (Cγ), 39.0 (Cc), 29.6 (Cβ), 28. (3C, *t*Bu), 28.3 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 27.0 (Cb), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (6C, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (2C, 2 Cq<sup>TBS</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>71</sub>H<sub>133</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1501.8961; found: 1501.8957.

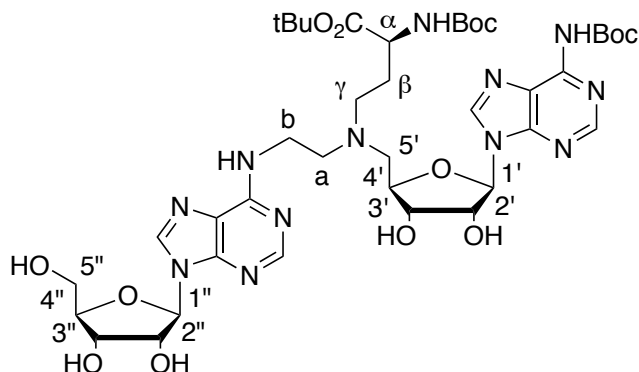
## Cleavage of silyl groups: General procedure

---



The compounds **19** or **20** (1 eq) were dissolved in MeOH (24 mL/mmol).  $\text{NH}_4\text{F}$  (20 eq) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. The solution was partitioned between DCM and brine. The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) to afford desired compounds as white foams.

***tert*-Butyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-((((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxy carbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)(2-((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)ethyl)amino) butanoate (**21**)**



**Chemical Formula:** C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>

**Molecular Weight:** 916.99 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **21** (32 mg, 61 %) was obtained from **19** (83 mg, 0.0557 mmol).

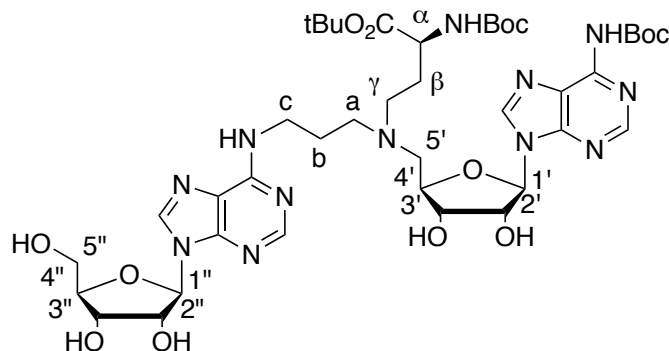
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.53 (s, 2H, H2 or H8), 8.13 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 7.98 (s, 1H, H2 or H8), 7.92 (s, 1H, H2 or H8), 5.93-5.89 (m, 2H, H1' and H1''), 5.51 (bs, 1H, NHCα), 4.98 (s, 1H, H2''), 4.78 (s, 1H, H2'), 4.50-4.46 (m, 2H, H3' and H3''), 4.29 (s, 1H, H4''), 4.24-4.17 (m, 2H, Hα and H4'), 3.91-3.88 (m, 1H, H5''), 3.74-3.72 (m, 1H, H5'), 3.57 (bs, 1H, Hb), 2.87-2.61 (m, 6H, H5', Ha and Hγ), 2.00 (bs, 1H, Hβ), 1.71 (bs, 1H, Hβ), 1.51 (s, 9H, *t*Bu), 1.39 (s, 9H, *t*Bu), 1.36 (s, 9H, *t*Bu).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 172.0 (C=O), 155.9 (C=O), 154.6 (C=O), 152.6 (2C, C2 or C8), 150.4 (Cq), 150.0 (Cq), 149.8 (Cq), 147.4 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 140.5 (C2 or C8), 122.0 (Cq), 120.5 (Cq), 90.9 (C1''), 89.9 (C1'), 87.6 (C4''), 82.3 (C4' or Cq), 82.2 (C4' or Cq), 80.8 (Cq), 80.1 (Cq), 73.8 (2C, C2' and C2''), 72.5 (2C, C3' and C3''), 59.0 (C5''), 56.8 (C5'), 53.8 (Ca), 52.5 (Cα), 51.2 (Cγ), 38.8 (Cb), 29.8 (Cβ), 28.4 (3C, *t*Bu), 28.2 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu).

**HRMS:** calcd for C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 917.4481; found: 917.4457.

***tert*-Butyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-((((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)(3-((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)amino) butanoate (**22**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>41</sub>H<sub>62</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>  
**Molecular Weight:** 931.01 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **22** (91 mg, 73 %) was obtained from **20** (201 mg, 0.133 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.55 (s, 1H, H2 or H8), 8.14 (s, 1H, H2 or H8), 8.02 (s, 1H, H2 or H8), 7.8 (s, 1H, H2 or H8), 5.97 (s, 1H, H1'), 5.86 (s, 1H, H1''), 5.56 (bs, 1H, NHCα), 5.01 (s, 1H, H2''), 4.77 (s, 1H, H2'), 4.59 (s, 1H, H3'), 4.46 (s, 1H, H3''), 4.30-4.07 (m, 3H, H4', H4'' and Hα), 3.91-3.89 (m, 1H, H5''), 3.74-3.58 (m, 3H, H5'' and Hc), 2.97-2.32 (m, 6H, H5', Ha and Hγ), 2.09-1.94 (bs, 1H, Hβ), 1.82 (bs, 3H, Hβ and Hb), 1.53 (s, 9H, *t*Bu), 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 1.36 (s, 9H, *t*Bu).

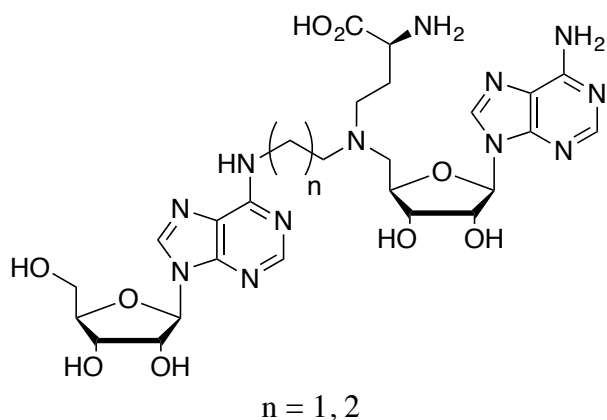
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.9 (C=O), 155.9 (Cq), 154.7 (Cq), 152.7 (2C, C2 or C8), 150.4 (Cq), 150.0 (Cq), 149.9 (Cq), 147.2 (Cq), 141.8 (C2 or C8), 140.3 (C2 or C8), 122.2 (Cq), 120.6 (Cq), 91.2 (C1''), 90.6 (C1'), 87.8 (C4' or C4''), 82.5 (Cq), 82.3 (Cq), 82.0 (Cq), 80.2 (C4' or C4''), 74.9 (2C, C2' and C2''), 73.8 (2C, C3' and C3''), 63.2 (C5''), 56.9 (C5'), 52.7 (Cα), 51.6 (Ca), 50.5 (Cγ), 38.4 (Cc), 29.4 (Cβ), 28.4 (3C, *t*Bu), 28.2 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 25.3 (Cb).

**HRMS:** calcd for C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 931.4638; found: 931.4625.



## Removal of Boc and *t*Bu groups: General procedure

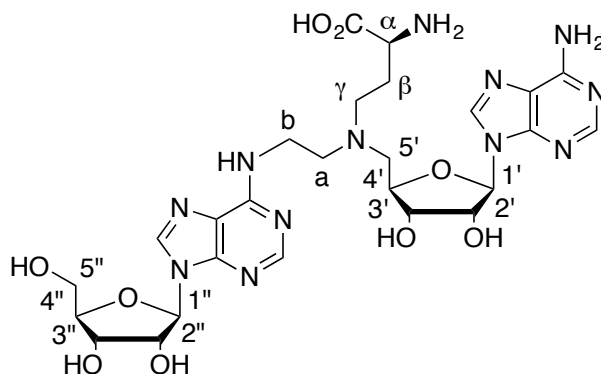
---



The SAM-adenosine conjugates **21** or **22** (1 eq) were dissolved in DCM (5 mL/mmol) and  $\text{ZnBr}_2$  (15 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (20 mL/mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compounds as white foams.

**(S)-2-Amino-4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl) methyl)(2-((9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)amino)ethyl)amino)butanoic acid (23)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub>  
**Molecular Weight:** 660.64 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **23** (5.5 mg, 16 %) was obtained from the SAM-adenosine conjugate **21** (32 mg, 0.034 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.26 (s, 1H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 8.08 (s, 1H, H2 or H8), 7.83 (s, 1H, H2 or H8), 6.03-6.00 (m, 2H, H1' and H1''), 5.23 (bs, 1H, H2'), 4.90-4.88 (m, 1H, H2''), 4.74-4.72 (m, 1H, H4'), 4.47-4.45 (m, 1H, H3''), 4.40-4.39 (m, 1H, H3'), 4.35-4.34 (m, 1H, H4'), 4.10 (bs, 1H, 1 H5'), 3.93-3.96 (m, 1H, H5''), 3.92-3.90 (m, 1H, Hα), 3.89-3.85 (m, 1H, H5''), 3.82 (bs, 2H, Hb), 3.75-3.67 (m, 4H, H5', Hγ, Ha), 3.58-3.54 (m, 1H, Ha), 2.55-2.48 (m, 1H, Hβ), 2.42-2.35 (m, 1H, Hβ), 1.98 (s, 17H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

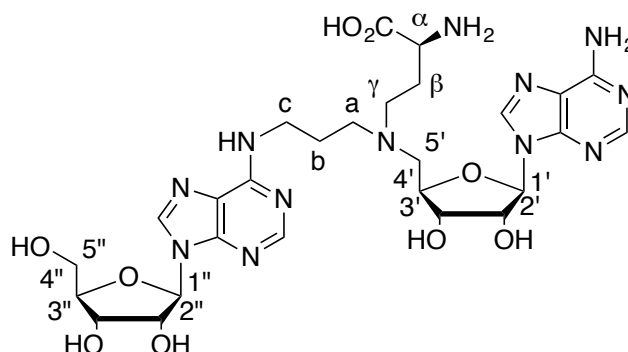
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 180.3 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 172.8 (C=O), 154.4 (Cq), 153.9 (Cq), 152.5 (C2 or C8), 151.2 (C2 or C8), 147.7 (Cq), 147.0 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 141.1 (C2 or C8), 118.8 (Cq), 118.7 (Cq), 89.5 (C1'), 88.6 (C1''), 86.0 (C4''), 79.5 (C4'), 73.7 (C2''), 71.9 (C3'), 71.5 (C2'), 70.7 (C3''), 61.7 (C5''), 55.6 (2C, C5' and Ca), 52.2 (Cα), 47.8 (Cγ), 37.2 (Cb), 24.2 (Cβ), 23.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 661.2806; found: 661.2805.

**HPLC retention time:** 12.9 min.

**2-Amino-4-((((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl) methyl) (3-((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino) propyl)amino)butanoic acid (**24**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub>

**Molecular Weight:** 674.67 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **24** (1.7 mg, 3 %) was obtained from the SAM-adenosine conjugate **22** (84 mg, 0.090 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.23 (s, 1H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 8.05 (s, 1H, H2 or H8), 7.95 (s, 1H, H2 or H8), 6.03 (d, *J* = 6.0, 1H, H1'), 5.91-5.90 (m, 1H, H1''), 4.75 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1H, H2'), 4.71-4.70 (m, 1H, H2''), 4.54-4.51 (m, 1H, H4' or H4''), 4.47-4.46 (m, 1H, H3'), 4.36-4.32 (m, 2H, H4' or H4'' and H3''), 3.99-3.96 (m, 1H, H5' or H5''), 3.93-3.86 (m, 2H, H5' or H5'' and Hα), 3.71-3.30 (m, 8H, H5' or H5'', Ha, Hc and Hγ), 2.31-2.26 (m, 1H, Hβ), 2.17-2.12 (m, 1H, Hβ), 2.07-2.00 (m, 2H, Hb), 1.97 (s, 18H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

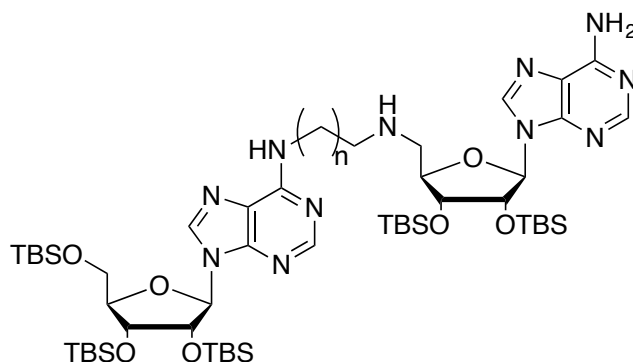
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 181.2 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 173.4 (C=O), 155.0 (Cq), 154.0 (Cq), 152.5 (C2 or C8), 152.0 (C2 or C8), 147.9 (Cq), 147.5 (Cq), 140.0 (C2 or C8), 139.9 (C2 or C8), 118.8 (2 Cq), 89.2 (C1''), 88.1 (C1'), 85.7 (C4' or C4''), 79.3 (C4'a or C4''), 73.8 (C2'), 72.6 (C2''), 71.7 (C3''), 70.6 (C3'), 61.5 (C5' or C5''), 54.3 (C5' or C5''), 53.3 (Cα), 51.8 (Ca), 51.2 (Cγ), 37.8 (Cc), 25.2 (Cβ), 23.7 (Cb), 23.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 697.2782; found: 697.2806

**HPLC retention time:** 14.6 min.

## Deprotection of the exocyclic amine: General procedure

---

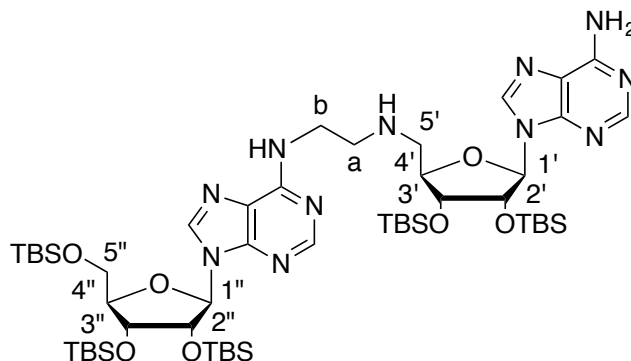


$$n = 1, 2$$

The SAM-adenosine conjugates **17** or **18** (1 eq) were dissolved in DCM (5 mL/mmol) and  $\text{ZnBr}_2$  (5 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (20 mL/mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and brine. The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 9:1) to afford the desired compounds as white foams.

***N*<sup>1</sup>-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-*N*<sup>2</sup>-((9-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)ethane-1,2-diamine (**25**))**

---



**Chemical Formula:** C<sub>52</sub>H<sub>99</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1130.85 g.mol<sup>-1</sup>

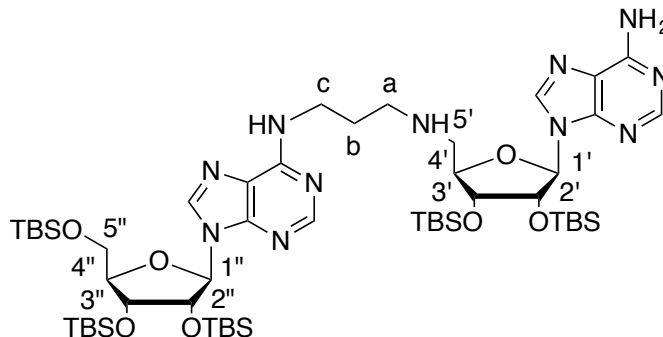
The compound **25** (86 mg, 71 %) was obtained from **17** (131 mg, 0.106 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.31 (s, 1H, H2 or H8), 8.22 (s, 1H, H2 or H8), 7.82 (s, 1H, H2 or H8), 7.73 (s, 1H, H2 or H8), 5.88 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.78-5.75 (m 2H, H1' and H1''), 5.10-5.08 (m, 1H, H2'), 5.04-5.02 (m, 1H, H2''), 4.35-4.34 (m, 1H, H3''), 4.27 (m, 2H, H3' and H4''), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.96-3.93 (m, 2H, H5' and Hb), 3.73-3.64 (m, 2H, H5' and Hb), 3.11-3.00 (m, 4H, H5'' and Ha), 0.95-0.92 (m, 27H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.12-0.06 (m, 18H, 6 Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.15 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.51 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.61 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.7 (Cq), 155.2 (Cq), 152.7 (C2 or C8), 152.6 (C2 or C8), 149.4 (Cq), 147.7 (Cq), 141.1 (C2 or C8), 140.4 (C2 or C8), 121.5 (Cq), 120.9 (Cq), 91.0 (C1''), 90.1 (C1'), 89.4 (C4'), 85.5 (C4''), 74.1 (3C, C2'', C3', C3''), 70.7 (C2''), 63.0 (C5'), 50.7 (C5''), 48.5 (Ca), 39.9 (Cb), 25.9 (9C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (4C, 4 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>), -5.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>52</sub>H<sub>100</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1130.6654; found: 1130.6632.

***N*<sup>1</sup>-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-*N*<sup>3</sup>-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)propane-1,3-diamine (**26**)**



**Chemical Formula:** C<sub>53</sub>H<sub>101</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1144.88 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **26** (15.9 mg, 46 %) was obtained from **18** (37 mg, 0.03 mmol).

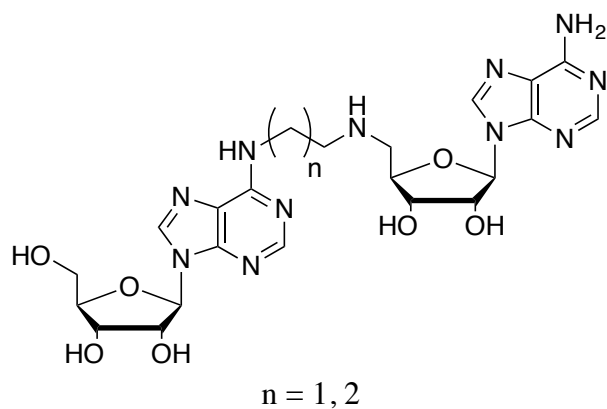
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.30 (s, 1H, H2 or H8), 8.24 (s, 1H, H2 or H8), 8.08 (s, 1H, H2 or H8), 7.89 (s, 1H, H2 or H8), 6.24 (bs, 1H, NH), 6.02-6.01 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H1'), 5.83-5.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H1''), 5.76 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.05-5.01 (m, 1H, H2''), 4.62 (bs, 1H, H2'), 4.36-4.30 (m, 3H, H3', H3'' and H4' or H4''), 4.15-4.11 (m, 1H, H4' or H4''), 4.05-4.02 (m, 1H, H5'), 3.84-3.77 (m, 2H, H5' and Hc), 3.71-3.68 (m, 1H, Hc), 3.10-3.08 (m, 1H, H5''), 2.96-2.91 (m, 3H, H5'' and Ha), 2.00-1.97 (m, 2H, Hb), 0.95-0.94 (m, 18H, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.14-0.11 (m, 15H, 5 Me<sup>TBS</sup>), 0.10-0.09 (m, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.20 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.7 (Cq), 155.0 (Cq), 153.1 (C2 or C8), 152.7 (C2 or C8), 149.3 (Cq), 148.9 (Cq), 141.1 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 121.0 (Cq), 120.1 (Cq), 90.2 (C1''), 89.6 (C1'), 88.4 (C4' or C4''), 85.4 (C4' or C4''), 76.0 (C2'), 74.2 (C3' or C3''), 73.9 (C2''), 72.0 (C3' or C3''), 62.6 (C5'), 50.9 (C5''), 47.2 (Ca), 39.0 (Cc), 29.4 (Cb), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>53</sub>H<sub>102</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1144.6810; found: 1144.6794.

## Cleavage of silyl groups: General procedure

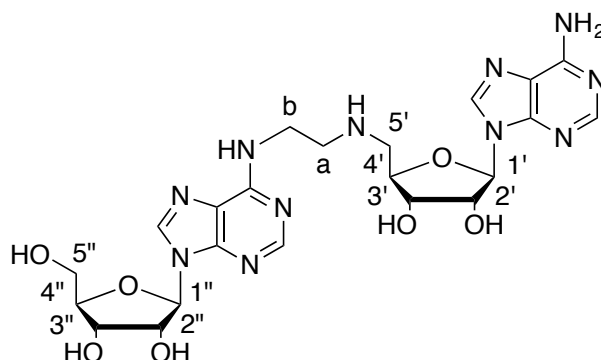
---



The compounds **25** or **26** (1 eq) were dissolved in MeOH (24 mL/mmol).  $\text{NH}_4\text{F}$  (20 eq) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. The solution was partitioned between DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compounds as white foams.

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-5-(((2-((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)ethyl)amino)methyl) tetrahydrofuran-3,4-diol (27)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>

**Molecular Weight:** 559.54 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **27** (48.6 mg, 50 %) was obtained from **25** (147 mg, 0.130 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.16 (s, 1H, H2 or H8), 8.01 (s, 1H, H2 or H8), 7.91 (s, 1H, H2 or H8), 7.64 (s, 1H, H2 or H8), 5.97 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H1'), 5.90 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H1''), 5.09-5.07 (m, 1H, H2'), 4.79 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1H, H2''), 4.57-4.54 (m, 1H, H4'), 4.41-4.39 (m, 1H, H3''), 4.36 (m, 1H, H3'), 4.29-4.28 (m, 1H, H4''), 3.93-3.89 (m, 2H, H5' and H5''), 3.89-3.82 (m, 1H, H5''), 3.81-3.66 (m, 3H, Hb and Ha), 3.63-3.52 (m, 1H, H5'), 3.51-3.29 (m, 1H, Ha), 1.96 (s, 8H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 180.1(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 154.1 (Cq), 153.7 (Cq), 152.1 (C2 or C8), 151.2 (C2 or C8), 147.5 (Cq), 146.7 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 140.9 (C2 or C8), 118.4 (Cq), 118.4 (Cq), 89.6 (C1'), 88.7 (C1''), 85.9 (C4' or C4''), 80.7 (C4' or C4''), 73.7 (C2''), 72.0 (C3'), 71.8 (C2'), 70.7 (C3''), 61.7 (C5''), 50.0 (Ca), 48.5 (C5'), 38.4 (Cb), 22.5 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

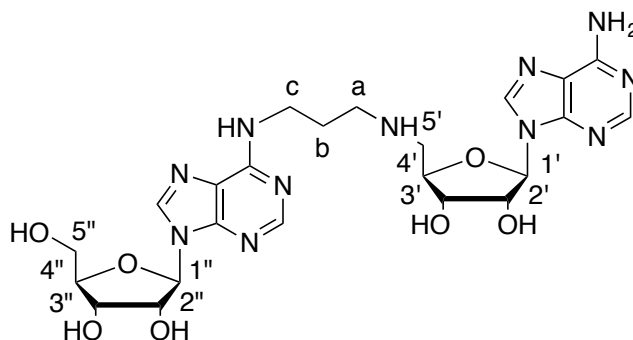
**HRMS:** calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 560.2330; found: 560.2320.

**HPLC retention time:** 13.8 min.



**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-5-(((3-((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxyl methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)propyl)amino)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (28)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>

**Molecular Weight:** 573,57 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **28** (1.3 mg, 15 %) was obtained from **26** (16 mg, 0.0139 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.24 (s, 1H, H2 or H8), 8.16 (s, 1H, H2 or H8), 8.09 (s, 1H, H2 or H8), 7.94 (s, 1H, H2 or H8), 6.05-6.02 (m, 2H, H1' and H1''), 4.87-4.85 (m, 1H, H2'), 4.79 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1H, H2''), 4.60-4.56 (m, 1H, H4' or H4''), 4.47-4.45 (m, 2H, H3' and H3''), 4.35-4.33 (m, 1H, H4' or H4''), 3.94 (dd, *J* = 2.7, 12.8 Hz, 1H, H5' or H5''), 3.88 (dd, *J* = 3.3, 12.9 Hz, 1H, H5' or H5''), 3.83-3.79 (m, 1H, H5' or H5''), 3.67 (bs, 1H, Hc), 3.61-3.58 (m, 2H, Hc and H5' or H5''), 3.42-3.39 (m, 2H, Ha), 2.19-2.14 (m, 2H, Hb), 1.82 (s, 8H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

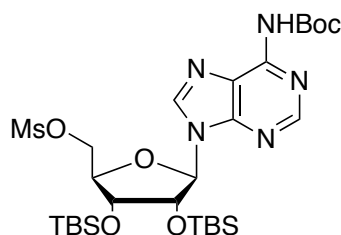
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 179.5 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 154.9 (Cq), 154.6 (Cq), 152.2 (C2 or C8), 152.2 (C2 or C8), 148.0 (2C, Cq), 141.1 (C2 or C8), 140.2 (C2 or C8), 119.1 (Cq), 118.9 (Cq), 89.7 (C1'), 88.3 (C1''), 85.7 (C4' or C4''), 79.9 (C4' or C4''), 73.8 (C2'), 72.6 (C2''), 71.6 (C3' or C3''), 70.6 (C3' or C3''), 61.5 (C5''), 48.2 (C5'), 45.1 (Ca), 37.5 (Cc), 25.2 (Cb), 22.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 596,2306; found: 596.2306.

**HPLC retention time:** 15.2 min.

**((2R,3R,4R,5R)-5-(6-((tert-Butoxycarbonyl)amino)-9H-purin-9-yl)-3,4-bis((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl methanesulfonate (29)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 673.97 g.mol<sup>-1</sup>

The adenosine **3** (400 mg, 0.671 mmol, 1 eq) was dissolved in pyridine (2.70 mL). Methanesulfonyl chloride (103  $\mu$ L, 1.34 mmol, 2 eq) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, quenched with water and then diluted in DCM. The organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the combined organic layers were co-evaporated with toluene. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 6:4) to provide the desired compound **29** as a white foam (413 mg, 91 %).

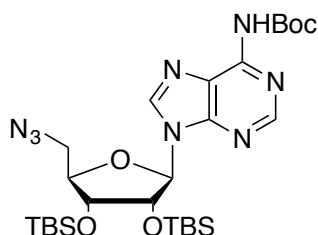
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.74 (s, 1H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 5.95 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, H1'), 5.01-4.99 (m, 1H, H2'), 4.62-4.59 (m, 1H, H5'), 4.51-4.48 (m, 1H, H5'), 4.35-4.34 (m, 2H, H3', H4'), 3.01 (s, 3H, Me<sup>Ms</sup>), 1.57 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.26 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  153.0 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.6 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 122.5 (Cq), 89.8 (C1'), 82.6 (C4'), 82.6 (Cq, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 74.1 (C2'), 72.0 (C3'), 68.0 (C5'), 37.8 (CH<sub>3</sub><sup>Ms</sup>), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 696,2895; found: 696.2908.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(azidomethyl)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**30**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 620.90 g.mol<sup>-1</sup>

The adenosine **29** (410 mg, 0.61 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (3 mL) and sodium azide (118 mg, 1.82 mmol, 3 eq) was added to the reaction. The mixture was heated at 70 °C for 3 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and brine. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 8:2) to provide the desired compound **30** as a white foam (256 mg, 67 %).

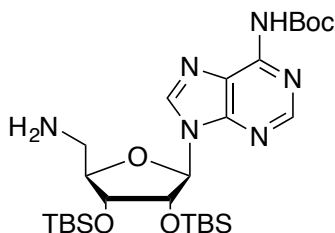
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.72 (s, 1H, H2 or H8), 8.32 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 8.16 (s, 1H, H2 or H8), 5.92 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H1'), 4.91-4.89 (m, 1H, H2'), 4.28-4.26 (m, 1H, H3'), 4.21-4.18 (m, 1H, H4'), 3.73-3.67 (m, 2H, H5'), 1.54 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.21 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.9 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 150.1 (Cq), 149.8 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 122.6 (Cq), 89.9 (C1'), 83.0 (C4'), 82.3 (Cq), 74.5 (C2'), 72.4 (C3'), 51.6 (C5'), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 643,3184; found: 643.3157.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(aminomethyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**31**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 594.90 g.mol<sup>-1</sup>

The adenosine **30** (1.14 g, 1.836 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (18 mL) and Pd/C (10 % wt, 294 mg, 0.28 mmol, 0.2 eq) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under 1 atm hydrogen atmosphere, filtered over celite and the filtrate was concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) to provide the desired compound **31** as a white foam (837 mg, 83 %).

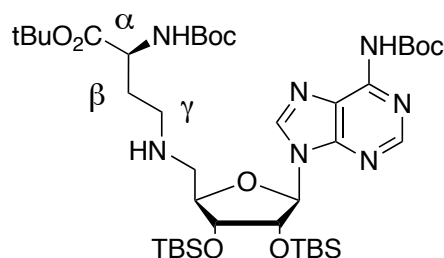
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.71 (s, 1H, H2 or H8), 8.09 (s, 1H, H2 or H8), 5.86 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H1'), 4.97-4.95 (m, 1H, H2'), 4.26-4.24 (m, 1H, H3'), 4.14-4.11 (m, 1H, H4'), 3.12-3.09 (m, 1H, 1 H5'), 3.04-3.00 (m, 1H, 1 H5'), 2.28 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 1.54 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.45 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.6 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 89.9 (C1'), 87.2 (C4'), 82.3 (Cq), 74.1 (C2'), 73.1 (C3'), 43.5 (C5'), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 595.3459; found: 595.3462.

***tert*-Butyl (*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-(((*2R,3R,4R,5R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)amino)butanoate (**32**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>40</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 852.23 g.mol<sup>-1</sup>

The amine **31** (380 mg, 0.639 mmol, 1.5 eq) was dissolved in MeOH (1.5 mL). The aldehyde **6** (116 mg, 0.426 mmol, 1eq), NaBH<sub>3</sub>CN (40 mg, 0.639 mmol, 1.5 eq) and acetic acid (24  $\mu$ L, 0.426 mmol, 1 eq) were added to the solution at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated and a work up was performed with ethyl acetate and a saturated solution of aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 5:5) to afford the desired compound **32** as a white foam (261 mg, 72 %).

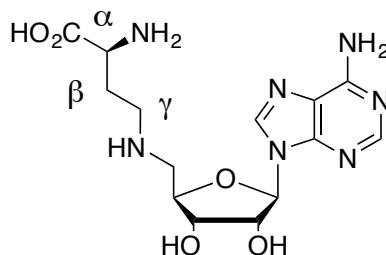
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.66 (s, 1H, H2 or H8), 8.35 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 8.05 (s, 1H, H2 or H8), 5.84-5.83 (m, 1H, H1'), 5.36-5.35 (m, 1H, NH-C $\alpha$ ), 4.96-4.94 (m, 1H, H2'), 4.25-4.21 (m, 2H, H $\alpha$  and H3'), 4.17-4.15 (m, 1H, H4'), 2.91-2.88 (m, 1H, H5'), 2.84-2.80 (m, 1H, H5'), 2.74-2.70 (m, 1H, H $\gamma$ ), 2.66-2.61 (m, 1H, H $\gamma$ ), 1.97-1.93 (m, 1H, H $\beta$ ), 1.71-1.67 (m, 1H, H $\beta$ ), 1.50 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 1.38 (s, 9H, *t*Bu), 1.37 (s, 9H, *t*Bu), 0.88 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.70 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.45 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  171.9 (C=O), 155.5 (C=O), 152.6 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.5 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 89.7 (C1'), 85.6 (C4'), 82.1 (Cq), 81.7 (Cq), 79.4 (Cq), 74.1 (C2'), 73.7 (C3'), 52.4 (C $\alpha$ ), 51.3 (C5'), 46.0 (C $\gamma$ ), 33.2 (C $\beta$ ), 28.3 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 28.0 (3C, *t*Bu), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>40</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 874,4906; found: 874.4886.

**(S)-2-amino-4-((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)amino)butanoic acid (32b)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>  
**Molecular Weight:** 367.36 g.mol<sup>-1</sup>

The compounds **32** ( 132 mg, 0.155 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (4 mL). NH<sub>4</sub>F ( 114 mg, 3.1 mmol, 20 eq) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. The solution was partitioned between DCM and water. The combined organic layers were evaporated and the crude was dissolved in DCM (1mL) and ZnBr<sub>2</sub> (520 mg, 2.31 mmol, 15 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (4 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and brine. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compounds as white foams (65 mg, 76 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.16 (s, 1H, H2 or H8), 8.04 (s, 1H, H2 or H8), 5.99 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1'), 4.79 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1H, H2'), 4.44-4.39 (m, 2H, H3' and H4'), 3.80-3.78 (m, 1H, Hα), 3.61-3.51 (m, 2H, H5'), 3.38-3.35 (m, 2H, Hγ), 2.27-2.18 (m, 2H, Hβ), 1.92 (s, 12H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)

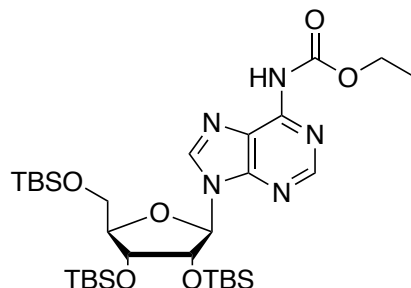
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 180.0 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 173.0 (C=O), 155.0 (Cq), 152.1 (C2 or C8), 148.2 (Cq), 140.7 (C2 or C8), 118.8 (Cq), 88.9 (C1'), 79.5 (C4'), 72.9 (C2'), 71.3 (C3'), 52.6 (Cα), 48.9 (C5'), 45.1 (Cγ), 26.8(Cβ), 22.5 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 368.1682; found: 368.1677.

**HPLC retention time:** 8.7 min.

**Ethyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl) tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**33**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>31</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 682.09 g.mol<sup>-1</sup>

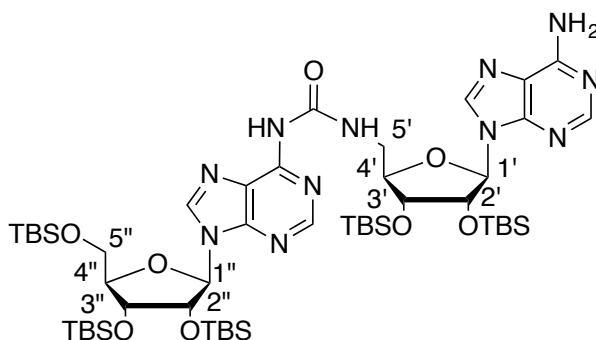
Adenosine **1** (100 mg, 0.163 mmol, 1 eq) was dissolved in pyridine (1.6 mL) and the mixture was cooled down to -10 °C. Ethyl chloroformate (47 μL, 0.489 mmol, 3 eq) was then added dropwise in the reaction. The reaction was stirred an additional hour at -10 °C and then was stirred overnight at room temperature. Pyridine was coevaporated with toluene and the crude was purified by silica gel chromatography (eluent : Cyclohexane/EtOAc 6 : 4) to provide the desired compound **33** as a white foam (57 mg, 51 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.76 (s, 1H, H2 or H8), 8.39 (s, 1H, H2 or H8), 6.09 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H1'), 4.64-4.62 (m, 1H, H2'), 4.35-4.31 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub><sup>Ethyl</sup>), 4.29-4.28 (m, 1H, H3'), 4.15-4.14 (m, 1H, H4'), 4.04-4.01 (m, 1H, H5'), 3.81-3.78 (m, 1H, H5'), 1.36-1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, Me<sup>Ethyl</sup>), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.15-0.13 (m, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (m, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.26 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 152.9 (C2 or C8), 151.0 (2 Cq), 149.4 (Cq), 141.6 (C2 or C8), 121.9 (C5), 88.6 (C1'), 85.8 (C4'), 76.2 (C2'), 72.0 (C3'), 62.6 (C5'), 62.3 (CH<sub>2</sub><sup>Ethyl</sup>), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 14.5 (Me<sup>Ethyl</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>31</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 704.3671; found: 704.3702

**1-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-3-(9-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)urea (**34**)**



**Chemical Formula:** C<sub>51</sub>H<sub>95</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1130.81 g.mol<sup>-1</sup>

**Conditions with carbamate **33**:**

The carbamate **33** (32 mg, 0.046 mmol, 1 eq) and the primary amine **31** (65 mg, 0.11 mmol, 2.3 eq) were dissolved in pyridine (1.6 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 16 h, and the solvent was co-evaporated with toluene three times. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 4:6) to provide the desired compound **34** as a white foam (39 mg, 74 %).

**Conditions with carbamate **35**:**

The carbamate **35** (35 mg, 0.051 mmol, 1 eq) and the primary amine **31** (60 mg, 0.10 mmol, 2 eq) were dissolved in pyridine (1.6 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 16 h, and the solvent was co-evaporated with toluene three times. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 4:6) to provide the desired compound **34** as a white foam (22 mg, 37 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 9.72-9.70 (m, 1H, NH-C5'), 8.34 (s, 1H, H2 or H8), 8.28 (s, 2H, H2 or H8), 8.10 (s, 1H, H2 or H8), 6.07 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H1''), 5.94 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, H1'), 4.60-4.58 (m, 1H, H2'), 4.36-4.34 (m, 1H, H2''), 4.29-4.28 (m, 2H, H3'' and H4'), 4.16-4.13 (m, 1H, H4''), 4.02-3.99 (m, 1H, H5''), 3.96-3.90 (m, 1H, H5'), 3.80-3.76 (m, 2H, H5'' and H5'), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 18H, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155.3 (C=O<sup>Urea</sup>), 154.4 (Cq or C2 or C8), 151.9 (Cq or C2 or C8), 151.1 (Cq or C2 or C8), 150.4 (Cq or C2 or C8), 150.0 (Cq or C2 or C8), 149.6 (Cq or C2 or C8), 141.5 (C2 or C8), 140.7 (C2 or C8), 120.6 (Cq), 120.1 (Cq), 89.4 (C1'), 88.4 (C1''), 85.8 (C4'), 84.7 (C4'), 76.3 (C2''), 74.6 (C2'), 73.6 (C3'), 72.1 (C3''), 62.6 (C5''), 41.8 (C5').

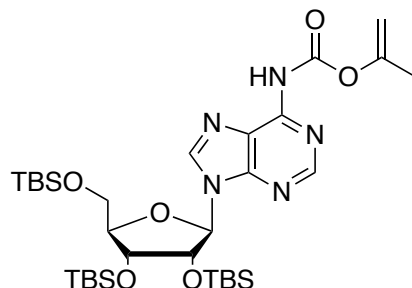


26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (6C, 2 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (2C, 2 Cq<sup>TBS</sup>), 18.00 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>51</sub>H<sub>95</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>8</sub>Si<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1152,6109; found 1152.6122.

**Prop-1-en-2-yl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**35**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>32</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 694.10 g.mol<sup>-1</sup>

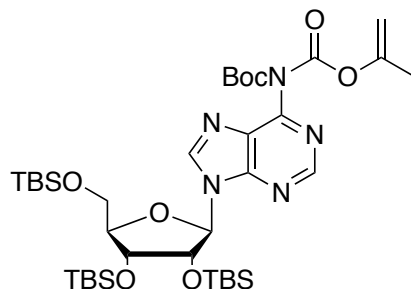
The adenosine **1** (500 mg, 0.819 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM (34 mL). Isopropenyl chloroformate (357  $\mu$ L, 3.27 mmol, 4 eq) and N-methylimidazole (522  $\mu$ L, 6.55 mmol, 8 eq) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 8:2) to provide the desired compound **35** as a white foam (430 mg, 75 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.76 (s, 1H, H2 or H8), 8.42 (bs, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, H2 or H8), 6.09 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, H1'), 4.87 (s, 1H, CH<sub>2</sub><sup>iso</sup>), 4.75 (s, 1H, CH<sub>2</sub><sup>iso</sup>), 4.67-4.65 (m, 1H, H2'), 4.31-4.30 (m, 1H, H3'), 4.15-4.14 (m, 1H, H4'), 4.02 (dd,  $J = 3.9, 11.4$  Hz, 1H, H5'), 3.81-3.78 (m, 1H, H5'), 2.05 (s, 3H, Me<sup>iso</sup>), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  152.9 (C2 or C8), 152.5 (Cq), 151.3 (Cq), 149.3 (Cq), 148.6 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 122.6 (Cq), 102.5 (CH<sub>2</sub><sup>iso</sup>), 88.6 (C1'), 85.8 (C4'), 76.1 (C2'), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 19.7 (CH<sub>3</sub><sup>iso</sup>), 18.7 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**Prop-1-en-2-yl (9-(3,4-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-N-tert-butyloxycarbonyl-purin-6-yl)carbamate (35b)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>3</sub>

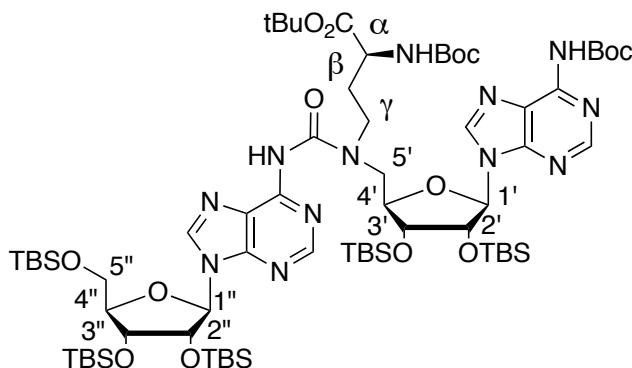
**Molecular Weight:** 794.22 g.mol<sup>-1</sup>

Adenosine **2** (428 mg, 0.602 mmol, 1 eq) was dissolved in pyridine (6.0 mL) and the mixture was cooled down to -10 °C. Isopropenyl chloroformate (197 μL, 1.8 mmol, 3 eq) was then added dropwise in the reaction. The reaction was stirred an additional hour at -10 °C and then was stirred overnight at room temperature. Pyridine was coevaporated with toluene and the crude was purified by silica gel chromatography (eluent : Cyclohexane/EtOAc 9 : 1) to provide the desired compound **35b** as a white foam (336 mg, 70 %).

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.88 (s, 1H, H2 or H8), 8.51 (s, 1H, H2 or H8), 6.14 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H1'), 4.76-73 (m, 2H, CH<sub>2</sub><sup>iso</sup>), 4.66-4.64 (m, 1H, H2'), 4.34-4.31 (m, 1H, H3'), 4.19-4.15 (m, 1H, H4'), 4.04 (dd, *J* = 2.6, 12.5 Hz, 1H, H5'), 3.82 (dd, *J* = 2.5, 10.0 Hz, 1H, H5'), 1.94 (s, 3H, Me<sup>iso</sup>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.96 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.15 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.26 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>8</sub>Si<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 816.4195; found 816.4157.

***tert*-Butyl 4-(3-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)-1-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl) amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)ureido)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)butanoate (**36**)**



**Chemical Formula:** C<sub>69</sub>H<sub>126</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1488.26 g.mol<sup>-1</sup>

The carbamate **35** (319 mg, 0.46 mmol, 1 eq) and the secondary amine **32** (391 mg, 0.46 mmol, 1 eq) were dissolved in pyridine (13.7 mL). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 16 h. The pyridine was co-evaporated with toluene three times. The crude product was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired compound **36** as a white foam (583 mg, 85 %).

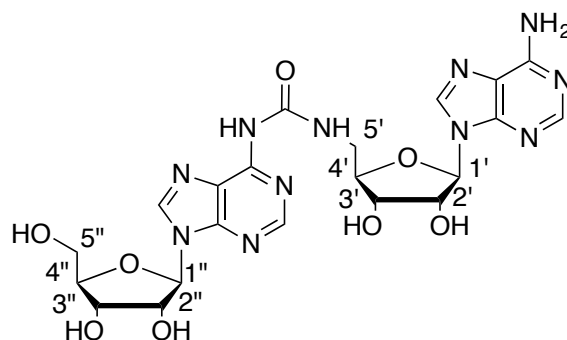
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.77 (s, 1H, H2 or H8), 8.46 (s, 1H, H2 or H8), 8.10 (s, 1H, H2 or H8), 7.79 (s, 1H, H2 or H8), 5.97-5.96 (m, 1H, H1''), 5.83 (s, 1H, H1'), 5.41 (bs, 1H, NH<sup>Boc</sup>), 5.03-4.92 (m, 2H, H2'' and H2'), 4.64 (bs, 1H, H3''), 4.36-4.28 (m, 2H, H4'' and H3'), 4.16-4.01 (m, 4H, Hα, H4', H5' and H5''), 3.80-3.73 (m, 2H, H5'' and Hγ), 3.57 (bs, 1H, H5'), 3.24 (bs, 1H, Hγ), 2.12 (bs, 1H, Hβ), 1.77 (bs, 1H, Hβ), 1.56 (s, 9H, *t*Bu), 1.42 (s, 18H, 2 *t*Bu), 0.97-0.92 (m, 27H, 3 *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.84 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.17 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.14-0.10 (m, 15H, 5 Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.25 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.41 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.3 (C=O), 155.9 (C=O), 153.7 (Cq), 152.6 (C2 or C8), 152.3 (C2 or C8), 150.9 (Cq), 150.8 (Cq), 149.9 (Cq), 149.7 (Cq), 143.2 (C2 or C8), 142.1 (C2 or C8), 139.5 (Cq), 123.4 (Cq), 123.3 (Cq), 91.1 (C1''), 89.3 (C1'), 85.8 (C4'), 84.8 (C4''), 82.3 (Cq), 82.2 (Cq), 79.8 (Cq), 74.3 (C2''), 73.9 (C3''), 73.6 (C2'), 72.5 (C3'), 62.8 (C5'), 52.6 (Cα), 50.6 (C5''), 45.3 (Cγ), 30.3 (Cβ), 28.5 (3C, *t*Bu), 28.3 (3C, *t*Bu), 28.1 (3C, *t*Bu), 27.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (3C, 3 Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>69</sub>H<sub>127</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1487.8441; found: 1487.8433.

**1-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-3-(9-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl) urea (37)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>11</sub>O<sub>8</sub>

**Molecular Weight:** 559,50 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **34** (59 mg, 0.05 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (1.2 mL) and NH<sub>4</sub>F (39 mg, 1.04 mmol, 20 eq) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h and a work up was performed with DCM and water. The aqueous layer was lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compound **37** as a white foam (5.3 mg, 18 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.52 (s, 1H, H2 or H8), 8.15 (s, 1H, H2 or H8), 7.9 (s, 1H, H2 or H8), 7.8 (s, 1H, H2 or H8), 6.17 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H1''), 6.06 (s, 1H, H1'), 4.98-4.94 (m, 2H, H2' and H3'), 4.87-4.85 (m, 1H, H2''), 4.51-4.49 (m, 1H, H3''), 4.36-4.31 (m, 2H, H4'' and H4'), 4.00-3.97 (m, 2H, H5' and H5''), 3.92-3.89 (m, 1H, H5''), 3.60-3.56 (m, 1H, H5'), 1.96 (s, 6H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

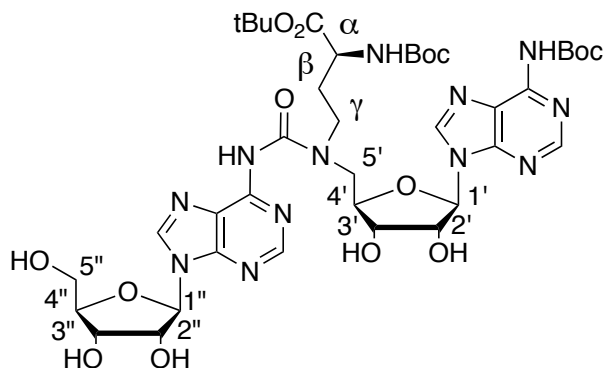
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 179.0 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 155.8 (C=O), 154.2 (C6), 152.0 (C2), 150.07 (C4), 149.4 (C6 or C2), 149.1 (C6 or C2), 148.2 (C4), 142.4 (C8), 141.1 (C8), 119.8 (C5), 118.0 (C5), 89.5 (C1'), 88.1 (C1''), 85.7 (C4''), 82.0 (C4'), 73.9 (C2''), 73.1 (C2'), 70.4 (C3''), 70.2 (C3'), 61.3 (C5''), 38.1 (C5'), 21.8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 582.1785; found: 582.1762.

**HPLC:** retention time: 16.7 min.

***tert*-Butyl 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-(1-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-((*tert*-butoxycarbonyl) amino)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-3-(9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)ureido)butanoate (**38**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>39</sub>H<sub>56</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>

**Molecular Weight:** 916,94 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **36** (583 mg, 0.392 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (9.4 mL). NH<sub>4</sub>F (20 eq) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. The solution was partitioned between DCM and brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) to afford the desired compound **38** as a white foam (79 mg, 22 %).

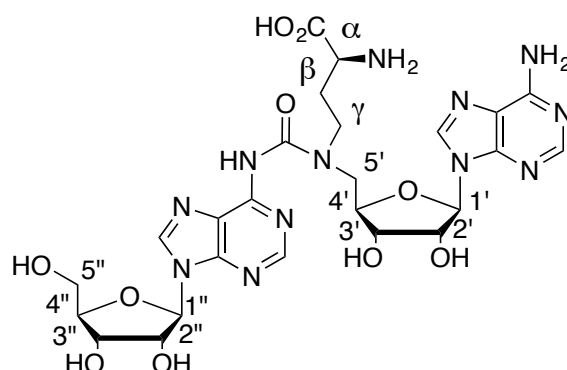
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 8.38 (s, 1H, H2 or H8), 8.36 (s, 1H, H2 or H8), 8.23 (bs, 1H, H2 or H8), 8.15 (bs, 1H, H2 or H8), 6.12-6.11 (m, 1H, H1''), 5.96-5.95 (m, 1H, H1'), 4.79 (H2'' and H3' masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O), 4.69-4.67 (m, 1H, H2'), 4.36-4.34 (m, 2H, H3' and H4''), 4.16-4.14 (m, 1H, H4'), 4.05 (bs, 2H, Hα and H5''), 3.90-3.87 (m, 2H, H5' and H5''), 3.78-3.75 (m, 1H, H5'), 3.63 (bs, 1H, Hγ), 3.56 (bs, 1H, Hγ), 2.20 (bs, 1H, Hβ), 2.00 (bs, 1H, Hβ), 1.57 (s, 9H, *t*Bu), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.42 (s, 9H, *t*Bu).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ 173.2 (C=O), 158.1 (C=O), 155.8 (C=O), 153.2 (Cq), 153.0 (C2 or C8), 152.4 (C2 or C8), 152.1 (Cq), 151.6 (Cq), 151.3 (Cq), 150.9 (Cq), 145.1 (C2 or C8), 143.5 (C2 or C8), 123.7 (Cq), 123.6 (Cq), 92.3 (C1''), 90.8 (C1'), 87.7 (C4'), 84.6 (C4''), 83.1 (Cq, *t*Bu), 82.8 (Cq, *t*Bu), 80.6 (Cq, *t*Bu), 75.6 (C2'), 75.0 (C2''), 72.2 (C3'), 72.1 (C3''), 63.1 (C5'), 54.1 (Cα), 50.9 (C5''), 47.0 (Cγ), 30.4 (Cβ), 28.7 (3C, *t*Bu), 28.5 (3C, *t*Bu), 28.3 (3C, *t*Bu).

**HRMS:** calcd for C<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 917.4117; found: 917.4115.

**2-Amino-4-(1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl) methyl)-3-(9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)ureido)butanoic acid (39)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>12</sub>O<sub>10</sub>

**Molecular Weight:** 660,60 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **38** (79 mg, 0.0861 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM (4 mL) and ZnBr<sub>2</sub> (15 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (1.7 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compound **39** as white foam (34 mg, 47 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 8.23 (s, 1H, H2 or H8), 8.16 (s, 1H, H2 or H8), 8.03 (s, 1H, H2 or H8), 7.76 (s, 1H, H2 or H8), 6.03 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H1''), 5.99-5.98 (m, 1H, H1'), 4.94-4.93 (m, 1H, H2'), 4.75-4.71 (m, 2H, H3' and H2''), 4.46-4.43 (m, 2H, H4' and H3''), 4.30-4.27 (m, 1H, H4''), 4.09-4.05 (m, 1H, H5'), 3.97-3.93 (m, 2H, H5' and H5''), 3.90-3.81 (m, 3H, H5'', H<sub>α</sub>, H<sub>γ</sub>), 3.57-3.50 (m, 1H, H<sub>γ</sub>), 2.42-2.35 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 2.25-2.19 (m, 1H, H<sub>β</sub>), 2.01 (s, 8H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

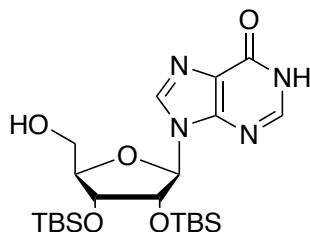
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 179.8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 174.0 (C=O), 155.7 (C=O), 154.2 (C<sub>q</sub>), 151.9 (C2 or C8), 151.1 (C2 or C8), 149.3 (2 C<sub>q</sub>), 148.1 (C<sub>q</sub>), 141.8 (C2 or C8), 141.3 (C2 or C8), 121.1 (C<sub>q</sub>), 118.2 (C<sub>q</sub>), 89.2 (C1'), 88.1 (C1''), 85.4 (C4''), 82.5 (C4'), 74.0 (C2''), 72.7 (C2'), 70.3 (2C, C3' and C3''), 61.2 (C5''), 52.5 (C<sub>α</sub>), 48.9 (C5'), 44.6 (C<sub>γ</sub>), 28.4 (C<sub>β</sub>), 22.3 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>12</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 661.2443, found 661.2438.

**HPLC:** retention time: 14.2 min.

**9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (40)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 496.75 g.mol<sup>-1</sup>

The trisilylated inosine **16** (2.19 g, 3.58 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (36 mL). Aqueous TFA 1:1 (27.4 mL, 179.2 mmol, 50 eq of TFA) was added at 0 °C and the reaction was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and diluted in ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc 1:9) to provide the desired compound **40** as a white foam (1.52 g, 85 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.13 (bs, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, H8 or H2), 7.96 (s, 1H, H2 or H8), 5.81 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H1'), 4.89-4.86 (m, 1H, H2'), 4.32 (m, 1H, H3'), 4.17 (s, 1H, H4'), 3.96-3.93 (m, 1H, H5'), 3.73-3.71 (m, 1H, H5'), 0.95 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.50 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

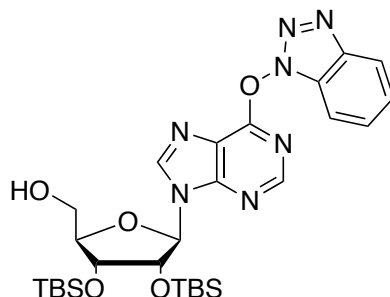
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 158.8 (Cq), 147.8 (Cq), 145.4 (C2 or C8), 141.1 (C2 or C8), 126.7 (Cq), 91.1 (C1'), 89.3 (C4'), 74.8 (C2'), 73.8 (C3'), 62.9 (C5'), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -5.6 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 495.2459; found: 495.2456.



**((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methanol (41)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 613.86 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **40** (1.51 g, 3.04 mmol, 1 eq) and BOP (2.7 g, 6.08 mmol, 2 eq) were dissolved in DMF (30 mL). DBU (909  $\mu$ L, 6.08 mmol, 2 eq) was then added to the reaction mixture dropwise at 0 °C and the reaction was stirred overnight at room temperature. A second addition of BOP (672 mg, 1.52 mmol, 0.5 eq) and DBU (227  $\mu$ L, 1.52 mmol, 0.5 eq) at 0 °C was done and the reaction was stirred 5 h more. The reaction was diluted with brine and EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent : cyclohexane/EtOAc 8 :2) to provide the desired compound **41** as a white foam (1.74 g, 93 %).

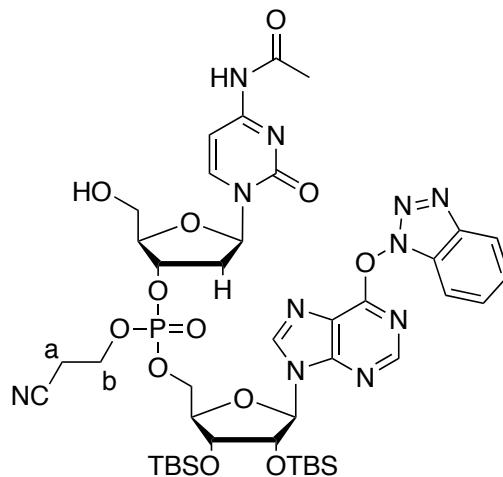
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.41 (s, 1H, H8 or H2), 8.24 (s, 1H, H2 or H8), 8.13-8.12 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.54-7.51 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.44-7.26 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.93 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H1'), 5.49-5.46 (m, 1H, OH), 4.98-4.96 (m, 1H, H2'), 4.34-4.33 (m, 1H, H3'), 4.18 (s, 1H, H4'), 3.94-3.91 (m, 1H, H5'), 3.73-3.69 (m, 1H, H5'), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.76 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.59 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.7 (Cq), 153.1 (Cq), 151.2 (C2 or C8), 145.5 (C2 or C8), 143.5 (Cq), 128.9 (C<sup>Ar</sup>), 128.8 (Cq), 125.0 (C<sup>Ar</sup>), 121.4 (Cq), 120.7 (C<sup>Ar</sup>), 108.6 (C<sup>Ar</sup>), 91.3 (C1'), 89.4 (C4'), 74.4 (C2'), 73.7 (C3'), 62.8 (C5'), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.6 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> : 636,2762; found: 636.2736.

**((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis ((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl ((2*R*,3*S*,5*R*)-5-(4-acetamido-2-oxypyrimidin-1(2*H*)-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl) (2-cyanoethyl) phosphate (42)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>42</sub>H<sub>60</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>PSi<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 998.15 g.mol<sup>-1</sup>

The commercial Ac-dC-PCNE phosphoramidite (250 mg, 0.324 mmol, 2.5 eq) was diluted in MeCN (350  $\mu$ L) in its vial and equipped with a magnetic stirrer. The benzotriazole derivative **41** (80 mg, 0.130 mmol, 1 eq) was diluted in MeCN (2 mL) and added to the phosphoramidite under argon atmosphere. A 0.45 M solution of tetrazole in MeCN (2.8 mL, 1.3 mmol, 10 eq) was then added slowly and the reaction was stirred for 1 h at room temperature. A 0.1 M solution of I<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O /Py / THF 2 : 20 : 75 (3.9 mL, 0.390 mmol, 3 eq) was added and the reaction was stirred for 30 min at room temperature. The reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with a saturated aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. A 0.18 M solution of trichloroacetic acid in DCM (7.2 mL, 1.3 mmol, 10 eq) was finally added to the resulting residue and the mixture was stirred at room temperature for 30 min, diluted in DCM and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent : DCM/MeOH 96:4) to provide the desired compound **42** as two diastereomers (ratio 5:5) as a white foam (89 mg, 68 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.49-8.47 (m, 1H, H2<sup>Ad</sup> or H8<sup>Ad</sup>), 8.41 (s, 1H, H2<sup>Ad</sup> or H8<sup>Ad</sup>), 8.30-8.25 (m, 1H, H6<sup>Cyt</sup>), 8.09-8.07 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.53-7.50 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.48-7.46 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.44-7.41 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.38-7.36 (m, 1H, H5<sup>Cyt</sup>), 6.19-6.16 (m, 1H, H1'<sup>Cyt</sup>), 6.05-6.04 (m, 1H, H1'<sup>Ad</sup>), 5.27-5.20 (m, 1H, H3'<sup>Cyt</sup>), 4.79-4.74 (m, 1H, H2'<sup>Ad</sup>), 4.52-4.47 (m, 1H, H5'<sup>Ad</sup>), 4.38-4.24 (m, 6H, H3'<sup>Ad</sup>, H4'<sup>Ad</sup>, H5'<sup>Ad</sup>, H4'<sup>Cyt</sup> and CH<sub>2</sub> b), 3.85-3.83 (m, 2H, H5'<sup>Cyt</sup>), 2.80-2.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub> a), 2.76-2.71 (m, 1H, H2'<sup>Cyt</sup>), 2.48-2.33 (m, 1H, H2'<sup>Cyt</sup>), 2.19 (s, 3H, Me<sup>Ac</sup>), 0.89 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.83-0.82 (m, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.03-0.02 (m, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.08--0.10 (m, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

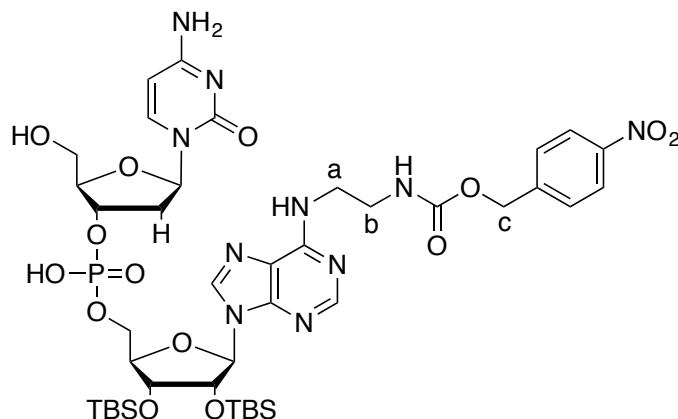
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171.2 (C=O), 162.9 (Cq), 159.2 (Cq), 155.8 (Cq), 153.7 (Cq), 151.6 (C2<sup>Ad</sup> or C8<sup>Ad</sup>), 145.3 (C6<sup>Cyt</sup>), 144.3 (Cq), 143.5 (C2<sup>Ad</sup> or C8<sup>Ad</sup>), 143.3 (Cq), 129.0 (C<sup>Ar</sup>), 125.1 (C<sup>Ar</sup>), 120.5 (C<sup>Ar</sup>), 120.1 (Cq), 116.7 (Cq), 108.8 (C<sup>Ar</sup>), 97.1 (C5<sup>Cyt</sup>), 90.1 (C1'<sup>Ad</sup>), 87.8 (C1'<sup>Cyt</sup>), 86.6 (C4'<sup>Ad</sup> or C4'<sup>Cyt</sup>), 82.5 (C4'<sup>Ad</sup> or C4'<sup>Cyt</sup>), 78.9 (C3'<sup>Cyt</sup>), 75.3 (C2'<sup>Ad</sup>), 71.2 (C3'<sup>Ad</sup>), 66.8 (C5'<sup>Ad</sup>), 62.9 (Cb), 61.4 (C5'<sup>Cyt</sup>), 39.9 (C2'<sup>Cyt</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 24.9 (Me<sup>Ac</sup>), 19.8 (Ca), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 14.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>31</sup>P NMR (<sup>1</sup>H, 202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -2.23, -2.55.

**HRMS:** calcd for C<sub>42</sub>H<sub>60</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>12</sub>PSi<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1020.3597; found: 1020.3574.

**4-Nitrobenzyl (2-((9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((((((2*R*,3*S*,5*R*)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2*H*)-yl)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl)oxy)(hydroxy)phosphoryl)oxy)methyl)-3,4-bis ((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)ethyl) carbamate (43)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>PSi<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 1007.15 g.mol<sup>-1</sup>

The dinucleotide **42** (88 mg, 0.088 mmol, 1 eq) and amine **4** (21 mg, 0.088 mmol, 1 eq) were dissolved in DMF (1.5 mL). DIPEA (184  $\mu$ L, 1.06 mmol, 12 eq) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h and concentrated. The crude was dissolved in a 5 M solution of MeNH<sub>2</sub> (3.52 mL, 17.6 mmol, 200 eq) in EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1. The reaction was stirred overnight at room temperature, concentrated and the residue was purified by HPLC to afford the desired compound **43** as a white foam (25 mg, 28 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  8.49 (s, 1H, H2<sup>Ad</sup> or H8<sup>Ad</sup>), 8.26-8.23 (m, 2H, H6<sup>Cyt</sup> and H2<sup>Ad</sup> or H8<sup>Ad</sup>), 8.18 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.53-7.51 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 6.23-6.21 (m, 1H, H1<sup>Cyt</sup>), 6.10-6.09 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, H1<sup>Ad</sup>), 5.99-5.97 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H5<sup>Cyt</sup>), 5.17 (s, 2H, Hc), 4.83 (H2<sup>Ad</sup> and H3<sup>Cyt</sup> masked in residual water peak), 4.45-4.44 (m, 1H, H3<sup>Ad</sup>), 4.22-4.12 (m, 4H, H4<sup>Ad</sup>, H4<sup>Cyt</sup> and H5<sup>Ad</sup>), 3.82-3.77 (m, 3H, H5<sup>Cyt</sup> and Ha), 3.45-3.43 (m, 3H, Ha and Hb), 2.63-2.60 (m, 1H, H2<sup>Cyt</sup>), 2.31-2.26 (m, 1H, H2<sup>Cyt</sup>), 0.98 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.19 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.16 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.02 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.32 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

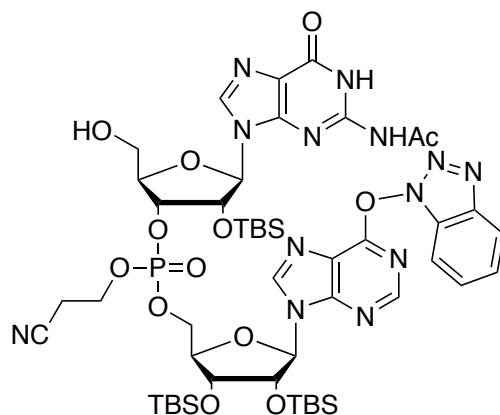
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD):**  $\delta$  163.3 (Cq), 158.6 (Cq), 156.3 (Cq), 153.8 (Cq), 151.9 (Cq), 148.9 (Cq), 146.1 (C2<sup>Ad</sup> or C8<sup>Ad</sup>), 145.1 (2C, C6<sup>Cyt</sup> and Cq), 141.0 (C2<sup>Ad</sup> or C8<sup>Ad</sup>), 129.0 (2C, C<sup>Ar</sup>), 124.5 (2C, C<sup>Ar</sup>), 120.6 (Cq), 95.1 (C5<sup>Cyt</sup>), 88.5 (C1<sup>Ad</sup>), 88.3 (C4<sup>Cyt</sup>), 87.8 (C1<sup>Cyt</sup>), 87.0 (C4<sup>Ad</sup>), 77.4 (C2<sup>Ad</sup> or C3<sup>Cyt</sup>), 75.9 (C2<sup>Ad</sup> or C3<sup>Cyt</sup>), 74.5 (C3<sup>Ad</sup>), 66.2 (C5<sup>Ad</sup>), 66.0 (Cc), 62.3 (C5<sup>Cyt</sup>), 41.7 (2C, Ca and Cb), 41.0 (C2<sup>Cyt</sup>), 26.4 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.7 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>41</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>PSi<sub>2</sub> [M-H]: 1005.3723; found: 1005.3755.

**HPLC retention time:** 28.3 min.

**((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl ((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-acetamido-6-oxo-1,6-dihydro-9*H*-purin-9-yl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-yl) (2-cyanoethyl) phosphate (44)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>49</sub>H<sub>74</sub>N<sub>13</sub>O<sub>13</sub>PSi<sub>3</sub>

**Molecular Weight:** 1168.43 g.mol<sup>-1</sup>

The commercial Ac-G-PCNE phosphoramidite (250 mg, 0.266 mmol, 2.5 eq) was diluted in MeCN (350  $\mu$ L) in its vial and equipped with a magnetic stirrer. The benzotriazole derivative **41** (65 mg, 0.106 mmol, 1 eq) was diluted in MeCN (2 mL) and added to the phosphoramidite under argon atmosphere. A 0.45 M solution of tetrazole in MeCN (2.4 mL, 1.1 mmol, 10 eq) was then added slowly and the reaction was stirred for 1 h at room temperature. A 0.1 M solution of I<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O / Py / THF 2 : 20 : 75 (3.2 mL, 0.318 mmol, 3 eq) was added and the reaction was stirred for 30 min at room temperature. The reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with a saturated aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. A 0.18 M solution of trichloroacetic acid in DCM (5.9 mL, 1.1 mmol, 10 eq) was finally added to the resulting residue and the mixture was stirred at room temperature for 30 min, diluted in DCM and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent : DCM/MeOH 96:4) to provide the desired compound **44** as two diastereomers (ratio 6:4) a white foam (70 mg, 57 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  10.42-10.33 (2  $\times$  s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.51-8.48 (2  $\times$  s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.12-8.10 (m, 1H), 8.02-7.92 (2  $\times$  s, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 7.49-7.44 (m, 2H), 6.08-6.03 (2  $\times$  d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.82-5.71 (2  $\times$  d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 5.20-5.12 (m, 1H), 5.05-4.99 (m, 1H), 4.89-4.80 (m, 1H), 4.53-4.50 (m, 1H), 4.42-4.30 (m, 6H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.81-3.78 (m, 1H), 2.83-2.78 (m, 2H), 2.36-2.32 (2  $\times$  s, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.86-0.84 (2  $\times$  s, 9H), 0.73-0.72 (2  $\times$  s, 9H), 0.13 (s, 3H), 0.11 (s, 3H), 0.05-0.03 (2  $\times$  s, 3H), -0.06 (s, 3H), -0.11 (s, 3H), -0.24- -0.27 (2  $\times$  s, 3H).

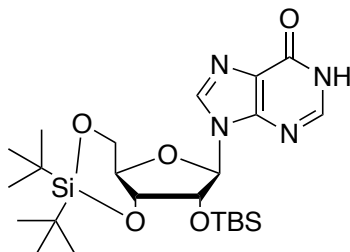
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 173.1-173.0, 159.3-159.2, 155.6, 153.6, 151.7, 148.0-147.9, 144.5, 144.2, 143.4, 143.2, 139.7, 129.0-128.9, 125.1, 121.8, 120.5, 120.1, 116.5, 108.6, 90.1, 89.2, 84.3, 82.3, 78.3, 75.1-74.8, 73.8-73.6, 71.5-71.1, 66.7, 62.7, 61.4, 29.7, 25.8 (3C), 25.7 (3C), 25.4 (3C), 24.3, 19.7, 18.0, 17.9, -4.3, -4.6-4.7, -4.7-4.8, -4.9, -5.1, -5.4.

**<sup>31</sup>P NMR (<sup>1</sup>H, 202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ -1.78, -1.89.

**HRMS:** calcd for C<sub>49</sub>H<sub>73</sub>N<sub>13</sub>O<sub>13</sub>PSi<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 1166.4496; found: 1166.4493.

**9-((4a*R*,6*R*,7*R*,7a*R*)-2,2-di-*tert*-Butyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-4*H*-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasilin-6-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (45)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 522.79 g.mol<sup>-1</sup>

Inosine (2.0 g, 7.45 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (20 mL) and di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate) (2.67 mL, 8.19 mmol, 1.1 eq) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 30 min at 0 °C and imidazole (2.53 g, 37.25 mmol, 5 eq) was added. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for an additional hour. Then *tert*butyl chloride (2.24 g, 14.9 mmol, 2 eq) and imidazole (1.01 g, 14.9 mmol, 2 eq) were added successively at 0 °C and the reaction was stirred at room temperature overnight. The reaction was diluted in EtOAc and washed five times with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired compound **45** as a white powder (4.4 g, quantitative yield).

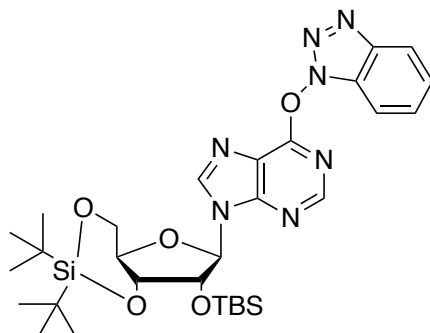
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 13.20 (bs, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, H8 or H2), 7.85 (s, 1H, H2 or H8), 5.92 (s, 1H, H1'), 4.53-4.52 (m, 1H, H2'), 4.49-4.46 (m, 1H, H5'), 4.35 (dd, *J* = 5.0, 9.7 Hz, 1H, H3'), 4.23-4.18 (m, 1H, H4'), 4.04-4.00 (m, 1H, H5'), 1.05 (s, 9H, *t*Bu), 1.02 (s, 9H, *t*Bu), 0.91 (s, 9H, *t*Bu), 0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 159.2 (Cq), 148.3 (Cq), 145.6 (C2 or C8), 138.2 (C2 or C8), 125.4 (Cq), 92.3 (C1'), 76.0 (C3'), 75.8 (C2'), 74.8 (C4'), 67.8 (C5'), 27.5 (3C, *t*Bu), 27.1 (3C, *t*Bu), 25.9 (3C, *t*Bu), 22.8 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), 20.4 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), 18.3 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 545.2591; found: 545.2600.

**6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9-((4*aR*,6*R*,7*R*,7*aR*)-2,2-di-*tert*-butyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-4*H*-furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxasiline-6-yl)-9*H*-purine (46)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 639.90 g.mol<sup>-1</sup>

The protected inosine **45** (243 mg, 0.465 mmol, 1 eq) and BOP (411 mg, 0.930 mmol, 2 eq) were dissolved in THF (4.7 mL). DBU (139  $\mu$ L, 0.930 mmol, 2 eq) was then added to the reaction mixture dropwise at 0 °C and the reaction was stirred overnight at room temperature. A second addition of BOP (103 mg, 0.232 mmol, 0.5 eq) and DBU (35  $\mu$ L, 0.232 mmol, 0.5 eq) at 0 °C was done and the reaction was stirred 5 h more. The reaction was diluted with brine and EtOAc. The organic layer was washed with brine and water, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent : cyclohexane/EtOAc 85:15) to provide the desired compound **46** as a white foam (211 mg, 71 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.41 (s, 1H, H8 or H2), 8.11 (s, 1H, H2 or H8), 8.14 (s, 1H, H<sup>OBT</sup>), 7.56-7.53 (m, 1H, H<sup>OBT</sup>), 7.49-7.45 (m, 2H, H<sup>OBT</sup>), 6.03 (s, 1H, H1'), 4.63 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, H2'), 4.53-4.50 (m, 1H, H5'), 4.44 (dd,  $J = 4.6, 9.6$  Hz, 1H, H3'), 4.30-4.24 (m, 1H, H4'), 4.06-4.02 (m, 1H, H5'), 1.07 (s, 9H, *t*Bu), 1.05 (s, 9H, *t*Bu), 0.94 (s, 9H, *t*Bu), 0.17 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.16 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

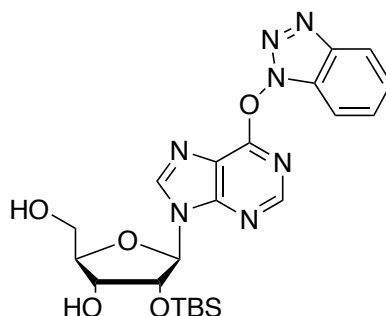
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.4 (Cq), 153.3 (Cq), 151.8 (C2 or C8), 143.7 (Cq), 143.2 (C2 or C8), 129.0 (Cq), 128.9 (C<sup>OBT</sup>), 125.0 (C<sup>OBT</sup>), 120.8 (C<sup>OBT</sup>), 120.4 (Cq), 108.8 (C<sup>OBT</sup>), 92.9 (C1'), 76.1 (C3'), 75.7 (C2'), 75.0 (C4'), 67.9 (C5'), 27.6 (3C, *t*Bu), 27.2 (3C, *t*Bu), 26.0 (3C, *t*Bu), 22.9 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), 20.5 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), 18.5 (Cq<sup>*t*Bu</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 640.3099; found: 640.3082.



**(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9*H*-purin-9-yl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3-ol (47)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si

**Molecular Weight:** 499.60 g.mol<sup>-1</sup>

Inosine **46** (200 mg, 0.312 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (4.4 mL) and HF.Py (65  $\mu$ L, 2.50 mmol, 8 eq) diluted in pyridine (111  $\mu$ L) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 15 min at room temperature then quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The mixture was diluted with DCM and the aqueous phase was extracted three times with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 4:6) to provide the desired compound **47** as a white powder (142 mg, 91 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.45 (s, 1H, H8 or H2), 8.20 (s, 1H, H2 or H8), 8.16-8.14 (m, 1H, H<sup>OBt</sup>), 7.57-7.54 (m, 1H, H<sup>OBt</sup>), 7.49-7.45 (m, 2H, H<sup>OBt</sup>), 5.91 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H1'), 5.09-5.07 (m, 1H, H2'), 4.39 (s, 1H, H4'), 4.37-4.36 (m, 1H, H3'), 3.87-3.89 (m, 1H, H5'), 0.83 (s, 9H, *t*Bu), -0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.33 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.8 (Cq), 153.0 (Cq), 151.5 (C2 or C8), 145.2 (C2 or C8), 143.6 (Cq), 129.0 (C<sup>OBt</sup>), 128.9 (Cq), 125.1 (C<sup>OBt</sup>), 121.5 (Cq), 120.8 (C<sup>OBt</sup>), 108.6 (C<sup>OBt</sup>), 91.5 (C1'), 87.7 (C4'), 74.7 (C2'), 72.7 (C3'), 63.3 (C5'), 25.6 (3C, *t*Bu), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

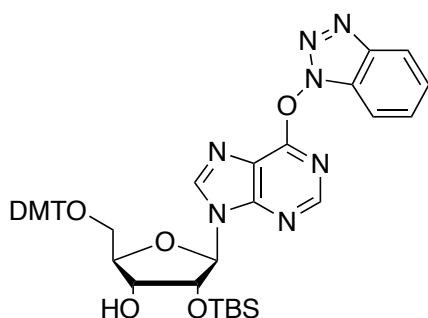
**HRMS:** calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 500.2078; found:500.2068.

**(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9*H*-purin-9-yl)-2-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) tetrahydrofuran-3-ol (48)**

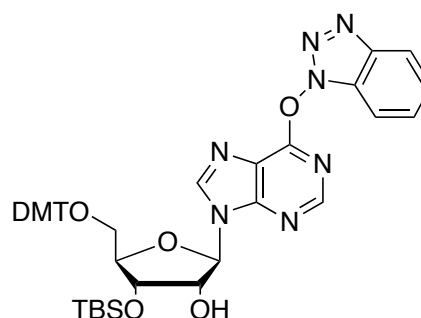
and

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-((1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9*H*-purin-9-yl)-5-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) tetrahydrofuran-3-ol (48b)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>Si  
**Molecular Weight:** 801.97 g.mol<sup>-1</sup>



**Chemical Formula:** C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>Si  
**Molecular Weight:** 801.97 g.mol<sup>-1</sup>

Route A: Inosine **47** (132 mg, 0.264 mmol, 1 eq) was dissolved in pyridine (2.0 mL). 4,4-Dimethoxytrityl chloride (98 mg, 0.290 mmol, 1.1 eq) and DMAP (32 mg, 0.264 mmol, 1 eq) were added at 0 °C and the reaction was stirred 2 h at room temperature. 4,4-Dimethoxytrityl chloride (98 mg, 0.290 mmol, 1.1 eq) was added again at 0 °C and the reaction was stirred for 2 h. The reaction was diluted with MeOH and concentrated. The crude was diluted in DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 8:2) to provide the desired compound **48** as a white foam (70 mg, 33 %).

Route B: Inosine **50** (700 mg, 1.02 mmol, 1 eq) and BOP (904 mg, 2.04 mmol, 2 eq) were dissolved in THF (10 mL). DBU (153 μL, 1.02 mmol, 1 eq) was then added to the reaction mixture dropwise at 0 °C and the reaction was stirred overnight at room temperature. The reaction was diluted with brine and EtOAc. The organic layer was washed with brine and water, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent : cyclohexane/EtOAc 8 :2) to provide the desired compound **48** and **48b** as a white foam (495 mg, 60 % for **48** and 163 mg, 20 % for **48b**).

Compound **48** :

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.35 (s, 1H, H8 or H2), 8.31 (s, 1H, H8 or H2), 8.13-8.11 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.54-7.51 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.47-7.44 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.43-7.41 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.32-7.30 (m, 3H, H<sup>Ar</sup>), 7.27-7.24 (m, 3H, H<sup>Ar</sup>), 7.21-7.19 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 6.81-6.79(m, 4H, H<sup>Ar</sup>), 6.13 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, H1'), 4.97-4.95 (m, 1H, H2'), 4.38-4.36 (m, 1H, H3'), 4.29-4.27 (m, 1H, H4'), 3.76

(s, 6H, 2 Me<sup>DMT</sup>), 3.52 (dd,  $J = 3.0, 10.7$  Hz, 1H, H5'), 3.42 (dd,  $J = 3.7, 10.7$  Hz, 1H, H5'), 0.83 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.00 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.13 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.3 (Cq), 158.8 (2C, Cq), 151.7 (Cq), 145.2 (Cq), 144.6 (Cq), 143.9 (C2 or C8), 143.7 (C2 or C8), 135.6 (Cq), 135.5 (Cq), 130.2 (4C, C<sup>DMT</sup>), 129.1 (C<sup>OBT</sup>), 128.2 (2C, C<sup>DMT</sup>), 128.1 (2C, C<sup>DMT</sup>), 127.2 (C<sup>DMT</sup>), 125.1 (C<sup>OBT</sup>), 125.0 (Cq), 120.8 (C<sup>OBT</sup>), 120.1 (Cq), 113.4 (4C, C<sup>DMT</sup>), 108.8 (C<sup>OBT</sup>), 88.9 (C1'), 87.0 (Cq<sup>DMT</sup>), 84.6 (C4'), 76.2 (C2'), 71.7 (C3'), 63.4 (C5'), 55.4 (2C, 2 Me<sup>DMT</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>43</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 802.3384; found: 802.3365.

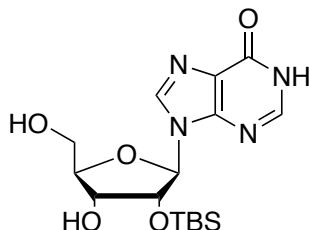
Compound **48b** :

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.28 (s, 1H, H8 or H2), 8.27 (s, 1H, H8 or H2), 8.02 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.42-7.28 (m, 5H, H<sup>Ar</sup>), 7.20-7.06 (m, 8H, H<sup>Ar</sup>), 6.68-6.70 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, H<sup>Ar</sup>), 6.01 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H1'), 4.71-4.68 (m, 1H, H2'), 4.51-4.49 (m, 1H, H3'), 4.13-4.11 (m, 1H, H4'), 3.66 (s, 6H, 2 Me<sup>DMT</sup>), 3.44 (dd,  $J = 3.0, 10.7$  Hz, 1H, H5'), 3.20 (dd,  $J = 3.7, 10.7$  Hz, 1H, H5'), 0.79 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.00 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.3 (Cq), 158.7 (2C, Cq), 153.9 (Cq), 151.6 (Cq), 144.4 (Cq), 144.0 (C2 or C8), 143.5 (C2 or C8), 135.6 (Cq), 135.5 (Cq), 130.1 (4C, C<sup>DMT</sup>), 128.8 (Cq), 128.1 (C<sup>OBT</sup>), 128.0 (2C, C<sup>DMT</sup>), 127.1 (2C, C<sup>DMT</sup>), 127.2 (C<sup>DMT</sup>), 125.0 (C<sup>OBT</sup>), 120.6 (C<sup>OBT</sup>), 120.2 (Cq), 113.3 (4C, C<sup>DMT</sup>), 108.8 (C<sup>OBT</sup>), 89.7 (C1'), 86.8 (Cq<sup>DMT</sup>), 84.8 (C4'), 74.7 (C2'), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 55.3 (2C, 2 Me<sup>DMT</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>).

**9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (49)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si

**Molecular Weight:** 382.49 g. mol<sup>-1</sup>

Inosine **45** (3.04 g, 5.82 mmol, 1 eq) was dissolved in THF (82 mL) and HF.Py (1.20 mL, 46.56 mmol, 8 eq) diluted in pyridine (2.1 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 15 min at room temperature then quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The mixture was diluted with DCM and the aqueous phase was extracted three times with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The reaction was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 85:15) to provide the desired compound **49** as a white powder (1.75 g, 78 %).

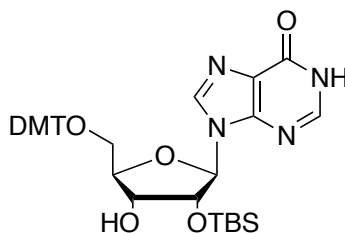
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):** δ 8.39 (s, 1H, H8 or H2), 8.12 (s, 1H, H8 or H2), 6.02 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H1'), 4.75-4.73 (m, 1H, H2'), 4.28-4.27 (m, 1H, H3'), 4.18-4.17 (m, 1H, H4'), 3.91-3.88 (m, 1H, H5'), 3.79-3.76 (m, 1H, H5'), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD):** δ 158.8 (Cq), 149.6 (Cq), 147.0 (C2 or C8), 141.1 (C2 or C8), 126.1 (Cq), 90.6 (C1'), 87.9 (C4'), 77.8 (C2'), 72.4 (C3'), 63.0 (C5'), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 405.1570; found: 405.1579.

**9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-hydroxytetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-one (50)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Si

**Molecular Weight:** 684.86 g.mol<sup>-1</sup>

Inosine **49** (178 mg, 0.465 mmol, 1 eq) was dissolved in pyridine (3.3 mL). 4,4-Dimethoxytrityl chloride (173 mg, 0.511 mmol, 1.1 eq) and DMAP (57 mg, 0.465 mmol, 1 eq) were added at 0 °C and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. 4,4-Dimethoxytrityl chloride (173 mg, 0.511 mmol, 1.1 eq) was added again at 0 °C and the reaction was stirred for 2 h. The reaction was diluted with MeOH and concentrated. The crude was diluted in DCM, washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH 96:4) to provide the desired compound **50** as an orange foam (252 mg, 79 %).

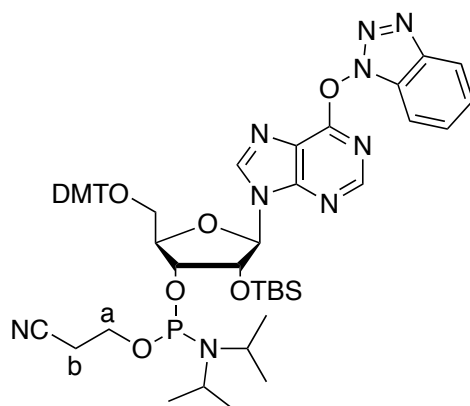
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.15 (s, 1H, H8 or H2), 8.10 (s, 1H, H8 or H2), 7.52-7.50 (m, 2H, H<sup>DMT</sup>), 7.41-7.39 (m, 4H, H<sup>DMT</sup>), 7.35-7.32 (m, 2H, H<sup>DMT</sup>), 7.29-7.27 (m, 1H, H<sup>DMT</sup>), 6.89-6.87 (m, 4H, H<sup>DMT</sup>), 6.08 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H1'), 4.96-4.94 (m, 1H, H2'), 4.40-4.38 (m, 1H, H3'), 4.33-4.32 (m, 1H, H4'), 3.84 (s, 6H, 2 Me<sup>DMT</sup>), 3.58-3.54 (m, 1H, H5'), 3.48-3.45 (m, 1H, H5'), 2.79 (bs, 1H, OH), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 159.3 (Cq), 158.7 (2C, Cq), 149.1 (Cq), 145.1 (C2 or C8), 144.6 (Cq), 139.0 (C2 or C8), 135.7 (Cq), 135.6 (Cq), 130.2 (4C, C<sup>DMT</sup>), 128.2 (2C, C<sup>DMT</sup>), 128.0 (2C, C<sup>DMT</sup>), 127.1 (C<sup>DMT</sup>), 125.2 (Cq), 113.3 (4C, C<sup>DMT</sup>), 88.3 (C1'), 86.8 (Cq<sup>DMT</sup>), 84.4 (C4'), 76.2 (C2'), 71.7 (C3'), 63.6 (C5'), 55.3 (2C, 2 Me<sup>DMT</sup>), 25.6 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 685.3058; found: 685.3044.

**(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-((1*H*-Benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)oxy)-9*H*-purin-9-yl)-2-((bis (4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite (**51**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>52</sub>H<sub>64</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>PSi

**Molecular Weight:** 1002.19 g.mol<sup>-1</sup>

The DMT-protected inosine **48** (495 mg, 0.617 mmol, 1 eq) was dissolved in degassed DCM (7.4 mL). The chlorophosphoramidite (550  $\mu$ L, 2.46 mmol, 4 eq) and DIPEA (430  $\mu$ L, 2.46, 4 eq) were added to the reaction at 0 °C. The solution was stirred overnight at room temperature, diluted in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The reaction was purified by silica gel chromatography neutralized with DIPEA (eluent : cyclohexane/EtOAc 7:3) to provide the two diastereoisomers **51** as a white foam (486 mg, 79 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.41-8.37 (2  $\times$  s, 1H, H8 or H2), 8.31-8.30 (2  $\times$  s, 1H, H8 or H2), 8.15-8.13 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.55-7.52 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.49-7.44 (m, 4H, H<sup>Ar</sup>), 7.37-7.33 (m, 4H, H<sup>Ar</sup>), 7.29-7.27 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.24-7.20 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 6.84-6.80 (m, 4H, H<sup>Ar</sup>), 6.16-6.09 (2  $\times$  d,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, H1'), 5.05-5.02 (m, 1H, H2'), 4.49-4.44 (2  $\times$  m, 1H, H3'), 4.43-4.38 (2  $\times$  m, 1H, H4'), 3.99-3.93 (m, 1H, Ha), 3.90-3.83 (m, 1H, Ha), 3.64-3.59 (m, 2H, CH<sup>ISOPROPYL</sup>), 3.58-3.53 (m, 1H, H5'), 3.40-3.34 (m, 1H, H5'), 2.69-2.59 (m, 2H, Hb), 1.21-1.17 (m, 6H, Me<sup>ISOPROPYL</sup>), 1.08-1.03 (m, 6H, Me<sup>ISOPROPYL</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.00--0.01 (2  $\times$  s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.16--0.17 (2  $\times$  s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

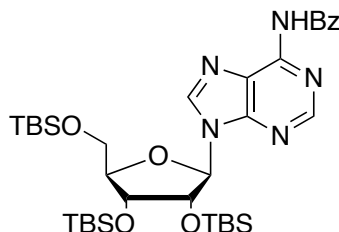
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  159.1 (Cq), 158.7 (2C, Cq), 154.1 (Cq), 151.5 (C2 or C8), 144.5-144.4 (Cq), 144.0 (C2 or C8), 143.5 (Cq), 135.6 (Cq), 135.5-135.4 (Cq), 130.2 (C<sup>OBT</sup>), 130.1 (4C, C<sup>DMT</sup>), 128.9-128.8 (Cq), 128.2-128.1 (2C, C<sup>DMT</sup>), 128.0-127.9 (2C, C<sup>DMT</sup>), 127.1 (C<sup>DMT</sup>), 124.8 (C<sup>OBT</sup>), 120.6 (C<sup>OBT</sup>), 120.1 (Cq), 117.5-117.3 (Cq), 113.3-113.2 (4C, C<sup>DMT</sup>), 108.7 (C<sup>OBT</sup>), 88.9-88.6 (C1'), 86.9-86.8 (Cq<sup>DMT</sup>), 84.4-84.0 (C4'), 75.6-74.9 (C2'), 73.4-72.7 (C3'), 63.3-63.1 (C5'), 58.8-58.7 (Ca), 55.3-55.2 (2C, 2 Me<sup>DMT</sup>), 43.5-43.0 (2C, 2 CH<sup>ISOPROPYL</sup>), 25.6 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 24.8-24.6 (4C, 4 Me<sup>ISOPROPYL</sup>), 20.5-20.1 (Cb), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 151.15, 149.28.

**HRMS:** calcd for C<sub>52</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>PSi [M+H]<sup>+</sup>: 1002.4463; found: 1002.4445.

***N*-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy) methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)benzamide (**52**)<sup>5</sup>**

---



**Chemical Formula:** C<sub>35</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>  
**Molecular Weight:** 714.1420 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **1** (2.0 g, 2.44 mmol, 1 eq), was dissolved in DCM/MeOH 4:1 (150 mL). Methylamine 33 % in EtOH (915  $\mu$ L, 7.32 mmol, 3 eq) was added dropwise at 0 °C. The reaction was stirred for 2 h at 0 °C and concentrated. Then it was dissolved in DCM and washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the combined organic layers were concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 7:3) to provide the desired compound **52** as a white foam (1.56 g, 89 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.81 (s, 1H, H8 or H2), 8.39 (s, 1H, H2 or H8), 8.05-8.04 (m, 2H, H<sup>Bz</sup>), 7.60-7.58 (m, 1H, H<sup>Bz</sup>), 7.53-7.50 (m, 2H, H<sup>Bz</sup>), 6.12 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H, H1'), 4.69-4.68 (m, 1H, H2'), 4.33-4.31 (m, 1H, H3'), 4.17-4.15 (m, 1H, H4'), 4.03 (dd,  $J = 4.0, 11.4$  Hz, 1H, H5'), 3.80 (dd,  $J = 2.8, 11.4$  Hz, 1H, H5'), 0.96 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.94 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.15 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.23 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  164.7 (C=O), 152.6 (C2 or C8), 151.7 (Cq), 149.6 (Cq), 142.06 (C2 or C8), 133.9 (Cq), 132.8 (C<sup>Bz</sup>), 128.9 (2C, C<sup>Bz</sup>), 128.0 (2C, C<sup>Bz</sup>), 123.1 (Cq), 88.6 (C1'), 85.8 (C4'), 76.1 (C2'), 72.1 (C3'), 62.6 (C5'), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>).

---

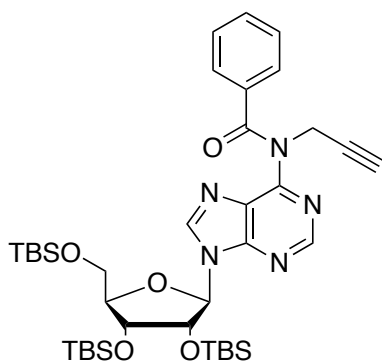
<sup>5</sup> M. J. Lambrecht, M. Brichacek, E. Barauskaite, A. Ariza, I. Ahel, P. J. Hergenrother, *J Am Chem Soc* **2014**, DOI : 10.1021/ja512528p



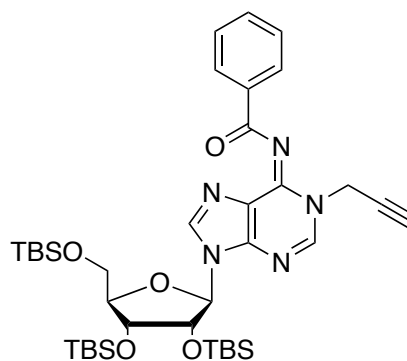
***N*-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide (**53**) and**

***N*-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-ylidene)benzamide (**54**)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>  
**Molecular Weight:** 752.19 g.mol<sup>-1</sup>



**Chemical Formula:** C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub>  
**Molecular Weight:** 752.19 g.mol<sup>-1</sup>

The trisilylated adenosine **52** (1.59 g, 2.22 mmol, 1 eq) and propargyl bromide (674  $\mu$ L, 8.88 mmol, 4 eq) were dissolved in DCM (50 mL), and tetrabutylammonium hydroxyde (1.78 g, 2.22 mmol, 1 eq) and 1M aqueous NaOH (22.2 mL) were added to the solution. After vigorous stirring of the mixture for 1 h at room temperature, the reaction was diluted in DCM and washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 9:1 then 7:3) to provide desired compounds as white foams (946 mg, 57 % for **53** and 475 mg, 28 % for **54**).

Compound **53**:

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  8.49 (s, 1H, H2), 8.14 (s, 1H, H8), 7.39-7.37 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.18-7.15 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.06-7.03 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.95 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H1'), 5.7 (d,  $J = 4.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.54-4.52 (m, 1H, H2'), 4.17-4.15 (m, 1H, H3'), 4.03-4.01 (m, 1H, H4'), 3.89 (dd,  $J = 4.4, 11.4$  Hz, 1H, H5'), 3.68 (dd,  $J = 2.8, 11.2$  Hz, 1H, H5'), 2.01 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1H, C $\equiv$ CH), 0.85 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.83 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.64 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.02 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.01 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.00 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.19 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.51 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  171.4 (C=O), 153.2 (C6), 152.8 (C4), 151.9 (C2), 142.8 (C8), 135.9 (C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>), 130.9 (C<sup>Ar</sup>), 128.9 (2C, C<sup>Ar</sup>), 127.9 (2C, C<sup>Ar</sup>), 127.0 (C5), 88.2 (C1'), 86.2 (C4'), 79.0 (C $\equiv$ CH), 75.8 (C2'), 72.4 (C3'), 71.7 (C $\equiv$ CH), 62.8 (C5'), 37.5 (CH<sub>2</sub>N), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 774.3878; found: 774.3904.

Compound **54**:

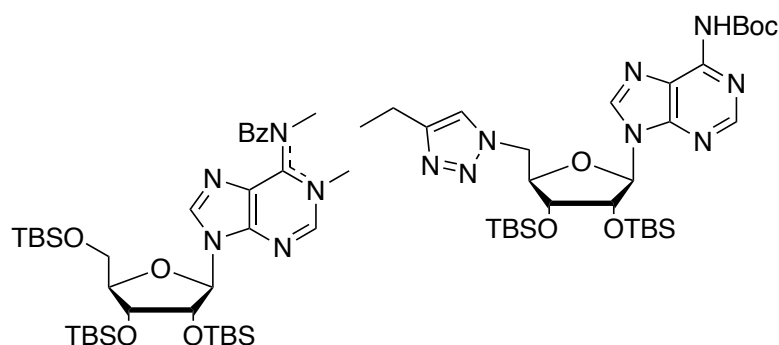
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.24 (s, 1H, H2), 8.16-8.15 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.88 (s, 1H, H8), 7.48-7.45 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.40-7.37 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.90 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H1'), 4.97 (t, *J* = 2.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.48-4.47 (m, 1H, H2'), 4.26-4.24 (m, 1H, H3'), 4.08-4.06 (m, 1H, H4'), 3.88 (dd, *J* = 4.0, 11.3 Hz, 1H, H5'), 3.73 (dd, *J* = 3.4, 11.4 Hz, 1H, H5'), 2.59 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, C≡CH), 0.92 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.89 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.81 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.19 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 177.2 (C=O), 146.1 (C6), 145.4 (C2), 145.1 (C4), 138.8 (C8), 135.8 (C<sub>q</sub><sup>Ar</sup>), 132.0 (C<sup>Ar</sup>), 129.9 (2C, C<sup>Ar</sup>), 128.1 (2C, C<sup>Ar</sup>), 122.3 (C5), 88.2 (C1'), 85.4 (C4'), 76.7 (C≡CH), 76.1 (C2'), 75.9 (C≡CH), 72.0 (C3'), 62.7 (C5'), 37.8 (CH<sub>2</sub>N), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 774.3878; found: 774.3911.

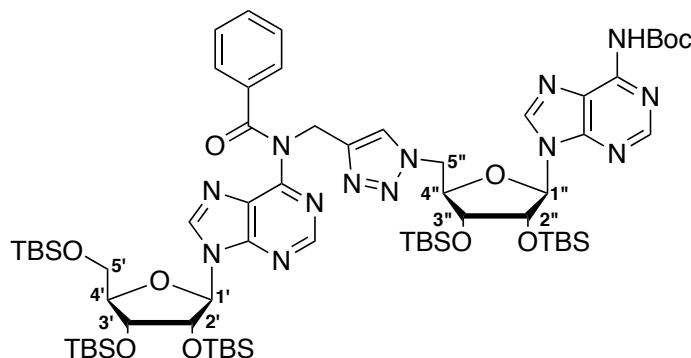
## Cycloaddition catalyzed with Cu<sup>I</sup>: General procedure

---



To a solution of alkyne **53** or **54** (2 eq), in THF (13 mL.mmol<sup>-1</sup>) was added the azido **30** (1eq). CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0.6 eq) was dissolved in water (3 mL.mmol<sup>-1</sup>) and added to the reaction mixture. Then sodium ascorbate (1.2) was dissolved in water (3 mL.mmol<sup>-1</sup>) and also added to the solution reaction. The reaction was stirred over night at room temperature, diluted in EtOAc and washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 7:3 for **55** and 6:4 for **56**) to provide the desired compounds as white foams.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((4-((*N*-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)benzamido) methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**55**)**



**Chemical Formula:** C<sub>65</sub>H<sub>109</sub>N<sub>13</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1373.09 g.mol<sup>-1</sup>

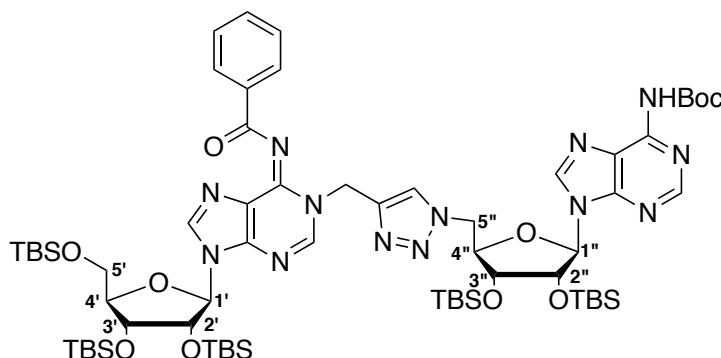
The compound **55** (384 mg, 68 %) was obtained from the alkyne **53** (578 mg, 0.77 mmol, 2 eq) and the azido **30** (277 mg, 0.38 mmol, 1 eq).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.75 (s, 1H, H8 or H2), 8.51 (s, 1H, H8 or H2), 8.19 (s, 1H, H8 or H2), 8.04 (bs, 1H, NH), 7.92 (bs, 1H, H8 or H2), 7.80 (s, 1H, CHN), 7.42-7.40 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.23-7.20 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.11-7.08 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.98 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.86 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H1''), 5.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.04-5.02 (m, 1H, H2''), 4.84 (dd, *J* = 6.3, 14.2 Hz, 1H, H5''), 4.61-4.57 (m, 2H, H5''' and H2'), 4.39-4.38 (m, 1H, H3''), 4.35-4.32 (m, 1H, H4''), 4.25-4.23 (m, 1H, H3'), 4.10-4.08 (m, 1H, H4'), 3.96 (dd, *J* = 4.4, 11.3 Hz, 1H, H5'), 3.75 (dd, *J* = 3.0, 11.4 Hz, 1H, H5'), 1.56 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.87 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 18H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.02 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), -0.43 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 172.1 (C=O), 153.7 (C2 or C8), 153.1 (Cq), 152.8 (Cq), 152.0 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.4 (Cq), 149.6 (Cq), 144.7 (Cq), 142.9 (C2 or C8), 142.6 (C2 or C8), 135.9 (Cq), 130.9 (C<sup>Ar</sup>), 129.0 (2C, C<sup>Ar</sup>), 127.9 (2C, C<sup>Ar</sup>), 127.3 (Cq<sup>Ar</sup>), 124.9 (CHN), 122.9 (Cq), 89.8 (C1''), 88.3 (C1'), 86.0 (C4'), 84.2 (C4''), 82.4 (Cq<sup>Boc</sup>), 75.8 (C2'), 73.4 (C3''), 73.1 (C2''), 72.2 (C3'), 62.7 (C5'), 51.7 (C5''), 44.0 (CH<sub>2</sub>N), 28.3 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.2 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (6C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (2C, Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (3C, 3 Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>65</sub>H<sub>108</sub>N<sub>13</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 1370.7188; found: 1370.7132.

***tert*-Butyl (9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((4-(((*Z*)-6-(benzoylimino)-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-6,9-dihydro-1*H*-purin-1-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)carbamate (**56**)**



**Chemical Formula:** C<sub>65</sub>H<sub>109</sub>N<sub>13</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1373.09 g.mol<sup>-1</sup>

The compound **56** (37 mg, 89 %) was obtained from the alkyne **54** (45 mg, 0.059 mmol, 2 eq) and the azido **30** (19 mg, 0.03 mmol, 1 eq).

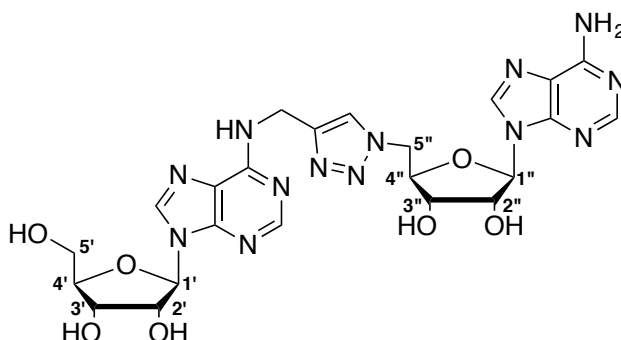
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.67 (s, 1H, H<sub>8</sub> or H<sub>2</sub>), 8.30 (s, 1H, H<sub>8</sub> or H<sub>2</sub>), 7.97 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.85 (s, 1H, H<sub>8</sub> or H<sub>2</sub>), 7.78 (s, 1H, H<sub>8</sub> or H<sub>2</sub>), 7.77 (s, 1H, CHN), 7.46-7.43 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.36-7.32 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.85 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>), 5.78 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>1''</sub>), 5.44 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 5.36 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>N), 5.12 (m, 1H, H<sub>2''</sub>), 4.87 (dd, *J* = 5.2, 14.3 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>), 4.70 (dd, *J* = 7.3, 14.2 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>), 4.48-4.47 (m, 1H, H<sub>3''</sub>), 4.46-4.44 (m, 1H, H<sub>2'</sub>), 4.37-4.34 (m, 1H, H<sub>4''</sub>), 4.24-4.23 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 4.07-4.05 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 3.87 (dd, *J* = 4.0, 11.3 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 3.71 (dd, *J* = 3.3, 11.3 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 1.57 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.89 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.87 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.07 (s, 6H, Me<sup>TBS</sup>), 0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.02 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.08 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.18 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.39 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 176.8 (C=O), 152.9 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 150.3 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 149.6 (C=O), 146.7 (2C, C<sub>q</sub>), 145.4 (C<sub>q</sub>), 142.6 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 141.9 (C<sub>q</sub>), 139.0 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 135.6 (C<sub>q</sub>), 131.9 (C<sup>Ar</sup>), 129.7 (2C, C<sup>Ar</sup>), 128.1 (2C, C<sup>Ar</sup>), 125.6 (CHN), 122.8 (C<sub>q</sub>), 122.6 (C<sub>q</sub>), 90.4 (C<sub>1''</sub>), 88.5 (C<sub>1'</sub>), 85.1 (C<sub>4'</sub>), 83.6 (C<sub>4''</sub>), 82.5 (C<sub>q</sub><sup>Boc</sup>), 76.0 (C<sub>2'</sub>), 73.5 (C<sub>3''</sub>), 73.3 (C<sub>2''</sub>), 71.7 (C<sub>3'</sub>), 62.6 (C<sub>5'</sub>), 51.9 (C<sub>5''</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>N), 28.2 (3C, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>65</sub>H<sub>108</sub>N<sub>13</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>5</sub> [M-H]: 1370.7188; found: 1370.7138.

**(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-5-(((4-(((9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (57)**

---



**Chemical Formula:** C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>13</sub>O<sub>7</sub>

**Molecular Weight:** 597.55 g.mol<sup>-1</sup>

Protected compound **55** (768 mg, 0.56 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM/MeOH 4:1 (10 mL) and MeNH<sub>2</sub> 33 % in EtOH (3.6 mL, 28.0 mmol, 50 eq) was added at 0 °C to the solution. The reaction was stirred at room temperature overnight, then diluted in DCM and washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the debenzoylated compound as a white foam.

The residue was then dissolved in DCM (1.4 mL) and ZnBr<sub>2</sub> (686 mg, 2.80 mmol, 5 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (5.8 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 3:7 then DCM/MeOH 9:1) to afford a yellow powder.

The resulting compound was engaged in the last deprotection step and was dissolved in MeOH (10 mL) and CsF (8.5 g, 112 mmol, 100 eq) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, concentrated and diluted in water. The residue was purified by HPLC to afford the desired compound **57** as a white foam (17 mg, 5% over 3 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 8.35 (s, 1H, H2 or H8), 8.26 (bs, 1 H, NH), 8.23 (s, 1H, H2 or H8), 8.19 (s, 1H, H2 or H8), 8.14 (s, 1H, H2 or H8), 7.81 (s, 1H, CHN), 7.28 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.90-5.89 (m, 2H, H1' and H1''), 5.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, OH2''), 5.43-5.41 (m, 2H, OH2' and OH3''), 5.36-5.34 (m, 1H, OH5'), 5.16 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH3'), 4.74-4.67 (m, 4H, H5'' and CH<sub>2</sub>N), 4.67-4.63 (m, 1H, H2''), 4.63-4.60 (m, 1H, H2'), 4.25-4.20 (m, 2H, H4'' and H3''), 4.16-4.14 (m, 1H, H3'), 3.97-3.95 (m, 1H, H4'), 3.69-3.65 (m, 1H, H5'), 3.58-3.53 (m, 1H, H5').

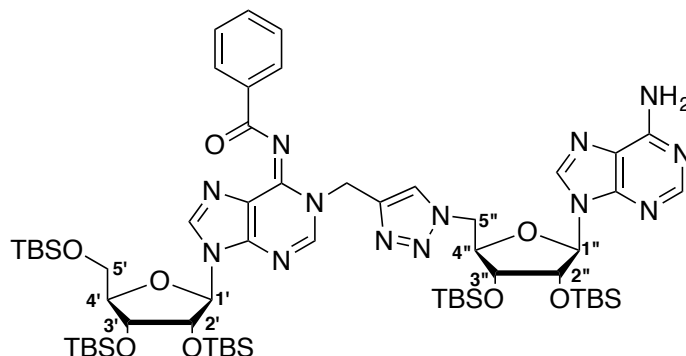
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO):** δ 156.1 (Cq), 154.2 (Cq), 152.6 (C2 or C8), 152.2 (C2 or C8), 149.3 (Cq), 148.5 (Cq), 145.3 (Cq), 139.9 (C2 or C8), 139.8 (C2 or C8), 123.6 (CHN), 119.8

(Cq), 119.2 (Cq), 87.9 (C1' or C1''), 87.7 (C1' or C1''), 85.8 (C4'), 82.5 (C4''), 73.4 (C2'), 72.5 (C2''), 71.0 (C3''), 70.6 (C3'), 61.6 (C5'), 51.3 (C5''), 35.3 (CH<sub>2</sub>N).

**HRMS:** calcd for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>13</sub>O<sub>7</sub> [M-H]: 596.2078; found: 596.2065.

**HPLC retention time:** 12.3 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN 100 : 0 → 0 : 100 in 30 min).

***N*-((*E*)-1-((1-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-ylidene)benzamide (**58**)**



**Chemical Formula:** C<sub>60</sub>H<sub>101</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>5</sub>

**Molecular Weight:** 1272.97 g.mol<sup>-1</sup>

Protected compound **56** (107 mg, 0.08 mmol, 1 eq) was dissolved in DCM (1 mL) and ZnBr<sub>2</sub> (95 mg, 0.40 mmol, 5 eq) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: Cyclohexane/EtOAc 2:8) to afford compound **58** as a white foam (52 mg, 50%).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.26 (s, 1H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.20 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 7.95 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.83 (s, 1H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 7.75 (s, 1H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 7.59 (s, 1H, CHN), 7.44-7.41 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.31 (t, *J* = 15.0 Hz, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.89 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.84 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>1'</sub>), 5.73 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>1''</sub>), 5.36 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.10 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>2''</sub>), 4.84-4.74 (m, 2H, H<sub>5''</sub>), 4.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H<sub>3''</sub>), 4.45 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>2''</sub>), 4.37-4.34 (m, 1H, H<sub>4''</sub>), 4.23 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 4.05 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>), 3.87 (dd, *J* = 5.0, 10.0 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>), 3.70 (dd, *J* = 5.0, 10.0 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 0.91 (s, 9H, *t*Bu<sup>Boc</sup>), 0.90 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.86 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.79 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9H, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 6H, 2 Me<sup>TBS</sup>), 0.04 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), 0.03 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.19 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>), -0.34 (s, 3H, Me<sup>TBS</sup>).

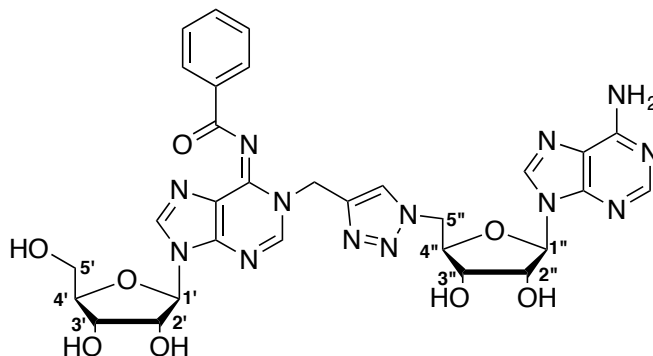
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 177.0 (C=O), 155.8 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 152.9 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 146.6 (2C, C<sub>q</sub>), 145.2 (C<sub>q</sub>), 141.8 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 140.7 (C<sub>q</sub>), 138.8 (C<sub>2</sub> or C<sub>8</sub>), 135.2 (C<sub>q</sub>), 131.8 (C<sup>Ar</sup>), 129.7 (2C, C<sup>Ar</sup>), 128.0 (2C, C<sup>Ar</sup>), 125.6 (CHN), 122.5 (C<sub>q</sub>), 121.0 (C<sub>q</sub>), 90.4 (C<sub>1''</sub>), 88.5 (C<sub>1'</sub>), 85.1 (C<sub>4'</sub>), 83.3 (C<sub>4''</sub>), 75.9 (C<sub>2'</sub>), 73.4 (2C, C<sub>2''</sub> and C<sub>3''</sub>), 71.4 (C<sub>3'</sub>), 62.6 (C<sub>5'</sub>), 51.8 (C<sub>5''</sub>), 43.6 (CH<sub>2</sub>N), 26.1 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3C, *t*Bu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3



(Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (2C, Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>).

**HRMS:** calcd for C<sub>60</sub>H<sub>102</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1272,6821; found: 1272.6789.

***N*-1-((1-(((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-9-((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-ylidene)benzamide (**59**)**



**Chemical Formula:** C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub>  
**Molecular Weight:** 701.66 g.mol<sup>-1</sup>

Compound **58** (52 mg, 0.04 mmol, 1 eq) was dissolved in MeOH (5 mL) and CsF (1.2 g, 8 mmol, 200 eq) was added. The reaction mixture was stirred at reflux for 24 h, concentrated and diluted in water. The residue was purified by HPLC to afford the desired compound **59** as a white foam (7 mg, 25%).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD):** δ 8.53 (s, 1H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 8.06 (s, 1H, H2 or H8), 7.90 (s, 2H, H2 or H8 and CHN), 7.83-7.81 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 7.45-7.42 (m, 1H, H<sup>Ar</sup>), 7.33-7.30 (m, 2H, H<sup>Ar</sup>), 5.96 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H1'), 5.90 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H1''), 5.43 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N), H5'' masked in the residual pick of water, 4.64-4.60 (m, 2H, H2'' and H2'), 4.47 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, H3''), 4.37-4.34 (m, 1H, H4''), 4.32-4.30 (m, 1H, H3'), 4.11 (q, *J* = 3.3 Hz, 1H, H4'), 3.83 (dd, *J* = 5.0, 15.0 Hz, 1H, H5'), 3.74 (dd, *J* = 5.0, 15.0 Hz, 1H, H5').

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD):** δ 178.8 (C=O), 157.2 (C2 or C8), 153.7 (C2 or C8), 149.2 (Cq), 148.5 (Cq), 146.9 (Cq), 143.3 (Cq), 141.5 (C2 or C8), 141.2 (Cq), 136.7 (C2 or C8), 133.2 (Cq), 130.6 (C<sup>Ar</sup>), 129.1 (2C, C<sup>Ar</sup>), 129.0 (2C, C<sup>Ar</sup>), 127.0 (CHN), 123.2 (Cq), 120.6 (Cq), 91.0 (C1'), 90.4 (C1''), 87.4 (C4'), 83.4 (C4''), 76.0 (C2'), 74.5 (C2''), 72.2 (C3''), 72.0 (C3'), 62.8 (C5'), 52.4 (C5''), 45.0 (CH<sub>2</sub>N).

**HRMS:** calcd for C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 702,2497; found: 702.2470.



## Bibliographie



## Bibliographie

- (1) G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology 3rd Edition*, Chap.7 RNA Structure and Function, RSC Publishing **2006**, 253-290 ; b) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Biologie moléculaire de la cellule 5<sup>ème</sup> Edition*, Chap. 6 Les cellules lisent le génome : de l'ADN aux protéines, Lavoisier **2011**, 329-410
- (2) M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Curr Opin Struct Biol* **2003**, *13*, 334-340
- (3) a) H. Madhani, C. Guthrie, *Ann Rev Genet* **1994**, *28*, 1-26 ; b) C. M. Smith, J. A. Steitz, *Cell* **1997**, *89*, 669-672 ; c) J. C. Kurz, C. A. Fierke, *Curr Opin Chem Biol* **2000**, *4*, 553-558
- (4) a) P. Nelson, M. Kiriakidou, A. Sharma, E. Maniatakis, Z. Mourelatos, *Trends Biochem Sci* **2003**, *28*, 534-540 ; b) G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244-251
- (5) K. Nagai, C. Oubridge, A. Kuglstatter, E. Menichelli, C. Isel, L. Jovine, *EMBO J* **2003**, *22*, 3479-3485
- (6) Y. Motorin, M. Helm, *WIREs RNA* **2011**, *2*, 611-631
- (7) L. Fu, C. R. Guerrero, N. Zhong, N. J. Amato, Y. Liu, S. Liu, Q. Cai, D. Ji, S ; G. Jin, L. J. Niedernhofer, G. P. Pfeifer, G. L. Xu, Y. Wang, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 11582-11585
- (8) X. Li, S. Ma, C. Yi, *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *33*, 108-116
- (9) J. J. Dalluge, T. Hashizume, A. E. Sopchik, J. A. McCloskey, D. R. Davis, *Nucleic Acids Res* **1996**, *15*, 1073-1079
- (10) A. Noma, Y. Kirino, Y. Ikeuchi, T. Suzuki, *EMBO J* **2006**, *25*, 2142-2154
- (11) H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz, *Angew Chem Int Ed* **1975**, *14*, 255-256
- (12) a) <http://mods.rna.albany.edu>; b) <http://modomics.genesilico.pl>
- (13) W. A. Cantara, P. F. Crain, J. Rozenski, J. A. McCloskey, K. A. Harris, X. Zhang, F. A. P. Vendeix, D. Fabris, P. F. Agris, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, D195-D201
- (14) S. Kirchner, Z. Ignatova, *Nat Rev Genet* **2015**, *16*, 98-112
- (15) I. A. Roundtree, M. E. Evans, T. Pan, C. He, *Cell* **2017**, *169*, 1187-1200
- (16) J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry Fifth Edition*, Transfer RNA molecules have a common design **2002**, 29.1.2
- (17) T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Muller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51*, 7110-7131
- (18) P. F. Agris, *EMBO Rep* **2008**, *9*, 629-635
- (19) J. W. Stuart, K. M. Koshlap, R. Guenther, P. F. Agris, *J Mol Biol* **2003**, *334*, 901-918
- (20) Y. Motorin, M. Helm, *Biochemistry* **2010**, *49*, 4934-4944
- (21) M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13338-13346
- (22) T. Muramatsu, S. Yokoyama, N. Horie, A. Matsuda, T. Ueda, Z. Yamaizumi, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa, *J Biol Chem* **1988**, *263*, 9261-9267
- (23) T. Muramatsu, K. Nishikawa, F. Nemoto, Y. Kuchino, S. Nishimura, T. Miyazawa, S. Yokoyama, *Nature* **1988**, *336*, 179-181
- (24) W. A. Decatur, M. J. Fournier, *Trends Biochem* **2002**, *27*, 344-351

- (25) K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma, K. D. Entian, D. L. J. Lafontaine, M. T. Bohnsack, *RNA Biol* **2016**, *14*, 1138-1152
- (26) J. Esguerra, J. Warringer, A. Blomberg, *RNA* **2008**, *14*, 649-656
- (27) A. Baudin-Baillieu, C. Fabret, X. H. Liang, D. Piekna-Przybylska, M. J. Fournier, J. P. Rousset, *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 7665-7677
- (28) I. Topisirovic, Y. V. Svitkin, N. Sonenberg, A. J. Shatkin, *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011, *2*, 277-298
- (29) a) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kiupec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* **2012**, *485*, 201-206 ;  
b) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C.E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* **2012**, *149*, 1635-1646
- (30) X. Li, X. Xiong, K. Wang, L. Wang, X. Shu, S. Ma, C. Yi, *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 311-316
- (31) J. E. Squires, H. R. Patel, M. Nusch, T. Sibbritt, D. T. Humphreys B. J. Parker, C. M. Suter, T. Preiss, *RNA Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 5023-5033
- (32) B. Delatte, F. Wang, L. V. Ngoc, E. Collignon, E. Bovin, R. Deplus, E. Calonne, B. Hassabi, P. Putmans, S. Awe, C. Wetzel, J. Kreher, R. Soin, C. Creppe, P. A. Limbach, C. Guezdan, V. Kruys, A. Brehm, S. Minkhina, M. Defrance, R. Steward, F. Fuks, *Science* **2016**, *351*, 282-285
- (33) T. M. Carlile, M. F. Rojas-Duran, B. Zinshteyn, H. Shin, K. M. Bartoli, W. V. Gilbert, *Nature* **2014**, *515*, 143-146
- (34) E. Y. Levanon, E. Eisenberg, R. Yelin, S. Nemzer, M. Halleger, R. Shemesh, Z. Y. Fligelman, A. Shoshan, S. R. Pollock, D. Sztybel, M. Olshansky, G. Rechavi, M. F. Jantsch, *Nat Biotechnol* **2014**, *515*, 143-146
- (35) I. A. Roundtree, M. E. Evans, T. Pan, C. He, *Cell* **2017**, *169*, 1187-1200
- (36) C. R. Alarcon, H. Goodarzi, H. Lee, X. Liu, S. Tavazoie, S. F. Tavazoie, *Cell* **2015**, *162*, 1299-1308
- (37) S. Ke, E. A. Alemu, C. Mertens, E. C. Gantman, J. J. Fak, A. Mele, B. Haripal, I. Zucker-Scharff, M. J. Moore, C.Y. Park, C. B. Vagbo, A. Kussnierczyk, A. Klungland, J. E. Darnell, R. B. Darnell, *Genes Dev* **2015**, *29*, 2037-2053
- (38) G. Zheng, J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C. M. Huang, C. J. Li, C. B. Vagbo, Y. Shi, W. L. Wang, S. H. Song, Z. Lu, R. P. Bosmans, Q. Dai, Y. J. Hao, X. Yang, W. M. Zhao, W.M Tong, X. J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. E. Krokan, A. Klungland, Y. G. Yang, C. He, *Mol Cell* **2013**, *49*, 18-29
- (39) X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, *Nature* **2014**, *505*, 117-120
- (40) S. Geula, S. Moshitch-Moshkovitz, D. Dominissini, A. A. Mansour, N. Kol, M. Salmon-Divon, V. Hershkovitz, E. Peer, N. Mor, Y. S. Manor, M. S. Ben-Haim, E. Eyal, S. Yunger, Y. Pinto, D. A. Jaitin, S. Viukov, Y. Rais, V. Krupalnik, E. Chomsky, M. Zerbib, I. Maza, Y. Rechavi, R. Massarwa, S. Hanna, I. Amit, E. Y. Levanon, N. Amariglio, N. Stern-Ginossar, N. Novershtern, G. Rechavi, J. H. Hanna, *Science* **2015**, *347*, 1002-1006
- (41) X. Wang, B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 1388-1399
- (42) M. Fontecave, M. Atta, E. Mulliez, *Trends in Biochemical Sciences* **2004**, *29*, 243-249
- (43) G. D. Markham, E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *J Biol Chem* **1980**, *255*, 9082-9092

- (44) J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr Opin Struct Biol* **2002**, *12*, 783-793
- (45) J. B. Broderick, B. R. Duffus, K. S. Duschene, E. M. Shepard, *Chem Rev* **2014**, *114*, 4229-4317
- (46) S. W. Ragsdale, *Vitam Horm Chap 10 : Catalysis of Methyl Group Transfers Involving Tetrahydrofolate and B<sub>12</sub>* **2008**, *79*, 293-317
- (47) a) X. Cheng, S. Kumar, J. Posfai, J.W. Pflugrath, R.J. Roberts, *Cell* **1993**, *74*, 299-307 ; b) J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr Opin Struct Biol* **2002**, *12*, 783-793
- (48) H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, *28*, 329-335
- (49) V. Anantharaman, E. V. Koonin, L. Aravind, *J Mol Microbiol Biotechnol* **2002**, *4*, 71-75
- (50) A. Jeltsch, *Biol Chem* **2001**, *382*, 707-710
- (51) L. D. Moore, T. Le, G. Fan, *Neuropsychopharmacology Rev* **2013**, *38*, 23-38
- (52) N. C. Parashar, G. Parashar, H. Nayyar, R. Sandhir, *Biochimie* **2018**, *144*, 56-62
- (53) Q. Du, Z. Wang, V. L. Schramm, *PNAS* **2016**, *113*, 2916-2921
- (54) P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat Rev Genet* **2002**, *3*, 415-428
- (55) a) D. Y. Lee, C. Teyssier, B. D. Strahl, M. R. Stallcup, *Endocrine Reviews* **2005**, *26*, 147-170, b) J. Murn, Y. Shi, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, *18*, 517-527
- (56) A. Di Lorenzo, M. T. Bedford, *FEBS Letters* **2011**, *585*, 2024-2031
- (57) Y. Motorin, M. Helm, *Advanced Review* **2011**, *2*, 611-631
- (58) J. Huang, P. Yin, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2018**, *16*, 85-98
- (59) G. Cao, H. B. Li, Z. Yin, R. A. Flavell, *Open Biol* **2016**, *6*, 160003
- (60) J. Liu, Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen, C. He, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 93-95
- (61) a) P. Sledz, M. Jinek, *eLife* **2016**, *5*, e18434 ; b) P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam, *Mol Cell* **2016**, *63*, 306-317
- (62) a) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* **2012**, *149*, 1635-1646 ; b) T. Csepány, A. Lin, C. J. Baldick, K. Beemon, *J Biol Chem* **1990**, *265*, 20117-20122 ; c) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kiupec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* **2012**, *485*, 201-206
- (63) M. Fujioka, *Int J Biochem* **1992**, *24*, 1917-1924
- (64) H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends in Biochemical Sciences* **2003**, *28*, 329-335
- (65) E. Nissinen, P. T. Mannisto, *Int Rev Neurobiol* **2010**, *95*, 73-118
- (66) P. J. Batista, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2017**, *15*, 154-163
- (67) C. Waters, *J Am Geriat Soc* **2000**, *48*, 692-698
- (68) a) X. C. Cai, K. Kapilashrami, M ; Luo, *Methods in enzymology Chap 11 Synthesis and Assays of Inhibitors of methyltransferases* **2016**, *574*
- (69) <http://hedds.org/index.jsp>
- (70) Y. S. Tian, Y. Zhou, T. Takagi, M. Kameoka, N. Kawashita, *Chem Pharm Bul* **2018**, *3*, 191-206
- (71) V. M. Richon, D. Johnston, C. J. Sneeringer, L. Jin, C. R. Majer, K. Ellinston, L. F. Jerva, M. P. Scott, R. A. Copeland, *Biol Drug Des* **2011**, *78*, 199-210
- (72) R. L. Hamil, M. M. Hoelm, *J Antibiot* **1973**, *26*, 463-465
- (73) H. G. Williams-Ashman, J. Seidenfeld, P. Galletti, *Bio Pharma* **1982**, *31*, 277-288



- (74) a) J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew Chem Int Ed* **2017**, *19*, 5182-52000 ; b) J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 583-597
- (75) M. Pignot, C. Siethoff, M. Linscheid, E. Weinhold, *Angew Chem Int Ed* **1998**, *37*, 2888-2891
- (76) a) G. Pljevaljcic, M. Pignot, E. Weinhold, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 3486-3492 ; b) F. H. Schmidt, M. Huben, B. Giber, F. Renault, M. P. Teulade-Fichou, E. Weinhold, *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 40-48
- (77) G. Plevajcic, F. Schmidt, A. J. Scheidig, R. Lurz, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1516-1519
- (78) L. R. Comstock, S. R. Rajska, *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 1644-1652
- (79) R. L. Weller, S. R. Rajska, *Org Lett* **2005**, *7*, 2141-2144
- (80) a) Y. Du, C. E. Hendrick, K. S. Frye, L. R. Comstock, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2225-2233 ; b) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291-5297
- (81) S. J. Hymbaugh Bergman, L. R. Comstock, *Bioorg Med Chem* **2015**, *23*, 5050-5055
- (82) a) G. Lukinavicius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 2758-2759
- (83) A. Plotnikova, A. Osipenko, V. Masevicius, G. Vilkaitis, S. Klimasauskas, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 13550-13553
- (84) H. Guo, R. Wang, W. Zheng, Y. Chen, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 476-484
- (85) K. Islam, I. Bothwell, Y. Chen, C. Sengelaub, R. Wang, H. Deng, M. Luo, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 5909-5915
- (86) a) Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koynov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, 1943-1952 ; b) K. Islam, Y. Chen, H. Wu, I. R. Bothwell, G. J. Blum, H. Zeng, A. Dong, W. Zheng, J. Min, H. Deng, M. Luo, *PNAS* **2013**, *110*, 16778-16783
- (87) a) M. Tomkuvienė, B. Clouet-d'Orval, I. Cerniauska, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 6765-6773 ; b) S. Willnow, M. Martin, B. Luscher, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1167-1173
- (88) B. W. K. Lee, H. G. Sun, T. Zang, B. J. Kim, J. F. Alfaro, Z. S. Zhou, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 3642-3643
- (89) F. Muttach, F. Masing, A. Studer, A. Rentmeister, *Chem Eur J* **2017**, *23*, 5988-5993
- (90) T. Lenz, P. Poot, E. Weinhold, M. Dreger, *Methods Bio Mol* **2012**, *803*, 97-125
- (91) J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 583-597
- (92) B. Masjost, P. Ballmer, E. Borroni, G. Zurcher, F. K. Winkler, R. Jakob-Roetner, F. Diederich, *Chem Eur J* **2000**, *6*, 971-982
- (93) C. Lerner, B. Masjost, A. Ruf, V. Gramlich, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *Org Biomol Chem* **2003**, *1*, 42-49
- (94) R. Paulini, C. Lerner, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1270-1274
- (95) R. Paulini, C. Trindler, C. Lerner, L. Brandli, W. B. Schweizer, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 340-357
- (96) a) M. Ellermann, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Schlatter, D. Roth, A. Ehler, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 9092-9096 ; b) M. Ellermann, R. Paulini, R. Jakob-Roetne, C.

- Lerner, E. Borroni, D. Roth, A. Ehler, W. B. Schweizer, D. Schlatter, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Chem Eur J* **2011**, *17*, 6369-6381
- (97) M. J. van Haren, R. Taig, J. Kuppens, J. Sastre Torano, E. E. Moret, R. B. Parsons, D. Sartini, M. Emanuelli, N. I. Martin, *Org Biomol Chem* **2017**, *15*, 6656-6667
- (98) N. Babault, A. Allali-Hassani, F. Li, J. Fan, A. Yue, K. Ju, F. Liu, M. Vedadi, J. Liu, J. Jin, *J Med Chem* **2018**, *61*, 1541-1551
- (99) J. Dowden, W. Wong, R. V. Parry, R. A. Pike, S. G. Ward, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 2103-2105
- (100) J. Dowden, R. A. Pike, R. V. Parry, W. Hong, U. A. Muhsen, S.G. Ward, *Org Biomol Chem* **2011**, *9*, 7814-7821
- (101) D. Smil, M. S. Eram, F. Li, S. Kennedy, M. M. Szewczyk, P. J. Brown, D. Barsyte-Lovejoy, C. H. Arrowsmith, M. Vedadi, M. Schapira, *ACS Med Chem Lett* **2015**, *6*, 408-412
- (102) M. van Haren, L. Q. van Ufford, E. E. Moret, N. I. Martin, *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 549-560
- (103) S. Mori, K. Iwase, N. Iwanami, Y. Tanaka, H. Kagechika, T. Hirano, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 8158-8166
- (104) G. Zhang, S. L. Richardson, Y. Mao, R. Huang, *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 4149-4154
- (105) G. Zhang, R. Huang, *RSC Adv* **2016**, *6*, 6768-6771
- (106) T. Osborne, R. L. Weller Roska, S. R. Rajsiki, P. R. Thompson, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 4574-4575
- (107) D. C. Wahnou, V. K. Shier, S. J. Benkovic, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 976-977
- (108) G. Hopley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. F. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 3079-3082
- (109) L. Halby, Y. Menon, E. Rilova, D. Pechalrieu, V. Masson, C. Faux, M. Amine Bouhleb, M. H. David-Cordonnier, N. Novosad, Y. Aussagues, A. Samson, L. Lacroix, F. Ausseil, L. Fleury, D. Guianvarc'h, C. Ferroud, P. B. Arimondo, *J Med Chem* **2017**, *60*, 4665-4679
- (110) L. Halby, N. Marechal, D. Pechalrieu, V. Cura, D. M. Franchini, C. Faux, F. Alby, N. Troffer-Charlier, S. Kudithipudi, A. Jeltsch, W. Aouadi, E. Decroly, J. C. Guillemot, P. Page, C. Ferroud, L. Bonnefond, D. Guianvarc'h, J. Cavarelli, P. B. Arimondo, *Phil Trans R Soc* **2018**, *373*, 1-15
- (111) E. Benghiat, P. A. Crooks, R. Goodwin, F. Rottman, *J Pharm Sci* **1986**, *75*, 142-145
- (112) a) S. Blanco, M. Frye, *Curr Opin Cell Biol* **2014**, *31*, 1-7 ; b) N. Liu, T. Pan, *Transl Res* **2015**, *165*, 28-35 ; c) P. J. Batista, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2017**, *15*, 154-163
- (113) P. A. Boriack-Sjodin, S. Ribich, R. A. Copeland, *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 435-453
- (114) E. Benghiat, P. A. Crooks, R. Goodwin, F. Rottman, *J Pharm Sci* **1986**, *75*, 142-145
- (115) M. Schapira, *ACS Chem Biol* **2016**, *11*, 575-582
- (116) P. V. Sergiev, A. Y. Golovina, I. A. Osterman, M. V. Nesterchuk, O. V. Sergeeva, A. A. Chugunova, S. A. Evfratov, E. S. Andreianova, P. I. Pletnev, I. G. Laptev, K. S. Petriukov, T. I. Navalayeu, V. E. Koteliansky, A. A. Bogdanov, O. A. Dontsova, *J Mol Biol* **2016**, *428*, 2134-2145
- (117) A. S. Warda, J. Kretschmer, P. Hackert, C. Lenz, H. Urlaub, C. Hobartner, K. E. Sloan, M. Bohnsack, *EMBO Rep* **2017**, *18*, 2004-2014
- (118) A. S. Puneekar, J. Liljeruhm, T. R. Shepherd, A. C. Forster, M. Selmer, *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, 9537-9548

- (119) a) P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam, *Molecular Cell* **2016**, *63*, 306-317 ; b) P. Sledz, M. Jinek, *eLife* **2016**, *5*, 1-16 ; c) X. Wang, J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou, P. Yin, *Nature* **2016**, *534*, 575-579
- (120) A. Ruszkowska, M. Ruszkowski, Z. Dauter, J. A. Brown, *Sci Rep* **2018**, *28*, 5311
- (121) H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Bio Sci* **2003**, *28*, 329-335
- (122) H. Roemeyer, *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 361-401
- (123) Bromopurine : E. A. Véliz, P. A. Peter, *J Org Chem* **2001**, *66*, 8592-8598 ; Iodopurine : J. Wolf, V. Dombos, B. Appel, S. Muller, *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 899-907 ; Fluoropurine : M. J. Robins, B. Uznanski, *Nucleic acid related compounds* **1981**, *34*, 2608-2611
- (124) Chloropurine : R. Ottria, S. Casati, E. Baldoli, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 8396-8402 ; J. Yu, L. X. Zhao, J. Park, H. W. Lee, P. K. Sahu, M. Cui, S. M. Moss, E. Hammes, E. Warnick, Z. G. Gao, M. Noh, S. Choi, H. C. Ahn, J. Choi, K. A. Jacobson, L. S. Jeong, *J Med Chem* **2017**, *60*, 3422-3437 ; W. Januchta, M. Serocki, K. Dzierzbicka, G. Cholewinski, M. Gensicka, A. Skladanowski, *RSC Adv* **2016**, *6*, 42794-42806 ; S. Mahajan, R. Manetsch, D. J. Merkler, S. M. Stevens Jr., *PLoS One* **2015**, *10*, e0115644
- (125) T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, *61*, 49-58
- (126) Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, *72*, 10194-10210
- (127) Imidazolyle : Z. Janeba, X. Lin, M. Robins, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2004**, *23*, 137-147
- (128) Triazolyle : A. Kovalovs, I. Novosjolova, E. Bizdena, I. Bizane, L. Shardziute, K. Kazlauskas, S. Jursenas, M. Turks, *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 850-853
- (129) Phenoxylye : a) H. Gao, R. Fathi, B. L. Gaffney, B. Goswami, P. Kung, Y. Rhee, R. Jin, R. A. Jones, *J Org Chem* **1992**, *57*, 6954-6959 ; b) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 7423-7433
- (130) Sulfonylye : a) N. A. Golubeva, A. V. Shipitsyn, *R J Bioorg Chem* **2007**, *33*, 562-568 ; b) D. Vrantza, P. Kaloudis, L. Leondiadis, T. Gimisis, G. C. Vougioukalakis, M. Orfanopoulos, D. Gasparutto, J. Cadet, S. Encinas, C. Paris, M. A. Miranda, *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 2371-2386 ; c) X. Lin, M. J. Robins, *Org Lett* **2000**, *2*, 3497-3499
- (131) Pyridyle : R. Fathi, B. Goswami, P. Kung, B. L. Gaffney, R.A. Jones *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 319-322
- (132) S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 782-789
- (133) a) W. Hong, J. Dowden, *Chinese Chemical Letters* **2011**, *22*, 1439-1442 ; b) T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, *61*, 49-58 ; c) Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, *72*, 10194-10210 ; d) Z. K. Wan, E. Binnun, D. P. Wilson, J. Lee, *Org Lett* **2005**, *7*, 5877-5880
- (134) a) J. Barends, J. B. Van Der Linden, F. L. Van Delft, G. Koomen, *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 2121-2126 ; b) P. F. Thomson, P. Lagisetty, J. Balzarini, E. De Clercq, M. K. Lakshman, *Adv Synth Catal* **2010**, *352*, 1728-1735 ; c) S. S. M. Bandaru, S. Bhilare, N. Chrysochos, V. Gayakhe, I. Trentin, C. Schulzke, A. R. Kapdi, *Org Lett* **2018**, *20*, 473-476

- (135) H. Paritala, Y. Suzuki, K. S. Carroll, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 199-220
- (136) S. Fletcher, *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 2948-2950
- (137) V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499
- (138) a) W. Hong, J. Dowden, *Chinese Chemical Letters* **2011**, *22*, 1439-1442 ; b) A. Reeve, C. A. Townsend, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15959-15974 ; c) V. Mai, L. R. Comstock, *J Org Chem* **2011**, *76*, 10319-10324
- (139) a) C. Joce, J. Caryl, P. G. Stockley, S. Warriner, A. Nelson, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 635-638 ; b) S. G. Petersen, S. R. Rajski, *J Org Chem* **2005**, *70*, 5833-5839
- (140) a) M. J. Thompson, A. Mekhalfia, D. P. Hornby, G. M. Blackburn, *J Org Chem* **1999**, *64*, 7467-7473 ; b) G. Ceulemans, F. Vandendriessche, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 11 ; c) A. P. Townsend, S. Roth, H. E. L. Williams, E. Stylianou, N. R. Thomas, *Org Lett* **2009**, *11*, 2976-2979 ; d) J. L. Anglin, L. Deng, Y. Yao, G. Cai, Z. Liu, H. Jiang, G. Cheng, P. Chen, S. Dong, Y. Song, *J Med Chem* **2012**, *55*, 8066-8074
- (141) G. S. Gibbons, H. D. Showalter, Z. Nikolovska-Coleska, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 348-360
- (142) X. Lu, H. Zhang, P. J. Tonge, D. S. Tan, *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 5963-5966
- (143) S. Picard, M. Le Roch, J. Renault, P. Uriac, *Org Lett* **2004**, *6*, 4711-4714
- (144) G. Hopley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 3079-3082
- (145) T. Fukuyama, H. Tokuyama, *Aldrichimica Acta* **2004**, *37*, 87-102
- (146) a) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291-5297 ; b) Z. Wan, E. Binnun, D. P. Wilson, J. Lee, *Org Lett* **2005**, *7*, 5877-5880 ; c) W. Hong, J. Dowden *Chinese Chemical Letters*, **2011**, *22*, 1439-1442 ; d) T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Aust J Chem* **2008**, *61*, 49-58
- (147) Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J Org Chem* **2007**, *72*, 10194-10210
- (148) S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 782-789
- (149) M. Chemama, M. Fonvielle, M. Arthur, J. Valéry, M. Ethève-Quellejeu, *Chem Eur J* **2009**, *15*, 1929-1938
- (150) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291-5297
- (151) R. Kaul, Y. Brouillette, Z. Sajjadi, K. A. Hansford, W. D. Lubell, *J Org Chem* **2004**, *69*, 6131-6133
- (152) a) J. R. Shelton, J. Balzarini, M. A. Peterson, *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 5107-5110 ; b) V. Mhatre, V. Joshi, *Indian J Chem* **2002**, *41B*, 2667-2675 ; c) R. Rayala, P. Theard, H. Ortiz, S. Yao, J. D. Young, J. Balzarini, M. J. Robins, S. F. Wnuk, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2186-2192
- (153) a) S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 2683-2704 ; b) V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83*, 152-161
- (154) a) K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 994-1006 ; b) G. Leszczynska, J. Pieta, B. Sproat, A. Malkiewicz, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 4443-4447 ; c) A. C. Bajji, D. R. Davis, *J Org Chem* **2002**, *67*, 5352-5358 ; d) M. Matuszewski, K. Debiec, E. Sochacka, *Chem Commun* **2017**, *53*, 7945-7948 ; e) M. Sundaram, P. F. Crain, D. R. Davis, *J Org Chem* **2000**, *65*, 5609-5614 ; f) D. Martin, E. Schlimme, *Z. Naturforsch* **1994**, *49c*, 834-842

- (155) J. S. Nowick, N. A. Powell, T. M. Nguyen, G. Noronha, *J Org Chem* **1992**, *57*, 7364-7366
- (156) S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 2683-2704
- (157) V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83*, 152-161
- (158) V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, *Helvetica Chimica Acta* **2000**, *83*, 152-161
- (159) a) K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 994-1006 ; b) G. Leszczynska, J. Pieta, B. Sproat, A. Malkiewicz, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 4443-4447 ; c) A. C. Bajji, D. R. Davis, *J Org Chem* **2002**, *67*, 5352-5358
- (160) a) M. Matuszewski, K. Debiec, E. Sochacka, *Chem Commun* **2017**, *53*, 7945-7948 ; b) M. Sundaram, P. F. Crain, D. R. Davis, *J Org Chem* **2000**, *65*, 5609-5614 ; c) D. Martin, E. Schlimme, *Z. Naturforsch* **1994**, *49c*, 834-842
- (161) I. Gallou, M. Eriksson, X. Zeng, C. Senanayake, V. Farina, *J Org Chem* **2005**, *70*, 6960-6963
- (162) J. H. Cho, S. J. Coats, R. F. Schinazi, *Org Lett* **2012**, *14*, 2488-2491
- (164) a) C. B. Collin, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 3851-3868 ; b) G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* **2006**, *4*, 147-150
- (165) A. M. Michelson, A. R. Todd, *J Chem Soc* **1955**, *0*, 2632-2638
- (166) R. Lohrmann, H. G. Khorana, *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 829-833
- (167) H. G. Khorana, *Science* **1979**, *203*, 614-625
- (168) a) R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J Am Chem Soc* **1965**, *87*, 3526-3527 ; b) C. B. Collin, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 3851-3868
- (169) S. S. Jones, B. Rayner, C. B. Reese, A. Ubasawa, M. Ubasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3075-3080
- (170) C. B. Reese, L. Zard, *Nucleic Acids Res* **1981**, *9*, 4611-4626
- (171) R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J Am Chem Soc* **1976**, *98*, 3655
- (172) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron* **1981**, *22*, 1859-1862
- (173) M. H. Caruthers, *Acc Chem Res* **1991**, *24*, 278-284
- (174) a) R. Lohrmann, D. Soll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka, H. G. Khorana, *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 819-829 ; b) J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegaal, G. Wille, *Nucleic Acids Res* **1977**, *4*, 1047-1063 ; c) K. K. Ogilvie, N. Theriault, K. L. Sadana, *J Am Chem Soc* **1997**, *99*, 7741-7743
- (175) <https://www.atdbio.com/content/22/RNA-oligonucleotide-synthesis>
- (176) a) T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson, *Modified RNAs as Tools in RNA Biochemistry, in Handbook of RNA Biochemistry, Second Edition* **2014**, 151-171, eds R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof ; b) M. Arthur, M. Ethève-Quelquejeu, *Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids, in Chemistry of Organo-Hybrids : Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects, First Edition* **2015**, 272-298, eds B. Charleux, C. Copéret, E. Lacôte
- (177) N. Venkatesan, S. J. Kim, B. H. Kim, *Curr Med Chem* **2003**, *10*, 1973-1991
- (178) N. Milisavljevic, P. Perlikova, R. Pohl, M. Hocek, *Org Biomol Chem* **2018**, *16*, 5800-5807
- (179) a) M. Chemama, M. Fonvielle, R. Villet, M. Arthur, J. Valéry, M. Ethève-Quelquejeu, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 12642-12643 ; b) M. Santarem, M. Fonvielle, N. Sakkas, G. Laisné, M. Chemama, J. Herbeuval, E. Braud, M. Arthur, M. Ethève-Quelquejeu, *Bioorg Med Chem* **2014**, *24*, 3231-3233

- (180) Y. Yu, W. Weiming, *Post-synthetic chemical functionalization of oligonucleotides*, *Comprehensive Organic Synthesis (2<sup>nd</sup> Edition)*, eds P. Knochel, G. A. Molander, **2014**, 9, 463-493
- (181) G. P. G. Grant, N. Boyd, D. Herschlag, P. Z. Qin, *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 3136-3137
- (182) M. Raouane, D. Desmaele, M. Gilbert-Sirieix, C. Gueutin, F. Zouhiri, C. Bourgaux, E. Lepeltier, R. Gref, R. Ben Salah, G. Clayman, L. Massaad-Massade, P. Couvreur, *J Med Chem* **2011**, 54, 4067-4076
- (183) J. W. Park, E. Bang, E. M. Jeon, B. H. Kim, *Org Biomol Chem* **2012**, 10, 96-102
- (184) A. A. Sawant, A. A. Tanpure, P. P. Mukherjee, S. Athavale, A. Kelkar, S. Galande, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Research* **2015**, 44, e16
- (185) A. Geiermann, R. Micura, *Curr Prot Nuc Acid Chem* **2015**, 62, 4.64.1-4.64.36
- (186) J. G. Aaronson, L. J. Klein, A. A. Momose, A. M. O'Brien, A. W. Shaw, T. J. Tucker, Y. Yuan, D. M. Tellers, *Bioconjugate Chem* **2011**, 22, 1723-1728
- (187) J. Imig, A. Brunschweigern A. Brummer, B. Guennewig, N. Mittal, S. Kishore, P. Tsikrika, A. P. Gerber, M. Zavolan, J. Hall, *Nat Chem Biol* **2015**, 11, 107-114
- (188) A. Maria, Pyka, C. Domnick, F. Braun, S. Kath-Schorr, *Bioconjugate Chem* **2014**, 25, 1438-1443
- (189) a) J. Yamamoto, S. Ebisuda, L. Kong, H. Yamago, S. Iwai, *Chem Lett* **2017**, 46, 767-770 ; b) T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, A. A. Arzumanov, E. A. Romanova, M. J. Gait, T. Oretskaya, *Bioconjug Chem* **2002**, 13, 822-830
- (190) L. Wicke, J. W. Engels, *Bioconjug Chem* **2012**, 23, 627-642
- (191) N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic Acids Research* **2007**, 35, 3128-3143
- (192) M. B. Walunj, A. A. Tanpure, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Research* **2018**, 46, e65
- (193) a) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem* **1997**, 119, 7423-7433 ; b) K. Wawrzyniak-Turek, C. Hobartner, *Methods Enzymol* **2014**, 549, 85-104 ; c) L. Buttner J. Seikowski, K. Wawrzyniak, A. Ochmann, C. Hobartner, *Biorg Med Chem* **2013**, 21, 6171-6180
- (194) A. E. Ferentz, G. L. Verdine, *Nucleosides and Nucleotides* **1992**, 11, 1749-1763
- (195) A. E. Ferentz, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1991**, 113, 4000-4003
- (196) Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *J Org Chem* **1992**, 57, 3839-3845
- (197) a) Y. Z. Xu, Q. Zheng, G. Urwin, P. F. Swann, *Nucleosides and Nucleotides* **1997**, 16, 1559-1562 ; b) Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *Tetrahedron* **1992**, 48, 1729-1740 ; c) Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *Tetrahedron Lett* **1992**, 33, 5837-5840
- (198) Y. Z. Xu, *Tetrahedron* **1996**, 32, 10737-10750
- (199) E. Kierzek, R. Kierzek, *Nucleic Acids Res* **2003**, 31, 4461-4471
- (200) T. Trichtinger, R. Charubala, W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett* **1983**, 24, 711-714
- (201) D. A. Erlanson, L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem Soc* **1993**, 115, 12583-12584
- (202) a) C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J Am Chem* **1997**, 119, 7423-7433 ; b) G. Sicoli, F. Wachowius, M. Bennati, C. Hobartner, *Angew Chem Int Ed* **2010**, 49, 6443-6447
- (203) S. Bae, M. K. Lakshman *J Am Chem Soc*, **2007**, 129, 782-789
- (204) S. Bae, M. K. Lakshman, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 782-789
- (205) A. Dallmann, A. V. Beribisky, F. Gnerlich, M. Rubbelke, S. Schiesser, T. Carell, M. Sattler, *Chem Eur J* **2016**, 22, 1-11

- (206) Q. Dai, G. Zheng, M. H. Schwartz, W. C. Clark, T. Pan, *Angew Chem Int Ed* **2017**, *56*, 1-5
- (207) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2001**, *40*, 2004-2021
- (208) a) R. Huisgen, *Angew Chem Int Ed* **1963**, *2*, 633-696 ; b) R. Huisgen, *Angew Chem Int Ed* **1963**, *2*, 565-632
- (209) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Eur J Org Chem* **2006**, 51-68
- (210) V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599
- (211) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, *67*, 3057-3064
- (212) a) C. S. McKay, M. G. Finn, *Chemistry & Biology* **2014**, *21*, 1075-1101 ; b) J. D. Castillo Gomez, A. Hagenbach, U. Abram, *Eur J Inorg Chem* **2016**, 5427-5434
- (213) V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem* **2010**, *21*, 1912-1916
- (214) a) T. Irie, I. Fujii, M. Sawa, *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22*, 591-596 ; b) X. Wang, B. Huang, X. Liu, P. Zhan, *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 118-132
- (215) W. Xi, T. F. Scott, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *Adv Funct Mater* **2014**, *24*, 2572-2590
- (216) a) V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599 ; b) A. Makarem, R. Berg, F. Rominger, B. F. Straub, *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54*, 7431-7435 ; c) I. Kalvet, J. Tammiku-Taul, U. Maeorg, K. Tamm, P. Burk, L. Sikk, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1804-1808
- (217) A. Makarem, R. Berg, F. Rominger, B. F. Straub, *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54*, 7431-7435
- (218) L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 15998-15999
- (219) M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J Org Chem* **2006**, *71*, 8680-8683
- (220) a) B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8923-8930 ; b) E. Boz, N. S. Tuzun, *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *724*, 167-176 ; c) D. Hou, T. Kuan, Y. Li, R. Lee, K. Huang, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9415-9420
- (221) B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8923-8930
- (222) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem Soc Rev* **2010**, *39*, 1272-1279
- (223) B. Schulze, U. Schubert, *Chem Soc Rev* **2014**, *43*, 2522-2571
- (224) G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. Genazzani, *Med Res Rev* **2008**, *28*, 278-308
- (225) a) J. W. Jones, R. K. Robins, *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 193-201 ; b) S. Porcher, S. Pitsch, *Helvetica Chimica Acta* **2005**, *88*, 2683-2704 ; c) J. Uzawa, K. Anzai, *Can J Chem* **1987**, *65*, 2691-2693 ; d) V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499
- (226) T. Aboul-Fadl, G. Rajeev, A. D. Broom, *J Heterocyclic Chem* **2008**, *45*, 445-451
- (227) K. Tishinov, D. Gillingham, *Synlett* **2015**, *26*, 2720-2723
- (228) a) R. Ottria, S. Casati, A. Manzocchi, E. Baldoli, M. Mariotti, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 4249-4254 ; b) W. A. H. Grimm, N. J. Leonard, *Biochemistry* **1967**, *6*, 3625-3631
- (229) T. Itaya, F. Tanaka, T. Fujii, N. J. Leonard, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1977**, *25*, 1449-1452
- (230) J. Buter, D. Heijnen, I. C. Wan, F. M. Bickelhaupt, D. C. Young, E. Otten, D. Branch Moody, A. J. Minaard, *J Org Chem* **2016**, *81*, 6686-6696

- (231) V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499
- (232) K. Arimoto, T. Wada, M. Sekine, *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1995**, 1837-1844
- (233) L. E. Kapinos, B. P. Operschall, E. Larsen, H. Sigel, *Chem Eur J* **2011**, *17*, 8156-8164
- (234) S. N. Mikhailov, J. Rozenski, E. V. Efintseva, R. Busson, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 1124-1131
- (235) a) K. K. Palaniappan, Z. Gao, A. A. Ivanov, R. Greaves, H. Adachi, P. Besada, H. O. Kim, A. Y. Kim, S. A. Choe, L. S. Jeong, K. A. Jacobson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7437-7448 ; b) K. S. Toti, S. M. Moss, S. Paoletta, Z. Gao, K. A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *Bioorg Med Chem* **2014**, *22*, 4257-4268 ; c) R. Ottria, S. Casati, A. Manzocchi, E. Baldoli, M. Mariotti, J. A. M. Maier, P. Ciuffreda, *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 4249-4254 ; d) J. Buter, D. Heijnen, I. C. Wan, F. M. Bickelhaupt, D. C. Young, E. Otten, D. Branch Moody, A. J. Minaard, *J Org Chem* **2016**, *81*, 6686-6696 ; e) K. A. Jacobson, M. Ohno, H. T. Duong, S. Kim, S. Tchilibon, M. Cesnek, A. Holy, Z. Gao, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 237-247
- (236) E. S. H. El Ashry, S. Nadeem, M. R. Shah, Y. El Kilany, *Advances in Heterocyclic Chemistry* **2010**, *101*, 161-228
- (237) Dimroth Otto, *Ann* **1909**, *364*, 183-226
- (238) E. S. El Ashry, Y. El Kilany, N. Rashed, H. Assafir, *Advances in Heterocycles Chemistry* **2000**, *75*, 79-165
- (239) T. Fujii, T. Itaya, *Heterocycles* **1998**, *48*, 359-390
- (240) K. Arimoto, T. Wada, M. Sekine, *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1995**, 1837-1844
- (241) V. E. Oslovsky, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2015**, *34*, 475-499
- (242) a) F. Wei, W. Wang, Y. Ma, C. Tung, Z. Xu, *Chem Commun* **2016**, *52*, 14188-14199 ; b) S. Ferrini, J. Z. Chandanshive, S. Lena, M. C. Franchini, G. Giannini, A. Tafi, M. Taddei, *J Org Chem* **2015**, *80*, 2562-2572
- (243) V. V. Rostotsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed* **2002**, *41*, 2596-2599
- (244) F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 2212-2221





# Publication



## RNA Methyltransferases

# Synthesis of SAM-Adenosine Conjugates for the Study of m<sup>6</sup>A-RNA Methyltransferases

Colette Atdjian,<sup>[a]</sup> Laura Iannazzo,<sup>[a]</sup> Emmanuelle Braud,<sup>\*[a]</sup> and  
Mélanie Ethève-Quellejeu<sup>\*[a]</sup>

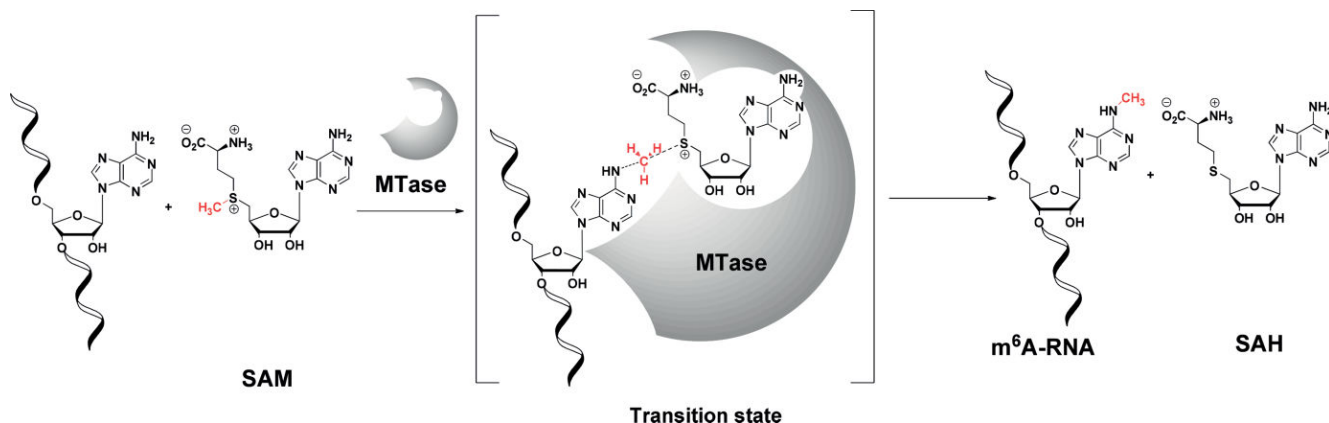
**Abstract:** RNA methyltransferases (RNMTs) catalyze the methylation of RNA using S-adenosyl-L-methionine (SAM) as the methyl donor. Methylation at the N-6 position of adenosine is the most abundant modification found in nearly all classes of RNAs and contributes to the regulation of many biological processes in the three domains of life. However, this family of enzymes remains relatively unexplored by the medicinal chemis-

try community and new molecules are needed for their studies. Since RNMTs are suitable for bisubstrate binding, we report here the synthesis of SAM-adenosine conjugates as bisubstrate analogues for RNMTs responsible for methylation of the N6-position of adenosine. Six compounds were synthesized by connecting an analogue of SAM to an adenosine unit chosen to mimic the RNA substrate, via alkyl and urea linkers.

## Introduction

The great majority of methyltransferases (MTases) use S-adenosyl-L-methionine (SAM) as the cofactor to transfer a methyl group to their substrates, leading to the methylation of nucleic acids, proteins or small-molecule metabolites and the release of the co-product S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). Based on their substrates, MTases are divided into four families, the DNA methyltransferases (DNMTs), protein methyltransfer-

ases (PMTs), MTases that catalyze the methylation of small molecules and RNA methyltransferases (RNMTs). These enzymes are involved in important cell events such as epigenetic,<sup>[1]</sup> epitranscriptome,<sup>[2]</sup> signal transduction<sup>[3]</sup> or in the regulation of protein functions<sup>[4]</sup> and metabolism.<sup>[5]</sup> It has also been shown that deregulation of the methylation process leads to the development of human diseases such as cancers, metabolic disorders or neurodegenerative diseases.<sup>[2a,6]</sup> In RNA (including rRNA, tRNA, mRNA and long-non-coding RNA), MTases catalyze the



Scheme 1. RNMTs-catalysed the methylation of adenosine at N-6 position.

[a] Laboratoire de Chimie et de Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Team "Chemistry of RNAs, nucleosides, peptides and heterocycles", Université Paris Descartes, UMR 8601, Paris, 75005 France  
E-mail: melanie.ethève-quelquejeu@parisdescartes.fr  
emmanuelle.braud@parisdescartes.fr  
<http://www.biomedicale.parisdescartes.fr/umr8601/Chemistry-of-RNAs-nucleosides-Peptides-and-Heterocycles.htm>

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800798>.

formation of N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A), which is the most prevalent internal mRNA modifications observed in a wide range of eukaryotes and in viruses or bacteria (Scheme 1). Recently, m<sup>6</sup>A RNA modification was defined as a dynamic process<sup>[7]</sup> and its disturbance probably correlated to human diseases thus emphasizing the importance of m<sup>6</sup>A RNA modification.<sup>[8]</sup>

SAM and SAH have been used to explore the functions of MTases or for structural studies, and crystallographic structures

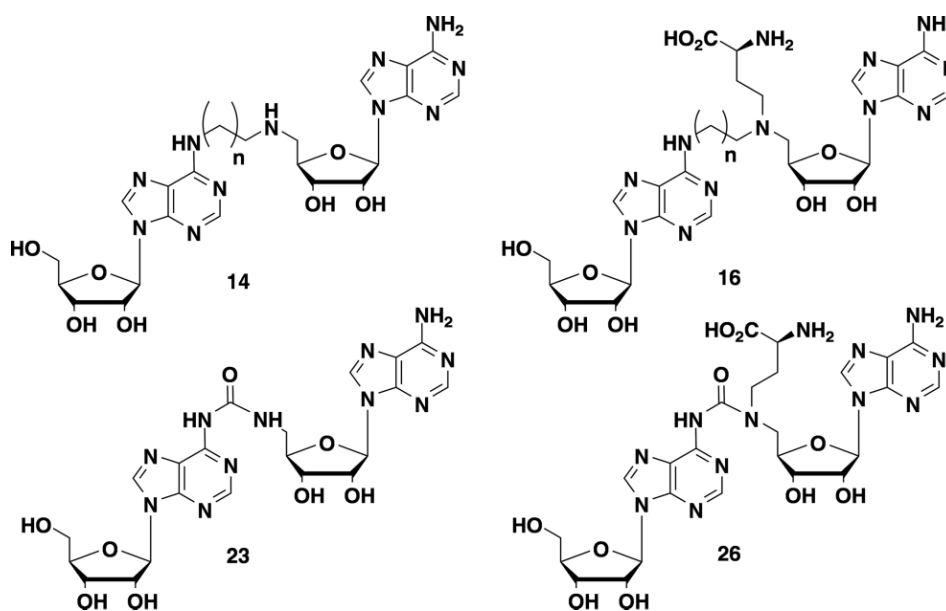


Figure 1. General structures of the bisubstrate analogues synthesized in this work (with  $n = 1, 2$ ).

of SAH/RNMTs and SAM/RNMTs complexes have been reported.<sup>[9]</sup> SAM and SAH analogues have been also synthesized as MTase inhibitors,<sup>[10,11]</sup> as chemical tools<sup>[12]</sup> or as synthetic cofactors for substrate labelling.<sup>[13]</sup> The drawback of the use of SAM or SAH-based inhibitors is the lack of selectivity due to the high homology of SAM binding domains of the different MTases. In this respect, bisubstrate analogues designed to accommodate the SAM-binding domain and the substrate binding site have shown increased potency and selectivity. The chemical structure of these compounds is based on a SAM analogue covalently attached to a substrate surrogate via an appropriate linker that mimics the transition state of the  $S_N2$  mechanism of the methylation reaction (Scheme 1). To date, studies have mainly focused on the development of bisubstrate analogues as inhibitors of catechol MTases and PMTs.<sup>[14]</sup> Inhibitors of catechol MTases contain a catechol motif attached to the 5'-position of the SAM analogue and a X-ray co-crystal structure has confirmed the bisubstrate binding mode.<sup>[14f,15]</sup> In 2010, synthetic bisubstrate inhibitors of protein arginine methyltransferase PRMT1 were reported, with an arginine motif tethered to a nitrogen on the 5'-position of the SAM analogues. Different alkyl linkers between the guanidinium group and the 5'-position of the SAM were used.<sup>[14a,14b]</sup> Bisubstrates have also been developed as histone lysine MTases inhibitors by linking alkyl-amino groups to an analogue of SAM<sup>[14e]</sup> and SAM-peptide conjugates have been described as bisubstrates for N-terminal methyltransferase 1.<sup>[14c,14d]</sup> In addition, a bisubstrate inhibitor for PRMT1 has been produced in situ by reacting an activated SAM moiety with a peptide substrate.<sup>[12c]</sup> More recently, bisubstrate inhibitors of nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT) have been synthesized<sup>[16]</sup> and the crystal structure of human NNMT in complex with this bisubstrate demonstrated that the inhibitor occupies both substrate and SAM binding sites.<sup>[16b]</sup>

A limited number of examples report the use of the bisubstrate concept for DNMTs studies. Two of them focus on the synthesis of bisubstrates for the bacterial DNA adenine N6

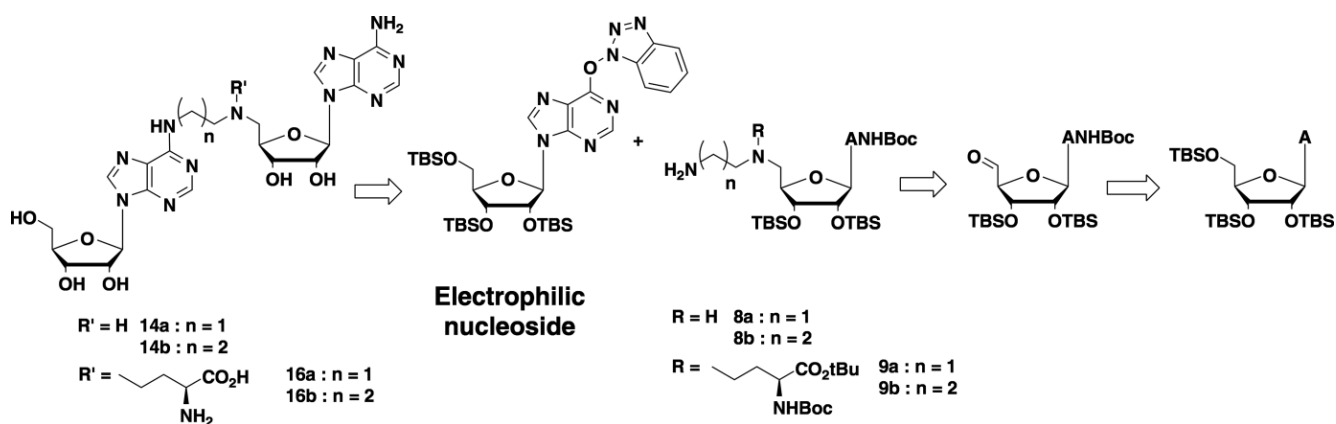
MTase<sup>[10]</sup> and one for inhibition of DNMTs in cancer cells.<sup>[17]</sup> All these studies describe bisubstrate analogues containing a truncated nucleoside without the ribose unit. Only one study reports the synthesis of bisubstrates for the inhibition of the *Vaccinia* RNA guanine 7-methyltransferase.<sup>[18]</sup> In this example, the SAM portion, lacking the methionine unit, is linked to the C6 of a guanine nucleic base.

Despite the important biological roles of  $m^6A$  RNA modification by methyltransferases, the development of bisubstrate analogues in this context has never been described.

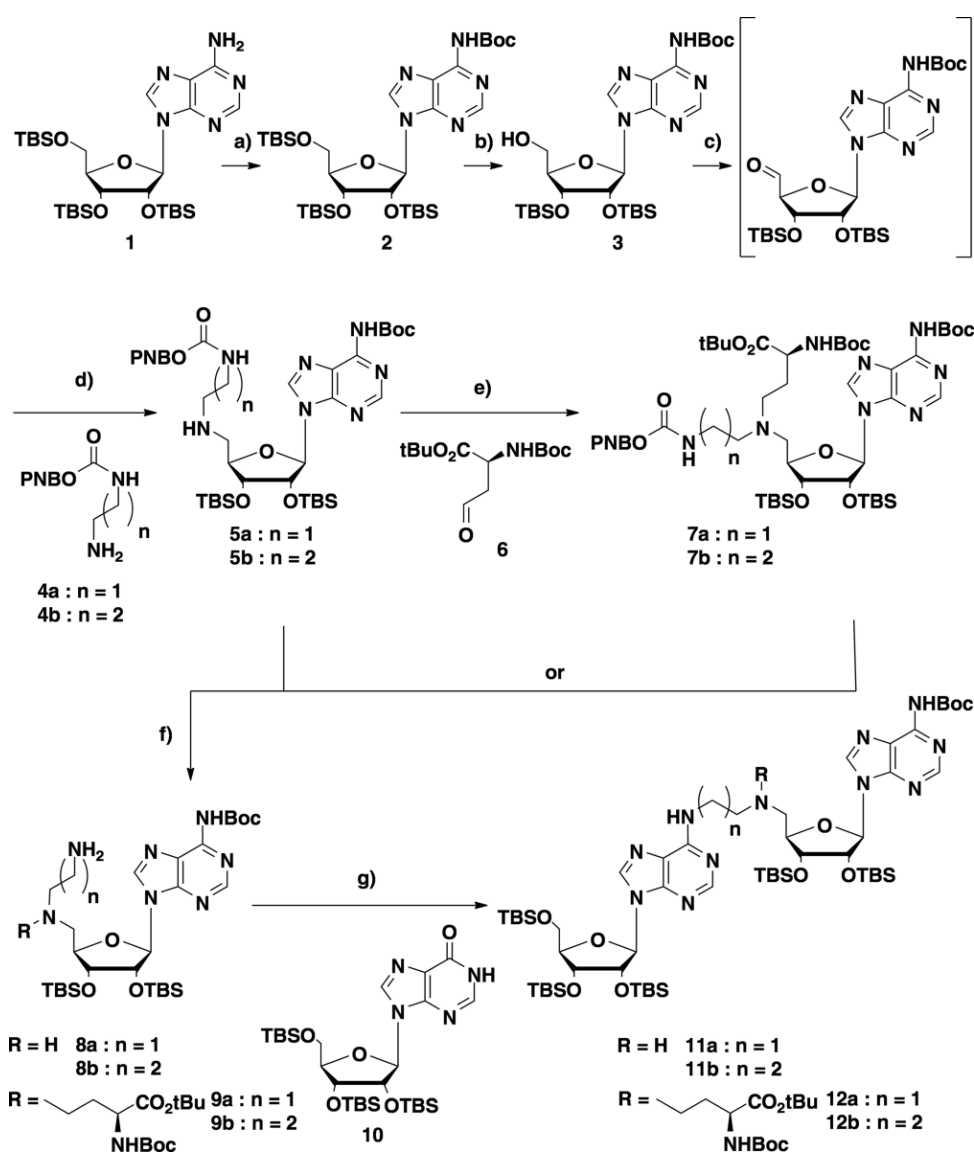
Here we report the synthesis of six SAM-adenosine conjugates as RNMTs bisubstrate analogues (Figure 1). These molecules connect a 5'-*N*-SAM analogue to the N-6 position of an adenosine used as a substrate surrogate. Alkyl linkers with 2 and 3 carbons atoms were chosen to tether the two moieties since they have already proven successful in obtaining PMTs<sup>[14d]</sup> and DNMTs<sup>[10a]</sup> inhibitors. We were also interested in the introduction of urea to get a shorter and stable linker. The corresponding bisubstrate analogues, lacking the amino acid side chain were also synthesized (Figure 1).

## Results and Discussion

Firstly, we were interested in the synthesis of the RNMTs bisubstrates containing alkyl linkers (compounds **14** and **16** in Figure 1). The crucial step of the synthesis is the connection between the SAM moiety bearing an alkyl linker and the N<sup>6</sup> of the adenosine (Scheme 2). *N*-6 alkylation of adenosine is traditionally achieved by nucleophilic attack of amines on electrophilic nucleosides<sup>[19]</sup> or by organometallic coupling.<sup>[20]</sup> Here, we used *O*<sup>6</sup>-(benzotriazol-1-yl)inosine<sup>[21]</sup> derivative as the electrophilic nucleoside (Scheme 2). Our synthetic strategy also required the formation of a secondary or a tertiary amine at the 5'-position of the SAM analogue (Scheme 2). These amines are usually constructed from a 5'-amino-adenosine derivative in a



Scheme 2. Retrosynthetic scheme for synthesis of bisubstrates containing alkyl linkers.



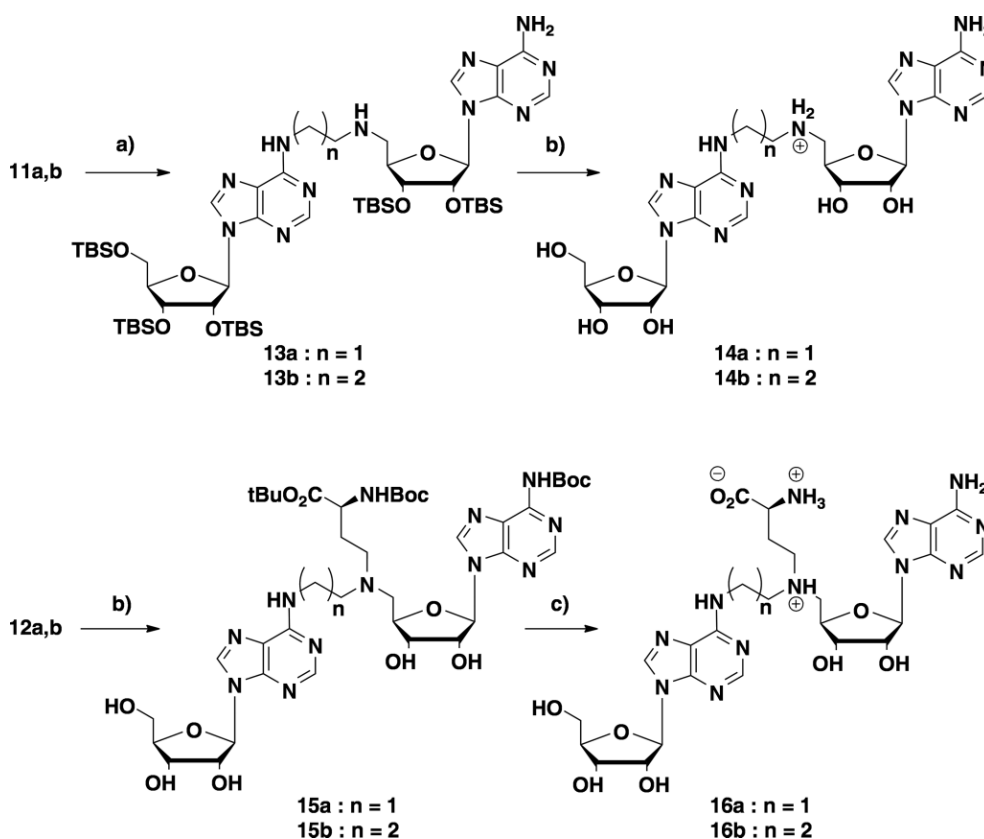
Scheme 3. Synthesis of the SAM-conjugates **11a–b** and **12a–b**: a) i. Boc<sub>2</sub>O (3 equiv.), DMAP (0.2 equiv.), THF, 65 °C, 2 h; ii. MeNH<sub>2</sub> 2 m in THF (4 equiv.), MeOH, room temp., 16 h, (quant. yield); b) TFA (50 equiv.)/H<sub>2</sub>O (1:1), THF, 0 °C, 4 h, (91 %); c) DMP (1.2 equiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 h, room temp.; d) **4a** or **4b** (1.5 equiv.), NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 equiv.), AcOH (1 equiv.), MeOH, room temp., 16 h, (54 % for **5a**), (48 % for **5b**) over two steps; e) aldehyde **6** (1 equiv.), NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 equiv.), AcOH (1 equiv.), MeOH, room temp., 16 h, (90 % for **7a**), (71 % for **7b**); f) H<sub>2</sub> 1 atm, Pd/C (0.2 equiv.), MeOH, room temp., 16 h, (81 % for **8a**), (81 % for **8b**), (93 % for **9a**), (89 % for **9b**); g) inosine **10** (1eq), PyBOP (1.5 equiv.), DBU (2 equiv.), DMF, room temp., 16 h, (85 % for **11a**), (85 % for **11b**), (80 % for **12a**), (81 % for **12b**).

two-step sequence involving two reductive amination reactions<sup>[10a,14b,14c]</sup> or a reductive amination reaction followed by an alkylation.<sup>[14c,14e]</sup> One single example reports the reductive amination using an isopropylidene protected adenosine 5'-carboxaldehyde.<sup>[22]</sup> In our strategy, we used a protected 5'-aldehyde-adenosine as the common precursor for the synthesis of bisubstrates of this series.

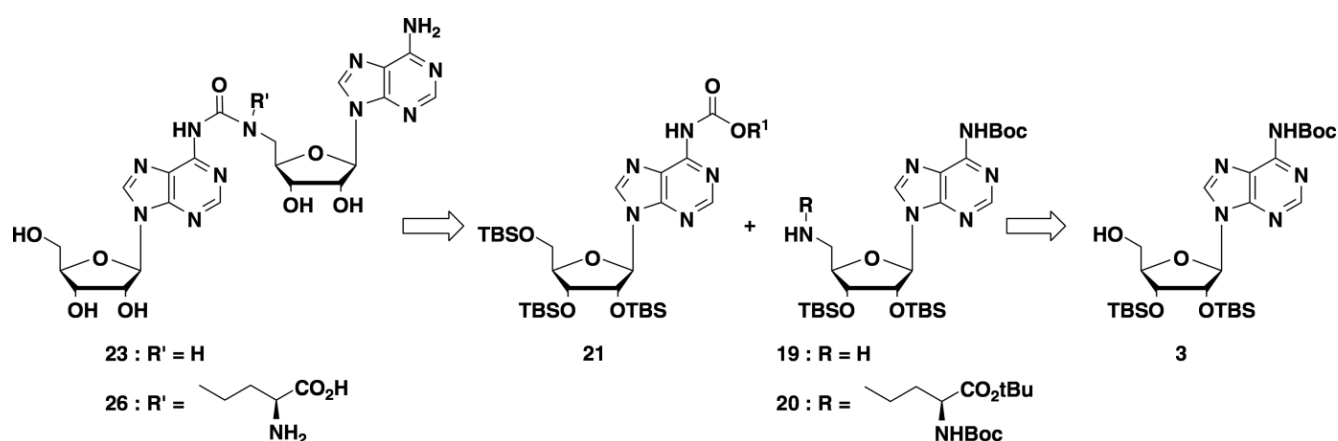
The synthesis started with the mono Boc-protection of adenosine **1** (Scheme 3). Compound **1** was treated with Boc<sub>2</sub>O to afford the bis-Boc protected adenosine that was subsequently reacted with methylamine in methanol to afford the Boc-adenosine **2** in quantitative yield. Selective removal of the TBS group at the 5'-position was achieved in the presence of aqueous TFA to give compound **3** in 91 % yield. The alkyl linkers and the amino acid chain were then introduced as follow. Using Dess–Martin periodinane, the 5'-hydroxy group was oxidized into the corresponding aldehyde. After filtration through celite, the aldehyde was directly reacted with the protected amines **4a** or **4b**<sup>[23]</sup> in the presence of sodium cyanoborohydride to afford the compounds **5a** and **5b** in 54 and 48 % yield, respectively over two steps. A second reductive amination step was performed, using the same conditions, with aldehyde **6**<sup>[24]</sup> and provided the compounds **7a** and **7b** in 90 and 71 % yield, respectively. In order to perform the nucleophilic aromatic substitution, the primary amine of the linker was deprotected using hydrogenolysis condition affording the amines **8a–b** and **9a–b**

in good yields ranging from 81 % to 93 % yield. The connection between the SAM-unit and the adenosine part was done by activation of the protected inosine **10**<sup>[25]</sup> by the PyBOP reagent in presence of DBU, followed by addition of the amines **8a–b** and **9a–b**. In these conditions, **11a–b** and **12a–b** were obtained with yields between 80 and 85 % (Scheme 3).

Access to the final compounds **14** and **16** from the SAM-conjugates **11a–b** and **12a–b** requires the removal of the TBS groups and the cleavage of the Boc groups and the *tert*-butyl ester function. The use of the acidic conditions (HCl/dioxane) already described in the literature for SAM analogues<sup>[26]</sup> did not yield the expected compounds in our case. Indeed, we observed the cleavage of the glycosidic bond between the ribose unit and the N-6 modified adenosine. Therefore, we applied the strategy reported in 2004<sup>[27]</sup> to remove simultaneously the *tert*-butyl ester and the N-Boc protecting groups using zinc bromide. Thus, for the compounds **11a–b**, the Boc group was first removed in the presence of 5 equivalents of zinc bromide to afford intermediates **13a–b** in 71 and 46 % yield, respectively. Final deprotection of the TBS groups was achieved using 20 equivalents of ammonium fluoride in methanol, leading to the expected bisubstrate analogues **14a–b** in 50 and 15 % yields, respectively after HPLC purification. For derivatives **12a–b**, removal of the TBS groups was performed as described previously to afford intermediates **15a–b** in 61 and 73 % yield that were treated with ZnBr<sub>2</sub> for deprotection of the remaining Boc



Scheme 4. Synthesis of bisubstrate analogues **14a–b** and **16a–b**: a) ZnBr<sub>2</sub> (5 equiv.), DCM/H<sub>2</sub>O (1:4), room temp., 24 h then 2 h, (71 % for **13a**), (46 % for **13b**); b) NH<sub>4</sub>F 20 eq, MeOH, 55 °C, 24 h, (50 % for **14a**), (15 % for **14b**), (61 % for **15a**), (73 % for **15b**); c) ZnBr<sub>2</sub> (15 equiv.), DCM/H<sub>2</sub>O (1:4), room temp., 24 h then 2 h, (16 % for **16a**), (3 % for **16b**).



Scheme 5. Retrosynthetic scheme for 6-ureido-adenosines **23** and **26**.

groups and the *tert*-butyl ester function. The SAM-conjugates **16a–b** were obtained after HPLC purification in 16 and 3 % yield, respectively (Scheme 4).

We were then interested in the synthesis of bisubstrate analogues bearing a urea as the linker to provide compounds with a shorter linker containing the exact number of atoms involved in the  $S_N2$  mechanism during the transfer of the methyl group by the RNMTs (Scheme 1).

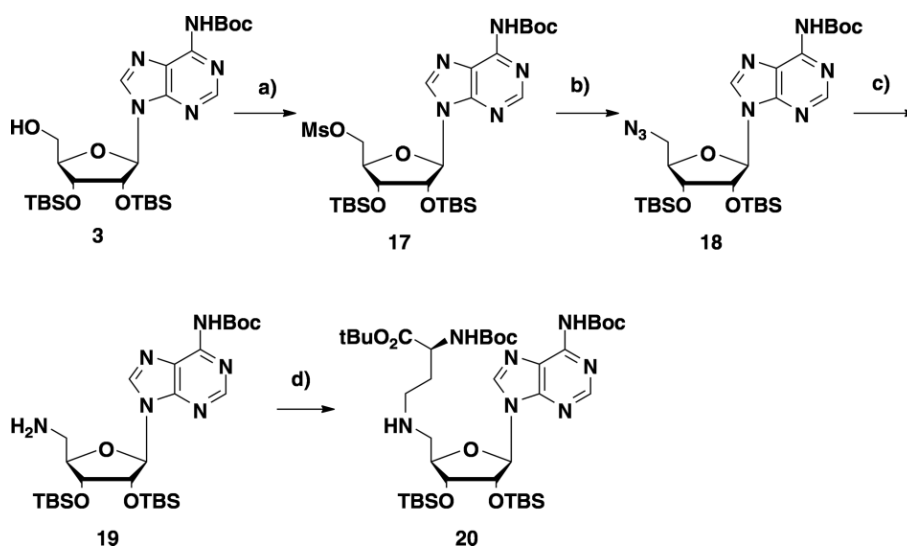
The classical methods for the introduction of a urea at position 6 of adenosine require either the condensation of a protected adenosine with isocyanates<sup>[28]</sup> or the synthesis of a protected adenosine carbamate<sup>[29]</sup> followed by the reaction with an amine. We chose the second strategy for the synthesis of our bisubstrates (Scheme 5).

First, the 5'-aminoadenosines **19** and **20** were synthesized starting from adenosine **3** using the synthetic pathway described in Scheme 6. The 5'-hydroxyl of **3** was converted into its corresponding mesylate to afford adenosine **17**, followed by nucleophilic substitution by sodium azide and reduction of the azide by hydrogenolysis. The 5'-amino-adenosine **19** was ob-

tained in 50 % over three steps. The amine **20** was obtained by a reductive amination between the primary amine **19** and the aldehyde **6** in 72 % yield.

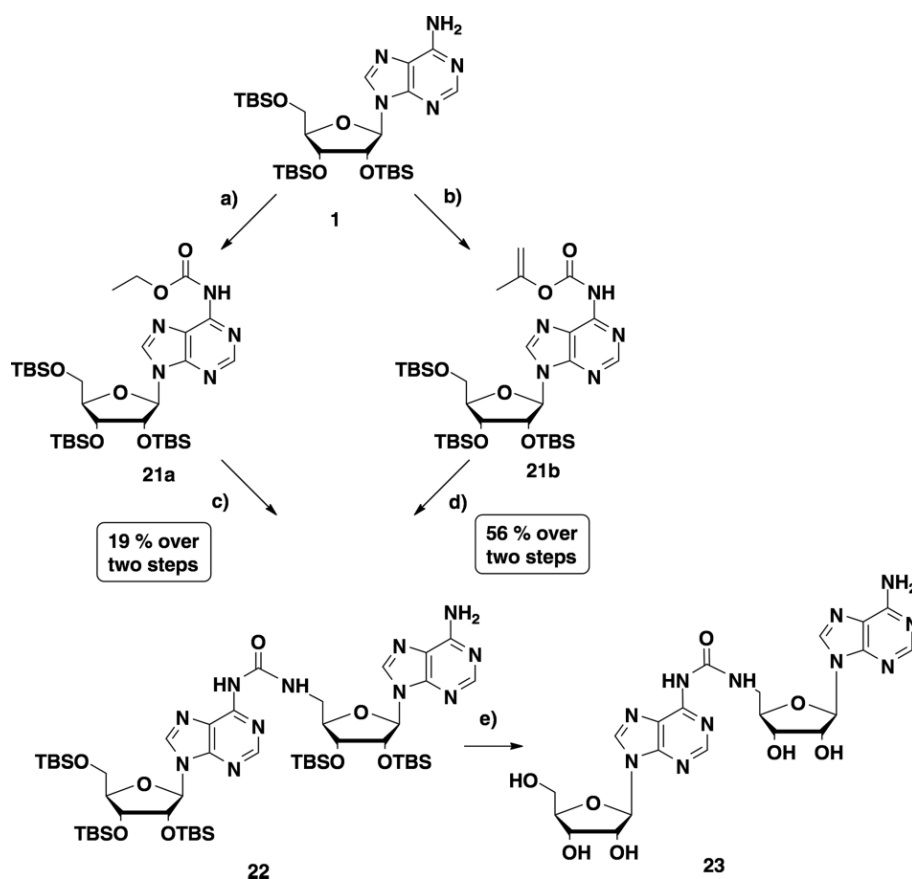
Protected adenosine ethyl carbamates have already been used for the formation of 6-ureido-adenosines.<sup>[29c,29d]</sup> Thus, we firstly synthesized the protected ethyl carbamate **21a** from adenosine **1** in 51 % yield (Scheme 7). Condensation of **21a** with the amine **19** in refluxing pyridine afforded the expected *N,N'*-disubstituted urea **22** with the loss of the Boc group in a moderate yield (37 %).

Since isopropenyl carbamates give unsymmetrical ureas in high yield, we chose to synthesize the isopropenyl carbamate **21b** for further condensation with 5'-amino-adenosines (Scheme 7). Of note, isopropenyl carbamate was already described for the preparation of unsymmetrical ureas<sup>[29g]</sup> but not in the context of nucleic base modifications. Isopropenyl carbamate **21b** was obtained in 75 % yield by treating the adenosine **1** with isopropenyl chloroformate in the presence of *N*-methylimidazole<sup>[30]</sup> (Scheme 7). Condensation with the amine **19** afforded urea **22** with the concomitant loss of the

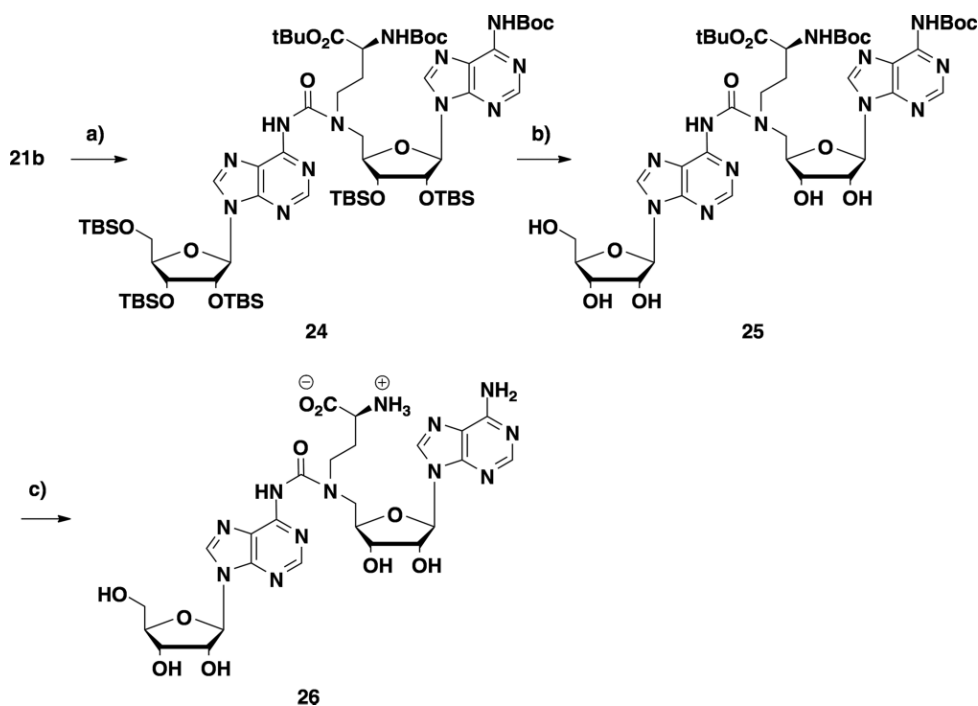


Scheme 6. Synthesis of the 5'-aminoadenosines **19** and **20**: a) MsCl (2 equiv.), pyridine, room temp., 1 h, 91 %; b) NaN<sub>3</sub> (3 equiv.), DMF, 70 °C, 3 h, 67 %; c) H<sub>2</sub> 1 atm, Pd/C (0.2 equiv.), MeOH, room temp., 48 h, 83 %; d) aldehyde **6** (1 equiv.), NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 equiv.), AcOH (1 equiv.), MeOH, room temp., 16 h, 72 %.





Scheme 7. Synthetic strategy to the SAM-conjugate **23**: a) ethyl chloroformate (3 equiv.), pyridine, room temp., 16 h, (51 %), b) *N*-methylimidazole (8 equiv.), isopropenyl chloroformate (4 equiv.), DCM, room temp., 20 h, 75 %; c) amine **19** (2 equiv.), pyridine, reflux, 16 h, 37 %; d) amine **19** (2 equiv.), pyridine, reflux, 16 h, 74 %; e)  $\text{NH}_4\text{F}$  (20 equiv.), MeOH, 55 °C, 24 h, 17 %.



Scheme 8. Synthesis of bisubstrate analogue **26**. a) amine **20** (1 equiv.), pyridine, 50 °C, 16 h, 85 %; b)  $\text{NH}_4\text{F}$  (20 equiv.), MeOH, 55 °C, 24 h, 22 %; c)  $\text{ZnBr}_2$  (15 equiv.), DCM/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:4), room temp., 24 h then 2 h, 47 %.

Boc group with an improved yield of 74 %. Deprotection of the silyl groups was achieved using ammonium fluoride to afford the final compound **23** in 17 % yield after HPLC purification.

The same strategy was applied for the synthesis of compound **24** (Scheme 8). Thus, reaction of **21b** with the secondary amine **20** gives the ureidoadenosine **24** in 85 % yield. Deprotection of the silyl groups with NH<sub>4</sub>F afforded compound **25**. The last step was the removal of the Boc groups and the *tert*-butyl ester function which allowed the formation of the urea **26** in 47 % yield.

## Conclusions

We reported here the synthesis of six SAM-adenosine conjugates as bisubstrate analogues for RNMTs that catalyze the m<sup>6</sup>A RNA modification. Our bisubstrates contain a SAM analogue covalently tethered to the N-6 position of an adenosine, mimicking the RNA part. The nature and the length of the linker between the two units were varied to afford a diversity of bisubstrate analogues. To contribute to the structural studies of RNMTs involved in the m<sup>6</sup>A modification, our compounds appear as valuable tools, since, recently, the structural studies of human RNMTs shows that unlike most methyltransferases, RNMTs feature a substrate-binding site which is largely open on the SAM binding pocket, favoring the design of bisubstrate inhibitors.<sup>[31]</sup> Biological and structural studies on methyltransferases of tRNA and rRNA in bacteria are under progress. Our synthetic strategy could be used to synthesize SAM-deoxyadenosine conjugates to explore m<sup>6</sup>dA modification in DNA of higher eukaryotes.<sup>[32]</sup>

## Experimental Section

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-5-(((tert-butyl)dimethylsilyloxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]carbamate (2):** Adenosine 1 (6.24 g, 10.23 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (102 mL) and Boc<sub>2</sub>O (6.70 g, 30.69 mmol, 3 equiv.) and DMAP (250.4 mg, 2.05 mmol, 0.2 equiv.) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred under reflux for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic layer was washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude was dissolved in methanol (79 mL) and a solution of methylamine 40 % wt. in H<sub>2</sub>O (3.54 mL, 40.92 mmol, 4 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature then concentrated and purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 7:3) to provide the desired compound **2** as a white foam (7.80 g, quantitative yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.73 (s, 1 H, H2 or H8), 8.30 (s, 1 H, H2 or H8), 8.00 (s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 6.07 (d, J = 5.3 Hz, 1 H, H1'), 4.66–4.64 (m, 1 H, H2'), 4.29 (m, 1 H, H3'), 4.14–4.12 (m, 1 H, H4'), 4.01 (dd, J = 4.0, 11.4 Hz, 1 H, H5'), 3.79 (dd, J = 2.7, 11.4 Hz, 1 H, H5'), 1.55 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.95 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.14 (m, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (m, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 6 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.29 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 152.9 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 149.7 (Cq), 149.6 (Cq), 141.3 (C2 or C8), 122.0 (C5), 88.3 (C1'), 85.7 (C4'), 82.1 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 76.0 (C2'), 72.0 (C3'), 62.5 (C5'), 28.1 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.6 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.5 (Cq<sup>TBS</sup>),

18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 710.4164, found 710.4157.

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]carbamate (3):** Compound **2** (1.89 g, 2.67 mmol, 1 equiv.) was dissolved in THF (27 mL). Aqueous TFA 1:1 (10.2 mL, 133.5 mmol, 50 eq of TFA) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction mixture was neutralized with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 5:5) to provide the desired adenosine **3** as a white foam (1.46 g, 91 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.73 (s, 1 H, H2 or H8), 8.06 (s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 7.95 (s, 1 H, H2 or H8), 6.18 (d, J = 11.5 Hz, 1 H, OH), 5.81 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H1'), 5.03–5.01 (m, 1 H, H2'), 4.32 (d, J = 4.5 Hz, 1 H, H3'), 4.16 (s, 1 H, H4'), 3.96–3.93 (m, 1 H, H5'), 3.73–3.68 (m, 1 H, H5'), 1.56 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.94 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.72 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.16 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.67 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 152.6 (C2 or C8), 150.8 (Cq), 149.7 (Cq), 149.4 (Cq), 142.9 (C2 or C8), 123.4 (C5), 91.2 (C1'), 89.8 (C4'), 82.7 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 74.1 (C2'), 74.0 (C3'), 63.1 (C5'), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (2 C, Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.7 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 596.3300, found 596.3293.

### General Procedure for the Formation of the Amines 5a and 5b:

The alcohol **3** (1 equiv.) was dissolved in DCM (12 mL/mmol). Dess Martin periodinane (1.2 equiv.) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction mixture was filtered through celite and concentrated. The crude was dissolved in MeOH (4.4 mL/mmol) and the appropriate amine **4a** or **4b** (1.5 equiv.) was added. NaBH<sub>3</sub>CN (1.5 equiv.) and acetic acid (1 equiv.) were then added and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction medium was diluted with ethyl acetate and washed with saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The combined organic phases were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 3:7) to afford the desired compound as a white foam.

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-5-(((2-(((4-nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)ethyl)amino)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]carbamate (5a):** The compound **5a** (280 mg, 54 %) was obtained from the adenosine **3** (375 mg, 0.629 mmol, 1 equiv.), and the amine **4a** (225 mg, 0.943 mmol, 1.5 equiv.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.69 (s, 1 H, H2 or H8), 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 8.06 (br. s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 7.98 (s, 1 H, H2 or H8), 7.47 (d, 2 H, Ar-H), 5.83 (d, J = 6.5 Hz, 1 H, H1'), 5.33 (br. s, 1 H, NH), 5.16 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>-O), 5.08–5.06 (m, 1 H, H2'), 4.22–4.19 (m, 2 H, H3' and H4'), 3.40–3.29 (m, 2 H, Hb), 2.97–2.90 (m, 2 H, H5'), 2.89–2.84 (m, 1 H, Ha), 2.80–2.76 (m, 1 H, Ha), 1.56 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.16 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.48 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 156.0 (C=O), 152.7 (C2 or C8), 150.5 (Cq), 150.3 (Cq), 149.6 (Cq), 147.7 (Cq), 144.1 (Cq), 142.9 (C2 or C8), 128.3 (2 C, Ar-C), 123.8 (2 C, Ar-C), 123.0 (C5), 90.2 (C1'), 86.0 (C4'), 82.5 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 74.0 (C3'), 73.6 (C2'), 65.2 (CH<sub>2</sub>-O), 50.9 (C5'), 49.0 (Ca), 40.9 (Cb), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 817.4100, found 817.4105.

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-5-(((3-(((4-nitrobenzyl)oxy)carbonyl)amino)-**

**propyl]amino)methyl]tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (5b):** The compound **5b** (1.04 g, 48 %) was obtained from the adenosine **3** (1.5 g, 2.6 mmol, 1 equiv.), and the amine **4b** (987 mg, 3.9 mmol, 1.5 equiv.).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.68 (s, 1 H, H2 or H8), 8.18 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 8.10 (br. s, 1 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 8.01 (s, 1 H, H2 or H8), 7.48 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2 H, Ar-H), 5.83 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1 H, H1'), 5.54 (br. s, 1 H, NH), 5.15 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 5.04–5.02 (m, 1 H, H2'), 4.22–4.20 (m, 2 H, H3' and H4'), 3.32–3.28 (m, 2 H, Hc), 2.92–2.91 (m, 2 H, H5'), 2.79–2.75 (m, 1 H, Ha), 2.72–2.67 (m, 1 H, Ha), 1.73–1.71 (m, 2 H, Hb), 1.55 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 0.92 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.73 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.08 (s, 6 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.13 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.47 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 155.9 (C=O), 152.6 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.3 (Cq), 149.6 (Cq), 147.6 (Cq), 144.4 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 128.2 (2 C, Ar-C), 123.8 (2 C, Ar-C), 122.9 (Cq), 90.1 (C1'), 85.8 (C4'), 82.4 (Cq<sup>Boc</sup>), 73.9 (C3'), 73.7 (C2'), 65.0 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 51.5 (C5'), 48.0 (Ca), 40.0 (Cc), 29.7 (Cb), 28.2 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 25.9 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 25.7 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.3 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.4 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.5 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –5.2 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm. HRMS calcd. for  $\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{N}_9\text{O}_9\text{Si}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 831.4257, found 831.4234.

**General Procedure for the Formation of the Tertiary Amines 7a and 7b:** The secondary amine **5a** or **5b** (1.1 equiv.) was dissolved in MeOH (3.4 mL/mmol). The aldehyde **6** (1 eq),  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1.5 equiv.) and acetic acid (1 equiv.) were added to the solution at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated and a work up was performed with ethyl acetate and a saturated solution of aqueous  $\text{NaHCO}_3$ . The organic layer was dried with  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The crude residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 6:4) to afford desired compounds as white foams.

**tert-Butyl 2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-[(2R,3R,4R,5R)-5-[[2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl][2-[(4-nitrobenzyl)oxy]carbonyl]amino)ethyl]amino)butanoate (7a):** The compound **7a** (454 mg, 90 %) was obtained from the adenosine **5a** (505 mg, 0.618 mmol, 1.1 equiv.), and the aldehyde **6** (154 mg, 0.562 mmol, 1 equiv.).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.67 (s, 1 H, H2 or H8), 8.24 (br. s, 1 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 8.13 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2 H, Ar-H), 7.99 (s, 1 H, H2 or H8), 7.41 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2 H, Ar-H), 5.83 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1 H, H1'), 5.67 (br. s, 1 H, NH), 5.46 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1 H, NH), 5.10–5.05 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.94 (s, 1 H, H2'), 4.17 (m, 2 H, H $\alpha$  and H4'), 4.0 (m, 1 H, H3'), 3.17 (br. s, 2 H, Hb), 2.93–2.81 (m, 2 H, H5'), 2.66–2.57 (m, 4 H, Ha and H $\gamma$ ), 1.91–1.87 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.66–1.62 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.51 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 1.38 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 1.35 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 0.88 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.73 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.06 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), 0.05 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.11 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.35 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 171.9 (C=O), 156.0 (C=O), 155.6 (C=O), 152.9 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 147.6 (Cq), 144.5 (Cq), 142.4 (C2 or C8), 128.1 (2 C, Ar-C), 123.7 (2 C, Ar-C), 122.8 (Cq), 90.1 (C1'), 83.7 (C4'), 82.4 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 82.0 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 79.8 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 74.4 (C3'), 73.7 (C2'), 64.9 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 56.5 (C5'), 54.0 (Ca or C $\gamma$ ), 52.8 (C $\alpha$ ), 50.7 (Ca or C $\gamma$ ), 39.1 (Cb), 29.8 (C $\beta$ ), 28.4 (3 C,  $\text{tBu}$ ), 28.2 (3 C,  $\text{tBu}$ ), 28.1 (3 C,  $\text{tBu}$ ), 25.9 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 25.8 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.2 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.3 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.4 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.8 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm. HRMS calcd. for  $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{Si}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 1074.5727, found 1074.5749.

**tert-Butyl 2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-[(2R,3R,4R,5R)-5-[[2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl][3-[(4-nitrobenzyl)oxy]carbonyl]amino)propyl]amino)butanoate (7b):** The compound **7b** (430 mg, 71 %) was obtained from the adenosine **5b** (506 mg, 0.609 mmol, 1.1 equiv.), and the aldehyde **6** (152 mg, 0.554 mmol, 1 equiv.).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  =

8.71 (s, 1 H, H2 or H8), 8.18 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2 H, Ar-H), 7.96 (s, 1 H, H2 or H8), 7.84 (s, 1 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 7.44–7.42 (d, 2 H, Ar-H), 5.86–5.85 (m, 1 H, H1'), 5.81 (br. s, 1 H, NH), 5.55 (br. s, 1 H,  $\text{NH}^{\text{Boc}}$ ), 5.14–5.04 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.99 (s, 1 H, H2'), 4.24–4.20 (m, 2 H, H $\alpha$  and H4'), 4.09 (m, 1 H, H3'), 3.22–3.19 (m, 2 H, Hc), 2.94–2.89 (m, 1 H, H5'), 2.80–2.78 (m, 1 H, H5'), 2.61–2.54 (m, 4 H, H $\gamma$  and Ha), 1.96–1.93 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.72–1.69 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.62–1.61 (m, 2 H, Hb), 1.56 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 1.43 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 1.41 (s, 9 H,  $\text{tBu}$ ), 0.94 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.78 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.11 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), 0.10 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.07 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.32 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 171.9 (C=O), 156.0 (C=O), 155.6 (C=O), 152.9 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.6 (Cq), 147.6 (Cq), 144.6 (Cq), 142.4 (C2 or C8), 127.9 (2 C, Ar-C), 123.8 (2 C, Ar-C), 122.8 (Cq), 90.2 (C1'), 84.0 (C4'), 82.5 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 82.0 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 79.7 (Cq,  $\text{tBu}$ ), 74.5 (C3'), 73.7 (C2'), 64.8 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 56.5 (C5'), 53.1 (Ca or C $\gamma$ ), 52.2 (Ca or C $\gamma$ ), 51.0 (C $\alpha$ ), 39.3 (Cc), 29.8 (C $\beta$ ), 28.4 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 28.2 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 28.1 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 26.8 (Cb), 25.9 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 25.8 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.1 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.3 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.4 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.8 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm. HRMS calcd. for  $\text{C}_{51}\text{H}_{86}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{Si}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 1088.5884, found 1088.5869.

**General Procedure for the Formation of Compounds 8a–b and 9a–b:** The compounds **5a–b** and **7a–b** (1 equiv.) were dissolved in MeOH (10 mL/mmol) and 10 % wt Pd/C (0.2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred under 1 atm hydrogen atmosphere for 16 h. The mixture was then filtered through celite and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH, 9:1) to afford desired compounds **8a–b** and **9a–b** as white foams.

**tert-Butyl 9-[(2R,3R,4R,5R)-5-[[2-(2-Aminoethyl)amino]methyl]-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (8a):** The compound **8a** (470 mg, 81 %) was obtained from the adenosine **5a** (737 mg, 0.902 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.64 (s, 1 H, H2 or H8), 8.00 (s, 1 H, H2 or H8), 5.77 (d,  $J$  = 6 Hz, 1 H, H1'), 4.94–4.92 (m, 1 H, H2'), 4.13–4.12 (m, 2 H, H3' and H4'), 2.89–2.81 (m, 2 H, H5'), 2.80–2.78 (m, 2 H, Hb), 2.75–2.71 (m, 1 H, Ha), 2.68–2.63 (m, 1 H, Ha), 1.44 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 0.85 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.65 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.00 (s, 6 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.22 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.50 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 152.5 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.9 (Cq), 142.5 (C2 or C8), 122.7 (C5), 89.6 (C1'), 85.5 (C4'), 81.8 (Cq,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 73.8 (C2'), 73.7 (C3'), 51.7 (Ca), 51.0 (C5'), 41.3 (Cb), 28.1 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 25.7 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 25.5 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.7 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.5 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.6 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.7 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –5.3 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm. HRMS calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_5\text{Si}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 638.3881, found 638.3875.

**tert-Butyl 9-[(2R,3R,4R,5R)-5-[[3-(Aminopropyl)amino]methyl]-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (8b):** The compound **8b** (264 mg, 81 %) was obtained from the adenosine **5b** (417 mg, 0.502 mmol).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.75 (s, 1 H, H2 or H8), 8.04 (s, 1 H, H2 or H8), 5.86 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1 H, H1'), 5.06–5.04 (m, 1 H, H2'), 4.24–4.22 (m, 2 H, H3' and H4'), 2.97–2.90 (m, 2 H, H5'), 2.82–2.79 (m, 2 H, Hc), 2.78–2.68 (m, 2 H, Ha), 1.74–1.68 (m, 2 H, Hb), 1.56 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 0.94 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.75 (s, 9 H,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.11 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –0.43 (s, 3 H,  $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 122.9 (C5), 90.1 (C1'), 86.1 (C4'), 82.4 (Cq,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 74.0 (C3'), 73.9 (C2'), 51.6 (C5'), 48.2 (Ca), 40.5 (Cc), 33.7 (Cb), 28.2 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{Boc}}$ ), 25.9 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 25.8 (3 C,  $\text{tBu}^{\text{TBS}}$ ), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.2 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.4 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –4.4 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ), –5.1 ( $\text{Me}^{\text{TBS}}$ ) ppm. HRMS calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_7\text{O}_5\text{Si}_2$  [M + H]<sup>+</sup>: 652.4038, found 652.4020.

**tert-Butyl 4-[(2-Aminoethyl)[(2R,3R,4R,5R)-5-[[2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butyl)dimethyl-**

**silyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methylamino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoate (9a)**: The compound **9a** (181 mg, 93 %) was obtained from the adenosine **7a** (233 mg, 0.215 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.65 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.12 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 5.83–5.82 (m, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.53 (br. s, 1 H, NH), 4.91–4.90 (m, 1 H, H<sub>2'</sub>), 4.13–4.09 (m, 3 H, H<sub>α</sub>, H<sub>3'</sub> and H<sub>4'</sub>), 2.87–2.79 (m, 2 H, H<sub>5'</sub>), 2.73–2.71 (m, 2 H, H<sub>β</sub>), 2.61–2.50 (m, 4 H, H<sub>γ</sub> and H<sub>α</sub>), 1.91–1.85 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.69–1.64 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.47 (s, 9 H, tBu), 1.36 (s, 9 H, tBu), 1.33 (s, 9 H, tBu), 0.86 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.70 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.05 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.03 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.13 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.36 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.6 (C=O), 155.4 (C=O), 152.5 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.9 (Cq), 142.6 (C2 or C8), 122.7 (C5), 89.7 (C1'), 83.6 (C4'), 82.0 (Cq, tBu), 81.7 (Cq, tBu), 79.5 (Cq, tBu), 74.1 (C3'), 73.8 (C2'), 56.7 (C5'), 55.9 (Ca or C<sub>γ</sub>), 52.7 (C<sub>α</sub>), 51.0 (Ca or C<sub>γ</sub>), 39.0 (Cb), 29.7 (C<sub>β</sub>), 28.3 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 27.9 (3 C, tBu), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.6 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.3 (Me<sup>TBS</sup>), –4.4 (Me<sup>TBS</sup>), –4.6 (Me<sup>TBS</sup>), –4.9 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>79</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 895.5509, found 895.5506.

**tert-Butyl 4-[(3-Aminopropyl)][(2R,3R,4R,5R)-5-{6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methylamino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoate (9b)**: The compound **9b** (361 mg, 89 %) was obtained from the adenosine **7b** (484 mg, 0.445 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.71 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.10 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 5.90–5.89 (d, J = 4.5 Hz, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.56 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, NH), 4.99 (s, 1 H, H<sub>2'</sub>), 4.19–4.15 (m, 3 H, H<sub>α</sub>, H<sub>3'</sub> and H<sub>4'</sub>), 2.85–2.76 (m, 2 H, H<sub>5'</sub>), 2.71–2.68 (m, 2 H, H<sub>c</sub>), 2.65–2.57 (m, 2 H, H<sub>γ</sub>), 2.53–2.48 (m, 2 H, H<sub>α</sub>), 1.97–1.91 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.74–1.70 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.59–1.55 (m, 11 H, H<sub>b</sub> and tBu), 1.43 (s, 9 H, tBu), 1.40 (s, 9 H, tBu), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.07 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.30 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.8 (C=O), 155.6 (C=O), 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.7 (Cq), 142.7 (C2 or C8), 122.9 (C5), 90.0 (C1'), 83.9 (C4'), 82.3 (Cq, tBu), 81.8 (Cq, tBu), 79.6 (Cq, tBu), 74.5 (C3'), 73.8 (C2'), 56.8 (C5'), 53.1 (C<sub>α</sub>), 52.6 (Ca or C<sub>γ</sub>), 51.0 (Ca or C<sub>γ</sub>), 40.4 (Cc), 30.3 (Cb), 29.7 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3 C, tBu), 28.2 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.2 (Me<sup>TBS</sup>), –4.3 (Me<sup>TBS</sup>), –4.4 (Me<sup>TBS</sup>), –4.8 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>81</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 909.5665, found 909.5683.

**General Procedure for the Formation of Compounds 11a–b and 12a–b**: The inosine **10** (1 equiv.) was dissolved in DMF (5 mL/mmol) with PyBop (1.5 equiv.). DBU (2 equiv.) was then added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The primary amines **8a–b** or **9a–b** (2eq) dissolved in DMF (5 mL/mmol) were added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. A work up was performed with ethyl acetate and brine. The organic layer was repeatedly washed with brine to remove DMF, dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 6:4) to afford desired compounds as white foams.

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-5-[[2-[[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]amino]ethyl)amino]methyl]-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (11a)**: The compound **11a** (273 mg, 85 %) was obtained from the inosine **10** (158 mg, 0.259 mmol, 1 equiv.), and the amine **8a** (331 mg, 0.518 mmol, 2 equiv.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.71 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.28 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.02 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.01 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 6.31 (br. s, 1 H, NH), 5.97 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.85 (d, J = 6.2 Hz, 1 H, H<sub>1''</sub>), 5.05–5.03 (m, 1 H, H<sub>2''</sub>), 4.68 (br. s, 1 H,

H<sub>2'</sub>), 4.30–4.26 (m, 2 H, H<sub>3'</sub> and H<sub>4''</sub>), 4.24–4.22 (m, 1 H, H<sub>3''</sub>), 4.12–4.10 (m, 1 H, H<sub>4'</sub>), 4.02 (dd, J = 4.4, 11.2 Hz, 1 H, H<sub>5'</sub>), 3.78–3.75 (m, 3 H, H<sub>5'</sub> and H<sub>b</sub>), 3.07–2.97 (m, 4 H, H<sub>5''</sub> and H<sub>a</sub>), 1.54 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 9 H, 3 Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.07 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.25 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.49 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.8 (Cq), 153.0 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.5 (Cq), 150.1 (Cq), 149.9 (Cq), 149.0 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 120.2 (Cq), 90.1 (C1''), 88.4 (C1'), 85.5 (2 C, C4' and C4''), 82.5 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 75.7 (C2'), 73.9 (C2''), 73.8 (C3''), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 51.0 (C5''), 49.4 (Ca), 40.4 (Cb), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 26.1 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.2 (Me<sup>TBS</sup>), –4.3 (Me<sup>TBS</sup>), –4.5 (2 C, Me<sup>TBS</sup>), –4.5 (2 C, Me<sup>TBS</sup>), –4.9 (Me<sup>TBS</sup>), –5.2 (2 C, Me<sup>TBS</sup>), –5.2 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>57</sub>H<sub>108</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1230.7178, found 1230.7169.

**tert-Butyl [9-((2R,3R,4R,5R)-5-[[3-[[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]amino]propyl)amino]methyl]-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (11b)**: The compound **11b** (212 mg, 85 %) was obtained from the inosine **10** (122 mg, 0.199 mmol, 1 equiv.), and the amine **8b** (259 mg, 0.397 mmol, 2 equiv.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.65 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.25 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.13 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.05 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 6.48 (br. s, 1 H, NH), 5.99 (d, J = 4.7 Hz, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.88 (d, J = 6.1 Hz, 1 H, H<sub>1''</sub>), 4.95–4.89 (m, 1 H, H<sub>2''</sub>), 4.61 (br. s, 1 H, H<sub>2'</sub>), 4.31–4.30 (m, 3 H, H<sub>3'</sub>, H<sub>3''</sub> and H<sub>4''</sub>), 4.13–4.11 (m, 1 H, H<sub>4'</sub>), 4.04–4.01 (m, 1 H, H<sub>5'</sub>), 3.80–3.77 (m, 1 H, H<sub>5'</sub>), 3.71 (br. s, 2 H, H<sub>c</sub>), 3.07–3.05 (m, 2 H, H<sub>5''</sub>), 2.97 (br. s, 2 H, H<sub>a</sub>), 2.04–1.94 (m, 2 H, H<sub>b</sub>), 1.54 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 6 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.04 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.18 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), –0.46 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 155.2 (Cq), 152.8 (C2 or C8), 152.5 (C2 or C8), 150.2 (Cq), 150.2 (Cq), 150.1 (Cq), 150.0 (Cq), 142.8 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 122.5 (Cq), 120.06 (Cq), 90.3 (C1''), 88.4 (C1'), 85.3 (C4' or C4''), 84.4 (C4' or C4''), 82.6 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 76.0 (C2'), 74.1 (C2''), 73.8 (C3'), 71.8 (C3'), 62.5 (C5'), 50.8 (C5''), 46.99 (Ca), 38.1 (Cc), 28.9 (Cb), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), –4.2 (Me<sup>TBS</sup>), –4.3 (Me<sup>TBS</sup>), –4.5 (Me<sup>TBS</sup>), –4.5 (2 C, Me<sup>TBS</sup>), –4.6 (Me<sup>TBS</sup>), –4.8 (Me<sup>TBS</sup>), –5.2 (Me<sup>TBS</sup>), –5.2 (Me<sup>TBS</sup>), –5.3 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>58</sub>H<sub>110</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1244.7334, found 1244.7336.

**tert-Butyl 4-[[2-[[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]amino]ethyl]-[[2-[[9-((2R,3R,4R,5R)-5-[[6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butyl dimethylsilyloxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl]amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoate (12a)**: The compound **12a** was obtained from the inosine **10** (33 mg, 0.055 mmol, 1 equiv.), and the amine **9a** (100 mg, 0.111 mmol, 2 equiv.) (66 mg, 80 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.70 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.2 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.03 (br. s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 8.01 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 7.97 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 6.30 (s, 1 H, NH-Cb), 5.96 (d, J = 5.3 Hz, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.92–5.86 (m, 1 H, H<sub>1'</sub>), 5.42–5.35 (m, 1 H, NH-C<sub>α</sub>), 5.02–4.96 (m, 1 H, H<sub>2'</sub>), 4.73–4.68 (m, 1 H, H<sub>2''</sub>), 4.30 (m, 1 H, H<sub>3''</sub>), 4.25–4.08 (m, 4 H, H<sub>4'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>α</sub> and H<sub>4''</sub>), 4.03 (dd, J = 11.3, 4.7 Hz, 1 H, H<sub>5''</sub>), 3.76 (dd, J = 3.1, 11.2 Hz, 1 H, H<sub>5'</sub>), 3.72–

3.56 (m, 2 H, H<sub>b</sub>), 2.97–2.87 (m, 2 H, H<sub>5'</sub>), 2.87–2.78 (m, 2 H, H<sub>a</sub>), 2.77–2.61 (m, 2 H, H<sub>γ</sub>), 2.02–1.90 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.81–1.71 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.54 (s, 9 H, tBu), 1.40 (s, 9 H, tBu), 1.38 (s, 9 H, tBu), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.91 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.90 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.08 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.07 (br. s, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.08 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.12 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.36 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.7 (C=O<sup>ester</sup>), 155.5 (C<sub>q</sub>), 154.7 (C<sub>q</sub>), 153.0 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.5 (C<sub>q</sub>), 150.0 (C<sub>q</sub>), 149.7 (C<sub>q</sub>), 148.9 (C<sub>q</sub>), 142.6 (C2 or C8), 138.9 (C2 or C8), 122.8 (C<sub>q</sub>), 120.3 (C<sub>q</sub>), 90.0 (C1'), 88.4 (C1''), 85.5 (C4'), 83.7 (C4'), 82.2 (C<sub>q</sub>, tBu), 81.9 (C<sub>q</sub>, tBu), 79.6 (C<sub>q</sub>, tBu), 75.4 (C2''), 74.2 (C3'), 73.7 (C2'), 72.2 (C3''), 62.7 (C5''), 56.5 (C5'), 53.5 (Ca), 52.7 (C<sub>α</sub>), 50.9 (C<sub>γ</sub>), 38.4 (C<sub>b</sub>), 29.8 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3 C, tBu), 28.2 (3 C, tBu), 28.0 (3 C, tBu), 26.1 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (6 C, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (6 C, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (3 C, 3 Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>70</sub>H<sub>131</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1487.8805, found 1487.8796.

**tert-Butyl 4-[(3-{[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]-5-[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]methyl)-tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)propyl]-[[(2R,3R,4R,5R)-5-[6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl]amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoate (12b):** The compound **12b** (211 mg, 81 %) was obtained from the inosine **10** (104 mg, 0.171 mmol, 1 equiv.), and the amine **9b** (310 mg, 0.341 mmol, 2 equiv.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.73 (s, 1 H, H2 or H8), 8.31 (s, 1 H, H2 or H8), 8.08 (br. s, 1 H, NH<sup>BoC</sup>), 7.99 (s, 1 H, H2 or H8), 7.92 (s, 1 H, H2 or H8), 6.16 (br. s, 1 H, NH-Cc), 5.99–5.96 (m, 2 H, H1' and H1''), 5.66–5.64 (m, 1 H, NH-C<sub>α</sub>), 5.01 (br. s, 1 H, H2'), 4.77–4.75 (m, 1 H, H2''), 4.33–4.32 (m, 1 H, H3''), 4.25–4.22 (m, 1 H, H4'), 4.16 (br. s, 2 H, H3', H<sub>α</sub>), 4.12–4.10 (m, 1 H, H4''), 4.05–4.02 (m, 1 H, H5''), 3.78–3.75 (m, 1 H, H5'), 3.64 (br. s, 2 H, Hc), 2.91–2.83 (m, 2 H, H5'), 2.64–2.46 (m, 4 H, H<sub>a</sub> and H<sub>γ</sub>), 1.95 (br. s, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.81–1.79 (m, 3 H, H<sub>β</sub> and H<sub>b</sub>), 1.56 (s, 9 H, tBu), 1.42 (s, 9 H, tBu), 1.39 (s, 9 H, tBu), 0.94 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.79 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.12–0.10 (br. s, 18 H, 6 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.06 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.25 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.8 (C=O), 155.6 (C<sub>q</sub>), 155.0 (C<sub>q</sub>), 153.1 (C2 or C8), 152.8 (C2 or C8), 150.6 (C<sub>q</sub>), 150.1 (C<sub>q</sub>), 149.7 (C<sub>q</sub>), 149.3 (C<sub>q</sub>), 142.7 (C2 or C8), 138.9 (C2 or C8), 122.9 (C<sub>q</sub>), 120.4 (C<sub>q</sub>), 90.1 (C1'), 88.5 (C1''), 85.5 (C4'), 83.9 (C4'), 82.3 (C<sub>q</sub>, tBu), 81.7 (C<sub>q</sub>, tBu), 79.5 (C<sub>q</sub>, tBu), 75.5 (C2''), 74.5 (C3'), 73.8 (C2'), 72.3 (C3''), 62.8 (C5''), 56.7 (C5'), 53.2 (C<sub>α</sub>), 52.2 (Ca), 51.1 (C<sub>γ</sub>), 39.0 (Cc), 29.6 (C<sub>β</sub>), 28.4 (3 C, tBu), 28.3 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu), 27.0 (Cb), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (6C, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.1 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (2C, 2 C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2C, 2 Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>71</sub>H<sub>133</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1501.8961, found 1501.8957.

**General Procedure for the Formation of Compounds 13a–b:** The SAM-adenosine conjugates **11a** or **11b** (1 equiv.) were dissolved in DCM (5 mL/mmol) and ZnBr<sub>2</sub> (5 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (20 mL/mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and brine. The combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH, 9:1) to afford desired compounds as white foams.

**N<sup>1</sup>-{[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl]-N<sup>2</sup>-[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]-5-[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]methyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]ethane-1,2-diamine (13a):** The compound **13a** (86 mg, 71 %) was obtained from **11a** (131 mg, 0.106 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.31 (s, 1 H, H2 or H8), 8.22 (s, 1 H, H2 or H8), 7.82 (s, 1 H, H2 or H8), 7.73 (s, 1 H, H2 or H8), 5.88 (br. s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.78–5.75 (m, 2 H, H1' and H1''), 5.10–5.08 (m, 1 H, H2'), 5.04–5.02 (m, 1 H, H2''), 4.35–4.34 (m, 1 H, H3'), 4.27 (m, 2 H, H3' and H4''), 4.15 (m, 1 H, H4'), 3.96–3.93 (m, 2 H, H5' and Hb), 3.73–3.64 (m, 2 H, H5' and Hb), 3.11–3.00 (m, 4 H, H5'' and Ha), 0.95–0.92 (m, 27 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.73 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.12–0.06 (m, 18 H, 6 Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.15 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.51 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.61 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 155.7 (C<sub>q</sub>), 155.2 (C<sub>q</sub>), 152.7 (C2 or C8), 152.6 (C2 or C8), 149.4 (C<sub>q</sub>), 147.7 (C<sub>q</sub>), 141.1 (C2 or C8), 140.4 (C2 or C8), 121.5 (C<sub>q</sub>), 120.9 (C<sub>q</sub>), 91.0 (C1''), 90.1 (C1'), 89.4 (C4'), 85.5 (C4''), 74.1 (3 C, C2'', C3', C3''), 70.7 (C2''), 63.0 (C5'), 50.7 (C5''), 48.5 (Ca), 39.9 (Cb), 25.9 (9 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (4 C, 4 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>), -5.8 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>52</sub>H<sub>100</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1130.6654, found 1130.6632.

**N<sup>1</sup>-{[(2R,3R,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl]-N<sup>3</sup>-[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]-5-[(tert-butylidimethylsilyl)oxy]methyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]propane-1,3-diamine (13b):** The compound **13b** (15.9 mg, 46 %) was obtained from **11b** (37 mg, 0.03 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.30 (s, 1 H, H2 or H8), 8.24 (s, 1 H, H2 or H8), 8.08 (s, 1 H, H2 or H8), 7.89 (s, 1 H, H2 or H8), 6.24 (br. s, 1 H, NH), 6.02–6.01 (d, J = 4.9 Hz, 1 H, H1'), 5.83–5.81 (d, J = 6.6 Hz, 1 H, H1''), 5.76 (br. s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 5.05–5.01 (m, 1 H, H2''), 4.62 (br. s, 1 H, H2'), 4.36–4.30 (m, 3 H, H3', H3'' and H4' or H4''), 4.15–4.11 (m, 1 H, H4' or H4''), 4.05–4.02 (m, 1 H, H5'), 3.84–3.77 (m, 2 H, H5' and Hc), 3.71–3.68 (m, 1 H, Hc), 3.10–3.08 (m, 1 H, H5''), 2.96–2.91 (m, 3 H, H5'' and Ha), 2.00–1.97 (m, 2 H, Hb), 0.95–0.94 (m, 18 H, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.14–0.11 (m, 15 H, 5 Me<sup>TBS</sup>), 0.10–0.09 (m, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.20 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 155.7 (C<sub>q</sub>), 155.0 (C<sub>q</sub>), 153.1 (C2 or C8), 152.7 (C2 or C8), 149.3 (C<sub>q</sub>), 148.9 (C<sub>q</sub>), 141.1 (C2 or C8), 139.0 (C2 or C8), 121.0 (C<sub>q</sub>), 120.1 (C<sub>q</sub>), 90.2 (C1''), 89.6 (C1'), 88.4 (C4' or C4''), 85.4 (C4' or C4''), 76.0 (C2'), 74.2 (C3' or C3''), 73.9 (C2''), 72.0 (C3' or C3''), 62.6 (C5'), 50.9 (C5''), 47.2 (Ca), 39.0 (Cc), 29.4 (Cb), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.2 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 18.0 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), 17.9 (C<sub>q</sub><sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.4 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>102</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1144.6810, found 1144.6794.

**General Procedure for the Formation of the Compounds 14a–b and 15a–b:** The compounds **12a–b** or **13a–b** (1 equiv.) were dissolved in MeOH (24 mL/mmol). NH<sub>4</sub>F (20 equiv.) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. For **15a–b**, the solution was partitioned between DCM and brine. The combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH, 95:5) to afford desired compounds as white foams. For **14a–b**, the solution was partitioned between DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford desired compounds as white foams.

**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-5-([2-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-**

**furan-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)ethyl]amino)methyl-tetrahydrofuran-3,4-diol (14a):** The compound **14a** (48.6 mg, 50 %) was obtained from **13a** (147 mg, 0.130 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.16 (s, 1 H, H2 or H8), 8.01 (s, 1 H, H2 or H8), 7.91 (s, 1 H, H2 or H8), 7.64 (s, 1 H, H2 or H8), 5.97 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H1'), 5.90 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H, H1''), 5.09–5.07 (m, 1 H, H2'), 4.79 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1 H, H2''), 4.57–4.54 (m, 1 H, H4'), 4.41–4.39 (m, 1 H, H3''), 4.36 (m, 1 H, H3'), 4.29–4.28 (m, 1 H, H4''), 3.93–3.89 (m, 2 H, H5' and H5''), 3.89–3.82 (m, 1 H, H5''), 3.81–3.66 (m, 3 H, Hb and Ha), 3.63–3.52 (m, 1 H, H5'), 3.51–3.29 (m, 1 H, Ha), 1.96 (s, 8 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 180.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 154.1 (Cq), 153.7 (Cq), 152.1 (C2 or C8), 151.2 (C2 or C8), 147.5 (Cq), 146.7 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 140.9 (C2 or C8), 118.4 (Cq), 118.4 (Cq), 89.6 (C1'), 88.7 (C1''), 85.9 (C4' or C4''), 80.7 (C4' or C4''), 73.7 (C2''), 72.0 (C3'), 71.8 (C2'), 70.7 (C3''), 61.7 (C5''), 50.0 (Ca), 48.5 (C5'), 38.4 (Cb), 22.5 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>11</sub>O<sub>7</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 560.2330, found 560.2320. HPLC retention time: 14 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0 → 0:100 in 30 min).

**(2R,3R,4S,5R)-2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-5-([3-({9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)propyl]amino)methyl-tetrahydrofuran-3,4-diol (14b):** The compound **14b** (1.3 mg, 15 %) was obtained from **13b** (16 mg, 0.0139 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.24 (s, 1 H, H2 or H8), 8.16 (s, 1 H, H2 or H8), 8.09 (s, 1 H, H2 or H8), 7.94 (s, 1 H, H2 or H8), 6.05–6.02 (m, 2 H, H1' and H1''), 4.87–4.85 (m, 1 H, H2'), 4.79 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1 H, H2''), 4.60–4.56 (m, 1 H, H4' or H4''), 4.47–4.45 (m, 2 H, H3' and H3''), 4.35–4.33 (m, 1 H, H4' or H4''), 3.94 (dd, *J* = 2.7, 12.8 Hz, 1 H, H5' or H5''), 3.88 (dd, *J* = 3.3, 12.9 Hz, 1 H, H5' or H5''), 3.83–3.79 (m, 1 H, H5' or H5''), 3.67 (br. s, 1 H, Hc), 3.61–3.58 (m, 2 H, Hc and H5' or H5''), 3.42–3.39 (m, 2 H, Ha), 2.19–2.14 (m, 2 H, Hb), 1.82 (s, 8 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 179.5 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 154.9 (Cq), 154.6 (Cq), 152.2 (C2 or C8), 152.2 (C2 or C8), 148.0 (2 C, Cq), 141.1 (C2 or C8), 140.2 (C2 or C8), 119.1 (Cq), 118.9 (Cq), 89.7 (C1'), 88.3 (C1''), 85.7 (C4' or C4''), 79.9 (C4' or C4''), 73.8 (C2'), 72.6 (C2''), 71.6 (C3' or C3''), 70.6 (C3' or C3''), 61.5 (C5''), 48.2 (C5'), 45.1 (Ca), 37.5 (Cc), 25.2 (Cb), 22.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>7</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 596.2306, found 596.2306. HPLC retention time: 13 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0 → 0:100 in 30 min).

**tert-Butyl 2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-[(2R,3S,4R,5R)-5-[6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl)methyl][2-({9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)ethyl]amino)butanoate (15a):** The compound **15a** (32 mg, 61 %) was obtained from **12a** (83 mg, 0.0557 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.53 (s, 2 H, H2 or H8), 8.13 (br. s, 1 H, NH<sup>BOC</sup>), 7.98 (s, 1 H, H2 or H8), 7.92 (s, 1 H, H2 or H8), 5.93–5.89 (m, 2 H, H1' and H1''), 5.51 (br. s, 1 H, NH-Cα), 4.98 (s, 1 H, H2''), 4.78 (s, 1 H, H2'), 4.50–4.46 (m, 2 H, H3' and H3''), 4.29 (s, 1 H, H4''), 4.24–4.17 (m, 2 H, Hα and H4'), 3.91–3.88 (m, 1 H, H5''), 3.74–3.72 (m, 1 H, H5'), 3.57 (br. s, 1 H, Hb), 2.87–2.61 (m, 6 H, H5', Ha and Hγ), 2.00 (br. s, 1 H, Hβ), 1.71 (br. s, 1 H, Hβ), 1.51 (s, 9 H, tBu), 1.39 (s, 9 H, tBu), 1.36 (s, 9 H, tBu). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.0 (C=O), 155.9 (C=O), 154.6 (C=O), 152.6 (2 C, C2 or C8), 150.4 (Cq), 150.0 (Cq), 149.8 (Cq), 147.4 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 140.5 (C2 or C8), 122.0 (Cq), 120.5 (Cq), 90.9 (C1''), 89.9 (C1'), 87.6 (C4''), 82.3 (C4' or Cq), 82.2 (C4' or Cq), 80.8 (Cq), 80.1 (Cq), 73.8 (2 C, C2' and C2''), 72.5 (2 C, C3' and C3''), 59.0 (C5''), 56.8 (C5'), 53.8 (Ca), 52.5 (Cα), 51.2 (Cγ), 38.8 (Cb), 29.8 (Cβ), 28.4 (3 C, tBu), 28.2 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu) ppm. HRMS calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 917.4481, found 917.4457.

**tert-Butyl 2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-[(2R,3S,4R,5R)-5-[6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl]-3,4-dihydroxy-**

**tetrahydrofuran-2-yl)methyl][3-({9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)propyl]amino)butanoate (15b):** The compound **15b** (91 mg, 73 %) was obtained from **12b** (201 mg, 0.133 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.55 (s, 1 H, H2 or H8), 8.14 (s, 1 H, H2 or H8), 8.02 (s, 1 H, H2 or H8), 7.8 (s, 1 H, H2 or H8), 5.97 (s, 1 H, H1'), 5.86 (s, 1 H, H1''), 5.56 (br. s, 1 H, NH-Cα), 5.01 (s, 1 H, H2''), 4.77 (s, 1 H, H2'), 4.59 (s, 1 H, H3'), 4.46 (s, 1 H, H3''), 4.30–4.07 (m, 3 H, H4', H4'' and Hα), 3.91–3.89 (m, 1 H, H5''), 3.74–3.58 (m, 3 H, H5'' and Hc), 2.97–2.32 (m, 6 H, H5', Ha and Hγ), 2.09–1.94 (br. s, 1 H, Hβ), 1.82 (br. s, 3 H, Hβ and Hb), 1.53 (s, 9 H, tBu), 1.38 (s, 9 H, tBu), 1.36 (s, 9 H, tBu). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.9 (C=O), 155.9 (Cq), 154.7 (Cq), 152.7 (2 C, C2 or C8), 150.4 (Cq), 150.0 (Cq), 149.9 (Cq), 147.2 (Cq), 141.8 (C2 or C8), 140.3 (C2 or C8), 122.2 (Cq), 120.6 (Cq), 91.2 (C1''), 90.6 (C1'), 87.8 (C4' or C4''), 82.5 (Cq), 82.3 (Cq), 82.0 (Cq), 80.2 (C4' or C4''), 74.9 (2 C, C2' and C2''), 73.8 (2 C, C3' and C3''), 63.2 (C5''), 56.9 (C5'), 52.7 (Cα), 51.6 (Ca), 50.5 (Cγ), 38.4 (Cc), 29.4 (Cβ), 28.4 (3 C, tBu), 28.2 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu), 25.3 (Cb) ppm. HRMS calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 931.4638, found 931.4625.

**General Procedure for the Formation of Compounds 16a–b:** The SAM-adenosine conjugates **15a** or **15b** (1 equiv.) were dissolved in DCM (5 mL/mmol) and ZnBr<sub>2</sub> (15 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (20 mL/mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford desired compounds as white foams.

**(S)-2-Amino-4-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl][2-({9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)ethyl]amino)butanoic Acid (16a):** The compound **16a** (5.5 mg, 16 %) was obtained from the SAM-adenosine conjugate **15a** (32 mg, 0.034 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.26 (s, 1 H, H2 or H8), 8.12 (s, 1 H, H2 or H8), 8.08 (s, 1 H, H2 or H8), 7.83 (s, 1 H, H2 or H8), 6.03–6.00 (m, 2 H, H1' and H1''), 5.23 (br. s, 1 H, H2'), 4.90–4.88 (m, 1 H, H2''), 4.74–4.72 (m, 1 H, H4'), 4.47–4.45 (m, 1 H, H3''), 4.40–4.39 (m, 1 H, H3'), 4.35–4.34 (m, 1 H, H4'), 4.10 (br. s, 1 H, 1 H5'), 3.93–3.96 (m, 1 H, H5''), 3.92–3.90 (m, 1 H, Hα), 3.89–3.85 (m, 1 H, H5'), 3.82 (br. s, 2 H, Hb), 3.75–3.67 (m, 4 H, H5', Hγ, Ha), 3.58–3.54 (m, 1 H, Ha), 2.55–2.48 (m, 1 H, Hβ), 2.42–2.35 (m, 1 H, Hβ), 1.98 (s, 17 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 180.3 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 172.8 (C=O), 154.4 (Cq), 153.9 (Cq), 152.5 (C2 or C8), 151.2 (C2 or C8), 147.7 (Cq), 147.0 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 141.1 (C2 or C8), 118.8 (Cq), 118.7 (Cq), 89.5 (C1'), 88.6 (C1''), 86.0 (C4''), 79.5 (C4'), 73.7 (C2''), 71.9 (C3'), 71.5 (C2'), 70.7 (C3''), 61.7 (C5''), 55.6 (2 C, C5' and Ca), 52.2 (Cα), 47.8 (Cγ), 37.2 (Cb), 24.2 (Cβ), 23.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 661.2806, found 661.2805. HPLC retention time: 13 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0 → 0:100 in 30 min).

**2-Amino-4-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl][3-({9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]amino)propyl]amino)butanoic Acid (16b):** The compound **16b** (1.7 mg, 3 %) was obtained from the SAM-adenosine conjugate **15a** (84 mg, 0.090 mmol). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.23 (s, 1 H, H2 or H8), 8.12 (s, 1 H, H2 or H8), 8.05 (s, 1 H, H2 or H8), 7.95 (s, 1 H, H2 or H8), 6.03 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, H1'), 5.91–5.90 (m, 1 H, H1''), 4.75 (masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O, 1 H, H2'), 4.71–4.70 (m, 1 H, H2''), 4.54–4.51 (m, 1 H, H4' or H4''), 4.47–4.46 (m, 1 H, H3'), 4.36–4.32 (m, 2 H, H4' or H4'' and H3''), 3.99–3.96 (m, 1 H, H5' or H5''), 3.93–3.86 (m, 2 H, H5' or H5'' and Hα), 3.71–3.30 (m, 8 H, H5'

or H5'', Ha, Hc and H $\gamma$ ), 2.31–2.26 (m, 1 H, H $\beta$ ), 2.17–2.12 (m, 1 H, H $\beta$ ), 2.07–2.00 (m, 2 H, Hb), 1.97 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 181.2 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 173.4 (C=O), 155.0 (Cq), 154.0 (Cq), 152.5 (C2 or C8), 152.0 (C2 or C8), 147.9 (Cq), 147.5 (Cq), 140.0 (C2 or C8), 139.9 (C2 or C8), 118.8 (2 Cq), 89.2 (C1''), 88.1 (C1'), 85.7 (C4' or C4''), 79.3 (C4'a or C4''), 73.8 (C2'), 72.6 (C2''), 71.7 (C3''), 70.6 (C3'), 61.5 (C5' or C5''), 54.3 (C5' or C5''), 53.3 (C $\alpha$ ), 51.8 (Ca), 51.2 (C $\gamma$ ), 37.8 (Cc), 25.2 (C $\beta$ ), 23.7 (Cb), 23.1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>12</sub>NaO<sub>9</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 697.2782, found 697.2806. HPLC retention time: 15 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0  $\rightarrow$  0:100 in 30 min).

**((2R,3R,4R,5R)-5-{6-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl}-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methylmethanesulfonate (17)**: The adenosine **3** (400 mg, 0.671 mmol, 1 equiv.) was dissolved in pyridine (2.7 mL). Methanesulfonyl chloride (103  $\mu$ L, 1.34 mmol, 2 equiv.) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, quenched with water and then diluted in DCM. The organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, and the combined organic layers were co-evaporated with toluene. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 6:4) to provide the desired compound **17** as a white foam (413 mg, 91 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.74 (s, 1 H, H2 or H8), 8.12 (s, 1 H, H2 or H8), 5.95 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H1'), 5.01–4.99 (m, 1 H, H2'), 4.62–4.59 (m, 1 H, H5'), 4.51–4.48 (m, 1 H, H5'), 4.35–4.34 (m, 2 H, H3', H4'), 3.01 (s, 3 H, Me<sup>Ms</sup>), 1.57 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.94 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.26 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 153.0 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.1 (Cq), 149.6 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 122.5 (Cq), 89.8 (C1'), 82.6 (C4'), 82.6 (Cq, tBu<sup>Boc</sup>), 74.1 (C2'), 72.0 (C3'), 68.0 (C5'), 37.8 (CH<sub>3</sub><sup>Ms</sup>), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 696,2895, found 696.2908.

**tert-Butyl (9-((2R,3R,4R,5R)-5-(Azidomethyl)-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)carbamate (18)**: The adenosine **17** (410 mg, 0.61 mmol, 1 equiv.) was dissolved in DMF (3 mL) and sodium azide (118 mg, 1.82 mmol, 3 equiv.) was added to the reaction. The mixture was heated at 70 °C for 3 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc and brine. The organic layer was washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 8:2) to provide the desired compound **18** as a white foam (256 mg, 67 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.72 (s, 1 H, H2 or H8), 8.32 (br. s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 8.16 (s, 1 H, H2 or H8), 5.92 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 H, H1'), 4.91–4.89 (m, 1 H, H2'), 4.28–4.26 (m, 1 H, H3'), 4.21–4.18 (m, 1 H, H4'), 3.73–3.67 (m, 2 H, H5'), 1.54 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.91 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.80 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.04 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.21 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 152.9 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 150.1 (Cq), 149.8 (Cq), 141.9 (C2 or C8), 122.6 (Cq), 89.9 (C1'), 83.0 (C4'), 82.3 (Cq), 74.5 (C2'), 72.4 (C3'), 51.6 (C5'), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.7 (Me<sup>TBS</sup>), -4.8 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 643,3184, found 643.3157.

**tert-Butyl (9-((2R,3R,4R,5R)-5-(Aminomethyl)-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)carbamate (19)**: The adenosine **18** (1.14 g, 1.836 mmol, 1 equiv.) was dissolved in MeOH (18 mL) and Pd/C (10 % wt, 294 mg, 0.28 mmol,

0.2 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under 1 atm hydrogen atmosphere, filtered through celite and the filtrate was concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH, 95:5) to provide the desired compound **19** as a white foam (837 mg, 83 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.71 (s, 1 H, H2 or H8), 8.09 (s, 1 H, H2 or H8), 5.86 (d, *J* = 6.2 Hz, 1 H, H1'), 4.97–4.95 (m, 1 H, H2'), 4.26–4.24 (m, 1 H, H3'), 4.14–4.11 (m, 1 H, H4'), 3.12–3.09 (m, 1 H, 1 H5'), 3.04–3.00 (m, 1 H, 1 H5'), 2.28 (br. s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 1.54 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 0.91 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.74 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.45 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 152.8 (C2 or C8), 150.6 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.6 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 89.9 (C1'), 87.2 (C4'), 82.3 (Cq), 74.1 (C2'), 73.1 (C3'), 43.5 (C5'), 28.2 (3 C, tBu<sup>Boc</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.1 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 595.3459, found 595.3462.

**tert-Butyl (S)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-4-(((2R,3R,4R,5R)-5-{6-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-9H-purin-9-yl}-3,4-bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-amino}butanoate (20)**: The amine **19** (380 mg, 0.639 mmol, 1.5 equiv.) was dissolved in MeOH (1.5 mL). The aldehyde **6** (116 mg, 0.426 mmol, 1eq), NaBH<sub>3</sub>CN (40 mg, 0.639 mmol, 1.5 equiv.) and acetic acid (24  $\mu$ L, 0.426 mmol, 1 equiv.) were added to the solution at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated and a work up was performed with ethyl acetate and a saturated solution of aqueous NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The crude residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 5:5) to afford the desired compound **20** as a white foam (261 mg, 72 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.66 (s, 1 H, H2 or H8), 8.35 (br. s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 8.05 (s, 1 H, H2 or H8), 5.84–5.83 (m, 1 H, H1'), 5.36–5.35 (m, 1 H, NH-C $\alpha$ ), 4.96–4.94 (m, 1 H, H2'), 4.25–4.21 (m, 2 H, H $\alpha$  and H3'), 4.17–4.15 (m, 1 H, H4'), 2.91–2.88 (m, 1 H, H5'), 2.84–2.80 (m, 1 H, H5'), 2.74–2.70 (m, 1 H, H $\gamma$ ), 2.66–2.61 (m, 1 H, H $\gamma$ ), 1.97–1.93 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.71–1.67 (m, 1 H, H $\beta$ ), 1.50 (s, 9 H, tBu<sup>Boc</sup>), 1.38 (s, 9 H, tBu), 1.37 (s, 9 H, tBu), 0.88 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.70 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.14 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.45 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 171.9 (C=O), 155.5 (C=O), 152.6 (C2 or C8), 150.7 (Cq), 150.2 (Cq), 149.7 (Cq), 142.5 (C2 or C8), 122.8 (Cq), 89.7 (C1'), 85.6 (C4'), 82.1 (Cq), 81.7 (Cq), 79.4 (Cq), 74.1 (C2'), 73.7 (C3'), 52.4 (C $\alpha$ ), 51.3 (C5'), 46.0 (C $\gamma$ ), 33.2 (C $\beta$ ), 28.3 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu), 28.0 (3 C, tBu), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.8 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>73</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 874,4906, found 874.4886.

**Ethyl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]-5-[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]methyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]carbamate (21a)**: Adenosine **1** (100 mg, 0.163 mmol, 1 equiv.) was dissolved in pyridine (1.6 mL) and the mixture was cooled down to -10 °C. Ethyl chloroformate (47  $\mu$ L, 0.489 mmol, 3 equiv.) was then added dropwise in the reaction. The reaction was stirred an additional hour at -10 °C and then was stirred overnight at room temperature. Pyridine was coevaporated with toluene and the crude was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 6:4) to provide the desired compound **21a** as a white foam (57 mg, 51 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 8.76 (s, 1 H, H2 or H8), 8.39 (s, 1 H, H2 or H8), 6.09 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H1'), 4.64–4.62 (m, 1 H, H2'), 4.35–4.31 (q, *J* = 7.0 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub><sup>Ethyl</sup>), 4.29–4.28 (m, 1 H, H3'), 4.15–4.14 (m, 1 H, H4'), 4.04–4.01 (m, 1 H, H5'), 3.81–3.78 (m, 1 H, H5'), 1.36–1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>Ethyl</sup>), 0.95 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.15–0.13 (m, 6 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (m, 6 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.26 (s,

3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 152.9 (C2 or C8), 151.0 (2 Cq), 149.4 (Cq), 141.6 (C2 or C8), 121.9 (C5), 88.6 (C1'), 85.8 (C4'), 76.2 (C2'), 72.0 (C3'), 62.6 (C5'), 62.3 (CH<sub>2</sub><sup>Ethyl</sup>), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), 14.5 (CH<sub>3</sub><sup>Ethyl</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.1 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 704.3671, found 704.3702.

**ProF(000)-en-2-yl [9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butylidimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]carbamate (21b):** The adenosine **1** (500 mg, 0.819 mmol, 1 equiv.) was dissolved in DCM (34 mL). Isopropenyl chloroformate (357 μL, 3.27 mmol, 4 equiv.) and *N*-methylimidazole (522 μL, 6.55 mmol, 8 equiv.) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 8:2) to provide the desired compound **21b** as a white foam (430 mg, 75 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.76 (s, 1 H, H2 or H8), 8.42 (br. s, 1 H, NH), 8.35 (s, 1 H, H2 or H8), 6.09 (d, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H1'), 4.87 (s, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>Isopropenyl</sup>), 4.75 (s, 1 H, CH<sub>2</sub><sup>Isopropenyl</sup>), 4.67–4.65 (m, 1 H, H2'), 4.31–4.30 (m, 1 H, H3'), 4.15–4.14 (m, 1 H, H4'), 4.04–4.01 (dd, *J* = 3.9, 11.4 Hz, 1 H, H5'), 3.81–3.78 (m, 1 H, H5'), 2.05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>Isopropenyl</sup>), 0.95 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.93 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.78 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.10 (s, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.05 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.27 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 152.9 (C2 or C8), 152.5 (Cq), 151.3 (Cq), 149.3 (Cq), 148.6 (Cq), 142.0 (C2 or C8), 122.6 (Cq), 102.5 (CH<sub>2</sub><sup>Isopropenyl</sup>), 88.6 (C1'), 85.8 (C4'), 76.1 (C2'), 72.1 (C3'), 62.7 (C5'), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 19.7 (CH<sub>3</sub><sup>Isopropenyl</sup>), 18.7 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (Me<sup>TBS</sup>), -5.3 (Me<sup>TBS</sup>) ppm.

**1-(((2R,3R,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-3-[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butylidimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]urea (22):** The carbamate **21** (32 mg, 0.046 mmol, 1 equiv.) and the primary amine **19** (65 mg, 0.11 mmol, 2.3 equiv.) were dissolved in pyridine (1.6 mL). The reaction mixture was stirred under reflux for 14 h, and the solvent was co-evaporated with toluene three times. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 4:6) to provide the desired compound **22** as a white foam (39 mg, 74 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.72–9.70 (m, 1 H, NH-C5'), 8.34 (s, 1 H, H2 or H8), 8.28 (s, 2 H, H2 or H8), 8.10 (s, 1 H, H2 or H8), 6.07 (d, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H1''), 5.94 (d, *J* = 5.8 Hz, 1 H, H1'), 4.60–4.58 (m, 1 H, H2'), 4.36–4.34 (m, 1 H, H2''), 4.29–4.28 (m, 2 H, H3'' and H4'), 4.16–4.13 (m, 1 H, H4''), 4.02–3.99 (m, 1 H, H5''), 3.96–3.90 (m, 1 H, H5'), 3.80–3.76 (m, 2 H, H5'' and H5'), 0.95 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.92 (s, 18 H, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.77 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.14 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.13 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.12 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.11 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.09 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.06 (s, 6 H, 2 Me<sup>TBS</sup>), -0.06 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.07 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 155.3 (C=O<sup>Urea</sup>), 154.4 (Cq or C2 or C8), 151.9 (Cq or C2 or C8), 151.1 (Cq or C2 or C8), 150.4 (Cq or C2 or C8), 150.0 (Cq or C2 or C8), 149.6 (Cq or C2 or C8), 141.5 (C2 or C8), 140.7 (C2 or C8), 120.6 (Cq), 120.1 (Cq), 89.4 (C1'), 88.4 (C1''), 85.8 (C4''), 84.7 (C4'), 76.3 (C2''), 74.6 (C2'), 73.6 (C3'), 72.1 (C3''), 62.6 (C5''), 41.8 (C5'), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (6 C, 2 tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.7 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (2 C, 2 Cq<sup>TBS</sup>), 18.00 (Cq<sup>TBS</sup>), 17.9 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.2 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.0 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>51</sub>H<sub>95</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>8</sub>Si<sub>5</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 1152.6109, found 1152.6122.

**1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl)-3-[9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]urea (23):** The compound **22** (59 mg, 0.05 mmol, 1 equiv.) was dissolved in MeOH (1.2 mL) and NH<sub>4</sub>F (39 mg, 1.04 mmol, 20 equiv.) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h and a work up was performed with DCM and water. The aqueous layer was lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compound as a white foam (5.3 mg, 18 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.52 (s, 1 H, H2 or H8), 8.15 (s, 1 H, H2 or H8), 7.9 (s, 1 H, H2 or H8), 7.8 (s, 1 H, H2 or H8), 6.17 (d, *J* = 5.9 Hz, 1 H, H1''), 6.06 (s, 1 H, H1'), 4.98–4.94 (m, 2 H, H2' and H3'), 4.87–4.85 (m, 1 H, H2''), 4.51–4.49 (m, 1 H, H3''), 4.36–4.31 (m, 2 H, H4'' and H4'), 4.00–3.97 (m, 2 H, H5' and H5''), 3.92–3.89 (m, 1 H, H5''), 3.60–3.56 (m, 1 H, H5'), 1.96 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 179.0 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 155.8 (C=O<sup>Urea</sup>), 154.2 (C6), 152.0 (C2), 150.07 (C4), 149.4 (C6 or C2), 149.1 (C6 or C2), 148.2 (C4), 142.4 (C8), 141.1 (C8), 119.8 (C5), 118.0 (C5), 89.5 (C1'), 88.1 (C1''), 85.7 (C4''), 82.0 (C4'), 73.9 (C2''), 73.1 (C2'), 70.4 (C3''), 70.2 (C3'), 61.3 (C5''), 38.1 (C5'), 21.8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>11</sub>NaO<sub>8</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 582.1785, found 582.1762. HPLC retention time: 17 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0 → 0:100 in 30 min).

**tert-Butyl 4-[3-[9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butylidimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]-1-(((2R,3R,4R,5R)-5-[6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)-9H-purin-9-yl)-3,4-bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)tetrahydrofuran-2-yl)methyl]ureido)-2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoate (24):** The carbamate **21** (319 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) and the secondary amine **20** (391 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) were dissolved in pyridine (13.7 mL). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 16 h. The pyridine was co-evaporated with toluene three times. The crude product was purified by silica gel chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 5:5) to provide the desired compound **24** as a white foam (583 mg, 85 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.77 (s, 1 H, H2 or H8), 8.46 (s, 1 H, H2 or H8), 8.10 (s, 1 H, H2 or H8), 7.79 (s, 1 H, H2 or H8), 5.97–5.96 (m, 1 H, H1''), 5.83 (s, 1 H, H1'), 5.41 (br. s, 1 H, NH<sup>Boc</sup>), 5.03–4.92 (m, 2 H, H2'' and H2'), 4.64 (br. s, 1 H, H3''), 4.36–4.28 (m, 2 H, H4'' and H3'), 4.16–4.01 (m, 4 H, Hα, H4', H5' and H5''), 3.80–3.73 (m, 2 H, H5'' and Hγ), 3.57 (br. s, 1 H, H5'), 3.24 (br. s, 1 H, Hγ), 2.12 (br. s, 1 H, Hβ), 1.77 (br. s, 1 H, Hβ), 1.56 (s, 9 H, tBu), 1.42 (s, 18 H, 2 tBu), 0.97–0.92 (m, 27 H, 3 tBu<sup>TBS</sup>), 0.84 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.75 (s, 9 H, tBu<sup>TBS</sup>), 0.17 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), 0.14–0.10 (m, 15 H, 5 Me<sup>TBS</sup>), -0.03 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.13 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.25 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>), -0.41 (s, 3 H, Me<sup>TBS</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 171.3 (C=O), 155.9 (C=O<sup>Urea</sup>), 153.7 (Cq), 152.6 (C2 or C8), 152.3 (C2 or C8), 150.9 (Cq), 150.8 (Cq), 149.9 (Cq), 149.7 (Cq), 143.2 (C2 or C8), 142.1 (C2 or C8), 139.5 (Cq), 123.4 (Cq), 123.3 (Cq), 91.1 (C1''), 89.3 (C1'), 85.8 (C4'), 84.8 (C4''), 82.3 (Cq), 82.2 (Cq), 79.8 (Cq), 74.3 (C2''), 73.9 (C3''), 73.6 (C2'), 72.5 (C3'), 62.8 (C5'), 52.6 (Cα), 50.6 (C5''), 45.3 (Cγ), 30.3 (Cβ), 28.5 (3 C, tBu), 28.3 (3 C, tBu), 28.1 (3 C, tBu), 27.1 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.2 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 26.0 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.9 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 25.8 (3 C, tBu<sup>TBS</sup>), 18.6 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.2 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), 18.0 (Cq<sup>TBS</sup>), -4.1 (Me<sup>TBS</sup>), -4.3 (Me<sup>TBS</sup>), -4.4 (Me<sup>TBS</sup>), -4.5 (3 C, 3 Me<sup>TBS</sup>), -4.6 (Me<sup>TBS</sup>), -4.9 (Me<sup>TBS</sup>), -5.2 (2 C, 2 Me<sup>TBS</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>69</sub>H<sub>127</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>Si<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 1487.8441, found 1487.8433.

**tert-Butyl 2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-[1-(((2R,3S,4R,5R)-5-[6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)methyl]-3-[9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl]ureido)butanoate (25):** The compound **24** (583 mg, 0.392 mmol, 1 equiv.) was dissolved in MeOH (9.4 mL). NH<sub>4</sub>F (20 equiv.) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred at



55 °C for 24 h. The solution was partitioned between DCM and brine. The combined organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (eluent: DCM/MeOH, 95:5) to afford the desired compound as a white foam (79 mg, 22 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 8.38 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.36 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.23 (br. s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.15 (br. s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 6.12–6.11 (m, 1 H, H<sub>1</sub>'), 5.96–5.95 (m, 1 H, H<sub>1</sub>'), 4.79 (H<sub>2</sub>' and H<sub>3</sub>' masked in residual water peak of D<sub>2</sub>O), 4.69–4.67 (m, 1 H, H<sub>2</sub>'), 4.36–4.34 (m, 2 H, H<sub>3</sub>' and H<sub>4</sub>'), 4.16–4.14 (m, 1 H, H<sub>4</sub>'), 4.05 (br. s, 2 H, H<sub>α</sub> and H<sub>5</sub>'), 3.90–3.87 (m, 2 H, H<sub>5</sub>' and H<sub>5</sub>'), 3.78–3.75 (m, 1 H, H<sub>5</sub>'), 3.63 (br. s, 1 H, H<sub>γ</sub>), 3.56 (br. s, 1 H, H<sub>γ</sub>), 2.20 (br. s, 1 H, H<sub>β</sub>), 2.00 (br. s, 1 H, H<sub>β</sub>), 1.57 (s, 9 H, tBu), 1.44 (s, 9 H, tBu), 1.42 (s, 9 H, tBu). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 173.2 (C=O), 158.1 (C=O), 155.8 (C=O), 153.2 (Cq), 153.0 (C2 or C8), 152.4 (C2 or C8), 152.1 (Cq), 151.6 (Cq), 151.3 (Cq), 150.9 (Cq), 145.1 (C2 or C8), 143.5 (C2 or C8), 123.7 (Cq), 123.6 (Cq), 92.3 (C1''), 90.8 (C1'), 87.7 (C4'), 84.6 (C4''), 83.1 (Cq, tBu), 82.8 (Cq, tBu), 80.6 (Cq, tBu), 75.6 (C2'), 75.0 (C2''), 72.2 (C3'), 72.1 (C3''), 63.1 (C5'), 54.1 (Cα), 50.9 (C5''), 47.0 (Cγ), 30.4 (Cβ), 28.7 (3 C, tBu), 28.5 (3 C, tBu), 28.3 (3 C, tBu) ppm. HRMS calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 917.4117, found 917.4115.

**2-Amino-4-(1-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl]methyl)-3-[9-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl]-9H-purin-6-yl]ureido)butanoic Acid (26):** The compound **25** (79 mg, 0.0861 mmol, 1 equiv.) was dissolved in DCM (4 mL) and ZnBr<sub>2</sub> (15 equiv.) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 24 h. Then, water (1.7 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 additional hours. A work up was performed with DCM and water. The combined aqueous layers were lyophilized and the residue was purified by HPLC to afford the desired compound as white foam (34 mg, 47 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.23 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.16 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 8.03 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 7.76 (s, 1 H, H<sub>2</sub> or H<sub>8</sub>), 6.03 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, H<sub>1</sub>'), 5.99–5.98 (m, 1 H, H<sub>1</sub>'), 4.94–4.93 (m, 1 H, H<sub>2</sub>'), 4.75–4.71 (m, 2 H, H<sub>3</sub>' and H<sub>2</sub>''), 4.46–4.43 (m, 2 H, H<sub>4</sub>' and H<sub>3</sub>''), 4.30–4.27 (m, 1 H, H<sub>4</sub>''), 4.09–4.05 (m, 1 H, H<sub>5</sub>'), 3.97–3.93 (m, 2 H, H<sub>5</sub>' and H<sub>5</sub>''), 3.90–3.81 (m, 3 H, H<sub>5</sub>'', H<sub>α</sub>, H<sub>γ</sub>), 3.57–3.50 (m, 1 H, H<sub>γ</sub>), 2.42–2.35 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 2.25–2.19 (m, 1 H, H<sub>β</sub>), 2.01 (s, 8 H, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 179.8 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 174.0 (C=O), 155.7 (C=O<sup>urea</sup>), 154.2 (Cq), 151.9 (C2 or C8), 151.1 (C2 or C8), 149.3 (2 Cq), 148.1 (Cq), 141.8 (C2 or C8), 141.3 (C2 or C8), 121.1 (Cq), 118.2 (Cq), 89.2 (C1'), 88.1 (C1''), 85.4 (C4'), 82.5 (C4''), 74.0 (C2''), 72.7 (C2'), 70.3 (2 C, C3' and C3''), 61.2 (C5''), 52.5 (Cα), 48.9 (C5'), 44.6 (Cγ), 28.4 (Cβ), 22.3 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ppm. HRMS calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>12</sub>O<sub>10</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 661.2443, found 661.2438. HPLC retention time: 14 min (NH<sub>4</sub>OAc/CH<sub>3</sub>CN, 100:0 → 0:100 in 30 min).

For experimental Details and NMR spectra, see supporting information.

**Supporting Information** (see footnote on the first page of this article): General procedures and NMR spectra.

## Acknowledgments

C. A is grateful to ED MTCl for PhD grant.

**Keywords:** S-adenosyl-L-methionine · Bisubstrate · M<sup>6</sup>A modification · RNA methyltransferase · Nucleosides chemistry

- [1] a) S. L. Berger, T. Kouzarides, R. Shiekhattar, A. Shilatifard, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 781–783; b) T. K. Kelly, D. D. De Carvalho, P. A. Jones, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1069–1078.
- [2] a) P. J. Batista, *Genomics Proteomics Bioinf.* **2017**, *15*, 154–163; b) E. M. Harcourt, A. M. Kietrys, E. T. Kool, *Nature* **2017**, *541*, 339–346.
- [3] S. Kirchner, Z. Ignatova, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 98–112.
- [4] R. Wang, M. Luo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 729–737.
- [5] H. S. Han, D. Choi, S. Choi, S. H. Koo, *Endocrinol. Metab. (Seoul)* **2014**, *29*, 435–440.
- [6] a) P. A. Jones, S. B. Baylin, *Cell* **2007**, *128*, 683–692; b) D. Kraus, Q. Yang, D. Kong, A. S. Banks, L. Zhang, J. T. Rodgers, E. Pirinen, T. C. Puliniikunnil, F. Gong, Y. C. Wang, Y. Cen, A. A. Sauve, J. M. Asara, O. D. Peroni, B. P. Monia, S. Bhanot, L. Alhonen, P. Puigserver, B. B. Kahn, *Nature* **2014**, *508*, 258–262; c) S. Espinoza, F. Manago, D. Leo, T. D. Sotnikova, R. R. Gainetdinov, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2012**, *11*, 251–263; d) T. Hamidi, A. K. Singh, T. Chen, *Epigenomics* **2015**, *7*, 247–265; e) C. J. Lewis, T. Pan, A. Kalsotra, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 202–210.
- [7] a) G. C. Cao, H. B. Li, Z. N. Yin, R. A. Flavell, *Open Biol.* **2016**, *6*, 160003; b) R. R. Edupuganti, S. Geiger, R. G. H. Lindeboom, H. L. Shi, P. J. Hsu, Z. K. Lu, S. Y. Wang, M. P. A. Baltissen, P. W. T. C. Jansen, M. Rossa, M. Muller, H. G. Stunnenberg, C. He, T. Carell, M. Vermeulen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 870; c) F. R. Traube, T. Carell, *Rna Biol.* **2017**, *14*, 1099–1107.
- [8] a) S. Blanco, M. Frye, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2014**, *31*, 1–7; b) N. Liu, T. Pan, *Transl. Res.* **2015**, *165*, 28–35.
- [9] a) X. Wang, J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou, P. Yin, *Nature* **2016**, *534*, 575–578; b) M. Kuratani, T. Yanagisawa, R. Ishii, M. Matsuno, S. Y. Si, K. Katsura, R. Ushikoshi-Nakayama, R. Shibata, M. Shirouzu, Y. Bessho, S. Yokoyama, *J. Struct. Funct. Genomics* **2014**, *15*, 173–180.
- [10] a) G. Hogley, J. C. McKelvie, J. E. Harmer, J. Howe, P. C. Oyston, P. L. Roach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3079–3082; b) D. C. Wahnon, V. K. Shier, S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 976–977.
- [11] X. C. Cai, K. Kapilashrami, M. Luo, *Methods Enzymol.* **2016**, *574*, 245–308.
- [12] a) J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 583–597; b) C. S. Zhang, R. L. Weller, J. S. Thorson, S. R. Rajski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2760–2761; c) T. Osborne, R. L. W. Roska, S. R. Rajski, P. R. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4574; d) W. Qu, K. C. Catcott, K. Zhang, S. Liu, J. J. Guo, J. Ma, M. Pablo, J. Glick, Y. Xiu, N. Kenton, X. Ma, R. I. Duclos Jr., Z. S. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2877–2880; e) K. Hartstock, B. Nilges, A. Ovcharenko, N. Cornelissen, N. Puellen, A.-M. Lawrence-Dörner, S. Leidel, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6342–6346; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 6451–6455.
- [13] a) J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5182–5200; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 5266; b) S. Willnow, M. Martin, B. Luscher, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1167–1173; c) A. Plotnikova, A. Osipenko, V. Masevicius, G. Vilkaitis, S. Klimasauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13550–13553; d) G. Lukinavicius, M. Tomkuvieni, V. Masevicius, S. Klimasauskas, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1134–1139.
- [14] a) J. Dowden, W. Hong, R. V. Parry, R. A. Pike, S. G. Ward, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2103–2105; b) J. Dowden, R. A. Pike, R. V. Parry, W. Hong, U. A. Muhsen, S. G. Ward, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7814–7821; c) G. Zhang, S. L. Richardson, Y. Mao, R. Huang, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4149–4154; d) G. Zhang, R. Huang, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 6768–6771; e) S. Mori, K. Iwase, N. Iwanami, Y. Tanaka, H. Kagechika, T. Hirano, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8158–8166; f) G. L. Anderson, D. L. Bussolotti, J. K. Coward, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1271–1277.
- [15] a) E. Benghiat, P. A. Crooks, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1470–1477; b) B. Masjost, P. Ballmer, E. Borroni, G. Zurcher, F. K. Winkler, R. Jakob-Roetne, F. Diederich, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 971–982; c) C. Lerner, B. Masjost, A. Ruf, V. Gramlich, R. Jakob-Roetne, G. Zurcher, E. Borroni, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 42–49; d) M. Ellermann, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Schlatter, D. Roth, A. Ehler, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9092–9096; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9256.
- [16] a) M. J. van Haren, R. Taig, J. Kuppens, J. Sastre Torano, E. E. Moret, R. B. Parsons, D. Sartini, M. Emanuelli, N. I. Martin, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6656–6667; b) N. Babault, A. Allali-Hassani, F. Li, J. Fan, A. Yue, K. Ju, F. Liu, M. Vedadi, J. Liu, J. Jin, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1541–1551.

- [17] L. Halby, Y. Menon, E. Rilova, D. Pechalrieu, V. Masson, C. Faux, M. A. Bouhlel, M. H. David-Cordonnier, N. Novosad, Y. Aussagues, A. Samson, L. Lacroix, F. Ausseil, L. Fleury, D. Guianvarc'h, C. Ferroud, P. B. Arimondo, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4665–4679.
- [18] E. Benghiat, P. A. Crooks, R. Goodwin, F. Rottman, *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 142–145.
- [19] a) M. Lakshman, R. E. Lehr, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1547–1550; b) M. H. Fleysher, A. Bloch, M. T. Hakala, C. A. Nichol, *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 1056–1061; c) J. Q. Liu, Z. Janeba, M. J. Robins, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2917–2919; d) E. A. Veliz, P. A. Beal, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8592–8598.
- [20] a) M. Hocek, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 245–254; b) M. K. Lakshman, *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 234–251.
- [21] a) S. Bae, M. K. Lakshman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 782–789; b) W. Hong, J. Dowden, *Chin. Chem. Lett.* **2011**, *22*, 1439–1442; c) Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 10194–10210; d) M. Ramadan, N. K. Bremner-Hay, S. A. Carlson, L. R. Comstock, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5291–5297.
- [22] G. S. Gibbons, H. D. Showalter, Z. Nikolovska-Coleska, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2015**, *34*, 348–360.
- [23] S. Picard, M. Le Roch, J. Renault, P. Uriac, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4711–4714.
- [24] S. C. Bergmeier, A. A. Cobas, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2369–2376.
- [25] B. Gadakh, G. Vondenhoff, E. Lescrier, J. Rozenski, M. Froeyen, A. Van Aerschot, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2875–2886.
- [26] R. L. Weller, S. R. Rajski, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 243–245.
- [27] R. Kaul, Y. Brouillette, Z. Sajjadi, K. A. Hansford, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6131–6133.
- [28] a) R. Rayala, P. Theard, H. Ortiz, S. Yao, J. D. Young, J. Balzarini, M. J. Robins, S. F. Wnuk, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2186–2192; b) J. R. Shelton, J. Balzarini, M. A. Peterson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5107–5110; c) V. Mhatre, V. Joshi, *Indian J. Chem. Sect. B* **2002**, *41*, 2667–2675.
- [29] a) G. Leszczynska, J. Pieta, B. Sproat, A. Malkiewicz, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4443–4447; b) K. Seio, S. Kurohagi, E. Kodama, Y. Masaki, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 994–1006; c) G. B. Chheda, C. I. Hong, *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 748; d) M. Matuszewski, K. Debiec, E. Sochacka, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 7945–7948; e) A. C. Bajji, D. R. Davis, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5352–5358; f) D. Martin, E. Schlimme, *Z. Naturforsch. C* **1994**, *49*, 834–842; g) H. Sigmund, W. Pfeiderer, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2299–2334.
- [30] J. H. Cho, S. J. Coats, R. F. Schinazi, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2488–2491.
- [31] M. Schapira, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 575–582.
- [32] N. C. Parashar, G. Parashar, H. Nayyar, R. Sandhir, *Biochimie* **2018**, *144*, 56–62.

---

 Received: May 23, 2018

