

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science**

**Department of Organic Chemistry**

Doktorský studijní program: Organická chemie

Ph.D. study program: Organic Chemistry

Autoreferát dizertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Syntéza nových typů anelovaných deazapurinových nukleosidů s potenciální  
biologickou aktivitou

Synthesis of novel types of annulated deazapurine nucleosides with potential  
biological activity

**Mgr. Michal Tichý**

Školitel/Supervisor: Prof. Ing. Michal Hocek, CSc., DSc.

Praha, 2015

## Abstract

This thesis reports the syntheses and biological activities of benzo- and thieno-fused 7-deazapurine ribonucleosides, which were designed as extended analogues of potent cytostatic 6-hetaryl-7-deazapurine or 6-amino-7-hetaryl-7-deazapurine ribonucleosides. First of all, multigram syntheses of (di)chloro-9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indoles from simple chloro-nitrobenzenes were developed. Pyrimidoindoles were successfully glycosylated and used for the synthesis of 4-hetaryl-6-chloro-, 4,6-bis(hetaryl)-, 4-amino-6-hetaryl-, 4-amino-5-hetaryl- and 4-substituted pyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleosides. Hetaryl groups were introduced by Suzuki or Stille cross-coupling reaction. Standard catalysts and conditions were used for reaction in position 4. To observe some reactivity of unreactive chlorine in position 6, modification of standard protocol was necessary. Screening of several ligands had been done and Buchwald ligand X-Phos was found to be optimal. As chlorine in position 4 is activated for nucleophilic substitution, amino and dimethylamino nucleosides were prepared by reaction with aqueous ammonia and dimethylamine, respectively. 4-Alkyl derivatives were synthesized by palladium-catalyzed alkylation with trialkylaluminium or by Negishi coupling in case of cyclopropyl derivative. Desired free nucleosides were obtained directly from reaction with nucleophiles or by Zemplén deprotection. The whole series of new ribonucleosides were screened for cytotoxic and antiviral (HCV and dengue) activity. 4-Amino-5(6)-hetaryl- as well as 4,6-disubstituted nucleosides were completely inactive, whereas several compounds from 4-hetaryl-6-chloro series showed interesting anti-dengue activities and 4-methylpyrimidoindole nucleoside displayed sub-micromolar activity against HCV.

The syntheses of two types of thienopyrrolopyrimidine ribonucleosides were developed. Tricyclic bases were synthesized from simple dichloropyrimidine and iodothiophene by three-step methodology involving thermally or photochemically induced cyclization of tetrazoles. Target nucleosides bearing hetaryl, amino, dimethylamino, methyl, methoxy and methylsulfanyl groups in position 4 were synthesized by the same methodology as pyrimidoindole derivatives. Thieno-fused nucleosides are also completely new, so they are screened for cytotoxic, antiviral (HCV, dengue, influenza, coxsackie, herpes simplex virus) and antimicrobial activity. Methyl, methoxy and methylsulfanyl derivatives from both series showed submicromolar activities accompanied by cytotoxicity in micromolar range.

## Abstrakt

Tato práce popisuje syntézy a biologické aktivity dvou typů kondenzovaných 7-deazapurinových nukleosidů, které byly navrženy jako prodloužená analoga 6-hetaryl-7-deazapurinových a 6-amino-7-hetaryl-7-deazapurinových nukleosidů, známých účinných cytostatik. Nejprve byla vyvinuta multigramová syntéza (di)chlor-9*H*-[4,5-*b*]pyrimidoindolů, vycházející ze snadno dostupných chlornitrobenzenů. Pyrimidoindoly byly úspěšně glykosylovány a použity na syntézu 4-hetaryl-6-chlor-, 4,6-bis(hetaryl)-, 4-amino-6-hetaryl-, 4-amino-5-hetaryl- pyrimidoindolových ribonukleosidů a také pyrimidoindolových nukleosidů substituovaných v poloze 4. Hetarylové skupiny byly zavedeny do polohy 4 pomocí Suzukiho nebo Stilleho cross-couplingové reakce. Pro úspěšné provedení reakce s nereaktivním chlorem v poloze 6 bylo nutné najít vhodný katalytický systém a upravit standardní reakční podmínky. Bylo vyzkoušeno několik ligandů, přičemž nejlepší výsledky byly získány při použití ligandu X-Phos. Protože chlor v poloze 4 je aktivovaný pro nukleofilní substituci, amino a dimethylamino deriváty byly připraveny reakcí s vodným amoniakem, respektive s dimethylaminem. Látky nesoucí alkylovou skupinu v poloze 4 byly získány palladiem katalyzovanou alkylací pomocí trialkylhlinitku nebo Negishiho reakcí v případě cyklopropyl derivátu. Cílové volné nukleosidy byly získány přímo z reakcí s nukleofily, případně Zemplénovou metodou. Protože všechny připravené nukleosidy jsou úplně novým typem látek, byla studována jejich cytotoxická a protivirová (HCV a dengue) aktivita. Zatímco všechny 4-amino-5(6)-hetaryl- stejně jako 4,6-disubstituované pyrimidoindolové nukleosidy byly zcela neaktivní, několik sloučenin ze série 4-hetaryl-6-chlorpyrimidoindolových nukleosidů vykazovalo zajímavou aktivitu proti dengue viru a 4-methyl derivát dokonce sub-mikromolární aktivitu proti HCV. Dále byla vyvinuta syntéza dvou izomerních thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů. Tricyklické báze byly připraveny z dichlorpyrimidinu a jodthiofenu tříkrokovou syntézou využívající termické nebo fotochemické cyklizace tetrazolů. Cílové nukleosidy nesoucí hetaryl, amino, dimethylamino, methyl, methoxy a methylsulfanylovou skupinu v poloze 4 byly připraveny pomocí stejných reakcí jako v případě pyrimidoindolů. Nukleosidy anelované s thiofenem jsou testovány na cytotoxické, protivirové a antimikrobiální aktivity. Prozatím jsou dostupné jen výsledky testování anti-HCV aktivit, kde několik sloučenin disponuje sub-mikromolární aktivitou, zároveň ovšem i výraznou (mikromolární) cytotoxicitou.

## List of abbreviations

BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetamide
CCRF-CEM	human T-lymphoblastoid cell line
CMD	concerted metalation-deprotonation
Cy	cyclohexyl
dba	dibenzylideneacetone
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DME	1,2-dimethoxyethane
eq.	equivalent
HCV	hepatitis C virus
HeLa S3	human cervic carcinoma
HepG2	hepatocelular carcinoma cells
Huh7	hepatocellular carcinoma cells
L1210	mouse lymphocytic leukemia cell line
LiHMDS	lithium hexamethyldisilazane
Refl.	reflux
SAR	structure-activity relationship
TBAB	tetrabutylammonium bromide
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
THF	tetrahydrofuran
THP-1	acute monocytic leukemia cell line
TMP	2,2,6,6-tetramethylpiperidin
TPPTS	tris(3-sulfophenyl)phosphine trisodium salt

# Contents

Abstract.....	2
Abstrakt .....	3
List of abbreviations .....	4
Contents.....	5
1 Introduction .....	6
2 Specific aims of the thesis .....	7
3 Results and discussion.....	8
3.1 Pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indole ribonucleosides .....	8
3.1.1 Synthesis of pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indole bases .....	8
3.1.2 Synthesis of 4-(het)aryl-6-chloropyrimido[4,5- <i>b</i> ]indole nucleosides .....	10
3.1.3 Synthesis of 4,6-disubstituted pyrimidoindole nucleosides .....	12
3.1.4 Synthesis of 4-amino-6-hetaryl pyrimidoindole nucleosides .....	15
3.1.5 Synthesis of 4-amino-5-hetaryl pyrimidoindole nucleosides .....	16
3.1.6 4-Substituted pyrimidoindole nucleosides .....	17
3.2 Biological activities of pyrimidoindole nucleosides .....	18
3.2.1 Biological activities of 4-hetaryl-6-chloro- and 4,6- bis(hetaryl)pyrimidoindole nucleosides .....	19
3.2.2 Biological activities of 4-aminopyrimidoindole nucleosides .....	19
3.3 Synthesis of thienopyrrolopyrimidine nucleosides .....	21
3.4 Biological activities of thienopyrrolopyrimidine nucleosides.....	26
3.5 Fluorescence properties of target nucleosides .....	27
4 Conclusion.....	28
1 Úvod .....	30
2 Cíle práce.....	30

3 Výsledky a diskuze.....	31
3.1 Pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolové ribonukleosidy .....	31
3.1.1 Syntéza pyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolových bází .....	31
3.1.2 Syntéza 4-(het)aryl-6-chlorpyrimido[4,5- <i>b</i> ]indolových nukleosidů .....	33
3.1.3 Syntéza 4,6-disubstituovaných pyrimidoindolových nukleosidů.....	35
3.1.4 Syntéza 4-amino-6-hetaryl pyrimidoindolových nukleosidů .....	38
3.1.5 Syntéza 4-amino-5-substituovaných pyrimidoindolových nukleosidů .....	39
3.1.6 Pyrimidoindolové nukleosidy substituované v poloze 4.....	40
3.2 Biologické aktivity pyrimidoindolových nukleosidů .....	41
3.2.1 Biologické aktivity 4-hetaryl-6-chlor a 4,6-bis(hetaryl)pyrimidoindolových nukleosidů .....	42
3.2.2 Biologické aktivity 4-aminopyrimidoindolových nukleosidů.....	42
3.3 Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů.....	44
3.4 Biologické aktivity thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů .....	49
3.5 Fluorescenční vlastnosti cílových nukleosidů .....	50
4 Závěr.....	51
List of publications of the author related to the thesis.....	53
Curriculum vitae .....	53
Konferenční příspěvky/ conference contributions.....	54
Acknowledgement.....	54
References .....	55

## 1 Introduction

Topic of this thesis is based on the results of a long-term medicinal chemistry research in Hocek group at IOCB. At the beginning was the discovery of micromolar cytostatic activities of 6-phenyl purine ribonucleosides in 2000.<sup>1</sup> During the time, many possible

modifications of purine ribonucleoside had been studied. It was shown, that all nucleosides modified at ribose moiety (5'-deoxy, 3'-deoxy, 2'-deoxy nucleosides and 9-(2,3-dihydroxypropyl) acyclic nucleoside analogues) were inactive or almost inactive.<sup>2,3,4</sup> L-Nucleosides, enantiomers of naturally occurring D-nucleosides, were inactive as well. It was also shown, that any substitution in position 2 or 8 of purine ring leads to completely inactive compounds.<sup>5,6</sup> Another option of purine modification is synthesis of deazapurine analogues. Whilst 3-deazaanalogues were completely inactive,<sup>7</sup> 1-deazapurine derivatives retain cytostatic activity, but lower than parent purine nucleosides.<sup>8</sup> However, 7-deazapurine analogues bearing thiophene or furan in position 6 and hydrogen or fluorine atom in position 7 displayed strong nanomolar cytostatic activity against several cancer cell lines.<sup>9</sup> Another class of nucleosides with nanomolar cytostatic activity are 6-amino-7-hetaryl-7-deazapurine ribonucleosides, analogues of tubercidin. The most active compounds from this series were 7-deazaadenosines bearing 2- or 3-thienyl and 2- or 3-furyl groups in position 7.<sup>10</sup> This led to design of new extended analogues of deazapurines, nucleosides with another aryl (pyrimido[4,5-*b*]indoles) or hetaryl (thienopyrrolopyrimidines) ring annulated to positions 7 and 8 of 7-deazapurine system. Pyrimidoindole bases itself are known for various biological activities,<sup>11</sup> but ribonucleosides containing such tricyclic bases have never been reported and investigation of their cytostatic and antiviral activities was the goal of this thesis.

## 2 Specific aims of the thesis

- 1) Development of multi-gram synthesis of pyrimido[4,5-*b*]indoles bearing additional halogen atoms in positions 4, 5 or 6 and synthesis of their nucleosides.
- 2) Synthesis of 4-(het)aryl-6-chloropyrimido[4,5-*b*]indole nucleosides; 4,6-bis(het)aryl pyrimido[4,5-*b*]indole nucleosides and nucleosides bearing small alkyl, (het)aryl and amino groups in position 4
- 3) Synthesis of 4-aminopyrimido[4,5-*b*]indole nucleosides bearing (het)aryl groups in position 5 or 6
- 4) Synthesis of thieno-fused 7-deazapurine ribonucleosides substituted in position 4

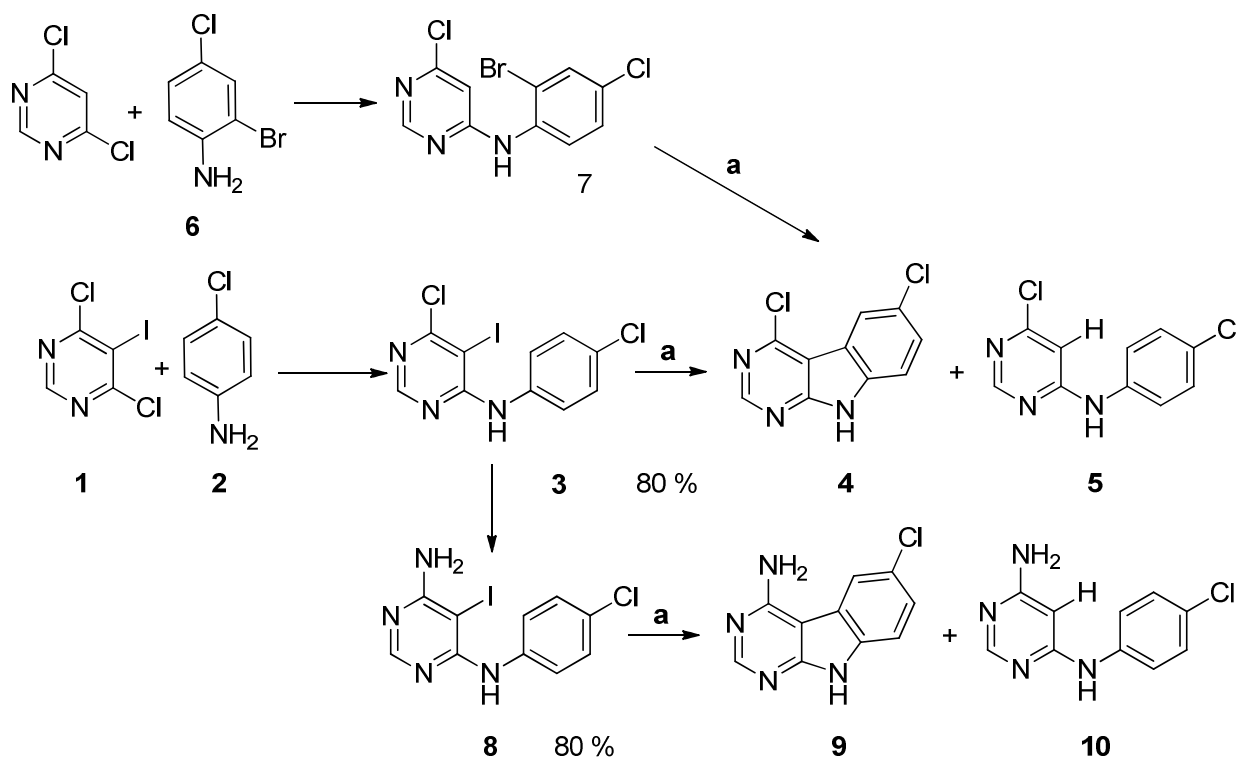
## 3 Results and discussion

### 3.1 Pyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleosides

#### 3.1.1 Synthesis of pyrimido[4,5-*b*]indole bases

To achieve the first goal, synthesis of pyrimidoindole bases, I had to develop multigram synthesis of such heterocycles. There are several possible approaches to pyrimidoindoles, for example photocyclization of tetrazoles,<sup>12</sup> dehydrogenation of corresponding 5,6,7,8-tetrahydropyrimidoindoles by DDQ or by palladium,<sup>13</sup> synthesis by heterocyclizations from *o*-chloronitrobenzenes or by intramolecular C-H arylation.<sup>14</sup> First I tried C-H arylation approach. Halogenated intermediates were synthesized by published procedures from 4,6-dichloropyrimidine and 4-chloroaniline or 2-bromo-4-chloroaniline. Several procedures selected from literature about many successful intramolecular C-H arylations were tried. Palladium acetate or Pd(OAc)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> were used as palladium source in combination with tricyclohexylphosphine, tri(*tert*-butyl)phosphine, tris(4-fluorophenyl)phosphine or tris(pentafluorophenyl)phosphine as ligands and potassium or cesium carbonates, potassium or sodium acetates or *tert*-butoxide as bases. Additives like copper (I) iodide, tetrabutylammonium bromide and especially pivalic acid were used in some experiments. Pivalate anion acts as proton shuttle in concerted metalation-deprotonation (CMD) catalytic cycle, which is generally accepted for this kind of reactions.<sup>15,16</sup> Most of the reactions were performed in DMF at temperatures 80-150 °C. The results were unsatisfying, only no reaction, decomposition of starting material or simple dehalogenation were observed in most of all experiments. The only two positive results were obtained with *N*-4-chlorophenyl-6-amino-5-iodopyrimidin-4-amine as a substrate and procedure using palladium acetate without any ligand, tetrabutylammonium bromide as additive at 150 °C in DMF, this reaction furnished desired pyrimidoindole base **9** in only 10 % yield, the rest was deiodinated product **10**. Also reaction under catalysis by palladium acetate in combination with tris(*p*-fluorophenyl)phosphine, potassium carbonate and 30 % of pivalic acid gave 10 % of desired product **9**, but the rest was decomposed starting material.

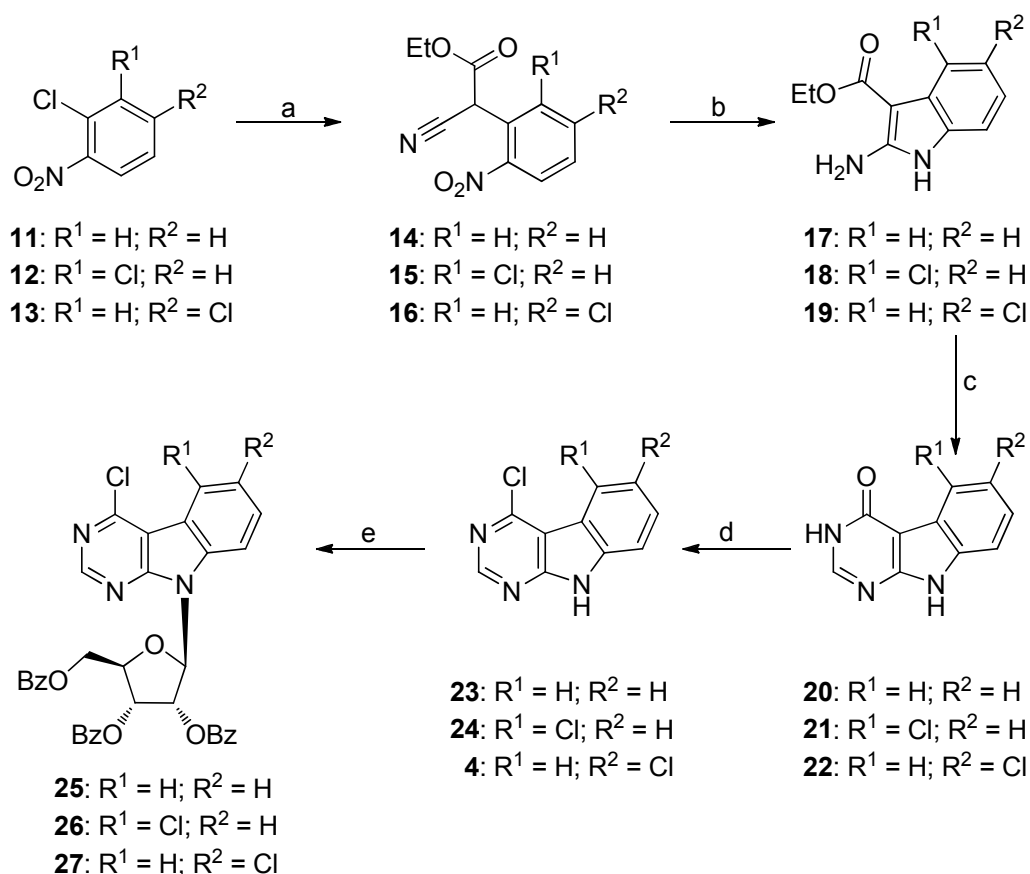




a: Pd(OAc)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 %; base, additive; DMF, 18 hr.

**Scheme 1** Attempts on intramolecular C-H arylation

Because all attempts on C-H arylation were unsuccessful, I turned my attention to another approach based on heterocyclization reactions. Synthesis started from commercially available *o*-chloronitrobenzenes. First step was an aromatic nucleophilic substitution of chlorine atom in position 2 by potassium salt of ethyl cyanoacetate according to literature procedure.<sup>17</sup> Obtained ethyl-2-(2-nitrophenyl)cyanoacetates **14-16** were reduced by zinc dust in acetic acid and spontaneously cyclized to indole derivatives **17-19**. In the next step, pyrimidoindole motif was formed by cyclization with formamide at 190 °C for 18 hours. Final chloropyrimido[4,5-*b*]indoles **23**, **24** and **4** were prepared by treatment of pyrimidoindolones **20-22** with POCl<sub>3</sub> under reflux. Synthesis of chlorinated pyrimidoindole heterocycles was optimized for 30 g scale without any chromatography and with excellent 50 % overall yield over 4 steps (Scheme 2).



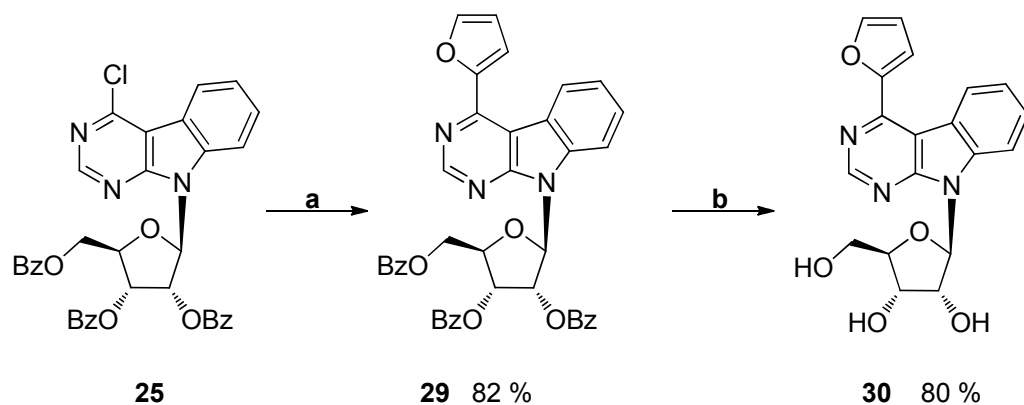
**a:** CNCH<sub>2</sub>COOEt, *t*-BuOK, THF, reflux, 48 h; **b:** Zn, AcOH, 55 °C, 150 min;  
**c:** formamide, 190 °C, 12 h; **d:** POCl<sub>3</sub>, reflux, 4 h;  
**e:** 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranose, BSA, TMSOTf, 60 °C, 8 h.

### Scheme 2 Synthesis of pyrimidoindole bases **23,24,4** and protected nucleosides **25-27**

Key intermediate chlorinated ribonucleosides **25-27** (Scheme 2) were obtained in about 50 % yields by Vorbrüggen glycosylation in analogy to published procedure<sup>9</sup> used for glycosylation of 7-deazapurines. Nucleosides **25-27** were used for synthesis of all target pyrimidoindole nucleosides.

#### 3.1.2 Synthesis of 4-(het)aryl-6-chloropyrimido[4,5-*b*]indole nucleosides

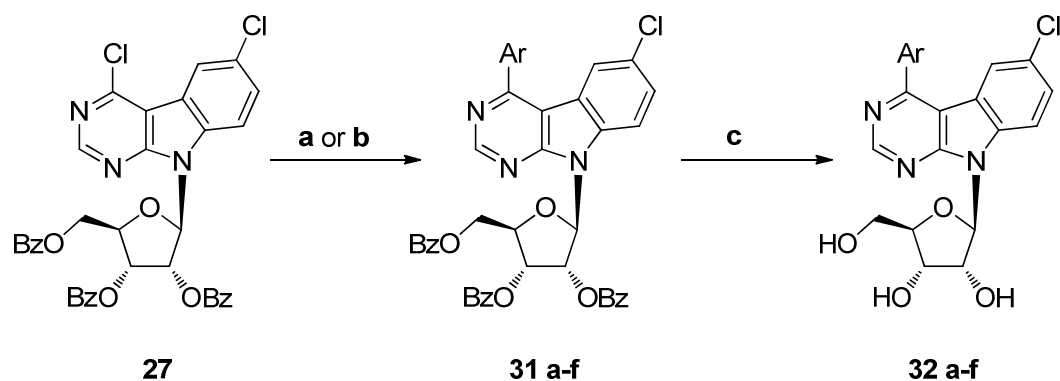
The first synthesized series of final nucleosides was series of 4-(het)aryl-6-chloropyrimidoindole ribonucleosides **32**. The reactivity of chlorine atom in position 4 was first tested on 4-chloro-9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleoside **25**, Stille cross-coupling was performed under standard conditions<sup>9</sup> with 2-(tributylstannyl)furan in the presence of PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in DMF at 100 °C to give the desired 4-(2-furyl)pyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleoside **29** in excellent 82 % yield. Its deprotection under the Zemplén conditions using NaOMe in methanol afforded the target free ribonucleoside **30** (Scheme 3).



**a:** (furan-2-yl)SnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.); PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.05 eq.), DMF, 100 °C, 8 h;  
**b:** 1M MeONa in MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

### Scheme 3 Synthesis of 2-furyl nucleoside **30**

Chlorine atom in position 4 is supposed to be much more reactive due to electron-poor nature of a pyrimidine ring, so I performed Suzuki or Stille reactions according to standard procedures, which means PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in DMF at 100 °C for the Stille coupling and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in toluene at 100 °C for the Suzuki coupling. All reactions worked smoothly and fully regioselectively; not even trace of 6-substituted product was observed. Desired 4-(het)aryl-6-chloropyrimidoindole nucleosides **31a-f** (Scheme 4) were isolated in good yields (64 - 79 %) (Table 1). Zemplén deprotection using sodium methoxide in methanol furnished series of final free nucleosides **32a-f** in excellent yields (78-91 %).



**a)** ArB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.): Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.), toluene, 100 °C, 8h;  
**b)** ArSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.): PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.05 eq.), DMF, 100 °C, 8 h;  
**c)** 1M MeONa in MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

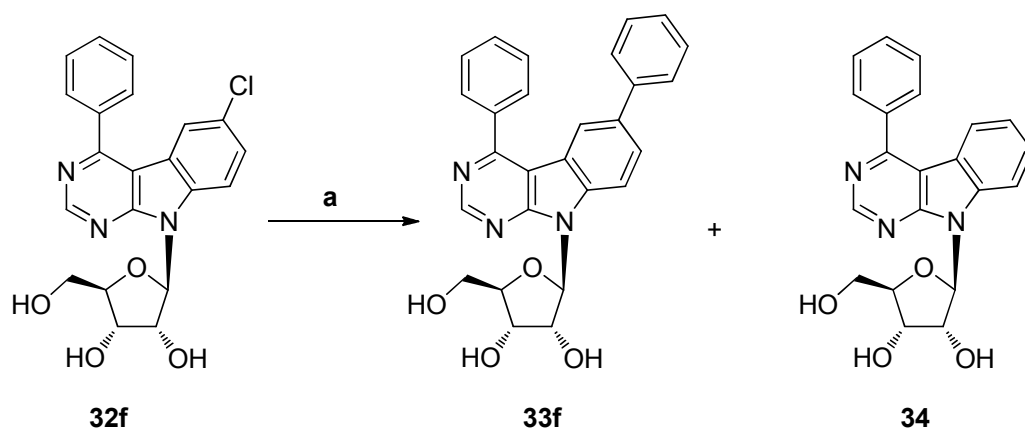
### Scheme 4 Synthesis of 4-(het)aryl nucleosides **32a-f**

**Table 1** Cross-coupling reactions of **27** followed by deprotection

Entry	Ar	M	Coupling product	Yield [%]	Free nucleoside	Yield [%]
1	2-furyl	SnBu <sub>3</sub>	<b>31a</b>	79	<b>32a</b>	86
2	3-furyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31b</b>	69	<b>32b</b>	91
3	2-thienyl	SnBu <sub>3</sub>	<b>31c</b>	78	<b>32c</b>	93
4	3-thienyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31d</b>	70	<b>32d</b>	86
5	2-benzofuryl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31e</b>	64	<b>32e</b>	78
6	phenyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31f</b>	72	<b>32f</b>	89

### 3.1.3 Synthesis of 4,6-disubstituted pyrimidoindole nucleosides

To achieve the next goal, synthesis of 4,6-disubstituted pyrimidoindole nucleosides, conditions for cross-coupling reaction with unreactive chlorine atom in position 6 had to be found. As there are many successful Suzuki reactions in aqueous media,<sup>18</sup> both protected or deprotected nucleosides can be used. First optimization was performed on unprotected nucleoside **32f**, several sets of catalytic systems including water soluble ligands in aqueous mixtures or Buchwald phosphine ligands were tested for Suzuki coupling with phenylboronic acid. Although reaction using TPPTS ligand did not proceed at all, reactions with CataXCium F in butanol/water mixture as well as reactions with DavePhos, S-Phos and X-phos ligands in DMF led to formation of desired product (Scheme 5, Table 2). Unfortunately, none of those reactions gave full conversion, which makes these conditions unsuitable for synthesis of larger series of nucleosides because of complicated separation of product from unreacted starting material.



a) Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), ligand (0.1 eq.), phenylboronic acid (1.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), solvent, 100 ° 8h.

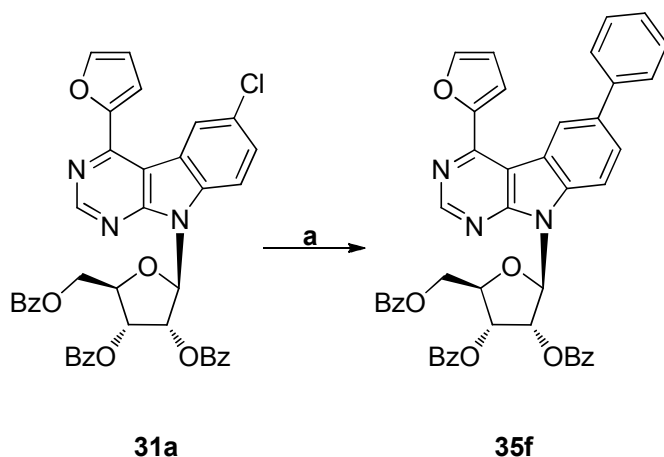
**Scheme 5** Optimization of Suzuki coupling of free nucleoside **33f**

**Table 2** Optimization of cross-coupling reaction of free nucleoside **32f** with phenylboronic acid

Entry	Ligand	Solvent	Conversion <sup>a</sup>
1	CataXCium F	<i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O, 2.5:1	60 <sup>b</sup>
2	TPPTS	MeCN/H <sub>2</sub> O, 2:1	0
3	S-Phos	DMF	30
4	DavePhos	DMF	20
5	X-Phos	MeCN/H <sub>2</sub> O, 2:1	35
6	X-Phos	DMF	60

<sup>a</sup>Determined by NMR from crude reaction mixture; <sup>b</sup> Reaction mixture contained a mixture of compounds **34** and **33f** in ratio 0.7:1.

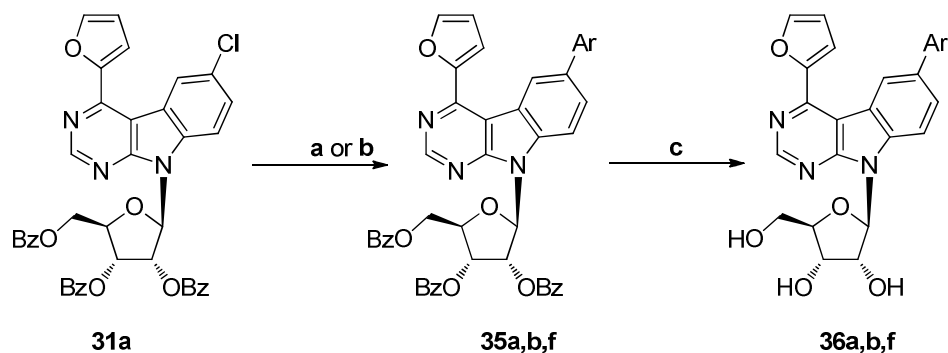
Therefore I turned my attention to protected nucleoside **31a** and classical cross-coupling in organic solvents. Again, three Buchwald ligands (Scheme 6) in DMF were tested, and whilst conversions with DavePhos and S-Phos were still moderate (20 % and 40 %, respectively), X-Phos ligand gave almost quantitative conversion to desired product **35f**.



**a:** Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), ligand (0.1 eq.), phenylboronic acid (1.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 100 °C, 8h.

### Scheme 6 Synthesis of 6-phenyl nucleoside **35f**

With these optimized conditions in hand, small series of 3 nucleosides was synthesized (Scheme 7). Reaction with phenylboronic acid furnished desired nucleoside **35f** in good yield (64 %). To obtain similar yield also with unstable<sup>19</sup> 3-furylboronic acid, it was necessary to add boronic acid into the reaction mixture in three portions. On the other hand, the portions-wise addition of phenylboronic acid did not improve the yield significantly (Table 8, Entries 3, 4). The same catalyst/ligand system was applied for Stille coupling with 2-(tributylstannyl)furan, target compound **35a** was isolated in 79 % yield. All benzoylated derivatives **35 a,b,f** were successfully deprotected with sodium methanolate to final free nucleosides **36 a,b,f** in good yields (Table 3, Scheme 7).



**a)** ArB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.): Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 95 °C 3h;  
**b)** ArSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.): Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 95 °C, 3 h;  
**c)** 1M MeONa in MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

### Scheme 7 Synthesis of 4,6-disubstituted derivatives **36**

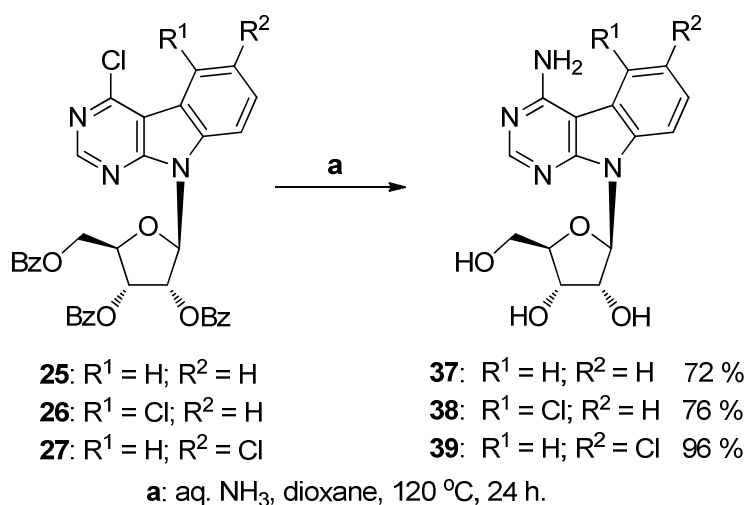
**Table 3** Synthesis of 4,6-disubstituted derivatives **36**

Entry	Ar	Conditions	Coupling product	Yield [%]	Free nucleoside	Yield [%]
1	3-furyl	a	<b>35b</b>	46	<b>36b</b>	90
2 <sup>a</sup>	3-furyl	a	<b>35b</b>	75		
3	phenyl	a	<b>35f</b>	62	<b>36f</b>	81
4 <sup>a</sup>	phenyl	a	<b>35f</b>	64		
5	2-furyl	b	<b>35a</b>	79	<b>36a</b>	89

<sup>a</sup>Boronic acid was added in three parts within 2 h.

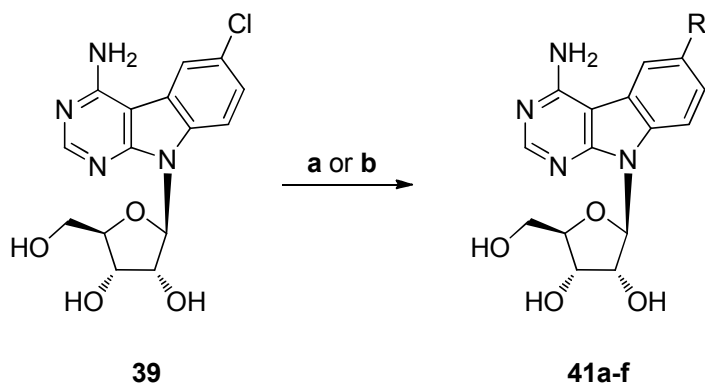
### 3.1.4 Synthesis of 4-amino-6-hetaryl pyrimidoindole nucleosides

Synthesis of key-intermediate 4-aminopyrimidoindole nucleosides **37-39** was optimized and all three nucleosides were prepared by amination of protected chloropyrimidoindole nucleosides **25-27** using aqueous ammonia in dioxane in excellent yields (Scheme 8).



### Scheme 8 Synthesis of 4-aminopyrimidoindole nucleosides

Several sets of catalyst/ligand systems were again tested for cross-coupling of unreactive chlorine in position 6. X-Phos ligand in DMF was found to be the best and it was used for synthesis of 4-amino-6-hetarylpyrimidoindole nucleosides in good yields (Scheme 9). Results are summarized in Table 4.



**a:** RB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 100 °C, 12 h;  
**b:** RSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 12 h.

**Scheme 9** Synthesis of final 4-amino-6-hetarylpyrimidoindole nucleosides **41**

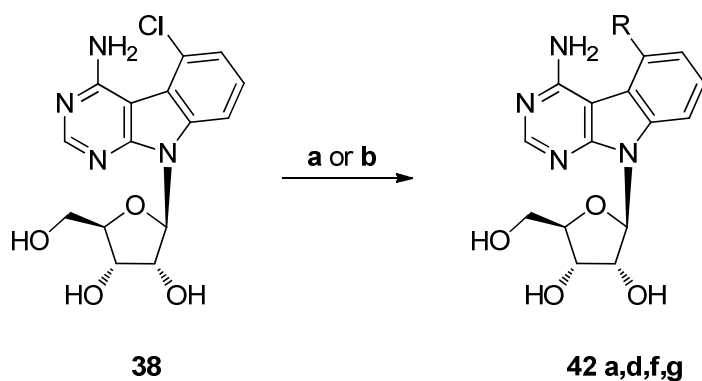
**Table 4** Yields of 4-amino-6-hetarylpyrimidoindole nucleosides

Comp.	Reagent	R-	Yield [%]
<b>41a</b>	phenylboronic acid	phenyl	93
<b>41b</b>	(furan-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	2-furyl	68
<b>41c</b>	(furan-3-yl)B(OH) <sub>2</sub>	3-furyl	72
<b>41d</b>	(thiophen-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	2-thienyl	73
<b>41e</b>	(thiophen-3-yl)B(OH) <sub>2</sub>	3-thienyl	77
<b>41f</b>	(benzofuran-2-yl)B(OH) <sub>2</sub>	2-benzofuryl	75

### 3.1.5 Synthesis of 4-amino-5-hetaryl pyrimidoindole nucleosides

The previously optimized procedure was applied also on the synthesis of 4-amino-5-hetarylpyrimidoindole nucleosides **42**, but yields of Suzuki cross-couplings were much lower and unexpected product of butyl transfer was obtained from Stille reactions. However, target nucleosides **44** were obtained in sufficient amounts for characterization and biological testing (Scheme 10, Table 5). Much lower reactivity of 5-chloro derivative **38** in comparison with 6-chloro derivative **39** is probably caused by steric hindrance of the chlorine atom in position 5 by the amino group in position 4.





**a:** RB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 100 °C, 12 h;  
**b:** RSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 12 h.

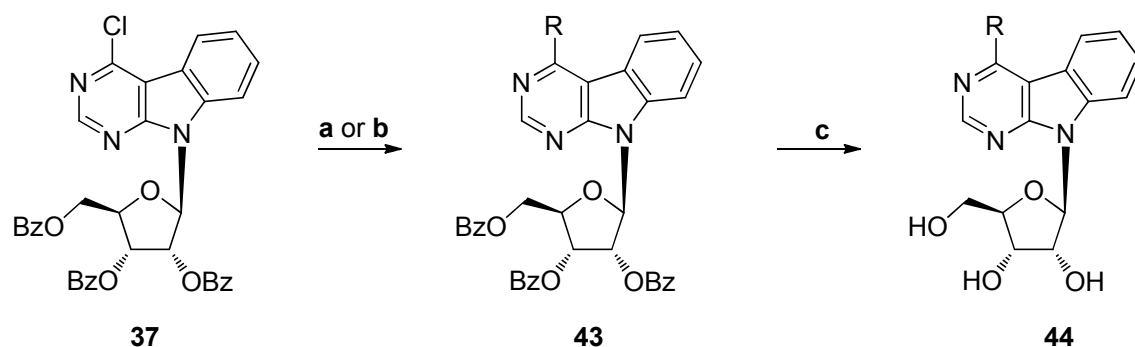
**Scheme 10** Synthesis of 4-amino-5-substituted pyrimidoindole nucleosides **42**

**Table 5** Yields of 4-amino-5-substituted pyrimidoindole nucleosides **42**

Entry	Comp.	Reagent	R-	Yield [%]
1	<b>42a</b>	phenylboronic acid	phenyl	28
2	<b>42b</b>	(furan-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	2-furyl	33
	<b>42g</b>		butyl	34
3	<b>42g</b>	(thiophen-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	butyl	42
4	<b>42d</b>	(thiophen-3-yl)B(OH) <sub>2</sub>	3-thienyl	24

### 3.1.6 4-Substituted pyrimidoindole nucleosides

To investigate the influence of the amino group in position 4 on biological activity, series of 4-substituted nucleosides was prepared. Methyl **43a**, ethyl **43b** and cyclopropyl **43c** nucleosides were synthesized by Pd-catalyzed cross-coupling reaction of protected 4-chloropyrimidoindole nucleoside **37** with trimethylaluminium, triethylaluminium or by Negishi reaction with cyclopropylzinc chloride under standard conditions in the presence of Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in THF at 70 °C in good yields (Table 6).<sup>20</sup> *N,N*-Dimethylamino derivative **43d** was obtained from 4-chloropyrimidoindole nucleoside **25** by a simple nucleophilic substitution with dimethylamine in THF/isopropanol at r.t. in 74 % yield. Zemplén deprotection furnished target free nucleosides **44** in good yields (88-92 %, Scheme 11).



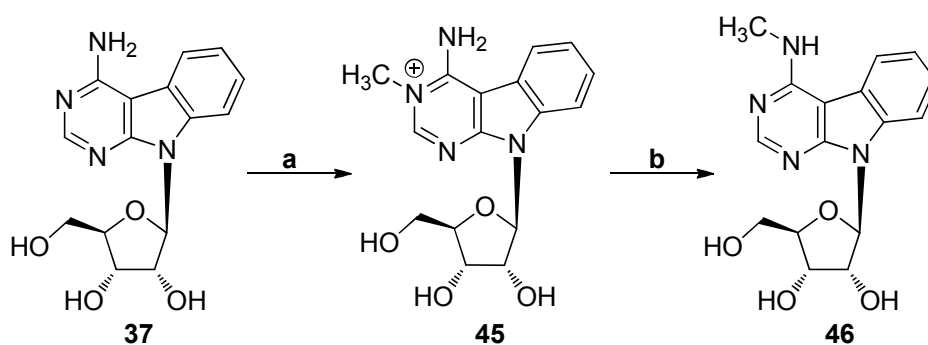
**a:** reagent (2 eq., see Table 12), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq), THF, r.t.; **b:** Me<sub>2</sub>NH in THF (2 eq.), propan-2-ol, r.t., 24 h; **c:** 1M MeONa in MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

**Scheme 11** Synthesis of 4-substituted pyrimidoindole nucleosides **44**

**Table 6** Yields of 4-substituted products

Entry	Reagent	R	Protected product	Yield [%]	Unprotected product	Yield [%]
1	Me <sub>3</sub> Al	Me	<b>43a</b>	63	<b>44a</b>	92
2	Et <sub>3</sub> Al	Et	<b>43b</b>	76	<b>44b</b>	85
3	cyclopropyl-ZnCl	cyclopropyl	<b>43c</b>	63	<b>44c</b>	89
4	Me <sub>2</sub> NH	Me <sub>2</sub> N	<b>43d</b>	74	<b>44d</b>	88

Nucleophilic substitution with methylamine surprisingly failed even though more than 10 equivalents of amine were used at 50 °C in a closed microwave vial. Desired *N*-methylamino compound **46** was finally synthesized according to a 40 years old procedure (Scheme 12).<sup>21</sup>



**a:** MeI (2 eq), DMA, r.t., 24 h; **b:** 1M NaOH, 100 °C, 1.5 h.

**Scheme 12** Synthesis of 4-*N*-methylamino pyrimidoindole nucleoside **46**

### 3.2 Biological activities of pyrimidoindole nucleosides

All the title compounds were tested for *in vitro* cytotoxic (human T-lymphoblastic leukemia line CCRF-CEM, promyelocytic leukemia HL-60 and cervical carcinoma HeLa S3)

and antiviral activity (HCV and Dengue virus). Cytostatic activity screening was done by group of Dr. Helena Mertlíková-Kaiserová at Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR. Anti-HCV activities were studied at Gilead Sciences, anti-dengue activities at Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore (NITD) or in group of Dr. Weber at IOCB.

### 3.2.1 Biological activities of 4-hetaryl-6-chloro- and 4,6-bis(hetaryl)pyrimidoindole nucleosides

None of these nucleosides showed any significant cytostatic/cytotoxic effect or anti-HCV activity, except for compound **32a**, which showed cytotoxicity in THP-1 and HepG2 cells with CC<sub>50</sub> of 1.565 and 0.175 μM, respectively. However, three examples of 4-hetaryl-6-chloropyrimido[4,5-*b*]indole nucleosides bearing 2-furyl **32a**, 2-thienyl **32c** or 2-benzofuryl **32e** groups at position 4 showed significant (submicromolar) effects against Dengue virus (Table 7). Unfortunately, narrow windows of these compounds (x 10) between EC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> in Huh-7 replicon assay were observed.

**Table 7** Anti-dengue activities of 4-hetaryl-6-chloropyrimidoindole nucleosides

comp.	Dg-reporter		Dg-replicon	
	K-562	K-562	Huh7	Huh7
	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
<b>32a</b>	0.01	4.12	0.49	3.60
<b>32b</b>	69.51	>100	>100	>100
<b>32c</b>	0.51	15.75	1.71	10.71
<b>32d</b>	41.77	>100	46.99	>100
<b>32e</b>	0.13	16.50	10.04	26.26
<b>32f</b>	27.56	51.34	15.63	20.10
<b>30</b>	>100	>100	61.77	>100
<b>36a</b>	3.51	18.43	18.69	31.09
<b>36b</b>	10.91	29.91	30.00	52.98
<b>36f</b>	3.46	7.36	7.53	11.1

### 3.2.2 Biological activities of 4-aminopyrimidoindole nucleosides

All the target nucleosides **37**, **38**, **39**, **41**, **42** and **45** were also studied for *in vitro* cytotoxic activity against cancer cell lines (HL60, HeLa S3, CCRF-CEM and HepG2) and for

anti-HCV activities. The title nucleosides **37**, **38**, **39**, **41**, **42** and **45** did not show any significant cytotoxicity in these assays. Results of testing against HCV genotype 1A, 1B and 2A replicons are summarized in Table 8. Several nucleosides displayed micromolar activity against HCV, but the activity was usually accompanied by cytotoxicity to MT-4 cells. The most active, but also the most cytotoxic compound was the 4-amino-5-chloro derivative **38**. However, 4-methyl nucleoside **44a** showed submicromolar activities in the HCV 1A and 1B replicon assays and cytotoxicity higher than 44  $\mu$ M.

**Table 8** Anti-HCV activities of 4-aminopyrimidoindole nucleosides

Compound	HCV replicon 1A		HCV replicon 1B		HCV replicon 2A	
	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>38</b>	0.53	1.16	0.32	1.71	1.28	1.66
<b>39</b>	30.55	>44	11.05	>44	>44	>44
<b>41d</b>	10.03	18.10	8.75	>44	24.89	>44
<b>41e</b>	10.09	17.34	7.38	25.60	13.77	30.19
<b>41f</b>	6.13	14.47	4.83	28.0	8.77	18.00
<b>42g</b>	>44	>44	8.81	>44	>44	>44
<b>44d</b>	21.27	>44	7.07	>44	>44	>44
<b>44a</b>	0.56	>44	0.34	>44	>44	>44

All the nucleosides were also tested for anti-dengue activities in Vero cells. This screening was done at IOCB in group of Dr. Weber. Several derivatives showed activity in micromolar concentrations, but only benzofuryl derivative **41e** was not cytotoxic to these cells. 4-Amino-5-chloro derivative **38** was the most active compound, but with low selectivity index.

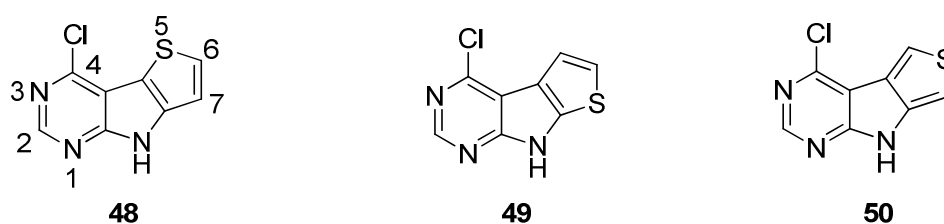
**Table 9** Anti-Dengue activities of 4-aminopyrimidoindole nucleosides

Compound	Vero cells, DENV-2 ( $\mu\text{M}$ )		
	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	SI
<b>38</b>	43.5	39.6	0.9
<b>39</b>	0.85	1.14	1.3
<b>43d</b>	18.8	46.3	2.5
<b>44g</b>	14.8	62.9	4.3
<b>43e</b>	15.4	>100	>6.5
<b>40</b>	39.6	43.5	1.1

Based on those results, it can be noted that all pyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleosides are less cytotoxic than the corresponding 7-deazapurine nucleosides and are not very promising cytostatics. Micromolar activity of 4-amino-5-chloro **38** and 4-methylpyrimidoindole nucleosides **44a** against HCV virus is also not sufficient for further development. On the other hand, submicromolar anti-dengue activity of three 4-hetaryl-6-chloropyrimidoindole nucleosides **31a**, **31c**, **31e** is far more interesting, especially because of the lack of any antiviral therapy or vaccine against dengue fever.

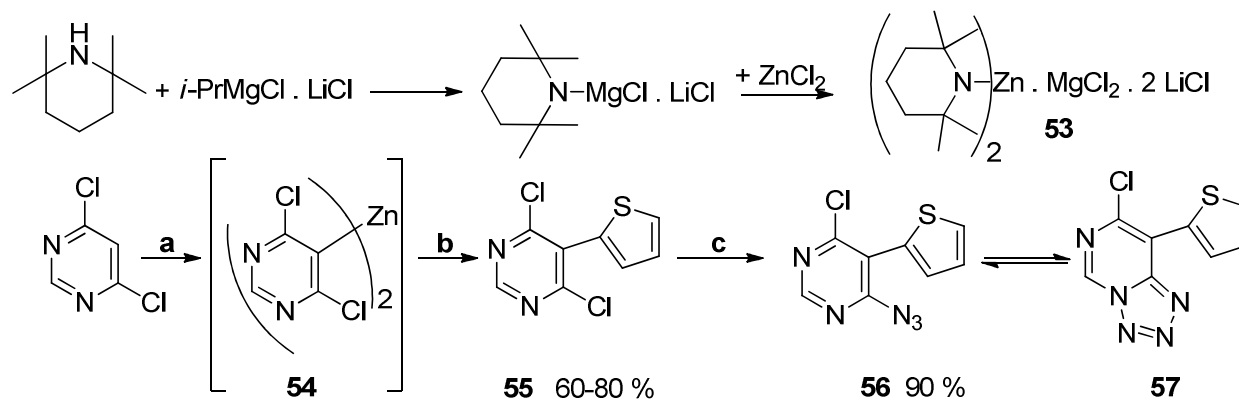
### 3.3 Synthesis of thienopyrrolopyrimidine nucleosides

Another class of target compounds were thieno-fused 7-deazapurine ribonucleosides. There are three possible isomeric bases, we were the most interested in 4-chloro-8*H*-thieno[2',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (**48**), isomer with sulphur in position 5 and 4-chloro-8*H*-thieno[3',2':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (**49**) with sulphur in position 7 of thienopyrrolo-pyrimidine system (Figure 1).

**Figure 1** Structures of all possible thienopyrrolopyrimidines

As iodine atom in position 5 of pyrimidine ring is supposed to be more reactive than chlorine in activated position 4,<sup>22,23,24</sup> I performed Stille reaction of 4,6-dichloro-5-iodopyrimidine (**1**) with 2-(tributylstannyl)thiophene, but only 4,6-disubstituted **51** or even trisubstituted product **52** was identified in the reaction mixture. So I changed strategy and used Negishi coupling for connection of pyrimidine and thiophene rings (Scheme 13). Azido

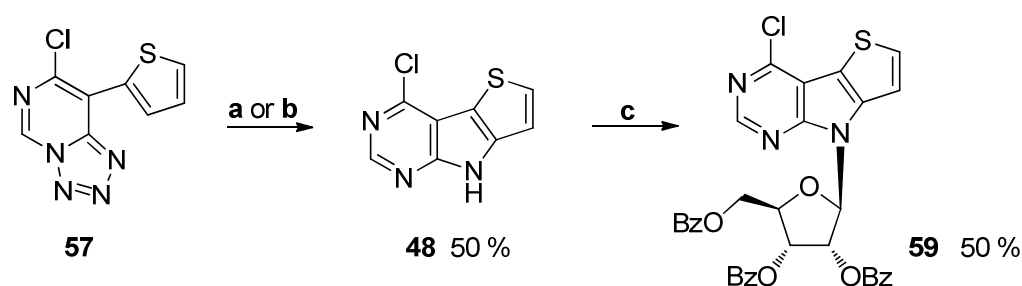
group was introduced into position 4 in the next step by nucleophilic substitution with sodium azide in DMF or THF and obtained azido derivative, which is present in form of tetrazole was cyclized photochemically or thermally to desired base **48**. Both cyclizations were successful, thermal cyclization is much faster and gives satisfactory 50 % yield.



**a:** (TMP)<sub>2</sub>Zn.MgCl<sub>2</sub>.2LiCl (0.55 eq.), THF, 0 °C, 1h, then r.t., 1h; **b:** 2-iodothiophene (1.2 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 eq.), THF, 65 °C, 16h; **c:** NaN<sub>3</sub> (1 eq.), LiCl (1 eq.), DMF, r.t.,

**Scheme 13** Preparation of organozinc complex **53** and synthesis of tetrazole **57**

For successful glycosylation of thienopyrrolopyrimidine base **48** it was necessary to optimize the procedure, tricyclic base **48** was heated with BSA for 30 minutes at 60 °C and then trimethylsilyltriflate and 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranose were added and heated overnight. This procedure gave the key-intermediate nucleoside **59** in ca. 50 % yield (Scheme 14).



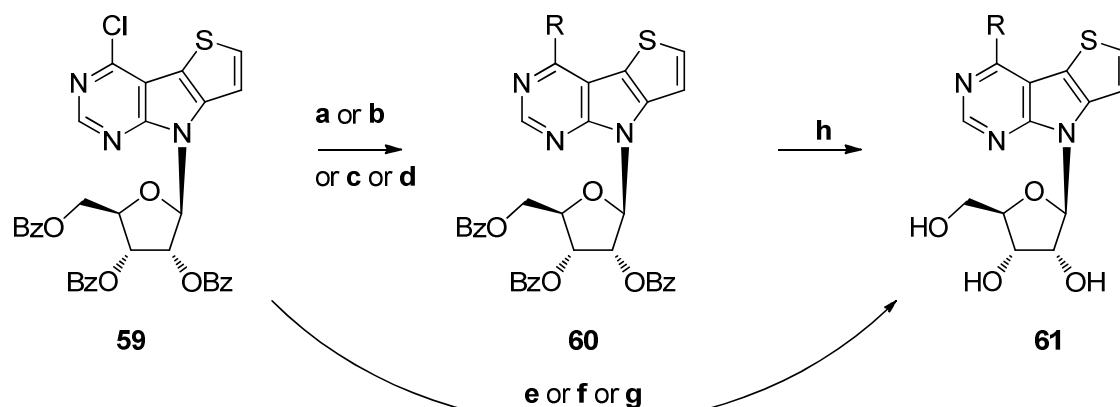
**a:** 1,4-dibromobenzene, 180 °C, 30 min; **b:** TFA, UV, r.t., days;  
**c:** BSA (1 eq.), MeCN, 60 °C, 30 min; then 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranose (2 eq.), TMSOTf (2 eq.), 60 °C, 8 h.

**Scheme 14** Synthesis of key-intermediate nucleoside **51**

Thienopyrrolopyrimidine nucleosides have never been reported, so we decided to synthesize the first series of 8 nucleosides substituted in position 4 for initial biological activity studies. Substituents selection was based on previous results obtained in our group.<sup>25,26</sup> Furyl and benzofuryl as well as amino and methyl groups were selected because pyrimidoindoles bearing those groups displayed some biological activity. Methoxy,

methylsulfanyl and dimethylamino groups were chosen as analogues of cytostatic 7-hetaryl-7-deazapurine ribonucleosides bearing those groups in position 6.<sup>27</sup>

Synthesis of final nucleosides was done in analogy to procedures used for synthesis of pyrimidoindole nucleosides **31** and **43**. 3-Furyl and 2-benzofuryl derivatives **60b**, **60e** were prepared from 4-chlorothienopyrrolopyrimidine nucleoside **59** by Suzuki coupling using Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> as a catalyst with potassium carbonate in toluene, 2-furyl derivative **60a** was synthesized by Stille coupling catalyzed by PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in DMF and 4-methyl derivative **60h** was obtained from palladium catalyzed alkylation by trimethylaluminium. Dimethylamino derivative **60i** was prepared by nucleophilic substitution with dimethylamine (Scheme 15). Yields of those protected nucleosides are summarized in Table 10. Zemplén deprotection furnished desired unprotected nucleosides **61** in good yields. Amino, methoxy and methylsulfanyl groups were introduced into position 4 by nucleophilic substitution with aqueous ammonia in dioxane, sodium methoxide or sodium thiomethoxide in methanol. Ribose moiety was simultaneously deprotected under the reaction conditions and target unprotected nucleosides **61** were obtained in good yields (Table 10).



**a**: 2-tributylstannylfuran (1.2 eq.), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 8 h; **b**: R-boronic acid (1.5 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.), toluene, 100 °C, 8 h; **c**: Me<sub>3</sub>Al (2 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq), THF, r.t., 12 h; **d**: Me<sub>2</sub>NH in THF (2 eq.), propan-2-ol/EtOH 1:1, r.t., 24 h; **e**: NH<sub>3</sub> (aq.), dioxane, 120 °C, 12 h; **f**: MeONa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **g**: MeSNa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **h**: 1M MeONa in MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

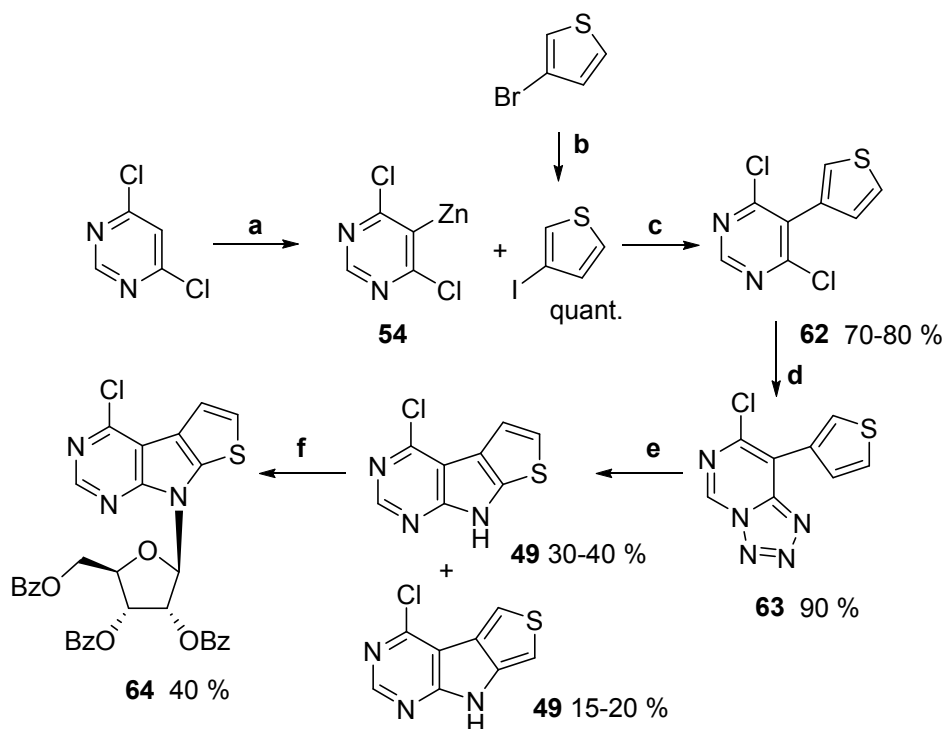
**Scheme 15** Synthesis of 4-substituted thienopyrrolopyrimidine nucleosides **60**, **61**

**Table 10** Synthesis of 4-substituted thienopyrrolopyrimidine nucleosides

Entry	Conditions	R	Protected product	Yield [%]	Unprotected product	Yield [%]
1	a	2-furyl	<b>60a</b>	84	<b>61a</b>	62
2	b	3-furyl	<b>60b</b>	82	<b>61b</b>	70
3	b	2-benzofuryl	<b>60e</b>	87	<b>61e</b>	68
4	c	Me	<b>60h</b>	87	<b>61h</b>	82
5	d	Me <sub>2</sub> N	<b>60i</b>	78	<b>61i</b>	49
6	e	NH <sub>2</sub>	-	-	<b>61j</b>	75
7	f	MeO	-	-	<b>61k</b>	78
8	g	MeS	-	-	<b>61l</b>	64

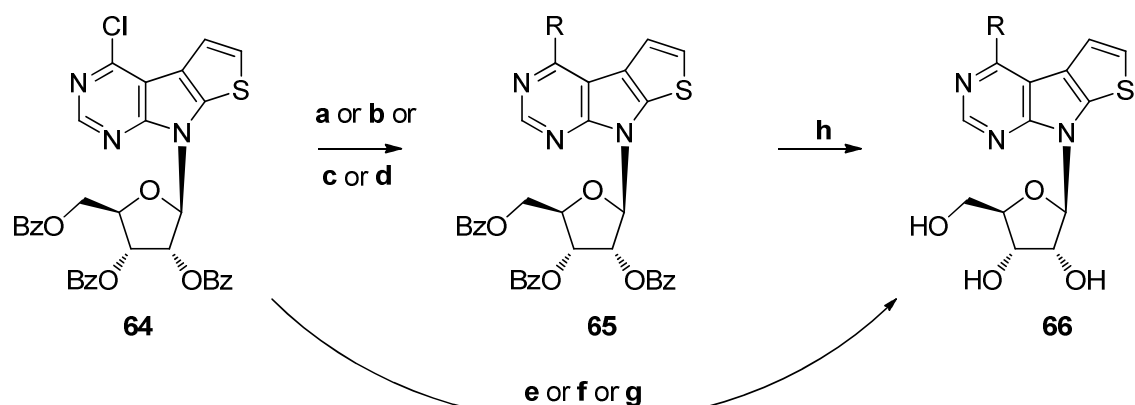
The next goal was to synthesize a series of nucleosides with izomeric 8*H*-thieno[3',2':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine base **49**. I applied the same synthetic strategy as in case of base **48**, just 2-iodothiophene was substituted with 3-iodothiophene, which was prepared by modified published procedure.<sup>28</sup> Negishi coupling with 3-iodothiophene worked well and product **62** was isolated in 70-80 % yield. Tetrazole was prepared by reaction with sodium azide and was cyclized photochemically to desired base **49**. In this case, thermal cyclization gave only 10-15 % yield, but only isomer **49** was formed. Photochemical cyclization led to formation of both possible isomers **49** and **50** in ratio 2:1 and total yield 45-70 %. Subsequent Vorbrüggen glycosylation was done in the same manner as in case of base **48** and furnished desired key-intermediate nucleoside **64** in yields around 40 % (Scheme 16).





#### Scheme 16 Synthesis of nucleoside **64**

Target nucleosides **66** were synthesized using the same procedures as for nucleosides **61** (Table 11, Scheme 17). Suzuki and Stille couplings were employed for preparation of 4-hetaryl nucleosides **65 a,b,e**; palladium catalyzed methylation furnished methyl derivative **65h**. All benzoylated nucleosides **65** were deprotected by sodium methoxide in methanol. Nucleophilic substitution on benzoylated 4-chlorothiopyrrolopyrimidine nucleoside **64** with ammonia, dimethylamine, sodium methoxide and sodium thiomethoxide led directly to final unprotected nucleosides **66** in good yields (Scheme 17, Table 11).



**a:** 2-tributylstannylfuran (1.2 eq.), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 8 h; **b:** R- boronic acid (1.5 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.), toluene, 100 °C, 8 h; **c:** Me<sub>3</sub>Al (2 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq), THF, r.t., 12 h; **d:** Me<sub>2</sub>NH in THF (2 eq.), propan-2-ol/EtOH 1:1, r.t., 24 h; **e:** NH<sub>3</sub> (aq.), dioxane, 120 °C, 12 h; **f:** MeONa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **g:** MeSNa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **h:** 1M MeONa in MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

**Scheme 17** Synthesis of 4-substituted thienopyrrolopyrimidine nucleosides **65**, **66**

**Table 8** Synthesis of 4-substituted thienopyrrolopyrimidine nucleosides **65**, **66**

Entry	Conditions	R	Protected product	Yield [%]	Unprotected product	Yield [%]
1	<b>a</b>	2-furyl	<b>65a</b>	67	<b>66a</b>	68
2	<b>b</b>	3-furyl	<b>65b</b>	82	<b>66b</b>	83
3	<b>b</b>	2-benzofuryl	<b>65e</b>	83	<b>66e</b>	86
4	<b>c</b>	Me	<b>65h</b>	-	<b>66h</b>	70
5	<b>d</b>	Me <sub>2</sub> N	<b>65i</b>	85	<b>66i</b>	88
6	<b>e</b>	NH <sub>2</sub>	-	-	<b>66j</b>	78
7	<b>f</b>	MeO	-	-	<b>66k</b>	65
8	<b>g</b>	MeS	-	-	<b>66l</b>	90

### 3.4 Biological activities of thienopyrrolopyrimidine nucleosides

All the title nucleosides are tested for cytostatic, antiviral and antimicrobial activities. Antiviral screening against hepatitis C virus (HCV) and respiratory syncytial virus (RSV) was done at Gilead Sciences. Compounds were also submitted to antiviral screening against dengue, influenza, coxsackie and herpes simplex viruses to the group of Dr. Weber at IOCB, for screening of cytostatic and antimicrobial activities to Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc.

Only results of screenings on HCV and RSV viruses are available at the moment, other studies are still in progress. All tested thieno-fused nucleosides are inactive against RSV. 2-furyl, 3-furyl and dimethylamino derivatives **61a**, **66a**, **61b**, **66b**, **61i**, **66i** were also completely inactive against HCV. Whilst benzofuryl and amino derivatives **61e**, **66e**, **61j**, **66j** displayed only low activity against HCV; methyl, methoxy and methylsulfanyl nucleosides **61h**, **66h**, **61k**, **66k**, **66l**, **61l** from both series showed sub-micromolar activity against HCV, unfortunately accompanied by micromolar cytotoxicity. Nucleosides **66** are more active, but also more toxic. The most active compounds are both methyl derivatives **61h**, **66h**, derivative **61h** is four times less toxic.

**Table 12** Anti-HCV activities of thienopyrrolopyrimidine nucleosides.

Compound	HCV replicon 1B		HCV replicon 2A		MT4	
	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>61e</b>	2.1	19.59	13.92	26.55	57.14	13.69
<b>61h</b>	0.11	44.44	0.06	44.44	57.14	2.40
<b>61j</b>	5.02	17.17	13.48	16.39	57.14	9.64
<b>61k</b>	0.95	29.24	15.00	13.91	57.14	2.50
<b>61l</b>	0.47	44.44	0.34	44.44	57.14	2.40
<b>66e</b>	2.05	44.44	14.09	44.44	57.14	3.53
<b>66h</b>	0.06	44.44	0.24	44.44	57.14	0.51
<b>66j</b>	17.52	44.44	44.44	44.44	57.14	0.94
<b>66k</b>	0.23	44.44	0.40	44.44	57.14	0.31
<b>66l</b>	0.13	44.44	0.80	44.44	57.14	0.70

### 3.5 Fluorescence properties of target nucleosides

Annulated 7-deazapurine nucleosides can be interesting not just for their biological activities, but also from biochemical point of view. All these tricyclic bases are supposed to be fluorescent and their corresponding 2'-deoxynucleosides can be used for preparation of modified DNA and study of its fluorescence and thermal stability, which was inspired by the Saito's applications of the related 2'-deoxynucleosides as fluorescent probes.<sup>29,30,31</sup> Therefore we studied electronic spectra and photophysical properties of the title nucleosides. All the title nucleosides exhibited fluorescence with emission maxima from 427 to 485 nm and low quantum yields (0.02-0.13) in case of pyrimidoindole nucleosides bearing hetaryl group in

position 4. 4-Aminonucleosides and nucleosides bearing alkyl groups in position 4 have emission maxima in broader range from 341 to 467 nm and moderate quantum yields 0.07-0.36. 4-amino-6-(2-benzofuryl)nucleoside **43e** is the most fluorescent compound with quantum yield 0.36. Its deoxy analogue has a great potential to be used for enzymatic synthesis of modified DNA and study of fluorescence properties and stability of such modified DNA.

## 4 Conclusion

Syntheses of ribonucleosides with tricyclic bases (fused 7-deazapurines: pyrimido[4,5-*b*]indoles and thienopyrrolopyrimidines) were developed and compounds were tested for cytostatic and antiviral activities. Although C-H arylation approach to pyrimido[4,5-*b*]indoles was not successful, synthesis of these heterocycles was developed. Pyrimidoindoles were built-up part by part from simple commercially available chloronitrobenzenes, first step was nucleophilic substitution with ethyl-cyanoacetate followed by reduction of nitro group and spontaneous cyclization to indole derivatives, pyrimidoindole motif was then formed by cyclization with formamide. 4-Chloropyrimidoindoles were obtained in the last step by reaction with phosphorus oxychloride. The whole synthesis was optimized for 30 g scale. Key-intermediate ribonucleosides bearing additional chlorine atoms in positions 4 and 5 or 6 were prepared by Vorbrüggen glycosylation method. Hetaryl groups were introduced into position 4 of 4,6-dichloropyrimido[4,5-*b*]indole nucleoside by Stille or Suzuki coupling reactions using standard conditions. Final free nucleosides were obtained by Zemplén deprotection. Biological activity screening showed interesting submicromolar anti-dengue activities of 4-hetaryl-6-chloro nucleosides bearing 2-furyl, 2-thienyl and 2-benzofuryl groups in position 4. On the other hand, there was no cytostatic effect or anti-HCV activity of these nucleosides with one exception; 2-furyl derivative displayed micromolar activity against THP-1 and HepG2 cell lines.

Since chlorine atom in position 6 is far less reactive than chlorine in position 4 and stayed untouched under standard cross-coupling conditions, I found effective catalyst-ligand system (palladium acetate and X-Phos ligand) for coupling in position 6 and prepared small series of 4,6-bis(hetaryl)nucleosides, which were completely inactive in all biological assays.

A series of pyrimidoindole nucleosides substituted only in position 4 was synthesized by nucleophilic substitution with ammonia or amines, alkyl groups were introduced into

position 4 by palladium catalyzed alkylation using trialkylaluminiums or by Negishi coupling and then deprotected by Zemplén procedure. There was no significant cytostatic and anti-dengue activity in this series, but 4-methylpyrimidoindole nucleoside **44a** showed submicromolar anti-HCV activity and no toxicity.

In next part of the project, benzo-fused analogues of tubercidin were synthesized by Suzuki or Stille cross-coupling reactions of 4-amino-6-chloro- or 4-amino-5-chloropyrimidoindole nucleosides employing previously optimized conditions (X-Phos ligand). The target 4-amino-5(6)hetarylpyrimidoindole nucleosides did not show any significant cytotoxic or antiviral activity. The most active compound was the starting 4-amino-5-chloropyrimidoindole nucleoside with sub-micromolar activities against dengue and HCV, unfortunately these activities were accompanied by cytotoxicity.

In the last part of my project, synthesis of thieno-fused 7-deazapurine nucleosides was developed. Tricyclic bases were synthesized by 3 step procedure from 4,6-dichloropyrimidine and iodothiophene, which were connected by Negishi coupling and after introduction of azido group into position 4 on pyrimidine ring, tricyclic motif was formed by thermal cyclization or photocyclization of tetrazole. Tricyclic bases were successfully glycosylated to key-intermediate 4-chlorothienopyrrolopyrimidine ribonucleosides. Two series of nucleosides with isomeric bases were synthesized by Suzuki or Stille coupling in case of hetaryl derivatives, methyl group was introduced into position 4 by palladium catalyzed alkylation. Amino, dimethylamino, methoxy and methylsulfanyl derivatives of unprotected nucleosides were obtained from the reaction of the chlorothieno-pyrrolopyrimidine nucleosides with corresponding nucleophiles. Biological activity screening of thieno-fused nucleosides is still in progress, only results of anti-HCV screening are available. 2-Furyl, 3-furyl and dimethylamino derivatives are completely inactive against HCV. Whilst benzofuryl and amino derivatives showed only low activity against HCV, methyl, methoxy and methylsulfanyl derivatives from both series showed sub-micromolar activity against HCV, unfortunately accompanied by micromolar cytotoxicity. The most active compounds are both methyl derivatives.

Anti-dengue activities of some pyrimidoindole nucleosides and anti-HCV activities of thienopyrrolopyrimidine nucleosides confirm the potential of nucleosides with fused 7-deazapurine bases to have an interesting biological activities and study of such types of nucleosides will continue in the Hocek group.

# 1 Úvod

Téma mé práce vychází z dlouhodobého výzkumu biologických aktivit purinových nukleosidů ve skupině Prof. Hocka na ÚOCHB. Na začátku byl objev mikromolárních cytostatických aktivit 6-fenylpurinových ribonukleosidů v roce 2000.<sup>1</sup> V následujících letech bylo připraveno množství různě modifikovaných purinových nukleosidů a bylo zjištěno, že všechny modifikace na cukerné části (5'-deoxy, 3'-deoxy, 2'-deoxypurinové nukleosidy a 9-(2,3-dihydroxypropyl) acyklická analogá nukleosidů) vedou k téměř nebo úplně neaktivním derivátům.<sup>2,3,4</sup> Podobně L-nukleosidy, enantiomery přírodních D-nukleosidů, byly zcela neaktivní. Dále také všechny vyzkoušené modifikace v polohách 2 a 8 na purinové části vedly k neaktivním sloučeninám.<sup>5,6</sup> Další možnou modifikací purinu je příprava deazapurinových analogů. Zatímco 3-deaza analogy byly zcela neaktivní,<sup>7</sup> u 1-deazapurinových nukleosidů zůstala cytotoxická aktivita zachována, nicméně byla nižší než u původních purinových nukleosidů.<sup>8</sup> Ovšem 7-deazapurinové analogy nesoucí thiofen nebo furan v pozici 6 a zároveň vodík nebo fluor v pozici 7 se ukázaly jako nanomolární cytostatika působící proti několika nádorovým liniím.<sup>9</sup> Další skupinou nanomolárních cytostatik jsou 6-amino-7-hetaryl-7-deazapurinové ribonukleosidy, deriváty odvozené od tubercidinu. Nejaktivnějšími sloučeninami v této sérii byly 7-deazaadenosiny nesoucí 2- a 3-thienyl nebo 2- a 3-furyl v poloze 7.<sup>10</sup> Tyto studie vedly k návrhu nových, prodloužených deazapurinových derivátů s dalším arylovým (pyrimido[4,5-*b*]indoly) nebo heteroarylovým (thienopyrrolopyrimidiny) kruhem přikondenzovaným k deazapurinu v polohách 7 a 8. Vlastní pyrimidoindolové báze jsou známé pro svoje různé biologické aktivity,<sup>11</sup> jejich ribonukleosidy však nebyly nikdy připraveny. Jejich příprava a studium potenciálních cytostatických a protivirových aktivit je cílem této práce.

## 2 Cíle práce

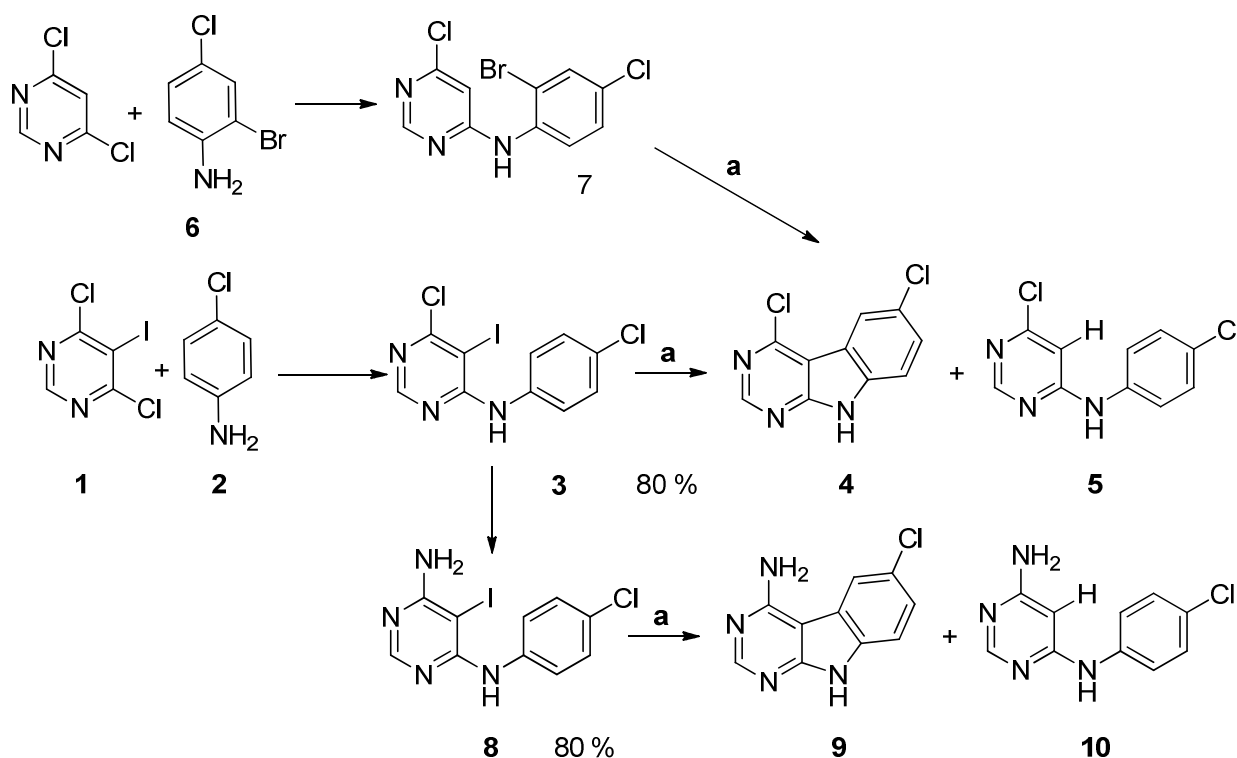
- 1) Vývoj multigramových syntéz pyrimido[4,5-*b*]indolů nesoucích halogenové atomy v polohách 4, 5 a 6 a příprava od nich odvozených ribonukleosidů.
- 2) Syntéza 4-(het)aryl-6-chloropyrimido[4,5-*b*]indolových a 4,6-bis(het)arylpyrimido[4,5-*b*]indolových nukleosidů a také nukleosidů nesoucích alkylové, (hetero)arylové a aminové skupiny v poloze 4.
- 3) Příprava 4-aminopyrimido[4,5-*b*]indolových nukleosidů nesoucích (hetero)arylové skupiny v polohách 5 nebo 6.
- 4) Syntéza thienopyrrolopyrimidinových ribonukleosidů substituovaných v poloze 4.

## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Pyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleosidy

#### 3.1.1 Syntéza pyrimido[4,5-*b*]indolových bází

Pro dosažení prvního cíle, syntézy pyrimidoindolových bází, bylo nejprve nutné vyvinout syntézu, která by umožnila přípravu multigramových množství těchto heterocyklů. Existuje několik možností syntézy pyrimidoindolů, např. fotocyklizace tetrazolů,<sup>12</sup> dehydrogenace odpovídajících 5,6,7,8-tetrahydropyrimidoindolů pomocí DDQ nebo palladia,<sup>13</sup> postupné heterocyklizace vycházející z *o*-chlornitrobenzenů nebo intramolekulární C-H arylace.<sup>14</sup> Nejprve jsem zkusil syntézu založenou na C-H arylaci. Potřebné halogenované meziprodukty byly získány pomocí publikovaných postupů z 4,6-dichlorpyrimidinu a 4-chloranilinu, případně 2-brom-4-chloranilinu. Bylo vyzkoušeno několik různých postupů popsanych v literatuře o úspěšných intramolekulárních C-H arylacích. Jako zdroje palladia byl použit octan palladnatý nebo Pd(OAc)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v kombinaci s fosfinovými ligandy (tricyklohexylfosfin, tri-*tert*-butylfosfin, tris(4-fluorfenyl)fosfin nebo tris(pentafluorfenyl)-fosfin) a několik bází, jako např. uhličitany cesný, draselný, octany sodný a draselný nebo *tert*-butoxidy sodný a draselný. V některých reakcích byla navíc použita aditiva jako jodid mědný, tetrabutylamonium bromid a zejména kyselina pivalová. Pivalát slouží jako přenašeč protonu při "concerted metalation-deprotonation" (CMD) mechanismu, kterým většina C-H arylací probíhá.<sup>15,16</sup> Většina reakcí byla provedena v DMF při teplotách 80-150 °C. Bohužel, výsledky byly neuspokojivé, reakce neprobíhala buď vůbec, nebo došlo k rozkladu výchozí látky, případně k dehalogenaci. Pouze ve dvou případech byl výsledek částečně pozitivní, a to při reakcích vycházejících z *N*-4-chlorfenyl-6-amino-5-jodpyrimidin-4-aminu. V první byl použit pouze octan palladnatý bez ligandu a s přidavkem tetrabutylamonium bromidu při 150 °C v DMF. Cílový pyrimidoindol byl získán v pouze 10% výtěžku, zbytek byl dejodovaný produkt. Druhý úspěšný pokus byl při použití octanu palladnatého v kombinaci s tris(*p*-fluorfenyl)fosfinovým ligandem, uhličitánem draselným a 30 % kyseliny pivalové. Z této reakce bylo také získáno 10 % produktu, ovšem zbytek byla pouze rozložená výchozí látka.

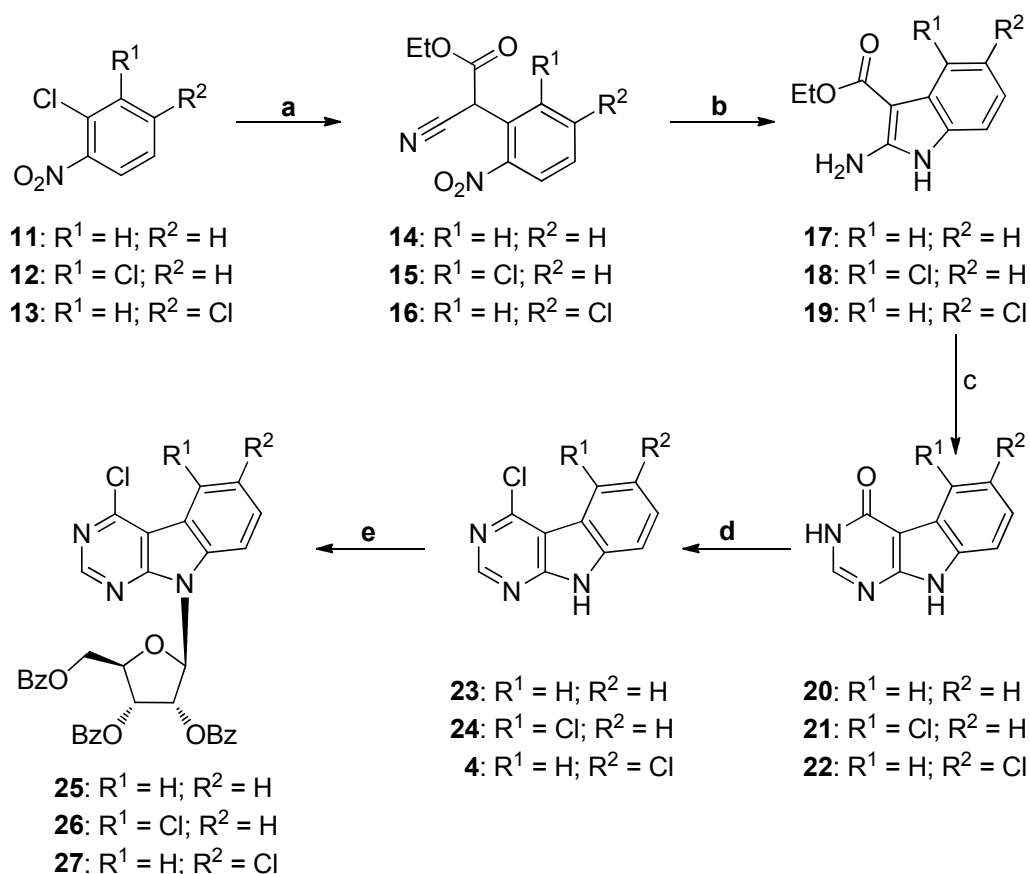


a: Pd(OAc)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 %; báze, additivum; DMF, 18 h.

**Schéma 1** Pokusy o intramolekulární C-H arylaci

Protože všechny pokusy o intramolekulární C-H arylaci byly neúspěšné, zaměřil jsem se na syntézu založenou na heterocyklizačních reakcích, která vychází z komerčně snadno dostupných *o*-chlornitrobenzenů. První krok, nukleofilní aromatická substituce chloru v poloze 2 aniontem ethylkyanoacetátu vedla k ethyl2-(2-nitrofenyl)kyanoacetátům **14-16**. Jejich následná redukce zinkem v kyselině octové a spontánní cyklizace poskytla deriváty indolu **17-19**. V dalším kroku již byl cyklizací s formamidem při 190 °C vytvořen pyrimidoindolový motiv. Cílové chlorpyrimido[4,5-*b*]indoly **23, 24** a **4** byly získány reakcí pyrimidoindolonů **20-22** s POCl<sub>3</sub> za refluxu. Celá syntéza byla optimalizována pro 30 gramové měřítko bez nutnosti chromatografické separace a s vynikajícím 50% výtěžkem po 4 krocích (Schéma 2).





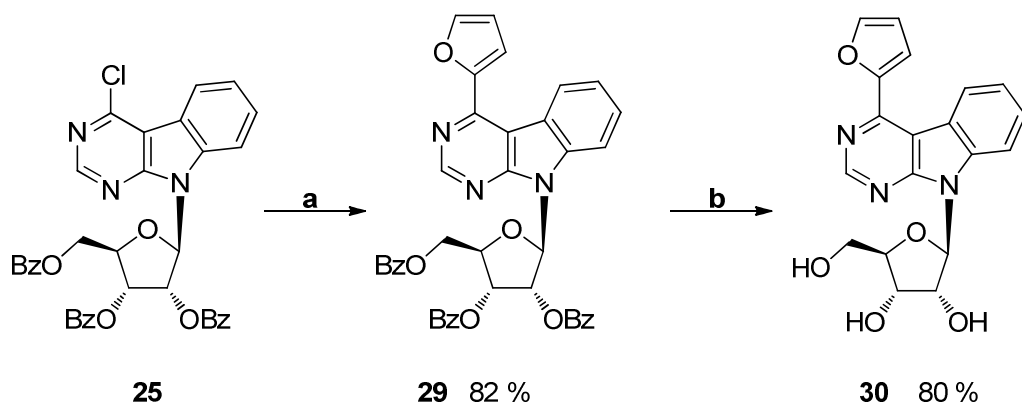
**a:** CNCH<sub>2</sub>COOEt, *t*-BuOK, THF, reflux, 48 h; **b:** Zn, AcOH, 55 °C, 150 min;  
**c:** formamid, 190 °C, 12 h; **d:** POCl<sub>3</sub>, reflux, 4 h;  
**e:** 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosa, BSA, TMSOTf, 60 °C, 8 h.

### Schéma 2 Syntéza pyrimidoindolových bází **23,24,4** a chráněných nukleosidů **25-27**

Chráněné chlorované ribonukleosidy **25-27** (Schéma 2) byly připraveny v 50% výtěžcích jako klíčové meziproducty pomocí Vorbrüggenovy glykosylační metody, která byla předtím úspěšně použita pro glykosylaci 7-deazapurinů.<sup>9</sup> Nukleosidy **25-27** byly následně použity pro syntézu všech cílových pyrimidoindolových derivátů.

#### 3.1.2 Syntéza 4-(het)aryl-6-chlorpyrimido[4,5-*b*]indolových nukleosidů

První připravená série cílových nukleosidů byly 4-(het)aryl-6-chlorpyrimidoindolové ribonukleosidy **32**. Nejprve však bylo nutné ověřit reaktivity atomu chlóru v poloze 4 na 4-chlor-9*H*-pyrimido[4,5-*b*]indolovém nukleosidu **25**. Stilleho reakce s tributyl-2-furylstannanem za standardních podmínek,<sup>9</sup> tedy katalýzy pomocí PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v dimethylformamidu při 100 °C, poskytla žádaný produkt **29** ve výborném výtěžku 82 %. Po odchránění Zemplénovou metodou pomocí methoxidu sodného v methanolu byl získán cílový nukleosid **30** ve výtěžku 80 % (Schéma 3).

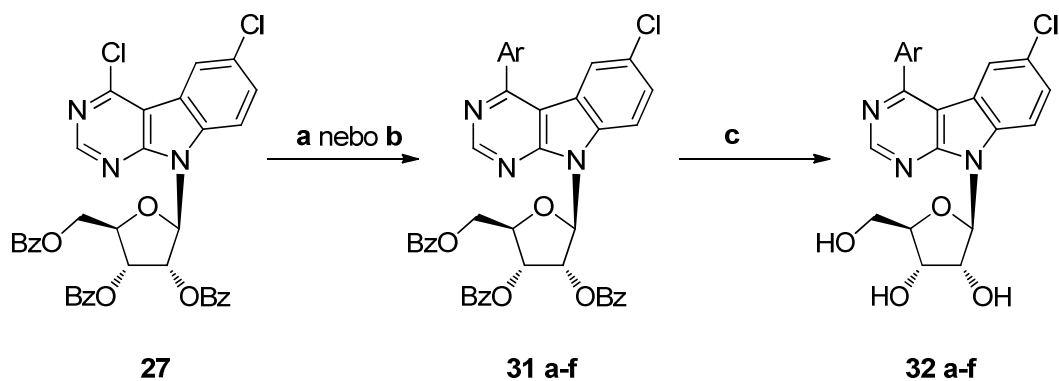


**a:** (furan-2-yl)SnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.); PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.05 eq.), DMF, 100 °C, 8 h;

**b:** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

### Schéma 3 Syntéza 4-(2-furyl)pyrimidoindolového nukleosidu **30**

Atom chloru v poloze 4 by teoreticky měl být mnohem reaktivnější díky elektronově chudému charakteru pyrimidinového jádra, proto jsem vyzkoušel Suzukiho a Stilleho reakce za použití standardních metod pro tyto reakce, tedy PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> v DMF při 100 °C pro Stilleho reakci a Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> s K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v toluenu při 100 °C pro Suzukiho reakci. Všechny reakce proběhly hladce a s plnou regioselektivitou, v reakční směsi nebyla pozorována ani stopa 6-substituovaných produktů. Kýžené 4-(het)aryl-6-chlorpyrimidoindolové nukleosidy **31a-f** (Schéma 4) byly izolovány v dobrých výtěžcích (64 - 79 %) (Tab. 1). Odstranění benzoylových skupin Zemplénovou metodou poskytlo sérii volných nukleosidů **32a-f** ve vysokých výtěžcích (78-91 %).



**a)** ArB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.); Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.), toluen, 100 °C, 8h;

**b)** ArSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.); PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.05 eq.), DMF, 100 °C, 8 h;

**c)** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

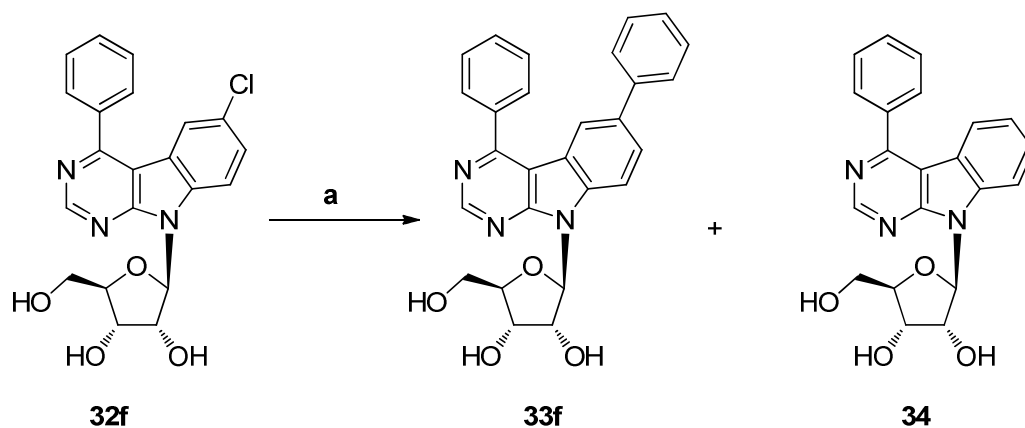
### Schéma 4 Syntéza 4-(het)arylpyrimidoindolových nukleosidů **32a-f**

**Tabulka 1** Cross-couplingové reakce nukleosidu **27** následované štěpením chránicích skupin

Pokus	Ar	M	Chráněný produkt	Výtěžek [%]	Volný nukleosid	Výtěžek [%]
1	2-furyl	SnBu <sub>3</sub>	<b>31a</b>	79	<b>32a</b>	86
2	3-furyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31b</b>	69	<b>32b</b>	91
3	2-thienyl	SnBu <sub>3</sub>	<b>31c</b>	78	<b>32c</b>	93
4	3-thienyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31d</b>	70	<b>32d</b>	86
5	2-benzofuryl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31e</b>	64	<b>32e</b>	78
6	fenyl	B(OH) <sub>2</sub>	<b>31f</b>	72	<b>32f</b>	89

### 3.1.3 Syntéza 4,6-disubstituovaných pyrimidoindolových nukleosidů

K dosažení dalšího cíle, přípravy 4,6-disubstituovaných derivátů, bylo nutné nejprve najít vhodné podmínky pro cross-couplingovou reakci s málo reaktivním chlorem v poloze 6. V literatuře jsou popsány úspěšné Suzukiho reakce ve vodném prostředí,<sup>18</sup> proto je možné vyjít z chráněných nebo volných, ve vodném prostředí rozpustných nukleosidů. Nejprve jsem se pokusil najít vhodné podmínky pro Suzukiho reakci volného nukleosidu **32f** s fenylboronovou kyselinou, zkusil jsem několik různých katalytických systémů včetně ve vodě rozpustných ligandů nebo Buchwaldových fosfinových ligandů. Zatímco reakce s ligandem TPPTS nefungovala vůbec, pokusy s ligandem CataXCium F ve směsi butanolu a vody stejně jako reakce s Buchwaldovými ligandy (DavePhos, S-Phos a X-phos) v dimethylformamidu poskytly kýžený produkt (Schéma 5, Tab. 2). Bohužel, žádná z reakcí neprobíhala s úplnou konverzí, což je s ohledem na obtížnou separaci produktu od výchozí látky činí prakticky nepoužitelnými pro syntézu větší série nukleosidů.



a) Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), ligand (0.1 eq.), fenylboronová kyselina (1.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), rozpouštědlo, 100 °C, 8h.

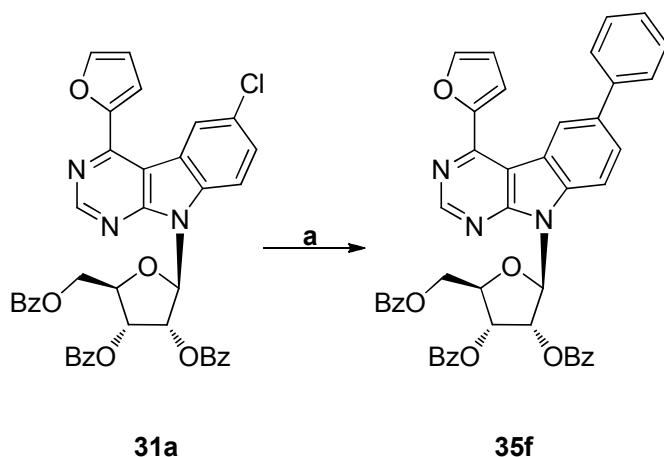
**Schéma 5** Suzukiho reakce volného nukleosidu **33f** s fenylboronovou kyselinou

**Tabulka 2** Optimalizace Suzukiho reakce volného nukleosidu **33f** s fenylboronovou kyselinou

Pokus	Ligand	Rozpouštědlo	Konverze <sup>a</sup>
1	CataXCium F	<i>n</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O, 2.5:1	60 <sup>b</sup>
2	TPPTS	MeCN/H <sub>2</sub> O, 2:1	0
3	S-Phos	DMF	30
4	DavePhos	DMF	20
5	X-Phos	MeCN/H <sub>2</sub> O, 2:1	35
6	X-Phos	DMF	60

<sup>a</sup> Stanoveno pomocí NMR ze surové reakční směsi; <sup>b</sup> Reakční směs obsahovala směs látek **34** a **33f** v poměru 0.7:1.

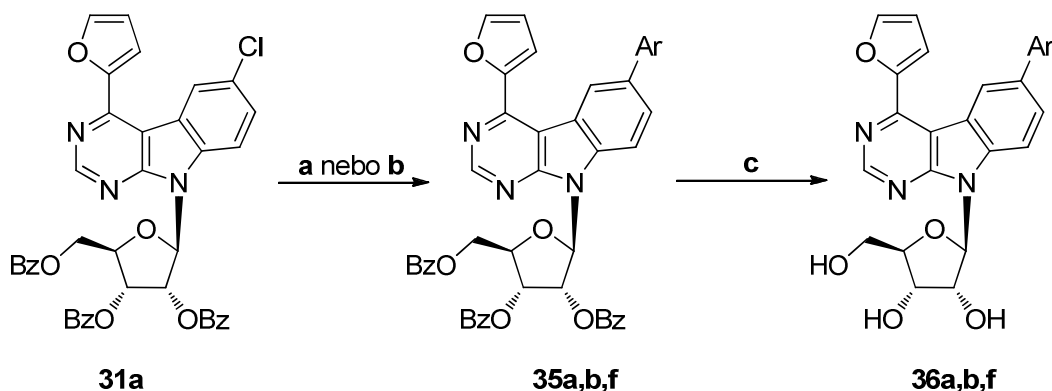
Proto jsem se zaměřil na chráněný nukleosid **31a** a klasické provedení couplingové reakce v organickém rozpouštědle. Znovu jsem otestoval tři Buchwaldovy ligandy (Schéma 6) v DMF, a zatímco konverze při použití DavePhosu a S-Phosu byly stále neuspokojivé (20 % a 40 %), reakce za použití X-Phosu proběhla během 8 hodin kvantitativně a poskytla kýžený produkt **35f**.



**a:** Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), ligand (0.1 eq.), fenyloboronová kyselina (1.5 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 100 °C, 8h.

### Schéma 6 Syntéza 6-fenylpyrimidoindolového nukleosidu **35f**

S takto optimalizovanou metodou pak byla připravena série tří nukleosidů (Schéma 7). Reakce s fenyloboronovou kyselinou vedla k žádanému produktu **35f**, který byl izolován ve výtěžku 64 %. K dosažení podobného výtěžku s méně stabilní<sup>19</sup> 3-furylboronovou kyselinou však bylo nutné přidávat boronovou kyselinu do reakční směsi po částech. Na druhou stranu postupné přidávání fenyloboronové kyseliny výtěžek reakce nijak nezlepšilo (Tab. 3). Stejná kombinace katalyzátoru a ligandu byla použita i pro Stilleho reakci s 2-furyltributylstannanem a poskytla žádanou sloučeninu **35a** v 79% výtěžku. Ze všech chráněných nukleosidů **35 a,b,f** byly následně odštěpeny benzoylové skupiny, což vedlo k volným nukleosidům **36 a,b,f** izolovaným v dobrých výtěžcích (Tab. 3, Schéma 7).



**a)** ArB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.): Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 95 °C, 3h;  
**b)** ArSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.): Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 95 °C, 3 h;  
**c)** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq.), MeOH, r.t., 24 h.

### Schéma 7 Syntéza 4,6-disubstituovaných pyrimidoindolových nukleosidů **36**

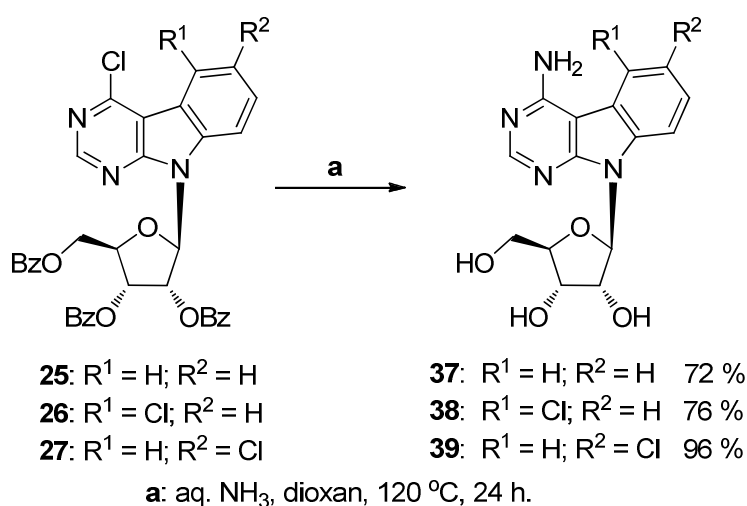
**Tabulka 3** Syntéza 4,6-disubstituovaných pyrimidoindolových nukleosidů **36**

Pokus	Ar	Podmínky	Chráněný produkt	Výtěžek [%]	Volný nukleosid	Výtěžek [%]
1	3-furyl	a	<b>35b</b>	46	<b>36b</b>	90
2 <sup>a</sup>	3-furyl	a	<b>35b</b>	75		
3	fenyl	a	<b>35f</b>	62	<b>36f</b>	81
4 <sup>a</sup>	fenyl	a	<b>35f</b>	64		
5	2-furyl	b	<b>35a</b>	79	<b>36a</b>	89

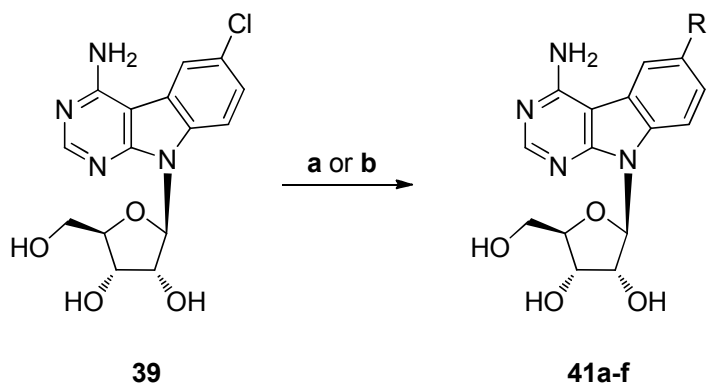
<sup>a</sup>Boronová kyselina byla do reakce přidávána ve třech částech v průběhu 2 hodin.

### 3.1.4 Syntéza 4-amino-6-hetaryl pyrimidoindolových nukleosidů

Nejprve byla optimalizována syntéza 4-aminopyrimidoindolových nukleosidů **37-39**, které byly připraveny aminací chráněných chlornukleosidů **25-27** vodným roztokem amoniaku v dioxanu ve vysokých výtěžcích (Schéma 8).

**Schéma 8** Syntéza 4-aminopyrimidoindolových nukleosidů

Znovu bylo vyzkoušeno několik různých katalytických systémů pro cross-couplingovou reakci s nereaktivním chlorem v poloze 6. Nejlépe se osvědčil znovu ligand X-Phos v dimethylformamidu, proto byl použit pro syntézu cílových 4-amino-6-hetarylpyrimidoindolových nukleosidů v dobrých výtěžcích (Schéma 9). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.



**a:** RB(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 eq.), DMF, 100 °C, 12 h;  
**b:** RSnBu<sub>3</sub> (1.2 eq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 12 h.

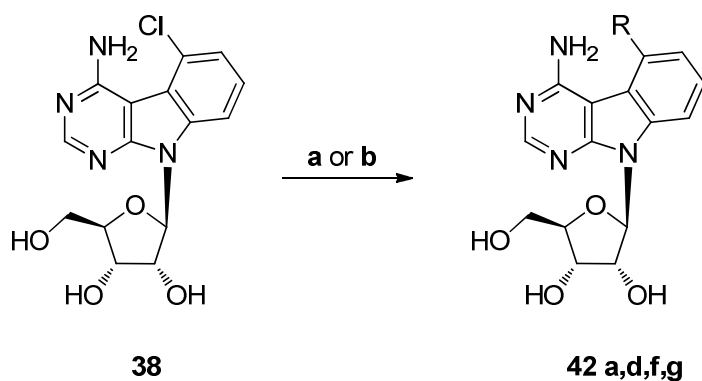
**Schéma 9** Syntéza 4-amino-6-hetarylpyrimidoindolových nukleosidů **41**

**Tabulka 4** Výtěžky 4-amino-6-hetarylpyrimidoindolových nukleosidů

Sloučenina	Reagent	R-	Výtěžek [%]
<b>41a</b>	Fenylboronová kys.	fenyl	93
<b>41b</b>	(furan-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	2-furyl	68
<b>41c</b>	(furan-3-yl)B(OH) <sub>2</sub>	3-furyl	72
<b>41d</b>	(thiofen-2-yl)SnBu <sub>3</sub>	2-thienyl	73
<b>41e</b>	(thiofen-3-yl)B(OH) <sub>2</sub>	3-thienyl	77
<b>41f</b>	(benzofuran-2-yl)B(OH) <sub>2</sub>	2-benzofuryl	75

### 3.1.5 Syntéza 4-amino-5-substituovaných pyrimidoindolových nukleosidů

Dříve optimalizovaná metoda byla použita také pro syntézu 4-amino-5-hetarylpyrimidoindolových nukleosidů **42**, ovšem výtěžky Suzukiho reakcí byly výrazně nižší a při Stilleho reakci byl dokonce izolován produkt přenosu butylové skupiny namísto hetarylové. Přesto se podařilo připravit dostatečná množství cílových nukleosidů **44** pro jejich charakterizaci a testování biologických aktivit. Výrazně nižší reaktivita 5-chlor derivátu **38** ve srovnání s 6-chlor analogem **39** je pravděpodobně způsobena sterickým bráněním atomu chloru v poloze 5 amino skupinou v poloze 4.



**a:**  $\text{RB(OH)}_2$  (1.5 eq.),  $\text{Pd(OAc)}_2$  (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3 eq.), DMF, 100 °C, 12 h;  
**b:**  $\text{RSnBu}_3$  (1.2 eq.),  $\text{Pd(OAc)}_2$  (0.05 eq.), X-Phos (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 12 h.

**Schéma 10** Syntéza 4-amino-5-substituovaných nukleosidů **42**

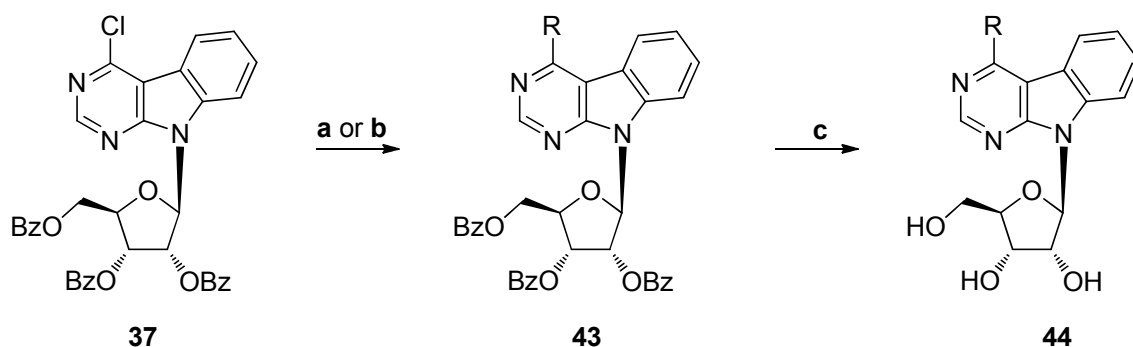
**Tabulka 5** Výtěžky 4-amino-5-substituovaných pyrimidoindolových nukleosidů **42**

Pokus	Slouč.	Reagent	R	Výtěžek [%]
1	<b>42a</b>	Fenylboronová kys.	fenyl	28
2	<b>42b</b>	$(\text{furan-2-yl})\text{SnBu}_3$	2-furyl	33
	<b>42g</b>		butyl	34
3	<b>42g</b>	$(\text{thiofen-2-yl})\text{SnBu}_3$	butyl	42
4	<b>42d</b>	$(\text{thiofen-3-yl})\text{B(OH)}_2$	3-thienyl	24

### 3.1.6 Pyrimidoindolové nukleosidy substituované v poloze 4

K prozkoumání vlivu amino skupiny v poloze 4 na biologickou aktivitu pyrimidoindolových nukleosidů byla připravena série sloučenin substituovaných v poloze 4. Methyl **43a**, ethyl **43b** a cyklopropyl **43c** deriváty byly připraveny pomocí palladiem katalyzovaných reakcí s trialkylhlinitky nebo Negishiho reakcí s příslušnou organozinečnatou sloučeninou za standardních podmínek v přítomnosti  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  v tetrahydrofuranu při 70 °C (Schéma 11, Tab. 6).<sup>32</sup> *N,N*-Dimethylamino derivát **43d** byl získán z 4-chlorpyrimidoindolového nukleosidu **25** nukleofilní substitucí dimethylaminem za laboratorní teploty v 74% výtěžku. Následné odstranění chránicích skupin vedlo k cílovým nukleosidům **44** v dobrých výtěžcích (88-92 %, Schéma 11).





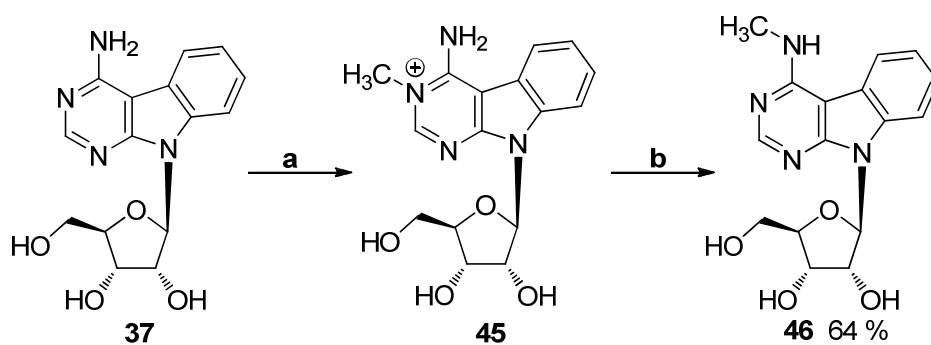
**a:** reagent (2 eq., viz Tab. 6), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq), THF, r.t.; **b:** Me<sub>2</sub>NH v THF (2 eq.), propan-2-ol, r.t., 24 h; **c:** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

**Schéma 11** Syntéza pyrimidoindolových nukleosidů substituovaných v poloze 4

**Tabulka 6** Výtěžky produktů substituovaných v poloze 4

Pokus	Reagent	R	Chráněný produkt	Výtěžek [%]	Volný nukleosid	Výtěžek [%]
1	Me <sub>3</sub> Al	Me	<b>43a</b>	63	<b>44a</b>	92
2	Et <sub>3</sub> Al	Et	<b>43b</b>	76	<b>44b</b>	85
3	cyklopropyl-ZnCl	cyklopropyl	<b>43c</b>	63	<b>44c</b>	89
4	Me <sub>2</sub> NH	Me <sub>2</sub> N	<b>43d</b>	74	<b>44d</b>	88

Nukleofilní substituce s methylaminem překvapivě nefungovala vůbec, ani při použití 10 násobného přebytku aminu při 50 °C v uzavřené baňce. Proto byl kýžený *N*-methylamino derivát **46** připraven podle 40 let starého postupu aplikovaného na purinový nukleosid (Schéma 12).<sup>33</sup>



**a:** MeI (2 eq), DMA, r.t., 24 h; **b:** 1M NaOH, 100 °C, 1.5 h.

**Schéma 12** Syntéza 4-*N*-methylaminopyrimidoindolového nukleosidu **46**

### 3.2 Biologické aktivity pyrimidoindolových nukleosidů

Všechny připravené nukleosidy byly testovány na *in vitro* cytotoxickou (lidská T-lymfoblastická leukemie CCRF-CEM, promyelocytická leukemie HL-60 a cervikální

karcinom HeLa S3) a protivirovou aktivitu proti HCV a dengue viru. Cytotoxické aktivity byly testovány na ÚOCHB ve skupině Dr. Heleny Mertlíkové-Kaiserové, anti-HCV aktivity byly testovány ve farmaceutické firmě Gilead Sciences v Kalifornii a aktivity proti dengue viru v Singapuru v Novartis Institute for Tropical Diseases (NITD) nebo ve skupině Dr. Webera na ÚOCHB.

### 3.2.1 Biologické aktivity 4-hetaryl-6-chlor a 4,6-bis(hetaryl)pyrimidoindolových nukleosidů

Žádný z těchto nukleosidů nevykázal žádný výraznější cytostatický/cytotoxický efekt nebo aktivitu proti viru HCV s výjimkou sloučeniny **32a**, která byla aktivní proti buněčným liniím THP-1 a HepG2 s  $CC_{50}$  1.565, respektive 0.175  $\mu\text{M}$ . Avšak tři sloučeniny ze série 4-hetaryl-6-chlorpyrimido[4,5-*b*]indolových nukleosidů nesoucích 2-furyl **32a**, 2-thienyl **32c** a 2-benzofuryl **32e** v poloze 4 ukázaly významný (submikromolární) efekt proti dengue viru (Tab. 7). Bohužel však byly pozorovány nedostatečné rozdíly mezi  $EC_{50}$  a  $CC_{50}$  ( $\times 10$ ) při testu na Huh-7 replikonu.

**Tabulka 7** Aktivity 4-hetaryl-6-chlorpyrimidoindolových nukleosidů proti dengue viru

Slouč.	Dg-reporter		Dg-replikon	
	K-562 $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	K-562 $CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Huh7 $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Huh7 $CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>32a</b>	0.01	4.12	0.49	3.60
<b>32b</b>	69.51	>100	>100	>100
<b>32c</b>	0.51	15.75	1.71	10.71
<b>32d</b>	41.77	>100	46.99	>100
<b>32e</b>	0.13	16.50	10.04	26.26
<b>32f</b>	27.56	51.34	15.63	20.10
<b>30</b>	>100	>100	61.77	>100
<b>36a</b>	3.51	18.43	18.69	31.09
<b>36b</b>	10.91	29.91	30.00	52.98
<b>36f</b>	3.46	7.36	7.53	11.1

### 3.2.2 Biologické aktivity 4-aminopyrimidoindolových nukleosidů

Také všechny cílové nukleosidy **37**, **38**, **39**, **41**, **42** a **45** byly testovány na *in vitro* cytotoxické aktivity na několika nádorových buněčných liniích (HL60, HeLa S3, CCRF-CEM a HepG2) ve skupině Dr. Heleny Mertlíkové-Kaiserové. Nukleosidy **37**, **38**, **39**, **41**, **42** a **45**

se v těchto testech ukázaly jako neaktivní. Výsledky testů na aktivity proti HCV genotypům 1A, 1B a 2A jsou shrnuty v tabulce 8. Několik nukleosidů bylo aktivních v mikromolárních koncentracích, ovšem zároveň byly také toxické pro MT-4 buňky. Nejaktivnější, ale zároveň také nejtoxičtější sloučeninou byl 4-amino-5-chlor derivát **38**. Naproti tomu 4-methylpyrimidoindolový derivát **44a** vykázal aktivitu nižší než 1  $\mu\text{M}$  a nebyl toxický v testovaných koncentracích ( $>44 \mu\text{M}$ ).

**Tabulka 8** Aktivity pyrimidoindolových nukleosidů substituovaných v poloze 4 proti HCV

Sloučenina	HCV replikon 1A		HCV replikon 1B		HCV replikon 2A	
	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
<b>38</b>	0.53	1.16	0.32	1.71	1.28	1.66
<b>39</b>	30.55	>44	11.05	>44	>44	>44
<b>41d</b>	10.03	18.10	8.75	>44	24.89	>44
<b>41e</b>	10.09	17.34	7.38	25.60	13.77	30.19
<b>41f</b>	6.13	14.47	4.83	28.0	8.77	18.00
<b>42g</b>	>44	>44	8.81	>44	>44	>44
<b>44d</b>	21.27	>44	7.07	>44	>44	>44
<b>44a</b>	0.56	>44	0.34	>44	>44	>44

Všechny připravené nukleosidy byly také otestovány na aktivity proti dengue viru na Vero buňkách. Testování bylo provedeno na ÚOCHB ve skupině Dr. Webera. Několik derivátů bylo aktivních v mikromolárních koncentracích, ovšem pouze benzofuryl derivát **41e** nebyl cytotoxický. Nejaktivnější sloučeninou byl 4-amino-5-chlorpyrimidoindolový nukleosid **38**, ovšem s nízkým indexem selektivity (SI, Tab. 16).

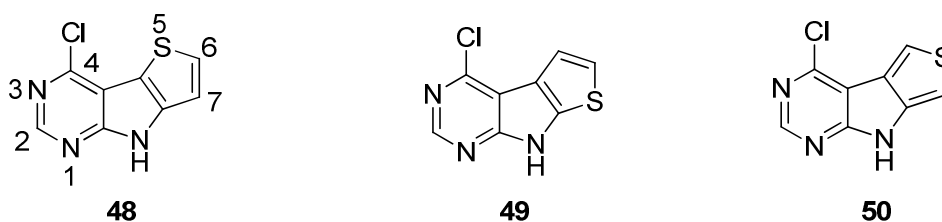
**Tabulka 9** Aktivity pyrimidoindolových nukleosidů proti dengue viru

Sloučenina	Vero buňky, DENV-2 ( $\mu\text{M}$ )		
	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	SI
<b>38</b>	43.5	39.6	0.9
<b>39</b>	0.85	1.14	1.3
<b>43d</b>	18.8	46.3	2.5
<b>44g</b>	14.8	62.9	4.3
<b>43e</b>	15.4	>100	>6.5
<b>40</b>	39.6	43.5	1.1

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že všechny pyrimido[4,5-*b*]indolové ribonukleosidy jsou méně cytotoxické než odpovídající 7-deazapurinové nukleosidy a nejsou tedy vhodnými potenciálními cytostatiky. Podobně mikromolární aktivita 4-amino-5-chlor- **38** a 4-methyl **44a** derivátů proti viru hepatitidy C není dostatečná pro další vývoj těchto látek. Na druhou stranu submikromolární aktivita tří sloučenin **31a**, **31c**, **31e** ze série 4-hetaryl-6-chlorpyrimidoindolových nukleosidů proti dengue viru je výrazně zajímavější, zejména proto, že stále chybí antivirotika proti dengue viru i vakcína proti horečce dengue.

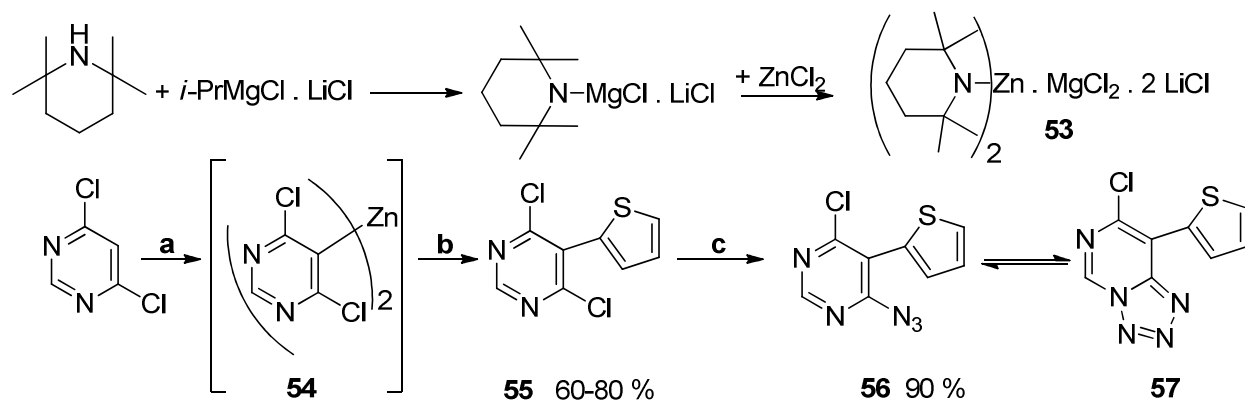
### 3.3 Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů

Další skupinou cílových sloučenin byly ribonukleosidy se 7-deazapurinovou bází anelovanou s thiofenem. Nás zajímaly dva ze tří možných izomerů, konkrétně 4-chlor-8*H*-thieno[2',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**48**), izomer s atomem síry v pozici 5 a 4-chlor-8*H*-thieno[3',2':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**49**), izomer s atomem síry v pozici 7 (Obr. 1).



**Obrázek 1** Struktury všech možných thienopyrrolopyrimidinů

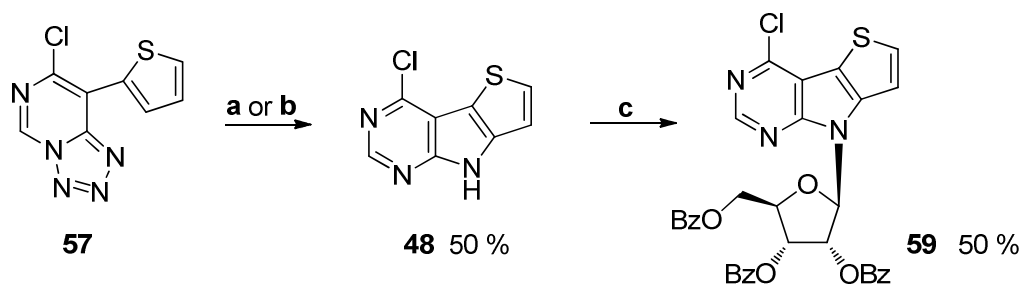
Protože atom jodu v poloze 5 pyrimidinového kruhu by měl být reaktivnější než atom chloru v aktivované poloze 4, zkusil jsem Stilleho reakci 4,6-dichlor-5-jodpyrimidinu (**1**) s 2-tributylstannylthiofenem. V reakční směsi však byl nalezen pouze disubstituovaný **51** a dokonce trisubstituovaný **52** produkt. Proto jsem se úspěšně pokusil spojit pyrimidinový a thiofenový kruh pomocí Negishiho reakce (Schéma 13). Azidová skupina byla následně zavedena do polohy 4 nukleofilní substitucí azidem sodným v DMF nebo THF a získaný azidový derivát, přítomný ve formě tetrazolu, byl termicky nebo fotochemicky cyklizován na kýženu tricycklickou bází **48**. Oba druhy cyklizací byly úspěšné, ovšem termická cyklizace je výrazně rychlejší a poskytuje uspokojivý 50% výtěžek.



**a:** (TMP)<sub>2</sub>Zn.MgCl<sub>2</sub>.2LiCl (0.55 eq.), THF, 0 °C, 1h, pak r.t., 1h; **b:** 2-iodthiofen (1.2 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 eq.), THF, 65 °C, 16h; **c:** NaN<sub>3</sub> (1 eq.), LiCl (1 eq.), DMF, r.t.,

**Schéma 13** Příprava organozinkového komplexu **53** a syntéza tetrazolu **57**

Pro úspěšnou glykosylaci thienopyrrolopyrimidinové báze **48** bylo nezbytné optimalizovat dříve použitý postup. Bylo nutné bázi **48** nejprve zahřát s BSA po dobu 30 minut na 60 °C a teprve potom přidat trimethylsilyltriflát a 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosu a pokračovat v zahřívání dalších 8 hodin. Tento postup vedl ke klíčovému meziprojektu, nukleosidu **59**, ve výborném 50% výtěžku (Schéma 14).



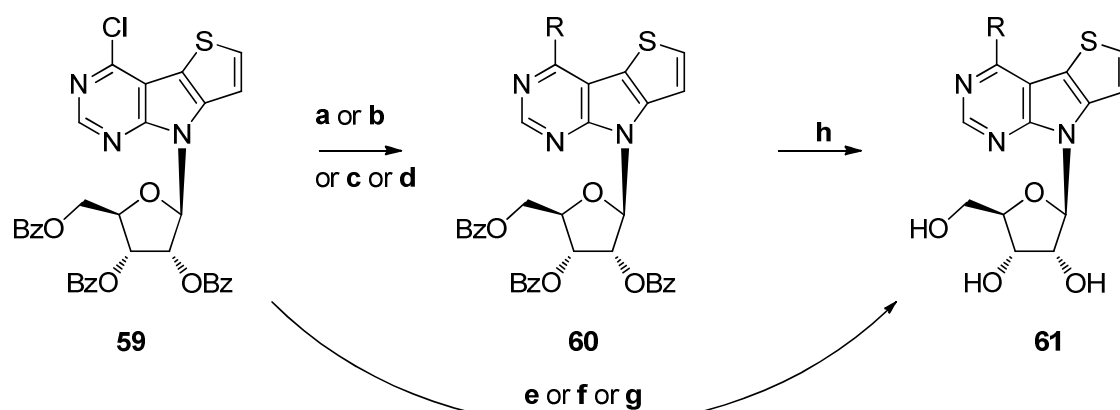
**a:** 1,4-dibrombenzen, 180 °C, 30 min; **b:** TFA, UV, r.t., 7 dní;  
**c:** BSA (1 eq.), MeCN, 60 °C, 30 min; pak 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-β-D-ribofuranosa (2 eq.), TMSOTf (2 eq.), 60 °C, 8 h.

**Schéma 14** Syntéza nukleosidu **51**

Protože thienopyrrolopyrimidinové nukleosidy nebyly nikdy popsány, rozhodli jsme se nejprve připravit sérii 8 nukleosidů substituovaných v poloze 4 pro studium biologických aktivit. Substituenty byly vybrány na základě předchozích výsledků získaných v naší skupině.<sup>25,26</sup> Furyl a benzofuryl stejně jako amino a methyl skupiny byly vybrány na základě biologických aktivit pyrimidoindolových nukleosidů nesoucích tyto substituenty, methoxy, methylsulfanyl a dimethylamino skupiny byly vybrány jako analoga cytostatických 7-hetaryl-7-deazapurinových ribonukleosidů nesoucích tyto skupiny v poloze 6.<sup>27</sup>

Cílové nukleosidy byly připraveny z 4-chlorthienopyrrolopyrimidinového nukleosidu **59** obdobnými postupy jako pyrimidoindolové nukleosidy **31** a **43**. 3-Furyl a 2-benzofuryl

deriváty **60b**, **60e** byly připraveny pomocí Suzukiho reakce za použití  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  a uhličitanu draselného v toluenu, 2-furyl derivát **60a** byl získán pomocí Stilleho reakce katalyzované  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  v dimethylformamidu a 4-methyl **60h** derivát byl připraven palladiem katalyzovanou alkylací trimethylhlíníkem. Dimethylamino derivát **60i** byl připraven nukleofilní substitucí dimethylaminem. Výťažky těchto chráněných nukleosidů jsou shrnuty v tabulce 10. Chránicí skupiny byly z těchto nukleosidů odštěpeny Zemplénovou metodou, což vedlo k cílovým volným nukleosidům v dobrých výtěžcích. Amino, methoxy a methylsulfanylové deriváty byly připraveny nukleofilní substitucí s vodným amoniakem, methoxidem sodným případně thiomethoxidem sodným v methanolu. Cukerná část molekuly byla během těchto reakcí zároveň zbavena chránících skupin a cílové nukleosidy **61** byly získány v dobrých výtěžcích (Tab. 10).



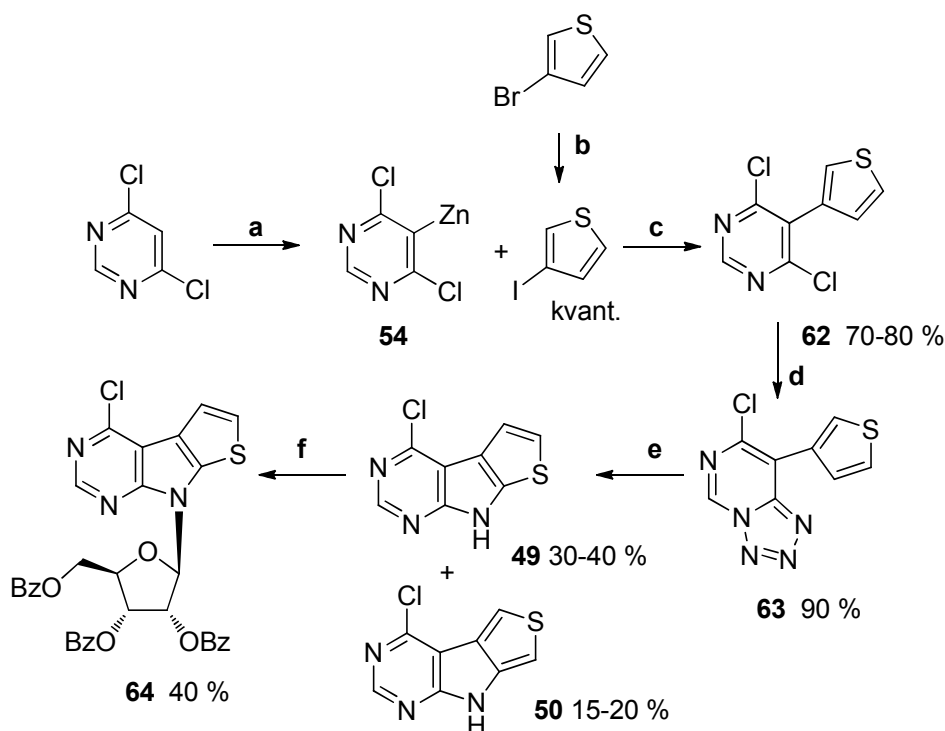
**a:** 2-tributylstannylfuran (1.2 eq.),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 8 h; **b:** R-B(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 eq.),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 eq.), toluen, 100 °C, 8 h; **c:**  $\text{Me}_3\text{Al}$  (2 eq.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.05 eq.), THF, r.t., 12 h; **d:**  $\text{Me}_2\text{NH}$  in THF (2 eq.), propan-2-ol/EtOH 1:1, r.t., 24 h; **e:**  $\text{NH}_3$  (aq.), dioxan, 120 °C, 12 h; **f:** MeONa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **g:** MeSNa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **h:** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

**Schéma 15** Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů substituovaných v poloze 4

**Tabulka 10** Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů substituovaných v poloze 4

Pokus	Podmínky	R	Chráněný produkt	Výtěžek [%]	Volný nukleosid	Výtěžek [%]
1	a	2-furyl	<b>60a</b>	84	<b>61a</b>	62
2	b	3-furyl	<b>60b</b>	82	<b>61b</b>	70
3	b	2-benzofuryl	<b>60e</b>	87	<b>61e</b>	68
4	c	Me	<b>60h</b>	87	<b>61h</b>	82
5	d	Me <sub>2</sub> N	<b>60i</b>	78	<b>61i</b>	49
6	e	NH <sub>2</sub>	-	-	<b>61j</b>	75
7	f	MeO	-	-	<b>61k</b>	78
8	g	MeS	-	-	<b>61l</b>	64

Dalším cílem bylo připravit sérii nukleosidů s izomerní 8*H*-thieno[3',2':4,5]-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinovou bází **49**. Pro syntézu jsem použil stejnou strategii jako pro přípravu báze **48**, pouze jsem 2-jodthiofen nahradil 3-jodthiofenem připraveným podle upraveného publikovaného postupu.<sup>28</sup> Negishiho reakce 3-jodthiofenu s pyrimidinem probíhala úspěšně se 70-80% výtěžkem. Tetrazol byl následně připraven reakcí s azidem sodným a poté cyklizován na tricyklickou bází **49**. Termická cyklizace vedla ke kýženému produktu **49** v pouze 10-15% výtěžku, který se nepodařilo zvýšit ani použitím jiných rozpouštědel. Výtěžek fotochemické cyklizace byl výrazně vyšší (45-70 %), ovšem vznikala směs obou možných izomerů **49** a **50** v poměru 2:1. Následná Vorbrüggenova glykosylace báze **49** analogickým postupem jako u báze **48** byla úspěšná a vedla k chlorovanému chráněnému nukleosidu **64** ve výtěžcích kolem 40 % (Schéma 16).

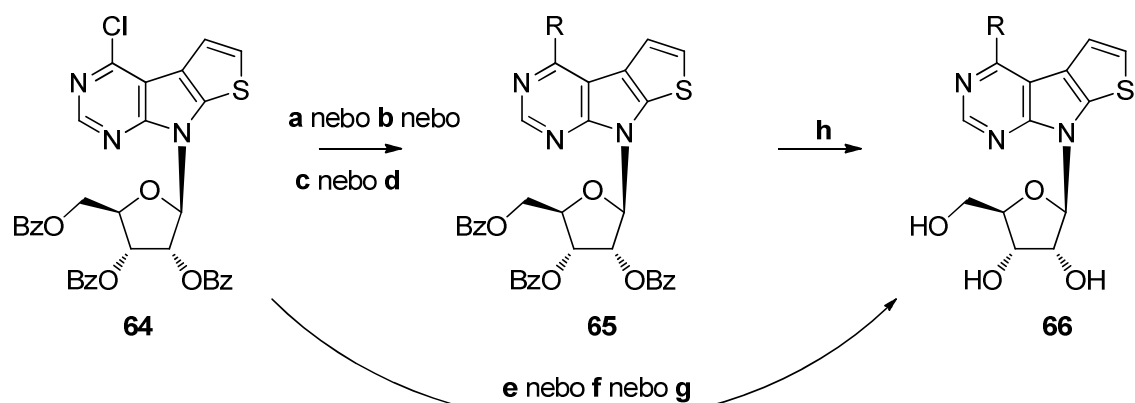


**a:**  $(\text{TMP})_2\text{Zn} \cdot \text{MgCl}_2 \cdot \text{LiCl}$ , 0 °C, 60 min, pak r.t., 45 min; **b:** NaI (2 eq.), CuI (0.05 eq.), *N,N*-dimethylethylenediamin (0.1 eq.), toluen/1,2-dimethoxyethan, refl., 2 dny; **c:**  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0.1 eq.), THF, 65 °C, 12 h, **d:**  $\text{NaN}_3$  (1 eq.), LiCl (1 eq.), THF, r.t., 2 dny; **e:** TFA, UV, r.t., 4 dny; **f:** BSA (1 eq.), MeCN, 60 °C, 30 min; pak 1-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranosa (2 eq.), TMSOTf (2 eq.), 60 °C, 8 h.

#### Schéma 16 Syntéza nukleosidu 64

Cílové nukleosidy **66** byly syntetizovány pomocí stejných postupů jako izomerní nukleosidy **61** (Tab. 11, Schéma 17). Hetarylové skupiny byly do molekuly zavedeny Suzukiho nebo Stilleho reakcí, methyl palladiem katalyzovanou alkylací a dimethylamino skupina nukleofilní substitucí s dimethylaminem. Všechny tyto reakce vedly k benzoylovaným substituovaným nukleosidům **65**, z nichž byly následně odstraněny chránicí skupiny Zemplénovou metodou, což vedlo k cílovým nukleosidům **66** v dobrých výtěžcích (Tab. 8). Nukleofilní substituce na benzoylovaném 4-chlorthienopyrrolopyrimidinovém nukleosidu **64** s amoniakem, methoxidem sodným a thiomethoxidem sodným vedly přímo k volným cílovým nukleosidům **66** (Tab. 11, Schéma 17).





**a:** 2-tributylstannylfuran (1.2 eq.), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.1 eq.), DMF, 100 °C, 8 h; **b:** R-B(OH)<sub>2</sub> (1.5 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq.), toluen, 100 °C, 8 h; **c:** Me<sub>3</sub>Al (2 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.05 eq.), THF, r.t., 12 h; **d:** Me<sub>2</sub>NH in THF (2 eq.), propan-2-ol/EtOH 1:1, r.t., 24 h; **e:** NH<sub>3</sub> (aq.), dioxan, 120 °C, 12 h; **f:** MeONa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **g:** MeSNa (1.3 eq.), MeOH, r.t., 12 h; **h:** 1M MeONa v MeOH (0.3 eq), MeOH, r.t., 24 h.

**Schema 17** Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů **65**, **66**

**Tabulka 11** Syntéza thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů **65**, **66**

Pokus	Podmínky	R	Chráněný produkt	Výtěžek [%]	Volný produkt	Výtěžek [%]
1	<b>a</b>	2-furyl	<b>65a</b>	67	<b>66a</b>	68
2	<b>b</b>	3-furyl	<b>65b</b>	82	<b>66b</b>	83
3	<b>b</b>	2-benzofuryl	<b>65e</b>	83	<b>66e</b>	86
4	<b>c</b>	Me	<b>65h</b>	-	<b>66h</b>	70
5	<b>d</b>	Me <sub>2</sub> N	<b>65i</b>	85	<b>66i</b>	88
6	<b>e</b>	NH <sub>2</sub>	-	-	<b>66j</b>	78
7	<b>f</b>	MeO	-	-	<b>66k</b>	65
8	<b>g</b>	MeS	-	-	<b>66l</b>	90

### 3.4 Biologické aktivity thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů

Všechny cílové nukleosidy jsou testovány na cytostatické, protivirové a antimikrobiální aktivity. Testování na aktivity proti HCV a RSV (respiratory syncytial virus) bylo provedeno ve firmě Gilead Sciences. Sloučeniny jsou také testovány na aktivity proti virům dengue, chřipky, coxsackie a herpes simplex viru ve skupině Dr. Webera na ÚOCHB, kde jsou také testovány cytostatické aktivity ve skupině Dr. Heleny Mertlíkové-Kaiserové. Rozšířené testování cytostatických aktivit stejně jako antimikrobiálních aktivit je prováděno na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Momentálně jsou dostupné pouze výsledky testování aktivit proti HCV a RSV. Všechny thienopyrrolopyrimidinové nukleosidy jsou zcela neaktivní proti RSV. 2-furyl-, 3-furyl- a dimethylamino- deriváty **61a**, **66a**, **61b**, **66b**, **61i**, **66i** jsou neaktivní i proti HCV. A zatímco benzofuryl a amino deriváty **61e**, **66e**, **61j**, **66j** ukázaly slabou aktivitu proti HCV, nukleosidy nesoucí v poloze 4 methyl, methoxy nebo methylsulfanylovou skupinu **61h**, **66h**, **61k**, **66k**, **66l**, **61l** jsou aktivní proti HCV v sub-mikromolárních koncentracích. Bohužel je však aktivita provázena také poměrně vysokou cytotoxicitou. Nukleosidy **66** jsou obecně aktivnější, ale také toxicitější. Nejaktivnějšími sloučeninami jsou oba methyl deriváty **61h**, **66h**, přičemž derivát **61h** je čtyřikrát méně toxický.

**Tabulka 12** Aktivity thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů proti HCV

Sloučenina	HCV replicon 1B		HCV replicon 2A		MT4	
	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>61e</b>	2.1	19.59	13.92	26.55	57.14	13.69
<b>61h</b>	0.11	44.44	0.06	44.44	57.14	2.40
<b>61j</b>	5.02	17.17	13.48	16.39	57.14	9.64
<b>61k</b>	0.95	29.24	15.00	13.91	57.14	2.50
<b>61l</b>	0.47	44.44	0.34	44.44	57.14	2.40
<b>66e</b>	2.05	44.44	14.09	44.44	57.14	3.53
<b>66h</b>	0.06	44.44	0.24	44.44	57.14	0.51
<b>66j</b>	17.52	44.44	44.44	44.44	57.14	0.94
<b>66k</b>	0.23	44.44	0.40	44.44	57.14	0.31
<b>66l</b>	0.13	44.44	0.80	44.44	57.14	0.70

### 3.5 Fluorescenční vlastnosti cílových nukleosidů

Anelované 7-deazapurinové nukleosidy mohou být zajímavé nejen pro své biologické aktivity, ale také z biochemického úhlu pohledu. Všechny tricyklické báze připravené v této práci by mohly být fluorescenční a od nich připravené 2'-deoxynukleosidy by mohly být použity pro přípravu modifikované DNA a studium její stability a fluorescence, což bylo inspirováno Saitovými aplikacemi pyrimidoindolových 2-deoxyribonukleosidů např. jako fluorescenčních sond.<sup>34,35,36</sup>

Proto jsme se rozhodli studovat fotochemické vlastnosti připravených nukleosidů. Prakticky všechny nukleosidy byly fluorescenční s emisními maximy v rozmezí 427-485 nm

a nízkými kvantovými výtěžky (0.02-0.13) v případě pyrimidoindolových nukleosidů nesoucích hetarylové skupiny v poloze 4. 4-aminopyrimidoindolové nukleosidy a nukleosidy nesoucí alkylové skupiny v poloze 4 mají emisní maxima v širším rozmezí (341-467 nm) a průměrné kvantové výtěžky (0.07-0.36). V případě thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů jsou deriváty nesoucí amino, methylsulfanyl a dimethylamino skupiny jen velice slabě fluorescenční, naopak deriváty nesoucí hetarylové skupiny ukazují silnější fluorescenci. Benzofurylové deriváty jsou ve všech sériích vždy nejvíce fluorescenční, derivát **66e** je látkou s nejvyšší fluorescencí s kvantovým výtěžkem 0.79.

## 4 Závěr

Byly vyvinuty syntézy ribonukleosidů obsahujících tricyklické báze (anelované 7-dezapuriny: pyrimido[4,5-*b*]indoly a thienopyrrolopyrimidiny) a všechny cílové sloučeniny byly otestovány na cytostatické a protivirové aktivity.

Přestože syntetický přístup k pyrimido[4,5-*b*]indolům založený na intramolekulární C-H arylaci selhal, tyto báze se podařilo připravit jinak. Pyrimidoindoly byly vystavěny po částech z komerčně dostupných chlornitrobenzenů. Prvním krokem byla nukleofilní substituce ethylkyanoacetátem následovaná redukcí nitro skupiny a spontánní cyklizací na indolové deriváty. Pak už byl reakcí s formamidem vytvořen cílový tricyklický motiv, jehož reakcí s POCl<sub>3</sub> byly získány 4-chlorpyrimidoindoly. Celou syntézu se podařilo optimalizovat ve 30 gramovém měřítku. Benzoylované pyrimidoindolové ribonukleosidy nesoucí atomy chloru v polohách 4 a 5 nebo 6 byly získány Vorbrügenovou glykosylační metodou. Hetarylové skupiny byly zavedeny do polohy 4 na 4,6-dichlorpyrimido[4,5-*b*]indolovém nukleosidu pomocí Stilleho nebo Suzukiho reakcí obvyklými postupy. Cílové volné nukleosidy byly získány Zemplénovou metodou. Testování biologických aktivit ukázalo zajímavé submikromolární aktivity několika sloučenin nesoucích 2-furyl, 2-thienyl a 2-benzofurylovou skupinu v poloze 4 proti dengue viru. Na druhou stranu nebyl pozorován žádný cytostatický efekt ani aktivita proti HCV, jedinou výjimkou byl 2-furyl derivát s mikromolární aktivitou proti buněčným liniím THP-1 a HepG2.

Přestože atom chloru v poloze 6 na pyrimidoindolovém systému je výrazně méně reaktivní než atom chloru v poloze 4, a zůstává nedotčen při standardním provedení cross-couplingových reakcí, podařilo se mi nalézt vhodný katalytický systém pro cross-couplingové reakce v poloze 6 (případně 5) založený na kombinaci octanu palladnatého a Buchwaldova

fosfinového ligandu X-Phos. Tímto postupem jsem připravil malou sérii 4,6-bis(hetaryl)-pyrimidoindolových nukleosidů, které však byly zcela neaktivní ve všech biologických testech.

Série nukleosidů substituovaných pouze v poloze 4 byla připravena pomocí nukleofilních substitucí amoniakem nebo aminy, pro zavedení alkylových skupin byly využity palladiem katalyzované reakce trialkylhliníků nebo Negishiho reakce a závěrečné odštěpení chránicích skupin Zemlénovou metodou. U žádného nukleosidu nebyla pozorována významná cytostatická nebo anti-dengue aktivita, pouze 4-methyl derivát disponuje sub-mikromolární aktivitou proti HCV a není cytotoxický.

V další části projektu byly připraveny anelované analogy tubercidinu pomocí Suzukiho nebo Stilleho reakcí 4-amino-6-chlor- a 4-amino-5-chlorpyrimidoindolových nukleosidů za použití dříve optimalizovaného postupu (ligand X-Phos). Cílové nukleosidy neukázaly žádnou významnou cytotoxickou ani protivirovou aktivitu. Nejaktivnější sloučeninou byl výchozí 4-amino-5-chlorpyrimidoindolový nukleosid se sub-mikromolární aktivitou proti virům dengue a HCV, tyto aktivity však byly provázeny i výraznou cytotoxicitou.

V poslední části mého projektu byla vyvinuta syntéza nukleosidů se 7-deazapurinovou bází anelovanou s thiofenem. Tricyklické báze byly připraveny třikrokovou syntézou z 4,6-dichlorpyrimidinu a jodthiofenu, které byly spojeny Negishiho reakcí a po zavedení azidové skupiny do polohy 4 na pyrimidinovém kruhu byl vytvořen tricyklický motiv termickou nebo fotochemickou cyklizací vzniklého tetrazolu. Tricyklické báze byly úspěšně glykosylovány na chráněné chlorované thienopyrrolopyrimidinové nukleosidy. Z nich pak byly připraveny 2 série izomerních nukleosidů, a to použitím Suzukiho nebo Stilleho reakce v případě hetarylových derivátů, methylová skupina byla do molekuly zavedena palladiem katalyzovanou alkylací. Po odštěpení chránicích skupin pak byly získány cílové nukleosidy. Cílové amino, dimethylamino, methoxy a methylsulfanyl deriváty byly připraveny nukleofilní substitucí chlorothienopyrrolopyrimidinových nukleosidů s příslušnými nukleofily (amoniak, dimethylamin, methoxid a thiomethoxid sodný). Testování biologických aktivit těchto nukleosidů stále probíhá, momentálně jsou dostupné pouze výsledky testů na aktivity proti RSV a HCV. Všechny nukleosidy jsou zcela neaktivní proti RSV viru, 2-furyl, 3-furyl a dimethylamino deriváty i proti HCV. Zatímco benzofuryl a amino deriváty disponují pouze slabými aktivitami proti HCV, methyl, methoxy a methylsulfanyl deriváty z obou sérií

ukázaly sub-mikromolární aktivitu proti HCV, zároveň však i mikromolární cytotoxicitu. Nejaktivnějšími sloučeninami jsou oba methyl deriváty.

Aktivity některých pyrimidoindolových a thienopyrrolopyrimidinových nukleosidů proti virům dengue a HCV potvrzují potenciál anelovaných 7-dezapurinových nukleosidů disponovat zajímavými biologickými aktivitami. Studium těchto typů látek bude pokračovat ve skupině Prof. Hocka na ÚOCHB.

## List of publications of the author related to the thesis

- 1) 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.
- 2) Tichý, M.; Pohl, R.; Tloušťová, E.; Weber, J.; Bahador, G.; Lee, Y.-J.; Hocek, M.: "Synthesis and biological activity of benzo-fused 7-dezaadenosine analogues. 5- and 6-substituted 4-amino- or 4-alkylpyrimido[4,5-*b*]indole ribonucleosides" *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5362-5372.

## Curriculum vitae

**2009-present Ph.D studies** - specialization: organic chemistry

*Synthesis of novel types of annulated deazapurine nucleosides with potential biological activity*

Charles University in Prague - Faculty of Science/ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic  
(supervisor Prof. Michal Hocek, Ph.D., DSc.)

**2007-2009 M. Sc. studies** – specialization: organic chemistry

*Preparation of triterpenic derivatives with anti-HIV activity*

Charles University in Prague - Faculty of Science  
(supervisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

**2004-2007 B. Sc. studies** - specialization clinical and toxicological analysis

*Preparation of heterocyclic esters of triterpenic acids with cytotoxic activity*

Charles University in Prague - Faculty of Science  
(supervisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

## Konferenční příspěvky/ conference contributions

1. XV<sup>th</sup> Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Component, Český Krumlov, Czech Republic 06/2011 (poster)
2. 17<sup>th</sup> European Symposium On Organic Chemistry, Crete, Greece 07/2011 (poster)
3. Challenges in Organic Chemistry and Chemical Biology, Edinburgh, UK 06/2012 (poster)
4. 4<sup>th</sup> EuCheMS Chemistry Congress, Prague, Czech Republic 09/2012 (poster)
5. XIII Interdisciplinary meeting of young biologists and chemists, Žďár, Czech Republic 05/2013 (lecture)
6. Heterocycles in Bio-organic Chemistry, Riga, Latvia 05/2013 (poster)
7. 48<sup>th</sup> Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry, Špindlerův Mlýn, Czech Republic, 11/2013 (poster)
8. XVI<sup>th</sup> Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Component, Český Krumlov, Czech Republic 06/2014 (poster)
9. XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry, Lisabon, Portugal 09/2014 (poster)
10. 7<sup>th</sup> Summer School "Medicinal Chemistry", Regensburg, Germany 09/2014 (poster)

## Acknowledgement

I would like to thank to my supervisor, Prof. Michal Hocek, for his guidance and interesting research project. I would also like to thank to Dr. Radek Pohl for measurement and interpretation of NMR data and Dr. Blanka Klepetářová for X-Ray analyses. I also wish to acknowledge Eva Tloušťová, Dr. Jan Weber, researches from Gilead Sciences and from Novartis Institute for Tropical Diseases for screening of biological activities. I also have to thank to all my colleagues from Hocek research group for their advices and inspiring working environment. I would especially like to thank to my colleagues and friends Dr. Pavla Perlíková, Dr. Tomáš Kubelka, Dr. Pavel Kielkowski, Dr. Jana Balintová, Anna Tokarenko and Dr. Chris Chambers for many useful advices and ideas, inspiring discussions and lots of fun. Last, but not least, I would like to thank to my family and girlfriend for their sustained support and patience with me and my work.

All the synthetic experiments were performed by me. I have also performed most of the spectroscopic measurements (IR, UV, fluorescence), but the measurement and

interpretation of NMR spectra of some intermediates and all final compounds were done by Dr. Radek Pohl. Crystal structure analyses were done by Dr. Blanka Klepetářová. All cytostatic/cytotoxic activity screening and antiviral screening (Chapters 3.2, 3.4) were performed by our collaborators from Novartis Institute for Tropical Diseases (Singapore), Gilead Sciences (California) and by the group of Dr. Weber and Dr. Helena Mertlíková-Kaiserová from IOCB. The parts that were done by our collaborating groups are always distinctly denoted in the thesis.

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (RVO: 61388963), Czech Science Foundation (P207/11/0344) and by Gilead Sciences, Inc.

## References

---

- <sup>1</sup> Hocek, M.; Holý, A.; Votruba, I.; Dvořáková, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1817-1825.
- <sup>2</sup> Hocek, M.; Holý, A.; Votruba, I.; Dvořáková, H. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1683-1697.
- <sup>3</sup> Hocek, M.; Šilhár, P.; Pohl, R. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, *71*, 1484-1496.
- <sup>4</sup> Hocek, M.; Šilhár, P.; Shih, I.; Mabery, E.; Mackman, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5290-5293.
- <sup>5</sup> Hocek, M.; Holý, A.; Dvořáková, H. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2002**, *67*, 325-335.
- <sup>6</sup> Hocek, M.; Hocková, D.; Štambaský, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 837-848.
- <sup>7</sup> Kimoto, M.; Moriyama, K.; Yokoyama, S.; Hirao, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5582-5585.
- <sup>8</sup> Nauš, P.; Kuchař, M.; Hocek, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2008**, *73*, 665-678.
- <sup>9</sup> Nauš, P.; Pohl, R.; Votruba, I.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Ameral, R.; Birkuš, G.; Wang, T.; Ray, A.; Mackman, R.; Cihlar, T.; Hocek, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 460-470.
- <sup>10</sup> Bourderioux, A.; Nauš, P.; Perlíková, P.; Pohl, R.; Pichová, I.; Votruba, I.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Stray, K.; Wang, T.; Ray, A.; Feng, J.; Birkuš, G.; Cihlar, T.; Hocek, M. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5498-507.
- <sup>11</sup> a) Zaware, N.; Sharma, H.; Yang, J.; Devambatla, R.; Queener, S.; Anderson, K.; Gangjee, A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1148-1151. b) Tessier, P.; Nicolau, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2887-2889. c) Andrus, P.; Fleck, T.; Oostveen, J.; Hall, E. *J. Neurosci. Res.* **1997**, *47*, 650-654. d) Gangjee, A.; Zaware, N.; Raghavan, S.; Ihnat, M.; Shenoy, S.; Kisliuk, R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1563-1578. e) Gangjee, A.; Zaware, N.; Devambatla, R.; Raghavan, S.; Westbrook, C.; Dybdal-Hargreaves, N.; Hamel, E.; Mooberry, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 891-902. f) Gangjee, A.; Zaware, N.; Raghavan, S.; Disch, B.; Thorpe, J.; Bastian, A.; Ihnat, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1857-1864. g) Showalter, H.; Bridges, A.; Zhou, H.; Sercel, A.; McMichael, A.; Fry, D. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5464-5474. h) Müller, Ch. E.; Geis, U.; Grahner, B.; Lanzner, W.; Eger, K. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2482-2491.

- 
- <sup>12</sup> Hyatt, J.; Swenton, J. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, *9*, 409–410.
- <sup>13</sup> Eger, K.; Lanzner, W.; Rothenhäusler, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 465–470.
- <sup>14</sup> Zhang, Y.-M.; Razler, T.; Jackson, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8235–8239.
- <sup>15</sup> Lafrance, M.; Fagnou, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16496–16497.
- <sup>16</sup> Liégault, B.; Lapointe, D.; Caron, L.; Vlassova, A.; Fagnou, K. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1826–1834.
- <sup>17</sup> Gangjee, A.; Zaware, N.; Raghavan, S.; Ihnat, M.; Shenoy, S.; Kisliuk, R. L. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1563–1578.
- <sup>18</sup> a) Zhou, J.; Guo, X.; Tu, C.; Li, X.; Sun, H. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 697–702. b) Kantam, M.; Roy, M.; Roy, S.; Sreedhar, B.; Madhavendra, S.; Choudary, B.; De, R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8002–8009. c) Lee, D.-H.; Lee, Y.; Kim, D.; Kim, Y.; Lim, W.; Harrowfield, J.; Thuéry, P.; Jin, M.-J.; Park, Y.; Lee, I.-M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7178–7182. d) Yuan, B.; Pan, Y.; Li, Y.; Yin, B.; Jiang, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4054–8. e) Nájera, C.; Gil-Moltó, J.; Karlström, S. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1798–1811. f) Kudo, N.; Perseghini, M.; Fu, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1282–1284.
- <sup>19</sup> Kinzel, T.; Zhang, Y.; Buchwald, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14073–14075.
- <sup>20</sup> Kuchař, M.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Votruba, I.; Hocek, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2377–2387.
- <sup>21</sup> Gerster, J. F.; Carpenter, B.; Robins, R. K.; Townsend, L. B. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 326–331.
- <sup>22</sup> Ceide, S. C.; Montalban, A. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4415–4418.
- <sup>23</sup> Solberg, J.; Undheim, K. *Acta Chem. Scand.* **1989**, *43*, 62–68.
- <sup>24</sup> Kondo, Y.; Watanabe, R.; Sakamoto, T.; Yamanaka, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *37*, 2814–2816.
- <sup>25</sup> Tichý, M.; Pohl, R.; Xu, H. Y.; Chen, Y. L.; Yokokawa, F.; Shi, P.-Y.; Hocek, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6123–6133.
- <sup>26</sup> Tichý, M.; Pohl, R.; Tloušťová, E.; Weber, J.; Bahador, G.; Lee, Y.-J.; Hocek, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5362–5372.
- <sup>27</sup> Nauš, P.; Caletková, O.; Konečný, P.; Džubák, P.; Bogdanová, K.; Kolář, M.; Vrbková, J.; Slavětínská, L.; Tloušťová, E.; Perlíková, P.; Hajdúch, M.; Hocek, M. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1097–1110.
- <sup>28</sup> Nagarjuna, G.; Yurt, S.; Jadhav, K.; Venkataraman, D. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8045–8050.
- <sup>29</sup> a) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Nishiza, K.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5875–5880. b) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9458–9463.
- <sup>30</sup> Okamoto, A.; Tanaka, K.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5066–5071.
- <sup>31</sup> a) Okamoto, A.; Kamei, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 658–662. b) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Fukuta, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9296–9297.
- <sup>32</sup> Kuchař, M.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Votruba, I.; Hocek, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2377–2387.
- <sup>33</sup> Gerster, J. F.; Carpenter, B.; Robins, R. K.; Townsend, L. B. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 326–331.
- <sup>34</sup> a) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Nishiza, K.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5875–5880. b) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9458–9463.



---

<sup>35</sup> Okamoto, A.; Tanaka, K.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5066-5071.

<sup>36</sup> a) Okamoto, A.; Kamei, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 658-662. b) Okamoto, A.; Tanaka, K.; Fukuta, T.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9296-9297.