

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristýna Grúlová

STUDIUM CYKLIZACE TETRAZOLOPYRIMIDINŮ PRO
SYNTÉZU TRICYKlickÝCH NUKLEOBÁZÍ

Study of cyclization of tetrazolopyrimidines
for synthesis of tricyclic nucleobases

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. Ing. Michal Hocek, CSc., DSc.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. 5. 2018

Kristýna Grúlová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Michalu Hockovi, za příležitost práce v jeho výzkumné skupině a za jeho cenné rady a připomínky. Další poděkování patří Dr. Michalu Tichému, který mě naučil všemu potřebnému, za jeho vedení a nekonečnou trpělivost a za cenné rady při psaní této práce. Děkuji všem členům z laboratoře B 3.14 na ÚOCHB za vytvoření přátelského pracovního prostředí a týmu hmotnostní spektrometrie za změření všech spekter. Poslední poděkování patří mé rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

V této bakalářské práci byla provedena studie cyklizační reakce substituovaných tetrazolopyrimidinů, připravených ve třech krocích z 4,6-dichlorpyrimidinu jeho zinkací, Negishiho couplingem s příslušným heteroaryl jodidem a následnou nukleofilní substitucí s azidem sodným. Dříve pozorovaný neočekávaný fluorescenční produkt vznikající při cyklizaci 2-thiofenyl derivátu byl připraven znovu. Analogický produkt byl získán cyklizací 3-thiofenyl derivátu. Naproti tomu cyklizace derivátů nesoucí fenyl, 1-naftyl a 2-furyl poskytly očekávaný tricyklický produkt vznikající cyklizací azidu.

Klíčová slova: heterocykly, cyklizace, nukleobáze

Abstract

This bachelor thesis describes a study of cyclization reaction of substituted tetrazolopyrimidines, which were obtained by a three-step synthesis starting from 4,6-dichloropyrimidine, which was first zincated and then submitted to Negishi coupling with corresponding heteroaryl iodide followed by nucleophilic substitution with sodium azide. The previously known unexpected fluorescent product produced by the cyclization of the 2-thiophenyl derivative was resynthesized. An analogous product was obtained by cyclization of the 3-thiophenyl derivative. In contrast, the cyclization of the phenyl, 1-naphthyl and 2-furyl derivatives gave the expected tricyclic product resulting from the cyclization of the azide.

Key words: heterocycles, cyclizations, nucleobases

Seznam použitých zkratek

ATR	Attenuated total reflectance (metoda pro měření IČ)
b.t.	Bod tání
DCM	Dichlormethan
DCPMD	4,6-dichlorpyrimidin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Electron spray ionization (metoda pro ionizaci v MS)
EtOAc	Ethyl-acetát
HCV	Virus hepatitidy C
IČ	Infračervená spektrometrie
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
m	Multiplet
NMR	Nukleární magnetická rezonance
R _f	Retenční faktor
r.t.	Laboratorní teplota
s	Singlet
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
PE	Petrolether

Obsah

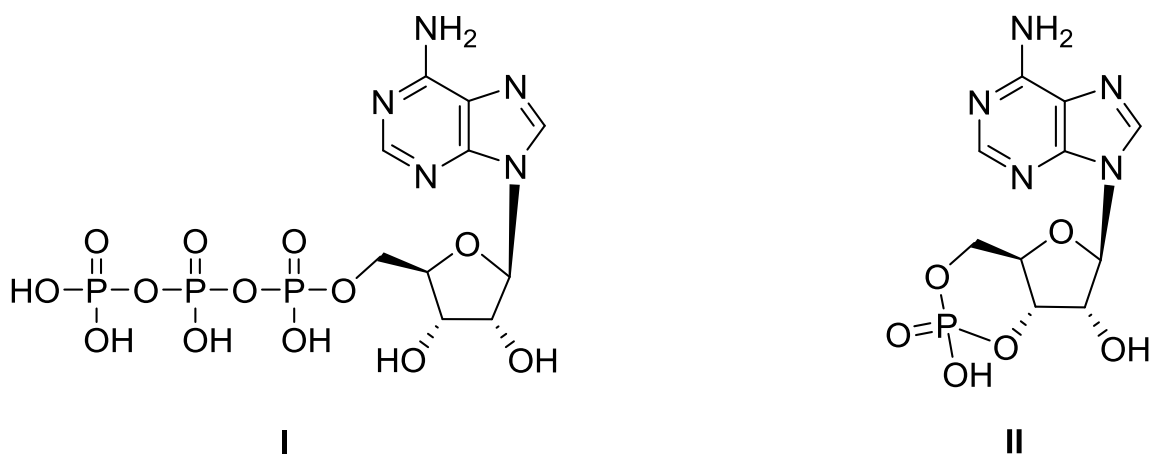
Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt	4
Seznam použitých zkratk	5
Obsah	
1 Úvod	8
1.1 Nukleotidy	8
1.2 Puriny jako důležité biologicky aktivní látky	10
1.2.1 Purinové nukleosidy	11
1.3 Pyrimidoindoly a jejich biologická aktivita	14
1.4 Cross coupling reakce organozinečnatých činidel (Negishi coupling)	16
2 Cíl práce	17
3 Výsledky a diskuze	18
3.1 Příprava zinkového komplexu	18
3.2 Příprava výchozí sloučeniny za pomoci Negishiho reakce	19
3.3 Příprava azidu	22
3.4 Cyklizace cílové sloučeniny	24
4 Závěr	28
5 Experimentální část	29
5.1 Obecné poznámky	29
5.2 Syntézy cílových sloučenin	30
6 Použitá literatura	36

1 Úvod

1.1 Nukleotidy

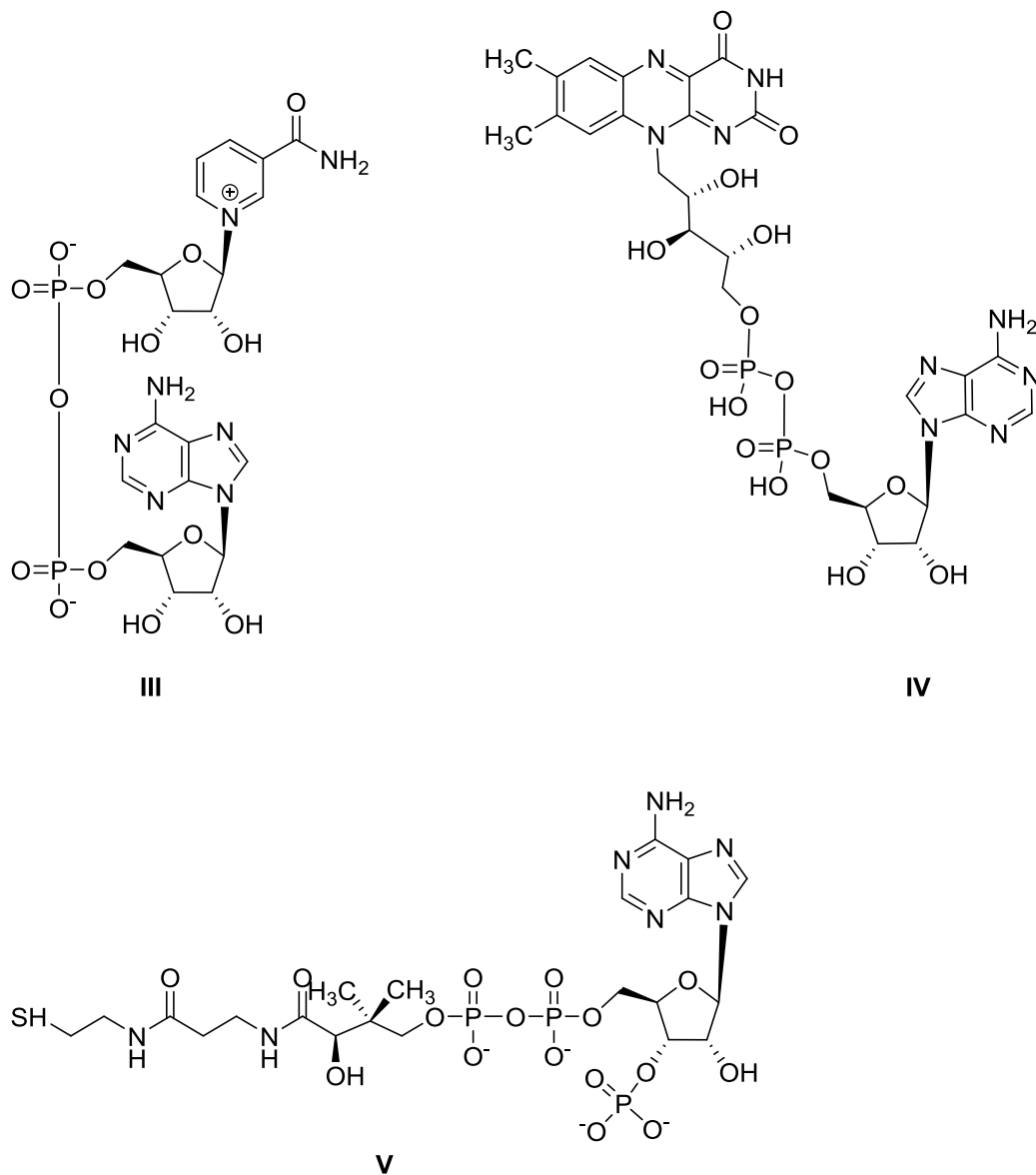
Nukleosidy a nukleotidy jsou biologicky významné látky, které se účastní téměř všech biochemických pochodů.¹ Všechny nukleotidy jsou složeny ze tří složek a to dusíkaté heterocyklické báze, pentózového cukru (D-ribóza u RNA a 2-deoxy-D-ribóza u DNA) a fosfátového zbytku.² Ribóza je přes svůj C-1' uhlík spojena s heterocyklickou bází (N-1 pyrimidinu a N-9 purinu) pomocí β -N-glykosidické vazby.³ Nukleotidy zbavené fosfátové skupiny se nazývají nukleosidy, které jsou součástí ribonukleových a deoxyribonukleových kyselin.⁴

Nejvýznamnějším nukleosidtrifosfátem je adenosintrifosfát (ATP) **I** (Obrázek 1), který je konečným produktem většiny metabolických drah, ve kterých se uvolňuje energie. Také většina metabolických drah je alespoň z části regulována hladinou nukleotidů. Podobně řada hormonálních signálů je uvnitř buňky zprostředkována cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) **II** (Obrázek 1).¹



Obrázek 1 Makroergická sloučenina ATP **I** a cAMP **II**

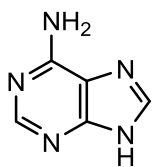
Nukleotidové deriváty, jako jsou NAD^+ **III**, FAD^+ **IV** a koenzym A **V** jsou nezbytnou částí mnoha enzymatických reakcí. NAD^+ and FAD^+ jsou zahrnuty v buněčných redoxních procesech a acetyl-koenzym A přenáší acylové skupiny (Obrázek 2).⁵



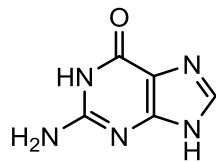
Obrázek 2 NAD^+ **III**, FAD^+ **IV** a koenzym A **V**

1.2 Puriny jako důležité biologicky aktivní látky

Adenin **VI** a guanin **VII** (Obrázek 3) jsou nejhojněji zastoupenými přirozeně se vyskytujícími deriváty purinu. Nacházejí se v DNA a RNA a společně s pyrimidinovými deriváty cytosinem **VIII**, uracilem **IX** a thyminem **X** (Obrázek 4) tvoří základní stavební kameny těchto polymerů a hrají tak hlavní roli v expresi genetické informace. Dalšími významnými zástupci purinů jsou například kyselina močová **XI**, hlavní konečný metabolický produkt purinových metabolitů a nebo třeba kofein **XII** - stimulant nacházející se v čaji a kávě (Obrázek 5).⁶

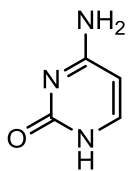


VI

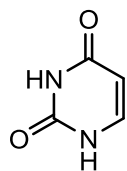


VII

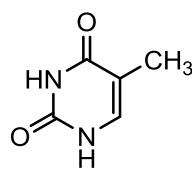
Obrázek 3 Purinové nukleobáze **VI**, **VII**



VIII

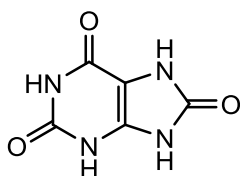


IX

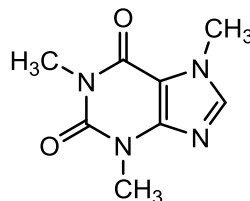


X

Obrázek 4 Pyrimidinové nukleobáze **VIII–X**



XI

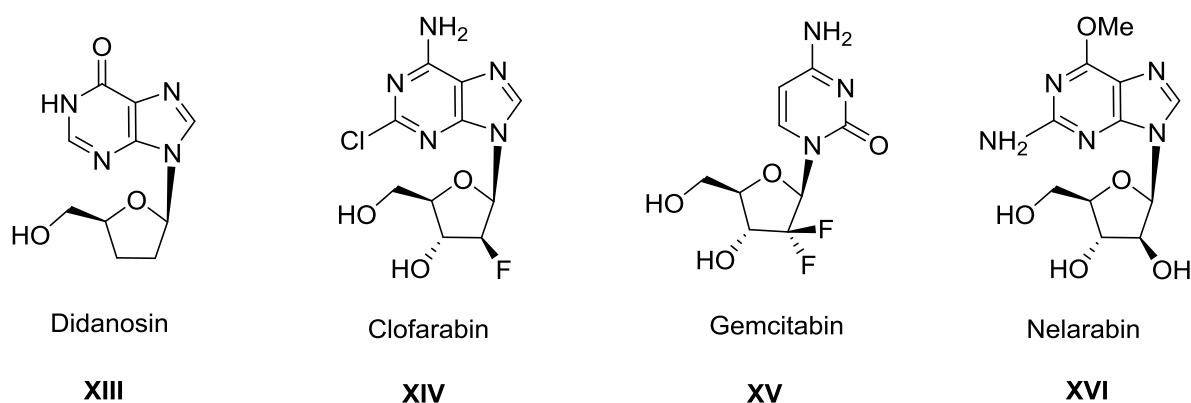


XII

Obrázek 5 Kyselina močová a kofein **XI**, **XII**

1.2.1 Purinové nukleosidy

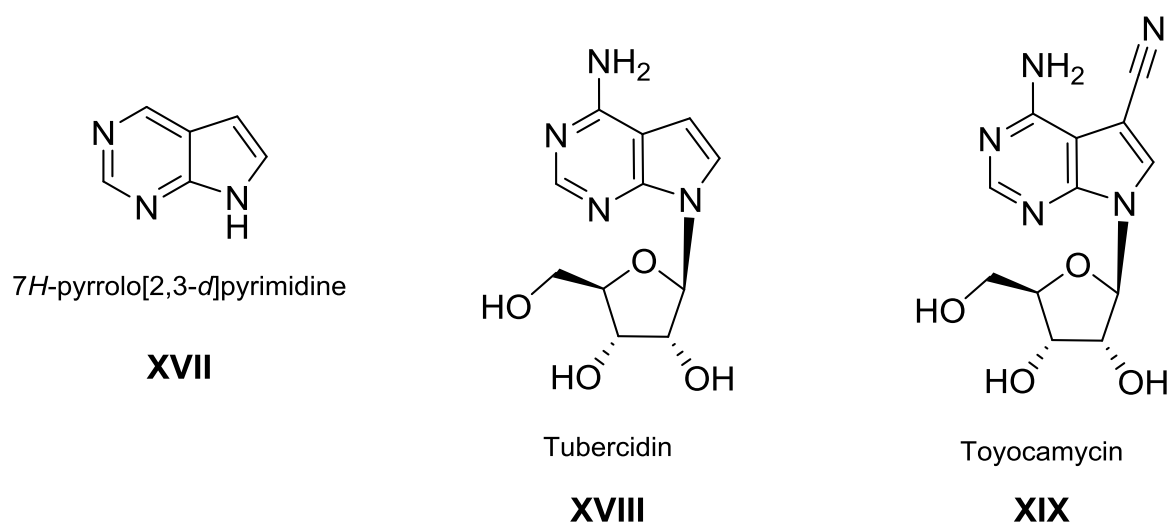
Purinové nukleosidy a jejich analogy jsou důležité biologicky aktivní látky, které byly rozsáhle zkoumány v posledních pěti desetiletích pro jejich antivirové a protinádorové vlastnosti. Používají se například k léčbě virové infekce jako je HIV (didanosin **XIII**)⁷ nebo chronická hepatitida typu B. Mnoho purinových derivátů (např. clofarabin **XIV**)⁸ a další nukleosidy (např. gemcitabin **XV** nebo nelarabin **XVI**)⁹ jsou také klinickými terapeutiky pro hematologické nádory (Obrázek 6).



Obrázek 6 Nukleosidy v léčbě HIV a hematologických nádorů

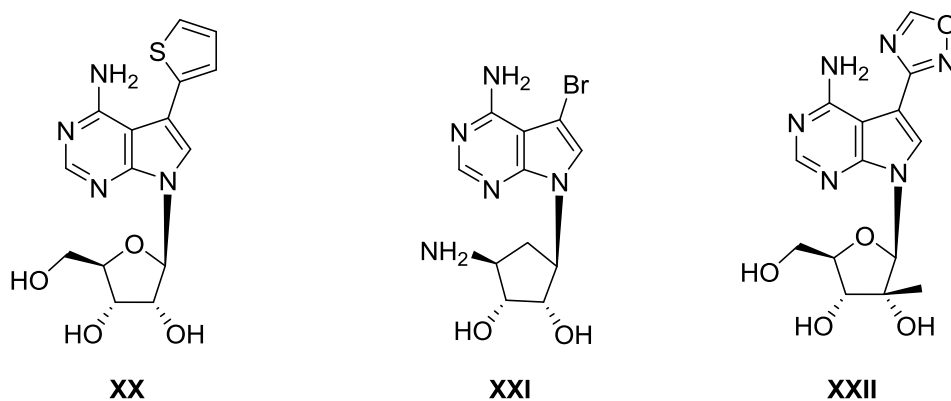
7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin **XVII** také známý jako 7-deazapurin (Obrázek 7), je metabolit na bázi purinu. Byl poprvé izolován z bakterií rodu *Streptomyces*¹⁰ a má různé funkce, které zahrnují například sekundární metabolismus modifikace RNA. V posledních letech bylo objeveno několik typů 7-deazapurinových nukleosidů se silnými cytostatickými nebo cytotoxickými účinky.¹¹ Nejznámějším a nejprostudovanějším 7-deazapurinovým nukleosidem je tubercidin **XVIII**¹² (Obrázek 7), který má jak protinádorovou, tak antivirální aktivitu a je vysoce cytotoxický.¹³

Dalším příkladem je například toyocamycin **XIX** (Obrázek 7) neboli 7-deaza-7-kyanoadenosin. Toto antibiotikum vykazuje značnou protinádorovou aktivitu, ale těžkou toxicitu pro lidské buňky.¹⁴



Obrázek 7 7-deazapurin a jeho deriváty

Nejslibnější z cytostatik jsou 7-hetaryl-7-deazaadenosiny, z nichž nejaktivnější je 7-(2-thienyl)-7-deazaadenosin **AB-61 XX**,¹⁵ které jsou aktivovány v rakovinových buňkách fosforylací a dostávají se do RNA (způsobují inhibici proteosyntézy) a DNA (způsobují poškození DNA).¹⁶ Mnoho derivátů 7-deazaadenosinu jsou silnými inhibitory adenosinkináz, jako například karbocyklický 7-bromo-7-deazapurinový nukleosid **XXI** (Obrázek 8).¹⁷ Některé deriváty 7-deazapurinových nukleosidů s modifikovaným cukrem jsou také silnými antiviroty. Nejsilnější účinek proti HCV byl pozorován u oxadiazolylového derivátu **XXII** (Obrázek 8).¹⁸

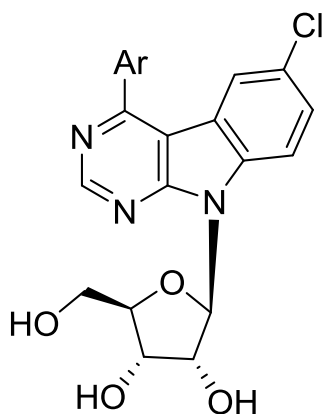


Obrázek 8 AB-61 **XX**, 7-deazaadenosin **XXI** a 7-deazapurinový nukleosid **XXII**

1.3 Pyrimidoindoly a jejich biologická aktivita

Další zajímavou skupinou nukleobází jsou pyrimidoindoly, které jsou v posledních letech stále intenzivně studovány. Jejich první syntéza byla popsána již v roce 1972.¹⁹ Některé pyrimido[4,5-*b*]indolové heterocykly se ukázaly jako účinné inhibitory tyrosinkinázy²⁰ přičemž některé z těchto sloučenin vykazovaly nanomolární aktivitu.²¹

V naší skupině byly připraveny benzo-anelované analogy 7-deazapurinů – 4-arylpyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleotidy **XXIII** (Obrázek 9),²² u kterých byla nalezena sub-mikromolární antivirová aktivita proti viru Dengue, která bohužel byla doprovázena značnou cytotoxicitou. Příslušné benzo-anelované 7-deazaadenosinové analogy²³ pak vykazovaly submikromolární aktivitu proti HCV a Dengue viru, a zároveň nízkou cytotoxicitu.

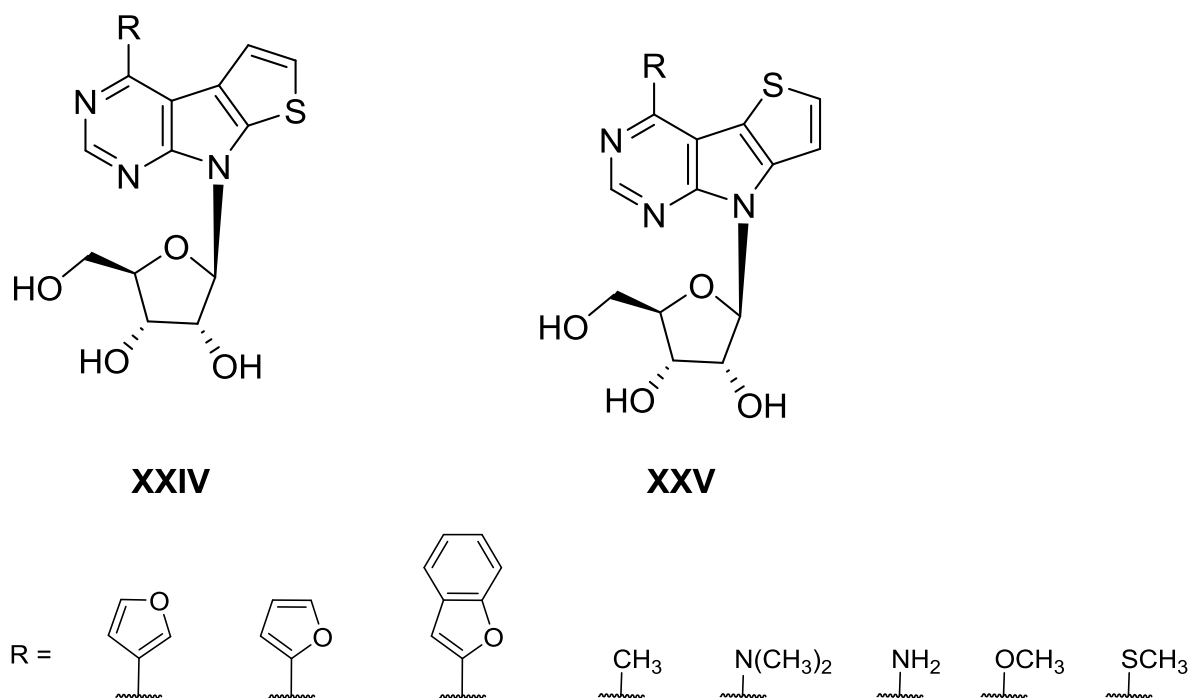


XXIII

Ar = 2-furyl, 2-thienyl nebo 2-benzofuryl skupiny v pozici 4

Obrázek 9 4-arylpyrimido[4,5-*b*]indolový ribonukleosid **XXIII**

Dále byly navrženy a pomocí tříkrokové syntézy připraveny dva izomerní typy 4-substituovaných thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů **XXIV** a **XXV** (Obrázek 10) a byly testovány na cytostatické aktivity.²⁴



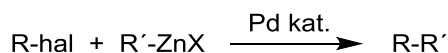
Obrázek 10 Thienopyrrolopyrimidinové nukleosidy

Zatímco furylové a dimethylaminové deriváty se prokázaly jako neaktivní, 2-benzofurylové a amino deriváty vykazovaly mírnou aktivitu proti všem buněčným liniím (včetně fibroblastů). Jako nejaktivnější z nich se prokázaly methoxy, methylsulfanyl a methyl deriváty se submikromolárním cytostatickým efektem a také se submikromolárním anti-HVC efektem. Derivát s methylovou skupinou, který je vysoce aktivní v proliferujících buňkách a je netoxický vůči fibroblastům je dobrým kandidátem na potenciální protinádorové léčivo.²⁴

1.4 Cross coupling reakce organozinečnatých činidel (Negishi coupling)

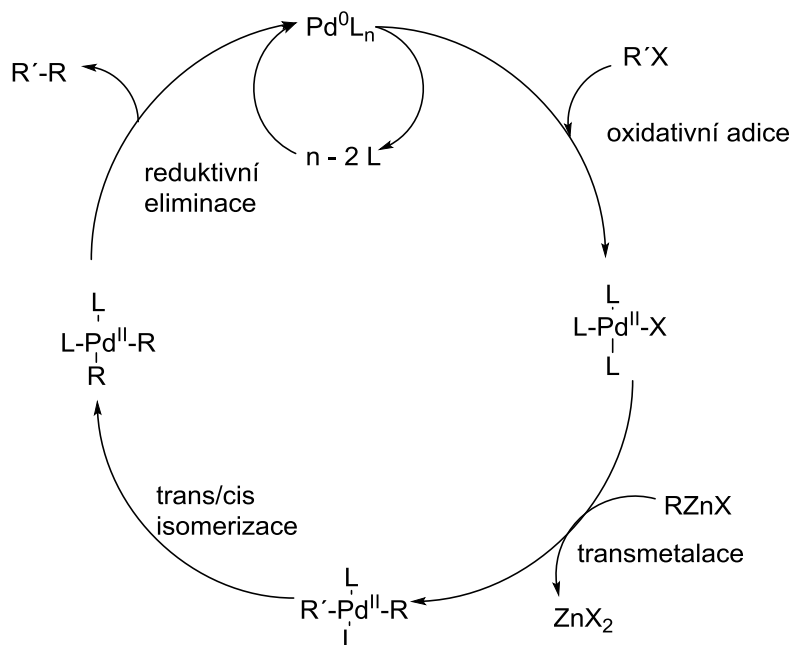
Tvorba C–C vazeb byla vždy jedním z největších výzev organické chemie a uplatňuje se v klíčových stupních syntéz mnoha složitějších molekul. Během historie byla vyvinuta celá řada reakcí pro tvorbu vazeb C–C (adice, cykloadice, nukleofilní substituce atd.). Ovšem až do začátku sedmdesátých let nebyla k dispozici obecná metodika pro tvorbu vazeb C–C mezi sp^2 uhlíkovými centry. Teprve rozvoj reakcí katalyzovaných komplexy niklu či palladia mezi elektrofilem (obvykle alkyl/arylhalogenidem či sulfonátem) a nukleofilem (obvykle organokovem, popřípadě alkenem) umožnil opravdovou revoluci v organické syntéze. Pro tuto obecnou a efektivní metodiku tvorby C–C vazeb je zaveden anglický termín cross-coupling.²⁵

Pd-katalyzované reakce organozinečnatých činidel jsou jednou z nejpoužívanějších cross-coupling reakcí (Schéma 1 a Obrázek 11).²⁶ Jsou velmi obecné (vhodné pro alkyl-, alkenyl- i arylskupiny) a vysoce efektivní. V některých případech jsou organozinečnatá činidla příliš reaktivní a netolerují přítomnost některých funkčních skupin.²⁷



Vysvětlivky: R, R' = alkyl, alkenyl, aryl

Schéma 1 Negishiho cross-coupling reakce



Obrázek 11 Mechanismus Negishiho reakce

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je studium cyklizace tetrazolopyrimidinů, klíčových intermediátů využívaných pro syntézu tricyklických nukleobází. Ty jsou významnými meziprodukty pro přípravu nukleosidů, nukleotidů a nukleových kyselin s výraznou biologickou aktivitou. Při jejich přípravě fotocyklizací byl pozorován vznik neobvyklého produktu. V rámci projektu bude zjišťováno, jaká je citlivost této reakce na změnu hetarylových substituentů na tetrazolopyrimidinu. Cílem bylo prostudovat cyklizace tetrazolopyrimidinů nesoucích různé pěti a šestičlenné heterocykly.

3 Výsledky a diskuze

Syntéza cílové sloučeniny byla provedena v tříkrokové syntéze (Schéma 2), která začíná z 4,6-dichlorpyrimidinu, který byl napřed metalován za vzniku organozinečnatého intermediátu, který byl poté připojen pomocí Negishiho reakce k jodovaným hetarylům. Dále byla pomocí nukleofilní substituce provedena azidace s azidem sodným. Posledním krokem syntézy byla cyklizace tetrazolu pomocí UV světla.

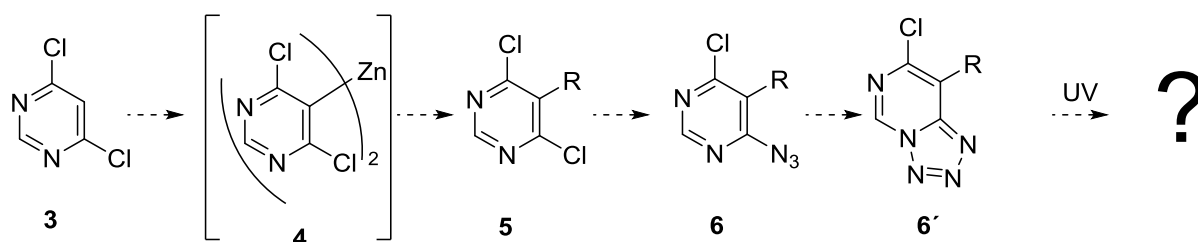


Schéma 2 Syntetický plán

3.1 Příprava zinkového komplexu

Prvním krokem v syntéze byla příprava zinkového komplexu dle modifikovaného postupu v citované literatuře.²⁸ K suchému chloridu zinečnatému, který byl ještě přetaven, byl po částech přidán vytemperovaný 2,2,6,6-tetramethylpiperidinychlorid hořečnatý v komplexu s chloridem lithným (TMPMgCl·LiCl) **1** a směs byla následně míchána při r.t. po dobu 16 h. Touto metodou byl připraven zinkový komplex (TMP)₂Zn·MgCl₂·2LiCl **2** (Schéma 3).

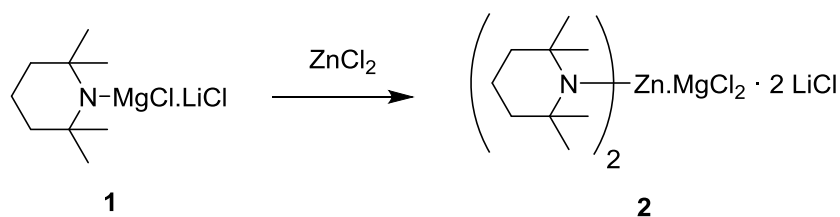
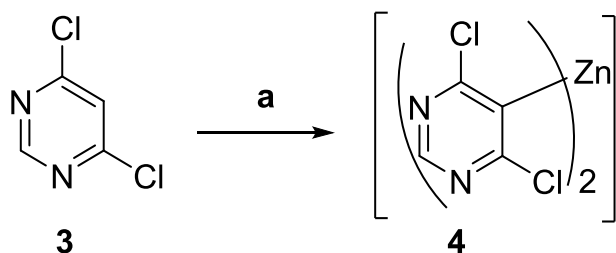


Schéma 3: Příprava zinkového komplexu **2**

Paralelně byl z 4,6-dichlorpyrimidinu (**3**), který byl nakapán do vychlazeného roztoku komplexu (TMP)₂Zn·MgCl₂·LiCl (**2**), připraven pyrimidinylzinkový komplex **4** (Schéma 4). Poté, co sloučenina vychladla na r.t. byla ihned použita v následujícím kroku syntézy.

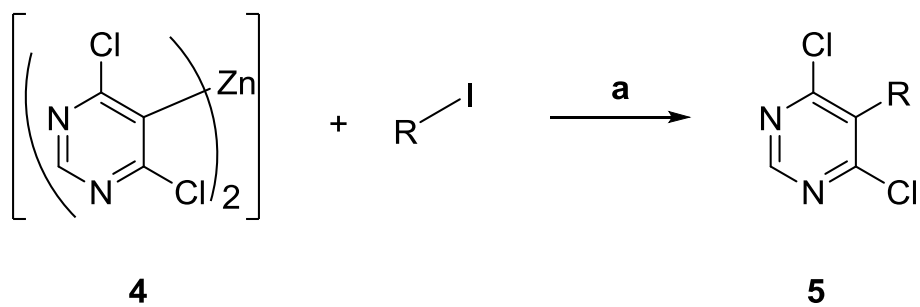


a: (TMP)₂Zn.MgCl₂·LiCl (0,55 ekv.), THF, 0 °C, 1 h, poté r.t., 1 h

Schéma 4: Příprava pyrimidinylzinkového komplexu **4**

3.2 Příprava výchozí sloučeniny za pomoci Negishiho reakce

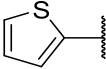
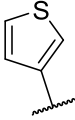
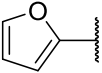
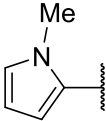
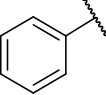
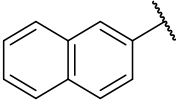
Dalším krokem bylo připojení jodovaných heteroarylů k vygenerovanému pyrimidinylzinkovému komplexu **4** z předchozího kroku syntézy. Nejprve byl jodovaný heteroaryl smíchán s 10 mol-% tetrakis(triphenylfosfin)palladiem (Pd(Ph₃)₄) suspendovaným v THF, sloučenina byla nakapána do pyrimidinylzinkového komplexu **4** a reakce probíhala po dobu 16 h při 65 °C (Schéma 5). Použité palladium sloužilo jako katalyzátor pro cross-couplingovou reakci. Přestože jsou jodované heteroaromáty často velmi drahé, obtížně se připravují a ne vždy jsou dostatečně stabilní, bylo jejich použití nezbytné s ohledem na jejich vyšší reaktivitu. Bromované heteroaryly za stejných podmínek buďto nereagovaly vůbec a nebo jen ve velmi malých výtěžcích.²⁹ Výtěžky reakcí (Tabulka 1) se pohybovaly v rozmezí 32–60 %.



a: Pd(Ph₃)₄ (10 mol-%), THF, 65 °C, 16 h

Schéma 5 Syntéza arylpyrimidinů **5a-5f** za pomoci Negishiho reakce

Tabulka 1 Výtěžky cross-coupling reakcí

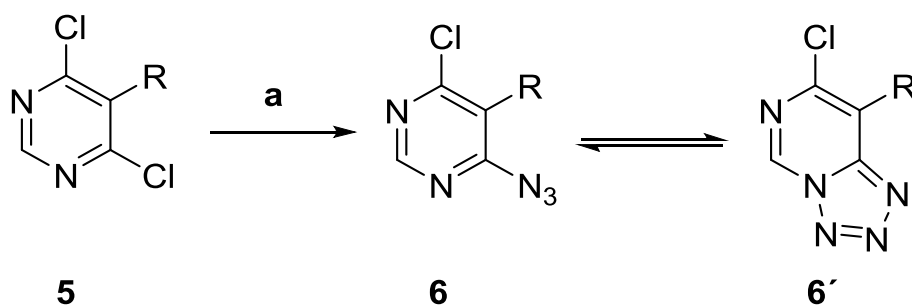
Látka	R	Výtěžek [%]
5a		32
5b		58
5c		16
5d		29
5e		51
5f		60

Výtěžky reakcí jsou ovlivněny nejen účinností zinkace, která bývá >90 %, ale zejména stabilitou jodovaných aromátů a případně i obtížnou separací, kdy produkty **5** mají R_f velice podobné výchozímu DCPMD (**3**). Stabilita jod derivátů je problém zejména u *N*-methylpyrrolu, který nelze izolovat vůbec.

Výtěžek produktu **5a** po reakci s 2-jodthiofenem byl 32 %, produktu **5d** (reakce s 2-jod-*N*-methylpyrrolem) 29 %, produktu **5e** (reakce s 1-jodbenzenem) 51 % a produktu **5f** (reakce s 1-jodnaftalenem) 60 %. Látky **5b** a **5c** byly připraveny v rámci předchozí studie.²⁴ Protože reakce byly prováděny s nestabilními jodaryly a zinkace pyrimidinu neprobíhala vždy kvantitativně, výtěžky reakcí nebyly nejvyšší. Nejnižší výtěžek byl obdržen při reakci s 2-jod-*N*-methylpyrolem a to díky jeho nestabilitě.

3.3 Příprava azidu

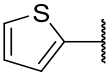
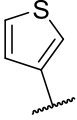
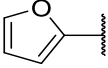
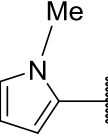
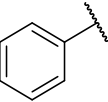
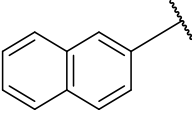
Dalším krokem v syntéze byla nukleofilní substituce s azidem sodným (NaN_3) a chloridem lithným (LiCl) v THF (Schéma 6). Reakční směs byla míchána po dobu 48 h při r.t. Baňka byla zakryta alobalem z důvodu fotolability vznikajícího azidu **6**. Dle publikovaných postupů v odborné literatuře se místo THF používá DMF.³⁰ K této změně bylo po první provedené azidaci (s 2-thienylem) přistoupeno z důvodů jednoduššího zpracování. Nebyla nutná extrakce a několikanásobné odpařování s toluenem, THF stačilo odpařit pouze jednou. Vzniklým produktem byl azidopyrimidin **6**, který se ve sloučenině vyskytoval ve formě směsi azidu **6** a tetrazolu **6'**. Reakce probíhaly s poměrně vysokým výtěžkem v rozmezí 66–95 % (Tabulka 2).



a: NaN_3 (1 ekv.), LiCl (1 ekv.), THF, r.t.

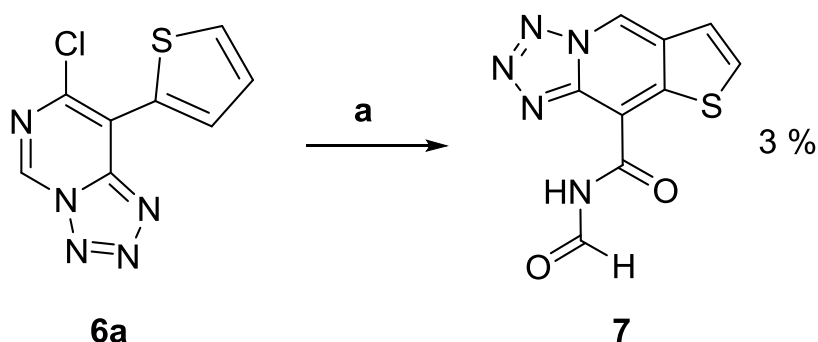
Schéma 6 Syntéza azidopyrimidinů **6a-6f**

Tabulka 2 Výtěžky azidací

Látka	R	Výtěžek [%]
6a		95
6b		90
6c		66
6d		91
6e		85
6f		68

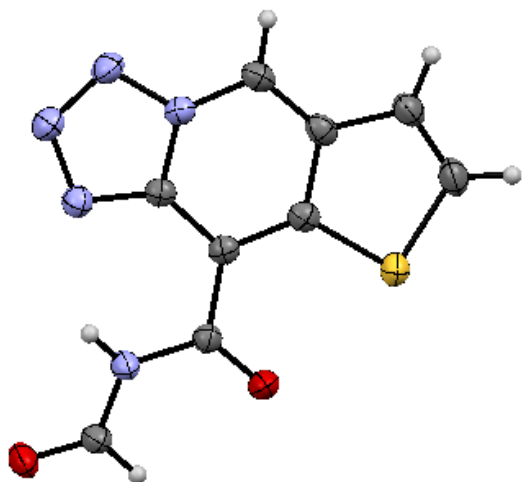
3.4 Cyklizace cílové sloučeniny

Finálním krokem byla cyklizace sloučeniny vzniklé po azidaci. Dle dosud publikované literatury by po osvětlení UV lampou (při vlnové délce 254 nm) měla vzniknout tricyklická báze.²⁴ Pokud ale sloučenina obsahovala pouze tetrazol, anorganické chloridy a stopy DMF, vznikl po osvětlení zacyklený fluorescenční produkt. Reakce byla nejprve opakována s 2-thienylem a 3-thienylem (Schéma 7 a 8). Poté byla reakce za stejných podmínek testována s **6c–6f** (Schéma 9). Reakce prováděná s derivátem 2-thienylu poskytla produkt **7** (Schéma 7) v souladu s literaturou,²⁹ zatímco při osvětlení derivátu **6b** vznikl po osvětlení fluorescenční produkt **8** (Schéma 8). Přestože během reakcí vznikaly ještě další neidentifikovatelné produkty a část výchozí látky se rozložila, byly oba produkty izolovány (ve velmi nízkých výtěžcích 3 %) a charakterizovány pomocí NMR i MS. Struktura látky **7** byla potvrzena také krystalograficky.²⁹

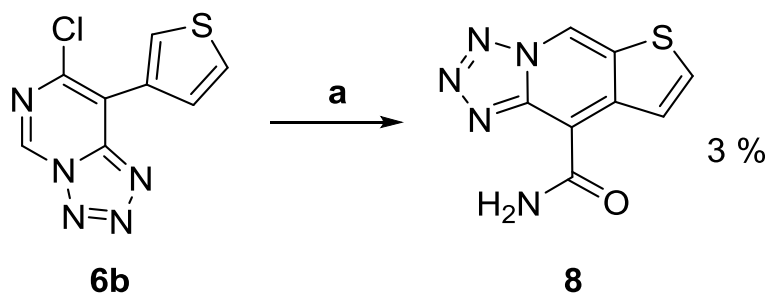


a: DMF, UV 254 nm, r.t., 48 h

Schéma 7: Cyklizace tetrazolu s 2-thienylem



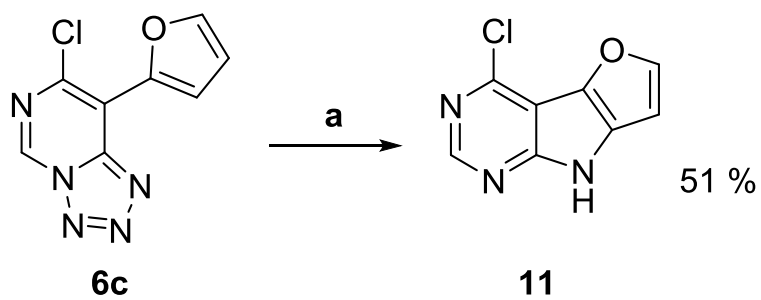
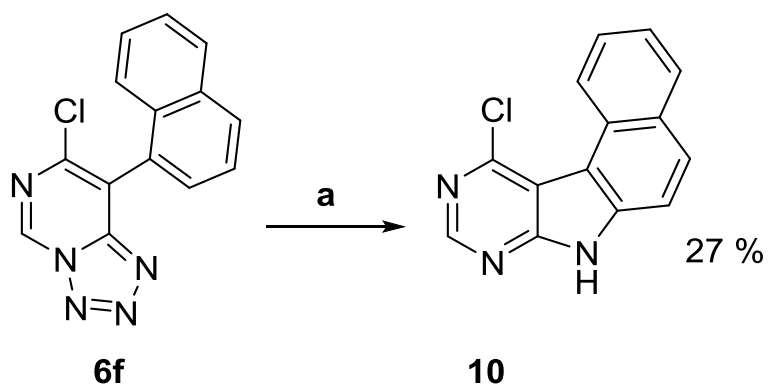
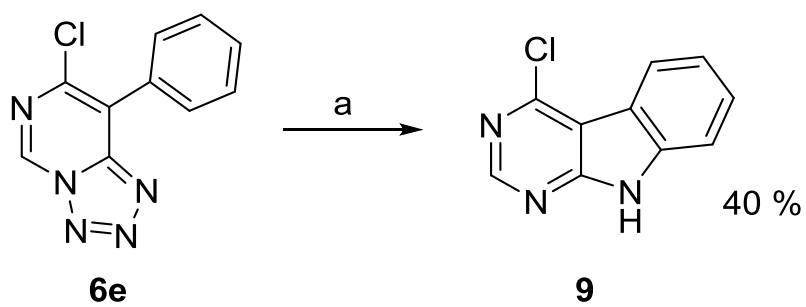
Obrázek 12 Krystalografie *N*-formyltetrazolo[1,5-*a*]thieno[2,3-*d*]pyridin-9-karboxamidu **7**²⁹



a: DMF, UV 254 nm, r.t., 48 h

Schéma 8 Cyklizace tetrazolu **6b** s 3-thienylem

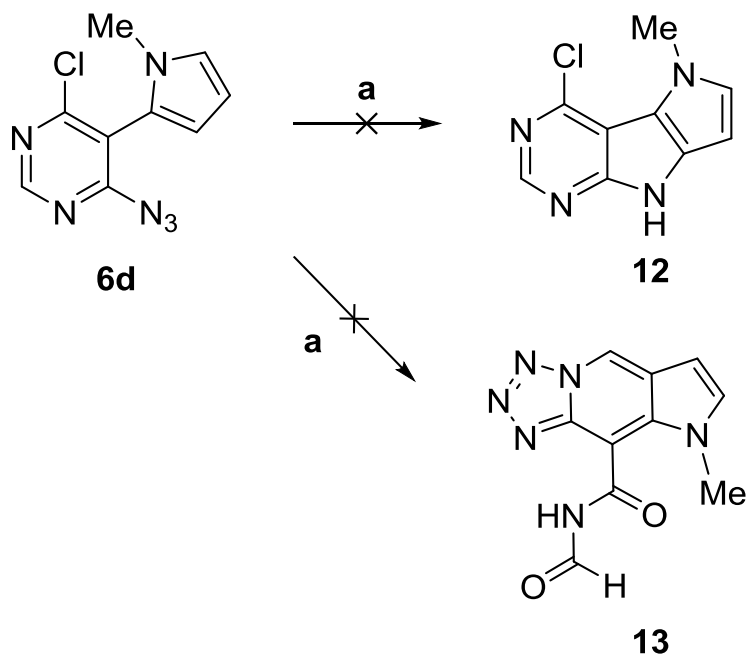
U reakcí prováděných s 2-furylem, fenylem a 1-naftylem po osvětlení UV lampou (254 nm) nebyl pozorován vznik fluorescenčního produktu, tyto deriváty se chovaly očekávaným způsobem a poskytly cyklizační produkty **9**, **10**, **11** známé z literatury^{31, 32} ve výtěžcích 40, 27, 51 %, které vznikají rozkladem azidu přes nitrenový intermediát (Schéma 9).



a: DMF, UV 254 nm, r.t., 48 h

Schéma 9 Cyklizace tetrazolů 6c, 6e, 6f

U reakce s 2-*N*-methylpyrrolylem se nepodařilo prokázat přítomnost ani tricyklické báze **12** ani *N*-formyl-8-methyl-8*H*-pyrolo[2,3-*d*]tetrazolo[1,5-*a*]pyridin-9-karboxamidu **13** (Schéma 10). Byla získána komplexní směs látek, která byla dále nedělitelná.



a: DMF, UV 254 nm, r.t., 48 h

Schéma 10 Cyklizace tetrazolu **6d**

4 Závěr

V této bakalářské práci byla provedena studie cyklizací 5-(hetaryl)tetrazolopyrimidinů nesoucích pětičlenné a šestičlenné hetarylové skupiny. Bylo tak připraveno 5 finálních tricyklických bází, u kterých se pouze u 2-thienylu a 3-thienylu podařilo prokázat vznik cyklického fluorescenčního produktu po osvětlení UV lampou, zatímco u fenylu, 1-naftylu a 2-furylu probíhá očekávaná cyklizace azidů vedoucí k anelovaným 7-deazapurinům.

Výjimku tvořil 2-*N*-methylpyrrolyl, u kterého vznikla komplexní směs dále nedělitelných produktů a nevznikala ani tricyklická báze ani fluorescenční produkt.

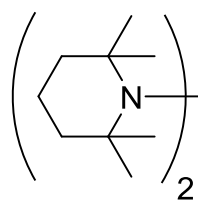
5 Experimentální část

5.1 Obecné poznámky

Všechny cross-couplingové reakce byly prováděny ve vysušených baňkách pod inertní atmosférou argonu. Použité chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. Rozpouštědla používaná v prováděných reakcích a ke chromatografiím byla získána komerčně a byla použita bez další úpravy. THF (max 0,005 % vody) používaný pro couplingové reakce byl koupen od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. sušený na sítech a uchovávaný pod septem. Vysokoučinné tlakové chromatografie (HPFC) byly prováděny na přístroji ISCO Combiflash Rf system na plnitelných kolonách nebo na kolonách s reverzní fází (RediSep Rf kolonách, C18). Kolony byly plněny SiO₂ Merck Silica gelem 60. Fotocyklizace byly prováděny za pomoci 4W germicidní UV GTL3 žárovky, model EUV-13B. Reakce byly průběžně sledovány pomocí tenkovrstevné chromatografie na TLC Silica gelu 60 F254 (Merck) a detekovány pomocí UV lampy při záření o vlnové délce 254 nm a 365 nm. Body tání byly měřeny na přístroji Stuart SMP40 a jsou nekorigované. NMR spektra pro charakterizaci produktů byla měřena na spektrometru Bruker Avance 400 MHz. Měření probíhalo v kapalně fázi, rozpouštědla byla použita komerčně dostupná DMSO-d₆ a CDCl₃. Chemické posuny byly referencovány vůči signálům rozpouštědel a jsou uvedeny v ppm. Všechna hmotnostní spektra byla změřena na přístroji AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000, MS servisem na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. IČ spektra byla měřena na přístroji Bruker Alpha FT-IR metodou ATR. Vlnočty jsou uvedeny v cm⁻¹.

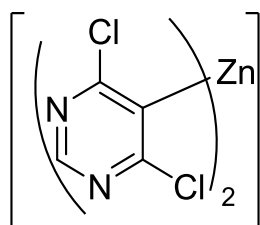
5.2 Syntézy cílových sloučenin

Tetramethylpiperidinyzinkový komplex s chloridem hořečnatým a chloridem lithným (**2**)



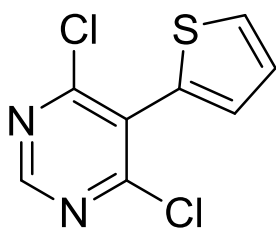
Zinkový komplex byl připraven dle modifikovaného postupu publikovaného v odborné literatuře.²⁸ Do vyžíhané baňky byl navážen suchý ZnCl_2 (1,0 g, 7,3 mmol), který byl ještě přesušen a následně byl po částech přikapán $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ **1** (14,7 ml), který byl vytemperovaný na r.t. Směs byla následně míchána při r.t. po dobu 16 h. Vzniklý zinkový komplex $(\text{TMP})_2\text{Zn}\cdot\text{MgCl}_2\cdot\text{LiCl}$ **2** byl bez přečištění použit v následujícím kroku syntézy.

Bis(4,6-dichlorpyrimidin-5-yl)zinkový komplex (**4**)



Organozinkové sloučeniny byly připravovány dle modifikovaného postupu publikovaného v odborné literatuře.²⁸ 4,6-dichlorpyrimidin (**3**) (2,0 g; 13,4 mmol) byl rozpuštěn v THF a po částech přidáván do ledově vychlazeného roztoku komplexu **2**. Reakce byla míchána při teplotě 0 °C po dobu 1 hodiny. Poté, co sloučenina vychladla na r.t., byla ihned použita v následujícím kroku syntézy.

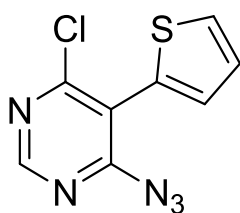
4,6-dichlor-5-(thiofen-2-yl)pyrimidin (**5a**)²⁹



Roztok 2-jodthiofenu (1,8 ml; 16,1 mmol) a $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (1,5 g; 1,34 mmol) v THF (12 ml) byl přidán do roztoku zinkovaného pyrimidinu **4** (připraveno dle obecného postupu popsáno u syntézy **4**). Reakce byla míchána při 65 °C po dobu 16 hodin. Následně bylo z reakční směsi na vakuové rotační odparce rozpouštědlo odpařeno a směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO_2 , PE/EtOAc, 10→47 %). Výsledným produktem **5a** (519 mg; 32 %) byla bílá pevná látka.

^1H NMR je v souladu s citovanou literaturou.²⁹ HR MS (ESI) pro $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{Cl}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: vypočítáno 229,98872; nalezeno 229,98875.

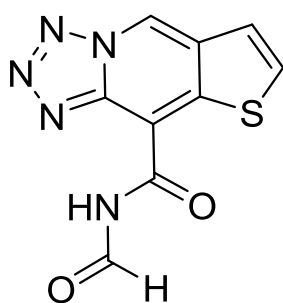
4-azido-6-chlor-5-(thiofen-2-yl)pyrimidin (**6a**)²⁹



Sloučenina **5a** (519 mg; 2,25 mmol) byla rozpuštěna v DMF (5 ml), společně s NaN₃ (146 mg; 2,25 mmol) a LiCl (95 mg; 2,25 mmol). Reakční směs byla míchána 2 dny za r.t. Po ukončení reakce bylo DMF několikrát odpařeno s toluenem a následně byla sloučenina vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE/DCM(1:1)/EtOAc, 5→10 %). Produkt **6a** (508 mg; 95 %) byl získán ve formě žluté pevné látky.

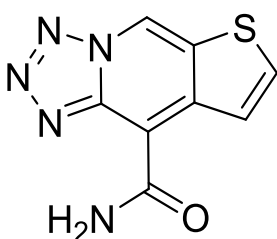
¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.²⁹

N-formyltetrazolo[1,5-*a*]thieno[2,3-*d*]pyridin-9-karboxamid (**7**)²⁹



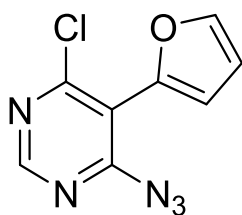
Směs tetrazolu a azidu **6a** (458 mg; 1,9 mmol) byla rozpuštěna v DMF (15 ml) a byla ozařována pomocí UV-lampy (254 nm) po dobu 48 h. při r.t. Rozpouštědlo bylo několikrát odpařeno s toluenem na vakuové odparce. Při pokusu o vyčištění látky pomocí reverzní chromatografie nebylo dosaženo požadované čistoty. Poté byla látka vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, cHex/EtOAc, 10→21 %) a lyofilizována. Produkt **7** (16,8 mg; 3,0 %) byl obdržen ve formě oranžové pevné látky. ESI MS *m/z* (rel%): 270 (100) [M + Na]⁺. HR MS (ESI) pro C₉H₅N₅O₂SNa [M + Na]⁺: vypočítáno 270.00620; nalezeno 270.00580. ¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.²⁹

5H,9H-tetrazolo[1,5-*a*]thieno[3,4-*d*]pyridin-9-karboxamid (**8**)



Směs tetrazolu a azidu z 4-azido-6-chlor-5-(thiofen-3-yl)pyrimidinu **6b** (300 mg; 1,3 mmol) byla rozpuštěna v DMF (15 ml) a byla ozařována pomocí UV-lampy (254 nm) po dobu 48 h. při r.t. Rozpouštědlo bylo několikrát odpařeno s toluenem na vakuové odparce. Poté byla látka vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE/EtOAc, 10→50 %) a lyofilizována. Byl získán produkt **8** (8,3 mg; 3,0 %) ve formě oranžové pevné látky. ESI MS *m/z* (rel%): 242 (100) [M + Na]⁺. HR MS (ESI) pro C₉H₅N₅O₂SNa [M+Na]⁺: vypočítáno 242,01070; nalezeno 242,01064.

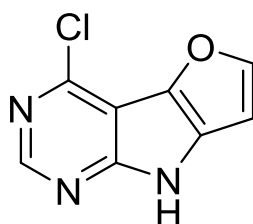
4-azido-6-chlor-5-(furan-2-yl)pyrimidin (**6c**)³¹



4,6-dichlor-5-(furan-2-yl)pyrimidin **5c** (146 mg; 0,68 mmol), LiCl (29 mg; 0,68 mmol) a NaN₃ (44 mg; 0,68 mmol), byly rozpuštěny v THF (5 ml) a reakce byla míchána 2 dny při r.t. Po dokončení byla reakční směs vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE:DCM (1:1)/EtOAc, 10→14 %) a byl obdržen produkt **6c** (100 mg; 66%) ve formě bílé pevné látky.

¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³¹

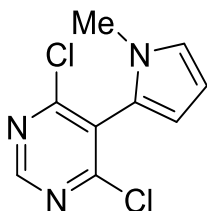
4-chlor-8*H*-furo[2',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**11**)³¹



Produkt **6c** (100 mg; 0,5 mmol) byl rozpuštěn v DMF (5 ml) a směs byla ozařována pomocí UV-lampy (254 nm) po 48 h. při r.t. Rozpouštědlo bylo několikrát odpařeno s toluenem na vakuové odparce. Směs byla následně vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, cHex/EtOAc, 15→40 %), ale vzhledem k tomu, že se nepovedlo dosáhnout požadované čistoty, byla následně přečištěna HPFC (SiO₂, DCM/MeOH, 1→5 %). Výsledným produktem **11** (45,1 mg; 51 %) byla bílá pevná látka.

¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³¹

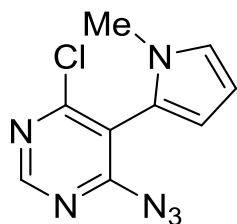
4,6-dichlor-5-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)pyrimidin (**5d**)³¹



Směs 2-jod-*N*-methylpyrrolu (3,3 g; 16,08 mmol) a Pd(PPh₃)₄ (1,55 g; 1,34 mmol) v THF (30 ml) byla přidána do roztoku zinkovaného pyrimidinu **4** (připraveno dle obecného postupu popsaného u syntézy **4**) a byla míchána při 65°C po 16 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno na vakuové odparce a reakční směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE/EtOAc, 1→10 %). Výsledným produktem **5d** (1,76 g; 29 %) byla žlutá olejovitá látka.

¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³¹ HR MS (ESI) pro C₉H₇Cl₂N₃: vypočítáno 227.0017; nalezeno 227.0019.

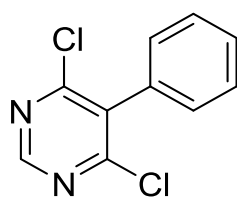
4-azido-6-chloro-5-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)pyrimidin (**6d**)³¹



Produkt **5d** (500 mg; 2,2 mmol) byl smíchán s LiCl (93 mg; 2,2 mmol) a NaN₃ (142 mg; 2,2 mmol), rozpuštěn v THF (5 ml) a reakční směs byla míchána 2 dny při r.t. Po dokončení byla směs vyčištěna pomocí HPFC (PE:DCM (1:1)/EtOAc, 5→10 %) a byl obdržen produkt **6d** (469 mg; 91 %) ve formě žluté olejovité látky.

¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³¹

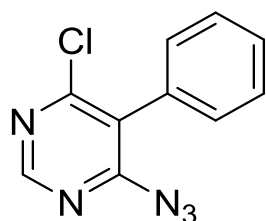
4,6-dichlor-5-(fenyl)pyrimidin (**5e**)



Roztok 1-jodbenzenu (1,8 ml; 9,66 mmol) a Pd(PPh₃)₄ (0,75 g; 0,67 mmol) v THF (6 ml) byl přidán do roztoku zinkovaného 4,6-dichlorpyrimidinu **4** (připraveno dle obecného postupu popsáno u syntézy **4** z polovičního množství) a byl míchán při 65 °C po 16 hodin.

Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce a směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE/EtOAc, 5→20 %). Produkt **5e** (770 mg; 51 %) byl obdržen ve formě bílé pevné látky. B.t. 105–106 °C; IČ (ATR): 3060, 2929, 1738, 1504, 1397, 1362, 1233, 809, 784, 753, 698, 561 cm⁻¹. ¹H NMR (500.0 MHz, CDCl₃): 7,30–7,32 (m, 2H, H-2',6'); 7,50–7,52 (m, 3H, H-3',4',5'); 8,78 (s, 1H, H-2). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃): 128,93 (C-3',5'); 129,25 (C-2',6'); 129,56 (C-4'); 132,89 (C-1'); 134,19 (C-5); 156,88 (C-2); 161,57 (C-4,6). ESI MS m/z (rel%): 224 (100) [M + Na]⁺. HR MS (ESI) pro C₁₀H₆Cl₂N₂ [M + Na]⁺: vypočítáno 223,99; nalezeno 223,9984.

4-azido-6-chlor-5-(fenyl)pyrimidin (**6e**)

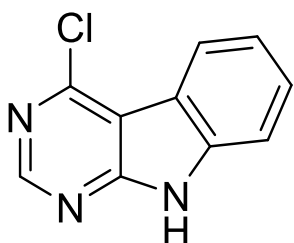


Sloučenina **5e** (309 mg; 1,97 mmol) byla smíchána společně s LiCl (56 mg; 1,32 mmol) a NaN₃ (86 mg; 1,32 mmol), vše bylo rozpuštěno v THF (5 ml) a reakční směs se míchala po 2 dny za r.t.. Po odpaření rozpouštědla byla směs vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, PE/DCM (1:1)/EtOAc, 10→14 %). Produkt **6e** (243 mg; 85 %) byl obdržen ve

formě bílé pevné látky. IČ (ART): 2138, 1732, 1592, 1479, 1395, 1351, 1285, 1079, 979, 894, 746, 662, 557 cm⁻¹. ¹H NMR (500.0 MHz, CDCl₃): 7,28–7,32 (m, 3H, H-4', 3', 5'); 7,47–7,51 (m, 2H, H-2', 6'); 8,69 (s, 1H, H-2). ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃):

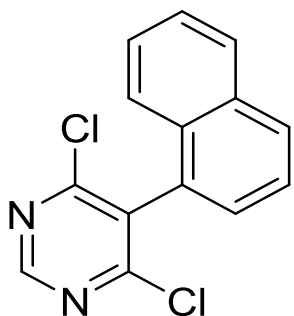
128,99 (C-3', 5'); 129,30 (C-2', 6'); 129,64 (C-4'); 156,90 (C-1'). ESI MS m/z (rel%): 231 (100) $[M + Na]^+$. HR MS (ESI) pro $C_{10}H_6ClN_5$ $[M + Na]^+$: vypočítáno 231,03; nalezeno 231,038.

4-chloro-9H-pyrimido[4,5-b]indol (9)²²



Sloučenina **6e** (243 mg; 1,1 mmol) byla rozpuštěna v DMF (5 ml) a byla ozařována UV lampou (254 nm) po dobu 48 h při r.t. Poté bylo rozpouštědlo několikrát odpařeno s toluenem na vakuové odparce a směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO_2 , DCM/MeOH, 1→20 %). Produkt **9** (86 mg; 40 %) byl obdržen ve formě bílé pevné látky. 1H NMR je v souladu s citovanou literaturou.²² HR MS (ESI) pro $C_{10}H_6ClN_3$ $[M + H]^+$: vypočítáno 204.03230; nalezeno 204.03229.

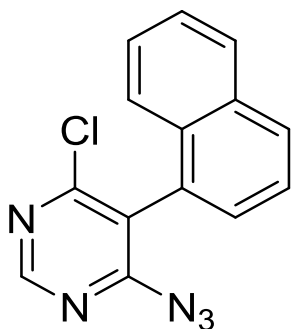
4,6-dichlor-5-(naftyl)pyrimidin (5f)³²



Roztok 1-jodnaftalenu (2,35 ml; 16,1 mmol) a $Pd(PPh_3)_4$ (1,5 g; 1,34 mmol) v THF (12 ml) byl přidán do roztoku zinkovaného pyrimidinu **4** (připraveno dle obecného postupu popsání u syntézy **4**) a reakční směs byla míchána při 65 °C po 16 hodin. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce a směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO_2 , cHex/EtOAc, 1→11 %). Výsledným produktem **5f** (2,2 g; 60 %) byla bílá pevná látka.

1H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³² HR MS (ESI) pro $C_{14}H_8Cl_2N_2$ $[M + H]^+$: vypočítáno 275,0144; nalezeno 275,0138.

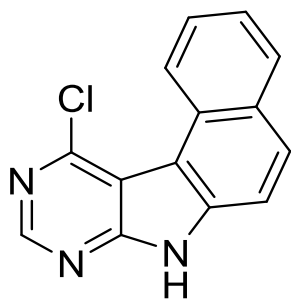
4-azido-6-chloro-5-(naftyl)pyrimidin (6f)³²



Sloučenina **5f** (500 mg; 1,8 mmol) byla smíchána s LiCl (77 mg; 1,81 mmol) a NaN_3 (118 mg; 1,81 mmol), vše bylo rozpuštěno v THF (5 ml) a reakce byla míchána po 2 dny při r.t. Po odpaření rozpouštědla byla vzniklá sloučenina vyčištěna pomocí HPFC (SiO_2 , PE/DCM (1:1)/EtOAc, 5→10 %). Byl obdržen produkt **6f** (44 mg; 68 %) ve formě žluté olejovité látky.

1H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³²

11-chloro-7H-benzo[e]pyrimidino[4,5-b]indol (10)³²



Sloučenina **6f** (349 mg; 1,2 mmol) byla rozpuštěna v DMF (5 ml) a byla ozařována UV lamou (254 nm) po dobu 72 h při r.t. Poté bylo rozpouštědlo několikrát odpařeno s toluenem a směs byla vyčištěna pomocí HPFC (SiO₂, cHex/EtOAc, 1→60 %) Produkt **10** (86 mg; 27 %) byl obdržen ve formě naředlé pevné látky.

¹H NMR je v souladu s citovanou literaturou.³² HR MS (ESI): pro C₁₄H₈ClN₃ [M + H]⁺: vypočítáno 254.0482; nalezeno 254.0480.

6 Použitá literatura

- ¹ Voet, J. G. D. *Biochemistry*; 1th ed.; John Wiley, **1995**.
- ² Blackburn, G.; Gait, M. J.; Loakes, D.; Williams, D. M. *Nucleic acids in chemistry and biology*; 3rd ed.; RSC Publishing, **2006**.
- ³ Scofield, M. *Nucleic Acids. xPharm. Compr. Pharmacol. Ref.* **2011**, 1–15.
- ⁴ Wellington, K.; Benner, S. A Review: Synthesis of Aryl C -Glycosides Via the Heck Coupling Reaction *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **2006**, 25, 1309–1333.
- ⁵ Legraverend, M. Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors, *Tetrahedron* **2008**, 64, 8585–8603.
- ⁶ Somerville, R. L. Purine. *Encycl. Genet.*; Elsevier, **2001**.
- ⁷ Farina, V.; Benigni, D. A. A new synthesis of 2',3'-dideoxynucleosides for AIDS chemotherapy. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 1239–1242.
- ⁸ Robak, T. Purine Nucleoside Analogues in the Treatment of Myeloid Leukemias. *Leuk. Lymphoma*. **2003**, 391–409.
- ⁹ Galmarini, C. M.; Mackey, J. R.; Dumontet, C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **2002**, 3, 415–424.
- ¹⁰ Davoll, J. Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidines. *J. Chem. Soc.* **1960**, 0, 131–138.
- ¹¹ McCarty, R. M.; Bandarian, V. Biosynthesis of Pyrrolopyrimidines. *Bioorg. Chem.* **2012**, 43, 15–25.
- ¹² Anzai, K.; Nakamura, G.; Suzuki, S. A. New Antibiotics, Tubercidin. *J. Antibiot.*, **1957**, 10, 201–204.
- ¹³ Arthur R. H. Nucleic acids. V. Nucleotide derivatives of tubercidin (7-deazaadenosine). *Biochemistry* **1968**, 7, 932–939.

-
- ¹⁴ Cheng, H.; Cao, X.; Xian, M.; Fang, L.; Cai, T. B.; Ji, J. J.; Tunac, J. B.; Sun, D.; Wang, P. G. Synthesis and Enzyme-Specific Activation of Carbohydrate-Geldanamycin Conjugates with Potent Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 645–652.
- ¹⁵ Bourderioux, A.; Nauš, P.; Perlíková, P.; Pohl, R.; Pichová, I.; Votruba, I.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Stray, K. M.; Wang, T.; Ray, A. S.; Feng, J. Y.; Birkus, G.; Cihlar, T.; Hocek, M. Synthesis and Significant Cytostatic Activity of 7-Hetaryl-7-deazaadenosines *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5498–5507.
- ¹⁶ a) Perlíková, P.; Rylová, G.; Nauš, P.; Elbert, T.; Tloušťová, E.; Bourderioux, A.; Poštová Slavětínská, L.; Motyka, K.; Doležal, D.; Znojek, P.; Nová, A.; Harvanová, M.; Džubák, P.; Šiller, M.; Hlaváč, J.; Hajduch, M.; Hocek, M. 7-(2-thienyl)-7-Deazaadenosine (AB61), a new potent nucleoside cytostatic with a complex mode of action. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 922–937.
- b) Perlíková, P.; Hocek, M. Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine (7-Deazapurine) as a Privileged Scaffold in Design of Antitumor and Antiviral Nucleosides. *Med. Res. Rev.* **2017**, *37*, 1429–1460.
- ¹⁷ Jarvis, M. F.; Yu, H.; McGaraughty, S.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Zhu, C.; Chu, K.; Kohlhaas, K.; Cowart, M.; Lee, C. H.; Stewart, A. O.; Cox, B. F.; Polakowski, J.; Kowaluk, E. A. Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of A-286501, a Novel Orally Active Adenosine Kinase Inhibitor. *Pain* **2002**, *96*, 107–118.
- ¹⁸ Di Francesco, M. E.; Avolio, S.; Pompei, M.; Pesci, S.; Monteagudo, E.; Pucci, V.; Giuliano, C.; Fiore, F.; Rowley, M.; Summa, V. Synthesis and Antiviral Properties of Novel 7-Heterocyclic , Substituted 7-Deaza-Adenine Nucleoside Inhibitors of Hepatitis C NS5B Polymerase. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4801–4811.
- ¹⁹ Hyatt, J.; Swenton, J. J. A facile synthesis of 9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indole via photolysis of 4-azido-5-phenylpyrimidine. *Heterocycl. Chem.* **1972**, *9*, 409–410.
- ²⁰ Bergstrom, D. E.; Brattesani, A. J.; Ogawa, M. K.; Reddy, A.; Schweickert, M. J.; Balzarini, J.; Clercq, E. De. Antiviral Activity of C-5 Substituted Tubercidin Analogues. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 285–292.

-
- ²¹ Müller, C. E.; Geis, U.; Grahner, B.; Lanzner, W.; Eger, K. Chiral Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidine and Pyrimido[4,5-b]Indole Derivatives: Structure-Activity Relationships of Potent, Highly Stereoselective A1-Adenosine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2482–2491.
- ²² Tichý, M.; Pohl, R.; Xu, H. Y.; Chen, Y. L.; Yokokawa, F.; Shi, P. Y.; Hocek, M. Synthesis and Antiviral Activity of 4,6-Disubstituted Pyrimido[4,5-b]Indole Ribonucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6123–6133.
- ²³ Tichý, M.; Pohl, R.; Tloušťová, E.; Weber, J.; Bahador, G.; Lee, Y. J.; Hocek, M. Synthesis and Biological Activity of Benzo-Fused 7-Deazaadenosine Analogues. 5- and 6-Substituted 4-Amino- or 4-Alkylpyrimido[4,5-b]Indole Ribonucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5362–5372.
- ²⁴ Tichý, M.; Smoleň, S.; Tloušťová, E.; Pohl, R.; Oždian, T.; Hejtmánková, K.; Lišková, B.; Gurská, S.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M. Synthesis and Cytostatic and Antiviral Profiling of Thieno-Fused 7-Deazapurine Ribonucleosides. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2411–2424.
- ²⁵ Diederich F., Stang P. J. Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Wiley*, **1998**.
- ²⁶ Knochel P., Perea J. J. A., Jones P. Organozinc mediated reactions. *Tetrahedron.* **1998**, *54*, 8275–8319.
- ²⁷ Hocek, M. Tvorba C–C a C–X Vazeb Cross-Coupling reakcemi katalyzovanými komplexy přechodných kovů. *Chem. Listy* **2003**, *97*, 1145–1150.
- ²⁸ Mosrin, M.; Knochel, P. Regio- and Chemoselective Metalation of Chloropyrimidine Derivatives with TMPMgCl x LiCl and TMP(2)Zn x 2 MgCl(2) x 2 LiCl. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 1468–1477.
- ²⁹ Tichý M., Synthesis of novel types annulated deazapurine nucleosides with potential biological activity, Disertační práce, Univerzita Karlova, **2015**.
- ³⁰ Kondo, Y.; Watanabe, R.; Sakamoto, T.; Yamanaka, H. Condensed Heteroaromatic Ring-systems, 16. Synthesis of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2933–2936.

-
- ³¹ Hocek, M.; Tokarenko, A.; Smoleň, S.; Hajduch, M.; Džubák, P. WO2018/24265, **2018**, A1.
- ³² Ghosh, K.; Perlíková, P.; Havlíček, V.; Yang, Ch.; Pohl, R.; Tloušťová, E.; Hodek, J.; Gurska, S.; Džubák, P.; Hajduch, M.; Hocek, M. Isomeric Naphtho-Fused 7-Deazapurine Nucleosides and Nucleotides. Synthesis, Biological Activity, Photophysical Properties and Enzymatic Incorporation to Nucleic Acids. *Eur. J. Org. Chem.* DOI: 10.1002/ejoc.201800165.