



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Syntese og molekylmodelleringsstudier av noen 1,4,5-trisubstituerte triazolanaloger av combretastatin A-1 og A-4

Synthesis and molecular modeling studies of some
1,4,5-trisubstituted triazole analogues of
combretastatin A-1 and A-4

Marte Madland Størdal og Sigrid Marie Storum
Kjemi

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved kjemiavdelingen på Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Vi vil først og fremst takke våre to veiledere, Professor Yngve Stenstrøm og Professor Trond Vidar Hansen, for god veiledning og for muligheten til å skrive denne spennende oppgaven.

Takk til overingeniør Anne Gravdahl for bestilling av kjemikalier, forsker Jens Nolsøe (Ph.D) og stipendiatene Ida, Harrison (Ph.D) og Simen for gode tips og råd og for å skape en god stemning i hverdagen.

Takk til Professor Dag Ekeberg for å ha utført HRMS analyser.

I tillegg vil vi takke Ingebrigt Sylte og Kurt Kristiansen ved Universitetet i Tromsø for god hjelp til å modellere forbindelsene våre og ansatte ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo for opptak av NMR-spekter.

Ås, desember 2016

Marte Madland Størdal og Sigrid Marie Storum

Sammendrag

Combretastatin A-1 og A-4 er naturprodukter som viser potent anticancer aktivitet. Naturproduktene har antivaskulær effekt, samt cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet. CA-1 og CA-4 har lav vannløselighet og kan gjennomgå *cis-trans* isomerisering av dobbeltbindingen mellom de to aromatiske ringene noe som resulterer i mindre aktive forbindelser. Det er derfor av interesse å syntetisere analoger av disse forbindelsene.

I dette masterprosjektet var målet å syntetisere 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av CA-1 og CA-4 med en karboksylsyre i posisjon 4. Karboksylsyren kan videre omgjøres til et salt og vil forhåpentligvis gjøre analogene mer vannløselig.

Det ble forsøkt å syntetisere ti combretastatinanaloger med en 1,2,3-triazolring.

Først ble en "one-pot" metode forsøkt uten at dette resulterte i ønsket produkt. Det ble dermed utviklet en ny metode for syntese av målforbindelsene. Metoden beskrevet i denne oppgaven inkluderer dannelse av imin, en Knoevenagel kondensasjon og en Huisgen 1,3-dipolar sykloddisjon av et alken og et azid etterfulgt av en hydrolyse av karboksylat til karboksylsyre.

Seks av de ti forbindelsene ble syntetisert i oppgaven og er sendt til biologisk testing.

Abstract

Combretastatin A-1 and A-4 are natural products that show potent anticancer activity. The natural products display vascular disrupting activity as well as cytotoxic and tubulin inhibitor effects. Several analogues have been reported in an effort to overcome difficulties of CA-1 and CA-4 which consist of low water solubility and *cis-trans* isomerization of the double bond connecting the two aromatic rings, resulting in less active isomers.

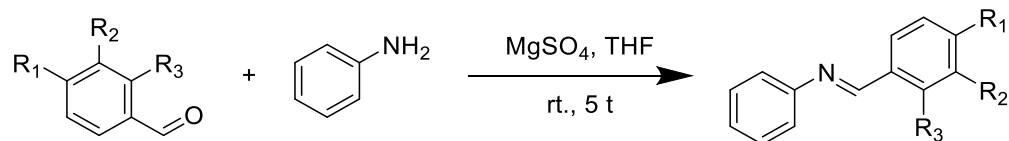
The aim of this master thesis was to prepare 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazole analogues of CA-1 and CA-4, with a carboxylic acid in the 4-position. The carboxylic acid will enable salt formation that may lead to more water-soluble compounds.

In this thesis, an attempt was made to synthesize ten combretastatin analogues with a 1,2,3-triazole ring.

A one-pot procedure was first attempted without success, thus a new method for the synthesis of the target compounds was developed. The method described in this thesis includes an imine formation, a Knoevenagel condensation and a Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of an alkene and azide followed by a hydrolysis of the carboxylate to the carboxylic acid.

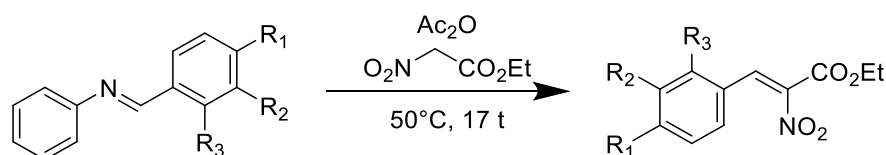
Out of the ten compounds, six obtained products have been submitted to biological testing.

Grafisk sammendrag



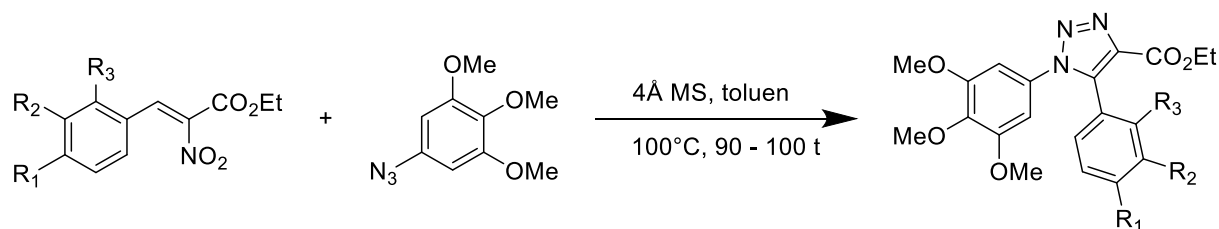
- 41: $R_1=R_2=R_3=H$
 44: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 47: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 50: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 53: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 56: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 59: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$

- 42: $R_1=R_2=R_3=H$
 45: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 48: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 51: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 54: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 57: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 60: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$



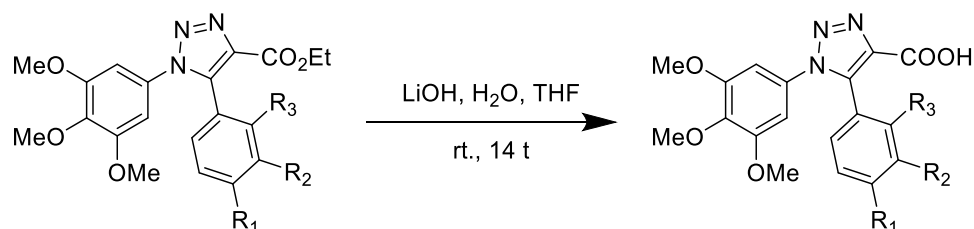
- 42: $R_1=R_2=R_3=H$
 45: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 48: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 51: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 54: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 57: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 60: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$

- 43: $R_1=R_2=R_3=H$
 46: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 49: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 52: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 55: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 58: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 61: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$



- 43: $R_1=R_2=R_3=H$
 46: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 49: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 52: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 55: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 58: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 61: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$

- 71: $R_1=R_2=R_3=H$
 72: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 73: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 74: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 75: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 76: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$
 77: $R_1=OMe, R_2=NO_2, R_3=H$



- 71: $R_1=R_2=R_3=H$
 72: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 73: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 74: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 75: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 76: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$

- 22: $R_1=R_2=R_3=H$
 23: $R_1=OMe, R_2=R_3=H$
 24: $R_1=R_2=OMe, R_3=H$
 25: $R_1=R_2=R_3=OMe$
 26: $R_1=OMe, R_2=F, R_3=H$
 27: $R_1=OMe, R_2=R_3=F$

Forkortelser

BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-metylphenol
CA-1	Combretastatin A-1
CA-1P	Fosfatprodrug combretastatin A-1
CA-4	Combretastatin A-4
CA-4P	Fosfatprodrug av combretastatin A-4
CuCCA	Kobberkatalysert sykloaddisjon
DAMA-kolkisin	<i>N</i> -deacetyl- <i>N</i> -(2-mercaptoacetyl)-kolkisin
DIPEA	Diisopropyletylamid
DMF	Dimetylformamid
DMSO	Dimetylsylfoksid
GDP	Guanosin difosfat
GTP	Guanosin trifosfat
IC ₅₀	Konsentrasjon som inhiberer 50 % av en gitt biologisk prosess
ICM	“Internal Coordinate Mechanics”
MBA	Mikrotubuli bindingsagent (“Microtubuli Binding Agent”)
R _t	Romtemperatur
RuCCA	Ruteniumkatalysert sykloaddisjon
S _{mp}	Smeltepunkt
TBA	Tubulinbindende forbindelse (“Tubulin Binding Agent”)
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tynnsljikt-kromatografi (“Thin Layer Chromatography”)
VEGF	Vaskulær endotel vekstfaktor (“Vascular endothelial growth factor”)
VEGFR-2	Vaskulær endotel vekstfaktor reseptor (“Vascular endothelial growth factor receptor”)
VLS	“Virtual Ligand Screening”

Generelle bemerkninger

IUPAC-nomenklatur er i størst mulig grad brukt for navnsetting av forbindelser. For alle tallverdier benyttes punktum i stedet for komma. Eksempelvis 5.6 fremfor 5,6. Teksten er i "Times New Roman", skriftstørrelse 12 og linjeavstand 1.15. Strukturer er tegnet i ChemDraw Professional 15.0.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Grafisk sammendrag	IV
Forkortelser	V
Generelle bemerkninger	VI
1 Innledning	1
1.1 Naturprodukter	1
1.1.1 Combretastatiner	1
1.2 Kreft	2
1.2.1 Cellegift	3
1.3 Biologisk aktivitet av CA-1 og CA-4	3
1.3.1 Tubulininhibitor	3
1.3.2 Cytotoksisk aktivitet	5
1.3.3 Antivaskulær og antiangiogenetisk aktivitet	5
1.3.4 Kliniske studier	6
1.4 Analoger av CA-1 og CA-4	8
1.4.1 Ring A modifikasjoner	8
1.4.2 Bro-modifikasjoner	9
1.4.3 Ring B modifikasjoner	11
1.5 Molekylmodellering	12
1.5.1 Kvantemekanisk og molekylmekanisk modell	12
1.5.2 Dokking og scoring	12
1.6 Kjemisk bakgrunn	13
1.6.1 Triazoler	13
1.6.2 Knoevenagel kondensasjon	14

1.6.3	Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjon.....	15
1.6.4	Tidligere synteser av substituerte triazolanaloger av combretastatin.....	21
1.7	Mål og bakgrunn for oppgaven	23
2	Resultater og diskusjon	24
2.1	Molekylmodellering	24
2.2	Syntese av 3,4,5-trimetoksifenylazid.....	29
2.3	Syntese for beskyttelse av (Z)-nitroakrylat 35 og 37	29
2.3.1	Syntese av 3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd.....	29
2.3.2	Syntese av 2,3-bis((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd.....	30
2.4	Syntese av 4-metoksi-2,3-dinitrobenzaldehyd	30
2.5	Syntese av etyl(Z)-2-nitro-3-fenylakrylat	31
2.6	Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat	32
2.7	Syntese av etyl(Z)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat og etyl(E)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	34
2.8	Syntese av etyl(Z)-3-(2,3,4-trimetoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	35
2.9	Syntese av etyl(Z)-3-(3-fluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	37
2.10	Syntese av etyl(Z)-3-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	38
2.11	Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-2-nitroakrylat	39
2.12	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-2,3-dinitrofenyl)-2-nitroakrylat.....	41
2.13	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	41
2.14	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(2,3-bis((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	42
2.15	Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	43
2.16	Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre.....	44
2.17	Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre.....	46

2.18	Syntese av 5-(2,3,4-trimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre.....	47
2.19	Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre.....	49
2.20	Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre.....	50
2.21	Forsøk på syntese av 5-(3-amino-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat.....	52
2.22	Forsøk på syntese av 5-(3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat.....	53
2.23	Forsøk på syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat	54
2.24	Forsøk på syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat	54
3	Konklusjon.....	56
3.1	Videre studier	56
4	Eksperimentelt	57
4.1	Generelt	57
4.2	Molekylmodellering	58
4.3	Syntese av 3,4,5-trimetoksifenylazid.....	58
4.4	Metode for beskyttelse av hydroksisubstituert benzaldehyd.....	60
4.4.1	Syntese av 3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd.....	60
4.4.2	Syntese av 2,3-bis((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd.....	60
4.5	Syntese av 4-metoksi-2,3-dinitrobenzaldehyd	61
4.6	Generell metode for (<i>Z</i>)-fenylakrylat og (<i>Z</i>)-nitroakrylat.....	62
4.6.1	Syntese av etyl(<i>Z</i>)-2-nitro-3-fenylakrylat.....	62
4.6.2	Syntese av etyl(<i>Z</i>)-3-(4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat	64
4.6.3	Syntese av etyl(<i>Z</i>)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat og etyl(<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat	66
4.6.4	Syntese av etyl(<i>Z</i>)-3-(2,3,4-trimetoksifenyl)-2-nitroakrylat	69

4.6.5	Syntese av etyl(Z)-3-(3-fluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat	71
4.6.6	Syntese av etyl(Z)-3-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat	73
4.6.7	Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-2-nitroakrylat.....	76
4.6.8	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-2,3-dinitrofenyl)-2-nitroakrylat	78
4.6.9	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat.....	79
4.6.10	Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(2,3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oksi-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat	79
4.7	Generell metode for fremstilling av 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylat	80
4.7.1	Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat.....	80
4.7.2	Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	82
4.7.3	Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	85
4.7.4	Syntese av 5-(2,3,4-trimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	87
4.7.5	Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	90
4.7.6	Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	92
4.7.7	Syntese av 5-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat	95
4.7.8	Forsøk på syntese av 5-(3-((<i>tert</i> -butyldimetylsilyl)oxy)-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre	97
4.8	Forsøk på syntese av 5-(3-amino-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat.....	98
4.9	Generell metode for fremstilling av 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre	99
4.9.1	Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre	99

4.9.2	Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	101
4.9.3	Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	104
4.9.4	Syntese av 5-(2,3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	106
4.9.5	Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	109
4.9.6	Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre	111
4.10	Forsøk på syntese 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazoler.....	114
4.10.1	Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat.....	114
4.10.2	Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylylat	115
5	Referanser	116

1 Innledning

1.1 Naturprodukter

Det har lenge vært kjent at naturprodukter og deres derivater har mange bruksområder innen medisin, farmasi og biologi. Naturprodukter kan isoleres ut fra blant annet planter og mikroorganismer. Disse kan bli brukt til å syntetisere strukturanaloger med bedre farmakologisk aktivitet og færre bivirkninger enn den opprinnelige forbindelsen.¹

Naturprodukter kan deles inn i to klasser: primære og sekundære metabolitter. Karbohydrater, proteiner, fett og nukleinsyrer er eksempler på primære metabolitter. Disse er essensielle i alle organiske forbindelser og trengs for å vokse, leve og reprodusere. Med noen unntak, har primære metabolitter samme biosyntese i alle organismer til tross for diversiteten. Eksempler på disse syntesene er glykolysen og sitronsyresyklusen for karbohydrater og β -oksidasjon av fettsyrer. Produktene av disse biosyntesene er ofte startmolekyler i biosyntesen til sekundære metabolitter. I tillegg danner de energi og andre nødvendige molekyler i cellen.²

Sekundære metabolitter er i motsetning til primære metabolitter mer spesifikke i hver organisme. Noen molekyler, som fett og sukker, kan dog havne under begge klassene. Sekundære metabolitter spiller en viktig rolle blant annet i plantenes forsvar og tilvenning til miljøet. Eksempler på sekundære metabolitter er alkaloider, glykosider, fenoler, terpenener og terpenoider. Planter, bakterier, sopp og marine organismer er kjente kilder til sekundære metabolitter. De sekundære metabolittene har en komplisert kjemisk struktur. Dette gjør at de er interessante som utgangsmateriale for ulike medisiner i farmasøytisk industri, i kjemisk industri, materstatninger og kosmetikk. Mange sekundære metabolitter har viktige effekter som antibakterielle, anticancer eller kolesterol-hemmende funksjoner.³ Tilgjengelighet og konsentrasjon av disse metabolittene i naturen er ofte begrenset. Som følge av dette er det stor interesse for å finne mulige synteseveier, da flere viser biologisk aktivitet utenfor organismen.²

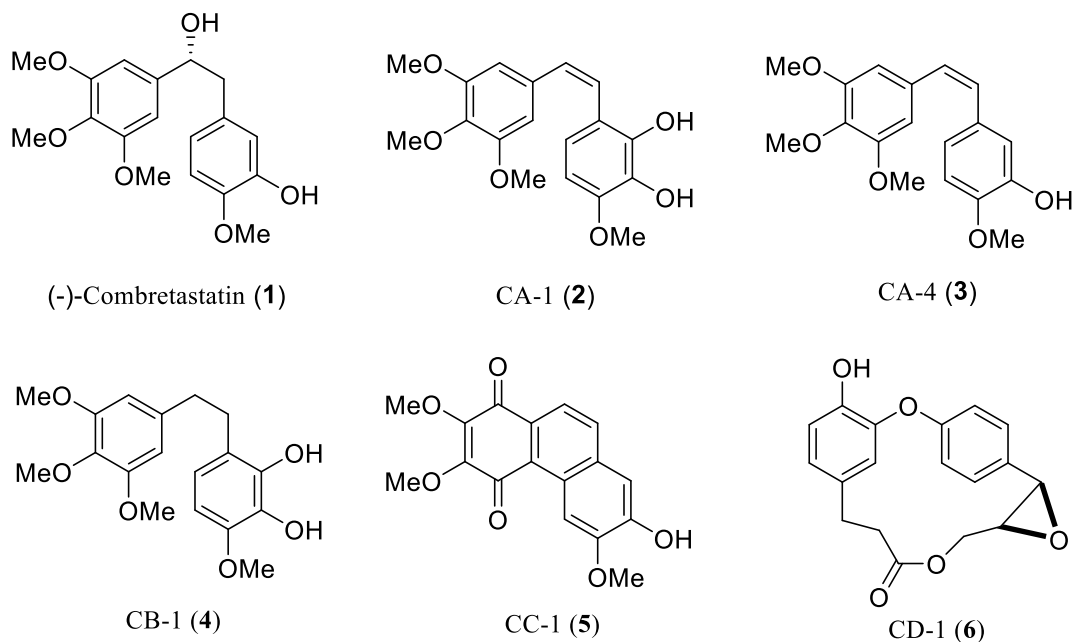
Et eksempel på sekundære metabolitter er combretastatin.¹

1.1.1 Combretastatiner

Combretastatiner er antimitotiske forbindelser som ble isolert for første gang fra barken til treet *Combretum cafferum* i 1982.^{4,5}

Combretastatin består av to substituerte benzenringer som er bundet sammen ved en mettet, hydroksisubstituert bro. Figur 1.1 viser den første isolerte forbindelsen av combretastatin, (-)-Combretastatin (**1**), som da hadde ukjent stereokjemi. I 1987 ble det fastslått *R*-konfigurasjon for det stereogene senteret.⁶ Combretastatinene deles inn i A, B, C og D-serier etter deres

strukturelle oppbygninger. A-serien består av *cis*-stilbener, B-serien av dihydrostilbener, C-serien av quioner og D-serien består av makrosykliske laktoner. Figur 1.1 gir en oversikt over utvalgte combretastatiner.



Figur 1.1 De ulike seriene av combretastatiner og deres strukurelle oppbygging.

En ulempe med CA-1 (2) og CA-4 (3) som mulig legemiddel er lav vannløselighet og isomerisering til den termodynamisk mer stabile, men mindre aktive *trans*-isomereren. De kan også danne ringslutning slik at fenantrensysteget dannes, som i CC-1 (5). Syntese og biologisk aktivitet av ulike combretastatinanaloger låst i *cis*-konfigurasjon er rapportert.^{7,8}

1.2 Kreft

Kreft er fellesbetegnelsen for en familie av sykdommer som oppstår innenfor en enkeltcelle som et resultat av akkumulasjon av muteringer innen DNA av den cellen. Når disse muteringene forekommer innenfor nøkkelgener kan det lede til ukontrollert celledeling. Etterhvert kan disse også spre seg til nye metastaser (datterkreftceller) andre steder i kroppen. Cellevekst og celledeling er en nøye regulert prosess som er avhengig av en presis interaksjon av flere regulatoriske faktorer. Kreft representerer en endring i disse reguleringsmekanismene hvor noen av de normale begrensningene ved cellevekst og celledeling forsvinner.⁹

1.2.1 Cellegift

Cellegift, eller cytostatika, sin funksjon er å drepe kreftceller så effektivt som mulig uten å samtidig ødelegge kroppens normale celler. Cellegift fungerer ved å ødelegge cellens evne til å dele seg og ved å påvirke cellenes dannelse av nødvendige proteiner. For mange av stoffene er det viktigste angrepsmålet DNA. Noen stoffer hemmer eller forhindrer syntesen av DNA, mens andre ødelegger strukturen til DNA.¹⁰ Et stort problem med konvensjonell cellegift er mangelen på selektivitet mot kreftcellene i forhold til normale celler. Nyere forskning retter søkelyset mot spesifikke gener, proteiner og reseptorer som regulerer vekst og overlevelse av kreftsvulster.¹¹

1.3 Biologisk aktivitet av CA-1 og CA-4

Biologiske studier har vist at combretastatiner har sterke cytotoxiske egenskaper testet opp mot flere ulike kreftcellerlinjer.¹² De mest studerte analogene, CA-1 og CA-4 har vist å hemme tubulinpolymeriseringen og påvirker dermed blodforsyningen til cellen. Sammen med de korresponderende prodrugene CA-1P og CA-4P har de gitt ny inngangsvinkel til kreftbehandling.^{12,13}

1.3.1 Tubulininhibitor

Dynamikken til tubulin gjør det til et interessant mål for cellegift.¹⁴ Flere hundre syntetiske eller semisyntetiske tubulininhibitorer har blitt oppdaget i nyere tid. De fleste tubulininhibitorer stammer fra naturprodukter som kolkisin, vinblastin og Taxol[®]. Disse naturproduktene har dog noen begrensinger. Kolkisin (7) er giftig og Taxol[®] er lite vannløselig. Det har derfor blitt syntetisert analoger basert på disse naturproduktene. De ulike inhibitorene binder seg til ulike reseptorer i tubulin. Tubulin er byggesteinene i mikrotubuli.¹⁵

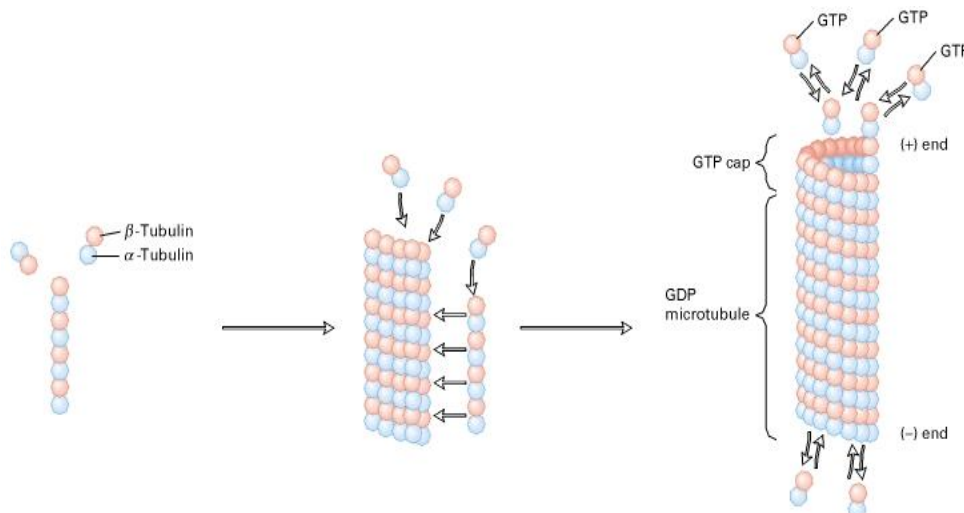
1.3.1.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli er essensielle under mitose og meiose og er derfor blitt et mål for ulike typer kreftmedisiner.¹⁶ Sammen med actinfilamentene og de intermediære filamentene utgjør de cytoskjelettet i eukaryote celler.¹⁷

Mikrotubuli er et komplekst, dynamisk protein som er tilstede i alle celler. Den har blant annet i oppgave å styrke cellen slik at den får struktur og form, samt transportere molekyler og organeller inne i cellen.¹⁸ Mikrotubuli bindingsagenter (MBA) er mye brukt innen cellegift. Det finnes to klasser av MBA; (1) de som gjør mikrotubuli ustabil og fremmer depolymerisering, og (2) de som gjør mikrotubuli stabilt og fremmer polymerisering. Resultat av begge disse klassene er celledød. Depolymeriseringsforbindelser har vist seg å binde til kolkisin bindingssete lokalisert på β -subenheten i nærheten av α -subenheten på tubulindimeren.¹⁹

1.3.1.2 Dannelse av mikrotubuli

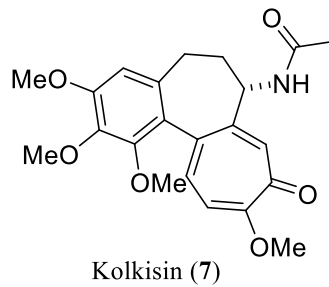
Inne i hver celle som har cellekjerne eksisterer det to sfæriske proteiner α - og β -tubulin. Det er en viss homologi mellom tubulin i ulike arter. De to proteinene binder seg sammen ved ikke-kovalente bindinger og danner en heterodimer som vist i Figur 1.2-1).¹⁷ Til denne heterodimeren er det bundet to energirike molekyler av guanosin trifosfat (GTP). GTP på α -monomeren regnes som en del av heterodimerens struktur da den er fanget og kan ikke hydrolyseres til GDP slik den på β -monomeren kan. Heterodimeren, ved 37 °C og GTP tilstede, danner en “hode-til-hale” ordning mellom α -monomeren og β -monomeren og resultatet blir protofilamenter som vist i Figur 1.2-1). Disse protofilamentene danner den rørlignende formen til mikrotubuli, vist i Figur 1.2-2), som inneholder rundt 12 eller 13 protofilamenter. Mikrotubuli er i konstant likevekt, der heterodimeren adderes på den ene enden av mikrotubuli, kalt pluss-enden. I den andre enden, minus-enden, forlater heterodimeren mikrotubuli, se Figur 1.2-3). Med denne likevekten blir lengden til mikrotubuli nøye kontrollert som er viktig for flere av dens funksjoner i cellen.



Figur 1.2 f.v: 1) Dannelse av heterodimeren og protofilamenter, 2) Dannelse av rørformen til mikrotubuli, 3) Likvekten til mikrotubuli.⁷

1.3.1.3 Kolkisin bindingssete

Kolkisin (**7**) har lenge vært assosiert med mikrotubuler og er en vanlig tubulinbindende agent (TBA) som depolymeriserer dannelse av mikrotubuli.¹⁸ Kolkisin er et trisyklisk alkaloid som først ble isolert fra *Colchicum autumnale* i 1820. Kolkisin er mye brukt til behandling mot urinsyregikt og Bechets sykdom.²⁰ Studier av kolkisin har ført til en bedre forståelse rundt forbindelsene som binder seg til tubulin.²¹



Figur 1.3 Strukturen til kolkisin.

Et annet naturprodukt som har vist seg å være en depolymeriserende forbindelse er combretastatiner og analoger av disse. I tillegg til å vise cytotoxisk aktivitet og påvirke blodforsyningen, blir ikke CA-4 gjenkjent av membranproteiner som holder ukjente molekyler utenfor cellen.¹⁸

1.3.2 Cytotoxisk aktivitet

Å finne forbindelser med økt cytotoxisk aktivitet er fortsatt et viktig mål ved utforskningen av nye anticancerforbindelser.¹ Cytotoxisiteten forteller noe om hvor giftig en forbindelse er for de aktuelle cellene. I farmakologi og ved utvikling av nye potensielle anticancerforbindelser er de første biologiske testene som utføres cytotoxiske tester. De aktuelle forbindelsene blir da testet mot ulike kreftceller *in vitro*. Resultatene fra disse studiene oppgis ofte i IC₅₀-verdier som forteller hvor mye av forbindelsen som er nødvendig for at halvparten av cellene skal nå nekrose. Flere studier har vist at CA-1 og CA-4 innehar cytotoxisk aktivitet mot noen cellelinjer, men CA-4 har vist å ha cytotoxisitet overfor flere.^{4,8,22-25} De har IC₅₀-verdier i nanomolarskala. Cytotoxisk aktivitet forteller lite om mekanismen til hvordan en forbindelse ødelegger celler og ytterligere biologiske tester er nødvendig.²³

1.3.3 Antivaskulær og antiangiogenetisk aktivitet

Det har blitt vel etablert at for at en tumor skal overleve og bli av relevant størrelse må den ha et godt blodforsyningssystem.^{26,27} Endotelceller lager et tilpasningsdyktig blodforsyningssystem for hver enkelt celle og får dermed oksygen og næringsstoffer inn til cellen. Det finnes to måter man kan forstyrre blodtilførselen til cellen på; (1) ved å inhibere dannelse av nye blodkar (antiangiogenese) eller (2) ødelegge allerede eksisterende blodkar og indusere sekundær celledød (antivaskulær aktivitet).^{26,28}

Angiogenese er vekst av blodårer ut fra eksisterende blodkar og er noe alle celler trenger for å få næring og metabolitter. Man kan enten stimulere eller inhibere angiogenese. Antiangiogenese er av stor interesse innen kreftmedisin.²⁹

Det finnes to måter å påvirke allerede eksisterende blodkar på. (i) De som bruker antistoffer og peptider for å levere virkestoff som induserer apoptose inn til tumorendotelet.²¹ Her oppstår det et behov for å identifisere antistoffer og peptider som kan angripe og kjenne igjen spesifikke determinanter som blir uttrykt i tumorcellen. Den andre måten (ii) er ved at forbindelser med lav molekylvekt ikke lokaliserer tumorendotelet, men oppfatter forskjellen mellom normale endoteler og tumorendoteler og utnytter denne forskjellen.²⁶ Forskjellene er blant annet ulikt genuttrykk, krav til vekstfaktorer og at tumorceller har en defekt barriere til plasmaproteiner.³⁰ Under den sistnevnte (ii) finner man tubulinbindende forbindelser (TBA). TBA endrer på strukturen eller hindrer dannelse av mikrotubuli i endotelcellene ved å binde seg mellom α - og β -subenheten i tubulin. Etter behandling med TBA vil dattercellene til endotelcellene endre form som en konsekvens av alternanser i cytoskjelettet. Denne endringen fører igjen til en endring i blodtilførselen til cellen, som fører til at cellen dør av oksygenmangel.²⁶

Kolkisin var den første tubulinbindende forbindelsen som viste antivaskulær aktivitet da den ødela nydannede kapillærer i tumorer. På grunn av en dårlig farmakokinetisk profil, krav til høy konsentrasjon og høy toksisitet ble studiene avsluttet. Fire personer fikk så store doser av kolkisin at de fikk toksiske symptomer og to av disse pasientene døde. I de to andre pasientene så man tydelig rask nekrose og degradering i tumoren i løpet av få dager. Denne observasjonen vet man i dag at skyldes vaskulær ødeleggelse inne i tumoren.^{21,27} I de senere år har combretastatiner, som har strukturell likhet med kolkisin, vist seg å ha liknende effekter.²⁷

Combretastatin A-1 og A-4 og analoger av disse er en relativt ny klasse som viser antivaskulær aktivitet, men som også har, sammen med taxaner og vinca-alkaloider, vist seg å ha antiangiogenetisk effekt.³¹ Det er likevel utført alt for få studier rundt cytotoxisiteten og bivirkningene denne behandlingen har til at man kan trekke generelle konklusjoner.³²

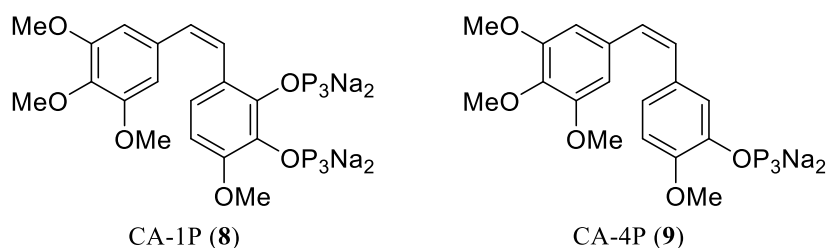
Nylige studier utført av Su og medarbeidere³¹ viser som tidligere nevnt, at CA-4 kan ha en antiangiogenetisk effekt ved å interagere med vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF). Denne faktoren stimulerer en rekke steg i tumoren sin angiogenese, inkludert overlevelse av endotelialcellene, spredning, migrasjon og invasjon. En antiangiogenetisk effekt vil være direkte korrelert med en eller flere av de overnevnte stegene, da VEGF binder seg til VEGFR-2. VEGFR-2 er en reseptor på overflaten av endotelialcellen som blir aktivert ved interaksjon mellom VEGF og VEGFR-2. Ved å forstyrre denne interaksjonen, vil det forhindre fosforylering av reseptoren som igjen vil føre til en kaskadereaksjon der promotoren til angiogenese ikke vil bli aktivert og følgelig vil ikke angiogenese finne sted.

1.3.4 Kliniske studier

Som denne oppgaven beskriver er det gjort mange forsøk på å bedre den farmakokinetiske profilen til combretastatin. Et av de mer vellykkede forsøkene har vært å innføre en eller to fosfatgrupper i henholdsvis CA-1 og CA-4. Dette løser vannløselighetsproblemet ved CA-1 og CA-4.³³ Studier utført på både mus og mennesker viser til at fosfatgruppen raskt blir

defosforylert til den aktive CA-4 forbindelsen, som blir distribuert bredt og konjugerer videre med glukonsyre.³⁴

Det har blitt utført kliniske studier på begge analogene, både alene og i kombinasjon med andre cytostatika. CA-1P (**8**) og CA-4P (**9**) sin anticancereffekt fungerer ved å angripe blodkarene til kreftsvulsten, som fører til at svulsten mister oksygen og essensielle næringsstoffer. Grunnet selektiviteten til disse antivaskulære forbindelsene vil kreftcellene som får forsyning av næringsstoffer fra nærliggende normalt vev, ikke bli ødelagt. Dette er i kontrast til de antiangiogenetiske forbindelsene som påvirker nydannelse av blodkar og dermed hindrer vekst av svulsten og begrenser metastase.³⁵ Av den grunn er de videre kliniske studiene fokusert på kombinasjonsstudier med CA-1P og CA-4P sammen med andre behandlingsmetoder som konvensjonell cellegift, stråling eller nyere antiangiogenetiske forbindelser.^{33,34}

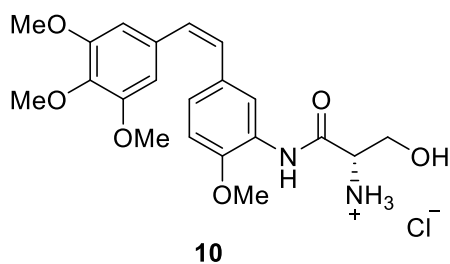


Figur 1.4 Fosfatprodrug CA-1P og CA-4P.

CA-4P som går under navnet Zybrestat[®] undergår for tiden to ulike kombinasjonsstudier mot livmorhalskreft og én mot glioblastom. Difosfatanalogen av CA-1 går under navnet OXi4503 og er nå inne i fase 2 av kliniske studier mot akutt myelogen leukemi (AML) i en kombinasjon med cytostatikumet Cytarabine.

Bivirkninger av disse fosfatanalogene av combretastatiner har vært akutte smerter, hypertensjon, kvalme, hodepine og utmattelse.³⁵

Andre combretastatinanaloger som har blitt klinisk studert er blant annet AVE8062 (Ombrabulin[®]) (**10**). Flere kliniske studier av Ombrabulin[®] er blitt utført i kombinasjon med ulike typer cytostatika hvor det til nå ikke er observert signifikante forskjeller på pasienter som er blitt behandlet med Ombrabulin[®] og pasienter med placebo.³⁶

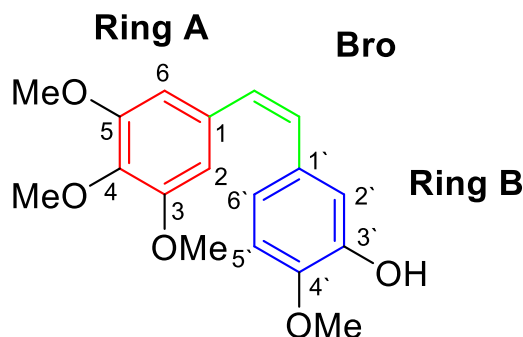


Figur 1.5 Combretastatinanalogen AVE8062 (Omrabulin®).

1.4 Analoger av CA-1 og CA-4

Combretastatinenes grunnstruktur er enkel og karakteristisk. Utallige analoger av CA-1 og CA-4 er blitt rapportert i forsøk på å etterligne effekten av combretastatinene. Et utvalg av disse vil bli presentert i denne oppgaven.

Strukturen til combretastatin kan deles inn i tre deler; en A-ring, en bro og en B-ring. Mange studier har blitt utført hvor alle delene av molekylet har blitt modifisert i forsøk på å oppdage nye potente analoger av combretastatin.⁷



Figur 1.6 De ulike delene av combretastatin A-4; ring A (rød), bro (grønn) og ring B (blå).

1.4.1 Ring A modifikasjoner

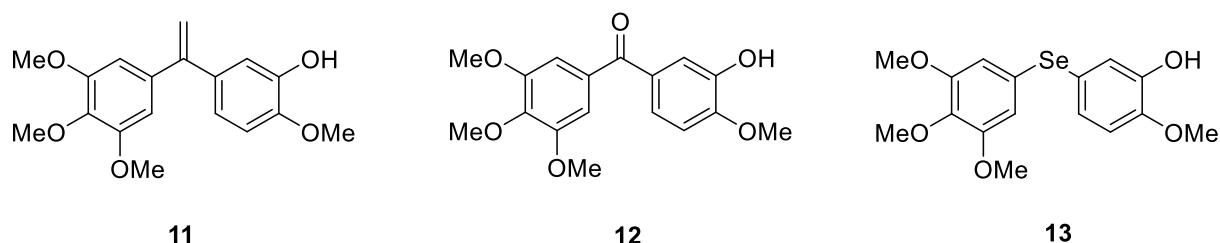
Tidligere studier viser at 3,4,5-trimetoksifenylenheden er nødvendig for den cytotoksiske aktiviteten.⁴ Mens substituentene på B-ringene menes å være essensielle for den biologiske aktiviteten til combretastatinanalogene, er det tenkt at trimetoksifenylenheden i A-ringene fungerer som et anker når det gjelder binding til tubulin. Det er derfor utført lite studier i forsøk på å endre funksjonaliteten i A-ringene, men det finnes noen unntak. Trimetoksifenylenheden er blitt byttet ut med en trimetylenhet som har vist seg å minske cytotoxiciteten, samtidig som den tubulinhemmende effekten beholdes. Den ene metoksigruppen i *meta*-posisjon er blitt

byttet ut med et halogen (F, Br, Cl) noe som førte til litt lavere cytotoxiskitet, men lik tubulinhemmende effekt, sammenlignet med CA-4.⁷

1.4.2 Bro-modifikasjoner

Det er blitt rapportert et stort antall analoger hvor broen har blitt modifisert med tilhørende biologiske studier. Studier utført av blant annet Hamel og medarbeidere^{37,38}, viser til at *cis*-konfigurering av broen gir bedre cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet sammenlignet med *trans*-konfigureringen. CA-4 har en kort biologisk halveringstid og isomeriserer fra den aktive *cis*-isomeren til den inaktive *trans*-isomeren når den utsettes for lys eller varme, eller ved fysiologiske betingelser.³⁹ Flere forsøk på syntese er blitt utført for å låse A- og B-ringen i en *cis*-konfigurering³⁹⁻⁴⁸. En annen faktor som er blitt undersøkt er lengden på broen. Studier viser at når man sammenligner ulike brolengder på analoger med likt substitusjonsmønster, viser to atomer i broen best aktivitet, etterfulgt av ett og tre atomer. Aktiviteten er altså avhengig av et samspill mellom substitusjonsmønsteret på B-ringen og brolengden.⁷

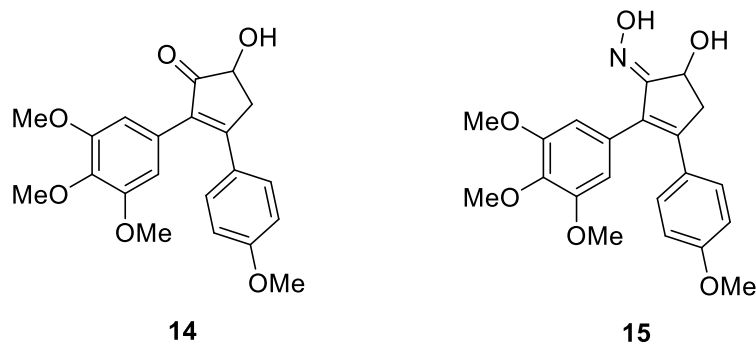
Når det gjelder analoger med ett atom i broen er det *isocombretastatin* A-4 (**11**) og benzophenonanalogen hydroksiphenstatin (**12**) som har generert de beste resultatene med tanke på cytotoxisk aktivitet og tubulinhemmende effekt.^{41,46} Analogene med et svovel- eller selenatom i broen har også blitt syntetisert hvor analog **13** har vist spesielt gode resultater med tanke på cytotoxisk og tubulinhemmende aktivitet.⁴⁹



Figur 1.7 Strukturene av *isocombretastatin* (**11**), hydroksiphenstatin (**12**) og analog med selen i broen (**13**).

Flere studier er blitt utført for å låse A- og B-ringen i en *cis*-konfigurering ved å sette inn en ring i broen. Størrelsen på ringene varierer mellom tre til seks atomer, men det er rapportert flest analoger med fem atomer i ringen.^{7,43}

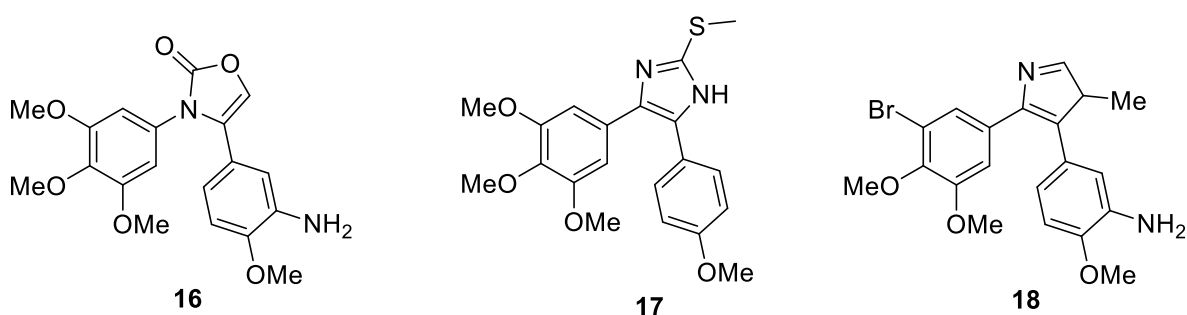
Ikke-heterosykliske analoger som 2,3-diarylsyklopentenon (**14**) har vist potent cytotoxisk aktivitet. Studiene viser også at analogene hvor karbonylgruppen blir byttet ut med en oksimgruppe (**15**) førte til bedre tubulinhemmende aktivitet, sammenlignbar med CA-4.⁵⁰ Videre studier utført på disse to analogene viste at forbindelse **15** viste spesielt god antiangiogenetisk aktivitet. *In vitro* tester av forbindelsen viste cytotoxisk aktivitet ovenfor seks av 16 kreftcellelinjer testet, mens forbindelse **14** kun ga gode resultater mot én av disse.⁵¹



Figur 1.8 Strukturene av 2,3-diarylsykloentenon (**14**) og analogen med en innført oksim-gruppe (**15**).

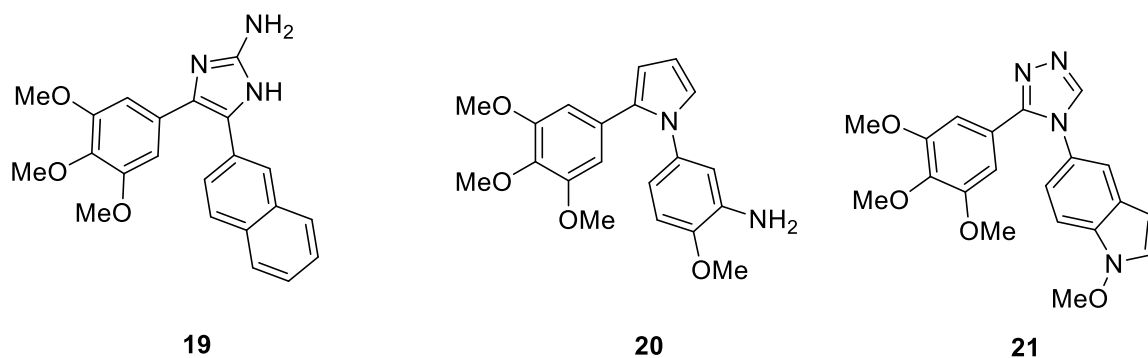
Mange heterosykliske analoger er blitt rapportert hvor flere av dem viser til mindre aktivitet sammenlignet med CA-4. Noen av disse analogene viser likevel til gode biologiske resultater og et utvalg av disse vil bli representert herunder.

Både 3,4-diaryloxazolone og 4,5-diaryloxazolone viser potent cytotoxisk aktivitet sammenlignet med CA-4. Analog **16** har vist bedre tubulinhemmende effekt, dog med litt reduksjon i cytotoxisk aktivitet.⁴³ Noen 4,5-diarylimidazolone har også blitt rapportert. Analog **17** viser potent cytotoxisk aktivitet og molekylmodelleringsstudier viser at den har muligheter for å binde seg til tubulin.⁴⁷ Det har blitt utført omfattende studier på analog **18** som har vist til *in vitro* inhibering av kreftceller og endotelial cellevekst og virket destruktiv på mikrotubuli. Som CA-4 viste analogen antivaskulær aktivitet både *in vitro* og *in vivo*.⁴⁸



Figur 1.9 Strukturen av 3,4-diaryloxazolone (**16**), 4,5-diarylimidazolone (**17**) og 4,5-diarylpyrrole (**18**).

Chaudhary og medarbeidere³⁹ har rapportert flere 2-aminoimidazolone analoger hvor en av dem, **19**, viser bedre cytotoxiske egenskaper mot noen kreftcellelinjer sammenlignet med CA-4 og gode tubulinhemmende egenskaper. 1,2-diarylpyrrole (**20**) har vist signifikant cytotoxisk aktivitet, ført til destabilisering av mikrotubuli og inhibert polymeriseringen av tubulin.⁴⁴ 3,4-diaryl-1,2,4-triazolone analogen (**21**) viser potent tubulinhemmende aktivitet.⁴⁵



Figur 1.10 Strukturen av 2-aminoimidazolanalog (**19**), 1,2-diarylpyrrol (**20**) og 3,4-diaryl-1,2,4-triazolanalog (**21**).

1.4.3 Ring B modifikasjoner

Hamel og medarbeidere^{37,38} gjorde på begynnelsen av 1990-tallet omfattende strukturaktivitetsstudier på ulike analoger av combretastatin for å blant annet studere hvor viktig metoksigruppen i *para*-posisjon i B-ring er for den biologiske aktiviteten. Metoksigruppen i B-ring har blitt forsøkt substituert med en rekke andre grupper og forskningen resulterte i at *p*-metoksigruppen er essensiell for den cytotoxiske aktiviteten til CA-1 og CA-4. Studier viser også at substituering av metoksigruppen med andre små molekyler som metyl, etyl og klor ikke nødvendigvis nedsetter den tubulinhemmende aktiviteten.^{37,38,52} Analogene diskutert tidligere viser at hydroksigruppen i *ortho*-posisjon ikke er nødvendig for verken den cytotoxiske aktiviteten eller for hemming av tubulinpolymeriseringen. Substituering av hydroksigruppen i CA-4 med fluor medfører tap av cytotoxiske aktivitet, men analogene viser seg å være mer potente tubulinhemmere.^{53,54} Pinney og medarbeidere⁵⁴ har utført studier med ulike nitrogensubstituent i denne posisjonen. Resultatene deres viser at en azidsubstituent fører til nedsatt cytotoxiske aktivitet, men tilsvarende tubulinhemmende effekt sammenlignet med CA-4. En nitrosubstituent i den aktuelle posisjonen fører til generell nedsatt aktivitet, mens en aminosubstituent fører til sammenlignbar cytotoxiske aktivitet og tubulinhemmende effekt med CA-4.⁵⁵ Bor som substituent har vist til gode biologiske resultater for cytotoxiske aktivitet, men litt redusert tubulinhemmende effekt.⁵³

Det er ikke gjort like mange biologiske studier på effekt av endring av substituent i CA-1 som i CA-4. Studier utført av Siles og medarbeidere⁵⁵ viser til meget gode resultater for den diaminosubstituerte CA-1 analog. Gode resultater på cytotoxiske aktivitet er rapportert og tubulinhemmende effekt er tilstede, men ikke like bra som CA-1 og CA-4. Analogene av CA-1 med difluorsubstituent er studert av Lawrence og medarbeidere⁵² som viste en mye høyere aktivitet sammenlignet med CA-1, men lavere sammenlignet med CA-4.

1.5 Molekylmodellering

Molekylmodellering gir en teoretisk innsikt i ulike prosesser blant annet innen kjemi og bioteknologi. Ved hjelp av visualiserte 3D-molekyler, etterligninger og beregninger kan man analysere og estimere egenskaper til molekyler. Utgangspunktet for beregningene er ofte en eksperimentell 3D struktur fra røntgenkrystallografi eller NMR.⁵⁶

1.5.1 Kvantemekanisk og molekylmekanisk modell

For å kunne gjøre beregninger er det nødvendig med en modellbeskrivelse av molekylet. Det finnes to typer modeller innen molekylmodellering; Kvantemekanisk og molekylmekanisk. I kvantemekanikk er elektronene, i tillegg til kjernen av atomet, tatt hensyn til. Ut fra Schrødingers likning kan man da beregne energi. Denne metoden er ganske nøyaktig, men fører til lang beregningstid og tar mye datakraft. Den kvantemekaniske modellen kan kun brukes på små molekyler. Av den grunn er det molekylmekanisk modell som blir brukt mest i dag.

Molekylmekanisk modell baseres på Born-Oppenheimers tilnærming; atomkjernen beveger seg mye saktere enn elektronene, så vibrasjonen og rotasjonen i et molekyl kan bli separert fra elektronbevegelsen. Dette forenkler beregningen som gjøres av datamaskiner, dog på bekostning av nøyaktighet.

Molekylmekanikk er en mye raskere metode og baserer seg på antagelsen om at energien til hele systemet er summen av inter- og intramolekulære interaksjoner. Den beregnede totalenergien til molekylet (E_{tot}) er summen av bindende og ikke-bindende interaksjoner. Dette inkluderer energien fra strekking av bindinger (E_{str}), vinkelbøyning (E_{angle}), rotering rundt en binding (E_{tors}), samt van der Waals (E_{vdW}) og elektrostatisk energi (E_{el}). Funksjonen for total energi blir da:

$$(I) \quad E_{\text{tot}} = (E_{\text{str}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{tors}}) + (E_{\text{vdW}} + E_{\text{el}})$$

Samlingen av disse individuelle interaksjonene kalles kraftfelt.⁵⁶ Kraftfeltet kalkulerer den potensielle energien til systemet.

1.5.2 Dokking og scoring

Dokking er en estimering og grov forenkling av konformasjonen og orienteringen til en ligand i ett spesifikt bindingssete. En utfordring med dokking er at proteinene i virkeligheten vil ligge i likevekt mellom flere ulike konformasjoner. Ligandbindingen er derfor ikke nødvendigvis i den konformasjonen som observeres i en eksakt krystalstruktur. Det brukes vanligvis en semidynamisk dokking, det vil si at man bruker en dynamisk ligand og rigid reseptor/protein. Dette er ikke optimalt for å få reelle resultater, men forenkler dokkingen tidsmessig og rent

teknisk. Dokkingen vurderes etter "score" som indikerer kvaliteten av interaksjonen mellom protein og ligand. De ulike interaksjonene får en poengsum rangert fra lavest til høyest. Lavere poengsum svarer til høyere affinitet mellom ligand og bindingssete. "Scoren" kan benyttes til å sammenligne ulike interaksjoner og konformasjoner av en ligand. Hvis en interaksjon får en bra "score" fra dokkingen kan dette brukes til å finne nye ligander fra en virtuell database.

Scoringsfunksjonen er en av de viktigste komponentene i strukturbasert leting etter nye farmakoforer.⁵⁷ Scoringsfunksjonene tar hensyn til liganden sin konformasjonelle energi og interaksjonene mellom liganden og proteinet.⁵⁸ De fleste scoringsfunksjonene estimerer bindingsaffiniteten gitt ved Gibbs fri energi;

$$(II) \Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_i$$

Flere ulike scoringsfunksjoner for protein-ligand interaksjoner har blitt utviklet, med ulik nøyaktighet og effektivitet. De fire mest brukte er kraftfelt, empirisk, kunnskapsbasert og konsensus scoringsfunksjon.

Kraftfelt beregner som vist i likning II, den potensielle energien. Empirisk scoringsfunksjon tar hensyn til flere egenskaper når den forutsier bindingsaffiniteten. Disse egenskapene er polare interaksjoner, upolare interaksjoner, lipofile og aromatiske interaksjoner, tap av ligandfleksibilitet og løsningsvevnen. En ulempe med denne funksjonen er at det er avhengig av testsett for å beregne egenskapene individuelt. Dette brukes derfor ofte til proteiner lik de i et testsett. Kunnskapsbasert scoringsfunksjon baserer seg på at potensiell energi blir konvertert fra strukturinformasjon samlet inn fra eksperimentelle bestemte atomstrukturer. Når et protein og en ligand er innenfor en viss radius for hverandre flere ganger, øker sannsynligheten for at disse vil interagere med hverandre. "Scoren" er definert som summen av alle interatomiske interaksjoner i protein-ligand komplekser. Denne funksjonen trenger ikke noe testsett, og inkluderer både løsningsvevnen og entropien. Konsensus scoringsfunksjon kombinerer de tre overnevnte scoringsfunksjonene.⁵⁶

1.6 Kjemisk bakgrunn

1.6.1 Triazoler

En viktig klasse av biologisk aktive nitrogenholdige heterosykliske forbindelser er 1,2,3-triazoler.⁵⁹ De har vist aktivitet innen antiHIV,^{41,59} antituberkulose,^{59,60} anticancer,⁶¹ antivirus⁵⁹ og antibakteriell aktivitet.⁶¹

Det er over 50 år siden ringstrukturen til 1,2,3-triazoler ble oppdaget.⁶² Den har fått mye oppmerksomhet da mange av dens derivater, deriblant combretastatinanaloger, viser biologisk aktivitet.⁶³ Den stabile og aromatiske strukturen til triazoler har gode evner til å danne

hydrogenbindinger, dipol-dipol interaksjoner og π -stakking.⁶⁴ Triazoler er også stabile under betingelser som syre, base, reduksjon og oksidasjon.⁶⁵

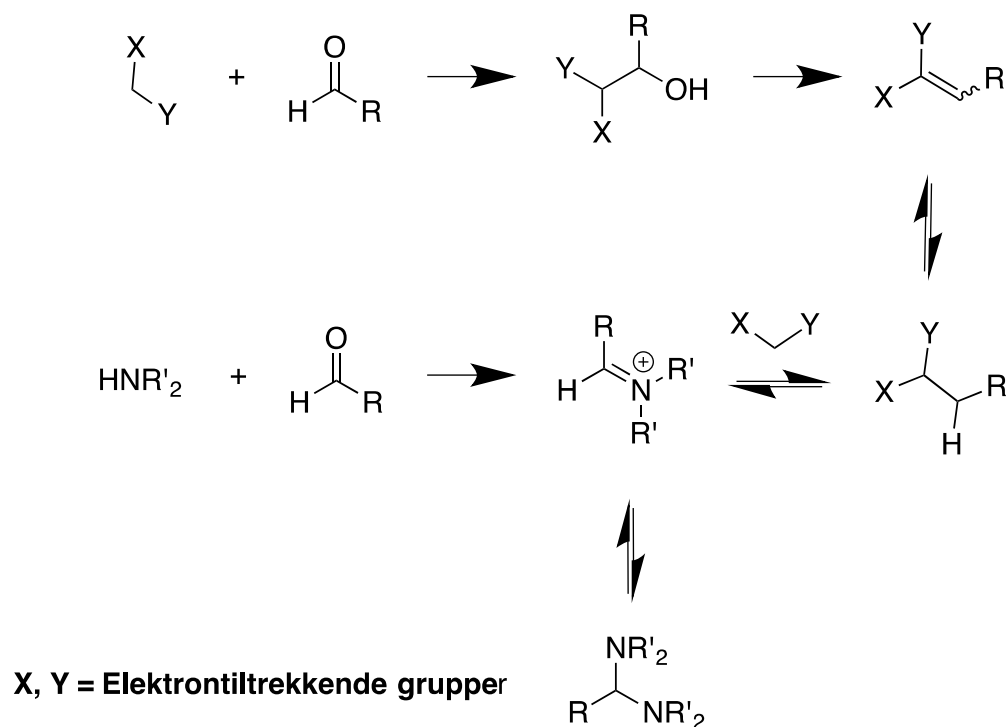
Det er kontinuerlig behov for utvikling av nye medisiner ettersom ineffektivitet grunnet multiresistent utvikling har blitt aktuelt.⁶³ 1,2,3-triazoler har en rekke applikasjoner fra medisinsk kjemi til materiell forskning. Triazolene sin evne til å tautomerisere seg er et fenomen som er svært essensiell i kjemien, da den er viktig i mange omdannelser og ringtransformasjoner. 1,2,3-triazoler er gode substrater for termisk transformasjon av ulike heterosykliske komponenter som isoquinoler, indoler, pyraziner og oxazoler.⁶²

1.6.2 Knoevenagel kondensasjon

Reaksjonen mellom et aldehyd eller keton med en aktiv metylenforbindelse av formen Y-CH₂-Z blir kalt en Knoevenagel kondensasjon. Både Y og Z må være elektrontiltrekkende grupper som for eksempel CHO, COR, COOR, NO₂ eller CN. Reaksjonen må skje i nærheten av en base, for eksempel et amin, som da fungerer som en katalysator.⁶⁶

Aldehyder som kan brukes i reaksjonen varierer bredt. Bruken av ketoner er derimot begrenset grunnet deres lave reaktivitet. Valg av katalysator er viktig, hvor primære, sekundære eller tertiære aminer og eventuelt deres korresponderende ammoniumsalter kan brukes. En mye brukt katalysator er pyridin. Flere mekanismer kan være gjeldende, men i de fleste tilfellene skjer det først en reaksjon mellom aldehyd og amin som danner et imin eller et iminiumsalt, som reagerer med den aktive metylenforbindelsen.

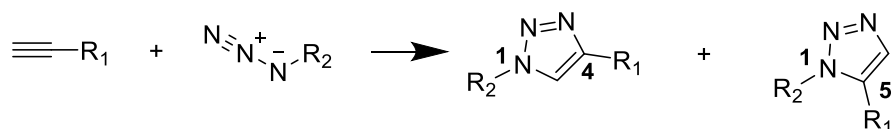
Knoevenagel reaksjonen tilhører en generell klasse av basekatalyserte aldolliknende kondensasjoner, hvor et karbanion adderes til en karbonyl eller heterokarbonylisk forbindelse. To ulike mekanismer, avhengig av hvilken base som blir tatt i bruk, har blitt foreslått for reaksjonen mellom metylenforbindelsen og aldehyd for å danne Knoevenagelproduktet. I Hann-Lappworth mekanismen er et intermediat som β -hydroksidikarbonylforbindelsen antatt og gjelder først og fremst ved bruk av tertiære aminer som pyridin. Ved bruk av sekundære eller primære aminer som katalysator har Knoevenagel vist at kondensasjon av aldehyd og amin danner et imin eller iminiumsalt, som deretter danner Knoevenagelproduktet. Siden et elimineringsstrinn er involvert i begge mekanismene vil sluttproduktet være det samme.⁶⁷ De to mekanismene er illustrert i Skjema 1.1.



Skjema 1.1 De to foreslåtte mekanismene for dannelsen av Knoevenagel- produktet.

1.6.3 Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjon

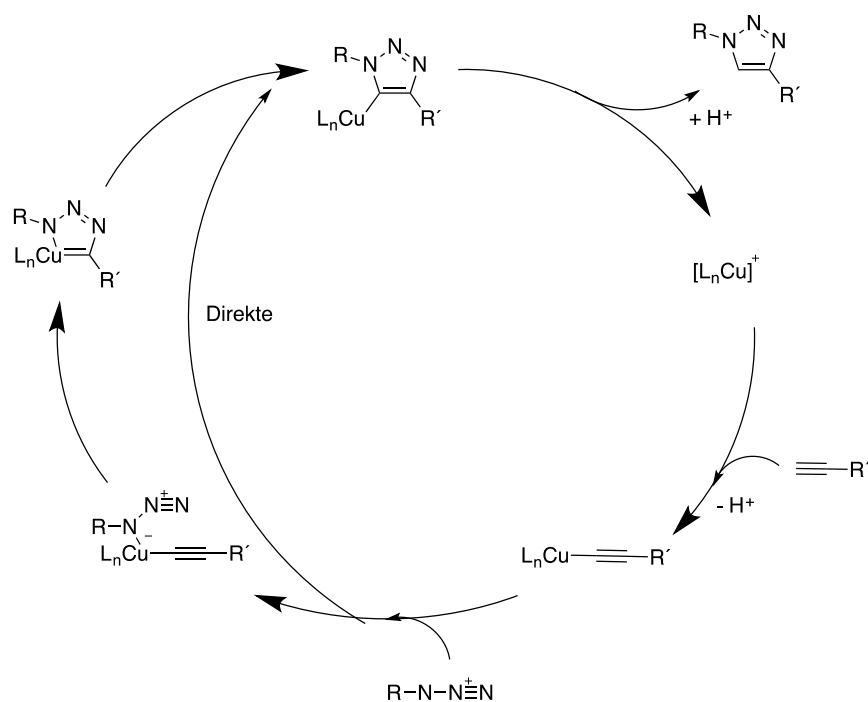
På 1960-tallet presenterte Huisgen⁶⁸ et generelt prinsipp for dannelsen av heterosykliske femringer. Reaksjonen ble kalt 1,3-dipolar sykloaddisjon hvor 1,3-dipolaren er definert som en forbindelse som er representert ved zwitterionisk resonansstrukturer. Denne gjennomgår 1,3-sykloaddisjon med forbindelser som innehar en dobbel- eller trippelbinding, dipol nukleofilen. Azider har vært mye brukt som 1,3-dipolar i disse sykloaddisjonene. Dette resulterer i en blanding av to regioisomerer, 1,4- og 1,5-disubstituerte 1,2,3-triazoler som vist i Skjema 1.2.⁶⁹ Reaksjonen krever høye temperaturer og kan ved noen omstendigheter medføre til større eliminasjonsprodukter som har ført til diskusjon rundt hvorvidt denne reaksjonen kan klassifiseres som en klikk-reaksjon.⁶⁸ Alken som dipolar nukleofil har blitt mye ignorert grunnet deres manglende reaktivitet, som er et resultat av elektronfattige olefiner, og eliminerende sidereaksjoner.



Skjema 1.2 Huisgen 1,3 dipolar sykloaddisjon med de to regioisomerene som produkt i forhold 1:1.

1.6.3.1 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazoler

Det har blitt gjort mange forsøk på å gjøre isomeriseringen regioselektiv. For eksempel brukte Sharpless og medarbeidere⁷⁰ i 2002 en kobberkatalysert reaksjon som på den tiden også var under utarbeidelse av Meldal og medarbeidere.⁶⁴ Denne Cu(I)-katalyserte azid-alkyn sykloaddisjonsreaksjonen (CuCCA) ga kun regioisomerer av typen 1,4-disubstituert-1,2,3-triazol i bra utbytte. Figur 1.11 viser en mulig mekanisme for CuCCA, der en direkte sykloaddisjon viste seg å ikke være favorisert. I stedet ble det foreslått en syntesevei via et kobber-acetylid kompleks etterfulgt av en trinnvis addering til et azid for å danne ringstrukturen.⁶⁴



Figur 1.11 Foreslått katalytisk syklus for 1,4-disubstituert 1,2,3-triazol med Cu(I) som katalysator.

Kobber som katalysator i dannelsen av 1,2,3-triazoler har vist seg å ha en rekke fordeler, der den blant annet akselererer en reaksjon til å gå opptil syv ganger fortere. Dannelsen av 1,2,3-triazoler fra azider og terminale alkyner katalysert av Cu(I) er en robust reaksjon som kan skje under ulike forhold og med flere løselige kobberkilder. Den kan finne sted i romtemperatur eller med moderat varme, og den er stereospesifikk og biokompatibel.⁷¹ Azid og alkyne tolererer stor variasjon i funksjonelle grupper, og er nesten inerte mot biologiske molekyler og reaksjonsbetingelser inne i levende systemer.^{72,73} Azider har blitt koblet med CuCCA-reaksjoner i en trekomponentsreaksjon og er nå mye brukt i klikk-kjemi.

Hvis Cu(I) blir oppbevart i løsning vil det ikke skje noe oksidasjon til Cu(II) og reaksjonen vil skje med høyt utbytte. Dette er årsaken til at bruken av Cu(II) må skje med en reduserende

forbindelse tilstede. Ved å bruke Cu(II)-kilder og følgelig den reduserende forbindelse vil reaksjonen bli mer stabil ovenfor luft, og reaksjonen kan finne sted under vanlig luft. Dette kan likevel være et problem da det kan skje oksidative sidereaksjoner under disse forholdene.⁷¹

Det finnes flere ulike kobberkilder til bruk i CuCCA reaksjoner.^{64,70,71} De mest vanlige kobberforbindelsene brukt er CuSO₄ i løsning sammen med en reduserende agent eller halidsalter, som for eksempel CuI. Det er observert store forskjeller mellom bruken av disse forskjellige kobberkildene i forhold til tilstedeværelse av base i reaksjonen. Halidsaltene krever minst en aminbase eller høy temperatur for å danne Cu-acetylid-komplekset. Den katalytiske aktive CuSO₄ blir derimot direkte generert ved reduksjon med askorbinsyre og danner umiddelbart Cu-acetylid. Dette kan skyldes at CuI i utgangspunktet er stabil så den vil kreve en viss konsentrasjon av acetylid anioner før komplekset kan dannes.⁷¹

Kobbersalter som CuI kan som nevnt over bli brukt uten reduserende forbindelse til stede. Reaksjonen krever vanligvis acetonitril som løsemiddel og en ekvivalent med nitrogenbase. Denne reaksjonen viste seg dessverre å danne mange ugunstige biprodukter, som diacetylen og bis-triazoler. De ugunstige biproduktene viste seg å kunne bli unngått med 2,6-lutidin til stede. Ved å ekskludere oksygen ble også renheten og utbytte bedre. Selv om både acetyl og azid reagerer i acetonitril-løsningen, er en enkel *in situ* reaksjon av Cu(II) med askorbinsyre å foretrekke.⁷⁰ Den er mer økonomisk og praktisk. Ulike løsemidler kan bli brukt, som vandig *tert*-butanol eller etanol og vann. Reaksjonstiden kan bli kortet ned med mikrobølgestråling.⁷⁴

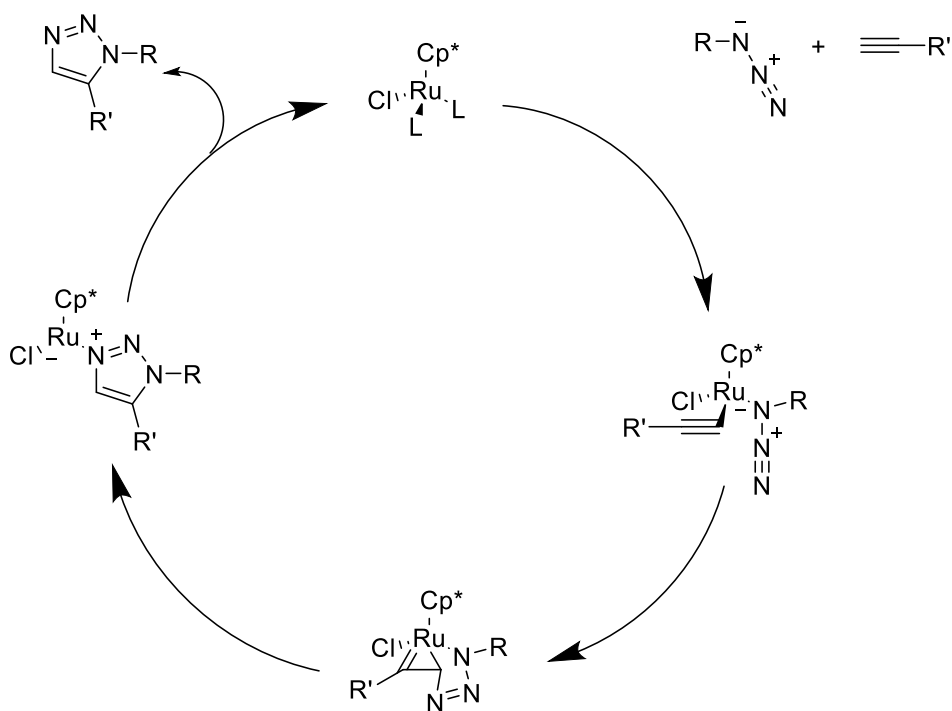
1.6.3.2 1,5-disubstituerte 1,2,3-triazoler

Siden oppdagelsen av Cu(I)-katalysert azid-alkyn sykloaddisjon, har bruken rundt disse reaksjonene økt enormt innen ulike områder av kjemisk syntese. Siden CuAAC kun gir den ene regioisomeren til disubstituerte 1,2,3-triazol, var det interessant å finne en regioespesifikk syntesevei for den andre isomeren via azid og alkyn.⁷⁵ For at den ønskede regioisomeren, 1,5-disubstituert 1,2,3-triazol skal bli dannet, kan man benytte seg av ruteniumkatalysert azid-alkyn sykloaddisjonsreaksjon (RuCCA). Foreslått katalytisk syklus er vist i Figur 1.12. Det ble forsøkt ulike ruteniumkomplekser, der Cp*RuCl(PPh₃)₂ viste seg å transformere azidet fullstendig til den korresponderende 1,5-disubstituerte triazolen.⁷⁶

Reaksjonen ble etablert av Fokin og medarbeidere i 2005.⁷⁶ Her ble det påvist sykloaddisjon mellom både terminalt og ikke-terminalt alkyn og et azid. Resultatet ga både 1,5-disubstituerte og 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazoler, avhengig av alkynet. Majireck og medarbeidere⁷⁷ beviste i 2006 at reaksjon med ikke-terminalt alkyn og azid katalysert med Cp*RuCl(PPh₃)₂ er en generell prosess. Produktet var 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazoler med høyt utbytte.

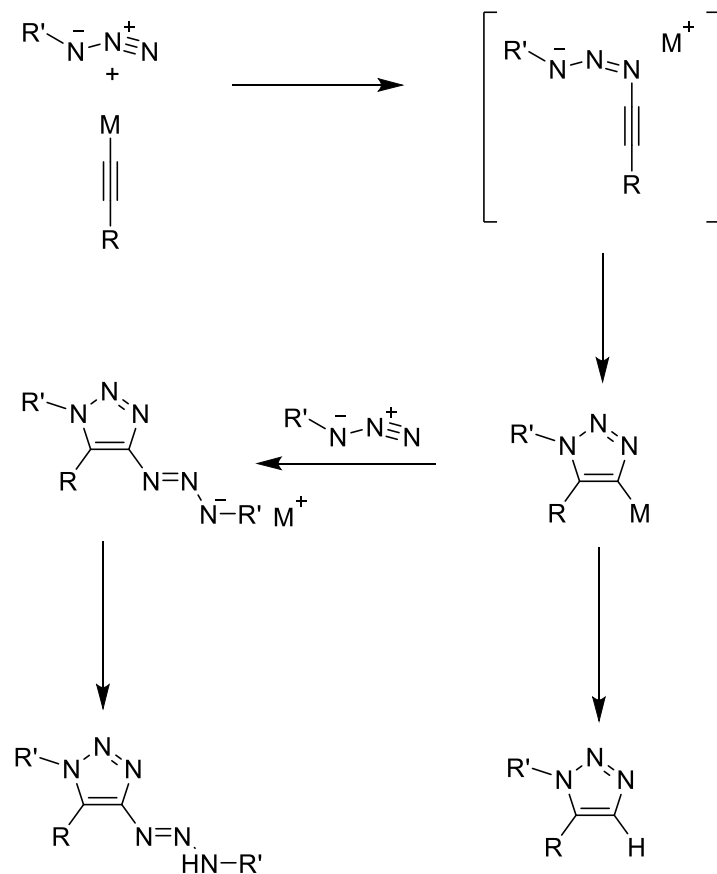
Dette er en endring fra CuCCA nevnt i 1.6.3.1, som kun lot seg gjennomføre med terminale alkyner. Egenskapene til azidet virket til å ha påvirkning på utbytte til reaksjonen. Reaksjonen ga bra utbytte med primære, alifatiske azider som fenyletylazid, mens tertiære azider som *tert*-butyl ga lavt utbytte etter endt reaksjonstid. Ved å øke ekvivalenten av katalysator og utvide

reaksjonstiden ble utbyttene noe høyere. Arylazider viste seg å omsettes dårlig og større endringer i betingelser ga mange biprodukter.⁷⁶



Figur 1.12 Foreslått katalytisk syklus for syntese av 1,5-disubstituert 1,2,3-triazol med rutenium som katalysator.⁷⁸

1,5-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger kan også bli syntetisert fra en reaksjon med halomagnesium acetylider med organiske azider. I 2004 utførte Kransinsk og medarbeidere⁷⁹ flere forsøk med magnesium som katalysator. De fleste reaksjonene stod i romtemperatur og ga kvantitative utbytter. Reaksjonen krevde ingen opprensning og resulterte i gode utbytter. Alifatiske acetylider er mindre reaktive enn arylene. Elektronfattige azider reagerer mye raskere enn elektronrike. Dette stemmer med det foreslåtte angrepet av en nukleofil på azidet som vist i Skjema 1.3.

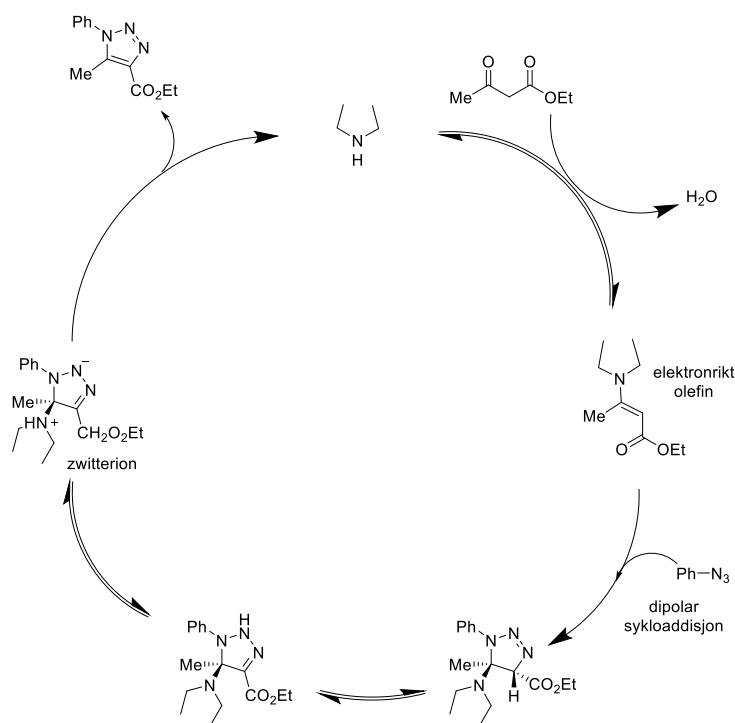


Skjema 1.3 Foreslått katalytisk syklus for syntese av 1,5-disubstituert 1,2,3-triazol med magnesium som katalysator.⁷⁹

1.6.3.3 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazoler ved organokatalyse

I 2008 rapporterte Ramachary og medarbeidere⁸⁰ en syntese av 1,2,3-triazoler katalysert av aminosyren prolin. På bakgrunn av dette arbeidet har flere grupper arbeidet videre med organokatalyserte synteser av 1,2,3-triazolforbindelser.^{61,81} Den kobberkatalyserte klikkreaksjonen mellom azid og alkyn har vist seg å vært svært viktig, men grunnet cytotoxisiteten til kobber er reaksjonen ikke gunstig ved for eksempel merking av biomolekyler i levende celler eller organismer.

I 2011 publiserte Wang og medarbeidere⁸¹ en regiosektiv prosedyre for dannelsen av 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazolanaloger gjennom sykloaddisjon mellom azid og β -keto ester med primært eller sekundært amin som katalysator. De beste utbyttene ble oppnådd ved bruk av dietylamin som katalysator. Figur 1.13 viser Wang og medarbeidere sitt forslag til mekanismen for sykloaddisjonen mellom etylacetoacetat og fenylazid.

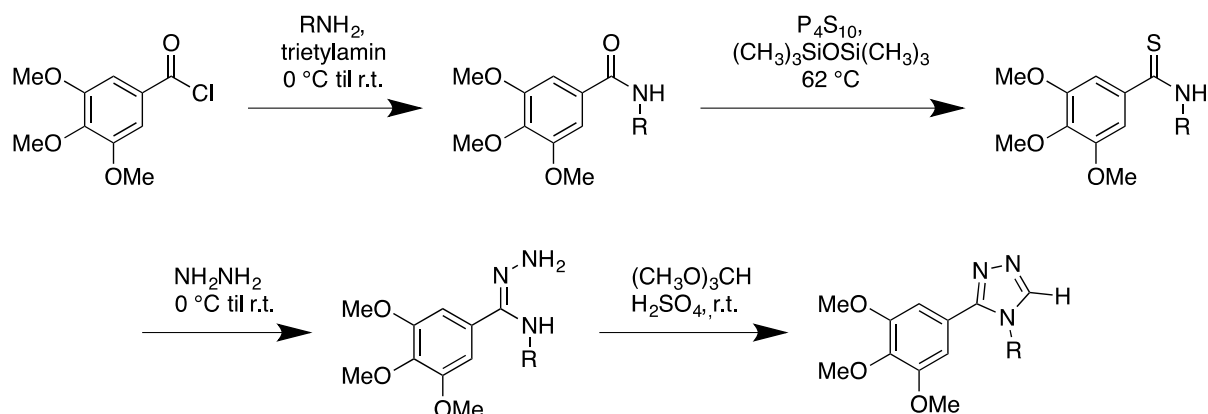


Figur 1.13 Foreslått organokatalysert mekanisme av 1,4,5-trisubstituert 1,2,3-triazol.⁸¹

Kompleksiteten til triazolsubstituenten i de overnevnte publiserte arbeidene er begrenset. Dehaen og medarbeidere⁶¹ publiserte derfor i 2014 en multikomponentsreaksjon med morfolinium *para*-toluensulfonat som katalysator. Deres arbeid resulterte i en trekomponentsreaksjon mellom et aldehyd, azid og nitroalkan, hvor en nitroalkan dipol nukleofil ble dannet via en Knoevenagel kondensasjon fra aldehyd og nitroalkan. Dipolar nukleofilen kan videre gjennomgå en Huisgen sykkloaddisjon med azid for å danne 1,4,5-trisubstituert 1,2,3-triazol med eliminering av HNO₂. Dette resulterte i en regioselektivitet på over 99 %. Regioselektiviteten kan forklares ut fra en nitrogruppe på dipolar nukleofilen som er sterkt elektrontiltrekkende og gjør β -karbonet mest elektrofil. Dermed vil en dipolar, som azid, reagere med et delvis positivt ladd β -karbon og danne et syklisk triazolin intermediat før HNO₂ elimineres. Studiene til Dehaen og medarbeidere viser til at katalysatoren ikke katalyserer selve sykkloaddisjonsreaksjonen, men Knoevenagel reaksjonen ved at den danner et imin med aldehydet som videre reagerer med nitroalkanet.

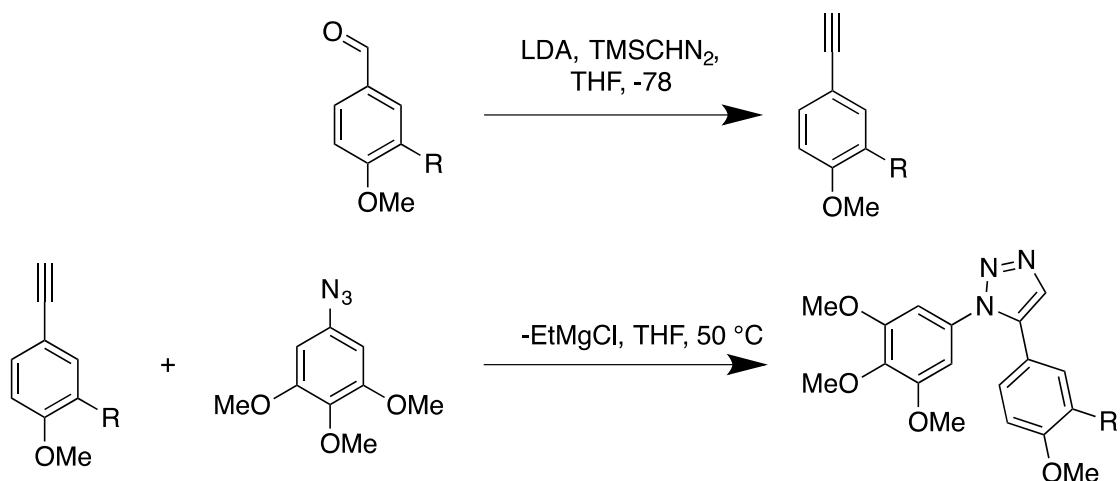
1.6.4 Tidligere synteser av substituerte triazolanaloger av combretastatin

Zhang og medarbeidere⁴⁵ sine 1,2,4-triazolanaloger, publisert i 2007, ble syntetisert gjennom amider som ble dannet ved å koble 3,4,5-trimetoksibenzoklorid med ulike aminer. Amidene ble så omgjort til thioamider. Thioamidene ble brukt videre uten opprensing hvor de ble omgjort til hydrazonamid ved bruk av hydrazin ved 0 °C. Det avsluttende sykloaddisjonstrinnet ble utført med trimetylorthoformat i surt miljø.



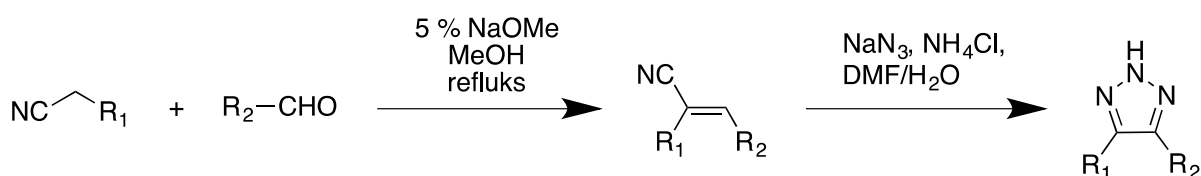
Skjema 1.4 Generell syntese for framstilling av 1,2,4-triazolanaloger.⁴⁵

Odlo og medarbeidere⁸² publiserte i 2008 en artikkel som omhandlet synteser av 1,5-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av CA-1 og CA-4. Deres syntese startet med dannelse av et terminalt alkyn fra et aldehyd ved en Colvin reaksjon. Dette terminale alkynet ble brukt videre i en Huisgen sykloaddisjon med azid. Som tidligere beskrevet kan Huisgen sykloaddisjonen gjøres stereospesifikk ved bruk av ulike katalysatorer. Odlo og medarbeidere tok her i bruk magnesium som katalysator for å nå mål molekylene i utbyttet på mellom 62-86 %. I denne publikasjonen ble det syntetisert to ulike analogklasser, hvor forskjellen var hvor nitrogenatomene var plassert i triazolen. Resultater fra de biologiske studiene viste at forbindelsene i klassen hvor trimetoksyfenylenheten var bundet til nitrogen var mest aktiv.



Skjema 1.5 Generell syntese for framstilling av 1,5-disubstituert 1,2,3-triazolanaloger.⁸²

Madadi og medarbeidere⁸³ publiserte i 2015 en artikkel hvor de har syntetisert 4,5-disubstituert-2*H*-1,2,3-triazolanaloger. I deres første syntesetrinn ble en serie med *Z*-substituerte diarylakrylnitrilanaloger syntetisert ved å reagere substituert benzaldehyd med deres korresponderende substituerte fenylacetonitril i 5 % NaOMe i MeOH. Reaksjonen ble rørt i 2-3 timer ved romtemperatur for å danne ønsket mellomprodukt. Videre ble disse mellomproduktene reagert med natriumazid og ammoniumklorid i DMF/H₂O (10:1) ved refluks i 5-12 timer. Dette førte til dannelsen av de ønskede triazolanalogene.



Skjema 1.6 Generell syntese for framstilling av 4,5-disubstituert-2*H*-1,2,3-triazolanaloger.⁸³

1.7 Mål og bakgrunn for oppgaven

Det er stor interesse for å studere de biologiske egenskapene til combretastatin A-1 og A-4 og analoger av disse. Både CA-1 og CA-4 har vist potent cytotoxisk aktivitet, tubulinhemmende og antivaskulær effekt. Nyere studier indikerer også at combretastatinene kan vise antiangiogenesisk effekt.

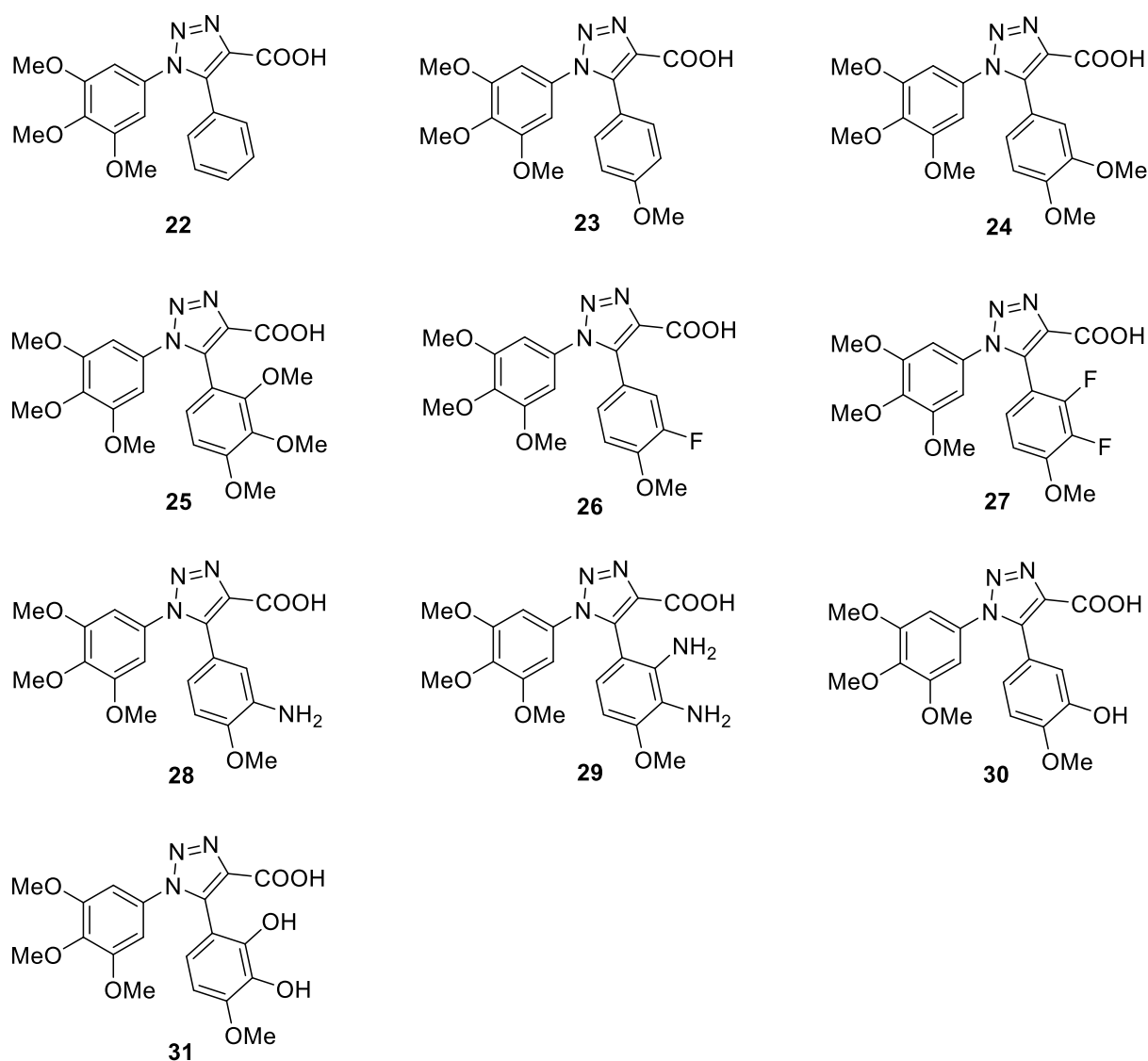
Målet med denne oppgaven var å syntetisere 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av CA-1 og CA-4. CA-1 og CA-4 gjennomgår *cis/trans*-isomerisering til den mindre aktive *trans*-isomeren. Ved å innføre en ringstruktur som for eksempel triazol blir analogene låst i den ønskede konfigurasjonen. Syntesen er bygget på tidligere publisert arbeid av Dehaen og medarbeidere⁶¹ og Liu og medarbeidere⁸⁴.

Forskergruppen LIPCHEM ved Universitetet i Oslo har tidligere forsket på lignende triazolanaloger av combretastatin. Resultater fra denne forskningen viser at analogene har interessante biologiske effekter. Vår oppgave bygger videre på dette arbeidet. Ved å innføre en karboksylsyre i 4-posisjon vil forhåpentligvis de korresponderende saltene kunne løse problematikken rundt den dårlige vannløseligheten til combretastatiner.

2 Resultater og diskusjon

2.1 Molekylmodellering

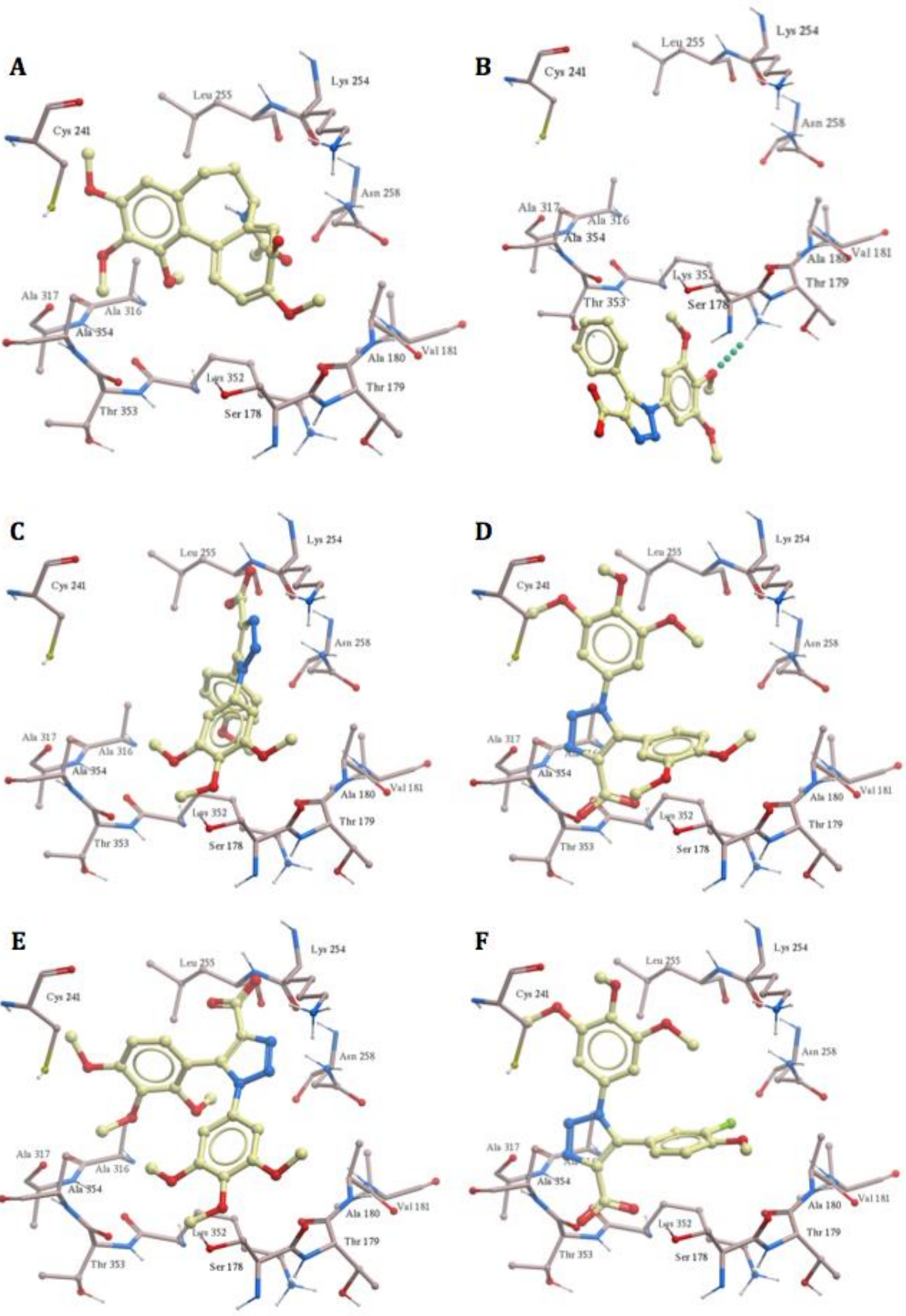
Programmet "Internal Coordinates Mechanics" (ICM) ble tatt i bruk for dokking av forbindelsene **22-31** i α - og β -subenhetene i tubulin, hvor kolkisin ble brukt som referansepunkt. Det ble forsøkt å dokke i ulike krystallstrukturer med høy oppløsning fra PDB-databasen, blant annet 1SA0, 5ITZ, 3UT5 og 4O2B med *N*-deacetyl-*N*-(2-mercaptoacetyl)-kolkisin (DAMA-kolkisin) som ligand, hvor sistnevnte ble tatt i bruk for videre studier. Resultatet fra dokkingen viste at åtte av forbindelsene la seg inne i bindingssete til kolkisin, mens to av dem, henholdsvis **22** og **29**, la seg utenfor.

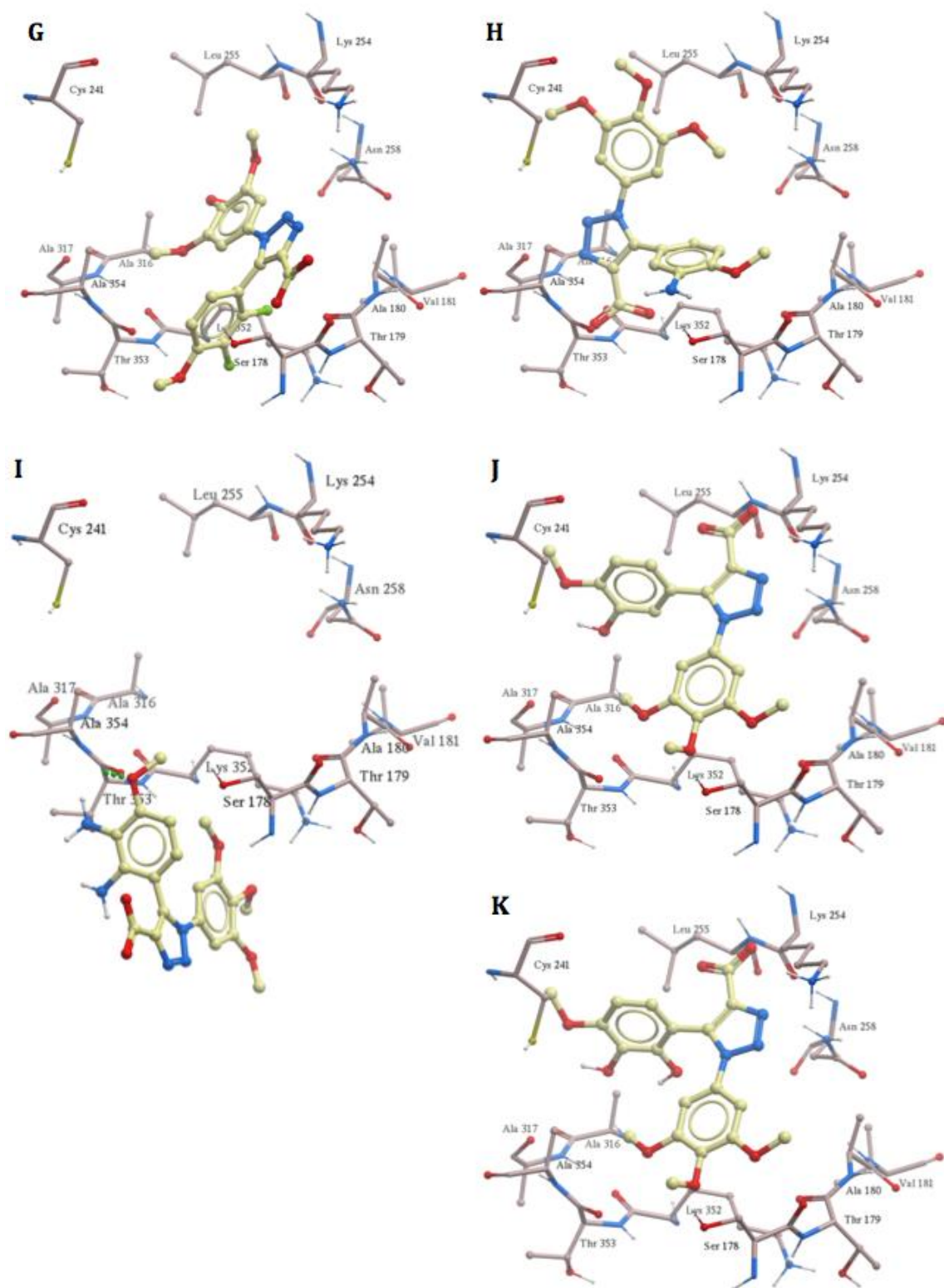


Figur 2.1 Oversikt over forbindelsene det ble utført molekylmodellingsstudier på.

Figur 2.2 viser illustrasjon fra dokking av ligandene i ICM med utvalgte aminosyrer fra bindingssetet. Her kan man tydelig se hvilke forbindelser som legger seg inne i bindingssetet og hvilken som legger seg utenfor i denne dokkingen. Forbindelsene **24**, **26** og **28** som befinner seg som D, F og H i figuren har lik orientering, med unntak av vridningen av B-ringen i forbindelse **26** som er motsatt av de to andre. Forbindelsene **25**, **30** og **31** har også lik orientering med karboksylsyren mot Leu255/Lys256. Sammenligner man orienteringen til de sistnevnte forbindelsene med kolkisin er det disse tre som viser størst korrelasjon. Tidligere molekylmodelleringsstudier utført på analoger av CA-1 og CA-4 har blitt dokket i $\alpha\beta$ -subenheten i tubulin. Siden bindingssetet til tubulin ligger i en posisjon hvor interaksjon med aminosyrer fra begge subenheten er mulig ble det valgt å dokke analogene i begge subenhetene samtidig.¹⁹

Dokking i 1SA0 ga en bedre score enn dokkingen i 4O2B, men grunnet overlapp mellom karboksylsyren i combretastatinanalogene og aminosyrer i bindingssetet ble det valgt å se bort fra disse resultatene. I 4O2B ble det også observert en kort distanse mellom karboksylsyren og noen av aminosyrene, men ingen overlapp. Det kan derfor være mulig at denne nylig innførte karboksylsyren påvirker de ulike analogenes affinitet til bindingssetet. Samtidig gir det mulighet for dannelse av flere interaksjoner mellom karboksylsyren og aminosyrer i bindingssetet. Det kan da nevnes hydrogenbindinger med amidbindingen mellom Lys254/Leu255 og Lys352/Thr353 og aminet til Ser178, avhengig av orienteringen til molekylet. I denne sammenheng er det viktig å huske på at man dokker i en rigid krystallstruktur mens den i realiteten er dynamisk. Rotasjon og bevegelse i krystallstrukturen av proteinet blir ikke tatt hensyn til i dokkingen. Scoringsfunksjoner benyttet i ICM består av ulike energitermer som beskriver kjente bindingsegenskaper til ulike ligander. Dette inkluderer hydrogenbinding, van der Waals, hydrofobiske, aromatiske, ioniske og lipofile interaksjoner. Av den grunn blir nøyaktig estimering av interaksjoner mellom ligand og protein utfordrende.⁸⁵





Figur 2.2 De ulike karboksylsyrene dokket i kolkisin bindingssete.

Studiene viser at kolkisin, sammen med flere av combretastatinanalogene kan ha en interaksjon med Asn258 i β -subenheten til tubulin. Analogene **26** og **27** kan ha interaksjoner via ringstrukturene, mens **25**, **30** og **31** og har mulig interaksjon mellom N3 og Asn258. Resultatene som står i Tabell 1 antyder at interaksjonen til N3 har lavere affinitet enn andre mulige interaksjoner med Asn258. I flere av analogene (**24**, **25**, **26**, **28**, **30** og **31**) var A- eller B-ringen i posisjon til å danne interaksjoner med Cys241 i β -subenheten. Cys241 er et eksempel på problematikken tidligere nevnt ved å dokke i en rigid proteinstruktur med tanke på at en vridning av Cys241 gjerne ville lagt føring for en bedre interaksjon mellom ligand og protein. Tidligere resultater⁸² viser også interaksjoner mellom combretastatinanaloger og Cys241, men da med tiolgruppen på aminosyren.

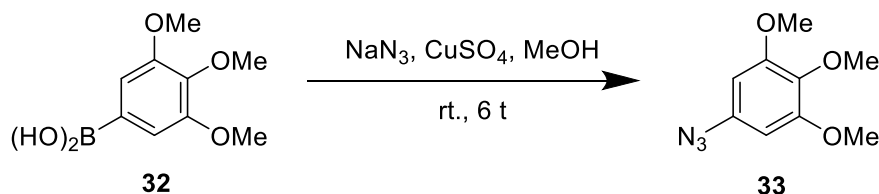
Tabell 1 "Virtual Ligand Screening-scoring" (VLS-scoring) resultatene av analogene sammenlignet med kolkisin.

Triazolalog	Score*	Prosent
Kolkisin (7)	-23,76	100 %
23	-20,45	86 %
22	-20,03	84 %
27	-19,84	84 %
26	-19,69	83 %
30	-14,08	59 %
31	-14,03	59 %
25	-12,93	54 %
28	-12,45	52 %
24	-10,07	42 %
29	-8,95	38 %

* - Verdier fra "Virtual Ligand Screening-score" rangert etter affinitet til bindingssetet.

Generelt sies det at en "VLS-score" under -32 blir betraktet som en god "score", men en god "scoreverdi" er også avhengig av systemet man dokker i. For noen systemer kan en "score" høyere en -32 være rimelig. Når man dokker kolkisin inn i proteinstrukturen, etter at man har fjernet ko-krystallstrukturen, får man en indikasjon på hva en bra "score" er i det aktuelle bindingssetet.⁸⁶ Ut fra Tabell 1 kan man se at analogene **23**, **27** og **26** er de analogene som muligens kan binde seg i det aktuelle bindingssetet. Analog **22** har en god "scoreverdi", men binder seg på utsiden av bindingssetet, som vises i illustrasjonene i Figur 2.2. Det er tydelig skille i VLS-scoringsverdiene mellom analog **26** og **30**. Analog **26** og **27** er analoger som inneholder fluor. Fluorholdige forbindelser er mye brukt i legemiddelkjemi grunnet molekylets egenskaper. På grunn av fluormolekylets høye elektronegativitet dannes det en sterk dipol i C-F bindingen. Denne dipolen kan danne multipolare interaksjoner med for eksempel N-H, C=O og C-H i proteiner.⁸⁷

2.2 Syntese av 3,4,5-trimetoksifenylazid

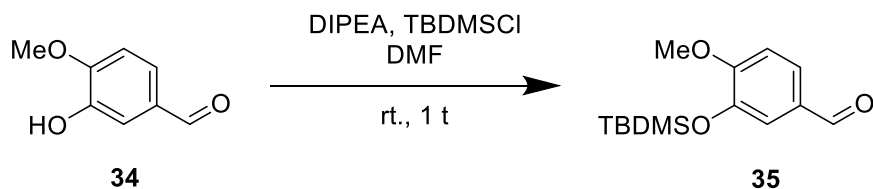


Skjema 2.1 Syntese av fenylazid **33** fra den korresponderende borsyren **32**.

Syntese av fenylazid **33** er basert på publisert materiale av Odlo og medarbeidere.¹⁹ I denne reaksjonen ble borsyre omsatt til fenylazid over 6 timer *in situ*. Utbytte ble 75% som er noe lavere enn 93 % som tidligere er rapportert. Spektroskopiske data stemmer overens med det som er rapportert i samme publikasjon. Resultatet bekreftes blant annet med skiftverdien 135.3 ppm i ^{13}C NMR-spekteret for karbonet i C1. I ^1H NMR-spekteret ser man at syreprotonene i borsyren ikke lenger er til stede.

2.3 Syntese for beskyttelse av (Z)-nitroakrylat **35** og **37**

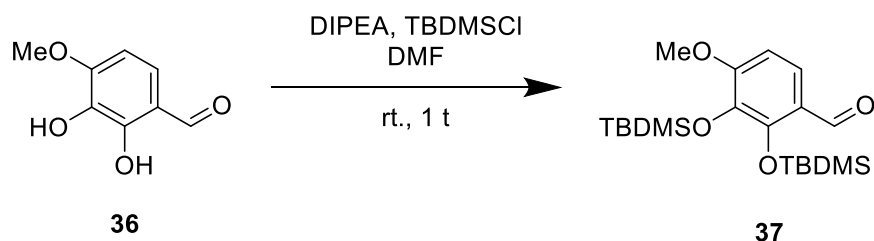
2.3.1 Syntese av 3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd



Skjema 2.2 Syntese av benzaldehyd **35** fra benzaldehyd **34**.

En prosedyre av Pettit og medarbeidere⁸⁸ ble benyttet for syntese av TBS-beskyttet benzaldehyd **35**. Utbyttet på denne reaksjonen var 95%, det samme som rapportert. Spektrale data fra ^1H og ^{13}C NMR-spektrene stemte overens med referansen. DIPEA, også kalt Hünig's base, fungerer her som katalysator ved å plukke opp protonet i hydroksigruppen. Det var nødvendig å vaske noen ekstra ganger med vann og saltlake for å unngå rester av DIPEA i produktet. Reaksjonen ble utført fire ganger med likt resultat hver gang.

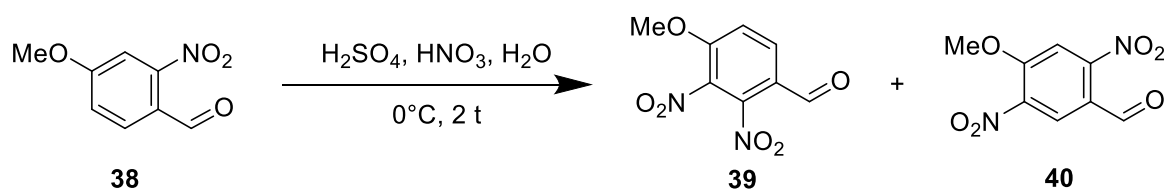
2.3.2 Syntese av 2,3-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd



Skjema 2.3 Syntese av benzaldehyd **37** fra benzaldehyd **36**.

Proseduren av Pettit og medarbeidere,⁸⁸ hvor lignende forbindelser er rapportert, ble benyttet for syntese av TBS-beskyttet benzaldehyd **37**. Utbyttet på denne reaksjonen var 67%. Denne forbindelsen er dihydroksisubstituert, noe som medførte at dobbel ekvivalens av DIPEA og TBDMSCl ble benyttet, i tillegg til dobbel mengde løsemiddel. Små rester av ubeskyttet benzaldehyd **36** ble observert i ¹H og ¹³C NMR-spektrene. Det er mulig det her hadde vært gunstig å tilsette en litt større mengde av DIPEA og TBDMSCl eller hatt en lengre reaksjonstid for at reaksjonen skulle bli fullstendig, men grunnet lite mengde av utgangsstoff ble det valgt å gå videre med det produserte benzaldehydet. ¹H og ¹³C NMR-spektrene bekreftet strukturen.

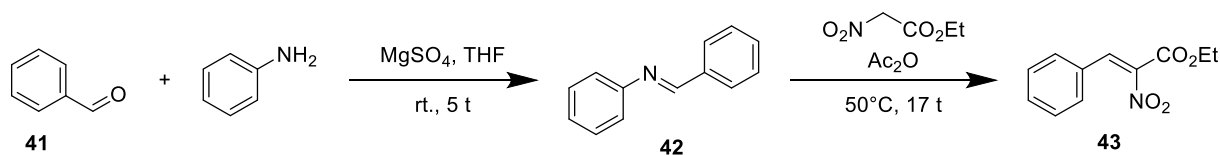
2.4 Syntese av 4-metoksi-2,3-dinitrobenzaldehyd



Skjema 2.4 Syntese av regioisomerene **39** og **40** fra benzaldehyd **38**.

En prosedyre av Devota og medarbeidere⁸⁹ ble fulgt, der benzaldehyd **39** ble omsatt fra benzaldehyd **38** med et utbytte på 59%. Det ble observert vann i råproduktet, og det ble derfor tørket i eksikator over natt. Produktet ble så rensed ved kolonnekromatografi. ¹H og ¹³C NMR-spektrene bekreftet ren isomer ved sammenligning med de publiserte spektrene.⁹⁰ Reaksjonen ble utført to ganger.

2.5 Syntese av etyl(Z)-2-nitro-3-fenylakrylat



Skjema 2.5 Syntese av fenylakrylat **43** fra benzaldehyd **41** via imin **42**.

Flere metoder ble forsøkt for å syntetisere fenylakrylat **43**.

Metode 1 fulgte en prosedyre av Dehaen og medarbeidere,⁶¹ hvor fenylakrylat **43** ble omsatt fra benzaldehyd og etyl-nitroacetat i ett trinn med et rapportert utbytte på 45 %. Det ble observert små mengder av ønsket produkt ved endt reaksjon og en annen metode ble derfor benyttet.

Metode 2 fulgte en prosedyre av Liu og medarbeidere⁸⁴, som bygger på en prosedyre der det ble framstilt Z-fenylakrylat ved en Knoevenagel kondensasjon med et imin som mellomprodukt.⁹⁰ Liu og medarbeidere rapporterte et utbytte på 63 % for Z-fenylakrylat **43**. Det beste utbyttet i denne oppgaven for dannelse av **43** var 25 %. ¹H NMR-spekteret bekreftet imin **42** som ble brukt videre uten opprensing.

Det ble observert større mengder benzaldehyd **41** i ¹H NMR-spekteret av råprodukt **43** som viser til at dekomponering av imin finner sted i reaksjonen. Det ble forsøkt ulike metoder for opprensing. Først ble det forsøkt rensing ved kolonnekromatografi, men minimalt utbytte ble oppnådd. Kolonnekromatografi hvor silikagel ble deaktivert med trietylamin ga høyere utbytte.

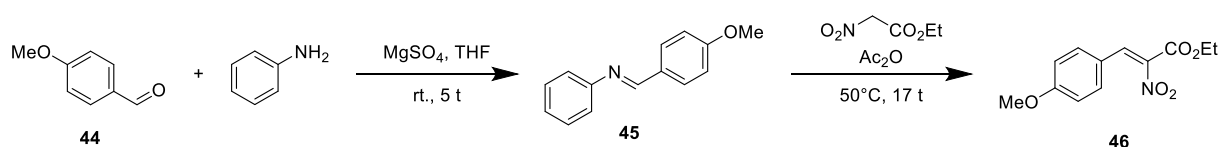
Ønsket renhetsgrad av akrylat **43** ble ikke oppnådd ved kolonnekromatografi. I utgangspunktet skulle benzaldehyd og akrylat **43** være mulig å separere på kolonnen ut i fra R_f-verdier. Det er her mulig at dekomponering av akrylatet medfører dårligere separasjon. Omkrystalliseringstrinnet var derfor nødvendig og ble utført med CH₂Cl₂/ heksan 1:10, som oppgitt i metoden. Fraksjonen lot seg ikke omkrystallisere, så ulike løsemidler og blandingsforhold ble testet. 1,2-dikloretan/heksan ga ingen utfelling, men eter/heksan ga rene krystaller av Z-fenylakrylat **43**.

¹H og ¹³C NMR-spektrene stemmer overens med tidligere rapportert resultat. Singletten ved 7.55 ppm i ¹H NMR-spekteret er trolig olefinprotonet, mens de aromatiske protonene kommer ut som en multiplett ved 7.4-7.5 ppm. Etylgruppen blir også bekreftet med skiftverdier på 4.40 ppm og 1.38 ppm. ¹³C NMR-spekteret viser karbonylgruppen ved 159.2 ppm, og de protonerte aromatkarbonene i *ortho*- og *meta*-posisjon kommer ut med sterkt signal ved henholdsvis 129.7 ppm og 129.4 ppm. Karbonet i *para*-posisjon og β-karbonet kommer ut ved ganske likt kjemisk skift, og er derfor vanskelige å skille fra hverandre. De gjenkjennes begge ved et sterkt signal

som indikerer at de har et proton bundet til seg, altså ved 132.9 ppm og 132.1 ppm. α -karbonet, som vil komme med et svakt signal fordi det er kvaternært, vil trolig bli skjermet fra karbonylgruppen og derfor komme ved et lavt kjemisk skift. Dette må da være signalet ved 128.9 ppm. Signalet ved 140.2 ppm er da det kvaternære karbonet i aromaten. I IR-spekteret kan også karbonylgruppen gjenkjennes med absorpsjonen på 1729 cm^{-1} . Alken- og aromatområdet gir et signal på 3062 cm^{-1} .

Reaksjonen ble utført mange ganger og med ulike mengder uten at dette påvirket resultatet.

2.6 Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.6 Syntese av nitroakrylat **46** fra benzaldehyd **44** via imin **45**.

Akrylat **46** ble syntetisert etter tidligere publisert arbeid.⁸⁴ Iminet ble bekreftet ved ^1H NMR og ble benyttet i neste reaksjon uten opprensing. Det ble forsøkt å øke ekvivalenten av etyl-nitroacetat til 1.2 mmol^{61} for å øke utbytte på reaksjonen, uten at det hadde noe stor effekt. Syntesen ble utført fem ganger.

^1H NMR-spekteret av råprodukt **46** viste benzaldehyd, akrylat og fenylacetamid samt store mengder Ac_2O . Ac_2O reagerer med anilin fra iminet og danner fenylacetamid som biprodukt. Siden iminet er såpass ustabil og dekomponerer enda lettere enn akrylatet er det rimelig å anta at det er her benzaldehydet stammer fra. Det var ikke benzaldehyd tilstede da reaksjonen ble startet. Kolonnekromatografi med deaktivert silikagel ble brukt til opprensing da tidligere akrylater har vist seg å være ustabile. Utbyttet ble noe dårligere enn forventet her, og fraksjonene inneholdt mye benzaldehyd **44** som tydet på dekomponering av akrylat. Verken omkrystallisering med ren heksan, CH_2Cl_2 /heksan eller eter/heksan ga tegn til utfelling av krystaller.

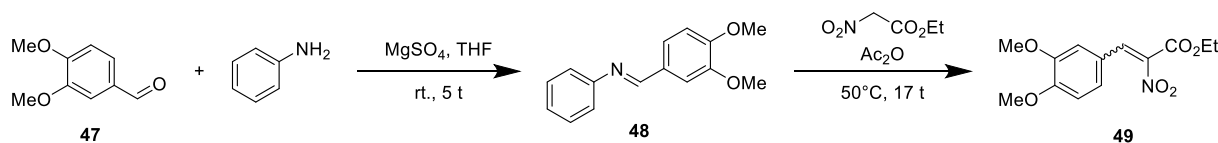
Det var ønskelig å fjerne så mye Ac_2O som mulig før opprensing med silikagel. Med et kokepunkt på $139,4^\circ\text{C}$ var det vanskelig å dampe av på rotavapor. Råproduktet med Ac_2O ble derfor dampet ned på oljebad i 1 time ved 150°C . ^1H NMR-spekteret bekreftet at mengde Ac_2O ble mindre uten at ønsket produkt ble ødelagt. Råprodukt ble forsøkt rensert ved filtrering gjennom en silikaplugg for å se om fenylacetamid kunne bli separert fra akrylatet uten å miste for store mengder av akrylatet. Separasjonen var vellykket, men noe dekomponering fant også sted. Fraksjonen ble omkrystallisert med ulike forhold av 1,2-dikloretan/heksan som førte til rene krystaller av Z-nitroakrylat **46**. Det ble i tillegg forsøkt omkrystallisering av råprodukt etter

fjerning av Ac_2O med 1,2-dikloretan/heksan som førte til utfelling av fenylacetamid. Moderluten ble igjen prøvd omkrystallisert med samme løsemiddel uten at utfelling fant sted.

En årsak til at det kan være vanskelig å få krystaller av dette akrylatet, og flere herunder, kan være at blandingen ikke har vært overmettet av ønsket produkt, som har ført til at alt løser seg og følgelig vil ingen krystaller felle ut. Råproduktet inneholdt mange komponenter, som kan forklare hvorfor det ikke ble noe utfelling ved omkrystallisering av råprodukt.

^1H NMR-spekteret viser olefinprotonet med en skiftverdi på 7.44 ppm. Protonene i *meta*-posisjon kommer ut ved kjemisk skift på 6.90 ppm som en dublett. Skiftverdien på 7.37 ppm er trolig protonene i *ortho*-posisjon. Sistnevnte kommer ut noe høyere på grunn av plasseringen på aromaten. Metoksigruppen, som en tydelig singlett ved 3.82 ppm, samt etylgruppen bekrefter strukturen. I ^{13}C NMR-spekteret kan karbonylgruppen ses ved 162.8 ppm, og karbonet plassert i *para*-posisjon vil nå komme ut ved høyere skiftverdi enn ved fenylakrylat **43**. Dette som følge av den nyinnførte metoksigruppen. To signaler ved 132.1 og 114.8 ppm med høy intensitet vil trolig være karbonene i aromaringen som ikke har noen funksjonell gruppe bundet til seg. Den høye intensiteten på signalene skyldes at det er to karboner som kommer ut ved likt kjemisk skift. Påstandene om hvilket signal som tilhører hvilket karbon grunnlegges med skjerming fra elektronene fra oksygenatomet i metoksigruppen.⁹¹ Denne gruppen påvirker de andre karbonene i aromaten ved å gjøre det lettere for nabokarbonene å danne resonans enn det det vil være for karbonene lenger borte fra metoksigruppen. Derfor vil nabokarbonene lengst borte komme ut ved høyere skift, altså karbonet i *meta*-posisjon for metoksigruppen vil komme ved høyere kjemisk skift enn de i *ortho*-posisjon. Ved 138.0 og 121.2 ppm observeres det topper med lav intensitet. Dette vil være fordi disse karbonene ikke har noe hydrogen bundet til seg, som vil gjøre at relaksjonstiden til karbonet vil være lavere, og følgelig vil intensiteten være lavere.⁹¹ Disse signalene viser α -karbonet og karbonet i aromaten som binder til alkenet, men det vil være vanskelig å si med sikkerhet hvem som er hvem. Signalet ved 132.5 ppm er trolig β -karbonet da den kommer ut med en sterkere intensitet enn de to kvaternære karbonene. I IR-spekteret ser man karbonylgruppen ved 1721 cm^{-1} . Et signal for alken- og aromatområde over 3000 cm^{-1} observeres, men instrumentet klarte ikke å registrere det.

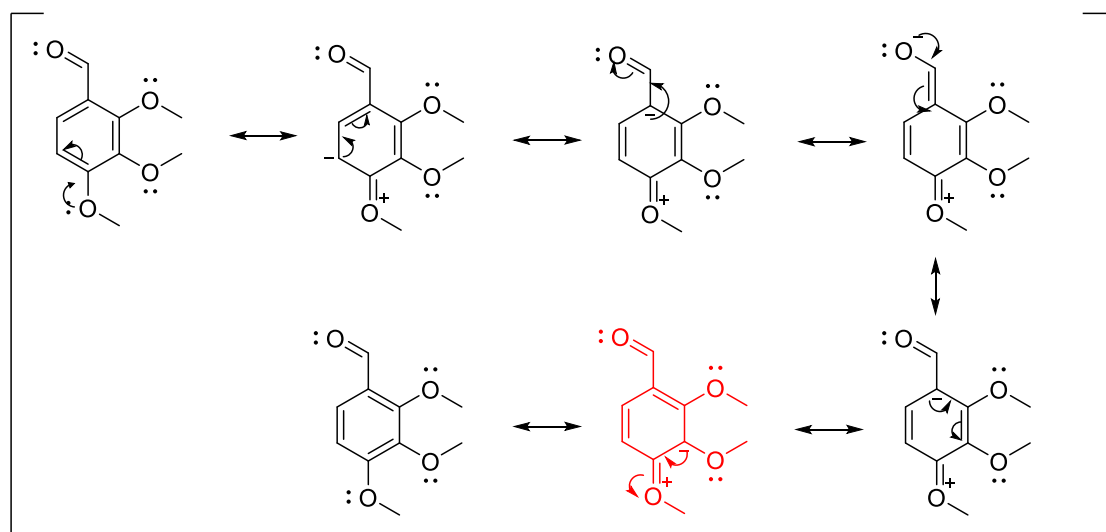
2.7 Syntese av etyl(*Z*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat og etyl(*E*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.7 Syntese av nitroakrylat **49** fra benzaldehyd **47** via imin **48**.

Prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ ble fulgt for å syntetisere nitroakrylat **49**.

Metoksi er en elektrondonerende gruppe og vil øke elektrontettheten i det aromatiske systemet. Metoksigruppen i *meta*-posisjon bidrar til at en av resonansene til aldehyd **47** får en negativ ladning ved siden av den elektronrike gruppen. Dette medfører en forlengelse av reaksjonstiden fra fem til 30 timer ved dannelse av imin **48**. Resonansformene er vist i Skjema 2.8, hvor den aktuelle resonansen er vist i rødt.



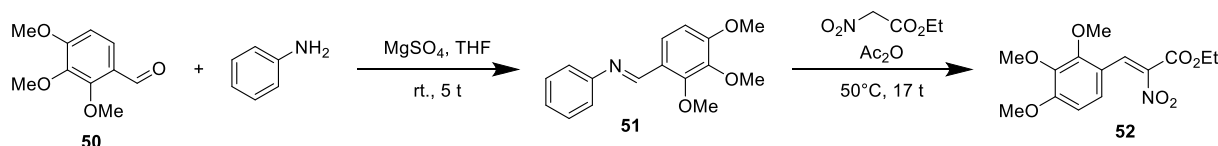
Skjema 2.8 Resonans av benzaldehyd **47**.

Det var vanskeligheter ved opprensing av produkt **49**. Ved første forsøk ble råproduktet delt i to fraksjoner hvor den ene ble forsøkt omkrystallisert med kokende CH_2Cl_2 /heksan, mens den andre ble rensed ved kolonnekromatografi med deaktivert silika. Ved omkrystallisering av råproduktet felte det først ut krystaller av biproduktet fenylacetamid. Moderluten ble så forsøkt omkrystallisert med CH_2Cl_2 /heksan igjen, men det ble ikke observert noen krystaller i denne fraksjonen. Noe dekomponering fant sted under opprensing ved kolonnekromatografi. De to fraksjonene fra kolonnen ble omkrystallisert med CH_2Cl_2 /heksan som resulterte i gule krystaller

av *Z*- og *E*-isomerene av akrylat **49**. Det ble forsøkt omkrystallisering for å isolere *Z*-isomerene, men dette viste seg å være vanskelig. Det ble istedenfor valgt å gå videre med blandingen av isomerer ettersom de begge ville danne ønsket produkt i neste trinn av syntesen. Reaksjonen ble utført to ganger.

^1H og ^{13}C NMR-spektrene bekrefter strukturen til akrylat **49**. I ^1H NMR-spekteret observeres olefinprotonet i *E*-isomerene som en singlett ved 8.03 ppm, mens *Z*-isomerene som en singlett ved 7.45 ppm. I aromatområdet er det problematisk å se hvilket signal som hører til hvilket proton av de to isomerene. Antall protoner stemmer imidlertid overens med strukturene. Metoksigruppene observeres som to dubletter ved 3.87 og 3.94 ppm. I tillegg kan man se begge etylgruppene i spekteret. I ^{13}C NMR-spekteret bekrefter signalene ved 161.8 og 159.5 ppm de to karbonylgruppene. Antall signaler stemmer overens med strukturene og man kan tydelig se åtte protonerte karboner i spekteret. Karbon som er bundet til en nitrogruppe har generert et mindre intenst signal i ^{13}C NMR som kan tilsi at signalene ved 138.3 og 139.9 ppm er disse to. Det er mer problematisk å skille etylgruppen fra noen av metoksigruppene i dette spekteret med begge diastereomerene, enn ved de øvrige forbindelsene. Krystallene har ikke blitt tilstrekkelig tørket ettersom det observeres rester av løsemiddel i form av 1,2-dikloretan ved 3.73 ppm i ^1H NMR-spekteret og 43.42 ppm i ^{13}C NMR-spekteret.⁹² I IR-spekteret vil signalet ved 1723 cm^{-1} komme fra karbonylgruppen. Det ønskede signalet over 3000 cm^{-1} fra alken- og aromatområdet ble ikke registrert av instrumentet, men observeres i spekteret.

2.8 Syntese av etyl(*Z*)-3-(2,3,4-trimetoksifenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.9 Syntese av nitroakrylat **52** fra benzaldehyd **50** via imin **51**.

Proseduren av Liu og medarbeidere⁸⁴ ble benyttet med noen modifikasjoner. Reaksjonstiden til imin **51** ble, av samme årsak som diskutert ved syntese av imin **48**, lenger enn angitt i prosedyren. Syntesen av imin **51** ble utført fire ganger.

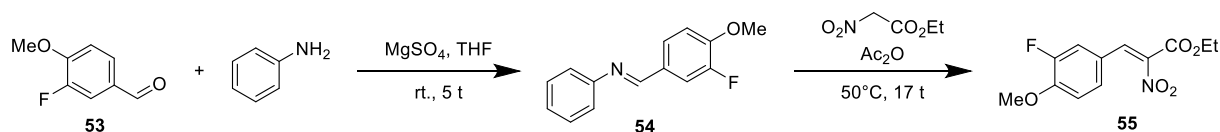
Høyeste utbytte av **52** ble kun 2 %, som kan skyldes mange opprensningstrinn. Reaksjonen ble utført fire ganger etter prosedyre med ulike molekvalenter, men det viste seg å bli vanskelig å bli kvitt Ac_2O . Før opprensning ble råproduktet derfor dampet inn på rotavapor i 1 time ved 150°C som utført på akrylater tidligere. Dette fjernet mye av Ac_2O og omkrystallisering ble lettere å gjennomføre. Spektrene av råproduktet ble også enklere å tolke før opprensning.

Det ble testet ut ulike opprensningstrinn for dette akrylatet. Det ble først forsøkt å dele

råproduktet, der den ene fraksjonen ble omkrystallisert med CH_2Cl_2 /heksan, uten at det ga utfelling. Det ble utført kolonnekromatografi på den andre fraksjonen med deaktivert silikagel, men mye av stoffet dekomponerte. To fraksjoner fra kolonnen, hvor begge hovedsakelig inneholdt de to isomerene, ble forsøkt omkrystallisert med CH_2Cl_2 /heksan. Det ble observert utfelling i begge, der krystallene inneholdt begge isomerene og aldehyd. Det ble forsøkt ny omkrystallisering med 1,2-dikloretan/heksan, der ren *Z*-isomer felte ut, men med rester av Ac_2O . Begge fraksjonene ble så satt på oljebad ved $150\text{ }^\circ\text{C}$ for å få bort restene av Ac_2O . Dette resulterte i rent akrylat **52**, men med veldig lavt utbytte. Ved nytt forsøk ble råproduktet rensert ved filtrering gjennom en silikplugg, der målet var å få separert fenylacetamid fra resten av komponentene og øke utbyttet på reaksjonen. Dette var noenlunde vellykket, men noe dekomponering fant sted. Dette viste seg likevel å bli det beste opprensingsmetoden. Det ble forsøkt omkrystallisering med 1,2-dikloretan/heksan som ga ren *Z*-isomer.

^1H NMR-spekteret bekrefter strukturen blant annet med et signal på 7.85 ppm som er olefinprotonet. De to dublettene ved forholdsvis 7.11 og 6.67 ppm er aromatprotoner, og de tre metoksigrupperne kommer ut som singletter ved 3.97, 3.91 og 3.86 ppm. Ellers bekrefter etylgruppen også strukturen. I ^{13}C NMR-spekteret vil trolig karbonylgruppen komme ved 159.7 ppm som det høyeste signalet. Etter dette følger de tre substituerte karbonatomene i *ortho*-, *meta*- og *para*-posisjon. Her er det rimelig å anta at karbonet i *meta*-posisjon vil komme ut med lavest kjemisk skift på grunn av skjerming fra begge nabogrupper, altså signalet på 157.3 ppm. Det er vanskelig å skille mellom karbonene i *para*-posisjon og *ortho*-posisjon, men de to på 153.9 og 142.0 ppm er trolig disse to. Signalet ved 139.2 ppm kommer ut med lav intensitet som antyder at karbonet ikke har noe hydrogen bundet til seg, så dette kan være α -karbonet. De tre signalene på 127.8, 124.1 og 107.8 ppm, med høyere intensitet enn de andre tyder på at karbonene er protonert, og vil følgelig være β -karbonet og de to karbonene i aromaten. Det er også her grunn til å anta at karbonet i *meta*-posisjon vil komme ut ved lavest kjemisk skift som følge av skjerming fra metoksigrupperne, mens de to andre er vanskelig å skille. Signalet på 116.0 ppm er da karbonet i aromaten som binder til alkenet. Ellers ser man tre tydelige metoksigrupper, samt etylgruppen som er med og bekrefter ønsket sluttprodukt. Det observeres spor av vann og hanefett i ^1H NMR-spekteret.⁹² I IR-spekteret bekrefter signalet ved 1723 cm^{-1} strukturen. Ønsket signal over 3000 cm^{-1} observeres i spekteret.

2.9 Syntese av etyl(Z)-3-(3-fluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.10 Syntese av nitroakrylat **55** fra benzaldehyd **53** via imin **54**.

To ulike metoder ble forsøkt for å syntetisere akrylat **55**.

Metode 1 fulgte en prosedyre av Dehaen og medarbeidere⁶¹ hvor akrylat **55** ble omsatt fra benzaldehyd og etyl-nitroacetat i ett trinn. Det ble observert små mengder av ønsket produkt ved endt reaksjon og en annen metode ble derfor benyttet.

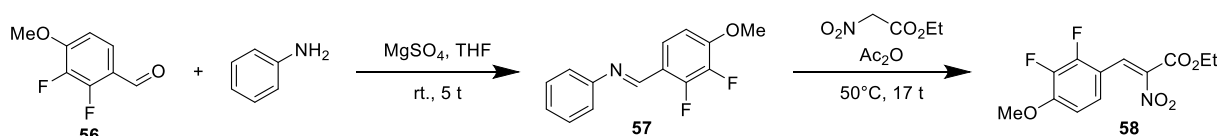
Metode 2 ble utført etter prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ som resulterte i ønsket produkt **55** med utbytte på 35 %.

Noen problemer var det også her under opprensing av akrylat **55**. Det ble først gjennomført opprensing ved kolonnekromatografi uten å deaktivere silika. TLC og ¹H NMR av råproduktet viste at akrylat **55** var tilstede, men etter opprensing ble det kun observert aldehyd **53** i fraksjonene. Det ble dermed utført kolonnekromatografi med deaktivert silika. Akrylat **55** viste seg å være mer stabil ved opprensing ved kolonnekromatografi med deaktivert silika enn flere av de øvrige akrylatene. Dette kan skyldes at fluoratomet er meget elektronegativt og elektrontiltrekkende som medfører mindre elektrontetthet i det aromatiske π-systemet. Noe dekomponering ble likevel observert, men det førte ikke til at endring av metoden ble ansett som nødvendig. Separasjon av akrylat og benzaldehyd ved opprensing var derimot problematisk, og omkrystalliseringstrinnet var nødvendig for å få rent akrylat **55** og da kun som *Z*-isomeren.

¹H NMR-spekteret bekrefter strukturen til akrylat **55**. Olefinprotonet kommer ved 7.42 ppm. Ellers ser man flere signaler i aromatområdet som til sammen gir tre protoner. Fluor bidrar med koblingskonstanter fra ³*J*-⁶*J* som er årsaken til at man ser flere signaler enn man skulle anta i aromatområdet.⁹¹ For å avgjøre hvilke signal som tilhørte hvilke proton, ble koblingskonstantene regnet ut manuelt. Den doble tripletten ved 7.22 ppm gir en koblingskonstant på ~1 Hz. Dette tilsvarer en ⁶*J*-kobling mellom fluor og det aktuelle protonet, som følgelig vil være protonet i *para*-posisjon for fluor. Den doble dubletten ved 7.18 ppm får en koblingskonstant på 11.8 Hz. Dette gir høy sannsynlighet for at den doble dubletten er protonet i *ortho*-posisjon med en ³*J*-kobling til fluor. Tripletten ved 6.98 ppm må da være protonet i *meta*-posisjon for fluor. Dette blir også bekreftet med en koblingskonstant på 8.5 Hz som stemmer godt overens med en ⁴*J*-kobling.

I ^{13}C NMR-spekteret gjenkjennes karbonylkarbonet ved 159.2 ppm. Som i ^1H NMR-spekteret, ser man også flere signaler enn man skal få, som igjen skyldes fluor. Fluor danner ^{13}C - ^{19}F koblingskonstanter, der $^1J_{\text{CF}}$ -koblingen er forventet å være veldig stor. Signalet på 151.2 ppm kan være C3. Dette sies på bakgrunn av at det observeres en koblingskontant på 249 Hz, som da er en $^1J_{\text{CF}}$ -kobling. Videre er det en kobling på 17 Hz ved 151.1 ppm. Dette er en $^2J_{\text{CF}}$ -kobling og følgelig C4, da intensiteten på signalet tilsier et kvaternært karbon og C2 kan derfor utelukkes. Signalet ved 139.1 ppm gir ingen kobling, og kan være α -karbonet. Signalene ved 131.5 og 127.6 og 113.4 ppm gir alle en $^4J_{\text{CF}}$ -kobling ~ 2 Hz. De tre signalene kommer med høy intensitet og vil følgelig ha et proton bundet til seg. Sammen med koblingskontanten kan det derfor antas at disse tre er C5, C6 og β -karbonet. Disse er dog noe vanskelig å skille fra hverandre. Signalet ved 121.6 ppm er et kvaternært karbon med en $^3J_{\text{CF}}$ -kobling på 7 Hz. Dette vil da trolig være C1. Ved 117.1 ppm kommer trolig C2, da koblingskonstanten på 19 Hz indikerer en $^2J_{\text{CF}}$ -kobling. Videre kan man se metoksigruppen samt etylgruppen bekrefter strukturen i spekteret. I IR-spekteret observeres signalet på 3048 cm^{-1} som trolig kommer fra aromat- og alkenområdet. Ved 1708 cm^{-1} kommer det er signal fra karbonylgruppen.

2.10 Syntese av etyl(Z)-3-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.11 Syntese av nitroakrylat **58** fra benzaldehyd **56** via imin **57**.

For å danne akrylat **58** ble prosedyre av Liu og medarbeidere⁸⁴ benyttet. Iminreaksjonen ble satt på tre ganger med halv ekvivalent hver gang. Etter 5 timer ble reaksjonen sjekket på TLC og ^1H NMR bekreftet at reaksjonen var ferdig. Knoevenagel kondensasjonen ble så satt på med halv mengde imin **57** uten videre opprensing.

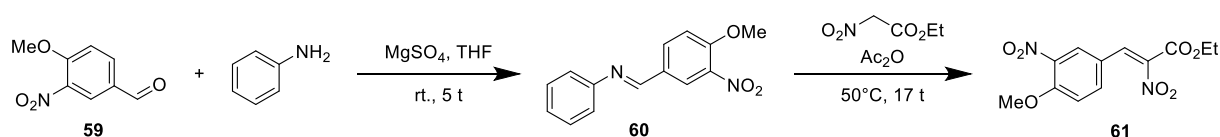
Opparbeiding ble utført etter prosedyre, og opprensing med kolonnekromatografi og deaktivert silika ble benyttet. Silikagelen ble deaktivert på grunnlag av at akrylat **55** viste dekomponering ved kolonnekromatografi uten deaktivert silikagel. En fraksjon med begge stereoisomerene ble omskrystallisert i henhold til prosedyre og *Z*-isomerene felte ut som krystaller. Reaksjonen ble utført fire ganger med lavere ekvivalent enn oppgitt i prosedyren uten problemer.

Olefinprotonet kommer ved 7.68 ppm i ^1H NMR-spekteret som bekrefter at Knoevenagel kondensasjonen har funnet sted. Videre ser man flere signaler i aromatområdet enn de to dublettene man kanskje forventer å se. Dette skyldes igjen at fluor kobler til proton. Den doble tripletten på 7.14 ppm får etter manuell utregning to koblingskonstanter på henholdsvis ~ 2 Hz

og 8.4 Hz. Ut i fra dette kan man konkludere med en 3J kobling og en 4J . Den andre doble tripletten ved 6.77 ppm får også koblingskonstanter med tilsvarende verdier. Dette stemmer bra med det som er antatt, da begge protonene i aromatområdet vil koble likt til fluor. Ved manuell utregning av teoretisk skiftverdi⁹¹ for de to protonene ser det ut som at *ortho*-protonet kommer ut ved høyest kjemisk skift. Dette er på grunnlag av hvor protonene ligger i forhold til metoksigruppen i *para*-posisjon, samt hvor de ligger i forhold til den elektronrike triazolen. Metoksigruppen ved 3.96 ppm og etylgruppen bekrefter ellers strukturen.

I ^{13}C NMR-spekteret kommer signalet til karbonylkarbonet ved 158.9 ppm. Det blir også i dette spekteret observert flere signaler enn karboner i forbindelsen, som igjen skyldes koblingen fluor har til karbon. Ellers observeres det en kvartett ved 152.4 ppm som kan være karbonet i *para*-posisjon. En noe høy $^2J_{\text{CF}}$ -kobling på 81 Hz, som kan stemme bra mot signalet på 151.5 ppm kan bekrefte antagelsen. Videre kobler signalet på 151.5 ppm trolig også med signalet på 149.1 ppm, med en $^1J_{\text{CF}}$ -kobling på 250 Hz. Det er da grunn til å tro at signalet på 151.5 ppm er et karbon med fluor bundet dirkete til seg, og da være C3. Videre ser man et lignende mønster i signalene rundt 139-142 ppm. Signalet på 140.4 ppm kobler til signalet på 142.2 ppm på 177 Hz. Man kan derfor anta en noe lav $^1J_{\text{CF}}$ -kobling her og si at signalet på 140.4 ppm er C2. Samme signal kobler også med signalet på 139.7 ppm. Her er koblingen på 58 Hz, altså en noe høy $^2J_{\text{CF}}$ -kobling, og følgelig kan man anta at det signalet er C1. De øvrige karbonene er alle kvaternære, som stemmer med intensiteten de kommer med. Signalene på 123.7, 123.0 og 108.8 ppm kommer derimot med sterk intensitet, som indikerer at de er protonert. De ligger også i aromat/alken-området, som stemmer bra med C5, C6, og β -karbonet. Disse er litt vanskelig å skille, da alle vil få en $^3J_{\text{CF}}$ - og $^4J_{\text{CF}}$ -kobling fra de to fluoratomene. α -karbonet er trolig det noe svakere signalet på 111.2 ppm som også får en noe høy $^4J_{\text{CF}}$ -kobling på 9 Hz. ^{13}C NMR-spekteret bekrefter ellers strukturen med metoksigruppen og etylgruppen tilstede. I IR-spekteret gir signaler ved 3058 og 1712 cm^{-1} indikasjon på rett struktur.

2.11 Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-2-nitroakrylat



Skjema 2.12 Syntese av nitroakrylat **61** fra benzaldehyd **59** via imin **60**.

For å danne akrylat **61** ble prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ benyttet. Det beste utbytte som ble oppnådd i denne oppgaven var 14 %.

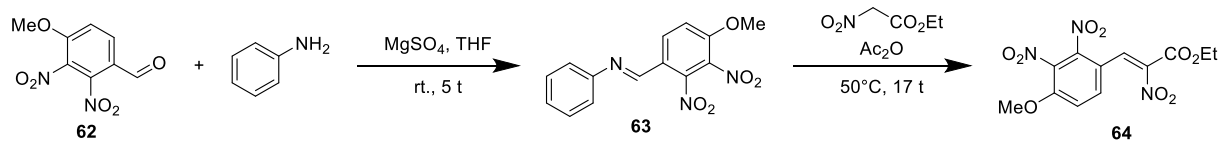
Som ved tidligere akrylater ble det også her problemer ved opprensing. Forbindelse **61** viste seg å dekomponere raskere enn flere av de andre akrylatene. Det ble først forsøkt rensing ved

kolonnekromatografi med deaktivert silika. TLC og ^1H NMR av råproduktet viste at akrylat var tilstede. Det ble tatt ^1H NMR av to fraksjoner fra kolonnekromatografien som viste store mengder benzaldehyd i begge fraksjonene. Det ble likevel forsøkt omkrystallisering av disse med CH_2Cl_2 /heksan. Dette ga ren *Z*-isomer av forbindelse **61**, men kun 15 mg når forventet masse var 705 mg. For å løse problemet med dekomponering ble råproduktet forsøkt rensset ved filtrering gjennom en silikaplugg hvor silika ble deaktivert. Dette medførte også dekomponering av store mengder akrylat. Det ble derfor utført omkrystallisering av råprodukt med kokende CH_2Cl_2 /heksan. Dette førte til utfelling av begge isomerer av akrylat **61** og biproduktet fenylacetamid. Igjen var større rester av Ac_2O et problem. Omkrystallisering av akrylat **61** viste seg vanskelig når amidet var til stede ettersom at disse felte ut mer eller mindre samtidig. Omkrystallisering måtte gjennomføres flere ganger med ulike løsemidler for å finne riktig forhold. Best resultat ga kokende 1,2-dikloretan/heksan. 1,2-dikloretan har et høyere kokepunkt enn CH_2Cl_2 noe som ga krystalliseringsprosessen lengre tid til å finne sted. Det måtte gjennomføres to til tre omkrystalliseringer før ren *Z*-isomer av forbindelse **61** ble oppnådd. Dette var ikke gunstig ettersom at mye av ønsket produkt ble borte ved hver omkrystallisering. Det ble ved flere anledninger valgt å gå videre til neste trinn i syntesen med rester av fenylacetamid grunnet antakelse om at biproduktet ikke ville påvirke sykloaddisjonen.

Verdier i ^1H og ^{13}C NMR-spektrene bekrefter strukturen. Olefinprotonet kommer ut som en singlett ved 7.47 ppm i ^1H NMR-spekteret. Dublett ved 7.93 ppm viser til naboprotonet til nitrogruppen. Dobbel dublett ved 7.61 ppm hører til det andre protonet i *meta*-posisjon. I motsetning til de overnevnte akrylatene ser man her *meta*-kobling mellom disse to protonene. Dublett ved 7.15 ppm vil da tilhøre protonet på C5. Metoksigruppen gir signal ved 4.03 ppm og etylgruppen ved 4.39 og 1.37 ppm. ^{13}C NMR-spekteret bekrefter karbonyl ved 159.0 ppm. Signalet ved 154.4 ppm er karbonet i *para*-posisjon. Signalene ved 134.5 og 130.1 ppm er trolig de to karbonene bundet til nitrogruppene. Det er her vanskelig å differensiere hvilket signal som hører til hvilket karbon. Dette gjelder også for karbonet øverst på aromaten som mest sannsynlig er signalet ved 121.4 ppm. Resten av karbonene er vanskelig å plassere, men det kan tenkes at *meta*-karbonet har skiftverdi på 114.6 ppm grunnet skjerming fra metoksigruppen. IR-spekteret gir signaler ved 3115 og 1720 cm^{-1} som indikerer alken- og aromatområdet og karbonylgruppe.

Første trinn av syntesen ble utført fem ganger, mens andre trinn ble utført syv ganger ettersom det ble valgt å dele opp det tillagde imin **60** ved de to første anledningene.

2.12 Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-2,3-dinitrofenyl)-2-nitroakrylat

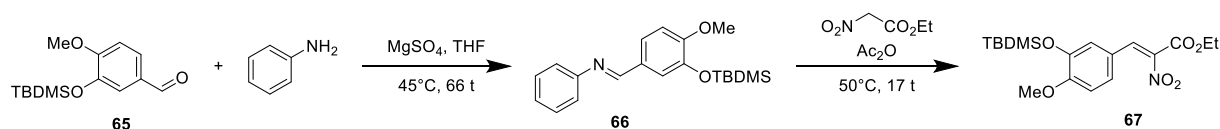


Skjema 2.13 Forsøk på syntese av nitroakrylat **64** fra benzaldehyd **62** via imin **61**.

Prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ ble forsøkt for syntese av akrylat **64**.

¹H NMR-spekteret viste at ønsket produkt var dannet, men det ble vanskelig å isolere fra de andre komponentene i råproduktet. Det ble forsøkt omkrystallisering av råprodukt da dette fungerte på akrylat **61**. Omkrystallisering med 1,2-dikloretan/heptan ga ingen krystaller. Deretter ble CH₂Cl₂/heksan brukt som førte til utfelling av fenylacetamid. Moderluten ble forsøkt omkrystallisert med CH₂Cl₂/heksan for å få isolert akrylatet, men det ble ikke observert utfelling. Reaksjonen ble kun forsøkt én gang på grunn av lite utgangsstoff og at tiden ikke strakk til.

2.13 Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat

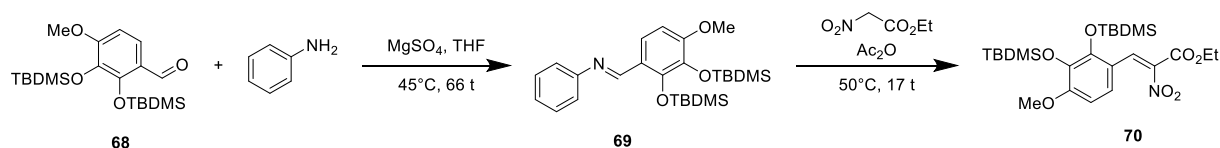


Skjema 2.14 Forsøk på syntese av nitroakrylat **67** fra benzaldehyd **65** via imin **66**.

Akrylat **67** ble forsøkt framstilt ved bruk av prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ med noen modifikasjoner. Reaksjonstiden til første trinn i syntesen, dannelsen av imin **66**, ble meget lang. Benzaldehyd **65** inneholder en TBS-beskyttelsesgruppe som er en elektronrik gruppe. Når denne gruppen donerer elektroner inn i det aromatiske systemet til benzaldehyd **65** vil ikke aldehydet reagere. Det ble også tilført varme til systemet i et forsøk på å få ned reaksjonstiden. Selv etter 66 timer med varme var det ved noen tilfeller rester av startprodukt til stede i løsningen.

Akrylat **67** viste seg som flere av de tidligere nevnte akrylatene å dekomponere lett. Det ble først forsøkt opparbeidelse ved kolonnekromatografi med deaktivert silika. ^1H og ^{13}C NMR-spektrene, samt TLC, viste akrylat **67** i råprodukt. Etter endt kolonnekromatografi var det ingen antydning til akrylat **67**. Råproduktet ble derfor forsøkt rensert ved filtrering gjennom en silikaplugg hvor silika ble deaktivert, som medførte at fenylacetamid og Ac_2O ble separert vekk. Fraksjonen fra silikaplugg med akrylat **67** tilstede ble forsøkt omkrystallisert med 1,2-diklorethan/heksan, men ingen utfelling ble observert. Det ble også forsøkt omkrystallisering med ren heksan. Omkrystallisering av råproduktet til det TBS-beskyttede akrylat **67** med 1,2-diklorethan/heksan ble også gjennomført. Dette førte til utfelling av fenylacetamid i to omganger. Ingen krystaller av TBS-beskyttet akrylat ble observert. Det ble til slutt valgt å bruke fraksjonen fra silikapluggen videre i neste trinn av syntesen. Denne inneholdt da begge isomerene av akrylat **67** og benzaldehyd **65**. Forsøk på syntesen ble utført fire ganger, hvor to av dem var nedskalert til 3.2 mmol.

2.14 Forsøk på syntese av etyl(*Z*)-3-(2,3-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat

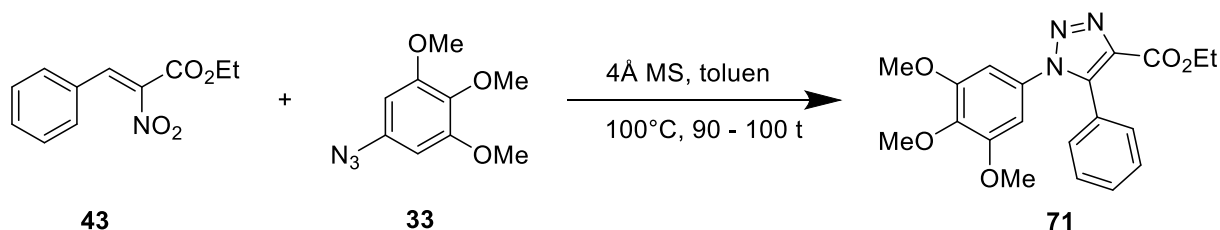


Skjema 2.15 Forsøk på syntese av nitroakrylat **70** fra benzaldehyd **68** via imin **69**.

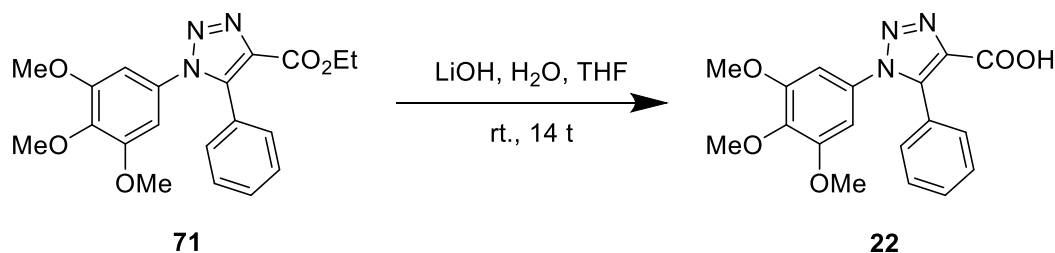
Prosedyren av Liu og medarbeidere⁸⁴ ble benyttet i forsøket på denne syntesen. Etter å ha forsøkt denne syntesen med én TBS-gruppe, var det grunn til å mistenke at imindannelsen ville bruke lenger tid enn oppgitt i referansen. Reaksjonen ble observert på TLC og ^1H NMR. Etter 13 timer ble det observert lite endring og det ble derfor skrudd på varme. Reaksjonen ble tatt av etter 24 timer. Reaksjonen ble nedskalert til 0.39 mmol og utført én gang.

Ved Knoevenagel kondensasjonen ble det satt på mindre ekvivalent (0.39 mmol) enn oppgitt i prosedyren grunnet lite startmateriale. Det ble også tilsatt 1.5 ekvivalent med etylnitroacetat for at reaksjonen skulle bli så fullstendig som mulig. I forsøk på å bli kvitt noe av biproduktene og startmateriale og på bakgrunn av lignenden akrylat **67**, ble ulike rensemetoder benyttet. Det ble forsøkt omkrystallisering av råproduktet med 1,2-diklorethan/heksan. Dette ga ingen utfelling. Det ble derfor valgt å filtrere råproduktet gjennom en silikaplugg med deaktivert silika. Fraksjon fra silikaplugg inneholdt begge isomerene i tillegg til litt aldehyd og Ac_2O . Omkrystallisering med 1,2-diklorethan/heksan ble forsøkt, men ingen utfelling ble observert. Reaksjonen ble utført én gang.

2.15 Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre



Skjema 2.16 Syntese av karboksylat **71** fra fenylakrylat **43**.



Skjema 2.17 Syntese av karboksylysyre **22** fra det korresponderende karboksylat **71**.

1,3-dipolar sykloaddisjon av fenylakrylat **43** og azid **33** til karboksylat **71** ble utført etter prosedyre av Dehaen og medarbeidere⁶¹, med noen modifikasjoner. Reaksjonen ble utført fire ganger hvor det beste oppnådde utbyttet ble 39 %.

Det ble observert rester av utgangsstoff etter endt kolonnekromatografi. Det er mulig en enda lengre reaksjonstid ville gitt bedre omsetting av utgangsstoffene. Reaksjonen var dessverre vanskelig å overvåke med TLC ettersom den viste seg å være sensitiv ovenfor oksygen og ikke gikk under nitrogenatmosfære. Dette førte til at reaksjonen ble stående i et helt tørt og tett mikrobølgeovnrør og når man først hadde brutt forseglingen på røret viste det seg å være vanskelig å starte reaksjonen igjen.

¹H og ¹³C NMR-spektrene bekrefter strukturen, der blant annet en tydelig singlett med høy intensitet ved 6.48 ppm viser til protonene i A-ringene. Multipllett ved 7.42 ppm viser til de tre protonene i *meta*- og *para*-posisjon i B-ringene, mens dublett ved 7.33 ppm viser til de to protonene i *ortho*-posisjon. Videre blir metoksigrupperne bekreftet av to singletter ved 3.84 og 3.65 ppm. Etylgruppen bekrefter også strukturen. I ¹³C NMR-spekteret vil karbonylen vises ved 160.9 ppm. Videre vil de to karbonene i *meta*-posisjon i A-ringene vises som et sterkt signal ved 153.3 ppm. Ved 102.5 ppm er et signal som ut fra intensiteten viser til to karboner med likt kjemisk skift. Skjerming fra de to metoksigrupperne fører til at signalet kommer ut ved et lavere skift og tilsier at dette er de to karbonene i *ortho*-posisjon i A-ringene. Karbonet i *para*-posisjon vil være vanskelig å skille fra de andre kvaternære karbonene i dette området. Metoksigrupperne og etylgruppen blir også observert i spekteret. I IR-spekteret ser man at signalene over ca. 3000

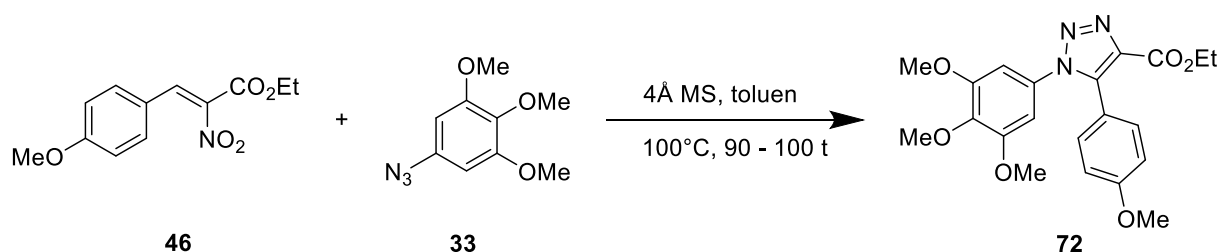
cm⁻¹ ikke har blitt registrert av instrumentet, men det bekrefter alkenområdet. Videre vil signalet ved 1719 cm⁻¹ vise til karbonylgruppen.

Det burde ikke være nødvendig å rense forbindelsen etter hydrolysen. Dessverre så ble det oppdaget forurensninger, som for eksempel hanefett, som medførte at en omkrystallisering av den hydrolyserte forbindelsen **22** måtte utføres. Det ble først forsøkt å trituere med heksan. Dette fikk vekk mesteparten av forurensingene, men siden renhet ble prioritert ble det valgt å omkrystallisere. Dette førte til et lavere utbytte på 53 %.

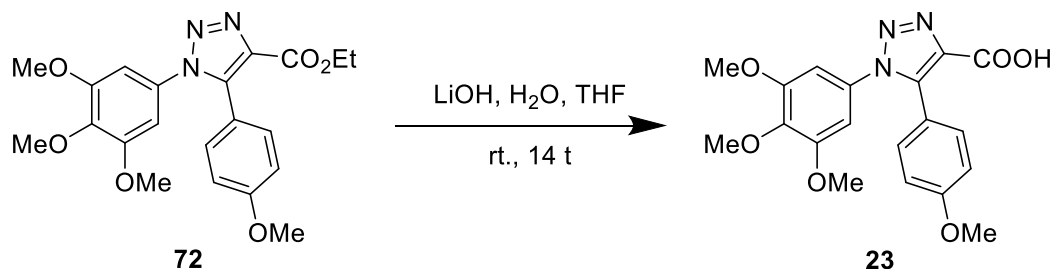
Hydrolysen bekreftes blant annet ved at det ikke lenger observeres etylgruppe i ¹H eller ¹³C NMR-spektrene. I ¹H NMR-spekteret vises syreprotonet som et bredt signal ved 8.62 ppm. Syreprotoner observeres som oftest ved et høyere kjemisk skift. Det relativt lave kjemiske skiftet kan skyldes hydrogenbinding mellom et nitrogenatom i triazolringen og hydrogenet i syren.⁷² Det observeres også en endring i det øverste signalet i ¹³C NMR-spekteret fra 160.9 ppm for karboksylat til 164.1 ppm for karboksylsyren.

I IR-spekteret bekreftes alkenområdet ved 3059 cm⁻¹ og en tydelig singlett ved 1717 cm⁻¹ er karbonylgruppen.

2.16 Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



Skjema 2.18 Syntese av karboksylat **72** fra nitroakrylat **46**.



Skjema 2.19 Syntese av karboksylsyre **23** fra det korresponderende karboksylat **72**.

Forbindelsen ble syntetisert etter kjent prosedyre av Dehaen og medarbeidere.⁶¹ Forbindelse **23** er tidligere rapportert av Demchuk og medarbeidere.⁹³ Reaksjonen av karboksylat **72** ble utført to ganger ved lavere ekvivalent (0.18 mmol) grunnet dårlig utbytte i reaksjonen før. Høyeste utbytte fra denne reaksjonen ble 39 %. Reaksjonen stod på i 96 timer før råproduktet ble rensset ved kolonnekromatografi med deaktivert silikagel.

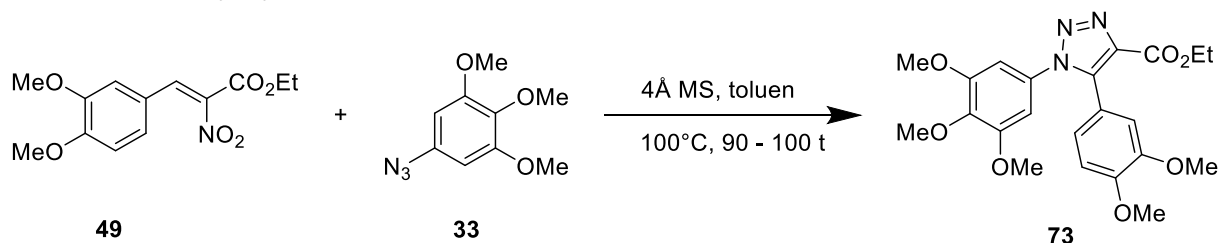
¹H og ¹³C NMR-spektrene bekrefter strukturen. De to dublettene i aromatområdet er protonene i B-ringene. Protonene i *meta*-posisjon vil komme ut noe lavere enn protonene i *ortho*-posisjon, følgelig med kjemisk skift på henholdsvis 6.92 og 7.26 ppm. Singletten ved 6.50 ppm er protonene i *ortho*-posisjon på A-ringene. Antall metoksigrupeer observert og etylgruppen støtter også opp om antagelsen om rett struktur.

¹³C NMR-spekteret viser karbonylkarbonet ved 161.1 ppm, mens signalet på 160.7 ppm trolig er karbonet i *para*-posisjon i B-ringene. Dette på bakgrunn av den nyinnførte metoksigrupeen som sitter på dette karbonet. Det sterke signalet ved 153.3 ppm er begge karbonene i *meta*-posisjon i A-ringene da disse vil komme ut sammen på grunn av symmetrien i A-ringene. Ved 140.6, 138.5, 137.0 og 131.8 ppm kommer det ut fire karboner hvorav alle er kvaternære. Disse er vanskelig i skille, da skiftverdien er relativt lik for aromater og alkener. Ved 130.1 og 128.4 ppm ser man derimot tydelig at må være karbonene i B-ringene. Også her vil karbonene i *meta*-posisjon og karbonene i *ortho*-posisjon komme ut med to signaler på grunn av symmetri i aromaten. Det er grunn til å anta at *ortho*-karbonene vil komme ut med et høyere kjemisk skift enn karbonene i *meta*-posisjon. Dette på grunn av den nyinnførte metoksigrupeen som skjerner for de sistnevnte karbonene, da metoksigrupeer er *ortho*- og *para*-dirigerende. Ved 102.5 ppm kommer karbonene i *ortho*-posisjon på A-ringene ut sammen. Antall metoksigrupeer stemmer som igjen bekrefter strukturen. IR-spekteret bekrefter karbonylgruppen ved 1724 cm⁻¹ og man kan observere at alkenområdet over 3000 cm⁻¹ vises selv om instrumentet ikke har registrert dette signalet.

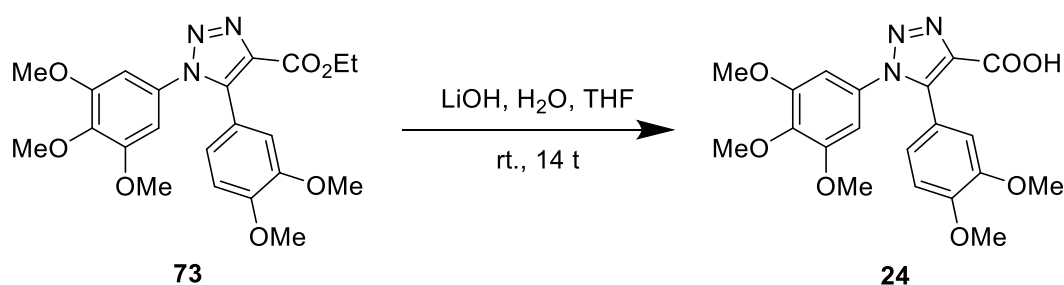
Hydrolyse av karboksylat **72** ble utført med utbytte på 58 %. Det relativt lave utbytte skyldes også her omkrystallisering.

I ¹H NMR-spekteret ser man at hydrolyse har skjedd da etylgruppen i **72** ved 4.39 ppm og 1.36 ppm ikke lenger er tilstede. Det ble ikke observert noe syreproton i spekteret. I ¹³C NMR-spekteret har karbonylkarbonet flyttet seg rundt 2 ppm opp i skiftverdi som stemmer godt med teorien om syrer. Det observeres noe løsemiddel (CH₂Cl₂) i ¹H NMR-spekteret.⁹² Ved 1700 cm⁻¹ i IR-spekteret er trolig signalet fra karbonylen. Instrumentet har ikke registrert verdier i alkenområdet, men det er tydelig tilstede.

2.17 Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre



Skjema 2.20 Syntese av karboksylat **73** fra akrylat **49**.



Skjema 2.21 Syntese av karboksylsyre **24** fra det korresponderende karboksylat **73**.

1,3-dipolar sykloaddisjon av azid **33** og akrylat **49** til karboksylat **73** ble utført etter prosedyre av Dehaen og medarbeidere⁶¹, med modifikasjoner. Det første trinnet i syntesen fra akrylat **49** til karboksylat **73** ga et utbytte på 26 %. Som tidligere nevnt ble det observert rester av utgangsstoff etter endt kolonnekromatografi, noe som kan tyde på at reaksjonen ikke har gått fullstendig. Det ble observert aldehyd, som kan skyldes dekomponering av akrylatet enten under reaksjonen eller på kolonnen. Syntesen av karboksylat **73** ble kun utført ved oppskalering fra 0.38 mmol til henholdsvis 0.78 og 0.67 mmol de to gangene den ble utført.

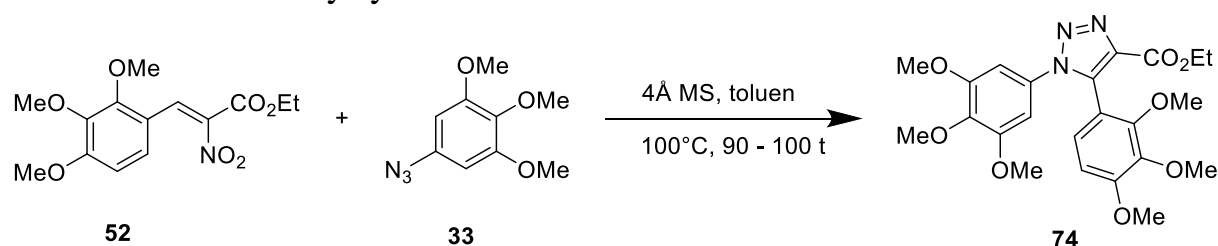
¹H og ¹³C NMR-spektrene bekrefter strukturen av karboksylat **73**. Multiplett ved 6.8-6.9 ppm i ¹H NMR-spekteret viser til de tre protonene i B-ringene. Singlett ved 6.48 ppm viser til de to protonene i *ortho*-posisjon i A-ringene. Videre er etylgruppen også bekreftet, i tillegg til de tre metoksigrupperne hvor de to i *meta*-posisjon i A-ringene kommer ut som én singlett.

I ¹³C NMR-spekteret vil karbonylkarbonet vises som signal på 160.9 ppm i karboksylat **73**. De to karbonene i *meta*-posisjon i A-ringene vil komme som ett sterkt signal ved 153.2 ppm. De to signalene ved 150.1 og 148.5 ppm vil være de to karbonene i B-ringene som er bundet til en metoksigruppe. Karbonet i *para*-posisjon i A-ringene vil komme lavere enn de andre karbonene bundet til metoksigrupper grunnet skjerming fra de to metoksigrupperne i *meta*-posisjon i A-ringene.

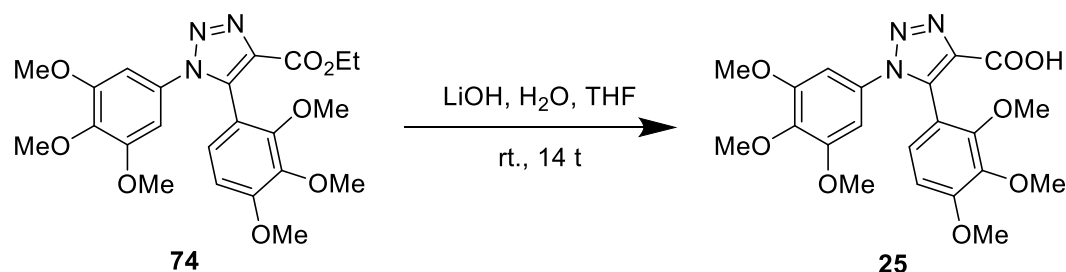
Metoksigrupper er *ortho*- og *para*-dirigerende. Dette fører til at karboner i disse plasseringene vil bli skjermet og signalet fra disse karbonene vil dermed komme ut ved en høyere skiftverdi. Det sterke signalet ved 123.3 ppm vil derfor trolig være C6 i B-ringene, da den tydelig har et proton bundet til seg. Det er fordi dette karbonet kun ligger i *para*-posisjon til én metoksigruppe og følgelig ikke vil bli skjermet like mye som de andre karbonene i B-ringene. C2 og C5 vil oppleve sterkere effekt av skjermingen og dermed få lavere skiftverdi. Signalet ved 102.6 ppm viser til de to karbonene i *ortho*-posisjon i A-ringene som også opplever skjerming fra de omliggende metoksigruppene. Signalene ved 3078 cm⁻¹ og 1726 cm⁻¹ i IR-spekteret bekrefter også strukturen.

¹H NMR-spekteret bekrefter hydrolysen av karboksylat **73** til karboksylsyre **24** ved at man kan se at kvartetten og tripletten ved henholdsvis 4.33 og 1.30 ppm er forsvunnet. Det ble ikke observert signal fra protonet på karboksylsyren. Dette av samme grunn som tidligere beskrevet. I ¹³C NMR-spekteret har også signalene fra etylgruppen blitt borte, og i tillegg har det øverste signalet endret seg fra 161.0 ppm til 163.7 ppm som også legger grunn for at karboksylsyre **24** er blitt dannet. I IR-spekteret bekrefter signaler ved 3081 cm⁻¹ og 1711 cm⁻¹ strukturen.

2.18 Syntese av 5-(2,3,4-trimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



Skjema 2.22 Syntese av karboksylat **74** fra nitroakrylat **52**.



Skjema 2.23 Syntese av karboksylsyre **25** fra det korresponderende karboksylat **74**.

Prosedyren av Dehaen og medarbeidere⁶¹ med modifikasjoner ble benyttet for denne syntesen. Reaksjonen ble utført to ganger i noe mindre skala enn prosedyren (0.27 mmol). Dette skyldtes vanskeligheter med renhet og utbytte under Knoevenagel kondensasjonen i tidligere syntesetrinn.

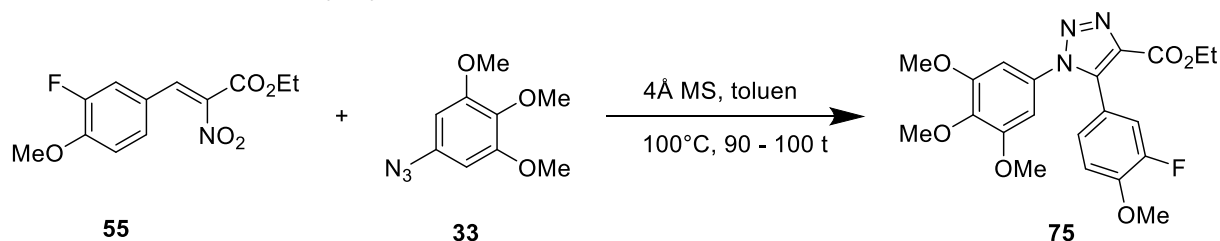
TLC av råproduktet viste akrylat, azid og karboksylat. For opprensing ble prosedyren fulgt ved kolonnekromatografi med deaktivert silikagel. Dette medførte at karboksylatet ble isolert helt rent.

Både ¹H og ¹³C NMR-spektrene bekrefter strukturen, der singletten i ¹H NMR-spekteret på 6.59 ppm vil være *ortho*-protonene i A-ringene. De to andre protonene som er forventet i aromatområde er de to i B-ringene, som følgelig kommer ut som dubletter ved forholdsvis 6.90 og 6.70 ppm. Ellers observeres det singletter i metoksiområdet med integraler på 3, 3, 3, 6 og 3, som stemmer med antall metoksigrupper på karboksylatet. Etylgruppen bekrefter også strukturen.

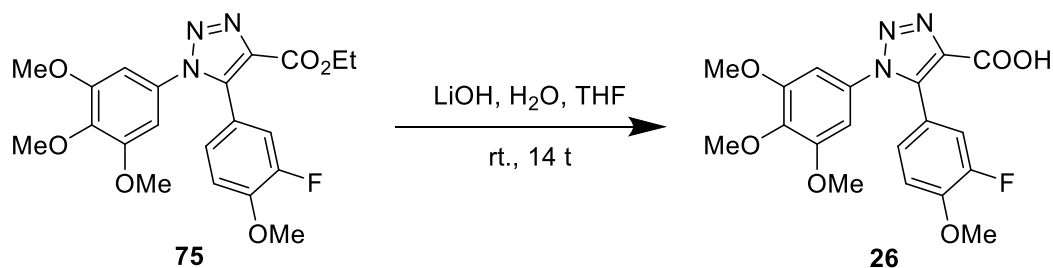
Ved 160.9 ppm i ¹³C NMR-spekteret er det trolig karbonylgruppen som observeres. Ved 155.6 ppm er det *ortho*-karbonet med metoksigruppen i B-ringene som vises. Årsaken til at denne blir ett av karbonene i aromatområdet med høyt skift skyldes at den ikke blir skjermet like mye som de andre karbonene. 153.1 ppm er et signal med sterk intensitet som kan tyde på at dette er to kvaternære karboner, altså *meta*-karbonene i A-ringene. Ved 125.7 og 106.9 ppm ser man tydelig at dette må være et karbon som har bundet proton til seg på grunn av den sterke intensiteten i forhold til de andre karbonene. Det er også grunn til å anta at sistnevnte er karbonet i *ortho*-posisjon på grunn av skjerming fra metoksigruppen i *para*-posisjon. Signalet ved 101.8 ppm er karbonene i *ortho*-posisjon i A-ringene. IR-spekteret gir signaler ved 1727 cm⁻¹ og over 3000 cm⁻¹ som ikke er registrert av instrumentet, men som er med og bekrefter strukturen.

Etter hydrolyse ble råstoffet trituert med kald heksan for å fjerne hane fett fra forbindelsen. Det ble utført omkrystallisering med CH₂Cl₂/heksan som ga ren karboksylsyre **25**. Hydrolyse av karboksylat **74** til karboksylsyre **25** ga et utbytte på 94% og blir bekreftet i ¹H NMR-spekteret. Signalene ved 4.33 og 1.29 ppm er ikke lenger å se i spekteret som indikerer at etylesteren ikke lenger er til stede. Det blir ikke observert noe signal fra syreprotonet, men i ¹³C NMR-spekteret kan man se at karbonylkarbonet har endret signal fra 160.9 til 163.8 ppm som legger til grunn for at karboksylsyre **25** har blitt dannet. Signaler ved 1706 cm⁻¹ og signaler over 3000 cm⁻¹ som ikke er registrert av instrumentet, er med og bekrefter strukturen.

2.19 Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



Skjema 2.24 Syntese av karboksylat **75** fra nitroakrylat **55**.



Skjema 2.25 Syntese av karboksylsyre **26** fra det korresponderende karboksylat **75**.

Som tidligere ble prosedyren til Dehaen og medarbeidere fulgt for å syntetisere ønsket produkt **75**.⁶¹

Reaksjonen ble utført fire ganger med ulikt resultatet, hvor det beste oppnådde utbytte ble 44 %. De ulike resultatene skyldes mest sannsynlig opparbeidingen ved kolonnekromatografi. Ved to av anledningene ble utbytte av rent produkt lavt grunnet dårlig separasjon mellom azid og ønsket forbindelse.

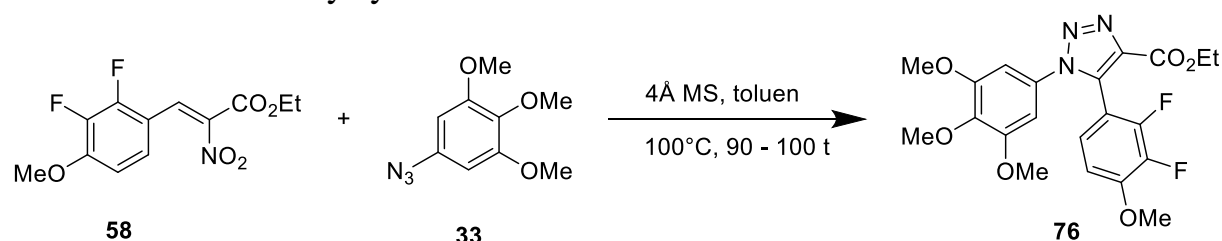
¹H og ¹³C NMR-spektrene bekrefter strukturen til forbindelse **75**. Disse spektrene er mer kompliserte å tolke enn de øvrige grunnet koblingen fluor har til hydrogen og karbon.

¹H NMR-spekteret bærer noe preg av dårlig oppløsning, og derfor noen uklare signaler. Likevel kan man gjenkjenne signalmønsteret fra Spekter 4.15, og anta at protonene vil komme i samme rekkefølge her som for akrylat **55**. Signalet ved 7.13 ppm vil da være protonet i *para*-posisjon for fluor mens signalet ved 7.06 ppm vil være protonet i *ortho*-posisjon. Protonet i *meta*-posisjon for fluor vil følgelig komme ved 6.97 ppm. Den tydelige singletten ved 6.49 ppm er de to protonene i A-ringen. Strukturen bekreftes også ved at rett antall metoksigrupper blir observert i spekteret, og etylgruppen er tilstede. Det observeres noen urenheter i spekteret. Dette er trolig CH₂Cl₂, heksan og vann fra løsemiddelet.⁹²

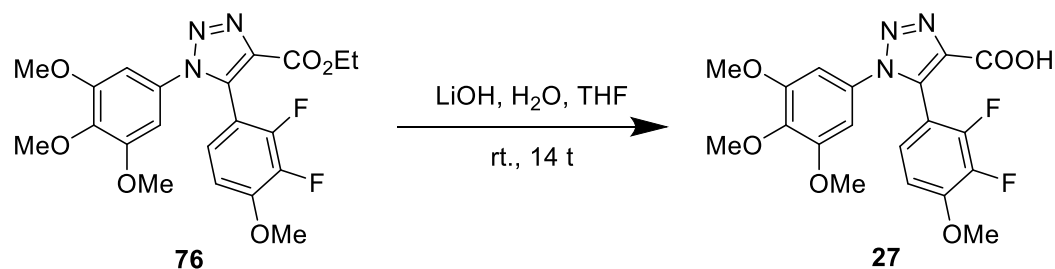
I ^{13}C NMR-spekteret kommer man over samme problemstilling som ved tidligere fluorsubstituerte forbindelser. Det observeres flere signaler i spekteret enn antall karboner i forbindelsen. Dette er igjen koblingen fluor har til karbon. Karbonylkarbonet kommer tydelig ut ved 160.9 ppm, mens det sterke signalet ved 153.4 ppm er to like karboner som er kvaternære, følgelig C3 og C5 i A-ringene. Videre blir det vanskelig å anta hvilke signal som kommer fra hvilke karbon, men det observeres en koblingskonstant på 247 Hz, som må være $^1J_{\text{CF}}$ -kobling. Signalet ved 150.9 ppm kan derfor godt være C3 i B-ringene. Den tydelige singletten ved 102.8 ppm er de to karbonene i A-ringene som har protoner bundet til seg, altså C2 og C6. Videre bekreftes strukturen ved at antall metoksigruupper stemmer overens med det som vises i spekteret og etylgruppen er tilstede. Urenhetene i spekteret er trolig heksan.⁹² I IR-spekteret observeres det signaler over 3000 cm^{-1} som ikke er registrert av instrumentet, men som bekrefter alkenområdet. Signalet ved 1723 cm^{-1} er karbonylgruppen.

^1H NMR-spekteret bekrefter hydrolysen av karboksylat **75** til karboksylsyre **26** ved at man kan se at kvartetten og tripletten ved henholdsvis 4.39 og 1.36 ppm er forsvunnet. Det er ikke blitt observert signal fra protonet på karboksylsyren. I ^{13}C NMR-spekteret har også signalene fra etylgruppen blitt borte, og i tillegg har det øverste signalet endret seg fra 160.9 ppm til 161.7 ppm som også legger grunn for at karboksylsyre **26** er blitt dannet. Heller ikke i dette IR-spekteret er området over 3000 cm^{-1} registrert av instrumentet, men er tydelig tilstede. Signalet ved 1717 cm^{-1} er karbonylgruppen.

2.20 Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



Skjema 2.26 Syntese av karboksylat **76** fra nitroakrylat **58**.



Skjema 2.27 Syntese av karboksylsyre **27** fra det korresponderende karboksylat **76**.

Prosedyren av Dehaen ble brukt.⁶¹

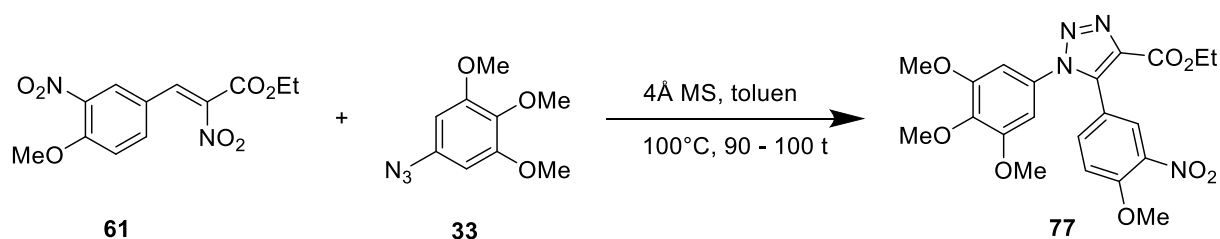
Reaksjonen ble satt på tre ganger med noe varierende ekvivalent uten at det påvirket sykloaddisjonen noe merkbart. Det høyeste utbytte på denne reaksjonen ble 52 % som er et av de bedre utbyttene denne prosedyren har gitt. En grunn til at denne reaksjonen kan ha blitt mer fullstending skyldes fluoratomene på B-ringene som vil trekke på elektronene i det ellers elektronrike systemet. Det ble benyttet kolonnekromatografi som rensesteg og dette ga helt rent karboksylat **76**.

Som for de øvrige forbindelsene med fluor, ble det også her observert flere signaler enn antall karboner i forbindelsen i aromatområdet. I ¹H NMR-spekteret gjenkjennes de to doble triplettene som også var tilstede i akrylatspekteret, Spekter 4.18. På bakgrunn av diskusjon i kapittel 2.10 vil det her konkluderes med at signalet på 6.96 ppm trolig er *ortho*-protonet i B-ringene. Signalet ved 6.80 ppm er følgelig *meta*-protonet i B-ringene. Den tydelige singletten ved 6.54 ppm er protonene på A-ringene. Ellers bekreftes karboksylatet ved at etylgruppen, samt de fire metoksigruppene er tilstede. Det observeres noe EtOAc i spekteret.⁹²

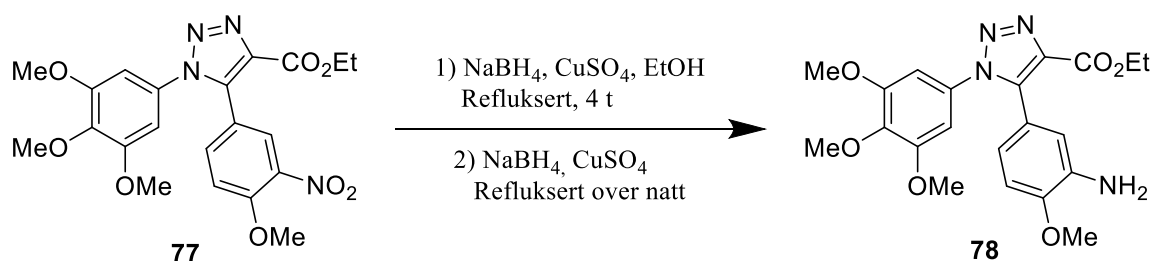
I ¹³C NMR-spekteret blir analysen noe vanskeligere her enn for akrylat **58**, da aromatområdet nå også vil vise karbonene fra A-ringene. Dette, sammen med koblingen fluor danner med karbonene i B-ringene, gjør at tolkningen av spekteret blir noe usikkert. Signalet ved 160.5 ppm er karbonylkarbonet. Det sterke signalet ved 153.4 ppm er trolig de to like kvaternære karbonene i A-ringene, altså C3 og C5. Videre gjenkjennes et noe lignende signalmønster som i Spekter 4.19. Signalet ved 150.2 ppm kobler til et signal ved høyere kjemisk skift, 150.8 ppm. Dette er trolig en ²J_{CF}-kobling på 58 Hz. Sammenlignet med spekteret til **58** vil derfor dette bli C4 i B-ringene, mens signalet ved 150.8 ppm er C3 i B-ringene. Dette blir også bekreftet av en ¹J_{CF}-kobling på 251 Hz fra signalet på 150.2 ppm til signalet ved 147.7 ppm. Singlett ved 139.8 ppm kobler til signalet ved 142.5 ppm ved en ¹J_{CF}-kobling på 250 Hz, som da bekrefter C2 i B-ringene. Videre er det vanskelig å si med sikkerhet hvilke signal som hører til hvor i aromatområdet, men den tydelige singletten ved 102.4 ppm er C2 og C6 i A-ringene. Videre stemmer antall metoksigrupper i spekteret, og etylgruppen bekrefter strukturen. I IR-spekteret observeres det signaler ved 3079 cm⁻¹ som bekrefter alkener, og en topp ved 1728 cm⁻¹ som trolig er en karbonylgruppe.

Hydrolysen bekreftes blant annet ved at det ikke lenger observeres etylgruppe i ¹H eller ¹³C NMR-spektrene. I ¹H NMR-spekteret vises syreprotonet som en bred singlett ved 8.79 ppm. Det observeres også en endring i det øverste signalet i ¹³C NMR-spekteret fra 160.5 ppm for karboksylat **76** til 163.8 ppm for karboksylsyren **27**. IR-spekteret her vil komme ut med et signal på 1717 cm⁻¹ som er fra karbonylgruppen. Ellers er det et signal over 3000 cm⁻¹ som ikke har blitt registrert av instrumentet, men som er der og bekrefter aromat- og alkenområdet.

2.21 Forsøk på syntese av 5-(3-amino-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



Skjema 2.28 Syntese av karboksylat **77** fra nitroakrylat **61**.



Skjema 2.29 Forsøk på redusering av karboksylat **77** til karboksylat **78**.

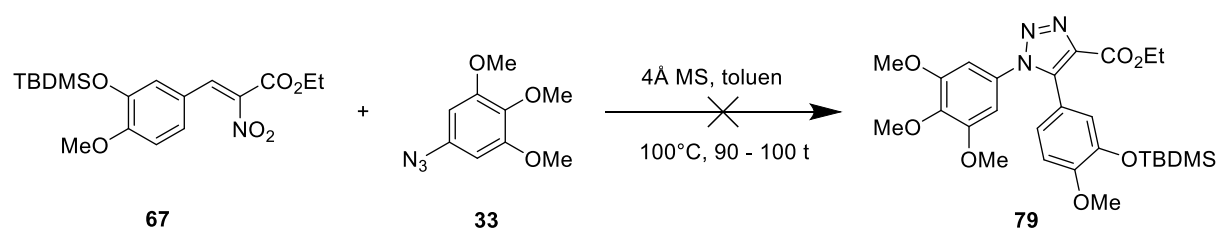
Prosedyre av Dehaen og medarbeidere⁶¹ ble brukt for å danne karboksylat **77** ved en Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjon.

Karboksylat **77** viste seg å være vanskelig å opprense ved kolonnekromatografi. Forbindelsen satt godt på kolonnen grunnet nitrogruppen sine polare egenskaper og en meget polar eluentkombinasjon var nødvendig for å få forbindelsen av kolonnen. Dette medførte til mye forurensninger som ikke kunne sees på TLC, men som ble observert ved ¹H NMR og som var vanskelig å gjenkjenne. Det ble forsøkt ulike eluentkombinasjoner, blant annet å tilsette 5% MeOH i EtOAc/heksan og 5-10 % MeOH i CH₂Cl₂ uten at resultatet ble forbedret. Ved bruk av MeOH som eluent ved kolonnekromatografi bør prosentandelen MeOH ikke økes til over 15-20 % da dette kan ødelegge silikaen. Siden forbindelsen var krystallinsk ble det forsøkt omkrystallisering med CH₂Cl₂/heksan etter kolonnekromatografi, men ingen krystaller felte ut. Problemene ved opprensingen førte til lavt utbytte på forbindelse **77** og det lyktes kun én gang med å få tilstrekkelig rent. For å ha nok av forbindelsen til å lykkes i de to neste trinnene av syntesen ble det valgt å benytte det delvis rensede produktet videre, selv om det inneholdt noen urenheter.

^1H og ^{13}C NMR-spektrene bekrefter strukturen. Dublett ved 7.95 ppm i ^1H NMR-spekteret er naboprotonet til nitrogruppen som kommer ut som dublett grunnet *meta*-kobling. *Meta*-koblingen vises også i den doble dubletten ved 7.49 ppm som da er det andre protonet i *meta*-posisjon i B-ringene. Dubletten ved 7.11 vil da være protonet i *ortho*-posisjon i B-ringene, mens singletten ved 6.50 ppm vil vise til de to protonene i A-ringene. Videre bekreftes også de fire metoksigrupper og etylgruppen i ^1H NMR-spekteret. I ^{13}C NMR-spekteret kommer karbonylen ut ved 160.7 ppm. De to karbonene i *ortho*-posisjon i A-ringene kommer ut ved lik skiftverdi ved 153.6 ppm. Karbonet i *para*-posisjon i B-ringene vises ved 153.8 ppm. De tre protonerte karbonene i B-ringene er gjenkjennelig grunnet sterkere signalintensitet sammenlignet med de øvrige kvaternære karbonene. Antall signaler stemmer overens med antall karboner i forbindelse **77**. I IR-spekteret er området over 3000 cm^{-1} ikke plukket, men observeres og bekrefter følgelig alkenområdet. Signalet ved 1725 cm^{-1} er karbonylgruppen.

Reduksjon av nitrogruppen til aminsubstituert forbindelse **78** ble utført etter prosedyre av Odlo og medarbeidere.¹⁹ Prosedyren ble fulgt uten modifikasjoner, men på noe lavere skala. TLC av råprodukt viste to prikker som ble antatt å være det reduserte karboksylatet, og noe ureagert karboksylat. De to forbindelsene ble separert ved ekstraksjon med 1.0 M HCl. På dette tidspunktet viste TLC kun én forbindelse. Deretter ble løsningen gjort basisk med 4.0 M NaOH og ekstrahert med EtOAc. Etter denne ekstraksjonen var TLC noe uklar, og det ble valgt å tørke og dampe ned løsningen for å ta ^1H NMR. Det ønskede produktet ble ikke observert i spekteret. Vannfasen ble ekstrahert en ekstra gang og ønsket forbindelse ble forsøkt å salte ut. Det lyktes dessverre ikke å isolere ønsket produkt i opparbeidelsen.

2.22 Forsøk på syntese av 5-(3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat

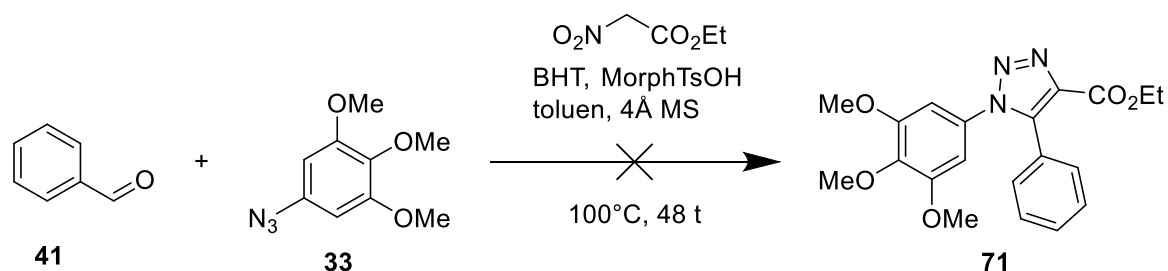


Skjema 2.30 Forsøk på syntese av karboksylat **79** fra nitroakrylat **67**.

Prosedyren av Dehaen og medarbeidere ble fulgt, med noen modifikasjoner.⁶¹ Som tidligere nevnt i kapittel 2.13 lyktes det ikke å krystallisere akrylat **67**. En blanding av aldehyd **65** og begge isomerene av akrylat **67** ble av den grunn brukt videre i denne syntesen. Det var håp om at benzaldehyd **65** ikke skulle påvirke denne reaksjonen og at dette da ville bli separert ved kolonnekromatografi etter endt reaksjon. Da reaksjonen ble avsluttet ble det tatt ^1H NMR

ettersom at det var vanskelig å observere endring på TLC. ¹H NMR-spekteret viste ingen tegn på at sykloaddisjon til karboksylat **79** hadde funnet sted.

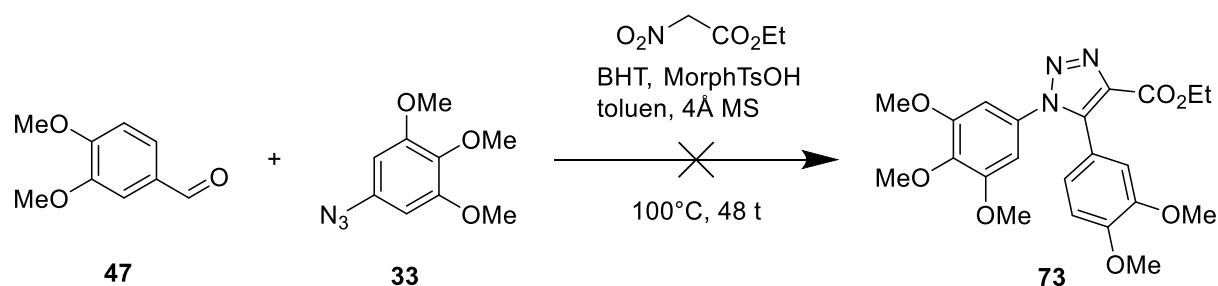
2.23 Forsøk på syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



Skjema 2.31 Forsøk på «one pot» fra benzaldehyd **41** til karboksylat **71**.

Prosedyren av Dehaen og medarbeidere⁶¹ ble fulgt. Etter endt reaksjonstid ble det kun observert startmateriale på ¹H NMR-spekteret. Reaksjonen ble utført én gang.

2.24 Forsøk på syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



Skjema 2.32 Forsøk på «one pot» fra benzaldehyd **47** til karboksylat **73**.

Prosedyre etter Dehaen og medarbeidere ble benyttet i forsøk på denne trekomponentsreaksjonen.⁶¹ Etter endt reaksjonstid ble det ikke observert ønsket sluttprodukt i NMR-spektrene og det ble derfor valgt å gå tilbake til syntesen med to trinn som benyttet i

kapittel 2.4-2.22. Reaksjonen ble forsøkt to ganger på ulike tidspunkt under laboratorieperioden, hvor begge gangene ga samme resultat.

3 Konklusjon

I denne oppgaven ble det utviklet en metode for syntese av 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av combretastatin A-1 og A-4. Seks av ti målmolekyler ble syntetisert, men med lave utbytter blant annet grunnet problemer med opprensing av akrylatforbindelsene.

Ulike metoder ble forsøkt for å danne målmolekylene. Det ble først forsøkt en "one-pot" metode hvor høye utbytter forventes. Denne metoden kan også være tidsbesparende. Reaksjonen gikk dessverre ikke og det ble derfor prøvd en annen metode. En Knoevenagel kondensasjon i ett trinn ble forsøkt, men heller ikke her gikk reaksjonen og kun startmateriale ble observert. En Knoevenagel kondensasjon hvor aldehyd først ble omsatt til imin og iminet deretter ble omsatt til akrylat ga ønsket mellomprodukt. Rene akrylater ble videre brukt i en Huisgen sykloaddisjon som, etterfulgt av en hydrolyse, ga ønskede målmolekyler.

De syntetiserte målmolekylene er blitt sendt til biologisk testing, men resultatene ble dessverre ikke ferdig i tide til å bli inkludert i denne oppgaven.

3.1 Videre studier

I denne oppgaven har det blitt syntetisert seks av ti ønskede sluttprodukter ved bruk av en metode som har ført til generelt lave utbytter. De seks forbindelsene har blitt sendt til biologisk testing og det vil bli interessant å tolke disse resultatene som dessverre ikke ble ferdig i tide for denne oppgaven. Sammen med molekylmodelleringsstudiene utført ved Universitetet i Tromsø vil det gi et grunnlag for om videre studier for syntesen av disse 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazolanalogene vil være av interesse.

Når det gjelder molekylmodelleringsstudiene ville det kunne være interessant å gjøre videre dokkingsstudier med fleksibel ligand og fleksibel proteinstruktur, en såkalt "induced fit" dokking i Schrödinger. Dette ble det dessverre ikke tid til de to ukene vi var i Tromsø.

Fokuset vårt i denne oppgaven har vært å få ferdigstilt så mange produkter som mulig innenfor vår tidsramme. Videre arbeid mener vi ville vært å legge mer vekt på å utvikle en "one-pot" prosedyre som forhåpentligvis vil medføre høyere utbytte av sluttproduktene. Den lange reaksjonstiden ved syntese av karboksylat kan også være mulig å redusere ved bruk av mikrobølgeovn.

Det gjenstår også å gjøre karboksylsyrene om til deres salter, som vil være av interesse med tanke på vannløselighet.

4 Eksperimentelt

4.1 Generelt

Alle reaksjoner ble utført under N₂-atmosfære, med mindre annet er påpekt.

Reaksjonene ble fulgt med tynnsjiktchromatografi (TLC) av typen TLC Silica gel 60 F254 plater produsert av Merck, 20x20 cm. Som mobilfase ble en blanding av heksan og EtOAc benyttet, med mindre annet er spesifisert. UV-lampe fra Western og K₂MnO₄ ble brukt til deteksjon.

Rensingen ble hovedsakelig utført med kolonnekromatografi, hvor den stasjonære fasen var silikagel av typen Silica Gel 60 (0.040-0.063mm) for column chromatography (230-240 mesh ASTM) produsert av Merck. Ulike blandingsforhold av løsemidler ble benyttet under de ulike omkrystalliseringene. Blandingsforhold er derfor ikke spesifisert.

NMR-spektra ble tatt opp på Bruker Ascens 400-instrument. Spektra er tatt opp ved 25°C, 400MHz for ¹H-NMR, 100MHz for ¹³C-NMR og kloroform-*d* ble brukt som løsemiddel for alle prøver med mindre annet er spesifisert.

IR-spektra ble tatt opp med Perkin Elmer, FT-IR System, Spectrum Bx, 50/60 Hz med HATR-celle og Agilent Technologies 5500 series FTIR.

Smeltepunkt er målt med «IA9100 Melting Point Apparatus» produsert av Electrothermal.

Utvalgte viktige topper i IR-spektra er forklart.

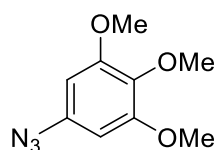
Det ble forsøkt å ta HRMS av analog **22-27**, men molekylionet ble ikke funnet.

4.2 Molekylmodellering

"Internal Coordinate Mechanics" (ICM) versjon 3.8-2 ble brukt for dokking av forbindelsene **22-31** i α - og β -subenhetene i tubulin. Studiene ble utført med en krystallstruktur fra røntgenkomplekset av tubulin. Det ble forsøkt å dokke forbindelsene i flere krystallstrukturer; 1SA0, 5ITZ, 3UT5 og 4O2B med DAMA-kolkisin.⁹⁴ Krystallstrukturer av vannmolekyler, ioner og krystalliserte inhibitorer ble fjernet fra krystallstrukturen, hydrogenatomer ble tilført og optimalisering ble utført. Forbindelsene **22-31** ble tegnet ved bruk av ICM før dokking. Det ble generert grid punkter som inkluderte aminosyrene innenfor 5Å av krystallstrukturen til DAMA-kolkisin, og semidynamisk dokking med fleksible ligander og en rigid proteinstruktur ble utført innenfor disse grid punktene. Hver dokking ble utført i tre paralleller for hver forbindelse. De ulike interaksjonene i dokkingen ble "scoret" ved bruk av "Virtual ligand screening-scoring" (VLS-scoring) i ICM programmet.

4.3 Syntese av 3,4,5-trimetoksifenylazid

Metoden som er benyttet er tidligere rapportert.¹⁹



$C_9H_{11}N_3O_3$

Molekylvekt: 209, 21 g/mol

Utbytte: 75%

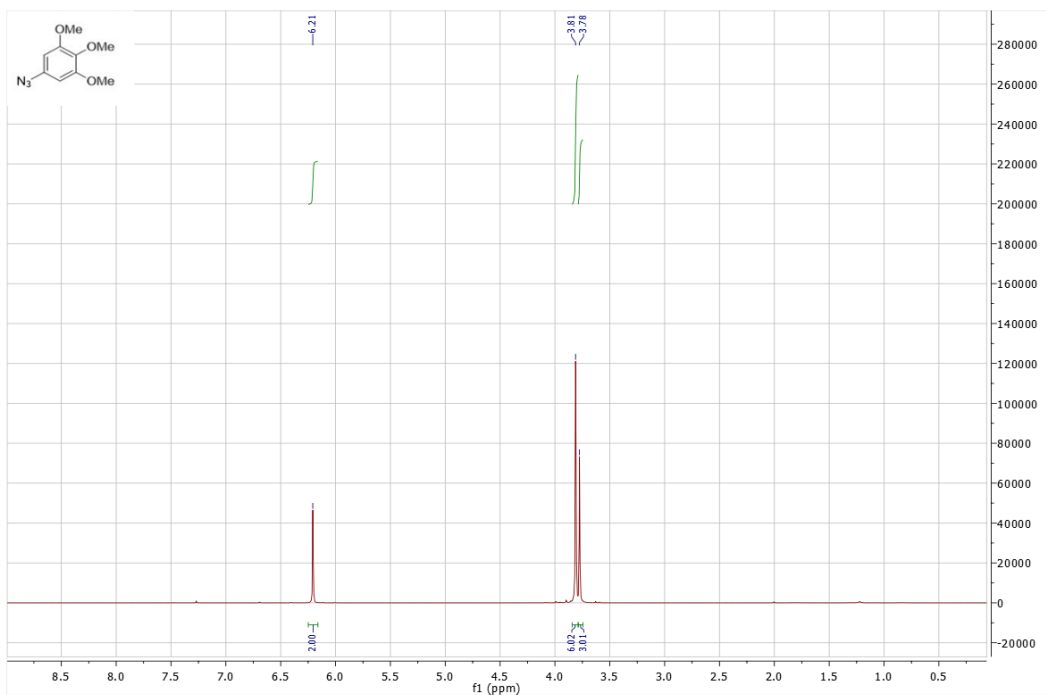
R_f: 0,57

En blanding av borsyre (218 mg, 1.0 mmol), natriumazid (78 mg, 1.2 mmol) og CuSO₄ (25 mg, 0.10 mmol) i MeOH (3 mL) ble rørt kraftig i 6 timer ved romtemperatur før vann (10 mL) ble tilsatt. Løsningen ble så ekstrahert med heksan (3x15 mL), vasket med 5% ammoniakk (2x10 mL) og tørket med MgSO₄. Blandingen ble filtrert og dampet inn, og ga urensset fenylazid (**33**) som en gul olje. Oljen ble rensert på silikagelkolonne med heksan/EtOAc (2:1). Dette ga forbindelse **33** som brune krystaller (75 %, 157 mg). Spektrale data er i overensstemmelse med publisert arbeid.

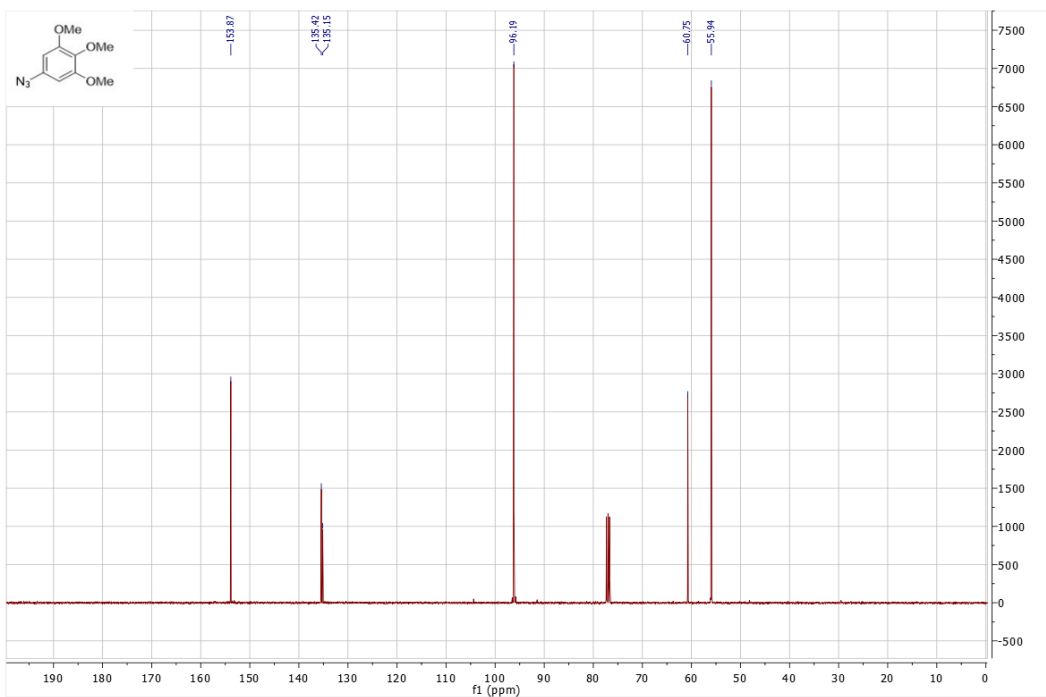
Data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.21 (s, 2H), 3.81 (s, 6H), 3.78 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 153.9, 135.4, 135.2, 96.2 (2C), 60.8, 55.9 (2C)



Spekter 4.1 ^1H NMR-spekter av fenylazid **33**.

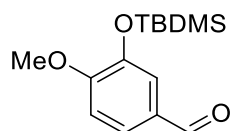


Spekter 4.2 ^{13}C NMR-spekter av fenylazid **33**.

4.4 Metode for beskyttelse av hydroksisubstituert benzaldehyd

Benzaldehyd **35** og **37** ble syntetisert etter kjent metode med modifikasjoner.⁸⁸

4.4.1 Syntese av 3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd



$C_{14}H_{22}O_3Si$

Molekylvekt: 266,13 g/mol

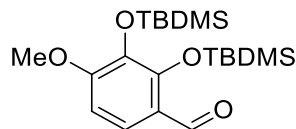
Utbytte: 95 %

DIPEA (1.26 g, 9.8 mmol) ble tilsatt en løsning av benzaldehyd (1.00 g, 6.5 mmol) i DMF (10 mL), etterfulgt av TBDMSCl (1.17 g, 7.8 mmol). Reaksjonen ble rørt i romtemperatur i 1 time. Vann (2 mL) ble tilsatt, og reaksjonen ble rørt i 10 minutter. Eter (30 mL) ble tilsatt, etterfulgt av mettet natriumbikarbonat og reaksjonen ble rørt i 15 minutter. Eterfasen ble separert og vannfasen ekstrahert med eter (3x20 mL). De kombinerte eterfasene ble vasket med mettet saltløsning (2x20 mL), etterfulgt av vann (2x20 mL). Den organiske fasen ble tørket (Na_2SO_4) og dampet inn. Dette ga benzaldehyd **35** som blank olje (95 %, 1.70 g).

Data

Forbindelsen er kjent og data stemmer overens med litteratur.⁸⁸

4.4.2 Syntese av 2,3-bis((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi)-4-metoksibenzaldehyd



$C_{20}H_{36}O_4Si_2$

Molekylvekt: 396,22 g/mol

Utbytte: 67%

DIPEA (230 mg, 1.8 mmol) ble tilsatt en løsning av benzaldehyd (100 mg, 0.60 mmol) i DMF (5 mL), etterfulgt av TBDMSCl (268 mg, 1.8 mmol). Reaksjonen ble rørt ved romtemperatur i 1

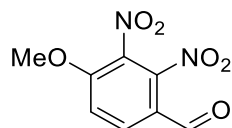
time. Vann (1 mL) ble tilsatt, og reaksjonen ble rørt i 10 minutter. Eter (15 mL) ble tilsatt, etterfulgt av mettet natriumbikarbonat og blandingen ble rørt i 15 minutter. Eterfasen ble separert og vannfasen ekstrahert med eter (3x10 mL). De kombinerte eterfasene ble vasket med saltlake (2x10 mL), etterfulgt av vann (2x10 mL). Den organiske fasen ble tørket med Na₂SO₄, filtrert og dampet ned på rotavapor. Dette ga benzaldehyd **37** som brun olje (67 %, 158 mg).

Data

Forbindelsen er kjent og data stemmer overens med litteratur.⁸⁸

4.5 Syntese av 4-metoksi-2,3-dinitrobenzaldehyd

Syntesen er utført etter tidligere rapportert metode.⁸⁹



C₈H₆N₂O₆

Molekylvekt: 226,02 g/mol

Utbytte: 59%

Benzaldehyd (1.53 g, 8.5 mmol) ble løst i konsentrert H₂SO₄ (25 mL) og til denne løsningen ble det dråpevis tilsatt en forhåndskjølet blanding av HNO₃ og H₂SO₄ (3.85 mL/2.85 mL). Reaksjonen ble rørt i 10 minutter, og deretter ble blandingen tilsatt dråpevis til isvann (100 mL). Reaksjonsblandingen ble rørt i 2 timer ved 0 °C før den ble filtrert og den faste forbindelsen ble vasket med isvann (10 mL). Råproduktet ble rensed ved kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (3:2). Dette ga den ønskede regioisomeren **39** som hvite krystaller (59 %, 133 mg).

Data

Forbindelsen er kjent og data stemmer overens med litteratur.⁸⁹

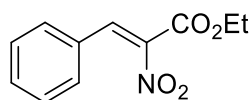
4.6 Generell metode for (Z)-fenylakrylat og (Z)-nitroakrylat

(Z)-fenylakrylat **43** og (Z)-nitroakrylat **46**, **49**, **52**, **55**, **58**, **61**, **64**, **67** og **70** ble syntetisert etter kjent metode med modifikasjoner.⁸⁴

Anilin (931 mg, 10 mmol) ble tilsatt en suspensjon av benzaldehyd (10 mmol) og MgSO₄ (337 mg, 2.8 mmol) i THF (3 mL). Løsningen ble rørt ved romtemperatur i 5 timer før den ble fortynnet i CH₂Cl₂, filtrert og dampet inn på rotavapor. Utbytte av imin var >95 % og ble brukt videre uten opprensing.

En løsning av etyl α -nitroacetat (1.33 g, 10 mmol) i Ac₂O (10 mL) ble varmet til 50°C. Imin ble så tilsatt i en porsjon, og løsningen ble rørt ved 50°C i 17-96 timer. Deionisert vann (100 mL) ble tilsatt og rørt i 10 minutter før blandingen ble ekstrahert med CH₂Cl₂ (3x100 mL), vasket med saltlake (3x50 mL), tørket over MgSO₄, filtrert og dampet inn. Akrylatene ble videre rensed ved ulike metoder. Dette ga de ønskede forbindelsene.

4.6.1 Syntese av etyl(Z)-2-nitro-3-fenylakrylat



C₁₁H₁₁NO₄

Molekylvekt: 221,21 g/mol

Utbytte: 25%

Smp: 55°C

R_f: 0,75

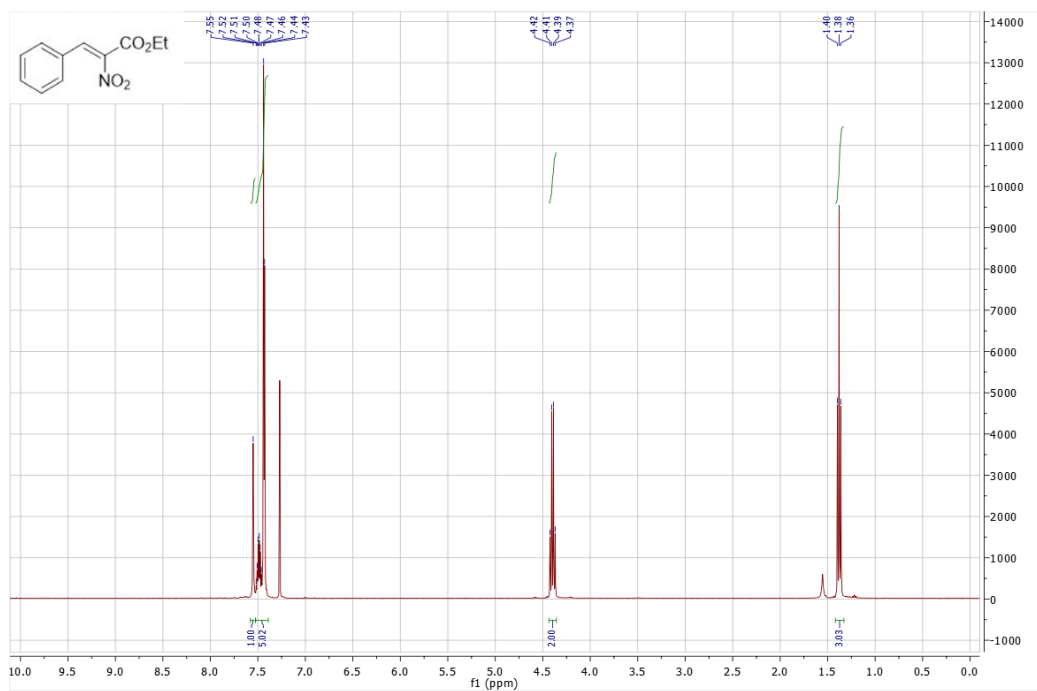
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **43**. Råproduktet ble rensed ved kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med eter/hexsan. Dette ga hvite krystaller (25 %, 55 mg).

Data

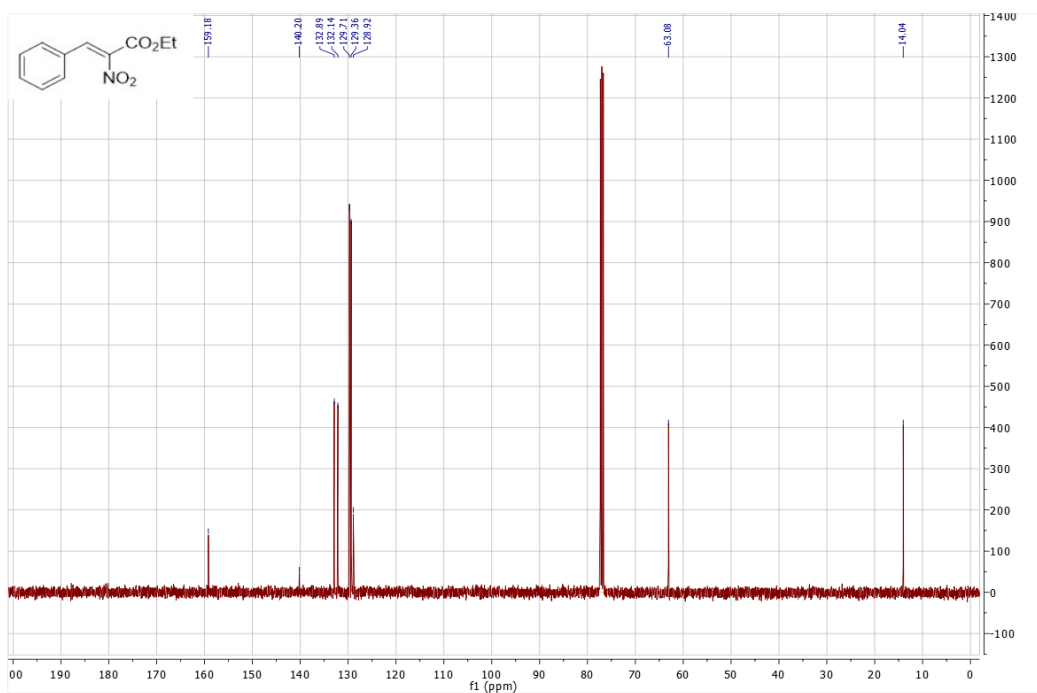
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (s, 1H), 7.5-7.4 (m, 5H), 4.40 (q, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 159.2, 140.2, 132.9, 132.1, 129.7 (2C), 129.4 (2C), 128.9, 63.1, 14.0

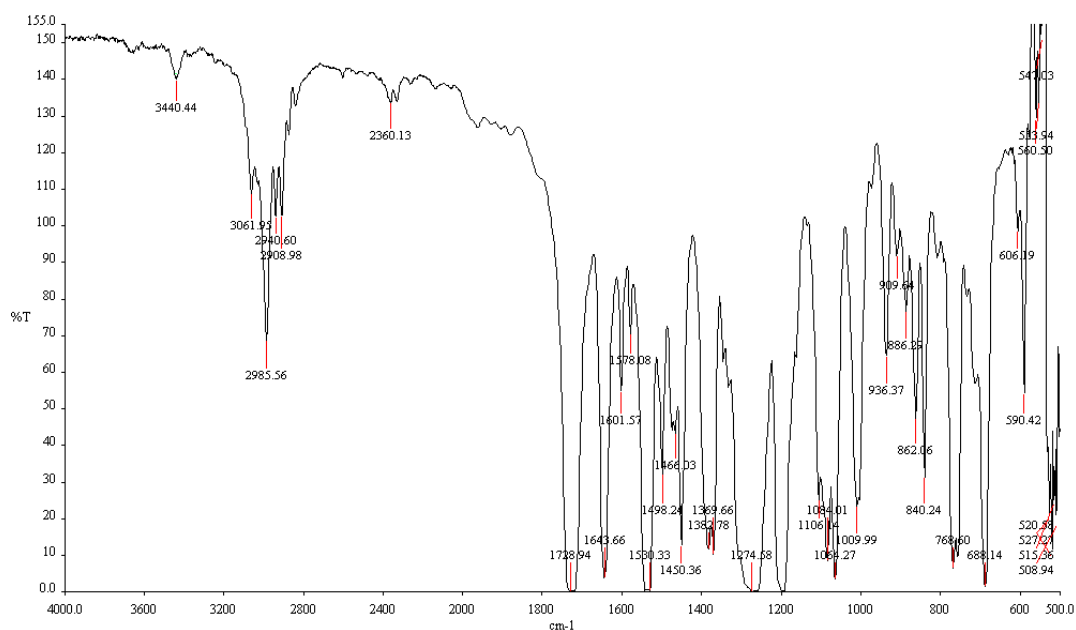
IR: 3062, 2986, 1729, 1643, 1600, 1580, 1530 cm⁻¹



Spekter 4.3 ^1H NMR-spekter av akrylat **43**.

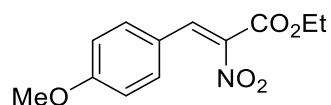


Spekter 4.4 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **43**.



Spekter 4.5 IR-spekter av akrylat **43**.

4.6.2 Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



$C_{12}H_{13}NO_5$

Molekylvekt: 251,24 g/mol

Utbytte: 3%

Smp: 52°C

R_f: 0.69

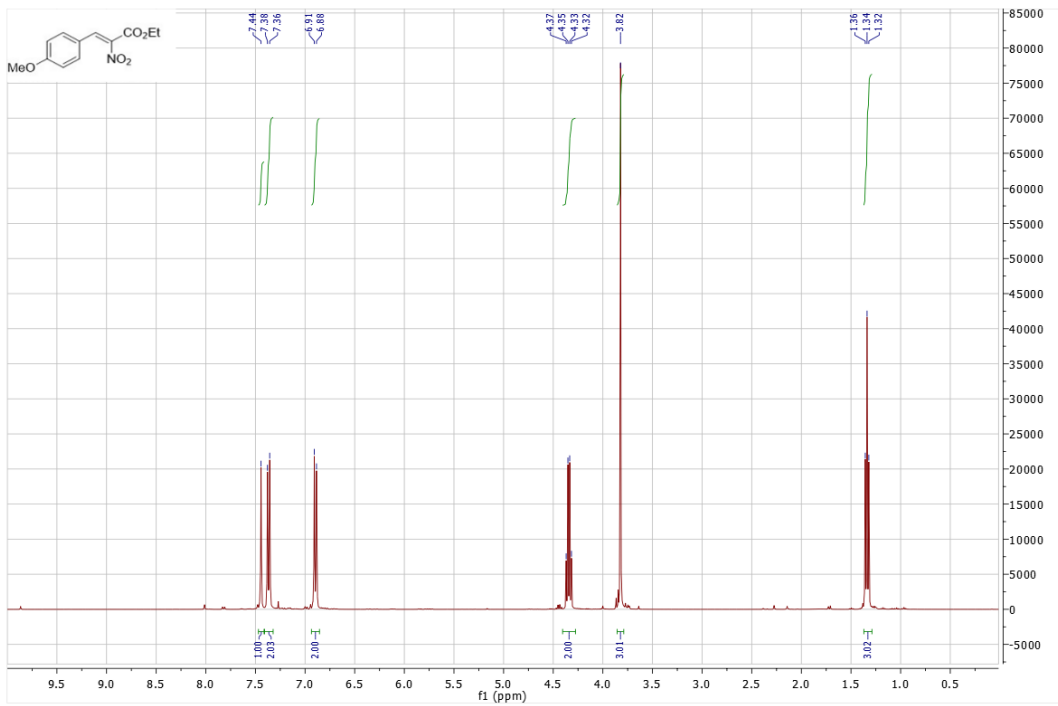
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **46**. Råprodukt ble renset ved filtrering gjennom en silikaplogg med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med 1,2-dikloretan/hexsan. Dette ga gule krystaller (3 %, 8 mg).

Data

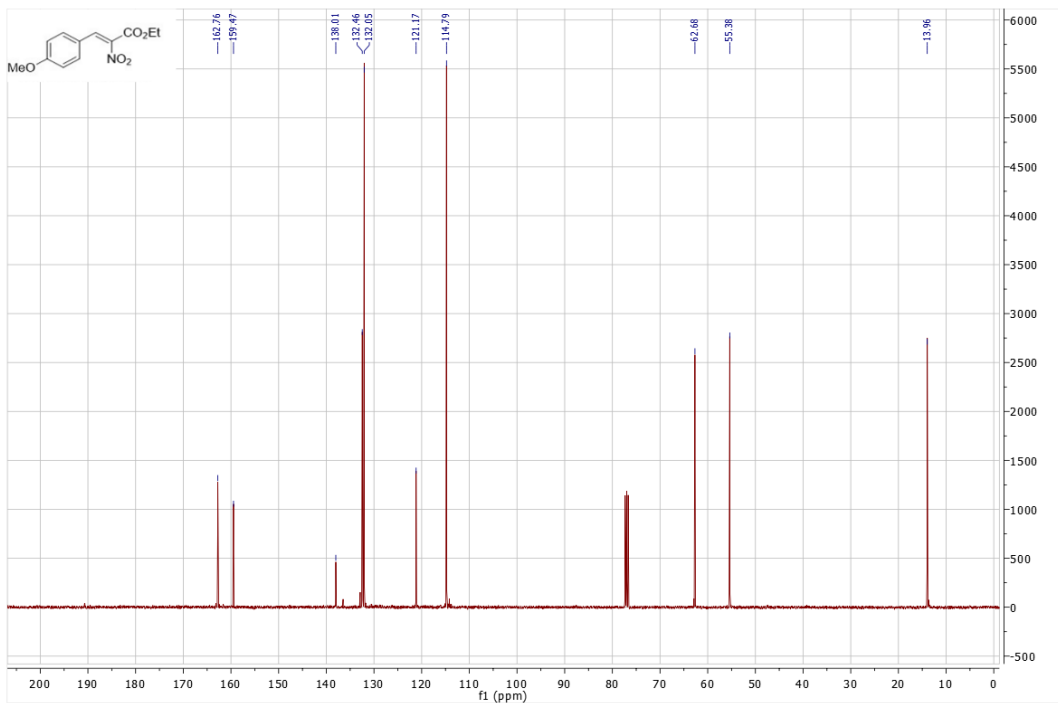
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.44 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.34 (q, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 162.8, 159.5, 138.0, 132.5, 132.1 (2C), 121.2, 114.8 (2C), 62.7, 55.4, 14.0

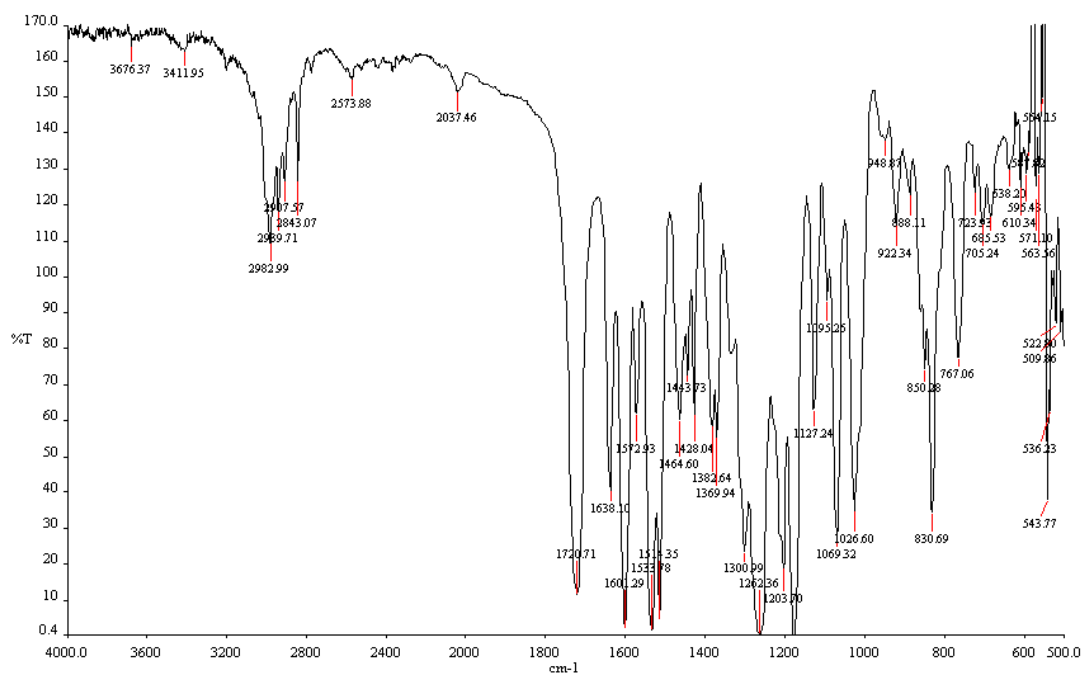
IR: 2983, 2940, 1721, 1638, 1602, 1573 cm^{-1}



Spekter 4.6 ^1H NMR-spekter av akrylat **46**.

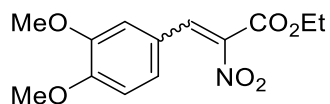


Spekter 4.7 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **46**.



Spekter 4.8 IR-spekter av akrylat **46**.

4.6.3 Syntese av etyl(*Z*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat og etyl(*E*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat



$C_{13}H_{15}NO_6$

Molekylvekt: 281,26 g/mol

Utbytte: 16%

SmP: 76°C

R_f: 0,49

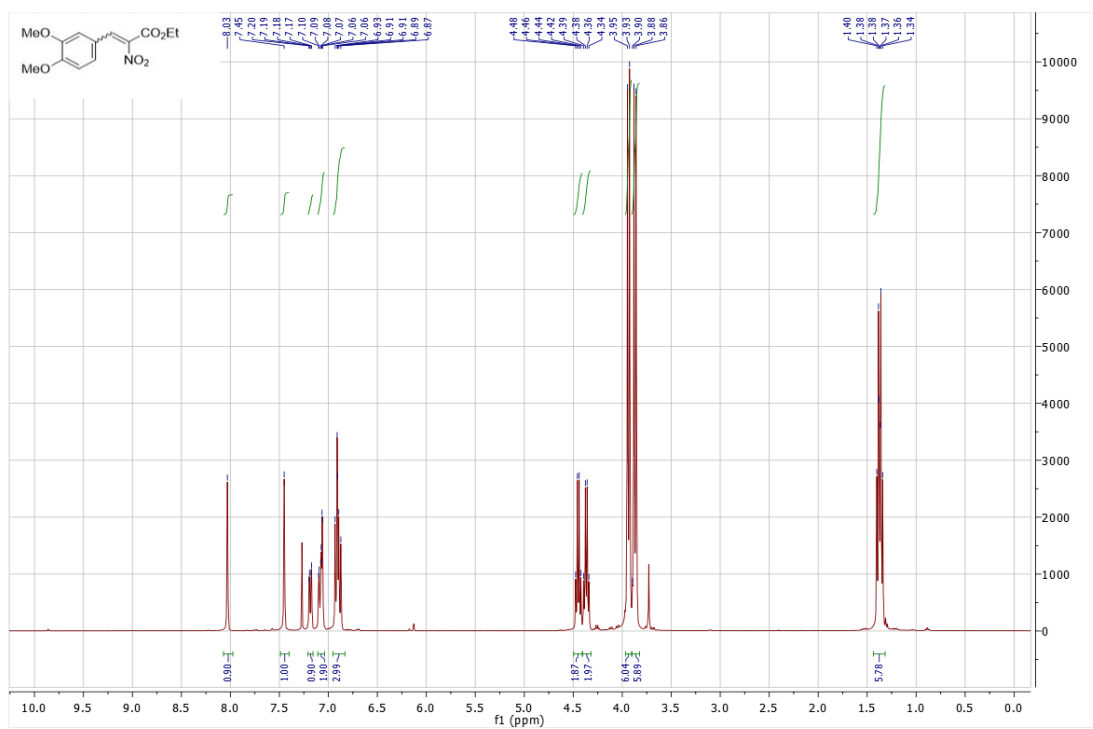
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **49**. Råprodukt ble renset ved filtrering gjennom en silikaplogg med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med 1,2-dikloretan/heksan. Dette ga en blanding av de to diastereomerene etyl(*Z*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat og etyl(*E*)-3-(3,4-dimetoksifenyl)-2-nitroakrylat som hvite krystaller (16 %, 45 mg).

Data

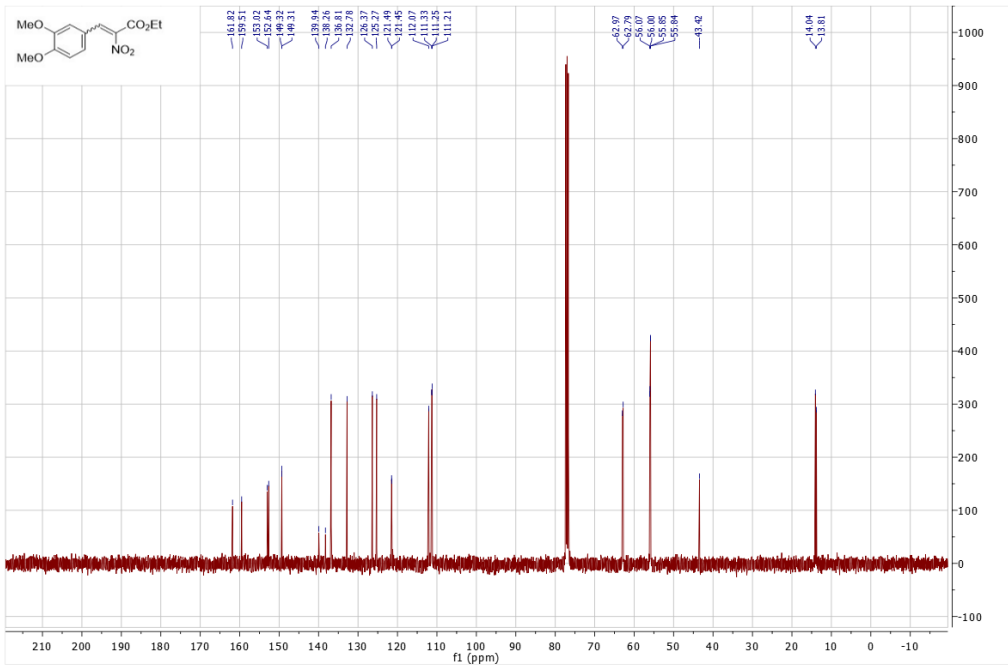
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.03 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.18 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, 1H), 7.10-7.06 (m, 2H), 6.91-6.87 (m, 3H), 4.45 (q, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 4.37 (q, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 3.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 6H), 3.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 6H), 1.37 (dt, $J = 9.7, 7.1$ Hz, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 161.8, 159.5, 153.0, 152.6, 149.3, 149.4, 139.9, 138.3, 136.8, 132.8, 126.4, 125.3, 121.5 (2C), 112.1, 111.3 (2C), 111.2, 63.0, 62.8, 56.1, 56.0, 55.9, 55.8 14.0, 13.8

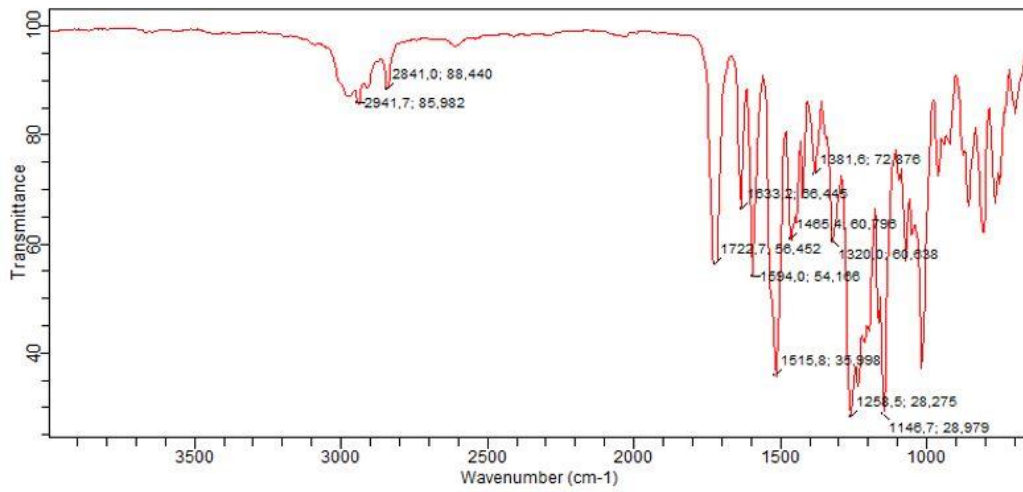
IR: 2942, 2841, 1723, 1633, 1594, 1515 cm^{-1}



Spekter 4.9 ^1H NMR-spekter av akrylat **49**.

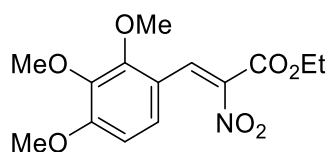


Spekter 4.10 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **49**.



Spekter 4.11 IR-spekter av akrylat **49**.

4.6.4 Syntese av etyl(Z)-3-(2,3,4-trimetoksifenyl)-2-nitroakrylat



$C_{14}H_{17}NO_7$

Molekylvekt: 311,29 g/mol

Utbytte: 2%

Smp: 69°C

R_f: 0,75

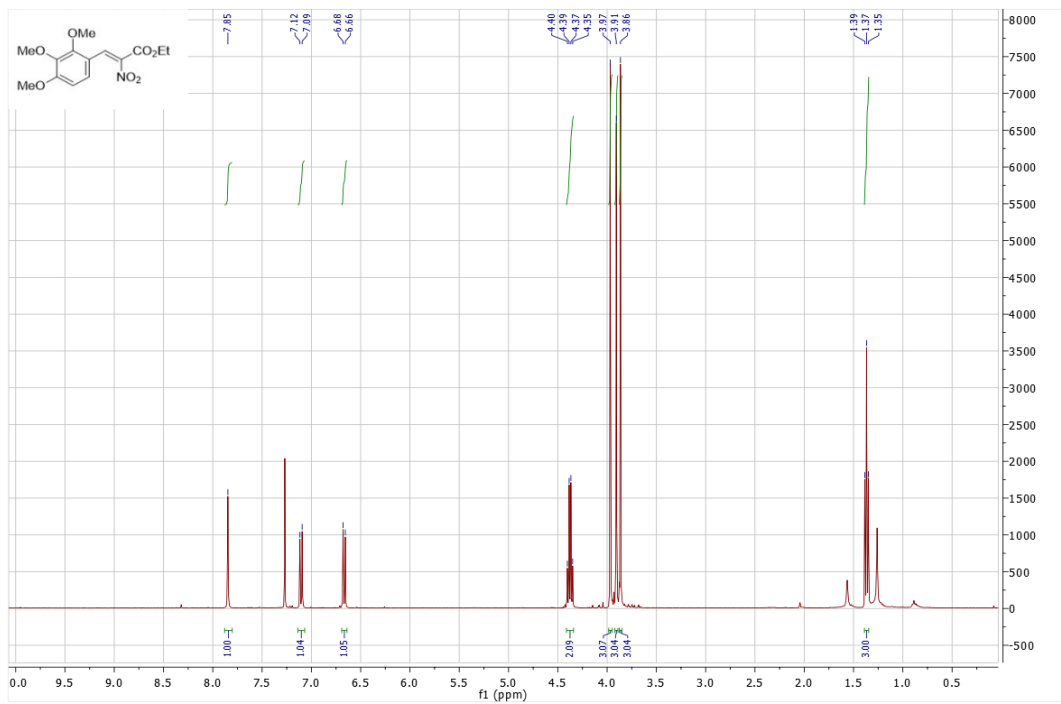
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **52**. Råprodukt ble rensert ved filtrering gjennom en silikplugg med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med 1,2-dikloretan/hexsan. Dette ga gule krystaller (2 %, 6 mg).

Data

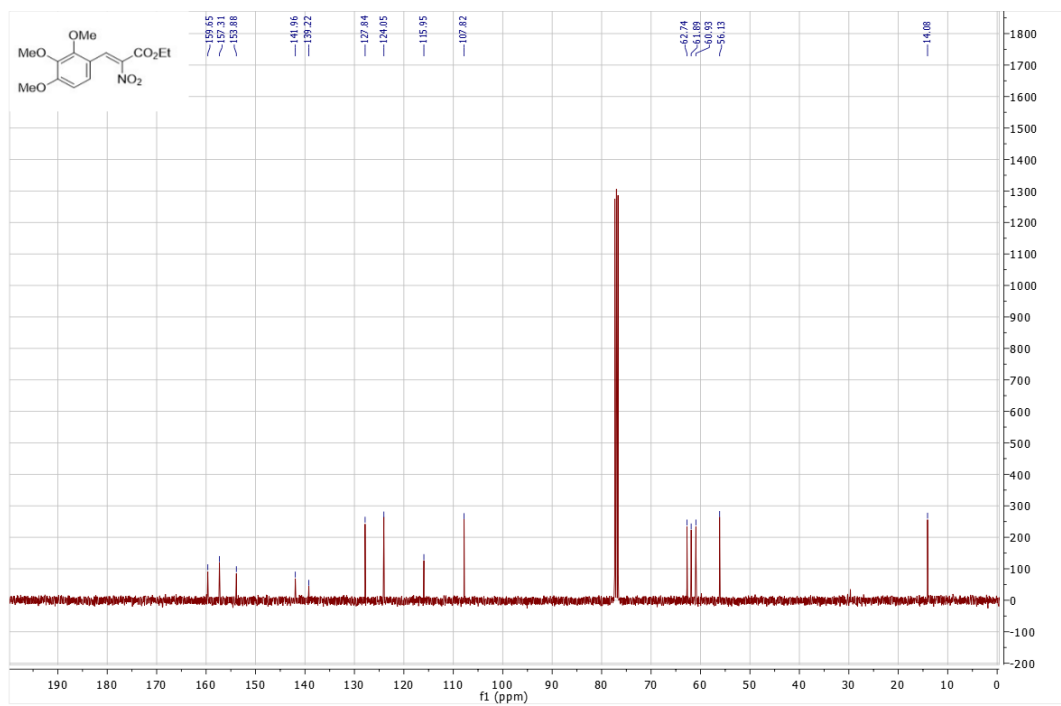
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.38 (q, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 159.7, 157.3, 153.9, 142.0, 139.2, 127.8, 124.1, 116.0, 107.8, 62.7, 61.9, 60.9, 56.1, 14.1

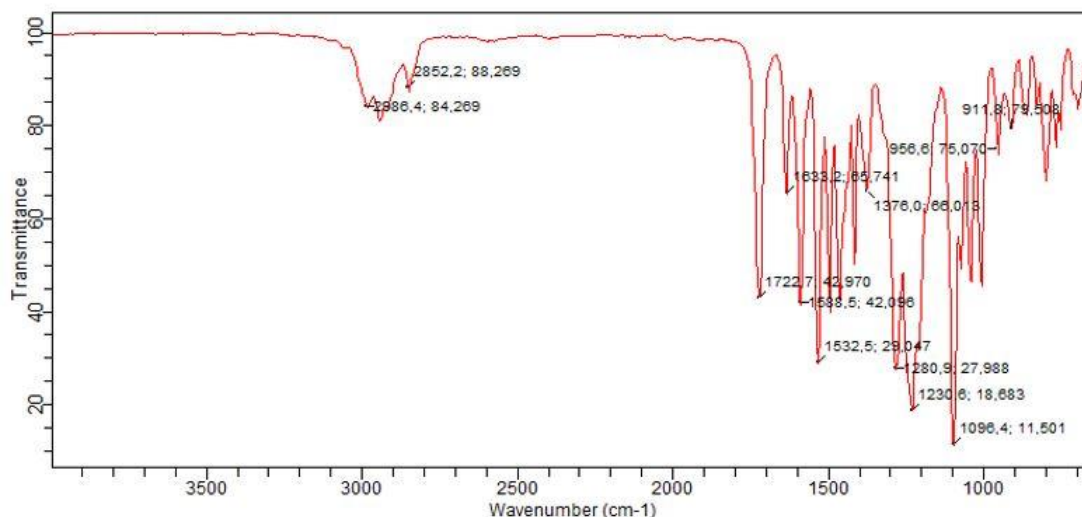
IR: 2986, 2852, 1723, 1633, 1588, 1532 cm⁻¹



Spekter 4.12 ^1H NMR-spekter av akrylat **52**.

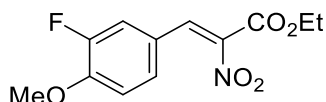


Spekter 4.13 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **52**.



Spekter 4.14 IR-spekter av akrylat **52**.

4.6.5 Syntese av etyl(Z)-3-(3-fluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



$C_{12}H_{12}FNO_3$

Molekylvekt: 269, 23 g/mol

Utbytte: 35%

Smp: 100°C

R_f: 0,69

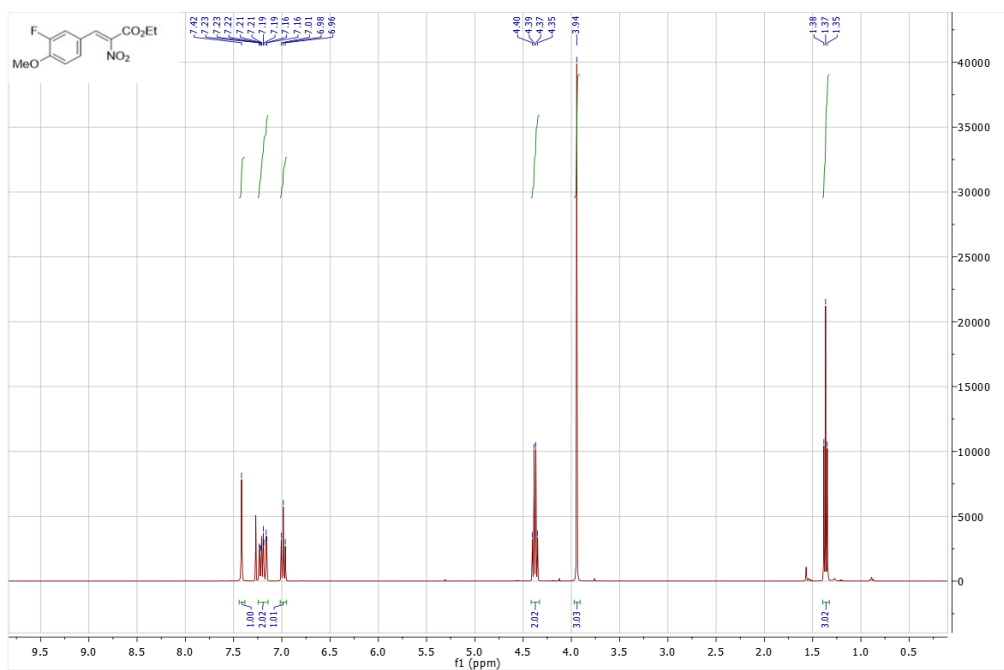
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **55**. Råproduktet ble rensert ved kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med CH_2Cl_2 /heksan. Dette ga oransje krystaller (35 %, 94 mg).

Data

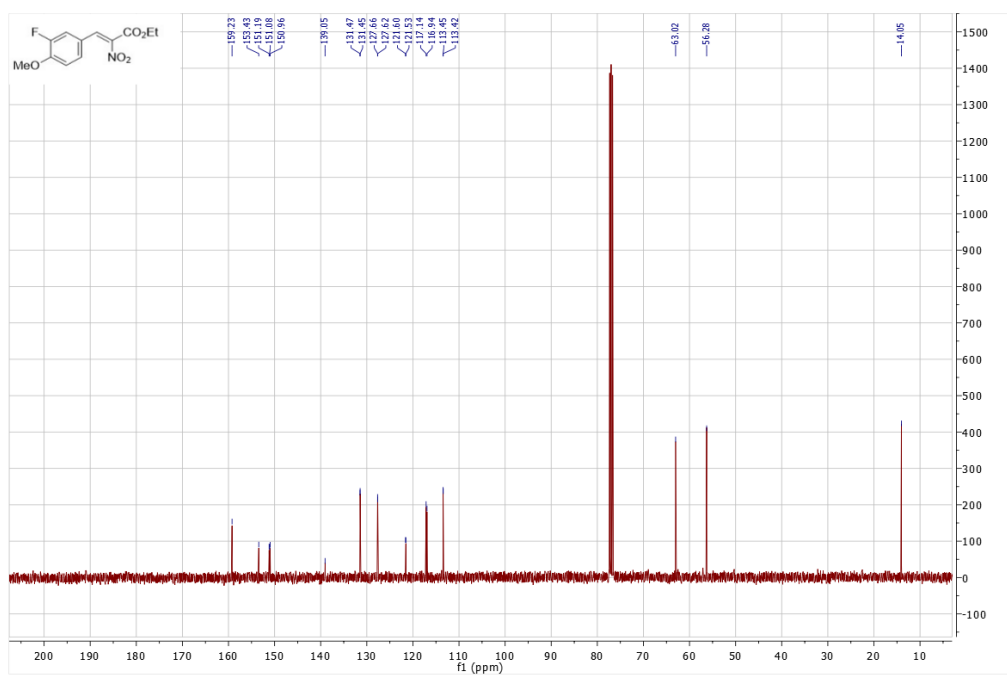
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.42 (s, 1H), 7.23-7.16 (m, 2H), 6.98 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.38 (q, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 159.2, 151.2 ($^1J_{CF} = 248.7$ Hz), 151.1 ($^2J_{CF} = 17.2$ Hz), 139.1, 131.5, 127.6, 121.6 ($^3J_{CF} = 7.1$ Hz), 117.1 ($^2J_{CF} = 19.2$ Hz), 113.4, 63.0, 56.3, 14.1

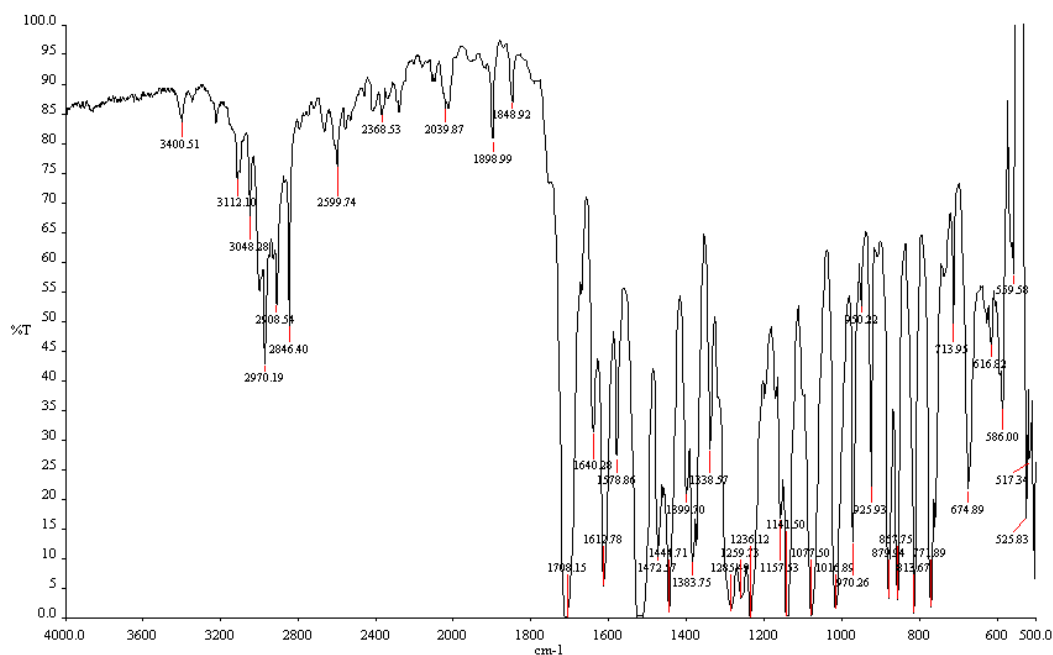
IR: 3048, 2970, 1708, 1640, 1612, 1578, 1472 cm^{-1}



Spekter 4.15 ^1H NMR-spekter av akrylat **55**.

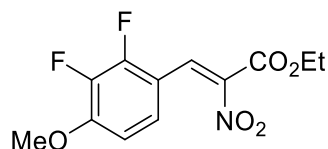


Spekter 4.16 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **55**.



Spekter 4.17 IR-spekter av akrylat **55**.

4.6.6 Syntese av etyl(Z)-3-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



C₁₂H₁₁F₂NO₃

Molekylvekt: 287, 22 g/mol

Utbytte: 42%

Smp: 120°C

R_f: 0,56

Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **58**. Råproduktet ble rensed ved kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (5:1) og omkrystallisert med CH₂Cl₂/heksan. Dette ga svakt gule krystaller (42 %, 120 mg).

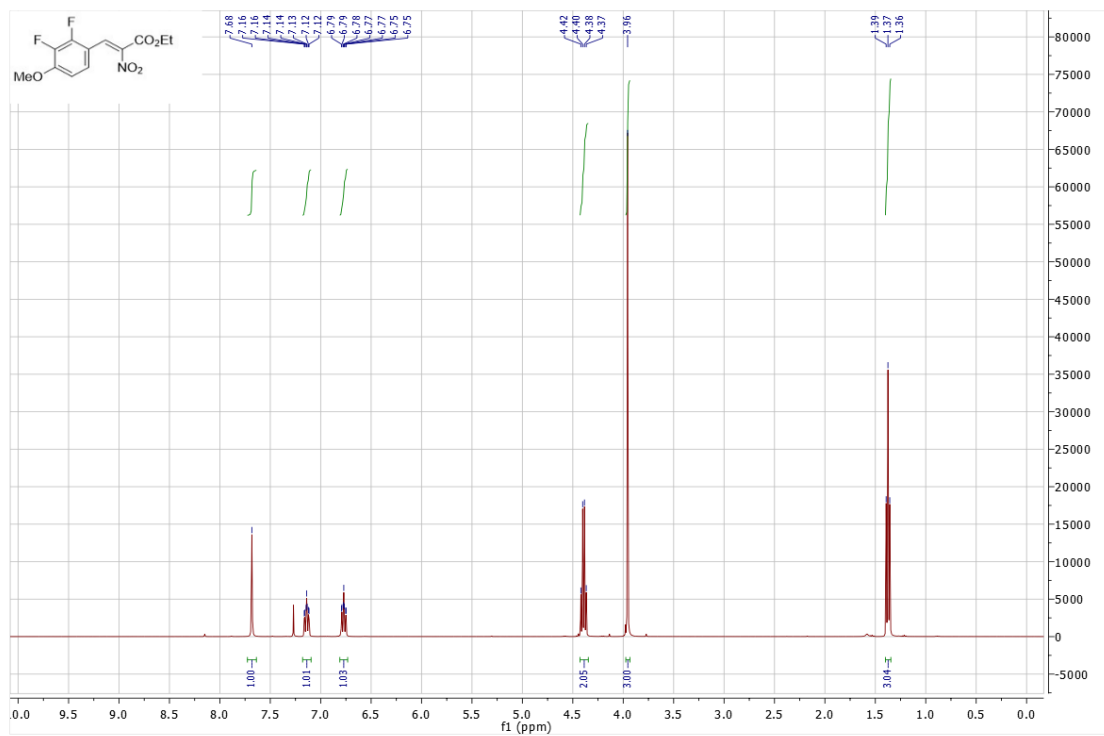
Data

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (s, 1H), 7.14 (dt, *J* = 9.4, 7.4, 2.3 Hz, 1H), 6.77 (dt, *J* = 9.2, 7.3, 1.9 Hz, 1H), 4.39 (q, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

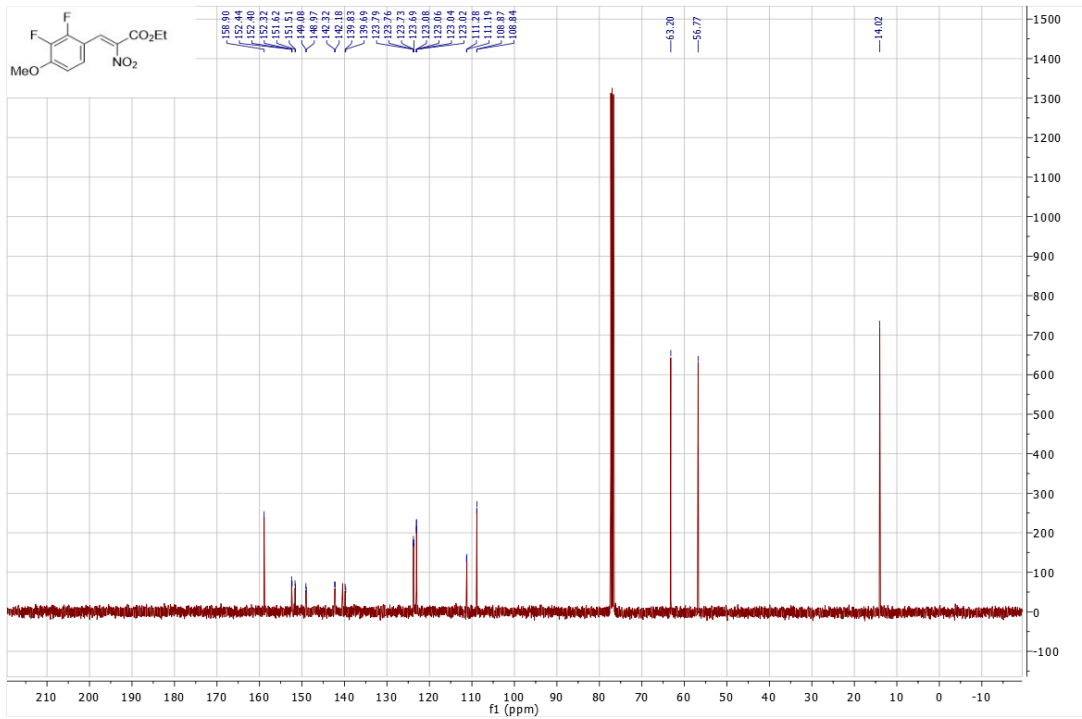
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.9, 152.4 (²*J*_{CF} = 82 Hz), 151.5 (¹*J*_{CF} = 256 Hz), 140.4 (¹*J*_{CF}

= 178 Hz), 139.7 ($^2J_{CF} = 72$ Hz), 123.7, 123.0, 111.2 ($^4J_{CF} = 9$ Hz), 108.8, 63.2, 56.8, 14.0

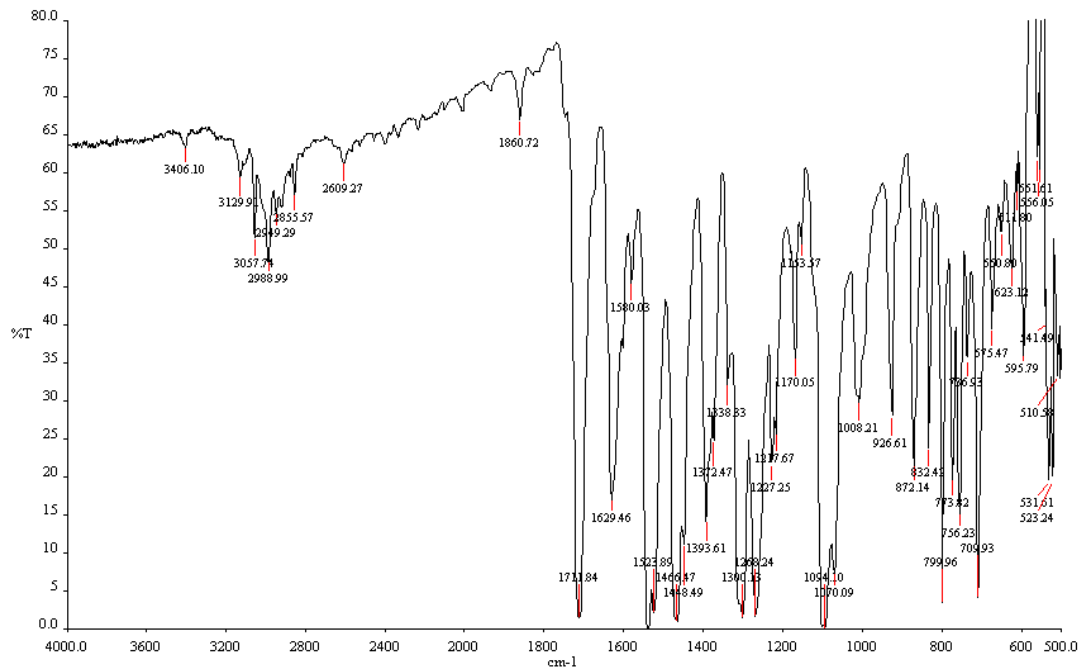
IR: 3058, 2989, 1712, 1629, 1580, 1523, 1448 cm^{-1}



Spekter 4.18 ^1H NMR-spekter av akrylat **58**.

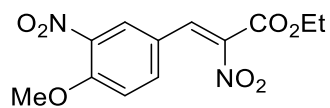


Spekter 4.19 ^{13}C NMR-spekter av akrylat **58**.



Spekter 4.20 IR-spekter av akrylat **58**.

4.6.7 Syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-2-nitroakrylat



$C_{12}H_{12}N_2O_7$

Molekylvekt: 296,24 g/mol

Utbytte: 14%

Smp: 140°C

R_f: 0,38

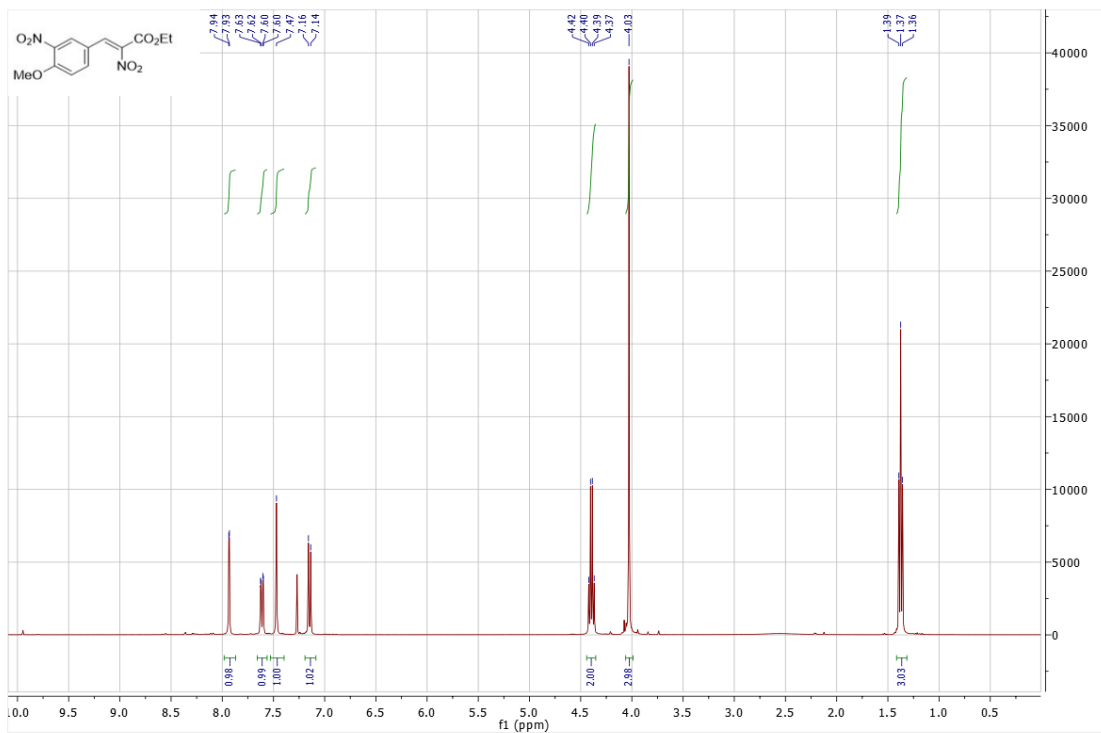
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **61**. Råproduktet ble omkrystallisert med 1,2-diklorethan/heksan. Dette ga gule krystaller (14 %, 41 mg).

Data

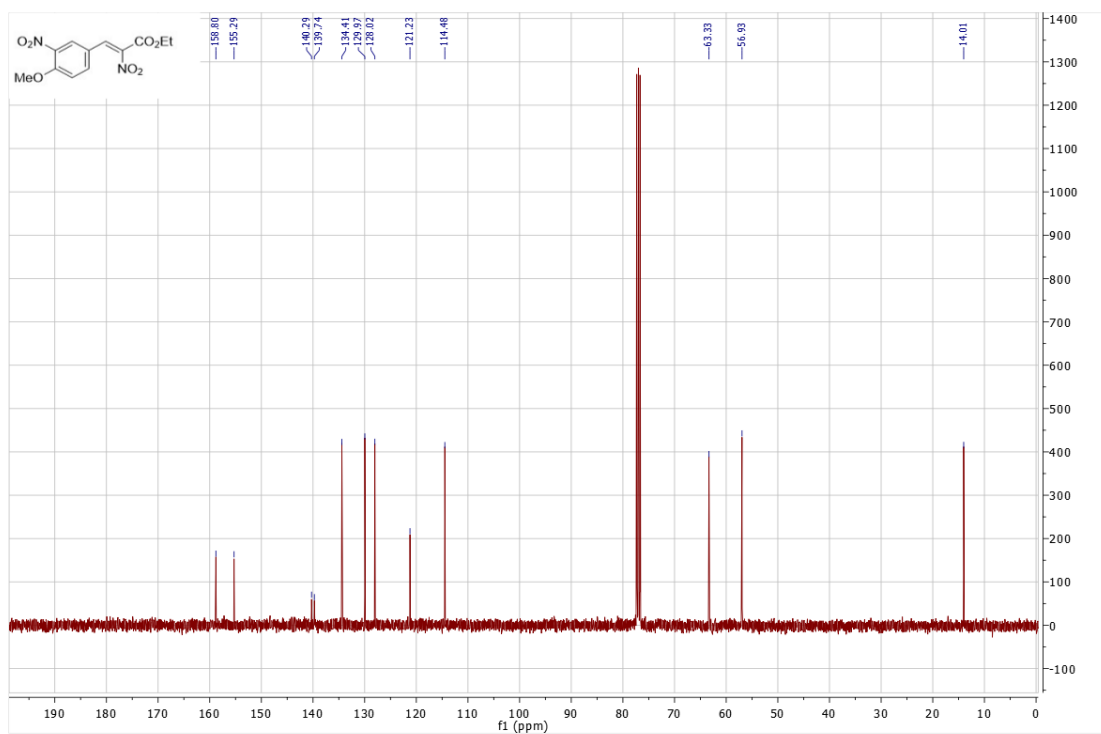
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.39 (q, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 159.0, 155.4, 140.3, 139.7, 134.5, 130.1, 128.0, 121.4, 114.5, 63.3, 56.9, 14.0

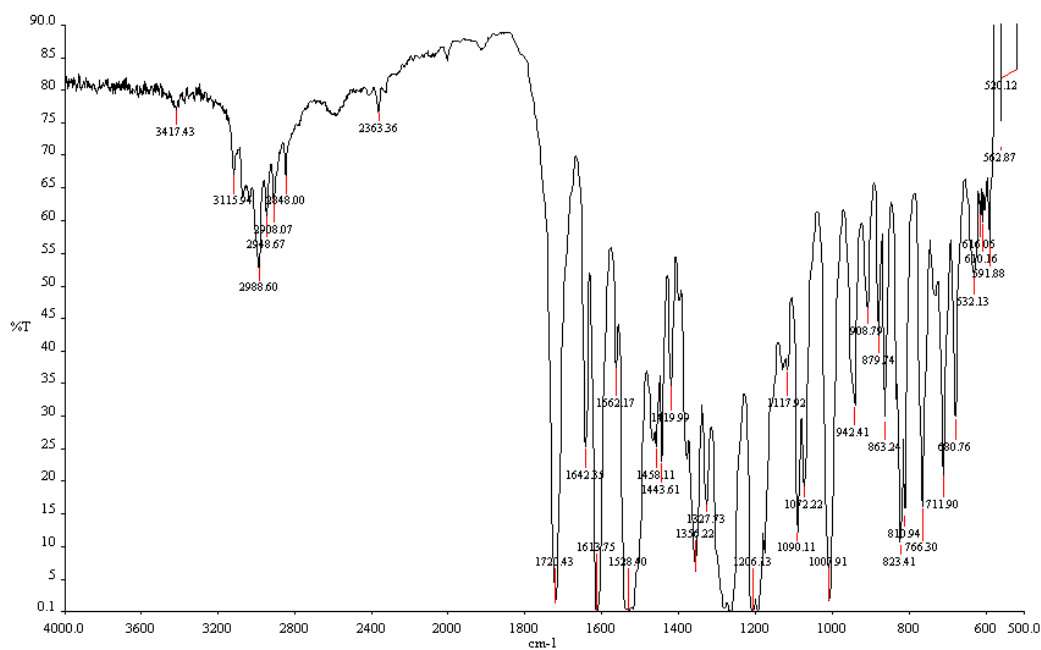
IR: 3115, 2988, 1720, 1642, 1614, 1562, 1528 cm⁻¹



Spekter 4.21 ¹H NMR-spekter av akrylat **61**.

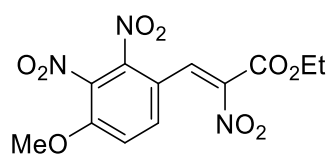


Spekter 4.22 ¹³C NMR-spekter av akrylat **61**.



Spekter 4.23 IR-spekter av akrylat **61**.

4.6.8 Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(4-metoksi-2,3-dinitrofenyl)-2-nitroakrylat



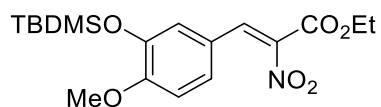
$C_{12}H_{11}N_3O_9$

Molekylvekt: 341,23 g/mol

Utbytte: - %

Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **64**. Råproduktet ble forsøkt omkrystallisert med 1,2-dikloretan/heksan. Ingen krystaller ble observert.

4.6.9 Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



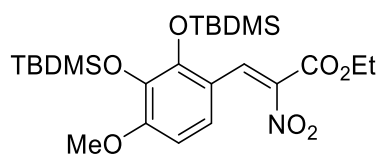
$C_{18}H_{27}NO_6Si$

Molekylvekt: 381,50 g/mol

Utbytte: - %

Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **67**. Råprodukt ble rensert ved filtrering gjennom en silikaplugg med heksan/EtOAc (5:1) og forsøkt omkrystallisert med 1,2-dikloretan/hexsan. Ingen krystaller observert.

4.6.10 Forsøk på syntese av etyl(Z)-3-(2,3-((*tert*-butyldimetylsilyl)oksi-4-metoksifenyl)-2-nitroakrylat



$C_{24}H_{41}NO_7Si_2$

Molekylvekt: 511,76 g/mol

Utbytte: - %

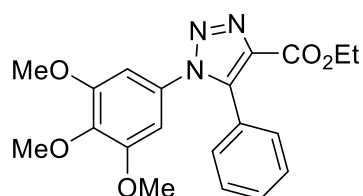
Den generelle metoden ble benyttet for å fremstille akrylat **70**. Råprodukt ble rensert ved filtrering gjennom en silikaplugg med heksan/EtOAc (5:1) og forsøkt omkrystallisert med 1,2-dikloretan/hexsan. Ingen krystaller ble observert.

4.7 Generell metode for fremstilling av 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylat

1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylat ble syntetisert etter kjent metode med modifikasjoner.⁶¹

De korresponderende akrylatene (0.38 mmol), azid (0.38 mmol), molsiv (50 mg) og toluen (2 mL) ble tilsatt et tørt mikrobølgeovnrør. Mikrobølgeovnrøret ble fylt med argongass og reaksjonen ble rørt under N₂-atmosfære i 90-100 timer på 100 °C. Forbindelsene ble rensert ved kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (2:3) som resulterte i de korresponderende 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylatene **71-77**.

4.7.1 Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



C₂₀H₂₁N₃O₅

Molekylvekt: 383,40 g/mol

Utbytte: 39%

Smp: 142°C

R_f: 0,76

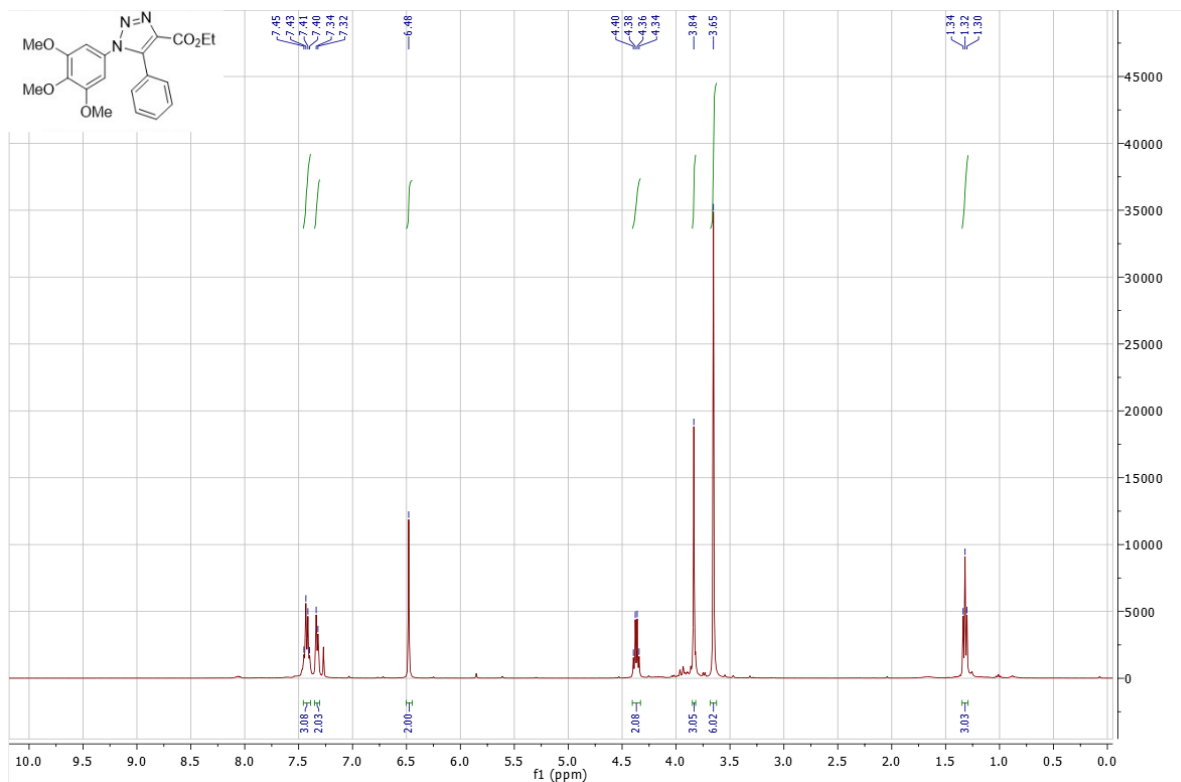
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **71** som hvite krystaller (39 %, 150 mg).

Data

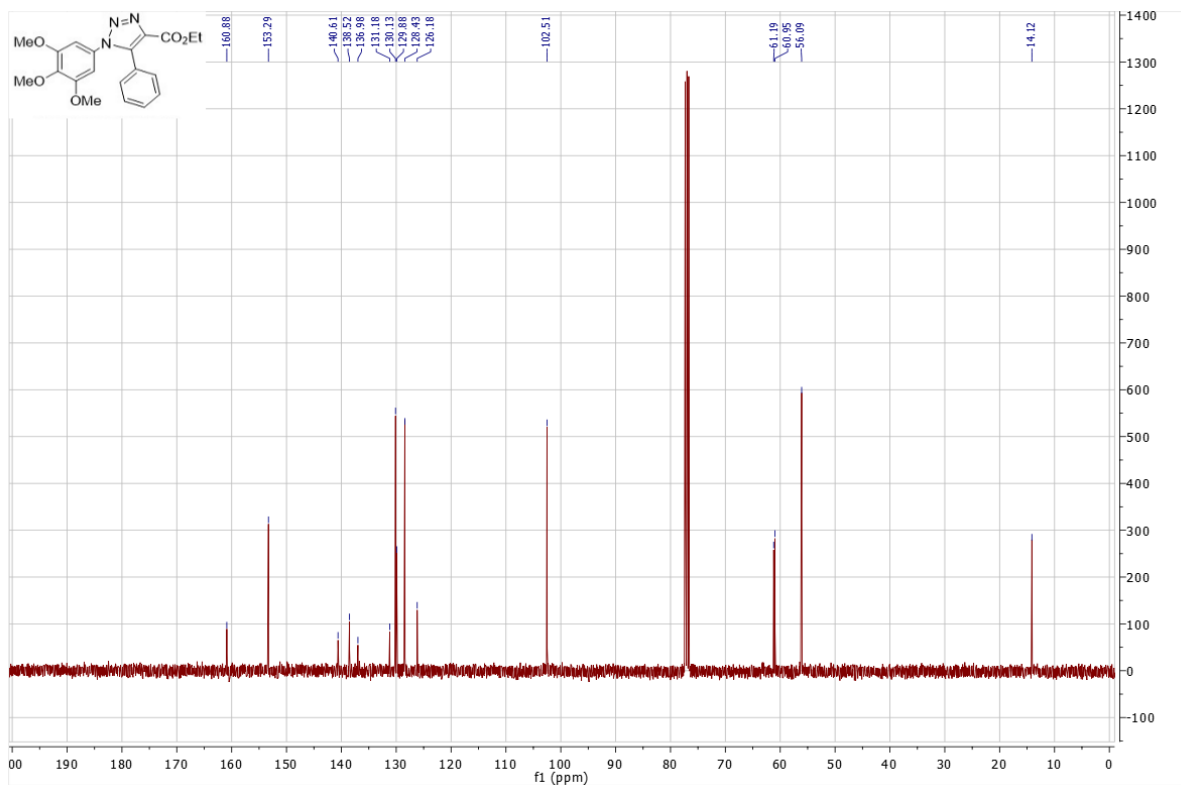
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (m, 3H), 7.33 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 6.48 (s, 2H), 4.37 (q, *J* = 7.1, 14.2 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.65 (s, 6H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 160.9, 153.3 (2C), 140.6, 138.5, 137.0, 131.2, 130.1 (2C), 129.9, 128.4 (2C), 126.2, 102.5 (2C), 61.2, 61.0, 56.1 (2C), 14.1

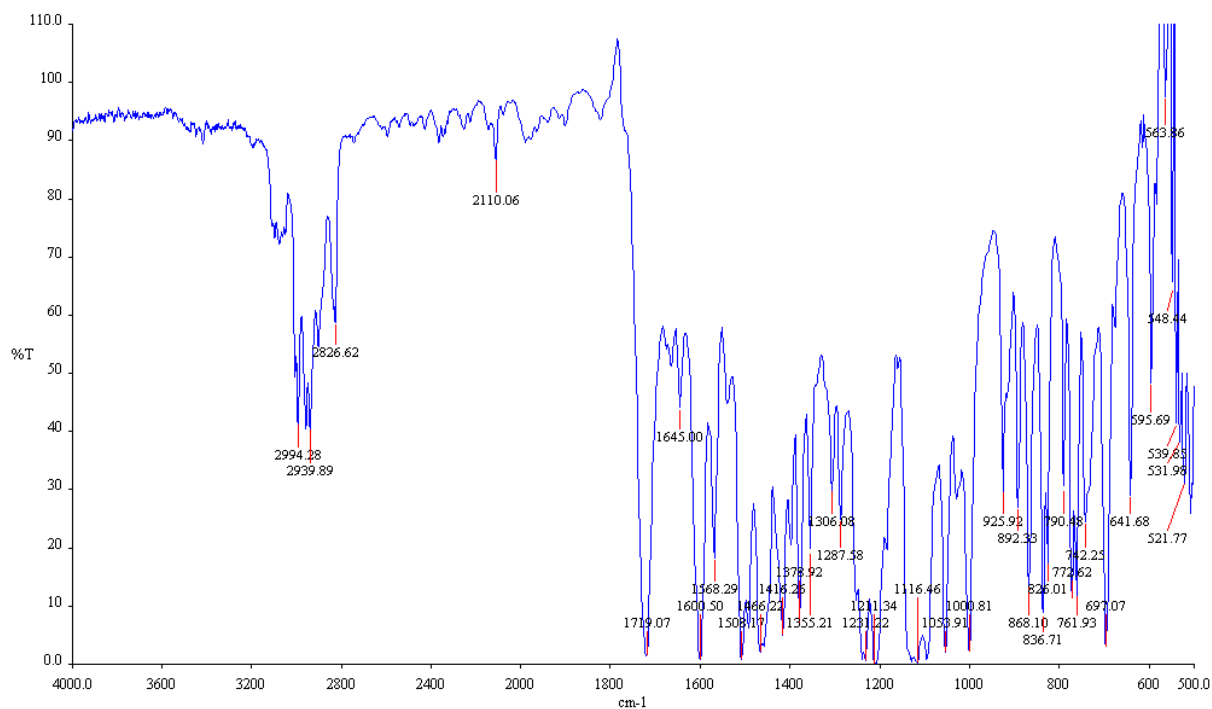
IR: 2994, 2939, 2827, 1719, 1645, 1600, 1568, 1508 cm⁻¹



Spekter 4.24 ^1H NMR-spekter av karboksylat **71**.

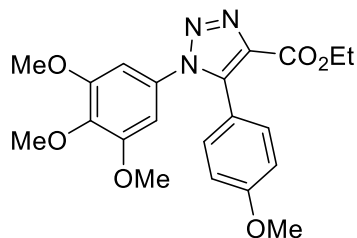


Spekter 4.25 ^{13}C NMR-spekter av karboksylat **71**.



Spekter 4.26 IR-spekter av karboksylat **71**.

4.7.2 Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{21}H_{23}N_3O_6$

Molekylvekt: 413,43 g/mol

Utbytte: 39%

Smp: -

R_f: 0,75

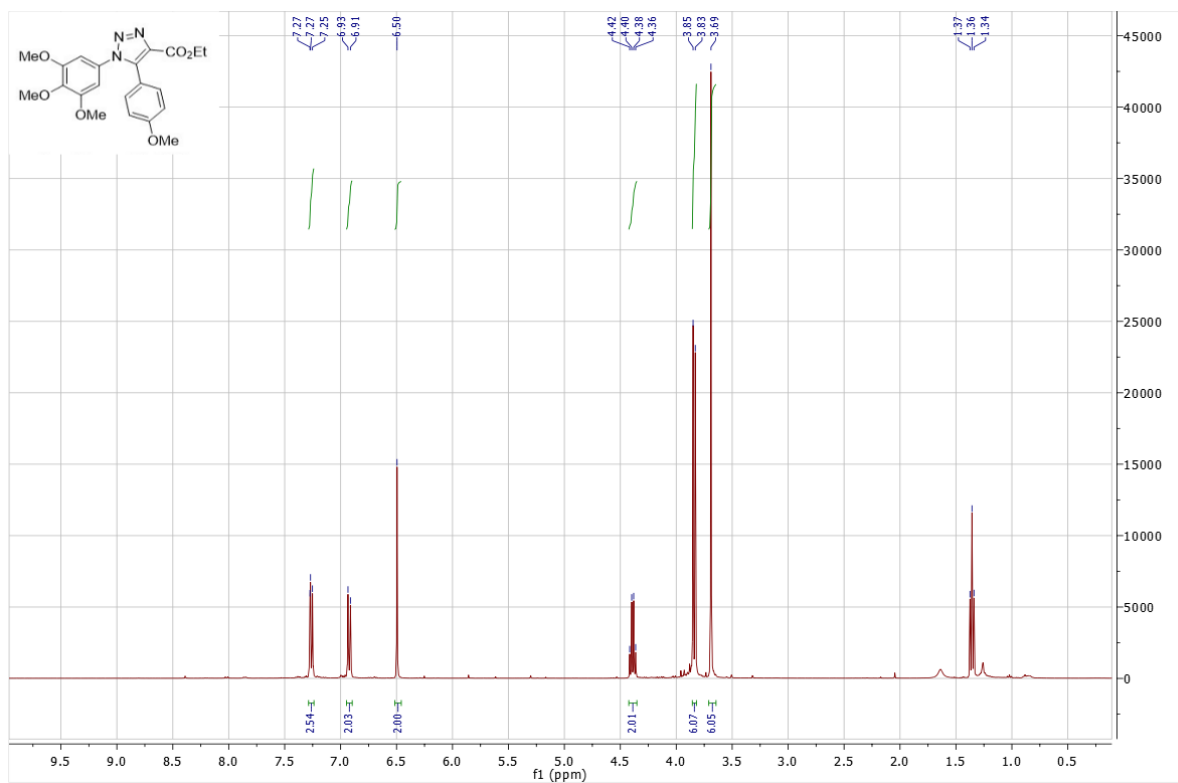
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **72** som gul olje (39 %, 161 mg).

Data

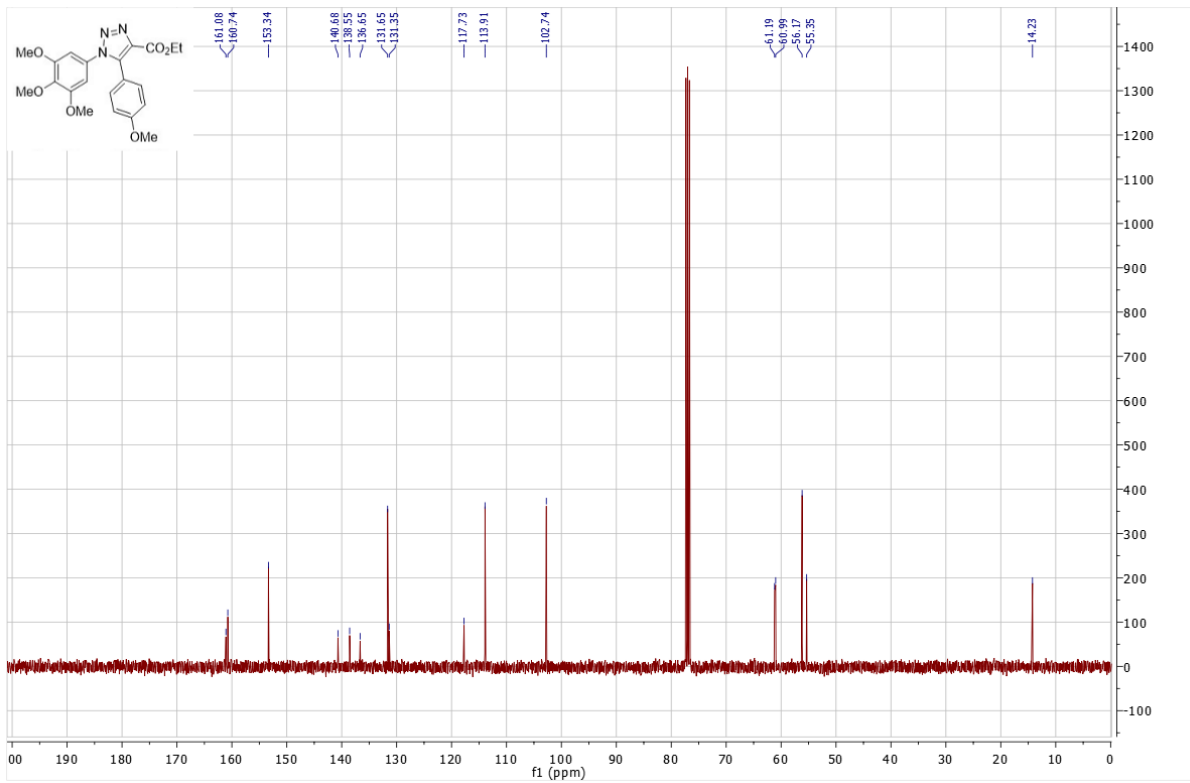
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 4.39 (q, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 6H), 3.69 (s, 6H), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 161.1, 160.7, 153.3 (2C), 140.7, 138.6, 136.7, 131.7, 131.4 (2C), 117.7, 113.9 (2C), 102.7 (2C), 61.0, 61.1, 56.2 (2C), 55.4, 14.2

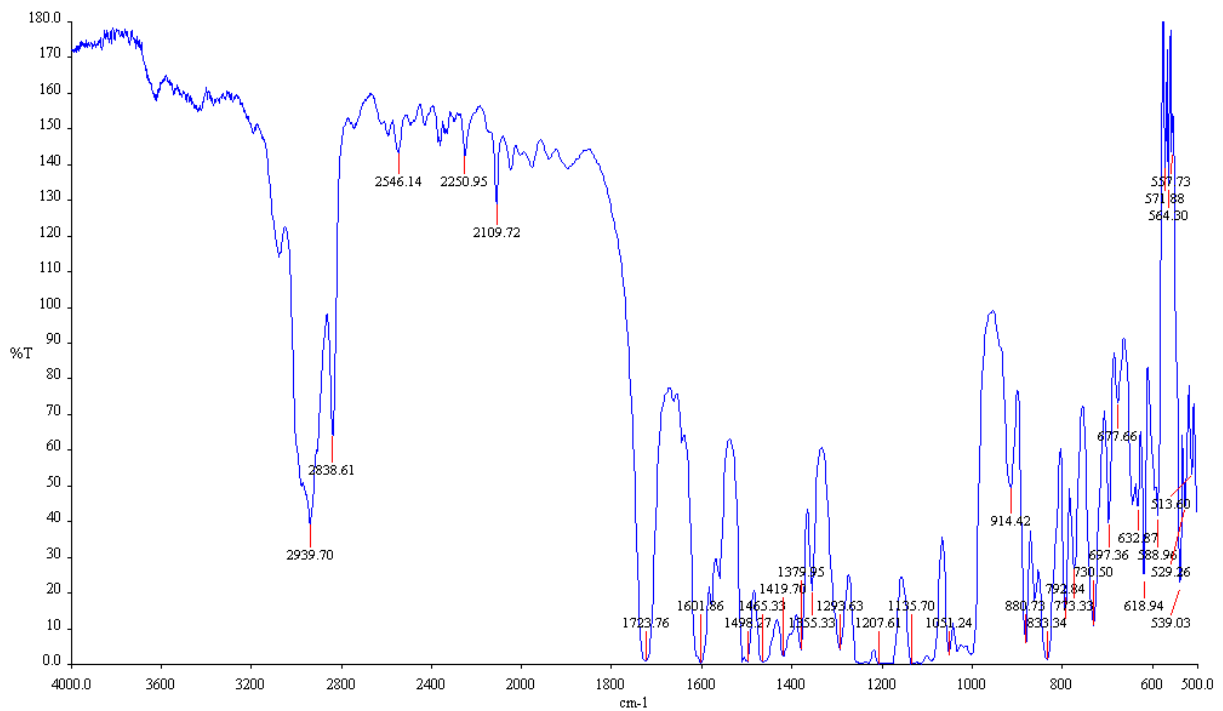
IR: 2939, 2838, 1724, 1601 cm^{-1}



Spekter 4.27 ^1H NMR-spekter av karboksylat **72**.

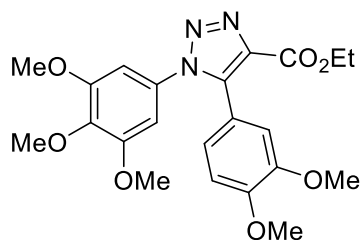


Spekter 4.28 ^{13}C NMR-spekter av karboksylat **72**.



Spekter 4.29 IR-spekter av karboksylat **72**.

4.7.3 Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{22}H_{25}N_3O_7$

Molekylvekt: 443,46 g/mol

Utbytte: 22%

Smp: 132°C

R_f: 0,70

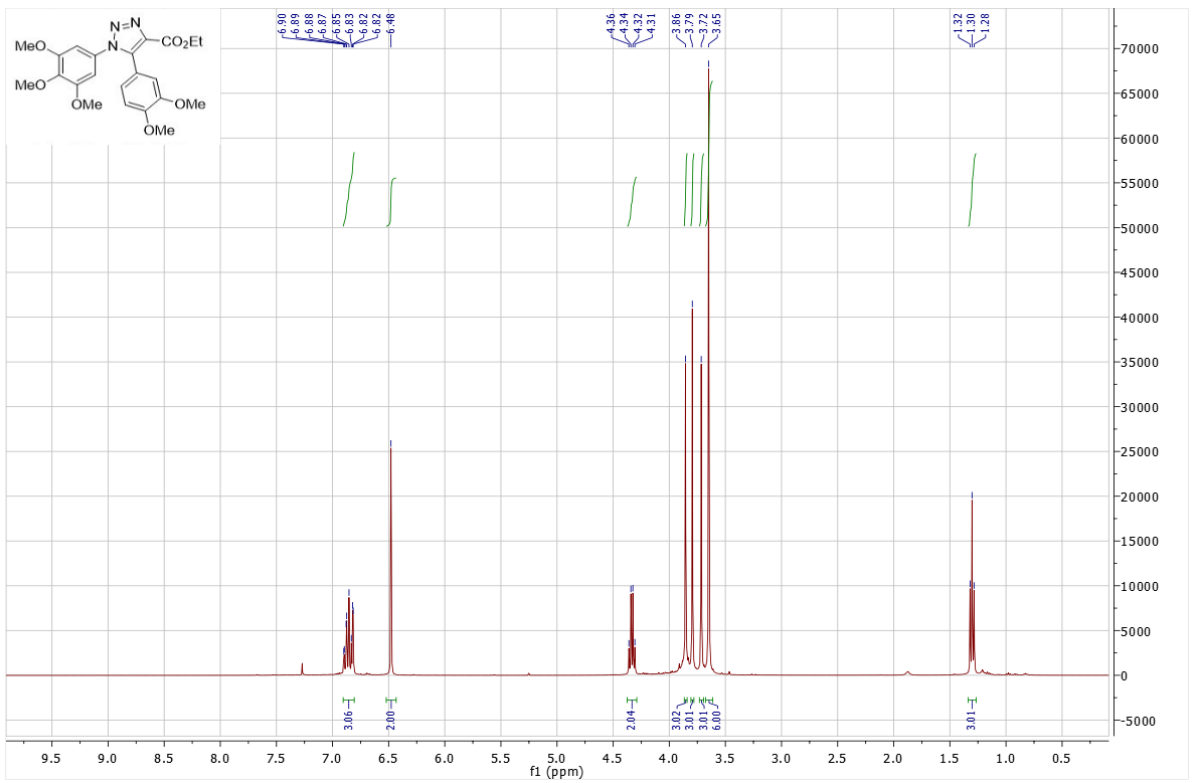
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **73** som hvite krystaller (22 %, 98 mg).

Data

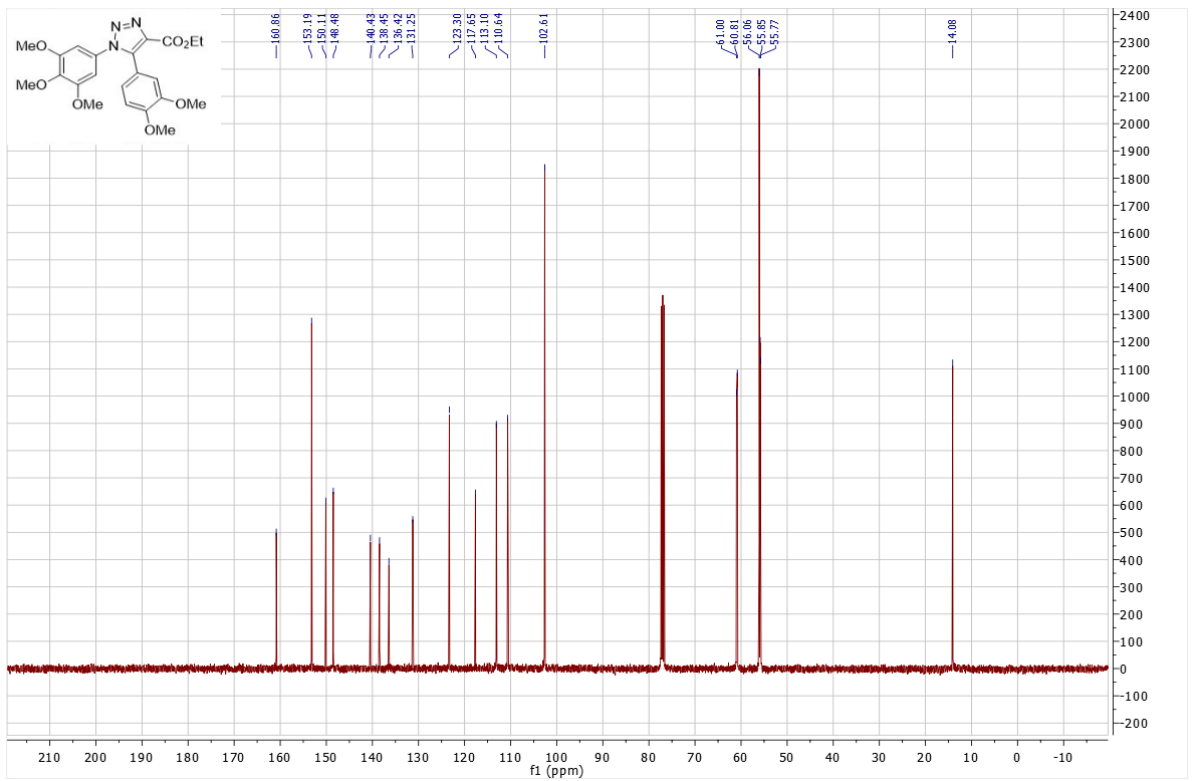
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.9-6.8 (m, 3H), 6.48 (s, 2H), 4.33 (q, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.65 (s, 6H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 160.9, 153.2 (2C), 150.1, 148.5, 140.4, 138.5, 136.4, 131.3, 123.3, 117.7, 113.1, 110.6, 102.6 (2C), 61.0, 60.8, 56.1 (2C), 55.9, 55.8, 14.1

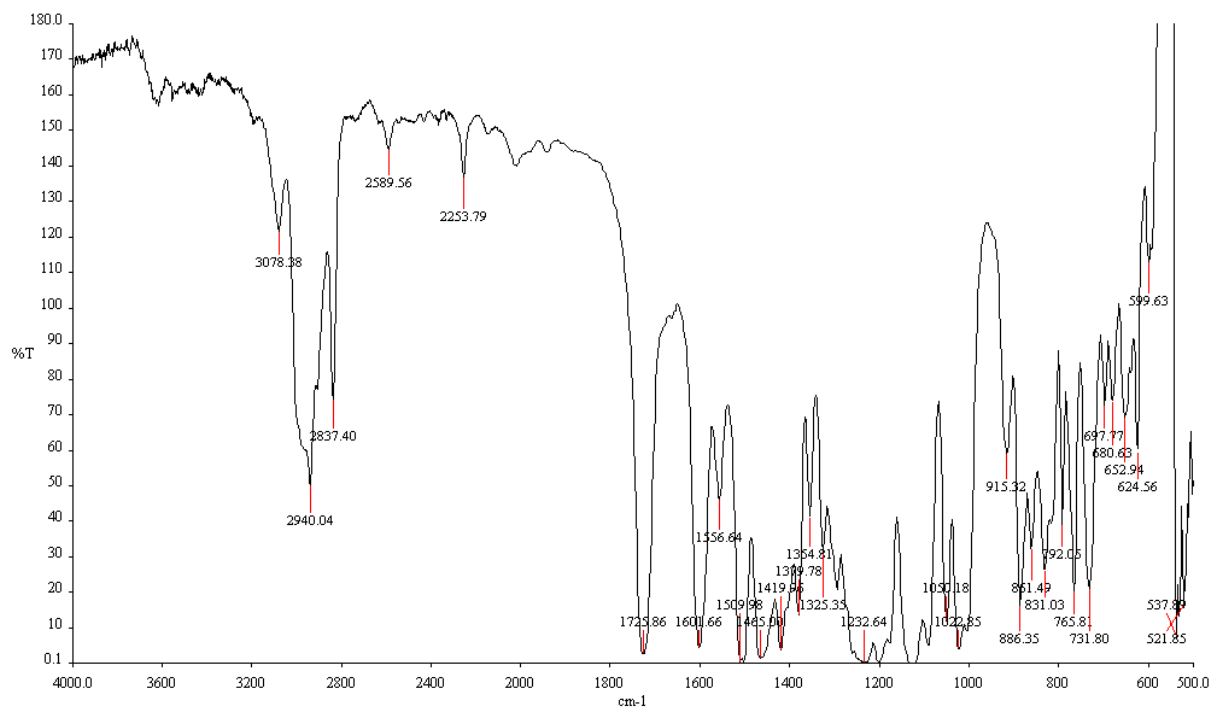
IR: 3078, 2940, 2837, 1726, 1601, 1556, 1509 cm⁻¹



Spekter 4.30 ^1H NMR-spekter av karboksylat **73**.

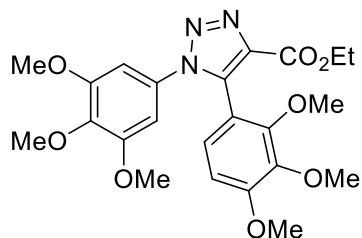


Spekter 4.31 ^{13}C NMR-spekter av karboksylat **73**.



Spekter 4.32 IR-spekter av karboksylat **73**.

4.7.4 Syntese av 5-(2,3,4-trimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{23}H_{27}N_3O_8$

Molekylvekt: 473,48 g/mol

Utbytte: 52%

Smp: -

R_f: 0.63

Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **74** som oransje olje (52 %, 246 mg).

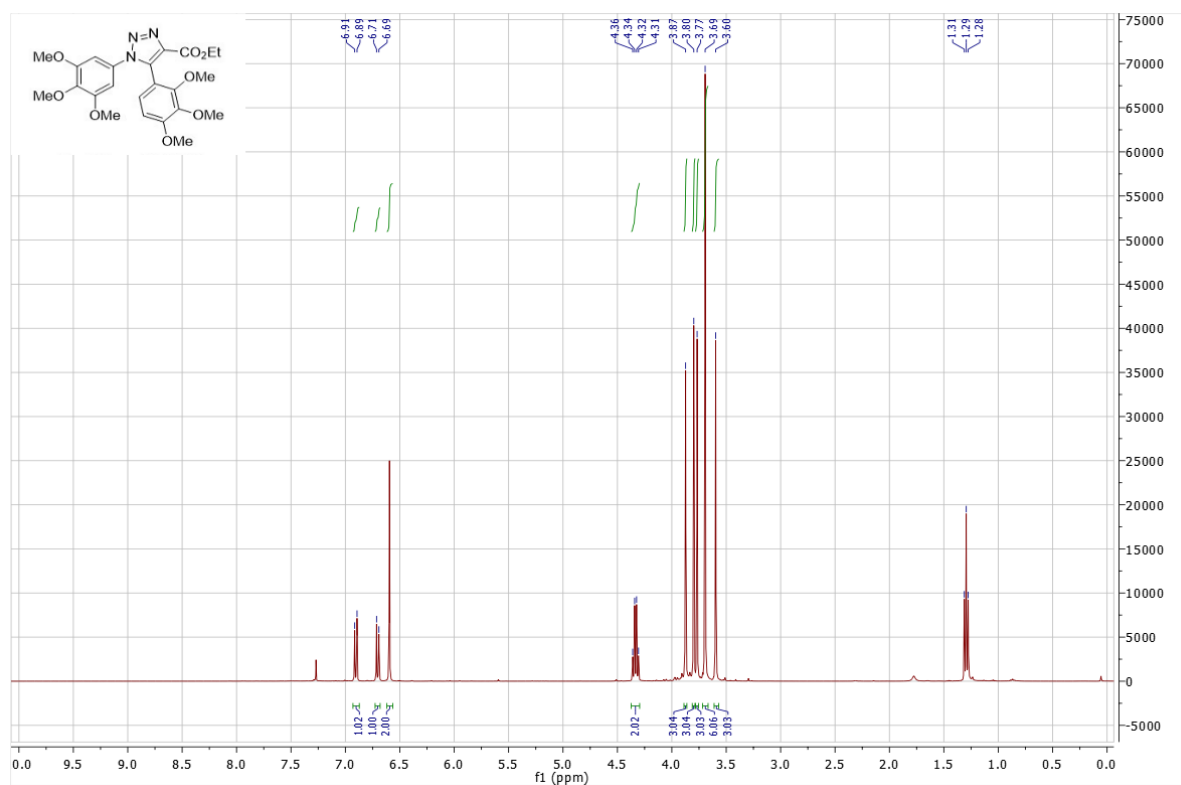
Data

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.59 (s, 2H),

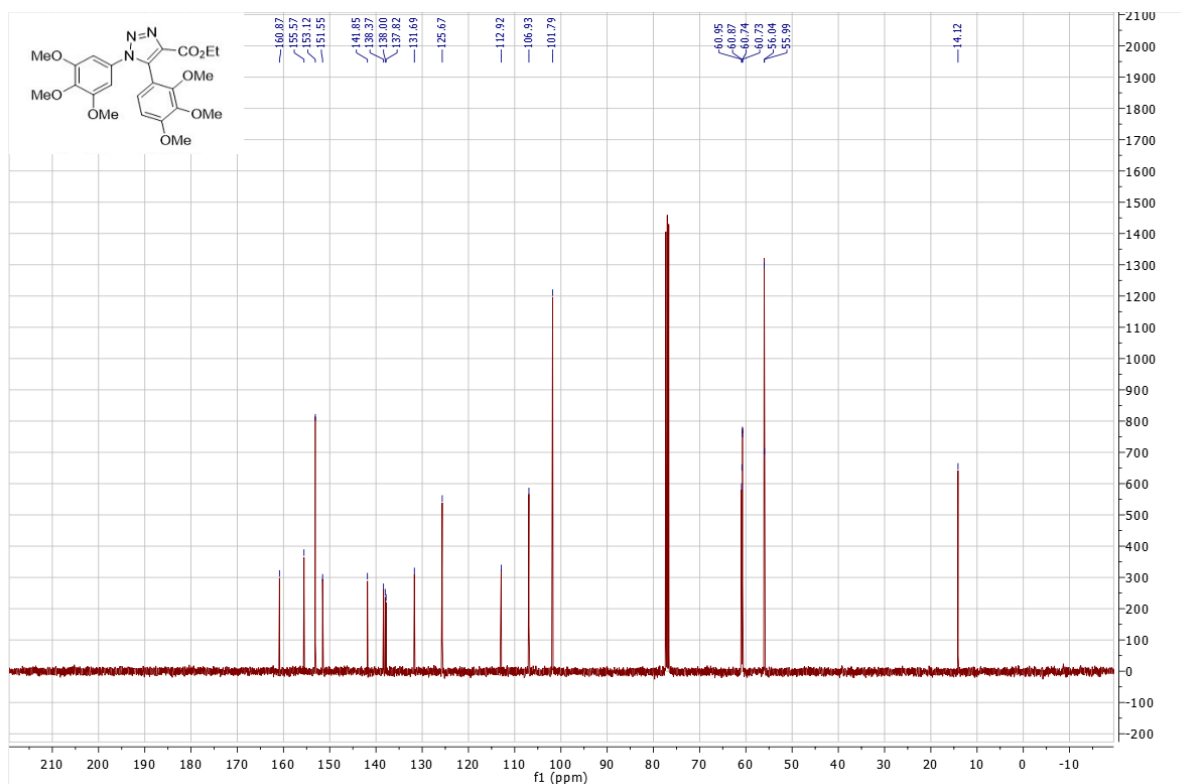
4.33 (q, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.69 (s, 6H), 3.60 (s, 3H), 1.29 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 160.9, 155.6, 153.1 (2C), 151.6, 141.9, 138.4, 138.0, 137.8, 131.7, 125.7, 112.9, 106.9, 101.8 (2C), 61.0, 60.9, 60.7 (2C), 56.0 (3C), 14.1

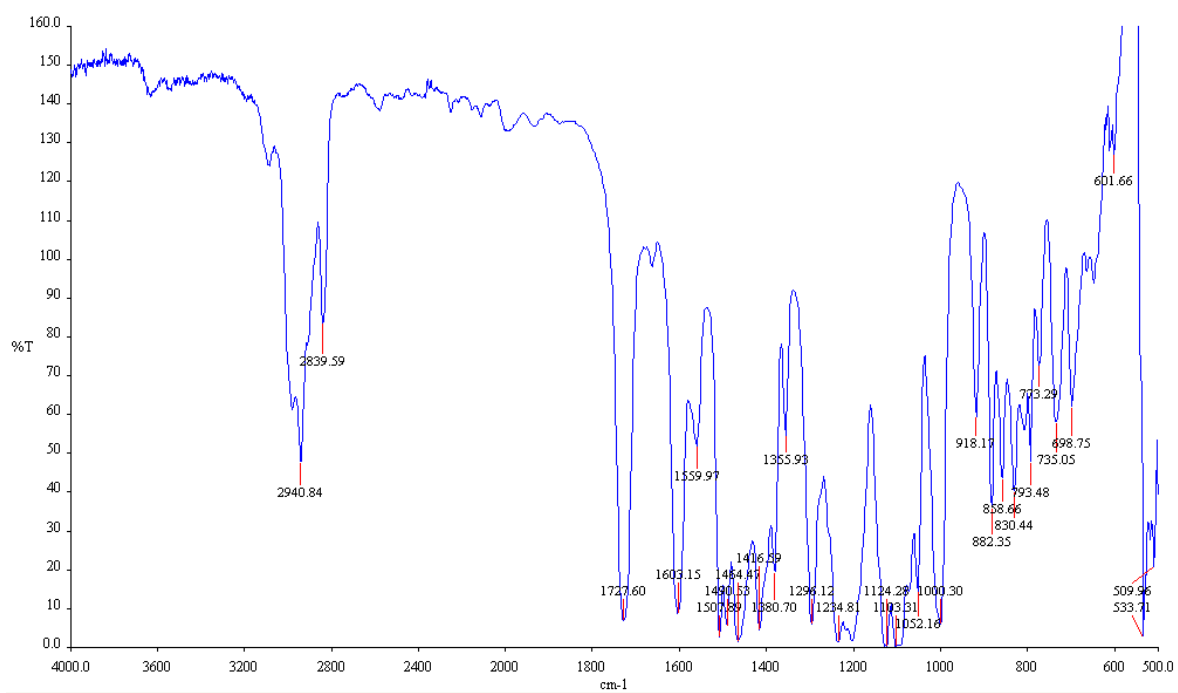
IR: 2940, 2839, 1727, 1603, 1559, 1507 cm^{-1}



Spekter 4.33 ^1H NMR-spekter av karboksylat **74**.

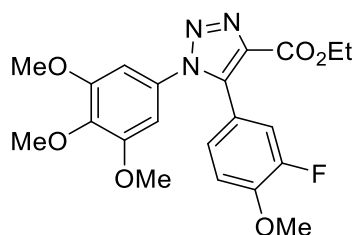


Spekter 4.34 ¹³C NMR-spekter av karboksylat **74**.



Spekter 4.35 IR-spekter av karboksylat **74**.

4.7.5 Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{21}H_{22}FN_3O_6$

Molekylvekt: 431,42 g/mol

Utbytte: 44%

Smp: 142°C

R_f: 0,69

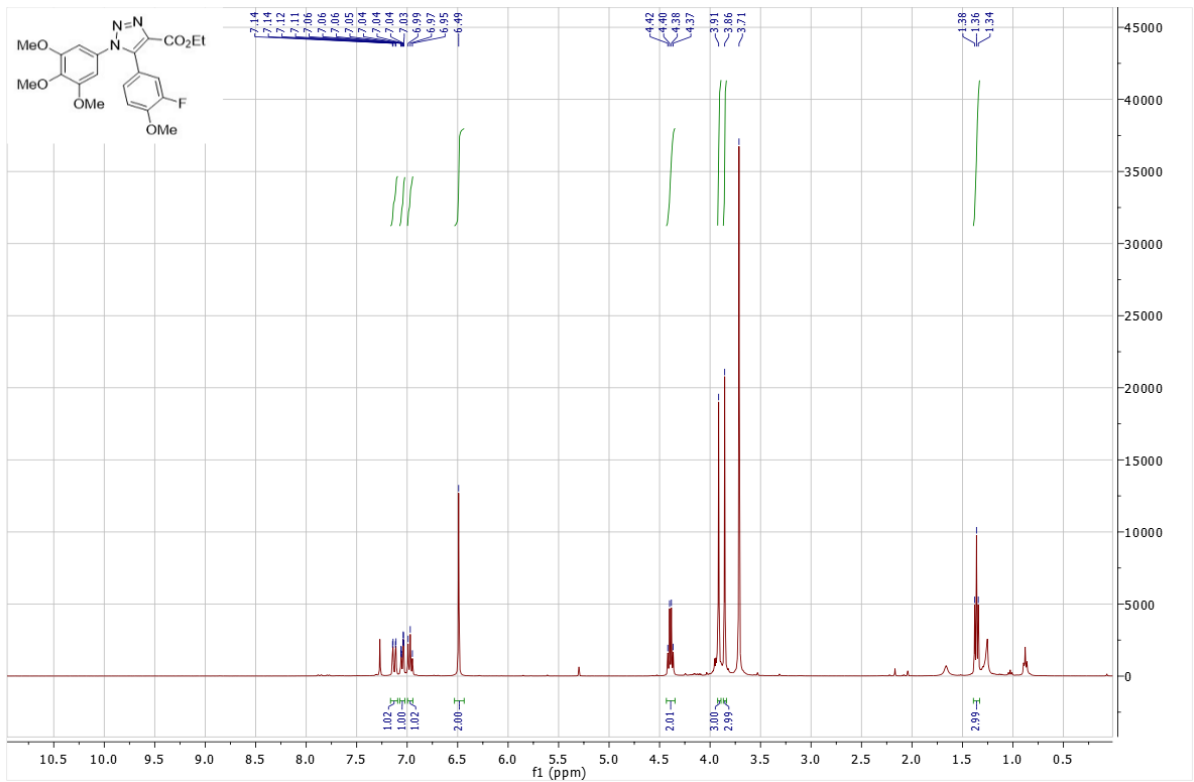
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **75** som oransje krystaller (44 %, 190 mg).

Data

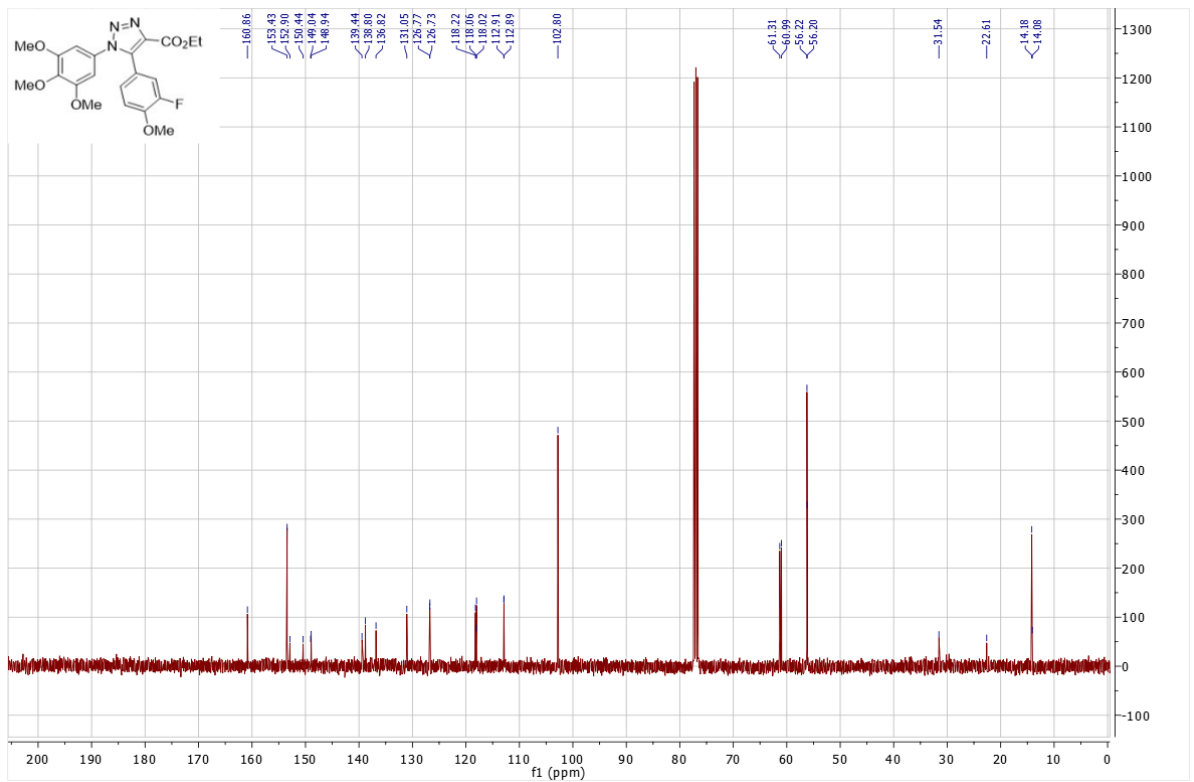
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.13 (dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, 1H), 7.06 (d, 1H), 6.97 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.49 (s, 2H), 4.39 (q, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 160.9, 153.4 (2C), 152.9, 150.9 ($^1J_{CF} = 247$ Hz), 149.0, 148.9, 139.4 ($^2J_{CF} = 65$ Hz), 136.8, 131.1, 126.7, 118.0, 112.9, 102.8 (2C), 61.3, 61.0, 56.2 (3C), 14.2

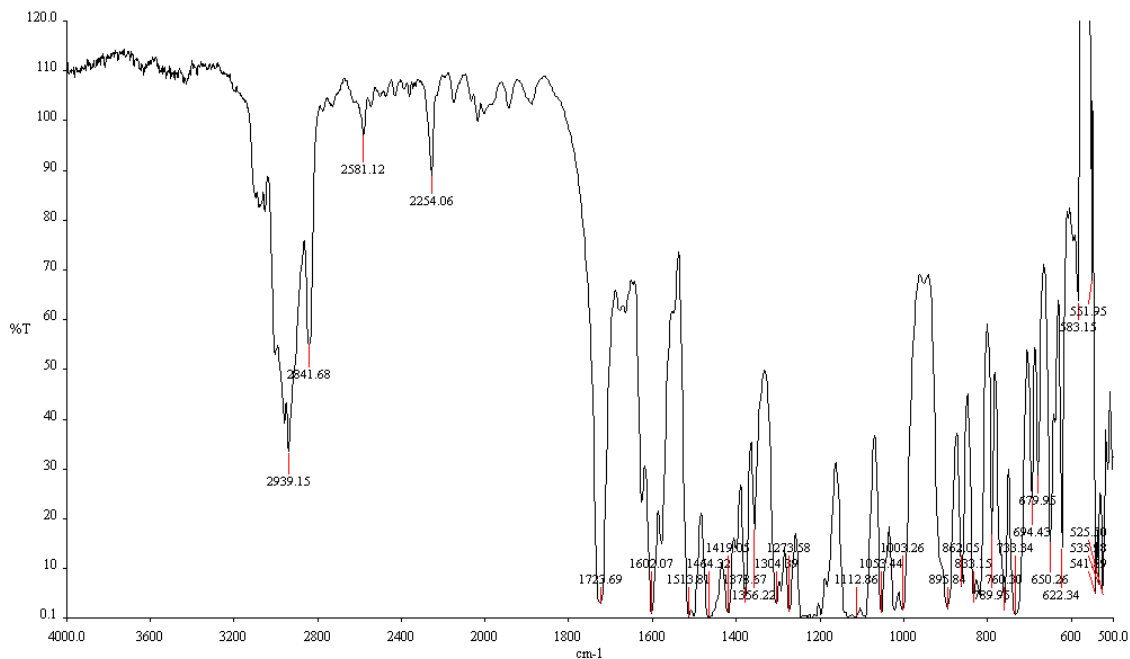
IR: 2939, 2841, 1723, 1602, 1513 cm^{-1}



Spekter 4.36 ^1H NMR-spekter av karboksylat **75**.

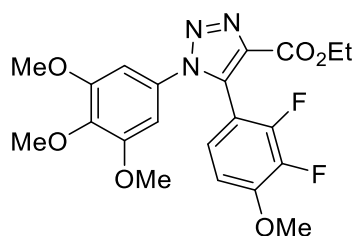


Spekter 4.37 ^{13}C NMR-spekter av karboksylat **75**.



Spekter 4.38 IR-spekter av karboksylat **75**.

4.7.6 Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{21}H_{21}F_2N_3O_6$

Molekylvekt: 449,41 g/mol

Utbytte: 52%

Smp: 139°C

R_f: 0,50

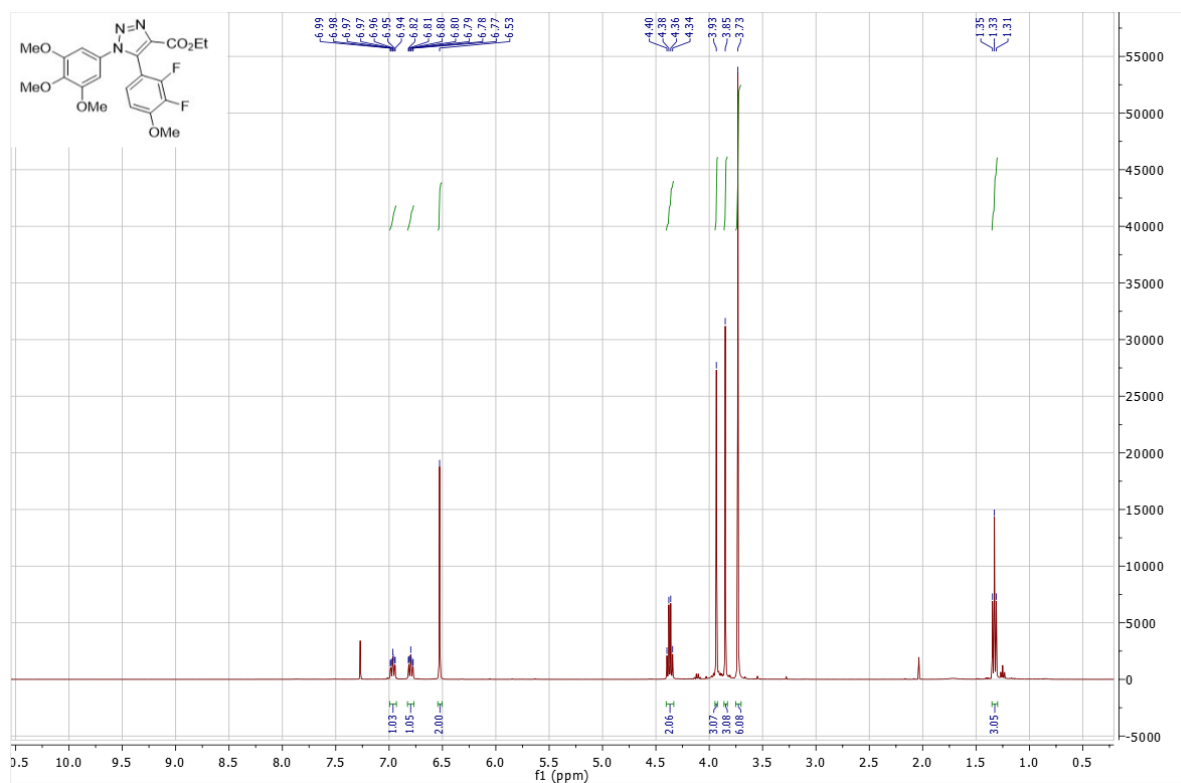
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **76** som brune krystaller (52 %, 234 mg).

Data

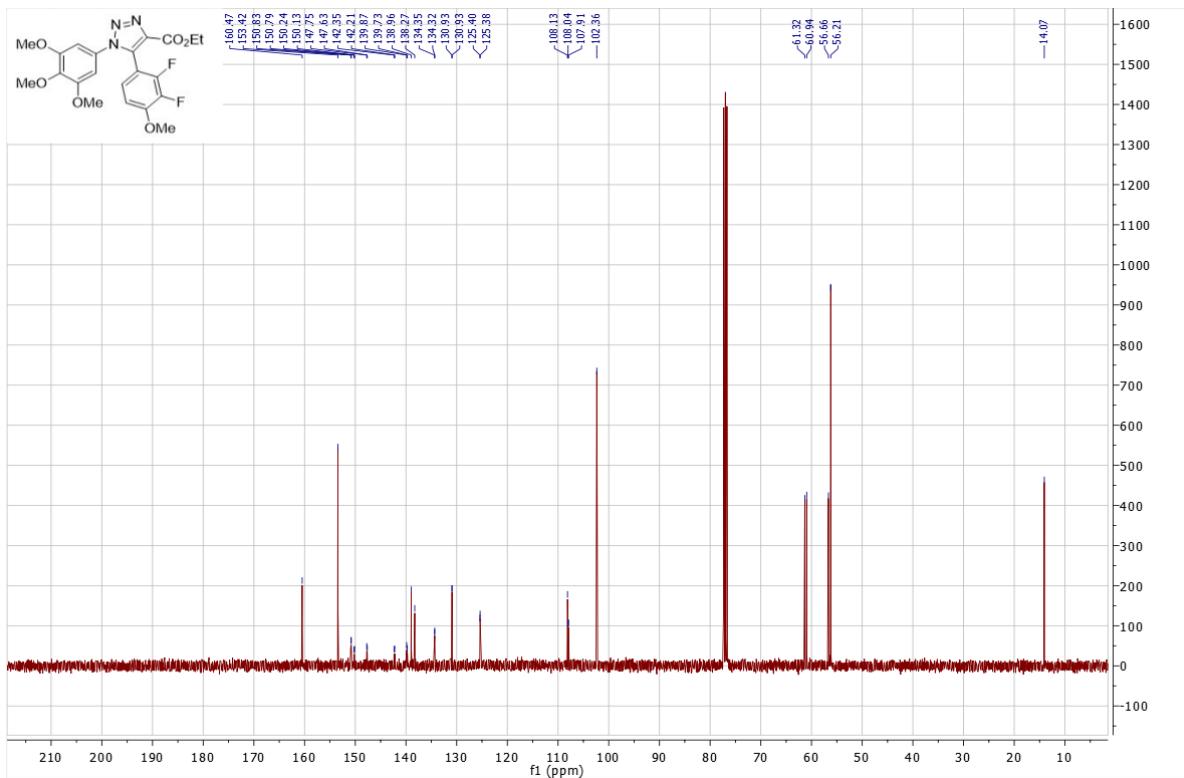
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.97 (dt, $J = 9.3, 7.1, 2.3$ Hz, 1H), 6.80 (dt, $J = 8.9, 7.2, 1.7$ Hz, 1H), 6.53 (s, 2H), 4.37 (q, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 160.5, 153.4 (2C), 150.8 ($^2J_{\text{CF}} = 58$ Hz), 150.2 ($^1J_{\text{CF}} = 251$ Hz), 147.8, 139.8 ($^1J_{\text{CF}} = 250$ Hz), 139.0 ($^2J_{\text{CF}} = 77$ Hz), 138.4, 134.5, 131.1, 125.5, 108.1, 102.4 (2C), 61.3, 60.9, 56.7, 56.2 (2C), 14.1

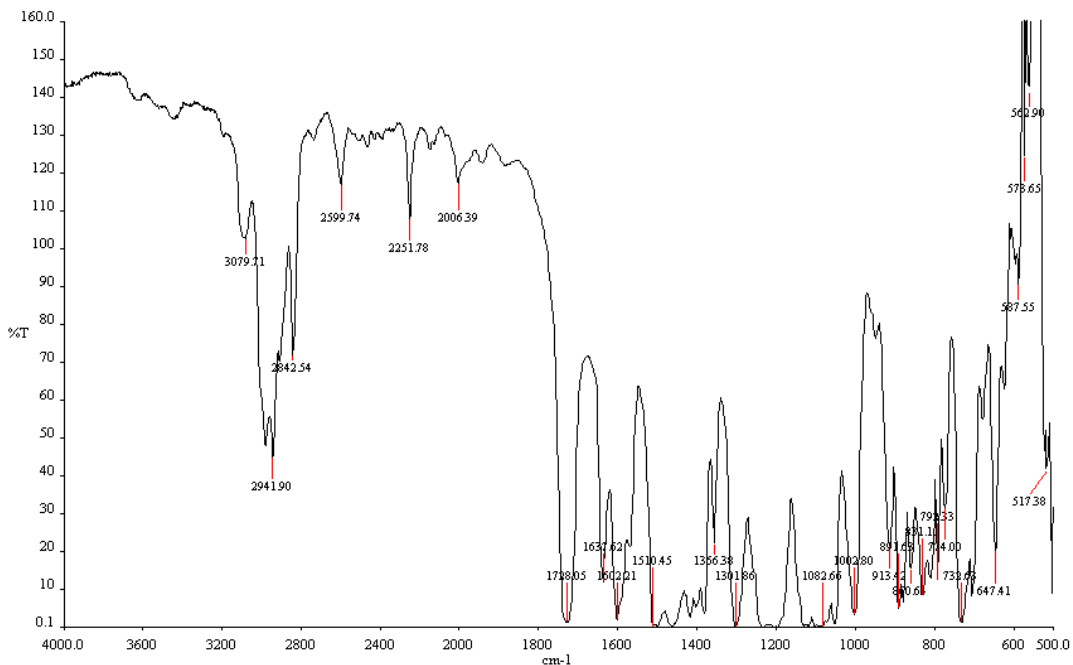
IR: 3079, 2941, 2843, 1728, 1638, 1602, 1510 cm^{-1}



Spekter 4.39 ^1H NMR-spekter av karboksylat **76**.

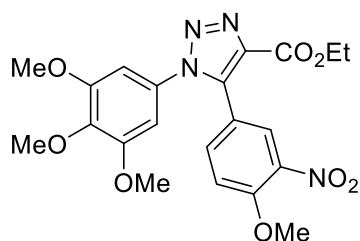


Spekter 4.40 ¹³C NMR-spekter av karboksylat **76**.



Spekter 4.41 IR-spekter av karboksylat **76**.

4.7.7 Syntese av 5-(4-metoksi-3-nitrofenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{21}H_{22}N_4O_8$

Molekylvekt: 458,14 g/mol

Utbytte: 26%

Smp: 225°C

R_f: 0,57

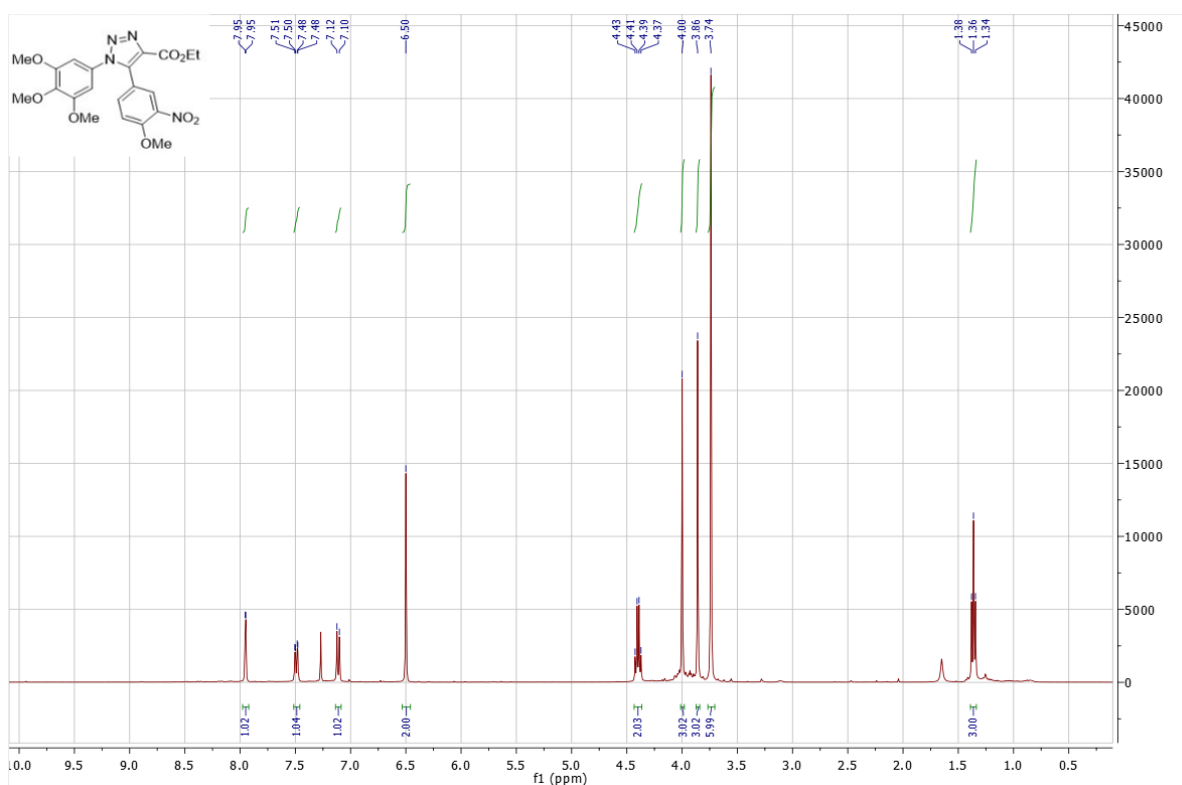
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av rent karboksylat **77** som oransje krystaller (26 %, 119 mg).

Data

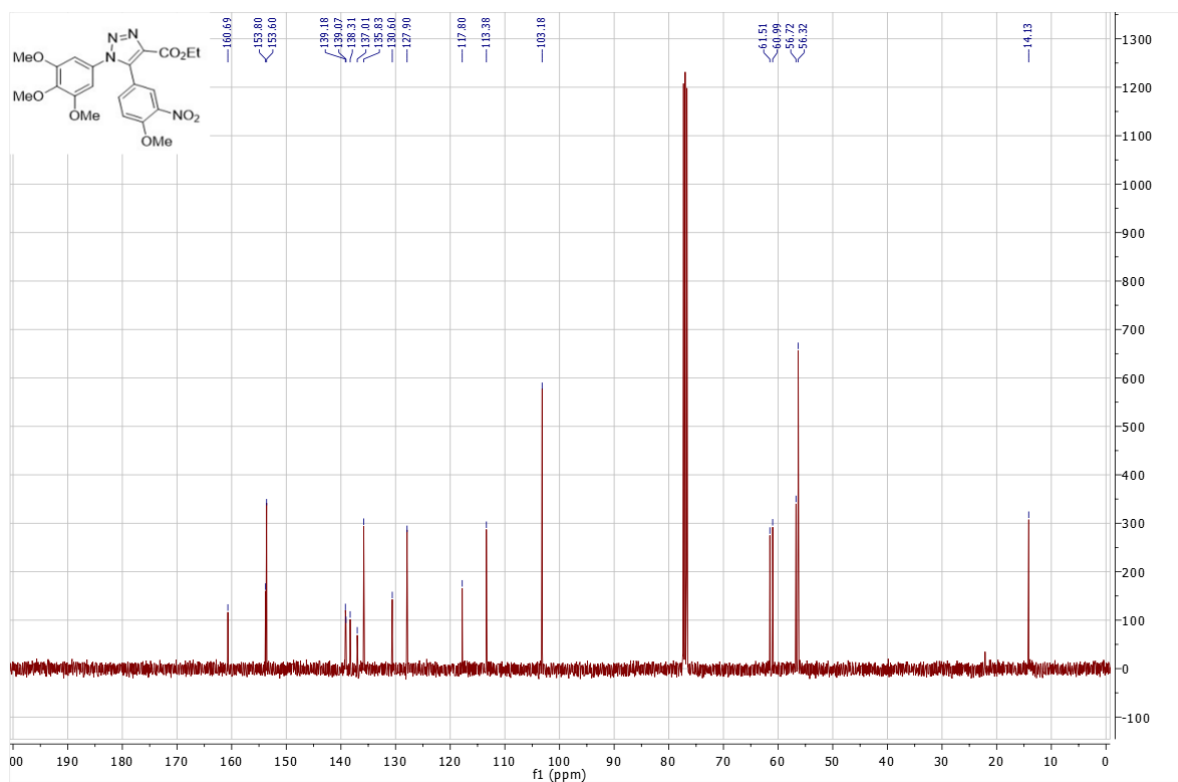
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.95 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 4.40 (q, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.74 (s, 6H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 160.7, 153.8, 153.6 (2C), 139.2, 139.1, 138.3, 137.0, 135.6, 130.6, 127.9, 117.8, 113.4, 103.2 (2C), 61.5, 61.0, 56.7, 56.3 (2C), 14.1

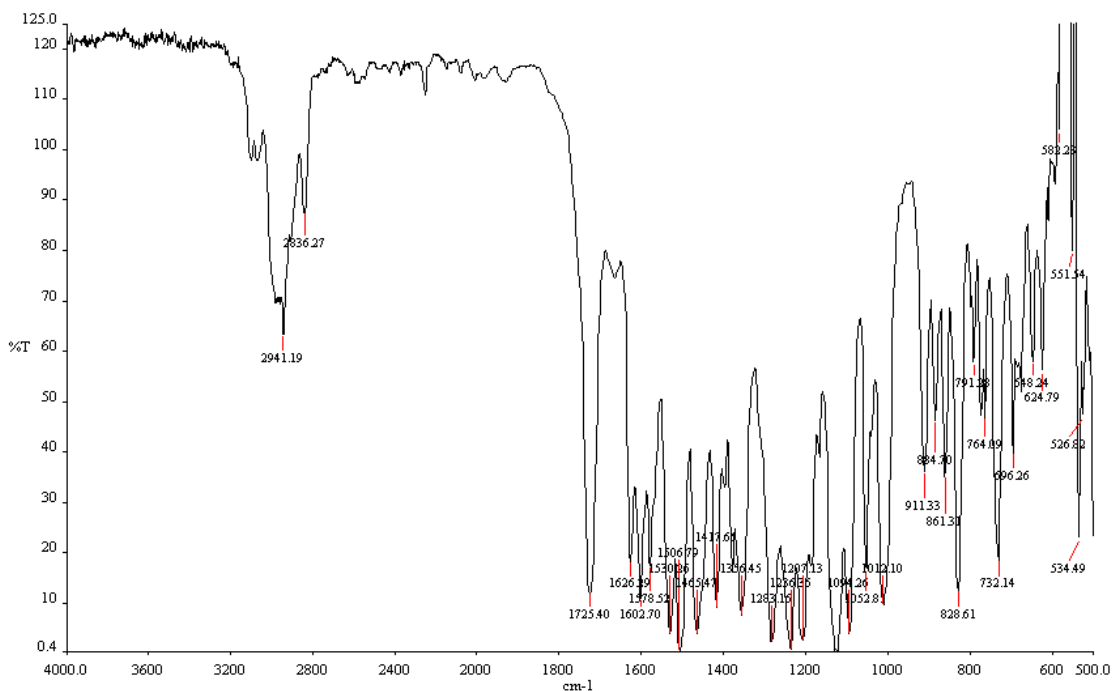
IR: 2941, 2836, 1725, 1626, 1602, 1578, 1506 cm^{-1}



Spekter 4.42 ^1H NMR-spekter av karboksylat **77**.

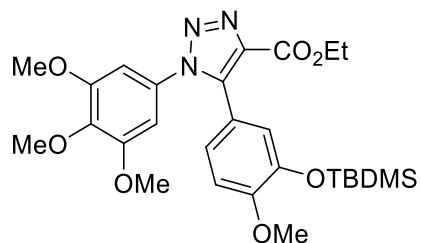


Spekter 4.43 ^{13}C NMR-spekter av karboksylat **77**.



Spekter 4.44 IR-spekter av karboksylar **77**.

4.7.8 Forsøk på syntese av 5-(3-((tert-butyldimetylsilyl)oxy)-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



$C_{21}H_{22}N_3O_7$

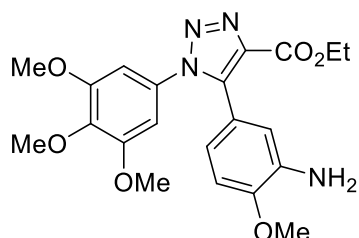
Molekylvekt: 429,43 g/mol

Utbytte: -

Den generelle metoden ble benyttet til forsøk på fremstilling av rent karboksylat **79**. Det ble ikke observert endring på TLC etter endt reaksjon.

4.8 Forsøk på syntese av 5-(3-amino-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat

Syntesen ble utført etter kjent metode.¹⁹



$C_{21}H_{24}N_4O_6$

Molekylvekt: 428,17 g/mol

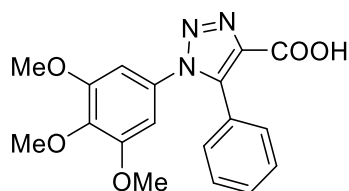
Utbytte: - %

Mettet kobbersulfatløsning (0.16 mL) ble tilsatt en løsning av nitrosubstituert triazol løst i etanol (5 mL). Løsningen ble nedkjølt til 0 °C, og en løsning av natriumborhydrid (78 mg, 2.1 mmol) i etanol/H₂O (1:1) ble tilsatt dråpevis. Løsningen ble refluxert i 4 timer. Etter nedkjøling ble det tilsatt mettet kobbersulfat (0.16 mL) og natriumborhydrid (78 mg, 2.1 mmol). Løsningen ble refluxert over natten. Etter nedkjøling ble EtOAc tilsatt og blandingen ble ekstrahert med 1.0 M HCl (3x10 mL). pH til de kombinerte vannfasene ble justert til pH 10 med 4.0 M NaOH, og ekstrahert med EtOAc (3x15 mL). De kombinerte organiske fasene ble tørket (MgSO₄) og dampet inn.

4.9 Generell metode for fremstilling av 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre

De korresponderende 1,4,5-trisubstituert-1,2,3-triazol-4-karboksylysyrene løst i THF (3.5 mL), LiOH (15 mg, 0.35 mmol) og vann (0.5 mL) ble tilsatt en rundkolbe. Reaksjonen ble rørt over natt. pH ble justert til pH 3-4 med 1.0 M HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med EtOAc (3x10 mL), tørket over Na₂SO₄ og dampet inn. Omkrystallisering med CH₂Cl₂/heptan (1:1) ga karboksylysyrene som hvite krystaller.

4.9.1 Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre



C₁₈H₁₇N₃O₅

Molekylvekt: 355,12 g/mol

Utbytte: 53%

Smp: 166°C

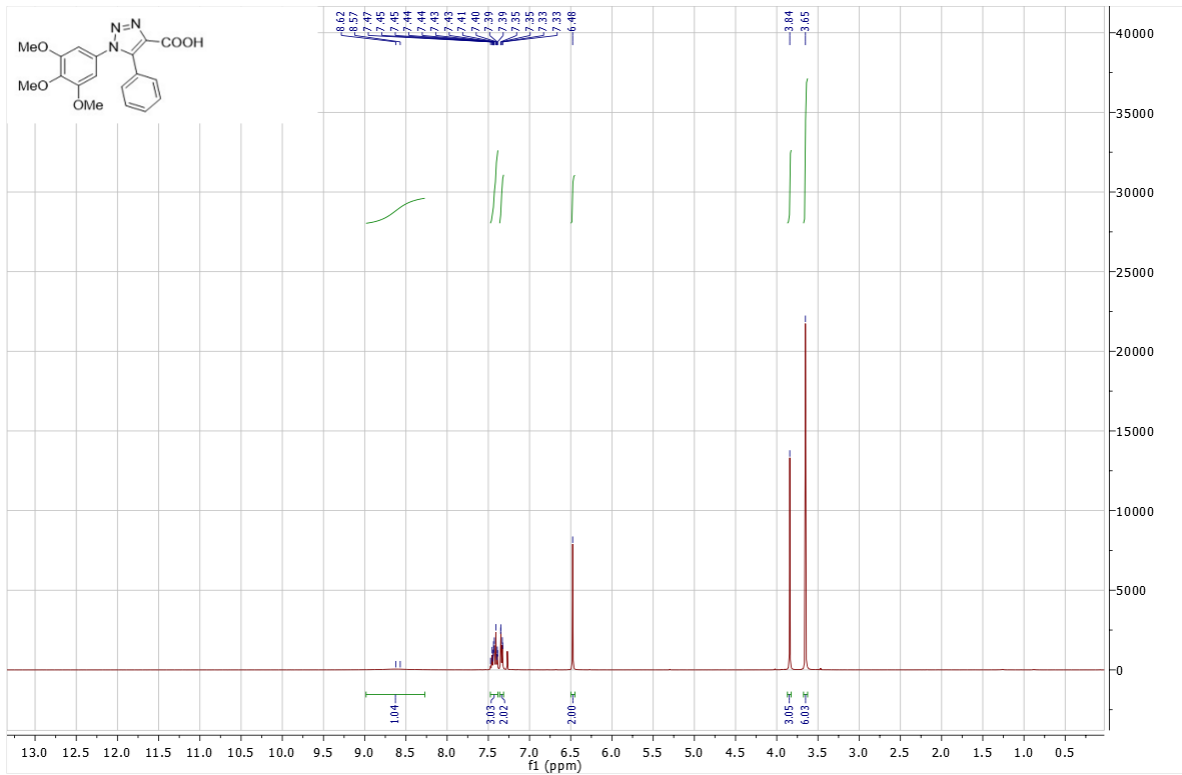
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylysyre **22** som hvite krystaller (53 %, 188 mg).

Data

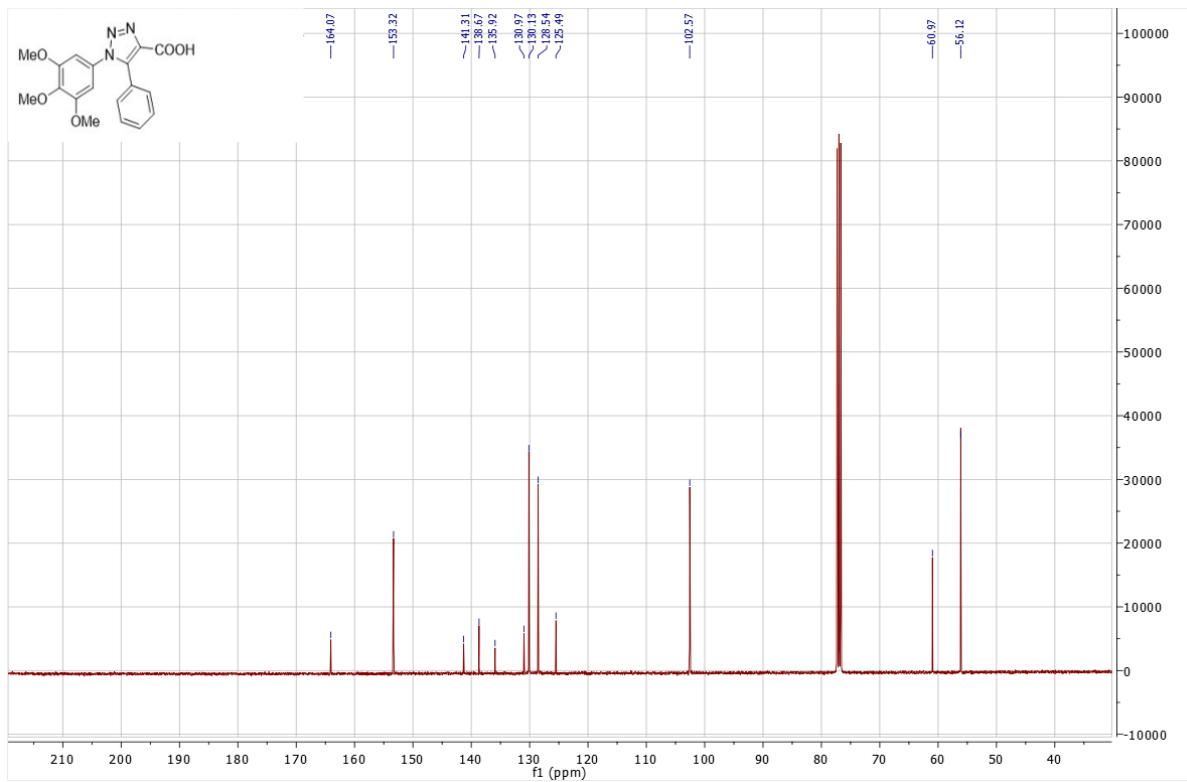
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.62 (s, 1H), 7.5-7.4 (m, 3H), 7.34 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 2H), 6.48 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.65 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.1, 153.3 (2C), 141.3, 138.7, 135.9, 131.0 (2C), 130.1, 128.5 (2C), 125.5, 102.6 (2C), 61.0, 56.1 (2C)

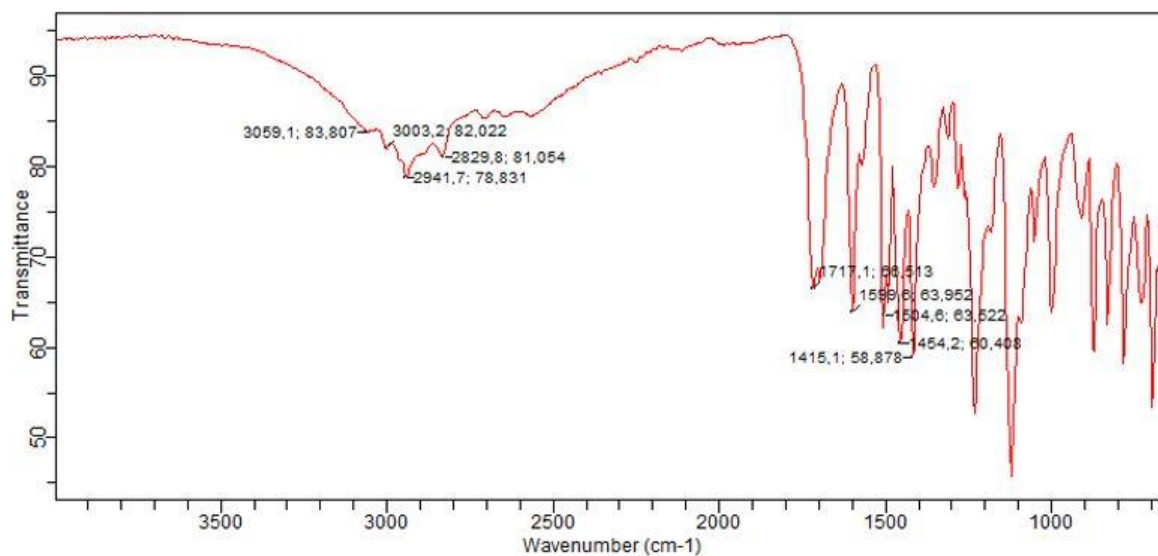
IR: 3059, 1717, 1599, 1566, 1504 cm⁻¹



Spekter 4.45 ^1H NMR-spekter av karboksylsyre 22.

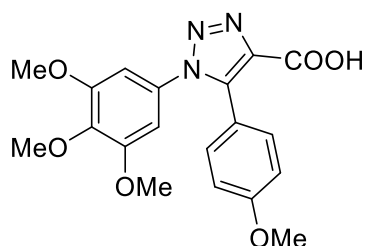


Spekter 4.46 ^{13}C NMR-spekter av karboksylsyre 22.



Spekter 4.47 IR-spekter av karboksylsyre **22**.

4.9.2 Syntese av 5-(4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



$C_{19}H_{19}N_3O_6$

Molekylvekt: 385,38 g/mol

Utbytte: 58%

Smp: 162°C

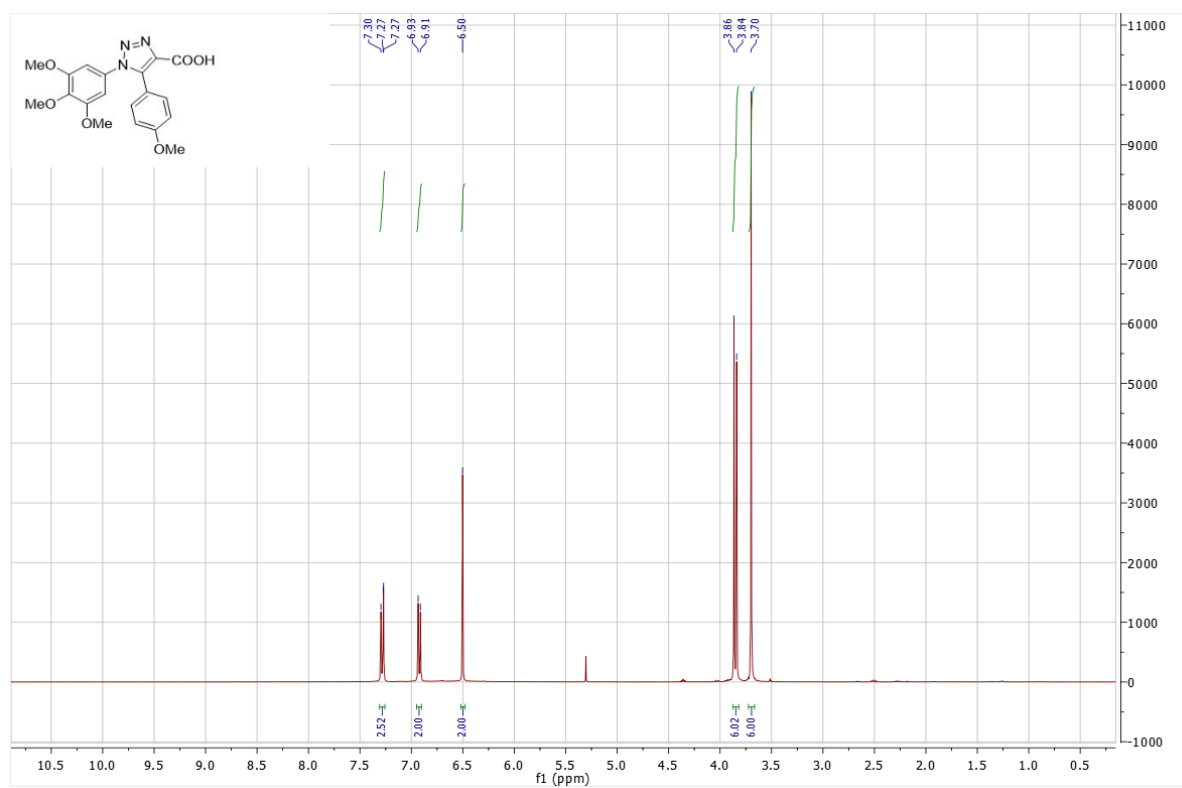
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylsyre **23** som hvite krystaller (58 %, 224 mg). Spektrale data fra 1H NMR er i overensstemmelse med publisert arbeid.⁹³

Data

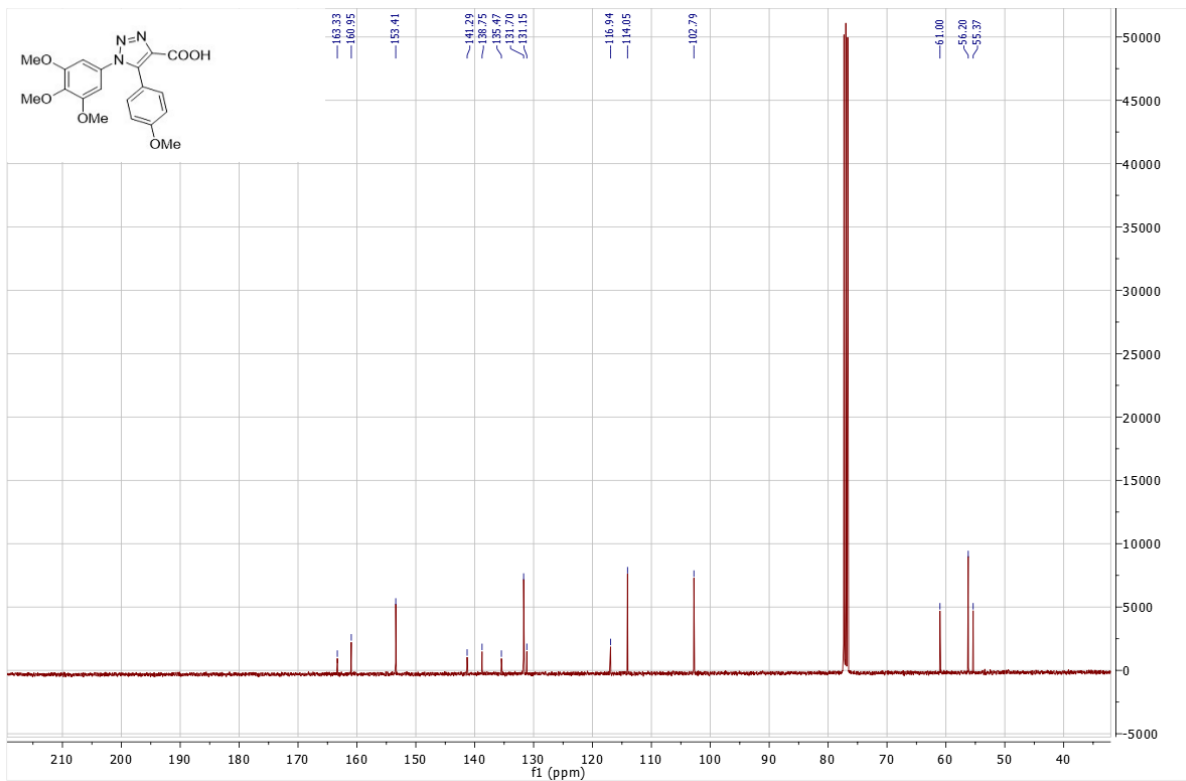
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.29 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 3.85 (d, $J = 10.1$ Hz, 6H), 3.70 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 163.3, 161.0, 153.4 (2C), 141.3, 138.8, 135.5, 131.7 (2C), 131.2, 116.9, 114.1 (2C), 102.8 (2C), 61.0, 56.2, 55.4

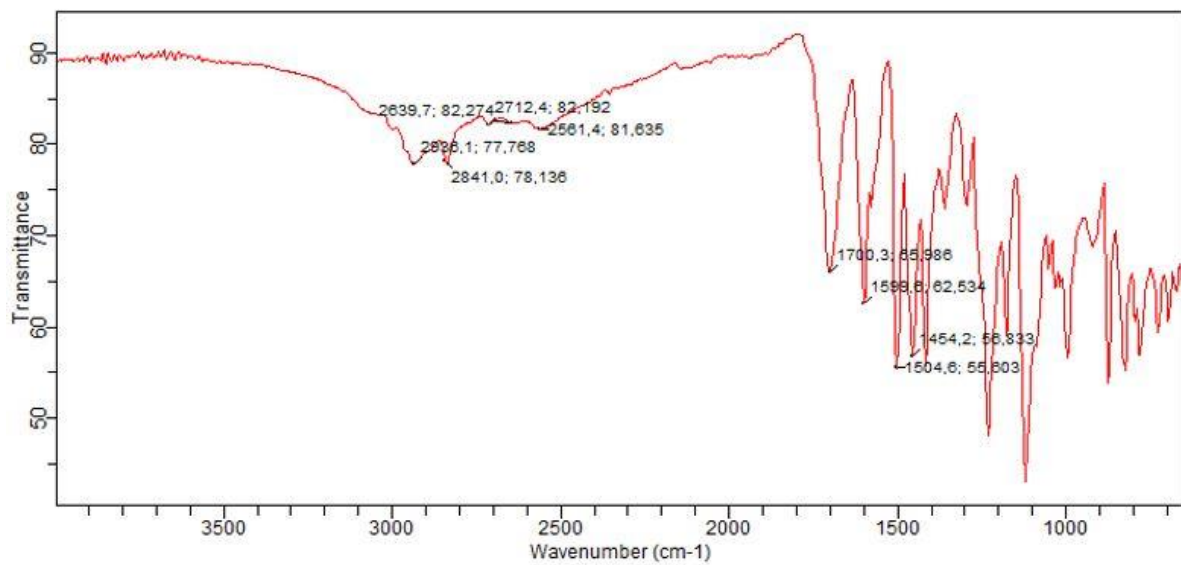
IR: 2936, 1700, 1598, 1565, 1504 cm^{-1}



Spekter 4.48 ^1H NMR-spekter av karboksylsyre **23**.

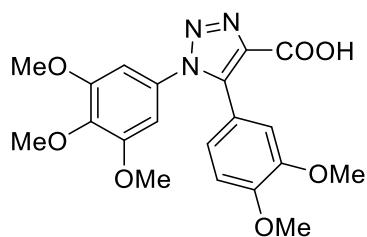


Spekter 4.49 ^{13}C NMR-spekter av karboksylsyre **23**.



Spekter 4.50 IR-spekter av karboksylsyre **23**.

4.9.3 Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre



$C_{20}H_{21}N_3O_7$

Molekylvekt: 415,14 g/mol

Utbytte: 74%

Smp: 191°C

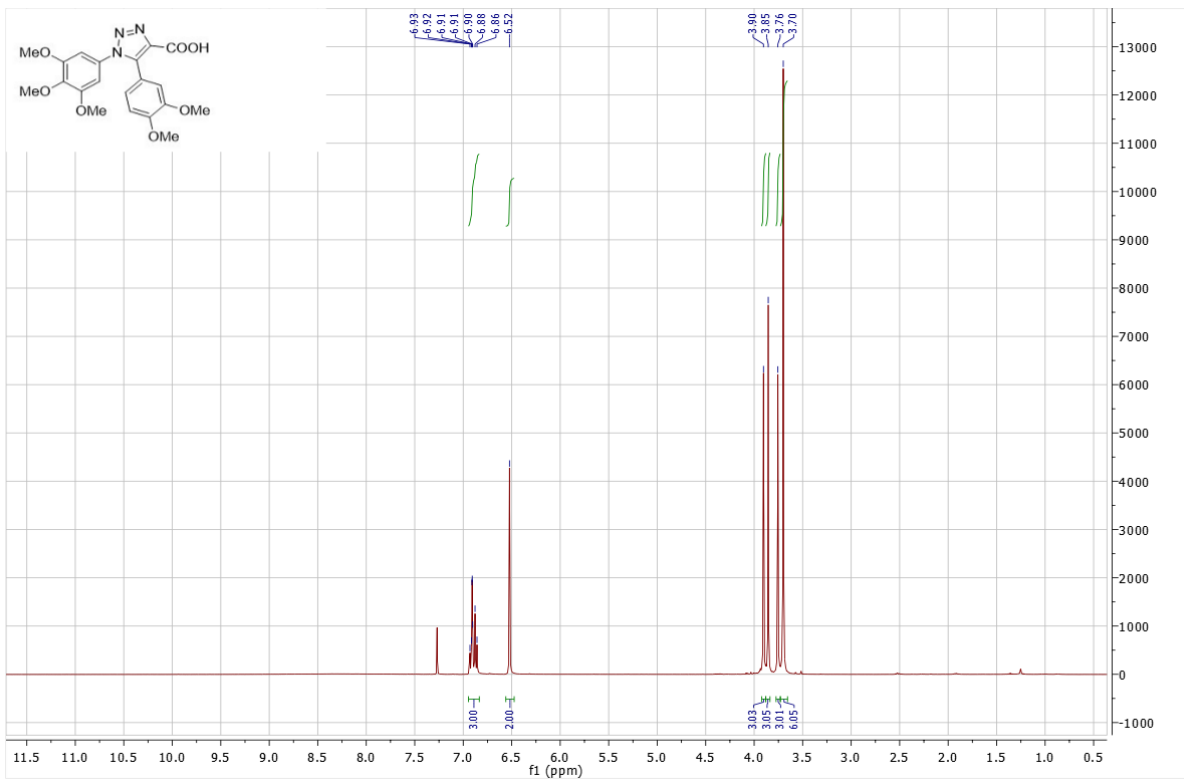
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylysyre **24** som hvite krystaller (74 %, 307 mg).

Data

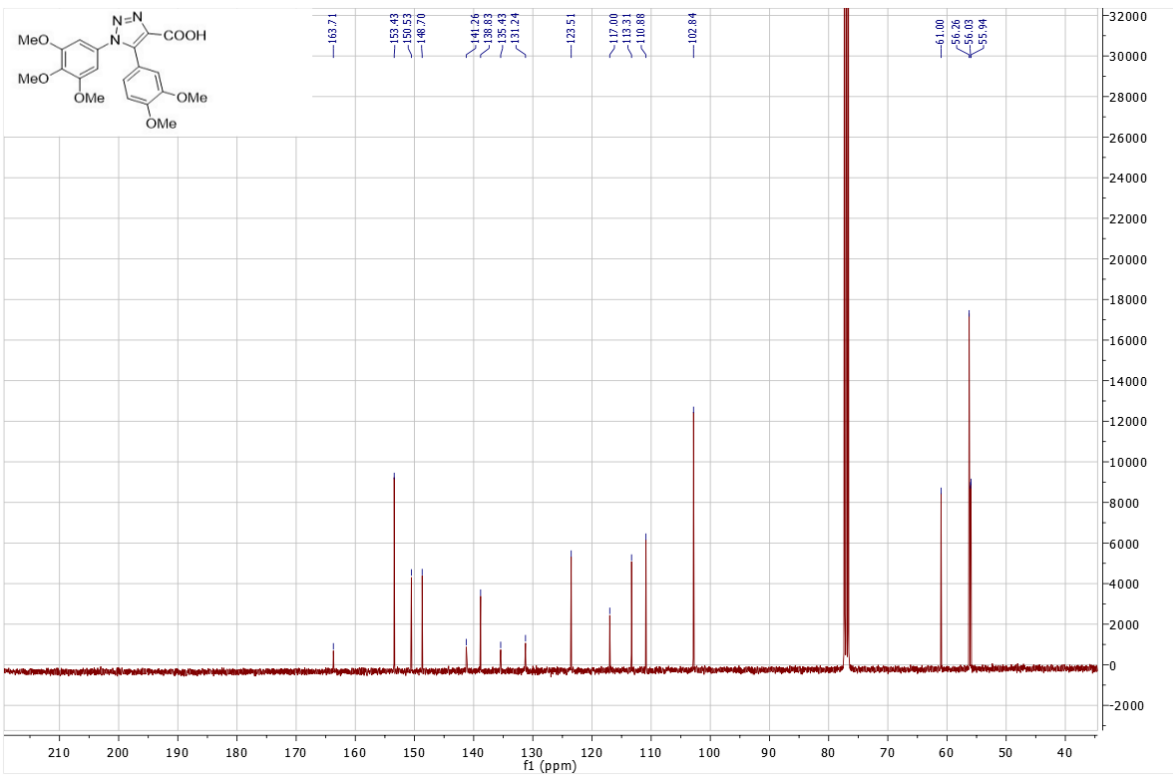
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.9-6.8 (m, 3H), 6.52 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 163.7, 153.4 (2C), 150.5, 148.7, 141.3, 138.8, 135.4, 131.2, 123.5, 117.0, 113.3, 110.9, 102.6 (2C), 61.0, 56.3 (2C), 56.0, 55.9

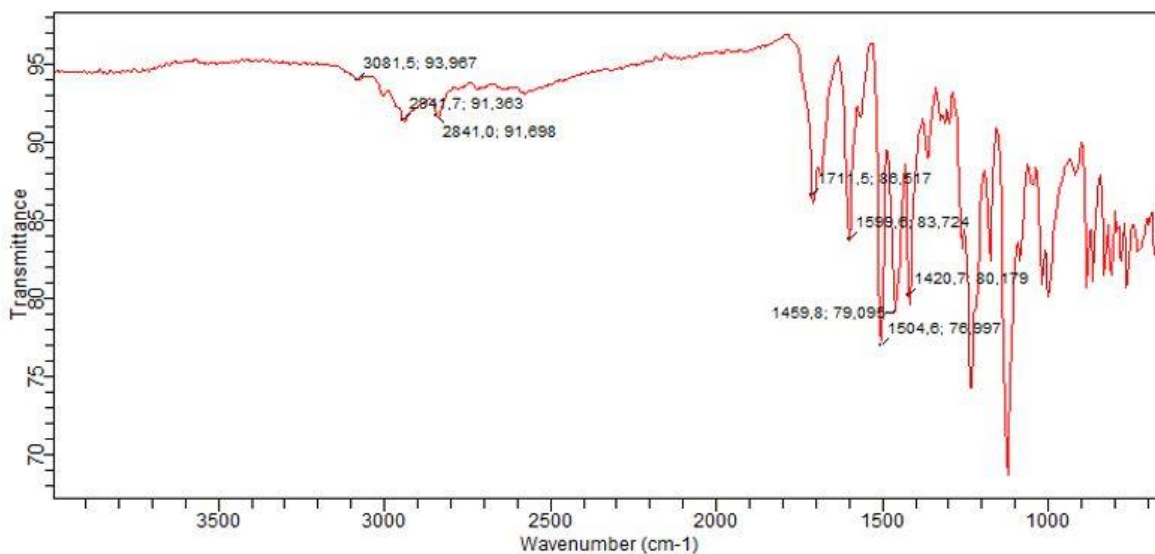
IR: 3081, 1711, 1599, 1588, 1504 cm^{-1}



Spekter 4.51 ^1H NMR-spekter av karboxylsyre **24**.

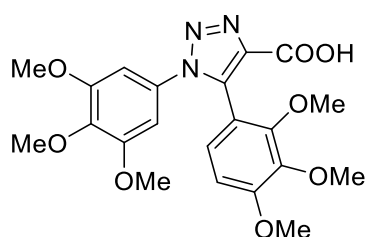


Spekter 4.52 ^{13}C NMR-spekter av karboxylsyre **24**.



Spekter 4.53 IR-spekter av karboksylsyre **24**.

4.9.4 Syntese av 5-(2,3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



$C_{21}H_{23}N_3O_8$

Molekylvekt: 445,15 g/mol

Utbytte: 94%

Smp: 180°C

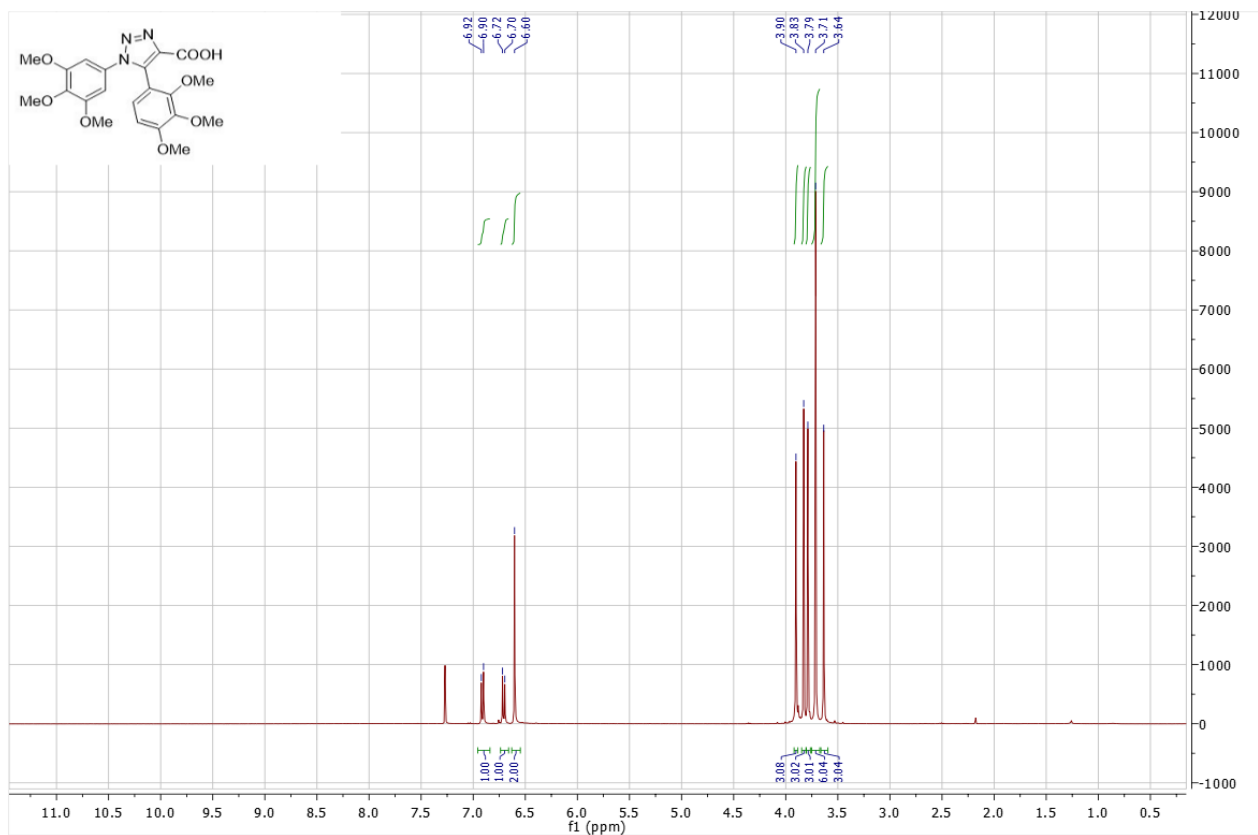
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylsyre **25** som hvite krystaller (94 %, 418 mg).

Data

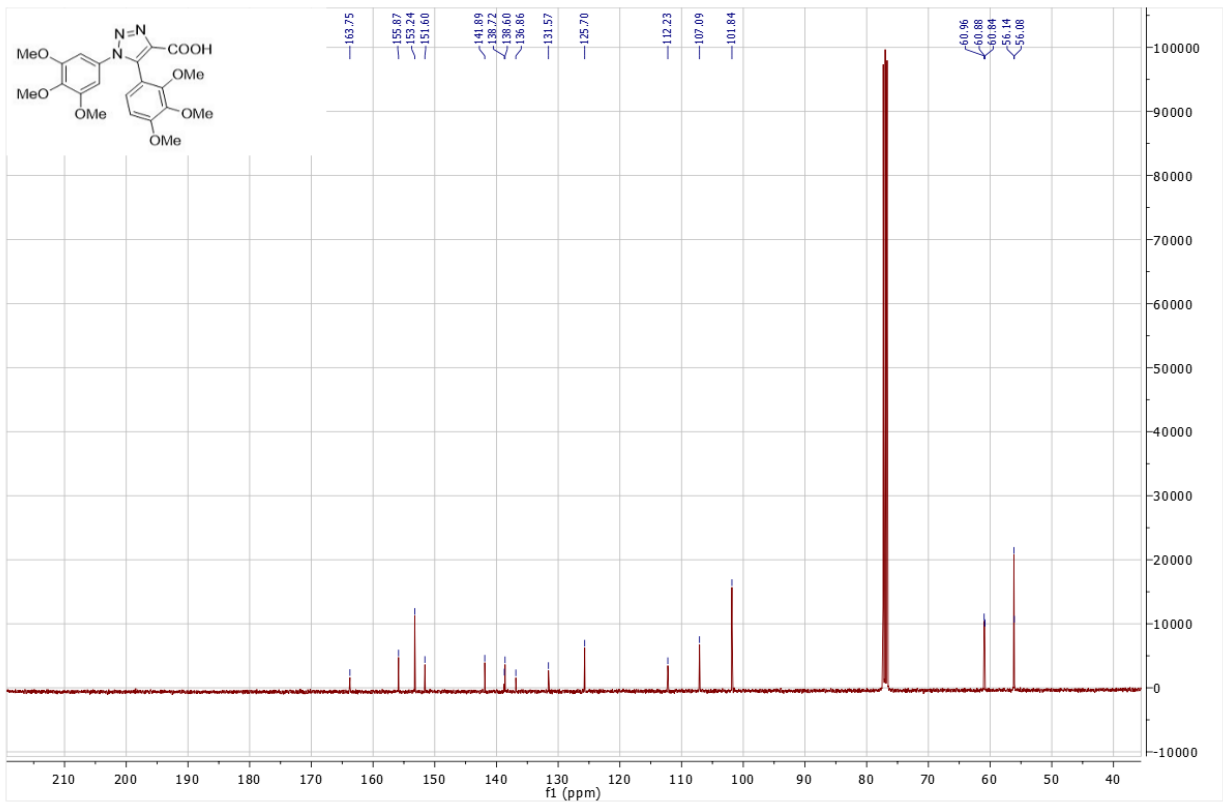
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.91 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 3.64 (s, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 163.8, 158.9, 153.2 (2C), 151.6, 141.9, 138.7, 138.6, 136.9, 131.6, 125.7, 112.2, 107.1, 101.8 (2C), 61.0, 60.9, 60.8, 56.1 (3C)

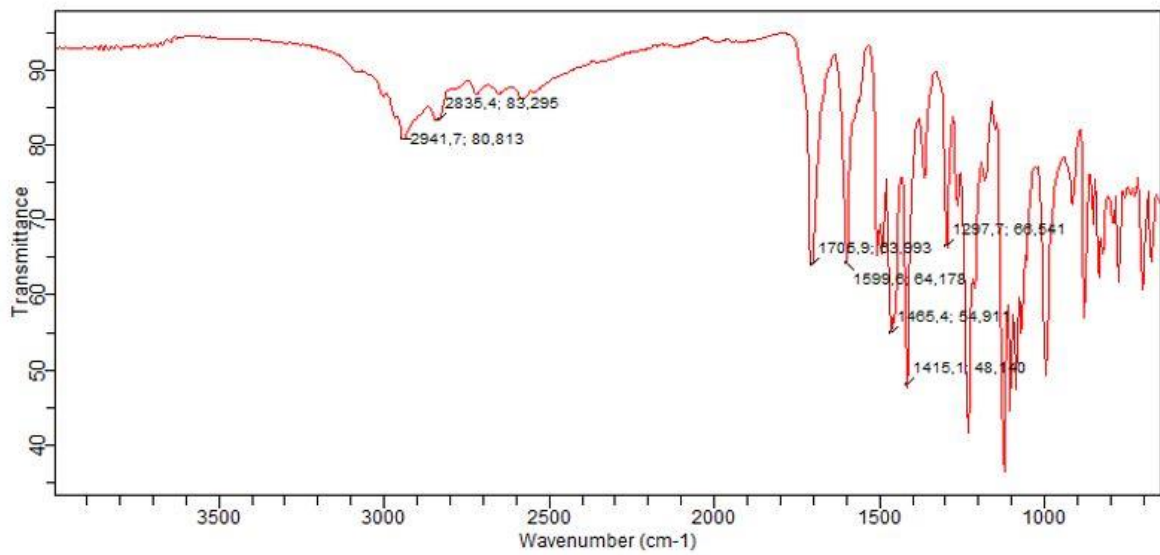
IR: 2941, 1706, 1599, 1563 cm⁻¹



Spekter 4.54 ¹H NMR-spekter av karboksylsyre 25.

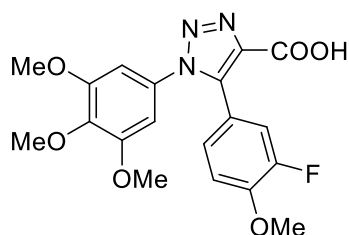


Spekter 4.55 ^{13}C NMR-spekter av karboksylsyre **25**.



Spekter 4.56 IR-spekter av karboksylsyre **25**.

4.9.5 Syntese av 5-(3-fluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylysyre



$C_{19}H_{18}FN_3O_6$

Molekylvekt: 403,12 g/mol

Utbytte: 43%

Smp: 175°C

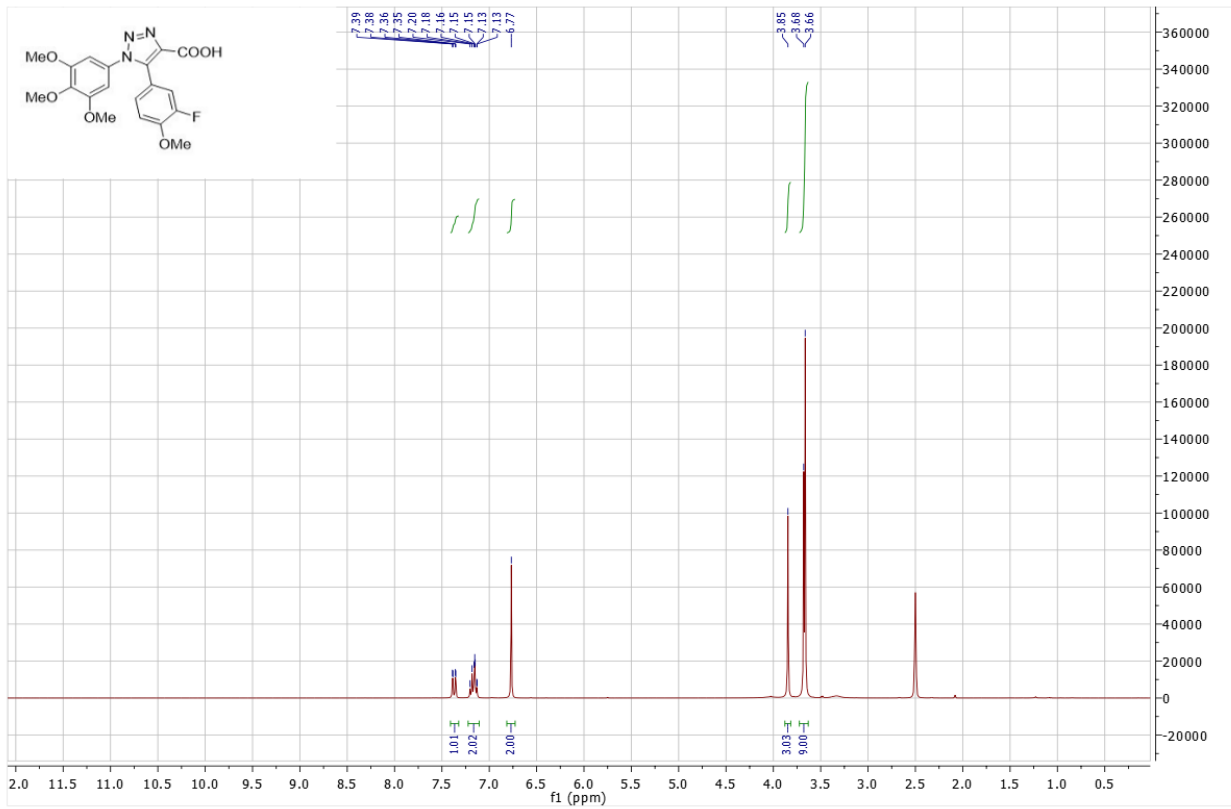
Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylysyre **26** som hvite krystaller (43 %, 173 mg).

Data

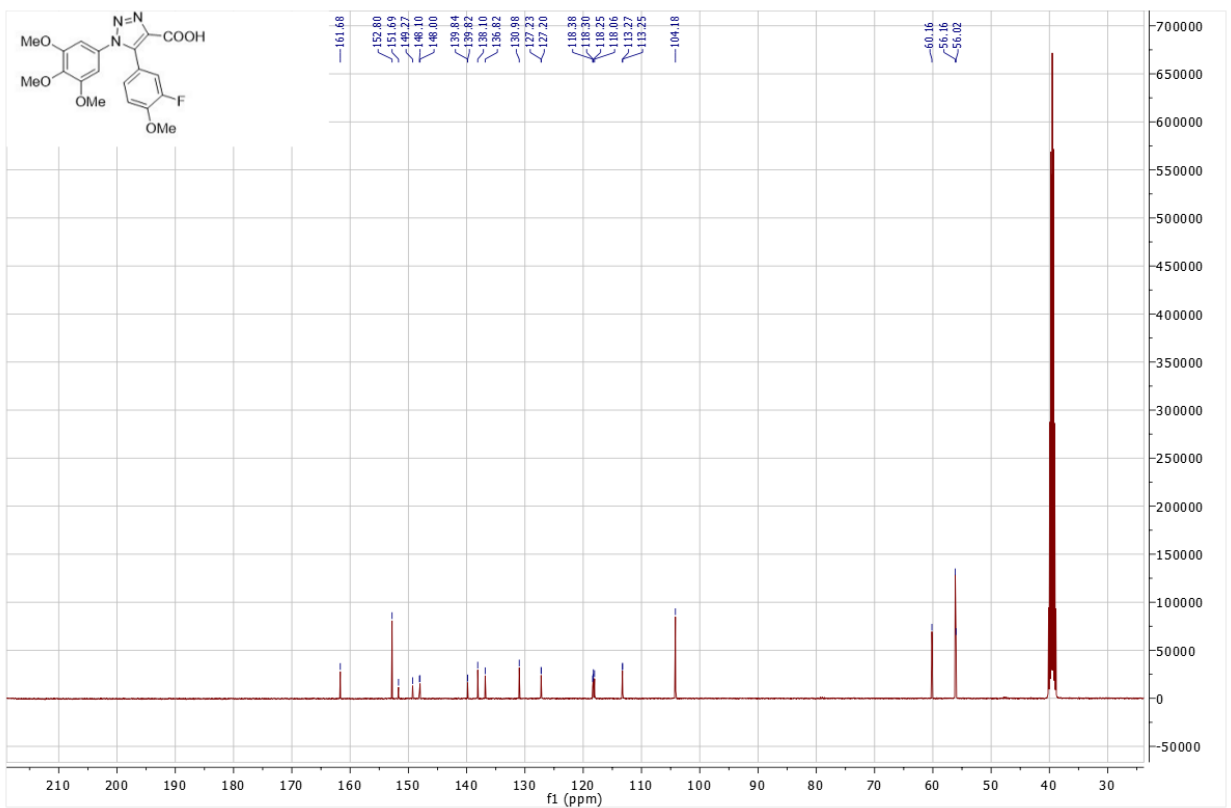
1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 7.37 (dd, $J = 12.2, 1.9$ Hz, 1H), 7.2-7.1 (m, 2H), 6.77 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.67 (d, $J = 6.3$ Hz, 9H)

^{13}C NMR (100MHz, DMSO- d_6): δ 161.7, 152.8 (2C), 151.7 ($^1J_{CF} = 244$ Hz), 149.3, 148.1, 139.8, 138.1, 136.8 131.0, 127.2, 118.4, 113.3, 104.2 (2C), 60.2, 56.2 (x 2), 56.0

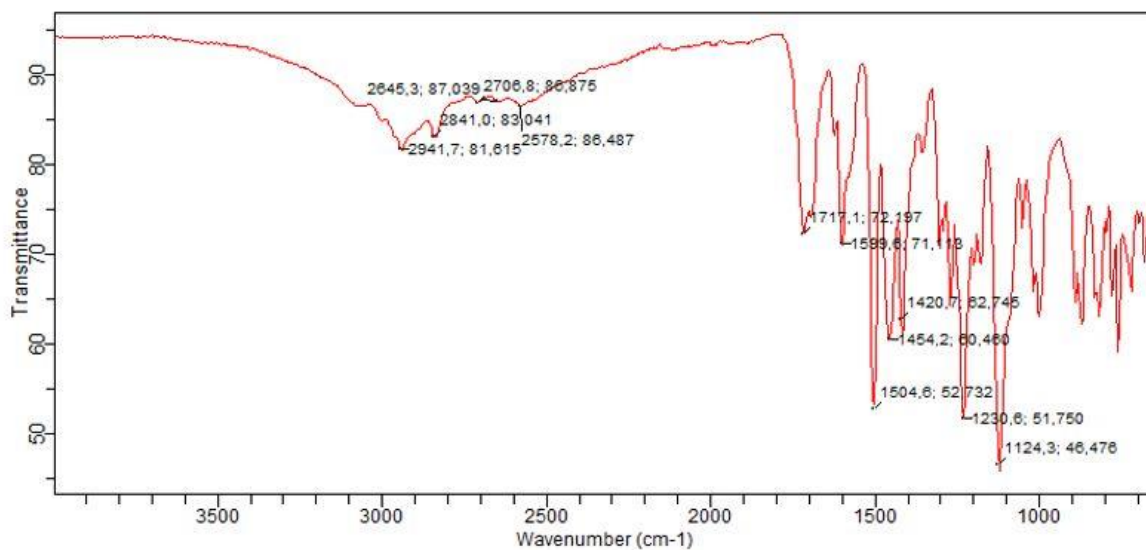
IR: 2941, 1717, 1599, 1504 cm^{-1}



Spekter 4.57 ^1H NMR-spekter av karboksylsyre **26**.

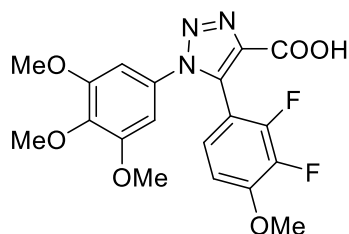


Spekter 4.58 ^{13}C NMR-spekter av karboksylsyre **26**.



Spekter 4.59 IR-spekter av karboksylsyre **26**.

4.9.6 Syntese av 5-(2,3-difluor-4-metoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylsyre



$C_{19}H_{17}F_2N_3O_6$

Molekylvekt: 421,11 g/mol

Utbytte: 52%

Smp: 120°C

Den generelle metoden ble benyttet til fremstilling av ren karboksylsyre **27** som hvite krystaller (52 %, 219 mg).

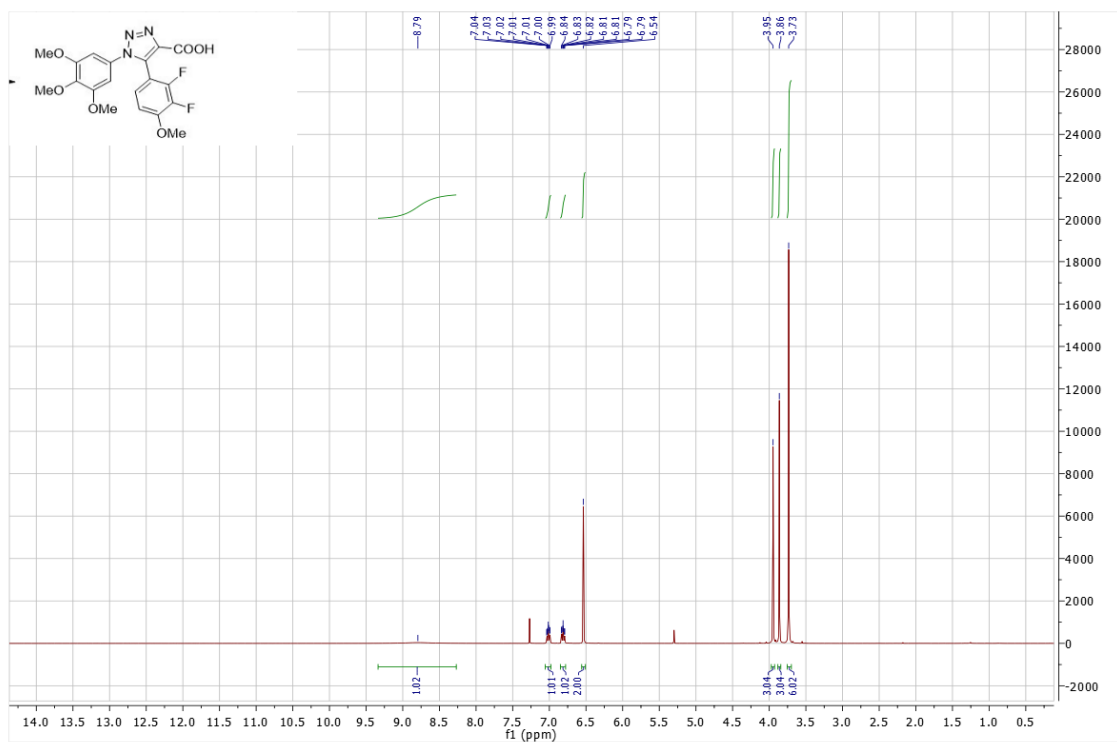
Data

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.79 (s, 1H), 7.01 (dt, $J = 9.2, 7.1, 2.2$ Hz, 1H), 6.81 (dt, $J = 9.0, 7.2, 1.7$ Hz, 1H), 6.54 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.73 (s, 6H)

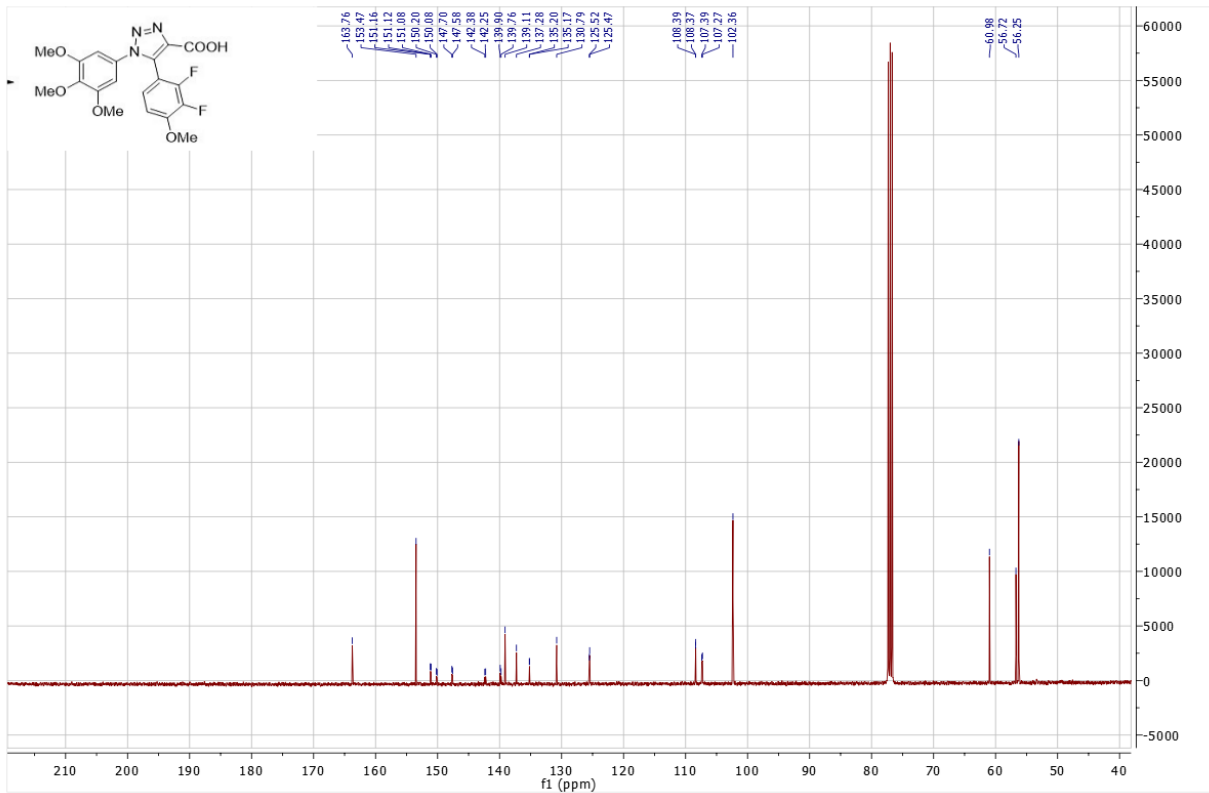
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 163.8, 153.5 (2C), 151.2 ($^2J_{CF} = 66$ Hz), 150.2 ($^1J_{CF} = 233$ Hz), 147.7, 142.4, 139.9 ($^1J_{CF} = 250$ Hz), 137.3, 135.2, 130.8, 125.5, 108.4, 102.4 (2C), 61.0,

56.7, 56.3 (2C)

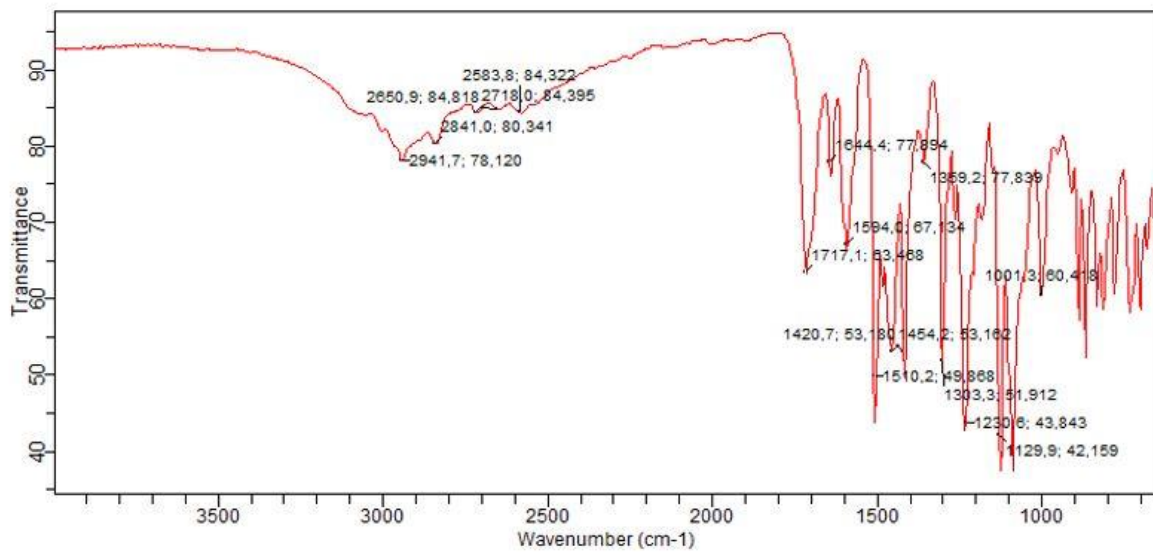
IR: 2941, 1717, 1594, 1583, 1510 cm^{-1}



Spekter 4.60 ^1H NMR-spekter av karboxylsyre 27.



Spekter 4.61 ¹³C NMR-spekter av karboxylsyre 27.



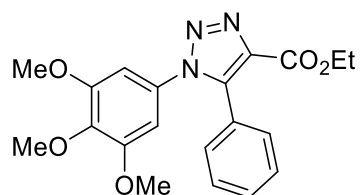
Spekter 4.62 IR-spekter av karboxylsyre 27.

4.10 Forsøk på syntese 1,4,5-trisubstituerte 1,2,3-triazoler

Det ble forsøkt å syntetisere karboksylat **71** og **73** etter metode fra Dehaen og medarbeidere.⁶¹

Til et oventørt mikrobølgeovnrør med magnet ble morfolinsalt (Morph:TsOH), aldehyd, etyl α -nitroacetat, 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylfenol (BHT) og 4Å molsiv tilsatt. Blandingen ble løst i toluen (0.2 mL) og rørt under N₂-atmosfære i 1 time på 100°C. Reaksjonen ble nedkjølt, før organisk azid ble tilsatt. Reaksjonsblanding stod 47-96 timer under N₂-atmosfære ved 100 °C. Råproduktet ble rensset med kolonnekromatografi med heksan/EtOAc (2:3) som skulle resultere i de korrespondernde 1,4,5-trisubstituerte-1,2,3-triazol-4-karboksylatene **71** og **73**.

4.10.1 Syntese av 5-fenyl-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



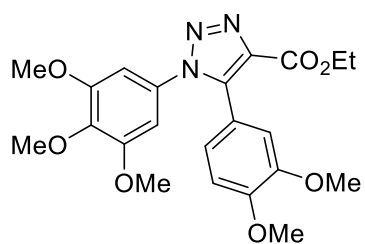
C₂₀H₂₁N₃O₅

Molekylvekt: 383,40 g/mol

Utbytte: -

Den generelle metoden ble benyttet til forsøk på fremstilling av rent karboksylat **71**. Det ble ikke observert endring på TLC etter endt reaksjon.

4.10.2 Syntese av 5-(3,4-dimetoksifenyl)-1-(3,4,5-trimetoksifenyl)-1,2,3-triazol-4-karboksylat



$C_{22}H_{25}N_3O_7$

Molekylvekt: 443,46 g/mol

Utbytte: -

Den generelle metoden ble benyttet til forsøk på fremstilling av rent karboksylat **73**. Det ble ikke observert endring på TLC under reaksjonstiden.

5 Referanser

- (1) Gordaliza, M. *Clinical and Translational Oncology* **2008**, *9*, 767.
- (2) Dawick, P. M. *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*; 3 ed.; John Wiley and Sons Ltd: West Sussex, United Kingdom, **2009**. 978-0-470-74168-9
- (3) Tan, D. G.; Doğanay, G. D.; Kolukırik, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, S88.
- (4) Lin, C. M.; Singh, S. B.; Chu, P. S.; Dempcy, R. O.; Schmidt, J. M.; Pettit, G. R.; Hamel, E. *Mol. Pharm.* **1988**, *34*.
- (5) Pettit, G.; Singh, S.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendal, D. *Experientia* **1989**, *45*, 209.
- (6) Cragg, G. M.; D.G.I.Kingston; Newman, D. J. *Anticancer Agents from Natural Products*; 2 ed.; CRC Press, **2011**. 9781439813829
- (7) Odlo, K. *Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-Triazole Analogues of Combretastatins A-4 and A-1*; Faculty of Mathematics and Natural Sciences: University of Oslo, **2010**.
- (8) Rappl, C.; Barbier, P.; Bourgarel-Rey, V.; Grégoire, C.; Gilli, R.; Carre, M.; Combes, S.; Finet, J.-P.; Peyrot, V. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9210.
- (9) Spence, R. A. H.; Johnston, P. *Oncology*; Oxford university press: New York, **2001**. 0-19-262982-4
- (10) Kristjansen, P. *Kræft-Hvad er det?*; Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck A/S: Viborg, **2001**. 87-17-06968-8
- (11) Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*; 2 ed.; Garland Science: New York, **2013**. 97808115342205
- (12) Bui, V.; Hudlicky, T.; Hansen, T. V.; Stenstrøm, Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*.
- (13) Odlo, K.; Klaveness, J.; Rongved, P.; Hansen, T. V. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1101.
- (14) Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943.
- (15) Shi, Q.; Chen, K.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H. *Curr. Pharm. Des.* **1998**, *4*, 219.
- (16) Kavallaris, M. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 194.
- (17) Alberts, D. S.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of The Cell*; 4 ed.; Garland Science: United Stats of America, **2002**. 0-8153-3218-1
- (18) Jordan, A.; Hadfield, J.; Lawrence, N.; McGown, A. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 259.
- (19) Odlo, K.; Fournier-Dit-Chabert, J.; Ducki, S.; Gani, O. A.; Sylte, I.; Hansen, T. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6874.
- (20) Cocco, G.; Chu, D.; Pandolfi, S. *Eur. J. Intern. Med.* **2010**, *21*, 503.
- (21) Siemann, D. W. *Vascular-targeted Therapies in Oncology*; John Wiley and Sons, Lt: Gainesville, Florida, USA, **2006**. 978-0-470-01294-3
- (22) Woods, J.; Hadfield, J. A.; Pettit, G.; Fox, B. W.; McGown, A. T. *Br. J. Cancer* **1995**, *71*, 705.
- (23) McGown, A. T.; Fox, B. W. *Cancer chemother. Pharmacol.* **1990**, *26*, 79.
- (24) Boehle, A. S.; Sipos, B.; Kliche, U.; Kalthoff, H.; Dohrmann, P. *Ann. Thorac. Surg.* **2001**, *71*, 1657.
- (25) Dziba, J. M.; Marcinek, R.; Venkataraman, G.; Robinson, J. A.; Ain, K. B. *Thyroid* **2002**, *12*, 1063.
- (26) Salmon, H. W.; Mladinich, C.; Siemann, D. W. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 3073.
- (27) Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1829.
- (28) Tozer, G. M.; Akerman, S.; Cross, N. A.; Barber, P. R.; Björndahl, M. A.; Greco, O.; Harris, S.; Hill, S. A.; Honess, D. J.; Ireson, C. R. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2301.
- (29) Adair, T. H.; Montani, J. P. *Angiogenesis*; Morgan and Claypool Life Sciences, **2010**; Vol. 2. 9781615043309
- (30) Baluk, P.; Hashizume, H.; McDonald, D. M. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 102.
- (31) Su, M.; Huang, J.; Liu, S.; Xiao, Y.; Qin, X.; Liu, J.; Pi, C.; Luo, T.; Li, J.; Chen, X. *Sci. Rep.*

2016, 6.

- (32) Shi, Y.-W.; Yuan, W.; Wang, X.; Gong, J.; Zhu, S.-X.; Chai, L.-L.; Qi, J.-L.; Qin, Y.-Y.; Gao, Y.; Zhou, Y.-L. *Sci. Rep.* **2016**, *6*.
- (33) Mateon Therapeutics. **2016**, <http://www.mateon.com/product-development/ca4/> 24.11 2016
- (34) Xu, X.-P.; Wu, X.-D.; Liang, G.-L.; Huang, W.-S.; Wang, L.; Jing, H.-Y.; Zhong, S.-L. *Pharmazie* **2012**, *67*, 529.
- (35) Siemann, D. W.; Chaplin, D. J.; Walicke, P. A. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 189.
- (36) Blay, J.-Y.; Pápai, Z.; Tolcher, A. W.; Italiano, A.; Cupissol, D.; López-Pousa, A.; Chawla, S. P.; Bompas, E.; Babovic, N.; Penel, N. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 531.
- (37) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; Chakraborti, A. K.; Lin, C. M.; Hamel, E. J. *Med. Chem.* **1991**, *34*, 2579.
- (38) Cushman, M.; Nagarathnam, D.; Gopal, D.; He, H. M.; Lin, C. M.; Hamel, E. J. *Med. Chem.* **1992**, *35*, 2293.
- (39) Chaudhary, V.; Venghateri, J. B.; Dhaked, H. P.; Bhoyar, A. S.; Guchhait, S. K.; Panda, D. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3439.
- (40) Hadfield, J. A.; Gaukroger, K.; Hirst, N.; Weston, A. P.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 529.
- (41) Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Peláez, R. *Bioorg. Med. Chem* **2009**, *17*, 6422.
- (42) Singh, R.; Kaur, H. *Synthesis* **2009**, *2009*, 2471.
- (43) Nam, N.-H.; Kim, Y.; You, Y.-J.; Hong, D.-H.; Kim, H.-M.; Ahn, B.-Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3073.
- (44) Sun, J.; Chen, L.; Liu, C.; Wang, Z.; Zuo, D.; Pan, J.; Qi, H.; Bao, K.; Wu, Y.; Zhang, W. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 1541.
- (45) Zhang, Q.; Peng, Y.; Wang, X. I.; Keenan, S. M.; Arora, S.; Welsh, W. J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 749.
- (46) Pettit, G. R.; Toki, B.; Herald, D. L.; Verdier-Pinard, P.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1688.
- (47) Assadieskandar, A.; Amini, M.; Ostad, S. N.; Riazi, G. H.; Cheraghi-Shavi, T.; Shafiei, B.; Shafiee, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2703.
- (48) Mahal, K.; Biersack, B.; Caysa, H.; Schobert, R.; Mueller, T. *Invest. New Drugs* **2015**, *33*, 541.
- (49) dos Santos, E. d. A.; Hamel, E.; Bai, R.; Burnett, J. C.; Tozatti, C. S. S.; Bogo, D.; Perdomo, R. T.; Antunes, A. M.; Marques, M. M.; de FC Matos, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4669.
- (50) Gurjar, M. K.; Wakharkar, R. D.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Borate, H. B.; Shinde, P. D.; Verma, R.; Rajendran, P.; Dutt, S.; Singh, G. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1744.
- (51) Sanna, V. K.; Jaggi, M.; Kumar, V.; Burman, A. C. *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 363.
- (52) Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *123*, 101.
- (53) Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3033.
- (54) Pinney, K. G.; Mejia, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2417.
- (55) Siles, R.; Ackley, J. F.; Hadimani, M. B.; Hall, J. J.; Mugabe, B. E.; Guddneppanavar, R.; Monk, K. A.; Chapuis, J.-C.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 313.
- (56) Höltje, H.; Sippel, W.; Rognan, D.; Folkers, G. *Molecular Modeling Basic Principles and Applications*; 2nd ed.; Wiley-VCH: Tyskland, **2003**. 3-527-30589-0
- (57) Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. *PCCP* **2010**, *12*, 12899.
- (58) Leach, A. R.; Shoichet, B. K.; Peishoff, C. E. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5851.
- (59) Singh, H.; Khanna, G.; Khurana, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2016**.

- (60) Costa, M. S.; Boechat, N.; Rangel, E. A.; Da Silva, F. d. C.; De Souza, A. M.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Junior, I. N.; Lourenço, M. C. S.; Wardell, S. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8644.
- (61) Dehaen, W.; Thomas, J.; John, J.; Parekh, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10155.
- (62) Dehaen, W.; Bakulev, V. A. *Chemistry of 1, 2, 3-triazoles*; Springer, **2015**. 978-3-319-07962-2
- (63) Khan, I. A.; Ahmad, M.; Aslam, S.; Jawwad, M.; Zahoor, F.; Naqvi, S. A. R.; Mansha, A. *Afinidad* **2015**, *72*.
- (64) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- (65) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1435.
- (66) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Synthesis: Reactions, Mechanisms and Structure*; 6 ed.; Wiley: New Jersey, **2006**. 978-0-471-72091-1
- (67) Trost, B. M.; Fleming, I. *Comprehensive organic synthesis*; Pergamon Press: Oxford, **1991**; Vol. 2. 978-0-08-040593-3
- (68) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 403.
- (69) Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- (70) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708.
- (71) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. rev.* **2008**, *108*, 2952.
- (72) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug discov. today* **2003**, *8*, 1128.
- (73) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688.
- (74) Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223.
- (75) Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5337.
- (76) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998.
- (77) Majireck, M. M.; Weinreb, S. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8680.
- (78) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923.
- (79) Krasinski, A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1237.
- (80) Ramachary, D. B.; Ramakumar, K.; Narayana, V. V. *Chem. Euro. J.* **2008**, *14*, 9143.
- (81) Danence, L. J. T.; Gao, Y.; Li, M.; Huang, Y.; Wang, J. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3584.
- (82) Odlo, K.; Hentzen, J.; dit Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A.; Sylte, I.; Skrede, M.; Flørenes, V. A.; Hansen, T. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4829.
- (83) Madadi, N. R.; Penthala, N. R.; Howk, K.; Ketkar, A.; Eoff, R. L.; Borrelli, M. J.; Crooks, P. A. *Euro. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 123.
- (84) Liu, J.; Gong, L.; Meggers, E. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 4653.
- (85) Gabrielsen, M.; Kurczab, R.; Siwek, A.; Wolak, M.; Ravna, A. W.; Kristiansen, K.; Kufareva, I.; Abagyan, R.; Nowak, G.; Chilmonecnyk, Z. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 933.
- (86) Abagyan, R.; Orry, A.; Raush, E.; Totrov, M. **2015** ICM-Pro User Guide v.3.8 <http://www.molsoft.com/icmpro/faq-docking.html#faq-pmf-score> 07.11 2016
- (87) Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315.
- (88) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Cragg, G. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3404.
- (89) Devkota, L.; Lin, C.-M.; Strecker, T. E.; Wang, Y.; Tidmore, J. K.; Chen, Z.; Guddneppanavar, R.; Jelinek, C. J.; Lopez, R.; Liu, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 938.
- (90) Blanco-Ania, D.; Hermkens, P. H.; Sliedregt, L. A.; Scheeren, H. W.; Rutjes, F. P. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5393.
- (91) Williams, D.; Fleming, I. *Spectroscopic methods in organic chemistry*; 6 ed.; McGraw-Hill Education: Berkshire, **2008**. 13 978-0-07-711812-9
- (92) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
- (93) Demchuk, D. V.; Samet, A. V.; Chernysheva, N. B.; Ushkarov, V. I.; Stashina, G. A.;

Konyushkin, L. D.; Raihstat, M. M.; Firgang, S. I.; Philchenkov, A. A.; Zavelevich, M. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 738.

(94) Protá, A. E.; Danel, F.; Bachmann, F.; Bargsten, K.; Buey, R. M.; Pohlmann, J.; Reinelt, S.; Lane, H.; Steinmetz, M. O. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1848.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway