

UiO • Kjemisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Syntese av myxin og myxinderivater som potensielle legemidler mot akutt myelogen leukemi

Bendik Melling Grøthe
Mastergradsoppgave i kjemi

60 sp.
Mai 2015



"Laboratory work was my first challenge.

...I still carry the scars of my first discovery - that test-tubes are fragile."

- Edward Teller 2001

- Bendik M. Grøthe 2013

FORORD

Arbeidet er utført ved Kjemisk institutt, Universitetet i Oslo, i tidsrommet august 2013 – mai 2015, under veiledning av 1. Amanuensis Tore Bonge-Hansen og professor Pål Rongved (Farmasøytisk institutt).

Først av alt vil jeg takke Tore for en spennende oppgave og for veiledning under denne masteroppgaven. Takk for at du alltid har hatt tid til prat om både kjemi og alt annet. Takk også til Pål Rongved for at du har vært min biveileder og at du har stilt opp med både entusiasme og visdom.

Generelt vil jeg takke de andre "labrottene" på Ø306 og alle på organisk seksjon som har delt av deres visdom og tid.

En spesiell takk går til Frode Rise for all god hjelp med NMR og for at du uten å nøle ville kjøre meg til legevakten med kuttskade; til Britt Paulsen for korrekturlesing og god hjelp med oppgaveskrivingen; og til Martin Hennum for å ha vist ekstra interesse for prosjektet mitt og alltid stilt opp med kunnskap og gode råd i rett stund. Uten dere hadde jeg aldri kommet så langt med oppgaven.

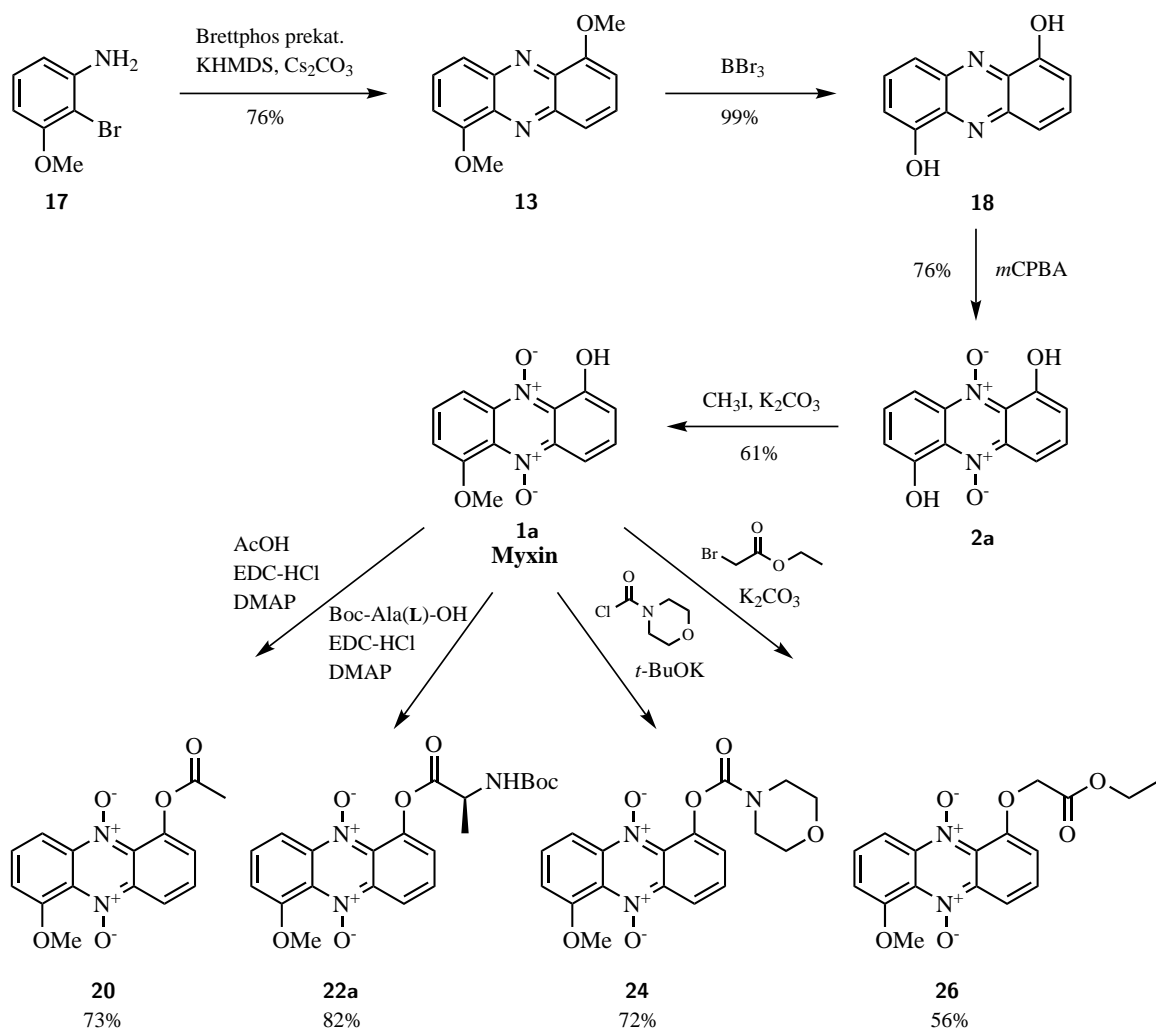
Til familie og venner utenfor universitetet, takk for at dere har hjulpet meg til å huske på at livet er mer enn bare kjemikalier og glassutstyr. Jeg kan aldri gi nok tilbake for alt det dere har vært for meg. Dere har min dypeste takknemlighet.

Til slutt vil jeg takke Kristina, kona mi, for at du har stått ved min side gjennom disse fem krevende årene og for at du har hatt troa på meg underveis. Ubeskrivelig takknemlig.

Blindern, mai 2015

Bendik Melling Grøthe

GRAFISK SAMMENDRAG



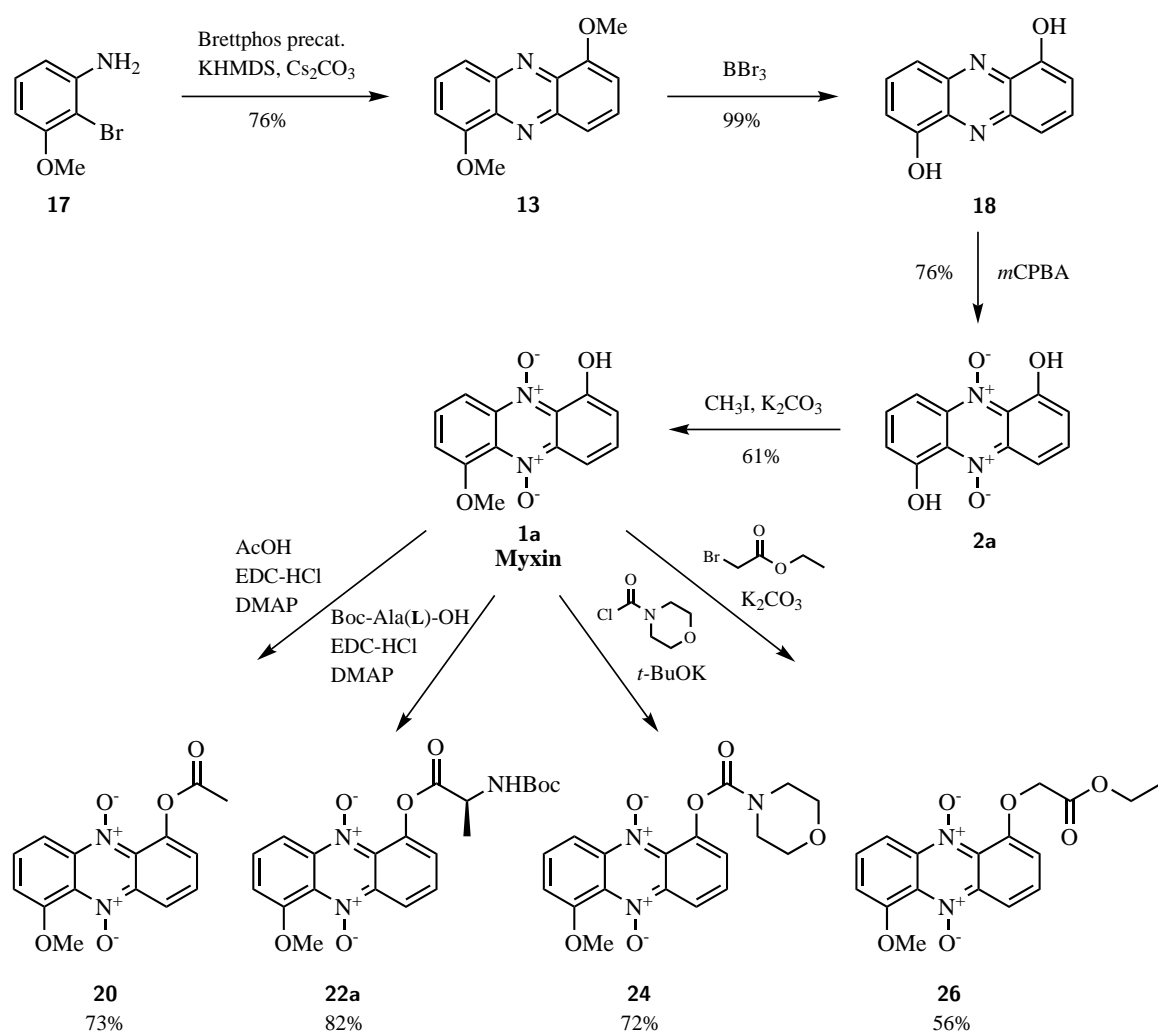
SAMMENDRAG

Naturproduktet myxin (**1a**) er et potensielt nytt legemiddel mot akutt myelogen leukemi (AML). Myxin er praktisk talt uløselig i vann, og frem til idag er det ikke rapportert noen effektiv syntese av dette naturproduktet. En målsetning for dette prosjektet har vært å utvikle en ny og effektiv synteserute til myxin, samt syntetisere derivater med økt løselighet i polare løsningsmidler.

To synteseruter har blitt undersøkt, og en 4-trinns synteserute til myxin har blitt etablert med 35% totalt utbytte. Som en del av denne synteseruten har også en synteserute til naturproduktet iodinin (**2a**) blitt utviklet med 57% totalt utbytte. Flere prosedyrer for syntese av forskjellige myxinderivater har blitt testet, og fire nye derivater har blitt syntetisert med gode utbytter.

Myxin har blitt biologisk testet og preliminare resultater er presentert i denne oppgaven.

GRAFICAL ABSTRACT



ABSTRACT

The natural product myxin (**1a**) is a potential new drug against acute myeloid leukemia (AML). Myxin is practically insoluble in water, and up until today, an effective synthesis of this natural product has not been reported. Among the aims of this project, one has been to develop a new and efficient route of synthesis of myxin and to synthesize derivatives of the product with increased solubility in polar solvents.

Two routes of synthesis have been studied, and one four-step route to myxin has been established with a total yield of 35%. As a part of this synthesis, a route of synthesis to the natural compound iodinin has also been developed; this with a total yield of 57%. Several procedures for synthesis of different derivatives of myxin have been tested, and four new derivatives have been synthesized with satisfying yields.

Myxin has been biologically tested and preliminary results are presented in this thesis.

NOMENKLATUR

AcCl	acetylklorid
AcOH	eddiksyre
AcOOH	pereddiksyre
AML	akutt myelogen leukemi
BrettPhos	BrettPhos Pd G1 metyl- <i>t</i> -butyl eteraddukt
Celit	kisulgur
d	dublett
dd	dobbel dublett
DCC	<i>N,N'</i> -disykloheksylkarbodiimid
DCE	1,4-dikloretan
DMAP	4-dimetylamino-pyridin
DMF	dimetylformamid
DNA	deoksyribonukleinsyre
EC ₅₀	effektiv konsentrasjon 50
EDC-HCl	<i>N</i> -(3-dimetylamino-propyl)- <i>N'</i> -etylkarbodiimide hydroklorid
EI	elektronionisasjon (eng: electron impact)
ESI	elektrosprayionisasjon (eng: electrospray ionization)
<i>et al</i>	med flere (latin)
EtOAc	etylacetat
HMBC	heteronukleær flerbindingskorrelasjon (eng: heteronuclear multiple-bond correlation)
HMPA	heksametylfosforamid
HOBt	hydroksybenzotriazol
HSQC	heteronukleær enkjernekorrelasjon (eng: heteronuclear single quantum correlation)
HR-MS	høyopløsnings-massespektrometri
<i>in situ</i>	i reaksjonsblandingen (latin)
<i>in vitro</i>	utenfor det levende (latin)
<i>in vivo</i>	i det levende (latin)
<i>J</i>	koblingskonstant
KHMDS	kalium bis(trimetylsilyl)amid
LiHMDS	litium bis(trimetylsilyl)amid
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	milli; NMR: multipllett
<i>m</i> CBA	<i>meta</i> -klorobenzosyre
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -kloroperbenzosyre
MeCN	acetonitril
min	minutter
MS	massespektrometri
NMR	nukleær magnetisk resonans
ppm	deler per million (eng: parts per million)
RNA	ribonukleinsyre
rt	romtemperatur
s	singlett
SAR	struktur-aktivitet forhold (eng: structure-activity relationship)


t	triplett
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
<i>t</i> -BuOK	kalium <i>tert</i> -butoksid
TEA	trietylamin
TFAA	trifluoro-eddiksyreanhydrid
THF	tetrahydrofuran
TLC	tynnsjikt-kromatografi
UHP	urea-hydrogenperoksidkompleks
UVs	UV-skjermet
18-krone-6	1,4,7,10,13,16-heksaoksa-syklooktadekan

TEGNSETTING

I følge norsk standard skal komma brukes som desimalskilletegn. Ved oppramsing av desimaltall, gir dette lett et uoversiktlig inntrykk av oppramsingen, eksempelvis 121,05, 116,59 sammenlignet med 121.05, 116.59. Av den grunn er det i denne oppgaven konsekvent brukt punktum som desimalskilletegn.

STEREOKJEMI

Når det i denne oppgaven er tegnet forbindelser med stereosentre er det benyttet følgende standard for å symbolisere stereokjemien eller konfigurasjonen:

 Brukes om absolutt stereokjemi.

 Brukes der stereosentre ikke er av betydning.

FIGURER OG SKJEMAER

Når det i denne oppgaven er tegnet figurer er følgende benyttet:

 Brukes for å vise at kun deler av molekylet er relevant for figuren.

Innhold

Forord	i
Grafisk sammendrag	ii
Sammendrag	iii
Grafical abstract	iv
Abstract	v
Nomenklatur	vii
Innholdsfortegnelse	x
1 Innledning	1
I Medisinalkjemi	2
II Oppgavens målsetning	3
2 Biologisk bakgrunn	5
I Akutt myelogen leukemi	6
II Fenaziner og fenazin- <i>N</i> -oksider	8
II.I Nytt potensielt AML-legemiddel?	9
III Myxin	10
III.I Biosyntese	11
III.II Prodrug og derivatisering	12
3 Kjemisk bakgrunn	13
I Generelt om Fenazin- <i>N,N'</i> -dioksider	14
I.I Fysikalske egenskaper	14
I.II Myxin	14
II Syntese av fenaziner	15
II.I Syntese av 1,6-substituerte fenaziner	16
II.II Syntese av <i>N,N'</i> -dioksiderte fenaziner	17
III Krysskoblingsreaksjoner	19
III.I Buchwald-Hartwig-kobling	19
III.II Ligand og katalysatoraktivering	19
IV Nukleofil acylsubstitusjon	21
V Steglich-esterifisering	21
4 Syntesestrategi	23
I Bakgrunn	24
II Ny syntese av myxin	25
II.I Bakgrunn for syntese av 1,6-dimetoksyfenazin	26
II.II Synteserute 2	27
II.III Synteserute 3	27

III	Derivaterisering av myxin	28
III.I	Ønskede derivater av myxin	28
III.II	Utfordringer	29
5	Syntese og resultater	31
I	Innledning	32
I.I	Syntese av 1,6-dimetoksyfenazin (13)	32
II	Synteserute 2	35
II.I	Syntese av 1,6-dimetoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (16a)	35
II.I.I	Endring av synteserute	37
III	Synteserute 3	38
III.I	Syntese av 1,6-dihydroksyfenazin (18)	38
III.II	Syntese av iodinin (2a)	40
III.III	Syntese av myxin (1a)	49
IV	Syntese av myxinderivater	53
IV.I	Syntese av esterderivat (20)	54
IV.I.I	Acetylering med acetylklorid	54
IV.I.II	Steglich-esterifisering	55
IV.II	Syntese av aminosyrederivat (22a)	57
IV.II.I	Avbeskyttelse	59
IV.III	Syntese av karbamatderivat (24)	60
IV.IV	Syntese av eterderivat (26)	62
V	Forsøk på diverse derivater	63
V.I	O-H-innsetting	63
V.II	Acetylering med brom acetylbromid	64
V.III	Karboksylering med ravsyreanhydrid	65
VI	Deoksygenering	66
VI.I	Mulige mekanismer	66
VII	Endelig synterute av myxin	68
6	Biologiske data	69
7	Konklusjon	73
8	Veien videre	75
9	Eksperimentelt	77
I	Generelt	78
I.I	Analyse	78
I.II	Kvaliteter og merker	79
II	Analyseparametre	79
III	Generelle prosedyrer	80
III.I	Prosedyre A: Steglich-esterifisering	80
III.II	Prosedyre B	80
III.III	Prosedyre C: Énkrystallrøntgendiffraksjon	80
IV	Synteser	81
	1,6-dimetoksyfenazin (13)	82
	1,6-dihydroksyfenazin (18)	84
	1,6-dihydroksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (2a)	86

1-hydroksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (1a)	88
1-hydroksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 10-oksid (1b)	90
1,6-dimetoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (16a)	92
1,6-dimetoksyfenazin- <i>N</i> 5-oksid (16b)	94
1-acetoksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (20)	96
1-(((<i>tert</i> -butoksykarbonyl)- <i>L</i> -alanyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (22a)	98
1-metoksy-6-((morfolin-4-karbonyl)oksy)fenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (24)	100
1-(2-etoksy-2-oksoetoksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (26)	102
V Synteseforsøk	104
(<i>S</i>)-1-((2-ammoniopropanoyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid klorid (22b)	104
1-metoksy-6-(1-fenyletoksy-2-metoksy-2-okso)fenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (28) . . .	105
1-(1-fenyletoksy-2-metoksy-2-okso)-6-hydroksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (29) . . .	106
1-(2-bromoacetoksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (31)	107
1-((3-karboksypropanoyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid (33)	108
6,6'-(malonylbis(oksy))bis(1-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid) (34)	109
10 Appendiks	111
I NMR-spektra	112
II Krystallografisk data	124
Referanser	129

Kapittel 1

Innledning

I. MEDISINALKJEMI

Fra det 19. århundre og frem til i dag har medisinalkjemien gjennomgått en enorm utvikling. Denne utviklingen bygger på økt forståelse og kunnskap om hvordan kroppen fungerer på celle- og molekylnivå.¹ Sekundærmetabolitter fra planter og mikroorganismer har vært kilde til nye legemidler og spesielt kreftlegemidler.^{2,3} I dag er omtrent halvparten av alle klinisk brukte kreftlegemidler avledet fra naturprodukter og dette er forventet å øke.⁴

Utviklingen av et nytt legemiddel involverer en konseptforbindelse (lead compound); en forbindelse som viser interessante farmakologiske egenskaper og er et startpunkt for videreutvikling av nye forbindelser med terapeutisk potensial. Isolering av naturprodukter fra mikroorganismer kan være tidkrevende og kostbart, og dersom nye konseptforbindelser skal ha en sjanse som nye legemidler forutsettes det at forbindelsene kan fremstilles med en viss grad av effektivitet. Kompleksiteten til mange naturprodukter kan gjøre syntese av disse forbindelsene svært utfordrende. Dette er ofte en begrensende faktor for fremstilling av naturprodukter.

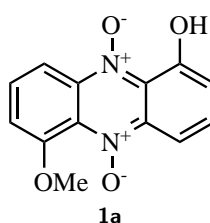
Naturproduktet myxin (**1a**) (Figur 1.1) er en potensiell konseptforbindelse for behandling av akutt myelogen leukemi (AML) og har sitt utspring i fra naturproduktet iodinin (**2a**) som allerede er en konseptforbindelse for behandling av AML.^{5,6} Per idag finnes det ingen effektiv syntese disse forbindelsene. Det er fokusert på myxin (**1a**) i dette masterprosjektet.

Arbeidet er utført som en del av den tverrfaglige prosjektgruppen SYNFAAS (UiO; Kjemisk Institutt og Farmasøytisk Institutt, og UiB; Haukeland universitetssykehus). Kun resultater fra eget arbeid vil bli presentert i denne oppgaven.

II. OPPGAVENS MÅLSETNING

Oppgavens målsetning var tredelt:

1. Etablere en effektiv syntese av myxin (**1a**) (Figur 1.1).
2. Syntetisere derivater av myxin ved å endre på fenolgruppen.
3. Sende syntetiserte derivater til Haukeland universitetssykehus for biologisk testing.



Figur 1.1: Myxin (**1a**).

Kapittel 2

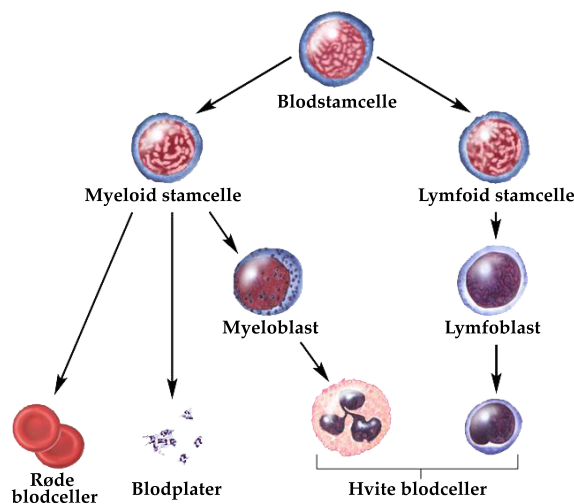
Biologisk bakgrunn

I dette kapitlet vil den biologiske bakgrunnen for dette arbeidet bli presentert. Det vil først bli gitt en introduksjon til akutt myelogen leukemi (AML) og utfordringer knyttet til dagens behandlingform. Deretter følger en introduksjon til fenaziner og myxin (**1a**) som et potensielt nytt legemiddel mot AML.

I. AKUTT MYELOGEN LEUKEMI

AML, akutt myelogen leukemi, er en form for blodkreft i beinmargen og blodbanen hvor myeloide stamceller med ervervede mutasjoner forårsaker feilaktig differensiering (Figur 2.1) og celledød av blodceller.⁷ Kreftformen forårsaker produksjon av abnorme celler (kalles blastceller eller leukemiceller) som i blodbanen og beinmargen fortrenger produksjon av blodplater, og røde- og hvite blodceller (Figur 2.1). Mangel på normale blodceller påvirker immunforsvaret og koagulasjonsfaktorer i blodet, noe som kan resultere i større blødninger og infeksjoner.⁸ AML er en aggressiv kreftform, og dersom en AML-pasient forblir ubehandlet er det forventet at døden vil inntreffe i løpet av få uker eller måneder.⁹

AML må ikke forveksles med ALL, akutt lymfatisk leukemi, som utvikler seg fra abnorme lymfoide stamceller. AML er den vanligste formen for leukemi blant voksne, og ALL er den vanligste formen for leukemi blant barn.¹⁰



Figur 2.1: Differensieringsmønster for utvikling av blodstamcelle til spesifikke blodceller.¹¹

Epidemiologi

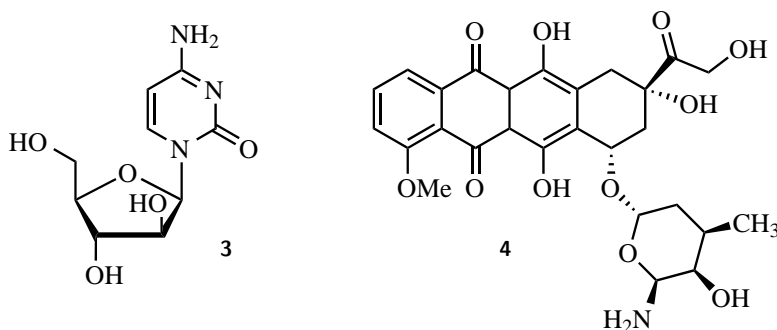
AML er en sykdom som hovedsaklig rammer mennesker over 60 år og forekommer sjelden hos dem under 45 år.⁷ Data fra American Cancer Society viser at gjennomsnittsalderen ved debut av AML er 66 år, og sykdommen er noe mer vanlig blant menn enn kvinner. Omtrent 30-40% av AML-pasienter under 60 år blir kurert for sykdommen, men dette er sterkt avhengig av alder og sykdomsforløp.^{12,13} På tross av forbedret behandling de siste årene, vil kun 10% av alle pasienter over 70 år nå komplett remisjon.⁸ Dette skyldes i mange tilfeller at kroppen ikke tåler den store påkjenningen det er å gjennomgå kjemoterapi. Behandlingssvikt kan også oppstå på grunn av kjemoresistens blant

de abnorme cellene.¹³ Sammenlignet med USA er statistikken i Norge noe bedre. Gjennomsnittsalderen ved debut er 69 år, og forventet 4 års overlevelse er 30% for pasienter over 60 år og 70-80% for pasienter under 60 år.¹⁴

Utviklingen av AML har ofte bakgrunn i misdannelse ved celledeling.⁸ Endringer i DNA og kromosomer (i hovedsak kromosomnummer 5 og 7) er en av hovedgrunnene for kreftutviklingen. Risikofaktorer for AML er blant annet eksponering for ioniserende stråling, benzen, og tidligere gjennomgått cytotoxisk kjemoterapi. Sigarettøyk er idag den vanligste kilden til benzeneksponering og man ser en overhyppighet av AML blant røykere.¹⁵

Behandling

I de siste 30 årene har behandling av AML nesten utelukkende bestått av kjemoterapi, i form av en kombinasjon av medikamentet Cytarabin (3) og et antracyklin, som for eksempel daunorubicin (4) (Figur 2.2).⁹ Cytarabin er en nukleosid-antimetabolitt som intranukleært blir fosforylert til et aktivt nukleotid som videre inhiberer DNA-syntese.¹⁶ Daunorubicin (4) interkalerer med DNA (innsetter mellom basepar i DNA-heliksen) og fungerer som en inhibitor for topoisomerase II.¹⁷ På denne måten blir AML-cellene skadet og forhindret i videre replikasjon.



Figur 2.2: Cytarabin (3) og daunorubicin (4).

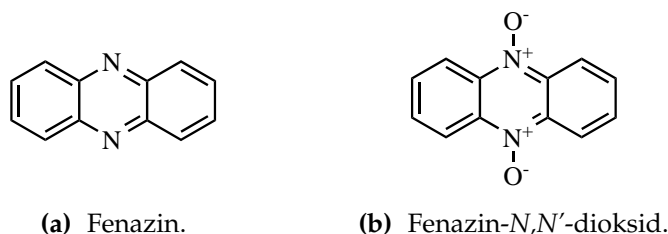
Behandlingen av AML gir sterke bivirkninger. Den tøffe kjemoterapien er svært cytotoxisk (skadelig for celler) og er i liten grad spesifikk for AML-celler.¹³ Behandlingen påvirker derfor celler i andre organer, hvor hjerteceller er svært utsatt. Antracykliner er rapportert til å være spesielt kardiotoxiske (skadelig for hjertet), og studier viser at pasienter behandlet med antracykliner vil utvikle hjertesvikt i løpet av 20 år.^{18,19} Svikten kan inntreffe så fort som en uke etter behandlingsstart.^{20,21}

I følge American Cancer Society vil det i USA i løpet av 2015 komme ca. 20830 nye tilfeller av AML. Omtrent 50% av pasientene vil dø av sykdommen.²² Med grunnlag i

data fra 2008-2014 er det i Norge forventet ca. 150 nye tilfeller av AML i 2015.²³ Dagens behandlingsform for AML er uspesifikk og tildels ueffektiv.²⁴ En ny eller forbedret behandlingsform av AML er derfor sterkt nødvendig.

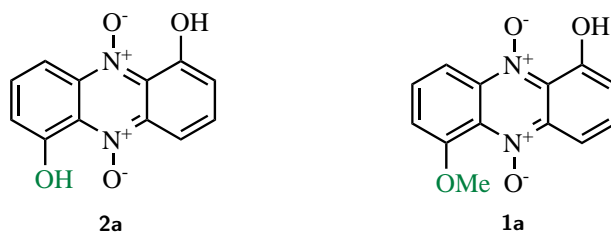
II. FENAZINER OG FENAZIN-*N*-OKSIDER

Fenaziner er en klasse naturlig forekommende forbindelser bestående av et nitrogeninnholdig heterosyklisk system (Figur 2.3a). Kjemiske og fysikalske egenskaper er sterkt avhengig av tilstedeværelsen av substituenten og deres posisjon i ringsystemet. Naturlige fenaziner er isolert som sekundærmetabolitter primært fra *Pseudomonas*, *Streptomyces*, og andre bakteriespesier i jordbunn og marint habitat.²⁵⁻²⁷ Over 100 forskjellige fenaziner er identifisert i naturen, og over 6000 forbindelser med fenazin som grunnstruktur har blitt syntetisert.^{25,28}



Figur 2.3: Grunnstruktur av fenaziner og fenazin-*N*-oksider.

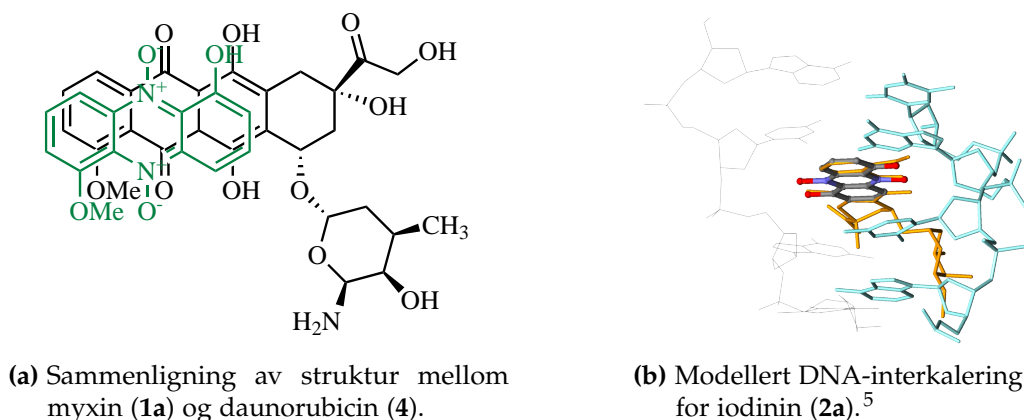
Fenazin-*N,N'*-dioksider (Figur 2.3b) er en unik klasse av fenaziner som i tillegg til å være et fenazin, tilhører en annen stoffklasse kjent som aromatiske *N*-oksider. Av naturlig forekommende fenaziner er fenazin-*N,N'*-dioksider relativt sjeldne, og blant dem er iodinin (**2a**) og myxin (**1a**) noen de mest kjente forbindelsene (Figur 2.4).



Figur 2.4: Naturlige fenazin-*N,N'*-dioksider: Iodinin (**2a**) og myxin (**1a**).

Naturlige og syntetiske fenaziner og fenazin-*N*-oksider har tidligere vært av særlig interesse på grunn av sine antibiotiske og antiparasittiske egenskaper.^{25,29,30} I nyere tid er de også aktuelle som kreftlegemidler, noe som øker interessen for disse forbindelsene.^{28,31-33} Den fysiologiske funksjonen til naturlige fenaziner er ikke fullstendig

kjent, men virkemåten i celler er antatt å være DNA-interkalering,⁵ polynukleotid-interaksjon,³⁴ inhibering av topoisomerase I og II,^{25,35} radikalfanging,²⁵ og inhibering av cellesyklus.³⁶ Interaksjonen med DNA stammer fra fenazinenes plane og aromatiske struktur som ved π - π -interaksjoner binder seg til DNA-basepar. Dette kan sammenlignes med de DNA-interkalerende egenskapene til daunorubicin (**4**).¹⁷ Figur 2.5 viser en sammenligning av strukturene til forbindelse **1a** og **4** (2.5a) og en modellert DNA-interkalering for **2a** (2.5b).⁵ Aromatiske *N*-oksider er kjent for å vise antitumor og antibakterielle egenskaper under hypoksiske betingelser gjennom bioreduktiv aktivering og dannelse av hydroksylradikaler.^{30,31,37} Kombinasjonen av en flat aromatisk struktur og aromatiske *N*-oksider gjør fenazin-*N,N'*-dioksider svært interessante som potensielle nye legemidler.



Figur 2.5: Strukturelle likheter mellom fenazin-*N,N'*-oksider og daunorubicin (**4**).

II.I. NYTT POTENSIELT AML-LEGEMIDDEL?

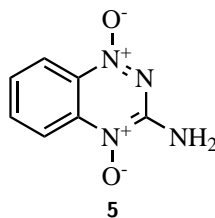
I en nylig gjennomført studie av Døskeland og Herfindal *et al* ved Haukeland universitetssykehus, ble fenazin-*N,N'*-dioksidet **2a** (Figur 2.4) testet og sammenlignet med daunorubicin (**4**) som et potensielt AML-legemiddel.^{5,6,38} I denne studien viste **2a** selektiv toksisitet for AML-celler, ved EC₅₀ for celledød, med opptil 40 ganger høyere selektivitet for AML-celler enn normale celler. Sammenlignet med daunorubicin (**4**) viste **2a** lignende aktivitet ovenfor AML-celler, men signifikant mindre toksisitet overfor kardiomyocytter og andre celler. Dette har gitt grunnlag for videre forskning på **2a** som et mulig nytt kreftlegemiddel mot AML.

I medisinalkjemisk historie har flere lovende legemiddelkandidater med opprinnelse fra naturen blitt semisyntetisk modifisert til forbindelser med høyere bioaktivitet eller spesifisitet.^{2,3} Dette er også mulig innen kreftterapi, og derivater av **2a** eller lignende forbindelser kan bli nye ledende legemiddelkandidater for behandling av AML.³⁹

III. MYXIN

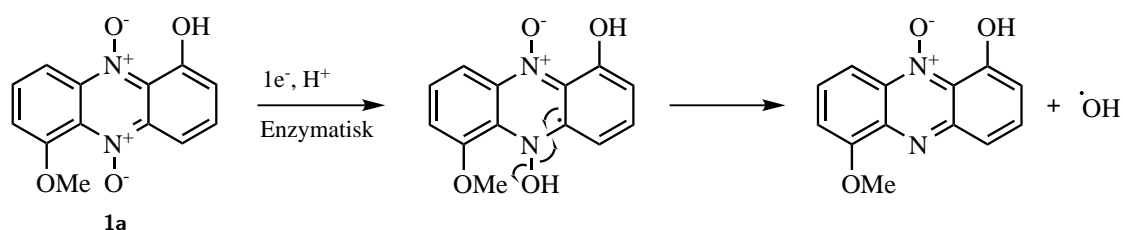
Et annet kjent naturprodukt med biologisk aktivitet er myxin (**1a**) (Figur 2.4).^{40,41} Strukturelt skiller **1a** seg fra **2a** med metoksygruppen i 6-posisjon, og er en analog av **2a** med potensial til være å legemiddelkandidat mot AML. Myxin (**1a**) ble først isolert fra *Sorangium* sp. av Peterson *et al* i 1966⁴⁰ hvor navnet *myxin* ble gitt til forbindelsen i en patentsøknad av samme forfatter.⁴² Myxin (**1a**) er videre kjent fra 1970-tallet, produsert av Hoffmann-LaRoche i form av et kobberchelat (Cuprimyxin) som et antibakterielt legemiddel for behandling av animalske hudinfeksjoner.⁴³ I senere tid har **1a** gjenoppstått som et potensielt kreftlegemiddel.³¹

Kombinasjonen av den flate aromatiske fenazinstrukturen og et aromatisk *N*-oksid har gjort at interessen for fenazin-*N*-oksider har økt de siste årene.^{29,31} De bioreduktive egenskapene forbundet med aromatiske *N*-oksider har i senere studier basert seg på den ledende legemiddelkandidaten tirapazamin (**5**) (Figur 2.6) som har blitt testet i fase I-III for klinisk behandling av varierte kreftformer.⁴⁴ Mekanismen baserer seg på en intracellulær ettelektronreduksjon med påfølgende avspalting av et hydroksylradikal som kan skade DNA. For tirapazamin (**5**) er denne mekanismen kjent under anaerobe betingelser.⁴⁵



Figur 2.6: Tirapazamin (**5**).

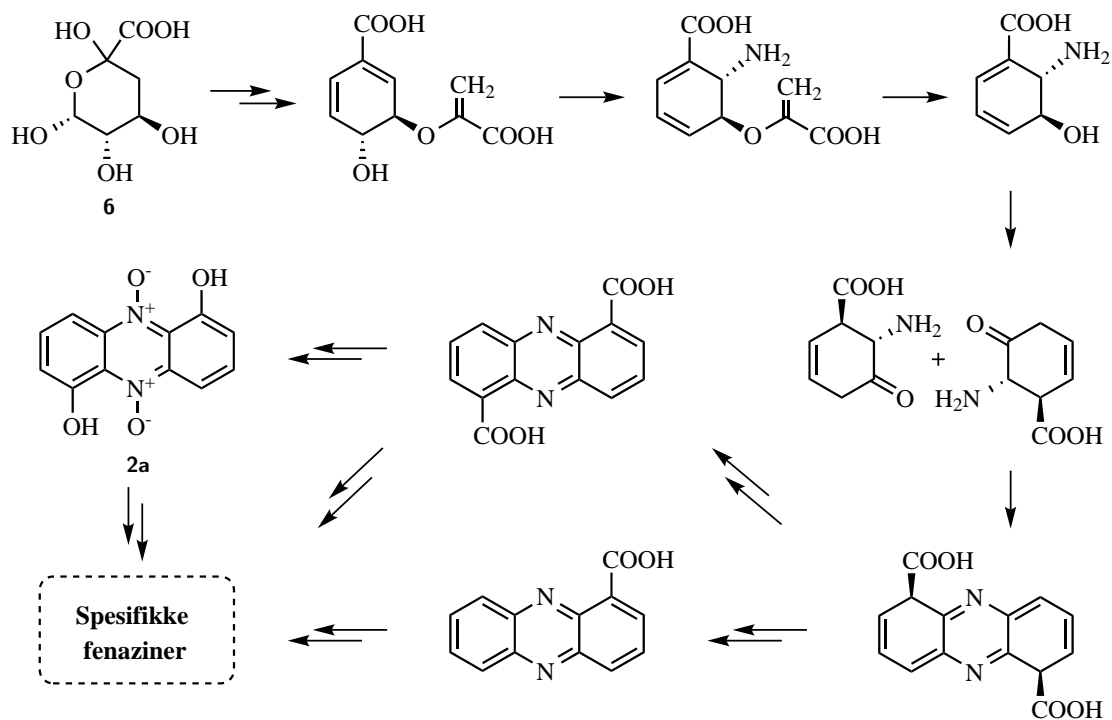
Med bakgrunn i den biologiske mekanismen til tirapazamin (**5**) ble det i 2012 av Chowdhury *et al*³¹ publisert en studie der det ble funnet at **1a** forårsaker ødeleggelse av DNA ved bioreduert-aktiverede hydroksylradikaler under både aerobe og anaerobe betingelser. Denne egenskapen gir **1a** et bredere potensial som kreftlegemiddel ettersom tirapazamin (**5**) kun viser denne egenskapen under anaerobe betingelser. Den foreslåtte mekanismen for en ettelektronreduksjon av **1a** og dannelsen av hydroksylradikaler er vist i Skjema 2.1.³¹



Skjema 2.1: Dannelse av hydroksylradial ved enzymatisk én-elektron reduksjon av myxin (**1a**).³¹

III.I. BIOSYNTESE

Biosyntese av myxin (**1a**) er ikke rapportert i litteraturen, men biosyntese av andre 1,6-substituerte fenaziner og -fenazin-*N,N'*-dioksider (for eksempel **2a**) rikelig studert.⁴³ Alternative synteseruter finnes, men synteseveien fra shikimisyre (**6**) er den mest kjente (Skjema 2.2).^{6,25,46,47}

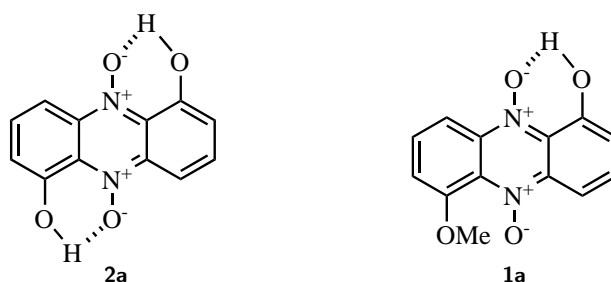


Skjema 2.2: Biosyntese av 1,6-substituerte fenaziner og fenazin-*N,N'*-dioksider fra shikimisyre (**6**).

III.II. PRODRUG OG DERIVATISERING

Fenolgruppen(e) på forbindelsene **2a** og **1a** er antatt til å være en relevant farmakofor og viktig for den biologiske mekanismen. Hydrogenatomet i fenolgruppen er funnet til å binde intramolekylært til *N*-oksidet (Figur 2.7).⁴⁸ Økt forståelse av funksjonen til fenolgruppen, samt i hvilken grad denne påvirker den biologiske mekanismen til *N*-oksidet, er viktig for en SAR-studie av disse forbindelsene. En sammenligning av forbindelser med 0-2 fenolgrupper er derfor et startpunkt for en SAR-studie av disse forbindelsene. Den intramolekylære hydrogenbindingen begrenser løseligheten til forbindelsene i fysiologiske media og forbindelsene må derfor modifiseres for oppnå bedre løselighet. Å lage prodrugs av forbindelsene ved derivatisering av fenolgruppene vil gi mulighet for tilpasning av løseligheten og gjøre forbindelsene mer anvendelige.

Derivatisering av fenolgrupper er svært vanlig ved forbedring eller tilpasning av legemidler.^{3,49} Av den grunn ble det prioritert å syntetisere ester- og eterderivater av **1a** med tanke på sammenligning av biologisk aktivitet med og uten fri fenolgruppe. Resultater fra biologisk testing og sammenligning av forbindelse **2a** og **1a** samt derivater av forbindelsene vil være en pekepinn for videre syntese av nye 1,6-substituerte fenazin-*N,N'*-dioksid-analoger som potensielt legemiddel mot AML.



Figur 2.7: Intramolekylær hydrogenbinding mellom fenolhydrogenet og *N*-oksidet til **2a** og **1a**.

Kapittel 3

Kjemisk bakgrunn

I dette kapitlet vil den kjemiske bakgrunnen for dette arbeidet bli presentert. Det vil bli gitt en introduksjon til kjente synteseer av fenaziner og fenazin-*N*-oksider, etterfulgt av noe teori forbundet med kjemien som har vært brukt ved videre syntese.

I. GENERELT OM FENAZIN-*N,N'*-DIOKSIDER

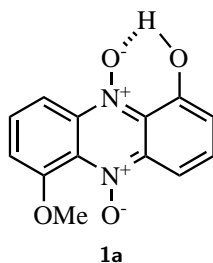
I.I. FYSIKALSKE EGENSKAPER

En generell struktur av fenaziner og fenazin-*N,N'*-dioksider ble presentert i kapittel 2, side 8. Fenaziner er flate, aromatiske molekyler, og deres konjugerte heterosykliske struktur gjør at molekylene absorberer lys i det synlige området og fremstår som fargede forbindelser. Substituenten kan endre graden av absorpsjon for et fenazinmolekyl og fargen vil variere for de forskjellige forbindelsene. Mange fenaziner er benyttet som pigmenter.⁵⁰

Fenazin-*N,N'*-dioksider er en kombinasjon av stoffklassen fenaziner og aromatiske *N*-oksider. *N*-Oksidene på fenazinet gjør ringsystemet elektronfattig på grunn av de elektronegative oksygenatomene.^{51,52} I seg selv er *N*-oksid-gruppen nøytral, likevel har oksygenatomet og nitrogenatomet henholdsvis positiv og negativ formell ladning ($N^+ - O^-$). *N*-Oksider benyttes i organisk syntese som blant annet intermediater for syntese av laktamer, hjelpemiddel i assymetrisk syntese, beskyttelsesgrupper, oksidasjonsmiddel, ligander i metallkomplekser og for å aktivere *N*-heterosykliske aromater for elektrofil aromatisk substitusjon.⁵³

I.II. MYXIN

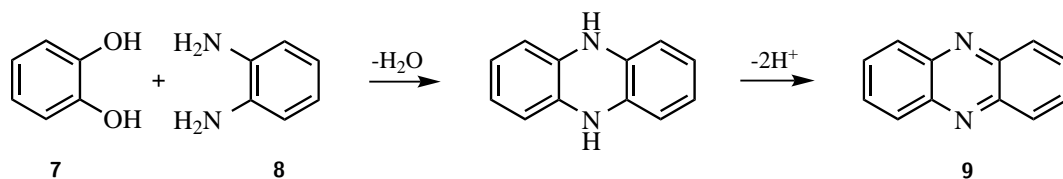
Myxin (**1a**) er et 1,6-substituert fenazin-*N,N'*-dioksid (Figur 3.1) med en fenolgruppe i 1-posisjon og en metoksygruppe i 6-posisjon. I fast form er **1a** en kirsebærrød forbindelse. Den er stabil i sur løsning og ustabil i basisk løsning. I deprotonert form vil forbindelsen farge løsningen smaragdgrønn. Hydrogenatomet i fenolgruppen hydrogenbinder intramolekylært til *N*-oksidet og intermolekylært til *N*-oksidet i nabomolekyler.⁴⁸ Denne intramolekylære hydrogenbindingen og den høye gitterenergien, forårsaket av den flate og krystallinske strukturen, begrenser løseligheten til **1a** i ulike media.



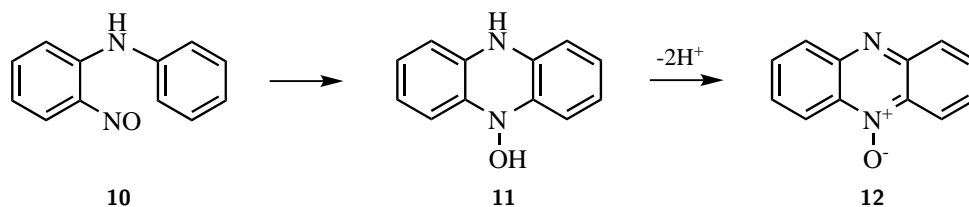
Figur 3.1: Myxin (**1a**) (1-hydroksy-6-metoksyfenazin-*N5,N10*-dioksid).

II. SYNTESE AV FENAZINER

De eldste kjente syntesene av fenaziner og fenazin-*N*-oksider er beskrevet av henholdsvis Merz i 1886⁵⁴ og Wohl og Aue i 1901.⁵⁵ Syntesen av fenazin (**9**) ble utført ved kondensering av katekol (**7**) og *ortho*-fenyl-diamin (**8**) (Figur 3.2a).⁵⁴ Dannelsen av fenazin-*N*-oksid (**12**) ble først observert ved ringslutning av den aromatiske nitrosoforbindelsen **10** og videre full aromatisering av **11** (Figur 3.2b).⁵⁵



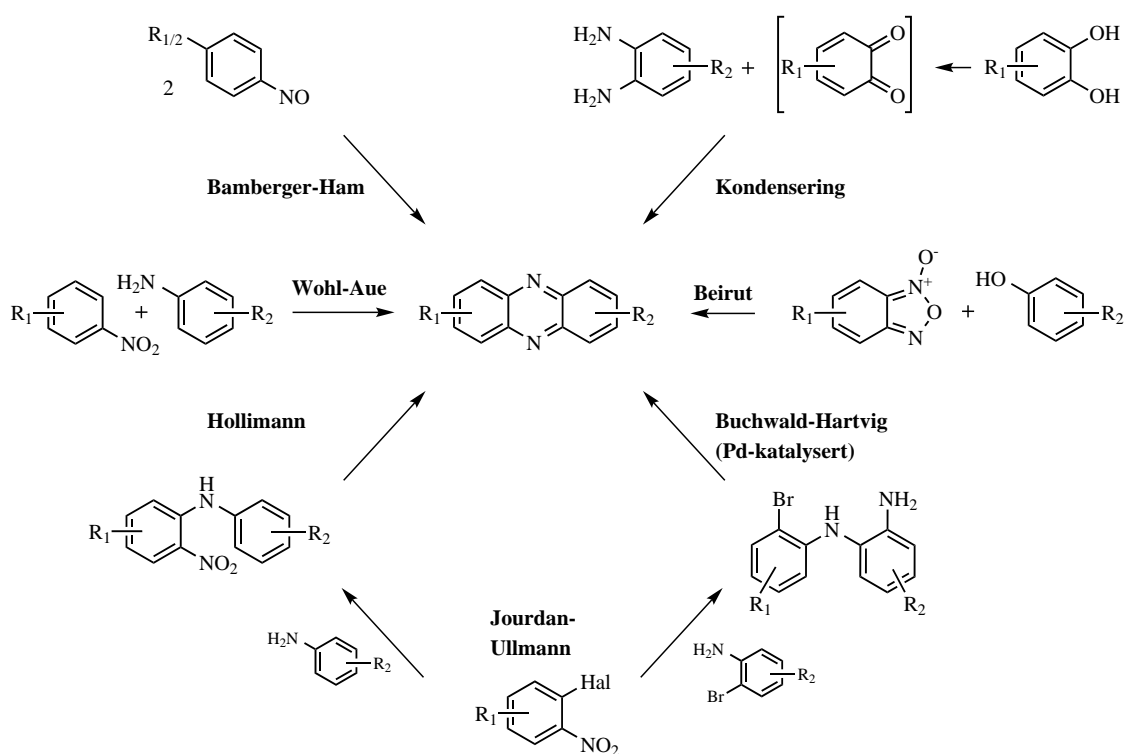
(a) Første syntese av fenazin (**9**) ved kondensering av katekol (**7**) og *ortho*-fenyl-diamin (**8**).⁵⁴



(b) Oppdagelse av fenazin-*N*-oksid (**12**) ved ringslutning av **10** og full aromatisering av **11**.⁵⁵

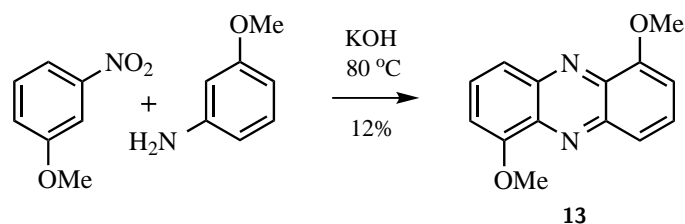
Figur 3.2: Første synteser av fenazin (**9**) og fenazin-*N*-oksid (**12**).

Skjema 3.1 viser en oversikt over kjente prosedyrer for syntese av fenaziner.^{25,35,56–64} Blant disse er Wohl-Aue-prosedyren,^{55,56,65} kondensering,³⁵ Beirut-reaksjonen^{51,57} og Buchwald-Hartwig-krysskobling^{60,62} de mest brukte metodene for syntese av substituerte fenaziner.²⁵

Skjema 3.1: Kjente synteseveier til fenaziner.^{25,50}

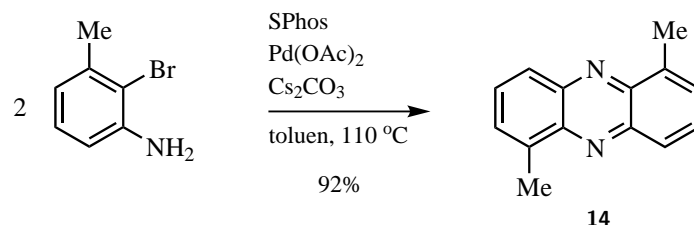
II.I. SYNTSE AV 1,6-SUBSTITUERTE FENAZINER

Til tross for et bredt utvalg av prosedyrer for syntese av fenaziner, er syntese av 1,6-substituerte fenaziner lite beskrevet i litteraturen. I 1951 beskrev Pachter og Kloetzel⁶⁵ en syntese av 1,6-dimetoksyfenazin (**13**) med 12% utbytte ved bruk av Wohl-Aue-prosedyren (Skjema 3.2). Denne prosedyren har siden vært benyttet for syntese av denne type forbindelser.

Skjema 3.2: Syntese av 1,6-dimetoksyfenazin (**13**) ved bruk av Wohl-Aue prosedyren.⁶⁵

Med utgangspunkt i Pd-katalysert arylering av aniliner beskrevet av Buchwald *et al*⁶⁶ og Hartwig *et al*,^{67,68} foreslo Beifuss og Tietze⁶⁹ i 2005 muligheten for homokobling av halogenerte aniliner for syntese av 1,6-substituerte fenaziner. I 2012 ble dette publisert av Winkler *et al*⁶² hvor 1,6-dimetylphenazin (**14**) ble syntetisert med 92% utbytte

(Skjema 3.3). Dette introduserte dermed en ny og effektiv prosedyre for syntese av 1,6-disubstituerte fenaziner. Buchwald-Hartwig-krysskobling vil bli videre beskrevet i seksjon III (side 19).

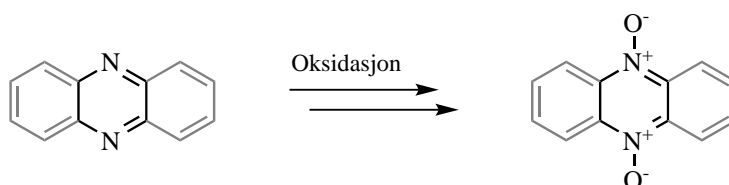


Skjema 3.3: Pd-katalysert syntese av 1,6-dimetylphenazin.⁶²

II.II. SYNTESE AV N,N' -DIOKSIDERTE FENAZINER

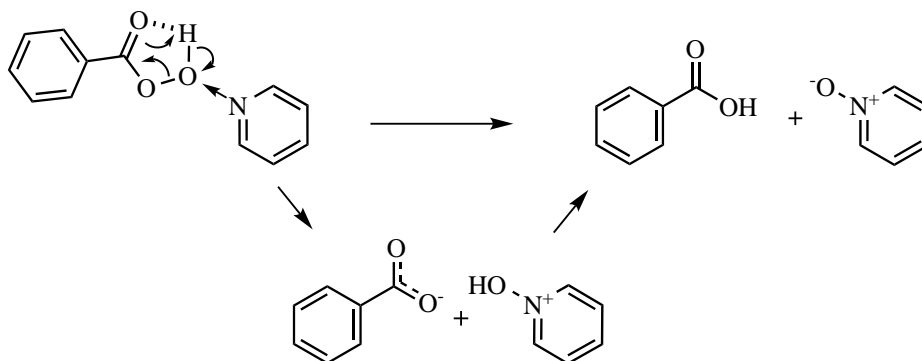
Hovedstrategien for syntese av fenazin- N,N' -dioksider har inntil midten av det 20. århundre vært assosiert med direkte N -oksidasjon av fenazinene.⁷⁰ Diverse substituerte fenazin- N,N' -dioksider syntetiseres idag i ett syntesetrinn via Beirut-reaksjonen (introdusert i Skjema 3.1, side 16) beskrevet av Haddadin og Issidorides i 1965.^{51,71,72} Reaksjonen innebærer en kobling av benzofurazan-1-oksid med benzen-1,4-diol-derivater, og gir 70-95% utbytte av 2/3- og 7/8-substituerte fenaziner- N,N' -dioksider. Syntese av 1,6-substituerte fenazin- N,N' -dioksider har vist begrenset suksess i reaksjon med substituert benzofurazan og 1,2-diketoner.⁵⁷ Metoden er derfor ikke en alternativ effektiv prosedyre for syntese av 1,6-substituerte fenazin- N,N' -dioksider.

Oksidasjon av N -heterosykliske aromater til N -oksider er godt beskrevet i litteraturen.^{51,73} Til tross for dette er di- N -oksidasjon av forskjellige diaziner kjent for å være utfordrende, og gir ofte lave utbytter av di- N -oksidert produkt.^{52,74} Eksempler på slike forbindelser kan være pyraziner, quinoxaliner og fenaziner (Skjema 3.4).⁵² Kjente prosedyrer for N -oksidasjon innebærer hovedsaklig bruk av persyrer, hvor eksempler på dette er H_2O_2 i eddiksyre,^{70,75,76} H_2O_2 og Ac_2O ,⁷⁷⁻⁷⁹ eller $m\text{CPBA}$.^{31,80}



Skjema 3.4: N -Oksidering av aromatiske diaziner.

N-oksidasjon med en persyre er et resultat av en reaksjon mellom det ledige elektronparet på nitrogenatomet og det elektrofile oksygenatomet til persyren.^{53,81} To mekanismer for *N*-oksidasjon med perbenzoesyre er foreslått.^{82,83} Reaksjonsmekanismene illustrert i Skjema 3.5 viser at reaksjonen kan være synkron (ett trinn), eller gå via dannelse av et hydroksylamin og et karboksylat med påfølgende deprotonering av hydroksylaminet med karboksylatet. I en studie publisert av Ramírez *et al*⁸² konkluderes det at reaksjonen er asynkron og vil gå via den sistnevnte mekanismen.



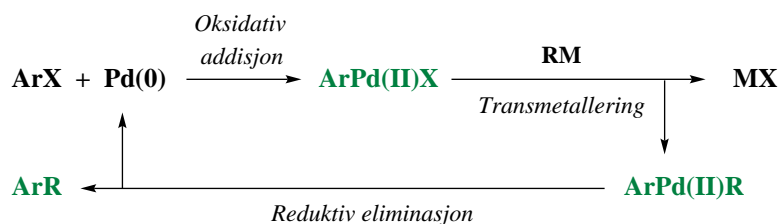
Skjema 3.5: Mulige mekanismer for *N*-oksidasjon med *m*CPBA.^{82,83}

Da reaksjonen går via et nukleofilt angrep fra nitrogenatomet, er reaktiviteten sterkt avhengig av nukleofilisiteten til dette atomet. I litteraturen er det kjent at *N*-oksidasjon av fenaziner gir lav omsetning til di-*N*-oksiderte produkter, men stor omsetning til de respektive mono-*N*-oksiderte produktene.^{31,52,74,75,84,85} Etter oksidasjon av det første nitrogenatomet blir det neste nitrogenatomet deaktivert for videre oksidasjon.^{51,52}

III. KRYSSKOBLINGSREAKSJONER

En krysskoblingsreaksjon er en reaksjon mellom et (hetero)arylhalid (ArX) og en organometallisk reaktant (RM) der det blir dannet en ny karbon-karbon/karbon-heteroatom binding.⁸⁶ Slike metallkatalyserte koblingsreaksjoner er benyttet i stor grad ved organisk syntese.⁸⁷

Eksempler på kjente navngitte krysskoblingsreaksjoner er Kumada-Corriu, Sonogoshira, Negishi, Stille, Suzuki-Miyaura, Hiyama, og Buchwald-Hartwig, der reaksjonene foruten Buchwald-Hartwig, representerer dannelsen av en karbon-karbon binding.⁸⁸ Den generiske katalytiske syklusen for nevnte reaksjoner er illustrert med palladium i Skjema 3.6 og viser essensielle trinn i alle krysskoblingsreaksjonene.^{67,68,89,90} Syklusen starter med en oksidativ addisjon av katalysator til arylhalidet, og fortsetter med en transmetallering der reaktantene som skal kobles føres sammen. Syklusen avsluttes med en reduktiv eliminasjon; katalysatoren regenereres og en ny binding mellom de ønskede reaktantene dannes.



Skjema 3.6: Generisk koblingsmekanisme for metallkatalyserte krysskoblingsreaksjoner. Illustrert med palladium som katalysator.⁸⁷

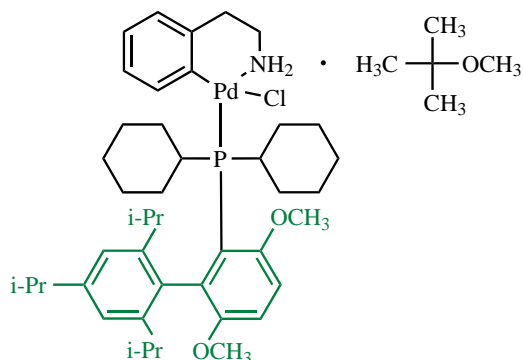
III.I. BUCHWALD-HARTWIG-KOBLING

Buchwald-Hartwig-koblingen bygger på en Pd-katalysert aminering av aryl-, vinyl-, og heteroarylhalider, og er et verdifult verktøy for syntese av naturprodukter, legemidler og andre forbindelser.⁹⁰ Viktige faktorer for en vellykket krysskobling er valg av Pd-kilde, ligand, base og løsningsmiddel.^{86,90} Betingelser for en rekke forskjellige C-N-koblinger er grundig studert og beskrevet i litteraturen, og vil derfor ikke bli diskutert her.⁹⁰⁻⁹²

III.II. LIGAND OG KATALYSATORAKTIVERING

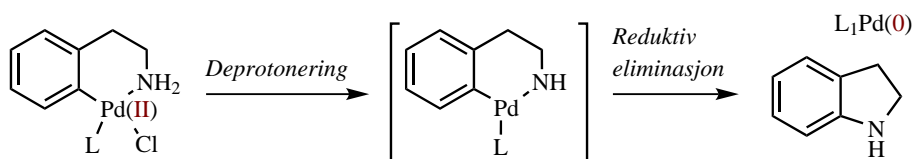
Den strukturelle oppbygningen av liganden har stor betydning for hvilke produkter som blir dannet i den katalytiske syklusen.⁹⁰ Sterkt elektrondonerende ligander øker elektrontettheten rundt metallet og akselererer den oksidative addisjonen av katalysatoren til substratet. Store ligander akselerer elimineringstrinnet.^{90,93} Liganden er derfor

kritisk for en vellykket krysskoblingsreaksjon. En rekke ligander er testet for arylering av forskjellige aminer, og blant dem er BrettPhos effektiv for arylering av primære aminer (Figur 3.3).^{61,94}



Figur 3.3: BrettPhos Pd G1 prekatalysator med ligand (L_1) illustrert i grønn farge.

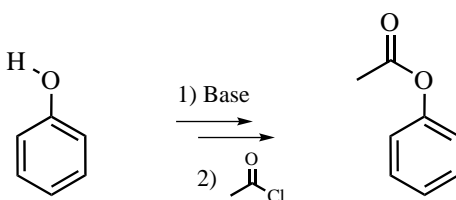
Palladiumkatalysatorer er aktive på sin reduserte form, Pd(0), men dekomponerer lett ved tilstedeværelse av vann eller luft.⁹⁰ Av praktiske grunner er derfor flere Pd-katalysatorer formulert som Pd(II)-salter, som for eksempel BrettPhos katalysatoren vist i Figur 3.3. Dette øker stabiliteten til katalysatoren i luft og gjør den mer anvendbar. Palladiumkatalysatorer aktiveres ved reduksjon av Pd(II) til Pd(0), noe som må finne sted før krysskoblingen kan begynne. Skjema 3.7 illustrerer den generelle mekanismen for aktivering av Pd-katalysatorer, hvor deprotonering av aminet *in situ* fører til en reaktiv eliminering og generering av aktiv Pd(0)-katalysator.⁹⁰ Betingelser for aktivering kan variere fra reaksjon til reaksjon, og tilsetning av en ekstra base kan være nødvendig for effektiv aktivering av prekatalysator.



Skjema 3.7: Aktivering av av Pd-prekatalysator til aktiv Pd-katalysator.⁹⁰

IV. NUKLEOFIL ACYLSUBSTITUSJON

Nukleofil acylsubstitusjon er en kjent reaksjon for kobling av nukleofiler med forskjellige karboksylsyrederivater.⁹⁵ Faktorer som favoriserer nukleofil acylsubstitusjon er en god nukleofil og en god utgående gruppe. En dårlig nukleofil kan til en viss grad kompenseres for med en forbedret utgående gruppe, og i slike tilfeller kan DMAP benyttes som katalysator. Skjema 3.8 viser en nukleofil acylsubstitusjon mellom en fenolgruppe og acetylklorid til å danne en acetoksygruppe. I denne oppgaven er det fokusert på basekatalysert substitusjon.

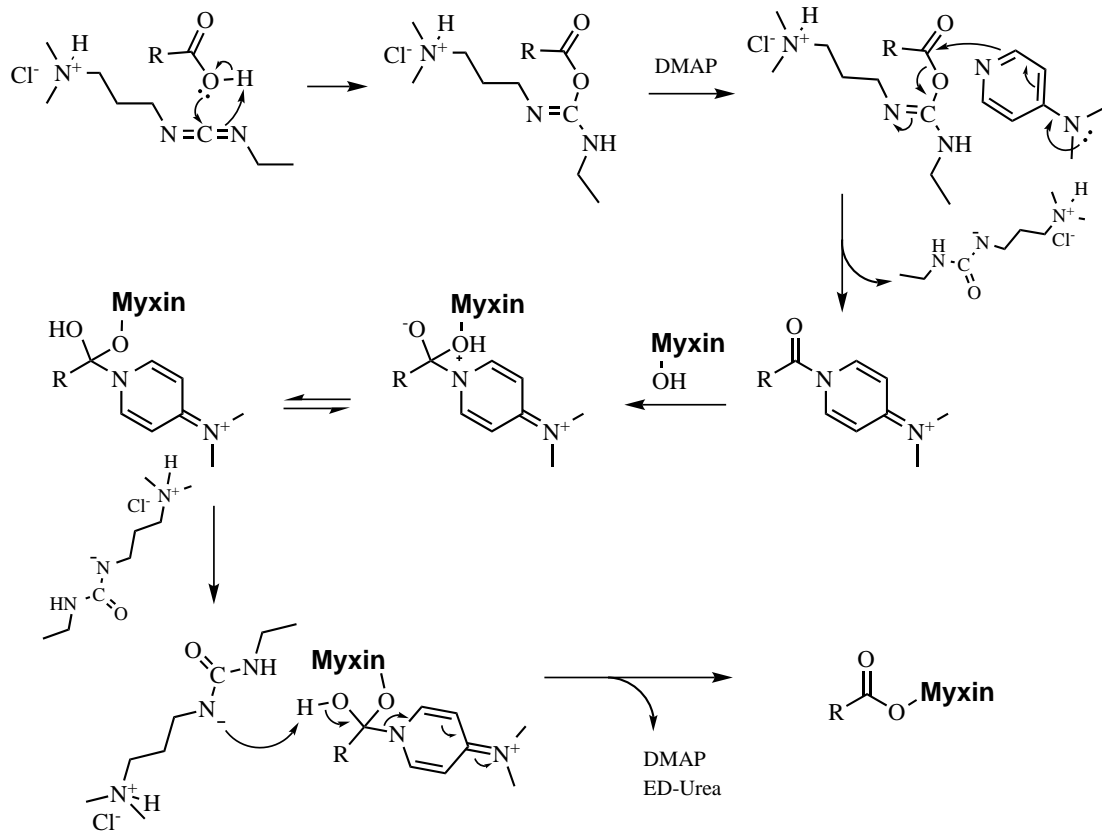


Skjema 3.8: Dannelsen av en acetoksygruppe ved nukleofil acylsubstitusjon.⁹⁵

V. STEGLICH-ESTERIFISERING

Steglich-esterifisering er en metode for syntese av estere ved bruk av DCC som koblingsreagens og DMAP som katalysator.⁹⁶ Mekanismen skiller seg fra nukleofil acylsubstitusjon ved at koblingsmekanismen ikke krever en støkiometrisk mengde base.⁵⁶ Prosedyren gjør det derfor mulig å lage esterderivater av **1a** uten å benytte base.

I senere tid er EDC-HCl blitt introdusert som koblingsreagens istedenfor DCC. Etersom EDC-HCl er et hydrokloridsalt, er reagentet enklere å bli kvitt under opprensing ved vandig ekstraksjon eller filtrering over Celite. En foreslått mekanisme for Steglich-esterifisering av **1a**, med DMAP som katalysator, er beskrevet i Skjema 3.9.⁵⁶



Skjema 3.9: Foreslått mekanisme for steglich-esterfisering.

Kapittel 4

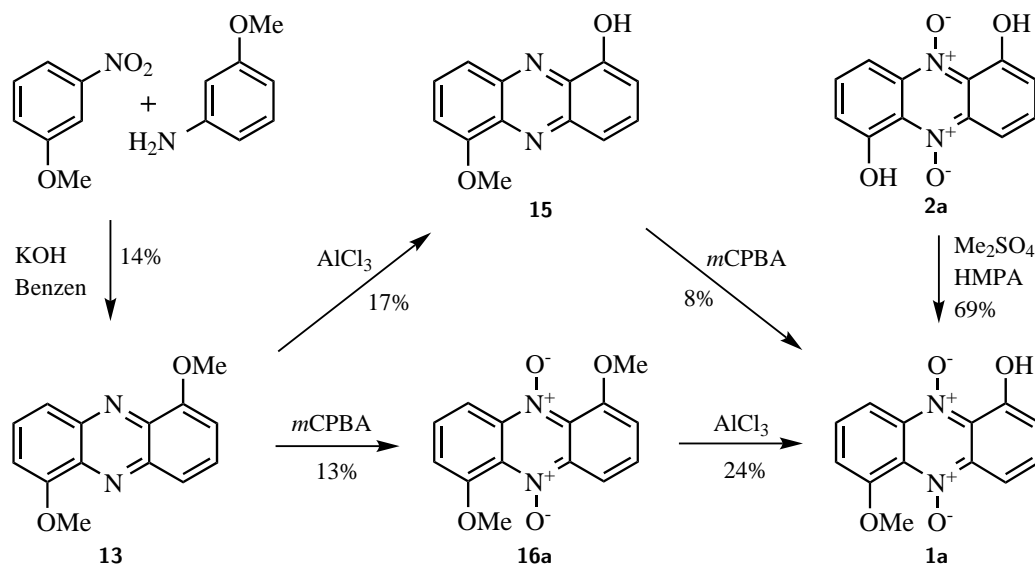
Syntesestrategi

I dette kapitlet vil strategien for syntese av myxin (**1a**) bli presentert. Kapitlet starter med en gjennomgang av kjente synteser av **1a**, deretter følger en seksjon om valg av synteserute og valg av type myxinderivater.

I. BAKGRUNN

Etter oppdagelsen av **1a** av Peterson *et al*⁴⁰ i 1966 ble en syntese av forbindelsen publisert av Edwards og Gillespie⁹⁷ samme år uten kjente utbytter. Den foreslåtte strukturen ble bekreftet året etter av Weigele og Leimgruber.⁸⁰ I et patent fra 1970-tallet, publisert av Weigele og Leimgruber,⁹⁸ er **1a** beskrevet syntetisert og produsert på stor skala ved alkylering av baktrielt fremgrodd **2a** med *t*-BuOK og Me₂SO₄ i HMPA (69% utbytte) (Skjema 4.1). Forbindelse **2a** ble isolert som et pigment produsert av *Chromobacterium iodinum* med et gjennomsnittlig utbytte på 1 g/m² medium.⁷⁵

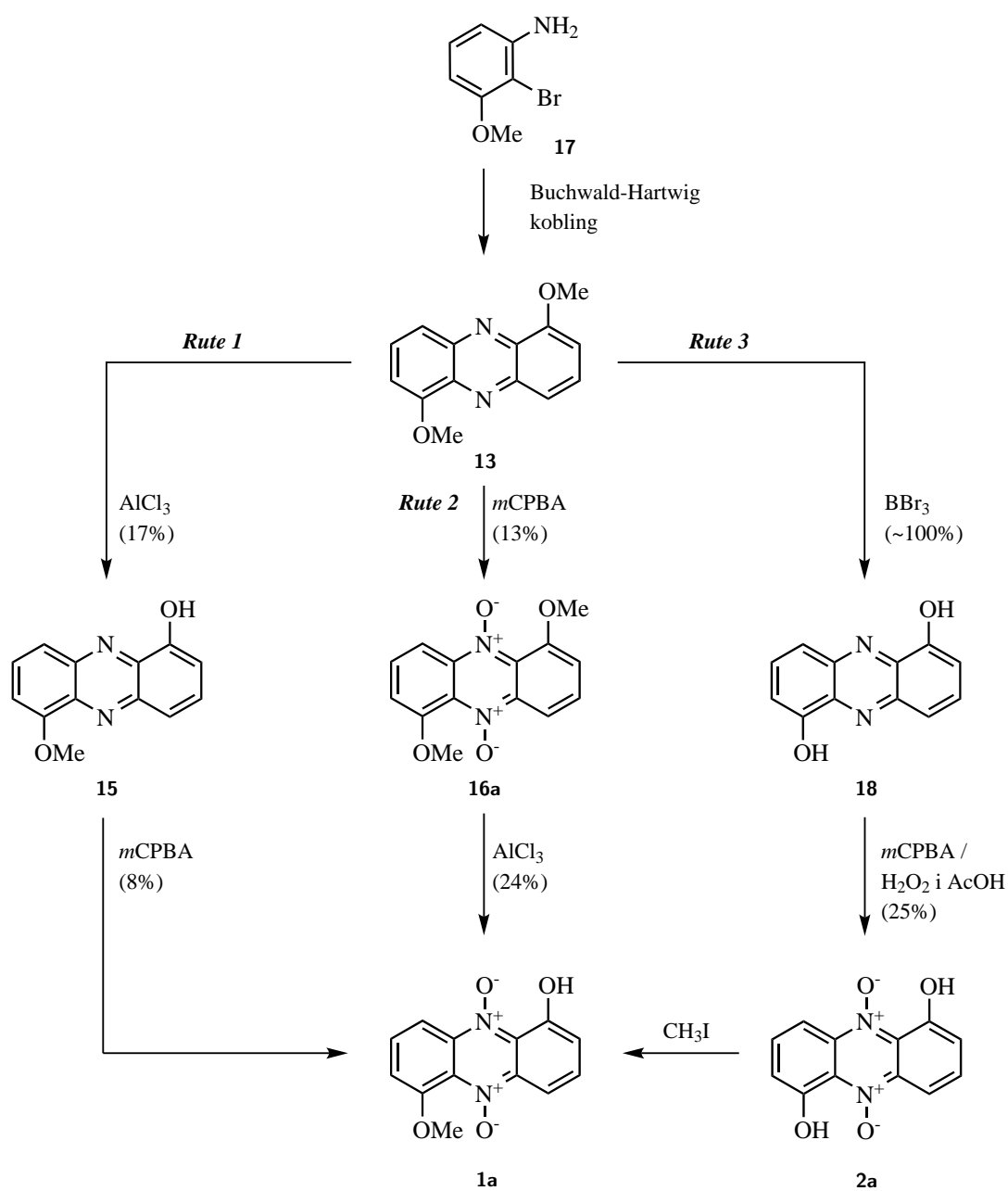
Med bakgrunn i interessen for **1a** som et potensielt kreftlegemiddel, ble **1a** på nytt syntetisert av Chowdhury *et al* i 2012.³¹ Med grunnlag i syntesen publisert av Edwards og Gillespie i 1966,⁹⁷ ble myxin (**1a**) syntetisert via to forskjellige synteseruter (Skjema 4.1). I disse to synteserutene ble forbindelse **13** henholdsvis demetylert før oksidasjon og oksidert før demetylering.³¹ Ved disse synteserutene ble **1a** syntetisert med henholdsvis 0.19% og 0.44% totalt utbytte. Synteserutene er beskrevet nærmere i neste seksjon. Utover prosedyrene beskrevet over er syntese av **1a** lite beskrevet i litteraturen.



Skjema 4.1: Kjente synteseruter til myxin (**1a**).^{31,98}

II. NY SYNTSE AV MYXIN

Med grunnlag i de kjente syntesene beskrevet over ble tre alternative synteseruter til **1a** sammenlignet (Skjema 4.2) for å finne den beste synteseruten til **1a**. Samtlige synteseruter beskrevet i Skjema 4.2 har sitt utgangspunkt i syntese og viderefunksjonalisering av forbindelse **13**. Det lave utbyttet for denne syntesen var et begrensende ledd for utvikling av en mer effektiv synteserute til **1a** og dette syntesetrinnet måtte derfor effektiviseres.



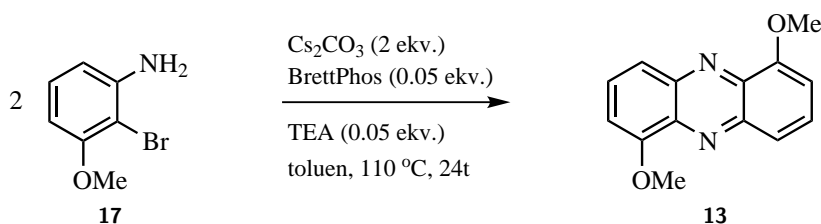
Skjema 4.2: Alternative synteseruter for syntese av myxin (**1a**). Litteraturutbytter er gitt i parentes.

Buchwald-Hartwig-homokobling for syntese av 1,6-substituerte fenaziner, beskrevet av Winkler *et al*,⁶² åpnet muligheten for syntese av **13** ved en ny og mer effektiv metode. De alternative syntesrutene til **1a** bygger derfor på denne syntesen.

Av de tre illustrerte synteseruter i Skjema 4.2, er synteserute 2 og 3 de mest interessante med tanke på forventet utbytte. På grunn av tidsbegrensning ble derfor synteserute 2 og 3 prioritert fremfor synteserute 1. Syntesetrinnene som var planlagt for synteserute 2 og 3, samt tanker rundt disse, vil bli presentert i kommende seksjoner.

II.I. BAKGRUNN FOR SYNTSE AV 1,6-DIMETOKSYFENAZIN

Arbeidet med fremstilling av 1,6-dimetoksyfenazin (**13**) bygger på et tidligere arbeid utført av Anthony Prandina (Farmasøytisk Institutt, UiO, Pål Rongved). I dette arbeidet har han, med bakgrunn i prosedyren publisert av Winkler *et al*,⁶² testet forskjellige katalysatorer og betingelser for homokoblingen av **17** til **13**. Det ble funnet at en BrettPhos-Pd(II) prekatalysatorⁱ ga de beste resultatene, og denne katalysatoren ble derfor benyttet for homokoblingen. Betingelser for vellykket omsetning av **17** til **13** er vist i Skjema 4.3.



Skjema 4.3: Syntese av **13** ved bruk av Buchwald-Hartwig-homokobling av **17**.

I Prandinas arbeid ble det funnet at tilsetning av ekstra base (trietylamin) var nødvendig for å aktivere katalysatoren, og dermed få omsatt **17** til **13**. Som flere andre Pd-katalysatorer er også aktiv BrettPhos-katalysator luft- og vannsensitiv, og syntesen måtte derfor gjøres under inerte og tørre betingelser.⁹⁰ Syntese av **13** vil i denne masteroppgaven bygge videre på Prandinas arbeid.

ⁱFullt navn på katalysatoren er gitt i nomenklaturdelen (side *vii*). Katalysatoren vil heretter bli omtalt som BrettPhos.

II.II. SYNTESERUTE 2

Synteserute 2 baseres på publisert arbeid av Chowdhury *et al*³¹ og Joyner.⁸⁴ Synteseruten innebærer di-*N*-oksidasjon av **13** med *m*CPBA, før videre monodemetylering av **16a** med AlCl₃.

Basert på tidligere introduserte oksidasjonsmidler, vil **13** bli forsøkt oksidert til **16a** med *m*CPBA, H₂O₂ og eddiksyre, og H₂O₂ og Ac₂O. Monodemetyleringen av **16a** vil bli utført med AlCl₃. En utfordring med monodemetylering vil være selektiviten for dannelsen av kun det monodemetylerte produktet. Høyst sannsynlig vil reaksjonen gi en produktblanding med mono- og didemetylerte produkter som reduserer utbytte av **1a**. En utfordring vil være å finne rette betingelser for å oppnå høyest mulig utbytte av **1a**, eventuelt finne andre betingelser for demetyleringen.

II.III. SYNTESERUTE 3

Synteserute 3 går via det biologisk interessante molekylet iodinin (**2a**). Denne synteseruten er av spesiell interesse, siden en effektiv syntese av (**2a**) ikke er kjent i litteraturen. Denne synteseruten fordrer derfor en effektiv syntese av **2a**, hvilket betyr at dersom synteserute 3 er vellykket, vil den etablere en ny synteserute for to naturprodukter.

I litteraturen er syntese av **2a** fra **13** publisert av Yosioka og Kidani med et totalt utbytte på 22.5%.^{85,99} I denne prosedyren ble **13** demetylert ved refluksring med HBr i eddiksyre, og **18** oksidert med H₂O₂ og Ac₂O. Didemetylering av **13** til **18** er i nyere tid publisert av Alonso *et al*¹⁰⁰ ved bruk av BBr₃ med kvantitativt utbytte. Denne demetyleringsprosedyren vil derfor være grunnlaget for demetyleringen i synteserute 3. Oksidasjon av **18** vil bli testet med oksidasjonsmidler som tidligere beskrevet; *m*CPBA, H₂O₂ i eddiksyre, og H₂O₂ og Ac₂O.

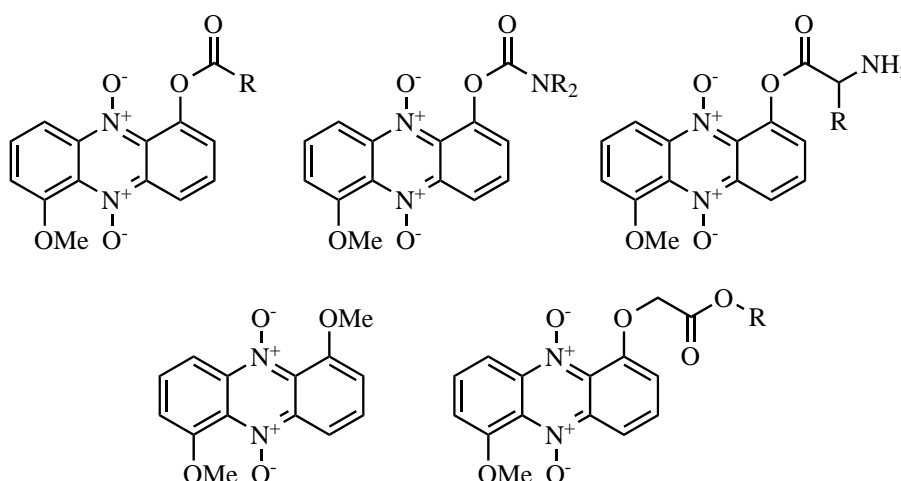
I litteraturen er monometylering av **2a** til **1a** rapportert utført med *t*-BuOK (1.1 ekv.) og Me₂SO₄ (1.5 ekv.) i HMPA,¹⁰¹ og diazometan,¹⁰² publisert med henholdsvis 69% og 25% utbytte. Av helsemessige årsaker er alternativer til Me₂SO₄, diazometan og HMPA undersøkt. Som erstatning til Me₂SO₄ og diazometan er CH₃I valgt som alkyleringsreagens. Alkylering av fenoler med CH₃I og andre alkyleringsmidler er kjent utført med K₂CO₃ i aceton.^{71,76} I likhet med HMPA er DMF et polart løsningsmiddel og kjent for å stabilisere kationer. DMF er derfor valgt som et alternativt løsningsmiddel for HMPA og aceton. På samme måte som for monodemetylering, vil det for monometylering være en utfordring å finne de rette betingelsene for å oppnå høyest mulig utbytte av kun det monometylerte produktet.

III. DERIVATERISERING AV MYXIN

III.I. ØNSKEDE DERIVATER AV MYXIN

For syntese av myxinderivater er det i denne oppgaven lagt vekt på derivatisering av fenolgruppen på **1a**. Som introdusert i kapittel 2 kan **1a** ved derivatisering av fenolgruppen enten formuleres som et prodrug eller gi grunnlag for nye legemiddelkandidater. I SAR-studien er det ønskelig å kartlegge nødvendigheten av fenolgruppen.

Med utgangspunkt i vanlige prodrugs av alkoholer og fenoler,^{3,49} samt interessante forbindelser for SAR-studien, var det ønsket å syntetisere derivater med ester-, karbamat-, aminosyre-, og eterfunksjonalitet (Skjema 4.4).



Skjema 4.4: Ønskede derivater av myxin (**1a**) (R = en alkylgruppe).

Ester- og karbamatderivater

Maskering av alkoholer og fenoler kan gjøres ved å formulere gruppene som estere. Estergruppe kan fungere godt som prodrug for fenolgruppen ved hydrolyse eller spalting av esterbindingen med en esterase *in vivo*.³ Karbamatgrupper er generelt mer stabile med hensyn på hydrolyse enn estergrupper samtidig som de er biologisk nedbrytbare.^{3,103} Et myxinderivat med karbamatfunksjonalitet er derfor også av interesse for en SAR-studie.

Aminosyrederivater

Aminosyrederivater kan gi ønsket vannløselighet, nedbrytbare metabolitter, samt mulighet for modifisering av de fysikalske egenskapene til molekylet. En prosedyre for syntese av aminosyrederivater er derfor ønskelig.

Eterderivater

Biologisk testing av nye eterderivater kan gi innsikt i om fenolgruppen på **1a** er nødvendig for den biologiske aktiviteten.

III.II. UTFORDRINGER

Sammenlignet med enkle fenolgrupper, er derivatisering av fenolgrupper på fenazin-*N,N'*-dioksider lite beskrevet i litteraturen. Av det rapporterte har González *et al*⁷¹ og Cerecetto *et al*³² rapportert om stor grad av monodeoksygenering av fenazin-*N,N'*-dioksider (40-60%) ved forsøk på derivatisering av fenolgruppen. Enkle S_N2-reaksjoner og nukleofile acylsubstitusjoner gir et maksimum utbytte på 30-50%. Av den grunn er det ønskelig å finne prosedyrer for funksjonalisering som unngår eller begrenser deoksygenering av *N*-oksidene.

Grunner til deoksygenering av *N*-oksidene i slike reaksjoner var ikke avklart ved masterprosjektets start, men vil bli diskutert i kapittel 5, side 66.

Kapittel 5

Syntese og resultater

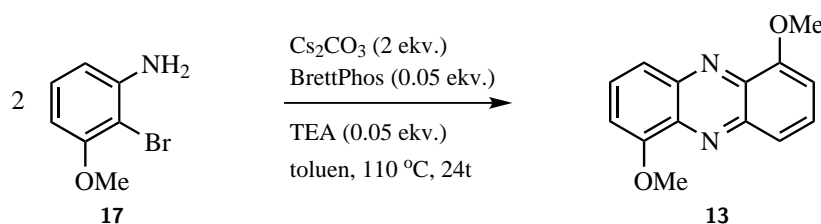
I dette kapitlet vil syntese og resultater bli presentert. Kapitlet vil ta for seg etableringen av syntesen av myxin (**1a**), samt syntese av nye myxinderivater. Det vil bli presentert og diskutert resultater og utfordringer som har dukket opp for de forskjellige reaksjonene i synteseruten. Til slutt i kapitlet vil det bli gitt en oppsummering av den etablerte synteseruten til **1a** sammenlignet med det som er kjent i litteraturen.³¹

I. INNLEDNING

Av synteserutene beskrevet i kapittel 3 (Skjema 4.2, side 25) ble det valgt å undersøke synteserute 2 og 3, hvor disse er presentert i samme rekkefølge. Felles for begge synteserutene er syntese av 1,6-dimetoksifenazin (**13**), og syntesen av denne forbindelsen er derfor presentert først.

I.I. SYNTSE AV 1,6-DIMETOKSYFENAZIN (**13**)

Arbeidet med denne syntesen bygger på et tidligere arbeid utført av Anthony Prandina (Farmasøytisk institutt, UiO, veileder Pål Rongved). Skjema 5.1 viser et synteseskjema for homokobling av **17** til **13** ved bruk av Cs_2CO_3 (2 ekv.), BrettPhos prekatalysator (0.05 ekv.) og trietylamin (0.05 ekv.) refluxert i toluen i 24 timer. Trietylamin ble benyttet som aktiveringsbase for katalysatoren. Basert på den generiske reaksjonsmekanismen for metallorganiske krysskoblingsreaksjoner (side 19), er det i Skjema 5.2 (side 34) foreslått en mekanisme for homokoblingen av forbindelse **17** til **13**.^{67,68,90}



Skjema 5.1: Syntese av **13** ved bruk av Buchwald-Hartwig-homokobling av **17**.

I reprodusering av denne Buchwald-Hartwig-homokoblingen ble det tydelig at renheten til kjemikaliene var essensiell for en vellykket reaksjon. Etter noen mislykkede reproduseringsforsøk gjennomført med kjemikalier tilgjengelig på laboratoriet, ble det systematisk endret på parametre i forsøk på å få omsatt **17** til **13**. Ved innkjøp av ny og tørr Cs_2CO_3 og tørr toluen ble **17** omsatt til **13** med 10-21% utbytte.

Fra Prandinas arbeid var det kjent at vellykket omsetning av **17** til **13** resulterte i en gul reaksjonsblanding som kom av fargen til det syntetiserte produktet **13**. I de innledende forsøkene ble reaksjonsblandingen raskt mørkt brun og deretter svart. Slik fargeforandring er ofte forbundet med dekomponering av katalysator og dannelse av metallisk palladium.¹⁰⁴ Ved endring til renere og tørrere kjemikalier holdt reaksjonsblandingen gul farge over lengre tid. Dette kan indikere at det tok lengre tid før katalysatoren dekomponerte. Basert på TLC-analyse ble reaksjonen avsluttet når **17** var fullstendig omsatt (ca. 24 timer) eller når det ikke lenger ble observert forandring i reaksjonsblandingen. Råprodukt-¹H-NMR-analyse ga et raskt inntrykk av omsetning

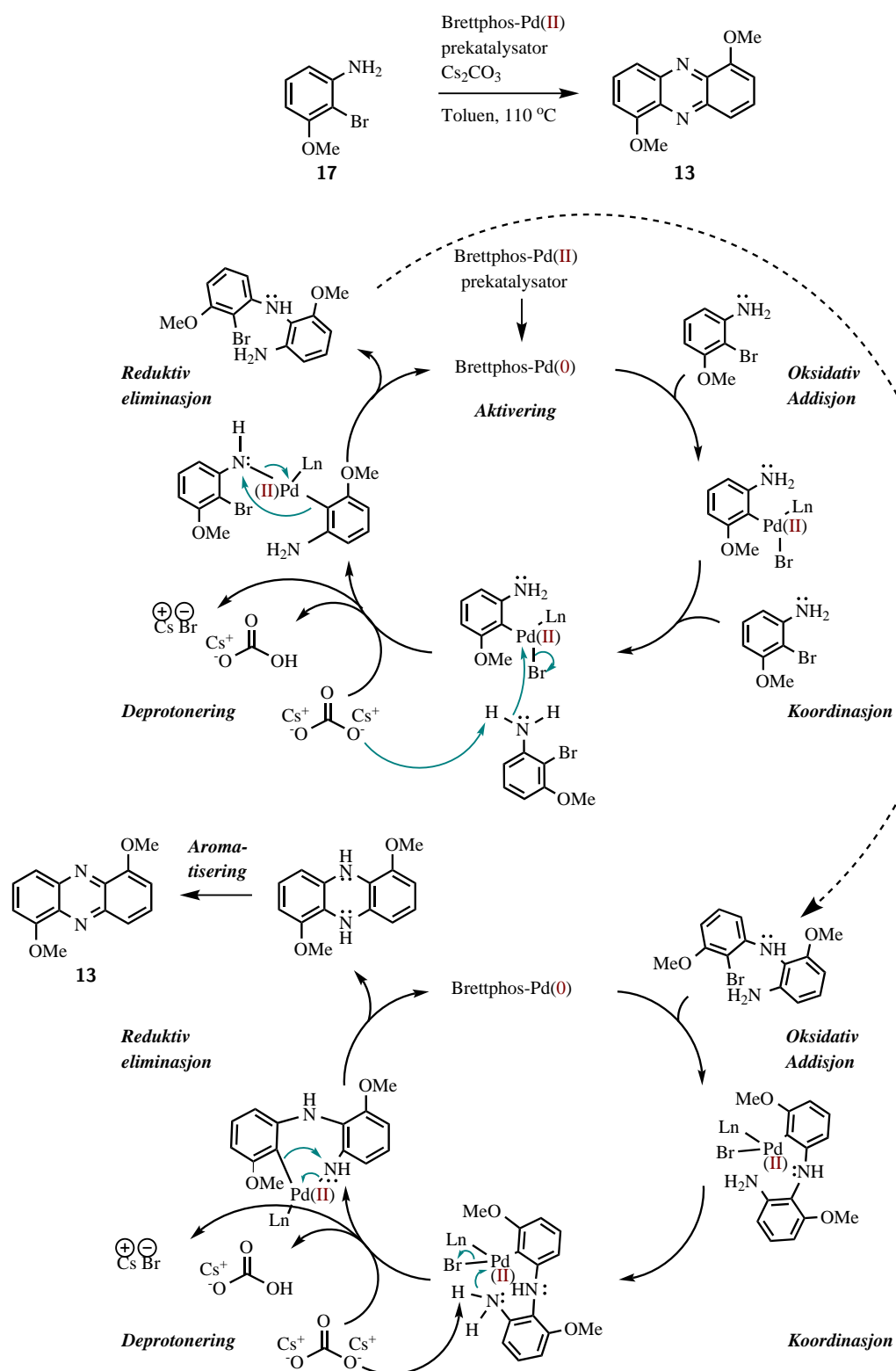
ved sammenligning av kjemisk skift for metoksygruppene til **17** (3.85 ppm) og **13** (4.10 ppm).

ENDRING AV AKTIVERINGSBASE

I forsøk på å se om endring av aktiveringsbase ville øke omsetningen i reaksjonen ble *t*-BuOK testet istedenfor trietylamin. Denne endringen økte utbyttet til reaksjonen fra 21% til 56%. En ekstra testing av KHMDS som aktiveringsbase økte utbyttet til ytterligere 77%. Det er tydelig at basen er viktig for omsetningen i reaksjonen.

MINDRE KATALYSATORMENGDE

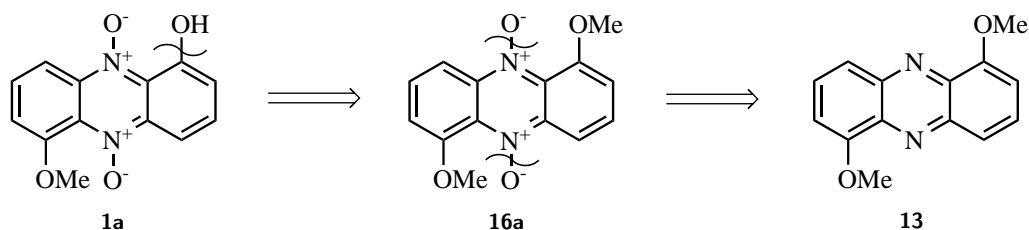
Palladiumkatalysatorer er kostbare, så det var ønskelig å teste om reaksjonen kunne utføres ved mindre katalysatormengde. Reaksjonen ble derfor testet med mindre katalysatormengde (0.02 ekv.), og dette ga 76% utbytte. Dette betyr at syntesen kan utføres med mindre katalysator, noe som gjør syntesetrinnet mer attraktivt med hensyn på pris. Syntesen ble vellykket oppskalert til 200-500 mg med samme utbytte.



Skjema 5.2: Mulig mekanisme for Buchwald-Hartwig-homokoblingen av 17 til 13.

II. SYNTESERUTE 2

Synteserute 2 er retrosyntetisk illustrert i Skjema 5.3 og bygger på en kjent syntese publisert av Chowdhury *et al.*³¹ Da det totale utbyttet av **1a** fra forbindelse **13** for denne synteseruten var under 4%, var målet å se om endring av reaksjonsbetingelsene kunne gi høyere utbytter.

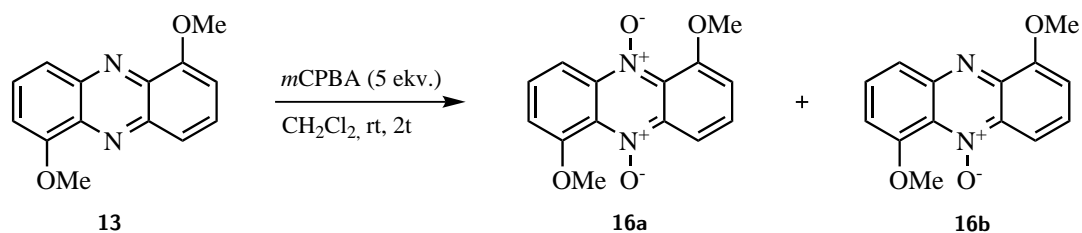


Skjema 5.3: Retrosyntetisk analyse av myxin (**1a**) for synteserute 2.

II.I. SYNTSE AV 1,6-DIMETOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**16a**)

OKSIDASJON MED *m*CPBA

Forsøk på di-*N*-oksidering av **13** til **16a** viste seg å være vanskeligere enn først antatt. Etter publisert prosedyre av Chowdhury *et al.*³¹ (Skjema 5.4) ble oksidasjon av **13** med *m*CPBA (5 ekv.) reproduisert (forsøk 1, Tabell 5.1). Dette ga ingen omsetning til **16a** basert på TLC-analyse. Kun **16b** og tungtløselig ukjent brunt biprodukt ble observert.



Skjema 5.4: Oksidasjon av **13** med *m*CPBA i CH_2Cl_2 .

Ved innkjøp av ny *m*CPBA ble forsøk 1 gjentatt. I denne reaksjonen ble spor av **16a** observert ved TLC-analyse. Utvidet reaksjonstid (12 timer) og ytterligere tilsetning av *m*CPBA (2 ekv.) ga ingen større omsetning til **16a**.

Med tanke på begrenset mengde med tilgjengelig utgangsstoff (**13**) og den lave omsetning til **16a** ved oksidasjon med *m*CPBA, ville ikke denne oksidasjon legge grunn for en ny effektiv synteserute av myxin **1a**. Nye oksidasjonsbetingelser ble derfor undersøkt og er presentert i kommende seksjoner.

OKSIDASJON MED H₂O₂ I EDDIKSYRE

Aromatiske *N*-oksider er kjent syntetisert med et overskudd av H₂O₂ (33%) (4 ekv.) i eddiksyre ved 60 °C i 8 timer.^{70,75,76,105,106} Med disse betingelsene ble **13** forsøkt oksidert til **16a** uten hell (forsøk 3, Tabell 5.1). Ytterligere tilsetning av 4 ekv. H₂O₂ underveis i reaksjonen, og en utvidet reaksjonstid på 24 timer, ga ingen forandring i omsetning. Det ble kun sett omsetning til det mono-*N*-oksiderte produktet **16b**.

OKSIDASJON MED H₂O₂ OG AC₂O

Di-*N*-oksidasjon av quinoxalinⁱⁱ er kjent utført med Ac₂O (eddiksyreanhydrid) og H₂O₂ (hydrogenperoksid).⁷⁷⁻⁷⁹ Ac₂O reagerer med H₂O₂ *in situ* og danner AcOOH (pereddiksyre) som oksiderer nitrogenatomene til *N*-oksider. Ved testing av disse oksidasjonsbetingelsene (forsøk 4 og 5, Tabell 5.1) ble det i reaksjonsblandingen observert gradvis fargeforandring fra gul mot oransje etter ca. 1 time. TLC-analyse viste omsetning til det mono-*N*-oksiderte produktet **16b**. Fargeforandring for fenaziner fra uoksidert til oksidert form er kjent, og det er mulig å følge oksidasjonsreaksjonen visuelt.¹⁰⁷ Etter ytterligere 30 minutter ble det observert at fargen på reaksjonsblandingen gikk tilbake til gul. Basert på TLC-analyse med kjent R_f-verdi og ¹H-NMR-analyse inneholdt råproduktblandingen utgangsstoff (**13**), mono-*N*-oksidert produkt (**16b**), og noen andre biprodukter. Biproduktene ble ikke videre studert da syntesen ble utført.

Tabell 5.1: Testede betingelser for di-*N*-oksidasjon av forbindelse **13** til **16a**.

Forsøk	Betingelser	Løsningsmiddel	Temp	Tid	Utbytte
1	<i>m</i> CPBA (5 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	40 °C	12t	–
2	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^a	CH ₂ Cl ₂	40 °C	12t	spor
3	H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	AcOH	60 °C	8t	kun mono- <i>N</i> -oksid
4	Ac ₂ O, H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	RT	2t	– ^b
5	Ac ₂ O, UHP (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	RT	2t	– ^b
6	TFAA, H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	RT	1t	– ^b
7	TFAA, UHP (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	RT	0.5t	24% mono- <i>N</i> -oksid
8	2,2,2-(trifluoroacetophenon), MeCN, H ₂ O ₂	buffer ^c	RT	1t	–
9	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) (inert,UVs.)	toluen	80 °C	5t	13% ^d

^aNyåpnet *m*CPBA ^bSynlig forandring i farge på løsning etter 60 minutter, men tilbakedannelse av utgangsstoff.

^cVandig buffer av 0.6 M K₂CO₃ og 4 × 10⁻⁵ M EDTA, pH 12. ^dTestet med de best egnede reaksjonsbetingelsene for oksidasjon av **18** (se seksjon III.II.)

ⁱⁱOgså kjent som benzopyrazin.

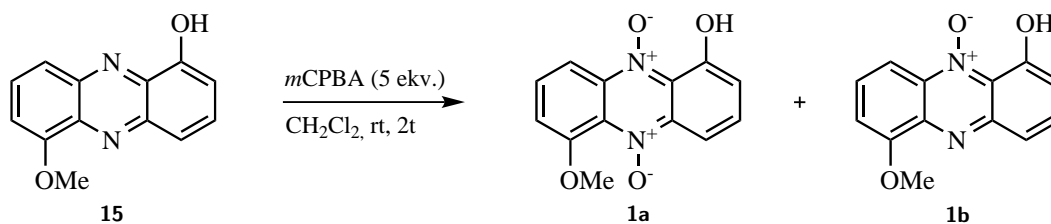
Et kraftigere oksidasjonsalternativ til AcOOH er trifluoro-pereddiksyre (TFPAA). Ac₂O ble derfor erstattet med TFAA (trifluoro-pereddiksyreanhydrid) (forsøk 6, Tabell 5.1). Endringen til TFAA ga samme resultater som for Ac₂O. Den eneste forskjellen var hastigheten på reaksjonen. På grunn av tilbakedannelsen av utgangsstoff ble forsøk 7 (Tabell 5.1) avsluttet da omsetningen til *N*-oksiderte produkter, visuelt sett og med grunnlag i TLC-analyse, var på det høyeste (etter ca. 30 minutter). TLC-analyse av reaksjonsblandingen viste dannelse av det mono-*N*-oksiderte produktet **16b** pluss spor av det di-*N*-oksidert produktet **16a**. Kun forbindelse **16b** ble isolert rent med (24% utbytte).

I retrospekt er det funnet at grunnen til tilbakedannelsen av utgangsstoff kan forklares ved acylering av *N*-oksidet som fører til deoksigenering og dannelse av eventuelle omleiringsbiprodukter.^{53,108} Dette kan forklare den observerte dannelsen av biprodukter nylig beskrevet og tilbakedannelse av utgangsstoff.

II.I.I. ENDRING AV SYNTESERUTE

Chowdhury *et al*³¹ og Joyner⁸⁴ har rapportert at oksidasjonen av forbindelse **15** (Skjema 5.5) ga kun to produkter, **1a** og **1b**, hvor **1b** var det eneste mono-*N*-oksiderte produktet. Dette kan indikere at *N*-oksidasjon med en fenolgruppe i *orto*-posisjon er favorisert over *N*-oksidasjon med en metoksygruppe i *orto*-posisjon.

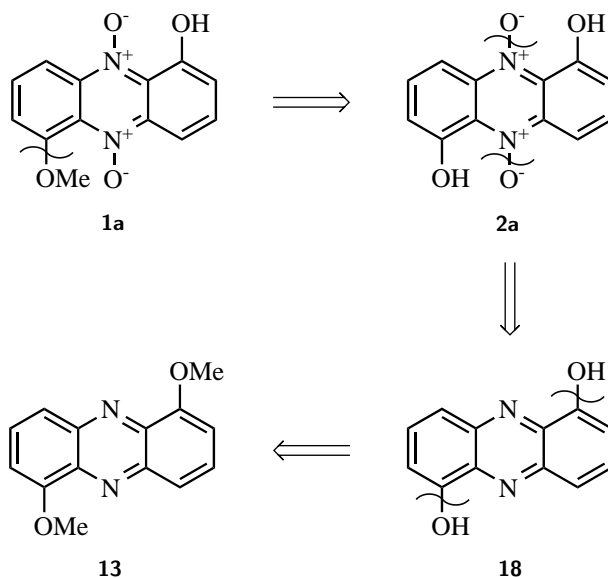
Siden det kunne virke som oksidasjonstrinnet ville være enklere med fenolgrupper istedenfor metoksygrupper i *orto*-posisjon i forhold til nitrogenatomet ble det besluttet å rette fokus mot synteserute 3.



Skjema 5.5: Oksidasjon av **15** med *m*CPBA viser favorisert *N*-oksidasjon i *orto*-posisjon til fenolgruppen.^{31,84}

III. SYNTESERUTE 3

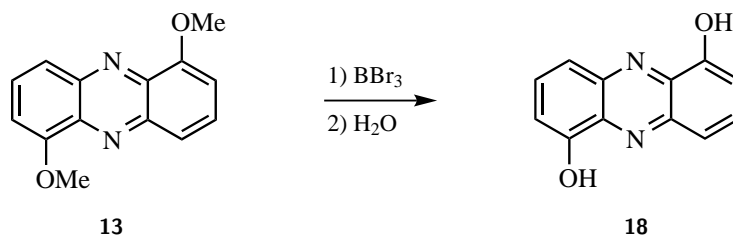
Med grunnlag i resultatene til Chowdhury *et al*³¹ og Joyner⁸⁴ om selektiv oksidasjon av nitrogenet i *orto*-posisjon til fenolgruppen, var håpet at synteserute 3 (Skjema 5.6) ville være en bedre synteserute til tross for et ekstra syntesetrinn.



Skjema 5.6: Retrosyntetisk analyse av myxin (**1a**) for synteserute 3.

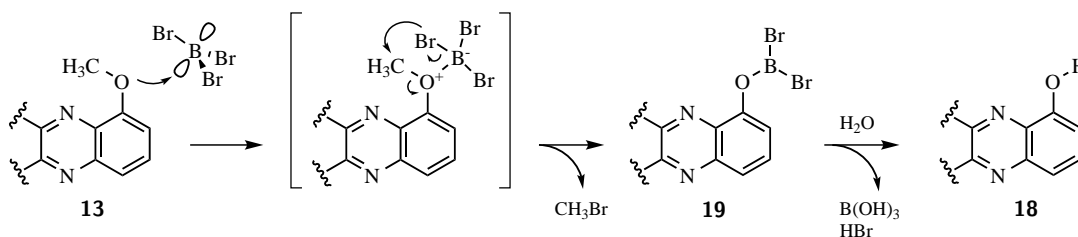
III.I. SYNTSE AV 1,6-DIHYDROKSYFENAZIN (**18**)

En demetylering av **13** til **18** med BBr_3 , rapportert med 100% utbytte av Alonso *et al*,¹⁰⁰ er illustrert i Skjema 5.7. Første reproduseringsforsøk ble utført ved refluksering (40 °C) av **13** i et overskudd av BBr_3 (1 M i CH_2Cl_2) i 24 timer. Betingelsene ga lav (< 15%) omsetning til **18** basert på $^1\text{H-NMR}$ -analyse. For å se om konsentrasjonen av BBr_3 var av relevans for omsetningen ble det benyttet ufortynnet BBr_3 både som løsningsmiddel og reagens. Reaksjonen ble refluksert i 5 timer før den ble avsluttet kontrollert ved nedkjøling av reaksjonsblandingen til ca. -20 °C og dråpevis tilsetning av isvann. Utfelling ved å justere pH til 7 ga **18** med 99% utbytte.



Skjema 5.7: Syntese av 1,6-dihydroksyfenazin (**18**) ved demetylering av **13** med BBr_3 .¹⁰⁰

BBr_3 er en sterk Lewissyre og reagerer eksotermt med vann og danner borsyre ($\text{B(OH)}_3/\text{H}_3\text{BO}_3$) og HBr -gass.¹⁰⁹ Ampullen med BBr_3 ble derfor åpnet under en kontinuerlig strøm av argongass før tilsetning til reaksjonskolben.¹¹⁰ Mekanismen til demetyleringen er gitt i Skjema 5.8 og viser et angrep fra et ledig elektronpar på oksygenatomet til et tomt orbital hos boratomet, som resulterer i en eliminasjon av CH_3Br .¹¹¹ Ønsket produkt (**18**) blir deretter oppnådd ved reaksjon av **19** med H_2O .



Skjema 5.8: En mulig mekanisme for demetylering av **13** med BBr_3 .¹¹¹

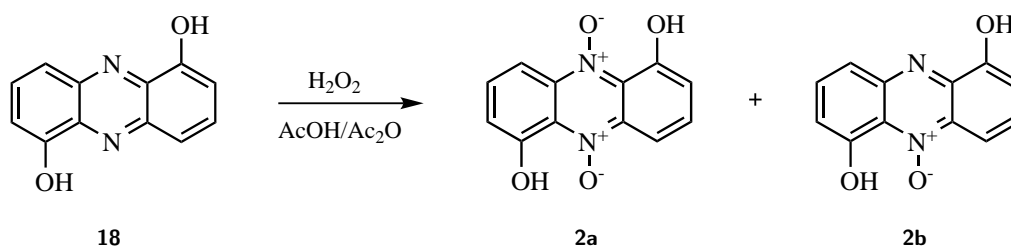
Demetyleringen av **13** med BBr_3 var en effektiv syntese. Ufortynnet BBr_3 er et dyrt kjemikalie, og det benyttes i stort overskudd i forhold til **13**, noe som gjør syntesesteget kostbart. Sett i sammenheng med prisen på startmaterialet (**17**) og katalysatoren i syntesen av **13** blir kostnaden for disse to syntesetrinnene høy. Det ble derfor besluttet å kjøpe inn **18** som et kommersielt tilgjengelig produkt til de følgende oksidasjonsforsøkene.

III.II. SYNTSE AV IODININ (**2a**)

Med grunnlag i oksidasjonsforsøkene av **13** til **16a**, ble **18** reagert med de samme oksidasjonsmidlene for å oppnå det di-*N*-oksiderte produktet **2a**. Av disse oksidasjonsmidlene vil betingelser med H₂O₂ i eddiksyre, og H₂O₂ med Ac₂O bli presentert først, og oksidasjon med *m*CPBA presentert til slutt. Utprøvde betingelser er oppsummert i Tabell 5.2, side 41.ⁱⁱⁱ

OKSIDASJON MED H₂O₂ I EDDIKSYRE

Forsøk på oksidering av **18** til **2a** ble utført med H₂O₂ (4 ekv.) i eddiksyre ved 60 °C i 8 timer (Skjema 5.9) (forsøk 1, Tabell 5.2).^{70,75,76,105,106} Dette ga, basert på TLC- og råprodukt-¹H-NMR-analyse, spor av di-*N*-oksidert produkt (**2a**), mono-*N*-oksidert produkt (**2b**) (7:1 med hensyn på **18**), noe ureagert utgangsstoff (**18**), og annet uløselig biprodukt som ikke ble studert videre. Ytterligere tilsetning av H₂O₂ (4 ekv.) underveis i reaksjonen, og en reaksjonstid på 24 timer, ga ingen forandring i omsetning til **2a** (forsøk 2, Tabell 5.2). Det mono-*N*-oksiderte produktet **2b** lot seg ikke rense ved ekstraksjon eller ved bruk av kolonnekromatografi. Forbindelsen hadde forholdsvis lav løselighet i organiske løsningsmidler (best i CH₂Cl₂). Kombinasjonen av en fri fenol, et intramolekylært bundet fenolhydrogen og et fritt arylamin gjorde separasjon med normal fase kolonnekromatografi svært vanskelig. Separasjon på kolonne med deaktivering av silika med 1% trietylamin i eluenten ble også utført uten hell. ¹H-NMR av det reneste isolerte produktet er lagt ved i appendiks (spekter 10.6, side 114) og viser ¹H-NMR-signalene til forbindelse **2b**.



Skjema 5.9: Oksidasjon av **18** med H₂O₂ og AcOH/Ac₂O.

OKSIDASJON MED H₂O₂ OG AC₂O

I en publikasjon av Yosioka og Kidani fra 1955⁸⁵ er syntese av **2a** rapportert ved oksidasjon av **18** med Ac₂O og H₂O₂ (33%) i benzen oppvarmet på vannbad i 5 timer

ⁱⁱⁱBetingelser testet av andre på forskningsgruppen er ikke tatt med i denne oppgaven ettersom ingen bedre resultater ble oppnådd.

(ukjent temperatur). Med grunnlag i denne prosedyren ble **18** reagert med H₂O₂ og Ac₂O i toluen ved 70 °C i 5 timer (forsøk 3, Tabell 5.2). Som for oksidasjonen av **13** med H₂O₂ og Ac₂O/TFAA i CH₂Cl₂, beskrevet side 36, ble det etter én time observert dannelse av oksidert produkt ved tydelig fargeforandring på reaksjonsblandingen fra gul til rød. TLC-analyse viste en blanding av **2a** og **2b** med stor overvekt av **2b**. Som tidligere ble det ved utvidet reaksjonstid (3 timer) observert fargeforandring tilbake til gul, og TLC- og råprodukt ¹H-NMR-analyse viste en sammensetning av **18**, **2b** og ukjente biprodukter.

Tabell 5.2: Testede betingelser for di-*N*-oksidasjon av forbindelse **18** til **2a**.

Forsøk	Betingelser	Løsningsmiddel	Temp	Tid	Utbytte
1	H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	AcOH	60 °C	8t	Spor
2	H ₂ O ₂ (33%) (8 ekv.)	AcOH	60 °C	24t	Spor
3	Ac ₂ O, H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	Toluen	70 °C	5t	Spor ^a
4	Ac ₂ O, H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	rt	2t	Spor ^a
5	Ac ₂ O, UHP (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	rt	2t	Spor ^a
6	Ac ₂ O, UHP (4 ekv.)	Ac ₂ O	rt	2t	Spor ^a
7	TFAA, H ₂ O ₂ (33%) (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	rt	2t	Spor ^a
8	TFAA, UHP (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	rt	2t	Spor ^a
9	TFAA, UHP (4 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	40 °C	2t	Spor ^a
10	2,2,2-(trifluoroacetophenon), MeCN, H ₂ O ₂	buffer ^b	RT	48t	–
11	<i>m</i> CPBA (5 ekv.)	CH ₂ Cl ₂	40 °C	12t	–
12	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^c	CH ₂ Cl ₂	40 °C	16t	10%
13	<i>m</i> CPBA (5 ekv.)	DCE	70 °C	16t	15%
14	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^d	DCE	70 °C	10t	19%
15	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^d	DCE	80 °C	7t/12t/24t	20% ^e
16	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^d (inert,UVs) ^g	DCE	80 °C	7t	20% ^f
17	<i>m</i> CPBA (10 ekv.) ^d	DCE	80 °C	6t	21%
18	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^g	Dioksan	40 °C	18t	Spor
19	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^g	THF	40 °C	18t	Spor
20	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^g	DMF	40 °C	18t	–
21	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^g	MeCN	40 °C	18t	–
22	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^{d,g}	Toluen	70 °C	7t	60%
23	<i>m</i> CPBA (5 ekv.) ^{d,g}	Toluen	85 °C	7t	76% ^h

^aFargeendring i reaksjonsblandingen indikerer dannelse av oksidert produkt, men utgangsstoff tilbakedannes etter kort tid. ^bVandig buffer av 0.6 M K₂CO₃ og 4 × 10⁻⁵ M EDTA, pH 12. ^cNyåpnet *m*CPBA. ^dAddisjon av *m*CPBA fordelt utover reaksjonstiden. ^eBasert på TLC-analyse, ingen forandring i reaksjonsblandingen etter 7 timer. ^fTLC-analyse viser mindre dekomponeringsprodukter og mer mono-*N*-oksidert produkt. ^gInert atmosfære og skjermet for lys. ^hNy opprensningmetode.

På samme måte som for **13**, ble **18** reagert med H₂O₂ og Ac₂O/TFAA i CH₂Cl₂ for å sammenligne reaktiviteten til **13** og **18** overfor oksidasjonsmidlet (forsøk 4-9, Tabell 5.2). I denne sammenligningen ble det funnet, basert på råprodukt ¹H-NMR-analyse, at oksidasjon av **18** ga større omsetning til respektive fenazin-*N,N'*-dioksid enn **13** (henholdsvis 7% og 4% med hensyn på utgangsstoff). Dette kan indikere at forbindelse **18** er mer reaktiv overfor oksidasjonsmidlet enn forbindelse **13**.

I reaksjonene der spor av **2a** ble dannet, ble **2a** forsøkt rensert ved bruk av kolonnekromatografi. Forbindelse **2a** er et sterkt pigment og er derfor synlig på silikagel ved veldig lav konsentrasjon. På grunn av liten stoffmengde og stor grad av koeluering med biprodukter var det dessverre ikke mulig å isolere rent produkt.

OKSIDASJON MED *m*CPBA

Etter prosedyre av Chowdhury *et al*³¹ ble forbindelse **18** reagert med *m*CPBA i CH₂Cl₂ i 12 timer (forsøk 11, Tabell 5.2). Resultatet av denne oksidasjonen var en rødlig reaksjonsblanding som, ved TLC-analyse, viste produkter som ga lange haler på TLC-platen. Ved større avsetning av reaksjonsblandingen på TLC-platen var det mulig, basert på kjent R_f-verdi, å observere det lilla produktet **2a** ved TLC-analyse.

Oksidasjonsforsøket med *m*CPBA ble, som et kontrollforsøk, gjentatt ved innkjøp av ny *m*CPBA. Basert på TLC-analyse og tydelig fargeforandring på reaksjonsblandingen ble det i denne reaksjonen observert større omsetning av **18** til **2a** (forsøk 12, Tabell 5.2). *m*CPBA ble derfor benyttet videre som oksidasjonsreagens.

Forbindelse **2a** er kjent som et sterkt pigment og farger løsninger dypt lilla.^{70,75} Tross sterk farge i løsning er løseligheten til **2a** svært lav i organiske løsningsmidler, dette gjorde det vanskelig å estimere den faktiske stoffmengden som var i råproduktblandingen. CH₂Cl₂ viste seg å løse **2a** best. Likevel måtte det anvendes relativt mye CH₂Cl₂ i forhold til mengden av **2a** (ca. 25-30 mL CH₂Cl₂ for ca. 10 mg). Dette gjorde opparbeiding og håndtering av reaksjonsblandinger inneholdende **2a** svært tidkrevende, og mye løsningsmiddel ble benyttet.

Råproduktblandingen etter avsluttet syntese inneholdt **18**, **2a**, **2b**, brunt biprodukt, og stort overskudd av *m*CPBA og *m*CBA^{iv}. ¹H-NMR av råproduktblandingen ga derfor ingen nyttig informasjon om omsetningen til **2a** siden signaler fra *m*CPBA/*m*CBA overlappet med signaler fra **2a**.

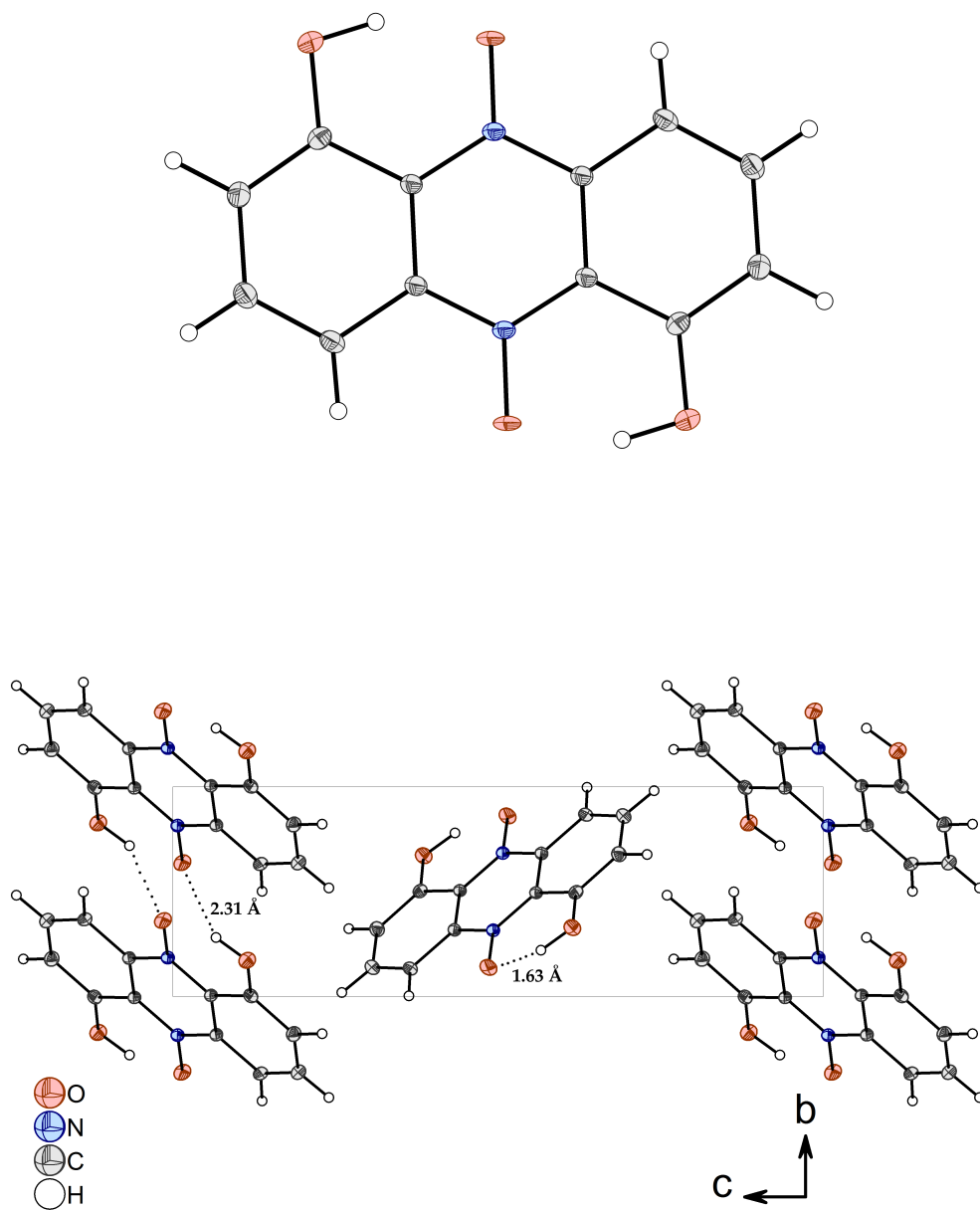
På grunn av koeluering var det ikke mulig med normal fase kolonnekromatografi å skille **2a** fra dens mono-*N*-oksiderte analog **2b**. Først ved bruk av C₁₈-omvendt fase

^{iv}Ved oksidasjon med *m*CPBA, blir *m*CPBA selv redusert til *m*CBA.

pakkemateriale ble en liten mengde **2a** isolert.

For å isolere større mengder **2a** fra blandingen med rester av oksidasjonsmiddel og biprodukter ble det forsøkt forskjellige teknikker for utfelling, filtrering, ekstraksjon og kromatografi. Kromatografering av mer enn 70 mg av **2a** var svært vanskelig da forbindelsen krystalliserte ut på kolonnen. På grunn av forskjeller i løselighet mellom **2a** og biprodukter, ble **2a** isolert med 10% utbytte ved gjentakende vasking med kald dietyleter og dekantering av løsningsmiddel inneholdende biprodukter. Metoden var tidkrevende og ueffektiv, og ville neppe være gjennomførbar ved oppskalering.

Krystaller til énkrystallrøntgendiffraksjon ble dyrket ved passiv diffusjon mellom CH_2Cl_2 og heksan (prosedyre C, side 80) og strukturen er vist i Figur 5.1. Lengden på den intra- og intermolekulære hydrogenbindingen mellom hydrogenatomet på fenolgruppen og *N*-oksidet, henholdsvis 1.63 Å og 2.31 Å, underbygger den lave løseligheten til **2a**. Hydrogenbindingslengder varierer vanligvis fra 4.0-2.2 Å, hvor bindingslengder under 2.5 Å kategoriseres som sterke og med delvis kovalent bindings-karakter.¹¹² Bindingslengder på 1.63 Å og 2.31 Å indikerer derfor sterke hydrogenbindinger både intramolekulært og intermolekulært.



Figur 5.1: Krystallstrukturen av iodinin (2a).

Økning i temperatur

Oksidasjoner med *m*CPBA blir ofte utført i klorerte løsningsmidler.^{31,113,114} 1,2-Dikloretan, heretter kun forkortet som dikloretan, ble testet som løsningsmiddel for å kunne øke reaksjonstemperaturen. Med en reaksjonstemperatur på 70 °C økte utbyttet til 15% (forsøk 13, Tabell 5.2). Da det er kjent at perbenzoesyrer gradvis dekomponerer ved forhøyede reaksjonstemperaturer (60-90 °C), ble tilsetningen av *m*CPBA fordelt utover reaksjonstiden.¹¹⁵ Dette økte reaksjonsutbyttet til 19% (forsøk 14, Tabell 5.2). En ytterligere temperaturøkning til 80 °C ga tilsvarende utbytter som ved 70 °C, men basert på TLC-analyse var det ingen endring i reaksjonsblandingen etter 7 timer.

Inert atmosfære og lysskjerming

Under arbeidet med opprensing av **2a** ble det observert ukjente signaler som i ¹H-NMR-spektra ikke tilhørte utgangsstoff eller andre kjente produkter. Forsøket ble derfor utført under inert atmosfære og skjermet for lys for å redusere variabler som kunne påvirke reaksjonen. Dette ga en renere reaksjonsblanding og mindre dannelse av ukjente biprodukter, og de ukjente ¹H-NMR-signalene forsvant fra ¹H-NMR-spektrene. Det er vanskelig å konkludere hva disse biproduktene kan være, men fotokjemisk dannelse av isomeriseringsprodukter av fenazin-*N*-oksider er kjent fra litteraturen. Slike produkter kan eksempelvis være ringekspansjon til sykliske etere og -laktamer eller oksaziridiner.^{47,76,116,117}

Større konsentrasjon av *m*CPBA

For å undersøke om konsentrasjonen av *m*CPBA i reaksjonsblandingen hadde påvirkning på graden omsetning ble syntesen utført med 10 ekv. *m*CPBA (forsøk 17, Tabell 5.2). Basert på TLC-analyse var reaksjonen ferdig etter 6 timer. Til tross for kortere reaksjonstid ga denne økningen samme utbytte som ved 5 ekv., men mer tidkrevende opprensing av **2a**. *m*CPBA (77% i *m*CBA) ble rensset ved utvasking av *m*CBA med NaHCO₃, tørket med MgSO₄ og filtrert over foldefilter, og oppkonsentrert under redusert trykk. Gradvis tilsetning av tørket *m*CPBA ga ingen forandring i utbyttet.

Løsningsmiddel

En rekke løsningsmidler ble testet for å undersøke om dette kunne ha betydning for oksidasjonen (forsøk 18-22, Tabell 5.2). Endring til tørr toluen økte reaksjonsutbyttet fra 19% til 60%. Dette indikerer at løsningsmiddel er en viktig parameter i oksidasjonen av **18** til **2a**.

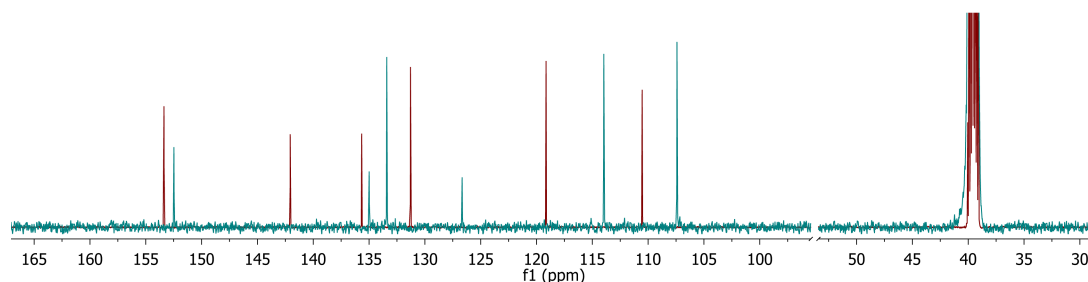
Opparbeidingsmetode

Ved oppskalering (> 0.6 g) ble det forsøkt forskjellige filtreringsteknikker for å isolere **2a**. Vellykket opprensing ble utført ved tørking av råproduktblandingen under redusert trykk og utvasking av biprodukter med kald metanol og -dietyler på en glassintertrakt. Dette økte det totale isolerte utbyttet til 76%, samt effektiviserte opparbeidingen og gjorde oppskalering mulig. Syntesen ble vellykket oppskalert til 1.1 gram.

Karakterisering

Den lave løseligheten til **2a** gjorde det vanskelig å få gode NMR-data. Det ble forsøkt forskjellige NMR-løsningsmidler og spektrometriske betingelser; blant dem CD₂Cl₂, toluen-d₈, CDCl₃, og DMSO-d₆ ved 25 °C. Det ble også testet med forhøyede temperaturer (40-55 °C) for toluen-d₈ og DMSO-d₆. Uten stor forskjell mellom 25 °C og 55 °C løste DMSO-d₆ **2a** best. Som kjent kan kvarternære karbonatomer gi lav intensitet ved ¹³C-NMR,¹¹⁸ og dette gjaldt også for de kvarternære karbonatomene til iodinin **2a**. Det var nødvendig med minimum 10240 opptak og 2.5 sekunder relaksasjonstid på et 600 MHz NMR-spektrometer for å få synliggjort de kvarternære karbonatomene. For å oppnå signaler fra disse karbonatomene ved ¹³C-NMR-spektroskopi valgte Sletta *et al*⁶ å mate bakteriene som produserte **2a** med ¹³C-anrikt medium.

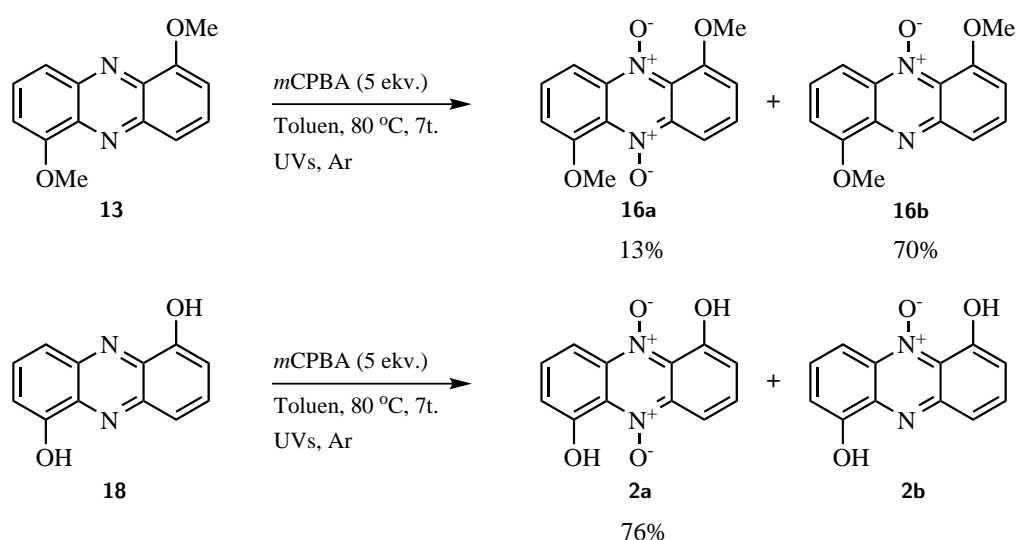
Introduksjon av *N*-oksider på den generelle fenazinstrukturen endret elektrontettheten i molekylet i vesentlig grad. Dette var spesielt merkbart ved sammenligning av de kjemiske skiftene til karbonnummer 4a/9a og 5a/10a (de fire laveste toppene mellom 125-145 ppm) ved ¹³C-NMR. Spekter 5.1 viser en sammenligning av ¹³C-NMR spekter for **18** (grønn) og **2a** (rød).



Spekter 5.1: Sammenligning av ¹³C-NMR spekter for henholdsvis uoksidert (grønn) (**18**) og di-*N*-oksidert **2a** (rød) form av 1,6-dihydroksyfenazin. (600 MHz / DMSO-d₆).

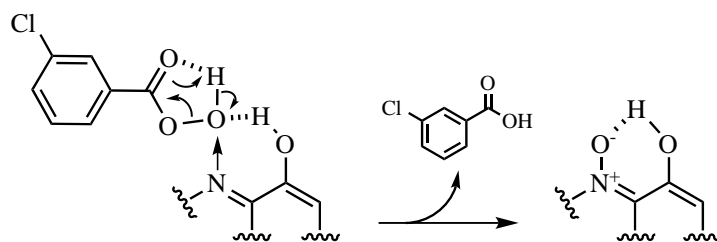
FAVORISERING AV FENOL I *orto*-POSISJON

Basert på observasjoner gjort i oksidasjonsarbeidet er det rimelig å anta at *N*-oksidasjon av fenazinet er enklere utført med en fenolgruppe enn en metoksygruppe i *orto*-posisjon til nitrogenatomet. De beste betingelsene for oksidasjon av **18** til **2a** ble testet på **13** for å se substituentene i 1- og 6-posisjon var av betydning for oksidasjonen (Tabell 5.1, forsøk 9), se Skjema 5.10. Basert på TLC-analyse ble det observert noe dannelse av **16a**, og mye av det mono-*N*-oksiderte produktet **16b**. Ved kolonnekromatografi ble **16a** isolert med 13% utbytte, som i sammenligning med 76% utbytte av **2a** utgjør en signifikant forskjell i omsetning til di-*N*-oksidert produkt.



Skjema 5.10: Sammenligning av di-*N*-oksidasjon av **13** og **18**. Utbyttene viser at fenolgruppen har stor betydning for graden av di-*N*-oksidasjon med bruk av *m*CPBA som oksidant.

En grunn til dette kan være at hydrogenatomet som sitter på fenolgruppen i *orto*-posisjon til nitrogenatomet har koordinerende effekt på persyren (*m*CPBA) og gjør oksidasjonen av det andre nitrogenatomet mye mer tilgjengelig. Den mulige mekanismen for dette er illustrert Skjema 5.11.



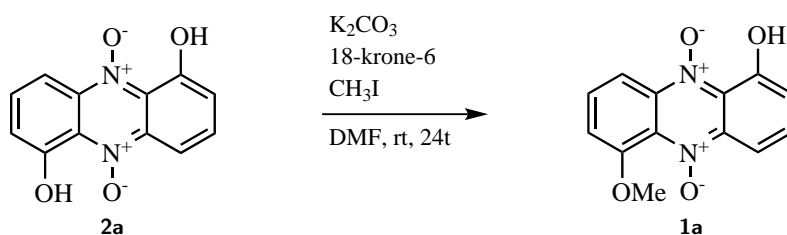
Skjema 5.11: En mulig mekanisme for oksidasjon av **18** der hydrogenatomet på fenolgruppen har koordinerende effekt for persyren.

OPPSUMMERING

En ny og effektiv syntese av **2a** ved oksidasjon av **18** har her blitt beskrevet. Reaksjonen må finne sted under inert atmosfære og skjermet for lys, og utbyttet øker drastisk ved bruk av tørr toluen som løsningsmiddel ved 70-80 °C. Det har blitt etablert en ny opprensingsmetode som tillater effektiv oppskalering av syntesen. *N*-oksidasjonen med *m*CPBA som oksidant er enklere utført med en fenolgruppe enn en metoksygruppe i *orto*-posisjon i forhold til nitrogenatomet. En mulig grunn til dette er at hydrogenatomet på fenolgruppen har koordinerende effekt på persyren.

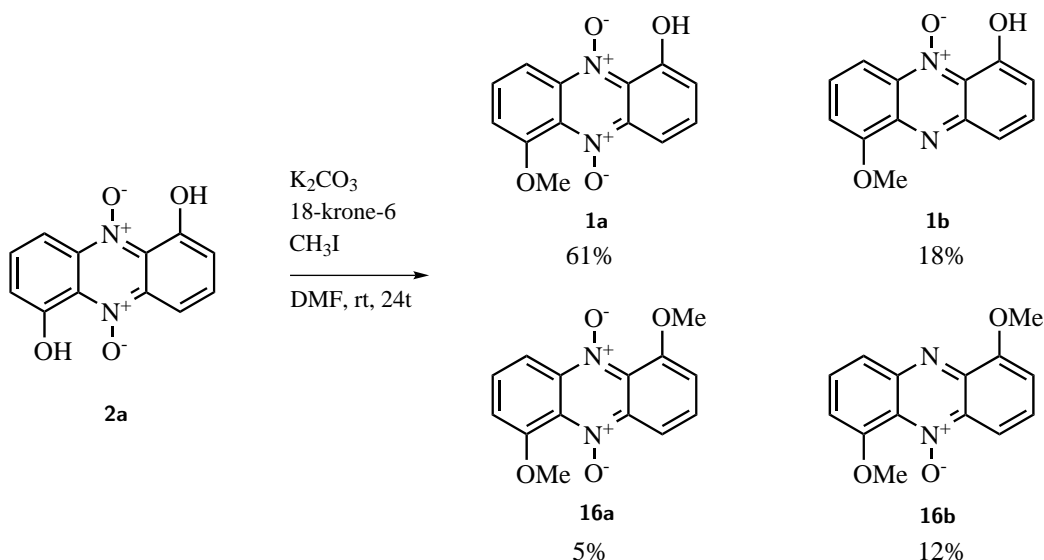
III.III. SYNTSE AV MYXIN (**1a**)

Syntesen av myxin (**1a**) ble først utført etter en modifisert prosedyre av Lavaggi *et al*⁷¹ med K_2CO_3 /18-krone-6 (1.1 ekv.), og CH_3I (1.2 ekv.), inert atmosfære og romtemperatur (Skjema 5.12). Reaksjonen ble stoppet etter 24 timer da det ved TLC-analyse ikke lengre ble observert forandring i reaksjonsblandingen. TLC-analyse av reaksjonsblandingen viste dannelse av fire produkter (Skjema 5.13), men også ufullstendig omsetning av **2a**. Forbindelse **1a** ble isolert i 31% utbytte etter opprensning med kolonnekromatografi.



Skjema 5.12: Syntese av myxin (**1a**) ved monometylering av **2a**.

Siden alt utgangsstoffet (**2a**) ikke ble omsatt med 1.1 ekv. base, ble mengden base økt til 2 ekv. Dette økte utbyttet fra 31% til 42%. En videre økning av CH_3I til 2 ekv. økte utbyttet ytterligere til 51% (forsøk 1-3, Tabell 5.3, side 50). Ved reaksjonstid lengre enn 24 timer ble det kun observert mer dannelse av de deoksygenerte produktene beskrevet i Skjema 5.13.



Skjema 5.13: Hovedproduktene ved syntesen av myxin (**1a**). Hovedproduktene var mono- og dimetylererte forbindelser (**1a**, **16a**) med respektive deoksygenerte produkter (**1b**, **16b**).

Som rapportert av Lavaggi *et al*⁷¹ ga denne reaksjonen stor grad av deoksygenererte produkter og dermed moderate utbytter av **1a**. Hovedproduktene i reaksjonen, vist i Skjema 5.13, er en blanding av mono- og dimetylerede produkter av **2a**. Alle produktene var av interesse med tanke på biologisk testing og kartlegging av behovet for doble *N*-oksider. Forbindelsene ble derfor isolert ved bruk av kolonnekromatografi. Mulige grunner til deoksygenering ble funnet senere i syntesearbeidet og er diskutert i seksjon VI, side 66.

Tabell 5.3: Testede betingelser for syntese av **1a**.

Forsøk	K ₂ CO ₃ /18-krone-6	CH ₃ I	Løsningsmiddel	Temp	Tid	Utbytte
1	1.1 ekv.	1.2 ekv.	DMF	rt	24t	31%
2	2 ekv.	1.2 ekv.	DMF	rt	24t	42%
3	2 ekv.	2 ekv.	DMF	rt	24t	51%
4	2 ekv.	2 ekv.	DMF	0-5 °C	48t	25%
5	2 ekv.	2 ekv.	DMF	50 °C	24t	–
6	2.3 ekv.	10 ekv.	DMF	rt	3t	45%
7	1.2 ekv.	10 ekv.	DMF	rt	24t	35% ^a
8	1.5 ekv.	3 ekv.	DMF	rt	24t	61%
9	1.5 ekv.	3 ekv.	DMF	rt	24t	39% ^b
10	1.5 ekv.	3 ekv.	DMF	rt	24t	60% ^c
11	1.5 ekv.	3 ekv.	DMF	rt	24t	23% ^d

^aUfullstendig omsetning av startmaterialet. ^bCH₃I tilsatt rett etter tilsetning av base. ^cCH₃I tilsatt 30 minutter etter tilsetning av base. ^dCH₃I tilsatt 4 timer etter tilsetning av base.

Temperatur

For å undersøke om endring av temperatur hadde betydning for deoksygenering og utbytte ble syntesen utført ved 0-5 °C og 50 °C (forsøk 4 og 5, Tabell 5.3). Ved 0-5 °C ble det observert lavere utbytte og mye lengre reaksjonstid, og ved 50 °C ble kun de mono-*N*-oksiderte produktene **1b** og **16b** observert. Resultatene indikerer at romtemperatur var den beste reaksjonstemperaturen med tanke på effektivitet og dannelsen av deoksygenererte produkter.

K₂CO₃ og CH₃I

Tabell 5.3 (side 50) viser en oversikt over de testede betingelsene for å finne den beste kombinasjonen av K₂CO₃ og CH₃I. Det ble funnet at 1.5 ekv. K₂CO₃ og 3 ekv. CH₃I ga det høyeste utbyttet på 61%. I forsøk 9-11 (Tabell 5.3) ble det funnet at tilsetning av CH₃I 30 minutter etter tilsetning av base gir høyest utbytte. Dette kan indikere at fullstendig monodeprotonering av **2a** tar noe tid og at en forsinket tilsetning av CH₃I derfor høyner utbyttet i reaksjonen. Til tross for dette forårsaker en forsinkelse på 4 timer før tilsetningen av CH₃I lavere utbytte (23%) (forsøk 11, Tabell 5.3).

TLC-analyse av reaksjonsblandingen (forsøk 11) før tilsetning av CH₃I viste dannelse av det deoksygenererte produktet (**2b**).

Base og løsningsmiddel

Under syntesearbeidet var grunner til deoksygenering ikke kjent. Det ble derfor undersøkt om endring av base (Cs₂CO₃, K₂CO₃, KHMDS, LiHMDS, *t*-BuOK og *n*-BuLi) og løsningsmiddel (toluen-CF₃, THF, aceton og DMF) kunne ha innvirkning på graden av deoksygenering og utbytte i syntese av **1a**. Basert på TLC- og ¹H-NMR-analyse ble det ikke observert positiv endring i graden av deoksygenering eller forhøyede utbytter (Tabell 5.3). Da omsetningen av **2a** til **1a** gikk raskest med DMF som løsningsmiddel, ble det fortsatt å benytte DMF i videre reaksjoner.

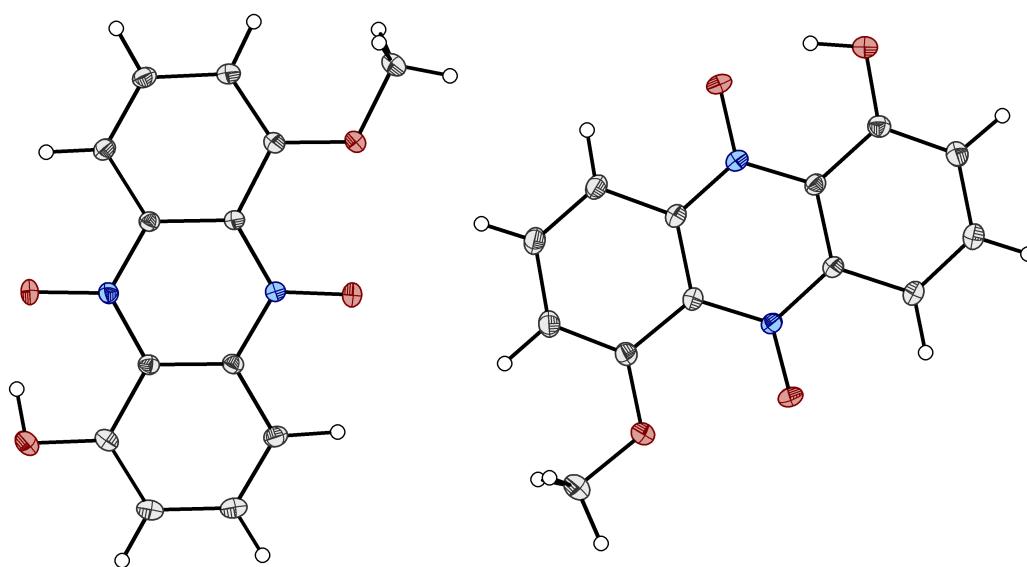
Tabell 5.4: Testing av forskjellige løsningsmidler og baser i syntese av **1a**.

Forsøk	Base	CH ₃ I	Løsningsmiddel	Temp	Tid	Utbytte
1	K ₂ CO ₃ (1.5 ekv.), 18-krone-6 (2 ekv.)	5 ekv.	DMF	rt	24t	54%
2	K ₂ CO ₃ (1.5 ekv.), 18-krone-6 (1.1 ekv.)	5 ekv.	Toluen-(CF ₃)	rt	24t	^a
3	K ₂ CO ₃ (1.5 ekv.), 18-krone-6 (2 ekv.)	5 ekv.	THF	rt	24t	^a
4	Cs ₂ CO ₃ (1.5 ekv.)	5 ekv.	DMF	rt	24t	^a
5	K ₂ CO ₃ (1.5 ekv.), 18-krone-6 (2 ekv.)	5 ekv.	Aceton	rt	24t	^a
6	KHMDS (1 ekv.)	5 ekv.	DMF	rt	24t	^a
7	LiHMDS (1 ekv.)	5 ekv.	DMF	rt	24t	Ingen reaksjon
8	<i>n</i> -BuLi (1.1 ekv.)	5 ekv.	THF	rt	24t	Ingen reaksjon ^b
9	<i>t</i> -BuOK (1.5 ekv.)	5 ekv.	DMF	rt	24t	49%
10	<i>t</i> -BuOK (1.5 ekv.)	5 ekv.	THF	rt	24t	Ingen reaksjon
11	<i>t</i> -BuOK (1.5 ekv.) 18-krone-6 (1.5 ekv.)	5 ekv.	THF	rt	24t	52%

^aBasert på råprodukt ¹H-NMR- og TLC-analyse, ingen forbedring i forhold til DMF og K₂CO₃. ^b*n*-BuLi tilstatt ved -78 °C.

I forsøk 7 og 8 ble det benyttet litiumbaserte baser. Ved disse forsøkene ble det ikke observert noen endring etter tilsetning av CH₃I. En plausibel grunn til dette kan være at Li⁺-ioner koordinerer inn mellom fenoksidet og *N*-oksidet.

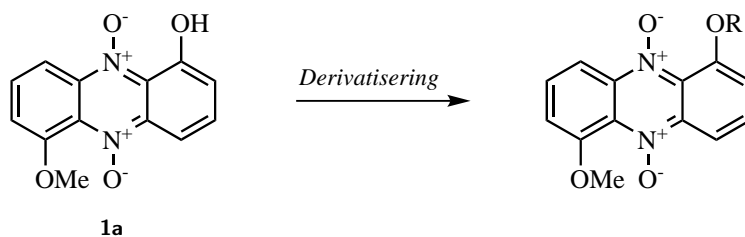
Krystaller til énkrystallrøntgendiffraksjon ble dyrket ved passiv diffusjon mellom CH₃Cl og heksan (prosedyre C, side 80), og bekreftet tilstedeværelsen av di-*N*-oksidfunksjonalitet. Krystallstrukturen til myxin (**1a**) er illustrert i Figur 5.2.



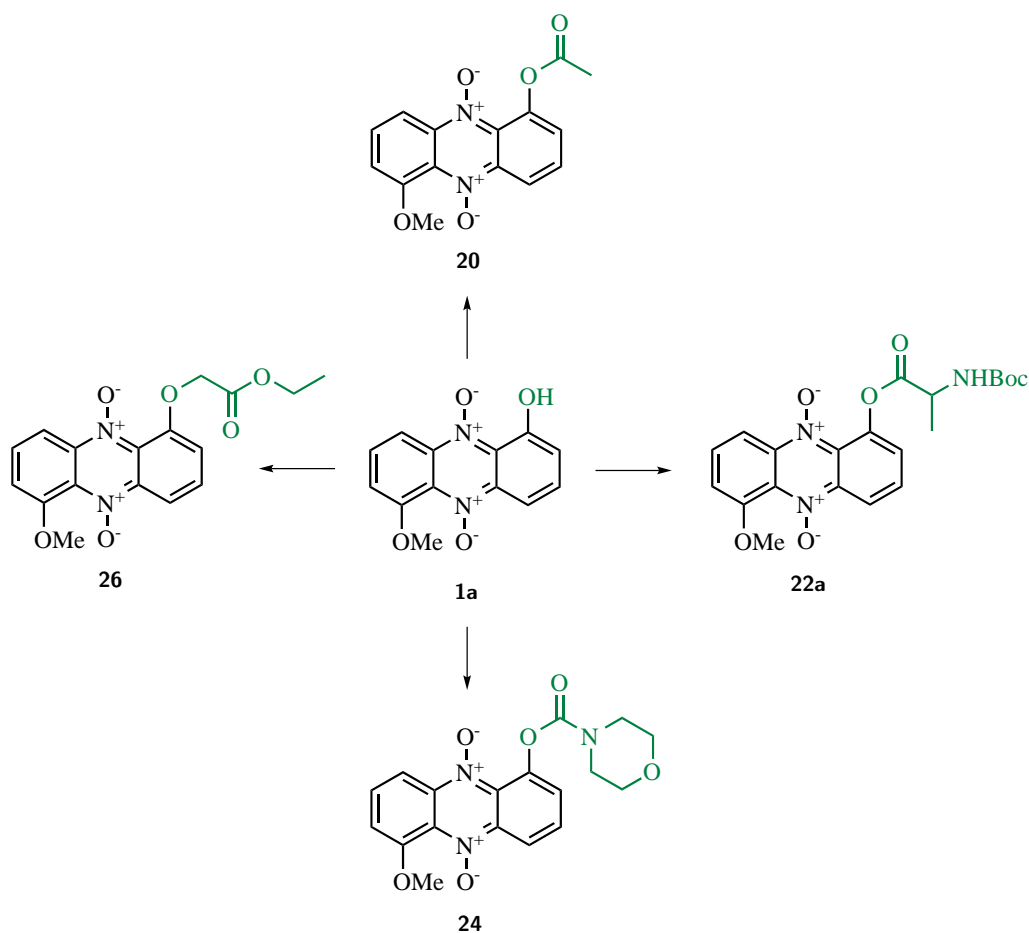
Figur 5.2: Krystallstrukturen av myxin (1a).

IV. SYNTSE AV MYXINDERIVATER

I kommende seksjoner presenteres syntese av myxinderivater. Skjema 5.14 viser et generelt synteseskjema for derivatisering av fenolgruppen på myxin (**1a**). Syntetiserte myxinderivater er vist i Figur 5.3.



Skjema 5.14: Derivatisering av fenolgruppen på **1a**, hvor R representerer de forskjellige funksjonelle gruppene illustrert i Figur 5.3.



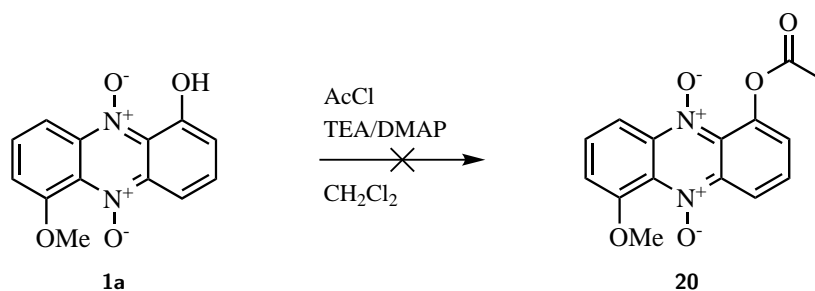
Figur 5.3: Oversikt over syntetiserte myxinderivater.

IV.I. SYNTSE AV ESTERDERIVAT (20)

Acetylering av **1a** med Ac_2O i pyridin er publisert i et patent av Leimgruber *et al.*¹⁰¹ Det er kjent i litteraturen at syreanhydrider reagerer med *N*-oksider og fører til deoksygenering av *N*-oksidene og dannelse av biprodukter.^{95,108,119-121} Dette er også beskrevet i Leimgrubers patent. Andre prosedyrer for acetylering ble derfor testet, hvor to prosedyrer er presentert i kommende seksjoner.

IV.I.I. ACETYLERING MED ACETYLKLORID

Etter kjent prosedyre for acetylering av fenolgruppe på fenaziner, publisert av Borrero *et al.*,⁷⁶ ble det testet å acetylere myxin (**1a**) med acetylklorid (3 ekv.) og trietylamin (1 ekv.) (forsøk 1, Tabell 5.5). TLC-analyse etter 24 timer viste dannelse av mange biprodukter med hovedvekt av **1b**. For å se om økt reaksjonshastighet kunne begrense graden av deoksygenering ble DMAP tilsatt som som katalysator (forsøk 2). Tilsetning av DMAP reduserte reaksjonstiden til 2 timer, men basert på TLC- og ¹H-NMR-analyse det ble ikke observert noen endring i graden av deoksygenering eller selektiv dannelse av ønsket produkt. Prosedyren ble derfor forkastet som mulig effektiv metode for acetylering av **1a** til **20**.



Skjema 5.15: Forsøk på syntese av **20** med bruk av acetylklorid og TEA/DMAP.

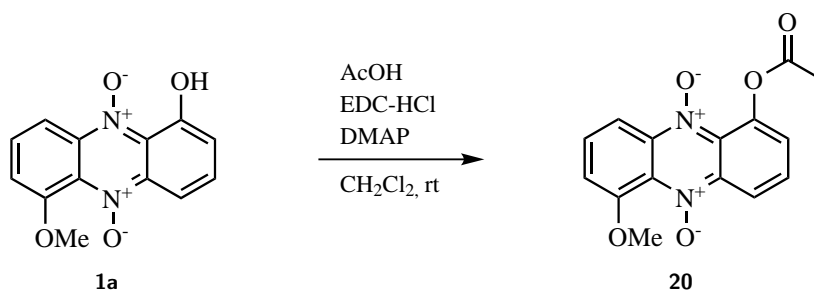
Tabell 5.5: Testede betingelser acetylering av **1a** med acetylklorid.

Forsøk	Reagenser	Tid	Temp	Løsningsmiddel	Utbytte
1	TEA (1 ekv.), AcCl (3 ekv.)	24t	0-rt	CH ₂ Cl ₂	Deoksygenering
2	TEA (1 ekv.), AcCl (3 ekv.), DMAP (5 ekv.)	2t	0-rt	CH ₂ Cl ₂	Deoksygenering

IV.I.II. STEGLICH-ESTERIFISERING

Som et forsøk på syntese av **20** uten deoksygenering av *N*-oksider, ble **20** vellykket syntetisert ved bruk av Steglich-esterifiseringmekanisme (beskrevet i kapittel 3, side 22) ved å koble eddiksyre og **1a**, med EDC-HCl og DMAP.

Første synteseforsøk ble utført etter kjent prosedyre av Benkovics *et al*¹²² med EDC-HCl (1.2 ekv.), eddiksyre (1.2 ekv.), og DMAP (0.1 ekv.) (forsøk 1, Tabell 5.6). Basert på TLC- og ¹H-NMR-analyse ga disse betingelsene etter 24 timer kun spor av **20** og ureagert **1a**. En økning til 4 ekv. EDC-HCl og 4 ekv. eddiksyre ga omsetning av **1a** til **20**. Syntesen ble avsluttet etter 24 timer da det basert på TLC-analyse ikke lengre skjedde noen endring i reaksjonsblandingen. Etter kolonnekromatografi ble **20** isolert med 73% utbytte, og ureagert **1a** ble isolert og gjenvunnet.

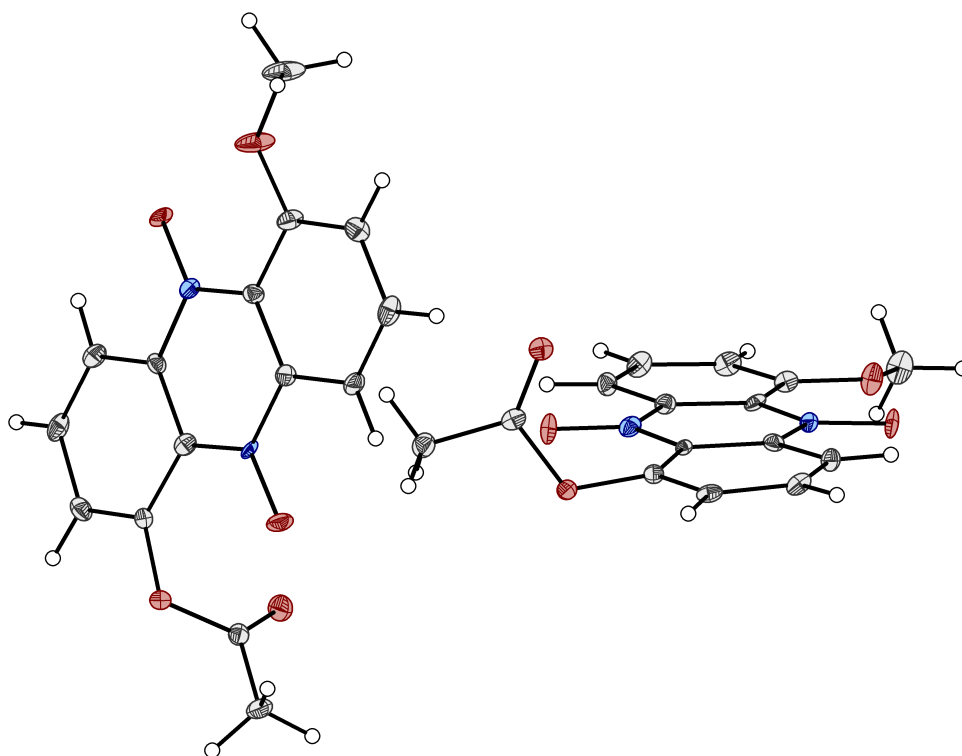


Skjema 5.16: Syntese av **20** ved bruk av Steglich-esterifisering.

Tabell 5.6: Testede betingelser for syntese av **20** med Steglich-esterifisering.

Forsøk	Reagenser	Tid	Temp	Løsningsmiddel	Utbytte
1	EDC-HCl (1.2 ekv.), AcOH (1.2 ekv.), DMAP (0.01 ekv.)	24t	rt	CH ₂ Cl ₂	spor av produkt
2	EDC-HCl (4 ekv.), AcOH (4 ekv.), DMAP (0.01 ekv.)	24t	rt	CH ₂ Cl ₂	73%

Strukturen til **20** ble bekreftet med énkrystallrøntgendiffraksjon (Figur 5.4). Krys-taller ble dyrket ved passiv diffusjon mellom CHCl₃ og heksan (prosedyre C, side 80).



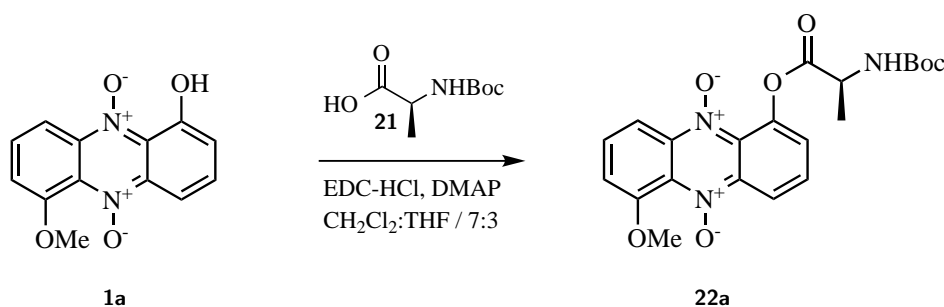
Figur 5.4: Krystallstrukturen av acetoksymyxin 20.

IV.II. SYNTSE AV AMINOSYREDERIVAT (**22a**)

BAKGRUNN

En suksessfull kobling mellom eddiksyre og **1a** ved bruk av Steglich-esterifisering åpnet muligheten for å koble **1a** med mer komplekse karboksylsyrer. Kobling av **1a** med en aminosyre danner et prodrug av **1a** med økt løselighet i polare løsningsmidler.¹²³

KOBLING MED BOC-BESKYTTET AMINOSYRE



Skjema 5.17: Reaksjonsskjema for syntese av forbindelse **22**.

For selektiv kobling av en aminosyre med **1a** ble det benyttet en Boc-beskyttet aminosyre. Det Boc-beskyttede aminosyrederivatet **22a** er i seg selv av interesse for biologisk testing.

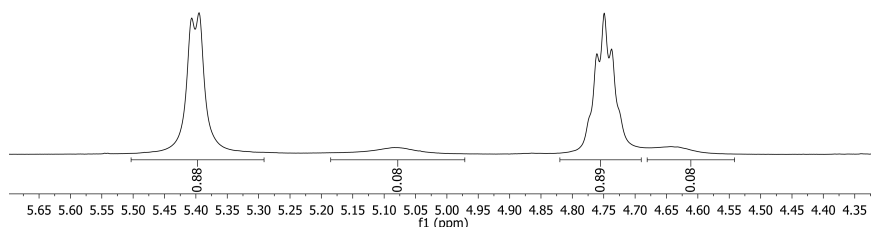
Syntese av **22a** ble først testet etter kjent prosedyre av Benkovics *et al*¹²² og Warren *et al*¹²⁴ med EDC-HCl (1.2 ekv.), Boc-Ala(L)-OH (**21**) (1.2 ekv.), og DMAP (0.1 ekv.) (forsøk 1, Tabell 5.7). Dette ga lav omsetning av **1a** til **22a** basert på TLC-analyse. En økning til 4 ekv. EDC-HCl og Boc-Ala(L)-OH ga heller ingen omsetning til **22a**.

Tabell 5.7: Testede betingelser for syntese av forbindelse **22a**.

Forsøk	Reagenser	Løsningsmiddel	Tid	Temp	Utbytte
1	EDC-HCl (1.5 ekv.), 21 (1.5 ekv.), DMAP (0.1 ekv.)	CH ₂ Cl ₂ :THF/7:3	24t	rt	-
2	EDC-HCl (4 ekv.), 21 (4 ekv.), DMAP (0.1 ekv.)	CH ₂ Cl ₂ :THF/7:3	24t	rt	spor
3	EDC-HCl (4 ekv.), 21 (4 ekv.), DMAP (0.25 ekv.)	CH ₂ Cl ₂ :THF/7:3	6t	rt	23%
4	EDC-HCl (4 ekv.), 21 (4 ekv.), DMAP (0.25 ekv.)	CH ₂ Cl ₂ :THF/7:3	3t	rt	82%

For å få omsatt **1a** til **22a** ble mengden DMAP økt fra 0.1 til 0.25 ekv.¹²⁵ Etter 30 minutter ble det observert dannet produkt både ved TLC-analyse og fargeforandring på reaksjonsblanding (forsøk 3, Tabell 5.7). Etter tre timer ble det observert redusert intensitet til flekken av dannet produkt på TLC-platen, og ¹H-NMR-analyse viste tilbakedannelse av **1a**. Etter ytterligere 4 timer reaksjonstid var produktet **22a** nesten borte fra reaksjonsblandingen. Gjentakelse av forsøk 3 med tre timer reaksjonstid ga **22a** med et utbytte på 82%.

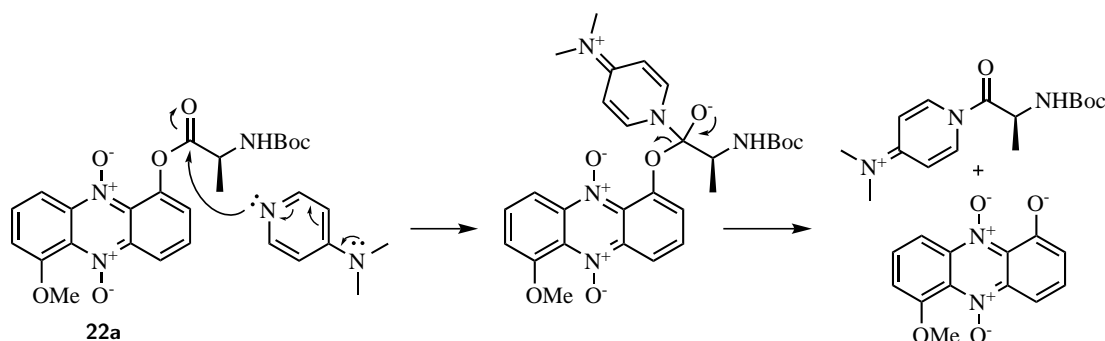
For amider er begrenset rotasjon om amidbindingen kjent.¹²⁶ I ¹H-NMR-spekteret av **22a** fremkommer to par distinkte topper, der to signaler deler på integralet av ett proton (spekter 5.2). En mulig grunn til dette er at **22a** foreligger som to rotamerer i CDCl₃ ved 25 °C. Signalene i ¹H-NMR-spekteret er muligens avhengig av løsningsmiddel og temperatur, men dette ble ikke ytterligere undersøkt da syntesen ble utført.



Spekter 5.2: Utsnitt av et ¹H-NMR-spekter som viser de rotamere signalene til **22a** (600 MHz / CDCl₃).

Tilbakedannelse

Grunnen til den observerte tilbakedannelse av **1a** er ikke fullstendig kjent. DMAP brukes som ofte som katalystor i nukleofil acylsusbstitusjon, og er også katalysator i Steglich-esterifiseringsmekanisme.^{88,95} En foreslått mekanisme for tilbakedannelsen av **1a** er at DMAP angriper det elektrophile setet på esterkarbonylen og eliminerer **1a** som en bedre utgående gruppe. Se foreslått mekanisme i Skjema 5.18.

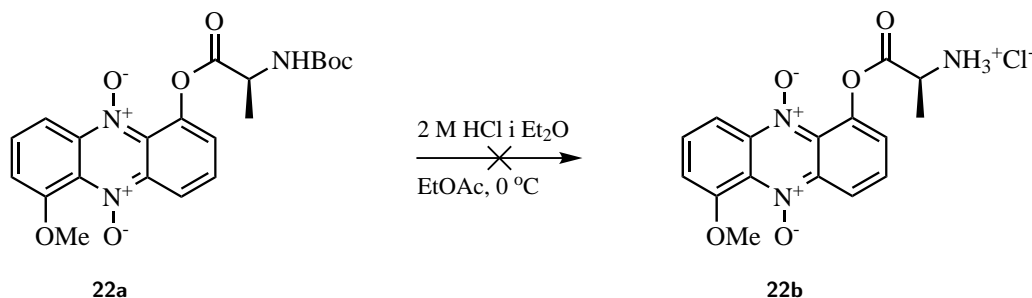


Skjema 5.18: Plausibel mekanisme for dekomponering av **22a**.

Det er publisert prosedyrer for kobling av fenoler og aminosyrer hvor DMAP er erstatt med HOBt.^{47,127} Sett i ettertid ville det vært nyttig å testet disse prosedyrene med tanke på tilbakedannelsen av **1a**.

IV.II.I. AVBESKYTTELSE

Boc-beskyttelsesgruppen på **22a** ble forsøkt fjernet etter en prosedyre av Gibson *et al*,¹²⁸ se Skjema 5.19. Forbindelse **22a** ble løst i tørr EtOAc ved 0 °C, med sakte tilsetning av HCl (1.2 ekv.). Det ble observert synlig endring i farge på reaksjonsblandingen fra første dråpe HCl. TLC-analyse av reaksjonsblandingen viste dannelse av **1a**, samt spor av et dannet produkt på grunnlinjen som kanskje kan ha vært ønsket produkt (**22b**). Da alt utgangsstoff var omsatt var også produktet på grunnlinjen borte, og kun **1a** i reaksjonsblandingen. Dette indikerer at betingelsene for fjerning av Boc-gruppen på **22a** også hydrolyserer esterfunksjonaliteten på **22b**.



Skjema 5.19: Reaksjonsskjema for mislykket syntese av forbindelse **22b**

En av grunnene til ustabiliteten til estergruppen under milde sure betingelser skyldes den sterke elektrontrontiltrekkende effekten til den protonerte aminogruppen. Aminogruppen aktiverer karbonylatomet i esterbindingen for hydrolyse, og kan selv bidra med intramolekylær katalytisk effekt for esterspaltningen.^{129,130} Dette kan begrenses ved å enten flytte aminogruppen lengre bort fra esterbindingen, eller ved å bytte til en aminosyre der alkylsidekjeden gir en optimal balanse mellom kjemisk stabilitet og hydrofobisitet (for eksempel valin).¹³¹

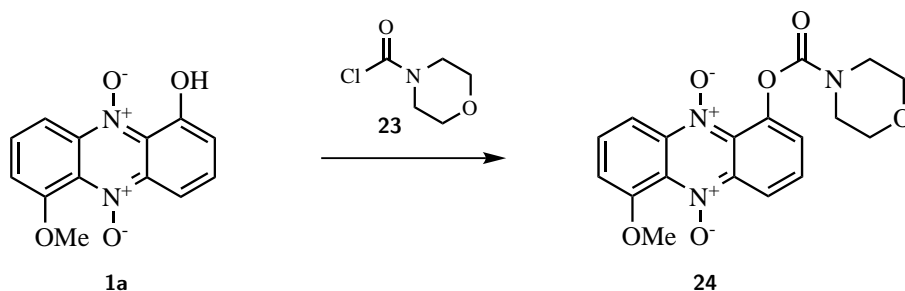
Aminet kan også beskyttes med en beskyttelsesgruppe som kan fjernes under andre betingelser. FMOC er en kjent beskyttelsesgruppe som fjernes under milde basiske betingelser og er en alternativ beskyttelsesgruppe for fremtidig syntese av tilsvarende derivater.¹³² På grunn av begrenset tilgjengelig mengde av **22a** ble disse endringene ikke testet.

IV.III. SYNTSE AV KARBAMATDERIVAT (**24**)

For syntesen av karbamatderivatet ble det valgt et karbamat med en morfolingruppe. Morfolingruppen øker polariteten til myxinderivatet ytterligere og er rapportert å ha antikreft-aktivitet.^{133–135}

Etter en kjent prosedyre for funksjonalisering av fenolgrupper med et karbamoylchlorid publisert av Quasdorf *et al.*,¹³⁶ ble syntese av **24** utført i reaksjon med *t*-BuOK (1.2 ekv.) og 4-morfolin karbonylchlorid (**23**) (5 ekv.) (Skjema 5.20). Dette ga kun spor av **24** basert på TLC-analyse. Tilsetning av DMAP (0.25 ekv.) økte utbyttet til 74% og indikerer at det er nødvendig med en katalysator for å få omsatt **1a** til **24** i reaksjon med **23**. Reaksjonen ble avsluttet når det ikke lenger ble observert noen endring i omsetning fra **1a** til **24**. Ureagert **1a** ble isolert og gjenvunnet. Tabell 5.8 viser en oversikt over testede reaksjonsbetingelser for syntese av **24**.

I forsøk på større omsetning av **1a** ble trietylamin benyttet som base (forsøk 3). Dette ga tilsvarende resultater som i forsøk 2.

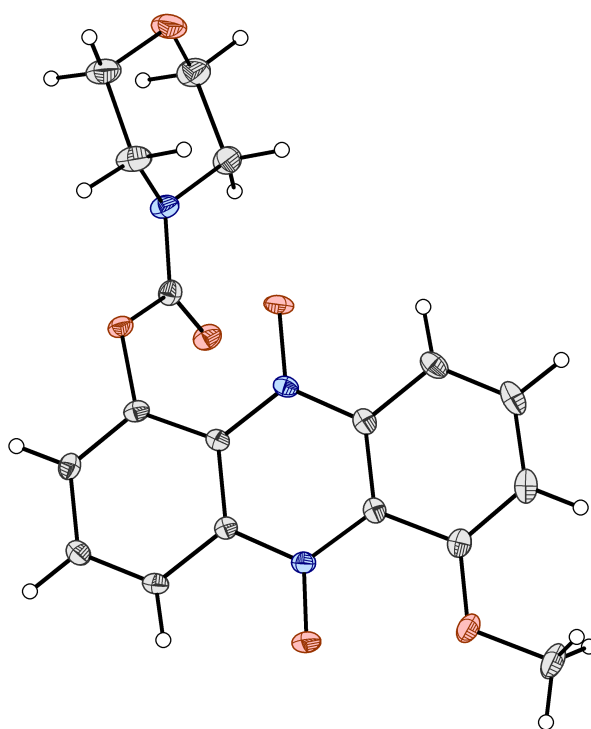


Skjema 5.20: Syntese av **24**.

Tabell 5.8: Oversikt over betingelser for syntese av **24**.

Forsøk	Reagenser	Løsningsmiddel	Tid	Temp	Utbytte
1	<i>t</i> -BuOK (1.2 ekv.), 23 (5 ekv.)	THF	24t	rt	spor av produkt
2	<i>t</i> -BuOK (1.2 ekv.), DMAP (0.25 ekv.), 23 (5 ekv.)	THF	16t	rt	74%
3	TEA (1.2 ekv.), 23 (5 ekv.)	THF	16t	rt	72%

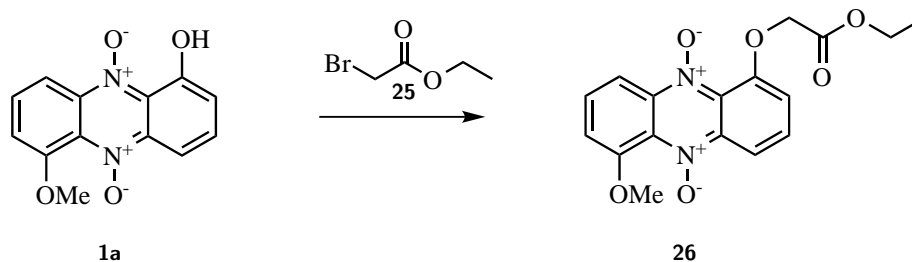
Strukturen til **24** ble bekreftet med énkrystallrøntgendiffraksjon (Figur 5.5). Krystaller til énkrystallrøntgendiffraksjon ble dyrket ved passiv diffusjon mellom CH₃Cl og heksan (etter prosedyre C, side 80).



Figur 5.5: Krystallstrukturen av 24.

IV.IV. SYNTSE AV ETERDERIVAT (26)

Til nå har det i denne oppgaven kun blitt beskrevet syntese av derivater med ester- eller karbatmatfunksjonaliteter. Det var ønskelig å kartlegge muligheten for å derivatisere fenolgruppen på **1a** med andre funksjonelle grupper, som blant annet etergrupper. Det ble besluttet å syntetisere en α -ester forbindelse siden estergruppen videre kan hydrolyseres og derivatet kan formuleres som et salt.

Skjema 5.21: Syntese av **26**.

Etter en modifisert prosedyre av Ragavan *et al*¹³⁷ ble **1a** i THF deprotonert med *t*-BuOK (1.5 ekv.) og alkylert med etylbromacetat (**25**) (3 ekv.) (Skjema 5.21). Dette ga etylmyxin-acetat (**26**) i 39% utbytte, hvor resterende produkt var det mono-deoksygenerte produktet **1b**. Mekanismen for reaksjon mellom **1a** og etylbromacetat (**25**) er en S_N2 -mekanisme og er favorisert av polare aprotiske løsningsmidler. Syntesen ble derfor utført i DMF, og dette økte utbyttet til 48%. Endring av base til K_2CO_3 sammen med 18-krone-6 økte utbyttet ytterligere til 56%. Tabell 5.9 viser en oversikt over testede betingelser for syntese av **26**. Fra tabellen kan det konkluderes med at DMF som løsningsmiddel og K_2CO_3 som base gir høyest utbytte i denne syntesen.

På grunn av tidsbegrensning ble **26** ikke hydrolysert i forsøk på å lage et salt.

Tabell 5.9: Oversikt over testede betingelser for syntese av **26**.

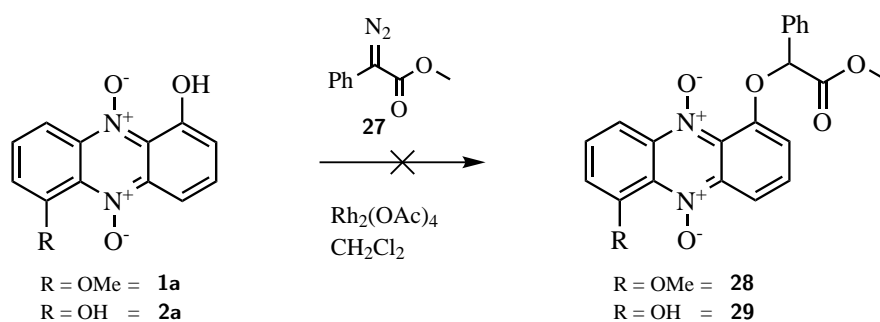
Forsøk	Reagenser	Løsningsmiddel	Tid	Temp	Utbytte
1	<i>t</i> -BuOK (1.5 ekv.), 25 (3 ekv.)	THF	24t	rt	39%
2	<i>t</i> -BuOK (1.5 ekv.), 25 (3 ekv.)	DMF	24t	rt	48%
3	K_2CO_3 (1.5 ekv.), 18-krone-6 (1.5 ekv.), 25 (3 ekv.)	DMF	24t	rt	56%

V. FORSØK PÅ DIVERSE DERIVATER

Forskjellige derivater av myxin (**1a**) ble forsøkt syntetisert. I den kommende seksjonen presenteres noen av reaksjonene som ikke ga ønsket produkt.

V.I. O-H-INNSETTING

O-H-innsetting med diazokarbonylforbindelser på alkoholer og fenoler er kjent i litteraturen.^{138,139} Som en mulig ny derivatiseringsmetode ble det forsøkt å O-H-innsette **27** på fenolgruppen til **1a** og **2a**. Syntesen ble utført etter en modifisert prosedyre av Haigh¹⁴⁰ og Shi *et al.*¹⁴¹ Metyl-2-diazo-2-fenylacetat (**27**) (1.2 ekv.) løst i CH₂Cl₂, under inert atmosfære, ble dråpevis tilsatt til en løsning av **1a/2a** og Rh₂(OAc)₄ (0.06 ekv.) (Skjema 5.22).

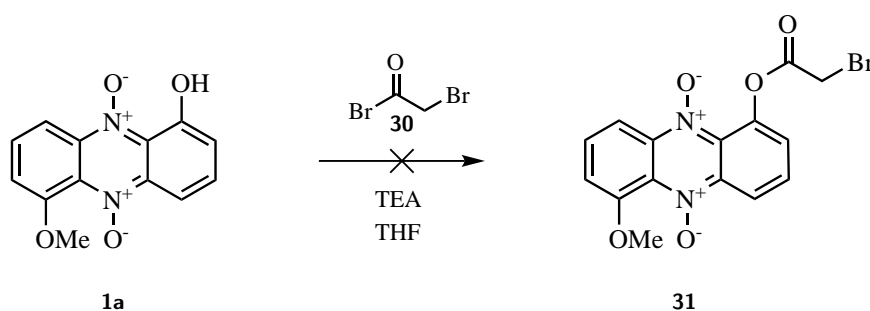


Skjema 5.22: Forsøk på syntese av **28** og **29** ved O-H-innsetting av **27**.

For **1a** ga reaksjonen beskrevet i Skjema 5.22 utelukkende deoksygenering av *N*-oksidet i *ortho*-posisjon i forhold til metoksygruppen (**1b**), og diazoforbindelsen reagerte med *N*-oksidet istedenfor fenolgruppen. Dette kunne indikere at den intramolekulære hydrogenbindingen mellom det fenoliske hydrogenatomet og *N*-oksidet hadde stabiliserende effekt for *N*-oksidet. For å undersøke om dette var stabiliserende nok til å oppnå O-H-innsetting istedenfor reduksjon av *N*-oksidet ble den samme reaksjonen utført for **2a**. Basert på TLC- og ¹H-NMR-analyse ga også denne reaksjonen tilsvarende deoksygenering, og det var tydelig at diazoforbindelsen heller reagerte med *N*-oksidet, og reduserte **2a**, istedenfor å O-H-innsette på fenolgruppen. Dermed kan vi konkludere at denne reaksjonen ikke er en mulig derivatiseringsreaksjon hvor begge *N*-oksidene holdes inntakt.

V.II. ACETYLERING MED BROM ACETYLBROMID

I likhet med acetylchlorid ble **1a** reagert med bromacetylbromid (**30**). Bromatomet i β -posisjon til karbonylgruppen sammen med acetylbromidet gjør karbonylkarbonet til en svært god elektrofil. Forsøket ble utført for å kartlegge om styrken på elektrofilen hadde betydning for selektiv alkylering av fenolgruppen og graden av deoksygenering.



Skjema 5.23: Forsøk på syntese av **31** ved å reagere **1a** med bromacetylbromid.

Første syntese ble utført ved romtemperatur med sakte tildrypping av bromacetylbromid (**30**) (1.4 ekv.) til en løsning av **1a** og trietylamin (1.2 ekv.) i tørr THF. I denne syntesen ble det, basert på TLC-analyse, observert stor grad av deoksygenering av **1a** pluss to nye ukjente produkter med overlappende R_f -verdi. Synteseforsøket ble gjentatt ved henholdsvis $-10\text{ }^\circ\text{C}$ og $-78\text{ }^\circ\text{C}$ for å se om reaksjonstemperaturen kunne ha innvirkning på dannede produkter i reaksjonen. Basert på TLC-analyse ble det observert mindre dannelse av det ene produktet ved $-10\text{ }^\circ\text{C}$, og ved $-78\text{ }^\circ\text{C}$ var dette produktet fraværende fra reaksjonsblandingen. $^1\text{H-NMR}$ -analyse av råproduktblandingen ga ingen klarhet i hva dette eller det gjenværende produktet kunne vært. Det var heller ikke mulig å isolere nok stoffmengde for strukturoppklaring.

Tabell 5.10: Testede betingelser for syntese av **31**.

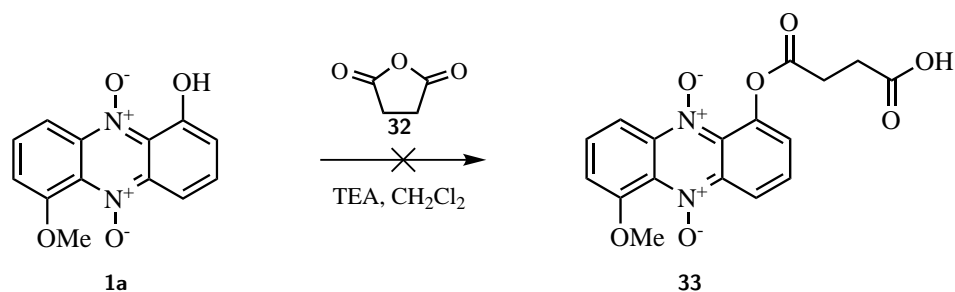
Forsøk	Reagenser	Tid	Temp	Løsningsmiddel	Utbytte
1	TEA (1.4 ekv.), 30 (2 ekv.)	10min	rt	THF	Deoksygenering
2	TEA (1.4 ekv.), 30 (2 ekv.)	1t	$-10\text{ }^\circ\text{C}$	THF	Deoksygenering
3	TEA (1.4 ekv.), 30 (2 ekv.)	4t	$-78\text{ }^\circ\text{C}$	THF	Deoksygenering

Ved TLC- og $^1\text{H-NMR}$ -analyse av det siste ukjente produktet ga flere observasjoner en indikasjon om at det dannede produktet er **31** uten *N*-oksid-funksjonalitet i *orto*-posisjon til metoksygruppen. Sammenligning av TLC- og $^1\text{H-NMR}$ -analyse av acetoksymyxin (**20**), generelt mono-deoksygenererte produkter, **1a**, samt råprodukt $^1\text{H-}$

NMR-spektre, ga en sterk indikasjon på at det ukjente produktet ikke var **31** med dobbelt *N*-oksid-funksjonalitet. Reaksjonen med bromacetyl bromid (**30**) ga dessverre ingen dypere innsikt i betydningen av elektrofilen og deoksygenering av *N*-oksidene.

V.III. KARBOKSYLERING MED RAVSYREANHYDRID

Etter kjente prosedyrer av Yushkova *et al*¹⁴² og Coualova *et al*¹⁴³ ble **1a** reagert med ravsyreanhydrid (**32**) (1.5 ekv.) og trietylamin (1.2 ekv.) i tørr THF for å lage et esterderivat med en terminal karboksylsyregruppe. Basert på TLC- og råprodukt-¹H-NMR-analyse ga denne reaksjonen svært mange produkter med hovedvekt av **1b**. Prosedyren ble forkastet som en effektiv derivatiseringsprosedyre.



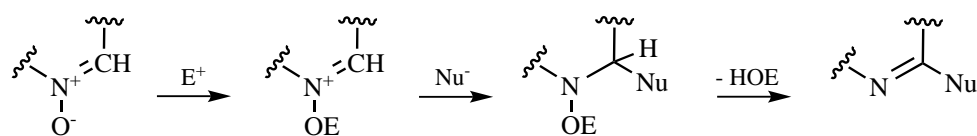
Skjema 5.24: Forsøk på syntese av **33** i reaksjon med ravsyreanhydrid og trietylamin.

VI. DEOKSYGENERING

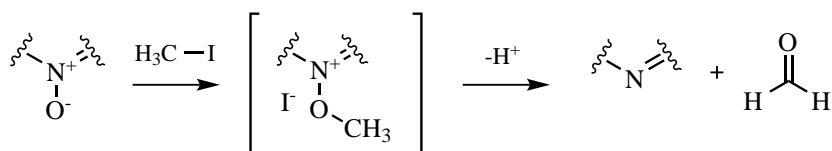
Deoksygenering av *N*-oksider ved syntese av myxin (**1a**) og myxinderivaterderivater har vært en utfordring i denne oppgaven. I denne seksjonen vil det bli presentert mulige mekanismer og grunner til den observerte deoksygeneringen av *N*-oksidene.

VI.I. MULIGE MEKANISMER

Alkylering av *N*-oksider til *N*-alkoksy-salter er kjent i litteraturen ved et nukleofilt angrep av *N*-oksidet på et elektrofilt alkylhalid.¹⁴⁴ *N*-Alkoksy-salter dekomponerer ved tilstedeværelse av base, enten ved nukleofil addisjon til nærliggende alkylgruppe (Figur 5.6a) eller ved en eliminasjonsreaksjon slik at alkylhalidet blir oksidert til en karbonylforbindelse og *N*-oksidet blir deoksygenert (Figur 5.6b).¹⁴⁴⁻¹⁴⁸ Forsøk på å forutsi utfallet ved hjelp av molekylorbitalteori, beskrevet av Albini og Pietra, har møtt begrenset suksess.⁵³



(a) Deoksygenering ved nukleofil addisjon.¹⁰⁸



(b) Deoksygenering av *N*-oksid ved eliminasjon.¹⁴⁴

Figur 5.6: Mulige mekanismer for deoksygenering av *N*-oksider med elektrofiler.

Det elektronfattige ringsystemet til *N,N'*-dioksiderte fenaziner gjør fenoksidet til en forholdsvis svak nukleofil. Da det delvis ladede *N*-oksidet også kan opptre som en svak nukleofil, og dermed alkyleres, begrenses noe av selektiviteten for alkylering kun på fenolgruppen.

I syntesen av **1a** ble det observert og isolert to hovedprodukter, **1b** (18%) og **16b** (12%), der deoksygenering av *N*-oksidet hadde funnet sted. Strukturoppklaring av molekylene med NMR- og HRMS-analyse viste kun deoksygenerte produkter og ingen nukleofil addisjon. Dette indikerer at mekanismen beskrevet i Figur 5.6b er den mest sannsynlige mekanismen for deoksygenering i dette tilfellet.

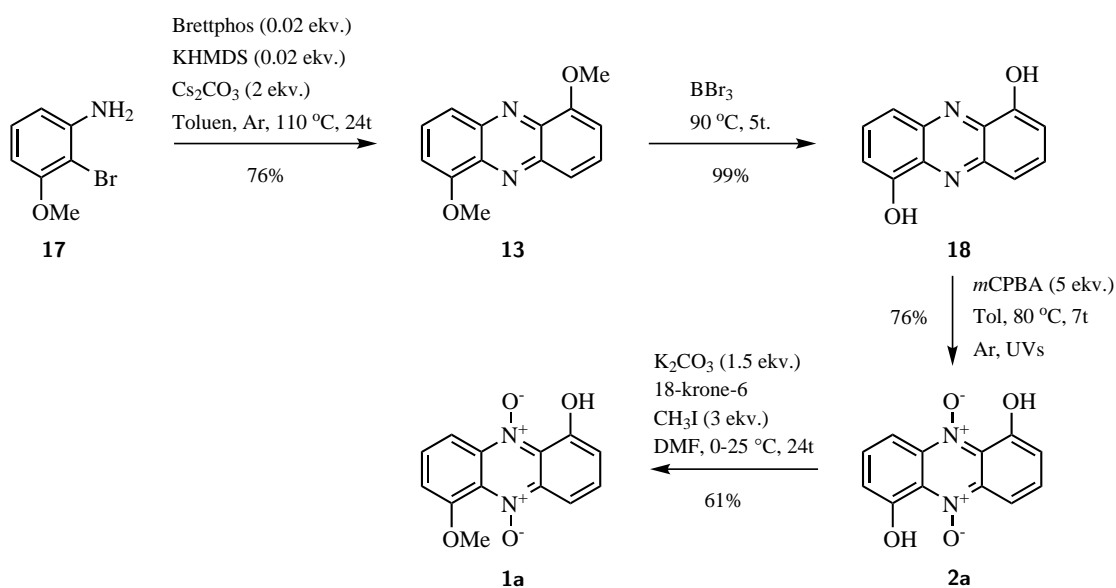
Oksidativ spalting av π -bindingen i *N*-oksidet er kjent for blant annet diazoforbindelser, og andre oksofile heteroatomer som *N*, *S*, og *P*.^{53,121,145,147,149} Dette begrenser alternative derivatiseringsreaksjoner og bruken av reagenser med oksofile heteroatomer. Der det er ønsket redusere *N*-oksider er dette ofte utført i reaksjon med PCl_3 ved å danne POCl_3 og et redusert arylamin.¹⁵⁰

Som tidligere nevnt i dette kapitlet er også fotokjemisk dannelse av isomeriseringsprodukter og acylering av fenazin-*N*-oksider kjent i litteraturen. Dette er derfor også mulige deoksygeneringsmekanismer for fenazin-*N*-oksidene.^{47,116}

VII. ENDELIG SYNTERUTE AV MYXIN

Som en oppsummering av diskusjonsdelen er den endelige synteseruten av myxin (**1a**) illustrert i Skjema 5.25. Det totale utbyttet har blitt forbedret fra 0.44% til 35%.

Tidligere synteser av 1,6-dimetoksyfenazin (**13**) har kun gitt 14% utbytte.³¹ Etableringen av en oppskalerbar palladiumkobling økte utbyttet til 76%. Synteserute 2 ble underveis i syntesearbeidet terminert som en mulig syntesevei da di-*N*-oksidasjonen av 1,6-dimetoksyfenazin **13** ga høyest utbytte på 13% ved en rekke oksidasjonsmidler. I synteserute 3 har oksidasjonen av 1,6-dihydroksyfenazin (**18**) til **2a** blitt forbedret til 76% utbytte, og en monometylering av (**2a**) har blitt utført med 61% utbytte.



Skjema 5.25: Endelig synteserute av myxin (**1a**) via synteserute 2.

Kapittel 6

Biologiske data

BIOLOGISKE RESULTATER

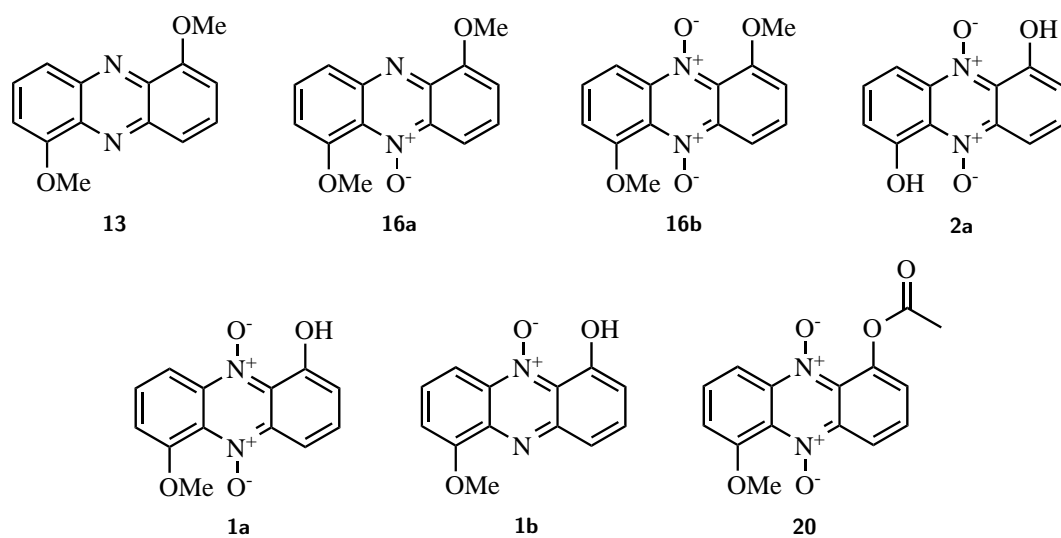
Sammen med iodinin (**2a**), ble myxin (**1a**) og forbindelse **13**, **16a**, **16b**, **1b** og **20** (Figur 6.1), sendt til Haukeland universitetssykehus for biologisk testing. Tabell 6.1 viser en oversikt over EC₅₀-verdier (konsentrasjonen som trengs for å oppnå 50% av maksimum effekt) for de respektive forbindelsene testet (*in vitro*) mot AML-cellelinjen IPC-81 (rotteceller) ved henholdsvis 2% og 20% O₂ metning. Verdiene ble beregnet med bruk av en fire-parameter-kurvetilpasning av en dose-respons-kurve med verdier fra 0.1-10 μM (ligning 6.1).

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{Hillslope}} \quad (6.1)$$

Basert på resultatene fra den biologiske testingen er det observert interessante trender. Blant disse er at tilstedeværelse av begge N-oksidene er nødvendig for den biologiske aktiviteten, og at aktiviteten reduseres ved maskering av fenolgruppene i 1- og 6-posisjon. Dette betyr at myxin (**1a**) ikke er like potent mot AML-celler som **2a**. Det ble besluttet å ikke teste flere myxinderivater, og av den grunn er **20** det eneste testede derivatet. De tomme feltene i tabellen skyldes at det ikke var merkbar forskjell i aktivitet mellom forbindelsen og kontrollprøve.

Tabell 6.1: Biologiske resultater for testing av diverse forbindelser.

Forbindelse	20% O ₂		2% O ₂	
	EC ₅₀ (μM)	R2	EC ₅₀ (μM)	R2
13	-	-	-	-
16a	6.08	0.999	12.6	0.943
16b	9.41	0.981	5.19	0.984
2a	1.38	0.982	0.51	0.998
1a	2.43	0.999	3.20	0.985
1b	-	-	-	-
20	1.78	0.999	1.74	0.999



Figur 6.1: Biologisk testede forbindelser fra Tabell 6.1.

Kapittel 7

Konklusjon

KONKLUSJON

Syntesen av naturproduktet myxin (**1a**) har blitt forbedret fra et totalt utbytte på 0.44% til et totalt utbytte på 35% via synteserute 3. Som et resultat av denne synteseruten har en effektiv syntese av naturproduktet iodinin (**2a**) også blitt etablert med 57% totalt utbytte.

Nye derivater av myxin (**1a**) har blitt syntetisert. Det er etablert en ny og effektiv prosedyre for syntese av esterderivater som unngår deoksygenering av *N*-oksidene (73-82% utbytte). Syntesene ble utført med bruk Steglich-esterifisering. Syntese av karbamat- og eterderivater har blitt syntetisert med henholdsvis 74% og 56% utbytte.

Myxin (**1a**) og iodinin (**2a**), samt derivater av de respektive forbindelsene, har blitt testet ved Haukeland universitetssykehus. Testresultatene viser at aktiviteten er høyest ved tilstedeværelse av begge fenolgruppene på iodinin (**2a**), og at metoksygruppen (6-posisjon) til myxin (**1a**) reduserer aktiviteten.

Den nyetablerte og effektive syntesen av myxin (**1a**) er i avslutningsfasen for patentering og arbeidet vil bli skrevet sammen til publisering når dette er ferdigstilt.

Kapittel 8

Veien videre

VEIEN VIDERE

Til tross for den lave aktiviteten til mot AML-celler kan myxin (**1a**) være et potensielt legemiddel mot andre kreftformer.^{29,31} Etableringen av en effektiv syntese har gjort myxin (**1a**) mer tilgjengelig for utvidet testing mot andre kreftformer og eventuelle andre biologiske mål.

Som en fortsettelse av dette prosjektet ville det være av spesiell interesse å ytterligere undersøke følgende:

Med tanke på derivatiseringsreaksjonene kan det virke som at basen er en viktig parameter i deoksygeneringsprosessen av *N*-oksidene, og en studie av syrekatalyserte derivatiseringsreaksjoner kan gi større innblikk i dette.

En nyttig studie vil være å se på om deoksygeneringen er avhengig av typen alkylerings-/derivatiseringsreagenser, og om det finnes forskjell i selektivitet mellom fenoksidanionet og *N*-oksidet.

Blant andre derivatiseringsreaksjoner er det av stor interesse å halogenere direkte på ringsystemet. Et slikt type derivat kan åpne for syntese av nye type derivater ved enten nukleofil aromatisk substitusjon eller metallkatalyserte krysskoblingsreaksjoner.⁷⁶

Kapittel 9

Eksperimentelt

I. GENERELT

I.I. ANALYSE

NMR-spektra er tatt opp på Bruker Avance-instrumenter ved 400 og 600 MHz for ^1H -NMR, og 100 og 150 MHz for ^{13}C -NMR. Alle spektra er tatt opp ved 25 °C. Kjemiske skiftverdier er kalibrert etter rester av protonert løsningsmiddel, hhv. 7.24/77.0 ppm for CDCl_3 og 2.50/39.5 ppm for DMSO-d_6 . ^{13}C -NMR-spektra er protondekoblet.

Signaler som ikke stammer produktene er i hovedsak løsningsmiddelrester, H_2O i NMR-løsningsmiddel (1.6 ppm CDCl_3 og 3.5 ppm DMSO-d_6), eller rester av vakumfett. Ved tilfeller der todimensjonale NMR-spektra (HSQC, HMBC, COSY, etc.) er brukt ved tilordning av kjemiske skiftverdier er disse lagt ved i appendiks.

Massespektre er tatt opp på et Fission VG Prospec sektorinstrument ved 70 eV (EI) eller et Micromas Q-ToF-2 massespektrometer (ESI) av Osamu Sekiguchi. Ved opptak av HR-MS ble perfluorkerosen (PFK) brukt som referanseløsning.

Smeltepunktverdier ble målt på et Büchi B-545-smeltepunktapparat. Smeltepunktene er ukorrigerte.

Énkrystallrøntgendiffraksjon ble utført og oppklart av Sigurd Øien-Ødegaard og Carl Henrik Gørbitz på et Bruker APEXII CCD diffraktometer.

Optisk rotasjon ble målt ved bruk av et Perkin Elmer Instruments 341 Polarimeter ved 20 °C med en natriumlampe som operer ved en bølgelengde på 589 nm.

TLC-analyse ble utført på aluminiumsplater belagt med 60 F_{254} silikagel fra Merck, sjikttykkelse 1 mm. All opprensing ved bruk av kolonnekromatografi ble enten utført manuelt eller med Combiflash CompanionTM med PeakTrak programvare fra Isco, Inc. Silikagel fra Merck (Merck 60, 40-60 μm , 460-520 m^2/g , pH 6.5-7.5) ble brukt som kolonnemateriale dersom ikke annet er nevnt. Gradienteluering ble benyttet og er rapportert i hvert enkelt tilfelle. Ved omvendt fase kolonnekromatografi ble det benyttet silikagel fra Fluka (90 C_{18} -omvendt fase) og Micon (Matre Silica C_{18} , 60 μm , 60 Å).

I.II. KVALITETER OG MERKER

Reaksjoner under tørre og inerte betingelser ble utført under argonatmosfære. Det ble benyttet argon (4.0) fra AGA. Luft- og fuktighetsfølsomme reagenser ble overført ved standard sprøyteteknikker.¹¹⁰

Kjemikalier: Kjemikalier ble levert fra Sigma-Aldrich og AK-Scientific, og ble benyttet slik de kom fra leverandøren dersom ikke annet er nevnt. *m*CPBA (77% max) og BBr₃ (99.99%) ble benyttet nyinnkjøpt. EDC-HCl ble kjøpt fra Fluorochem Ltd. 2-Br-3-metoksy-anilin (**17**) ble kjøpt fra Ark Pharm, Inc. 1,6-dihydroksyfenazin (**18**) ble kjøpt fra Accel Pharmtech.

Løsningsmidler: Tørr toluene ble kjøpt fra Sigma-Aldrich og oppbevart under argonatmosfære. Benyttede løsningsmidler var av p.a.-kvalitet og ble kjøpt fra enten VWR eller Sigma-Aldrich. I reaksjoner der THF, CH₂Cl₂, Et₂O og DMF er benyttet, er løsningsmidlene tørket ved å benytte et MB SPS-800 løsningsmiddelrensesystem fra MBraun. NMR-løsningsmidler ble levert fra Sigma-Aldrich og Cambridge Isotope Laboratories og ble benyttet slik de kom fra leverandøren. Løsningsmidler for kromatografi og omkrystallisering ble benyttet slik de kom fra leverandøren. Heksan ble destillert før bruk.

II. ANALYSEPARAMETRE

NMR-spektra av fenaziner: Gode NMR-spektra av substituerte fenaziner ble oppnådd ved bruk av høysensitive spektrometre (600 MHz). Tilfredstillende ¹³C-NMR-spektra for de generelle fenazinene ble oppnådd med minimum 1500 opptak og 2.5 sekunders relaksasjonstid. For iodinin (**2a**) ble ¹³C-NMR-spektra oppnådd med 70°-puls, minimum 10240 opptak og en relaksasjonstid på 2.5 sekunder.

MS: For noen av forbindelsene ble det ikke molekylionet observert ved bruk av EI som ionisasjonsteknikk. I disse tilfellene er ESI benyttet som ionisasjonsteknikk.

III. GENERELLE PROSEDYRER

III.I. PROSEDYRE A: STEGLICH-ESTERIFISERING

Betingelser: Myxin **1a** (15 mg, 1 ekv.), EDC-HCl (*N*-(3-dimetylamino-propyl)-*N'*-etylkarbodiimide hydroklorid) (4 ekv.) og karboksylsyre (4 ekv.) ble løst i CH₂Cl₂:THF/7:3 (1.5 mL). DMAP (4-dimetylamino-pyridin) (0.25 ekv.) ble tilsatt etter 5 minutters røring. Reaksjonen ble fulgt ved hjelp av TLC-analyse og avsluttet etter ca. 3 timer.

Opparbeiding: Etter avsluttet syntese ble råproduktblandingen filtrert gjennom et lag av Celite og oppkonsentrert ved inndampning av løsningsmiddel under redusert trykk. Da syntetiserte derivater av myxin (**1a**) i denne oppgaven har vært mer polare enn utgangsstoffet, har opprensning av ønskede produkter vært utført ved bruk av normal fase kolonnekromatografi. Benyttet eluent var CH₂Cl₂ med en gradient av EtOAc (0-100%). Uomsatt utgangsstoff ble isolert og gjenvunnet.

III.II. PROSEDYRE B

Betingelser: Under inert atmosfære og ved 0 °C ble myxin **1a** (10-15 mg, 1 ekv.), K₂CO₃ (1.5 ekv.), 18-krone-6 (1.5 ekv.) løst i DMF (2 mL). Alkyleringsmiddel (4 ekv.) ble tilsatt etter 20 minutters røring. Reaksjonen ble fulgt ved hjelp av TLC-analyse og avsluttet når det ikke lenger var noen forandring på TLC-platen.

Opparbeiding: Samme opparbeidingsmetode som i prosedyre A.

III.III. PROSEDYRE C: ÉNKRYSTALLRØNTGENDIFFRAKSJON

Enkrystaller til opptak av krystalldata ble dyrket ved passiv diffusjon mellom enten CHCl₃ eller CH₂Cl₂ som indre løsningsmiddel og heksan som ytre løsningsmiddel. I et dramsglass ble ren forbindelse (ca. 2 mg) løst i CHCl₃ eller CH₂Cl₂ (1 mL). Dramsglasset ble plassert i et større beger (med lokk) inneholdende heksan (ca. 4 mL). Omkrystalliseringen tok vanligvis 2-3 dager. I krystallstrukturene er karbonatomene grå, hydrogenatomene hvite, nitrogenatomene blå, og oksygenatomene røde. De termiske ellipsoidene er plottet med 50% grad av sannsynlighet.

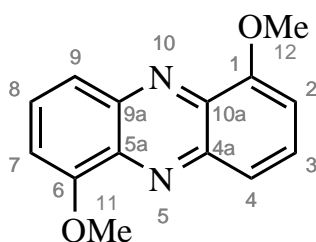
IV. SYNTESER

OVERSIKT

Syntese av:		
(13)	1,6-dimetoksyfenazin	82
(18)	1,6-dihydroksyfenazin	84
(2a)	1,6-dihydroksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	86
(1a)	1-hydroksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	88
(1b)	1-hydroksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 10-oksid	90
(16a)	1,6-dimetoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	92
(16b)	1,6-dimetoksyfenazin- <i>N</i> 5-oksid	94
(20)	1-acetoksy-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	96
(22)	1-(((<i>tert</i> -butoksykarbonyl)- <i>L</i> -alanyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	98
(24)	1-metoksy-6-((morfolin-4-karbonyl)oksy)-fenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	100
(26)	1-(2-etoksy-2-oksoetoksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	102
Forsøk på syntese av:		
(22b)	(<i>S</i>)-1-((2-ammoniopropanoyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid klorid	104
(28)	1-metoksy-6-(1-fenyletoksy-2-metoksy-2-okso)fenazine- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	105
(29)	1-(1-fenyletoksy-2-metoksy-2-okso)-6-hydroksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	106
(31)	1-(2-bromoacetoksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	107
(33)	1-((3-karboksypropanoyl)oksy)-6-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid	108
(34)	6,6'-(malonylbis(oksy))bis(1-metoksyfenazin- <i>N</i> 5, <i>N</i> 10-dioksid)	109

De systematiske navnene til forbindelsene er gitt etter standard nummerering av fenaziner, hvor de heterosykliske ringene er nummerert fra 1-10. Nummereringen av atomene som er gitt i kommende seksjon er gitt for å henvise til kjemiske skiftverdier og må ikke, til tross for lignende nummerering, forveksles med atomnummerene gitt de systematiske navnene.

1,6-DIMETOKSYFENAZIN (13)



13

Til en tørr rundkolbe fylt med 2-Br-3-metoksyanilin (17) (492 mg, 2.44 mmol, 1 ekv.), BrettPhos Pd G1 prekatalysator (40 mg, 0.050 mmol, 0.02 ekv.), Cs₂CO₃ (1.67 g, 4.87 mmol, 2 ekv.), KHMDS (10 mg, 0.050 mmol) og argongass ble det tilsatt degasset toluen (8 mL). Reaksjonsblandingen ble evakuert og fylt med argon tre ganger før reaksjonen ble varmet til 110 °C i 24 timer med et overtrykk av argongass. Blandingen ble så kjølt ned til romtemperatur, fortynnet med CHCl₃ og filtrert gjennom et lag av Celite. Dimetoksyfenazin ble isolert som et guldfarget krystallisk pulver (222 mg, 76% utbytte) ved bruk av kolonnekromatografi, 0-15% (gradient) EtOAc i CH₂Cl₂.

R_f: 0.51 (100% EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ 7.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H4/H9), 7.70 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3/H8), 7.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H2/H7), 4.14 (s, 6H, H11/H12).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

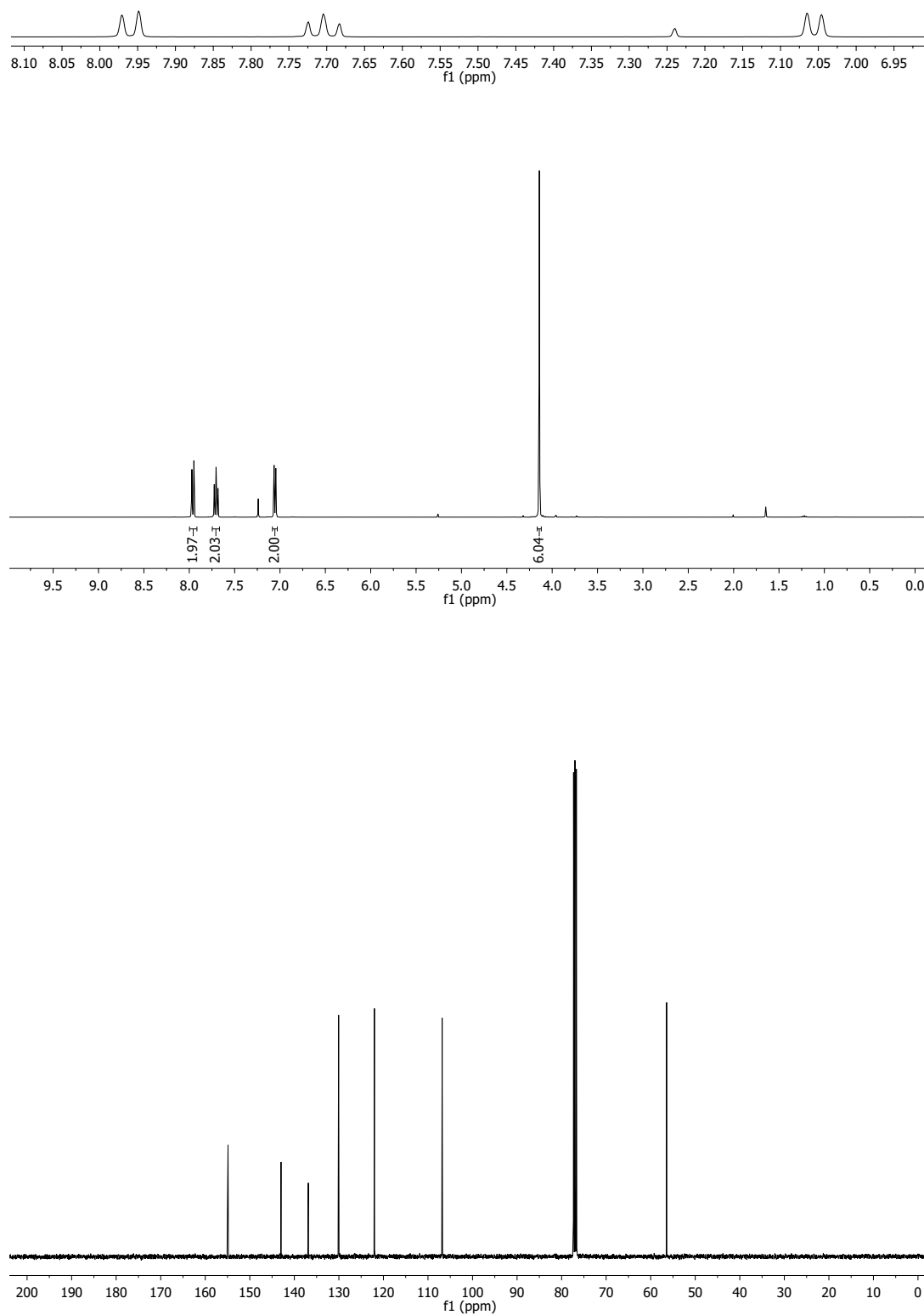
δ 154.9 (C1/C6), 143.0 (C4a/C9a), 136.9 (C5a/C10a), 130.1 (C3/C8), 122.0 (C4/C9), 106.8 (C2/C7), 56.4 (C11/C12).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 240 (M⁺, 100%), 239 (44), 211 (57), 210 (31).

HR-MS (EI): 240.0894. Beregnet for C₁₄H₁₂N₂O₂: 240.0899 (1.8 ppm).

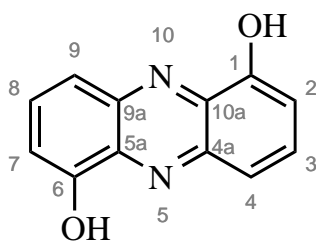
Smeltepunkt: 244-246 °C (fra CH₂Cl₂). Litteraturverdi: 246-247 °C.⁶⁵

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.⁶⁵



Spekter 9.1: ¹H- og ¹³C-NMR av 13 (400/100 MHz, CDCl₃).

1,6-DIHYDROKSYFENAZIN (18)



18

Under en kontinuerlig strøm av argongass ble BBr_3 (en ampulle med 5.0 g, 20 mmol, 21 ekv.) tilsatt en rundkolbe inneholdende 1,6-dimetoksifenazin (13) (230 mg, 0.960 mmol, 1 ekv.). Reaksjonsblandingen ble varmet til reflux (92 °C) og rørt i 5 timer, for så å bli avsluttet ved nedkjøling av reaksjonsblandingen til -20 °C og forsiktig tilsetning av isvann (40 mL). Utfelling av gult produkt ble oppnådd ved å justere pH i vannfasen til 7 ved tilsetning av NaOH (1.0 M og 0.1 M). Det utfelte produktet ble isolert ved vakumfiltrering etterfulgt av vasking med vann og kald aceton (ca. 0 °C). Produktet ble tørket under redusert trykk over lengre tid og ga 1,6-dihydroksifenazin (18) (202 mg, 99% utbytte) som et gulffarvet krystallisk produkt.

R_f : 0.42 (100% EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6):

δ 10.49 (s, 2H, OH1/OH6), 7.79–7.70 (m, 4H, H3/H8/H4/H9), 7.19 (dd, $J = 7.2, 1.4$ Hz, 2H, H2/H7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6):

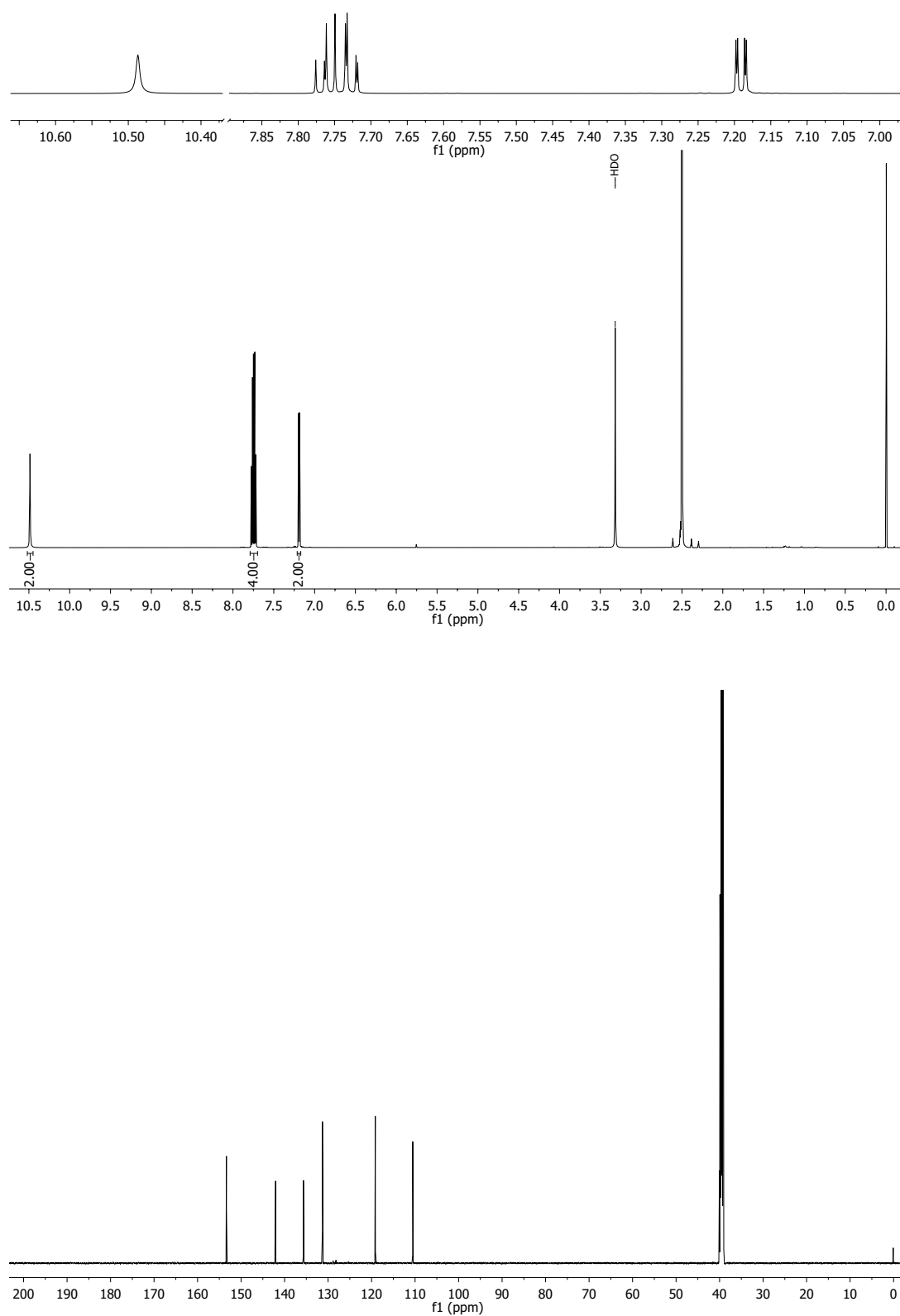
δ 153.4 (C1/C6), 142.1 (C4a/C9a), 135.7 (C5a/C10a), 131.3 (C3/C8), 119.1 (C4/C9), 110.5 (C2/C7).

MS (EI) m/z (relativ intensitet): 212 (M^+ , 100%), 184 (33), 155 (8).

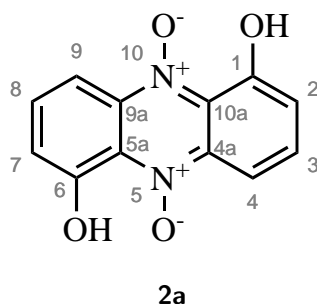
HR-MS (EI): 212.0588. Beregnet for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$: 212.0586 (-0.9 ppm).

Smeltepunkt: 273–276 °C (fra CH_2Cl_2). Litteraturverdi: 278 °C.¹⁰⁰

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.¹⁰⁰



Spekter 9.2: ^1H - og ^{13}C -NMR av 18 (600/150 MHz, DMSO-d_6).

1,6-DIHYDROKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**2**) (IODININ)

En suspensjon av 1,6-dihydroksifenazin (**18**) (1.09 g, 5.14 mmol, 1 ekv.) i tørr og degasset toluen (80 mL) ble plassert i en rundkolbe påmontert en kjøler. Til løsningen ble *m*CPBA (1.77 g, 10.3 mmol, 2 ekv.) tilsatt, og skjermet for lys ble reaksjonsblandingen varmet til 80 °C med et overtrykk av argongass. *m*CPBA (3 × (887 mg, 5.14 mmol, 1 ekv.)) ble tilsatt til reaksjonsblandingen hver andre time. Etter 7 timer ble reaksjonsblandingen konsentrert under redusert trykk og den samlede massen ble overført til en glassintertrakt. Rester av *m*CPBA og biprodukter ble vasket ut med kald metanol og dietyler. Dette ga **2a** (0.97 g, 77% utbytte) som et dypt-lillafarget og kobberaktig krystallisk produkt.

R_f: 0.78 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 14.18 (s, 2H, OH1/OH6), 7.93 (dd, *J* = 9.0, 0.9 Hz, 2H, H4/H9), 7.81 (dd, *J* = 9.0, 7.9 Hz, 2H, H3/H8), 7.18 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 2H, H2/H7).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆):

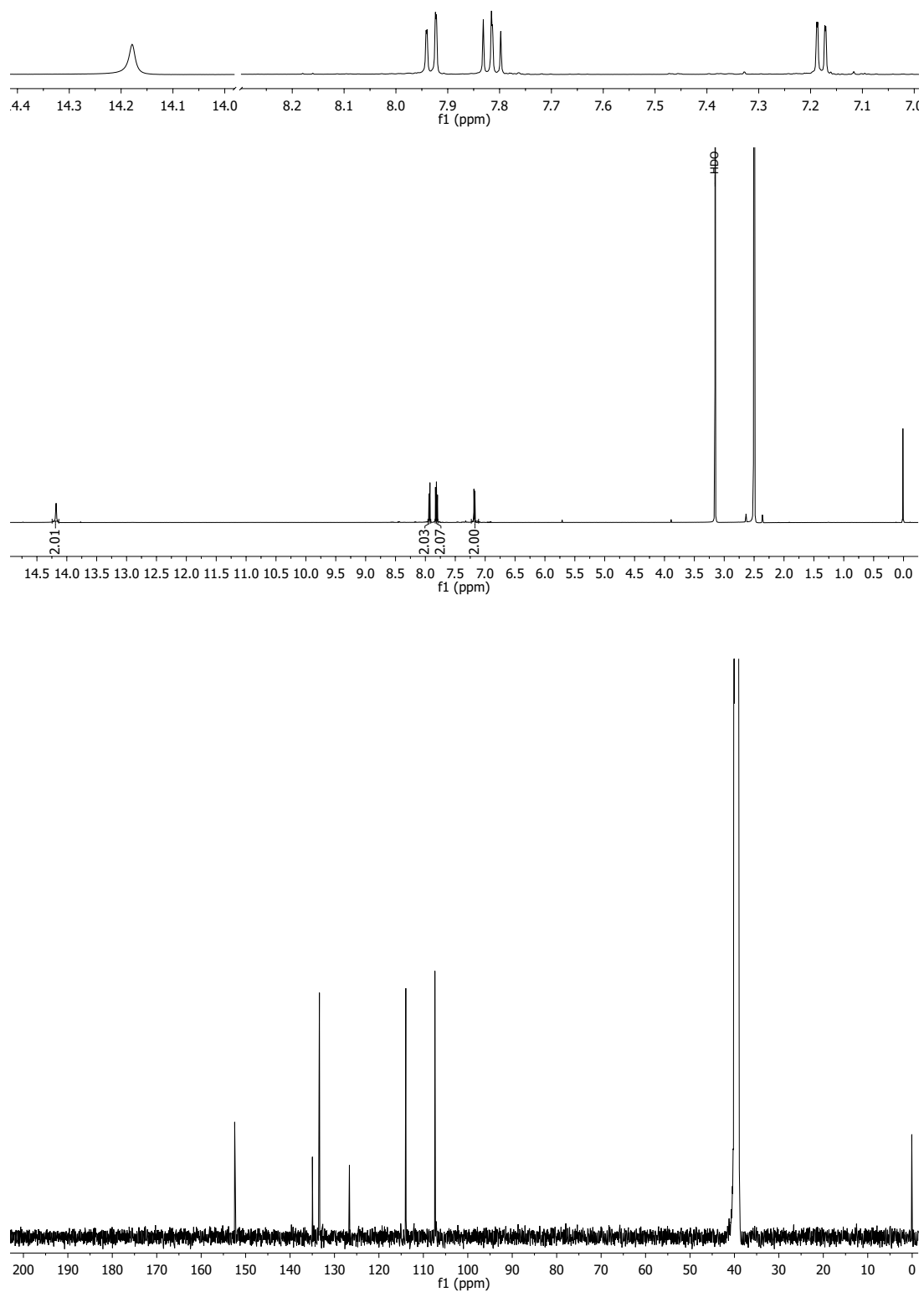
δ 152.5 (C1/C6), 135.0 (C4a/C9a), 133.4 (C3/C8), 126.6 (C5a/C10a), 114.0 (C2/C7), 107.4 (C4/C9).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 244 (*M*⁺, 100%), 228 (52.4), 227 (84.4), 212 (11.8), 199 (30.2), 183 (19.2), 155 (25.9).

HR-MS (EI): 244.0487. Beregnet for C₁₂H₈N₂O₄: 244.0484 (-1.2 ppm).

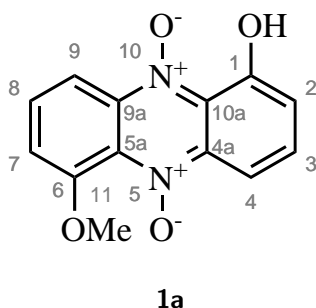
Smeltepunkt: 237-240 °C (fra toluen). Litteraturverdi: 236 °C.^{99,151}

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.^{99,151}



Spekter 9.3: ¹H- og ¹³C-NMR av Iodinin 2a (600/150 MHz, DMSO-d₆).

1-HYDROKSY-6-METOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (1) (MYXIN)



Syntesen ble utført etter en variant av prosedyre B (side 80).

Under inert atmosfære og ved 0 °C (isbad) ble iodinin (**2a**) (230 mg, 0.942 mmol, 1.0 ekv.), K₂CO₃ (195 mg, 1.41 mmol, 1.5 ekv.) og 18-krone-6 (373 mg, 1.41 mmol, 1.5 ekv.) løst i DMF (8 mL). Den smaragdgrønne reaksjonsblandingen ble tatt av isbadet og etter 20 minutter igjen kjølt ned til 0 °C før dråpevis tilsetning av CH₃I (176 µL, 2.83 mmol, 3.0 ekv.). Etter 24 timer ble reaksjonsblandingen filtrert over Celite og konsentrert under redusert trykk. Forbindelsene ble separert ved bruk av kolonnekromatografi (gradientluering 0-50% EtOAc i CH₂Cl₂) og ga myxin (**1a**) (148 mg, 61% utbytte) som hovedprodukt og forbindelse **1b** (41 mg, 18% utbytte), **16a** (13 mg, 5% utbytte) og **16b** (28 mg, 12% utbytte) som hovedbiprodukter. **16a** ble eluert ut med 100% EtOAc.

R_f: 0.58 (100% EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ 14.56 (s, 1H, OH1), 8.20 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H9), 8.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H4), 7.63 (m, *J* = 8.5 Hz, 2H, H3/H8), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H2), 7.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H7), 4.07 (s, 3H, H11).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

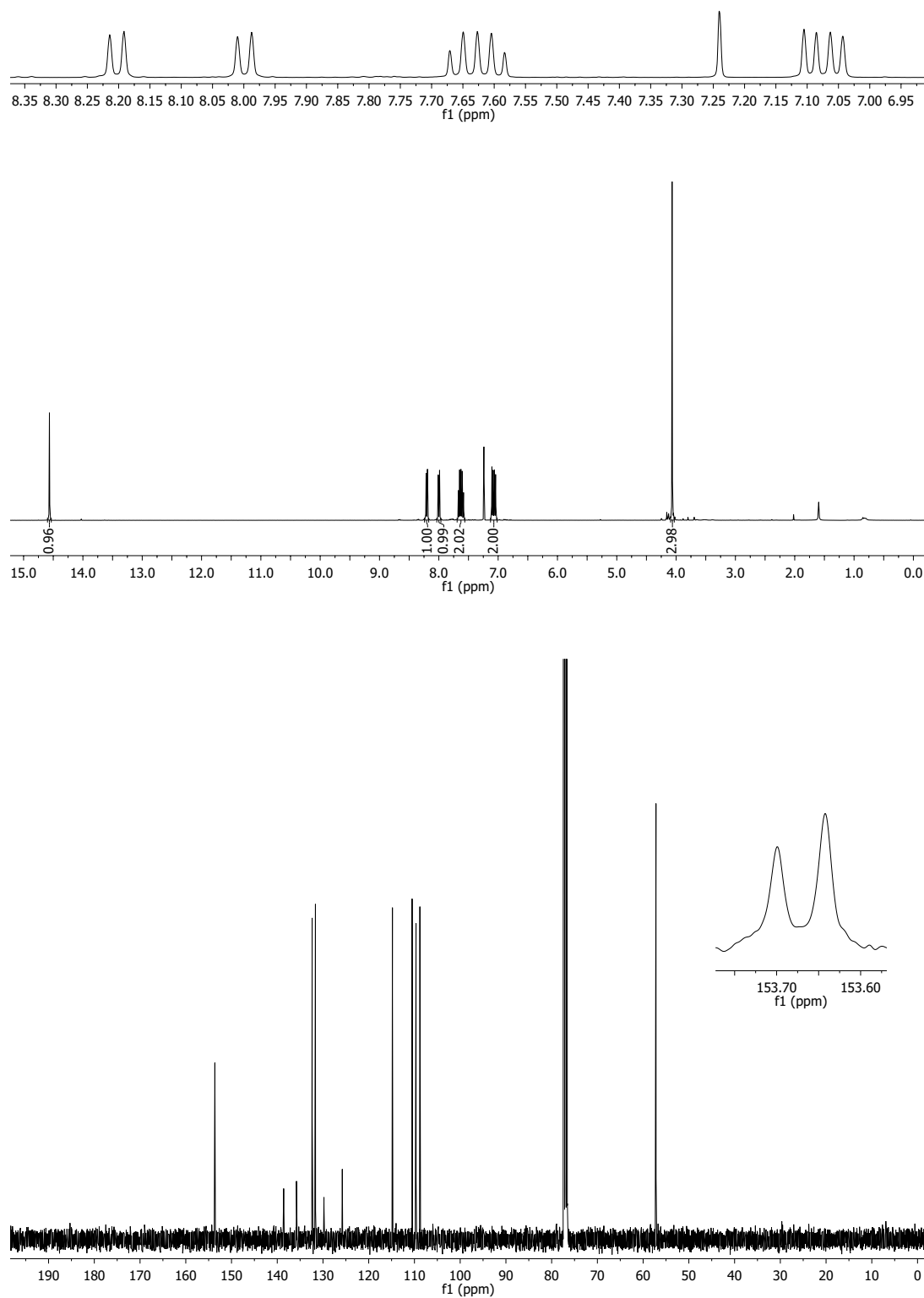
δ 153.7 (C6), 153.6 (C1), 138.6 (C4a), 135.8 (C9a), 132.4 (C8), 131.7 (C3), 129.8 (C5a), 125.8 (C10a), 114.8 (C2), 110.5 (C9), 109.7 (C7), 108.8 (C4), 57.2 (C11).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 258 (M⁺, 35.2%), 242 (96.9), 228 (5.7), 226 (62.7), 225 (100), 197 (64.3), 196 (44.3), 183 (16.3).

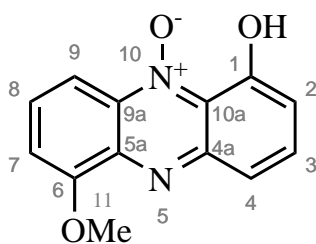
HR-MS (EI): 258.0643. Beregnet for C₁₃H₁₀N₂O₄: 258.0641 (-0.8 ppm).

Smeltepunkt: 133-135 °C (fra CH₂Cl₂). Litteraturverdi: 130-135 °C.⁸⁰

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.⁸⁰



Spekter 9.4: ¹H- og ¹³C-NMR av Myxin (1a) (400/100 MHz, CDCl₃).

1-HYDROKSY-6-METOKSYFENAZIN-N10-OKSID (**1b**)**1b**

Forbindelse **1b** er et biprodukt i syntesen av forbindelse **1a**. Se prosedyre side 88.

R_f: 0.65 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ 13.64 (s, 1H, OH1), 8.15 (dd, *J* = 9.0, 1.1 Hz, 1H, H9), 7.81 (dd, *J* = 8.8, 1.2 Hz, 1H, H4), 7.71–7.65 (m, 2H, H3/H8), 7.08 (dd, *J* = 7.8, 3.2, 1.1 Hz, 2H, H7/H2), 4.15 (s, 3H, H11).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

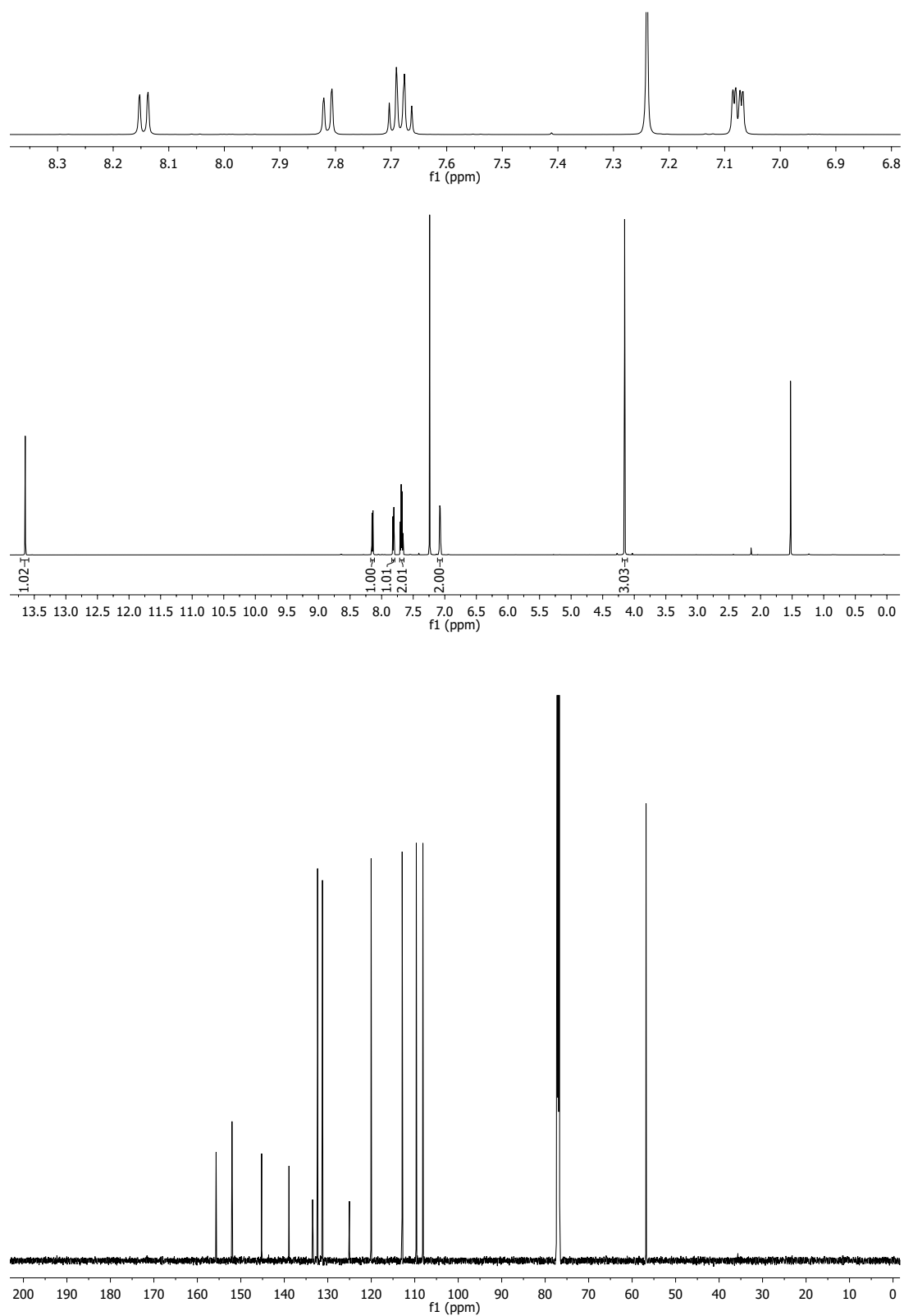
δ 155.7 (C6), 152.0 (C1), 145.2 (C4a), 138.9 (C5a), 133.5 (C9a), 132.4 (C3), 131.2 (C8), 125.0 (C10a), 120.0 (C4), 112.9 (C2), 109.6 (C9), 108.1 (C7), 56.8 (C11).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 242 (M⁺, 100%), 241 (15.9), 226 (25.1), 225 (71.4), 197 (31.5).

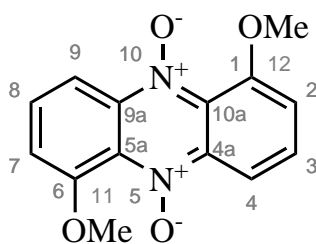
HR-MS (EI): 242.0692. Beregnet for C₁₃H₁₀N₂O₃: 242.0691 (-0.1 ppm).

Smeltepunkt: 224–227 °C (fra EtOAc). Litteraturverdi: 227–229 °C.⁹⁷

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.⁹⁷



Spekter 9.5: ¹H- og ¹³C-NMR av **1b** (600/150 MHz, CDCl₃).

1,6-DIMETOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**16a**)**16a**

Forbindelse **16a** er et biprodukt i syntesen av forbindelse **1a**. Se prosedyre side 88.

R_f: 0.08 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ 8.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H4/H9), 7.60 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, H3/H8), 7.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H2/H7), 4.07 (s, 6H, H11/H12).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

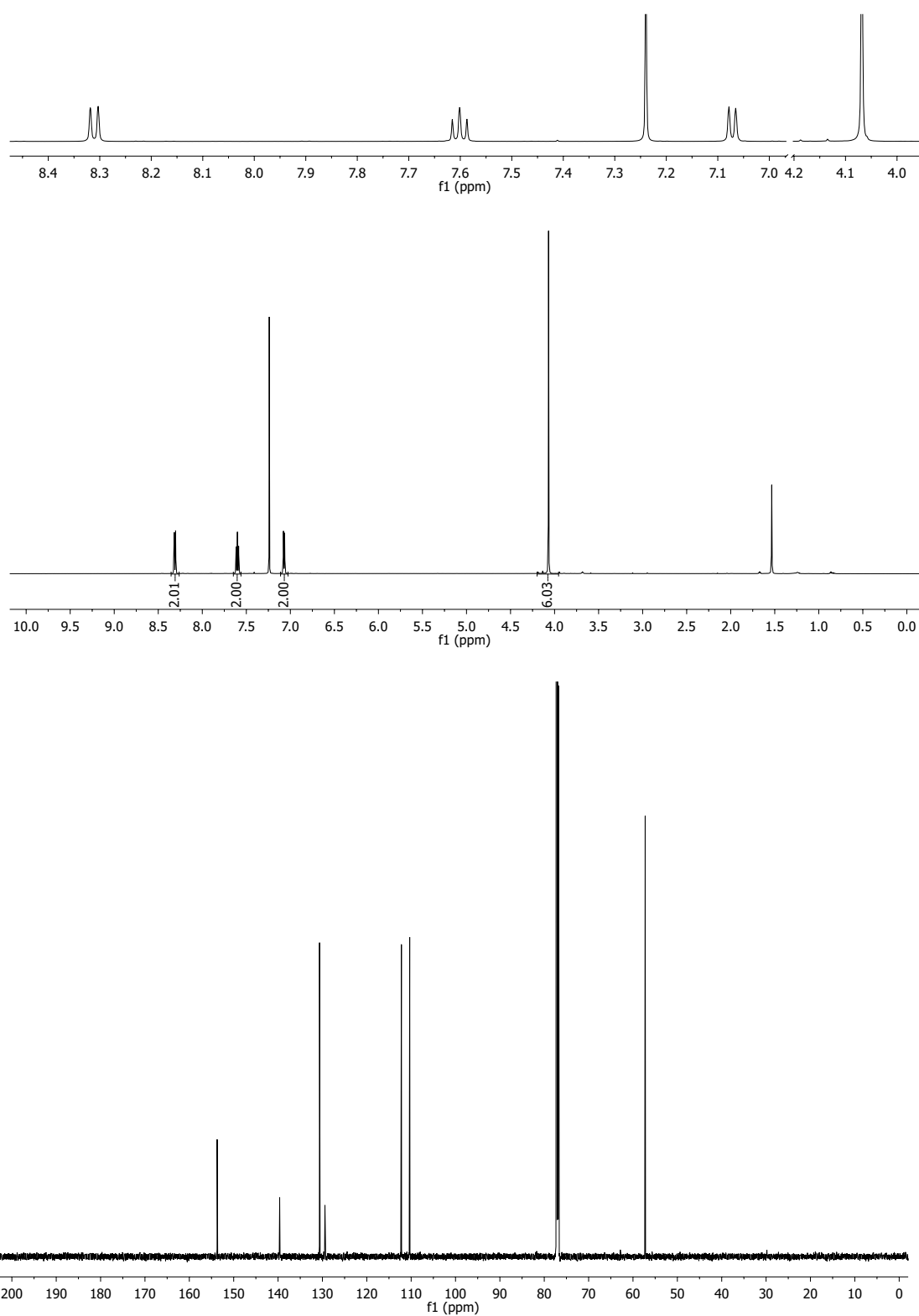
δ 153.7 (C1/C6), 139.6 (C4a/C9a), 130.7 (C3/C8), 129.4 (C5a/C10a), 112.2 (C2/C7), 110.3 (C4/C9), 57.3 (C11/C12).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 272 (M⁺, 5.0%), 256 (62.1), 241 (14.2), 240 (88.2), 226 (11.9), 225 (29.4), 210 (100), 197 (33.2).

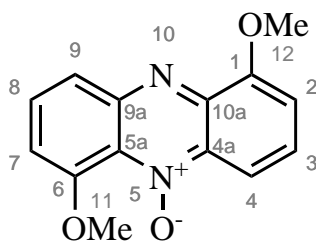
HR-MS (EI): 272.0795. Beregnet for C₁₄H₁₂N₂O₄: 272.0797 (0.9 ppm).

Smeltepunkt: 178-180 °C (fra CHCl₃). Litteraturverdi: 190-192 °C.⁸⁰

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.⁸⁰



Spekter 9.6: ^1H - og ^{13}C -NMR av **16a** (600/150 MHz, CDCl_3).

1,6-DIMETOKSYFENAZIN-*N*5-OKSID (**16b**)**16b**

Forbindelse **16b** er et biprodukt i syntesen av forbindelse **1a**. Se prosedyre side 88.

R_f : 0.18 (100% EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ 8.22 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H4), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H9), 7.62 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H8), 7.58 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H3), 7.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H2), 6.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H7), 4.13 (s, 3H, H12), 4.05 (s, 3H, H11).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

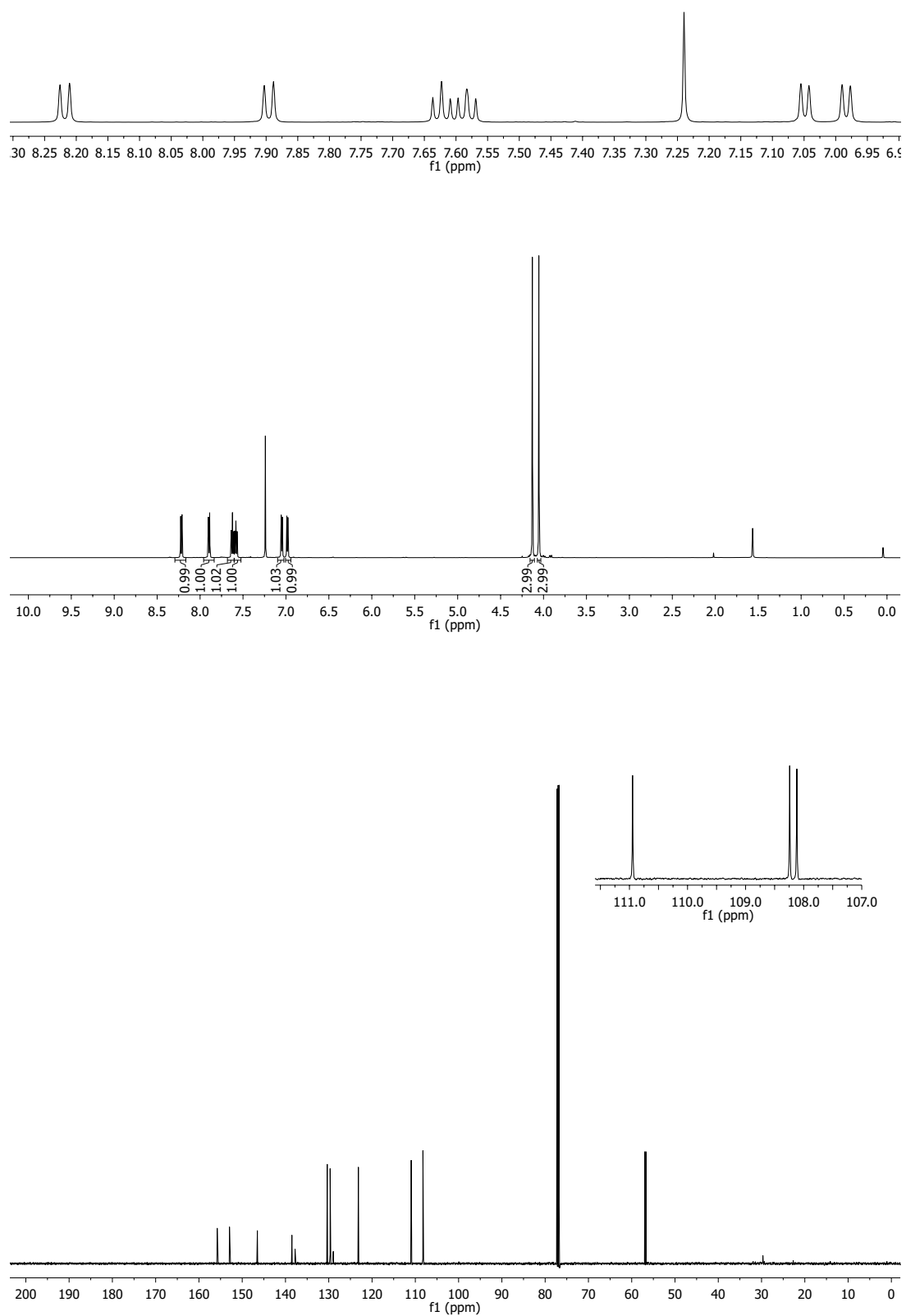
δ 155.8 (C1), 152.9 (C6), 146.5 (C9a), 138.5 (C10a), 137.8 (C4a), 130.4 (C8), 129.7 (C3), 129.0 (C5a), 123.2 (C9), 111.0 (C4), 108.2 (C7), 108.1 (C2), 57.0 (C11), 56.7 (C12).

MS (EI) m/z (relativ intensitet): 256 (M^+ , 91.1%), 240 (68.5), 226 (8.6), 225 (27.7), 210 (100), 209 (17.7), 197 (33.7).

HR-MS (EI): 256.0851. Beregnet for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: 256.0848 (-1.2 ppm).

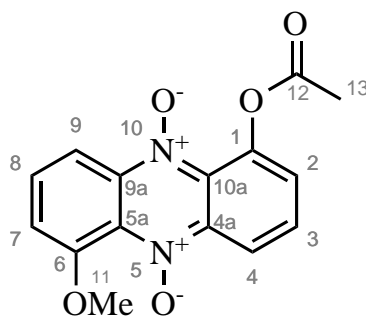
Smeltepunkt: 181-183 °C (fra CH_3Cl). Litteraturverdi: 192 °C.⁸⁰

Forbindelsen er rapportert i litteraturen.⁸⁰



Spekter 9.7: ^1H - og ^{13}C -NMR av **16b** (600/150 MHz, CDCl_3).

1-ACETOKSY-6-METOKSYFENAZIN-N5,N10-DIOKSID (20)



20

Syntesen ble utført etter prosedyre A.

Utgangsstoff: Myxin (**1a**) (20 mg, 0.077 mmol, 1 ekv.), eddiksyre (5.0 μ L, 0.31 mmol, 4 ekv.).

Forbindelse **20** (17 mg, 73% utbytte) ble isolert som et oransjefarget krystallinsk pulver.

R_f: 0.17 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ 8.60 (dd, $J = 9.1, 1.2$ Hz, 1H, H4), 8.20 (dd, $J = 9.0, 0.9$ Hz, 1H, H9), 7.65 (dd, $J = 9.1, 7.5$ Hz, 1H, H3), 7.60 (dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, 1H, H8), 7.32 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H, H2), 7.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H7), 4.05 (s, 3H, H11), 2.48 (s, 3H, H13).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

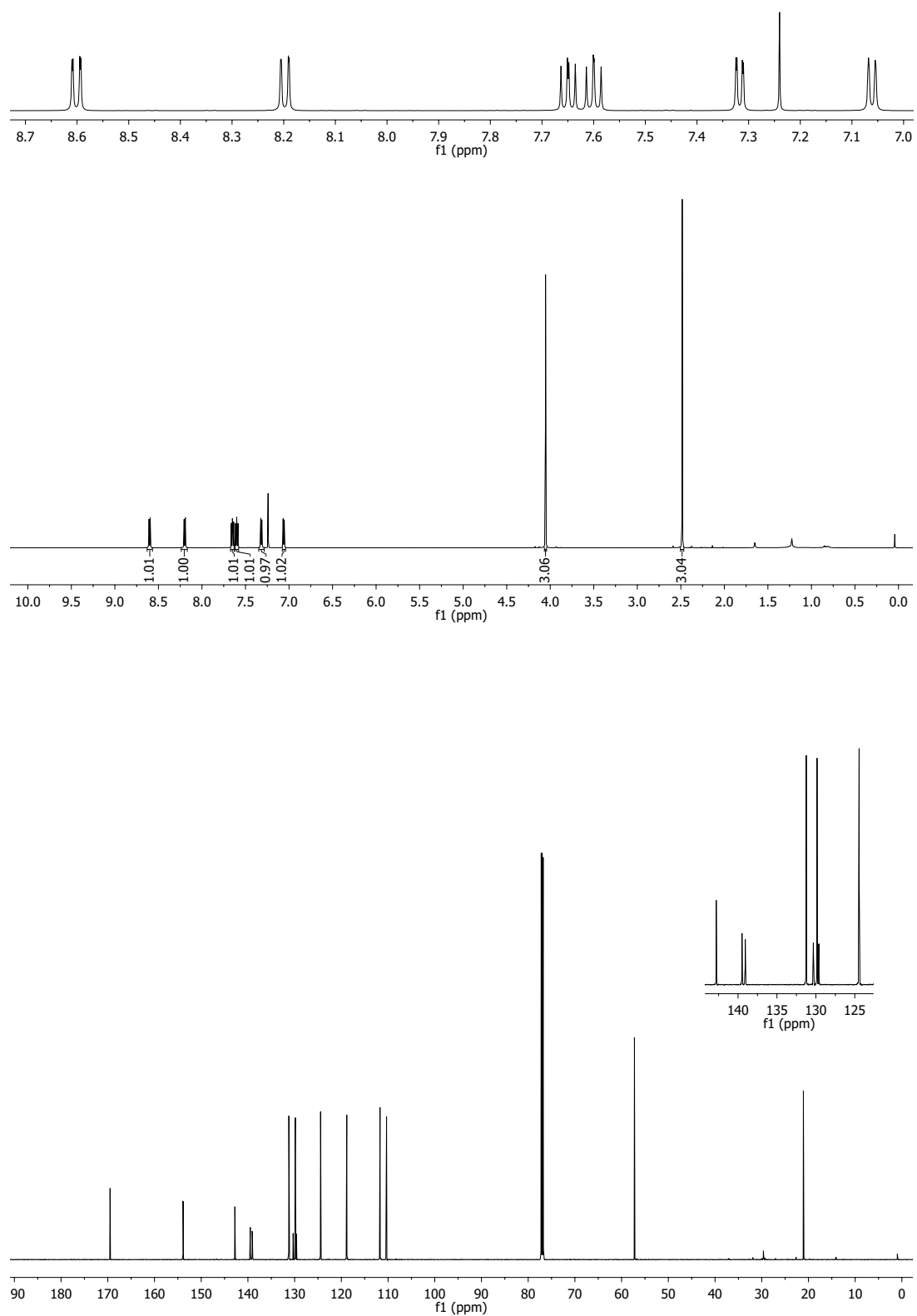
δ 169.5 (C12), 153.9 (C6), 142.8 (C1), 139.5 (C9a), 139.1 (C4a), 131.2 (C8), 130.3 (C10a), 129.9 (C3), 129.6 (C5a), 124.4 (C2), 118.8 (C4), 111.7 (C9), 110.3 (C7), 57.3 (C11), 21.1 (C13).

MS (EI) m/z (relativ intensitet): 300 (M^+ , 3.8%), 284 (19.5), 242 (100), 241 (22.3), 226 (46.9), 225 (95.3), 197 (42.0).

HR-MS (EI): 300.0751. Beregnet for C₁₅H₁₂N₂O₅: 300.0746 (-1.5 ppm).

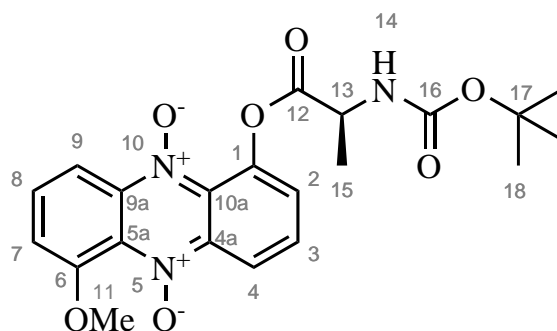
Smeltepunkt: 160-161 °C (fra CH₃Cl). Litteraturverdi 162 °C.¹⁰¹

Forbindelsen er rapportert, men spektroskopiske data for forbindelsen er ikke kjent i litteraturen.¹⁰¹



Spekter 9.8: ¹H- og ¹³C-NMR av 20 (600/150 MHz, CDCl₃).

1-(((*tert*-BUTOKSYKARBONYL)-L-ALANYL)OKSY)
-6-METOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**22a**)



22a

Syntesen ble utført etter prosedyre A.

Utgangsstoff: Myxin (**1a**) (12 mg, 0.046 mmol, 1 ekv.), Boc-Ala(L)-OH (36 mg, 0.19 mmol, 4 ekv.).
Forbindelse **22a** (17 mg, 82% utbytte) ble isolert som et rødfarget krystallinsk pulver.

R_f: 0.15 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ 8.62 (dd, *J* = 9.1 Hz, 1H, H4), 8.19 (dd, *J* = 9.1 Hz, 1H, H9), 7.66 (t, *J* = 9.1, 7.6 Hz, 1H, H3), 7.61 (t, *J* = 8.0, 9.1 Hz, 1H, H8), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H2), 7.07 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1H, H7), 5.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.9H, *N*-H14, Rotamer 1), 5.08 (bred singlet, 0.1H, *N*-H14, Rotamer 2), 4.75 (m, *J* = 8.0 Hz, 0.9H, H13, Rotamer 1), 4.64 (bred singlet, 0.1H, H13, Rotamer 2), 4.06 (s, 3H, H11), 1.72 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, H15), 1.46 (s, 9H, H18).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ 171.4 (C12), 155.4 (C16), 153.9 (C6), 142.7 (C1), 139.5 (C9a), 139.0 (C4a), 131.3 (C8), 130.1 (C10a), 129.9 (C3), 129.6 (C5a), 124.6 (C2), 119.1 (C4), 111.8 (C9), 110.3 (C7), 79.9 (C17), 57.3 (C11), 49.6 (C13), 28.4 (C18), 18.0 (C14).

MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 242 (60.2), 226 (100), 225 (61.4), 197 (65.4).

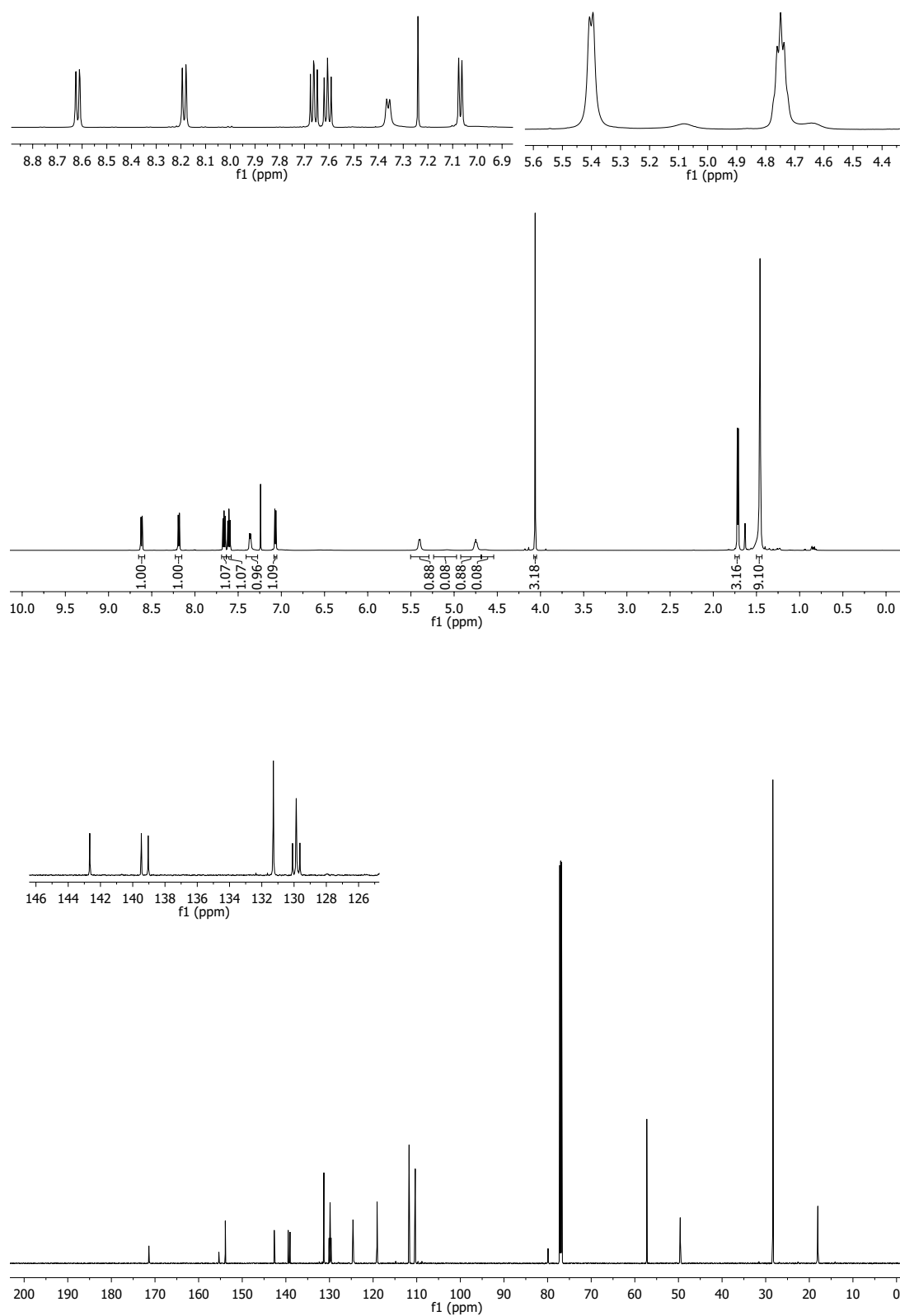
MS (ES) *m/z* (relativ intensitet): 452.1 [M+Na]⁺.

HR-MS (ES): 452.1420. Beregnet for C₂₁H₂₃N₃O₇Na: 452.1433 (-3.03 ppm).

Smeltepunkt: 121-123 °C (fra CH₃Cl).

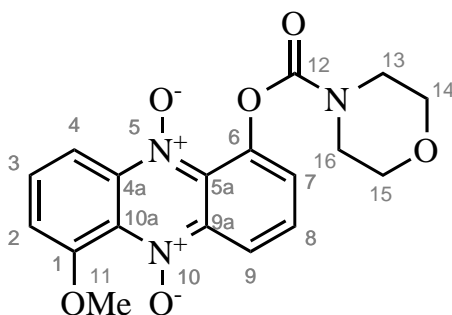
Optisk rotasjon: [α]_D²⁰: -62° (c = 0.1 i CH₂Cl₂).

Forbindelsen er ikke rapportert i litteraturen.



Spekter 9.9: ¹H- og ¹³C-NMR av 22a (600/150 MHz, CDCl₃).

1-METOKSY-6-((MORFOLIN-4-KARBONYL)OKSY)
-FENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**24**)

**24**

Under inert atmosfære ble myxin (**1a**) (10 mg, 0.039 mmol, 1.0 ekv.) og *t*-BuOK (5.5 mg, 0.049 mmol, 1.3 ekv.) løst i tørr THF (2 mL) ved romtemperatur. Til den smaragdgrønne løsningen, ble det etter 20 minutter tilsatt 4-morfolin-karbonylchlorid (**23**) (23 μ L, 0.20 mmol, 5.0 ekv.). Opparbeiding etter prosedyre A (side 80) ga **24** (11 mg, 74% utbytte) som et oransjefarget krystallisk pulver.

R_f: 0.04 (100% EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

δ 8.60 (dd, *J* = 9.1 Hz, 1H, H9), 8.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H4), 7.65 (dd, *J* = 9.1 Hz, 1H, H8), 7.61 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H3), 7.36 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H7), 7.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H2), 4.07 (s, 3H, H11), 3.91 (s, 2H), 3.84 (s, 4H), 3.63 (s, 2H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):

δ 153.9 (C1), 153.6 (C12), 143.6 (C6), 139.5 (C4a), 139.1 (C9a), 131.0 (C3), 130.8 (C5a), 129.9 (C8), 129.5 (C10a), 124.8 (C7), 118.5 (C9), 112.0 (C4), 110.3 (C2), 66.7 (C14/C15), 66.6 (C15/C14), 57.3 (C11), 45.6 (C13/C16), 44.6 (C16/C13).

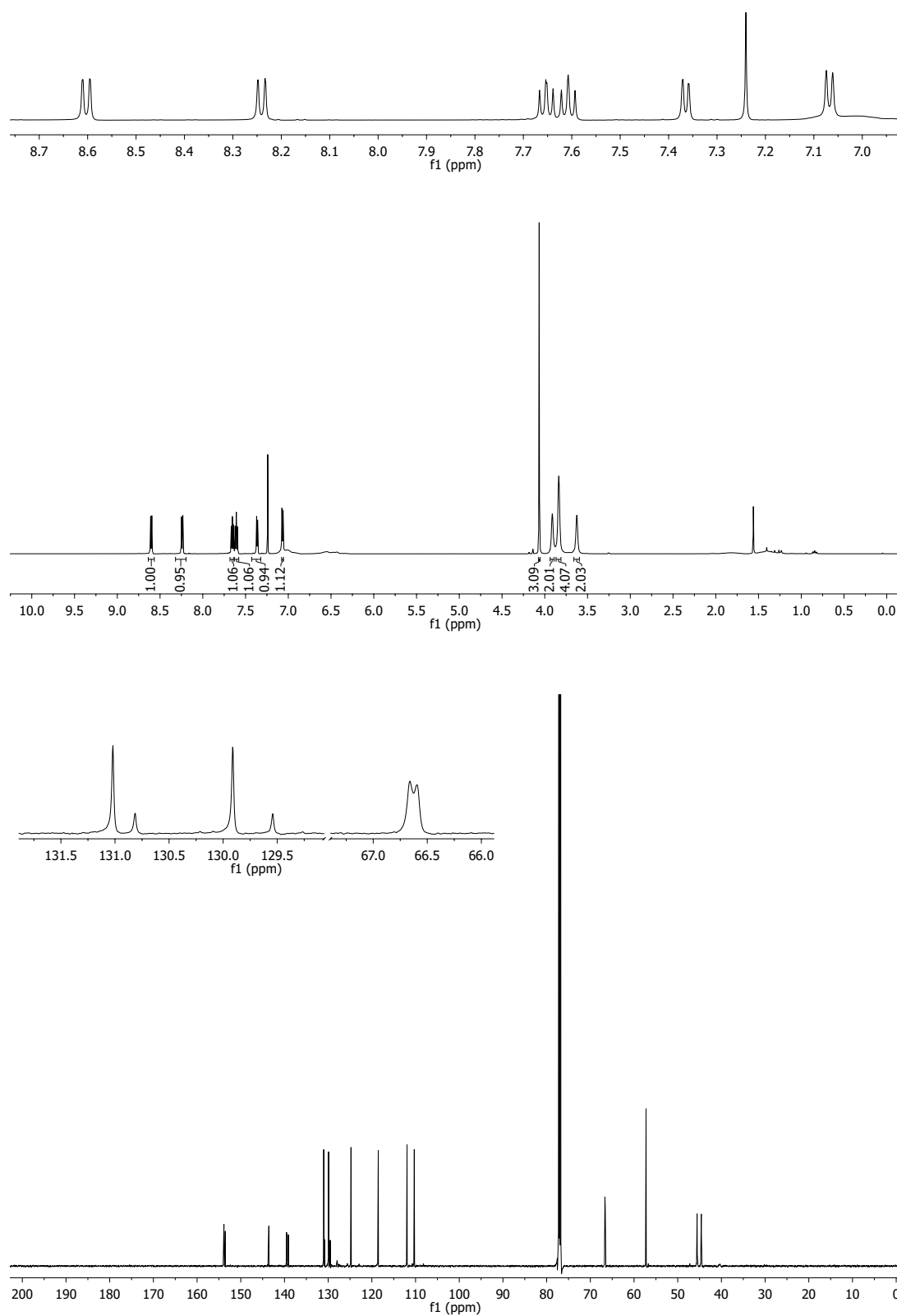
MS (EI) *m/z* (relativ intensitet): 355 (4.7), 339 (11), 253 (23.2), 226 (4.6), 225 (5.0), 197 (4.4), 114 (100).

MS (ES) *m/z* (relativ intensitet): 394.1 [M+Na]⁺.

HR-MS (ES): 394.1008. Beregnet for C₁₈H₁₇N₃O₆Na: 394.1015 (-1.79 ppm).

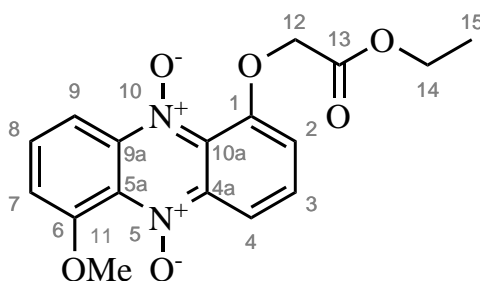
Smeltepunkt: 185-187 °C (fra CH₃Cl).

Forbindelsen er ikke rapportert i litteraturen.



Spekter 9.10: ¹H- og ¹³C-NMR av 24 (600/150 MHz, CDCl₃).

1-(2-ETOKSY-2-OKSOETOKSY)-
6-METOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**26**)

**26**

Syntesen ble utført etter prosedyre B.

Utgangsstoff: Myxin (**1a**) (20 mg, 0.077 mmol, 1 ekv.), etylbromacetat (25 μ L, 0.23 mmol, 3 ekv.).

Forbindelse **26** (15 mg, 56% utbytte) ble isolert som et oransjefarget krystallinsk pulver.

R_f : 0.06 (100% EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

δ 8.41 (dd, $J = 9.1, 0.9$ Hz, 1H, H4), 8.30 (dd, $J = 9.0, 0.9$ Hz, 1H, H9), 7.61 (dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz, 1H, H8), 7.57 (dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, 1H, H3), 7.14 (dd, $J = 7.9, 0.9$ Hz, 1H, H2), 7.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H7), 4.87 (s, 2H, H12), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H14), 4.07 (s, 3H, H11), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H15).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

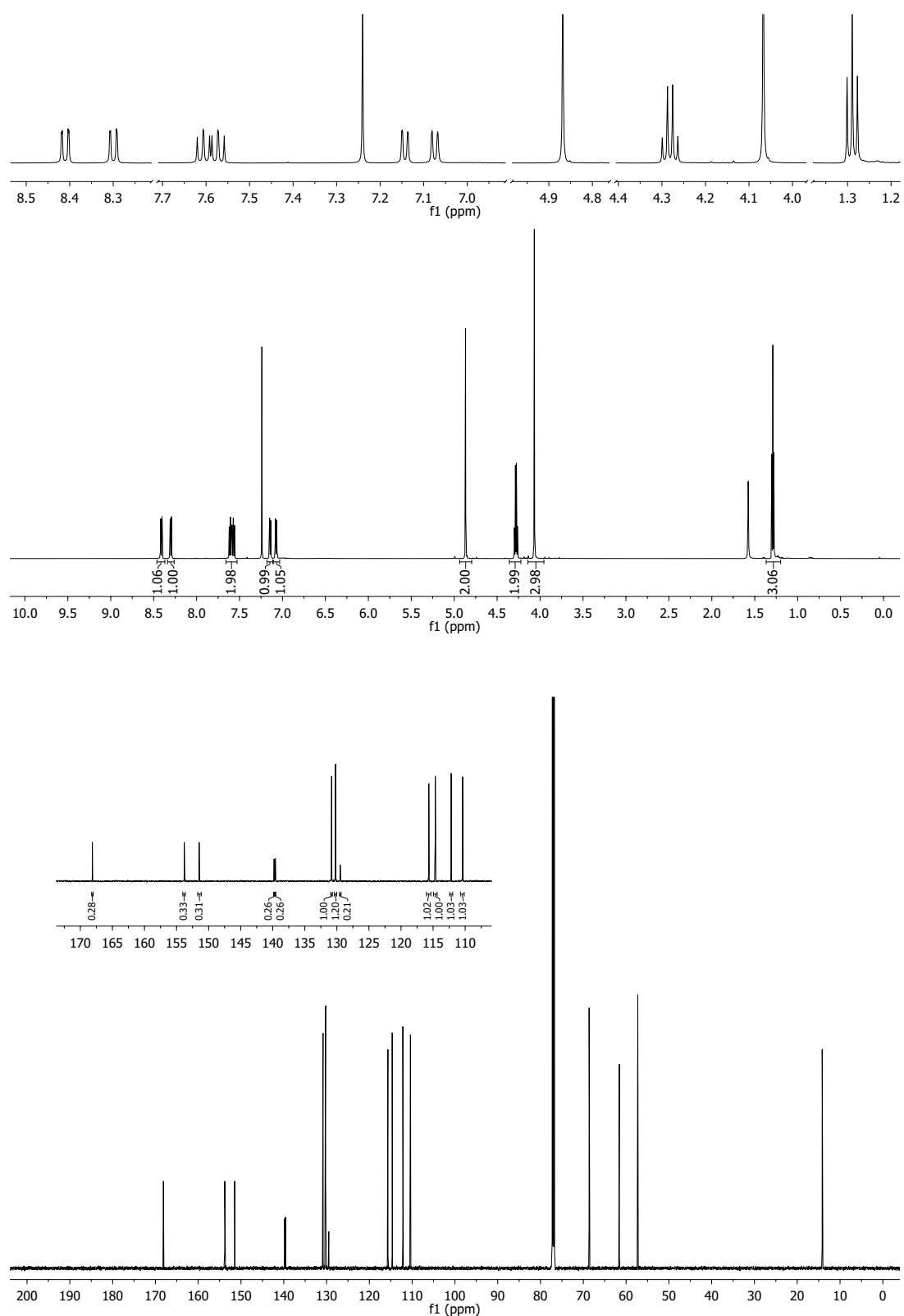
δ 168.1 (C12), 153.8 (C6), 151.5 (C1), 139.8 (C9a), 139.6 (C4a), 130.8 (C8), 130.2 (C3, C10a), 129.5 (C5a), 115.7 (C2), 114.7 (C4), 112.2 (C9), 110.4 (C7), 68.6 (C12), 61.6 (C14), 57.3 (C11), 14.2 (C15).

MS (EI) m/z (relativ intensitet): 344 (M^+ , 9.0%), 328 (18.8), 312 (10.0), 226 (12.6), 225 (17.7), 197 (14.6).

HR-MS (EI): 344.1005 (fra CH_2Cl_2). Beregnet for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$: 344.1008 (1.1 ppm).

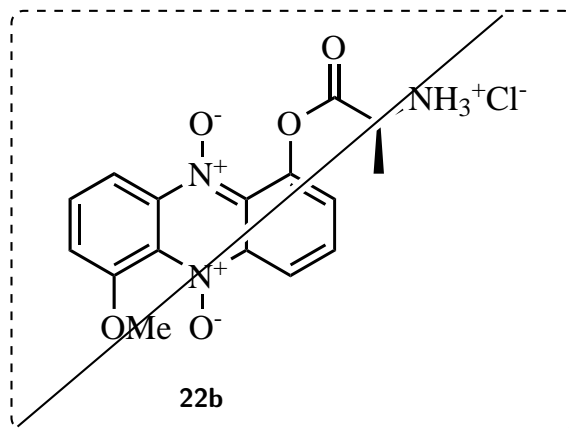
Smeltepunkt: 137-139 $^\circ\text{C}$.

Forbindelsen er ikke rapportert i litteraturen.

Spekter 9.11: ¹H- og ¹³C-NMR av 26 (600 MHz, CDCl₃).

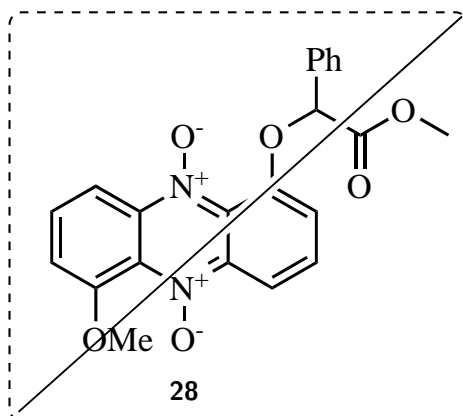
V. SYNTSEFORSØK

(S)-1-((2-AMMONIOPROPANOYL)OKSY)-6-METOKSY
-FENAZIN-N5,N10-DIOKSID KLORID (**22b**)



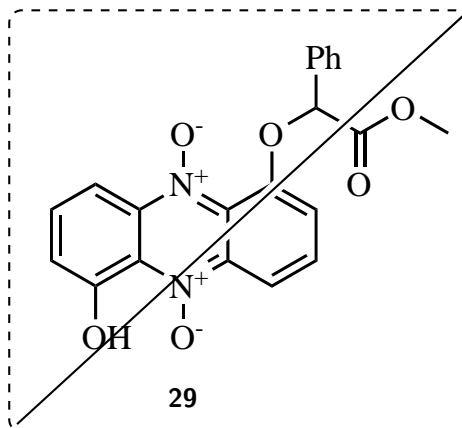
Til en løsning av **22a** (16 mg, 0.037 mmol, 1.0 ekv.) i tørr EtOAc (1 mL) ved 0 °C og inert atmosfære, ble HCl (2.0 M i tørr Et₂O) (22 µL, 0.044 mmol, 1.2 ekv.) dråpevis tilsatt. Etter fullstendig omsetning av **22a** ble det kun observert **1a** i reaksjonsblandingen.

1-METOKSY-6-(1-FENYLETOKSY-2-METOKSY-2-OKSO)-
FENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**28**)

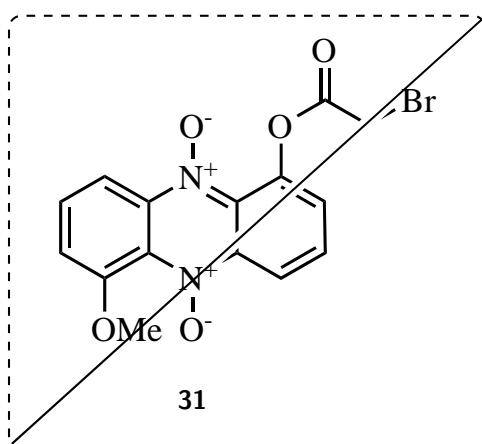


Til en løsning av **1a** (10 mg, 0.038 mmol, 1.0 ekv.) og $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (1.0 mg, 0.0023 mmol, 0.060 ekv.) i tørr CH_2Cl_2 (2 ml) under argonatmosfære ble det over 5 minutter tilsatt metyl-2-diazo-2-fenylacetat (**27**) (8.0 mg, 0.045 mmol, 1.2 ekv.) løst i tørr CH_2Cl_2 (2 ml). Reaksjonen ga utelukkende det deoksygenererte produktet **1b** som hovedprodukt.

1-(1-FENYLETOKSY-2-METOKSY-2-OKSO)
-6-HYDROKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**29**)

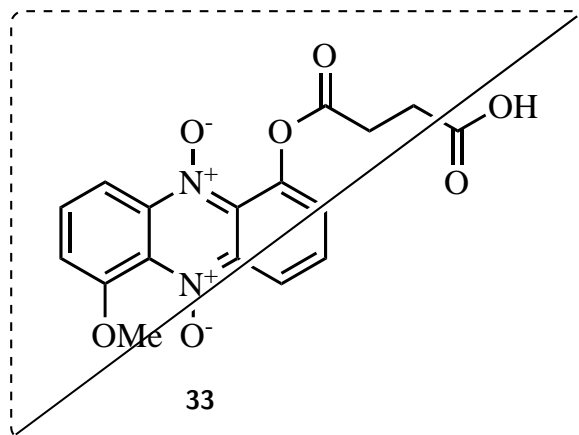


Til en løsning av **2a** (10 mg, 0.041 mmol, 1.0 ekv.) og $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (1.0 mg, 0.0023 mmol, 0.060 ekv.) i tørr CH_2Cl_2 (2 ml) under argonatmosfære ble det over 5 minutter tilsatt metyl-2-diazo-2-fenylacetat (**27**) (9.0 mg, 0.049 mmol, 1.2 ekv.) løst i tørr CH_2Cl_2 (2 ml). Reaksjonen ga utelukkende det deoksygenerte produktet **2b** som hovedprodukt.

1-(2-BROMOACETOKSY)-6-METOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**31**)

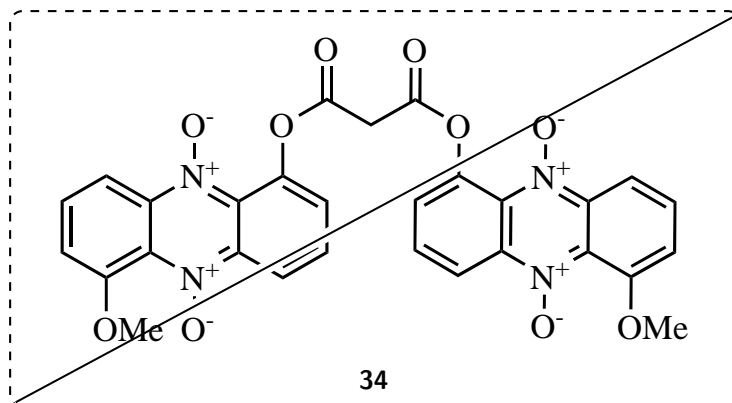
Under inert atmosfære ble myxin (**1a**) (10 mg, 0.058 mmol, 1.0 ekv.) og trietylamin (9.0 μ L, 0.070 mmol, 1.2 ekv.) løst i tørr THF (2 mL) ved -78 °C. Bromacetyl bromid (**30**) (7.0 μ L, 0.080 mmol, 1.4 ekv.) ble dråpevis tilsatt etter 5 minutter. Reaksjonen ga hovedvekt av **1b** og det mono *N*-deoksygenererte produktet av **31**.

1-((3-KARBOKSYPROPANOYL)OKSY)-6-METOKSY
-FENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID (**33**)



Under inert atmosfære ble myxin (**1a**) (10 mg, 0.039 mmol, 1.0 ekv.) og trietylamin (6.0 μ L, 0.047 mmol, 1.2 ekv.) løst i tørr THF (2 mL) ved romtemperatur. Ravsyreanhydrid (**32**) (6.0 mg, 0.060 mmol, 1.5 ekv.) ble tilsatt etter 5 minutters røring. Basert på TLC-analyse ga reaksjonen svært mange biprodukter.

6,6'-(MALONYLBIS(OKSY))BIS(1-METOKSYFENAZIN-*N*5,*N*10-DIOKSID)
(34)



Syntesen ble forsøkt utført etter prosedyre A.

Utgangsstoff: Myxin (**1a**) (15 mg, 0.058 mmol, 1 ekv.) og malonsyre (24 mg, 0.23 mmol, 4 ekv.).

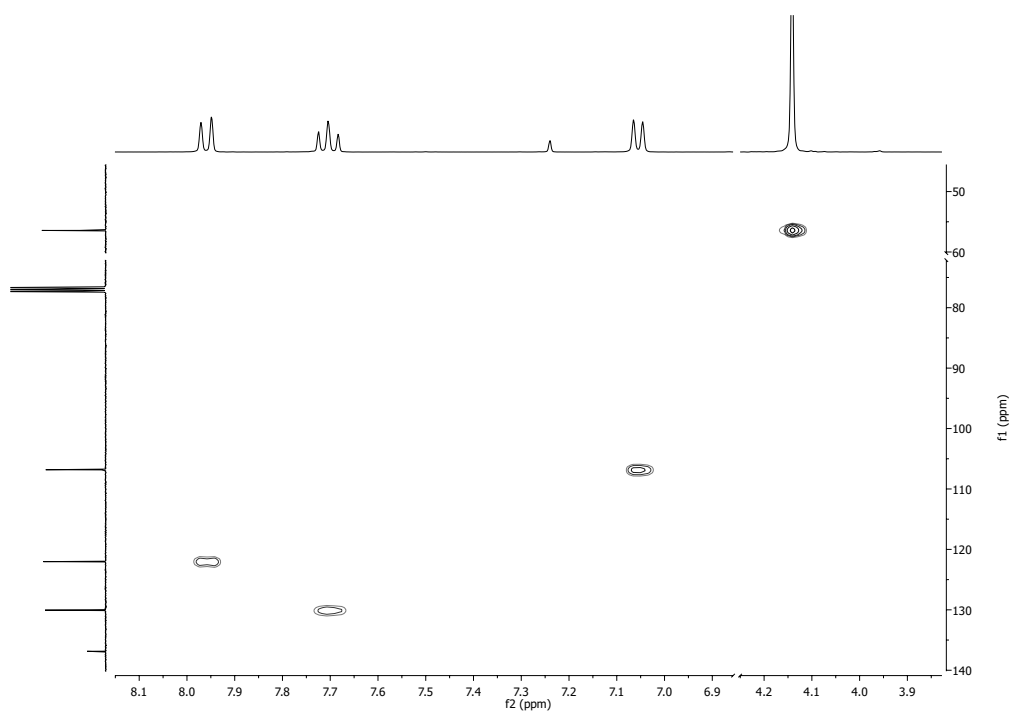
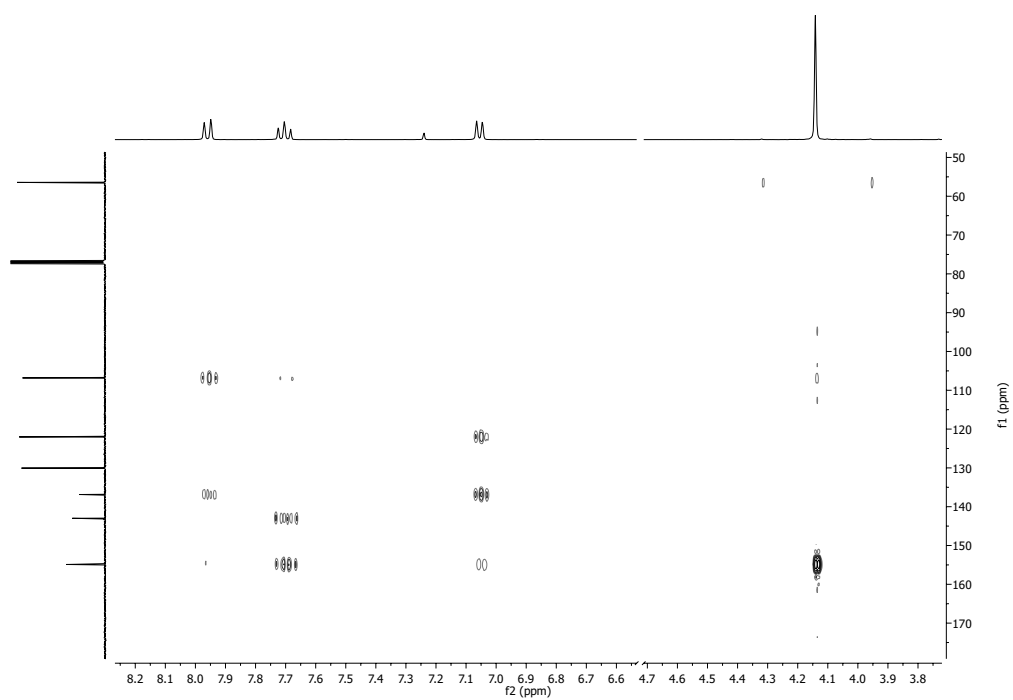
Basert på TLC- og ¹H-NMR-analyse var ingenting av **1a** forbrukt etter 48 timer.

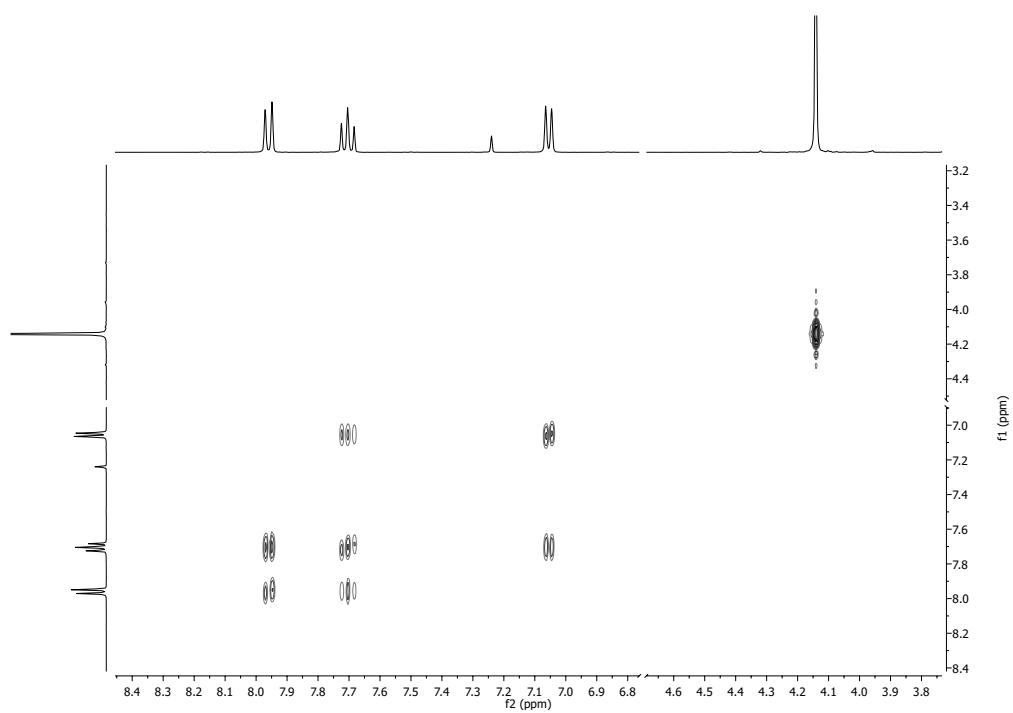
Kapittel 10

Appendiks

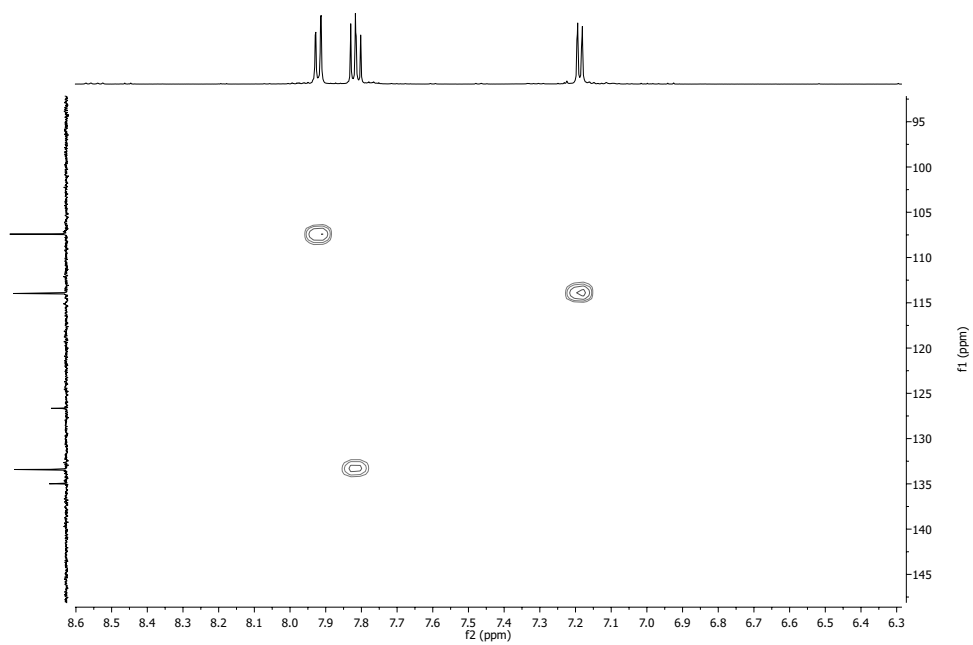
Inkludert i appendikset er NMR-spektra og data fra énkrySTALLRøNTGENDIFFRAKSJON. I de todimensjonale NMR-spektrene er kun relevant område inkludert; dette for å gjøre det enklere å tyde informasjonen spektrene gir.

I. NMR-SPEKTRA

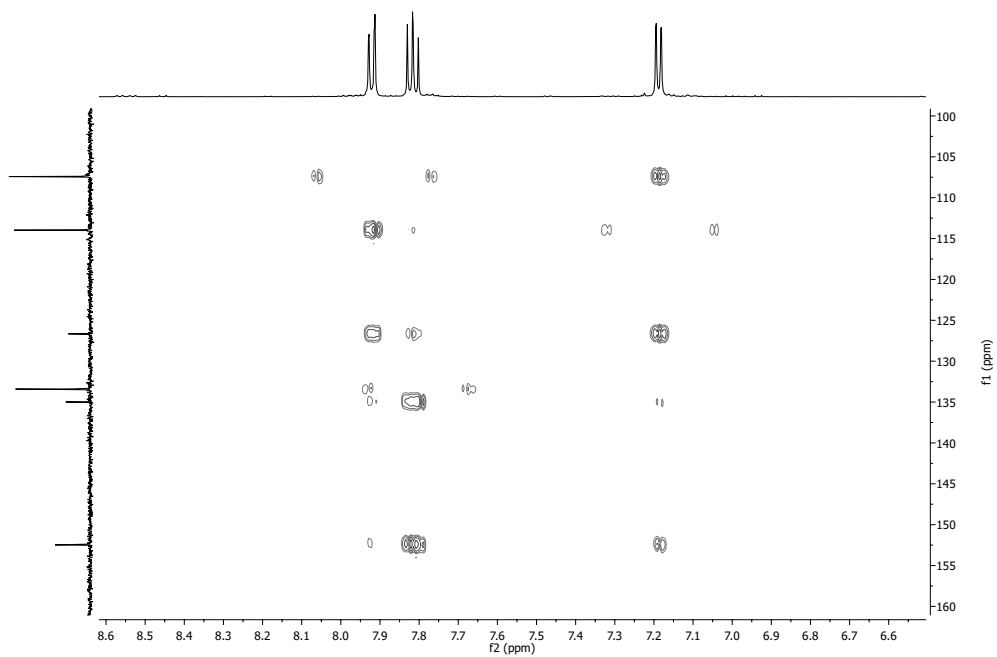
Spekter 10.1: HSQC-spekter av 13 (400 MHz / CDCl₃).Spekter 10.2: HMBC-spekter av 13 (400 MHz / CDCl₃).



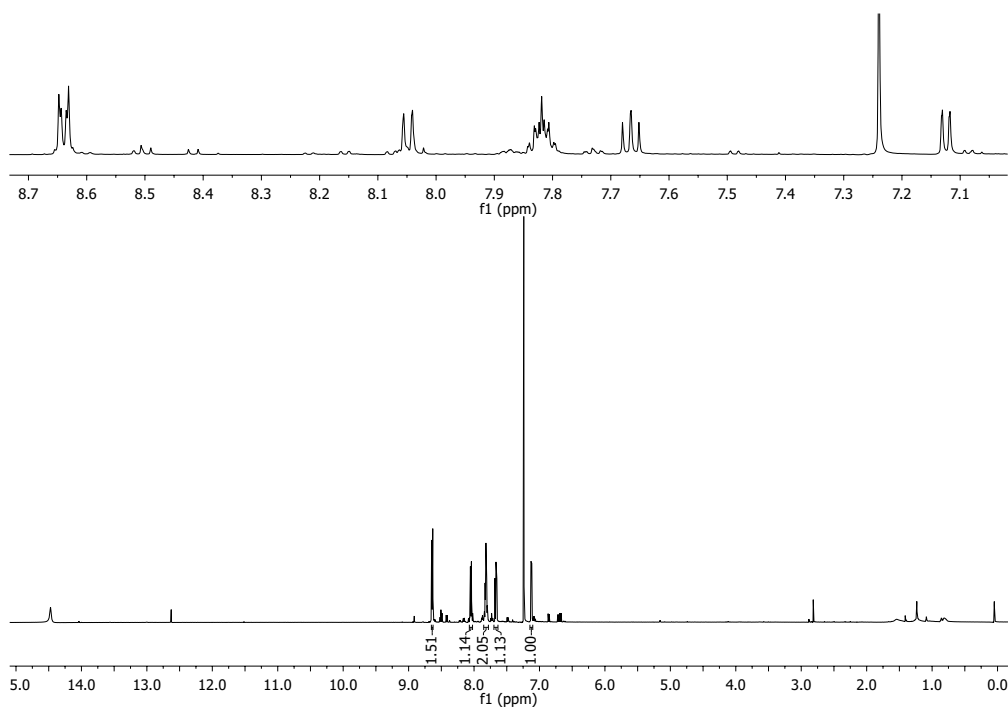
Spekter 10.3: COSY-spekter av 13 (400 MHz / CDCl₃).



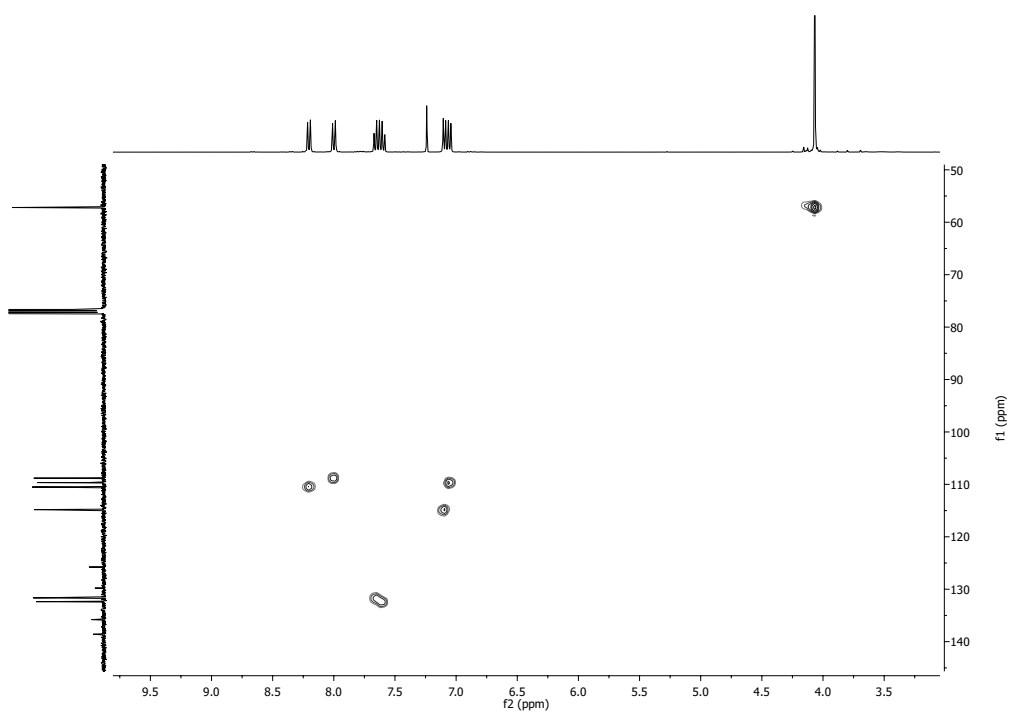
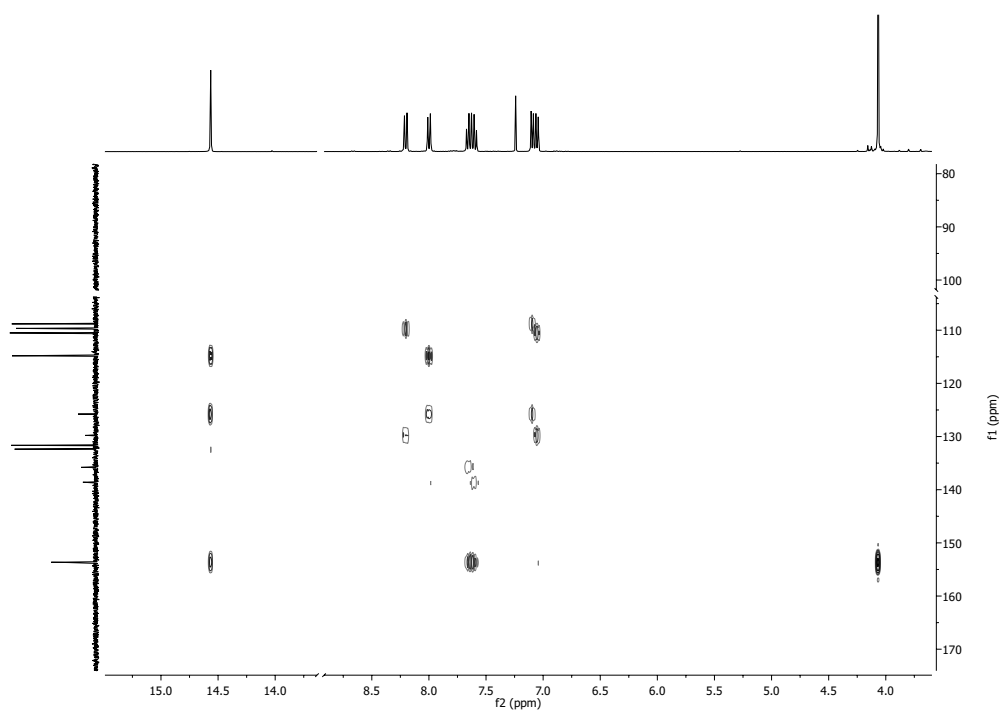
Spekter 10.4: HSQC-spekter av 2a (600 MHz / DMSO-d₆).

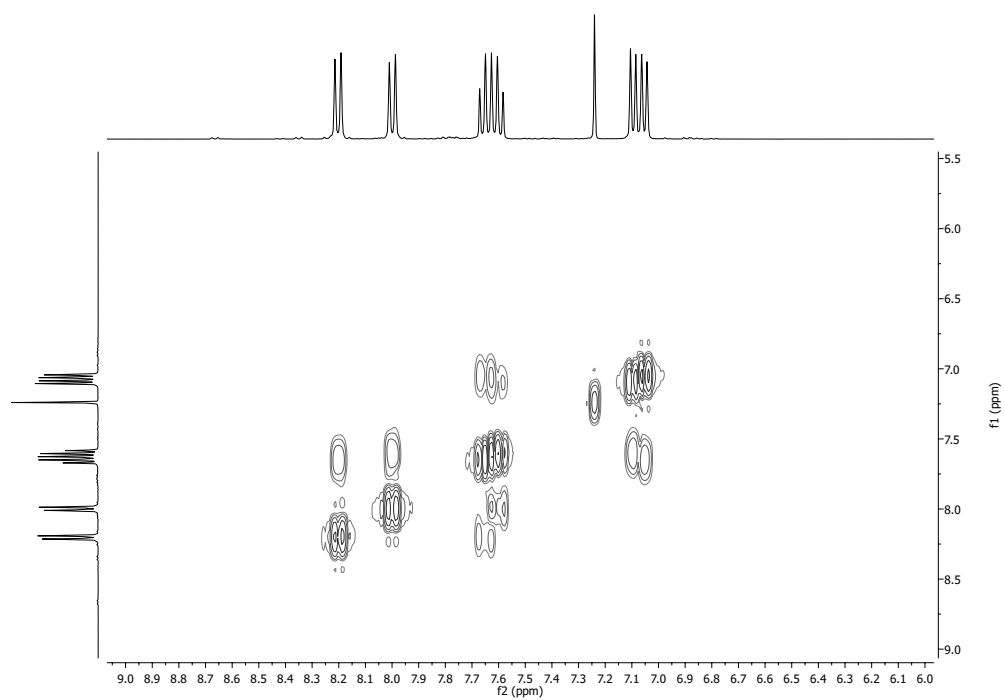


Spekter 10.5: HMBC-spekter av **2a** (600 MHz / DMSO-d₆).

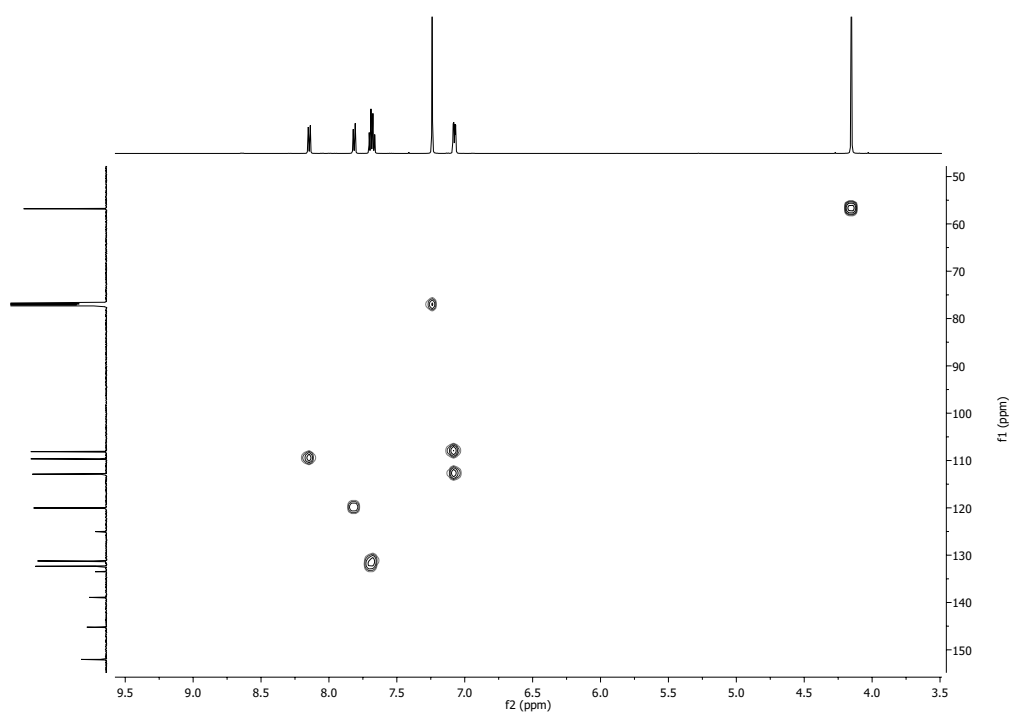


Spekter 10.6: Urent ¹H-NMR-spekter av **2b** (400 MHz / CDCl₃).

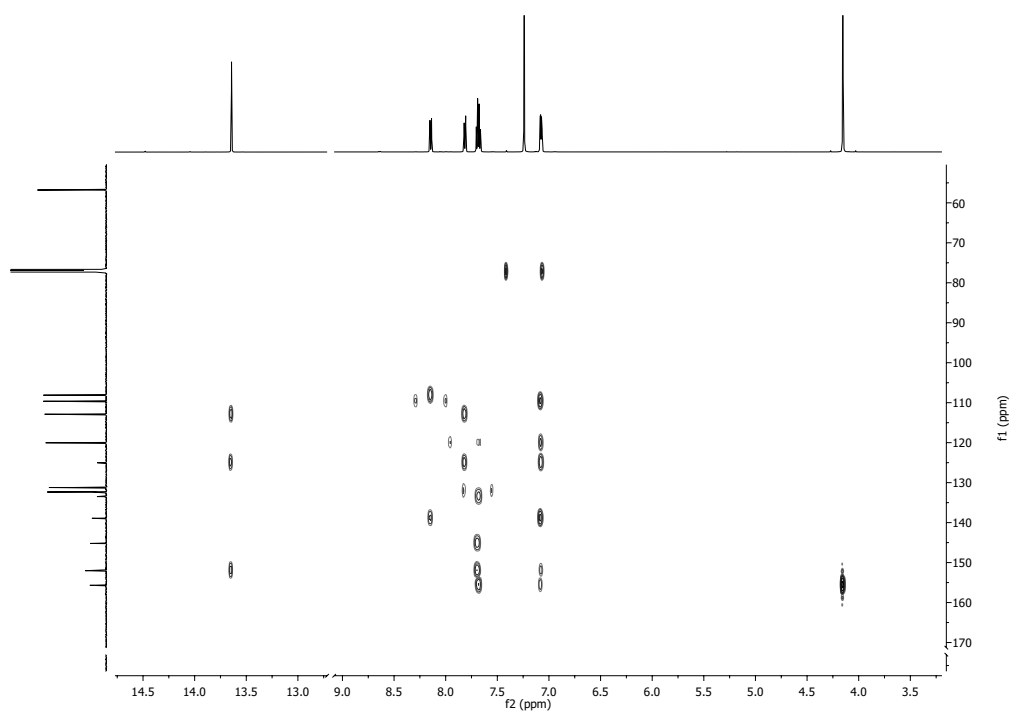
Spekter 10.7: HSQC-spekter av **1a** (400 MHz / CDCl₃).Spekter 10.8: HMBC-spekter av **1a** (400 MHz / CDCl₃).



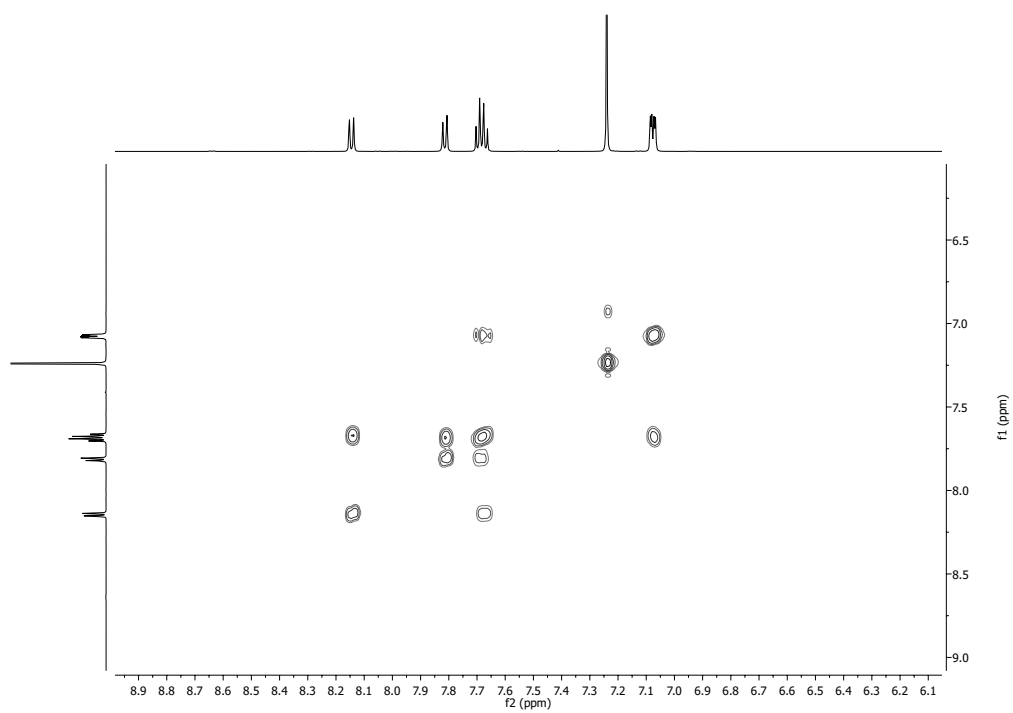
Spekter 10.9: COSY-spekter av **1a** (400 MHz / CDCl₃).



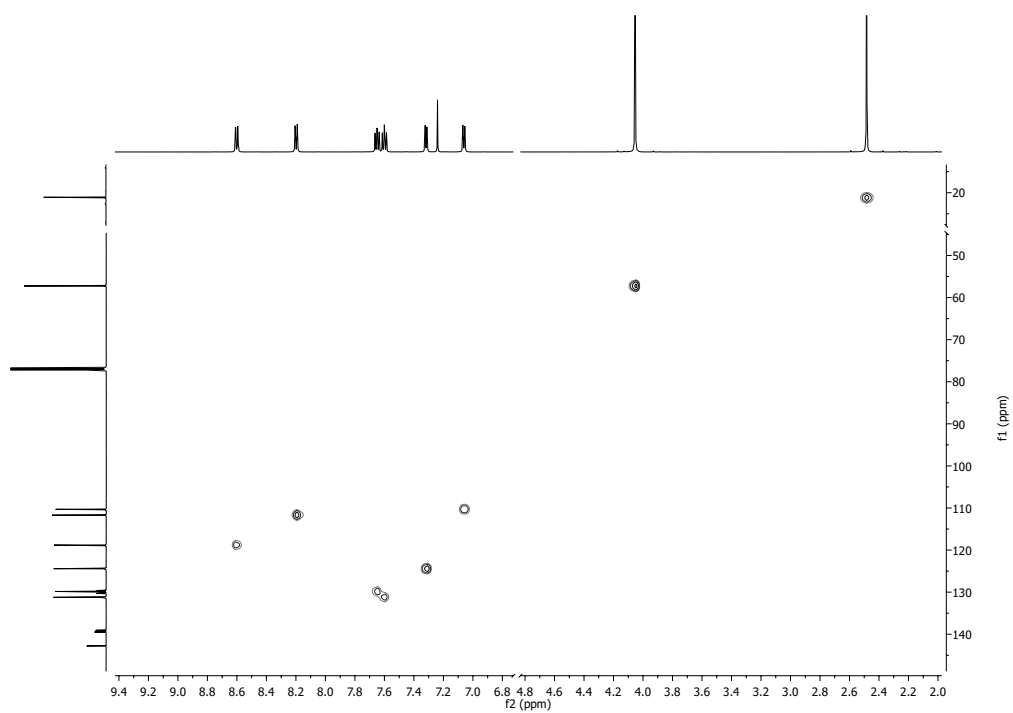
Spekter 10.10: HSQC-spekter av **1b** (600 MHz / CDCl₃).



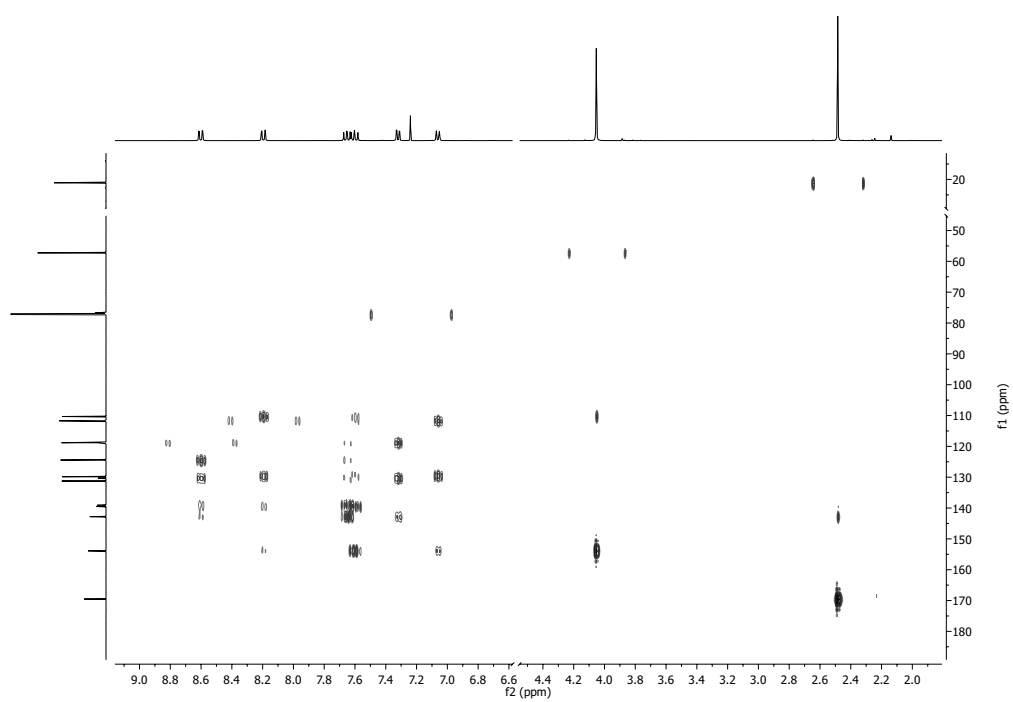
Spekter 10.11: HMBC-spekter av **1b** (600 MHz / CDCl₃).



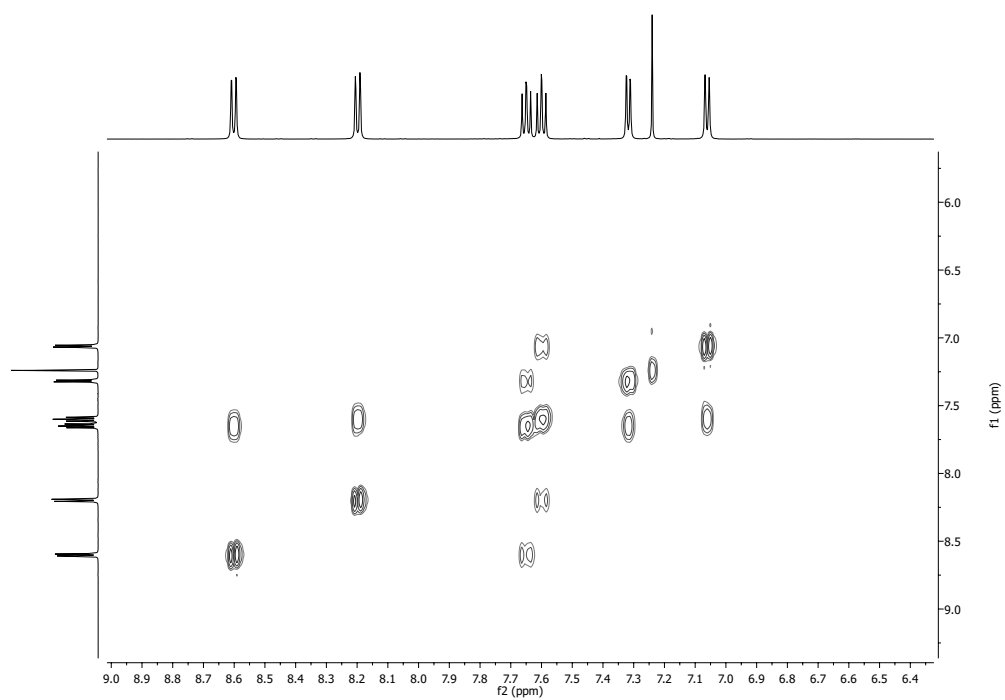
Spekter 10.12: COSY-spekter av **1b** (600 MHz / CDCl₃).



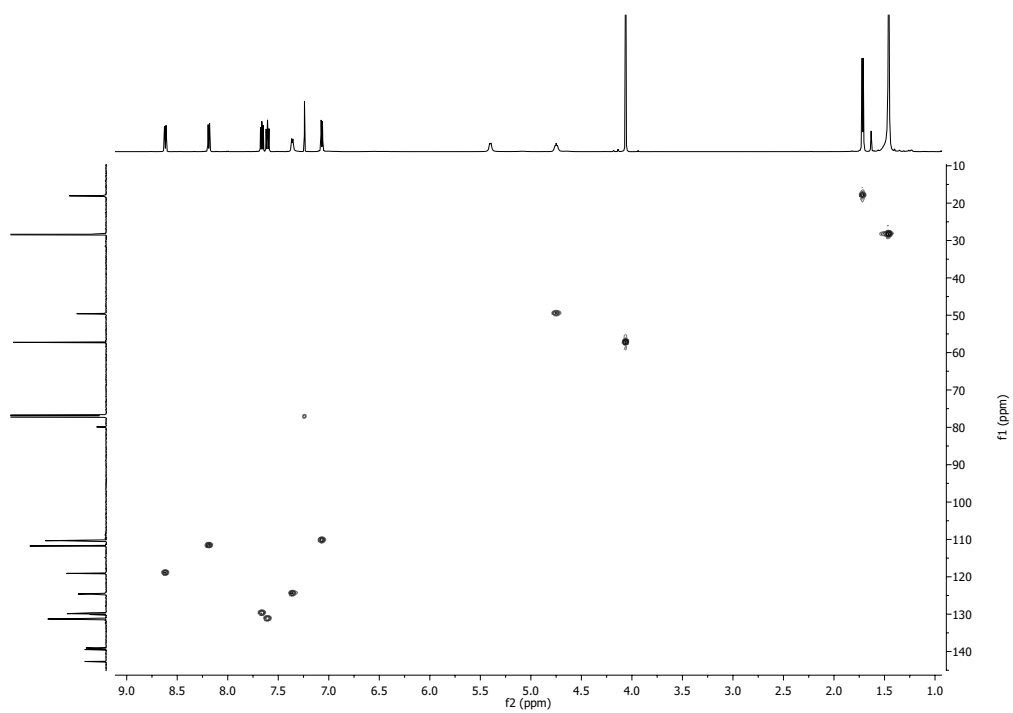
Spekter 10.13: HSQC-spekter av **20** (600 MHz / CDCl₃).



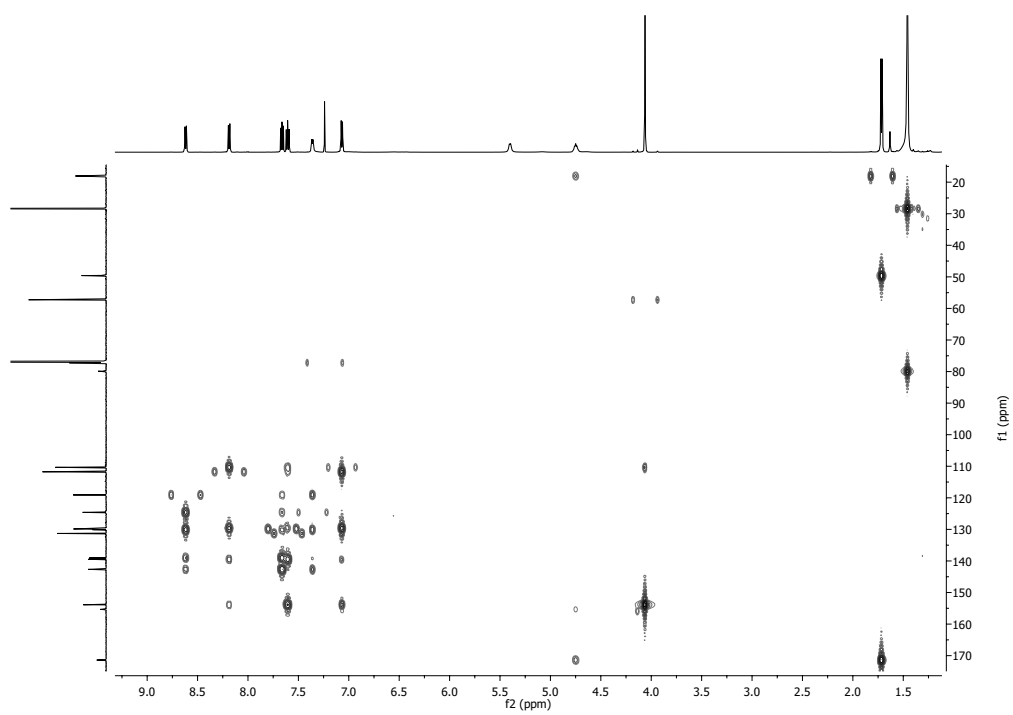
Spekter 10.14: HMBC-spekter av **20** (600 MHz / CDCl₃).



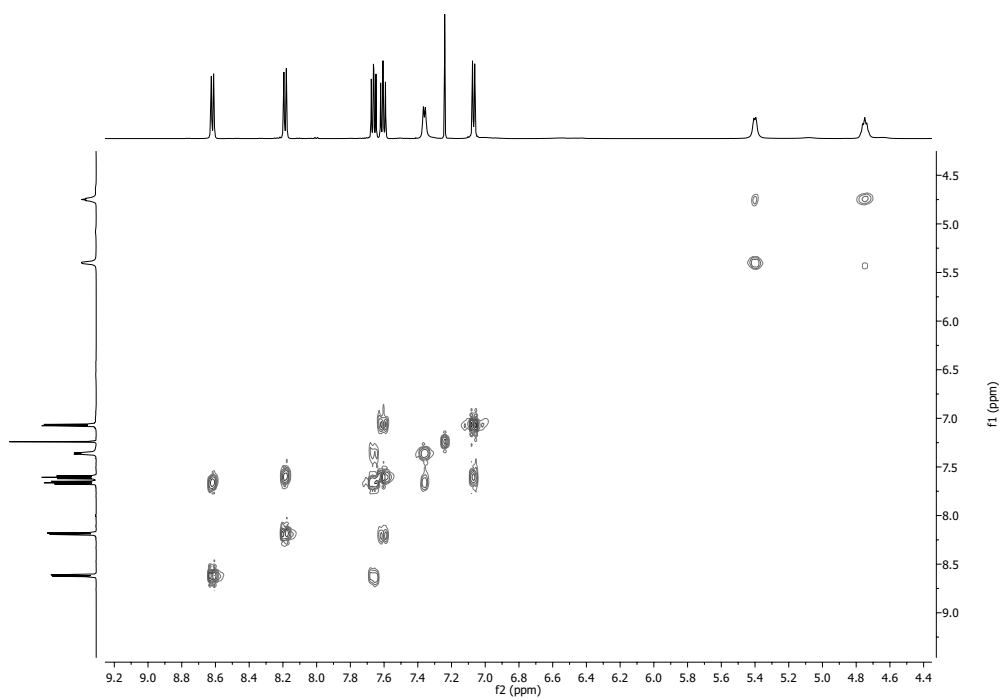
Spekter 10.15: COSY-spekter av 20 (600 MHz / CDCl₃).



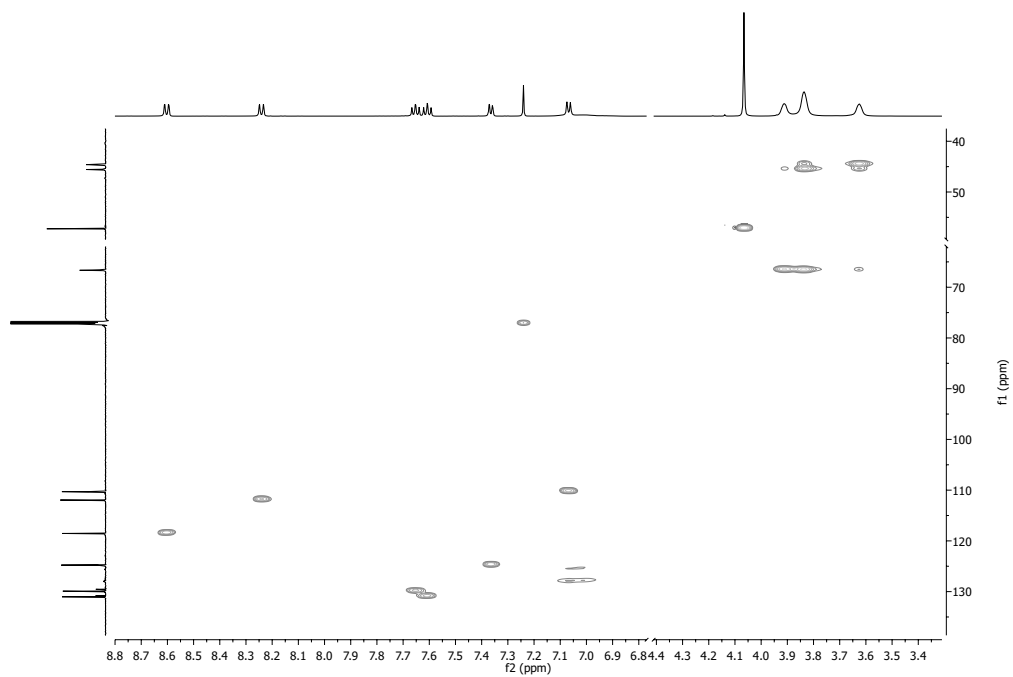
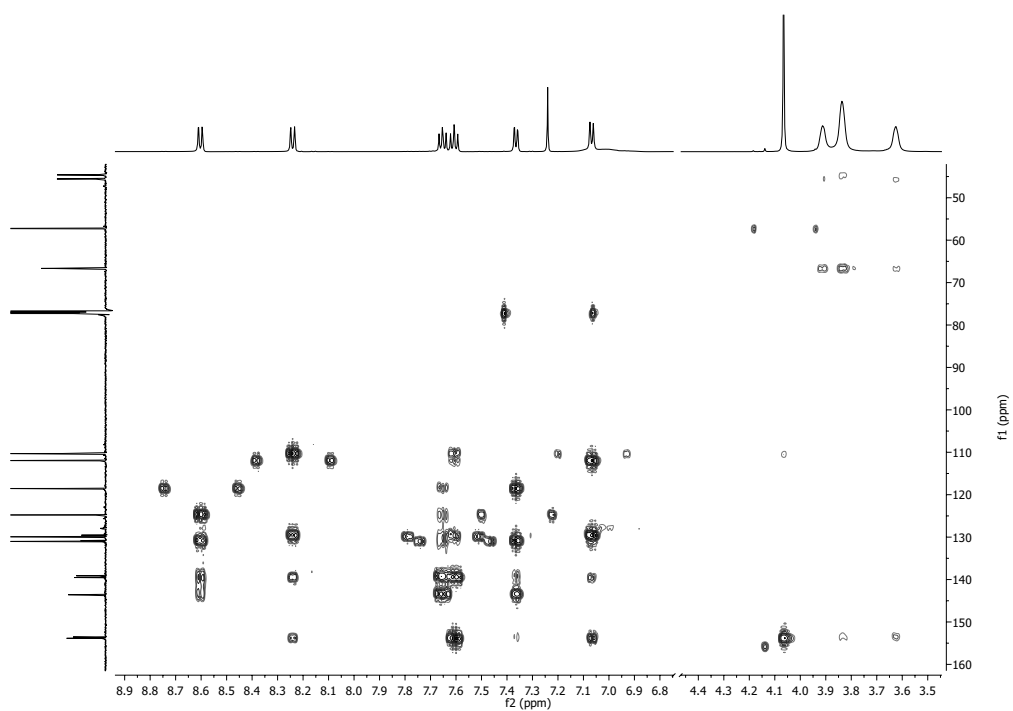
Spekter 10.16: HSQC-spekter av 22a (600 MHz / CDCl₃).

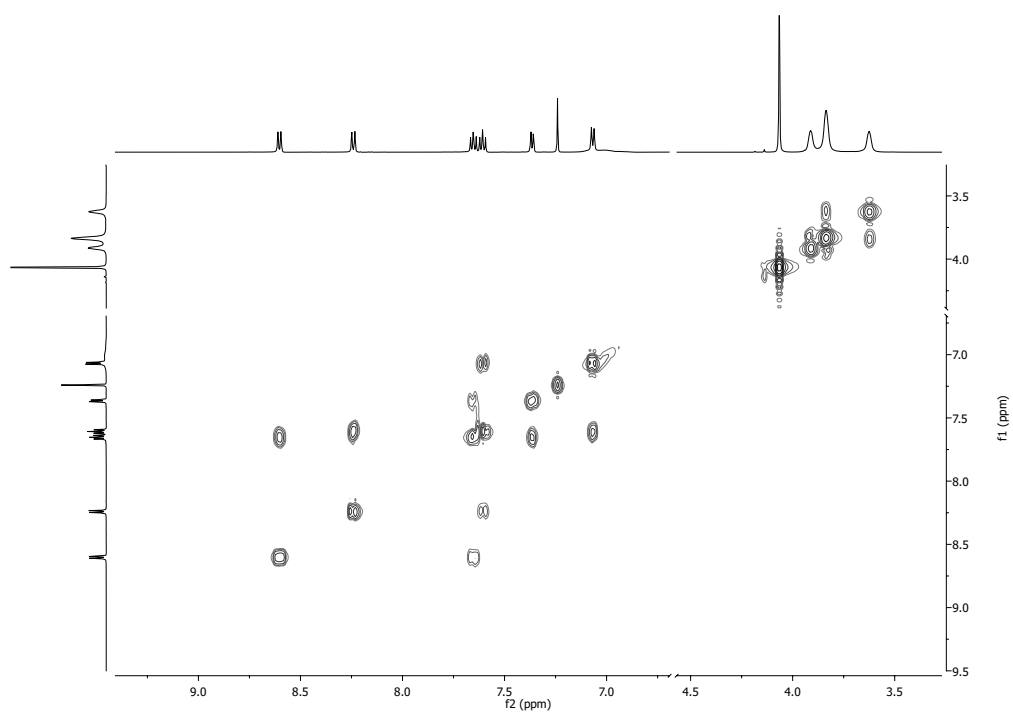


Spekter 10.17: HMBC-spekter av **22a** (600 MHz / CDCl_3).

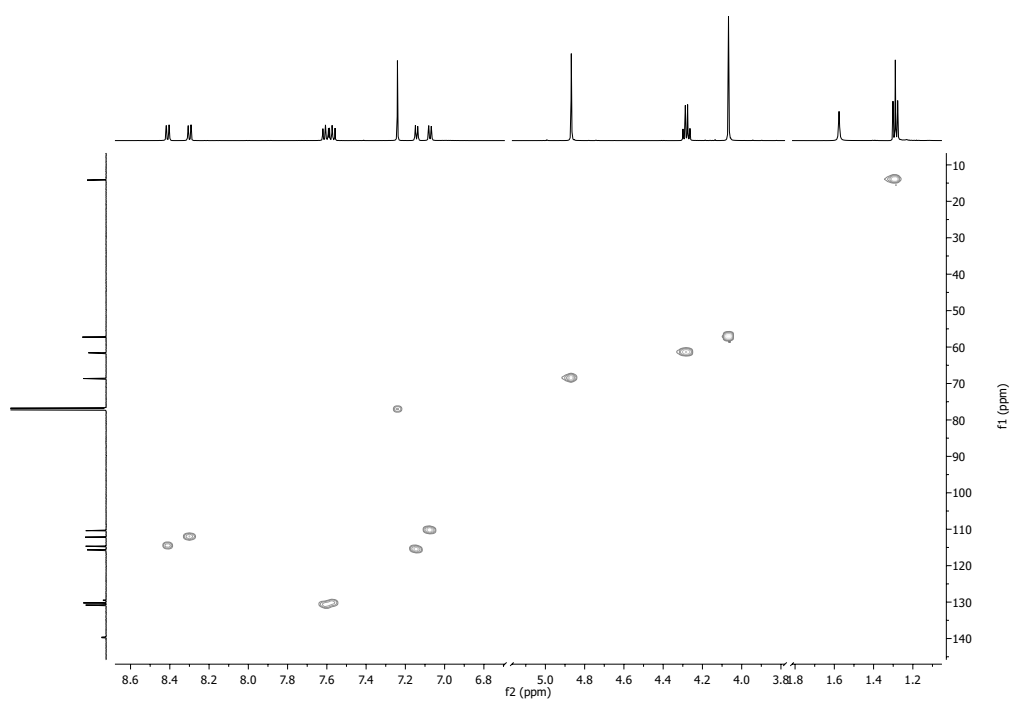


Spekter 10.18: COSY-spekter av **22a** (600 MHz / CDCl_3).

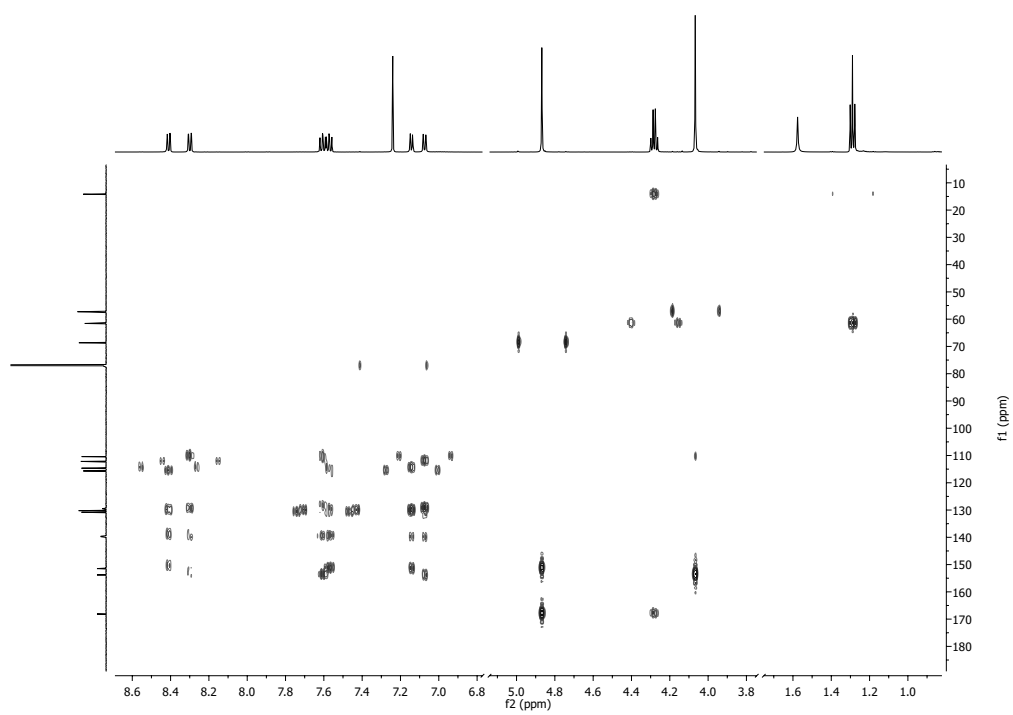
Spekter 10.19: HSQC-spekter av **24** (600 MHz / CDCl₃).Spekter 10.20: HMBC-spekter av **24** (600 MHz / CDCl₃).



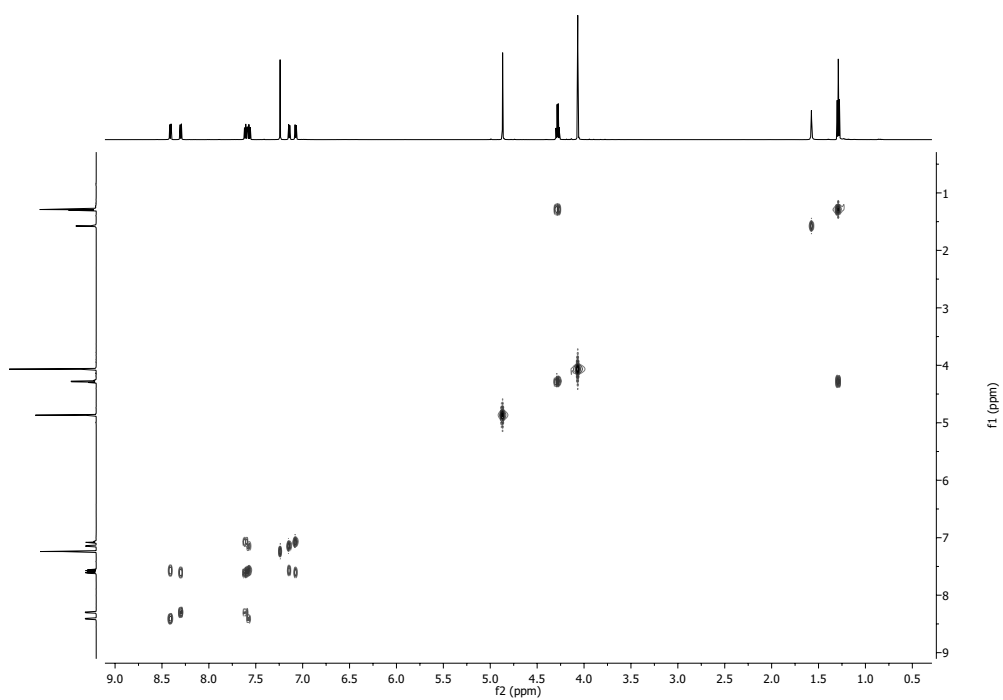
Spekter 10.21: COSY-spekter av **24** (600 MHz / CDCl₃).



Spekter 10.22: HSQC-spekter av **26** (600 MHz / CDCl₃).



Spekter 10.23: HMBC-spekter av **26** (600 MHz / CDCl₃).



Spekter 10.24: COSY-spekter av **26** (600 MHz / CDCl₃).

II. KRYSTALLOGRAFISK DATA

Crystal data	
Name	Iodinin (2a) BMG49
Formula	C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₄
M _r	244.21
Crystal system, Space group	Monoclinic, <i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Colour, shape	Prism, amber
Cell length a	6.0741(5) Å
Cell length b	5.0200(4) Å
Cell length c	15.6025(11) Å
Cell angle α	90°
Cell angle β	90.875(2)°
Cell angle γ	90°
Cell volume, V	475.70(6) Å ³
Formula units, Z	4
Sum of unit cell electrons, F(000)	252
Radiation	Mo K α λ = 0.71073 Å
Absorption coefficient (μ)	0.13 mm ⁻¹
Temperature, T	100 K
Data collection	
Instrument	Bruker D8 Venture diffractometer
Measured reflections	15435
Independent reflections	2436
Reflections with $I > 2\sigma(I)$	1850
R _{int}	0.051
Θ_{\max} , Θ_{\min}	37.0°, 2.6°
h	-10 → 10
k	-8 → 8
l	-26 → 26
Refinement	
Refinement on F ²	
R [$I^2 > 2\sigma(F^2)$]	0.046
wR(F ²)	0.144
S	1.06
Reflections	2436
Parameters	98
Restraints	0
(Δ/σ) _{max}	0.001
$\Delta\rho_{\max}$	0.66 e Å ⁻³
$\Delta\rho_{\min}$	-0.23 e Å ⁻³
Hydrogen site location	Difference Fourier map
	All H-atom parameters refined

Tabell 10.1: Krystallografisk data for **2a**.

Crystal data	
Name	Myxin (1a) BMG59
Formula	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₄
M _r	258.233
Crystal system, Space group	Monoclinic, <i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
Crystal size	0.42 × 0.04 × 0.04 mm
Colour, shape	Needle, red
Cell length a	4.8855(4) Å
Cell length b	29.331(2)
Cell length c	15.0246(13) Å
Cell angle α	90°
Cell angle β	98.751(2)°
Cell angle γ	90°
Cell volume, V	2127.9(3) Å ³
Formula units, Z	6
Sum of unit cell electrons, F(000)	936
Radiation	Mo Kα λ = 0.71073 Å
Absorption coefficient (μ)	0.11 mm ⁻¹
Temperature, T	100 K
Data collection	
Instrument	Bruker D8 Venture diffractometer
Measured reflections	34632
Independent reflections	8498
Reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	6648
R _{int}	0.033
Θ _{max} , Θ _{min}	33.7°, 2.7°
h	-7 → 7
k	-45 → 45
l	-23 → 22
Refinement	
Refinement on F ²	
R [<i>I</i> ² > 2 σ(<i>F</i> ²)]	0.046
wR(<i>F</i> ²)	0.132
S	11.01
Reflections	8498
Parameters	423
Restraints	0
(Δ/σ) _{max}	0.001
Δρ _{max}	0.57 e Å ⁻³
Δρ _{min}	-0.27 e Å ⁻³
Hydrogen site location	Difference Fourier map
	All H-atom parameters refined

Tabell 10.2: Krystallografisk data for **1a**.

Crystal data	
Name	BMG70 (35)
Formula	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₅
M _r	300.27
Crystal system, Space group	Orthorhombic, <i>Pna</i> 2 ₁
Crystal size	0.49 × 0.05 × 0.03 mm
Colour, shape	Needle, orange
Cell length a	17.6210(13) Å
Cell length b	4.9839(4) Å
Cell length c	28.268(2) Å
Cell angle α	90°
Cell angle β	90°
Cell angle γ	90°
Cell volume, V	2482.5(3) Å ³
Formula units, Z	8
Sum of unit cell electrons, F(000)	1248
Radiation	Mo Kα λ = 0.71073 Å
Absorption coefficient (μ)	0.12 mm ⁻¹
Temperature, T	100 K
Data collection	
Instrument	Bruker D8 Venture diffractometer
Measured reflections	23114
Independent reflections	6269
Reflexions with $I > 2\sigma(I)$	4921
R _{int}	0.052
Θ _{max} , Θ _{min}	29.6°, 2.3°
h	-24 → 23
k	-6 → 4
l	-39 → 35
Refinement	
Refinement on F ²	
R [$I^2 > 2\sigma(F^2)$]	0.058
wR(F ²)	0.150
S	1.04
Reflections	6269
Parameters	401
Restraints	7
(Δ/σ) _{max}	0.006
Δρ _{max}	0.85 e Å ⁻³
Δρ _{min}	-0.34 e Å ⁻³
Hydrogen site location	Difference Fourier map
	All H-atom parameters refined

Tabell 10.3: Krystallografisk data for 20.

Crystal data	
Name	BMG102 (24)
Formula	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₆
M _r	371.34
Crystal system, Space group	Monoclinic, <i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
Crystal size	0.34 × 0.11 × 0.05 mm
Colour, shape	Prism, red
Cell length a	14.7770(8) Å
Cell length b	19.8882(12) Å
Cell length c	10.8257(6) Å
Cell angle α	90°
Cell angle β	93.033(2)°
Cell angle γ	90°
Cell volume, V	3177.1(3) Å ³
Formula units, Z	8
Sum of unit cell electrons, F(000)	1552.0
Radiation	Mo Kα λ = 0.71073 Å
Absorption coefficient (μ)	0.12 mm ⁻¹
Temperature, T	100 K
Data collection	
Instrument	Bruker D8 Venture diffractometer
Measured reflections	29994
Independent reflections	7869
Reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	6371
R _{int}	0.029
Θ _{max} , Θ _{min}	28.3°, 2.1°
h	-19 → 19
k	-26 → 26
l	-14 → 14
Refinement	
Refinement on F ²	
R [<i>I</i> ² > 2 σ(<i>F</i> ²)]	0.040
wR(<i>F</i> ²)	0.103
S	1.03
Reflections	7869
Parameters	623
Restraints	0
(Δ/σ) _{max}	0.001
Δρ _{max}	0.36 e Å ⁻³
Δρ _{min}	-0.26 e Å ⁻³
Hydrogen site location	Difference Fourier map
	All H-atom parameters refined

Tabell 10.4: Krystallografisk data for 24.

Referanser

- [1] Patrick, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press Inc., 2001; Chapter 8.
- [2] Avendano, C.; Menendez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 1st ed.; Elsevier Science, 2008; Chapter 1.
- [3] Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7th ed.; Lippincott Williams and Wilkins, 2012; Part I, III:5.
- [4] Balandrin, M. F.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R. *Human Medicinal Agents from Plants*; ACS Symposium Series, 1993; Volum 524; Chapter 1.
- [5] Myhren, L. E.; Nygaard, G.; Gausdal, G.; Sletta, H.; Teigen, K.; Degnes, K. F.; Zahlsen, K.; Brunsvik, A.; Bruserud, Ø.; Døskeland, S. O.; Selheim, F.; Herfindal, L. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 332.
- [6] Sletta, H.; Degnes, K. F.; Herfindal, L.; Klinkenberg, G.; Fjærvik, E.; Zahlsen, K.; Brunsvik, A.; Nygaard, G.; Aachmann, F. L.; Ellingsen, T. E.; Døskeland, S. O.; Zotchev, S. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 603.
- [7] American Cancer Society., Leukemia - Acute Myeloid.
<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acute-myeloid/learnmore/detailedguide/index>. 12.09.2014.
- [8] Estey, E.; Döhner, H. *Lancet* **2006**, *368*, 1894.
- [9] Tallman, M. S.; Gilliland, D. G.; Rowe, J. M. *Blood* **2005**, *106*, 1154.
- [10] American Cancer Society., Leukemia - Acute Lymphocytic.
<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acute-lymphocytic/learnmore/detailedguide/index>. 12.01.2015.
- [11] Bethesda MD: National Cancer Institute., PDQ Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment. <http://cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultAML/Patient>. 05.07.2013.
- [12] Mehta, A.; Hoffbrand, V. *Haematology at a Glance*, 3rd ed.; John Wiley and Sons, Inc., 2009; Part 3.
- [13] Gulati, G.; Heck, S. L.; Ree, A. H.; Gravdehaug, B.; Røsjø, H.; Steine, K.; Bratland, Å.; Hoffmann, P.; Geisler, J.; Omland, T. *Tidsskr. Nor. Lægeforen.* **2013**, *17*, 1832.

- [14] Norsk Elektronisk Legehåndbok 4.3., Akutt myelogen leukemi (AML).
<http://legehandboka.no/blod/pasientinformasjon/blodkreft/akutt-myelogen-leukemi-oversikt-1055.html>. 03.12.2012.
- [15] Lichtman, M. A. *Leukemia* **2007**, *21*, 1137.
- [16] Norsk Legemiddelhåndbok., L2.1.2.8 Cytarabin.
<http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/39318/?ids=39319|39362|328811#i3-9319>. 26.05.2013.
- [17] Norsk Legemiddelhåndbok., L2.1.4.3 Daunorubicin.
<http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/40346/?ids=40347#i40347>.
26.05.2013.
- [18] Norsk Legemiddelhåndbok., L2.1.4 Cytotoksiske antibiotika.
<http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/40188/?ids=40189#i40189>.
26.05.2013.
- [19] Giantris, A.; Abdurrahman, L.; Hinkle, A.; Asselin, B.; Lipshultz, S. E. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1998**, *27*, 53.
- [20] Hoff, D. D. V.; Layard, M. W.; Basa, P.; Jr., H. L. D.; Hoff, A. L. V.; Rozenzweig, M.; Muggia, F. M. *Ann. Intern. Med.* **1979**, *91*, 710.
- [21] Steinherz, L. J.; Steinherz, P. G.; Tan, C. T.; Heller, G.; Murphy, M. L. *JAMA* **1991**, *266*, 1672.
- [22] American Cancer Society., Key statistics about AML.
<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acute-myeloid-aml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-key-statistics>. 12.09.2014.
- [23] Association of the Nordic Cancer Registries, NORDCAN., Kreftstatistikk i Norge - Akutt myelogen leukemi.
http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/NO/PDF/FS_450-578.pdf. 17.12.2014.
- [24] Stapnes, C.; Gjertsen, B. T.; Reikvam, H.; Bruserud, Ø. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 433.
- [25] Laursen, J. B.; Nielsen, J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1663.
- [26] Price-Whelan, A.; Dietrich, L. E. P.; Newman, D. K. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 71.
- [27] Mavrodi, D. V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L. S. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2006**, *44*, 417.
- [28] Chincholkar, S.; Thomashow, L.; Cimmino, A.; Andolfi, A.; Evidente, A. *Microbial Phenazines: Biosynthesis, Agriculture and Health.*; Springer, 2013; Chapter 11.
- [29] Cimmino, A.; Evidente, A.; Mathieu, V.; Andolfi, A.; Lefranc, F.; Kornienko, A.; Kiss, R. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 487.
- [30] Crawford, P. H.; Scamehorn, R. G.; Hollstein, U.; Ryan, M. D.; Kovacic, T. *Chem. Biol. Interact.* **1986**, *60*, 67.

- [31] Chowdhury, G.; Sarkar, U.; Pullen, S.; Wilson, W. R.; Rajapakse, A.; Fuchs-Knotts, T.; Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 197.
- [32] Gonda, M.; Nieves, M.; Nunes, E.; de Ceráin, A. L.; Monge, A.; Lavaggi, M. L.; González, M.; Cerecetto, H. *Med. Chem. Commun* **2013**, *4*, 595.
- [33] Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M. L.; Aravena, M. A.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Azqueta, A.; de Cerain, A. L.; Monge, A.; Bruno, A. M. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *2*, 511.
- [34] Hollstein, U.; Butler, P. L. *Biochemistry* **1972**, *11*, 1345.
- [35] Spicer, J. A.; Gamage, S. A.; Rewcastle, G. W.; Finlay, G. J.; Bridewell, D. J. A.; Baguley, B. C.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1350.
- [36] Pachón, O. G.; Azqueta, A.; Lavaggi, M. L.; de Cerain, A. L.; Creppy, E.; Collins, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Centelles, J. J.; Cascante, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1578.
- [37] Xia, Q.; Zhang, L.; Zhang, J.; Sheng, R.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 919.
- [38] Oftedal, L.; Selheim, F.; Wahlsten, M.; Sivonen, K.; Døskeland, S. O.; Herfindal, L. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 332.
- [39] Cholewiński, G.; Dzierzbicka, K.; Kotodziejczyk, A. M. *Pharmacol. Rep.* **2011**, *63*, 305.
- [40] Peterson, E. A.; Gillespie, D. C.; Cook, F. D. *Can. J. Microbiol.* **1966**, *12*, 221.
- [41] Stevenson, I. L. *Can. J. Microbiol.* **1970**, *16*, 1249.
- [42] Lesley, S. M.; Behki, R. M. *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 1837.
- [43] Xie, Y.; Wright, S.; Shenb, Y.; Du, L. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1277.
- [44] DiSilvestro, P. A.; Ali, S.; Craighead, P. S.; Lucci, J. A.; Lee, Y.-C.; Cohn, D. E.; Spirtos, N. M.; Tewari, K. S.; Muller, C.; Gajewski, W. H.; Steinhoff, M. M.; Monk, B. J. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 458.
- [45] Hay, M. P.; Gamage, S. A.; Kovacs, M. S.; Pruijn, F. B.; Anderson, R. F.; Wilson, A. V. P. W. R.; Brown, J. M.; Denny, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *46*, 169.
- [46] Hollstein, U.; Mock, D. L.; Sibbitt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *33*, 2987.
- [47] Pietra, S.; Bettinetti, G. F.; Albin, A.; Minoli, G. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1977**, *13*, 1263.
- [48] Hanson, A. W. *Acta Cryst.* **1967**, *B24*, 1084.
- [49] Dhareshwar, S. S.; Stella, V.; Borchardt, R.; Hageman, M.; Oliyai, R.; Maag, H.; Tilley, J. *Prodrugs: Challenges and rewards.*; Springer New York, 2007; Chapter 3.2.
- [50] Swan, G. A.; Felton, D. G. I. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds: Phenazines*; Interscience Publishers, Inc., 1957; Part I.

- [51] González, M.; Cerecetto, H.; Monge, A. *Top. Heterocycl. Chem.* **2007**, *11*, 179.
- [52] Kobayashi, Y.; Kumadaki, I.; Sato, H.; Sekine, Y.; Hara, T. *Org. Synth.* **1974**, *22*, 2097.
- [53] Albini, A.; Pietra, S. *Heterocyclic N-Oxides*; John Wiley and Sons, Inc., 1991.
- [54] Merz, V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, *19*, 725.
- [55] Wohl, A.; Aue, W. *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2442.
- [56] Wang, D. Z. *Comprehensive organic name reactions and reagents*; John Wiley and Sons, Inc., 2009; Volum 3.
- [57] Issidorides, C. H.; Atfah, A.; Sabounji, J. J.; Sidani, A. R.; Haddadin, M. J. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 217.
- [58] Sawhney, S. N.; Boykin, D. W. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1979**, *16*, 397.
- [59] Bamberger, E.; Ham, W. *Liebigs Ann. Chem.* **1911**, *82*, 382.
- [60] Emoto, T.; Kubosaki, N.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 355.
- [61] Maiti, D.; Fors, B. P.; Henderson, J. L.; Nakamura, Y.; Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 57.
- [62] Winkler, J. D.; Twenter, B. M.; Gendrineau, T. *Heterocycles* **2012**, *84*, 1345.
- [63] Challand, S. R.; Herhert, R. B.; Holliman, F. G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1970**, *1*, 1423.
- [64] Vivian, D. L.; Hartwell, J. L.; Waterman, H. C. *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 1641.
- [65] Pachter, I. J.; Kloetzel, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4958.
- [66] Yang, B. H.; Buchwald, S. L. *J. Organomet. Chem.* **1998**, *576*, 125.
- [67] Hartwig, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046.
- [68] Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *16*, 5969.
- [69] Beifuss, U.; Tietze, M. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *244*, 77.
- [70] Pietra, S.; Bettinetti, G. F.; Albini, A.; Minoli, G. *Biochem. J.* **1943**, *37*, 265.
- [71] Lavaggi, M. L.; Nieves, M.; Cabrera, M.; Olea-Azar, C.; de Ceráin, A. L.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5362.
- [72] Haddadin, M. J.; Issidorides, C. H. *Tetrahedron* **1965**, *6*, 3253.
- [73] Youssif, S. *Arkivoc* **2001**, *1*, 242.
- [74] Landquist, J. K. *J. Chem. Soc.* **1953**, *1*, 2816.
- [75] Clemo, G. R.; McIlwain, H. *J. Chem. Soc.* **1938**, *1*, 479.

- [76] Borrero, N. V.; Bai, F.; Perez, C.; Duong, B. Q.; Roccan, J. R.; Jina, S.; Huigens, R. W. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 881.
- [77] Cooper, M. S.; H. Heaney,; Newbold, A. J.; Sanderson, W. R. *Letters* **1990**, *1*, 533.
- [78] Kiss, L. E.; Ferreira, H. S.; Torrao, L.; Bonifácio, M. J.; Palma, N.; da Silva, P. S.; Learmonth, D. A. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *41*, 3396.
- [79] Caron, S.; Do, N. M.; Sieser, J. E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2299.
- [80] Weigele, M.; Leimgruber, W. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 715.
- [81] Undheim, K.; Nordal, V.; Borka, L. *Angew. Chem. Scand.* **1969**, *51*, 2075.
- [82] Ramírez, G. G.; Rubio, M. F. A. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1996**, *25*, 22.
- [83] Katritsky, A. R. *Advances in the heterocyclic chemistry*; Academic Press, 1988; Volum 43; Chapter 4,5.
- [84] Joyner, J. Synthesis of novel heterocyclic N-oxide glycolides: Glycosylation of myxin analogs. M.Sc. thesis, Georgia State University, 2013.
- [85] Yosioka, I.; Kidani, Y. *J. Pharm. Soc. Japan.* **1955**, *1*, 45.
- [86] Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1439.
- [87] Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*, 5th ed.; Wiley-Blackwell, 2010; Chapter 4.
- [88] Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. Background and Detailed Mechanisms*; Elsevier, Inc., 2005.
- [89] Hartwig, J. F. *Organotransition metal chemistry - from bonding to catalysis*; University Science Books, 2010; Chapter 19.
- [90] Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 27.
- [91] Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4176.
- [92] Martin, R.; Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1461.
- [93] Galardon, E.; Ramdeehul, S.; Brown, J. M.; Cowley, A.; Hii, K. K.; Jutand, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1760.
- [94] Fors, B. P.; Watson, D. A.; Biscoe, M. R.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13552.
- [95] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press, Inc., 2012.
- [96] Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522.
- [97] Edwards, O. E.; Gillespie, D. C. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *40*, 4867.
- [98] Leimgruber, W.; Weigele, M. Alkylation of iodinin. Patent US 3929790, 30.12.1975.

- [99] Yoshioka, I.; Kidani, Y. *J. Pharm. Soc. Japan.* **1952**, *72*, 847.
- [100] Alonso, A. M.; Horcajada, R.; Groombridge, H. J.; Chudasama, R.; Motevalli, M.; Utley, J. H. P.; Wyatt, P. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2832.
- [101] Leimgruber, W.; Weigele, M. 1-acylated-6-methoxyphenazine-5,10-dioxides. Patent US 3530130, 22.09.1975.
- [102] Sigg, H. P.; Toth, A. *Helv. Chim. Acta.* **1967**, *50*, 716.
- [103] Sambale, C.; Kula, M. R. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1987**, *9*, 251.
- [104] Iwasawa, T.; Tokunaga, M.; Obora, Y.; Tsuji, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6554.
- [105] Corey, E. J.; Borrer, A. L.; Fogl, T. *J. Org. Soc.* **1965**, *30*, 288.
- [106] Maerker, G.; Case, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2745.
- [107] Swan, G. A. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Phenazines*; John Wiley and Sons, Inc., 2009.
- [108] Katritzky, A. R.; Ramsden, C. A.; Joule, J. A.; Zhdankin, V. V. *Handbook of heterocyclic chemistry*, 3rd ed.; Elsevier, 2010; Chapter 3.2, 3.4.
- [109] Pohanish, R. P.; Greene, S. A. *Wiley Guide to Chemical Incompatibilities*; John Wiley and Sons, Inc., 2009.
- [110] Harwood, L. M.; Moody, C. J.; Percy, J. M. *Experimental Organic Chemistry: Standard and Microscale*, 2nd ed.; Blackwell Publishing, 1999.
- [111] Sousa, C.; Silva, P. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 5195.
- [112] Jeffrey, G. A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press, 1997; Chapter 1.
- [113] Ray, P. C.; Mittapelli, V.; Rohatgi, A.; Tyagi, O. D. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 2861.
- [114] Kleiböhmer, W. *Environmental Analysis*; Elsevier, 2001; Volum 3; Chapter 3.
- [115] Bylina, G. S.; Dzhemilev, U. M.; Vostrikov, N. S.; Tolstikov, G. A.; Moiseenkov, A. M.; Semenovskii, A. V.; Shabanov, S. S. *Russ. Chem. Bull.* **1978**, *27*, 387.
- [116] Horspool, W. M.; Lenci, F. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed.; CRC Press, 2003; Chapter 99.
- [117] Shi, X.; Poole, J. S.; Emenike, I.; Burdzinski, G.; Platz, M. S. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, *109*, 1491.
- [118] Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry*, 2nd ed.; Elsevier, 2009; Chapter 4.
- [119] Cohen, T.; Deets, G. L. *J. Org. Chem* **1972**, *37*, 55.
- [120] Boekelheide, V.; Lehn, W. L. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 428.
- [121] Cohen, T.; Song, H.; Fager, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *4*, 237.

- [122] Benkovics, T.; Guzei, I. A.; Yoon, T. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9153.
- [123] Ackaert, O. W.; Graan, J. D.; Capancioni, R.; Pasqua, O. E. D.; Dijkstra, D.; Westerink, B. H.; Danhof, M.; Bouwstra, J. A. *J. Control. Release* **2010**, *144*, 296.
- [124] Warren, J. D.; Miller, J. S.; Keding, S. J.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6576.
- [125] Pennington, M. W.; Byrnes, M. E. *Methods in Molecular Biology. Peptide Synthesis Protocols*; Springer, 1995; Chapter 1.
- [126] Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books, 2006; Chapter 1.
- [127] Sheikh, M. C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7272.
- [128] Gibson, F. S.; Bergmeier, S. C.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3216.
- [129] Bundgaard, H.; Larsen, C.; Thorbek, P. *Int. J. Pharm.* **1984**, *18*, 67.
- [130] Bundgaard, H.; Larsen, C.; Arnold, E. *Int. J. Pharm.* **1984**, *18*, 79.
- [131] Anderson, B. D.; Conradi, R. A.; Knuth, K. E. *Int. J. Pharm.* **1985**, *74*, 67.
- [132] Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [133] Oliveira, M. F.; Lemos, T. L. G.; Mattos, M. C. D.; Segundo, T. A.; Santiago, G. M. P.; Braz-Filho, R. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2002**, *74*, 211.
- [134] Khanum, S. A.; Begum, B. A.; Girish, V.; Khanum, N. F. *Int. J. Biomed. Sci.* **2010**, *6*, 60.
- [135] Janganati, V.; Penthala, N. R.; Madadi, N. R.; Chen, Z.; Crooks, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3499.
- [136] Quasdorf, K. W.; Riener, M.; Petrova, K. V.; Garg, N. K. *J. Am. Chem.* **2009**, *131*, 17748.
- [137] Ragavan, R. V.; Vijayakumar, V.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3852.
- [138] Doyle, M. P.; McKervey, M. A.; Ye, T. *Modern Catalytic Methods for Organic Synthesis with Diazo Compounds: From Cyclopropanes to Ylides*; John Wiley and Sons, Inc., 1998; Chapter 8.
- [139] Norbeck, D. W.; Kramer, J. B. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1988**, *110*, 7217.
- [140] Haigh, D. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5011.
- [141] Shi, G.; Cao, Z.; Cai, W. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5011.
- [142] Yushkova, Y. V.; Chernyak, E. I.; Morozov, S. V.; Grigorev, I. A. *Chem. Nat. Compd.* **2014**, *50*, 827.
- [143] Coufalova, L.; Mrozek, L.; Rarova, L.; Placek, L.; Opatrilova, R.; Dohnal, J.; Kralova, K.; Paleta, O.; Kral, V.; Drasar, P.; Jampilek, J. *Steroids* **2013**, *78*, 435.

- [144] Haines, A. *Methods for Oxidation of Organic Compounds V2: Alcohols, Alcohol Derivatives, Alky Halides, Nitroalkanes, Alkyl Azides, Carbonyl Compounds Hydroxyarenes and Aminoarenes*; Elsevier, 2012; Volum 3; Chapter 3.
- [145] Franzen, V. *Org. Synth.* **1961**, 47, 96.
- [146] Mukaiyama, S.; Inanaga, J.; Yamaguchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, 54, 2221.
- [147] Castle, R. N. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Pyridazines*; John Wiley and Sons, Inc., 2009; Chapter 2.
- [148] Haddadin, M. J.; Zahr, G. E.; Rawdah, T. N.; Chelhot, N. C.; Issidorides, C. H. *Tetrahedron* **1974**, 30, 659.
- [149] Vasil'vitskii, A. E.; Shostakovskii, V. M.; Nefedov, O. M. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1982**, 18, 545.
- [150] Emerson, T. R.; Rees, C. W. *J. Chem. Soc.* **1964**, 435, 2319.
- [151] Tsujibo, H.; Sato, T.; Inu, M.; Yamamoto, H.; Inamori, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, 52, 301.

*“It is not your business to succeed, but to do right.
When you have done so the rest lies with God.”*

- C.S. Lewis