

# ***Ortho*-formylering av østradiol for fremstilling av potensielle cytotoksiske salicylaminer**

**Masteroppgave i farmasi**



Katrine Martinsen

Farmasøytisk institutt, seksjon legemiddelkjemi, avdeling farmasøytisk kjemi.

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

15. mai 2011

# Forord

Det siste året av farmasistudiet som masterstudent har bydd på mange nyervervede erfaringer og vært en større omveltning enn forventet. Hele prosessen fra start til slutt har vært hektisk og preget av oppturer og nedturer. Uten et godt støtteapparat rundt meg, ville det hele ha vært en tung tid.

Det er flere sentrale personer jeg vil rette en stor takk til for å ha hjulpet meg utover all forventning, ved å avsette mye av deres tid til meg. Først og fremst min hovedveileder, førsteamanuensis Trond Vidar Hansen for hans gode veiledning og tette oppfølging som har vært beundringsverdig. Hans unike kunnskap om kjemi, og våre samtaler om sport og felles hjemby Sarpsborg er ting jeg har satt stor pris på. Tusen takk til stipendiat Øyvind W. Akselsen, min medveileder, for alle gode råd og opplæring på laboratoriet. Stipendiat Eirik Solum for å ha hjulpet meg helt i starten, og for at han spør hvordan det går. Stipendiat Ove Alexander Åstrand for å ha vært så behjelpelig og alltid blid når man spør om noe. Ingeniør Atle Haugen for å ha bistått gladelig. Hoan Vu Christopher Nguyen min medstudent og gode venn; for å ha vært den best tenkelige laboratoriepartner. En helt spesiell takk vil jeg rette til avdelingsingeniør Iuliana Cezarina Aldea Johansen, for all hjelp, støtte og omsorg; uten tvil en uvurderlig person for meg.

En takk vil jeg også rette til alle som utgjør legemiddelkjemigruppen; alle bidrar til trivsel og et godt arbeidsmiljø på hver sin måte, og det har helt klart påvirket min arbeidsmoral.

Til slutt vil jeg takke min familie og mine venner. Med dere i tankene hentet jeg motivasjon til å stå på videre.

Oslo, mai 2011

Katrine Martinsen

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt, Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet ved Universitetet i Oslo.

# Sammendrag

Denne masteroppgaven omhandler syntese av 2-metoksiøstradiolanaloger ved å modifisere 2-posisjonen på A-ringene i østradiol. Opprinnelig var videre mål å studere egenskapene til disse analogene ved biologisk testing. Bakgrunn for dette er at de potensielt ville inneha tilsvarende/forbedrede egenskaper som 2-metoksiøstradiol, som angiogenesehemmere.

Fremstilling av potensielle toksiske analoger gikk over flere syntesetrinn fra utgangsstoffet 17- $\beta$ -østradiol. Første syntese innebar en *ortho*-formylering av den aromatiske A-ringene i østradiol til intermedietet (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksi-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd (**9**) og (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksi-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-4-karbaldehyd (**11**). Forbindelsene (**9**) og (**11**) ble dannet i regioisomerisk blanding i et utbytte på 85 %. 2-Isomeren (**9**) ble rensset ved søylekromatografi i 39 % utbytte.

Neste syntese var reduktiv aminering av aldehydet for å fremstille salicylaminer. Målet var å fremstille fem salicylaminer fra forbindelse (**9**). Prosedyren med NaBH<sub>4</sub> som reduksjonsmiddel ble først forsøkt på to salicylaldehyder. 4-Metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol (**27**) ble fremstilt i 76 % utbytte og 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol (**29**) i 50 % utbytte. Det ble gjort fem forsøk på å fremstille salicylaminer av (**9**). Fire synteser var vellykket, og gav (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino)metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**21**) i 75 % utbytte, (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**22**) i 61 % utbytte, (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**24**) i 89 % utbytte og (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**) i 86 % utbytte.

Siste forsøk på reduktiv aminering var basert på en prosedyre med bruk av 5-etyl-2-metylpyridinboran kompleks (PEMB) som reduksjonsmiddel. Dette gav salicylaminet *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksyfenyl)metanamin (**31**) i 66 % utbytte og (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**) i 65 % utbytte.

# Forkortelser

Ang-1 – Angiopoietin-1

bFGF – Basisk fibroblast vekst faktor

$\text{CDCl}_3$  – Kloroform

*d*<sub>6</sub>-DMSO – Dimetylsulfoksid

E2 – 17 $\beta$ -østradiol

ECM – Ekstracellulær matriks/basalmembranen

EPC – Endotel forløperceller

Et<sub>3</sub>N – Trietylamin

FGF – Fibroblast vekst faktor

HB-EGF – Heparin-bindende epidermal vekst faktor

HIF- 1 $\alpha$  – Hypoksi-induserende faktor en alfa

HMPTA – Heksalmetylfosfortriamid

IGF – Insulin-liknende vekst faktor

IL-8 – Interleukin 8

MCP-1 – Monocyt-chemoattractant protein 1

MeOH – Metanol

MOM – Metoksimetyl eter

MgCl<sub>2</sub> – Magnesiumklorid

MMP – Matriks metalloproteaser

PDGF – Plate-derivert vekst faktor

PEMB – 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks

RhuMAb – Rekombinant humanisert monoklonalt antistoff

Sm.p – Smeltepunkt

TAM – Tumor assosiert makrofag

TGF- $\alpha$  – Transformerende vekst faktor alfa

THF – Tetrahydrofuran

Tie-2 – Tyrosin kinase reseptor med immunoglobulin-liknende domene

TIMP – Vevhemmere av matriks metalloproteinaser

tPA – Vev plasminogen aktivator

uPA – Urokinase plasminogen aktivator

VEGF – Vaskulær endotel vekst faktor

VEGF-R - Vaskulær endotel vekst faktor reseptor

VHL – Von Hippel-Lindau

2- Me – 2-metoksiøstradiol

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	1
Sammendrag.....	2
Forkortelser .....	3
Innholdsfortegnelse .....	5
1 Introduksjon.....	9
1.1 Kreft.....	9
1.1.1 Generelt om kreft .....	9
1.1.2 Hva er en tumor?.....	9
1.1.3 Angiogenese.....	10
1.1.4 Angiogenese-bryteren.....	12
1.1.5 Dannelsen av nytt kapillær-nettverk .....	13
1.1.6 Fysiologien til basalmembranen .....	14
1.1.7 Sentrale aktører innenfor angiogenese .....	15
1.2 Angiogenese hemmende stoffer og legemidler.....	17
1.2.1 Hvordan hemme angiogenese? .....	17
1.2.2 Endogene hemmere av angiogenese .....	21
1.2.3 2-Metoksiøstradiol .....	22
1.2.4 Hemming av angiogenese via HIF-1 $\alpha$ .....	24
1.2.5 Tubulin.....	25
1.2.6 Panzem®.....	26
1.3 Syntese av 2-ME analoger .....	27
1.3.1 SAR studier av 2-ME .....	27
1.3.2 Noen utvalgte synteser av 2-ME.....	28
1.3.3 Strategi for å syntetisere 2-ME analoger .....	30
1.4 <i>Ortho</i> -formylering av fenoler .....	32
1.4.1 Generelt .....	32
1.4.2 Casaraghi metoden (Casiraghi <i>et al</i> , 1978, 1980).....	32
1.4.3 Skattebøl metoden (Hofsløkken & Skattebøl, 1999) .....	33
1.5 Reduktiv aminering av aldehyder .....	34

1.5.1	Generelt .....	34
1.5.2	Reduktiv aminering av salicylaldehyder (Hansen <i>et al</i> , 2007).....	35
1.5.3	Reduktiv aminering med 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks (PEMB).....	36
1.6	Mål for oppgaven .....	37
2.	Resultater og diskusjon.....	39
2.1	<i>Ortho</i> -formylering.....	39
2.1.1	Syntese av 3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroksibenzaldehyd .....	39
2.1.2	Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-3,17-dihydroksy-13-metyl 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-2-karbaldehyd.....	41
2.2	Reduktiv aminering.....	48
2.2.1	Forsøk på syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-(aminometyl)-13-metyl 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol.....	48
2.2.2	Syntese av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol.....	50
2.2.3	Syntese av 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol.....	52
2.2.4	Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-13-metyl-2-((fenylamino) metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol .....	54
2.2.5	Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-(( <i>tert</i> -butyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol .....	57
2.2.6	Forsøk på syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((heksylamino) metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklo- penta[ <i>a</i> ]fenantren-3,17-diol .....	60
2.2.7	Forsøk på syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((sykloheksyl- amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-3,17-diol.....	61
2.2.8	Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol .....	63
2.3	Reduktiv aminering med 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks (PEMB) .....	65
2.3.1	Syntese av <i>N</i> -benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin .....	65
2.3.2	Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol.....	70
3.	Konklusjon .....	73
4.	Eksperimentell del .....	74
4.1	Materialer.....	74
4.2	Apparatur.....	74
4.3	Synteser og spektroskopidata .....	75
4.3.1	Syntese av 3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroksibenzaldehyd.....	75

4.3.2 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-3,17-dihydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16, 17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-2-karbaldehyd.....	77
Hydrolyse av formatester (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-formyl-3-hydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-17-yl format fra syntese 4.3.2 .....	78
4.3.3 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-(aminometyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantrene-3,17-diol .....	79
4.3.4 Syntese av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol.....	80
4.3.5 Syntese av 2,4-Dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol.....	82
4.3.6 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-13-metyl-2 ((fenylamino)- metyl)-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ] fenantren-3,17-diol.....	83
4.3.7 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-(( <i>tert</i> -butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]fenantren-3,17-diol.....	84
4.3.8 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((heksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol.....	86
4.3.9 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((sykloheksylamino)metyl) -13-metyl-7,8,9,11,12, 13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ] -fenantren-3,17-diol.....	87
4.3.10 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ] - fenantren-3,17-diol.....	88
4.3.11 Syntese av <i>N</i> -benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin .....	90
4.3.12 Syntese av (8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6 <i>H</i> -syklopenta[ <i>a</i> ]- fenantren-3,17-diol.....	91
5. Referanseliste .....	93
VEDLEGG 1.....	97
VEDLEGG 2.....	98
VEDLEGG 3.....	99
VEDLEGG 4.....	100
VEDLEGG 5.....	101
VEDLEGG 6.....	102
VEDLEGG 7.....	103
VEDLEGG 8.....	104
VEDLEGG 9.....	105
VEDLEGG 10.....	106



VEDLEGG 11.....	107
VEDLEGG 12.....	108
VEDLEGG 13.....	109
VEDLEGG 14.....	110
VEDLEGG 15.....	111
VEDLEGG 16.....	112
VEDLEGG 17.....	113
VEDLEGG 18.....	114
VEDLEGG 19.....	115

# 1 Introduksjon

## 1.1 Kreft

### 1.1.1 Generelt om kreft

Kreft karakteriseres av celler som vokser uten kontroll og i et unormalt høyt tempo. Kreft forekommer hyppigst i vev som fra før har høy celledeling. Likevel kan man differensiere mellom kreftceller og normale celler; kreftceller har ikke programmert celledød. Normalt har alle celler en viss levetid, og før de blir for gamle og nærmest farlige for en organisme, blir de fjernet ved programmert celledød kalt apoptose. Denne prosessen induseres av proteiner kalt caspaser. På denne måten blir eldre celler erstattet med nye, og livsviktige funksjoner opprettholdes (Chilman-Blair, 2003). Kreft var forårsaket av bestemte onkogener og proteiner trodde man tidligere; i dag er det større enighet om at kreft er en vevssykdom. Nyere kreftforskning går mer i retning av å studere tumorer, og deres sammenheng med kreftcellene (Weinberg 2007).

### 1.1.2 Hva er en tumor?

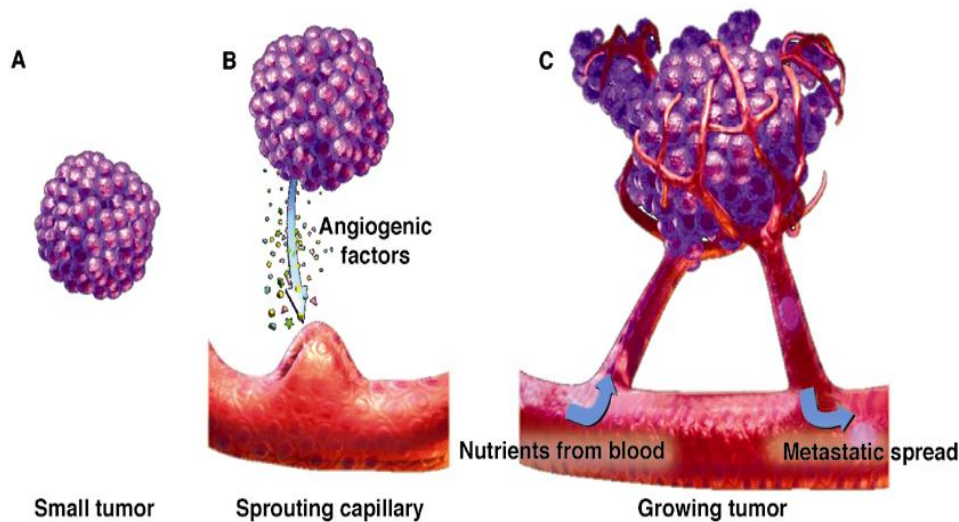
Tumorer er komplekse vev hvis funksjon avhenger av kommunikasjon mellom de ulike celletypene som til sammen utgjør tumoren. Så mye som 90 % av en tumormasse kan bestå av friske celler; disse støttevevscellene er biologisk svært forskjellige. Stromale celler som makrofager, mastceller, lymfocytter, fibroblaster, myofibroblaster, pericytter, glatte muskelceller, er viktige samarbeidspartnere med neoplastiske epitelceller/kreftceller. De ulike cellene utgjør et nettverk hvor kommunikasjon mellom cellene er viktig for å opprettholde svulstens struktur. Kommunikasjon er meget viktig for et godt samarbeid, kreftcellene klarer seg ikke på egenhånd. Kommunikasjonen foregår da ved hjelp av hver enkelt celledes heterotypiske signaler. (Baguley & Kerr, 2002,) Grunnen til ansamlingen av stromale celler kan skyldes at de er gjenværende etter at kreftceller slo seg ned og formerte seg. En annen forklaring er at det slett ikke er tilfeldig, men at de ulike celletypene er der for å utveksle nødvendige signaler for å rekruttere flere celler og forbedre overlevelsen til kreftcellene.

Epitelceller er rekruttert fra blodsirkulasjonen og utnyttes til å drive frem tumorvekst. Sammen med epitelceller kontrollerer kreftcellene proliferasjonen av nærliggende celler og veksten av celler inne i tumoren. Tumorvev skiller seg fra normale epitelvev ved at tumoren har en hard masse, dette skyldes matriksen som er deponert av myofibroblaster. Myofibroblaster skiller ut kollagen type I og II, fibronektin, proteoglycaner, i gjengjeld skiller disse ut urokinase plasminogen aktivator (uPA) og matriks metalloproteaser (MMP). Disse mobiliserer vekstfaktorer som fører til at tumoren blir mer og mer acellulær og stromale celler byttes ut med kollagenrik ekstracellulær matriks (ECM). Slike prosesser kan vare over måneder eller år (Weinberg 2007)

Fysiologien til karsinomer er mer kompleks enn tidligere antatt. Signalutvekslingen som foregår innen- og utenfor en tumor involverer som tidligere nevnt flere ulike celletyper, opptil 8, som igjen har sine innviklede signalmønstre. Ennå er det mye som gjenstår å bli oppklart innen kreftbiologien.

### **1.1.3 Angiogenese**

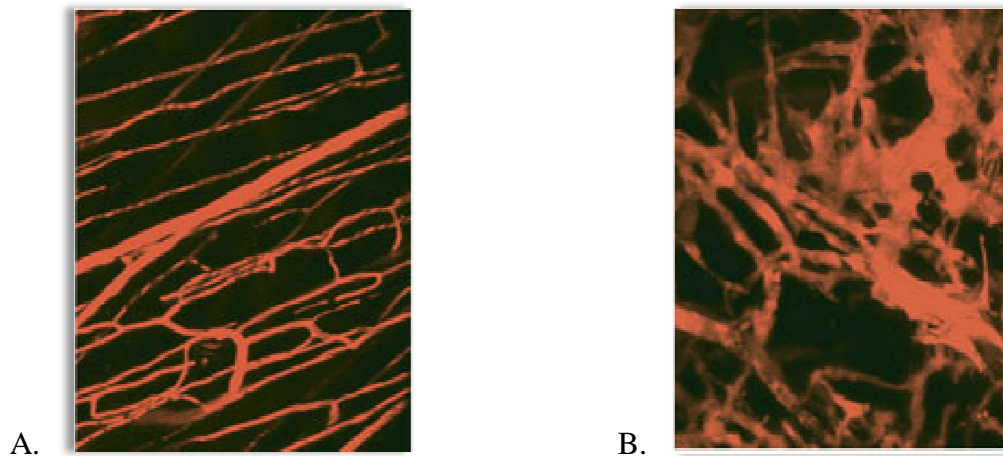
Angiogenese, også kalt neoangiogenese, er utviklingen av nye blodkar fra allerede eksisterende; dette tenkes å være helt essensielt for tumorvekst og spredning av kreft. En tumor kan ikke vokse større enn 1-2 mm uten tilknytning til et blodårenettverk. Tilstrekkelig blodforsyning er viktig for tilførsel av næringsstoffer og deponering av avfallsstoffer. Denne utvekslingen med blodet er helt avgjørende for tumorutviklingen som karakteriseres av celledeling i høyt tempo. Angiogenese-prosessen kan innledes med at endotelceller befris fra deres kontaktforhindrede tilstand. Dette oppstår ved skade eller oppløsning av basalmembranen, og dermed kan endotelceller vandre og proliferere. Dette initieres av angiogenese faktorer som basisk fibroblast vekst faktor (bFGF) og vaskulær endotel vekst faktor (VEGF). bFGF og VEGF aktiverer spesifikke celleoverflatereseptor tyrosin kinaser. VEGF induserer hyperpermeabilitet ved avsetning av plasmaproteiner. Dermed dannes en angiogenetisk matriks som støtter invasjon og proliferasjon av endotelceller. Cellemigrasjonen involverer integriner  $\alpha_v\beta_3$  (og  $\alpha_v\beta_5$ ) og er avhengig av tyrosin kinase signaler intracellulært. Det siste stadiet i angiogenese (C i figur 1) er blodåredannelse; endotelceller danner "tight- junctions" med andre endotelceller.



Figur 1: Illustrasjon av angiogenese. (Siemann, 2002)

Angiogenese er et diskret, hastighetsbestemmende trinn i tumorvekst og tumorutvikling. Flere ulike faktorer kan påvirke eller utløse denne komplekse prosessen. Genetiske faktorer som tap av et "tumor undertrykker"- gen, eller aktivering av et onkogen (kreftgen) kan føre til økt sekresjon av angiogenesefaktorer, eller redusert sekresjon av angiogenesehemmere. Tap av Von Hippel-Lindau (VHL) protein fører til reduksjon av hypoksi induserende faktor, HIF-1 $\alpha$ , som fører til økt VEGF produksjon. Tap av p53 protein funksjon, som undertrykker kreft ved å regulere cellyklus og forhindrer genmutasjon, fører til redusert sekresjon av angiogenesehemmere thrombospondin-1. Endringer i mikromiljøet, hypoksi, inflammasjon eller vevsskade bidrar til økt uttrykk av angiogenesefaktorer, som fører til nydannelse av blodårer.

I løpet av tumorutviklingen forandres støttevevet rundt tumoren. Det er paralleller mellom tumor støttevev og sårheling. Begge karakteriseres av økt fibrinogen deponering, økt karpermeabilitet, og inflammasjonsresponser. Signalprosessene som foregår i angiogenese har klare likheter med prosessen som skjer under sårheling. Kreftcellene viser dermed at de utnytter allerede et veletablert system som kroppen har laget (Weinberg 2007). Når en skade på kroppen oppstår, er cellenes aktive funksjon i sårhelingen nøye regulert, i motsetning til kreft. Tumorer er "sår som ikke leges"; normalt nedreguleres aktiviteten til cellene som lukker såret, mens i kreftsammenheng er det ingen negativ feedback, og prosessen foregår i det "uendelige".



Figur 2: A. Normale kapillærer, B. Tumor-vaskulatur. (Jain, 2003)

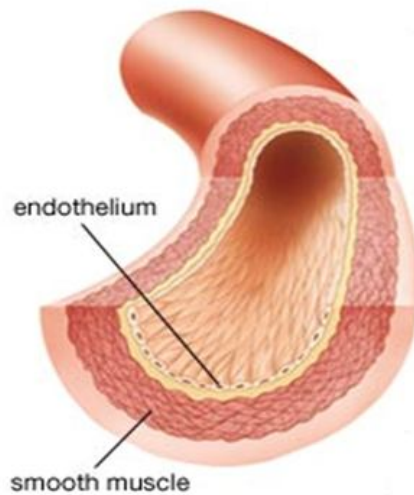
### 1.1.4 Angiogenese-bryteren

Angiogenese skyldes kort forklart en ubalanse mellom positive og negative regulatorer av angiogenese. Normalt er dannelse av nye blodkar en prosess som kun aktiveres fra forhold som sårheling, artritt, psoriasis og kreft. Før tumoren klarer å bryte barrieren som kroppen kontrollerer, er den i en låst tilstand hvor antallet celler holdes nærmest konstant; celler proliferer og gjennomgår apoptose. Den ekstracellulære matriksen (ECM) holder endotelceller fast slik at disse forhindres i å vandre på egenhånd, og oppbevarer den viktige angiogenese faktoren VEGF. På denne måten klarer kroppen å forhindre dannelsen av nye blodårer. Det ser ut som at bryteren er avhengig av inflammatoriske celler, ettersom VEGF er innelåst. Matriks metalloproteinase MMP-9 sekreses av inflammasjonsceller og bryter ned ECM, og dermed frigjøres angiogenese faktorer, deriblant VEGF. Angiogenese bryteren innebærer: 1) uidentifiserte signaler som tiltrekker inflammasjonsceller 2) MMP-9 som aktiverer latent VEGF 3) VEGF stimulerer endotelceller til proliferasjon. Angiogenese trenger ikke nødvendigvis være helt avhengig av VEGF, dersom reseptorene inaktiveres, kan fibroblaster skille ut bFGF og transformerende vekst faktor, TGF- $\alpha$ . Dette gjør anti-angiogenese terapi til en utfordring, fordi det er så mange ulike signalstoffer involvert (Weinberg, 2007).

### 1.1.5 Dannelsen av nytt kapillær-nettverk

Endotelceller utgjør veggene i blodårer og kapillærer, så vel som i lymfeknuter. Derfor er de viktige for en tumor. Tumoren er avhengig av endotelceller som danner kapillærer som forsyner tumoren med blod. Celler som ikke får adekvat tilførsel av oksygen frigjør angiogenese faktorer som stimulerer dannelse av kapillærer. Under utviklingen av nye blodårer frigjør endotelcellene plate-derivert vekst faktor (PDGF) og heparin-bindende epidermal vekst faktor (HB-EGF) som tiltrekker pericytter og glatte muskelceller som utgjør det ytre laget på blodårer. PDGF er viktig for at pericyttene er direkte linket til endotelcellene. I gjengjeld frigjør glatte muskelceller VEGF og angiopoietin-1 (Ang-1) som stimulerer overlevelse hos endotelcellene. Pericyttene og de glatte muskelcellene bidrar med stabilitet og evne til å motstå trykk fra blodstrøm. Etter hvert som epitelcellene formerer seg og tumoren vokser, etterfølger en formering av stromale celler. Det er også observert at kreftceller som sprer seg og danner metastaser rekrutterer stromale celler til å hjelpe med konstrueringen av nye tumorkolonier. En tumor er mer ondartet jo tettere årenettverket er (høyt uttrykk av VEGF). Tumorer med rikelige blodårer gir dårligere prognose enn tumorer med få blodårer. De kreftcellene som er dårlige på å stimulere angiogenese er avhengig av sine naboceller. Ettersom en tumor videreutvikles er den avhengig av endotel forløperceller fra beinmargen som sirkulerer i sirkulasjonssystemet. VEGF tiltrekker disse endotelcellene mot tumoren.

Blodåresystemet som forsyner en tumor har en kaotisk oppbygning. I tillegg er årene mye mer gjennomtrengelige sammenlignet med normale blodårer. En teori er at plasmamembranene til endotelcellene ikke er tette nok, men etterlater gap mellom cellene. Permeabiliteten kan også skyldes en ubalanse i angiopoietin-1 og -2 og forhøyede verdier av VEGF. Derfor lekker en del væske inn i tumoren; lymfeknuter skulle normalt drenert bort væsken, men disse kollapser på grunn av endret trykk. Dermed blir det høyt væsketrykk inne i tumoren, hvilket er uheldig for legemiddelbehandling ettersom tilgangen til cytostatika blir dårligere (Weinberg, 2007).



Figur 3: Figuren illustrerer et snitt av en blodåre og viser to av de mest sentrale cellene som utgjør blodårer; endotelceller og glatte muskelceller. (Debakey et al., 2011)

### 1.1.6 Fysiologien til basalmembranen

Basalmembranen er en proteinmembran hvilket utgjør den ekstracellulære matriksen (ECM) rundt cellene og kalles ofte for ECM. Tumorer består i stor grad av bindevev og dette innebærer at den samtidig er rik på ECM. Basalmembranens viktigste proteiner er kollagen og elastin, og membranen har flere viktige funksjoner. Dets matriks fungerer som strukturdannende element i vev og skiller stroma og epitelcellene (Fossum, 2011). Proteoglykaner i ECM er viktig for fuktighet, og langvarig lagring av vekstfaktorer. Matriksen har en sentral rolle innenfor angiogenese ved at den fungerer som et kammer som holder igjen angiogenesefaktorer og angiogenesehemmere. Like essensielt er at membranen viderefremidler signaler som er viktige for endotelcellers overlevelse og forhindrer også at endotelceller kan bevege seg fritt. Viktige interaksjoner mellom endotelceller og ECM proteiner reguleres av integriner, som er heterodimere transmembran proteiner. Den kontinuerlige nedbrytningen og oppbyggingen av ECM er kritisk for angiogenese. Enzymer, metalloproteinaser og vev serine proteaser, står for den pågående prosessen med nedbygging og ombygging av ECM. Disse enzymene aktiveres av plasmin.

Angiogenese begynner lenge før nedbrytning av ECM. Ved en ukjent mekanisme klarer kreftceller å skille ut signaler gjennom basalmembranen for å stimulere angiogenese. Disse signalene stimulerer myofibroblaster som igjen stimulerer angiogenese. Denne angiogenesen

er begrenset, og kan bare avansere når kreftcellene kan invadere membranen og komme i direkte kontakt med stromale celler (Weinberg, 2007).

### 1.1.7 Sentrale aktører innenfor angiogenese

- Makrofager, mest kjent for deres viktige rolle i immunforsvaret, er overraskende delaktig i tumorutvikling. Monocyt chemo-attractant protein, MCP-1, som tiltrekker makrofager uttrykkes av epitel kreftceller. Antall makrofager kan indikere nivå på angiogenesen. Makrofagene skiller ut VEGF og et interleukin, IL-8, som øker angiogenese aktiviteten og fører til et mer ekstensivt blodårenettverk. Innenfor en tumor er det forskjell på kreftcellenes egenskaper til å stimulere angiogenese. Ikke alle kreftceller som opplever hypoksi klarer å stimulere dannelse av nye kapillærer. Oksygenfattige områder i en tumor tiltrekker makrofager som er tolerante for hypoksi. De tilstrømmende makrofagene sørger indirekte for oksygentilførsel ved utskillelse av VEGF som videre tiltrekker endotelceller dit det er behov for kapillærdannelse. Det er ikke i alle tilfeller at makrofager på egen hånd kan redde celler som utsettes for hypoksi. Tumorer som vokser raskt kan bestå av deler som er nekrotiske, fordi ikke alle cellene får tilstrekkelig oksygentilførsel i den unormalt hurtige utviklingen. Tumor assosiert makrofag (TAM), skiller ut MMP-9 som stimulerer angiogenese ved å ødelegge vevsstruktur og gjør plass for tumormasse og frigjør angiogenese faktorer. MMP-9 kløyver også insulin liknende faktor til IGF som er et overlevelses signal for kreftceller.
- VEGF er en av de viktigste angiogenese faktorene og stimulerer produksjonen av HIF- $\alpha$  og endotel forløperceller (EPC). VEGF er endotelspesifikk. Oksidativt stress fører til økt VEGF sekresjon. VEGF-R1 og VEGF-R2 er VEGF reseptorer med høy affinitet for VEGF. Disse uttrykkes under regulering av hypoksi induserende faktor, HIF-1 $\alpha$ . Hypoksi gir oppregulering av VEGF-R1 og R2. Hemming av VEGF fører til suppresjon av tumorvekst.
- Fibroblast vekst faktor (FGF) familien induserer cellulær migrasjon, prolifering og differensiering. FGF sekresjonen mangler signalsekvenser og inngår ikke i noen klassisk "pathway", men sekreseres passivt fra cellen ved celledød, skade, kjemisk skade, bestråling, eller infeksjon. FGF sender proangiogenese signaler til cellen via



transmembrane reseptor tyrosinkinaser. Den eksakte mekanismen for den aktive sekresjonen av FGF er ennå ikke kartlagt. Endotelceller stimuleres av VEGF til å produsere bFGF som forsterker angiogenese aktivitet. bFGF syntetiseres av stromale fibroblaster og påvirker mange ulike celler og organer ved å inngå i celledifferensiering og vekst. I angiogenese prosessen regulerer bFGF aktiviteten til ekstracellulære molekyler; kollagenase, proteaser, uPA, integriner, og disse danner nye kapillær-strukturer. bFGF stimulerer også sårheling og er viktig for nervesystemet.

- Angiopoietiner er en familie endotel-spesifikke vekst faktorer. Angiopoietin-1 (agonist) og angiopoietin-2 (antagonist) virker på tyrosin kinase reseptoren Tie-2. Disse tre er viktige i endotelcellers etablering av stabile cellulære og biokjemiske interaksjoner. Angiopoietin/Tie-2 pathway hemming fører til hemming av tumorvekst og metastase.
- Integriner (heterodimere transmembrane proteiner): angiogenese er avhengig av spesifikke molekylære interaksjoner mellom vaskulære celler og komponenter fra ekstracellulær matriks. Integrin-mediert celleadhesjon fører til intracellulær kommunikasjon som kontrollerer alt fra celle-overlevelse, vekst, og migrasjon.  $\alpha_v\beta_3$  er mest viktig for angiogenese ved å kontrollere ekstracellulær matriks (ECM) og tillater celleinvasjon av ECM. Endotelceller som inngår i angiogenese uttrykker høye nivåer av  $\alpha_v\beta_3$ .
- Matriks metalloproteinaser, MMP, navnet kommer av et sink metall i det aktive setet, og det fins 17 ulike. Proteinase bryter ned alle komponenter i ECM hvilket er svært gunstig for cellemotilitet og angiogenese. Tumorutviklingen påvirkes i stor grad av at MMP-ene frigjør angiogenesefaktorer. MMP-7, MMP-9 og MMP-12 er de eneste som hemmer angiogenese ved å omdanne plasminogen til angiostatin som er en kraftig hemmer av angiogenese. Degradering av ECM er så sentralt innenfor angiogenese at legemidler som hemmer MMP er under utvikling.
- Plasminogen aktivator (PA) systemet er en kaskade av enzymer kalt proteaser. uPA er viktig for cellemigrasjon hos kreftceller, epitelceller og fibroblaster. Antistoffer som blokkerer uPA fører til redusert tumorvekst. Høye nivåer av uPA, og dets reseptor uPA-R gir dårlig prognose. tPA uttrykkes vanligvis kun hos endotelceller og har en primær rolle i fibrinolyse og angiogenese ved degradering av blodpropp og sårheling. Angiogenese vekstfaktorer stimulerer økt uttrykk av serine proteaser, uPA og tPA på

endotelceller. uPA og tPA kan danne plasmin av plasminogen som igjen fører til fibrinolyse. Plasmin aktiverer MMP og er viktig for å bryte ned fibrin og ECM slik at endotelceller kan migrere og invadere.

Det er registrert at tumorvekst kan være avhengig av fibroblaster, det er registrert at veksten går i mye raskere tempo ved deres tilstedeværelse. Dette kan skyldes at tumorvekst i stor grad styres av angiogenese, og myofibroblaster skiller ut VEGF som stimulerer endotelceller. Ved å øke hastigheten på det hastighetsbestemmende trinn vokser tumoren enda raskere (Baguley & Kerr, 2002).

## 1.2 Angiogenese hemmende stoffer og legemidler

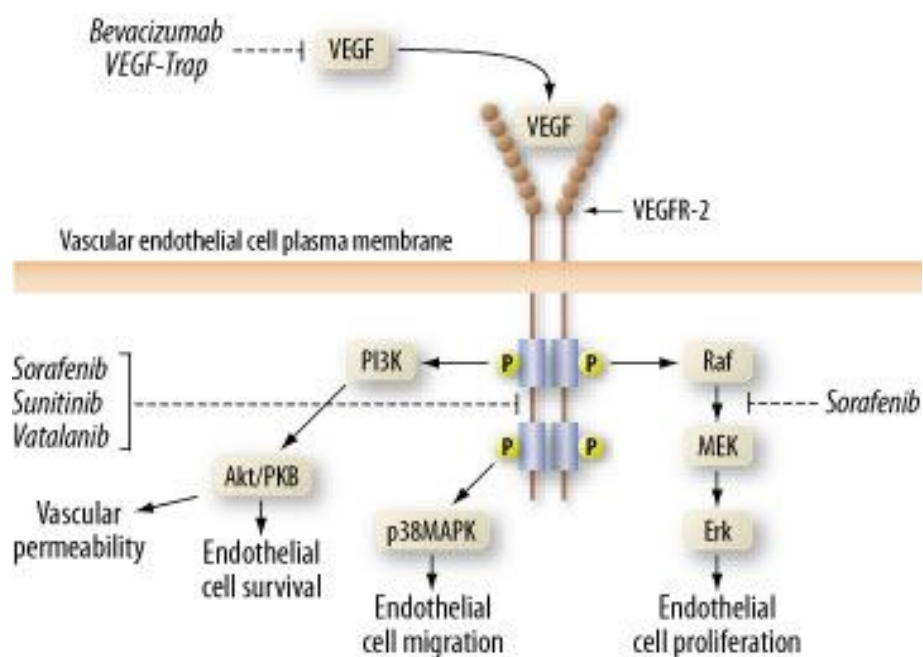
### 1.2.1 Hvordan hemme angiogenese?

Det er flere måter å hemme på: 1) hemme angiogenese faktorer 2) forhindre cellemigrasjon og proliferasjon 3) blokkere ECM nedbrytning og 4) direkte angrep på blodkar. Angiogenese innebærer som nevnt tidligere dannelse av nye blodårer. Det er fordel å angripe endotelcellene som danner de nye blodkarene av flere grunner: a) Endotelceller er mer genetisk stabile enn kreftceller og medfører mindre problem med resistens b) Det er enkelt å nå frem til blodårene pga blodsirkulasjonssystemet c) Legemidler som brukes kan benyttes mot en rekke forskjellige tumorer, ettersom angiogenese er sentralt for mange forskjellige tumorer d) Færre bivirkninger oppstår pga spesifikk målretting på tumor (Baguley & Kerr, 2002).

#### 1) Hemming av angiogenese faktorer

- Hemming av FGF reseptor. SU668 (4) induserer høye nivåer av apoptose i tumor kapillærer.
- Hemming av integrin funksjon hemmer adhesjonsavhengige overlevelsessignaler og resulterer i apoptose og forstyrrelse av angiogenese.

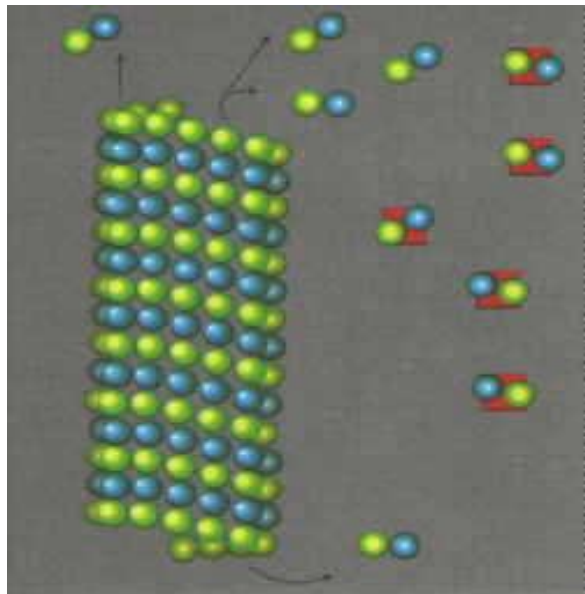
- Antistoffer er laget spesifikt for å forhindre VEGFs funksjon. Rekombinant humanisert monoklonalt antistoff (RhuMAb) hemmer VEGF binding til VEGF reseptoren på endotelceller. Dermed hemmes tumorvekst og VEGF-indusert celleproliferasjon. Man har også blokkert VEGF reseptor signalisering. Avastin™ (bevacizumab) er et monoklonalt antistoff, med flere indikasjonsområder, bla i kombinasjon med annen kjemoterapi som paclitaxel ved metastatisk brystkreft (Legemiddelverket, 2011). Avastin™ binder og nøytraliserer VEGF-A. Kombinert med et tradisjonelt cytostatikum viser Avastin™ synergistisk effekt, samt bedret administrasjon av legemiddelet. En pasientstudie viste at kombinasjonsterapi gav forlenget levetid sammenliknet med enkeltterapi (Baguley & Kerr, 2002).



Figur 4: Mekanismen til bevacizumab. VEGF interaksjon med VEGF- reseptoren forhindres ved at bevacizumab bindes til VEGF. Akt/PKB = protein kinase B; Erk = ekstracellulær signal-regulerte kinaser; MAPK = mitogen-aktive protein kinaser; MEK = MAPK/ERK kinase; PI3K = fosfoinositid-3 kinase; Raf = v-raf-1 murine leukemi viral oncogen homolog 1. (Choueiri et al., 2006)

## 2) Hemming av cellemigrasjon og proliferasjon

Mikrotubuli er et kjent angrepsmål for kreftlegemidler. Det er bygget opp av tubulinproteiner og er en viktig bestanddel i cytoskjelettet i celler (figur 6). Dets ulike cellulære funksjoner innebærer bevegelse, deling, fasong og intracellulær transport, og er derfor kritisk for celler. Anti-tubulin legemidler kategoriseres enten som hemmere av tubulin polymerisering, eller som mikrotubulistabiliserende (Fang *et al*, 2009).

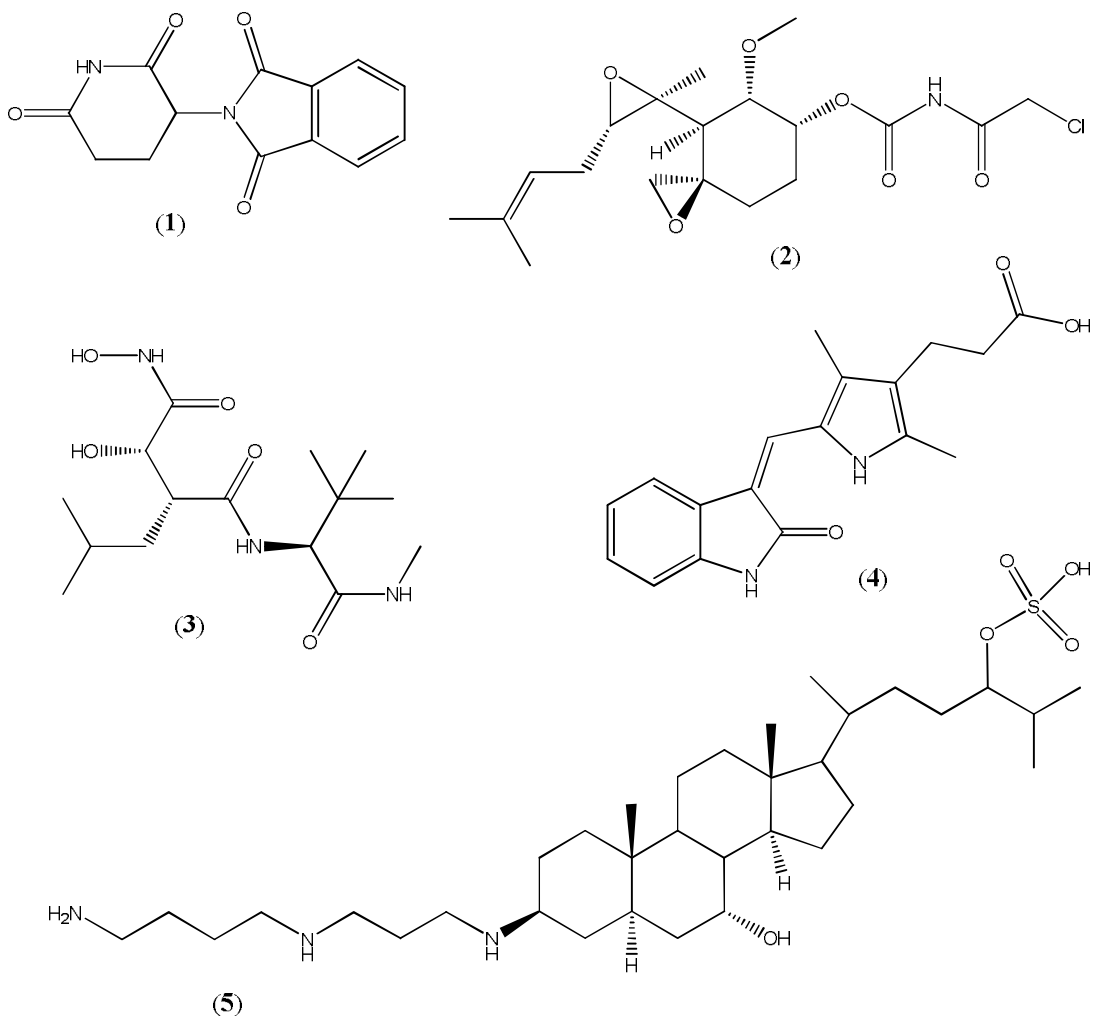


Figur 6: Mikrotubuli. Angrepsmål for kreftlegemidler (Childs, 1999).

- Thalidomid (**1**) hemmer angiogenese og undertrykker TNF- $\alpha$  produksjon. Hemmer også bFGF og VEGF induert angiogenese.
- Fumagillin analogen, TNP470 (**2**), hemmer celleproliferasjon *in vitro* og angiogenese *in vivo*. Virkningen skyldes økt produksjon av nitrogen oksid hvilket forårsaker mitokondriell dysfunksjon og DNA skade. Denne er under utprøving i fase I og II studier.
- Squalamin (**5**) fra hai-lever hemmer proliferasjon og migrasjon av endotelceller.
- Combrestatiner hemmer celleproliferasjon ved å hemme tubulin polymerisering. (Fang *et al*, 2009)

### 3) Blokkering av nedbrytning og oppbygging av ECM

- Vevhemmere av matriks metalloproteinaser kalt TIMP hemmer MMP ved å danne ikke-kovalente bindinger. Dermed hemmes angiogenese ved at nedbrytning av ECM forhindres.
- Thrombospondin-1 er et ECM protein og hemmer angiogenese ved å hindre vekst og bevegelighet av endotelceller *in vitro*.
- Marimastat (**3**) er en syntetisk fremstilt hemmer av MMP og er i fase III studier.
- Neovastat er en anti-angiogenese agent funnet i hai-brusk. Stoffet inducerer apoptose av endotelceller og hemmer MMP. Legemiddelnavnet er AE-941 og testes i fase III studier.



Figur 6: Thalidomid (1), TNP 470 (2), Marimastat (3), SU 6668 (4), og Squalamin (5)

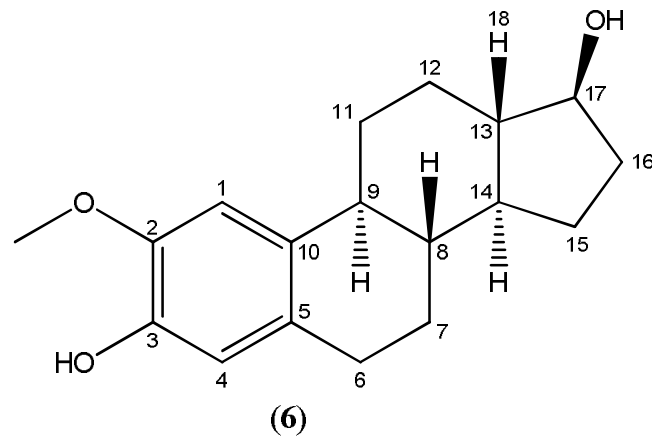
#### 4) Angrep på blodkar

Bruk av antistoffer og peptider direkte mot blodkar er en lovende anticancer strategi. Utfordringen er å finne noe som kjennetegner angiogenese- endotelceller for å skille dem fra normale endotelceller. Angrep på human vevsfaktor i tumor-endotel inducerer kaskader som fører til tumor infarkt. Et peptid som spesifikt angriper tumor endotelceller og ikke normale celler er testet. Peptidet var bundet til en cytotoxisk agent og reduserte tumorens størrelse. En viktig oppgave innenfor kreftmedisin ligger i å finne og identifisere de spredte stamcellene som finnes "gjemt". Ved å hemme disse cellene forhindres modningen til nye celle- fenotyper som er helt avgjørende for tumorutvikling (Baguley & Kerr, 2002).

### **1.2.2 Endogene hemmere av angiogenese**

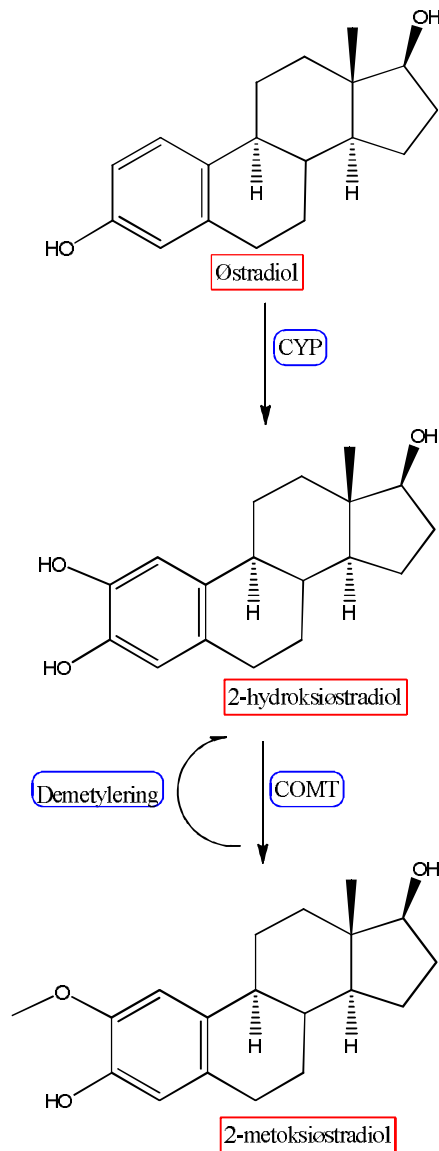
- Angiostatin er et fragment av plasminogen. Virkningen er ikke kartlagt. Disulfidbindingen i strukturen er viktig for å hemme endotelcellevekst.
- Endostatin inducerer celleapoptose. Øker caspase 3 aktivitet, inducerer DNA fragmentering og reduserer Bcl-2 nivå. Binder plasminogen. Redusert nivå av bFGF og VEGF er sett hos noen pasienter i fase I studier.
- Antitrombin III hemmer bFGF og VEGF industert celleproliferasjon, hemmer angiogenese i dyremodeller og hemmer tumor progresjon *in vivo* hos mus (Baguley & Kerr, 2002).

### 1.2.3 2-Metoksiøstradiol



Figur 7: 2-Metoksiøstradiol (6)

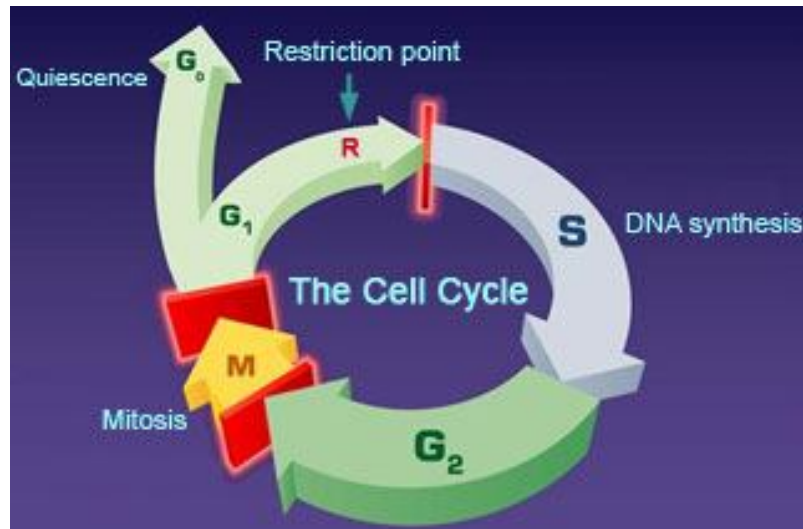
2-Metoksiøstradiol (2-ME) er en endogen metabolitt av steroidhormonet 17 $\beta$ -østradiol (E2) (se figur 8). E2 blir metabolisert av enzymer; oksidasjon av CYP 450 til 2-hydroksiøstradiol som videre metyleres til 2-ME av COMT (katekol-o-metyl-transferase). 2-ME blir raskt omdannet til den inaktive metabolitten 2-metoksiøstron i plasma ved oksidasjon på C17. Videre metaboliseres metabolitten ved hydroksylering på den aromatiske ringen eller den alifatiske 5-ring (Mueck & Seeger, 2010). 2-ME utskilles fra kroppen ved konjugering av sulfat eller glukuronsyre på 3- og 17-posisjon. Serumnivåer av 2-ME *in vivo* er i pikomolar konsentrasjon ( $10^{-12}$ ), bortsett fra hos gravide kvinner, nanomolar ( $10^{-9}$ ) og detekteres i blod og urin (Sutherland *et al*, 2007). 2-ME har 500-3200 lavere affinitet til østrogenreseptorer enn østradiol. Det kan derfor tenkes at anti-tumor egenskapene til 2-ME er østrogenreseptor-uavhengig og at 2-ME ikke har østrogenaktivitet. I en studie gav dosering av 2-ME over lang tid til mus ingen tumorvekst, sammenliknet med østradiol som gav tumor. Høye doser over tid til hund og rotter viste derimot noe østrogenaktivitet, dette kan skyldes metabolitter av 2-ME og ikke 2-ME selv (Lakhani *et al*, 2003).



Figur 8: Endogen metabolisme av hormonet østradiol.

2-ME har anti-tumor virkning pga hemming av neoangiogenese, apoptose aktivitet og mikrotubuli aktivitet og produksjon av superoksider (Lakhani *et al*, 2003) Proliferasjon av celler skjer ved celledeling og styres av cellesyklus (se figur 9). Ved å hemme cellesyklus hemmes celledelingen. Behandling med 2-ME hemmer celleprolifering ved G1 celledelingsarrest, som et resultat av DNA- syntese hemming, og G2/M arrest som skyldes effekt på mikrotubuli. Den anti-proliferative aktiviteten ble påvist allerede i 1980 (Sutherland *et al*, 2007).





Figur 9: Cellesyklusen og dens ulike faser. G<sub>0</sub> er hvilefasen, cellen skal ikke deles. G<sub>1</sub> er den innledende fasen i celsesyklus hvor cellen forberedes på celledeling. S fasen innebærer DNA syntese til en ny celle. G<sub>2</sub> fasen er den siste kontrollfasen før cellen deles i to, og celleantallet er fordoblet.

## 1.2.4 Hemming av angiogenese via HIF-1 $\alpha$

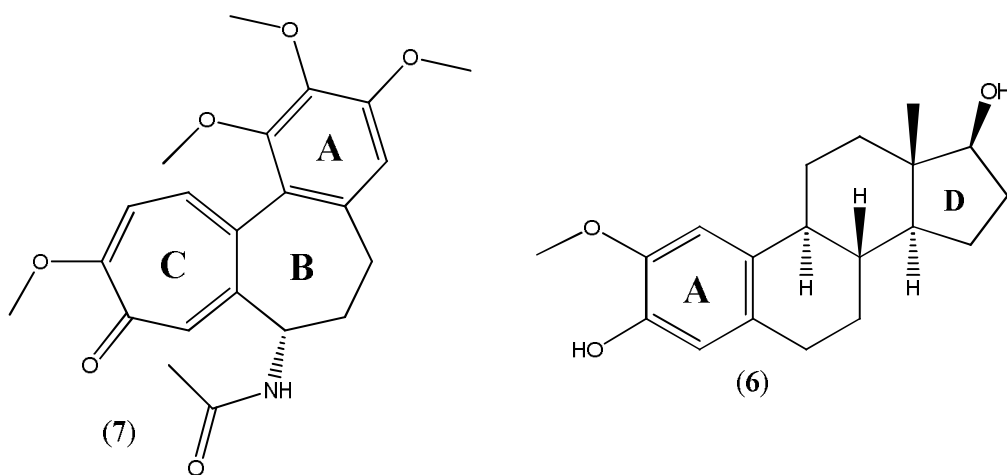
Angiogenese forhindres ved at 2-ME reduserer uttrykk av HIF-1 $\alpha$ , som i 70 % av krefttilfeller overuttrykkes. Redusert nivå av HIF-1 $\alpha$  fører til indirekte hemming av VEGF og redusert tumorvekst og kardannelse (Chilman-Blair, 2003). 2-ME induserer selektivt apoptose hos celler med høy celledeling, som kreftceller og angiogenese-endotelceller, ikke normale endotelceller (Sutherland *et al*, 2007). Brystkreft-celler ser ut til å være mest sensitive for 2-ME. Kreftceller som er i hvilefasen (G<sub>0</sub>) påvirkes i liten grad (Mueck & Seeger, 2010). Apoptose induseres av 2-ME på flere ulike måter: (Lakhani *et al*, 2003).

- stimulerer caspase 3 som resulterer i G<sub>2</sub>-M celsesyklusarrest, hvilket fører til DNA-fragmentering.
- øker nivåene av caspase 8 og 9 (Chilman-Blair, 2003).
- induserer p53 apoptose hos leukemi celler, sannsynligvis på grunn av hemming av superoksid dismutase som fører til oksidativt stress.
- øker produksjonen av nitrogenoksid.
- oppregulering av dødsreseptor 5 uttrykk *in vitro* og *in vivo* (Chilman-Blair, 2003).

## 1.2.5 Tubulin

2-ME (6) har antimitotiske egenskaper ved å binde seg til kolkisin-setet på tubulin. 2-ME hemmer mikrotubuliformasjon og er den mest potente endogene hemmeren av tubulinpolymerisering. I endotelceller viser 2-ME selektiv ødeleggelse av mikrotubuli i forhold til andre strukturer i cytoskjelettet. Avhengig av reaksjonsbetingelsene hemmer 2-ME polymerformasjon, eller inkorporeres i en polymer med endret stabilitet (Lakhani *et al*, 2003).

Det er antatt at østradiol og andre østrogenforbindelser hemmer tubulin, studien viste at den mest potente østrogenforbindelsen var 2-ME. Østradiol hadde svak aktivitet i forhold. Det kan kanskje være en sammenheng i at 2-ME strukturelt sett likner på kolkisin (7). Kolkisin består av en aromatisk 6 ring og to 7 ringer. Det er antatt at den aromatiske A- ringen i 2-ME er homolog med c ringen i kolkisin. Resten kan være homologt med c/d ringen i 2-ME, mer potente anti-tubulinderivater kan syntetiseres ved å modifisere c/d ringen i steroidet. Kolkisin analoger har vist at b-ringene kan ha 2 aromatiske ringer, a og c, men da kan bare en av b og c være 6-ring, ikke begge (D'Amato *et al*, 1994).



Figur 10: Kolkisin (7), og 2-metoksiøstradiol (6)

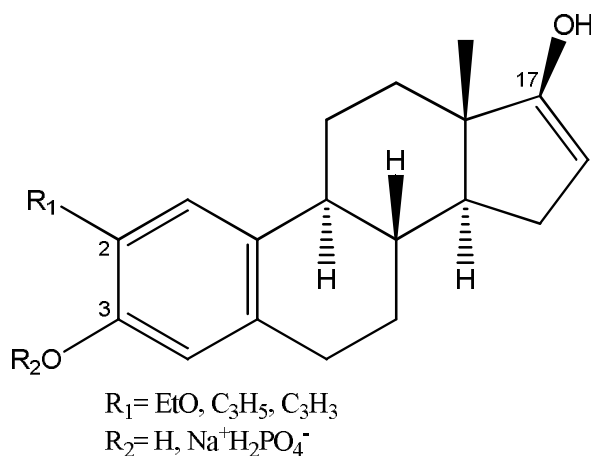
## 1.2.6 Panzem®

2-ME (Panzem®) viser lovende egenskaper i flere kliniske studier. Kliniske studier gjort på brystkreft- og prostatakreftpasienter i fase I og II viser god tolerabilitet. Antitumor aktiviteten oppnås kun ved doser høyere enn 50mg/kg som også er doseringen hvor man registrerer bivirkninger. Selv med høye doseringer på gram nivå er plasmakonsentrasjonen lav. 2-ME har kort halveringstid pga sin utstrakte metabolisme og viser dårlig biotilgjengelighet som igjen gir formuleringsutfordringer (Sutherland *et al*, 2007). Den dårlige biotilgjengeligheten kan skyldes lav vannløselighet (Edsall *et al*, 2007). I kombinasjon med paclitaxel gir den synergistiske effekter på tumor. Registrerte bivirkninger på pasienter er moderate; tretthet, diaré, forhøyede leververdier (som forsvinner ved seponering). Ingen østrogenliknende bivirkninger på koagulasjonssystemet er registrert (Mueck & Seeger, 2010). En fase II studie gjort på pasienter med prostatakreft med døgndoser på 400 eller 1200 mg resulterte i en nedgang i VEGF nivå. En studie viste signifikant reduksjon av beinsmerter ved behandling med 2-ME (200-1000mg/døgn) (Lakhani *et al*, 2003). Kombinasjonsterapi med en cytotoxisk forbindelse kan forventes å være en mer effektiv behandling mot kreft og gi færre bivirkninger (Sutherland *et al*, 2007) Flere *in vitro* studier viser at 2-ME gir additiv eller synergistisk effekt på hemming av cellevekst (Mueck & Seeger, 2010). På grunn av de ulike egenskapene til 2-ME er det mindre fare for resistens hos kreftceller (Sutherland *et al*, 2007). 2-ME har vist effekt på celler med utviklet resistens mot cytostatika (Chilman-Blair, 2003)

2-ME virker kardiobeskyttende og hemmer vekst av glatte muskelceller i kar ved regulering av cellyklus i G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> og G<sub>2</sub>/M fasene (Sutherland *et al*, 2007). Dette er vist i både dyre- og humane celler. Et dyreforsøk viste reduksjon av dødelighet ved økt nitrogenoksid syntese og hemmet syntese av endothelin, som er en sterk vasokonstriktor (Mueck & Seeger, 2010).

## 1.3 Syntese av 2-ME analoger

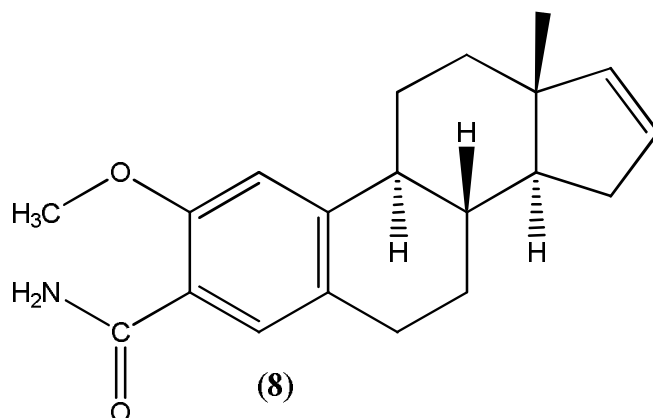
### 1.3.1 SAR studier av 2-ME



Figur 11: SAR studier gjort på 2-ME innebærer blant annet modifiseringer i posisjon 2, 3 og 17.

2-ME metaboliseres i høy grad som nevnt tidligere, og det er derfor gjort flere struktur-aktivitets forhold (SAR) studier med tanke på å fremstille analoger med forbedret farmakokinetikk. En annen tilnærming er å utvikle vannløselige prodrugs som kan metaboliseres til 2-ME. Fosfat prodrugs konverteres via uspesifikke enzymer til ønsket legemiddel (Edsall *et al*, 2007). 2,3 og 17- posisjonene er godt egnet for modifisering. Flere ulike substituent er testet med tanke på potensering av de ulike egenskapene til 2-ME. Økt biologisk aktivitet er observert når metylgruppen i 13-posisjonen erstattes med en etylgruppe samtidig som hydroksylgruppen i 17- posisjonen er metylert. Studier gjort på D-ringen viser at dehydrogenering gav dårligere interaksjon med tubulin (Rao *et al*, 2008). Analoger med modifisert 3 og 17 posisjon viser bedre motstand mot metabolisme og bedre biotilgjengelighet (Sutherland *et al*, 2007). Den antiproliferative aktiviteten avhenger av hydrogenonor egenskaper til substituenten på C3. Dersom hydroksylgruppen i 3-posisjon erstattes med tiol, reduseres aktiviteten betraktelig, hvilket skyldes at tiol ikke kan danne hydrogenbindinger. Nitrogenholdige grupper er hydrogendonorer og viser antiproliferativ aktivitet (Suwandi *et al*, 2009). Modifisering av elektroneffekten i posisjon 2 og 17 er viktig for tubulin aktivitet. Oksidasjon av hydroksylgruppen på C17 forventes å gi lavere potens og demetylering på C2 er uheldig, fordi dette gir et katekol som kan interagere med DNA. Små, steriske substituent

på C2 er heldig for tubulin-hemming, og signifikant mer polare og større, steriske substituer er uheldig (Edsall *et al*, 2004). Analoger med 2- eller 3- karbonkjeder i posisjon 2 som inneholder en dobbeltbinding, oksygen eller nitrogen viser mer potent hemming av tubulin polymerisering. Forgrenede karbonkjeder i posisjon 2 gir lavere aktivitet (Muranaka, 2001); likeså substituenten som er elektrontiltrekkende og reduserer elektrontettheten i den aromatiske A-ringene. For å forbedre aktiviteten kan elektrondonerende substituenten virke lovende (Edsall *et al*, 2004). Det er allerede syntetisert en lovende analog, kalt ENMD-1198 (**8**), hvilket har et primært amid i 3-posisjonen og et olefin i 17-posisjonen. Denne viser høyere antiproliferativ- og antiangiogenese aktivitet og har bedre biotilgjengelighet enn 2-ME. Den lovende analogen er testet ut i fase I studier (Agoston *et al*, 2009).

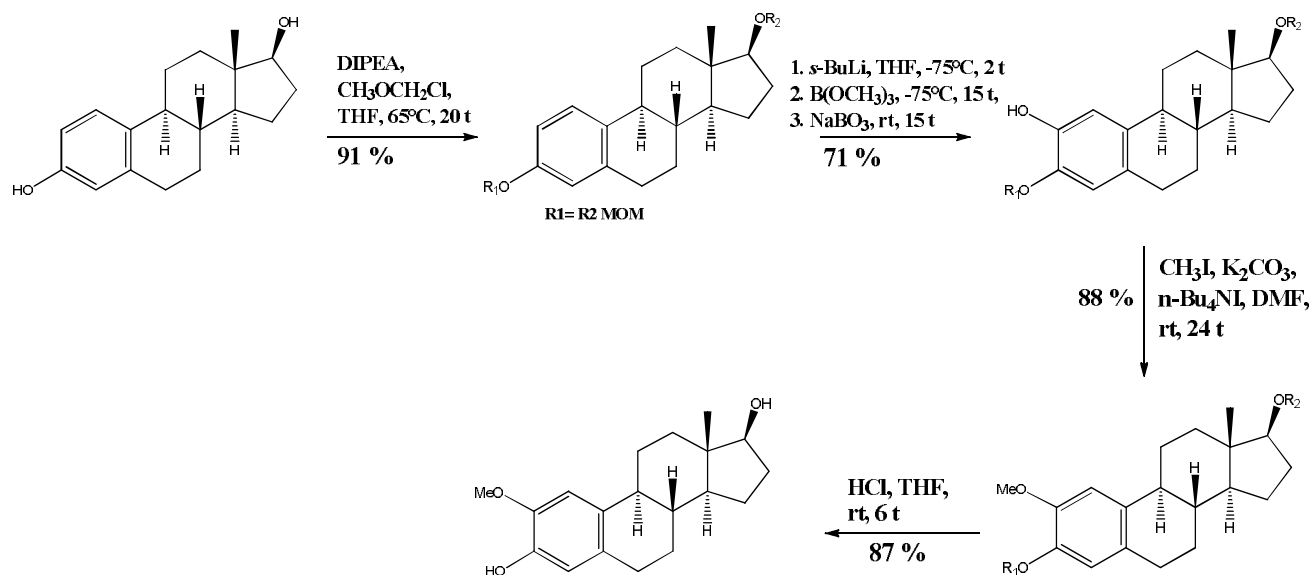


Figur 12: ENMD 1198 (**8**)

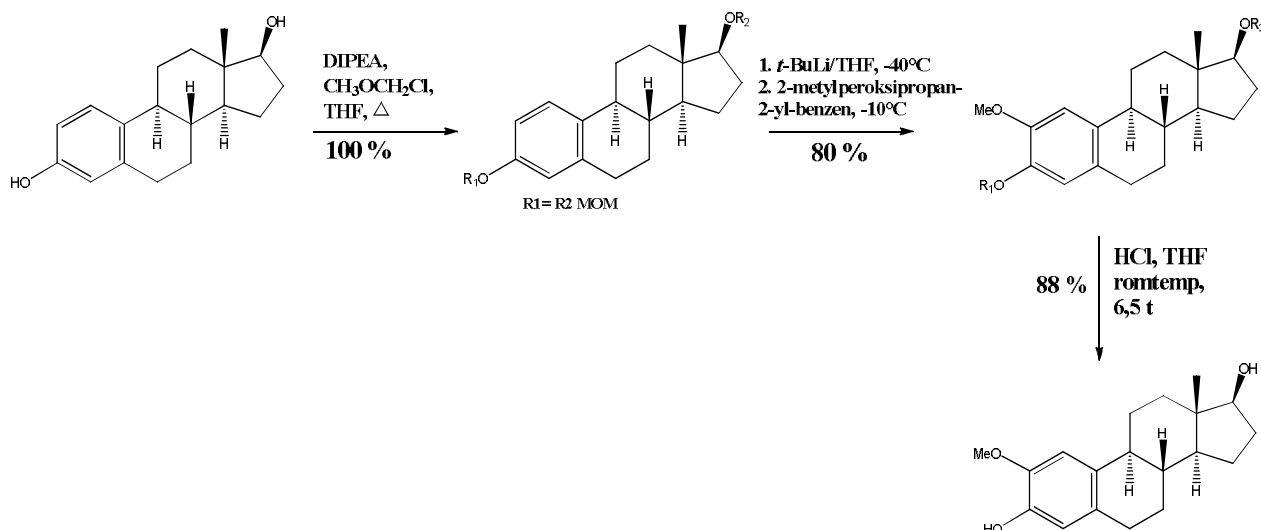
### 1.3.2 Noen utvalgte synteser av 2-ME

Flere synteser er rapportert av 2-ME. De tre utvalgte syntesene (figur 13-15) varierer noe, fellesnevneren er at 17 $\beta$ - $\delta$ stradiol er utgangsstoff. Antall syntesetrinn varierer fra tre til fire og totalt utbytte er 50 % for syntese 1 (figur 13), 70 % for syntese 2 (figur 14) og 20 % for syntese 3 (figur 15). Det første syntesetrinnet i alle syntesene innebærer innføring av beskyttelsesgruppen metoksimetyl eter (MOM) for å beskytte de to hydroksylgruppene på henholdsvis den aromatiske ringen og den alifatiske 5-ringene. Betingelsene for reaksjonen varierer i noen grad, tetrahydrofuran er valgt som løsemiddel og reaksjonsblandingen varmes opp. Neste trinn for syntese 1 og 3 er hydroksylering før metylering i neste trinn. Syntese 2

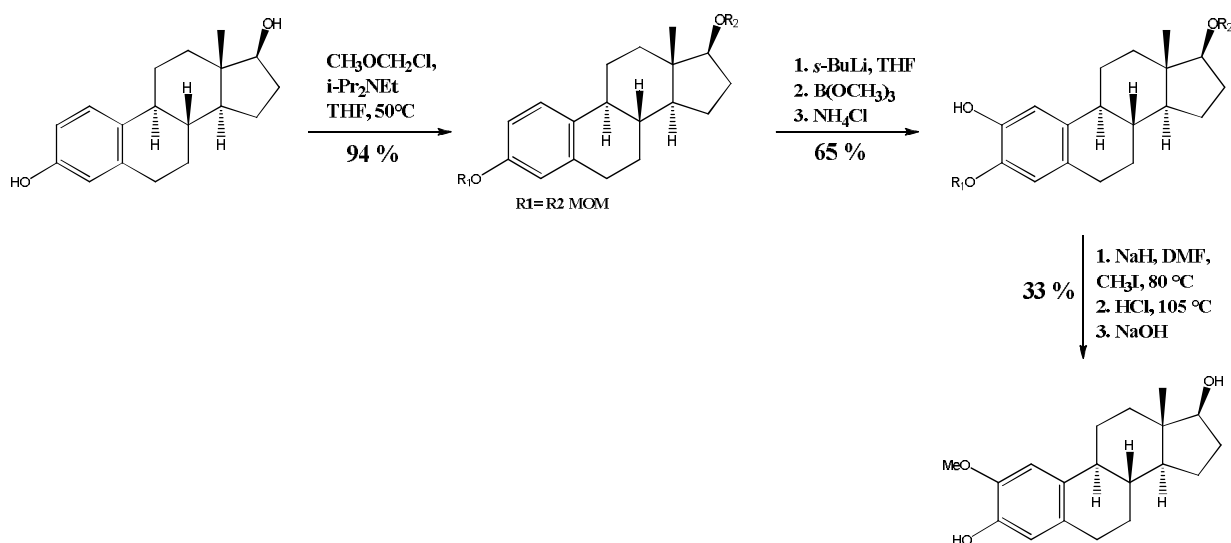
hopper over hydroksylering-trinnet og innfører en metoksigruppe direkte på benzenringen. Siste trinn for alle syntesene er fjerning av beskyttelsesgruppene. Dette oppnås i surt miljø.



Figur 13: Syntese 1. Syntese av 2-ME over fire syntesetrinn. (Lee et al, 2007)



Figur 14: Syntese 2. Syntese av 2-ME over tre syntesetrinn. (Hou et al, 2009)



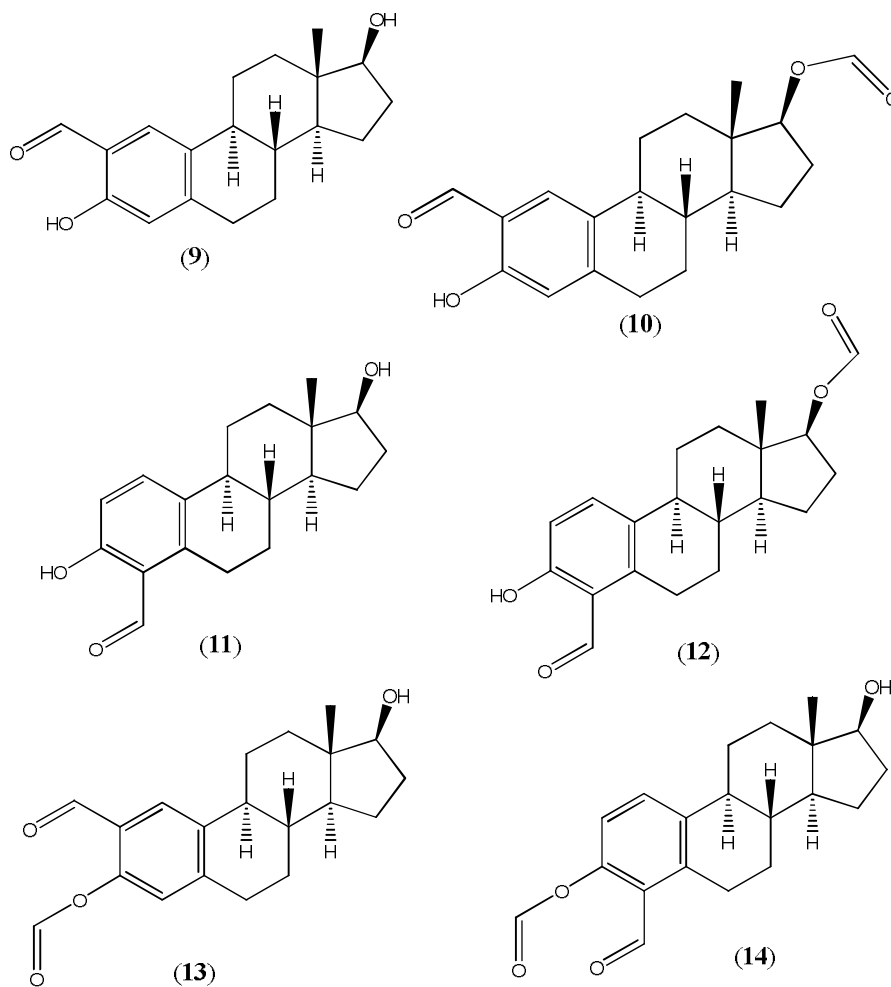
Figur 15: Syntese 3. Syntese av 2-ME over 3 syntesetrinn. (Mun et al, 2006)

### 1.3.3 Strategi for å syntetisere 2-ME analoger

Første reaksjon i syntese av nye 2-ME analoger er en *ortho*-formylering av utgangsstoffet østradiol. Østradiol har en aromatisk 6-ring med en hydroksylgruppe i 3-posisjon, og i første syntesetrinn skal en formylgruppe innføres i 2-posisjonen som er i *ortho*-posisjon.

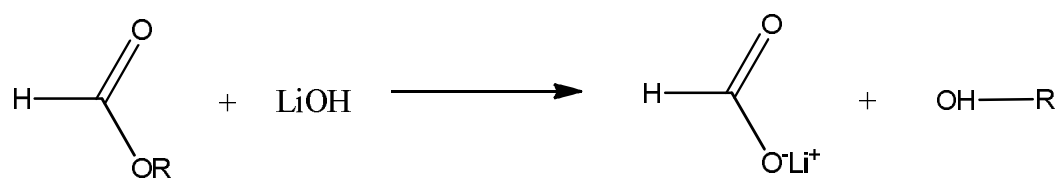
Hydroksylgruppen er en sterk aktiverende gruppe og er *ortho*- og *para*-dirigerende i elektrofile substitusjoner. Magnesiumklorid sammen med trietylamin gjør reaksjonen mer *ortho*-selektiv og kombinasjonen av disse er helt nødvendig for at reaksjonen skal skje (Hofsløkken & Skattebøl, 1999). Trietylamin fjerner hydrogenet. Aldehydgruppen fra formaldehyd forventes å reagere med karbonet i *ortho*-posisjonen til den tertiære alkoholen.

*Ortho*-formylering av østradiol kan i teorien gi seks sannsynlige produkter.



Figur 16: De seks teoretisk mulige produktene ved ortho-formylering av østradiol

2- Isomeren (9) er den ønskede forbindelsen som skal isoleres. Det er rapportert at formylering av østradiol (19) kan gi formatestre som må hydrokysyleres (Akselsen & Hansen). (se figur 17).



Figur 17: Forenklet reaksjonslikning av basisk esterhydrolyse av formatester



Andre reaksjon innebærer en reduktiv aminering av aldehydet. Metoden er selektiv redusering av iminet, ettersom det vil være aldehyd tilstede. Dette gjøres ved katalytisk hydrogenering; C=N bindingen i iminet er svakere enn C=O bindingen i aldehydet. Det skal benyttes to ulike prosedyrer for reaksjonen. Den første prosedyren (se 2.2) bruker NaBH<sub>4</sub> som reduksjonsmiddel, det er mulig at dette vil redusere det mer elektrofile aldehydet fremfor iminet. Modifiserte borohydrider som [NaB(CN)H<sub>3</sub> eller NaB(OAc)<sub>3</sub>H] blir foretrukket siden de er mer selektive i å redusere iminsaltet og stabiliserer det i surt miljø. (Solomon & Fryhle, 2004) Den andre prosedyren (se 2.3) benytter 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks som reduksjonsmiddel.

## 1.4 *Ortho*-formylering av fenoler

### 1.4.1 Generelt

Første reaksjon i syntese av nye 2-ME analoger er en *ortho*-formylering av utgangsstoffet østradiol. Reaksjonen er en aromatisk elektrofil substitusjon hvor et hydrogen erstattes med et elektrofilet aldehyd. Det som er viktig med denne reaksjonen er at reaktantene krever tørre betingelser og stiller derfor krav til tørt utstyr og bruk av argon/ nitrogen. Substituentene på utgangsstoffet kan ha betydning for utbytte. Elektron-donerende grupper favoriserer reaksjonen kontra elektron-tiltrekkende grupper. Substrater med elektron-tiltrekkende grupper reagerer dårligere og fullstendig konvertering av utgangsstoff kan være vanskelig selv med forlenget reaksjonstid (Hofsløkken & Skattebøl, 1999).

### 1.4.2 Casaraghi metoden (Casiraghi *et al*, 1978, 1980)

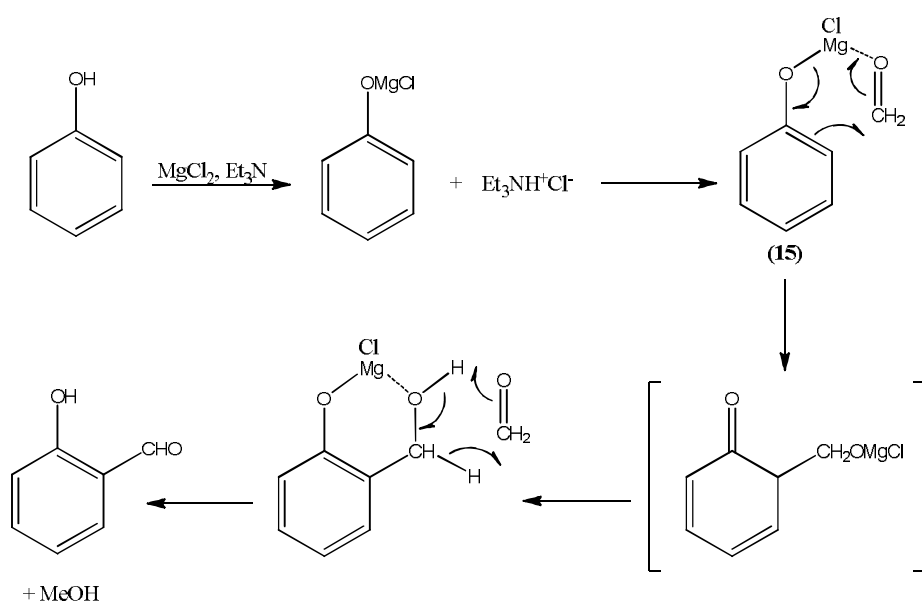
For flere år tilbake rapporterte Casiraghi *et al.* om reaksjon av paraformaldehyd med magnesium fenoksider som gav regioselektiv *ortho*-formylering på fenoler. De benyttet støkiometrisk mengde av heksalmetylfosfortriamid (HMPTA) i benzen hvilket gav høyt utbytte (50-90 %) i forhold til andre rapporter med flere synteserinn og lavere utbytte (<50 %). Magnesiumionet spiller en rolle for selektiviteten og tenkes å aktivere det elektrofile

aldehydet og den aromatiske ringen. Magnesiumreagens-komplekset som driver reaksjonen fremover kan forhindres i nærvær av en 2-metoksi gruppe og derfor oppnådde de ingen reaksjon med 2-metoksi som substituent. 4-metoksifenol derimot var reaktiv.

### 1.4.3 Skattebøl metoden (Hofsløkken & Skattebøl, 1999)

Dette er en forenklet versjon av Casiraghi metoden. Denne metoden gir økt utbytte, færre biprodukter, og gjør bruken av metall kompleksende agent heksalmetylfosfortriamid (HMPTA) overflødig. Paraformaldehyd med magnesiumklorid og trietylamin som base gav selektive *ortho*-formyleringer på fenolderivater. Magnesiumsaltet (**15**) som dannes er helt nødvendig for produktdannelse; ingen reaksjon ble observert når en løsning med fenol, trietylamin, paraformaldehyd i acetonitril ble refluxert i 48 timer. Høyt utbytte av korresponderende salisylaldehyder ble oppnådd med alkylsubstituerte fenoler. Liknende resultater gav kloro-substituerte fenoler, mens 2-metoksifenol var ureaktiv.

Elektrontiltrekkende grupper forlenger reaksjonstiden og fører til dannelse av biprodukter. Men dette problemet har blitt løst ved å redusere mengden paraformaldehyd til tre-fire ekvivalenter samt ved bruk av tetrahydrofuran som løsningsmiddel (Hansen & Skattebøl, 2005).

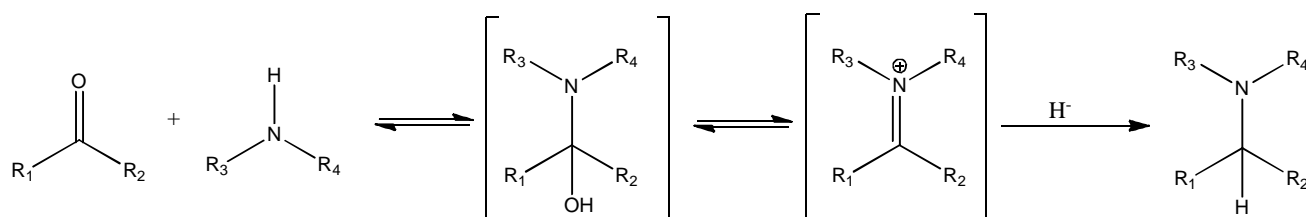


Figur 18: Generell reaksjonsligning *ortho*-formylering av fenoler (Hofsløkken & Skattebøl, 1999).

## 1.5 Reduktiv aminering av aldehyder

### 1.5.1 Generelt

Aminer er viktige funksjonelle grupper i mange legemidler, og reduktiv aminering er en kjent reaksjon innenfor syntese av legemidler og deres mellomprodukter. Reduktiv aminering, også kalt reduktiv alkylering, innebærer kondensasjon av et aldehyd eller keton med et amin i nærvær av et reduksjonsmiddel. Mekanisme: nukleofil addisjon av et amin på en karbonylgruppe, hvilket gir en aminoalkohol, fulgt av dehydrering til et iminiumion som blir redusert til et amin (se figur 19) (Baxter & Reitz, 2002). Iminformasjonen er reversibel, men hydrid addisjonen er ikke det (Solomons & Fryhle, 2004).



Figur 19: Generell reduktiv amineringsreaksjon. Først dannes aminoalkohol, deretter et imin som reduseres til et amin. Det siste trinnet er irreversibelt.

Utvalget av substrater kan variere i stor grad. En rekke funksjonelle grupper tolereres i reaksjonen (karboksylsyrer, estere, amider, hydroksi, nitril, nitro). For en vellykket reaksjon er valget av riktig reduksjonsmiddel sentralt. Natrium cyanoborohydrid (NaBH<sub>3</sub>(CN)), er det mest kjente hydridreagenset innenfor reduktiv alkylering. Det er likevel mange andre reduksjonsmidler som kan benyttes: natrium borohydrid (NaBH<sub>4</sub>), litium cyanoborohydrid, tetrabutylammonium cyanoborohydrid for å nevne noen (Baxter & Reitz, 2002).

Reduksjonsmiddelet må tåle de betingelser som er tilstede og skal selektivt redusere iminet til et amin. pH 5-7 er optimal for reduksjon av iminer. Vann er et biprodukt og imindannelse kan forhindres, spesielt for ketoner og aminer med høy vannløselighet. Man kan risikere å få alkoholer som biprodukter ved reduksjon av karbonylgruppen. Derfor er det viktig at imindannelsen går raskere enn en eventuell aldehyd-reduksjon. Iseddik benyttes for å

favorisere imindannelse ved reaksjon med et keton. For alifatiske aldehyder vil derimot iseddik favorisere aldehydreduksjon. Tre syrestabile reduksjonsmidler kan brukes: natrium cyanoborohydrid, natrium triacyloksiborohydrid og amin boraner. Andre midler er ikke-selektive og vil dekomponere i surt miljø (Burkhardt & Coleridge, 2008).

For vanskelige reaksjoner kan molekylærsieve og Lewis syre være nyttig. Molekylærsieve promoterer imindannelse ved å absorbere vann, og driver reaksjonen fremover. Reduktiv aminering er ikke alltid vellykket; ingen reaksjon, eller dannelse av biprodukter kan observeres. De vanligste sidereaksjonene er *bis*-alkylering av primære aminer og reduksjon av karbonylgruppen. De fleste alifatiske og aromatiske primære og sekundære aminer inngår i reductive amineringer. Primæraminer inngår gjerne i dialkylering med aldehyder, fordi det monoalkylerte produktet er ofte mer nukleofilt enn startaminet. Dette kan unngås ved å bruke mindre av karbonylforbindelsen, og ved å sørge for at imindannelsen er ferdig før tilsetning av reduksjonsmiddel. Alifatiske aminer kan være mindre reaktive enn aromatiske aminer fordi de blir lettere protonert, og dermed er mindre av det frie aminet tilgjengelig for reaksjon. Sterisk hindrede aminer som f. eks *tert*-butyl amin reagerer lett med aldehyder. Elektronfattige aniliner kan ofte brukes i reduktiv aminering med aldehyder. Sekundære aromatiske aminer sammen med aromatiske aldehyder og ketoner er problematisk, bare få vellykkete reaksjoner er rapportert. Dersom imindannelsen er treg pga dårlig reaktivitet av reaktantene kan sidereaksjoner være uunngåelig. Høyere pH kan favorisere iminreduksjon over karbonylreduksjon. Mislykkete reaksjoner skyldes gjerne ureaktive karbonylforbindelser eller ureaktivt amin i det initierende kondensasjonstrinnet. Reduktive amineringer kan i enkelte tilfeller resultere i miksturer av produkter uten noen opplagt forklaring. (Baxter & Reitz, 2002)

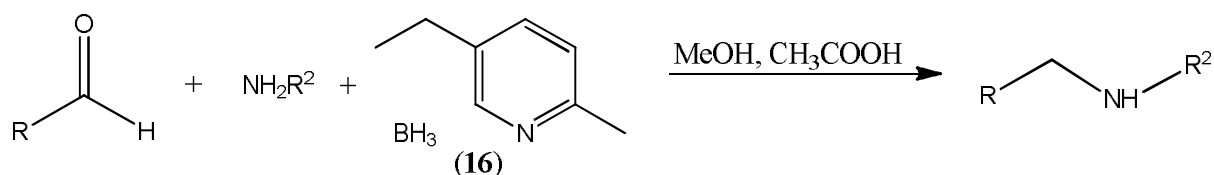
### **1.5.2 Reduktiv aminering av salicylaldehyder** (Hansen *et al.*, 2007)

Salicylaminer og derivater av disse er nyttige intermediater for syntese av heterosykler og biologisk aktive forbindelser. Reduktiv aminering av salicylaldehyder er en metode for fremstilling av salicylaminer. Hansen *et al.* rapporterte om en "one-pot" prosedyre hvor en fenol blir først omdannet til et salicylaldehyd, og deretter redusert til et salicylamin. Denne metoden er effektiv med tanke på tid og kostnader som går med til isolering, behandling og kromatografi. I artikkelen ble  $\text{NaBH}_4$  brukt som reduksjonsmiddel.  $\text{NaBH}_4$  reduserer iminer

lett, og bruk av syre er som regel ikke nødvendig. Det som er viktig er å være sikker på at iminet er dannet før tilsetning, for den reduserer aldehyder og ketoner. Det fremgår av forfatterne at det ble benyttet diverse disubstituerte aromatiske aminer. Aromatiske aminer er mindre reaktive enn alifatiske aminer, men inngår gjerne i reductive amineringer med alifatiske aldehyder. Ved fremstilling av salisylaldehyd, ble paraformaldehyd benyttet. Paraformaldehyd er meget reaktiv og reagerer med fenol. I neste trinn skal salisylaldehydet reagere med et amin, og kan være den begrensede faktoren i reduktiv aminering. Alifatiske aldehyder er mest reaktive.  $\alpha$ ,  $\beta$ -umetta aldehyder gir en sakte imindannelse. Det som begrenser reaktiviteten er steriske og elektroniske faktorer. Dårlig elektrofilisitet og sterisk hindring gir negativt utslag. I tillegg kan steriske faktorer påvirke selektivitet. (Baxter & Reitz, 2002)

### 1.5.3 Reduktiv aminering med 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks (PEMB)

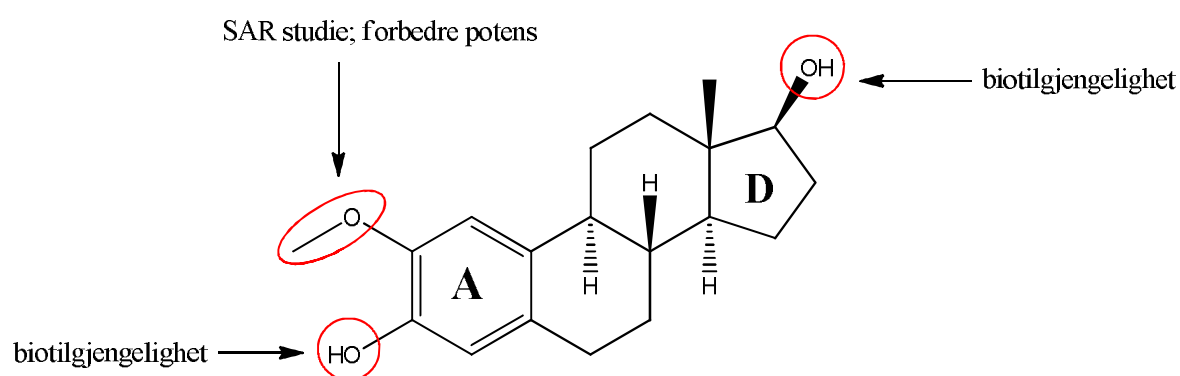
I de siste forsøkene på reduktiv aminering ble PEMB (5-etyl-2-metylpyridin boran, **(16)**) kjøpt inn og brukt. Det er flere fordeler ved bruk av PEMB. Det er på flytende form, termisk stabilt ved romtemperatur, og reagerer sakte med protiske løsemidler. PEMB er uløselig i vann. Reduksjonsmiddelet inneholder to eller tre hydrider hvilket maksimerer den reductive effekten. PEMB er fordelaktig ved at reaksjonstiden er kort, to timer eller mindre, reaksjonen trenger ikke oppvarming, og bruk av løsemiddel kan sløyfes (Burkhardt & Coleridge, 2008).



Figur 20: Generell reaksjonslikning for reduktiv aminering med et aldehyd, amin og PEMB (**16**).

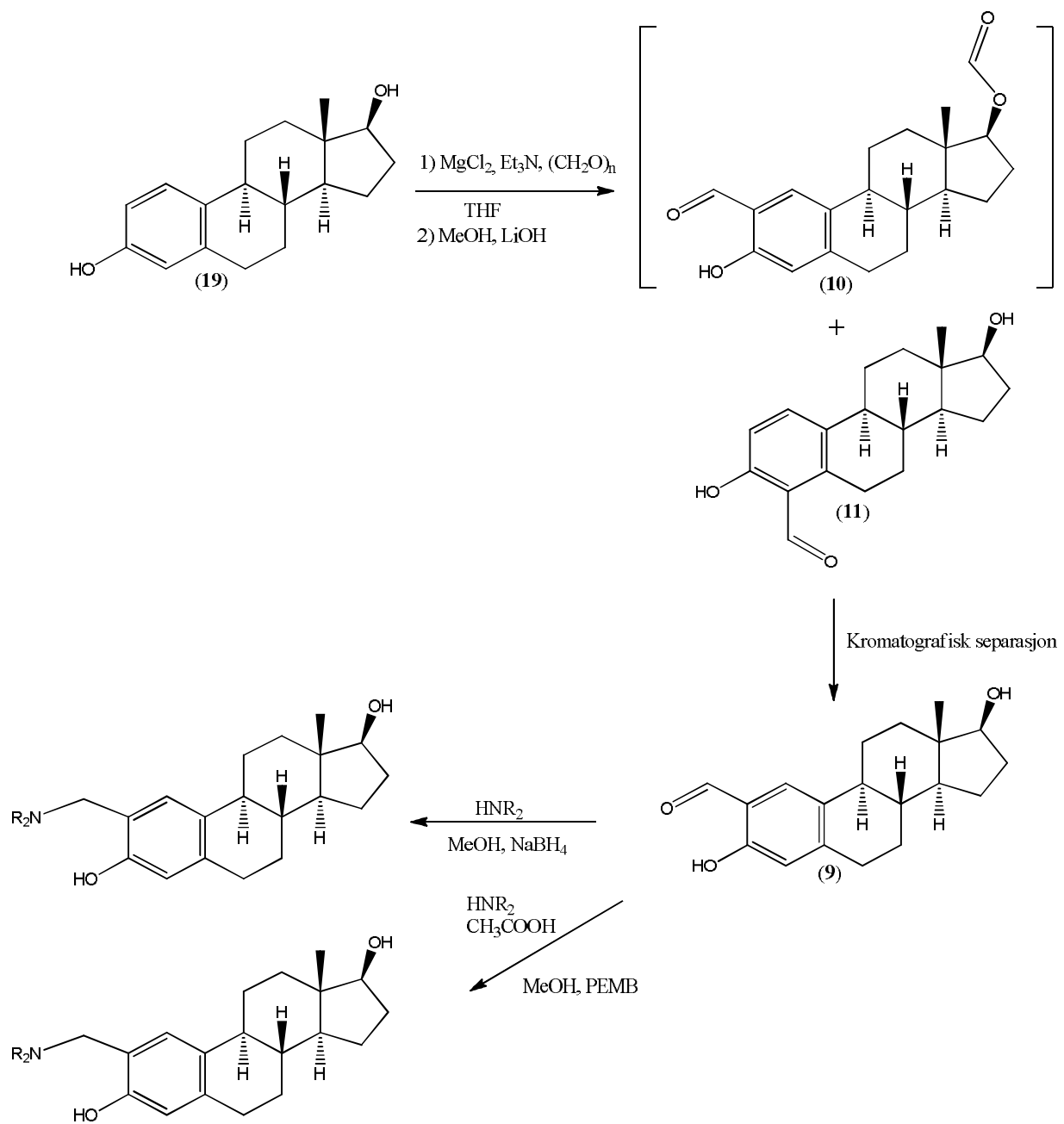
## 1.6 Mål for oppgaven

Ved å ta utgangspunkt i et lovende angiogenese-hemmende virkestoff, 2-metoksiøstradiol, som er i fase I og II studier, ble det forsøkt å syntetisere analoger med potensielt gode anticancer egenskaper. Det er kjent at 2-posisjonen på den aromatiske A-ringene har betydning for biotilgjengeligheten. Ved å gjøre modifiseringer på denne posisjonen kan man få mer informasjon om stoffets SAR.



Figur 21: Illustrasjon av mål for oppgaven- modifisering av 2-posisjonen i 2-metoksiøstradiol

Opgavens mål var å syntetisere nye analoger av lead compound 2-metoksiøstradiol ved å erstatte metoksigruppen i 2-posisjonen med et primært eller sekundært amin. Aminene fremstilles ved en kombinasjon av *ortho*-formylering og reduktiv aminering reaksjoner. Dersom det er tid og reaksjonene blir vellykket, vil det utføres biologisk testing av analogene og sammenlikne med 2-metoksiøstradiol.



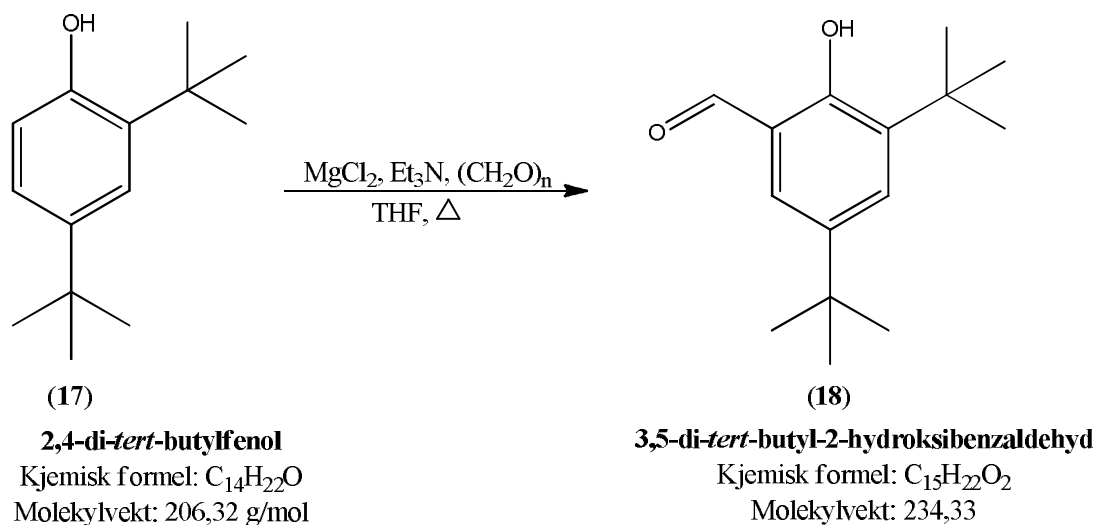
Figur 22: Alle syntesetrinn for å fremstille 2-metoksiøstradiol analoger.

## 2. Resultater og diskusjon

### 2.1 *Ortho*-formylering

#### 2.1.1 Syntese av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd

For syntesen av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd (**18**) beskrevet i kapittel 4.3.1 ble det tatt utgangspunkt i litteratur publisert av Hofsløkken og Skattebøl som beskriver *ortho*-formylering av fenoler. Denne reaksjonen er en forbedret versjon av Casiraghi-reaksjonen. Grignard reagenset er byttet ut med et magnesiumklorid-trietylamin basesystem. Casiraghi og medarbeidere har rapportert om selektive *ortho*-formyleringsreaksjoner og har antydnet at magnesiumionet påvirker selektiviteten til *ortho*-posisjonen. Hansen og Skattebøl oppgir at med tetrahydrofuran som løsemiddel gir raskere reaksjon. I dette forsøket har utgangsstoffet flere funksjonelle grupper sammenliknet med litteraturen hvor fenol ble brukt, og på grunn av sterisk hindring fra to *tert*-butyl grupper forventes en selektiv *ortho*-formylering. Betingelsene valgt for dette forsøket er likt som i litteraturen, tetrahydrofuran (tørr) er valgt som løsemiddel, magnesiumklorid-trietylamin som basesystem, og paraformaldehyd som aldehydkilde. Det fremgår i artikkelen at overskudd av paraformaldehyd gir raskere reaksjonstid.



Figur 23: Fremstilling av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd (**18**).



## Syntese 1

Dette synteseforsøket av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd (**18**) viste seg å være mislykket. Etter 3 timer med reflux viste tynnsjiktskromatografi ingen reaksjon med utgangsstoffet (**17**). Først var mistanken at magnesiumkloridet ikke var tilstrekkelig tørt, men årsaken var at mengden paraformaldehyd tilsatt var for liten.

## Syntese 2

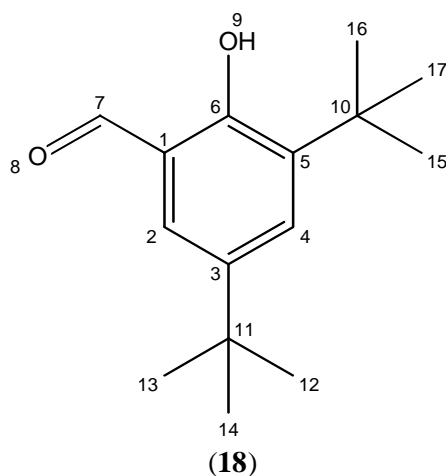
I dette synteseforsøket av 3,5-di-*tert*-2-hydroksibenzaldehyd ble antall ekvivalenter av reagensene doblet. Etter tre timer med reflux viste tynnsjiktskromatografi at utgangsstoff (**17**) hadde reagert og dannet et produkt som var meget synlig under ultrafiolett lys.

Råprodukt: gul olje. Utbytte (råprodukt): 74 %. Utbytte (renset produkt): 49 %. Produkt: Gult, fast stoff. Dersom utbyttet av (tall) 49 % sammenliknes med et nesten tilsvarende produkt, 3-*tert*-butylsalisylaldehyd 83 %, fra Hofsløkken og Skattebøl, er dette lavt. Det må dog nevnes at artikkelforfatterne brukte acetonitril som løsemiddel, og dette kan ha hatt betydning.

## Syntese 3

Dette synteseforsøket av 3,5-di-*tert*-2-hydroksibenzaldehyd ble gjort på akkurat samme måte som i syntese 2. Det ble ikke gjort noen endringer for å forsøke å utbedre utbyttet i reaksjonen. Utbytte (råprodukt): 33 %.

### $^1\text{H}$ NMR og $^{13}\text{C}$ NMR tolkning av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd (**18**)



Figur 24: Nummerering av 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd (**18**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter

Ved diskusjon av  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ - NMR spektra tas det utgangspunkt i figur 24.

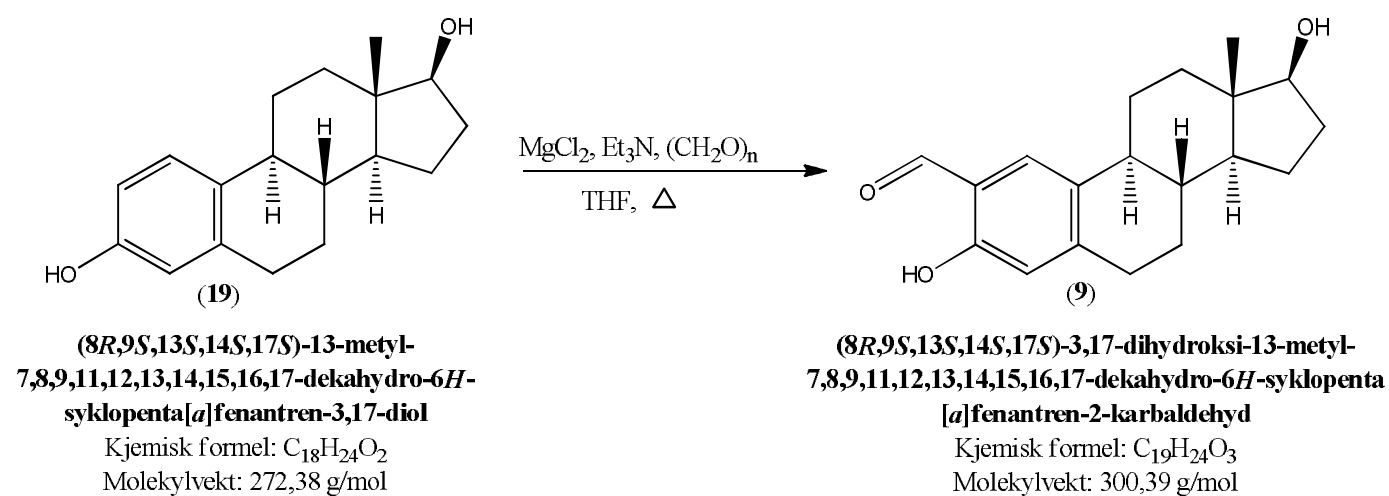
$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 1): Signalet ved 11,65 ppm (s, 1H) er hydroksylgruppen i posisjon 9. En singlett ved 9,87 ppm (s, 1H) er aldehydet i posisjon 7. I det aromatiske området av spekteret observeres to signaler ved 7,35 ppm (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H) og 7,60 ppm (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H). Disse er begge dubletter hvilket integrerer for et proton hver og koblingskonstanten viser at de er *meta*-koblet. Signalene er de to aromatiske protonene i posisjon 2 og 4. Tre lave signaler observeres ved 3,46 3,94 og 4,64 ppm, disse er mest sannsynlig forurensninger. I alifatisk område ved 1,44 ppm (s, 9H) og 1,33 ppm (s, 9H) er to høye signaler som begge integrerer for ni protoner hver. Dette må være signaler for de to *tert*-butylgruppene. Protonene i posisjon 15,16 og 17 tilhører signalet ved 1,44 ppm. Dette skyldes at de er nærmere hydroksylgruppen i posisjon 9 enn protonene i posisjon 12,13 og 14 som mest sannsynlig er signalet ved 1,33 ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 2): Signalet ved 197,73 ppm er karbonet i aldehydet i posisjon 7. I det aromatiske området av spekteret fra 159,49-120,39 er det seks signaler for de seks karbonene som utgjør benzenringen i strukturen (**18**). Karbonet i posisjon 6 som er bundet til hydroksylgruppen i posisjon 9 får høy ppm verdi på grunn av de elektrontiltrekkende egenskapene til fenol og er signalet ved 159,49 ppm. Karbonet i posisjon 1 kan være signalet ved 142,02 ppm, dette karbonet er i nærheten av aldehydgruppen og kan derfor få høyere ppm verdi enn de andre aromatiske karbonatomene. De resterende signalene ved 137,99 ppm, 132,29 ppm, og 128, 23 ppm er karbonatomene i posisjon 2, 3, og 5. Karbonet i posisjon 4 kan være signalet ved 120,39 ppm ettersom dette karbonet er lengst unna de to elektrontiltrekkende oksygenatomene. I det alifatiske området 35,42-29,67ppm er det åtte signaler som er for de åtte alifatiske karbonatomene som utgjør de to *tert*-butylgruppene.

### **2.1.2 Syntese av (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-dihydrokso-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd**

Østradiol har en aromatisk 6-ring med en hydroksylgruppe i 3-posisjon, og i første syntesetrinn innføres en formylgruppe i 2-posisjonen som er *ortho*-posisjonen. Hydroksyl er

en sterkt aktiverende gruppe, og er *ortho*- og *para*-dirigerende i elektrofile substitusjoner. Fenoler er sure, pKa 9-10. Ut fra dette kan man forvente at formaldehyd vil ikke kun reagere med 2-posisjonen, men også 4-posisjonen på den aromatiske ringen. I tillegg er det kjent at dannelse av formatester biprodukt er vanlig (referans: supporting information, akselsen, hansen). Den eksperimentelle prosedyren (se 4.3.2) tar utgangspunkt i publisert litteratur av Hansen og Skattebøl Dette forsøket ble gjentatt totalt 15 ganger, ikke alle syntesene var helt vellykkede. Det ble lenge antatt at grunnen til problemet var det omkrystalliserte utgangsstoffet (**19**), denne gjetningen skyldtes NMR spektra tatt som viste innhold av vann. Deretter ble det gjort flere forsøk på å fjerne vannet. Fjerning av vann ble gjort slik; østradiol ble løst i tetrahydrofuran og toluen, deretter tørket med magnesiumsulfat og dampet inn på rotavapor. Inndampet stoff ble tørket på vakuum over natt med varmebad. Resultatet av dette ble et vellykket forsøk og dermed ble det antatt at problemet var løst. Så fulgte mer eller mindre vellykkede forsøk og utgangsstoff ble tørket på nytt, inntil ikke-omkrystallisert stoff ble brukt istedet; dette så ut til å fungere. Gjenværende problem var at tynnsjikt-kromatografi viste smårester av utgangsstoff i reaksjonsblandingen. Tiltak som ble gjort var å sette magnesiumklorid til tørking i varmeskap (120 °C) over natten før forsøk. Etter 13 gjennomførte forsøk på *ortho*-formylering ble det oppdaget at problemet var en av reagentene, paraformaldehyden. Grunnen til den dårlige kvaliteten på stoffet skyldtes en ikke-isolert eksikator. Løsningen ble å bytte ut eksikatoren med en ny, og ha en mindre beholder med mindre paraformaldehyd.



Figur 25: Fremstilling av (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-dihydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[a]fenantren-2-karbaldehyd (**9**).

### Syntese 1

Første forsøk på å syntetisere (**9**) gikk ikke som forventet. Forsøket ble gjort som beskrevet i kapittel 5.3.2. Tynnsjiktskromatografi viste at lite av utgangsstoff (**19**) hadde reagert, selv etter 3,5 timer med refluks. Forsøket ble gjort i småskala: 0,5 mmol av (**19**).

### Syntese 2

Forsøket ble forsøkt på nytt med samme mengder av reaktantene. Tynnsjiktskromatografi av reaksjonsblandingen viste ingen endring etter to timer med refluks. Etter tre timer observeres noe produktdannelse, men også mye utgangsstoff er igjen. Mistanken var da at de tørre betingelsene ikke er tilstrekkelig oppfylt og  $^1\text{H}$  NMR spekter ble tatt av østradiol. Spekteret viste at det omkrystalliserte utgangsstoffet inneholdt vann. Tiltaket ble å sette (**19**) i varmeskap.

### Syntese 3

Forsøket gjentas med litt høyere stoffmengder 0,9 mmol (**19**). Etter 1,5 timer med refluks viste tynnsjiktskromatografi antydning til reaksjon. Ny prøve av reaksjonsblandingen etter 3,5 timer viste dannelse av produkt, men fortsatt mye utgangsstoff igjen. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet. Utbytte (råprodukt): 35 %. Tok  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av råprodukt.

### Syntese 4

Dette forsøket ble gjort på samme måte som de tidligere, denne gangen med 1 mmol (**19**). Denne gangen ble rekkefølgen på tilsetningen av reaktantene endret, østradiol ble tilsatt først, de tidligere gangene ble østradiol tilsatt sist. Etter 2,5 timer med refluks viste tynnsjiktskromatografi at reaksjonen var vellykket, ingen rester av (**19**) var synlig. Dette skyldes nok i høy grad at kolben med omkrystallisert (**19**) ble ikke brukt denne gangen, men en boks med ubehandlet (**19**). Dette var mye vanskeligere å jobbe med, pga diffundering ut i luften og stoffet klistret seg overalt.  $^1\text{H}$  NMR spekter ble tatt av råprodukt og viste at produkt inneholdt en formatestergruppe. Esteren ble hydrolysert som beskrevet i kapittel 5.3.2. Tynnsjiktskromatografi av produkt etter hydrolysen viste fravær av ester. Utbytte (etter hydrolyse): 52 %

### **Syntese 5**

Dette forsøket ble mislykket, lite av utgangsstoffet (**19**) ble omdannet av uviss grunn.

Reaksjonen ble stanset etter tre timer og forkastet.

### **Syntese 6**

I dette forsøket viste tynnsjikt-kromatografi etter 1,5 timer med reflux ingen reaksjon. Mer paraformaldehyd ble tilsatt. Etter to timer var det antydning til reaksjon, reaksjonen ble dermed stanset og avkjølt også ble det forsøkt å tilsette reagenser på nytt (alle unntatt østradiol) for å se om dette ville endre noe. Denne reaksjonsblandingen ble refluxert i to timer og tynnsjikt-kromatografi viste ingen rester av (**19**). Utbytte (råprodukt): 123 %, dette skyldes nok at så mye mengde reagenser ble tilsatt. <sup>1</sup>H NMR ble tatt av råprodukt og av utgangsstoff (**19**) som igjen viste vanninnhold, dette forklarer hvorfor reaksjonen gikk dårlig. Det ble forsøkt å fjerne vann på nytt.

### **Syntese 7**

Dette forsøket var ifølge tynnsjikt-kromatografi vellykket. Reaksjonen ble stanset etter 1,5 timer med reflux. Råprodukt: gul, oljeaktig. Utbytte (råprodukt): 91 %. <sup>1</sup>H NMR av råprodukt ble tatt.

### **Syntese 8**

I dette forsøket ble stoffmengdene oppskalert, forbindelse (**19**) til 2 mmol. Reaksjonen ble stanset etter 1 time med reflux ettersom tynnsjikt-kromatografi viste ingen rester av (tall). Råprodukt: gul, oljeaktig. Utbytte (råprodukt): 91 %. Det som er verdt å nevne er at mengden reaktanter (unntatt østradiol) ble feil. På grunn av regnefeil ble det tilsatt seks ekvivalenter av magnesiumklorid istedenfor tre osv.

### **Syntese 9**

Dette forsøket var vellykket ifølge tynnsjikt-kromatografi, tatt etter 1,5 timer med reflux.

Råprodukt: gul/oransje olje. Utbytte (råprodukt): 102 %

### **Syntese 10**

Dette forsøket var vellykket, tynnsjiktskromatografi viste etter 1 time med reflux produktdannelse og ingen rester av (19). Reaksjonen ble stanset etter 1,5 timer. Utbytte (råprodukt): 111 %

### **Syntese 11**

Dette forsøket gikk raskt, allerede etter 20 minutter viste tynnsjiktskromatografi at noe av (19) hadde reagert. Reaksjonen ble stanset etter 45 minutter. Utbytte (råprodukt): 91 %

### **Syntese 12**

Dette forsøket var en sammenslåing av batchene fra syntese 7 og 8 som viste rester av utgangsstoff (19). Etter 1,5 timer med reflux viste tynnsjiktskromatografi produktdannelse og reaksjonen ble stanset. Utbytte (råprodukt): 72 %

### **Syntese 13**

I dette forsøket gikk reaksjonen saktere, muligens reaktantenes kvalitet begynte å forringes. Tynnsjiktskromatografi av reaksjonen etter 1,5 timer viste ingen produktdannelse. Reaksjonen ble stanset og avkjølt. Deretter ble mer paraformaldehyd og trietylamin tilsatt. Etter en time ble det observert produktdannelse, reaksjonen ble stanset etter 1,5 timer. Utbytte (råprodukt): 117 %. Dette høye utbyttet skyldes nok rester av reaktanter, som trietylamin.

### **Syntese 14**

Forsøket ble stanset etter to timer med reflux. Utbytte (råprodukt): 87 %

### **Syntese 15**

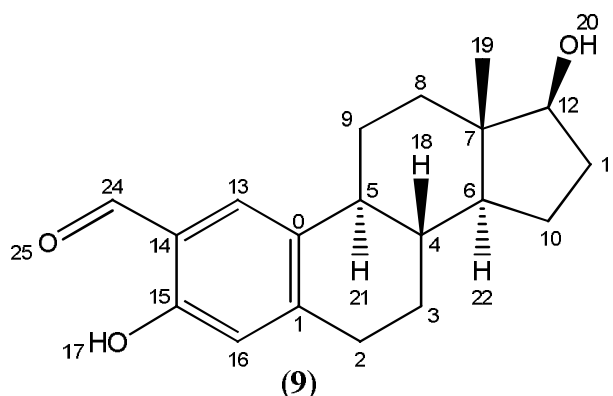
I dette forsøket ble mengden reaktanter oppskalert, 3 mmol (19). Dette var siste stoffmengden av (19) som var igjen, det ble ikke kjøpt inn noe nytt stoff. Tynnsjiktskromatografi viste produktdannelse etter en time med reflux og ingen rester av (19). Utbytte (råprodukt): 105 %.

<sup>1</sup>H- NMR-spekter av råprodukt fra alle syntesene viste at (10) ble dannet, og formatesteren lot seg enkelt fjerne ved en basisk esterhydrolysereaksjon. Før hydrolyse ble råproduktet tilsatt

metanol og dampet inn på rotavapor for å bli kvitt rester av etylacetat fra syntesereaksjonen. For esterhydrolysereaksjonen ble metanol benyttet som løsemiddel ettersom det favoriserer hydrolyse. Litiumhydroksid fungerte som base, hvilket har et hydroksidion som opererer som en nukleofil og angriper karbonyl karbonatomet. Litiumkarboksylatet som blir dannet er så lite reaktivt at reaksjonen er irreversibel (Solomons & Fryhle, 2004) (se figur 17). Varme ble tilført reaksjonen og det ønskede produktet (**9**) ble dannet. Utbyttet av hydrolysereaksjonen var relativt høyt, til eksempel ble syntese 14 og 15 (se kapittel 2.1.2) slått sammen for hydrolysereaksjon, og utbyttet etter hydrolyse var 87 %. Reaksjonen ble kontrollert med <sup>1</sup>H-NMR hvilket viste ingen rester av formatester.

Videre ble produktet, hvilket var en regioisomerisk blanding av (**9**) og (**11**), rensed ved kolonnekromatografi. På grunn av isomerenes strukturellighet og tilnærmet like R<sub>f</sub>-verdier, var det en utfordring å få dem separert. I mellomtiden ble et forsøk på reduktiv aminering utført (se 2.2.1). Separasjonen ble fullført ved bruk av tradisjonell søylekromatografi og automatisert søylekromatografi. Dette ble gjort for at (**9**) som utgangsstoff i det neste syntesetrinnet skulle være så rent som mulig for å unngå problemer med isomerblandinger. Total mengde ren 2-isomer produkt etter rensing var 1,3 g hvilket utgjorde 39 % av mengden råprodukt. Dette forteller at mye stoff gikk dessverre tapt i renseprosessen.

Tolkning av <sup>1</sup>H NMR og <sup>13</sup>C NMR spektrene av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd (**9**)



Figur 26: Nummerering av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd (**9**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 26.

$^1\text{H}$  NMR-spekteret (se vedlegg 3) er i overensstemmelse med litteratur (Akselsen & Hansen), endog ikke så rent, dette tyder på at produktet (**9**) inneholder rester av utgangsstoff (**19**).

Signalet ved 10,78 ppm (s, 1H) er hydroksylgruppen i posisjon 17 og signalet ved 9,81 ppm (s, 1H) er aldehydet i posisjon 24. De to aromatiske protonene i posisjon 16 og 13 er, som forventet, i det aromatiske området 6,5-8,5 ppm. Ettersom det ikke er symmetri i den aromatiske ringen har de to protonene ulike kjemiske shift verdier. De har *para*-kobling og observeres som singletter. Protonene observeres ved 7,43 ppm (s, 1H) og ved 6,70 ppm (s, 1H). Protonet i posisjon 16 kan ha mindre elektrontetthet enn protonet i posisjon 13 på grunn av kort avstand til hydroksylgruppen i posisjon 18. Dermed er signalet ved 7,43 ppm protonet i posisjon 16 og signalet ved 6,70 ppm protonet i posisjon 13. De lave signalene i området 7,17-6,55 er rester av 4-isomer (**11**). I det alifatiske området av spekteret observeres en multiplett ved 3,78-3,71 ppm (m, 1H), dette er for et av de alifatiske protonene i strukturen til forbindelse (**9**). En multiplett ved 2,94-2,86 ppm (m, 2H) integrerer for to alifatiske protoner. Ved 2,40-1,12 ppm (m, 23H) er det mange signaler som fremstår som en multiplett. Disse signalene skal integrere for 14 protoner slik at det totale antallet protoner for forbindelse (**9**) blir 24, men i stedet er det integrert for 23 protoner. Dette skyldes at det er rester av 4-isomer. Som forventet er metylgruppen i posisjon 19 som integrerer for tre protoner det høye signalet ved 0,80 ppm (s, 3H). Den lave ppm verdien skyldes høy elektrontetthet rundt protonene.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 4): Spekteret viser 19 signaler, dette stemmer med at molekylet består av 19 karboner. Noen små signaler er synlige og disse tyder på å være rester av 4-isomer ettersom de er halvparten av størrelsen til de resterende. Karbonet i karbonylgruppen i posisjon 24 observeres som et signal ved 192,87 ppm. De seks aromatiske karbonatomene er i området 117,32-159,21 ppm. Karbonet bundet til hydroksylgruppen i posisjon 15 er signalet ved 159,21 ppm. Dette karbonet får høyere ppm verdi enn de andre og er lengre til venstre i spekteret på grunn av de elektronegative effektene til fenol. Nabokarbonet til karbonylgruppen i posisjon 14 kan være signalet ved 147,46 ppm på grunn av dets nærhet til hydroksylgruppen og karbonylgruppen. Karbonatomene i posisjonene 13 og 16 kan være signalene ved 132,75 ppm, og 127,25 ppm, mens de i posisjon 0 og 1 som er lengst unna de elektronegative oksygenatomene er signalene ved 120,93 ppm og 117,32 ppm. Karbonet i posisjon 12 bundet til hydroksylgruppen på 5-ringen observeres ved 80,83 ppm. De resterende

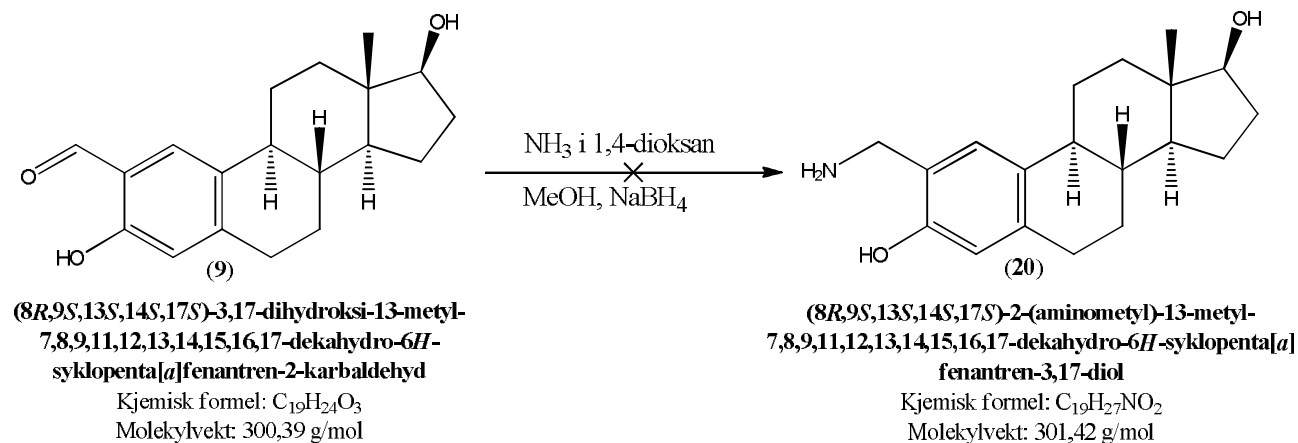


alifatiske karbonatomene observeres i området 23,58-50,34 ppm. Karbonatomet i metylgruppen i posisjon 19 er signalet ved 12,03 ppm.

## 2.2 Reduktiv aminering

### 2.2.1 Forsøk på syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-(aminometyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol

Dette var første forsøket på å syntetisere en analog med en aminogruppe. Syntesen tok utgangspunkt i en litteraturprosedyre av Hansen *et. al* (2007). Natriumborhydrid brukes som reduksjonsmiddel og metanol som løsemiddel. I dette forsøket ble det ikke tatt hensyn til at utgangsstoffet (9) var en blanding av 2- og 4-isomeren.



Figur 27: Forsøk på fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-(aminometyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (20).

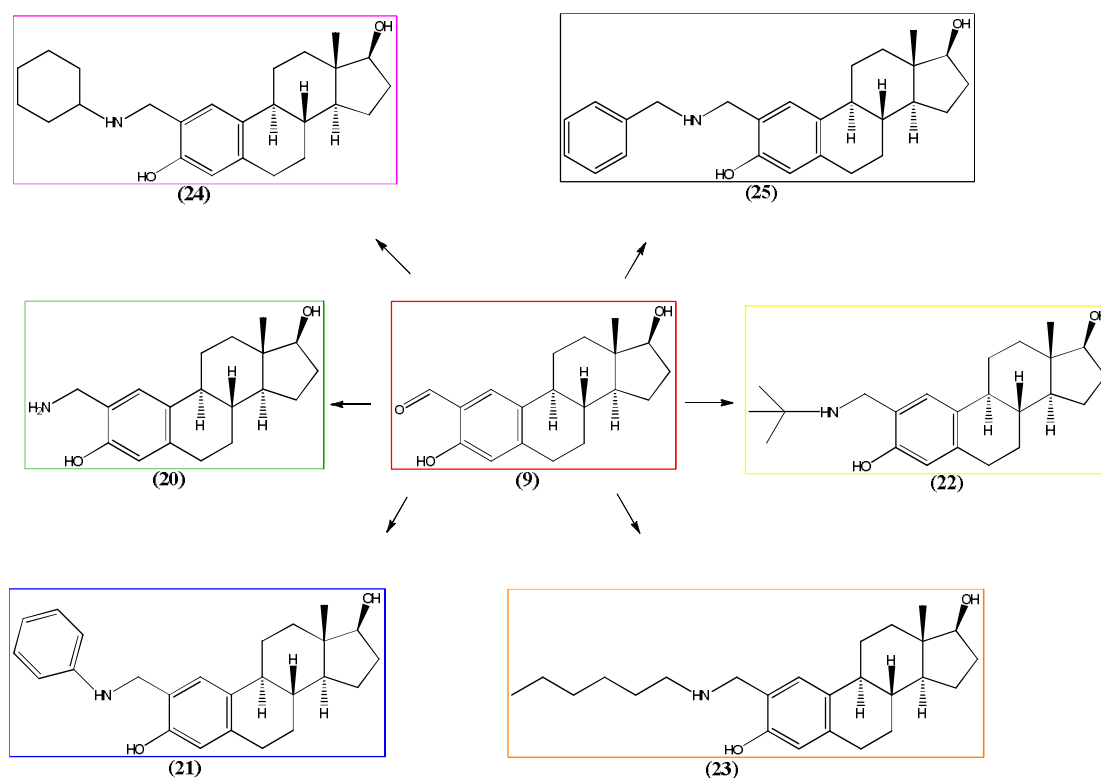
#### Forsøk 1

Forsøket ble gjort som beskrevet i kapittel 4.3.3 i liten skala: 0,2 mmol (9).

Tynnsjiktscromatografi av reaksjonsblandingen var vanskelig å tyde, selv om styrkeforholdet på elueringsmiddelet ble variert. Råproduktet ble likevel opparbeidet etter å ha stått over

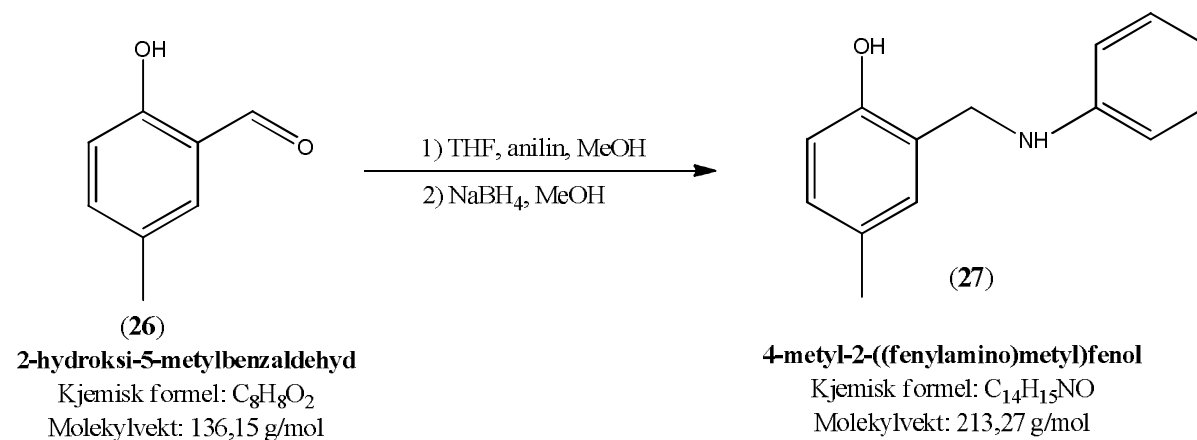
natten under omrøring. Utbytte (råprodukt): 90 %. <sup>1</sup>H NMR ble tatt av råprodukt, det så ikke ut til at (20) var produktet. Det så heller ut som at det var dannet en sekundær alkohol. Ammoniakk er et primært amin og skal reagere lett med aldehyd. Muligens burde en syre vært tilsatt for å optimalisere pH for imindannelse.

Før nye forsøk på reduktiv aminering, ble råprodukt fra *ortho*-formyleringssyntesene rensset ytterligere ved separasjon av 2- og 4-isomer. Det ble forsøkt flere ganger å skille 2-isomeren (9) fra 4-isomer (11). Første gangen på automatisert søylekromatografi var vellykket (forhold 2- og 4-isomer; 98:2) og gav 0,5 g ren 2-isomer (9) fra 1,5 g regioisomerisk blanding. Andre gangen var mislykket, selv med samme prosedyre, derfor ble tradisjonell søylekromatografi utført, hvilket gav en vellykket separasjon, i dog mindre utbytte (27 % utbytte og forhold 99:1). Mengden ren 2-isomer var totalt 635 mg. Ut i fra den sparsomme mengden av (9) ble syntesene utført i 0,1 mmol skala. Før ren (9) ble tatt i bruk, ble det gjort to prøve-forsøk på to ulike salicylaldehyder (se 2.1.4 og 2.1.5). Alle forsøkene på reduktive amineringer tok utgangspunkt i litteraturprosedyren nevnt over, og ble utført på samme måte.



Figur 28: Opprinnelig plan for 6 reduktive amineringer hvilket skulle gi 6 nye 2-ME analoger. Østradiol (9), ammoniakkanalog (20), anilinanalog (21), tert-butylaminanalog (22), heksylaminanalog (23), sykloheksylaminanalog (24), og benzylaminanalog (25)

## 2.2.2 Syntese av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol

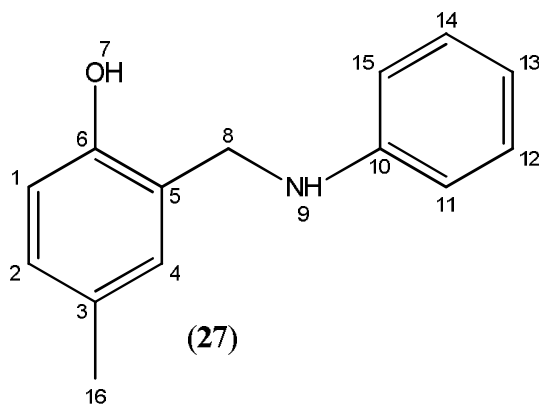


Figur 29: Fremstilling av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol (27).

### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.4 i 1 mmol skala. Reaksjonen stod under omrøring og ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi etter 2 og 3 timer. På grunn av rester av utgangsstoff fikk reaksjonen stå under omrøring i 18 timer før reduksjonsmiddel ble tilsatt. Råprodukt ble opparbeidet etter 3 timer, og var et gult/brunt oljeaktig stoff. Etter rensing var produktet gult, fast stoff. Sm.p: 88-92 °C. Utbytte: 76 %

### Tolkning av $^1H$ NMR og $^{13}C$ NMR spektra av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol (27)



Figur 30: Nummerering av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol (27). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

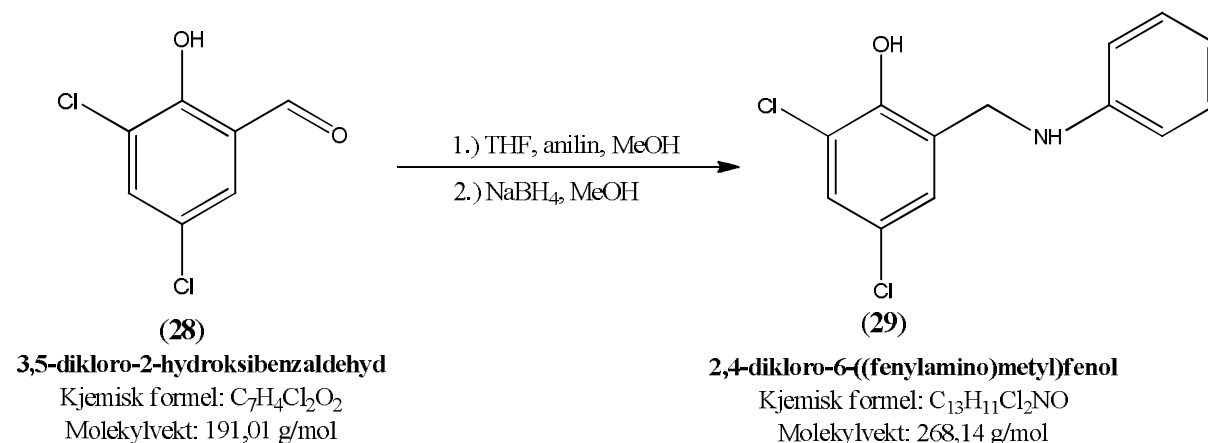
Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 30.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 5): Et lavt signal observeres ved 8,57 ppm (s, 1H), dette er mest sannsynlig en forurensning. I det aromatiske området 7,28-7,11 ppm (m, 3H), 7,03-6,65 (m, 7H) observeres to multiplerter hvilket integrerer for totalt ti protoner. Strukturen til forbindelse (27) inneholder åtte aromatiske protoner. En grunn til at multiplertene er så kompliserte er at forbindelse (27) har en monosubstituert benzenring. Dette gir tre ulike typer protoner. De to protonene i posisjon 11 og 15 er ekvivalente, protonene i posisjon 12 og 14 er ekvivalente og protonet i posisjon 13 har en annen kjemisk shift verdi enn de andre. I noen tilfeller er shift verdiene for slike protoner så like at fenylgruppen observeres som en stor singlett. I dette tilfellet kan shift verdiene være så ulike at protonene synes i spekteret som en stor multiplert. Multiplerten ved 7,28-7,11 ppm som integrerer for tre protoner er de tre aromatiske protonene på fenolringen i posisjon 1,2 og 4. I området 7,03-6,65 ppm er den andre multiplerten som integrerer for syv protoner. Det forventes at det skal være fem på grunn av de fem aromatiske protonene i anilinringen. Et bredt signal observeres ved 5,54 ppm (s, 1H), dette kan være aminet i posisjon 9. (dette er karakteristisk for en hydroksylgruppe og er hydroksylgruppen i posisjon 7). Signalet for aminer kan ifølge litteratur variere mye. Aminer kan være i området 1,5-6,0 ppm og de aromatiske i området 3-5 ppm (Solomons & Fryhle, 2004). Grunnen til at aminet i dette tilfellet har en høyere ppm verdi enn forventet kan være på grunn av en intramolekylær hydrogenbinding dannet med hydroksylgruppen i posisjon 7. Av figur 30 av forbindelsen (27) kommer ikke dette så tydelig frem, men anilingroupen kan orientere seg nærmere hydroksylgruppen enn figuren illustrerer. Den høye toppen som integrerer for to protoner ved 4,36 ppm (s, 2H) er signalet for de to protonene i posisjon 8 ved siden av aminet. Et høyt signal ved 2,26 ppm (s, 3H) integrerer for tre protoner og er karakteristisk for en metylgruppe. Signalet er for metylgruppen i posisjon 16. Etylacetat synes som små signaler ved 4,12 ppm, 2,05 ppm og 1,25 ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 6): Forbindelse (27) består av fjorten karbonatomer, tolv aromatiske og to alifatiske. Karbonet i posisjon 6 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 7 er signalet ved 154,73 ppm. Det er på grunn av oksygenets elektronegative egenskaper at karbonet får så høy ppm verdi. Karbonet i posisjon 10 bundet til aminet er signalet ved 147,66 ppm, dette skyldes at karbonet får lavere elektrontetthet når det er bundet til nitrogen. I det aromatiske området observeres åtte signaler fra 130,02-116,24 ppm. To av disse er omtrent dobbelt så høye som de andre, dette tyder på at det er totalt fire karbonatomer som overlapper. Dette kan være fire av de aromatiske karbonatomene på anilinringen i posisjonene 11,12,14, og 15.

Karbonatomene i posisjon 11 og 15 er kjemisk ekvivalente og kommer som et signal ved 129,77 ppm. Signalet ved 116,24 ppm er for karbonatomene i posisjon 12 og 14 som er kjemisk ekvivalente. De resterende seks signalene er for de siste seks aromatiske karbonatomene i strukturen og er i posisjonene 1,2,3,4,5,13. Signalet ved 49,09 ppm er karbonatomet i posisjon 8 bundet til aminet. Karbonatomet i metylgruppen i posisjon 16 er signalet ved 20,91 ppm.

### 2.2.3 Syntese av 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol



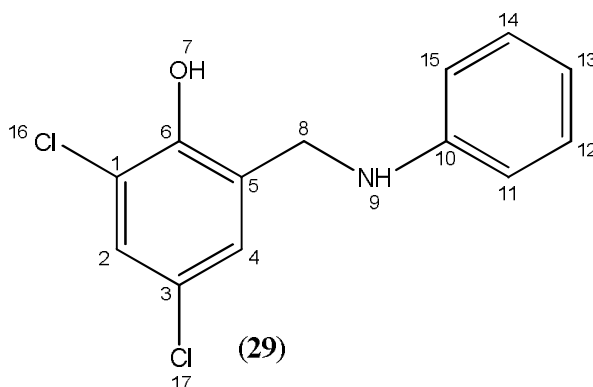
Figur 31: Fremstilling av 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol (29).

#### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.5 og utført i 1 mmol skala.

Tynnsjiktskromatografi viste ingen rester av utgangsstoff (28) etter to timer under omrøring og reduksjonsmiddel ble tilsatt etter 2,5 timer. Råprodukt var et mørkt oransje oljeaktig stoff. Etter to forsøk med rensing på flashkolonne ble utbytte 50 %, produkt var et gult, fast stoff. Sm.p: 84-85 °C.

## Tolkning av $^1\text{H}$ NMR og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol (**29**)



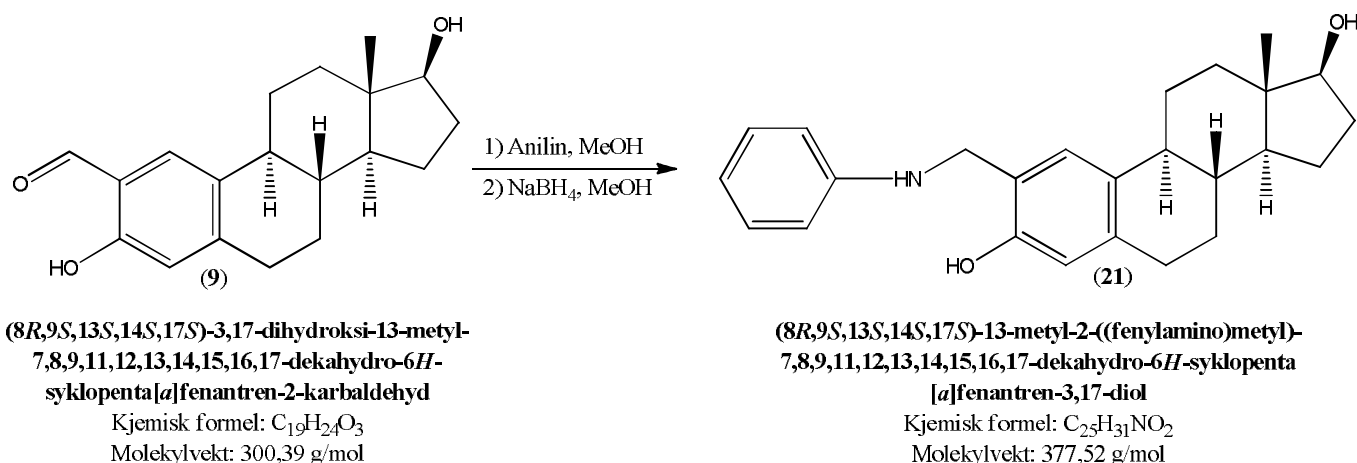
Figur 32: Nummerering av 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol (**29**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 32.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 7): Et lavt signal ved 8,50 ppm (s, 1H) kan være en forurensning. I det aromatiske området er det som forventet mange signaler, ettersom forbindelsen (**29**) har en anilinring og en benzenring i strukturen. Ved 7,20 ppm (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H) er en dublett med en koblingskonstant på 2,5 Hz, dette er et proton som har en *meta*-kobling til et annet proton. Signalet kan være protonet i posisjon 2 som har en *meta*-kobling til protonet i posisjon 4. Protonet i posisjon 2 er også i nærheten av to kloratomer og vil derfor få høyere ppm verdi på grunn av kloratomenes elektronegative egenskaper. Ved 7,19-7,12 ppm (m, 2H) observeres en multipllett som integrerer for to protoner. Det kan være protonene i posisjon 11 og 15. Ved 7,05 ppm (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H) er en dublett med koblingskonstant på 2,5 Hz, dette er da protonet i posisjon 4 som er *meta*-koblet til protonet i posisjon 2. Ved 6,81 ppm (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H) er det en tripllett, dette kan være protonet i posisjon 13 som har to naboprotoner i posisjonene 12 og 14. Ved 6,68 ppm (dd,  $J = 8.5, 0.9$  Hz, 2H) observeres en dobbeldublett med koblingskonstanten 8,5 Hz som er typisk for *ortho*-kobling og 0,9 Hz som er typisk for *para*-kobling. I tillegg integrerer signalet for to protoner, dette kan da være protonene i posisjonene 12 og 14. Et bredt signal observeres ved 5,95 ppm (s, 1H), dette kan være aminet i posisjon 9. Den høye toppen som integrerer for to protoner ved 4,32 ppm (s, 2H) er signal for de to protonene i posisjon 8 ved siden av aminet. To signaler i det alifatiske området ved 2,10 ppm og 1,97 ppm er lave og er mest sannsynlig forurensninger. Ved 1,18 ppm (s, 1H) observeres en singlett hvilket integrerer for ett proton og dette kan være en forurensning.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 8): Ved 150,53 ppm er karbonatomet i posisjon 6 som er bundet til hydroksylgruppen i posisjon 7. På grunn av oksygenets elektronegative egenskaper får karbonatomet lavere elektrontetthet og dermed høy ppm verdi. Signalet ved 147,06 ppm er karbonatomet i posisjon 10 bundet til aminet i posisjon 9. Signalet ved 129,84 ppm er dobbelt så høyt som de andre signalene og er et signal for to ekvivalente karbonatomer, dette kan være karbonatomene i posisjon 11 og 15. De to signalene ved 128,61 ppm og 127,38 ppm kan være de to karbonatomene i posisjon 1 og 3. Signalene ved 126,86 ppm, 125,23 ppm og 121,79 ppm kan være karbonatomene i posisjonene 2,4, og 5. Signalet ved 120,77 ppm kan være karbonatomet i posisjon 13. Det høye signalet ved 115,52 ppm er dobbelt så høyt som de andre og kan være de kjemisk ekvivalente karbonatomene i posisjonene 12 og 14. Det siste signalet lengst til høyre ved 47,71 ppm er karbonatomet i posisjon 8 bundet til aminet i posisjon 9.

## 2.2.4 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino)metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol

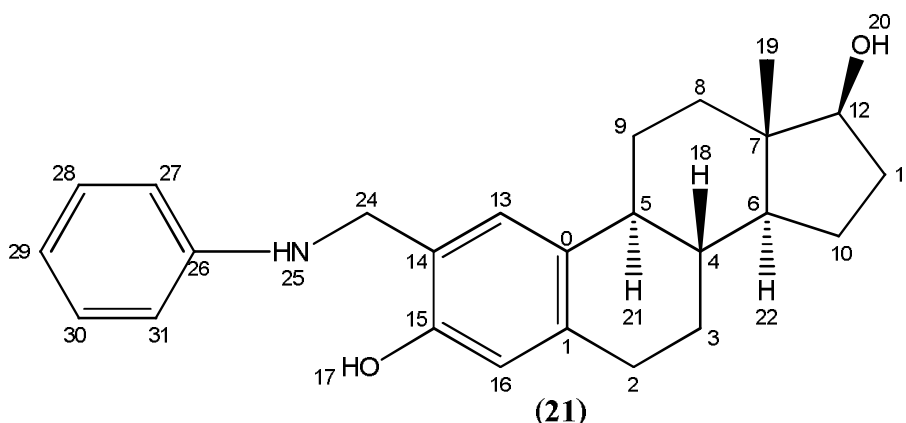


Figur 33: Fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino)metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol(21).

## Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 3.3.6 i liten skala, 0,3 mmol. På bakgrunn av de to foregående forsøkene med reduktiv aminering ble ingen av betingelsene i prosedyren endret. Reakjonen ble kontrollert med tynnsjiktscromatografi og det var ingen synlige rester av (**9**) etter 2,5 timer. Råprodukt: gult, oljeaktig stoff. Ved oppbevaring, selv med lysbeskyttelse, ble fargen endret til mørk brun. Dette kan tyde på at det har skjedd en oksidasjon i kolben, skulle nok vært oppbevart kjølig for å forhindre at noe slikt kan skje. Anilin er et meget lysømfintlig amin. Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR før rensing med søylekromatografi. Separasjonen ble utført på vanlig silika. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte: 75 %

Tolkning av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino)metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**21**)



Figur 34: Nummerering av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino)metyl) 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**21**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 34.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 9): Det er mange signaler som observeres i det aromatiske området av spekteret, dette skyldes at strukturen (**21**) innehar to benzenringer. Totalt skal det være syv aromatiske protoner i spekteret. Det er et tydelig skille mellom to multipletter og to singletter. Signalene 7,27-7,21 ppm (m, 2H) integrerer for to protoner. Dette kan være de protonene i posisjon 27 og 31 som er nærmest aminet i posisjon 25. Signalet ved 7,07 ppm (s, 1H) er et av

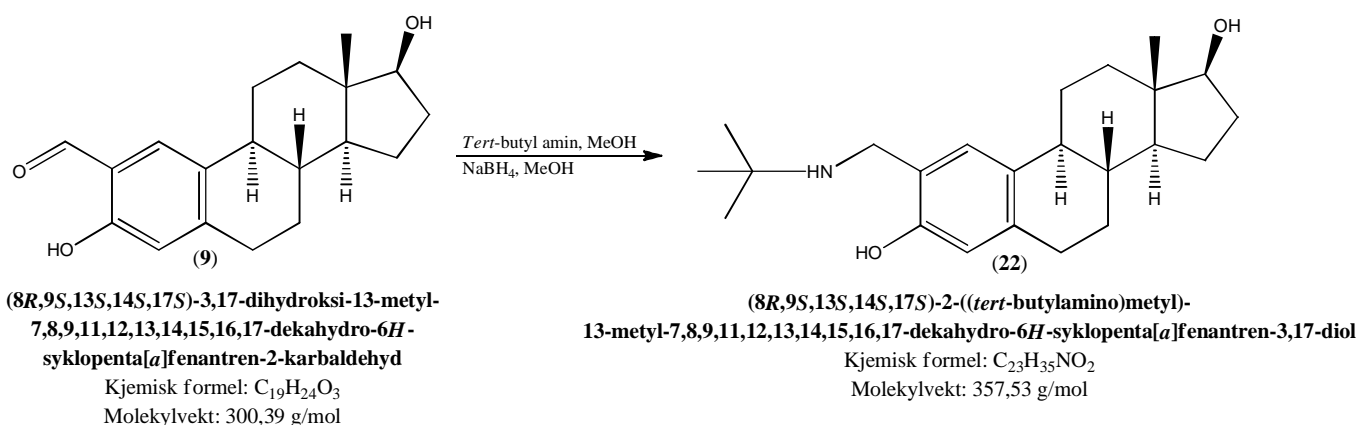


de aromatiske protonene på den aromatiske ringen i steroidskjelettet, det kan være protonet i posisjon 16. Signalene 6,92-6,82 ppm (m, 3H) er de resterende tre protonene på anilinet i posisjon 28, 29 og 30. Signalet ved 6,63 ppm (s, 1H), er en singlett og er det andre aromatiske protonet i posisjon 13. Ved 4,36 ppm (s, 2H) er et signal som integrerer for to protoner, det er de to protonene i posisjon 24 ved siden av aminet. Et bredt signal ved 2,85-2,78 ppm (m, 2H) ser ut som en multipllett, denne går igjen i flere spektre og tilhører den alifatiske delen av strukturen. Forbindelsen (**21**) har mange alifatiske protoner, og disse kommer som flere multiplletter i det alifatiske området av spekteret. Ved 2,35-2,08 ppm (m, 5H) og 1,31-2,00 ppm (m, 14H) er det integrert for totalt 19 protoner. Det karakteristiske høye signalet ved 0,79 ppm (s, 3H) er signalet for metylgruppen i steroid-skjelettet i posisjon 19. Til sammen er det signaler for totalt 34 protoner medregnet aminet, dette er tre for mye og kan skyldes at prøven inneholder forurensninger. Aminets signal kan være i et område fra 1,5-6,0 ppm som nevnt tidligere. Det skal være en liten, bred topp som forventes lenger ned til venstre i spekteret på grunn av intramolekylær hydrogenbinding som dannes mellom aminet og hydroksylgruppen i posisjon 17. En slik topp er ikke fremtredende i spekteret, det kan være antydning til en topp tett til 6 ppm, men dette er så svakt at det ikke blir oppfattet av dataverktøy brukt. Det kan være at konsentrasjonen i prøven er for lav til at aminet kunne gi noe utslag. Rester av etylacetat er tripletten ved 1,27 ppm, singletten ved 2,05 ppm, og kvartetten ved 4,12 ppm. Metylgruppen i posisjon 19 er lett gjenkjennelig som det høye signalet ved 0,79 ppm (s, 3H) som integrerer for tre protoner.

<sup>13</sup>C NMR (se vedlegg 10): Strukturen til (**21**) består av 25 karbonatomer, hvorav tolv er aromatiske og tretten alifatiske. Ti signaler er synlige i området 153,49-113,06 ppm og to av disse er dobbelt så høye som de andre. Dette kan være at de to signalene er for to karbonatomer som kommer på samme shift verdi. Signalet ved 153,49 er for et karbonatom og kan være karbonet i posisjon 26, som er like ved siden av aminet i posisjon 25. Signalet ved 149,81 kan være karbonet i posisjon 16 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 18. De resterende signalene som er omtrent like høye ved 136,10, 131,09, 126,35, 123,70, 116,35, 115, 55 ppm er karbonatomene i posisjonene 1,2,14,15,17,29. De to høye signalene kan være de symmetriske karbonatomene i anilinringen. 129,58 ppm kan være karbonatomene i posisjon 27 og 31. Karbonatomene i posisjon 28 og 30 kommer ved 113,06 ppm. Et signal som står alene ved 80,90 ppm er karbonatomet i posisjon 13 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 21. De alifatiske karbonatomene i som utgjør resten av strukturen, steroidskjelettet,

er signalene i området 23,63-50,37 ppm. Signalet ved 12,13 ppm er karbonatomet i metylgruppen i posisjon 20.

## 2.2.5 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8, 9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



Figur 35: Fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol(22).

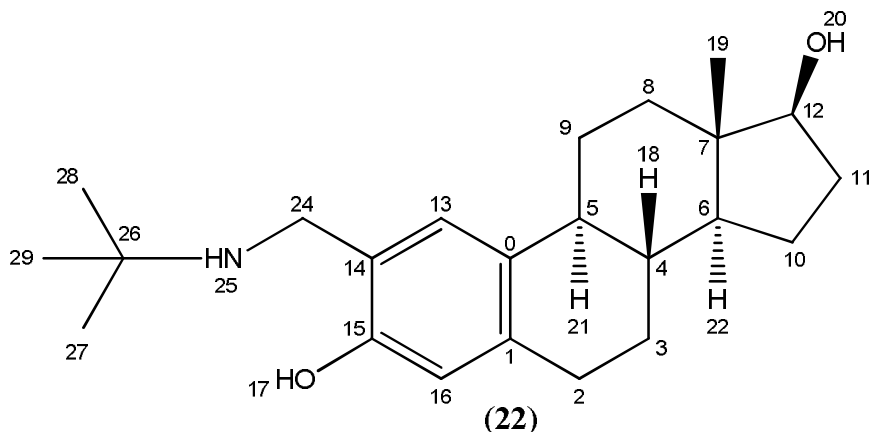
### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.7 og i samme skala som ovennevnte reaksjon, 0,3 mmol. Denne reaksjonen var vanskeligere å tyde med tynnsjiktskromatografi på grunn av dårlig vandring på silikaplaten. Etter justering av elueringsmiddel og farging med kaliumpermanganat var ikke rester av utgangsstoff (19) synlig etter 2,5 timer med omrøring.

Råprodukt: gult, oljeaktig. Utbytte (råprodukt): 108 %. Det ble tatt <sup>1</sup>H- og <sup>13</sup>C- NMR spektra av råproduktet. Produktet ble forsøkt gjenvunnet fra løsemiddelet *d*<sub>6</sub>-DMSO, og rensat.

Rensing på søylekromatografi gav et gult,fast stoff og et utbytte på 13 %.

Tolkning av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (22)



Figur 36: Nummerering av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (22). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

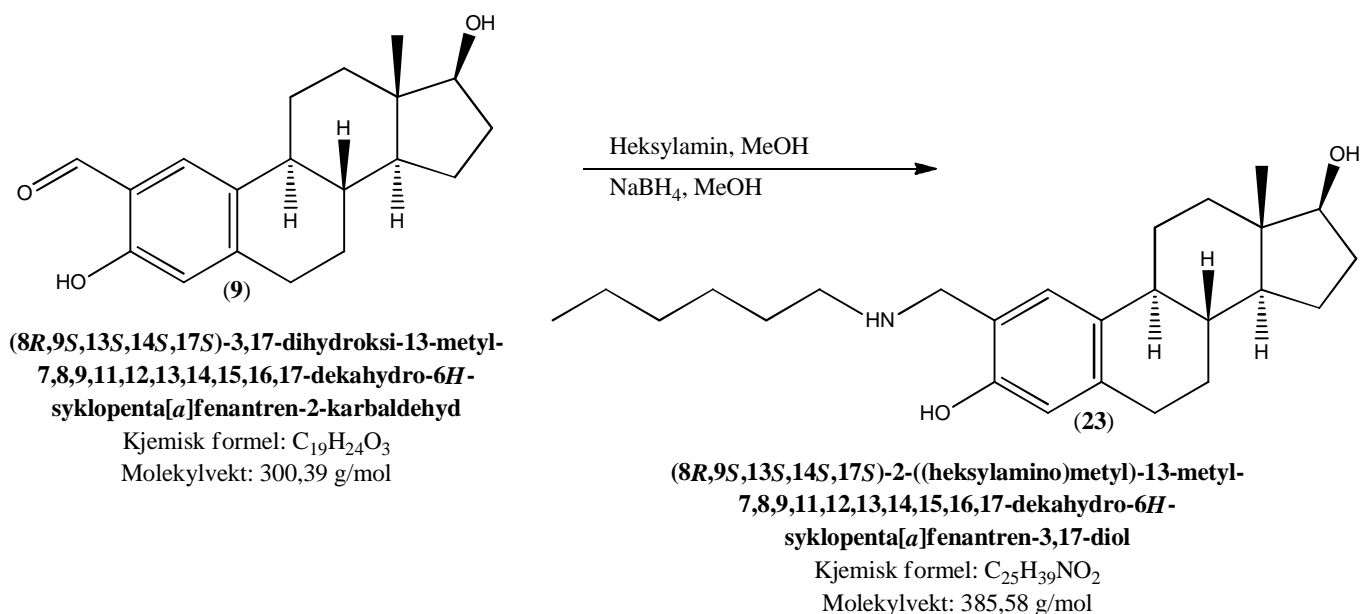
Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 36.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 11): Selv om forbindelsen (22) ble forsøkt rensert viser spektra at det er noen forurensninger. I tillegg er det flere tegn på at spekteret inneholder en isomerisk blanding av produktet (22). I det aromatiske området av spekteret er det flere signaler enn forventet, ved 8,28 ppm (s, 1H) er et lite signal, dette kan være et aromatisk proton for en isomer. Ved 7,15 ppm (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H) observeres en dublett, denne tilhører ikke forbindelse (22) ettersom det forventes bare to singletter som skal være protonene i posisjon 13 og 16. Disse finnes ved 6,95 ppm (s, 1H) og 6,60 ppm (t,  $J = 10.1$  Hz, 1H). Det er andre lave signaler ved 6,65 ppm (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H) og 6,56 ppm (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), begge er dubletter som viser koblingskonstanter rundt 2,5 Hz, dette er typisk for *meta*-kobling og er da to aromatiske protoner som er *meta*-koblet til hverandre. De protonene tilhører en isomer. En singlett observeres ved 3,90 ppm (s, 1H), dette er for de to protonene i posisjon 24 ved siden av aminet. En karakteristisk tripplett ved 3,73 ppm (t,  $J = 8,3$  Hz, 3H), dette tilhører den alifatiske delen av strukturen til (22), denne pleier å integrere for et proton, i dette tilfellet for tre. Det kan være at aminet i posisjon 25 kommer ved denne ppm verdien sammen med protonet fra hydroksylgruppen i posisjon 17. Det kunne forventes at aminet skulle komme lenger til venstre i spekteret på grunn av intramolekylær hydrogenbinding, men ettersom prøven ikke er helt ren og aminet i dette tilfellet er omgitt av tre elektronrike metylgrupper

kan den få lavere ppm verdi. En lav, bred topp observeres ved 2,80 ppm (s, 4H) dette signalet går igjen i alle spektrene og er alifatiske protoner tilhørende forbindelse (**22**). Vanligvis integrerer den for to protoner, men i dette tilfellet fire hvilket er dobbelt så mange og er med på å bekrefte at råproduktet er en isomerisk blanding. Ved 2,64 ppm (s, 1H) er en singlett som integrerer for et proton, dette kan være en forurensning. De resterende signalene i det alifatiske området er multipletter og fem høye singletter. Fire av singlettene skal være fire metylgrupper. Signalet ved 2,17 ppm (s, 4H), dette kan være rester av aceton eller en forurensning. Tre singletter kommer tett ved 1,32 ppm (s, 4H), 1,26 ppm (s, 6H) og 1,21 ppm (s, 12H). Singletten ved 1,32 ppm (s, 4H) kan være en forurensning. Det er mulig at singletten ved 1,26 ppm som integrerer for seks protoner er en metylgruppe for de to isomere som overlapper. For forbindelse (**22**) kan metylgruppen i posisjon 29 være signalet ved 1,26 ppm. Singletten ved 1,21 ppm (s, 12H) integrerer for 12 protoner og kan være totalt 4 metylgrupper for to isomere. Metylgruppene i posisjon 27 og 28 er signalet ved 1,21 ppm og disse overlapper da med to andre metylgrupper fra isomeren. Metylgruppen i posisjon 19 er lett gjenkjennelig og lokaliseres ved 0,78 ppm (s, 6H). Vanligvis integrerer denne toppen for tre protoner, men ettersom det er mest sannsynlig en isomerisk blanding er det to metylgrupper som overlapper.

<sup>13</sup>C NMR (se vedlegg 12): Struktur (**22**) består av totalt 23 karbonatomer hvorav seks er aromatiske og 17 alifatiske. Karbonspekteret viser i alt 26 signaler, det er da tre for mange signaler i det alifatiske området og det er forventet ettersom produktet ikke er helt rent. I området 156,35-116,15 ppm er det som forventet seks signaler. Det signalet lengst til venstre ved 156,35 ppm er karbonatomet i posisjon 15 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 17. Signalet ved 136,35 ppm kan være karbonatomet i posisjon 16. Signalene ved 125,78, 122,33 og 116,15 ppm er de resterende aromatiske karbonatomene i posisjon 0,1,13,14. Signalet ved 80,91 ppm er karbonatomet i posisjon 12 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 20. I området 67,87-12,12 ppm er de siste 19 signalene. Tre av disse er en forurensning. Det som er klart er at karbonatomet i metylgruppen i posisjon 19 er signalet ved 12,12 ppm.

## 2.2.6 Forsøk på syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((heksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9, 11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



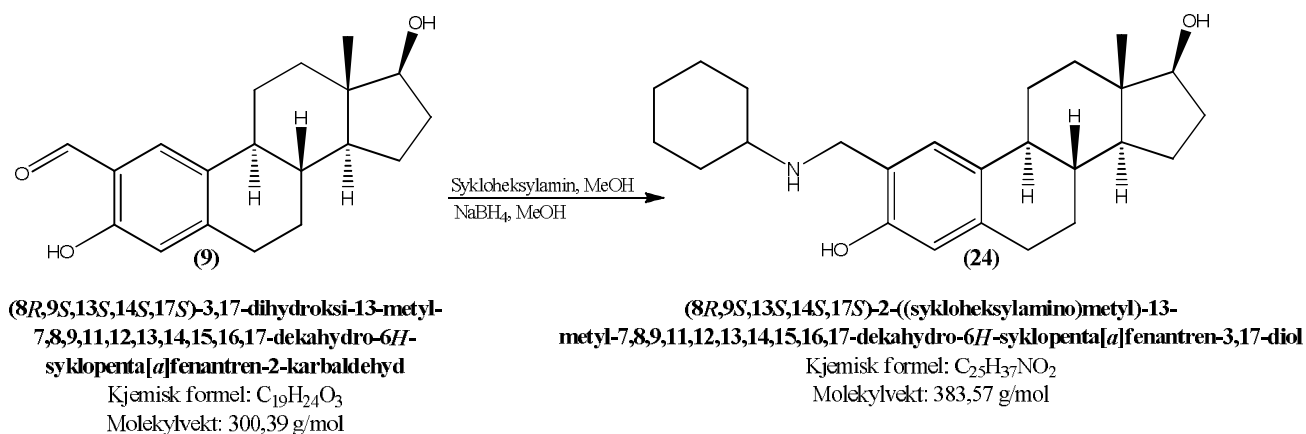
Figur 37: Forsøk på fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((heksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (23).

### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.8 og stoffmengden er ikke endret.

Tynnsjiktskromatografi var enkelt å tyde, produktet gav en sterk rosa farge ved bruk av ninhydrin. Reduksjonsmiddel ble tilsatt etter 3,5 timer. Reaksjonsblandingen fikk stå under omrøring over natten og etter opparbeidelsen var råproduktet sterkt neongult. Utbytte (råprodukt): 149 %. Dessverre ble rensing av råproduktet på flashkolonne mislykket og produktet gikk tapt. Det ble heller ikke tatt noe NMR spekter av råproduktet, hvilket er uheldig for det er vanskelig å si om reaksjonen var vellykket.

## 2.2.7 Forsøk på syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol

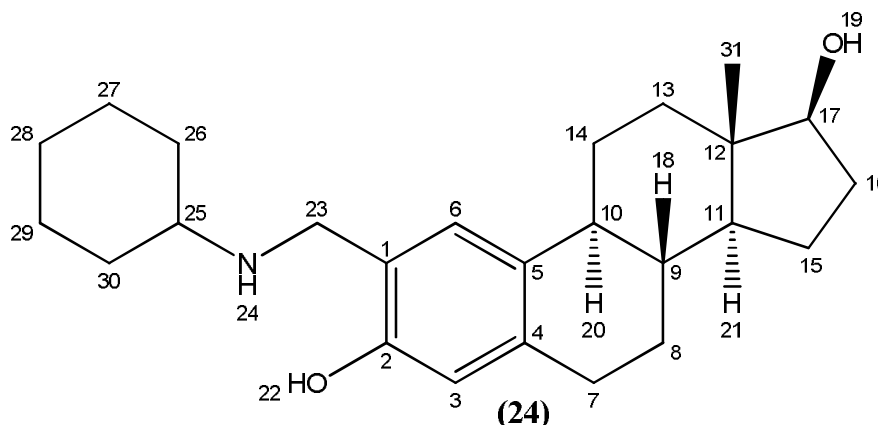


Figur 38: Fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (24).

### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.9 og ingen endringer ble foretatt på den generelle prosedyren. Tynnsjiktskromatografi viste ingen rester av (9) etter 2 timer. Råprodukt ble opparbeidet dagen etter tilsetning av reduksjonsmiddel. Utseende råprodukt: gult, fast stoff. Utbytte råprodukt: 89 % <sup>1</sup>H-NMR ble tatt av råprodukt før rensing på kolonnekromatografi. Produktet ble forsøkt gjenvunnet fra løsemiddelet *d*<sub>6</sub>-DMSO, og renses. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte: 12 %. På grunn av lavt utbytte var det ikke nok stoffmengde til et <sup>13</sup>C- NMR spekter av produktet, men <sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt. Spekteret viste ikke noe som kunne tyde på at rensingen var vellykket og var dessverre mislykket.

Tolkning av  $^1\text{H}$  NMR spektra av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol (**24**)

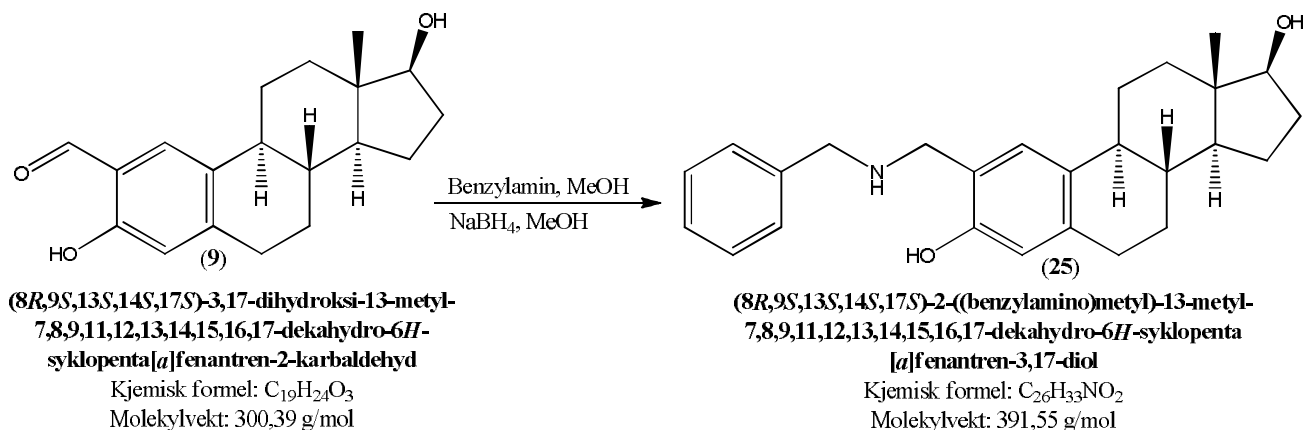


Figur 39: Nummerering av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**24**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Ved diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR tas det utgangspunkt i figur 39.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 13): Spekteret er tatt av råprodukt av (**24**) og inneholder derfor flere forurensinger og/eller biprodukter. Det ser ut som det er rester av utgangsstoff (**9**) i spekteret ved at to singletter som kan se ut som en fenol og et aldehyd ved 10,14 ppm (s, 1H) og 8,49 (s, 1H). De to aromatiske protonene i posisjon 3 og 6 er singlettene i det aromatiske området ved 7,29 ppm (s, 1H) og 6,54 ppm (s, 1H). Det er flere signaler i det aromatiske området, disse tilhører ikke forbindelse (**24**) ettersom den har kun to aromatiske protoner. Ved 4,49 ppm (s, 1H) er en singlett som integrerer for et proton, dette er nok ikke aminet ettersom det skal være en lav, bred topp. Det er mer sannsynlig at aminet er under et av signalene i området 1,5-3,6, som signalet ved 3,57-3,47 (m, 2H). En singlett ved 3,33 ppm (s, 2H) integrerer for to protoner og er protonene i posisjon 23 ved siden av aminet. I det alifatiske området 2,34-1,94 ppm (m, 20H) er det mange protoner, hvilket er forventet ettersom forbindelsen (**24**) har en sykloheksylring. Signalet ved 1,89-1,26 ppm (m, 6H) integrerer for seks protoner, disse må ha nokså lik ppm verdi ettersom signalet nesten er som en singlett. Det kan være de åtte protonene i posisjon 26,27,29 og 30 selv om multipletten integrerer for seks. Signalet ved 0,66 ppm (s, 3H) er gjenkjennelig og er metylgruppen i posisjon 31.

## 2.2.8 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9, 11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



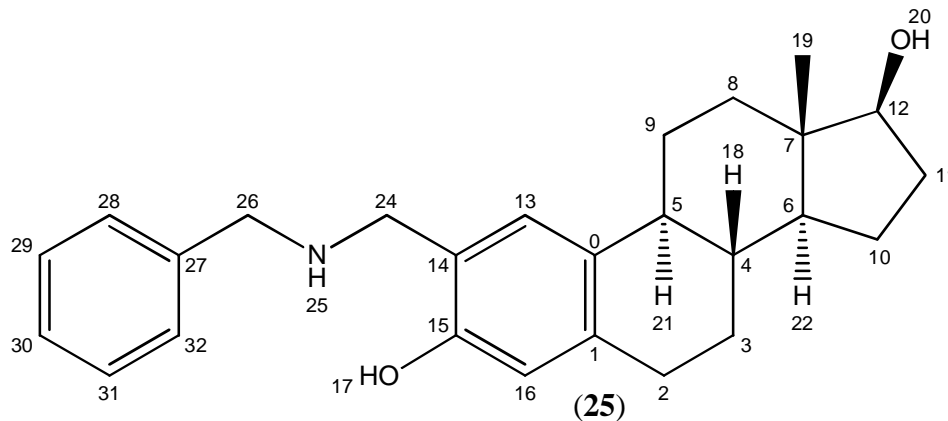
Figur 40: Fremstilling av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino) metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (25).

### Forsøk 1

Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 4.3.10. Reaksjonsblandingen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi etter reflux og det var ingen synlige rester av (9), reaksjonen fikk likevel stå over natt før reduksjonsmiddel ble tilsatt. Etter opparbeidelse var råproduktet gult, fast stoff. Utbytte (råprodukt): 134 %. Det ble tatt <sup>1</sup>H- og <sup>13</sup>C-NMR spekter av råproduktet. Etter rensing ble råproduktet satt på vakuüm. Utbytte (produkt): 86 %, men forbindelsen (25) er ikke helt ren, selv etter forsøk på rensing på søylekromatografi.



Tolkning av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**)



Figur 41: Nummerering av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra tar utgangspunkt i figur 41.

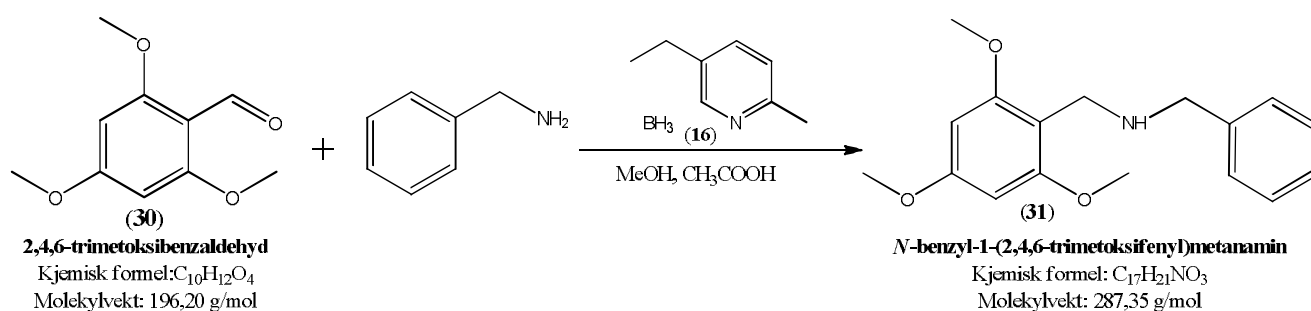
$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 14): I det aromatiske området av spekteret observeres en multiplett ved 7,29-7,21 ppm som integrerer for fem aromatiske protoner. Disse hører til den aromatiske ringen fra benzylamin i posisjonene 28,29,30,31 og 32. Det er to singletter ved 6,84 ppm (s, 1H) og 6,53 ppm (s, 1H). Disse er signaler for de to aromatiske protonene i den aromatiske A-ringen av steroidet i posisjon 13 og 16. Signalet ved 5,21 ppm er diklormetan. Et bredt signal rundt 4,71 ppm (s, 3H) kan være for aminet i posisjon 25 og hydroksylgruppene i posisjon 17 og 20. På grunn av at aminet danner en intramolekylær binding til hydroksylgruppen i posisjon 17 får aminet en høy ppm verdi. To signaler som er nesten like ved 3,89 ppm (s, 2H) og 3,74 ppm (s, 2H) er signaler for de protonene i posisjon 24 og 26. Et lavt signal observeres ved 3,38 ppm og er rester av metanol, integralet viser 0,15. Et bredt gjenkjennelig signal ved 2,77-2,70 ppm (s, 2H) tilhører den alifatiske delen av strukturen (**25**). De mange signalene fra 2,34-1,02 ppm (m, 16H) integrerer for de resterende alifatiske protonene i steroidstrukturen, ring B, C og D. Det skulle vært integrert for fjorten protoner slik at antallet ble 33, det er nok på grunn av at prøven ikke er helt ren at det blir to protoner for mye. Det høye karakteristiske signalet ved 0,71 ppm (s, 3H) integrerer for tre protoner og er metylgruppen i posisjon 19.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 15): Signalet ved 156,11 ppm er karbonatomet i posisjon 15 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 17. Signalet ved 137,76 ppm kan være karbonatomet i posisjon 17 ettersom det er kort avstand til hydroksylgruppen og protonet kan ha lavere elektrontetthet enn karbonatomet i posisjon 14. Karbonatomet i posisjon 14 kan være signalet ved 131,41 ppm. De to høye signalene ved 129,07 ppm og 129,03 ppm er omtrent dobbelt så høye som de andre signalene og tyder på at noen karbonatomer overlapper hverandre. Dette kan være de symmetriske karbonatomene i posisjonene 28,29,31 og 32. Karbonatomene i posisjon 28 og 32 overlapper hverandre og karbonatomene i posisjon 29 og 31 overlapper hverandre, derfor får de dobbelt så høyt signal. Signalene ved 127,92-116,68 ppm er de resterende aromatiske karbonatomene i posisjonene 0,1,13,14, og 30. Karbonatomet i posisjon 13 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 20 er signalet ved 82,30 ppm. Tolv signaler fra 53,04-23,53 ppm er tolv alifatiske karbonatomer i strukturen. Signalet ved 11,49 ppm er karbonatomet i metylgruppen i posisjon 19.

## 2.3 Reduktiv aminering med 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks (PEMB)

I de siste forsøkene på reduktiv aminering ble PEMB (16) brukt som reduksjonsmiddel.

### 2.3.1 Syntese av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin



Figur 43: Fremstilling av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin (31).

Dette synteseforsøket tar utgangspunkt i supporting information, reductive amination with, E. Burkhardt og B. Coleridge. Viktig å tilsette aldehyd til sist, og amin og iseddik først, slik at aminet er på protonert form før aldehydet tilsettes. Pga dannelse av bunnfall, ble metanol tilsatt slik at bunnfallet løste seg før tilsetning av aldehyd. Aldehydet er meget elektronrikt, pga flere oksygener i strukturen, og dette gir den gule fargen på reaksjonsblandingen. Iminer er ustabile og kan være vanskelige å isolere. Ved å velge et selektivt reduksjonsmiddel unngår man at aldehydet blir redusert og at likevekten forskyves i ønsket retning, nemlig amindannelse. Reduksjon av aldehyd tar lengre tid enn reduksjon av iminer.

### **Forsøk 1**

Forsøket ble stort sett utført som beskrevet i kapittel 4.3.11, kapittelet baseres på forsøk 2. I dette forsøket var produktet som ble dannet et ammoniumkloridsalt. Reaksjonsblandingen (en orange og hvit masse) ble dampet inn på rotavapor ved 50 °C etter fem timer med reflux ved 73 °C. En feil som ble gjort var at tilsvarende mengde saltsyre brukt av Burkhardt *et al.* ble tilsatt reaksjonen for å ”quenche” overflødig boran. Denne mengden skulle vært nærmere 20 ganger mindre. Det ble heller ikke tilsatt noe base for å nøytralisere reaksjonen. I stedet ble reaksjonsblandingen tilsatt kald heptan (0 °C, 20 ml) og ifølge prosedyren skulle blandingen filtreres og vaskes med heptan. Derimot var blandingen i dette tilfellet uløselig i heptan, og det ble heller valgt å rense råproduktet ved kolonnekromatografi. Etylacetat ble tilsatt og det fargede stoffet ble løst, det hvite stoffet som mest sannsynlig var aminet var uløselig. Det separerte hvite stoffet ble rensert på manuell kolonne med elueringsmiddel diklormetan:metanol (99:1) hvor gradienten økte til 10 prosent metanol. Utbytte produkt: 23 %, (hvorav 5 % helt rent).

<sup>1</sup>H NMR spekter ble tatt før og etter kromatografering og gav indikasjoner av at reaksjonen var vellykket. Derimot ved nærmere analyse av det rene produktet etter rensing, kunne ikke to protoner tilhørende et alifatisk karbon ved siden av aminet allokere noe sted. Mest sannsynlig er denne toppen gjemt bak en bred topp som er vann. DMSO var valgt som løsningsmiddel, og inneholdt vann. På bakgrunn av mengde tilsatt saltsyre og ingen nøytralisering, kan det også være grunn til å tro at produktet var et ammoniumkloridsalt. Når et amin reagerer med saltsyre dannes et ammoniumkloridsalt. Dette må nøytraliseres for å få aminet på dets frie form. Natriumbikarbonat er en base som kunne vært brukt og justert den sure pH-verdien til 8.

## **Forsøk 2**

Forsøket ble gjort som beskrevet i kapittel 4.3.11. For å prøve å øke utbyttet ble reaksjonstiden for reaktantene økt før tilsetning av PEMB. Ikke noe bunnfall ble dannet. I dette forsøket ble 0,1 ml saltsyre tilsatt før reflux. Reflukstiden ble over natt i motsetning til 5 timer fra forrige forsøk. Råproduktet ble rensert ved manuell flash på vanlig silika (diklormetan:metanol 9:1). Det var flere produkter fra reaksjonen som skulle separeres, hvilket som var produktet var vanskelig å tyde. Til slutt ved hjelp av eliminasjonsmetoden ble produktet identifisert. Først var det en blanding av blank olje og blanke krystaller, når kolbe ble lagt i fryser felte flere krystaller ut og oljen ble vasket vekk ved bruk av dietyler. Utbytte av ren (**31**) som hvite krystaller: 66 %. Sm.p: 163-169 °C.

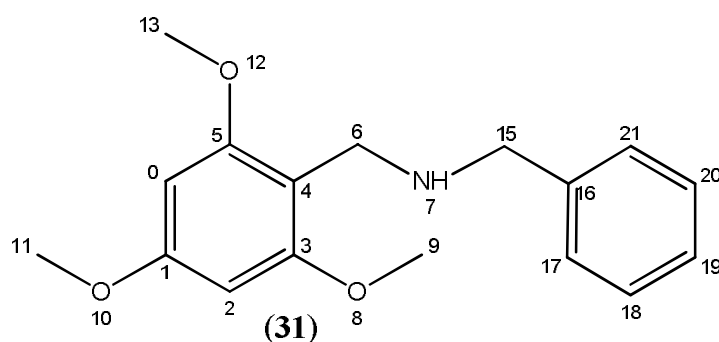
## **Forsøk 3**

Amin og iseddik ble tilsatt først, dannet bunnfall. Metanol løste opp bunnfallet, dette stod under omrøring i fem min. Aldehyd ble tilsatt og dette gav en gul farge. Omrøring i 1,5 timer før PEMB ble tilsatt 0,15 ml over ca 10 min. Ikke noe bunnfall ble dannet. Reaksjonen stod under omrøring i to timer før kontroll med TLC. Fargen var blitt lysere. Reaksjonen ble analysert med HPLC før og under reflux. Kolonne: C18 og normalfase. Prøve tatt 0 timer, 2 timer, 50 min etter tilsatt 1 dråpe kons. saltsyre. Konsentrasjon reaksjon: 3,25 mg/ml, en egen prøve av aldehyd (5,1 min) og benzylamin (4,2 min) ble også analysert, kons 1 mg/ml. Første prøve av reaksjonen viste ingen rester av amin el aldehyd, men to hovedprodukter og noe lipofilt. Dermed kan jeg konkludere med at 1,5 timer med omrøring er god nok tid for reaktantene til å reagere. Andre prøven viste kun ett hovedprodukt og noe lipofilt. Ser ut som bindingen til boran er borte etter to timer med reflux, derfor trenger jeg ikke tilsette saltsyre neste gang jeg tester reaksjonen. Ifølge artikkelen skal man det for å bli kvitt rester av boran, men i mitt tilfelle hadde ikke dette vært nødvendig, men jeg tilsatte allikevel en dråpe. Etter tilsetningen refluxerte blandingen i 50 min til. Deretter oppkonsentrering på rotavapor, ingen utfelling. Råprodukt: lysgul olje. Rensing ble utført på armen flash med silikakolonne (EasyVarioFlash D24-Silice 30.0 g) diklormetan og metanol (99:1) som elueringsmiddel. Gradienten ble sakte økt til 95:5, og produkt ble isolert. Utbytte (ikke helt rent): 35 %  
Utseende: hvite krystaller og litt gul olje.

## Forsøk 4

Denne gangen var planen at reaktantene skulle stå under omrøring i femten minutter i romtemperatur, før PEMB ble tilsatt. Kontroll med tynnsjiktskromatografi viste derimot rester av utgangsstoff etter 15 minutter med omrøring ved 23 grader. Dette kan skyldes at aldehydet som ble brukt er krystallinsk, og det tok litt tid før krystallene ble løst. Etter en time med omrøring ble PEMB tilsatt over ti-femten minutter. Ikke noe bunnfall. Deretter fikk reaksjonen stå under omrøring i to timer som ifølge valgt artikkel. Før reflux ble ikke noe saltsyre tilsatt. Refluks ble gjort ved 82 grader celsius. Det ble oppdaget at tørre betingelser var ikke oppfylt pga ikke helt tett system, dette ble rettet opp, men kan forklare hvorfor reaktantene reagerte dårligere enn observert tidligere. Ser ut som flere biprodukter er dannet. Ingen utfelling ved oppkonsentrering på rotavapor. Råprodukt: klar olje. Utbytte (råprodukt): . Rensing ble utført på armen flash, denne gangen med aluminiumoksid kolonne (SuperVarioFlash D26-Alox 60.0 g), diklormetan:metanol (99:1) gradienten ble sakte økt til 92:8. Produktet isolert var ikke helt rent. Utbytte: På grunn av tisdpress ble ikke tid til å rense råprodukt med søylekromatografi.

### Tolkning av $^1\text{H}$ NMR og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl) metanamin (31).



Figur 44: Nummerering av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl) metanamin (31). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

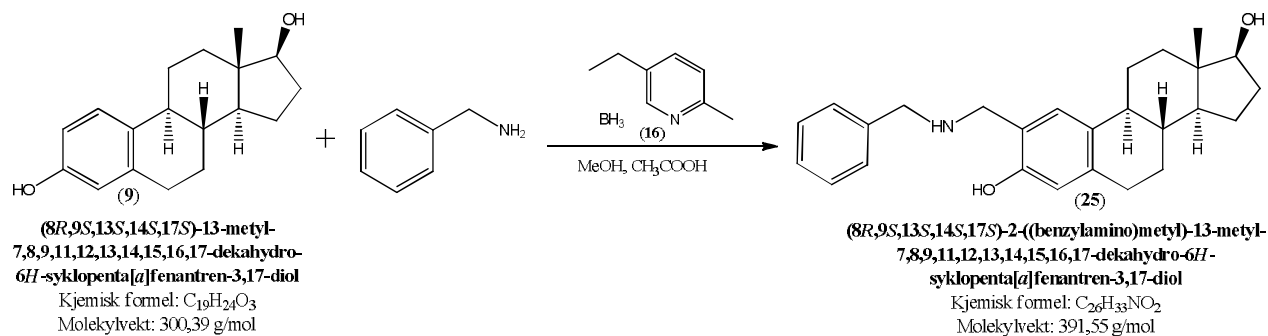
Diskusjon av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra tar utgangspunkt i figur 44.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 16): Det brede signalet ved 9,52 ppm er aminet i posisjon 7. Signalet ved 7,52 ppm er en dobbeldublett som integrerer for to protoner. Signalet ved 7,28 ppm er en dublett og integrerer for tre protoner. Signalet ved 5,96 ppm er en singlett som integrerer for to protoner og er de to protonene i posisjon 0 og 2. De to signalene ved 3,99 ppm og 3,87 ppm integrerer for to protoner hver og er signaler for protonene i posisjon 6 og 15. Det høye signalet ved 3,75 ppm integrerer for seks protoner og er de to symmetriske metylgruppene i posisjon 19 og 20. Signalet ved 3,66 ppm integrerer for tre protoner og tilhører metylgruppen i posisjon 21.

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 17): Signalet ved 162,82 ppm kan være karbonatomet i posisjon 1 som er bundet til et elektronegativt oksygenatom og får dermed høy ppm verdi. Signalet ved 160,08 ppm er omtrent dobbelt så høyt som de andre og kan være karbonatomene i posisjonene 3 og 5. De er bundet til hvert sitt oksygenatom og dermed får de høye ppm verdier og på grunn av symmetri i benzenringen er karbonatomene kjemisk ekvivalente og kommer på samme signal. Signalet ved 131,73 ppm kan være karbonatomet i posisjon 4. Signalet ved 130,45 er dobbelt så høyt som de andre og kan være karbonatomene i posisjon 0 og 2. Signalet ved 129,10 kan være karbonatomet i posisjon 16. Signalet ved 128,94 ppm er dobbelt så høyt som de andre og kan være karbonene i posisjonene 17 og 21 ettersom de er kjemisk ekvivalente. Da er det tre aromatiske karbonatomer som gjenstår i posisjon 18, 19 og 20. Disse skal være i det aromatiske området, men i stedet er det signaler for tre karboner i området 99,86-90,50 ppm\*. Signalet ved 56,08 ppm er omtrent dobbelt så høyt som de andre og kan være karbonatomene i posisjon 9 og 13 som overlapper på grunn av symmetri. Signalet ved 55,61 ppm kan være karbonatomet i posisjon 11. Signalet ved 49,67 ppm er karbonatomet i posisjon 6 og karbonatomet i posisjon 15 er signalet ved 38,42 ppm.

\* Kanskje en forklaring er at prøven ikke tålte å være i løsemiddel over lang tid, det kan ha dekomponert.

### 2.3.2 Syntese av (8R,9S,13S,14S,17S)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[a]-fenantren-3,17-diol



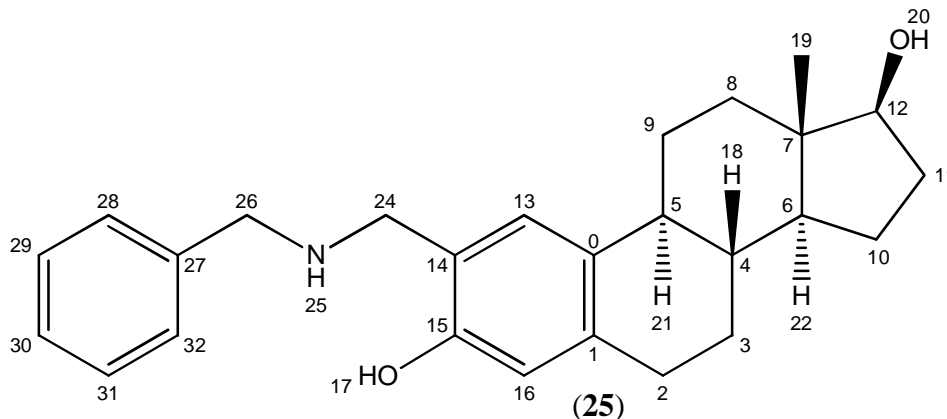
Figur 45: Fremstilling av (8R,9S,13S,14S,17S)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[a]fenantren-3,17-diol ved bruk av PEMB (16).

Den eksperimentelle prosedyren er som beskrevet i 4.3.12 og tar utgangspunkt i supporting information, E.Burkhardt, B.Coleridge.

#### Forsøk 1

Ser ut til at bunnfallet som ble dannet etter tre timer omrøring er iminet. Iminet løses dårlig i metanol. Etter tilsetning av reduksjonsmiddelet PEMB ble alt bunnfall oppløst og den kraftige gulfargen avtok til gul/grønn og blandingen ble gjennomsiktig. Etter to timer med omrøring etter tilsatt reduksjonsmiddel, var reaksjonsblandingen nærmest avfarget. En dråpe saltsyre (konsentrert) ble tilsatt og reaksjonen refluxerte ved 80-82 grader celsius. Etter 1,5 timer reflux, total avfarging ble observert. Reaksjonen refluxerte over natt. En dråpe mettet natriumbikarbonat ble tilsatt etter avkjøling til romtemperatur. <sup>1</sup>H- NMR spektra ble tatt av råprodukt viste produktdannelse. Ved manuell kolonnekromatografi ble produktet isolert, dog ikke helt rent.

Tolkning av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av  $8R,9S,13S,14S,17S$ -2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**)



Figur 46: Nummerering av  $8R,9S,13S,14S,17S$ -2-((benzylamino) metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (**25**). Nummereringen følger ikke IUPAC-regler, og er ment som hjelp ved diskusjon av NMR-spekter.

Diskusjon av  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ - NMR spektra tar utgangspunkt i figur 46.

$^1\text{H}$  NMR (se vedlegg 18): I det aromatiske området ved 7,32 ppm (s, 5H) er det en høy og bred singlett, dette er ikke uvanlig for en monosubstituert benzenring. Dette signalet integrerer for fem protoner hvilket er forventet ettersom struktur (**25**) innehar en benzenring med fem aromatiske protoner i posisjonene 28,29,30,31 og 32. Lenger til høyre observeres to signaler. Signalet ved 6,90 ppm (s, 1H) er et aromatisk proton hvilket tilhører den aromatiske ringen i steroidet. Signalet kan være protonet i posisjon 16. Signalet ved 6,62 ppm (s, 1H) er det siste aromatiske protonet i strukturen i posisjon 13. Signalet ved 6,48 ppm (s, 3H) er en bred, lav topp hvilket integrerer for tre protoner. Dette kan være protonene fra aminet i posisjon 25, og hydroksylgruppene i posisjon 17 og 20. På grunn av intramolekylær hydrogenbinding mellom aminet og hydroksylgruppen i posisjon 17, får aminet høy ppm verdi. Signalet ved 3,96 ppm (s, 2H) integrerer for to protoner og kan være protonene i posisjon 24. Signalet ved 3,87 ppm (s, 2H) kan være protonene i posisjon 26. Ved 3,72 ppm (t,  $J = 8,4$  Hz, 1H), er det en triplett som integrerer for ett proton, dette tilhører den alifatiske delen av strukturen. Signalet ved 3,47 ppm (s, 1H) er lavt og integrerer 0,10, dette er rester av løsningsmiddelet metanol. Et gjenkjennelig bredt signal ved 2,76 ppm (s, 2H) integrerer for to



protoner som tilhører den alifatiske delen av strukturen. Dette signalet går igjen i spektrene med steroidstruktur. Flere signaler observeres i det alifatiske området, og et signal skiller seg ut. Det høye signalet er ved 2,03 ppm og integrerer for tre protoner. Dette er iseddik. Resten av de alifatiske protonene er i området 2,30-2,06 ppm (m, 3H), 1,98-1,10 ppm (m, 13H). De tre protonene tilhørende metylgruppen i posisjon 19 er det høye signalet ved 0,77 ppm (s, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (se vedlegg 19): Strukturen (**25**) har totalt 26 karbonatomer og i karbonspekteret er det 22 synlige signaler. Dette tyder på at noen karbonatomer er kjemisk ekvivalente. Signalet ved 155,30 ppm er karbonatomet i posisjon 15 bundet til hydroksylgruppen i posisjon 17. I den aromatiske delen av spekteret er det syv signaler, det skal være elleve ettersom forbindelsen (**25**) har to benzenringer i strukturen. Karbonatomene i posisjon 13 og 16 kan være signalene ved 138,69 ppm og 131,82 ppm. Signalet ved 129,29 er omtrent dobbelt så høyt som de andre og kan være to karbonatomer. Dette signalet kan være karbonene i posisjon 13 og 27. Signalet ved 129,20 ppm er omtrent fire ganger så høyt og kan være de fire symmetriske karbonatomene i posisjonene 28,29,31 og 32. Karbonene i posisjon 0,1 og 30 er signalene ved 128,55 ppm, 126,80 ppm og 117,04 ppm. Dette gjør at det blir totalt tolv aromatiske karboner. De resterende fjorten er alifatiske. Signalet ved 82,29 er karbonatomet i posisjon 12 som er bundet til hydroksylgruppen i posisjon 20. Tolv signaler fra 74.93-23.52 er karbonatomene i posisjon 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,24 og 26. Signalet ved 11,49 ppm er karbonatomet i metylgruppen i posisjon 7.

### 3. Konklusjon

Skattebøls *ortho*-formylerings metode av  $17\beta$ -østradiol gav et utbytte på 85 % i form av en isomerisk blanding av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksi-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd (**9**) og (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksi-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-4-karbaldehyd (**11**). Rensing ved normal silika gav et utbytte på 39 % av ren 2-isomer **9**. Dette viser at metoden for *ortho*-formylering fungerer godt, men det er behov for utvikling av en bedre kromatografisk metode.

Ved reduktiv aminering syntesene ble en metode av Hansen *et al.* forsøkt. På bakgrunn av NMR spektra tatt av råproduktene, er metoden ikke optimal for et aldehyd som **9**. Basert på NMR dataene er metoden med bruk av 5-etyl-2-metylpyridin boran kompleks (PEMB) en mer egnet metode.

Totalt fem 2-ME analoger ble forsøkt syntetisert. Dessverre var det ikke nok stoffmengde til å gjøre flere synteseforsøk og derfor ble ikke noe forsøk på forbedring av prosedyren forsøkt. På grunn av tidspress ble ikke råproduktene ren-fremstilt. Det har vært en utfordring å isolere rent produkt ved silikabasert søylekromatografi. Normal aluminafase kan være en bedre metode.

Syntese av nye 2-ME analoger med modifisert 2-posisjon er fortsatt av interesse og det gjenstår å få fremstilt rene analoger og utføre biologiske studier på disse.

## 4. Eksperimentell del

### 4.1 Materialer

Alle reaktanter, reagenser og løsemidler ble kjøpt fra Sigma Aldrich og brukt uten videre bearbeidelse med mindre noe annet er beskrevet.

### 4.2 Apparatur

Synteseproduktene ble analysert ved hjelp av TLC,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, smeltepunkt og HPLC (kun forbindelse (31)).

#### Tynnsjikt-kromatografi (TLC)

Synteseproduktene ble identifisert ved sammenlikning med vandringslengden til kjente stoff, og  $R_f$ -verdier ble bestemt. Tynnsjiktplater som ble brukt var belagt med silikagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Plotene for prøve og referanse ble synliggjort ved bruk av UV (256 nm) og farging med kaliumpermanganat, anisaldehyd eller fosfor molybdenum løst i svovelsyre.

#### Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR)

$^1\text{H}$  NMR spektra ble tatt for alle mellomprodukter og sluttprodukter ble analysert med både  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR. NMR spektra ble tatt opp ved hjelp av Bruker DPX 300 instrument med 300 MHz og automatisk samplechanger. Prøver ble løst i  $\text{CDCl}_3$  og  $d_6$ -DMSO og analysert ved romtemperatur. Bearbeiding av spektra ble utført med dataprogrammet Mestrenova. For videre tolkning av kromatogrammene ble koblingskonstantene ( $J$ ) rapportert i hertz og kjemisk shiftverdi oppgitt i parts per million (ppm/ $\delta$ ) i forhold til løsemiddelet brukt.

Kjemisk shiftverdi løsemidler:

Kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ):  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  7,26 (s) og  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  77,16 (t)

Dimetylsulfoksid ( $d_6$ -DMSO):  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2,50 (m) og  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  39,52 (m)

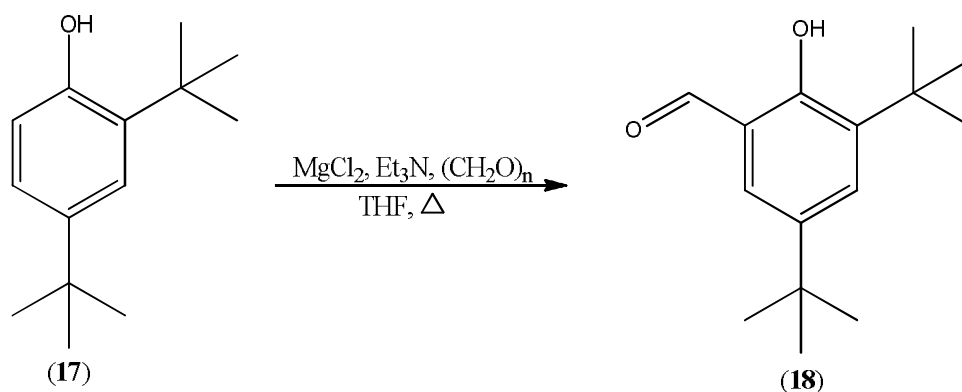
## Væskekromatografi med høy ytelse (HPLC)

HPLC med C18 kolonne og normalfase ble benyttet for å analysere en prøve fra reduktiv aminering reaksjonen med PEMB, syntese 2 av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin (**31**).

## 4.3 Synteser og spektroskopidata

### 4.3.1 Syntese av 3,5-Di-*tert*-butyl-2-hydroksibenzaldehyd

Dette forsøket ble utført 3 ganger. Forsøket tar utgangspunkt i litteratur beskrevet av Hansen & Skattebøl.



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
( <b>17</b> )	$2 \times 10^{-3}$	1	412	-	206,32	0,93	-
Paraformaldehyd	$6 \times 10^{-3}$	3	180	-	30,27	0,88	-
Trietylamin	$4 \times 10^{-3}$	2	404	-	101,19	0,73	-
Magnesiumklorid	$4 \times 10^{-3}$	2	380	-	95,21	2,32	-
THF	-	-	-	10	72,11	0,89	66

Forbindelse (**17**) (426 mg), tørr tetrahydrofuran (10 ml), trietylamin (450 mg), magnesiumklorid (396 mg), og paraformaldehyd (188 mg) ble tilsatt en tohalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (uklar løsning) ble satt til reflux i tre timer ved 78-79 °C (blandingen får en fersken farge v/oppvarming). Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, heptan:etylacetat (90:10). Etter 35 minutter ble reaksjonen stanset og avkjølt til romtemperatur. Dietyleter (10 ml) ble tilsatt og organisk fase ble ekstrahert med 1 M saltsyre (3 x 10 ml) og vasket med vann (3 x 10 ml). Organisk fase ble tørket med magnesiumoksid. Råprodukt: gul, oljeaktig. Råprodukt ble rensert ved flash, heptan:etylacetat (90:10), kolonnediameter 20 mm. Produkt:gult, fast stoff. Utbytte (etter rensing): 49 %. Sm.p: 50-53 °C (litt.53-56 °C) (Larrow & Jacobsen, 1994)

Analytisk data:

- $R_F$  (utgangsstoff) = 0,24
- $R_F$  (produkt) = 0,49

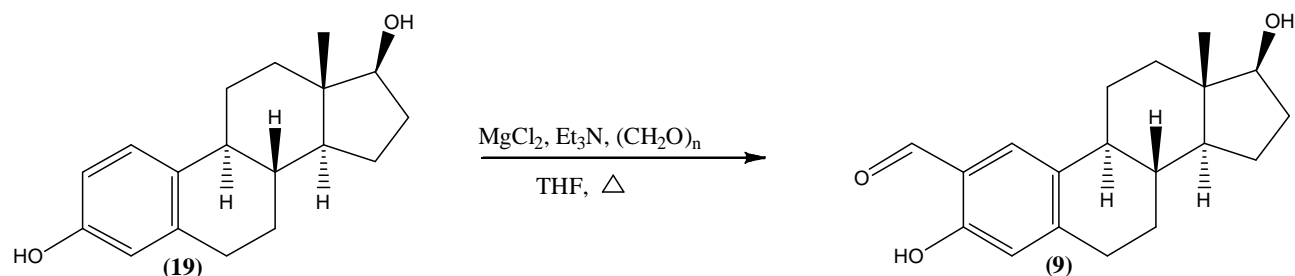
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  11.65 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.33 (s, 9H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  197.73, 159.49, 142.02, 137.99, 132.29, 128,23, 120.39, 35.42, 34.56, 32.01, 31.98, 31.72, 30.45, 30.05, 29.67

### 4.3.2 Syntese av (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-dihydrokxy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16, 17-dekahydro-6H-syklopenta[a]fenantren-2-karbaldehyd



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	1 x 10 <sup>-3</sup>	1	272	-	272,38	1,170	-
Trietylamin	3 x 10 <sup>-3</sup>	3	304	0,42	101,19	0,728	-
Magnesiumklorid	3 x 10 <sup>-3</sup>	3	285	-	95,21	2,32	-
Paraformaldehyd	4 x 10 <sup>-3</sup>	4	120	-	30,27	1,4	-
THF	-	-	-	10	72,11	0,888	66

Tørr tetrahydrofuran (10 ml), forbindelse (19) (261 mg), destillert trietylamin (0,42 ml), tørr magnesiumklorid (311 mg) og paraformaldehyd (131 mg) ble tilsatt en tohalset rundkolbe (50 ml) under N<sub>2</sub>. Reaksjonsblandingen (ugjennomsiktig) stod under omrøring og reflux under N<sub>2</sub> gass i en-to timer (fargeendring; sterk gul) og ble kontrollert med tynnsljiktromatografi (heptan:aceton, 1:1). Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og 1M saltsyre (10 ml) ble tilsatt. Vannfasen ble ekstrahert med etylacetat (2 x 10 ml), de kombinerte organiske fasene ble vasket med mettet natriumklorid løsning (10 ml) og deretter tørket med magnesiumsulfat. Tørket organisk fase ble filtrert over i en rundkolbe (100 ml) og løsemiddelet ble dampet av på rotavapor. Produkt; hvitt/gult tørrstoff. Enkelt utbytte (gjennomsnitt): 85 %, ratio 2- vs. 4-isomer (86:14). Rensing ved søylekromatografi (heksan:tetrahydrofuran, 9:1) gav et hvitt stoff som var ren 2-isomer (9). Sm.p 223-226 °C (litt.230-233 °C) (Rugang *et al.*, 1990 )(Pert *et al.*, 1989)

Analytisk data:

- $R_F$  (utgangsstoff) = 0,42
- $R_F$  (produkt) = 0,49

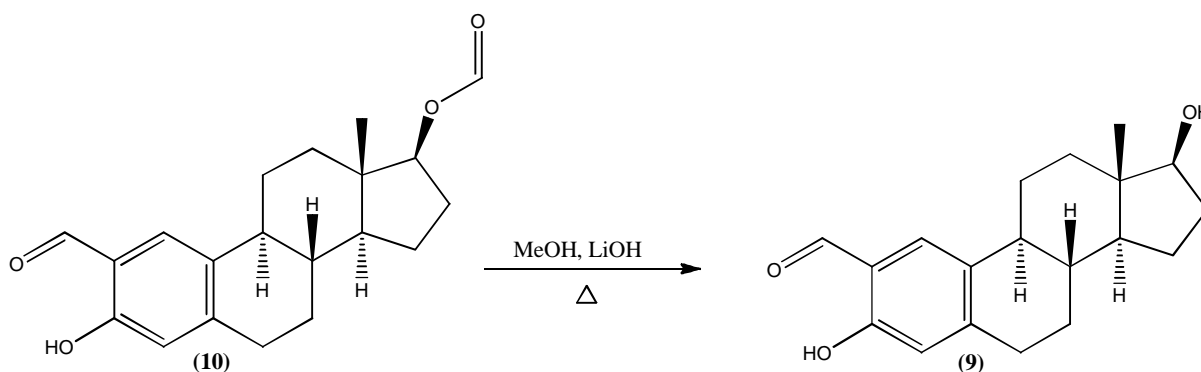
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  10.78 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 3.78-3.71 (m, 1H) 2.94- 2.86 (m, 2H), 2.40- 1.12 (m, 23H), 0.80 (s, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):

$\delta$  192.87, 159.21, 147.46, 132.75, 127.25, 120.93, 117.32, 80.83, 50.34, 43.86, 43.59, 39.02, 37.21, 30.71, 30.28, 27.28, 26.74, 23.58, 12.03

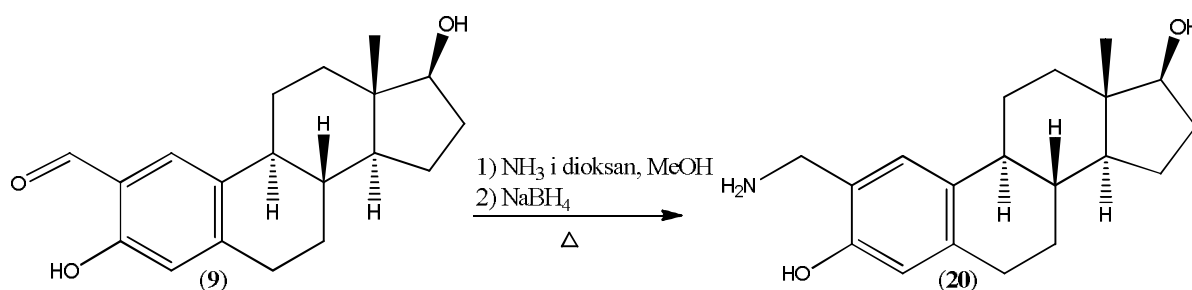
### Hydrolyse av formatester (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-formyl-3-hydroksy-13-metyl-7,8,9,11, 12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-17-yl format fra syntese 4.3.2



Råproduktet fra syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksy-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14, 15,16, 17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-2-karbaldehyd (9) gir et biprodukt i form av en formatester (10). Råproduktet (gul-oransje fast stoff) ble tilsatt metanol og dampet inn på rotavapor for å fjerne rester av etylacetat etter *ortho*-formyleringen. Metanol (15 ml) og 2 M

litiumhydroksid (15 ml) ble tilsatt (fargeendring til sterk rødbrun) og blandingen ble satt på varmebad (45 °C) under omrøring i en time. Reaksjonsblanding ble kontrollert med tyynsjiktkromatografi (heptan:acetone, 1:1). Vanskelig å tyde kromatografi kun ved hjelp av UV, ved bruk av kaliumpermanganat var en forandring synlig. Reaksjonsblanding ble avkjølt til romtemperatur og tilsatt 1 M saltsyre (40 ml). Ved tilsetning av syre ble bunnfall dannet og reaksjonsblanding ble avfarget til hvit, pH ≈ 1. Den sure blandingen ble ekstrahert med etylacetat (2 x 50 ml) og bunnfall løste seg i organisk fase. (Vannfase svak gul, organisk fase sterk gul). De kombinerte organiske fasene ble vasket med mettet natriumklorid løsning (50 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Løsningsmiddel ble dampet av på rotavapor. Produkt ble rensert ved søyle- kromatografi. Renset produkt (9): hvitt, fast stoff. <sup>1</sup>H NMR spektra tatt av produkt (9) viste ingen rester av formater.

### 4.3.3 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-(aminometyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantrene-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	1,7 x 10 <sup>-4</sup>	1	50	-	300,39	-	-
Ammoniakk i 1,4-dioksan	6,7 x 10 <sup>-4</sup>	4	-	1,33	17,04	1,03	-
Natriumborhydrid	6,7 x 10 <sup>-4</sup>	4	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	2	32,04	0,79	65



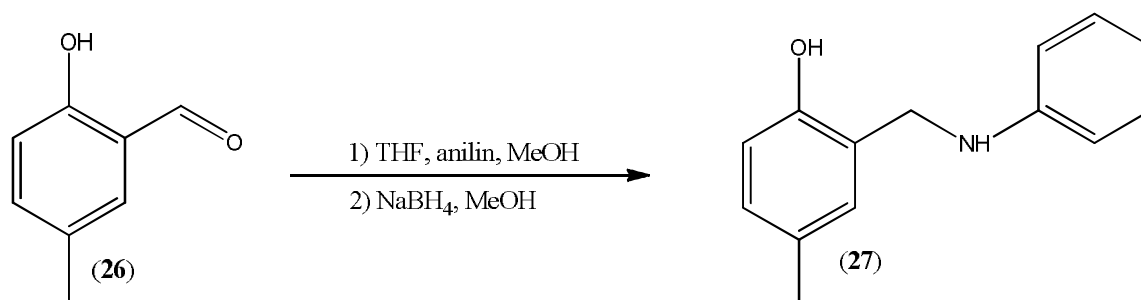
Forbindelse (9) (50 mg) ble veid direkte i en 25 ml rundkolbe., ammoniakk løst i 1,4-dioksan (1,5 ml) og metanol (2 ml) ble tilsatt og satt under omrøring på varmebad (75 °C).

Natriumborhydrid (28 mg) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen (klar løsning) refluxerte i 30 minutter og ble deretter satt til avkjøling til romtemperatur. Tynnsjiktskromatografi (heptan:etylacetat, 1:4) ble brukt for å kontrollere reaksjonen. Mettet løsning med natriumhydrogenkarbonat (4 ml, pH 8) ble tilsatt reaksjonsblandingen (utfelling av karbonatsalt). Ved tilsetning av mer vann ble saltet løst og basisk vannfase (pH ≈ 8) ble ekstrahert med etylacetat (10 ml x 2). De organiske fasene ble samlet og vasket med mettet natriumklorid løsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Den organiske fasen ble deretter filtrert over på en 50 ml tarert rundkolbe og løsemiddel dampet av på rotavapor. Produkt var hvitt, fast stoff. Utbytte (råprodukt): 90 %

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,61

R<sub>f</sub> (produkt): ikke noe produkt ble dannet. Mistanke om sekundær alkohol.

#### 4.3.4 Syntese av 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	P (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(26)	1 x 10 <sup>-3</sup>	1	136	-	136,15	-	-
Anilin	1 x 10 <sup>-3</sup>	1	96	0,1	93,13	-	-
Natriumborhydrid	2 x 10 <sup>-3</sup>	2	76	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	15	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	10	72,11	0,89	66

Tørr tetrahydrofuran (10 ml), forbindelse (**26**) (154 mg), anilin (0,1 ml), metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen, en gul, klar løsning, ble satt til reflux i 30 minutter ved 78-79 °C. Kolben ble tildekket med aluminiumsfolie. Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi. Etter 18 timer under omrøring, ble natriumborhydrid (78 mg) løst i metanol (10 ml), tilsatt dråpevis over 15 minutter. Ingen farge-endring. Reaksjonen ble stanset etter tre timer, pH viste 8. Deretter ble blandingen ekstrahert med dietyleter (30 ml x 2). Vann (30 ml) ble tilsatt for å få faseskille og pH ble endret til 10. Deretter ble 1M saltsyre ble tilsatt til pH 8. Den organiske fasen ble vasket med mettet natriumklorid løsning (30 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: mørk gul/brunt fast stoff. Råprodukt ble rensset med kromatografi, kolonnediameter 45mm. Heksan:etylacetat, 4:1. Produkt: gult fast stoff. Utbytte (etter rensing): 76 %. Sm.p: 88-92 °C. (litt. forbindelsen er ikke rapportert)

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,55

R<sub>f</sub> (produkt): 0,33

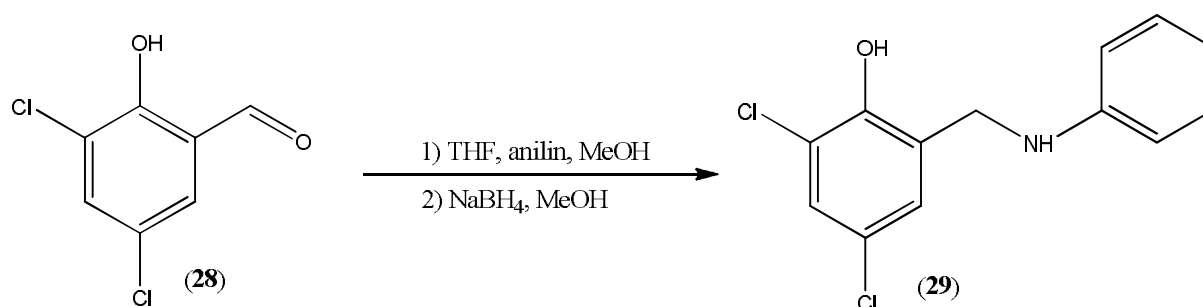
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 8.57 (s, 1H), 7.28- 7.11 (m, 3H), 7.03- 6.65 (m, 7H), 5.54 (s, 1H), 4.36 (s, 2H), 2.26 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 154.73, 147.66, 130.02, 129.77, 129.66, 129.63, 123.04, 121.13, 116.80, 116.24, 49.09, 20.91

### 4.3.5 Syntese av 2,4-Dikloro-6-((fenylamino)metyl)fenol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(28)	$1 \times 10^{-3}$	1	191	-	191,01	-	-
Anilin	$1 \times 10^{-3}$	1	96	0,1	93,13	-	-
Natriumborhydrid	$2 \times 10^{-3}$	2	76	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (28) (198 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), anilin (0,1 ml) og metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til reflux i 30 min ved 74-75 °C (fargen ble mørkere under oppvarming). Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, heksan:etylacetat (4:1), etter 2,5 timer ble natriumborhydrid (76 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over ti minutter (fargen blir lysere). Etter 24 timer ble reaksjonen stanset, pH viste 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M saltsyre ble tilsatt til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med dietyleter (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: mørk oransje, oljeaktig. Rensing ble gjort ved kolonnekromatografi, heksan:etylacetat (8:2), kolonnediameter 25 mm. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte (etter rensing): 50 % Sm.p: 84-85 °C (litt. forbindelsen er ikke rapportert, det som er rapportert er 143-144 °C for *N*-fenyl-2-hydroksi-3,5-diklorobenzylamin) (Azuma & Imoto, 1958)

$R_f$ (produkt): 0,40

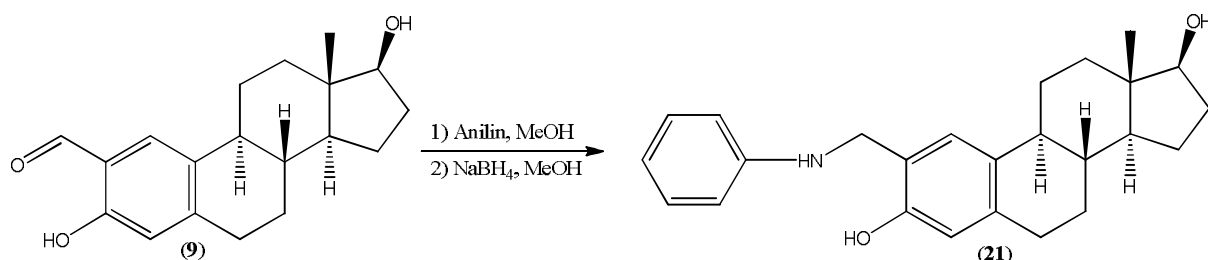
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  8.50 (s, 1H), 7.20 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.19-7.12 (m, 2H), 7.05 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.81 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.68 (dd,  $J = 8.5$  Hz, 0.9 Hz, 2H) 5.95 (s, 1H), 4.32 (s, 2H), 1.18 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  150.53, 147.06, 129.84, 128.61, 127.38, 126.86, 125.23, 121.79, 120.77, 115.52, 47.17

#### 4.3.6 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2 ((fenylamino)-metyl)-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	$3,33 \times 10^{-4}$	1	100	-	300,39	-	-
Anilin	$3,33 \times 10^{-4}$	1	30	0,03	93,13	-	-
Natriumborhydrid	$6,66 \times 10^{-4}$	2	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (9) (90 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), anilin (0,03 ml) og metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til reflux i 30 min ved 76-77 °C (fargen ble mørkere gul under oppvarming).

Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, heksan:etylacetat (4:1), etter 2,5 timer ble natriumborhydrid (25 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over ti minutter. Etter to timer ble reaksjonen stanset, pH var 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M saltsyre til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med dietyleter (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: gult, oljeaktig. Rensing ble gjort ved flash, heksan:etylacetat (4:1), kolonnediameter 25 mm. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte (før kromatografi): 75 % Utbytte (etter kromatografi): 66 % Sm.p:

$R_f$  (utgangsstoff): 0,12

$R_f$  (produkt): 0,16

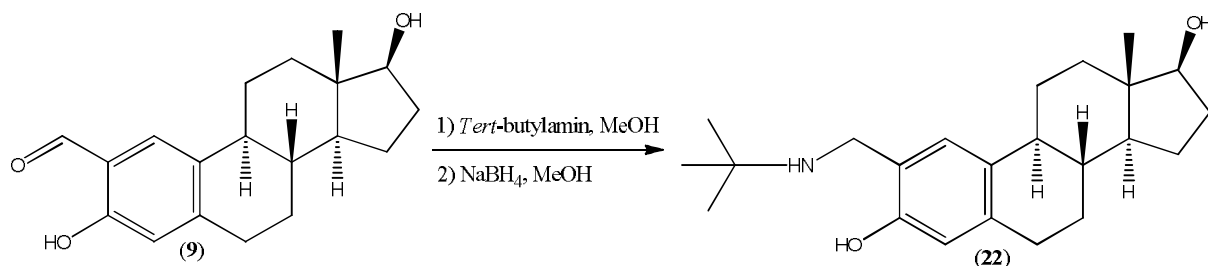
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  8.59 (s, 1H) 7.27-7.21 (m, 3H), 7.07 (s, 1H), 6.92-6.82 (m, 3H), 6.63 (s, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.73 (t,  $J = 8.4$  Hz, 1H) 2.85-2.78 (m, 2H), 2.35-2.08 (m, 5H), 2.00-1.31 (m, 14H) 0.79 (s, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):

$\delta$  153.49, 149.81, 136.10, 131.09, 129.58, 126.35, 123.70, 116.35, 115.55, 113.06, 80.90, 50.37, 44.47, 43.66, 42.28, 37.40, 30.77, 29.72, 27.83, 27.02, 23.63, 12.13

### 4.3.7 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	$3,33 \times 10^{-4}$	1	100	-	300,39	-	-
Tert-butyl amin	$3,33 \times 10^{-4}$	1	24	0,03	73,14	0,696	44-46
Natriumborhydrid	$6,66 \times 10^{-4}$	2	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (9) (92 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), anilin (0,03 ml) og metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til reflux i 30 min ved 78-79 °C (fargen blir mørkere gul under oppvarming). Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, heksan:etylacetat (1:1), etter 2,5 timer ble natriumborhydrid (27 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over 10 minutter. Ingen fargeendring. Etter 19 timer ble reaksjonen stanset, pH viste 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med dietyleter (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: gult, oljeaktig. Utbytte (råprodukt): 61 %. Rensing ble gjort ved flash, diklormetan:metanol (95:5), kolonnediameter 25 mm. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte (etter rensing): 13 % Sm.p:

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,41

R<sub>f</sub> (produkt): 0,00

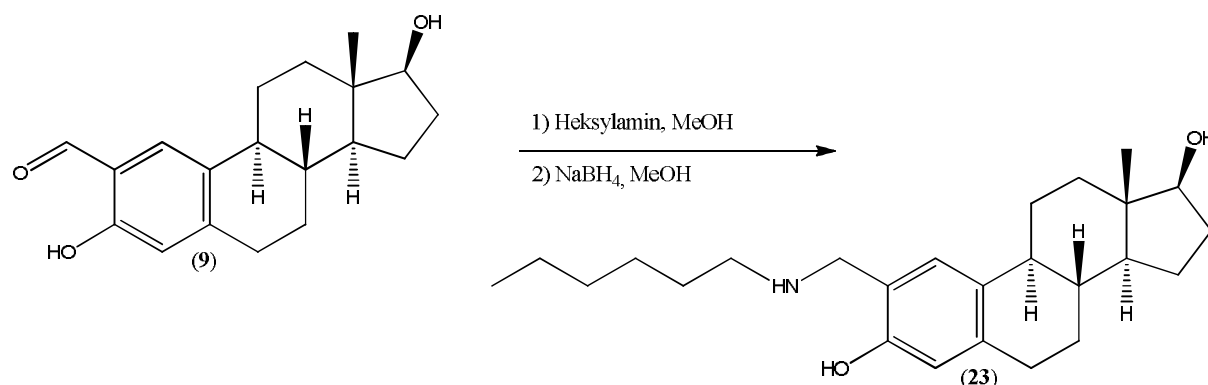
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  8.28 (s, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.65 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H) 6.60 (s, 1H), 6.56 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.73 (t,  $J = 8,3$  Hz, 3H), 2.80 (s, 4H), 2.64 (s, 1H), 2.37-2.20 (m, 1H), 2.17 (s, 4H), 2.15-1.34 (m, 4H), 1.32 (s, 4H), 1.26 (s, 6H), 1.21 (s, 12H) 0.78 (s, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (75MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

$\delta$  156.36, 136.35, 130.67, 125.78, 122.33, 116.15, 80.91, 67.87, 57.31, 51.58, 50.40, 45.31, 44.38, 43.66, 37.45, 31.28, 30.76, 30.31, 30.02, 29.70, 28.79, 27.86, 27.05., 25.99, 23.64, 12.12

### 4.3.8 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((heksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14, 15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalente r	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	$3,33 \times 10^{-4}$	1	100	-	300,39	-	-
Heksylamin	$3,33 \times 10^{-4}$	1	34	0,04	101,19	0,77	-
Natriumborhydrid	$6,66 \times 10^{-4}$	2	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (9) (98 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), heksylamin (0,04 ml) og metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til refluks i 30 min ved 77-78 °C. Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, heksan:etylacetat (1:1), etter 3,5 timer ble natriumborhydrid (26 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over 15 minutter. Ingen fargeendring. Etter 18 timer ble reaksjonen stanset, pH = 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M saltsyre (2 ml) til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med dietyleter (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: gult, fast stoff. Rensing ble gjort ved flash, diklormetan:etylacetat (4:1), kolonnediameter 25 mm. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte (etter rensing): 0 %. Mistet produkt i forsøk på rensing på kolonnekromatografi. Sm.p: ukjent.

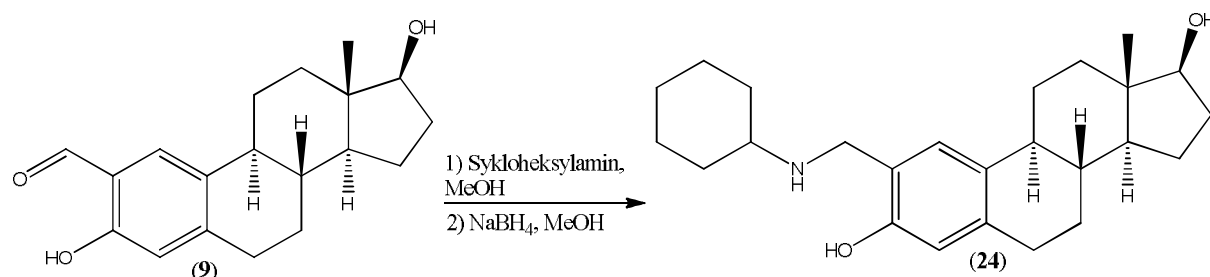
R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,56

R<sub>f</sub> (produkt): 0,10

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

Ikke noe spektra tatt.

### 4.3.9 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12, 13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	1	100	-	300,39	-	-
Sykloheksylamin	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	1	-	0,04	99,17	0,87	134,5
Natriumborhydrid	6,66 x 10 <sup>-4</sup>	2	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (9) (99 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), sykloheksylamin (0,04 ml) og metanol (5 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til reflux i 30 min ved 78-79 °C (fargen ble mørkere gul under



oppvarming). Reaksjonen ble kontrollert med tynnsljtskromatografi, heksan:etylacetat (4:1), etter 2 timer ble natriumborhydrid (27 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over 15 minutter. Ingen fargeendring. Etter 20 timer ble reaksjonen stanset, pH 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M saltsyre til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med dietyler (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: gult, fast stoff. Utbytte (råprodukt): 89 %.  $^1\text{H}$  NMR spektra ble tatt av råprodukt. Rensing ble gjort ved manuell kolonne-kromatografi, diklormetan:etylacetat (4:1), aluminiumoxid silika (aktivert, nøytral), kolonnediameter 25 mm. Produkt: gult, fast stoff. Utbytte (før kromatografi): 89 % Sm.p: 120-123 °C Utbytte (etter rensing): 12 % Ved studering av  $^1\text{H}$  NMR spektra tatt av rensset produkt ser det ut til at det ikke var den ønskede forbindelsen (**24**). Rensingen var mislykket.

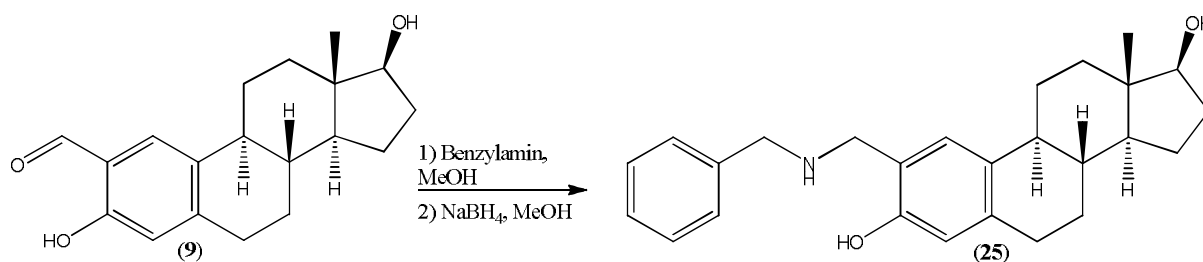
$R_f$  (utgangsstoff): 0,17

$R_f$  (produkt): 0,54

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):

$\delta$  13.36 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.57-3.47 (m, 1H), 3.33 (s, 2H), 2.81 (dd,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 2.34-1.94 (m, 1H), 1.91 (s, 1H), 1.89-1.26 (m, 6H), 1.23 (d,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 0.66 (s, 3H)

#### 4.3.10 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13, 14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	$3,33 \times 10^{-4}$	1	100	-	300,39	-	-
Benzylamin	$3,33 \times 10^{-4}$	1	36	0,04	107,15	0,98	185
Natriumborhydrid	$6,66 \times 10^{-4}$	2	25	-	37,83	1,07	-
Metanol	-	-	-	10	32,04	0,79	65
THF	-	-	-	15	72,11	0,89	66

Forbindelse (9) (95 mg), tørr tetrahydrofuran (15 ml), benzylamin (0,04 ml) og metanol (10 ml) ble tilsatt en trehalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonsblandingen (gul, klar løsning) ble satt til reflux i 30 min ved 77-78 °C. Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, diklormetan:etylacetat (3:1), etter 15 timer ble natriumborhydrid (32 mg) løst i metanol (5 ml) tilsatt dråpevis over 15 minutter. Ingen fargeendring. Etter seks timer (gulfargen virket lysere) ble reaksjonen stanset, pH 8. Vann (30 ml) ble tilsatt og 1 M saltsyre til pH 8. Blandingen ble ekstrahert med etylacetat (30 ml x 2) og organisk fase ble vasket med mettet natriumkloridløsning (20 ml) og tørket med magnesiumsulfat. Råprodukt: gult, fast stoff. Utbytte (før kromatografi): 86 %. Rensing ble gjort ved manuell søylekromatografi, diklormetan:metanol (9:1). Produkt: hvitt, fast stoff. Utbytte (etter rensing): 51 %. Sm.p: 108-109 °C.

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,59 (diklormetan:etylacetat, 3:1)

R<sub>f</sub> (produkt): 0,68 (diklormetan:metanol, 9:1)

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

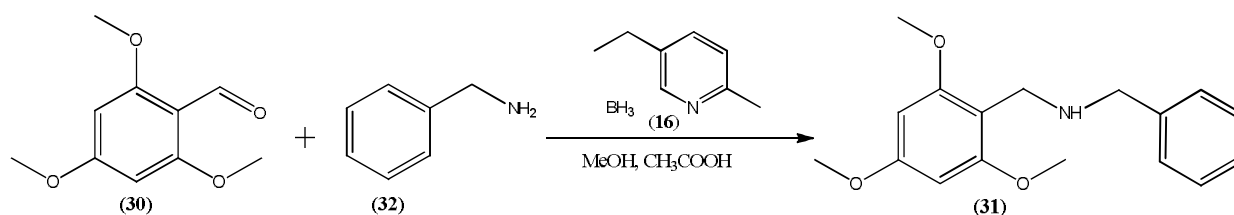
$\delta$  7.29-7.21 (m, 5H), 6.84 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.71 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 3.74 (s, 2H), 2.77-2.70 (m, 2H), 2.34-1.02 (m, 16H) 0.71 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  156.11, 137.76, 131.41, 129.07, 129.03, 127.92, 127.81, 125.80, 120.01, 116.68, 82.30, 53.04, 52.42, 50.45, 44.30, 43.66, 39.31, 37.15, 31.01, 29.79, 27.70, 26.83, 23.53, 11.49

### 4.3.11 Syntese av *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksyfenyl)metanamin

Dette forsøket ble gjort 4 ganger, dog med små forskjeller i prosedyren. Denne prosedyren baseres på forsøk 2 beskrevet i 3.3.1



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(30)	$2 \times 10^{-3}$	2	392	-	196,20	1,13	-
Benzylamin	$2 \times 10^{-3}$	2	214	0,22	107,15	0,98	185
PEMB	$1 \times 10^{-3}$	1	135	0,15	135,01	0,91	-
Metanol	-	-	-	4	32,04	0,79	65
Iseddik	$4 \times 10^{-3}$	4	-	0,23	60,05	1,05	118

Forbindelse (30) (399 mg), forbindelse (32) (0,22 ml), iseddik (0,23 ml) og metanol (4 ml) ble tilsatt en tohalset rundkolbe under tørre betingelser. Reaksjonen (klar, mørk gul løsning) stod under omrøring i 1,5 timer ved romtemperatur. 5-Etyl-2-metylpyridin borat (PEMB) (0,15 ml) ble tilsatt ved 24-25 °C over ti minutter (fargeendring; fargen ble lysere). Reaksjonen ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi, diklormetan:metanol (9:1). Konsentrert saltsyre (0,1 ml) ble tilsatt etter to timer og reaksjonsblandingen (klar løsning) ble satt til reflux ved 73 °C over natt. Neste dag, løsningen er fargeløs. Tre dråper med mettet natriumbikarbonat ble satt til. Oppkonsentrering ble gjort på rotavapor ved 50 °C. Råprodukt: blanding av olje og krystaller, utbytte 167 %. Rensing ble gjort ved manuell kolonnekromatografi, diklormetan:metanol (9:1). Produkt: Hvite krystaller. Utbytte (etter rensing): 66 % Sm.p: 163-169 °C. (litt. forbindelsen er ikke rapportert)

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,82

R<sub>f</sub> (produkt): 0,56

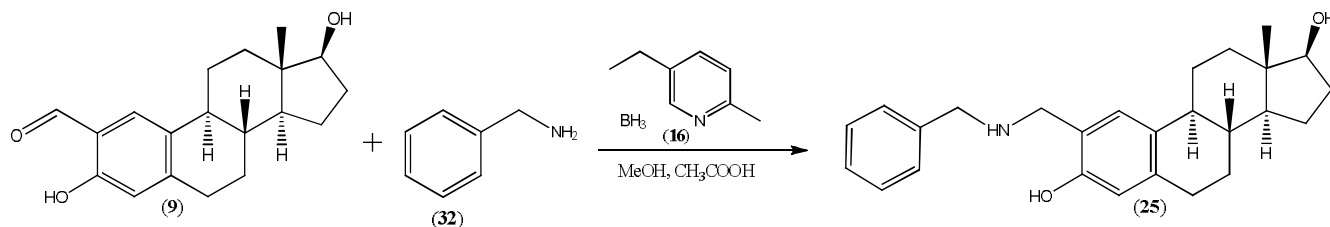
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 9,52 (s, 1H), 7,52 (dd, *J* = 6.3, 2.7 Hz, 2H), 7,28 (d, *J* = 5,4 Hz, 3H), 5,96 (s, 2H), 3,99 (s, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,75 (s, 6H), 3,66 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 162.82, 160.08, 131.73, 130.45, 129.10, 128.94, 99.86, 90.50, 56.08, 55.61, 49.67, 38.42

### 4.3.12 Syntese av (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



Reagenser	Mol	Ekvivalenter	Masse (mg)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	ρ (g/cm <sup>3</sup> )	k.p °C
(9)	5,2 x 10 <sup>-4</sup>	2	156	-	300,39	-	-
Benzylamin	5,2 x 10 <sup>-4</sup>	2	56	0,06	107,15	0,98	185
PEMB	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	1	35	0,04	135,01	0,91	-
Metanol	-	-	-	1	32,04	0,79	65
Iseddik	1 x 10 <sup>-3</sup>	4	60	0,06	60,05	1,05	118

Forbindelse (**32**) (0,06 ml), metanol (1 ml), iseddik (0,06 ml). Dette stod under omrøring i 5-10 minutter. Forbindelse (**9**) (140 mg) ble tilsatt, det tok rundt ti minutter før alt var oppløst. Reaksjonsblandingen hadde en sterk gulfarge. Reaksjonen fikk stå under omrøring ved 23 °C og ble kontrollert med tynnsjiktskromatografi etter 2,5 timer. Prøven viste rester av reaktanter. Etter tre timer med omrøring var det felt ut masse stoff med en kraftig gulfarge, det så ut som en tykk grøt, dette skyldes noe fordampning av metanol. Tynnsjiktskromatografi viste ingen rester av reaktanter. Mer løsemiddel ble tilsatt (0,5 ml) og bunnfallet var uløselig. PEMB (0,04 ml) ble tilsatt over fem til ti minutter. Dette løste opp bunnfallet og den kraftige gulfargen avtok til gul/grønn. Reaksjonsblandingen fikk stå under omrøring i romtemperatur i to timer. Ved tilsetning av 1 dråpe saltsyre (konsentrert) er reaksjonsblandingen nesten avfarget. Refluks v/80-82 °C over natt. Reaksjonen ble avkjølt til romtemperatur og en dråpe natriumbikarbonat (mettet) ble tilsatt. Oppkonsentrering ble gjort på rotavapor ved 50 °C. Råprodukt: olje. Rensing ble gjort ved kolonnekromatografi, diklormetan:metanol (99:1). Produkt: Klare krystaller. Utbytte: 65 %. Sm.p: 128-131 °C.

R<sub>f</sub> (utgangsstoff): 0,82

R<sub>f</sub> (produkt): 0,46

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 7.32 (s, 5H), 6.90 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.48 (s, 3H), 3.96 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.72 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3.47 (s, 1H), 2.76 (s, 2H), 2.30- 2.06 (m, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98- 1.10 (m, 13H), 0.77 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ 155.30, 138.69, 131.82, 129.29, 129.20, 128.55, 126.80, 117.04, 82.29, 74.93, 51.91, 50.43, 44.23, 43.63, 39.23, 37.11, 30.96, 29.78, 27.62, 26.79, 23.52, 11.4

## 5. Referanseliste

Agoston G.E., Shah, J.H., Suwandi, L.S., Hanson, A.D., Zhan, X.H., LaVallee, T.M., Pribluda, V., og Treston, A.M., *Synthesis, antiproliferative, and pharmacokinetic properties of 3-and 17-double-modified analogs of 2-methoxyestradiol. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6241-6244

Akselsen, Ø.W, og Hansen, T.V., *Regioselective synthesis of 2-formyl estrone derivatives. Supporting information for manuscript submitted to Tetrahedron* (2011)

Azuma, K., Imoto, E., *The transjointing reaction of phenolic Mannich bases with several organic compounds. Kogyo Kagaku Zasshi* 61 (1958) 1043-1046

Ed: Baguley, B.C., og Kerr, D.J., *Anticancer drug development. Koop, E.A., Voest, E.E., Tumor vasculature as a target* (2002) 7:123-186

Baxter, E.W., og Reitz, A.B., *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents. Org. React* 59 (2002) 1-170

Burkhardt, E.R., og Coleridge, B.M., *Reductive amination with 5-ethyl-2-methylpyridine borane. Tetrahedron, Lett.* 49 (2008) 5152-5155

Casiraghi, G., Casnati, G., Cornia, M., Pochini, A., Puglia, G., Sartori, G., og Ungaro R., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* (1978) 318-321

Casiraghi, G., Casnati, G., Puglia, G., Sartori, G. Terenghi, *J. Chem.Soc. Perkin Trans 1.* (1980) 1862-1865

Childs, G.V., Ph.D., *Microtubule structure* (1999) 409 Aksessert 10.mai 2011

URL Address: [http://cellbio.utmb.edu/cellbio/microtubule\\_structure.htm](http://cellbio.utmb.edu/cellbio/microtubule_structure.htm)

Chilman-Blair, K., *2-Methoxyestradiol: Anticancer agent angiogenesis inhibitor. Drugs of the future* 28 (2003) 11:1064-1069

Choueiri, T.K., Bukowski, R.M., Rini, B.I., *The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. Semin Oncol.* 33 (2006) 596-606

D'Amato, R.J., Lin, C.M., Flynn, E., Folkman, J., og Hamel, E., *2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1994) 3964-3968

DeBakey M. E., Diethrich E. B, Entman M. L., Godman M. J., Oliver M. F, Prout W.G. , Warren, J. V. *Encyclopedia Britannica Online. Cardiovascular disease. Comparison of arteries.* Aksessert 28.mars 2011  
<http://www.britannica.com/EBchecked/media/100168/Cross-sectional-diagrams-of-human-blood-vessels-showing-a-norma>.

Edsall, A.B., Mohanakrishnan, A.K., Yang, D., Fanwick, P.E., Hamel, E., Hanson, A.D., Agoston, G.E., og Cushman, M., *Effects on altering the electronics of 2-methoxyestradiol on cell proliferation, on cytotoxicity in human cancer cell cultures, and on tubulin polymerization. J. Med. Chem.* 47 (2004) 5126-5139

Edsall, A.B., Agoston, G.E., Treston, A.M., Plum, S.M., McClanahan, R.H., Lu, T.S., Song, W., og Cushman, M., *Synthesis and in vivo antitumor evaluation of 2-methoxyestradiol 3-phosphate, 17 phosphate, and 3,17 diphosphate. J. Med. Chem.* 50 (2007) 6700-6705

Fang, Z., Agoston, G.E., Ladouceur, G., Treston, A.M., Wang, L., og Cushman, M., *Structure elucidation by synthesis of four metabolites of the antitumor drug ENMD-1198 detected in human plasma samples. Tetrahedron* 65 (2009) 10535-10543

Fossum, S., *Ekstracellulær matriks. Store norske leksikon.* Aksessert 12.april 2011  
[http://www.snl.no/.sml\\_artikkel/ekstracellul%C3%A6r\\_matriks](http://www.snl.no/.sml_artikkel/ekstracellul%C3%A6r_matriks)

Hansen, T.V., og Skattebøl, L., *Ortho-formylation of phenols; Preparation of 3-bromosalicylaldehyde, Organic Syntheses* 82 (2005) 64

Hansen, T.V., Anwar, H.F., og Skattebøl, L., *Synthesis of substituted salicylamines and dihydro-2H-1,3-benzoxazines. Tetrahedron* 63 (2007) 9997-10002

Hofsløkken, N.U., og Skattebøl, L., *Convenient Method for the ortho-formylation of Phenols. Acta. Chem. Scand.* 53 (1999) 258-262

Hou, Y., Meyers, C, Y., og Akomeah, M., *A Short, Economical Synthesis of 2-Methoxyestradiol, an Anticancer Agent in Clinical Trials. J. Org. Chem.* 74 (2009) 6362-6364

- Jain, R. K., *Molecular regulation of vessel maturation. Nature Medicine* 9 (2003) 685-693
- Lakhani, N.J., Sarkar, M.A., Venitz, J., og Figg, W.D., *2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. Pharmacotherapy* 23 (2003) 165-172
- Larrow, J. F., og Jacobsen, E. N. *A Practical Method for the Large-Scale Preparation of [N,N-Bis(3,5-di-tert-butyl-salicylidene)-1,2-cyclohexanediaminato(2-)] manganese(III) Chloride, a Highly Enantioselective Epoxidation Catalyst. J. Org. Chem* 59 (1994) 1939-1942
- Lee, I., Choe, Y. S., Jung, K-H., Lee, K-H., Choi, J.Y., Choi, Y., og Kim, B-T., *2- [methyl-<sup>11</sup>C]Methoxyestradiol: synthesis, evaluation and pharmacokinetics for in vivo studies on angiogenesis. Nuclear Medicine and Biology*, 34 (2007) 625–631
- Mueck, A.O., og Seeger, H., *2-Methoxyestradiol- Biology and mechanism of action. Steroids*. 75 (2010) 625-631
- Mun, J., Voll, J.R., og Goodman, M.M., *Synthesis of 2-[<sup>11</sup>C]methoxy-3,17b-estradiol to measure the pharmacokinetics of an antitumor drug candidate, 2-methoxy-3,17b-estradiol. J Label Compd Radiopharm* 49 (2006) 1117–1124
- Muranaka, K., *Anticancer activity of estradiol derivatives: A quantitative structure-activity relationship approach. J. Chem. Ed.* 78 (2001) 1390-1393
- Pert, D., Ridley, D.D., *Formylation of estrogens. Australian Journal of Chemistry* 42 (1989) 405-419
- Rao, P.N., Cessac, J.W., Boyd, J.W., Hanson, A.D., og Shah, J., *Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs- Part II. Steroids* 73 (2008) 158-170
- Rugang, X., Qiuyun, C., Jin, X., Huaming, Z., *Steroids. A new efficient synthetic method for 2- and 4-hydroxy-17a-ethynylestradiol* 55 (1990) 488-490
- Siemann, D.W., *Vascular targeting agents. Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside.* 3 (2002) 4-15
- Ed: Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., *Organic chemistry, 8 th ed.* (2004) 18: 835-836, 20: 957-958



Statens legemiddelverk, *Preparatsøk, pakning Avastin 25 mg/ml*. Aksessert 15.april 2011  
[http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_\\_\\_\\_80333.aspx?SearchID=9db7336e-8d0d-4322-8e95-8f1654b39403](http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch____80333.aspx?SearchID=9db7336e-8d0d-4322-8e95-8f1654b39403)

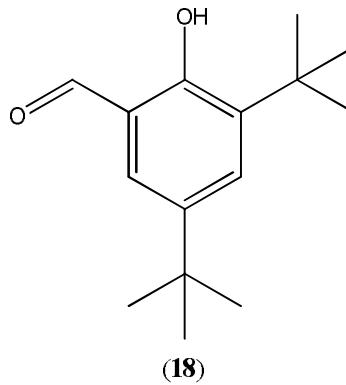
Sutherland, T.E., Anderson, R.L., Hughes, R.A., Altmann, E., Schuliga, M., Ziogas, J., og Stewart, A.G. *2-Methoxyestradiol- a unique blend of activities generating new class of anti-tumor/anti-inflammatory agents*. *Drug Discovery Today* 12 (2007) 577-584

Suwandi, L.S., Agoston G.E., Shah, J.H., Hanson, A.D., Zhan, X.H., LaVallee, T.M., og Treston, A.M., *Synthesis and antitumor activities of 3-modified 2-methoxyestradiol analogs*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6459-6462

Ed: Weinberg, A.R., *The biology of cancer. Dialogue replaces monologue: Heterotypic interactions and the biology of angiogenesis*. (2007) 13:527-586

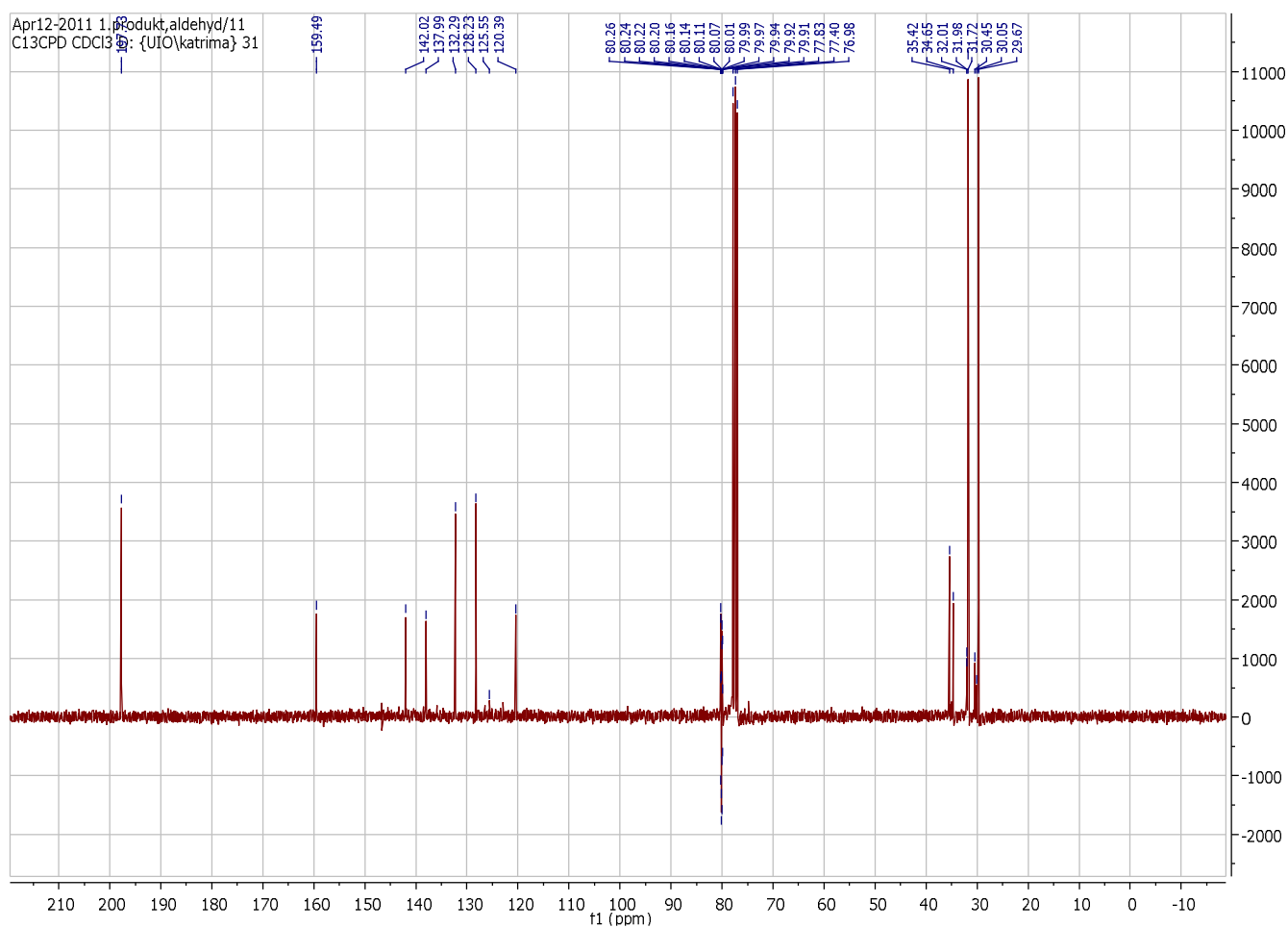
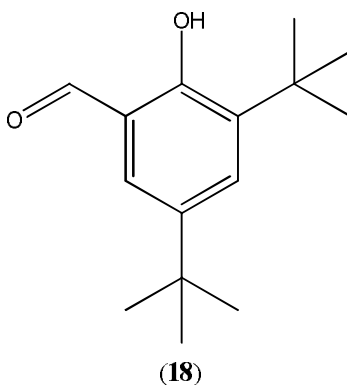
# VEDLEGG 1

## $^1\text{H}$ NMR SPEKTER AV 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksi-benzaldehyd



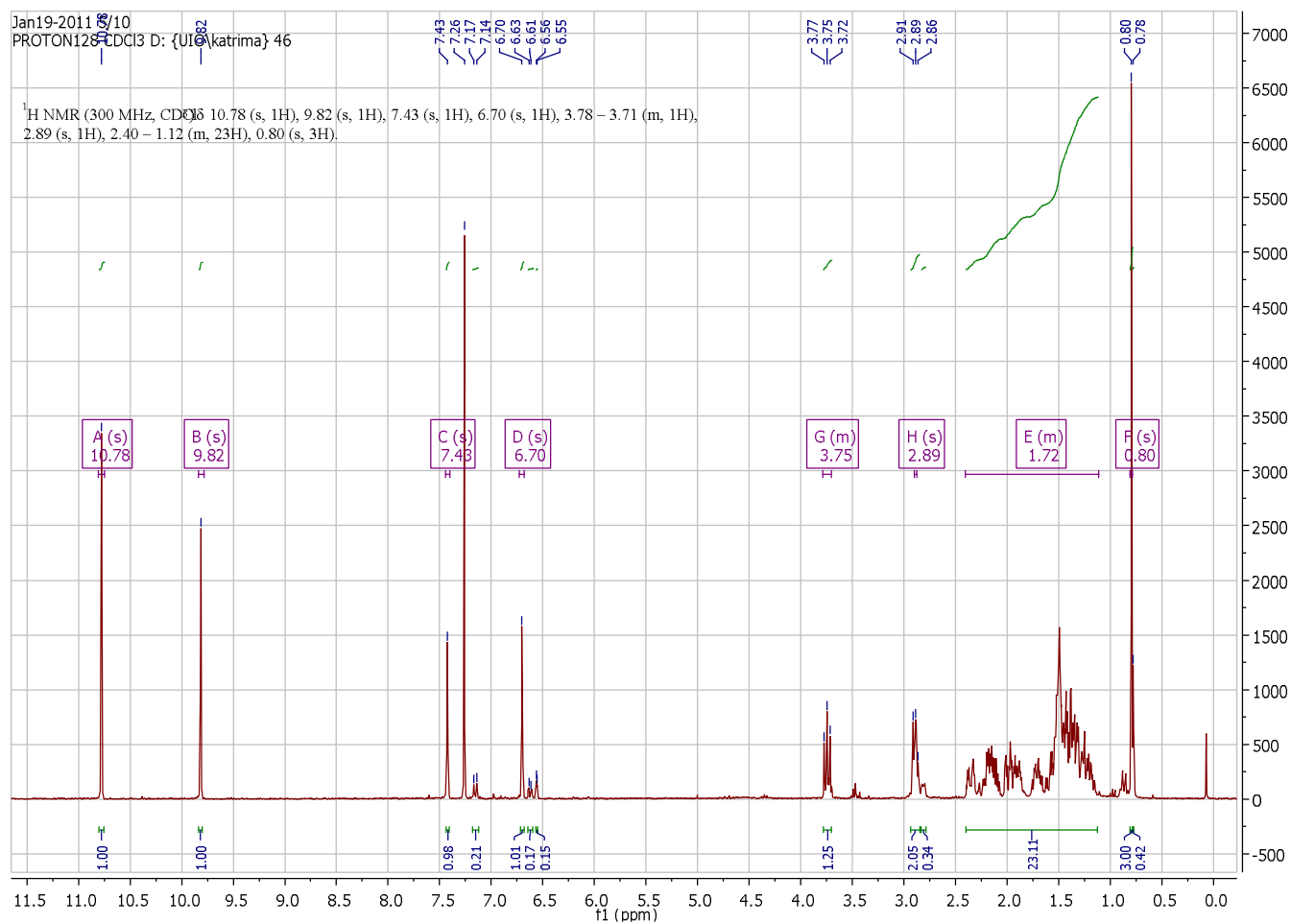
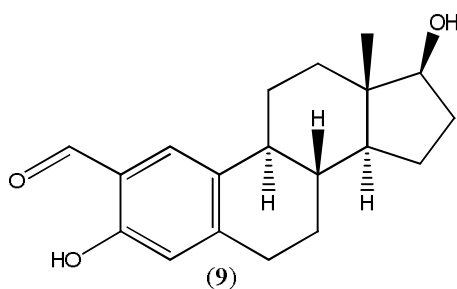
# VEDLEGG 2

## $^{13}\text{C}$ NMR SPEKTER AV 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroksi-benzaldehyd



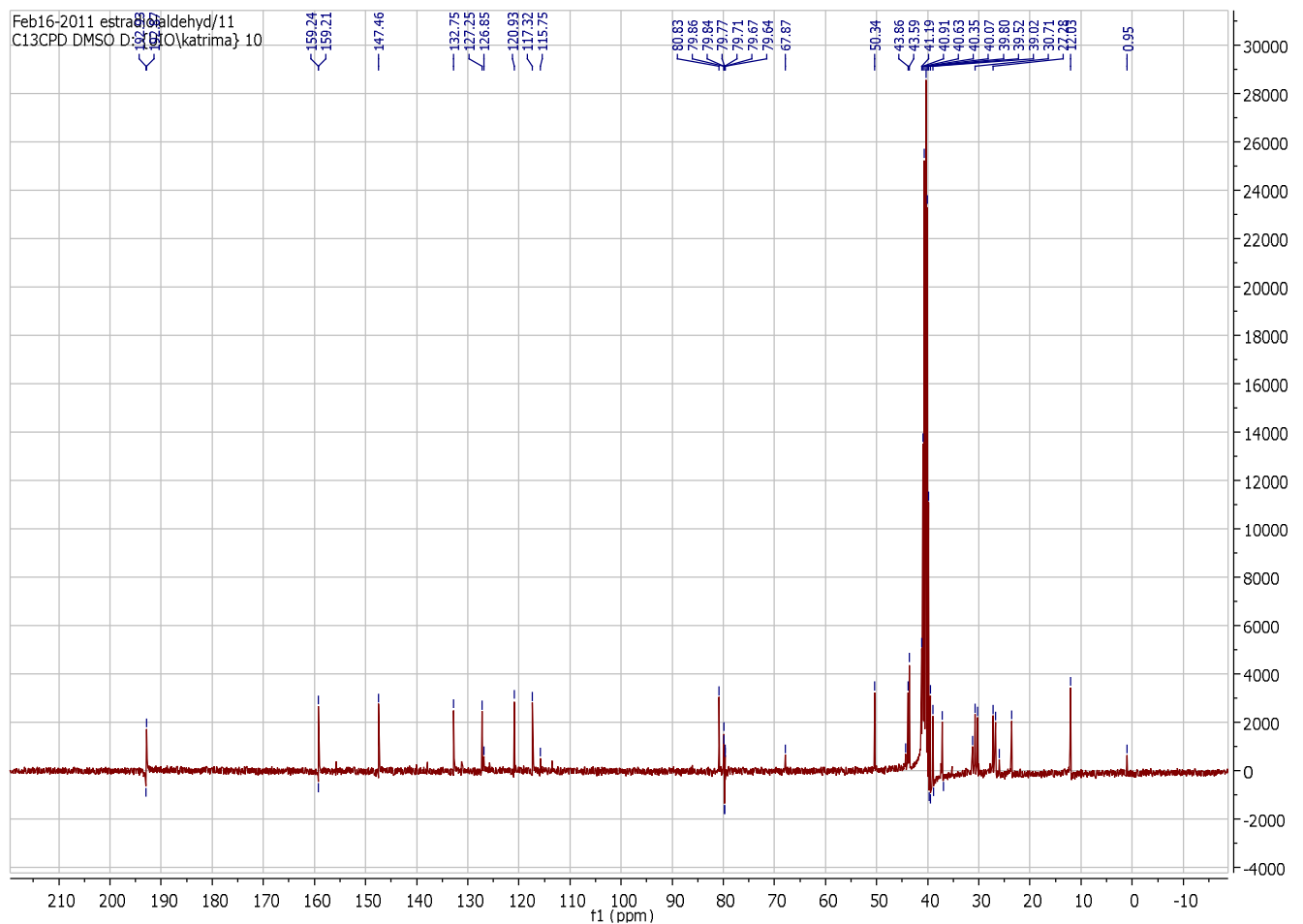
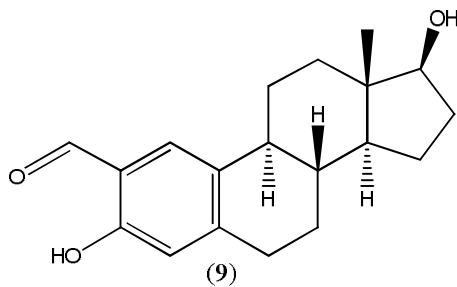
# VEDLEGG 3

## <sup>1</sup>H NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksy-13-metyl 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-2-karbaldehyd



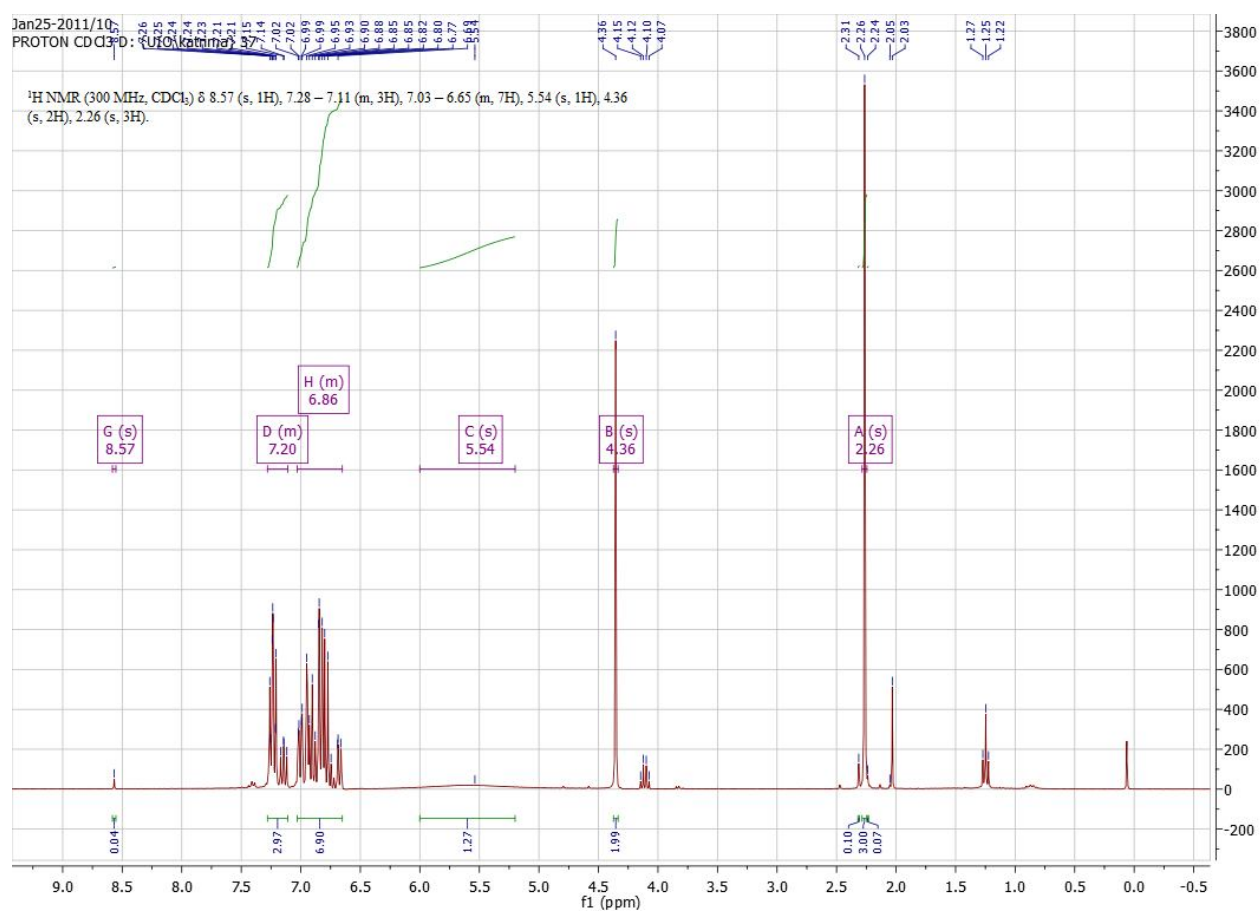
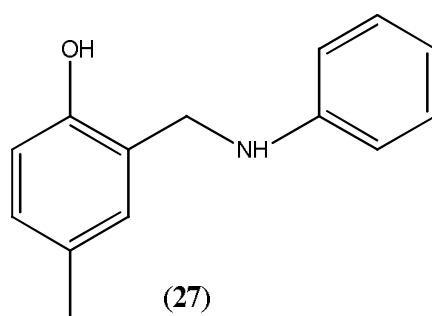
# VEDLEGG 4

$^{13}\text{C}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3,17-dihydroksy-13-metyl 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-2-karbaldehyd



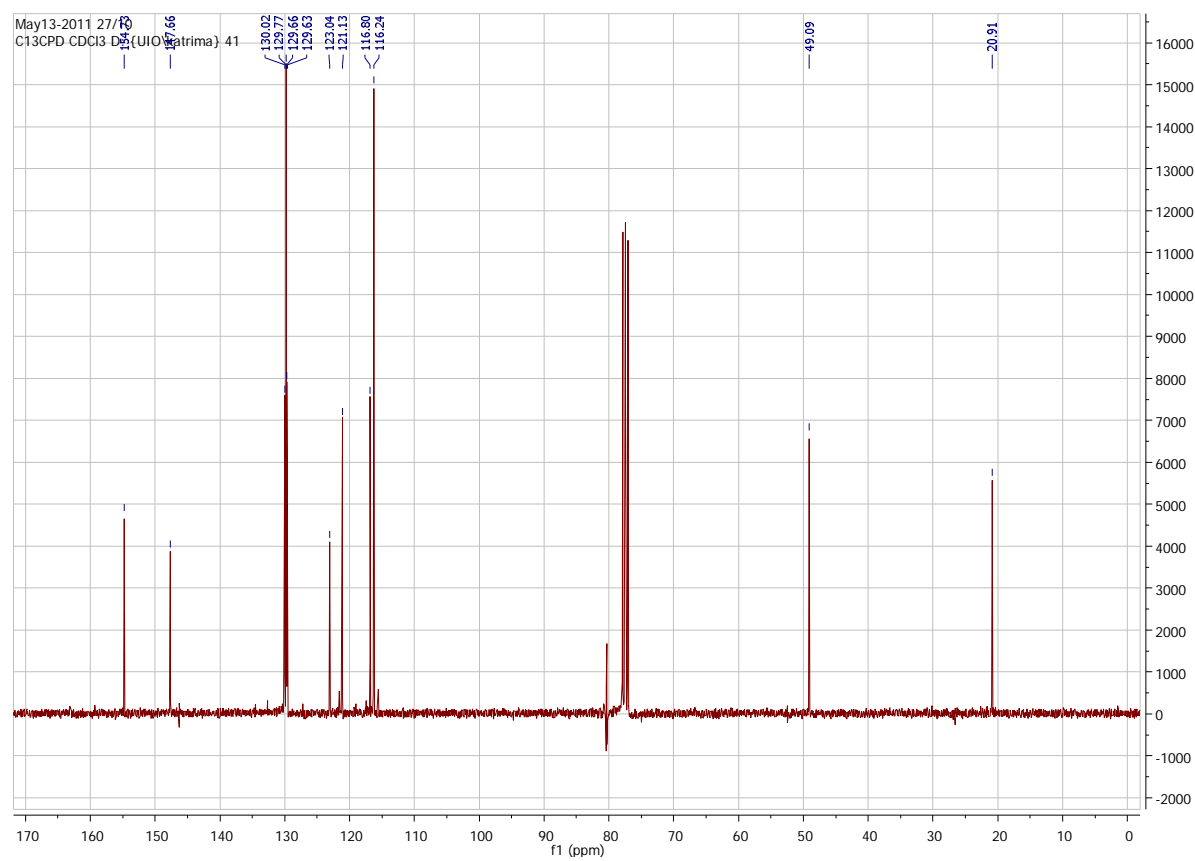
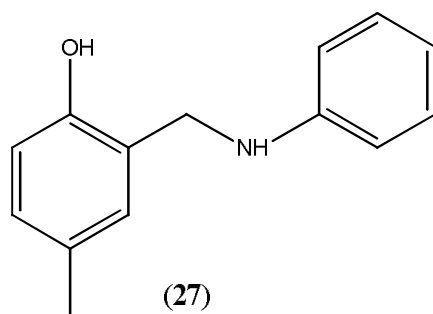
# VEDLEGG 5

## <sup>1</sup>H NMR SPEKTER AV 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol



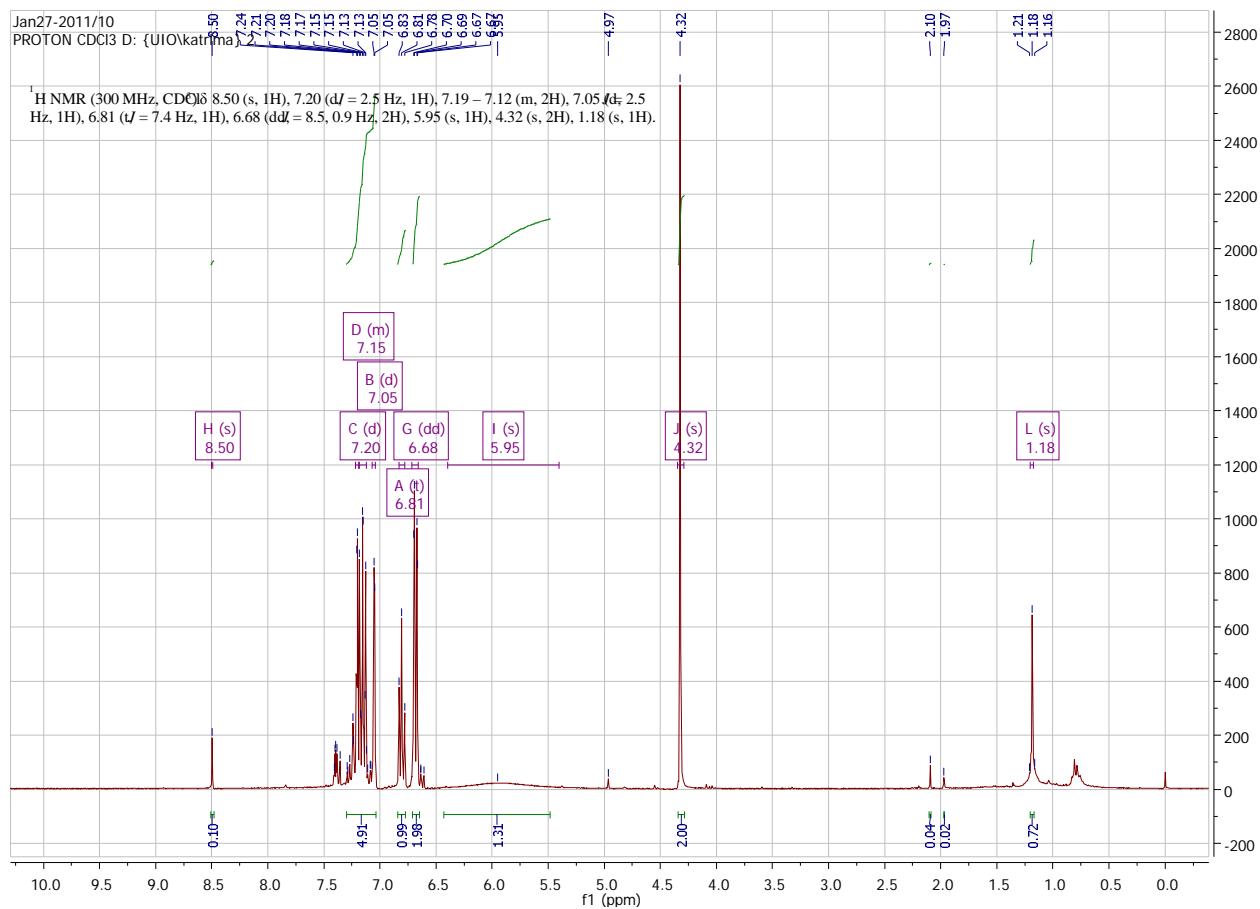
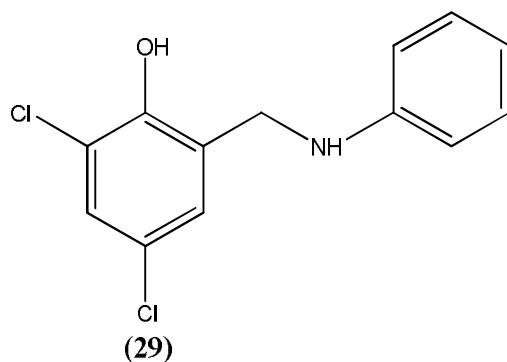
# VEDLEGG 6

## $^{13}\text{C}$ NMR SPEKTER AV 4-metyl-2-((fenylamino)metyl)fenol



# VEDLEGG 7

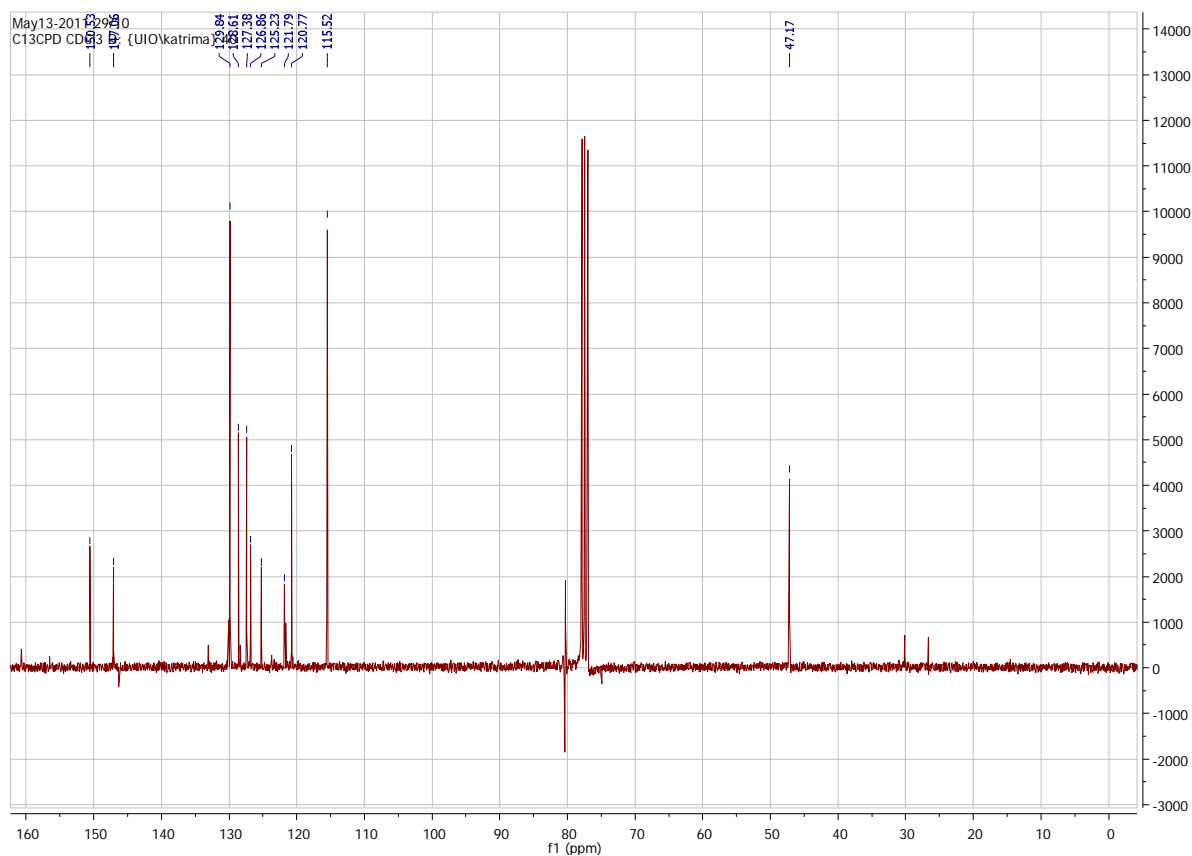
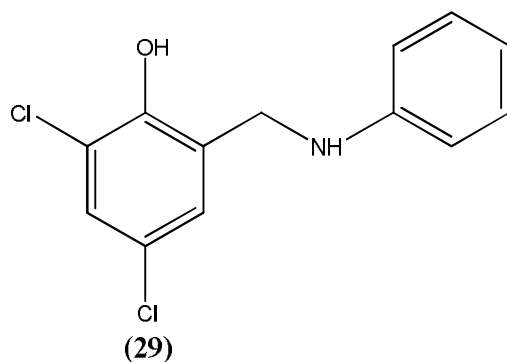
## <sup>1</sup>H NMR SPEKTER AV 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)-fenol





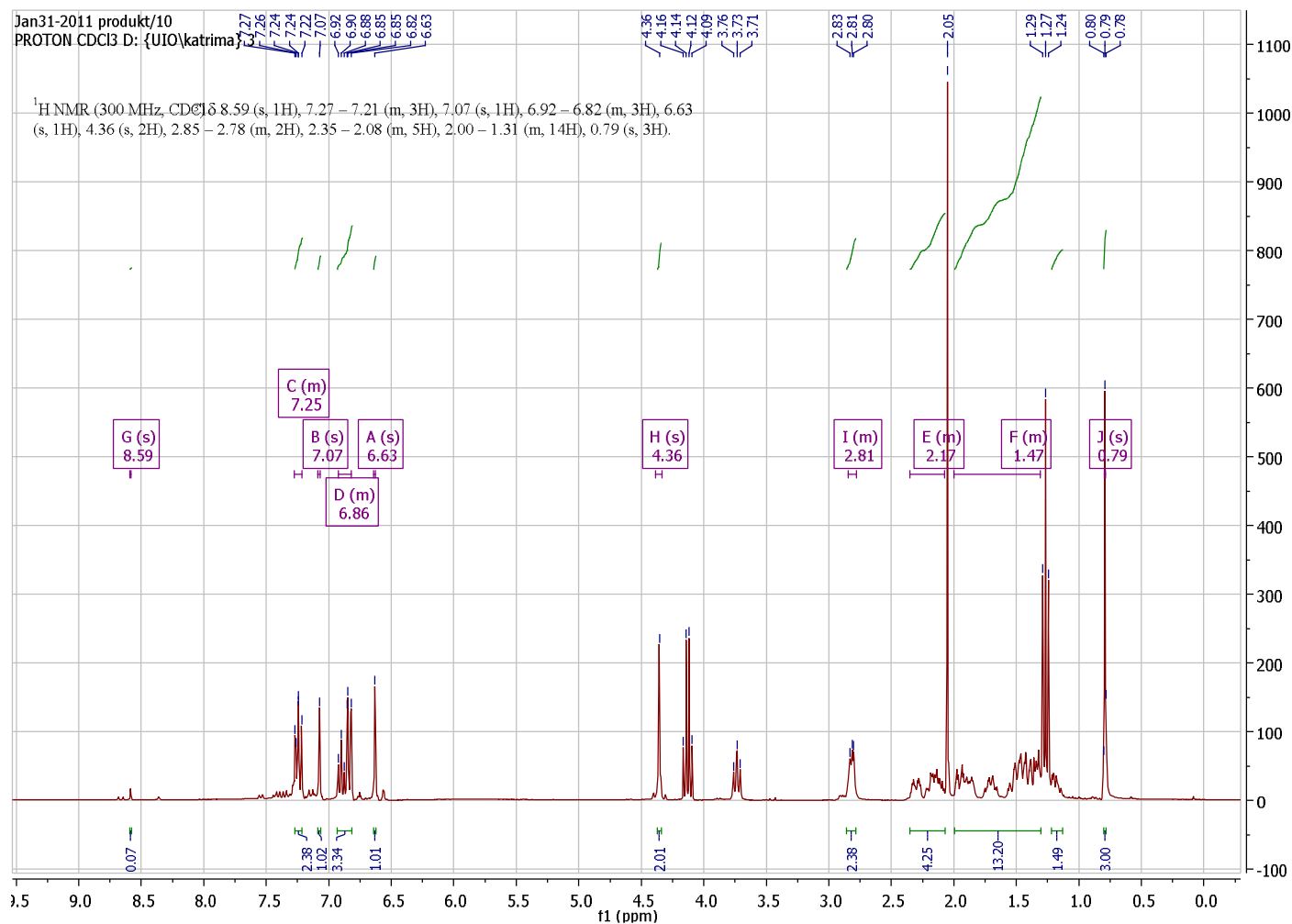
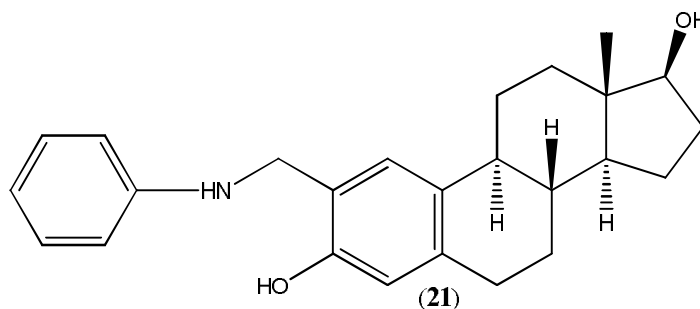
# VEDLEGG 8

## $^{13}\text{C}$ NMR SPEKTER AV 2,4-dikloro-6-((fenylamino)metyl)-fenol



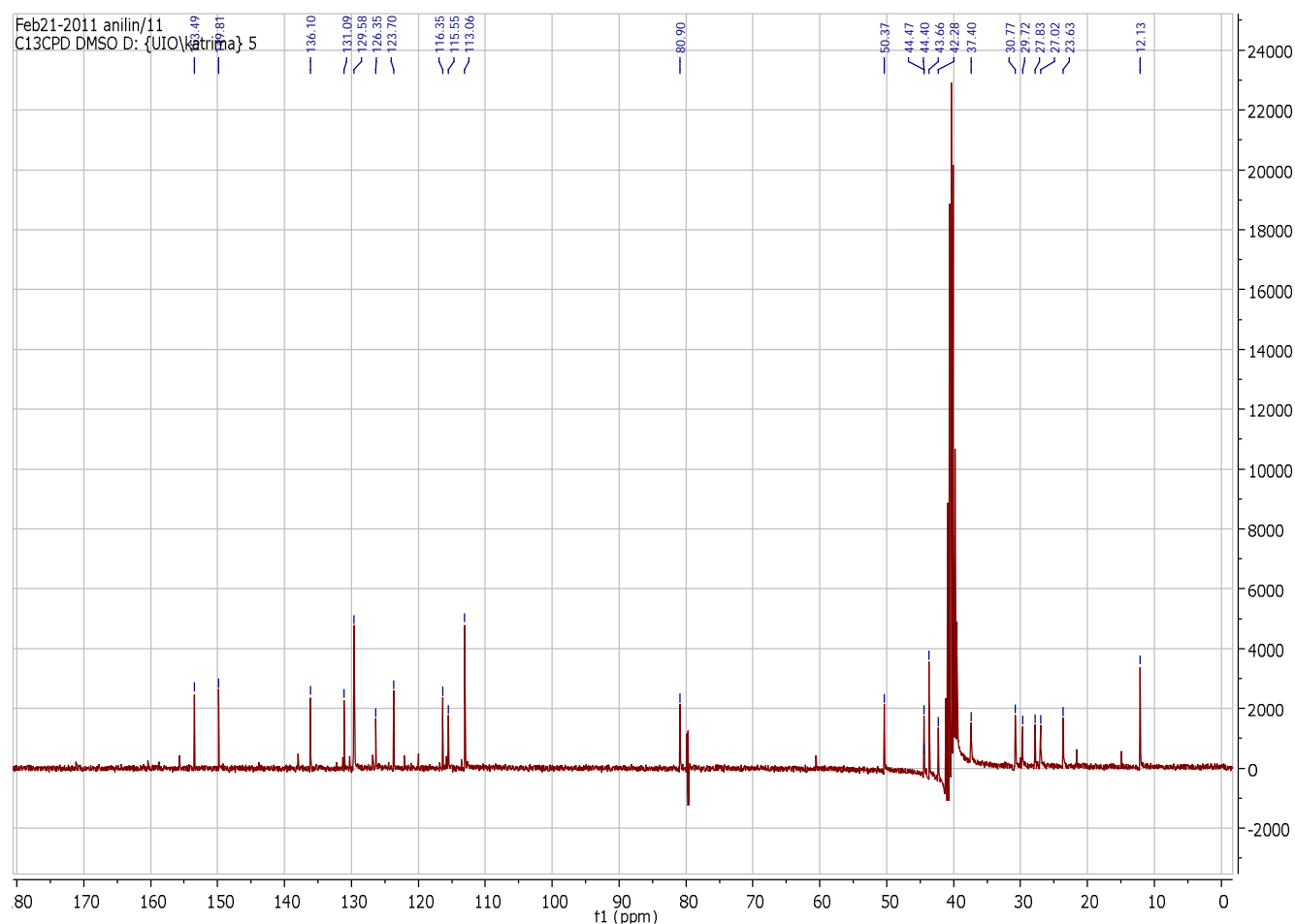
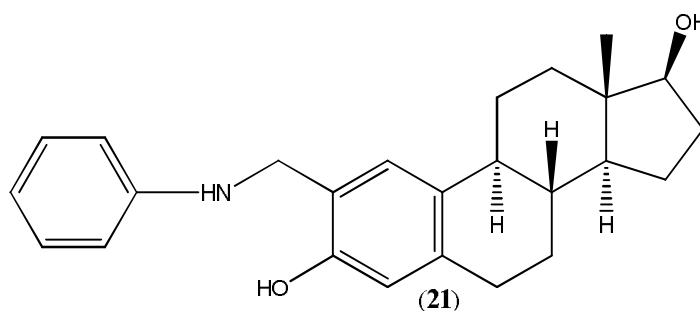
# VEDLEGG 9

## <sup>1</sup>H NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino) metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]-fenantren-3,17-diol



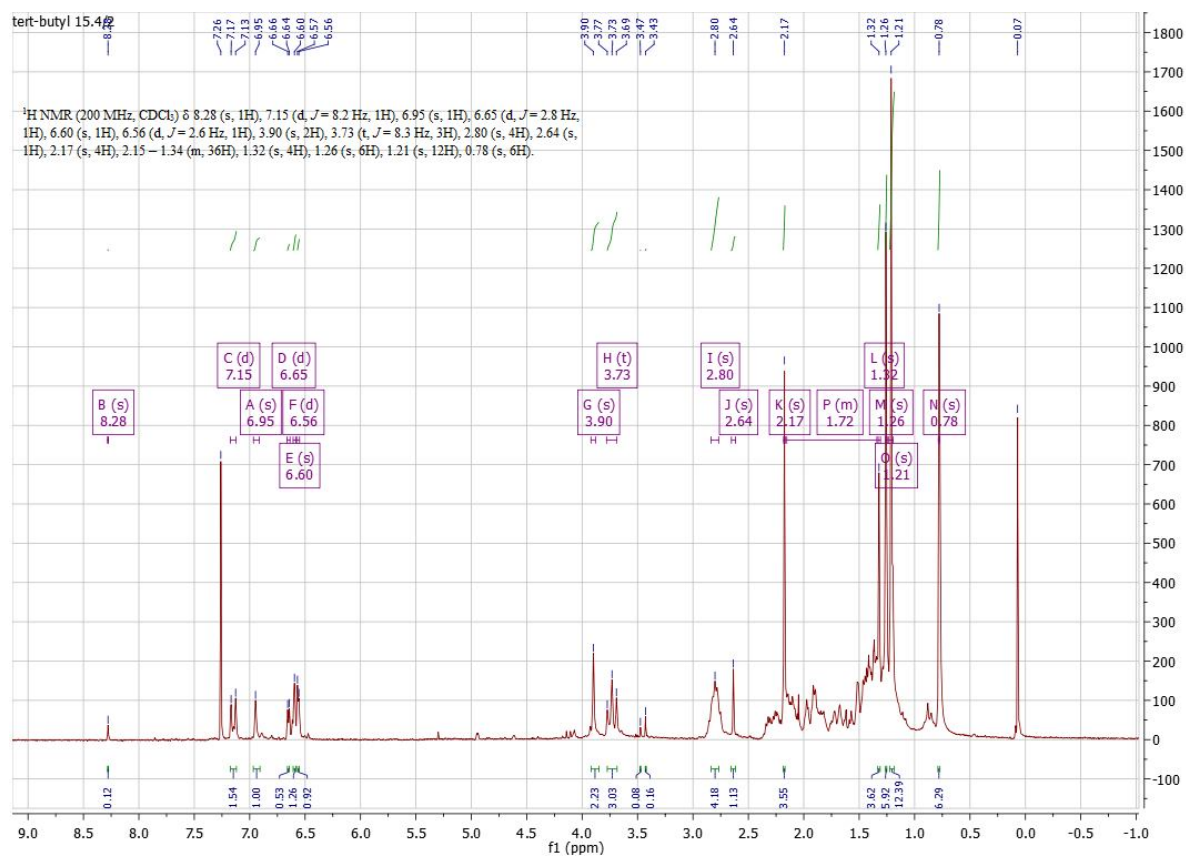
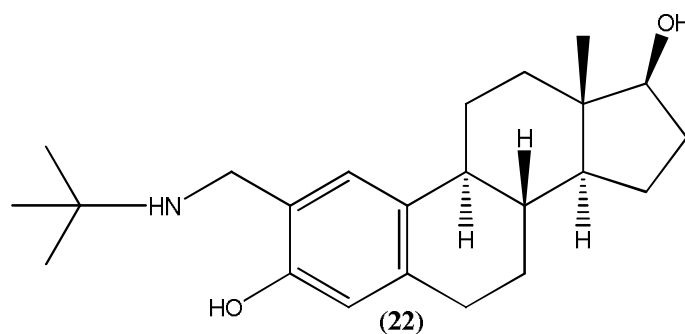
## VEDLEGG 10

$^{13}\text{C}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-13-metyl-2-((fenylamino) metyl)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]- fenantren-3,17-diol



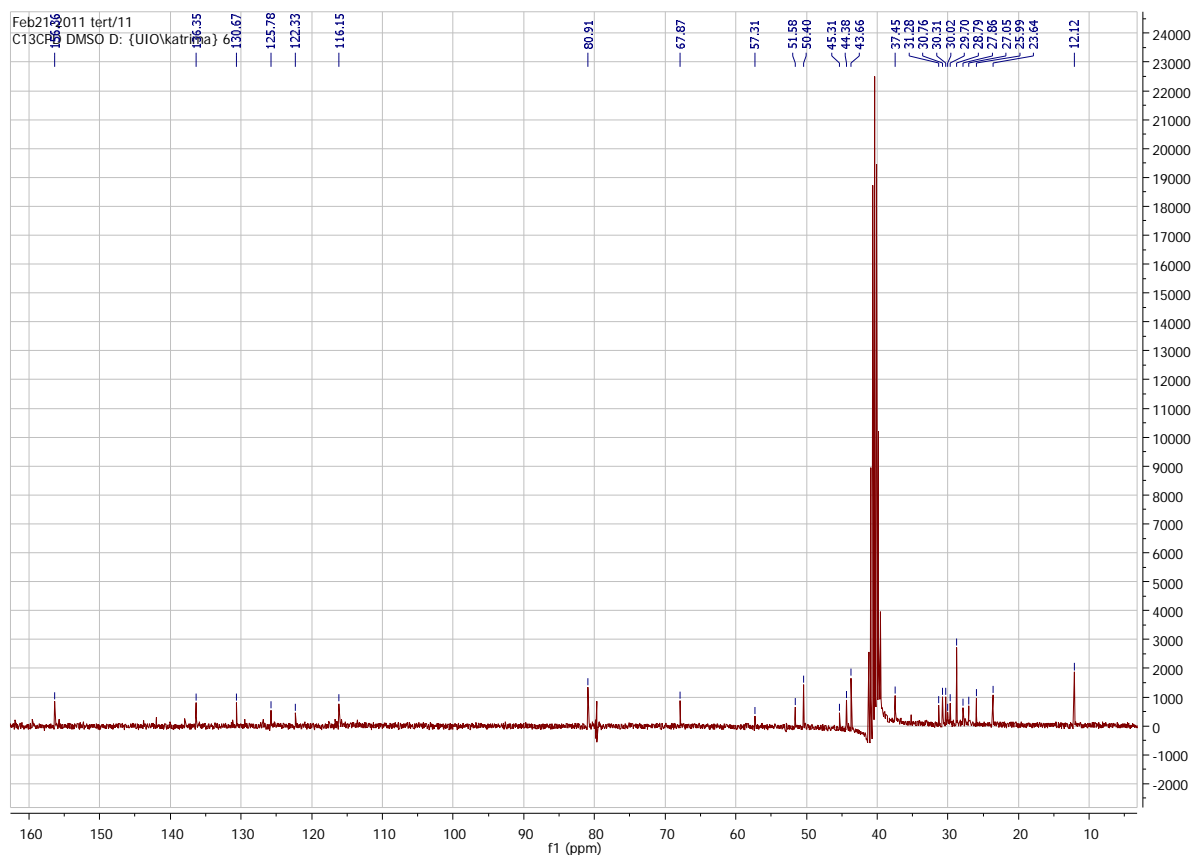
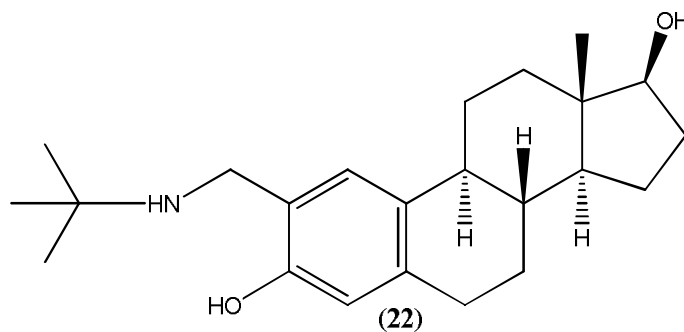
# VEDLEGG 11

$^1\text{H}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8, 9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]- fenantren-3,17-diol



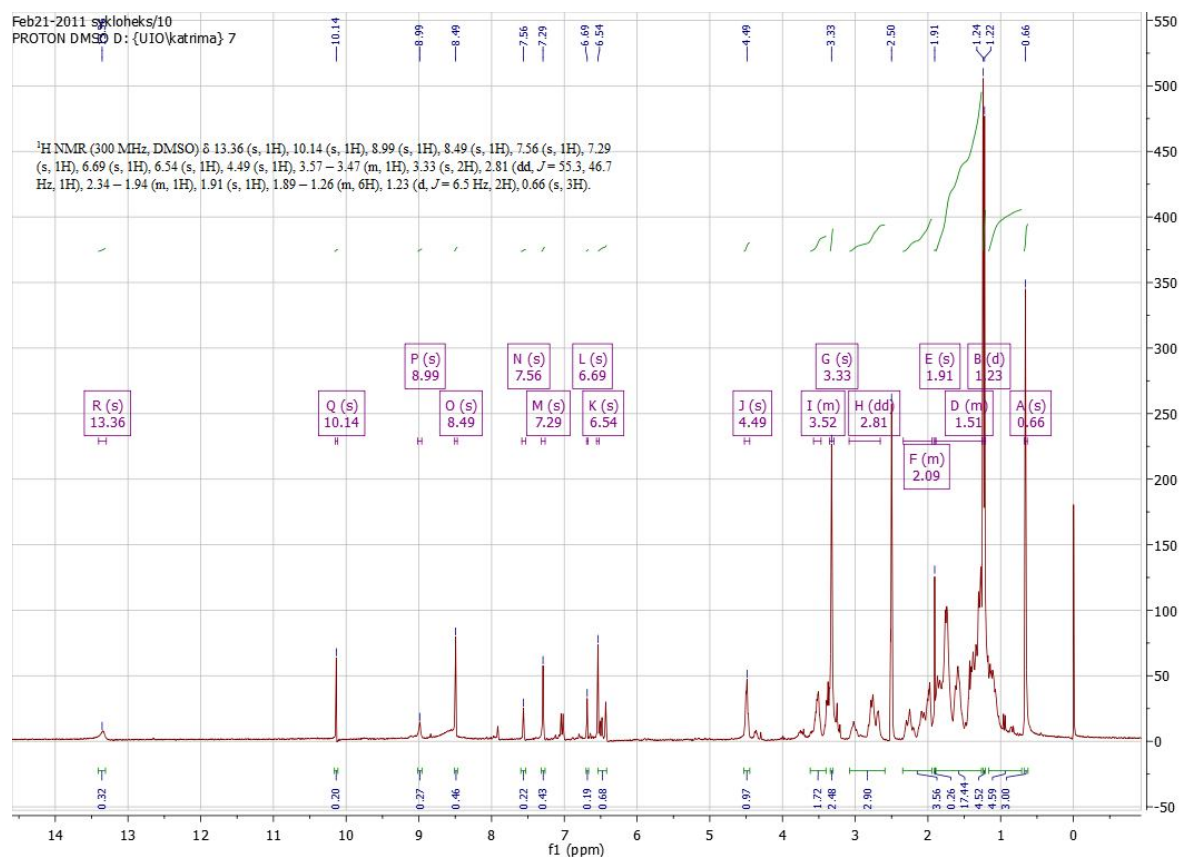
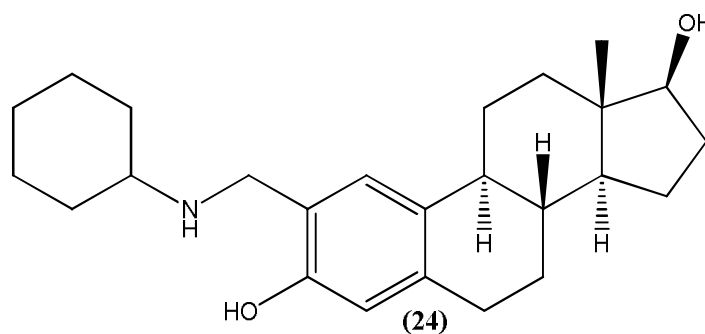
## VEDLEGG 12

$^{13}\text{C}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((*tert*-butylamino)metyl)-13-metyl-7,8, 9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]- fenantren-3,17-diol



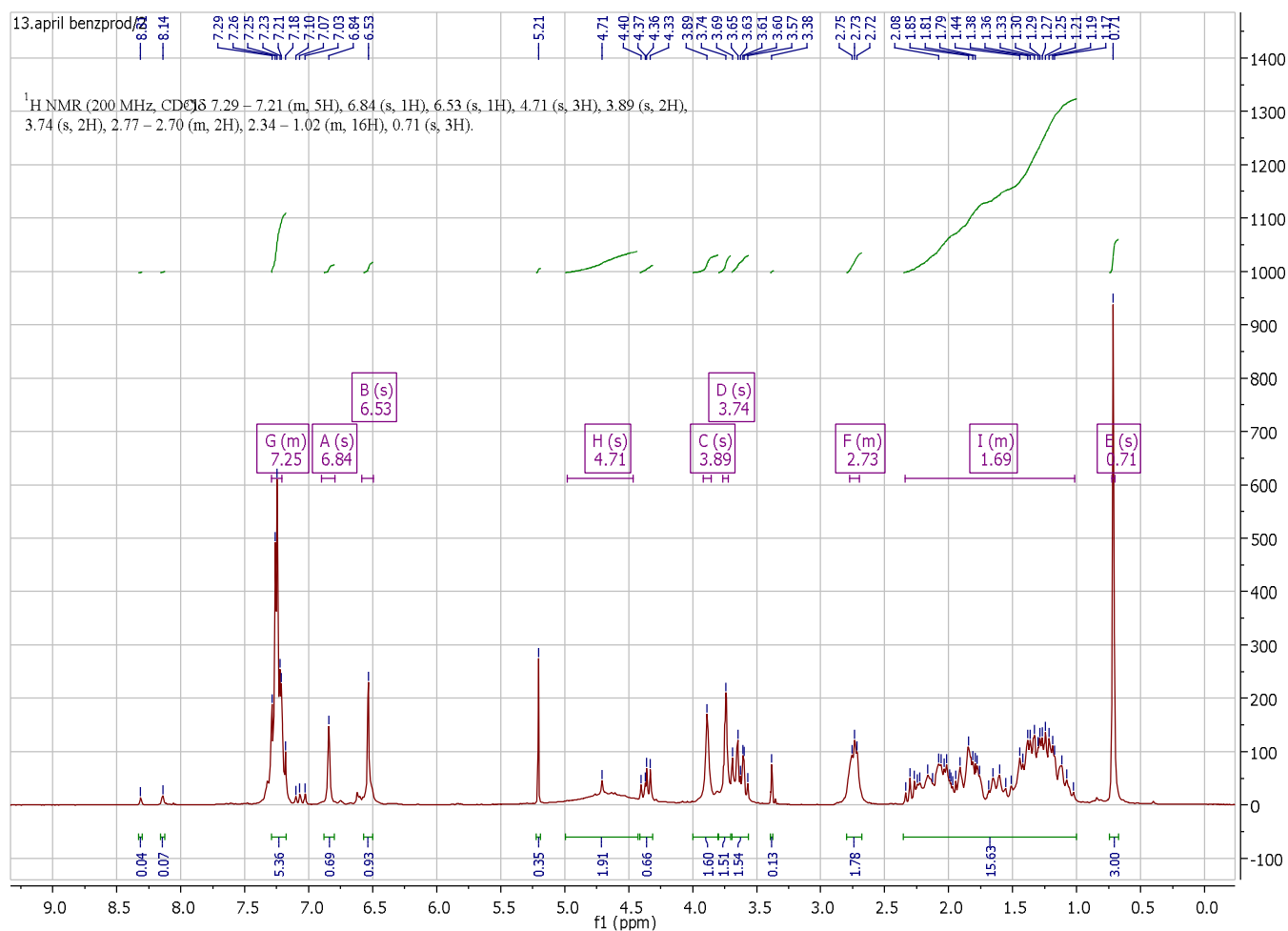
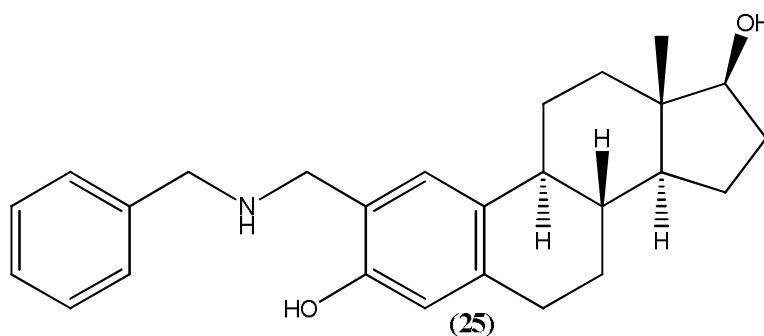
# VEDLEGG 13

$^1\text{H}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((sykloheksylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15, 16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



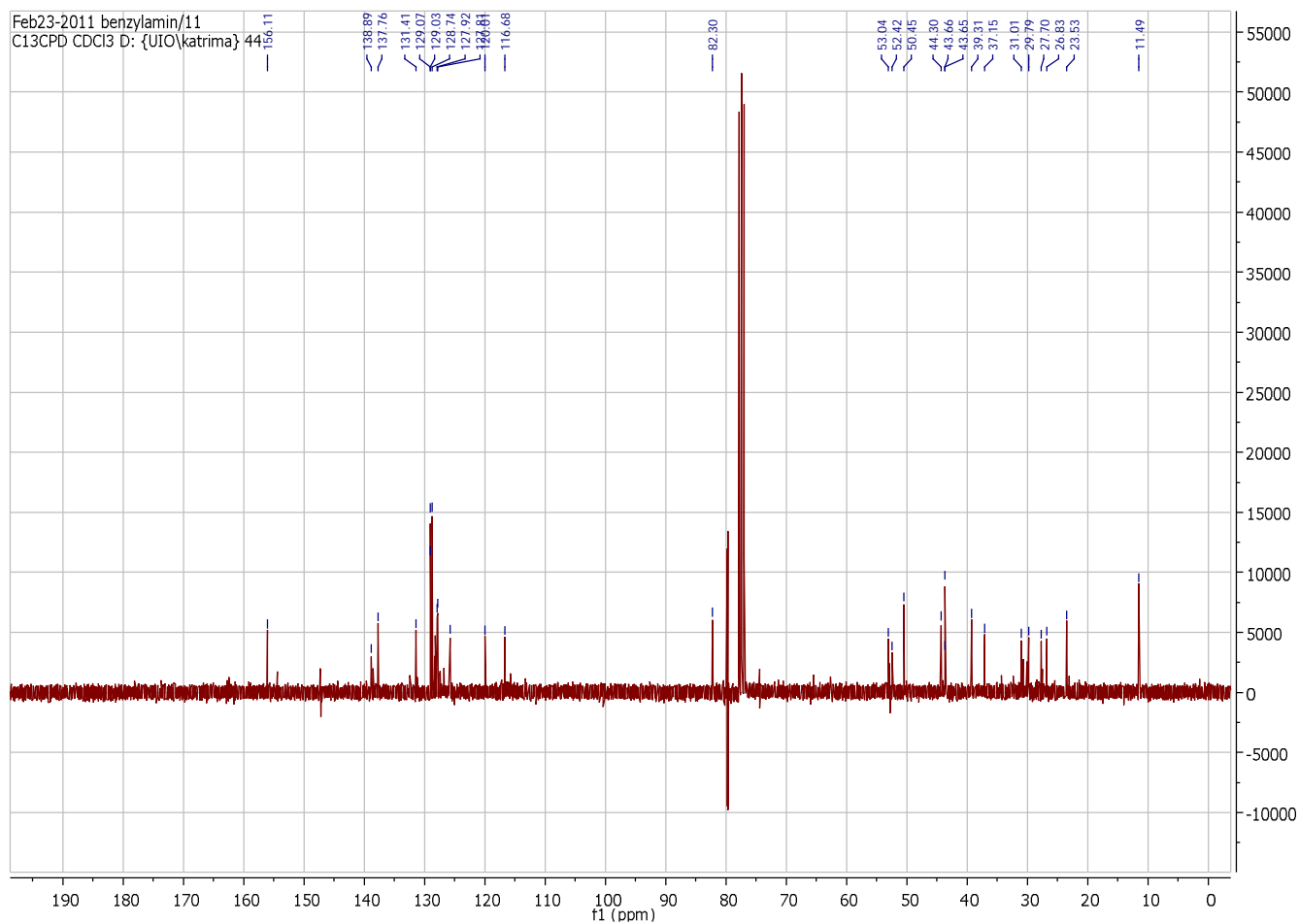
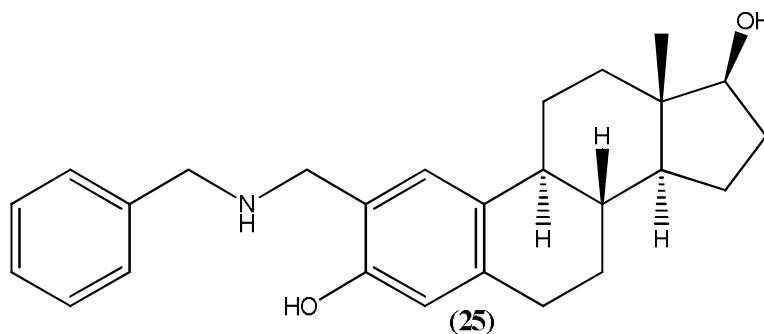
# VEDLEGG 14

$^1\text{H}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



## VEDLEGG 15

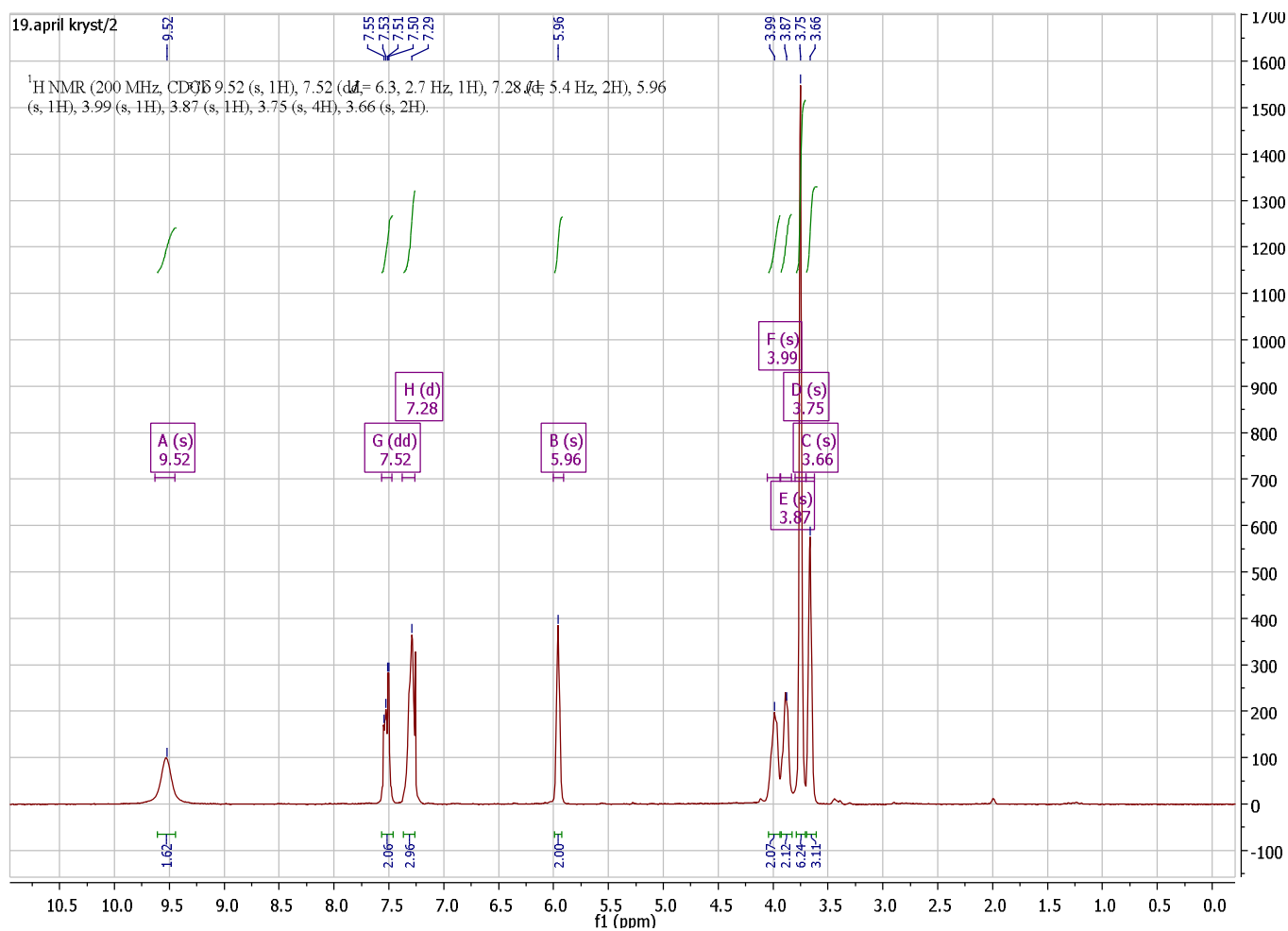
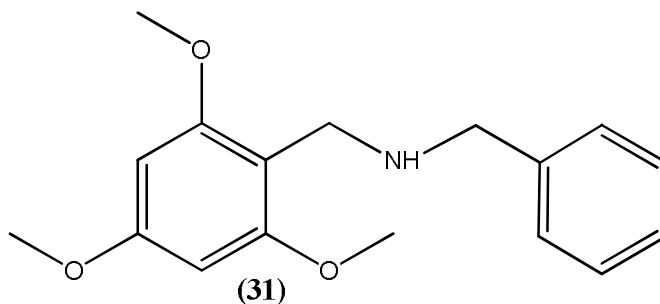
$^{13}\text{C}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzylamino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol





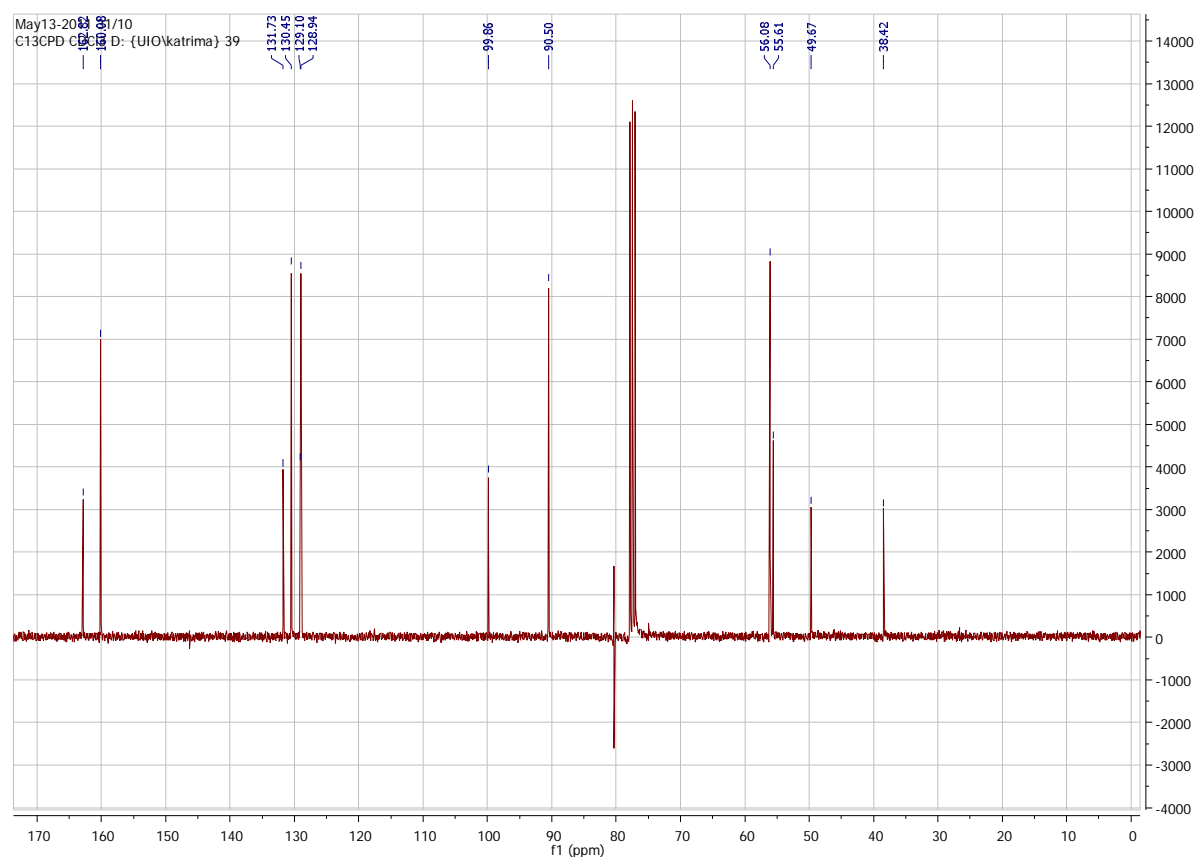
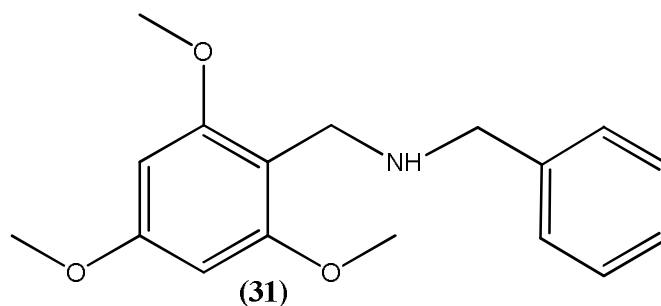
# VEDLEGG 16

## <sup>1</sup>H NMR SPEKTER AV *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin



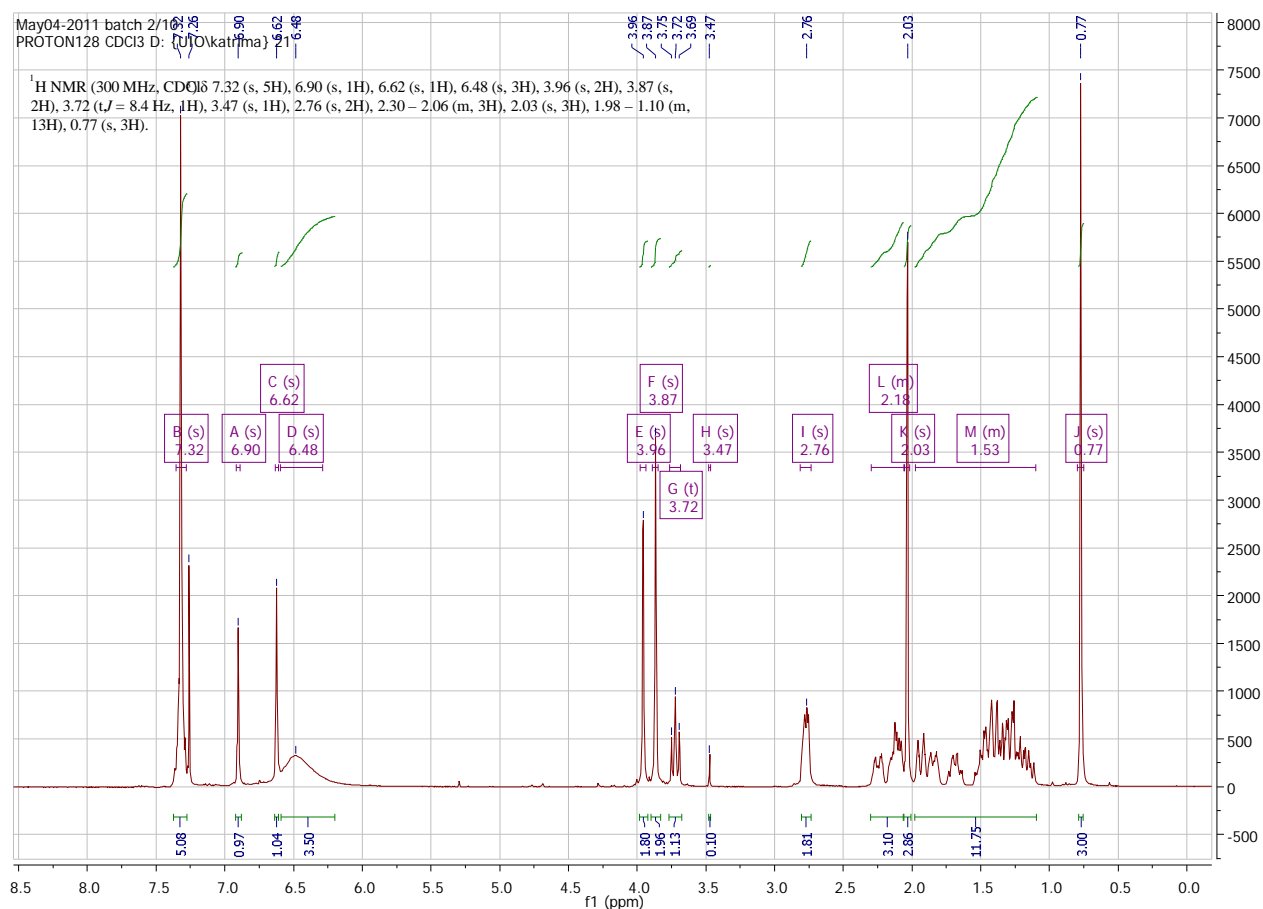
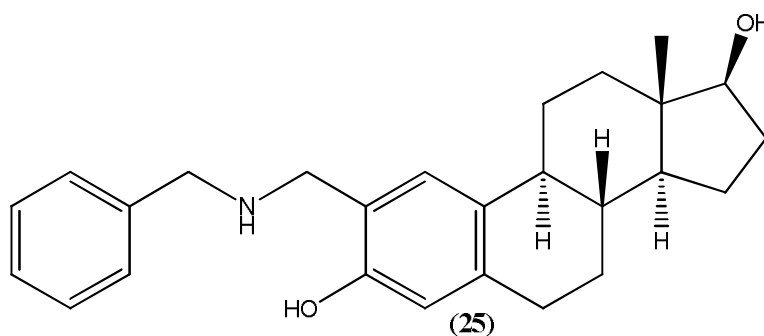
# VEDLEGG 17

## $^{13}\text{C}$ NMR SPEKTER AV *N*-benzyl-1-(2,4,6-trimetoksifenyl)metanamin



# VEDLEGG 18

$^1\text{H}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol



# VEDLEGG 19

$^{13}\text{C}$  NMR SPEKTER AV (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-2-((benzyl-amino)metyl)-13-metyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6*H*-syklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol

