

Karina Ervik

Syntetiske studier av chrysogeamide A og B

Masteroppgave i Farmasi

Veileder: Eirik Johansson Solum og Bjørg Siw Møller Tannæs

Juni 2020

Karina Ervik

Syntetiske studier av chrysogeamide A og B

Masteroppgave i Farmasi

Veileder: Eirik Johansson Solum og Bjørg Siw Møller Tannæs
Juni 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for medisin og helsevitenskap
Institutt for klinisk og molekylær medisin



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført som et samarbeid mellom Norges Teknisk-naturvitenskapelige Universitet og OsloMet – Storbyuniversitetet fra august 2019 til juni 2020. Laboratoriearbeid ble utført på farmasiutdanningen på OsloMet. Prosjektet ble veiledet av førsteamanuensis Eirik Johansson Solum (NTNU), og førsteamanuensis Bjørg Siw Møller Tannæs (OsloMet).

Jeg ønsker å takke Eirik Solum for å ha gitt meg mulighet til å arbeide med et så spennende prosjekt, og for å ha lagt til rette for god veiledning over Skype. Jeg ønsker også å takke Bjørg M. Tannæs for all veiledning på lab, tilrettelegging, motivasjonssamtaler, og utallige timer brukt for å hjelpe meg med prosjektet. Denne oppgaven hadde ikke vært mulig å gjennomføre uten hennes innsats og dyktighet. Jeg vil også takke kjemiingeniør Marius Landsverk for opplæring i analyseinstrumenter og bestilling av kjemikalier.

En spesiell takk må rettes til medstudent og labpartner Eivind Halvorsen Brenna for samarbeidet i prosjektet. Dagene på laboratoriet ville vært utholdelige uten hans tørre vitser og morsomheter. Sammen har vi møtt veggen opptil flere ganger, men vi har alltid støttet hverandre og løftet hverandre opp.

Jeg ønsker også å takke Professor Frode Rise og senioringeniør Dirk Petersen fra kjemisk institutt på Universitetet i Oslo for opplæring og veiledning i bruk av NMR, og for å ha gitt meg mulighet til å benytte meg av instrumentene.

Sist, men ikke minst, ønsker jeg å takke min familie og venner for å ha holdt ut med meg i dette perioden. Spesielt ønsker jeg å takke min samboer for å ha måttet takle mine dårlige ettermiddager etter mislykkede forsøk på laboratoriet, og for å ha støttet meg hele veien.

Våren 2020 ble ikke helt som forutsett da pandemien covid-19 brøt løs for alvor. 12. mars innførte regjeringen tiltak som førte til blant annet stengte universiteter, noe denne masteroppgaven bærer preg av. Det ble ikke mulig å gjennomføre full spekterdekning av syntetiserte forbindelser.

Sammendrag

En av de største utfordringene i dagens samfunn er utviklingen av antibiotikaresistens hos bakterier. For å forhindre at bakterielle infeksjoner blir like dødelig som før oppdagelsen av antibiotika er det helt avgjørende å utvikle nye typer antibiotika samtidig som bakterienes resistensmekanismer hemmes. Naturstoffer har tidligere vist seg å være viktig i utviklingen av nye antibiotika. Oppdagelse, identifisering, og testing av nye naturstoffer forskes derfor mye på. Målet for denne masteroppgaven var å syntetisere to nylig identifiserte naturstoffer fra den marine soppen *Penicillin chrysogenum* CHNSCLM-0003, chrysogeamide A og B. Det var ønskelig å teste disse forbindelsene på et bredt spekter av bakterier for å undersøke eventuell antibakteriell effekt.

Syntesen av målmolekylene besto av blant annet peptidsyntese av et pentapeptid, Negishi krysskobling, samt asymmetrisk syntese. Syntese av dipeptider ga høye utbytter, og det ble utarbeidet en prosedyre som ga kortere reaksjonstid og enklere opparbeidelse enn publisert i litteraturprosedyrer. Peptidsyntese av tetrapeptid og pentapeptid derimot viste seg å være utfordrende når det kom til rensing av produktet. Etter prøving og feiling ble det utviklet en metode som gjorde isolering av produktet enklere. I stedet for å benytte standard koblingsreagenser EDC, HOBt og DIPEA ble kun EDC og DIPEA benyttet.

Negishi krysskobling med Pd-PEPPSI-IPr viste seg å være en utfordring da sidereaksjoner som β -hydrid eliminering og homokobling var eneste produkter etter reaksjon. Variasjon i temperatur og mengde katalysator ga ingen endringer av resultatet. En alternativ syntesestrategi ble forsøkt for å syntetisere målmolekylene uten Negishi krysskobling. En sentral del av den nye strategien var asymmetrisk alkylering. Asymmetrisk alkylering har tidligere vist god stereoselektivitet, men reaksjonen ga ikke produkt. Videre tester viste også vanskeligheter med aminolyse som skulle koble pentapeptidet sammen med ikke-peptidfragmentene. Syntese av chrysogeamide A og B ble ikke fullført, og det gjenstår enda arbeid for å utvikle en syntesestrategi for forbindelsene.

Abstract

One of the greatest challenges the world is facing today is the development of bacteria that are resistant to antibiotics. To avoid bacterial infections becoming as deadly as they were before the discovery of antibiotics, it is crucial to develop new antibiotics and to stop the resistance mechanism in bacteria. Natural products have played a central role in the development of new antibiotics, and much of recent research has focused on the discovery, identification and testing of new natural products. The aim of this master thesis was to synthesize two newly identified natural products from the marine fungus *Penicillin chrysogenum* CHNSCLM-0003, chrysogeamide A and B. These compounds would then be tested on a wide range of bacteria in order to assess their antibiotic properties.

The synthesis of the target compounds consisted mainly of peptide synthesis, Negishi cross coupling and asymmetrical synthesis. Synthesis of dipeptides gave a high yield, which inspired the design of a procedure that shortened reaction time and simplified purification processes in comparison to methods shown in literature. The peptide synthesis of tetra- and pentapeptides proved to be challenging during the purification process, making isolating the product difficult. After a process of trial-and-error, it became evident that the reaction gave the best results without using the reagent HOBt, making it possible to isolate the product.

Negishi cross coupling using the Pd-PEPPSI-IPr complex only gave β -hydride elimination and homocoupled products. A variation in temperature or quantity of catalyst did not change this outcome, making the cross coupling a challenge. An alternative synthesis plan was therefore tried without the Negishi cross coupling. In the new plan, asymmetrical alkylation played an important role. Asymmetric alkylation would selectively give the chiral center needed, but the reaction failed. Further testing also revealed challenges with aminolyses connecting the peptide with the non-peptide fragment. Synthesis of chrysogeamide A and B was unsuccessful, making further research necessary in order to properly synthesize these compounds.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Symboler og forkortelser	VI
1. Bakgrunn og mål	1
2. Syntesestrategi og teori	3
2.1 Syntese av ikke-peptidfragmentene 8 og 9	5
2.2 Negishi krysskobling.....	7
2.2.1 Reaksjonsmekanisme	7
2.2.2 Ligander.....	8
2.3 Reduksjon med DIBAL-H.....	10
2.4 Asymmetrisk aldolreaksjon, «non-Evans» syn.....	11
2.4.1 Zimmerman-Traxler	11
2.4.2 «Nagao chelated transition state»	13
2.5 Asymmetrisk alkylering.....	16
2.6 Syntese av pentapeptidet 7 Gly-Val-Leu-Ala-Val-OMe	17
2.6.1 Peptidsyntese.....	18
2.7 Syntese av aminolyseproduktene 40 og 41	20
2.7.1 Aminolyse.....	20
3. Resultater og diskusjon	21
3.1 Negishi krysskobling.....	21
3.1.1 Forsøk på syntese av metyl (<i>S</i>)-2-metyloktanoat 22	21
3.1.2 Endring av syntesestrategi A	23
3.1.3 Krysskobling med benzylbromid.....	24
3.2 Reduksjon til (<i>R</i>)-3-brom-2-metylpropanal 43	25
3.3 Asymmetrisk aldolreaksjon.....	26
3.3.1 Acylering av (<i>R</i>)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl) etan-1-on.....	27
3.3.2 «Non-Evans» syn aldol	27
3.3.3 Bestemmelse av stereokjemi.....	29
3.4 Syntesevei B	30
3.5 Asymmetrisk alkylering.....	31
3.5.1 Acylering av (<i>R</i>)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)propan-1-on 20 og (<i>R</i>)-4-benzyl-3-propionylsazolidin-2-on 21	31
3.5.2 Forsøk på syntese av (<i>R</i>)-4-benzyl-3-((<i>S</i>)-2-metylheksanoyl)oksazolidin-2-on 31	31
3.5.3 Forsøk på syntese av (<i>S</i>)-1-((<i>R</i>)-4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)-2-metylheksan-1-on 29	32
3.5.4 Asymmetrisk alkylering med TiCl ₄ og DIPEA	33
3.6 Peptidsyntese	35
3.6.1 Syntese av dipeptidet Boc-Gly-Val-OMe 39	36
3.6.2 Syntese av tetrapeptidet Boc-Gly-Val-Leu-Ala-OMe 47	37
3.6.3 Peptidsyntese uten HOBt	37
3.6.4 Forbedring av prosedyre for avbeskyttelse av Boc.....	38

3.7	Syntesevei 2	41
3.8	Aminolysetest.....	42
3.9	Test av Steglich esterifisering	45
4.	Konklusjon	48
5.	Fremtidig arbeid.....	49
6.	Eksperimentell del.....	51
6.1.	Generelt	51
6.2.	Syntese av forbindelse 43 , (<i>R</i>)-3-brom-2-metylpropanal.....	52
6.3.	Syntese av forbindelse 17 , (<i>R</i>)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)etan-1-on	52
6.4.	Syntese av forbindelse 20 , (<i>R</i>)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)propan-1-on.....	53
6.5.	Syntese av forbindelse 21 , (<i>R</i>)-4-benzyl-3-propionyloksazolidin-2-on	54
6.6.	Syntese av forbindelse 44 , (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-((<i>R</i>)-4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)-5-brom-3-hydrokso-4-metylpentan-1-on.....	55
6.7.	Syntese av forbindelse 45a , (<i>R</i>)-1-((<i>R</i>)-4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)3-hydroksydekan-1-on	56
6.8.	Syntese av forbindelse 39 , Boc-Gly-Val-OMe	57
6.9.	Syntese av forbindelse 46 , Boc-Leu-Ala-OMe.....	57
6.10.	Syntese av forbindelse 47 , Boc-Gly-Val-Leu-Ala-OMe	58
6.11.	Syntese av forbindelse 55 , metyl acetyl- <i>L</i> -valinat.....	59
6.12.	Syntese av forbindelse 59 , oktan-2-yl(<i>tert</i> -butoksykarbonyl) glysinat	60
7.	Litteraturliste	61
	Vedlegg 1, NMR.....	I
	Vedlegg A, Forbindelse 43.....	II
	Vedlegg B, forbindelse 17	III
	Vedlegg C, forbindelse 20	IV
	Vedlegg D, forbindelse 21	V
	Vedlegg E, forbindelse 44	VI
	Vedlegg F, forbindelse 45a.....	XI
	Vedlegg F-2, forbindelse 45b	XII
	Vedlegg G, forbindelse 39	XV
	Vedlegg H, forbindelse 46	XVI
	Vedlegg I, forbindelse 47.....	XVII
	Vedlegg J, forbindelse 55.....	XVIII
	Vedlegg K, forbindelse 59	XIX
	Vedlegg 2, Poster.....	XX
	Synthesis of chrysogeamide- and scopularide A and B.....	XX

Symboler og forkortelser

Ala	Alanin
Boc	<i>Tert</i> -butyloksykarbonyl
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Kjemisk skift (ppm)
d	Dublett
dba	Dibenzylidenacetone
DCC	<i>N,N'</i> -disykloheksylkarbodiimid
dd	Dobbel dublett
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisoprotyletylamin
DMA	Dimetylacetamid
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	Dimetylformamid
DMI	1,3-dimetyl-2-midazolidin
Dppf	1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocene
dr	Diastereomeric ratio
EDC	1-Etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid
Et	Etyl
<i>et al.</i>	Og andre
EtOAc	Etylacetat
Eq.	Ekvivalent
FDPP	Pentafluorfenyl difenylfosfinat
g	Gram
GC-FID	Gasskromatografi - flammeionisasjonsdetektor
GC-MS	Gasskromatografi - massespektrometri
Gly	Glysin
HATU	1-[Bis(dimetylamino)metylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oksid heksafluorfosfat
HBTU	3-[Bis(dimetylamino)metyliumyl]-3 <i>H</i> -benzotriazol-1-oksid heksafluorfosfat
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HOAt	1-Hydroksy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroksybenzotriazol
HPLC	Høypresisjonsvæskeskromatografi
HSQC	Heteronuclear singel quantum coherence spectroscopy
Hz	Hertz
<i>J</i>	Koblingskonstant (Hz)
L	Liter
LAH	Litium aluminium hydrid
Leu	Leusin
m	Multiplett
M	Metall
M	Molar
Me	Metyl
mmol	millimol
NaHMDS	Natrium bis (trimetylsilyl) amin

NHC	<i>N</i> -heterosyklisk karbon
NMM	4-metylmorfolin
NMO	4-metylmorfolin-4-oksidi
NMP	1-metyl-2-pyrrolidinon
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butyllitium
Pd-PEPPSI-IPr	Palladium - pyridin-sterket prekatylst, forberedelse, stabilisering, og initiering - isopropyl
Ph	Fenyl
Phe	Fenylalanin
PMA	Phosphomolybdic acid
ppm	Parts per million
R_f	Retensjonsfaktor
r.t	Romtemperatur
s	Singlett
t	Triplett
TBS	<i>tert</i> -Butyldimetylsilyl
TFA	Trifluoreddiksyre
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tynnsljikt-kromatografi
TPAP	Tetrapropylammonium perrutenat
UV	Ultrafiolett
Val	Valin
X	Halogen
$^1\text{H-NMR}$	Proton kjernemagnetisk resonans
$^{13}\text{C-NMR}$	Karbon kjernemagnetisk resonans
°C	Grader celsius

1. Bakgrunn og mål

I tiden før antibiotika ble oppdaget var bakterielle infeksjoner den tilstanden som krevde flest menneskeliv. Dette kom av at det ikke fantes noen kur mot bakterielle infeksjoner, så et infisert sår kunne i verste fall være dødelig. Ved en tilfeldighet ble *Penicillinet* oppdaget i 1928 av den britiske forskeren Fleming. Det skulle likevel ta mange flere år før man klarte å oppkonsentrere *Penicillin* i store nok mengder til at det kunne brukes i behandling av pasienter. Den første dokumenterte bruken av *Penicillin* hos en pasient var i 1941, og det var i årene etter dette at *Penicillin* ble allment kjent som et mirakel. Det ble syntetisert mange ulike typer antibiotika i årene som fulgte, slik at det ble mulig å behandle både gramnegative og grampositive bakterielle infeksjoner. Dette var et stort skritt i medisinsk historie, og førte til at mange pasienter som før ville dødd av infeksjoner nå overlevde. Antibiotikas gullalder stoppet midlertidig opp på midten av 1960-tallet, og nesten alle typer antibiotika som benyttes i dag er oppdaget før 1970. Utfordringen i dag er en stadig økende antibiotikaresistens som fører til at de ulike typene antibiotika mot bakterielle infeksjoner ikke vil være effektive i fremtiden. For å unngå at bakterielle infeksjoner igjen blir dødelig er effektive antibiotika en nødvendighet. Å forhindre resistensutviklingen samfunnet står overfor i dag er mulig ved å hemme resistensmekanismene, samtidig som nye og effektive antibiotika må lages.¹



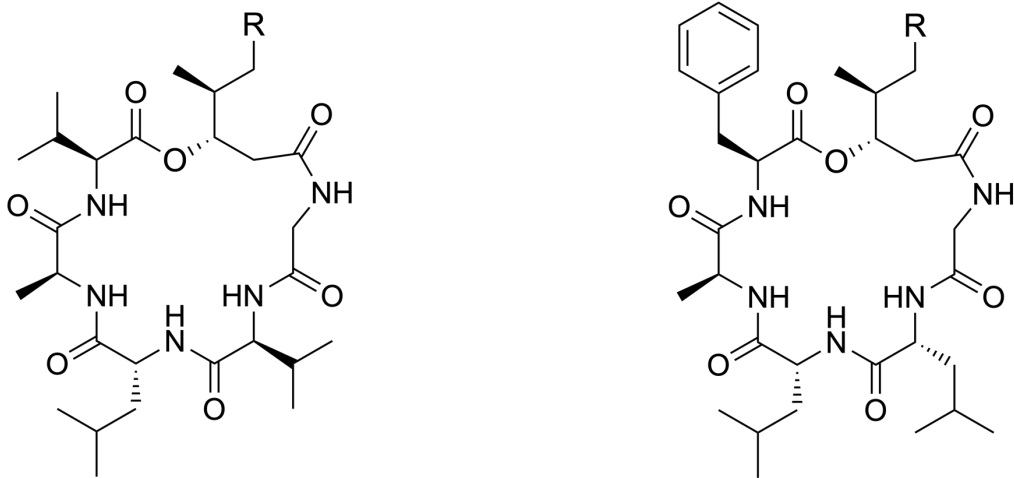
Figur 1.1: I 1945 fikk A. Fleming, H. Florey og E. Chain nobelprisen i fysiologi eller medisin for oppdagelsen av *Penicillinet*.¹

Naturstoffer er substanser som er isolert fra levende organismer som sopp, bakterier eller andre mikroorganismer. Marine sopper er verdifulle kilder til naturstoffer, og det er funnet mer enn 1000 ulike derivater som er farmakologisk aktive. De farmakologisk aktive derivatene har vist toksisk effekt mot bakterier, virus, sopp og kreft.² Soppen *Penicillin* har over 200 arter i det marine økosystemet, og enda er mange ikke identifiserte. Over 660 ulike substanser er identifisert fra den marine *Penicillin* slekten, der flere har spilt en viktig rolle for behandling av blant annet kreft. Det er derfor stort potensiale for at det finnes flere substanser produsert av *Penicillin*-arten som kan ha en viktig farmakologisk rolle.³ Nylig ble flere nye forbindelser oppdaget, isolert og

identifisert fra marin *Penicillin chrysogenum* CHNSCLM-0003, chrysogeamide A-G, nodupetide og scopularide A og B.³

Fellesnevneren for disse forbindelsene er at de er sykliske og består av ulike aminosyrer i tillegg til et fragment bestående av en ester og karbonkjeder av ulike lengder.

Forbindelsene chrysogeamide A og B består av fem aminosyrer; Glysin, D-Leusin, L-alanin, og to L-valin. De har blitt testet på sebrafiskembryoer, og vist tegn til å fremme angiogenese i embryoene sammenlignet med kontrollprøven. De viste ingen åpenbar toksisk effekt på embryoene. Chrysogeamide A og B er også testet på et utvalg bakterier og virus uten å ha vist noen umiddelbar effekt alene. Målet med denne masteroppgaven var å syntetisere chrysogeamide A og B, og teste deres effekt på et bredt spekter av bakterier som enda ikke er blitt undersøkt. Figur 1.2 viser en oversikt over noen av forbindelsene som ble identifisert.³



Chrysogeamide A (1) R = $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$
Chrysogeamide B (2) R = $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
Nodupetide (3) R = CH_3

Chrysogeamide C (4) R = $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
Chrysogeamide D (5) R = CH_3
Chrysogeamide E (6) R = $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

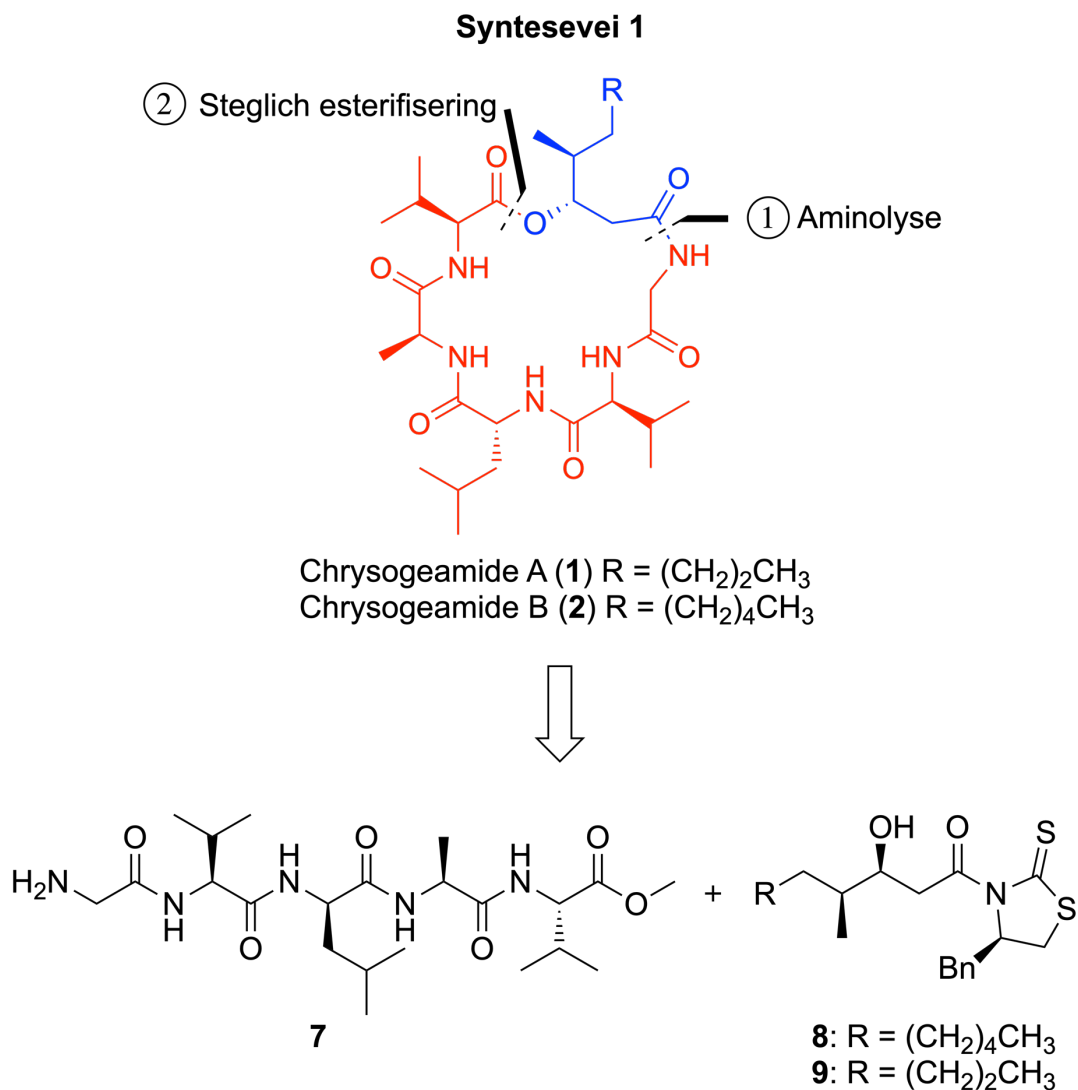
Figur 1.2: Noen av forbindelsene som ble identifisert fra *Penicillin chrysogenum* CHNSCLM-0003.

2. Syntesestrategi og teori

Strukturene til chrysogeamide A og B kan deles inn i to hoveddeler, fem aminosyrer (rød), og et ikke-peptidfragment (blå), se figur 2.1. Det vil bli presentert to ulike retrosyntetiske analyser for hvordan målmolekylene kan brytes ned til passende byggesteiner.

Syntesevei 1:

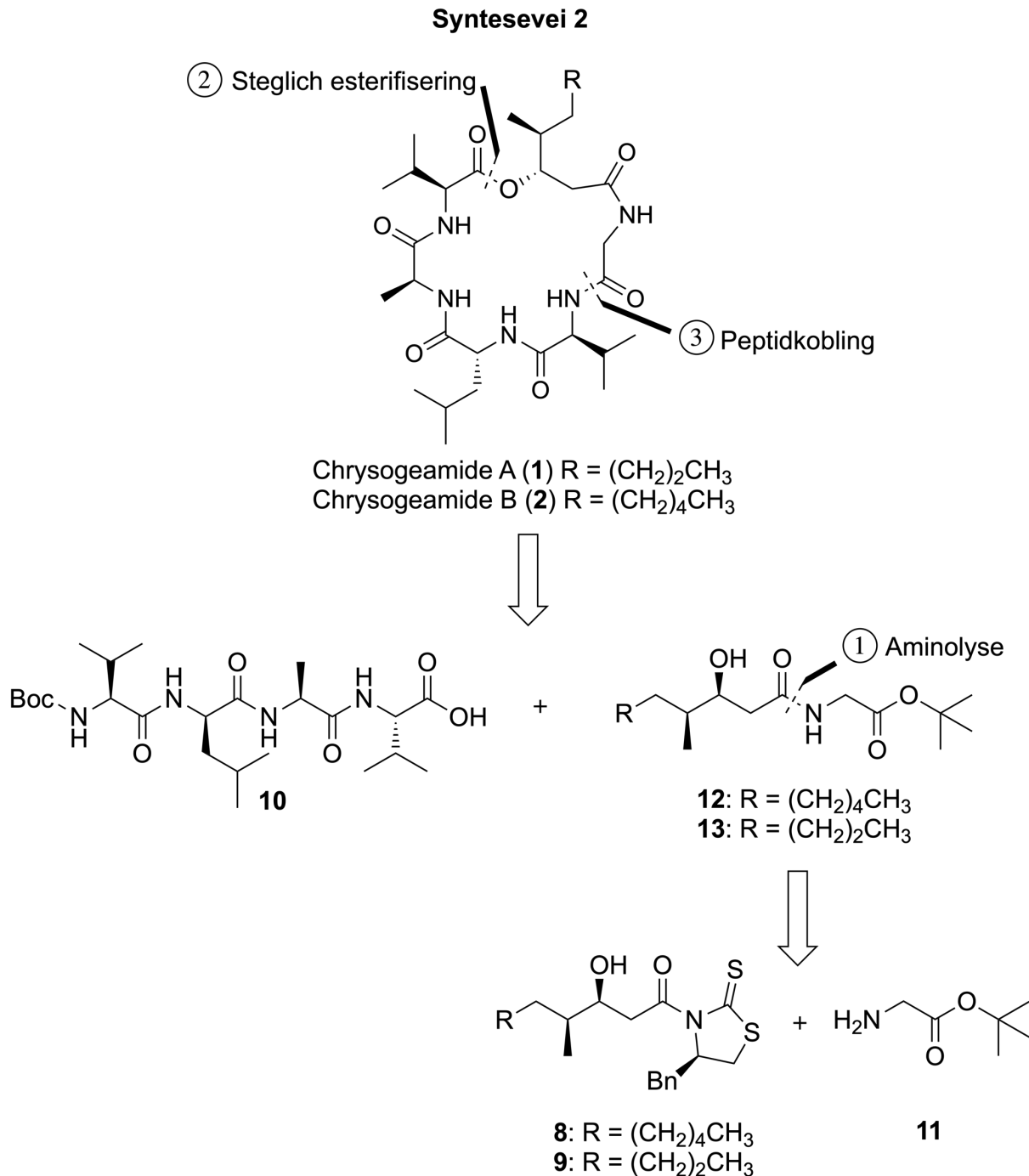
Syntesevei 1 gir ikke-peptidfragmentene **8** og **9**, og pentapeptidet **7** som passende byggesteiner, vist i figur 2.1. Disse forbindelsene kan syntetiseres parallelt. Ved å syntetisere pentapeptidet **7** og ikke-peptidfragmentene **8** og **9** samtidig kan de to komponentene kobles sammen og sykliseres ved henholdsvis ① aminolyse⁴ og ② Steglich esterifisering⁵. Aminolyse vil føre til dannelse av amid mellom glysin på pentapeptidet og ketonet på ikke-peptidfragmentet. Makrosyklisering med Steglich esterifisering vil danne en ester mellom hydroksylgruppen og karboksylsyreren på valin med DMAP og DCC som koblingsreagenser.



Figur 2.1: Retrosyntetisk analyse med pentapeptid **7** og ikke-peptidfragmentene **8** og **9**.

Syntesevei 2:

Figur 2.2 presenterer en retrosyntetisk analyse av mål molekylene der rekkefølgen på sykliseringen er noe annerledes enn i syntesevei 1. Til forskjell fra syntesevei 1 vil ① aminolyse kun være mellom ikke-peptidfragmentene **8** og **9**, og glysin *t*-butylester **11**. Dette vil gi aminolyseproduktene **12** og **13**. Parallelt med syntese av forbindelse **12** og **13** vil tetrapeptid **10** syntetiseres ved standard peptidsyntese i løsning. Tetrapeptid **10** vil bli koblet på aminolyseproduktene **12/13** ved ② Steglich esterifisering. TFA vil fjerne Boc og *t*-butylgruppen på glysin før makrosyklisering ved ③ peptidsyntese gir mål molekylene med FDPP og DIPEA som koblingsreagenser.



Figur 2.2: Retrosyntetisk analyse av mål molekylene med peptidsyntese som siste trinn.

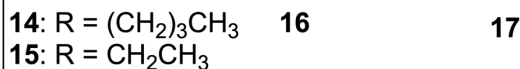
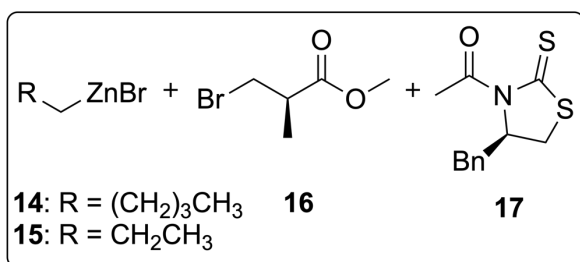
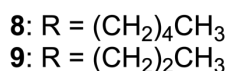
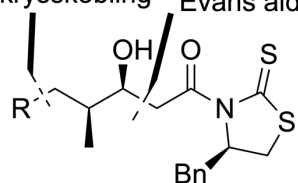
Syntesevei 1 (figur 2.1 side 3) består av to trinn, mens syntesevei 2 (figur 2.2 side 4) består av tre trinn. Det ble besluttet å følge synteseveien presentert i syntesevei 1 da færrest syntesetrinn ofte resulterer i høyest totalt utbytte.

2.1 Syntese av ikke-peptidfragmentene **8** og **9**

Det finnes flere strategier for å syntetisere forbindelse **8** og **9**. Figur 2.3 presenterer to ulike retrosyntetiske analyser. Syntesevei A deler ikke-peptidfragmentene i tre ulike deler som gir forbindelsene **14/15**, **16** og **17** som passende byggesteiner. Forbindelse **16** og **14/15** kan kobles sammen ved sp^3 - sp^3 Negishi krysskobling før esteren reduseres til aldehyd og kobles med forbindelse **17** i «non-Evans» syn aldolreaksjon. Syntesevei B bryter også ikke-peptidfragmentene ned til tre deler, forbindelse **18/19**, **20/21** og **17**. Forbindelse **18/19** kobles på forbindelse **20/21** under asymmetrisk alkylering før reduksjon gir aldehydet som kan kobles med forbindelse **17** i en «non-Evans» syn aldolreaksjon.

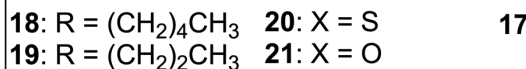
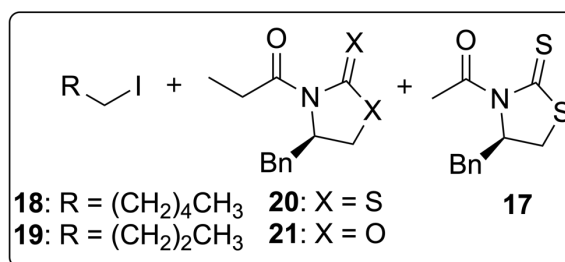
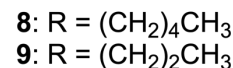
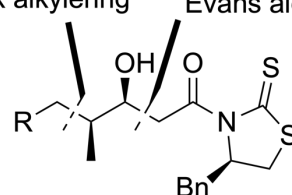
Syntesevei A

Negishi krysskobling Evans aldol



Syntesevei B

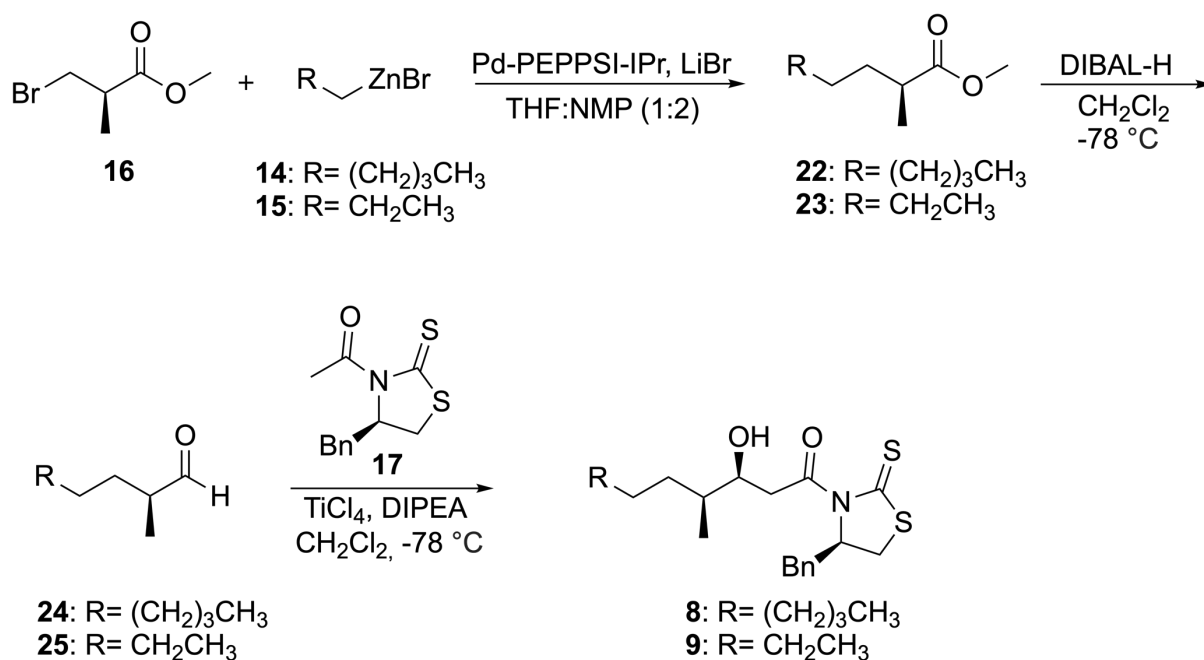
Asymmetrisk alkylering Evans aldol



Figur 2.3: Retrosyntetiske analyser av ikke-peptidfragmentene **8** og **9**.

Syntesevei A:

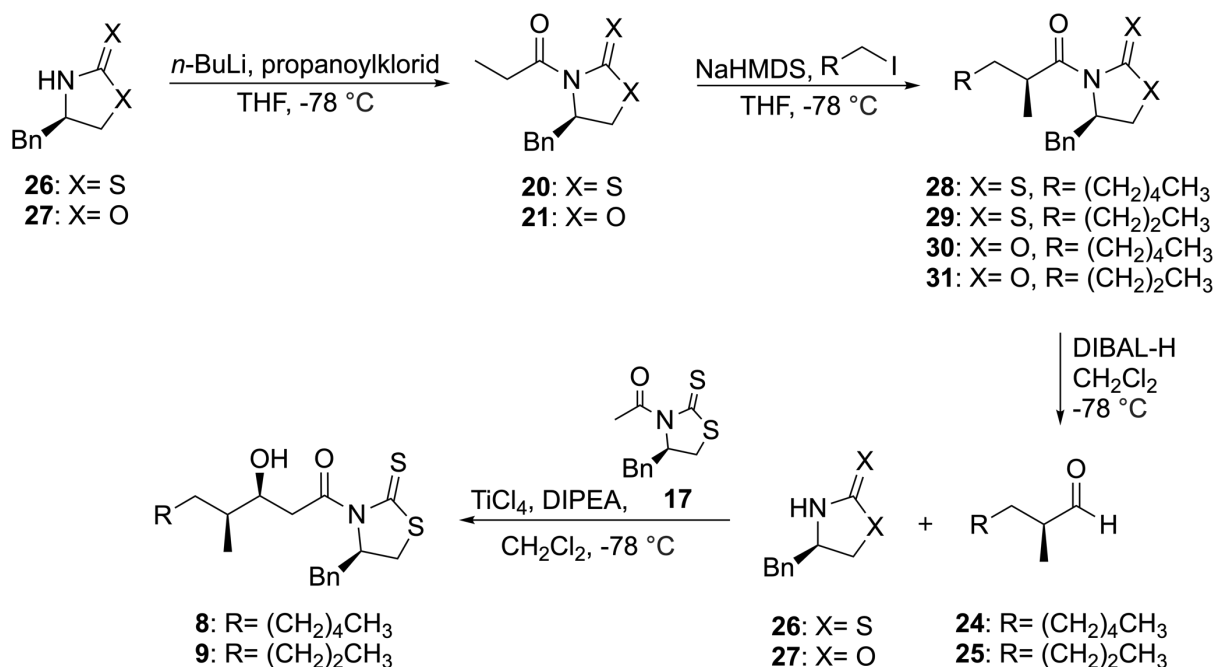
Syntesevei A består av tre syntesetrinn (vist i figur 2.4 side 6): Negishi krysskobling, reduksjon med DIBAL-H og asymmetrisk aldolreaksjon. Forbindelse **16** er kommersielt tilgjengelig og innehar et kiralt senter, noe som er fordelaktig.



Figur 2.4: Syntesevei A for ikke-peptidfragmentene **8** og **9**.

Syntesevei B:

Syntesevei B (vist i figur 2.5) består av fire trinn: acylering, asymmetrisk alkylering, reduksjon med DIBAL-H og asymmetrisk aldolreaksjon. Denne syntesestrategien forutsetter syntese av to kirale sentere.



Figur 2.5: Syntesevei B.

Det ble bestemt å følge syntesevei A da den har færrest trinn, noe som ofte gir høyere totalt utbytte. I tillegg er det kun et kiralt senter som syntetiseres i syntesevei A, mot to i syntesevei B.

2.2 Negishi krysskobling

Krysskoblinger er av stor betydning og mye brukt i organisk kjemi. Krysskobling er en samlebetegnelse på karbon-karbon kobling ved bruk av et katalysatorsystem, ofte med palladium (Pd). Det finnes mange ulike metoder for krysskobling, noen av de kjente er Heck, Stille, Suzuki, Sonogashira, Tsuji-Trost og Negishi.⁶

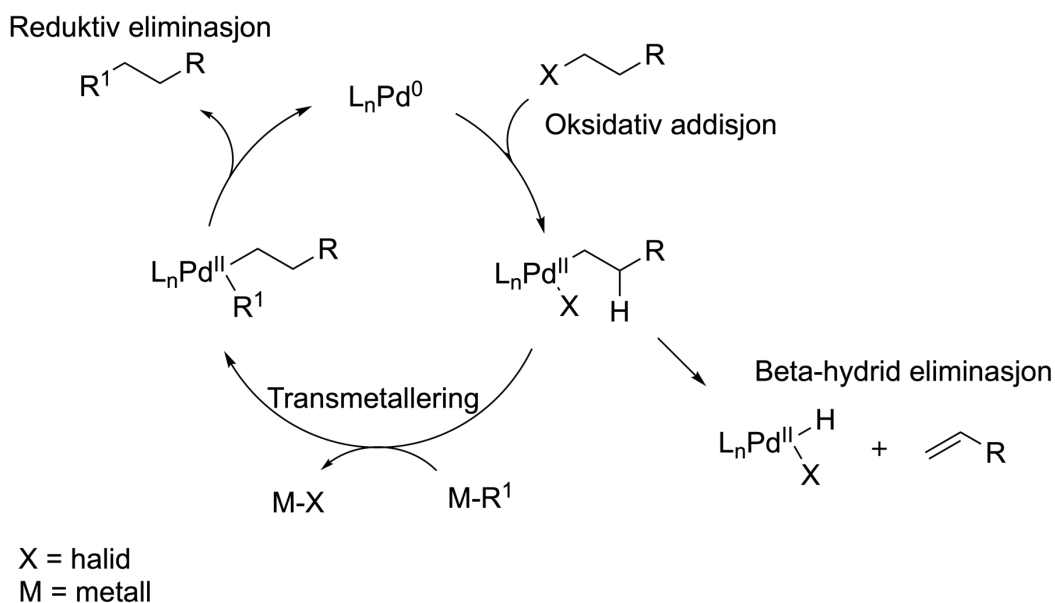
I Negishi krysskobling er reagensene som benyttes organosinkhalid og alkyl-, aryl- eller alkenhalid. Alkyl-sinkhalidreagenser er en av de mest reaktive nukleofilene brukt i Pd-krysskobling da de raskt inngår i transmetallering. Dette gjør Negishi krysskobling egnet til kobling utover standard sp^2 - sp^2 bindinger.⁶ Denne egenskapen var bakgrunnen for hvorfor Negishi krysskobling ble valgt i syntesevei A figur 2.4 side 6.

2.2.1 Reaksjonsmekanisme

Selv med mange ulike varianter av krysskobling følger de fleste den samme generelle sykliske mekanismen vist i figur 2.6 side 8. Pd (0) er den aktive formen av Pd-katalysatoren. Det første trinnet i katalysesirkelen er en oksidativ addisjon der R-X kompleksere seg til Pd (0) og danner et organopalladium (II)-kompleks. Neste trinn er transmetallering der et diorganopalladium (II)-kompleks dannes. Siste delen av katalysesirkelen er selve krysskoblingen der karbon-karbon bindingen blir dannet under reduktiv eliminasjon.^{7,8}

Krysskobling av aryler og alkener er godt dokumentert og har gode litteraturprosedyrer, mens kobling av uaktiverede alkylhalider i lengre tid ikke var like godt dokumentert.⁹ Det ble foreslått at årsaken til dette kunne være at oksidativ addisjon gikk veldig sakte mens β -hydrid eliminasjon av alkylhalider gikk veldig raskt. Dette kan føre til rask dannelse av uønsket eliminasjonsprodukt og lite ønsket produkt.

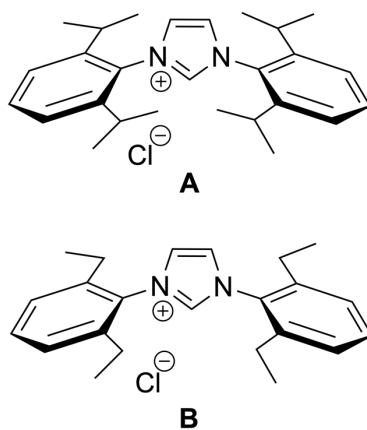
Grunnen til at β -hydrid eliminasjon er spesielt for krysskobling med alkylhalider er fordi de kan ha tilgjengelig β -hydrogener. Dette gir mulighet for Pd (II) til å bruke β -hydrogenet som en ligand, og eliminasjon i alkylhalidet kan forekomme (se figur 2.6, side 8). Denne muligheten finnes ikke ved krysskobling av aryl-, alken- eller benzyhalogener da de ikke har β -hydrogener.¹⁰



Figur 2.6: Generell mekanisme for palladium-katalysert krysskobling.⁸

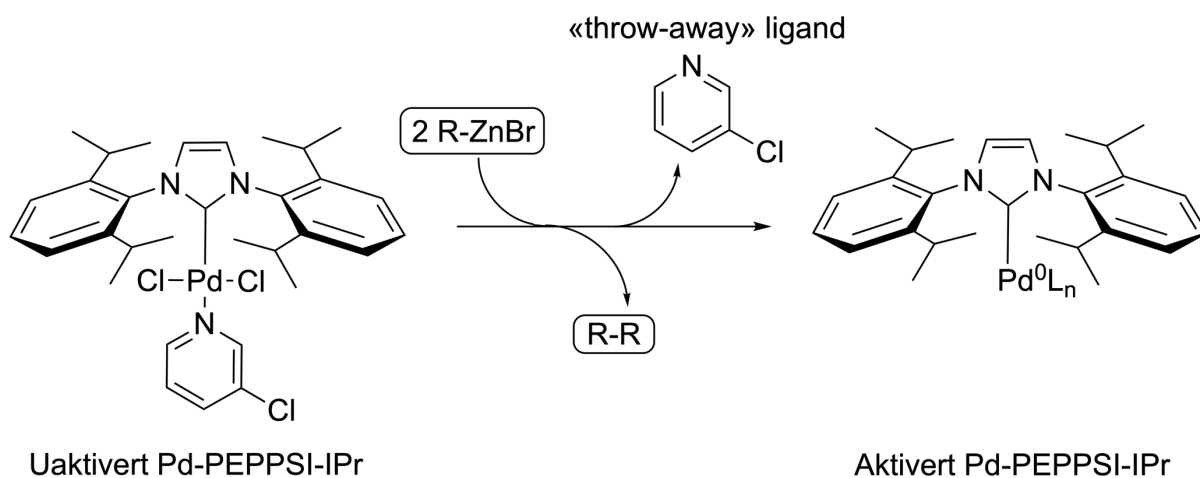
2.2.2 Ligander

Negishi krysskobling med uaktivert alkylhalid har blitt rapportert med opptil 80 % eliminasjonsprodukt og 10 % ønsket produkt med $PdCl_2(dppf)$ i THF som katalysatorsystem.¹¹ Organ *et al.* rapporterte senere hvilken betydning valg av ligander utgjorde for utbyttet under krysskoblingen.⁹ Det ble rapportert 77 % utbytte da $Pd_2(dba)_3$ (2 mol %), $IPr \cdot HCl$ (8 mol %), THF:NMP (2:1) i romtemperatur over 24 timer ble benyttet. Test av ulike løsemidler viste at det var avgjørende å ha et polart løsemiddel, enten DMA, DMI eller NMP for å oppnå høyt utbytte. $IPr \cdot HCl$ er et *N*-heterosyklisk karben (NHC), se figur 2.7, som er godt egnet som ligand til palladium. Bruk av liganden NHC viste en hemmende effekt på β -hydrid eliminasjon. Det ble rapportert at kun små endringer i den kjemiske sammensetningen til NHC-liganden ga betydelig endring i utbytte. Den steriske hindringen på *N*-substituenten på nitrogenatomet var avgjørende. Ved å endre substituenten fra **A** (IPr) til **B** (IEt) falt utbyttet fra 77 % til 17 %.⁹ Årsaken ble foreslått å være at mer sterisk hindring gjør reaktiv eliminasjon raskere, og dette er med på å forhindre uønskede sidereaksjoner.¹²



Figur 2.7: NHC har vist gode egenskaper som ligand til palladium.¹²

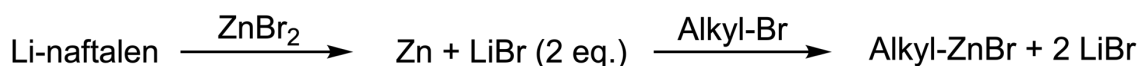
Katalysatorsystemet viste utfordringer ved bruk i stor skala. Det ble foreslått at disse utfordringene skyltes reagensenes sensitivitet overfor oksygen og vann. NHC-liganden er svært sensitiv for fuktighet og oksygen.¹² Dannelsen av aktivt katalysatorsystem mellom PdCl₂ og NHC-ligand under krysskobling ble rapportert vanskelig å følge, og høyst sannsynlig ble store mengder av både PdCl₂ og NHC-liganden ødelagt under katalysatoraktivering. Organ *et al.* utarbeidet et Pd-kompleks bestående av én NHC-ligand, to anioniske ligander, ofte Cl, og en «throw-away» ligand, 3-klorpyridin.¹² Dette komplekset fikk navnet Pd-PEPPSI som står for «pyridine-enhanced precatalyst, preparation, stabilization, and initiation». Pd-PEPPSI kan håndteres og oppbevares i luft, og reduseres enkelt til aktivt Pd(0)-NHC ved at 3-klorpyridin dissosierer fra Pd-komplekset i løsning med organosinkhalid, se figur 2.8.



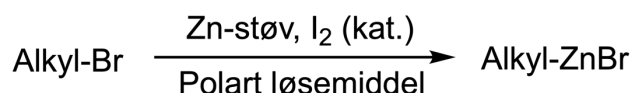
Figur 2.8: Aktivering av Pd-PEPPSI-IPr.¹²

Bruk av Pd-PEPPSI-IPr i Negishi krysskobling har vist lovende resultater med lite til ingen dannelse av uønskede produkter, og reaksjonene kan gå i romtemperatur. Økende bruk av Pd-PEPPSI-IPr viste at metoden brukt for å lage organosinkhalidet hadde betydning for utbyttet under krysskoblingen.¹³ Det var i hovedsak to ulike metoder som var vanlig å benytte for å lage organosinkhalider, Rieke eller Huo.¹³ Da Rieke sin metode ble benyttet ble det rapportert høye utbytter. Bruk av Huo's metode ga derimot ikke produkt. Mekanismen i de ulike metodene forklarte de observerte forskjellene.

Rieke's metode:



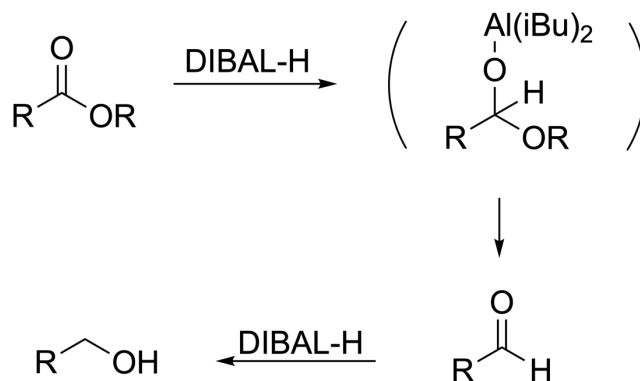
Huo's metode:



Rieke's metode for organosinkbromiddannelse ga rester av saltet LiBr i råproduktet. Råproduktet ble ofte brukt direkte videre i krysskoblingen med Pd-PEPPSI-IPr. Huo's metode, som er en lettere metode for å danne organosinkbromid, ga ikke rester av LiBr i råproduktet. Det har blitt utført studier der utbyttet i krysskoblingsforsøk ble sammenlignet etter tilsetning av varierende ekvivalenter LiBr etter Huo's metode for organosinkbromidsyntese.¹³ Ved å titrere opp mengden LiBr ble det bevist at ved mindre enn 1 ekvivalent LiBr ble det ikke dannet produkt, men at mellom 1.4-2 ekvivalenter LiBr ga høye utbytter. Organ *et al.* foreslo at dette var fordi organosinkbromid må aktiveres til $2\text{Li}^+(\text{Alkyl-Zn-Br}_3)^{2-}$ for å kunne transmetalleres.¹³ Saltet LiBr er derfor nødvendig for å aktivere organosinkbromid før transmetallering.

2.3 Reduksjon med DIBAL-H

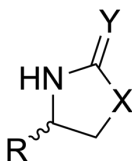
Det finnes flere ulike reduksjonsreagenser som kan benyttes for å redusere ester til aldehyd, en av dem er DIBAL-H.¹⁴ DIBAL-H kan brukes til å redusere estere til aldehyd, men også til korresponderende alkohol. DIBAL-H virker ved å danne et intermediat med esteren, se figur 2.9. Ved å holde temperaturen på $-78\text{ }^\circ\text{C}$ vil intermediatet med DIBAL holdes stabilt frem til opparbeidelsen. Ved høyere temperaturer er intermediatet mer ustabil og kan gi aldehydet før opparbeidelse. Aldehydet kan reagere videre med DIBAL-H og korresponderende alkohol blir dannet, som vist i figur 2.9.¹⁴



Figur 2.9: Intermediat med DIBAL

2.4 Asymmetrisk aldolreaksjon, «non-Evans» syn

En stor utfordring ved syntese av naturstoffer er å få den rette stereokjemien i store og komplekse molekyler. Det er derfor forsket mye på, og utviklet flere metoder for asymmetrisk syntese. En mye brukt metode er aldolreaksjon, en metode for karbon-karbon kobling.¹⁵ Koblingen skjer mellom et enolat og et aldehyd. Evans *et al.* introduserte i 1981 en metode der diastereomerisk selektivitet kan styres med et kiralt hjelpestoff.¹⁶ Det kirale hjelpestoffet kan være oksazolidinoner, oksazolidintioner eller tiazolidintioner, se figur 2.10.¹⁷



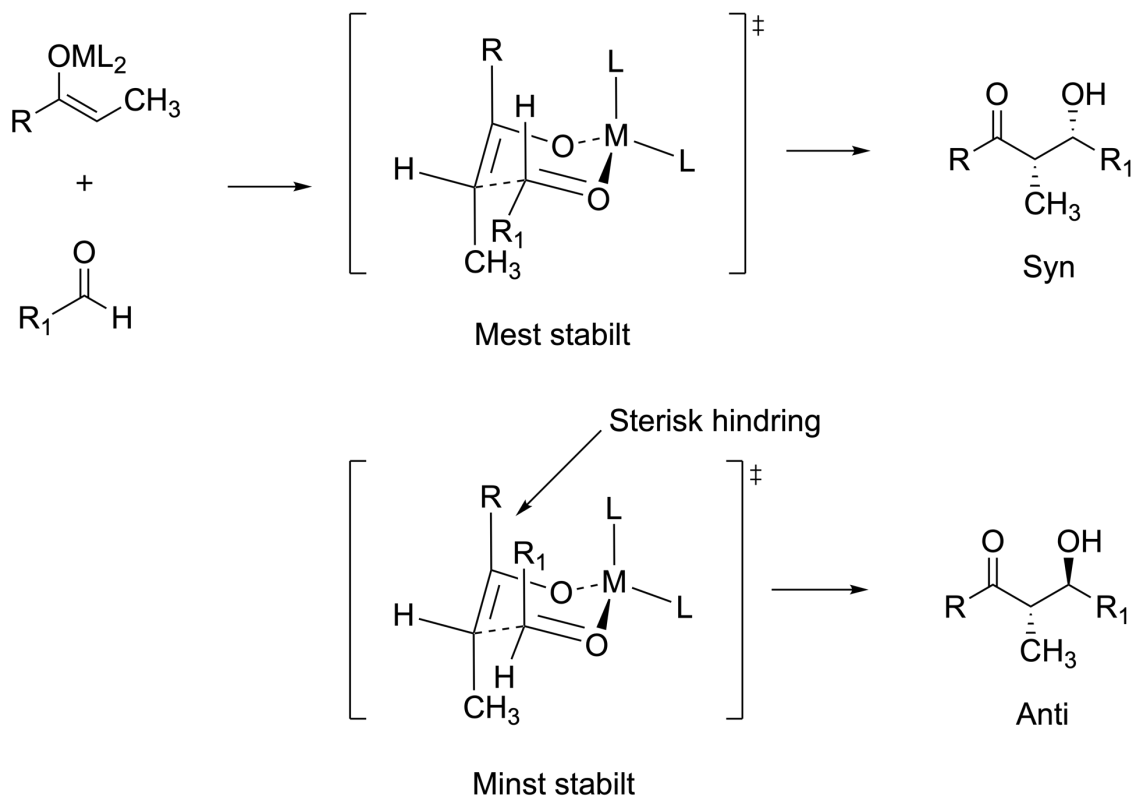
X = Y = S = tiazolidintion
X = Y = O = oksazolidinon
X = O, Y = S = oksazolidintion

Figur 2.10: Kirale hjelpestoff.

Evans sin metode ble valgt i syntesestrategien fordi den viser god selektivitet, og er godt egnet til formålet. I tillegg er det dokumentert høye utbytter ved direkte aminolyse av hjelpestoffet tiazolidintion. Aminolyse er etter syntesevei 1 figur 2.1 side 3 neste trinn etter aldolreaksjon. Tiazolidintion ble derfor valgt som kiralt hjelpestoff.¹⁸

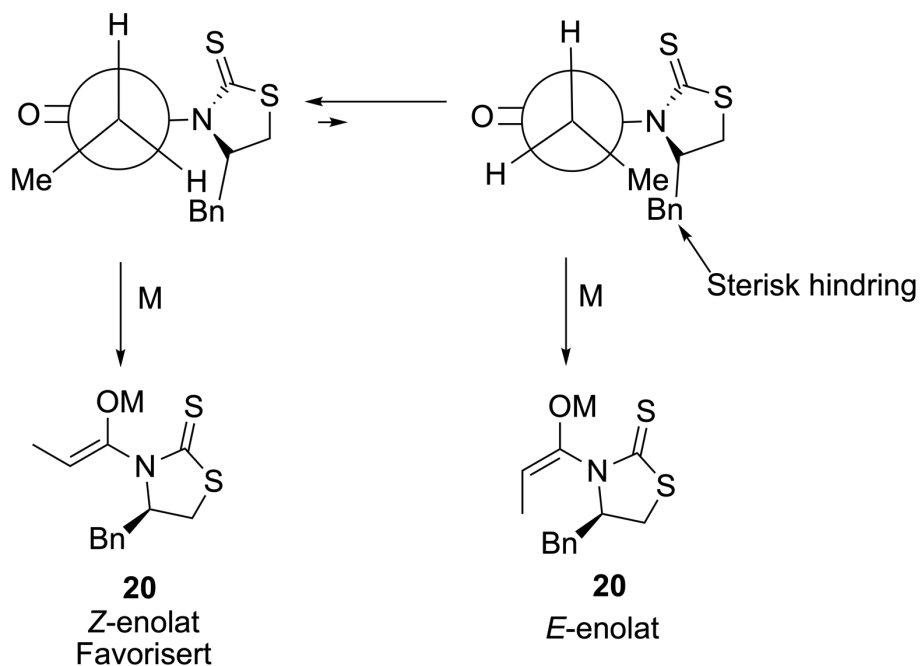
2.4.1 Zimmerman-Traxler

Zimmerman og Traxler publiserte i 1957 en teori om hvordan overgangstilstanden mellom enolatet og aldehydet ser ut før og under karbon-karbon kobling.¹⁹ Overgangstilstanden ble foreslått å være en seksringformasjon mellom aldehydet og enolatet, med koordinering til metallet, se figur 2.11 side 12. Denne overgangstilstanden fører enolatet og karbonylgruppen på aldehydet i nærheten av hverandre. Det ble antatt at elektronene i p -orbitalene til enolatet angriper det elektrophile karbonet på aldehydet, noe som fører til dannelse av en σ -binding. Karbonet på enolatet vil da gå fra å være sp^2 hybridisert til å bli sp^3 hybridisert.²⁰ Interaksjonen med metallet er antatt å polarisere karbonylgruppen. Zimmerman og Traxler foreslo at en «chair-like» konformasjon var lavest i energi, og dermed mest sannsynlig favorisert. Det er senere blitt undersøkt og bekreftet at *Z*-enolatet vil gi «chair-like» konformasjon om det koordinerer med metallet titan.²¹ Figur 2.11 side 12 viser hvordan overgangstilstanden vil se ut. Syn-produktet vil være favorisert siden den gir minst interaksjon mellom R-gruppene i overgangstilstanden. For *E*-enolatet vil anti-produktet være favorisert.



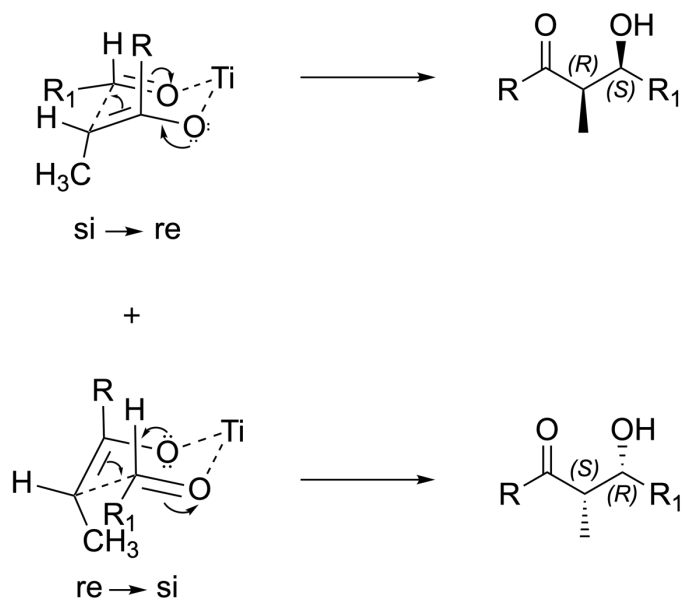
Figur 2.11: Z-enolatet vil gi mest syn produkt.

I Evans sin metode for asymmetrisk aldol med TiCl_4 og DIPEA er produktene kun syn, noe som betyr at det utelukkende er Z-enolatet som dannes. Dette kommer av sterisk hindring mellom metylgruppen og det kirale hjelpestoffet på nitrogenet. Derfor vil dannelse av E-enolatet være undertrykket, se figur 2.12.



Figur 2.12: Sterisk hindring fører til at Z-enolatet er sterkt favorisert.²²

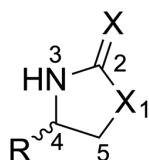
Aldolreaksjon med aldehyd og *Z*-enolat vil gi en blanding av (\pm) syn produkter, vist i figur 2.13. Dette kommer av at elektronene i enolatet kan angripe karbonylen på aldehydet både fra si- og re-siden.²³ Hvis elektronene i enolatet angriper fra si-siden til re-siden av karbonylen blir (*R*, *S*)-produktet dannet. Hvis elektronene på enolatet angriper fra re-siden til si-siden av karbonylen blir (*S*, *R*)-produktet dannet, som vist i figur 2.13.



Figur 2.13: Racemisk blanding av syn aldolprodukter.

2.4.2 «Nagao chelated transition state»

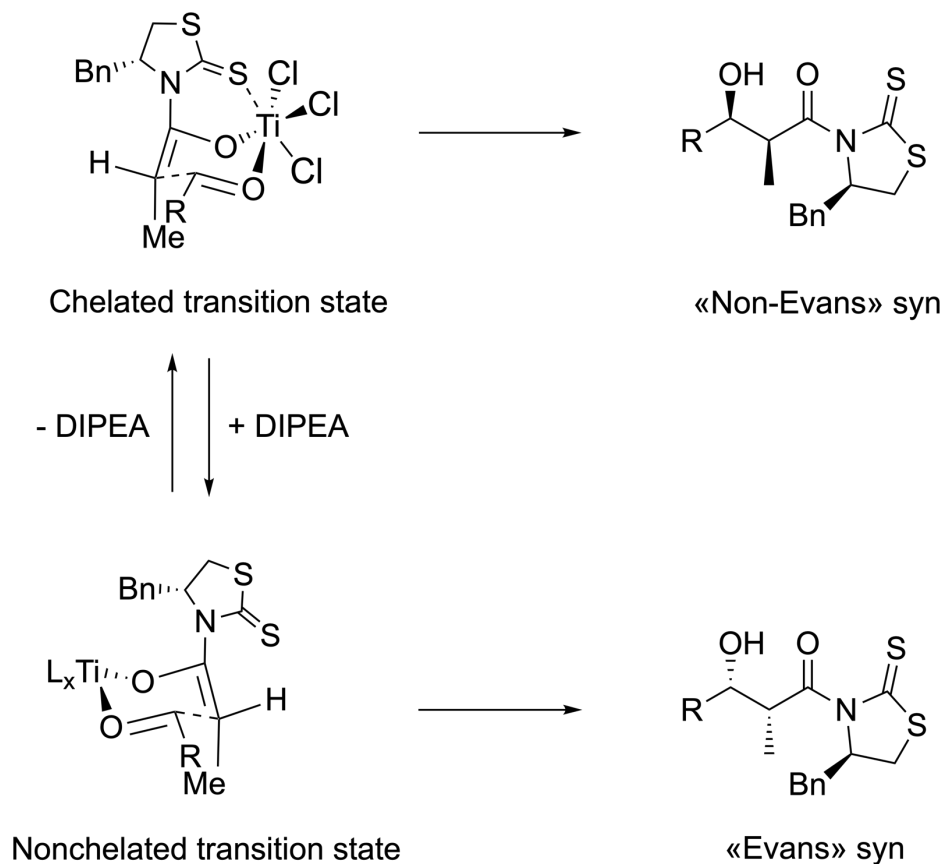
Det kirale hjelpestoffet introdusert av Evans har den funksjonen å dirigere aldehydet i forhold til enolatet slik at det selektivt kan styres om elektronene i enolatet angriper fra re- eller si-siden.¹⁶ Diastereomerisk forhold styres av det kirale senteret på hjelpestoffet, C4, se figur 2.14. Substituenten på C4, R, varierer, noen av de som brukes mest er benzyl, *iso*-propyl og metyl.²⁴ Substituenten vil ved sterisk hindring selektivt dirigere aldehydet til enten re- eller si-siden av enolatet.



Figur 2.14: C4 og C5.

Det ble rapportert at det ikke bare var stereokjemien til substituenten på C4 som avgjorde stereokjemien i aldolproduktet. Nagao og Fujita publiserte i 1989 en artikkel der det ble presentert ulike kompleks-konformasjoner som kunne oppstå i aldolreaksjonen da tinn ble brukt som metall.²⁵ De samme konformasjonene dannes også ved bruk av titan som metall. Når *N*-acyl-tiazolidintion er i løsning med TiCl₄ og DIPEA vil det dannes et kompleks som gir enolatdannelse. Tilsetning av aldehyd vil føre til dannelse av overgangstilstanden først rapportert av Zimmerman og Traxler, som forklart i avsnitt 2.4.1. Komplekset som gir «non-Evans» syn produkt kalles «chelated transition state», og er når titan-metallet koordinerer med oksygenet på aldehydet som vist i figur 2.15, i tillegg til amidet og tiokarbonyl på *N*-acyl-tiazolidintion. Denne overgangstilstanden skiller seg fra Zimmerman-Traxler overgangstilstanden ved at tiokarbonyl også koordinerer til titan. I dette komplekset er stereokjemien på C4-substituenten avgjørende for hvor aldehydet vil få plass i komplekset, og dermed også for hvilken stereokjemi som blir dannet når elektronene i enolatet angriper aldehydet. Som vist i figur 2.15 vil aldehydet koordinere til metallet titan fra motsatt side enn C4 substituenten grunnet sterisk hindring. Denne overgangstilstanden kalles også «Nagao chelated transition state».¹⁷

I tillegg til «Nagao chelated transition state» ble det rapportert observasjon av en annen overgangstilstand. Denne overgangstilstanden kalles «nonchelated transition state» og gir «Evans» syn produkt. «Nonchelated transition state» skiller seg fra førstnevnte ved at metallet kun er i kompleks med to oksygenatomer, tilhørende aldehydet og amidet. «Nonchelated transition state» er lik overgangstilstanden først presentert av Zimmerman og Traxler.¹⁷



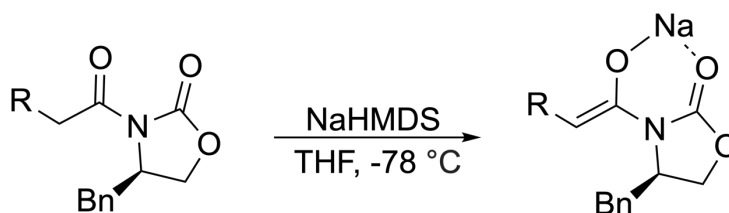
Figur 2.15: «Chelated transition state» gir «non-Evans» syn produkt.

Crimmins *et al.* utførte studier der resultater av aldolreaksjoner ble sammenlignet avhengig av om det ble brukt oksazolidinoner, oksazolidintioner eller tiazolidintioner som hjelpestoff.¹⁷ Forsøkene viste at mengden base og TiCl_4 tilsatt var kritisk. For tiazolidintioner ble det observert høy stereoselektivitet av «non-Evans» syn ved 1 eq. av både TiCl_4 og basen DIPEA. Det ble forsøkt å øke mengden DIPEA til 2.5 eq., og da endret selektiviteten seg helt om og viste høyt utbytte av «Evans» syn produktet. Dette ble forklart ved at når 2 eq. av DIPEA tilsettes vil aminet koordinere til titan-metallet, og tiokarbonyl blir presset ut av metallkomplekset. Det ble foreslått at metallet flytter seg til motsatt side av hjelpestoffet, der det er mindre sterisk hindring. En «nonchelated transition state» vil da være favorisert. Aldehydet vil bli angrepet fra re-siden i stedet for si-siden i figur 2.15 side 14. Denne konformasjonen vil gi «Evans» syn produkt.

Mengden DIPEA i reaksjonsblandingen bestemmer om produktet blir «non-Evans» syn eller «Evans» syn for hjelpestoff tiazolidintion. For oksazolidinon og oksazolidintion er mengden TiCl_4 i tillegg til mengden DIPEA avgjørende for overgangstilstanden i aldolreaksjonen.¹⁷

2.5 Asymmetrisk alkylering

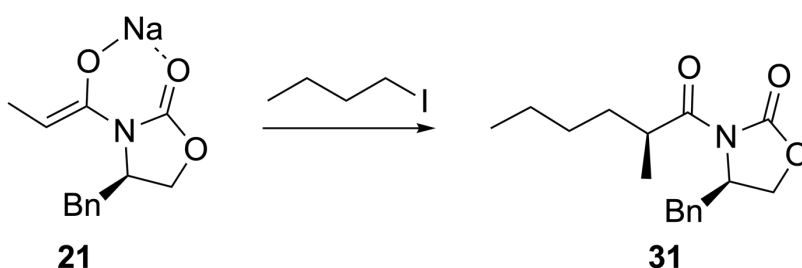
I 1982 publiserte Evans *et al.* en artikkel om asymmetrisk alkylering av kirale imidenolater.²⁶ Asymmetrisk alkylering, i likhet med asymmetrisk aldolreaksjon, er av stor interesse og viktighet for syntese av kirale sentere. Prinsippet under alkyleringen har mange likhetstrekk som under aldolreaksjonen. Det benyttes et kiralt hjelpestoff, oksazolidinon. I aldolreaksjonen var det TiCl_4 og DIPEA som dannet enolatet¹⁷, mens i alkyleringen benyttes det en sterk base, eksempelvis NaHMDS.²⁶ Figur 2.16 viser foreslått Z-enolatdannelse med NaHMDS.



Figur 2.16: Foreslått Z-enolatdannelse med NaHMDS.

Ved bruk av oksazolidinoner, oksazolidintioner eller tiazolidintioner vil Z-enolatet være favorisert. Dette kommer av sterisk hindring under dannelse av E-enolatet, som vist i figur 2.12 side 12.

Når enolatet er dannet tilsettes det en elektrofil som vil være alkyleringsmiddelet. Alkyleringsmiddelet er ofte organojodid eller organobromid. Andre gode utgående grupper enn jod og brom er også rapportert benyttet. Det er foreslått at substituenten på det kirale senteret, C4, på oksazolidinon dirigerer alkyleringsmiddelet selektivt til re- eller si-siden av enolatet. Substituenten gir sterisk hindring slik at angrep fra det elektronrike enolatet kun vil være mulig fra re-siden i figur 2.17.²⁶

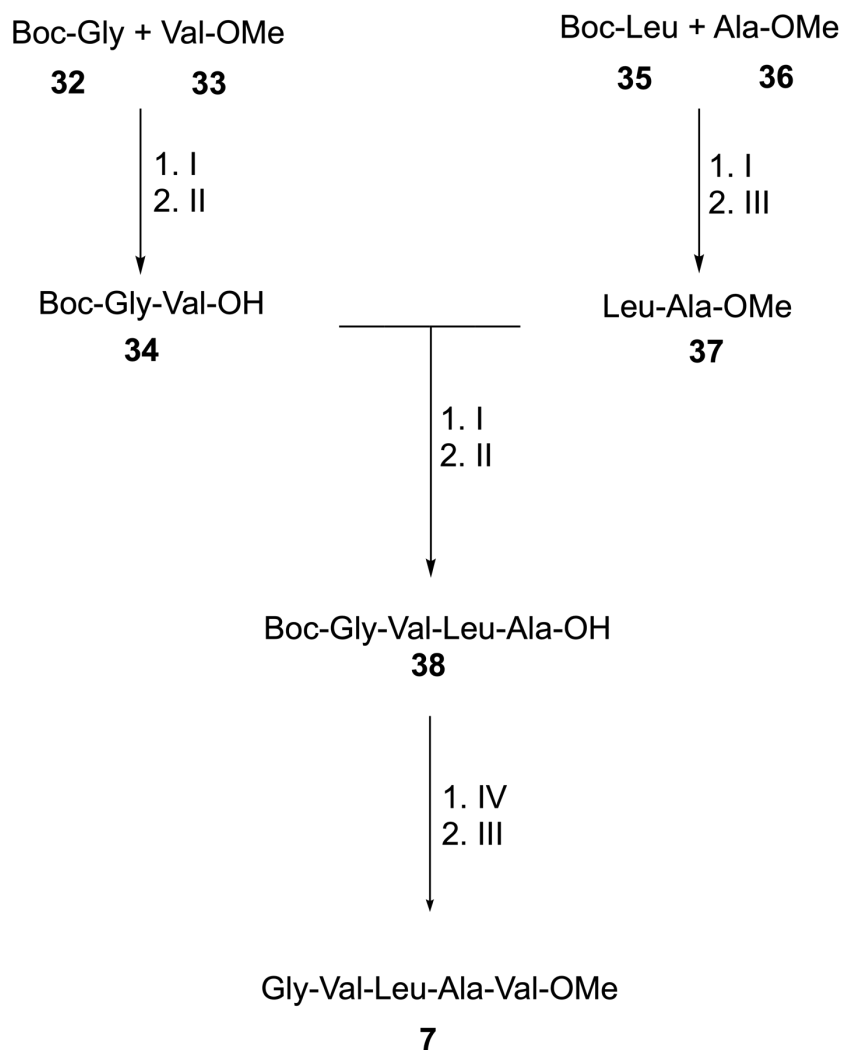


Figur 2.17: Elektrofilen blir angrepet fra re-siden av enolatet.

Andre baser enn NaHMDS har også blitt benyttet i asymmetrisk alkylering med andre metaller som litium eller kalium, men natrium har vist best stereoselektivitet.²⁶

2.6 Syntese av pentapeptidet **7** Gly-Val-Leu-Ala-Val-OMe

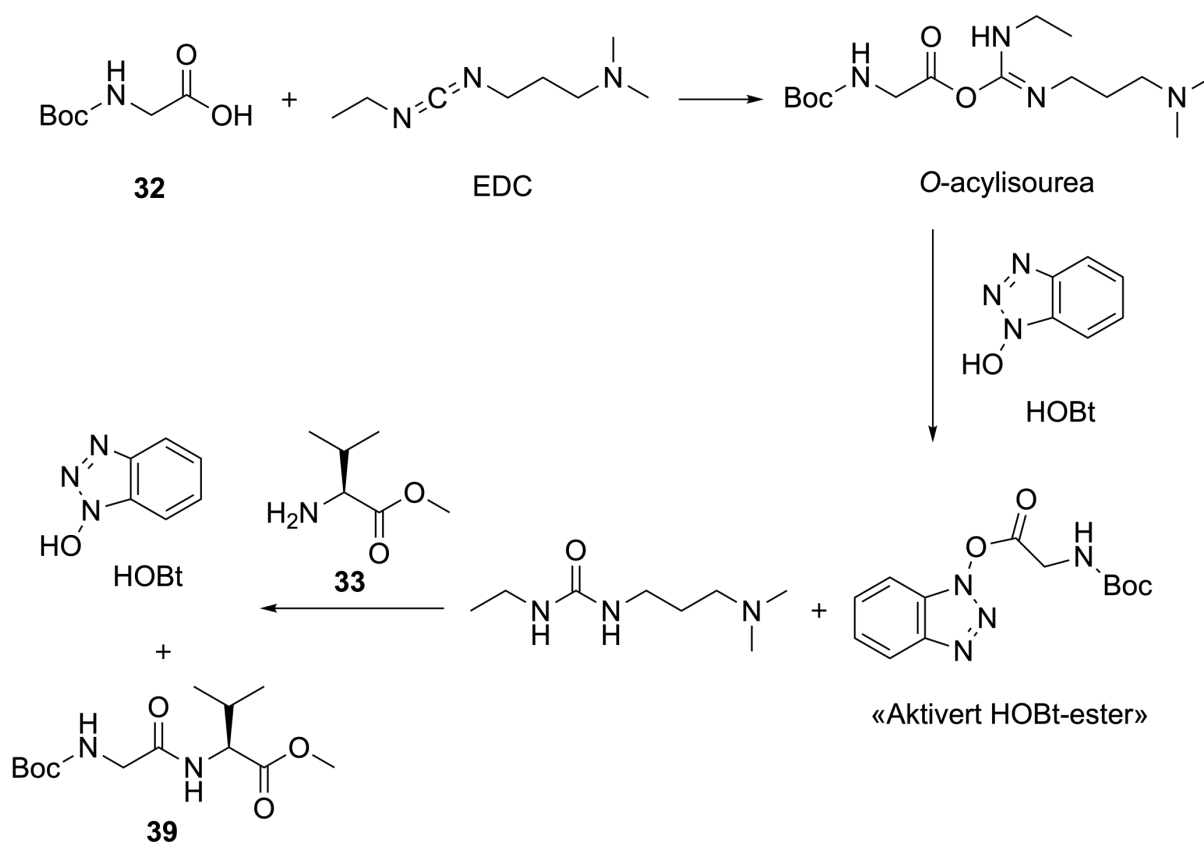
Forbindelse **7** består av fem aminosyrer koblet sammen til et pentapeptid. Det ble planlagt å koble aminosyrene med standard peptidsyntese i løsning. TFA og LiOH vil fjerne henholdsvis Boc- og metylesterbeskyttelsesgrupper på aminosyrene. Se figur 2.18 for syntesestrategi for pentapeptidet **7**. Det ble planlagt å syntetisere to dipeptider parallelt: Boc-Gly-Val-OH **34** og Leu-Ala-OMe **37**. Dipeptidene **34** og **37** vil deretter bli koblet sammen til tetrapeptidet Boc-Gly-Val-Leu-Ala-OH **38** før den siste aminosyren, valin **33**, blir koblet på og ønsket pentapeptid **7** er syntetisert.



Figur 2.18: Syntesestrategi for pentapeptidet. (I) EDC, DIPEA, HOBT, CH₂Cl₂, 0 °C → r.t.; (II) LiOH, THF:MeOH:H₂O (3:1:1), 0 °C; (III) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C; (IV) Val-OMe **33**, EDC, DIPEA, HOBT, CH₂Cl₂, 0 °C → r.t.

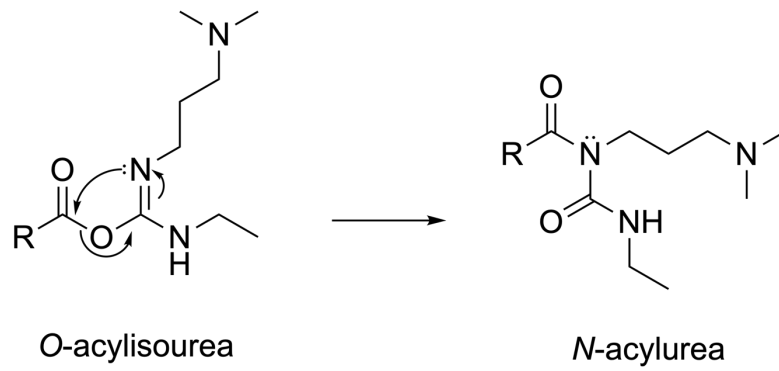
2.6.1 Peptidsyntese

Det finnes i dag flere ulike koblingsreagenser som kan benyttes til peptidsyntese, blant annet DCC og EDC. EDC er mest brukt da den er lettere å fjerne under opparbeidelse siden den er vannløselig, i motsetning til DCC.²⁷ Funksjonen til EDC er å aktivere aminosyren med ubeskyttet karboksylsyre til esteren *O*-acylisourea som vist i figur 2.19. Etter aktivering er den mottakelig for nukleofilt angrep av aminet på en annen aminosyre.²⁸ Dermed kan aminosyrer kobles sammen til peptider. I tillegg til EDC blir det ofte brukt et ekstra koblingsreagens.²⁸ Det finnes flere av disse, deriblant HOBT, HOAt, HATU og HBTU.²⁹ Se figur 2.19 for oversikt over generell mekanisme ved bruk av EDC og HOBT.



Figur 2.19: Generell mekanisme for peptidsyntese ved bruk av EDC og HOBT.²⁸

HOBT eller lignende andre reagenser brukes ofte fordi de danner en mer stabil ester med karboksylsyren enn *O*-acylisourea.²⁸ Bruk av HOBT vil derfor kunne gi en økning i total koblingseffektivitet. Esteren som dannes mellom karboksylsyren og EDC, *O*-acylisourea, se figur 2.20 side 19, er ustabil og kan reagere med vann eller rearrangere til *N*-acylurea som er mer stabilt og uønsket.²⁸ *N*-acylurea er ikke reaktiv for primære aminer, og vil dermed ikke kunne koble med aminosyrer.³⁰ HOBT brukes for å unngå denne sidereaksjonen.

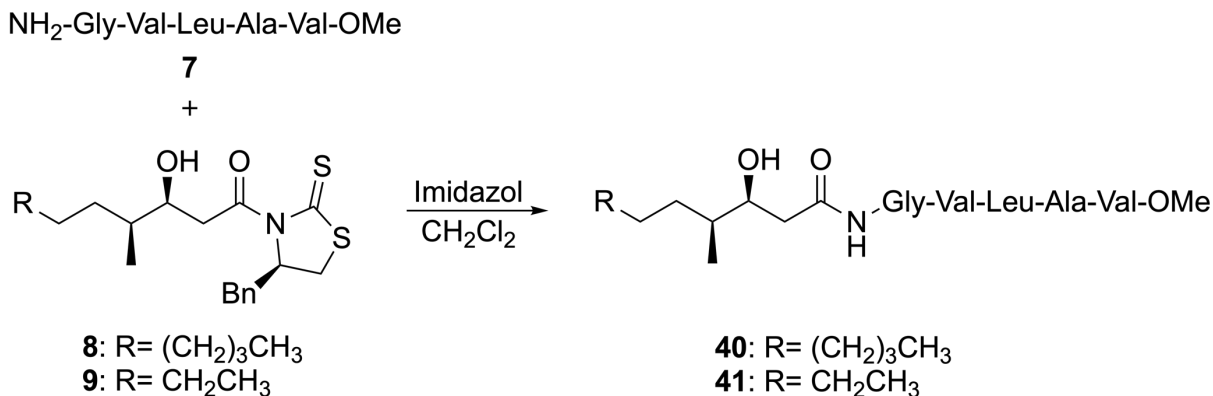


Figur 2.20: Rearrangering fra O-acylisourea til N-acylurea.³⁰

Grunnet utfordringer med løselighet og isolering av produkt etter kobling benyttes ikke peptidkobling i løsningsprosedyrer i stor skala. Fast fase peptidsyntese, introdusert i 1963, er i dag den mest brukte metoden for peptidsyntese.³¹

2.7 Syntese av aminolyseproduktene **40** og **41**

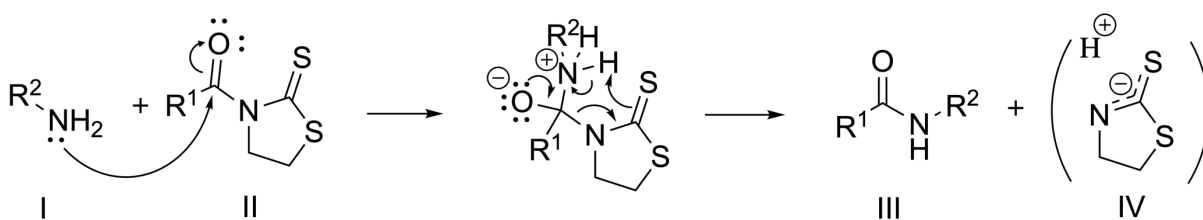
Syntesevei 1 (figur 2.1 side 3) består blant annet av aminolyse mellom ikke-peptidfragmentene **8** og **9** og pentapeptidet **7**. Figur 2.21 viser reaksjonsligningen som gir aminolyseproduktene **40** og **41**.



Figur 2.21: Syntese av aminolyseproduktene **40** og **41**.

2.7.1 Aminolyse

I 1980 ble det publisert en oversikt over aminolyse av tiazolidintioner.⁴ En stor fordel med denne reaksjonen er mulighetene det gir for videre syntese etter Evans aldolreaksjon. Aminolyse, også kalt transamidering, er en reaksjon der et amin byttes ut med et annet. I dette tilfellet er det pentapeptidet **7** som blandes sammen med en løsning av *N*-acyl-tiazolidintion i CH₂Cl₂. Som vist i figur 2.22 vil det primære aminet på glysin angripe karbonylgruppen, og tiazolidintion vil spaltes av. Tiazolidintion er en god utgående gruppe siden den negative ladningen kan stabiliseres på både nitrogenet og svovel. Både primære og sekundære aminer kan undergå aminolyse, men reaksjonstiden er ofte kortere for primære aminer.⁴



Figur 2.22: Generell mekanisme for aminolyse foreslått av Nagao et al.⁴
(I) pentapeptidet **7**; (II) ikke-peptidfragmentene **8/9**; (III) aminolyseproduktene **40/41**; (IV) forbindelse **26**.

Reaksjonen kan monitoreres visuelt i og med at *N*-acyl-tiazolidintion er gul, mens tiazolidintion er hvit. Dermed vil gulfarge indikere at reaksjonen ikke er ferdig mens blank eller hvit farge indikerer at reaksjonen er ferdig.⁴

3. Resultater og diskusjon

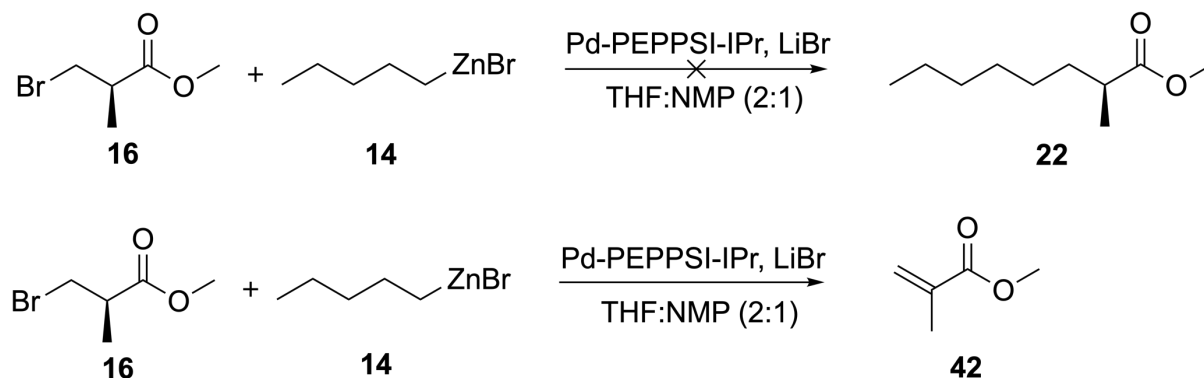
Målet med denne masteroppgaven var å syntetisere målmolekylene chrysogeamide A og B ved å følge strategien beskrevet i syntesevei 1 (figur 2.1 side 3) og syntesevei A (figur 2.3 side 5) for ikke-peptidfragmentene **8** og **9**. Resultatene fra forsøkene vil i denne delen bli presentert og diskutert.

3.1 Negishi krysskobling

3.1.1 Forsøk på syntese av metyl (*S*)-2-metyloktanoat **22**

Det ble forsøkt å koble metyl (*R*)-(+)-3-brom-2-metylpropionat **16** med pentylsinkbromid **14** til forbindelse **22** (se figur 3.1 side 22) under betingelser utarbeidet av Organ *et al.*⁷ Det viste seg at reaksjonen var vanskelig å følge på TLC da det ikke var mulig å fremkalle utgangsstoffene i de fremkallingsmetodene som var tilgjengelig: UV-lys, kaliumpermanganat, anisaldehyd og PMA. Prosedyren ble likevel fulgt som beskrevet i artikkelen, og det ble brukt GC-MS for å analysere råproduktet etter opparbeidelse. Pd-PEPSSI-IPr og LiBr ble løst i NMP under nitrogengass før pentylsinkbromid **14** ble tilsatt. Det ble observert fargeendring fra lys brun til mørk brun/svart etter tilsetning av forbindelse **14**, noe som kunne indikere aktiveringen av Pd-PEPSSI-IPr-komplekset som beskrevet i teoridelen på side 9. Forbindelse **16** ble tilsatt og reaksjonen rørte i 2 timer. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet og råproduktet ble analysert på GC-MS. Analyseresultatene var vanskelig å tolke da det var mye rester etter reagenser eller biprodukter i råproduktet. Det eneste som kunne bekreftes av GC-MS i råproduktet var løsemiddelrester. Reaksjonen ble forsøkt to ganger til med samme betingelser, men ga samme resultat. Etter å ha sammenlignet prosedyrer fra ulike artikler ble det oppdaget at forholdet mellom løsemidlene THF og NMP varierte.¹³ Forholdet mellom løsemidlene THF og NMP var 1:2 i prosedyren fulgt etter Organ *et al.*, mens i en annen publisert artikkel var forholdet mellom løsemidlene omvendt.¹³ Reaksjonen ble derfor forsøkt igjen, men denne gangen var løsemiddelforholdet mellom THF og NMP 2:1. Etter opparbeidelse ble råproduktet analysert på GC-FID, og det var nå to tydelige topper som skilte seg ut som mye større enn de andre. Råproduktet ble derfor analysert på GC-MS, og det ble tatt ¹H-NMR. GC-MS bekreftet en liten mengde av dekan og en større topp med hva den med 87 % sikkerhet bekreftet å være β -hydrid eliminasjonsprodukt **42** (se figur 3.1 side 22). Massespektrometeret som ble benyttet var koblet opp mot NIST 17 mass spectral library. Analyseinstrumentet bruker biblioteket den er koblet opp mot til å anslå molekyler etter fragmenteringsmønsteret. NMR-spekteret av råproduktet kunne underbygge teorien om eliminasjonsprodukt da det var to topper i området hvor sp^2 -hydridiserte protoner forventes: 5.97 ppm og 5.42 ppm. Det var ikke noe tegn til rester av utgangsstoff **16**, men heller ikke noe ønsket produkt **22**. Det ble derfor forsøkt å øke temperaturen i håp om det kunne gi produkt, men GC viste samme resultatet som ved romtemperatur.

β -hydrid eliminasjon i forbindelse **16** gir konjugasjon i produktet. Det kan antas at β -hydrid eliminasjonsproduktet **42** er mer stabilt enn utgangsstoffet **16** siden eliminasjonsproduktet er eneste produkt observert. Det kan også antas at β -hydrid eliminasjon skjer raskt, og at dette er med på å undertrykke dannelse av ønsket produkt. Pd-PEPPSI-IPr har vist gode resultater i Negishi krysskobling med andre alkylhalider, men det ser ikke ut til at den er optimal når mulighet for konjugasjon i molekylet er tilstede. Av tidligere publiserte artikler med bruk av Pd-PEPPSI-IPr er det ingen resultater å vise til der en β -hydrid eliminasjon fører til 1,3 konjugasjon med en karbonylgruppe.



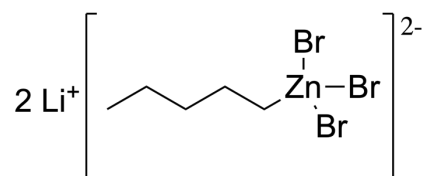
Figur 3.1: Krysskoblingen var mislykket, med β -hydrid eliminasjonsprodukt **42** i reaksjonsblandingen etter opparbeidelse.

Eliminasjon i forbindelse **16** ga den α -, β -umettede esteren **42**, som betyr at pentylsinkbromid **14** ikke hadde reagert med forbindelse **16**. Forbindelse **14** var likevel ikke detektert under GC-MS. Det kan antas at dette skyldes at pentylsinkbromid **14** ikke er stabil i vandige forhold under opparbeidelsen av råproduktet. Organosinkhalogener er sensitive for både oksygen og vann, noe som kan forklare dette.⁶

Det var en liten andel med dekan i råproduktet etter endt reaksjon. Dette kan være et tegn på at aktiveringen av Pd-PEPPSI-IPr komplekset var vellykket. Som beskrevet i teoridelen side 9 aktiveres komplekset ved at to organosinkbromider kobles sammen mens 3-klorpyridin dissosieres. I dette tilfellet vil to pentylsinkbromider som kobles sammen bli dekan. Det kan antas at Pd-PEPPSI-IPr komplekset var blitt aktivert, noe fargeendringen observert også er et tegn på. Videre kan det verken bekreftes eller avkreftes om mengden dekan i råproduktet var større enn forventet. Dermed kan ikke homokobling av forbindelse **14** utover aktivering av katalysatorkomplekset utelukkes.

Forholdet mellom løsemidlene i denne reaksjonen viste tegn til å ha betydning for resultatet. Når forholdet mellom THF og NMP ble endret fra 1:2 til 2:1 ble det observert tydeligere topper på GC. Valg av løsemidler i en reaksjon er avgjørende for resultatet da alle reagensene må være oppløst for å være tilgjengelig. I dette tilfellet var det to ulike løsemidler. NMP som er et polart løsemiddel, og THF som er mindre polart. THF er blandbar med NMP, så kombinasjonen av NMP og THF er ikke et tofasesystem. Organosinkbromidet må aktiveres for å kunne transmetalleres som beskrevet på side 10, se figur 3.2 side 23. Aktiveringen er avhengig av saltdannelse, og for at dette skal være

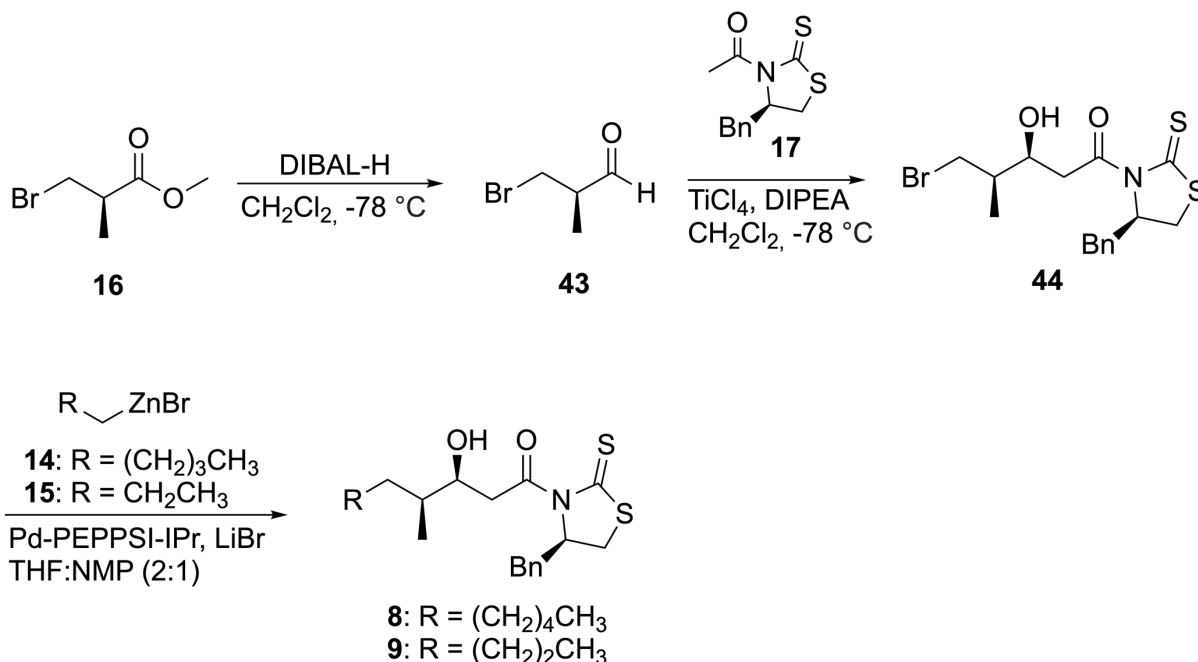
mulig må det være i et løsemiddel som er polart. Det er også helt essensielt at LiBr er oppløst slik at organosinkbromidet kan aktiveres.¹³



Figur 3.2: Pentylsinkbromid aktivert for transmetallering.

3.1.2 Endring av syntesestrategi A

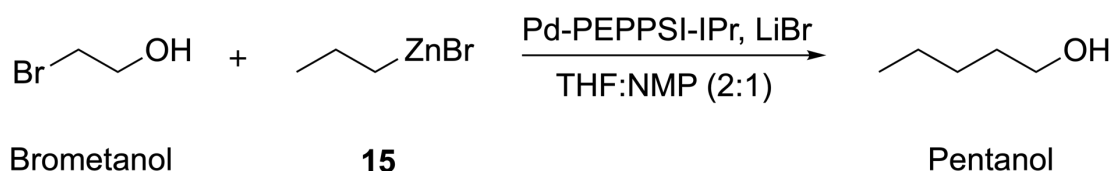
Etter flere forsøk med krysskobling mellom forbindelsene **16** og **14** uten ønsket produkt ble det nødvendig med endring i syntesestrategien. Det ble antatt at konjugasjonen i eliminasjonsproduktet **42** (figur 3.1 side 22) var en mulig forklaring på hvorfor reaksjonen var mislykket. Det var derfor ønskelig å unngå konjugasjon i det eventuelle eliminasjonsproduktet. Forbindelse **44** (figur 3.3) kunne syntetiseres ved å redusere forbindelse **16** til korresponderende aldehyd **43** og deretter utføre en aldolreaksjon mellom aldehydet og forbindelse **17**. β -hydrid eliminasjon av forbindelse **44** vil ikke gi konjugasjon i eliminasjonsproduktet, og det ble derfor bestemt å forsøke krysskobling mellom forbindelse **44** og **14/15**, vist i figur 3.3.



Figur 3.3: Ny plan for Negishi krysskobling.

En potensiell utfordring ved denne planen var hydroksylgruppen i forbindelse **44**. Det ble ikke funnet noen tidligere publiserte artikler med Negishi krysskobling der Pd-PEPPSI-IPr var benyttet med en ubeskyttet hydroksylgruppe tilstede. Siden metyl (*R*)-(+)-3-brom-2-

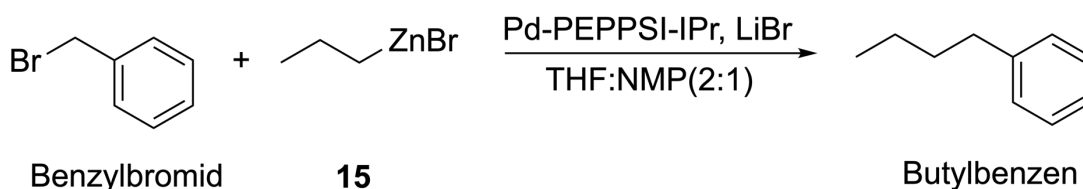
metylpropionat **16** var kostbar ble det bestemt å teste krysskobling av brometanol med propylsinkbromid **15**, se figur 3.4. Råproduktet ble analysert på GC og det viste seg at det ikke var dannet noe produkt, men at utgangsstoffet brometanol fortsatt var i blandingen. Det ble antatt at krysskobling med ubeskyttet hydroksylgruppe var utfordrende. For å unngå denne problematikken kunne hydroksylgruppen beskyttes med en TBS-gruppe. Før det ble forsøkt krysskobling med TBS-beskyttet hydroksylgruppe var det ønskelig å forsøke krysskobling med benzylbromid.



Figur 3.4: Testreaksjon med brometanol og propylsinkbromid **15**.

3.1.3 Krysskobling med benzylbromid

Det var ønskelig å forsøke Negishi krysskobling med enklere og mindre kostbare alkylhalider for å undersøke om betingelsene benyttet under forsøk på krysskobling av forbindelse **22** (figur 3.1 side 22) var optimale. Av tilgjengelige reagenser var benzylbromid best egnet. Benzylbromid har ingen β -hydrogener, og derfor vil β -hydrid eliminasjon ikke være en mulig sidereaksjon. Det ble forsøkt å krysskoble benzylbromid med propylsinkbromid **15**, se figur 3.5. Forsøket ble utført flere ganger med ulike betingelser, se tabell 1.



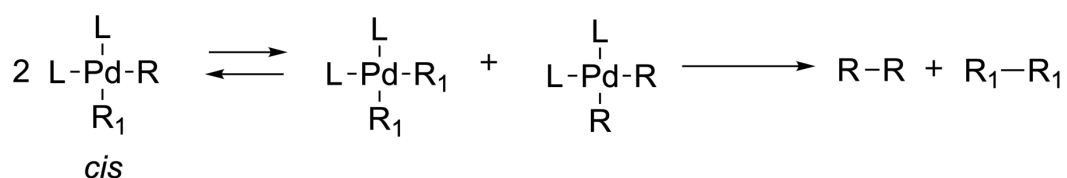
Figur 3.5: Testreaksjon mellom benzylbromid og propylsinkbromid **15**.

Tabell 1: Resultater fra Negishi krysskobling med benzylbromid og propylsinkbromid **15** under varierende betingelser.

Forsøk	Temp.	Mol % kat. ^a	% Utbytte ^b
1	r.t.	4	0
2	50 °C	10	0
3	60 °C	4	0
4	85 °C	10	0
5	r.t.	10	0

^a Pd-PEPPSI-IPr, ^b Analysert på NMR.

Organosinkreagenser er sensitive for oksygen og vann⁶, derfor gikk reaksjonene i tørre trykkrør flushet med nitrogengass. Selv med varierende betingelser og gjentatte forsøk var det ingen tegn til forventet produkt. Dette var noe overraskende resultater i og med at tidligere publiserte artikler viste til høye utbytter ved bruk av Pd-PEPPSI-IPr.⁷ I alle forsøkene viste TLC ingen tegn til at det var noe igjen av utgangsstoffet benzylbromid. Siden det ikke var blitt noe produkt, men utgangsstoffet var fullstendig omsatt hadde det mest sannsynlig skjedd en sidereaksjon, som ikke er så uvanlig i krysskoblinger. De vanligste sidereaksjonene utenom β -hydrid eliminasjon er homokobling eller dehalogenering.³² ¹H-NMR av fraksjonene etter rensing på kolonne avslørte at 1,2-difenyletan var dannet. Det bekreftet homokobling av benzylbromid. Dette kan ha skjedd ved at reaksjonen ikke hadde fulgt den generelle sykliseringsmekanismen som vist i figur 2.6 side 8 under reduktiv eliminasjon. For at krysskobling mellom karbonene kan forekomme må R-gruppene være *cis* i forhold til hverandre før reduktiv eliminasjon.³³ Når R-gruppene står *cis* for hverandre kan et bytte i R-grupper mellom to Pd-komplekser skje, som vist i figur 3.6. Dette vil føre til at like R-grupper står *cis* i forhold til hverandre på samme Pd, og homokobling mellom både R og R₁ forekommer.³³ Det kan antas at denne mekanismen har skjedd under reaksjonen, og ført til dannelse av 1,2-difenyletan.



Figur 3.6: Foreslått likevekt som gir homokobling.³³

1,2-difenyletan ble bekreftet av NMR, og utfra den antatte mekanismen vist i figur 3.6 vil også homokobling av organosinkbromid forekomme. Propylsinkbromid **3** vil gi heksan som homokoblet produkt. Det var ikke mulig å bekrefte heksan i reaksjonsblandingen siden råproduktet hadde vært rensert på flashkolonne og dampet inn på rotavapor gjentatte ganger. Heksan kan ha blitt dampet av, og det ble antatt at det var grunnen til at heksan ikke var synlig i ¹H-NMR-spekteret.

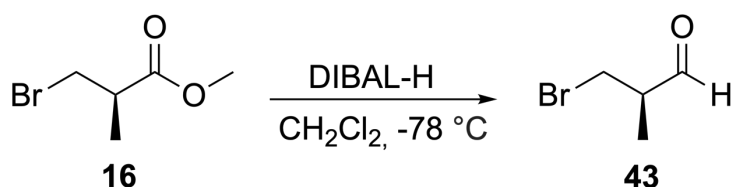
3.2 Reduksjon til (*R*)-3-brom-2-metylpropanal **43**

Syntesevei A ble endret som vist i figur 3.3 side 23 til at reduksjon fra esteren **16** til aldehyd **43** er første trinnet i syntesestrategien. Hensikten med å redusere esteren til aldehyd var for å reagere aldehydet videre i en aldolreaksjon i neste trinn. Produktet etter aldolreaksjonen, forbindelse **44**, var som forklart på side 23 ønskelig å krysskoble med pentylsinkbromid **14** og propylsinkbromid **15** for å gi ikke-peptidfragmentene **8** og **9**.

Metyl (*R*)-(+)-3-brom-2-metylpropionat **16** ble redusert til (*R*)-3-brom-2-metylpropanal **43**, se figur 3.7 side 26, etter prosedyre utarbeidet av Olivo *et al.*³⁴ Etter quenching med MeOH og mettett vandig løsning Rochelle salt ble løsemiddelet forsiktig dampet av under redusert trykk. Det ble tatt et ¹H-NMR-spekter av råproduktet og analysen viste en enkelt topp på 9.62 ppm som er forventet område for aldehyder. Både NMR og TLC viste

imidlertid at det var nødvendig å rense råproduktet før videre bruk. Råproduktet ble derfor forsøkt rensert på kort kolonne med silikagel. Kort kolonne er en kolonne der det benyttes mindre silikagel enn flashkolonne. I tillegg blir løsemiddelet presset gjennom silikagelen med vannstrålevakuum i stedet for nitrogengass ovenfra. Kort kolonne kan benyttes når produktet som skal isoleres har en betydelig høyere R_f -verdi enn biprodukter og rester av reagenser den ønskes isolert fra. Fordelen med å bruke kort kolonne fremfor flashkolonne er lavere forbruk av silikagel og løsemidler. Rensing på kort kolonne vil også ta kortere tid enn isolering av produkt på flashkolonne.

Etter rensing på kort kolonne ble det tatt nytt $^1\text{H-NMR}$ -spekter, men resultatene var ikke som ønsket. Det var tre topper i aldehydområdet der det tidligere kun var én. Dette indikerte at forbindelse **43** enten ikke tålte å bli rensert, at den dekomponerte over tid, eller en kombinasjon av begge. I et senere forsøk ble det igjen tatt $^1\text{H-NMR}$ av råproduktet, men denne prøven ble stående noen timer før analysen ble kjørt. NMR-spekteret viste flere topper i aldehydområdet. Det kan antas at aldehyd **43** var ustabil og derfor kan ha dekomponert ved henstand.

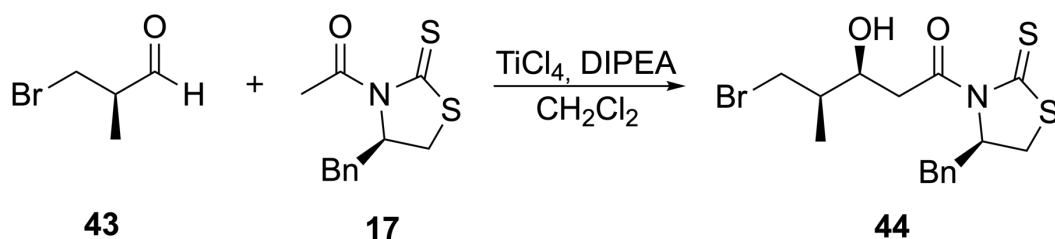


Figur 3.7: Reduksjon av forbindelse **16** til aldehydet **43**

Grunnet rask dekomponering av aldehyd **43** ble det besluttet å bruke råproduktet direkte videre i neste reaksjonstrinn, «non-Evans» syn aldolreaksjon, figur 3.8.

3.3 Asymmetrisk aldolreaksjon

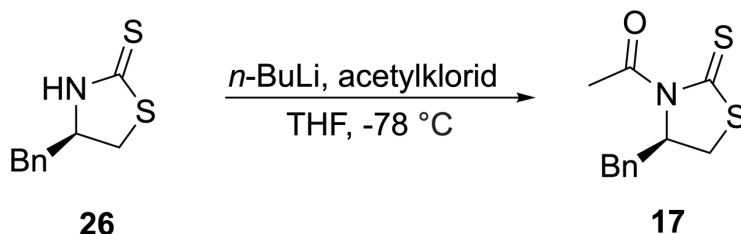
Aldolreaksjon ble forsøkt med aldehyd **43** direkte etter reduksjon med DIBAL-H og hjelpestoffet **17** som vist i figur 3.8. Før aldolreaksjonen kunne gjennomføres måtte forbindelse **17** syntetiseres.



Figur 3.8: Aldolreaksjon med forbindelse **43** og **17**.

3.3.1 Acylering av (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl) etan-1-on

Det kirale hjelpestoffet **17** som ble brukt i aldolreaksjonen var ikke kommersielt tilgjengelig, og måtte syntetiseres fra (*R*)-4-benzyltiaolidin-2-tion **26**, se figur 3.9. Dette ble gjort ved å acylere forbindelse **26** med acetylklorid ved bruk av *n*-BuLi i THF ved -78 °C, etter en prosedyre publisert av Urpí *et al.*³⁵



Figur 3.9: Acylering av (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl) etan-1-on, **17**

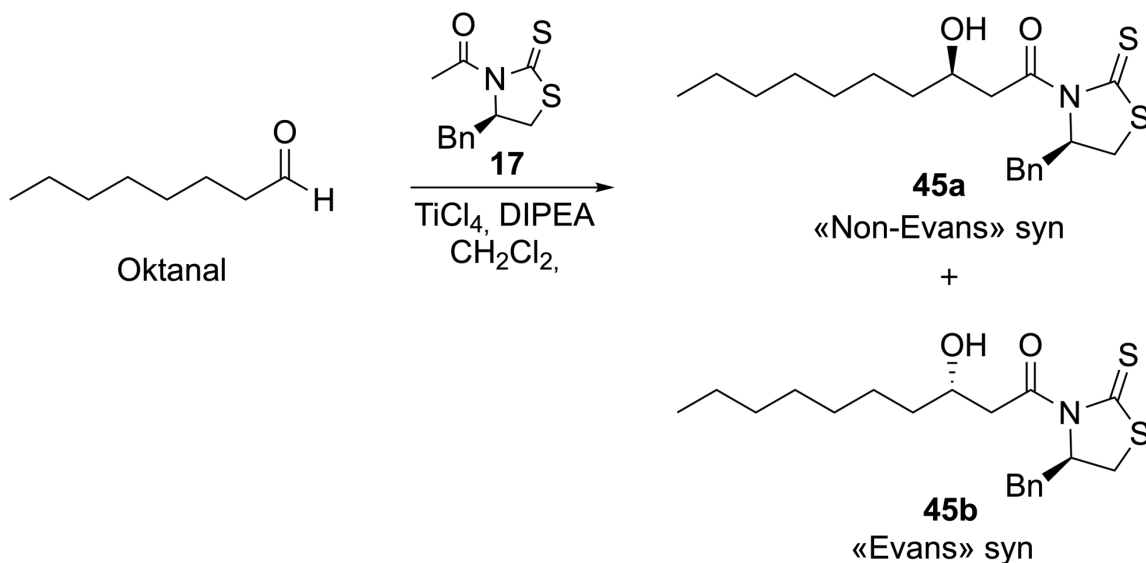
Etter opparbeidelse var råproduktet en gul olje, og etter rensing på flashkolonne var produktet et gult fast stoff. Forbindelse **17** ble bekreftet med ¹H-NMR.

3.3.2 «Non-Evans» syn aldol

Aldolreaksjon ble utført etter prosedyre publisert av Olivo *et al.* som rapporterte 92 % isolert utbytte av «non-Evans» syn aldolprodukt, 98:2 dr.³⁴ Første forsøk på aldolreaksjon mellom (*R*)-3-brom-2-metylpropanal **43** og hjelpestoffet **17** (se figur 3.8 side 26) ga kun 27 % isolert utbytte. I tillegg var diastereomerisk forhold dårligere enn forventet. Det ble observert tre nye flekker på TLC, og NMR bekreftet at to av de var produkt. Det kunne antas at både *R* og *S*-enantiomeren av aldolproduktet **44** var blitt dannet. Prosedyren ble forsøkt to ganger, men med like dårlig resultat. Siden aldehyd **43** som ble brukt var direkte reagert videre fra forrige trinn, reduksjon med DIBAL-H, var det vanskelig å bestemme hvilket trinn som ikke var optimalt. For å få klarhet i dette ble kommersielt tilgjengelig oktanal brukt som test i «non-Evans» syn aldolreaksjon, se figur 3.10 side 28. Testreaksjonen viste seg å gi like dårlig utbytte, se forsøk 1 tabell 2 side 28. Det var derfor nødvendig å utarbeide en bedre prosedyre for aldolreaksjonen.

Enolatdannelsen er den sentrale og kritiske delen av aldolreaksjonen, som beskrevet i teoridelen side 14. Det har blitt rapportert lite til ingen forskjell i utbytte og diastereomerisk forhold om det benyttes 1 eller 2 ekvivalenter med TiCl₄ og aldehyd. Det som er rapportert av betydning er ekvivalenten base som er benyttet. 1 ekvivalent DIPEA skal selektivt gi «non-Evans» syn produkt mens 2 eller mer ekvivalenter DIPEA gir «Evans» syn produkt.¹⁷ I prosedyren fulgt etter Olivo *et al.*³⁴ var det benyttet 1 eq. TiCl₄ og 1.05 eq. aldehyd, noe som i teorien er innenfor rapporterte anbefalte mengder. Ekvivalenten DIPEA derimot var på 0.47 som er under halvparten av teoretisk rapportert optimal mengde. Dette kunne være en årsak til dårlig utbytte. Selv om mindre mengde av DIPEA var brukt ble den dype rødfargen som indikerer enolatdannelsen og kompleksing med TiCl₄¹⁷ observert under reaksjonen. Under dråpevis tilsetning av oktanal ble det observert fargeendring fra dyp rød til brun før aldehydet var ferdig tilsatt.

Dette kunne om mulig være et tegn på at det ikke var mer enolat igjen i reaksjonsblandingen før all oktanalen var tilsatt. Aldolreaksjonen er avhengig av enolatdannelse for å reagere, så det kan antas at lav ekvivalent DIPEA var årsaken til lavt utbytte. Det ble forsøkt nye reaksjoner med 1 ekvivalent DIPEA, og det ble observert at rødfargen ikke forsvant under tilsetning av oktanal, men holdt seg fram til quenching med halvmettet vandig NH_4Cl -løsning. Fargeendringen observert under tilsetning av aldehyd når mindre mengde base var benyttet kan bekrefte viktigheten av basen for enolatdannelsen. For lite base i reaksjonsblandingen kan antas å hindre enolatdannelse mellom TiCl_4 og forbindelse **17**, noe som vil føre til dårlig utbytte.



Figur 3.10: Testreaksjon med oktanal for å optimalisere reaksjonsbetingelsene.

Tabell 2: Forsøk med oktanal med ulike temperaturer, mengde aldehyd og DIPEA.

Forsøk	Temp.	Eq. DIPEA	% Utbytte	45a:45b
1	-78 °C	0,47	30	64:36 ^b
2	0 °C	1	19	58:42 ^b
3	0 -> -78 °C	1	45	100:0 ^c
4 ^a	0 -> -78 °C	1	43	100:0 ^c

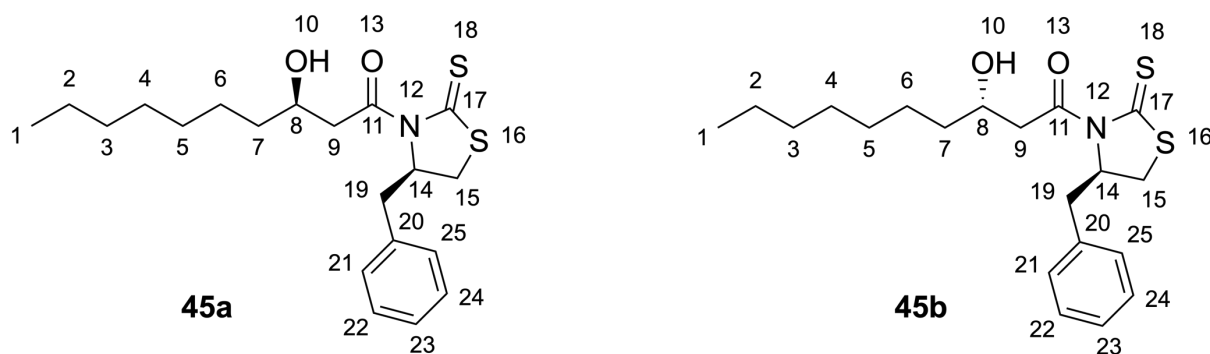
^a 2 ekvivalenter oktanal, ^b Analysert på NMR, ^c Etter observasjon på TLC

Variasjon i ekvivalent DIPEA viste at den er avgjørende for resultatet i aldolreaksjonen. Dobbel mengde aldehyd (forsøk 4, tabell 2) ga ingen markant endring i utbytte. Sammenligning av ulike artikler og prosedyrer viste at det var brukt ulike temperaturer under aldolreaksjonen. Crimmins *et al.* rapporterte høye utbytter av aldolreaksjon der hele prosedyren foregikk i 0 °C ved bruk av tiazolidintion.¹⁸ Andre rapportert høye utbytter når reaksjonen gikk ved 0 °C for så å bli kjølt ned til -78 °C før tilsetning av aldehyd.³⁶⁻³⁸ For å undersøke om temperaturen var av betydning ble det gjort forsøk med ulike temperaturer. Forsøk 2, tabell 2 gikk ved 0 °C, men ga kun 19 % utbytte, og dessuten var stereoselektiviteten dårlig. Både forsøk 3 og 4 startet ved 0 °C, og ble kjølt

ned til -78 °C før oktanal ble dråpevis tilsatt. Utbyttene på mellom 43-45 % var en forbedring, noe som bekreftet at reaksjonen bør gå i lave temperaturer. Det var planlagt å forsøke en reaksjon med oktanal der hele reaksjonen skulle gå ved -78 °C, men dette ble ikke gjort grunnet situasjonen med koronaviruset. Selv om det ikke ble forsøkt en aldolreaksjon på -78 °C med 1 eq. DIPEA tyder observerte resultater på at det er en fordel med lave temperaturer for bedre utbytte og stereoselektivitet.

3.3.3 Bestemmelse av stereokjemi

$^1\text{H-NMR}$ -spektre av forbindelse **45** ble sammenlignet med publiserte spekterdata for lignende strukturer der diastereomerisk forhold hadde blitt bestemt på HPLC (Dynamax-60 A, 1 mL/min, 30 % EtOAc/heksan).¹⁷ Spekterdataene viste en trend der «non-Evans» syn produkter ga høyere ppm-verdi på H8 enn i «Evans» syn produkter (se figur 3.11). Dette samsvarer med observerte resultater i aldolreaksjonen. Det kan derfor antas at samme trend vil gjelde for forbindelse **45a** og **45b**. «Non-Evans» syn aldolprodukt **45a** vil ha H8 med ppm-verdi 4.16, mens **45b** har H8 med ppm-verdi 4.07, som er de to diastereomerene observert på $^1\text{H-NMR}$.



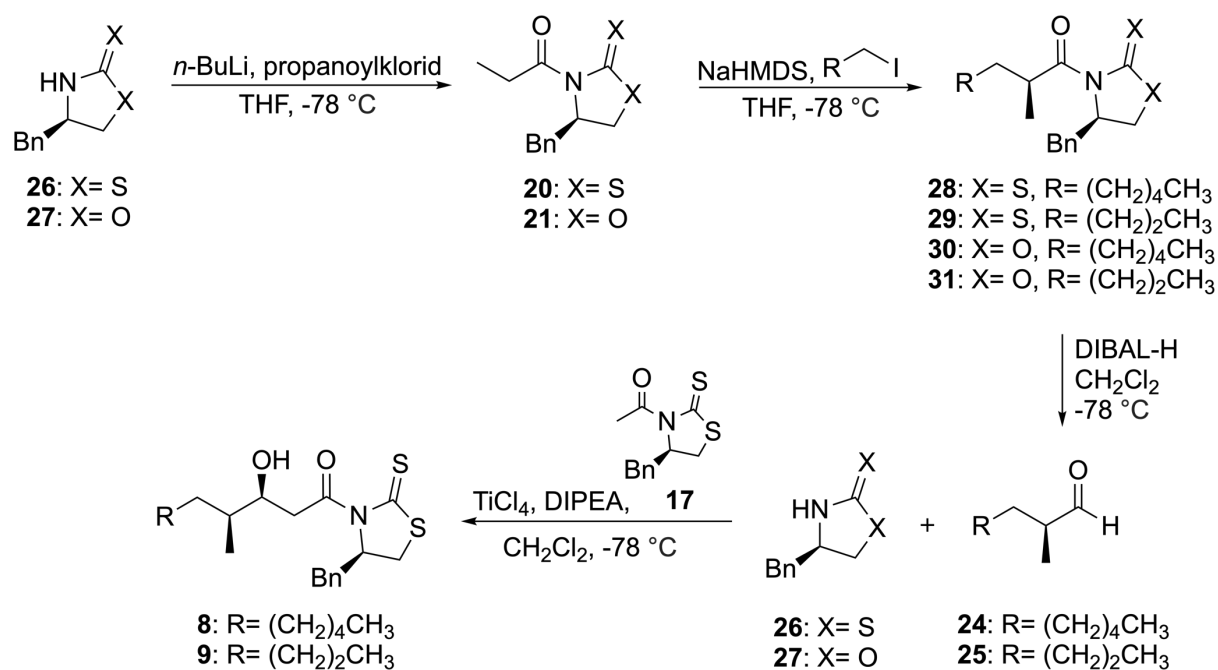
Figur 3.11: Aldolproduktene nummerert.

De to aldolproduktene var utfordrende å isolere fra hverandre da de oppførte seg likt i eluentsystemer. Forbindelse **45b** ble isolert og analysert, mens forbindelse **45a** ikke ble fullstendig isolert før etter åpning av OsloMet etter koronastenging. NMR-spektre ble tatt av forventet produkt **45a**, men viste tegn til nedbrytning. Det var etter omstendighetene ikke mulig å gjennomføre en ny aldolreaksjon.

3.4 Syntesevei B

Den opprinnelige planen for å syntetisere ikke-peptidfragmentene **8** og **9**, syntesevei A (figur 2.4 side 6), viste seg å være en utfordring grunnet mislykkede forsøk av Negishi krysskobling. Resultatene etter krysskoblingstestreaksjon med benzylbromid og propylsinkbromid **15** (figur 3.5 side 24) viste vanskeligheter med Negishi krysskobling. Organosinkreagenser er i tillegg ikke kompatible med flere vanlige funksjonelle grupper.⁶ Dette kunne potensielt gitt utfordringer med forbindelse **44** (figur 3.3 side 23) da den inneholder en hydroksylgruppe og et tioimid. Dette, i kombinasjon med begrenset tid i en masteroppgave, og den høye kostnaden til metyl (*R*)-(+)-3-brom-2-metylpropionat **16** ga grunnlag for å forsøke å syntetisere ikke-peptidfragmentene **8** og **9** uten Negishi krysskobling.

Det ble bestemt å forsøke å syntetisere ikke-peptidfragmentene **8** og **9** etter syntesevei B (figur 3.12). Syntesevei B består av flere av de samme mekanismene forsøkt i syntesevei A: acylering, reduksjon med DIBAL-H og «non-Evans» syn aldol. Det er ett trinn som er nytt, asymmetrisk alkylering med butyljodid og heksyljodid.



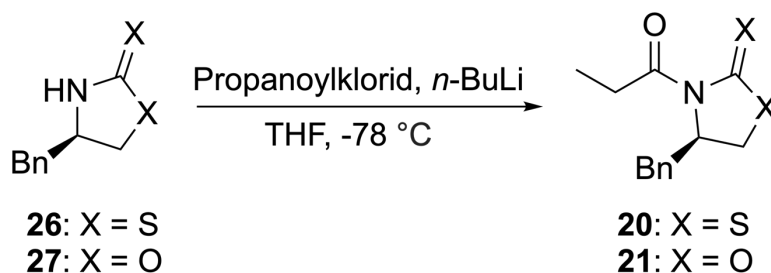
Figur 3.12: Syntesevei B.

3.5 Asymmetrisk alkylering

Asymmetrisk alkylering er rapportert ved bruk av oksazolidinon som kiralt hjelpestoff.²⁶ Det ble derfor besluttet å benytte forbindelse **21** under alkylering (se figur 3.13). Neste trinn i syntesevei B present i figur 3.12 side 30 etter alkylering er reduksjon til aldehyd med DIBAL-H. Det er rapportert direkte reduksjon til tilsvarende aldehyd fra *N*-acyl-tiazolidintion, men det ble ikke funnet lignende litteratur for *N*-acyl-oksazolidinon.¹⁸ På bakgrunn av dette ble det besluttet å forsøke alkylering med forbindelse **20** i tillegg.

3.5.1 Acylering av (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)propan-1-on **20** og (*R*)-4-benzyl-3-propionyloksazolidin-2-on **21**

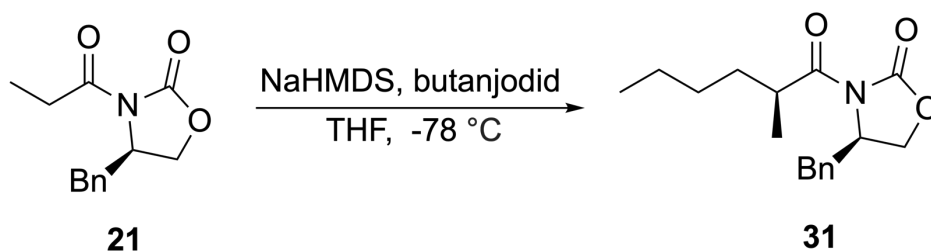
Acylering av forbindelse **20** og **21** ble utført etter samme prosedyre som ble benyttet under acylering av forbindelse **17** (avsnitt 3.3.1 side 27).³⁵ Propanoylchlorid ble benyttet i stedet for acetylchlorid. Etter opparbeidelse bekreftet ¹H-NMR riktige produkter, med høye utbytter.



Figur 3.13: Asymmetrisk alkylering ble forsøkt med både forbindelse **20** og **21**.

3.5.2 Forsøk på syntese av (*R*)-4-benzyl-3-((*S*)-2-metylheksanoyl)oksazolidin-2-on **31**

Alkylering (figur 3.14 side 32) ble forsøkt utført etter prosedyre publisert av Schinzer *et al.*³⁹ Under alkylering av forbindelse **21**, (*R*)-4-benzyl-3-propionyloksazolidin-2-on, med butanjodid ble det jevnlig tatt ut prøver til TLC. TLC-platene var vanskelige å tolke da R_f -verdien til **21** potensielt var lik produktet, forbindelse **31**. Alle TLC-prøvene som var tatt viste UV-absorpsjon med samme R_f -verdi uavhengig av hvor lenge reaksjonen hadde stått, og om butanjodid var tilsatt eller ikke. Det var derfor vanskelig å si med sikkerhet om det hadde skjedd en reaksjon. Råproduktet ble analysert på NMR. ¹H-NMR viste at utgangsstoffet **21** fortsatt var i blandingen, i tillegg til rester av reagenser. Butanjodid var i stort overskudd i reaksjonen, så det var ikke uventet at det var rester av den i råproduktet. Det var ingen tegn til produkt.



Figur 3.14: Det ble forsøkt å syntetisere forbindelse **31**.

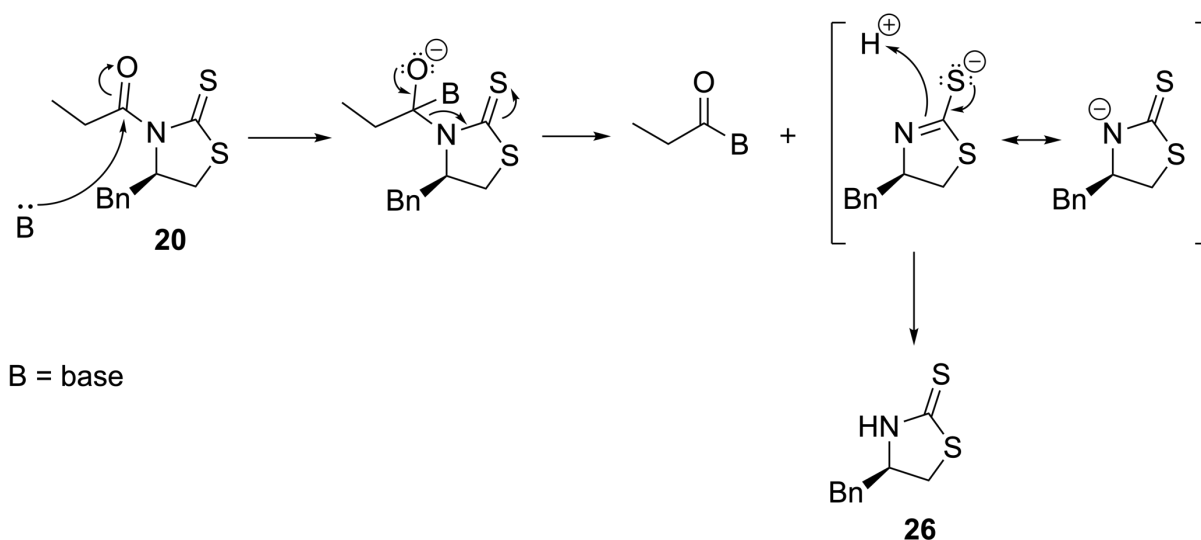
Tidligere publiserte artikler om asymmetrisk alkylering med alkyljodid viser en trend i isolert utbytte.²⁶ Evans *et al.* benyttet metanjodid og etanjodid som elektrofil under alkylering, men utbyttene viser stor forskjell mellom disse to. *N*-acyl-oksazolidinon alkylert med metanjodid ga 79 % isolert utbytte mens samme prosedyre med etanjodid kun ga 36 % isolert utbytte.²⁶ Det er en markant nedgang i utbytte, med jodreagenset som eneste variabel av betydning. Dette tyder på nedgang i reaktivitet jo større alkylkjeden er. Det kan potensielt være flere årsaker til nedsatt reaktivitet. Sterisk hindring kan være en årsak, eller at jo lenger alkylkjeden er, jo dårligere er jod som en utgående gruppe.

Det ble oppdaget litteratur der det var forsøkt lignende alkyleringsreaksjon med heksyljodid som feilet. Heksan ble gjort mer reaktiv ved å erstatte jod med triflat, og isolert utbytte ble da rapportert til 69 %.⁴⁰ Dette kan tyde på at sterisk hindring ikke er årsaken til nedsatt reaktivitet da triflat er en større utgående gruppe enn jod. Triflat er sammenlignet med jod, en bedre utgående gruppe da den negative ladningen kan stabiliseres av både svovel og tre oksygenatomer. I dette tilfellet kan det antas at årsaken til mislykkede reaksjoner var at jod ikke var en god nok utgående gruppe.

Det var ønskelig å forsøke asymmetrisk alkylering med butyltriflat og heksyltriflat, og sammenligne resultatene. Dessverre ble ikke dette mulig grunnet tidsbegrensninger i koronapandemien.

3.5.3 Forsøk på syntese av (*S*)-1-((*R*)-4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)-2-metylheksan-1-on **29**

Det ble forsøkt å alkylere (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl) propan-1-on **20** med butanjodid etter samme prosedyre som i avsnitt 3.5.2. Denne reaksjonen ble også fulgt med TLC underveis. Da basen NaHMDS og forbindelse **20** var blandet sammen i -78 °C viste TLC UV-absorpsjon sterkest på samme R_f -verdi som forbindelse **26** (se figur 3.15 side 33). Siden NaHMDS danner et enolat med forbindelse **20**, vil mest sannsynlig en TLC ikke gi et godt innblikk av hva som er i reaksjonsblandingen da enolatet trolig vil oppløses på TLC-platen. Etter tilsetning av jodbutan så TLC-platen likevel lik ut som før butanjodid ble tilsatt. Reaksjonen ble opparbeidet, og ny TLC viste samme resultatet. Det ble tatt en GC-FID av råproduktet, og den bekreftet at blandingen inneholdt mest av (*R*)-4-benzyltiaolidin-2-tion **26**. Dette var et overraskende resultat, og en indikasjon på at *N*-acyl-tiazolidintion ikke tåler NaHMDS på samme måte som *N*-acyl-oksazolidinon. Figur 3.15 side 33 viser et forslag til mekanisme for hva som kan ha skjedd under reaksjonen.



Figur 3.15: Forslag til hvordan basen spalter forbindelse **20** tilbake til utgangsstoffet **26**.

Resultatene er interessante siden de viser stor forskjell mellom oksazolidinoner og tiazolidintioner i blanding med NaHMDS. Oksazolidinoner viser ingen tegn til å bli brutt ned til utgangsstoffet. Resultatet støtter andre publikasjoner som påstår tiazolidintioner kan være en fordel å benytte i aldolreaksjon siden de lett kan spaltes av og erstattes med andre funksjonelle grupper.¹⁸ Når det gjelder asymmetrisk alkylering med NaHMDS vil ikke tiazolidintioner være anbefalt siden de ikke tåler basen. En mulig årsak til den store forskjellen kan være at svovel, selv om den er mindre elektronegativ enn oksygen, har et elektronskall mer enn oksygen og derfor er større, og mer effektiv til å stabilisere den negative ladningen.⁴¹

3.5.4 Asymmetrisk alkylering med TiCl_4 og DIPEA

Hensikten til NaHMDS under asymmetrisk alkylering var å danne enolatet av hjelpestoffet, som er det samme som skjer når komplekset med kiralt hjelpestoff, TiCl_4 og DIPEA i aldolreaksjonen dannes. Siden det allerede var bevist at *N*-acyl-tiazolidintion tåler TiCl_4 og DIPEA, ble det forsøkt å bruke samme mekanisme som i aldolreaksjonen i stedet for basen NaHMDS. Det ble ikke tilsatt et aldehyd, men butanjodid. Forhåpentligvis ville butanjodid reagere med enolatet da det var dannet et kompleks med TiCl_4 og DIPEA. Reaksjonen ble nøye fulgt med TLC, og en dyp-rødfarge i reaksjonsblandingen indikerte enolatdannelse. Butanjodid ble tilsatt ved $-78\text{ }^\circ\text{C}$ og reaksjonen ble fulgt med TLC. Etter en time var det ikke observert noen endring. Temperaturen ble derfor sakte justert opp under oppfølging på TLC. Da temperaturen nådde $0\text{ }^\circ\text{C}$ viste TLC fortsatt ingen endring, så reaksjonen ble sakte temperert til romtemperatur og sto videre på røring. Etter 12 timer ble det observert at den dype rødfargen var borte, noe som indikerte at enolat-komplekset ikke var i blandingen lenger. TLC bekreftet at det var kommet et nytt produkt, og det ble tatt $^1\text{H-NMR}$ av

dette. NMR-spekteret viste flere nye topper, men det karakteristiske mønsteret til tiazolidintion var ikke lenger i blandingen. Reaksjonen var mislykket.

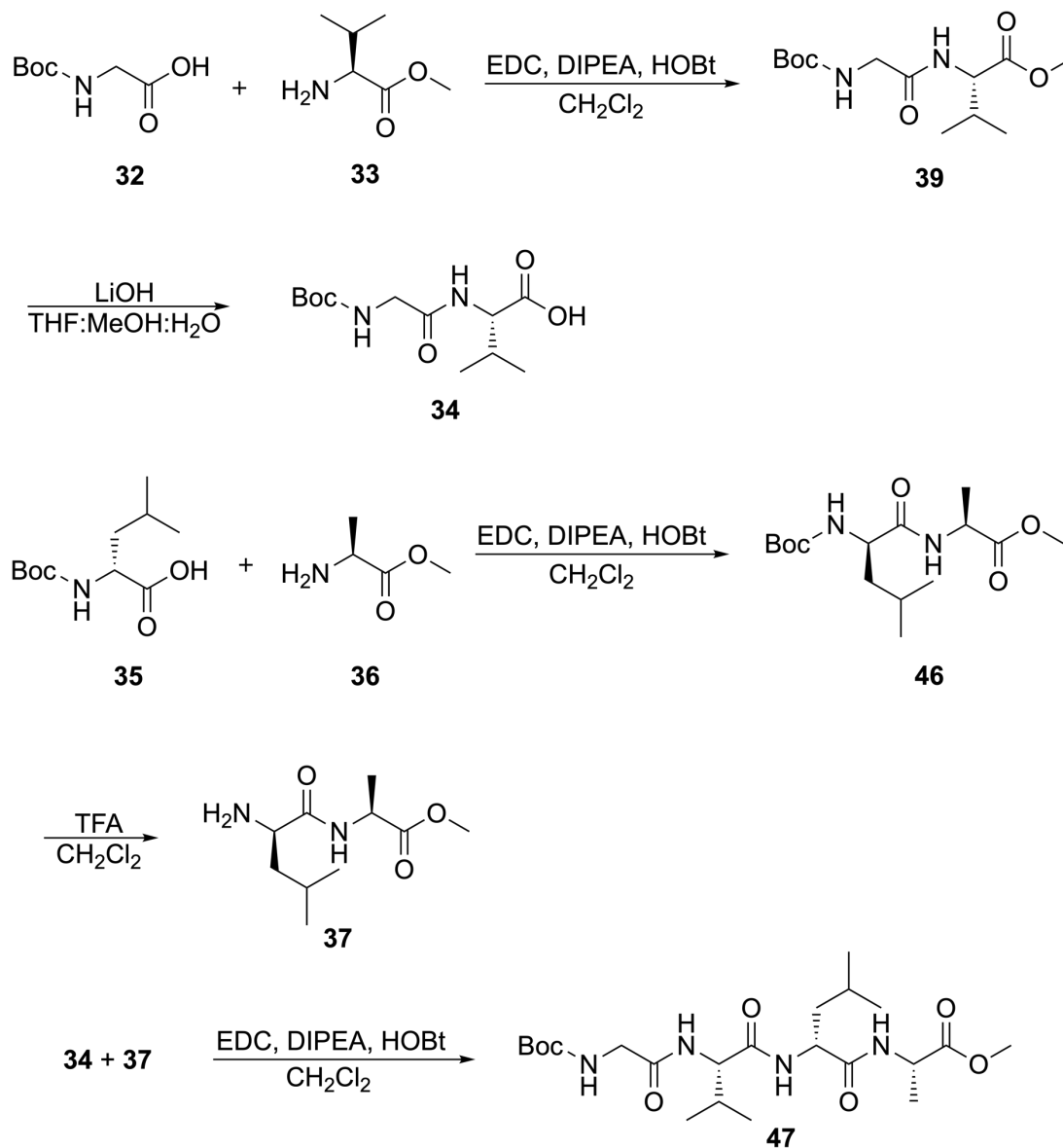
Det neste trinnet i syntesestrategien (figur 3.12 side 30) er reduksjon med DIBAL-H til aldehydet. Tidligere publikasjoner viser høye utbytter ved reduksjon av tiazolidintioner.^{18,24} Det er ikke funnet noen publikasjoner av denne typen reduksjon med oksazolidinoner som hjelpestoff, kun over to steg der korresponderende alkohol fremstilles først.³⁹ Det ville derfor vært interessant å undersøke hvilke forskjeller reduksjonen med DIBAL-H ville vist med de ulike hjelpestoffene.

Grunnet mislykkede alkyleringsreaksjoner og begrensninger grunnet koronaviruset ble det ikke arbeidet mer med denne syntesestrategien.

3.6 Peptidsyntese

Peptidsyntese var en sentral del av syntesestrategien for å oppnå målmolekylene. Peptidsyntesen foregikk i løsning da utstyr for fast fase ikke var tilgjengelig. Koblingsreagenser som ble brukt var EDC, DIPEA og HOBT. For å fjerne Boc-gruppene ble TFA brukt, og for å avbeskytte metylesteren på karboksylgruppen ble LiOH benyttet. Prosedyrene ble utført etter publikasjon av Chandrasekhar *et al.*⁴² Reaksjonene kunne følges på TLC-plater med ninhydrin som fremkallingsvæske.

Syntesestrategien presentert i syntesevei 1 (figur 2.1 side 3) ble fulgt under peptidsyntesen. Målet med syntesevei 1 var å syntetisere pentapeptidet Gly-Val-Leu-Ala-Val-OMe **7**. For å syntetisere pentapeptid **7** var det planlagt å syntetisere dipeptidene Boc-Gly-Val-OMe **39** og Boc-Leu-Ala-OMe **46** parallelt, for deretter å koble de sammen til tetrapeptidet **47**, se figur 3.16. Når tetrapeptid **47** var syntetisert vil avbeskyttelse av metylester med LiOH, deretter kobling med Val-OMe **33** gi ønsket pentapeptid **7** etter fjerning av Boc.



Figur 3.16: Syntesestrategi for tetrapeptid **47**.

3.6.1 Syntese av dipeptidet Boc-Gly-Val-OMe **39**

Dipeptidet Boc-Gly-Val-OMe **39** ble syntetisert etter prosedyre publisert av Chandrasekhar *et al.*⁴² Det ble observert på TLC at utgangsstoffene Boc-Gly og Val-OMe ikke ble fullstendig omsatt, uavhengig av om reaksjonen sto tre eller 24 timer på omrøring. I tillegg ble det observert en UV-flekk med høyere R_f -verdi enn produktet på TLC-platen. Produktet ble rensset på flashkolonne. Utbyttet ble lavere enn rapportert i litteraturen, se forsøk 1 tabell 3. Prosedyren fulgt benyttet stort overskudd av koblingsreagenser, noe som ga utfellinger i reaksjonsblandingen. Store mengder av koblingsreagenser gir mye overskudd i reaksjonsblandingen som må renses ut fra råproduktet. Det er ikke ønskelig å bruke mer reagenser enn hva som er nødvendig for å fullføre reaksjonen. En publikasjon av Chakraborty *et al.* viser til høye utbytter av peptidkoblinger ved bruk av færre ekvivalenter koblingsreagenser.⁴³ Det ble forsøk å syntetisere dipeptidet **39** under betingelsene utarbeidet av Chakraborty *et al.* Etter opparbeidelse var utbyttet høyere enn forsøket med stort overskudd koblingsreagenser, se forsøk 2 tabell 3. Det ble derfor konkludert at det ikke var nødvendig å bruke stort overskudd av koblingsreagenser.

Tabell 3: Syntese av dipeptid **39** under ulike ekvivalenter av DIPEA, HOBt og EDC.

Forsøk	Eq. 32 og 33	Eq. DIPEA	Eq. HOBt og EDC	% Utbytte
1	1	3	3	46
2	1	2	1	82
3 ^a	1	2	1	87

^a Reaksjonen ble stoppet etter 1 time.

Observasjoner på TLC viste at UV-flekken med høyere R_f -verdi enn produktet ikke dukket opp før etter 1-2 timer etter reaksjonsstart. Det ble derfor testet å avbryte reaksjonen etter 1 time (forsøk 3 tabell 3). Fordelen med å avslutte reaksjonen før UV-flekken dukket opp var at det ville være mulig å rense dipeptidet på kort kolonne i stedet for flashkolonne. Det er flere grunner til at det er ønskelig, blant annet for å spare tid, silikagel og løsemidler. Det vil også være mindre svinn av produktet under rensing på kort kolonne. Testproduktet ble rensset på kort kolonne, og isolert utbytte var enda høyere enn for reaksjoner som hadde stått i flere timer og blitt rensset på flashkolonne.

Forsøk 3 (tabell 3) ga like høyt utbytte som rapporterte utbytter i litteraturen. Til forskjell fra litteraturprosedyrer for peptidsyntese i løsning ga prosedyren utarbeidet i dette prosjektet en betraktelig kortere reaksjonstid, og en enklere metode for opparbeidelse. Forsøk 3 var derfor utført etter en prosedyre bedre enn litteraturprosedyrer.

3.6.2 Syntese av tetrapeptidet Boc-Gly-Val-Leu-Ala-OMe **47**

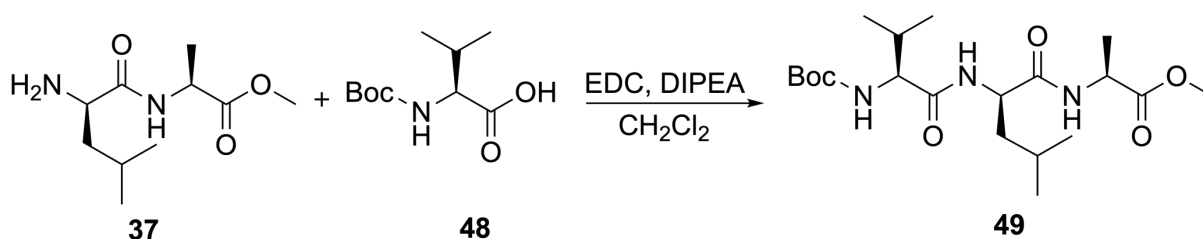
Prosedyrene publisert av Chakraborty *et al.* ble fulgt for å avbeskytte dipeptidene Boc-Leu-Ala-OMe **46** og Boc-Gly-Val-OMe **39**, se figur 3.16 side 35.⁴³ Det var ønskelig å koble disse sammen til tetrapeptidet **47**. Boc-Gly-Val-OMe ble avesterifisert med LiOH til Boc-Gly-Val-OH **34**, mens Boc-Leu-Ala-OMe fikk fjernet Boc under nærvær av TFA. Reaksjonene ble avsluttet da TLC viste fullstendig omsetting av utgangsstoff i reaksjonsblandingene. Syntese av tetrapeptid **47** ble utført under samme betingelser som dipeptidene (forsøk 3 tabell 3 side 36). Etter 1 time viste TLC-platen kun svakt spor etter produkt, og det ble besluttet at reaksjonen skulle røre videre. Etter 12 timer ble reaksjonen opparbeidet. Det var nødvendig å rense produktet på flashkolonne da det var tegn til rester av reagenser i råproduktet. Det viste seg å være vanskelig å rense tetrapeptidet på flashkolonne. Selv med god separasjon mellom produktet og rester av reagenser i utvalgt eluent kom både produkt og urenheter i samme fraksjoner. Samme råprodukt ble forsøkt rensset 3 ganger med ulike eluenter før produktet ble isolert. Råproduktet ble først forsøkt rensset på flashkolonne med EtOAc uten hell, deretter ble det forsøkt rensset med blanding av heksan og EtOAc med forhold 1:3 som eluent. Da heller ikke denne flashkromatografien ga rent produkt ble det igjen forsøkt rensset på flashkolonne med MeOH og CH₂Cl₂ i forhold 1:20 som eluent. Produktet ble isolert fra reagenser, men med lavt utbytte.

Bruk av fast fase peptidsyntese hadde vært en fordel å benytte siden det var nødvendig å koble sammen aminosyrer til et pentapeptid. Ved fast fase peptidkobling kan biprodukter og rester av reagenser enkelt vaskes bort.³¹ Om det kun skulle syntetiseres dipeptider hadde kobling i løsning vært like optimalt som fast fase, men som resultatene ved syntese av tetrapeptid **47** viser er ikke syntese i løsning optimalt.

3.6.3 Peptidsyntese uten HOBt

Prosedyren benyttet for å syntetisere tetrapeptidet **47** var ikke optimal. Det var behov for å endre prosedyren slik at produktet kunne isoleres fra biprodukter og reagenser i råproduktet. Det ble derfor tatt ¹H-NMR av isolert UV-flekk med R_f-verdi høyere enn produktet. NMR-spekteret viste at det var et biprodukt av koblingsreagenset HOBt. Det var derfor ønskelig å forsøke peptidkobling uten HOBt. I en prosedyre publisert av Tullberg *et al.* var det kun brukt EDC og NMM som koblingsreagenser. Opparbeidelsen bestod av vasking med 10 % vandig sitronsyre.⁴⁴ NMM var ikke tilgjengelig på laboratoriet, men siden det er en base ble det forsøkt å benytte basen DIPEA isteden. Prosedyren publisert av Tullberg *et al.* ble forsøkt med dipeptidet Boc-Gly-Val-OMe **39**, og etter vasking med 10 % vandig sitronsyre 3 ganger var råproduktet så rent at det ikke var nødvendig med noe videre rensing. Utbyttet ble veldig høyt, 89 %. Det kan antas at HOBt ikke var absolutt nødvendig for kobling av peptider. I teoridelen om peptidsyntese presentert på side 18 er det EDC som er koblingsreagenset mens basen som benyttes, ofte DIPEA, er en protonplukker. Basen er viktig for å aktivere metylesteraminosyren som kommersielt tilgjengelig er et hydroklorid. Den aktive formen av aminosyren er R-NH₂, og det er basen som aktiverer den fra R-NH₃⁺Cl⁻.

Kobling uten HOBt ga høyt utbytte, og det virket derfor ikke som dannelse av *N*-acylurea (figur 2.20 side 19) var problematisk. Det ble forsøkt å syntetisere tripeptid Boc-Val-Leu-Ala-OMe **49** (figur 3.18) etter avbeskyttelse av Boc til dipeptidet Leu-Ala-OMe **37**. Etter endt reaksjon og opparbeidelse viste TLC rent produkt, noe som var et godt tegn. Overraskende nok var isolert utbytte 47 %, som var lavere enn forventet (forsøk 1 tabell 4 side 40). Dette var om mulig en indikasjon på at det var behov for forbedring av prosedyre for avbeskyttelse av Boc.

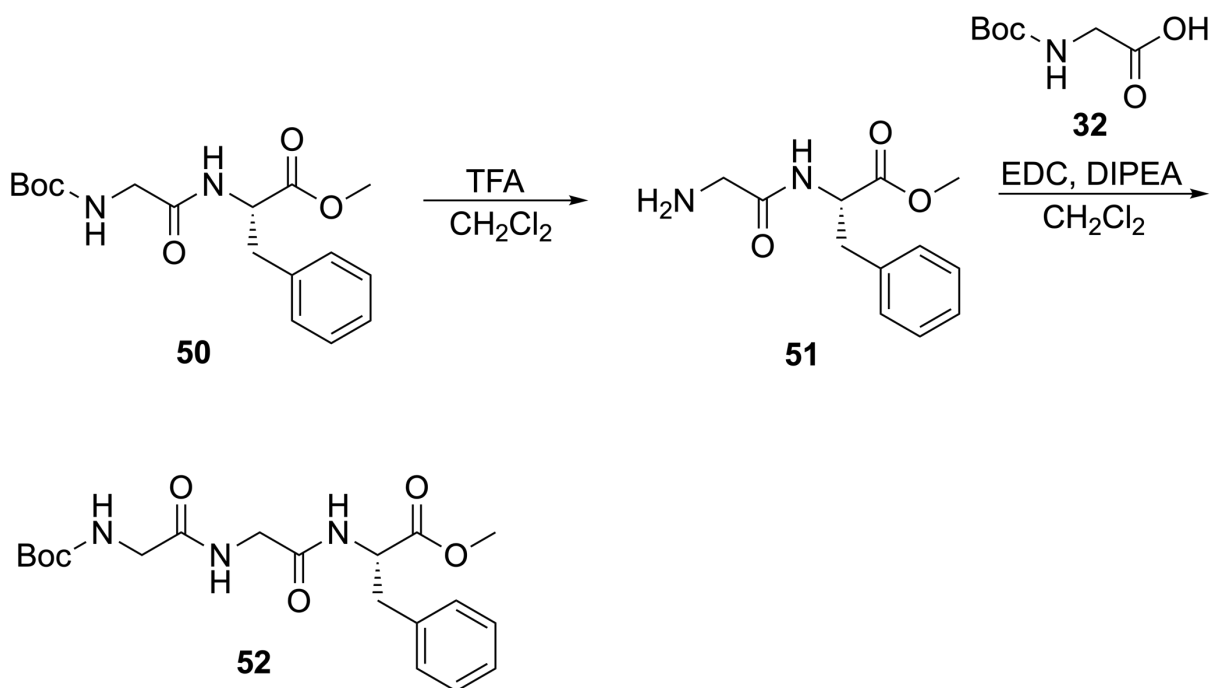


Figur 3.18: Tripeptid **49**.

3.6.4 Forbedring av prosedyre for avbeskyttelse av Boc

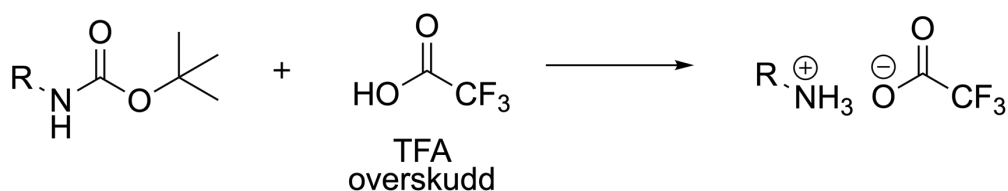
Boc-gruppen ble fjernet med syren TFA. Da reaksjonen var fullført ble kolben med reaksjonsblandingen satt direkte på rotavapor der løsemiddelet, CH₂Cl₂, og TFA ble dampet av. Etter inndampning ble råproduktet brukt direkte videre i peptidkobling. Under avbeskyttelse med TFA ble det brukt et overskudd av syren, som ble dampet av på rotavapor etter endt reaksjon. Kokepunktet til TFA er på 72.4 °C, så det er mulig at ikke alt overskuddet av TFA ble dampet av. Det var derfor ønskelig å undersøke om bruk av høyvakuum før videre kobling kunne fjerne eventuelle rester av TFA og dermed gi bedre utbytte.

Det ble testet å fjerne eventuelle TFA-rester ved å sette reaksjonskolben med Boc-avbeskyttet dipeptid Gly-Phe-OMe **51** på høyvakuum-pumpe etter inndampning på rotavapor (figur 3.19 side 39). Etter 24 timer på høyvakuum ble det observert krystalldannelse i kolben. Det ble forsøkt å koble på en ny aminosyre, Boc-Gly-OH **32**, etter prosedyre publisert av Tullberg *et al.* Ved å koble på ny aminosyre kunne utbyttet sammenlignes med tidligere koblingsforsøk. Etter endt reaksjon ble råproduktet vasket med 10 % vandig sitronsyre. TLC viste at råproduktet ikke ble isolert etter vasking. Det ble tatt ¹H-NMR av råproduktet for å undersøke hva den inneholdt. NMR-spekteret viste at det i hovedsak var Boc-Gly-OH **32** i råproduktet (forsøk 2 tabell 4 side 40). Forsøket var mislykket da det ikke ble observert produkt.



Figur 3.19: Testreaksjon med tripeptid **52** som produkt.

Ved å se nærmere på reaksjonsmekanismen for avbeskyttelse med TFA kan det lave utbyttet forklares. Når Boc-gruppen er fjernet fra aminosyren blir det dannet et salt mellom TFA og aminosyren, se figur 3.20.



Figur 3.20: TFA og aminosyren blir et salt.

Under peptidkobling er den aktive formen av aminet R-NH₂, og det er basen DIPEA som plukker det ekstra protonet slik at aminet blir aktivert. I prosedyren fulgt etter Tullberg *et al.* var ekvivalenten DIPEA lik ekvivalenten av avbeskyttet Boc-peptid.⁴⁴ Det kunne dermed være en mulighet at mengden DIPEA var for liten i forhold til TFA om det var et overskudd av TFA tilstede i råproduktet, selv etter 24 timer på høyvakuum. For å undersøke dette ble det benyttet pH-sticks for å følge pH etterhvert som DIPEA ble tilsatt kolben med TFA-Gly-Phe-OMe **51**. Da det var tilsatt lik mengde DIPEA som TFA-Gly-Phe-OMe var reaksjonsblandingen fortsatt sur, pH 5. Etter at ytterligere 0.3 ekvivalenter med DIPEA var tilsatt, ble pH målt til mellom 7 og 8. Det ble da forsøkt peptidkoblingsreaksjon. Etter endt reaksjon viste TLC tydelig produkt i tillegg til noen rester etter reagenser. Etter opparbeidelse med 10 % vandig sitronsyre var råproduktet rent, og det var ikke nødvendig med videre rensing. Isolert utbyttet ble 76 %, forsøk 3 tabell 4 side 40. Dette var et høyt utbytte, og det viser at DIPEA var viktig for å aktivere aminet slik at peptidkoblingen ble vellykket.

Tabell 4: Oversikt over utbytte av peptidkobling etter avbeskyttelse av Boc.

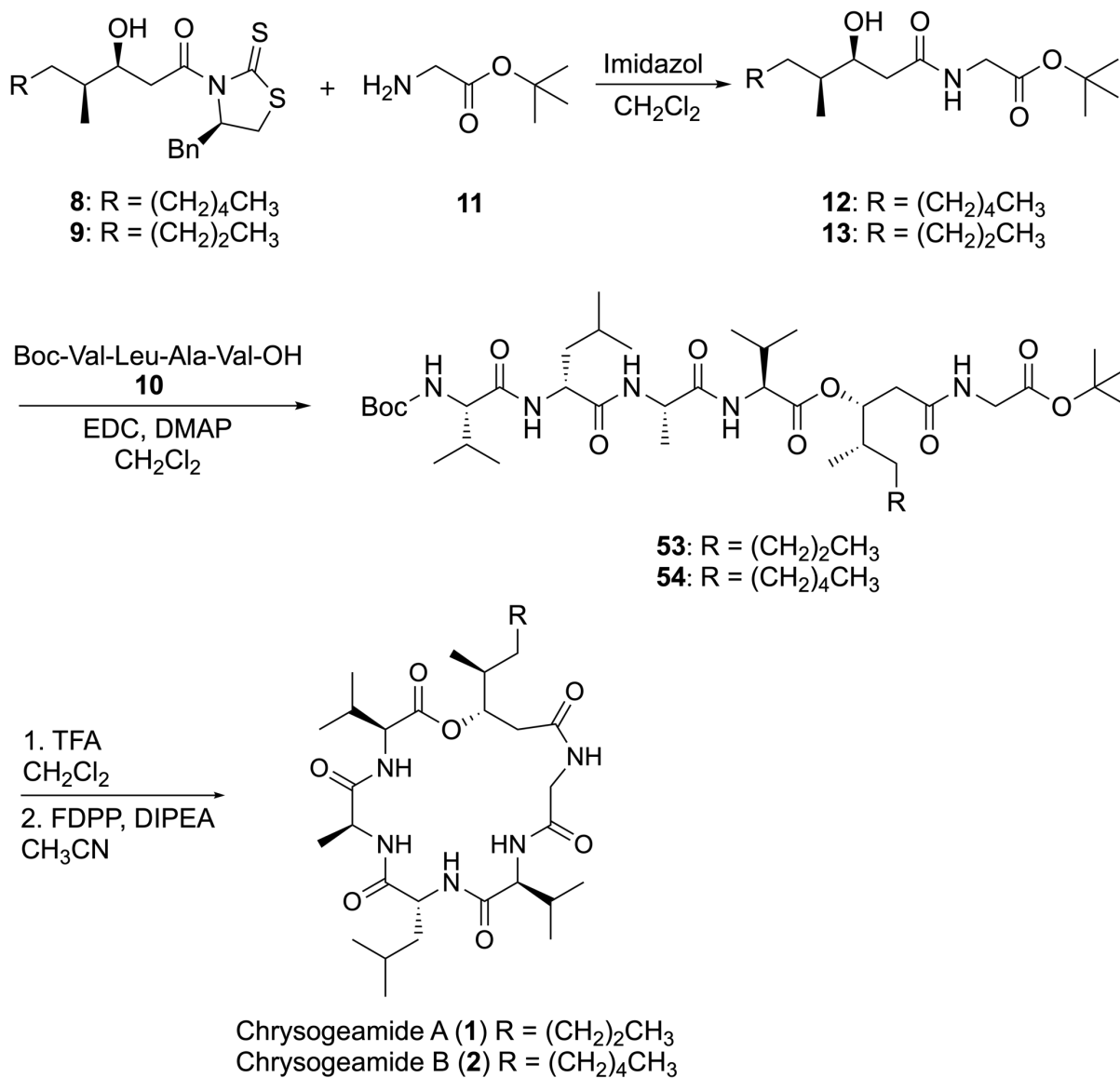
Forsøk	Produkt	Eq. DIPEA	Timer på høyvakuumb	% Utbytte
1	49	1	0	47 ^b
2	52	1	24	0 ^c
3	52	1.3	24	76 ^b

^a Før peptidkobling, ^b Isolert utbytte, ^c ¹H-NMR av råprodukt

3.7 Syntesevei 2

Det ble oppdaget at lignende strukturer som chrysogeamide A og B tidligere er forsøkt syntetisert. En lignende syntesestrategi som presentert i syntesevei 1 figur 2.1 side 3 ble forsøkt, men feilet under makrosyklisering med Steglich esterifisering.⁴⁵ Denne problemstillingen ble løst ved å koble aminosyrer på begge endene av ikke-peptidfragmentet først, for så å makrosyklisere med peptidkobling som siste trinn ved bruk av koblingsreagensene FDPP og DIPEA. På bakgrunn dette ble det besluttet å følge retrosyntetisk analyse presentert i figur 2.2 side 4, syntesevei 2.

Syntesevei 2 (figur 3.21) ble utarbeidet basert på vellykkede synteser av lignende strukturer.⁴⁶ Målet var å syntetisere aminolyseproduktene **12** og **13**, og koble disse med tetrapeptidet Boc-Val-Leu-Ala-Val-OH **10** under Steglich esterifisering. Forbindelse **53** og **54** kan makrosyklisere ved å fjerne Boc og *t*-butylester med TFA før syklisering med FDPP og DIPEA for å oppnå målmolekylene.

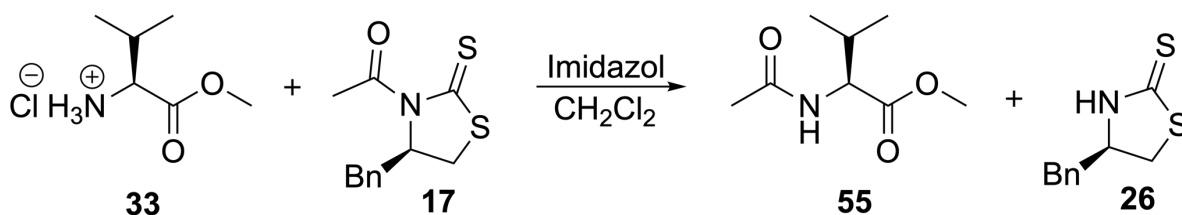


Figur 3.21: Syntesevei 2.

For å følge syntesevei 2 (figur 3.21 side 41) måtte ikke-peptidfragmentene **8** og **9** syntetiseres. Disse forbindelsene hadde ikke blitt syntetiser grunnet utfordringer med både Negishi krysskobling og asymmetrisk alkylering. Under test av aldolreaksjonen ble forbindelse **45a** syntetisert. Aldolproduktet **45a** ligner strukturelt på ikke-peptidfragmentene **8** og **9**, eneste forskjellen er en kiral metylgruppe. Aldolproduktet **45a** ble brukt som en test i aminolysetrinn, se figur 3.23 side 43. Det var ønskelig å forsøke syklisering med test-aldolproduktet **45a** da ikke-peptidfragmentene **8** og **9** ikke ble syntetisert.

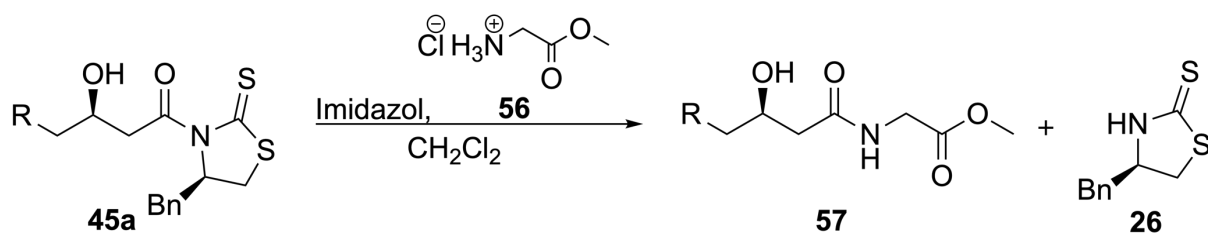
3.8 Aminolysetest

Det ble gjennomført en aminolysetest etter prosedyren beskrevet av Nagao *et al.*⁴ Testen ble gjort med valin metylester hydroklorid **33** og forbindelse **17** (figur 3.22). Forbindelse **33** ble løst i CH₂Cl₂ og deretter overført til en løsning av forbindelse **17** i CH₂Cl₂. Det ble satt opp to parallelle reaksjoner. Forsøk 1 tabell 5 side 44 der forbindelse **33** og **17** ble løst i CH₂Cl₂ i romtemperatur, og forsøk 2 tabell 5 side 44 der det i tillegg ble tilsatt 3 ekvivalenter av basen imidazol. Imidazol ble tilsatt fordi aminosyren valin **33** var et hydroklorid, og det tidligere var rapportert bruk av imidazol i aminolysereaksjoner ved bruk av hydroklorid-versjonen av aminet.¹⁸ Ved reaksjonsstart var begge reaksjonsblandingene gule, og det var liten visuell endring etter to timer. Reaksjonen sto videre på røring i romtemperatur. Etter 12 timer var forsøk 1 tabell 5 side 44 fortsatt gul i fargen, og TLC viste ingen endring. Forsøk 2 tabell 5 side 44 hadde blankt innhold med hvite utfellinger. TLC viste fullstendig omsatt utgangsstoff **17**, i tillegg til sterk UV-absorpsjon på samme R_F-verdi som tidligere observert for forbindelse **26**. Det var kun litt rester igjen etter forbindelse **33** på TLC, og i tillegg var det en ny flekk på TLC som ble synlig under fremkalling med kaliumpermanganat. Valin **33** var i overskudd i reaksjonen, så det kunne forklare hvorfor den ikke var blitt fullstendig omsatt. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet og rensert på kort kolonne med eluentgradiering. ¹H-NMR bekreftet produkt, med et isolert utbytte på 78 % (forsøk 2 tabell 5 side 44).



Figur 3.22: Aminolysetest ga høye utbytter med imidazol.

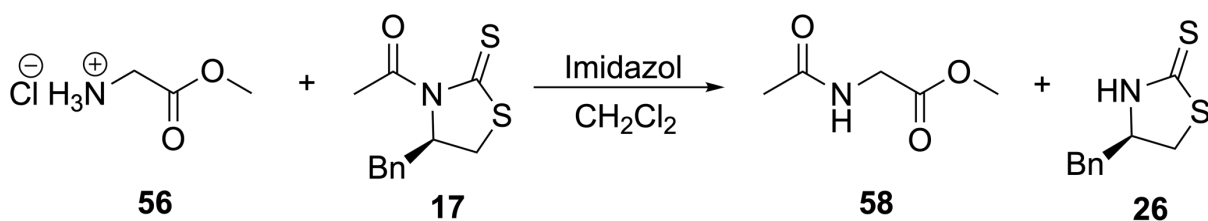
Siden forbindelsene **8** og **9** ikke hadde blitt syntetisert ble aminolyse testet med Gly-OMe HCl **56** og aldolproduktet **45a** for å gi forbindelse **57**, se figur 3.23 side 43. I syntese-strategien presentert i figur 3.21 side 41 er det *tert*-butylesteren av glysin **11** som skal benyttes, men siden den var kostbar ble det testet med metylester i første omgang.



R = (CH₂)₅CH₃

Figur 3.23: Aminolyse med aldolproduktet **45a**.

Det ble observert at Gly-OMe HCl **56** ikke var løselig i CH₂Cl₂. Dette gjorde overføringen av forbindelse **56** til reaksjonskolben med forbindelse **45a** vanskelig. Det var derfor ikke mulig i utføre reaksjonen på samme måte som testreaksjonen med valin **33** og **17** (forsøk 1 og 2 tabell 5 side 44). Forbindelse **56** ble tilsatt som tørrstoff direkte i reaksjonskolben med forbindelse **45a**, etterfulgt av imidazol, forsøk 3 tabell 5 side 44. Etter 24 timer under omrøring var fargen på reaksjonsblandingen fortsatt gul, og TLC viste ingen nye produktflekker. Det var i tillegg vanskelig å se om det var blitt dannet noe av forbindelse **26** siden R_f-verdiene til **26** og **45a** var like, uavhengig av type eluent som ble brukt. Forbindelse **26** er ønsket biprodukt etter endt reaksjon, se figur 3.23. Det ble antatt at årsaken til at reaksjonen var mislykket hadde sammenheng med at forbindelse **56** ikke var løselig i CH₂Cl₂. Det ble derfor testet å blande imidazol i en kolbe med Gly-OMe HCl **56** i CH₂Cl₂. Det ble straks «nye» hvite utfellinger. Dette ble overført med en glasspipette til en kolbe med forbindelse **45a** (forsøk 4 tabell 5 side 44). Tilsvarende ble også gjort til en annen kolbe med forbindelse **17** figur 3.24 (forsøk 5 tabell 5 side 44). Etter 12 timer var kolben med forbindelse **17** og **56** blitt blank med hvite utfellinger, og TLC bekreftet ønsket biprodukt **26**. Forsøk 4 tabell 5 side 44, reaksjonen med aldolprodukt **45a** og glysin **56** var fortsatt gul. TLC viste ingen endring. Resultatet tydet på at løseligheten til forbindelse **56** ikke hadde noen betydning for aminolysereaksjonen da forsøk 5 tabell 5 side 44 var vellykket. Det ble forsøkt å bruke DIPEA som base i stedet for imidazol, men heller ikke dette ga produkt (forsøk 6 tabell 5 side 44). Aminolyseprodukt **57** ble ikke syntetisert. Det kunne antas at noe ved forbindelse **45a** var årsaken til mislykkede forsøk.



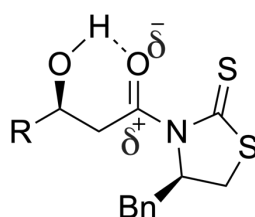
Figur 3.24: Aminolyse mellom Gly-OMe **56** og forbindelse **17**.

Tabell 5: Forsøk på aminolyse med ulike reagenser og baser.

Forsøk	Reagens 1	Reagens 2	Base	Produkt	% Utbytte
1	33	17	-	55	0
2	33	17	Imidazol	55	78 ^b
3 ^a	56	45a	Imidazol	57	0
4	56	45a	Imidazol	57	0
5	56	17	Imidazol	58	100 ^c
6	56	45a	DIPEA	57	0

^a Forbindelse **56** og imidazol ble tilsatt reaksjonskolben tørt, ^b Isolert utbytte, ^c Vurdert på TLC

Forskjellen mellom forbindelse **17** og **45a** er hydroksylgruppen, samt lengden på karbonkjeden. Posisjonen til hydroksylgruppen er slik at det kan dannes en intramolekylær hydrogenbinding mellom karbonylen og hydrogenet, se figur 3.25. Det antas at dette vil føre til at karbonet som i utgangspunktet vil være elektrofilt vil bli enda mer elektrofilt, og enda mer utsatt for angrep av en nukleofil.



Figur 3.25: Hydroksylgruppen vil i teorien føre til sterkere δ^+ -ladning på karbonet enn uten hydroksylgruppen.

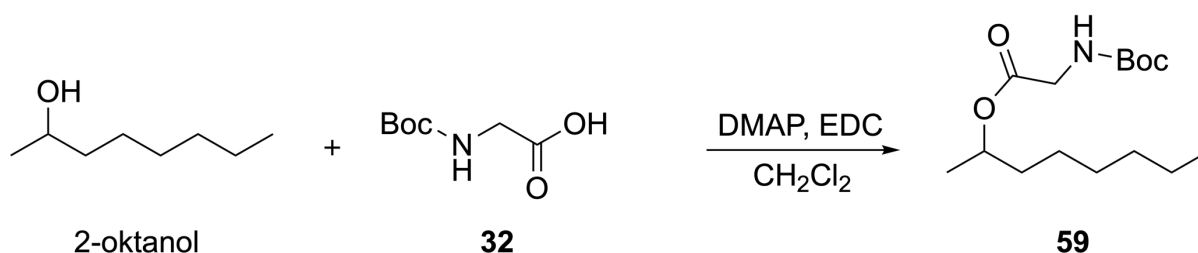
I teorien vil dette føre til at reaksjonen bør skjer raskere. Crimmins *et al.* har rapportert aminolyse med aldolprodukter, altså med en hydroksylgruppe i samme posisjon som forbindelse **45a**, med utbytte på 77 %.¹⁸ Det var derfor overraskende at det ikke ble dannet produkt, og det var vanskelig å finne en forklaring på hvorfor dette var tilfellet.

En mulig forklaring var at forbindelse **45a** ikke var intakt ved reaksjonsstart. En GC-FID av forbindelse **45a** som var brukt i aminolyseforsøkene viste tegn til urenheter som ikke var synlig på TLC. Disse urenheterne kunne potensielt være oktanal som ikke hadde reagert under aldolreaksjonen og ikke blitt borte under rensing på kolonne. Dette ville potensielt føre til at mengde **45a** oppveid var feil.

¹H-NMR av forbindelse **45a** før aminolyse ville avslørt mulige rester av reagenser eller biprodukter. Det ble antatt at urenheter fra aldolprodukt **45a** var årsaken til mislykkede aminolysereaksjoner. Det var ønskelig å ta ¹H-NMR av aldolprodukt **45a** før aminolyseforsøk, men dette kunne ikke utføres grunnet stenging av universiteter. Om NMR hadde vist at aldolproduktet **45a** var rent men likevel ikke ga produkt under aminolyseforsøk kunne katalytiske mengder av DMAP forsøkes tilsatt. DMAP er en sterk base, og den vil, som vist i figur 3.15 side 33, spalte av forbindelse **26**. Det kan antas at dette ville forkortet reaksjonstiden.

3.9 Test av Steglich esterifisering

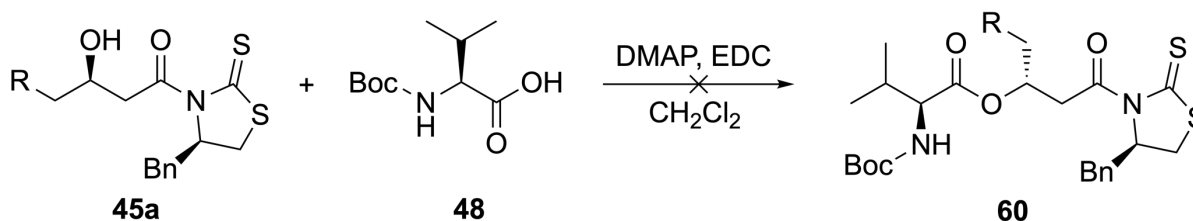
Prosedyren som ble fulgt var utarbeidet av Pradhan *et al.*⁴⁶ Reagensene som ble brukt i denne prosedyren var DCC og DMAP i CH₂Cl₂. DCC var ikke tilgjengelig på laboratoriet, så det ble testet om bruk av EDC ville gi samme resultat. DCC og EDC er relativt like strukturelt sett, men det er ofte en fordel å bruke EDC da den er lettere å vaske bort fra råproduktet. Testen som ble utført var mellom Boc-Gly-OH **32** og 2-oktanol, se figur 3.26. Det ble tilsatt katalytiske mengder DMAP, og 3 ekvivalenter av EDC. TLC viste umiddelbart etter reaksjonsstart en ny flekk samtidig som Boc-Gly ikke lenger var synlig. Reaksjonen sto på røring i 3 timer før den ble opparbeidet da TLC ikke viste noen endring. Etter opparbeidelse viste TLC-platen et relativt rent råprodukt, og det ble tatt ¹H-NMR av dette. NMR-spekteret bekreftet at forventet produktet **59** var dannet.



Figur 3.26: Test med 2-oktanol var vellykket.

Aminolyseproduktene **12**, **13** og **57** hadde ikke blitt syntetisert. Det var derfor ikke mulig å utføre Steglich esterifisering som planlagt i syntesevei 2 (figur 3.21 side 41). Derimot ble det testet å esterifisere Boc-Val-OH **48** og aldolproduktet **45a** for å undersøke om det kunne være mulig å endre på rekkefølgen i syntesevei 2. I så fall kunne det undersøkes om esterifiseringen kunne gjøres før aminolyse, og kanskje det kunne gi bedre resultater for aminolysereaksjonen.

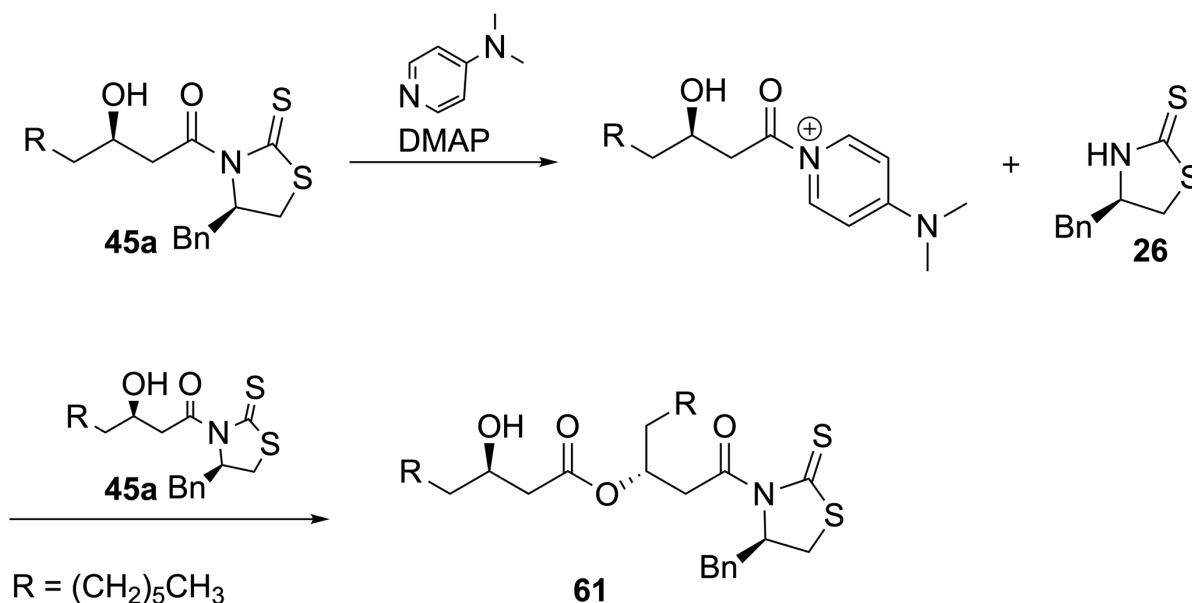
Steglich esterifisering med Boc-Val-OH **48** og forbindelse **45a** (figur 3.27) ble forsøkt utført etter samme prosedyre som testreaksjonen mellom 2-oktanol og glysin **32** figur 3.26. Reaksjonen ble fulgt med TLC, og den viste at jo lenger reaksjonen sto, jo mer «grums» som ble dratt oppover fra grunnlinja ble synlig. Samtidig var det heller ikke noe tegn til nytt produkt. Reaksjonen ble opparbeidet selv om det fortsatt ikke noe tegn til produkt. DMAP er en base og en nukleofil, og det finnes en mulighet for at den kan reagere inn på karbonylgruppen til forbindelse **45a** og spalte av forbindelse **26** som vist i figur 3.15, side 33.



R = (CH₂)₅CH₃

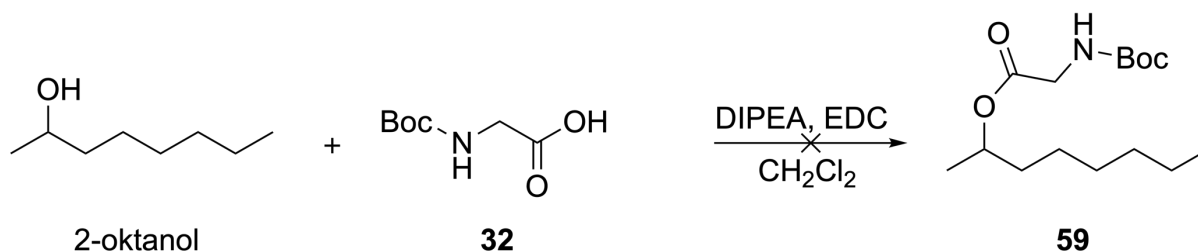
Figur 3.27: Det ble forsøkt Steglich esterifisering mellom aldolprodukt **45a** og Boc-Val-OH **48**.

At DMAP kan føre til at forbindelse **45a** spalter av forbindelse **26** forklarer likevel ikke grumset i UV-lys som observeres på TLC. En mulig forklaring kan være at det har skjedd en Yamaguchi esterifisering. Yamaguchi esterifisering er dannelse av en ester fra et anhydrid og en alkohol med DMAP som katalysator.⁴⁷ Dermed kan det ikke utelukkes at det kan ha oppstått en form for dimerisering og dannelse av forbindelse **61**, som vist i figur 3.28.



Figur 3.28: Yamaguchi esterifisering.

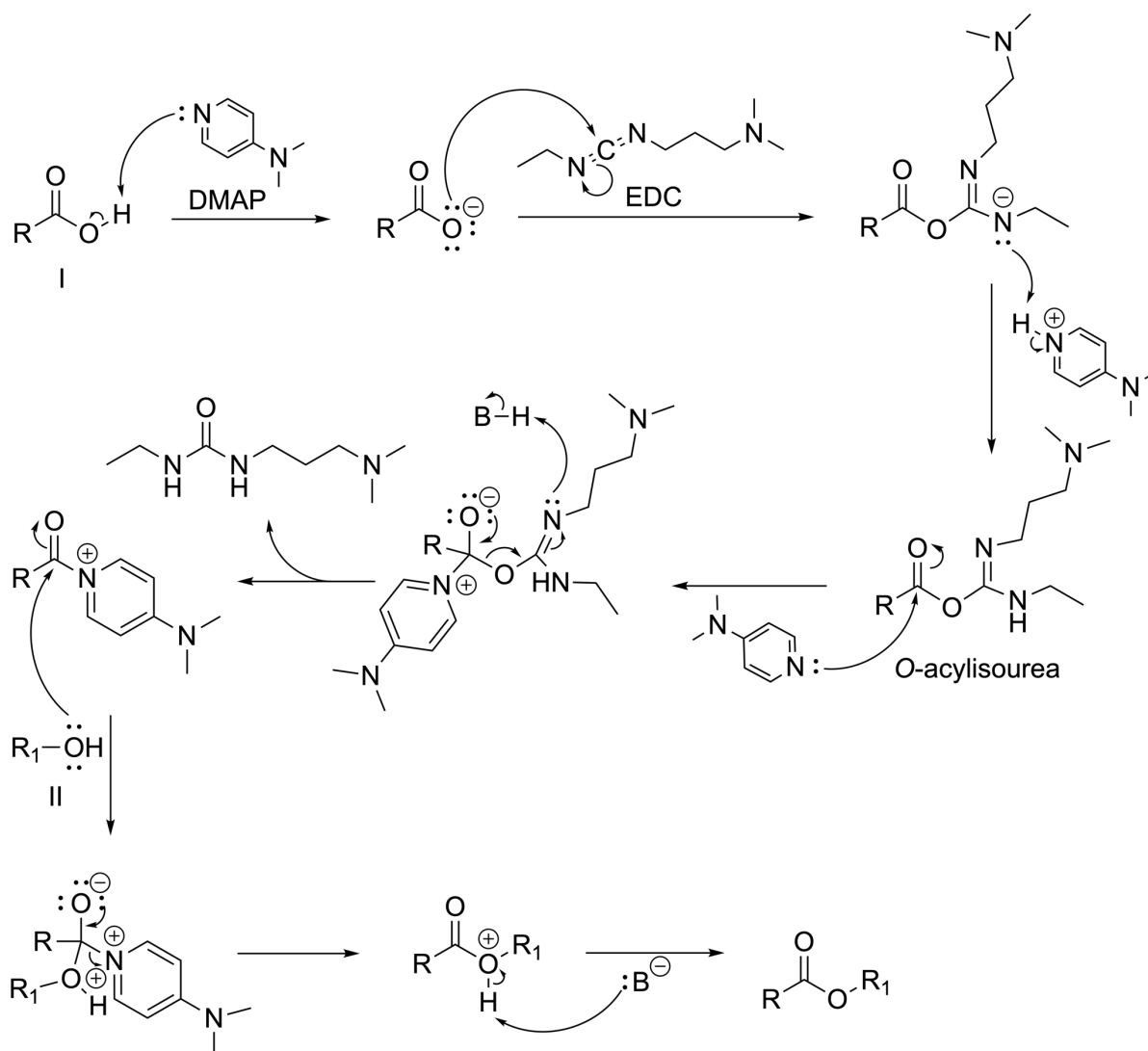
DMAP kan tenkes å erstattes med en annen base som ikke er en nukleofil. DIPEA er en base, men den er ikke en nukleofil. Det ble derfor testet om 2-oktanol og Boc-Gly-OH **32** ville reagere om DMAP ble erstattet med DIPEA. Reaksjonen ble fulgt med TLC, men det ble ikke noe produkt uten DMAP som vist i figur 3.29.



Figur 3.29: Uten DMAP som katalysator blir det ikke produkt.

For å få ønsket produkt er det nødvendig med katalytiske mengder DMAP, og den kan ikke erstattes med en annen base som ikke også er en nukleofil. For å forstå hvorfor dette er tilfellet er det nødvendig å undersøke hvilken funksjon DMAP har i reaksjonsmekanismen (figur 3.30 side 47). Karboksylsyren blir aktivert til O-acylisourea av EDC. Deretter er det foreslått at DMAP, på samme måte som i Yamaguchi esterifiseringen, vil reagere inn ved det elektrofile karbonyl-karbonet. Intermediatet med

DMAP er mer stabil enn *O*-acylisourea, noe som undertrykker uønskede sidereaksjoner. I tillegg er det lettere for hydroksylgrupper å reagere inn og danne en ester med DMAP-intermediatet, se figur 3.30.^{5,48}



B = Base
 I = Boc-Gly **32**
 II = 2-oktanol

Figur 3.30: Reaksjonsmekanisme for Steglich esterifisering mellom Boc-Gly **32** og 2-oktanol.⁴⁸

DMAP sin rolle i mekanismen er derfor som en nukleofil, og den kan ikke erstattes med DIPEA som ikke er en nukleofil.

Forbindelse **45a** (figur 3.28 side 46) kunne ikke esterifiseres ved bruk av DMAP og EDC med Boc-Val-OH **48** uten uønskede sidereaksjoner. Det var derfor essensielt at aminolysetrinnet var først, som planlagt i syntesevei 2 (figur 3.21 side 41).

4. Konklusjon

Målet med denne masteroppgaven var å syntetisere og teste antimikrobiell effekt av to forbindelser, chrysogeamide A og B. Målet ble ikke oppnådd da syntesestrategiene utarbeidet ga uforutsette utfordringer som førte til mislykkede forsøk. Negishi krysskobling som var en del av syntesevei A ga kun sidereaksjoner som β -hydrid eliminasjon og homokobling. Asymmetrisk alkylering med butyljodid og heksyljodid som var en del av syntesevei B var heller ikke vellykket, tross forsøk med både oksazolidinon og tiazolidintion som kiralt hjelpestoff.

Aldolreaksjonen viste også utfordringer med lavere utbytte enn forventet, i tillegg til dårligere selektiv stereokjemi enn rapportert i litteraturen. Ulike temperaturer og ekvivalenter av reagenser ble prøvd ut, men høyeste utbytte var likevel ikke mer enn 45 %. Aldoltestreaksjon med aldehydet oktanal ga forbindelse **45a** som ble brukt som test for den planlagte syntesestrategien for syklisering. Forsøk med å koble forbindelse **45a** med glysin ved aminolyse ga ikke produkt. Esterifisering mellom forbindelse **45a** og valin ble forsøkt, men var mislykket da uønskede sidereaksjoner med katalysatoren DMAP fant sted.

Peptidsyntese var en vesentlig del av prosjektet, og viste høye utbytter ved syntese av dipeptider. Likevel, ved syntese av tripeptid eller tetrapeptid ble det utfordrende å få rensert produktet fra reaksjonsreagenser, og dette førte til mye arbeid ved opprensing og lave utbytter. Det ble forsøkt peptidkobling uten koblingsreagensen HOBt, noe som gjorde opprensingen betraktelig lettere, og med høyere utbytter.

Det gjenstår fortsatt mye arbeid for å utvikle en god syntesestrategi for å syntetisere mål-molekylene. Forhåpentligvis vil resultatene i denne masteroppgaven gi viktig informasjon til videre arbeid i syntese av chrysogeamide A og B.

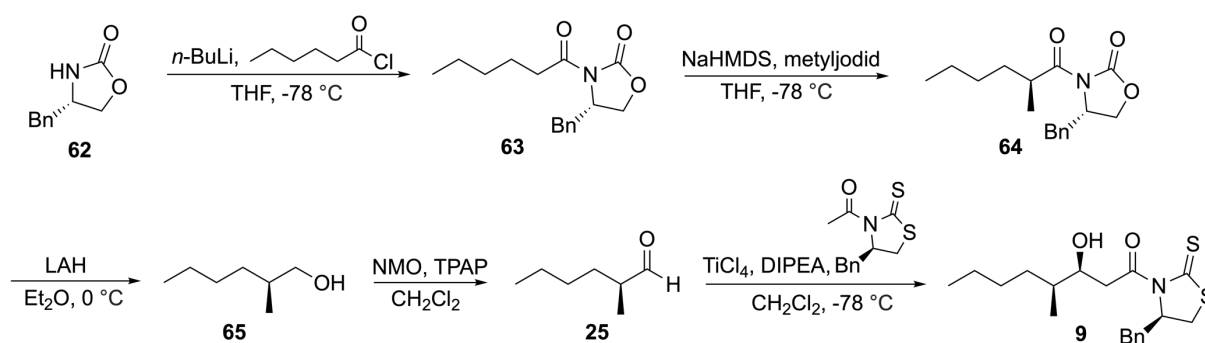
5. Fremtidig arbeid

Målemolekylene ble ikke fremstilt og testet for antimikrobiell effekt. Syntesestrategien har behov for videre utarbeidelse før målmolekylene kan syntetiseres. Denne delen av masteroppgaven vil ta for seg forslag til videre forskning for å syntetisere chrysogeomide A og B.

Den opprinnelige planen for å syntetisere ikke-peptidfragmentene **8** og **9** feilet grunnet sidereaksjoner som undertrykket dannelse av produkt under Negishi krysskobling. Det er rapportert at større sterisk hindring på NHC-liganden kan gi en hemmende effekt for β -hydrid eliminasjon.⁹ Det kunne derfor vært forsøkt å benytte katalysatoren Pd-PEPSSI-IPent for å undersøke om den kunne gi mindre β -hydrid eliminasjonsprodukt **42**. Det er likevel stor sannsynlighet for sidereaksjon grunnet konjugasjon i eliminasjonsproduktet.

Syntesevei B for ikke-peptidfragmentene **8** og **9** med asymmetrisk alkylering var mislykket grunnet en for lite reaktiv utgående gruppe på elektrofilen. En mulighet for å løse denne problemstillingen ville vært å bytte ut den utgående gruppen jod med triflat. Det er publisert asymmetrisk alkylering med heksyltriflat og *N*-acyl-oksazolidinon som kiralt hjelpestoff.⁴⁰ Om det ikke er mulig å benytte seg av triflatet ville en annen mulighet være å ha motsatt stereokjemi på hjelpestoffet, og acylert med heksanoylklorid og oktanoylklorid. Dermed kunne elektrofilen under alkyleringen være metyljodid, som det gjentatte ganger er rapportert høye utbytter på.²⁶

Ved bruk av oksazolidinon er det uvisst om DIBAL-H ville gi aldehydet direkte slik som rapportert for tiazolidintion. Oksazolidinon har vist seg å være mer robust, og det kan ikke garanteres at den vil spaltes av på samme måte som tiazolidintion. Det er rapportert høye utbytter ved å redusere til alkoholen med LAH for deretter å oksidere til aldehydet ved bruk av TPAP/NMO.³⁹ Videre vil «non-Evans» syn aldol gi ikke-peptidfragmentene **8** og **9**. Lavt utbytte av aldolreaksjonen gir grunnlag for forbedring av dette trinnet. Lave temperaturer viste bedre resultater, og derfor bør det forsøkes å utføre hele reaksjonen på -78 °C. Se figur 5.1 for forslag til ny syntesestrategi for ikke-peptidfragmentene.

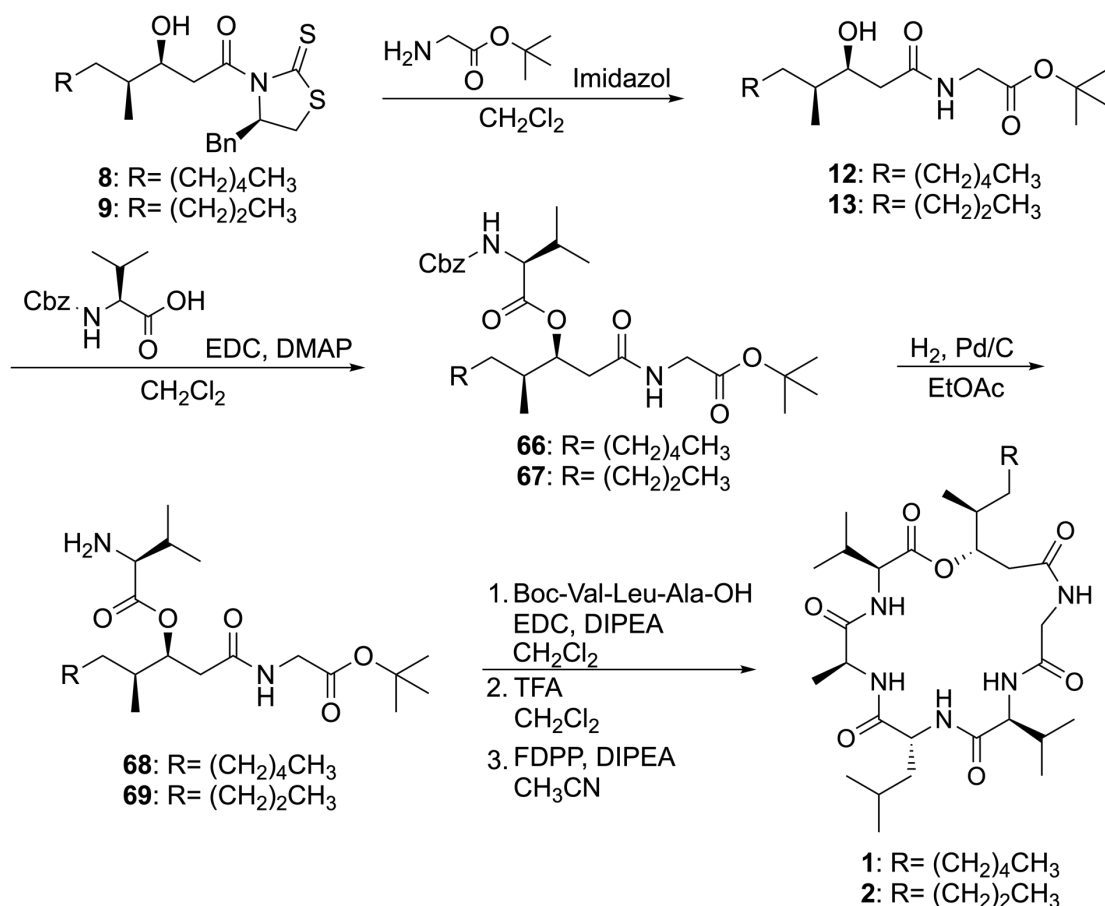


Figur 5.1: Forslag til syntesestrategi for ikke-peptidfragmentet. Prosedyren må gjøres med både heksanoylklorid og oktanoylklorid.

Syntese av tripeptider eller tetrapeptider i løøsning viste dårlige utbytter da isolering av produkt etter reaksjon var utfordrende. Ved syntese av peptider større enn dipeptider vil fast fase peptidsyntese være et bedre alternativ. Fast fase peptidsyntese gir mulighet for skylning og rensing som ikke er mulig for reaksjoner gjort i løøsning.

Kobling av aldolprodukt **45a** og aminosyrer viste utfordringer. Aminolyse ga ikke produkt under forsøk med aldolproduktet **45a** og glysin. Det ble ikke funnet noe forklaring på hvorfor reaksjonen ikke skulle gå da lignende reaksjoner har vist høye utbytter. Om begge utgangsstoffene var helt rene men likevel ikke ga produkt kunne det vært aktuelt å benytte katalytiske mengder av DMAP. Om det likevel ikke skulle gi noe produkt kan hydroksylgruppen forsøkes å beskyttes. Ved beskyttelse av hydroksylgruppen kan ikke DMAP benyttes som katalysator grunnet sidereaksjoner observert mellom DMAP og aldolprodukter. TBS-beskyttelse av sekundære alkoholer kan oppnås ved bruk av TBSCl og imidazol i DMF.

Steglich esterifisering ble ikke forsøkt på planlagte forbindelser. Planen var å koble tetrapeptidet **10** direkte på hydroksylgruppen til ikke-peptidfragmentet. Dette er ikke prøvd før, og det kunne by på utfordringer grunnet store molekyler med sterisk hindring. Lignende syntese er rapportert vellykket der kun én aminosyre er koblet på ved esterdannelse. Ved å ha Cbz beskyttelse på denne aminosyren, altså valin, kunne den blitt avbeskyttet uten at *t*-butylgruppen på glysin hadde blitt fjernet. Dermed kunne tripeptidet Boc-Val-Leu-Ala-OH kobles på valin ved en vanlig peptidsyntesekobling i løøsning. Avbeskyttelse med TFA og makrosyklisering med FDPP og DIPEA er rapportert med tilfredsstillende utbytter.⁴⁶ Se figur 5.2 for alternativ sykliseringsstrategi.



Figur 5.2: Alternativ syntese strategi for syklisering.

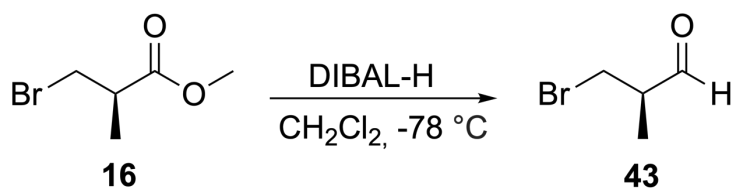
6. Eksperimentell del

6.1. Generelt

Alle reagenser og løsemidler brukt var kommersielt tilgjengelig fra Merck og brukt uten videre rensing. Tørre løsemidler ble ikke videre behandlet før bruk. Alle tørre reaksjoner ble utført med glassutstyr tørket i varmeskap på 150 °C, og flushet med nitrogengass. Reaksjoner som gikk på temperaturer høyere enn romtemperatur ble utført i et silikonoljebad under omrøring. Reaksjoner på 0 °C gikk i et bad med isbiter og vann. Et acetonbad med tørris ble benyttet for å kjøle reaksjoner ned til -78 °C. Alle reaksjonene ble monitorert med TLC-plater (silikagel 60 F₂₅₄ på aluminiumsplater) fra VWR. Ulike fremkallingsmidler ble benyttet for å analysere TLC-platene: UV-lys (254 nm), ninhydrin og kaliumpermanganat. Kolonnekromatografi ble utført med silikagel (40-63 μm, 60 Å) med varierende eluent. Eluent benyttet for separasjon er spesifisert i hvert trinn.

¹H, ¹³C, COSY, NOESY, HSQC og HMBC NMR ble analysert på Bruker Avance AVII400, AVIII400 eller AVII600 med CDCl₃ som løsemiddel. Kjemisk skift er oppgitt som δ (ppm) kalibrert etter CDCl₃ (δH = 7.24 ppm, δC = 77.0 ppm). Koblingskonstanter, *J*, oppgis i Hz. Signaler i ¹H-NMR defineres etter deres splittingsmønster: s (singlett), d (dublett), dd (dobbel dublett), t (triplett), br (brede topper) eller m (multiplett) som oppgis som intervaller. GC-MS analyser ble utført på en MS-ISQ QD single quad mass SPECTROMETER oppkoblet til NIST 17 mass spectral library.

6.2. Syntese av forbindelse **43**, (*R*)-3-brom-2-metylpropanal³⁴

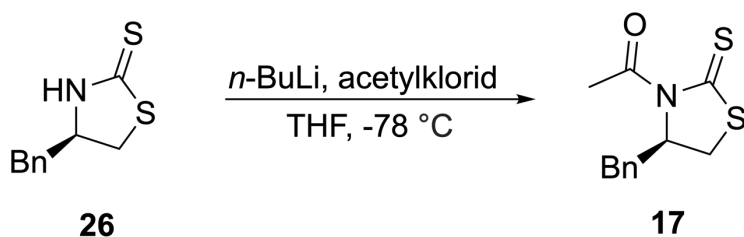


En tørr rundkolbe ble tilsatt eggmagnet under nitrogen gass før et septum ble påmontert. Metyl(*R*)-(+)-3-brom-2-metylpropionat **16** (0.07 mL, 0.55 mmol, 1 eq.), ble trukket opp med en glassprøyte og tilsatt rundkolben gjennom septumet. 30 mL CH₂Cl₂ ble deretter tilsatt gjennom septumet via en gasstett sprøyte. Kolben ble deretter kjølt ned til -78 °C på et acetontørrisbad. 1M DIBAL-H i heksan (0.58 mL, 0.58 mmol, 1.05 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt rundkolben gjennom septumet. Blandingen rørte i 15 minutter i -78 °C før den ble quenched med 0.4 mL MeOH. Blandingen rørte deretter i 5 nye minutter før 15 mL mettet vandig løsning av Rochelles salt ble tilsatt og tørrisbadet ble fjernet. Blandingen rørte 30 minutter i romtemperatur før den ble ekstrahert tre ganger med CH₂Cl₂ og organiske faser ble samlet og tørket over MgSO₄. Etter 30 minutter tørking i kjøleskap ble organisk fase filtrert gjennom et foldefilter og filtratet ble dampet inn på rotavapor under kontrollert vakuum. Råproduktet ble ikke videre rensset, og derfor finnes det urenheter i spekterdataene for denne forbindelsen.

Spektroskopisk data for forbindelse **43** (Vedlegg A):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.62 (s, 1H, CHO), 3.56-3.55 (m, 1H, BrCH₂), 3.53-3.52 (m, 1H, BrCH₂), 2.82-2.77 (m, 1H, CH), 1.24 (d, *J* = 7.12 Hz, 3H, CH₃)

6.3. Syntese av forbindelse **17**, (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)etan-1-on³⁵



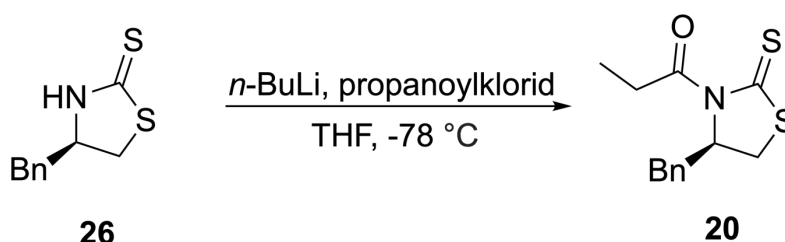
En tørr tohalset-rundkolbe ble flushet med nitrogen gass og tilsatt en eggmagnet. (*R*)-4-benzyltioazolidin-2-tion **26** (0.626 g, 3 mmol, 1 eq.) ble veid i et halvtdramsglass under nitrogen gass og tilsatt rundkolben. På det ene slipet av kolben ble det påmontert et septum, mens på det andre ble et kuldetermometer montert. Tørr THF (10 mL) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt kolben. Kolben ble deretter satt i et kuldebad og kjølt ned til -78 °C. 1.6 M *n*-BuLi i heksan (2.05 mL, 3.3 mmol, 1.1 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt blandingen så temperaturen i

kolben ikke kom over $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Blandingen sto på røring i 15 minutter før acetylklorid (0.28 mL, 3.9 mmol, 1.3 eq.) dråpevis ble tilsatt blandingen uten at den interne temperaturen kom over $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deretter sto blandingen på røring i 5 minutter før kuldebadet ble fjernet og reaksjonen ble varmet til romtemperatur. Blandingen rørte på romtemperatur i 1.5 timer før den ble satt på isbad og quenched med en vandig mettet løsning NH_4Cl (1.2 mL) og vann (3 mL). Blandingen ble deretter overført til en skilletrakt og ekstrahert med CH_2Cl_2 tre ganger før organiske faser ble samlet i en erlendmeyerkolbe og tørket over MgSO_4 . Organisk fase ble deretter filtrert gjennom et foldefilter, dampet inn og rensset på flashkolonne med CH_2Cl_2 som eluent. Isolert utbytte ble 96 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **17** (Vedlegg B):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38-7.27 (m, 5H, Ph-H), 5.42-5.36 (m, 1H, CH), 3.39 (dd, $J = 7.2, 11.4$ Hz, 1H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 3.23 (dd, $J = 3.7, 13.1$ Hz, 1H, PhCH_2), 3.05 (dd, $J = 13.1, 10.4$ Hz, 1H, PhCH_2), 2.9 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 2.81 (s, 3H, COCH_3)

6.4. Syntese av forbindelse **20**, (*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)propan-1-on

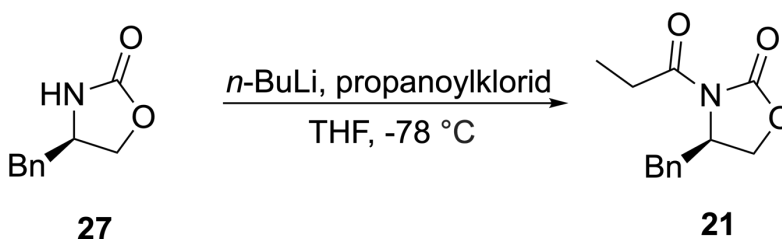


En tørr tohalset-rundkolbe ble flushet med nitrogen gass og tilsatt en eggmagnet. (*R*)-4-benzyltioazolidin-2-tion **26** (0.627 g, 3 mmol, 1 eq.) ble veid i et halvtdramsglass under nitrogen gass og tilsatt rundkolben. På det ene slipet av kolben ble det påmontert et septum, mens på det andre ble et kuldetermometer montert. Tørr THF (10 mL) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt kolben. Kolben ble deretter kjølt ned til $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ i et kuldebad. 1.6 M *n*-BuLi i heksan (2.0 mL, 3.3 mmol, 1.1 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt blandingen så temperaturen i kolben ikke kom over $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Blandingen sto på røring i 15 minutter før propanoylklorid (0.34 mL, 3.9 mmol, 1.3 eq.) dråpevis ble tilsatt blandingen uten at den interne temperaturen kom over $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deretter sto blandingen på røring i 5 minutter før kuldebadet ble fjernet og reaksjonen ble varmet til romtemperatur. Blandingen rørte på romtemperatur i 1.5 timer før den ble satt på isbad og quenched med en vandig mettet løsning NH_4Cl (1.2 mL) og vann (3 mL). Blandingen ble deretter overført til en skilletrakt og ekstrahert med CH_2Cl_2 tre ganger før organiske faser ble samlet i en erlendmeyerkolbe og tørket over MgSO_4 . Organisk fase ble deretter filtrert gjennom et foldefilter, dampet inn og rensset på flashkolonne med CH_2Cl_2 som eluent. Isolert utbytte ble 97 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **20** (Vedlegg C):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.30-7.28 (m, 5H, Ph-*H*), 5.39-5.33 (m, 1H, CH), 3.49-3.43 (m, 1H, COCH_2CH_3), 3.41-3.38 (m, 1H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$) 3.24 (dd, $J = 3.7, 13.1$ Hz, 1H, PhCH₂), 3.15-3.07 (m, 1H, COCH_2CH_3), 3.03 (dd, $J = 10.5, 13.1$ Hz, 1H, PhCH₂), 2.86 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, COCH_2CH_3)

6.5. Syntese av forbindelse **21**, (*R*)-4-benzyl-3-propionyloksazolidin-2-on

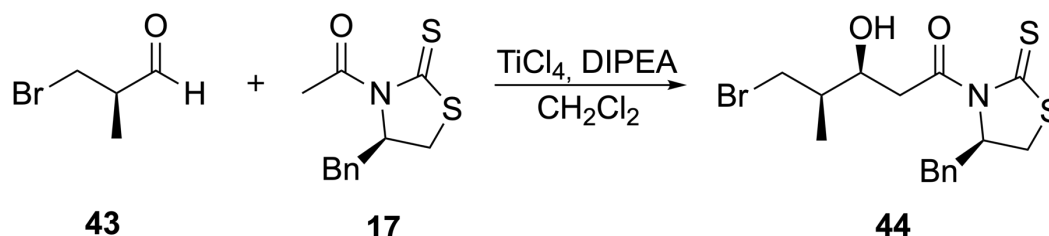


En tørr tohalset-rundkolbe ble flushet med nitrogen gass og tilsatt en eggmagnet. (*R*)-4-benzyl-2-oxazolidinon **27** (0.532 g, 3 mmol, 1 eq.) ble veid i et halvt dramsglass under nitrogen gass og tilsatt rundkolben. På det ene slipet av kolben ble det påmontert et septum, mens på det andre ble et kuldetermometer montert. Tørr THF (10 mL) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt kolben. Kolben ble deretter satt i et kuldebad med aceton og tørris og kjølt ned til $-78\text{ }^\circ\text{C}$. 1.6 M $n\text{-BuLi}$ i heksan (2.0 mL, 3.3 mmol, 1.1 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt blandingen så temperaturen i kolben ikke kom over $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Blandingene sto på røring i 15 minutter før propanoylchlorid (0.34 mL, 3.9 mmol, 1.3 eq.) dråpevis ble tilsatt blandingen uten at den interne temperaturen kom over $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Deretter sto blandingen på røring i 5 minutter før kuldebadet ble fjernet og reaksjonen ble varmet til romtemperatur. Blandingene rørte på romtemperatur i 1.5 timer før den ble satt på isbad og quenched med en vandig mettet løsning NH_4Cl (1.2 mL) og vann (3 mL). Blandingene ble deretter overført til en skilletrakt og ekstrahert med CH_2Cl_2 tre ganger før organiske faser ble samlet i en erlendmeyerkolbe og tørket over MgSO_4 . Organisk fase ble deretter filtrert gjennom et foldefilter og dampet inn på rotavapor. Utbytte ble 96 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **21** (Vedlegg D):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.37-7.22 (m, 5H, Ph-*H*), 4.72-4.66 (m, 1H, CH), 4.24-4.17 (m, 2H, $\text{PhCH}_2\text{CHCH}_2$), 3.32 (dd, $J = 3.3, 13.3$ Hz, 1H, PhCH₂), 3.06-2.88 (m, 2H, COCH_2CH_3), 2.79 (dd, $J = 9.5, 13.3$ Hz, 1H, PhCH₂), 1.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, COCH_2CH_3)

6.6. Syntese av forbindelse **44**, (3*S*,4*R*)-1-((*R*)-4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)-5-brom-3-hydroksy-4-metylpentan-1-on

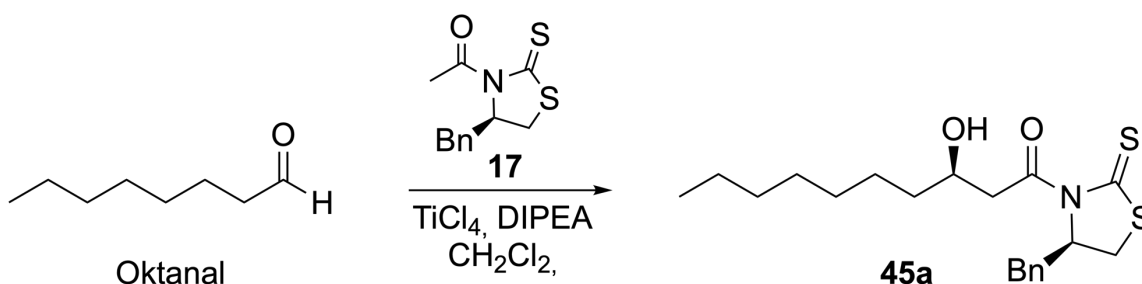


(*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)etan-1-on **17** (0.2332 g, 0.9 mmol, 0.86 eq.) ble veid i en tørr rundkolbe. 6 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. En eggmagnet ble tilsatt rundkolben før et septum ble påmontert og kolben kjølt ned til -78 °C. 1M TiCl₄ (CH₂Cl₂)(1.0 mL, 1.0 mmol, 0.95 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt rundkolben gjennom septumet. Etter 10 minutter på omrøring ble DIPEA (0.09 mL, 0.46 mmol, 0.44 eq.) oppløst i 1.2 mL tørr CH₂Cl₂ trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt reaksjonsblandingen dråpevis. Blandingen sto 30 minutter under omrøring før aldehydet (*R*)-3-brom-2-metylpropanal **43** (0.1524 g, 0.05 mmol, 1 eq.) oppløst i 2 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt reaksjonsblandingen. Etter 3 timer under omrøring på -78 °C ble reaksjonen quenched med 0.4 mL mettet vandig løsning NH₄Cl. Etter 5 minutter ble kuldebadet fjernet og blandingen temperert til romtemperatur. Separert organisk fase ble tørket over MgSO₄, filtrert gjennom et foldefilter og dampet inn på rotavapor. Råproduktet ble rensert på flashkolonne med CH₂Cl₂ som eluent. Isolert utbytte ble 27 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **44** (Vedlegg E):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.39-7.28 (m, 5H, Ph-*H*), 5.46-5.41 (m, 1H, PhCH₂CH), 4.43-4.38 (m, 1H, CHO), 3.64-3.56 (m, 2H, BrCH₂ og COCH₂), 3.46-3.37 (m, 2H, PhCH₂CHCH₂ og BrCH₂), 3.30-3.23 (m, 2H, PhCH₂ og COCH₂), 3.07 (dd, *J* = 10.3, 13.0 Hz, 1H, PhCH₂), 2.93 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, PhCH₂CHCH₂), 2.73 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, OH), 2.03-1.95 (m, 1H, BrCH₂CH), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, BrCH₂CHCH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 201.5, 172.9, 136.3, 129.4, 128.9, 127.3, 68.3, 68.2, 43.6, 40.4, 36.9 (2C), 32.1, 13.3.

6.7. Syntese av forbindelse **45a**, (*R*)-1-((*R*)-4-benzyl-2-tioksotioazolidin-3-yl)3-hydroksydekan-1-on



Forbindelse **17** (0.1257 g, 0.5 mmol, 1 eq.) ble veid opp i en 25 mL tørr rundkolbe og flushet med nitrogengass. En eggmagnet ble tilsatt under nitrogen. 2 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en 5 mL gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. Kolben ble satt på isbad med røring. 1M TiCl₄ i CH₂Cl₂ (0.65 mL, 0.65 mmol, 1.3 eq.) ble trukket opp med en 2.5 mL gasstett sprøyte og dråpevis tilsatt rundkolben. Blandingen rørte i 10 minutter før DIPEA (0.095 mL, 0.5 mmol, 1 eq.) blandet i 1 mL tørr CH₂Cl₂ dråpevis ble tilsatt reaksjonsblandingen. Den røde blandingen rørte i 20 minutter før kolben ble kjølt ned til -78 °C i et aceton-tørrisbad. Oktanal (0.078 mL, 0.5 mmol, 1 eq.) ble fortynnet i 2 mL tørr CH₂Cl₂ og dråpevis tilsatt rundkolben. Reaksjonen stod under omrøring på tørrisbadet i 1 time før badet ble fjernet og blandingen temperert. Reaksjonen ble quenched med 1 mL halvmettet vandig løsning NH₄Cl og overført til en skilletrakt. Fasene ble separert og vannfasen ble ekstrahert med CH₂Cl₂ før organiske faser ble samlet og tørket over MgSO₄. MgSO₄ ble filtrert bort gjennom et foldefilter, filtratet ble oppkonsentrert på rotavapor og rensert på kort kolonne med gradieringseluent (CH₂Cl₂, deretter heksan 1:1 EtOAc), og ga 45 % isolert utbytte. Det ble kun tatt rene spektre av forbindelse **45b** med rester av oktanal.

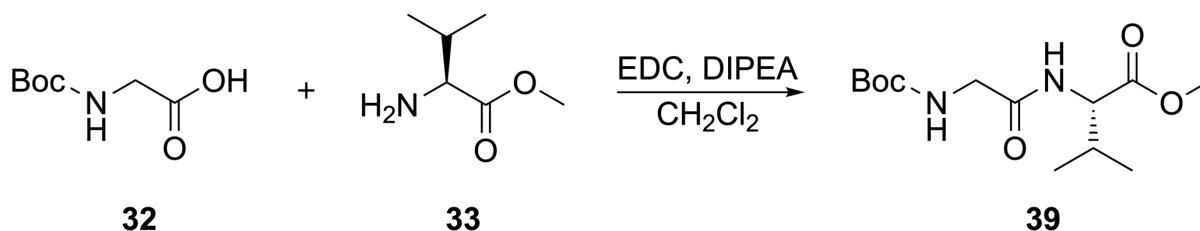
Spektroskopisk data for forbindelse **45a** (Vedlegg F)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.39-7.22 (m, 5H, Ph-*H*), 5.44-5.38 (m, 1H, PhCH₂CH), 4.18-4.14 (m, 1H, CHOH), 3.68-3.61 (m, 1H, COCH₂), 3.46-3.38 (m, 1H, PhCH₂CHCH₂), 3.23 (dd, *J* = 3.8, 13.1 Hz, 1H, PhCH₂), 3.18-3.09 (m, 1H, COCH₂), 3.06-3.00 (m, 1H, PhCH₂), 2.91 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, PhCH₂CHCH₂), 2.58 (br, 1H, OH), 1.66-1.49 (m, 2H, CHOHCH₂), 1.31-1.26 (m, 10H, CHOHCH₂(CH₂)₅CH₃), 0.91-0.88 (m, 3H, CHOH(CH₂)₆CH₃).

Spektroskopisk data for forbindelse **45b** (Vedlegg F-2):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.29-7.19 (m, 5H, Ph-*H*), 5.35-5.30 (m, 1H, PhCH₂CH), 4.10-4.01 (m, 1H, CHOH), 3.57 (dd, *J* = 2.4, 17.8 Hz, 1H, COCH₂), 3.33 (dd, *J* = 7.2, 11.4 Hz, 1H, PhCH₂CHCH₂), 3.15 (dd, *J* = 3.9, 13.2 Hz, 1H, PhCH₂), 3.05 (dd, *J* = 9.5, 17.8 Hz, 1H, COCH₂), 2.97 (dd, *J* = 10.3, 17.0 Hz, 1H, PhCH₂), 2.82 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, PhCH₂CHCH₂), 2.34 (br, 1H, OH), 1.55-1.39 (m, 2H, CHOHCH₂), 1.23-1.21 (m, 10H, CHOHCH₂(CH₂)₅CH₃), 0.83-0.79 (m, 3H, CHOH(CH₂)₆CH₃).

6.8. Syntese av forbindelse **39**, Boc-Gly-Val-OMe

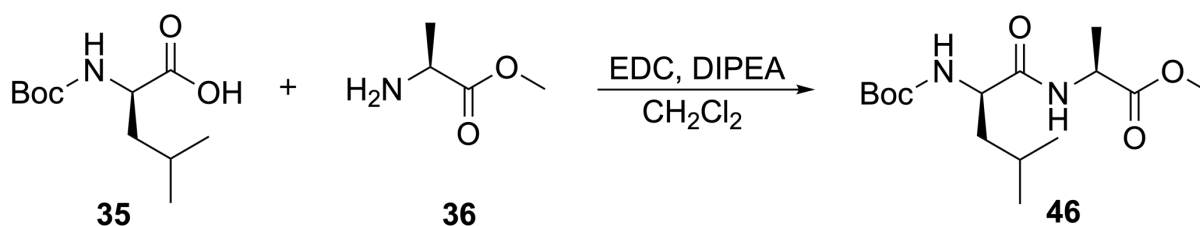


Val-OMe (0.1108 g, 0.64 mmol, 1.27 eq.) ble veid i et halvtdramsglass og overført til en tørr rundkolbe med eggmagnet under nitrogengass. 5 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. Kolben ble satt på isbad før DIPEA (0.12 mL, 0.64 mmol, 1.27 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. Etter 40 minutter omrøring på isbad ble Boc-Gly (0.088 g, 0.5 mmol, 1 eq.) og EDC (0.122 g, 0.64 mmol, 1.27 eq.) tilsatt reaksjonsblandingen. Blandingen rørte i 3 timer på isbad før isbadet ble fjernet. Reaksjonsblandingen rørte på romtemperatur over natten. Blandingen ble overført til en skilletrakt og vasket med 10 % vandig sitronsyre 4 ganger. Organisk fase ble tørket over MgSO₄, filtrert gjennom foldefilter og løsemiddelet dampet inn (det er rester av EtOAc i spekteret). Isolert utbytte ble 89 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **39** (Vedlegg G):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.84 (br, 1H, NHCH₂), 5.46 (br, 1H, NHCH), 4.45 (dd, *J* = 5.0, 8.6 Hz, 1H, NHCHCH(CH₃)₂), 3.82-3.68 (m, 2H, NHCH₂), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 2.12-2.03 (m, 1H, NHCHCH(CH₃)₂), 1.36 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 0.83 (dd, *J* = 6.7, 14.8 Hz, 6H, NHCHCH(CH₃)₂).

6.9. Syntese av forbindelse **46**, Boc-Leu-Ala-OMe⁴⁴

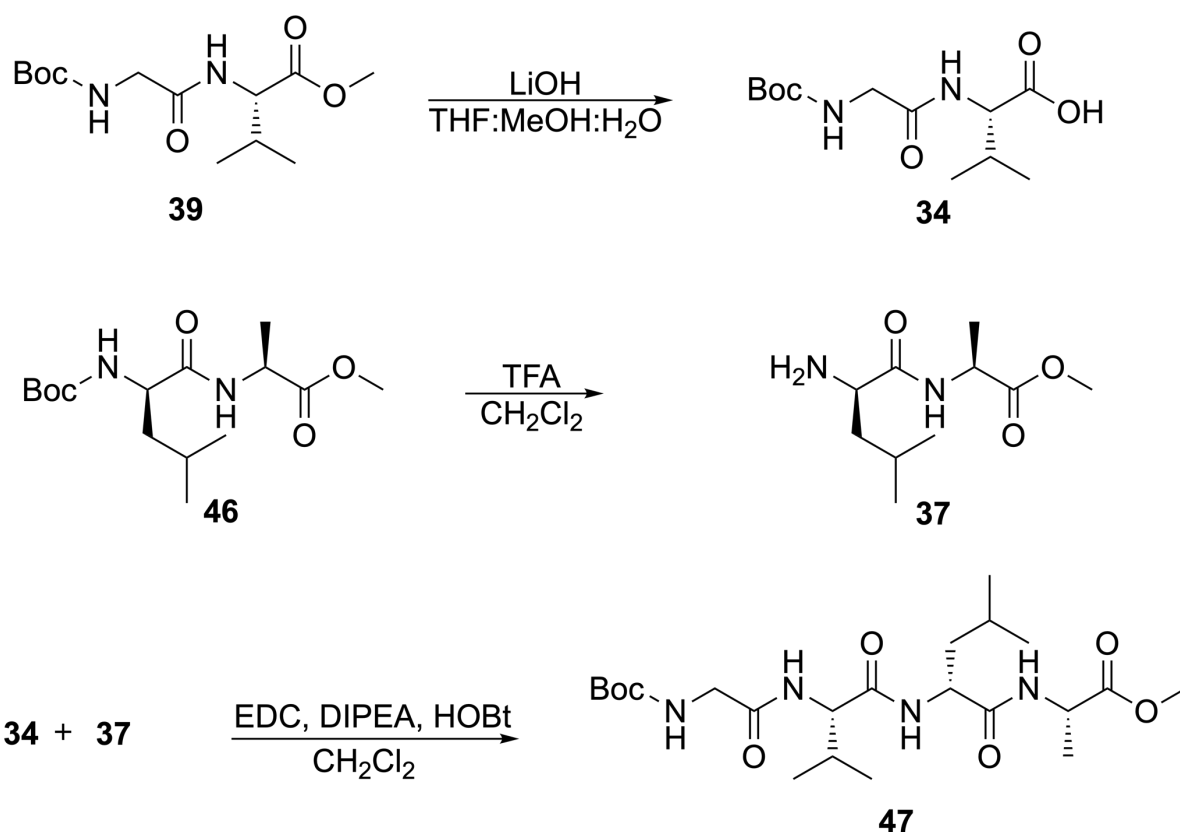


Ala-OMe (0.544 g, 3.9 mmol, 1.3 eq.) ble veid i et halvtdramsglass under nitrogengass og tilsatt en tørr rundkolbe med eggmagnet. 9 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp og tilsatt kolben med en gasstett sprøyte. Blandingen ble deretter satt på røring i et isbad. DIPEA (0.75 mL, 3.9 mmol, 1.3 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt kolben. Blandingen sto på røring i 40 minutter før EDC (0.748 g, 3.9 mmol, 1.3 eq.) og Boc-Leu (0.696 g, 3.0 mmol, 1 eq.) ble tilsatt. Blanding rørte på 0 °C i 3 timer før isbadet ble fjernet, og blandingen rørte i romtemperatur i 12 timer. Blandingen ble deretter fortynnet med CH₂Cl₂ og vasket med 10 % vandig sitronsyre fire ganger. Organisk fase ble tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert under vakuum (det er rester av EtOAc i spekteret). Forbindelse **46** var et hvitt fast stoff. Isolert utbytte ble 68 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **46** (Vedlegg H):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.90 (br, 1H, NHCHCH_3), 5.09 (br, 1H, NHCHCH_2), 4.52-4.44 (m, 1H, NHCHCH_3), 4.11 (br, 1H, NHCHCH_2), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 1.59-1.56 (m, 2H, NHCHCH_2), 1.44-1.40 (m, 1H, NHCHCH_2CH), 1.36 (s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 1.31 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, NHCHCH_3), 0.86-0.84 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

6.10. Syntese av forbindelse **47**, Boc-Gly-Val-Leu-Ala-OMe



Boc-Gly-Val-OMe (0.1157 g, 0.422 mmol, 1 eq.) ble overført til en rundkolbe med eggmagnet og oppløst i 3 mL THF:MeOH:H₂O (3:1:1). Rundkolben ble satt på isbad under omrøring. LiOH (0.032 g, 1.266 mmol, 3 eq.) ble tilsatt rundkolben før reaksjonsblandingen sto på røring i 1 time. pH ble justert til 2 med 1M HCl før blandingen ble fortynnet med EtOAc, vasket med mettet vandig løsning NaCl, tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert på rotavapor. Forbindelse **34** ble ikke isolert før videre bruk.

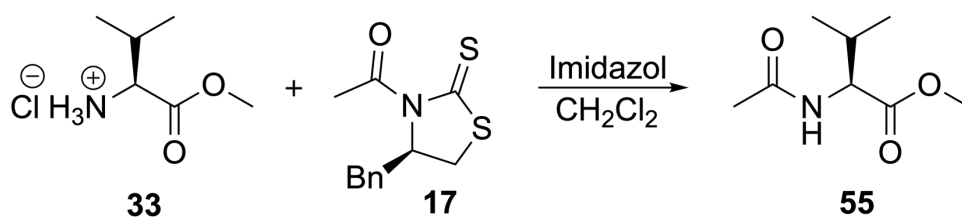
Boc-Leu-Ala-OMe (0.091 g, 0.41 mmol) ble oppløst i 2 mL tørr CH₂Cl₂ i en tørr rundkolbe og satt på isbad under omrøring med eggmagnet. 1 mL TFA ble trukket opp med en gassett sprøyte og tilsatt rundkolben. Reaksjonsblandingen sto på røring i 30 minutter før rundkolben ble satt på rotavapor der løsemiddel og overskudds-TFA ble dampet av. Forbindelse **37** ble ikke isolert før videre bruk.

Det ble tilsatt en eggmagnet og 2 mL tørr CH₂Cl₂ i rundkolben med Boc-Gly-Val. Blandingen ble satt på isbad før HOBt (0.0617 g, 0.421 mmol, 1 eq.) og EDC (0.081 g, 0.421 mmol, 1 eq.) ble tilsatt under nitrogengass og septum påmontert. Blandingen rørte i 15 minutter før Leu-Ala-OMe oppløst i 2 mL tørr CH₂Cl₂ ble overført gjennom et teflonrør til rundkolben. DIPEA (0.16 mL, 0.842 mmol, 2 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt blandingen gjennom septumet. Isbadet ble fjernet og reaksjonen sto på røring i romtemperatur i 12 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc og overført til en skilletrakt. Organisk fase ble vasket med mettet vandig løsning NH₄Cl og NaCl før organisk fase ble tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert i rotavapor. Råproduktet ble rensert på kolonne med EtOAc som eluent (det er rester av EtOAc i spekteret) og ga 52 % utbytte.

Spektroskopisk data for forbindelse **47** (vedlegg I):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.38 (s, 1H, NH), 7.20 (s, 1H, NH), 6.97 (s, 1H, NH), 5.59 (s, 1H, NH), 4.52-4.47 (m, 2H, NHCH og NHCH), 4.23-4.20 (m, 1H, NHCHCH₃), 3.86 (s, 2H, NHCH₂), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 2.13-2.05 (m, 1H, NHCHCH), 1.67-1.63 (m, 1H, NHCHCH₂CH), 1.61-1.51 (m, 2H, NHCHCH₂), 1.40 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.36-1.33 (m, 3H, NHCHCH₃), 0.93-0.84 (m, 12H, CH(CH₃)₂ og CH(CH₃)₂).

6.11. Syntese av forbindelse **55**, metyl acetyl-*L*-valinat

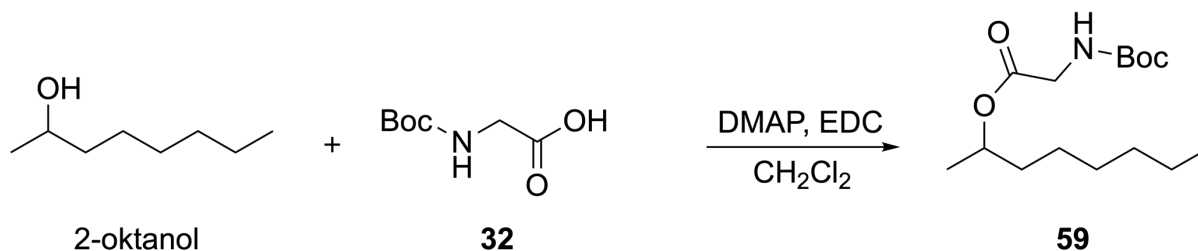


(*R*)-1-(4-benzyl-2-tioksotiazolidin-3-yl)etan-1-on **17** (0.050 g, 0.2 mmol, 1 eq.) ble veid opp i et halvt dramsglass og tilsatt en 5 mL rundkolbe med en eggmagnet. Val-OMeHCl **33** (0.037 g, 0.22 mmol, 1.1 eq.) ble vei i et halvt dramsglass og tilsatt en 5 mL pærekolbe. 1 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. 1 mL tørr CH₂Cl₂ ble også tilsatt pærekolben. Innholdet i pærekolben ble trukket opp med en gasstett sprøyte og overført til rundkolben. Deretter ble imidazol (0.041 g, 0.6 mmol, 3 eq.) veid i et halvt dramsglass og tilsatt rundkolben. Reaksjonsblandingen rørte i romtemperatur i 12 timer. Blandingen ble fortynnet med CH₂Cl₂ og overført til en skilletrakt før vasking med mettet vandig løsning av NH₄Cl x 2. Organisk fase ble tørket over MgSO₄, filtrert gjennom et foldefilter og konsentrert på rotavapor. Råproduktet ble rensert på kort kolonne med gradieringseluent. Først heksan 1:1 EtOAc (det er rester av EtOAc i spekteret), deretter CH₂Cl₂ 10:1 MeOH og ga isolert utbytte på 78 %.

Spektroskopisk data for forbindelse **55** (Vedlegg J):

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.08 (br, 1H, NH), 4.51 (dd, *J* = 5.0, 8.5 Hz, 1H, NHCH), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.12-2.06 (m, 1H, NHCHCH), 1.98 (s, 3H, COCH₃), 0.87 (dd, *J* = 6.8, 18.6 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

6.12. Syntese av forbindelse **59**, oktan-2-yl(*tert*-butoksykarbonyl) glysinat



Boc-Gly **32** (0.098 g, 0.56 mmol, 1.5 eq.) ble veid i et halvtdramsglass og tilsatt en tørr nitrogengass-flusket 5 mL rundkolbe med eggmagnet. 0.5 mL tørr CH₂Cl₂ ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. 2-oktanol (0.058 mL, 0.37 mmol, 1 eq.) ble trukket opp med en gasstett sprøyte og tilsatt rundkolben. Kolben ble satt på isbad under omrøring. EDC (0.215 g, 1.12 mmol, 3 eq.) og DMAP (0.006 g, 0.05 mmol, 0.135 eq.) ble veid opp i hvert sitt halvtdramsglass og tilsatt rundkolben under nitrogengass. Isbadet ble fjernet, og reaksjonen sto på røring i 3 timer. Blandingen ble deretter filtrert igjennom 0.5 cm Celite i en kort kolonne under vannstrålevakuum. Filtratet ble dampet inn på rotavapor og fortynnet med EtOAc og CH₂Cl₂ og overført til en skilletrakt. Organisk fase ble vasket med mettet vandig NH₄Cl løsning og mettet løsning av NaCl (brine) før den ble tørket over MgSO₄, filtrert og konsentrert på rotavapor. Spekterdataene for denne forbindelsen er av råproduktet og inneholder derfor urenheter.

Spektroskopisk data for forbindelse **59** (Vedlegg K):

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5.13 (br, 1H, NH), 4.85-4.80 (m, 1H, OCH), 3.74 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, NHCH₂), 1.48-1.34 (m, 2H, OCHCH₂), 1.32 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.17-1.13 (m, 11H, CH₃CHCH₂(CH₂)₄CH₃), 0.76-0.74 (m, 3H, CH₂CH₃).

7. Litteraturliste

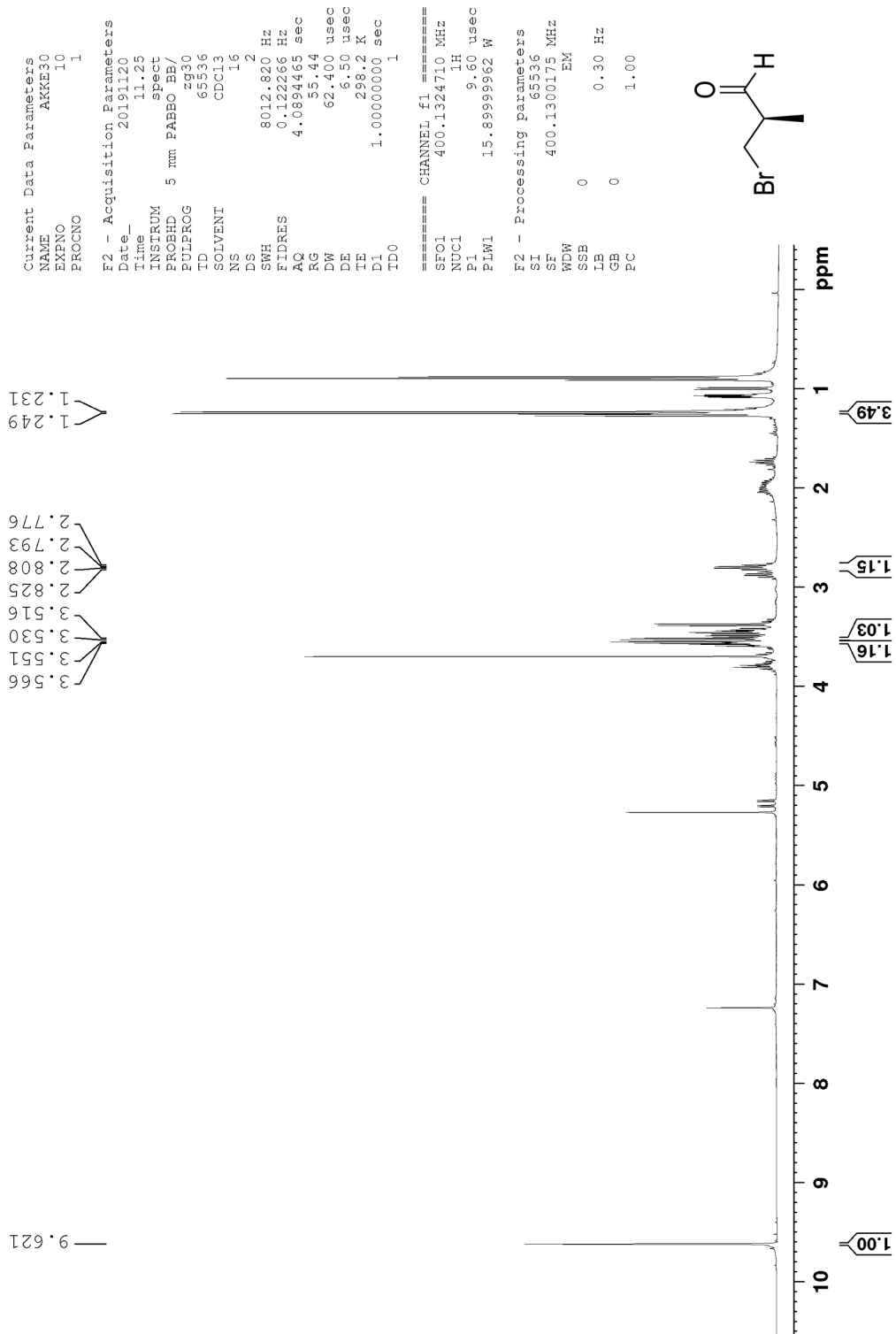
- 1 Lassen, J., Yazdankhah, S., Midtvedt, T. & Solberg, C. O. Historien om antibiotika. *Tidsskriftet - Den Norske Legeforening* (2013).
- 2 Li, J. *et al.* Broad-Spectrum Antiviral Natural Products from the Marine-Derived *Penicillium* sp. IMB17-046. *Molecules* **24**, doi:10.3390/molecules24152821 (2019).
- 3 Hou, X. M. *et al.* Integrating Molecular Networking and (1)H NMR To Target the Isolation of Chrysogeamides from a Library of Marine-Derived *Penicillium* Fungi. *J. Org. Chem.* **84**, 1228-1237, doi:10.1021/acs.joc.8b02614 (2019).
- 4 Nagao, Y. *et al.* Monitored aminolysis of 3-acylthiazolidine-2-thione: a new convenient synthesis of amide. *Tetrahedron Lett.* **21**, 841-844, doi:0040-4039/80/0222-0841/02.00/0 (1980).
- 5 Neises, B. & Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 522-524, doi:10.1002/anie.197805221 (1978).
- 6 Nicolaou, K. C., Bulger, P. G. & Sarlah, D. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 4442-4489, doi:10.1002/anie.200500368 (2005).
- 7 Organ, M. G. *et al.* A User-Friendly, All-Purpose Pd-NHC (NHC=N-Heterocyclic Carbene) Precatalyst for the Negishi Reaction: A Step Towards a Universal Cross-Coupling Catalyst. *Chem. Eur. J* **12**, 4749-4755, doi:10.1002/chem.200600206 (2006).
- 8 Xu, S., Kim, E. H., Wei, A. & Negishi, E. Pd- and Ni-catalyzed cross-coupling reactions in the synthesis of organic electronic materials. *Science and Technology of Advanced Materials* **15**, 044201, doi:10.1088/1468-6996/15/4/044201 (2014).
- 9 Hadei, N., Kantchev, E. A. B., O'Brien, C. J. & Organ, M. G. Room-Temperature Negishi Cross-Coupling of Unactivated Alkyl Bromides with Alkyl Organozinc Reagents Utilizing a Pd/N-Heterocyclic Carben Catalyst. *J. Org. Chem.* **70**, 8503-8507, doi:10.1021/jo051304c (2005).
- 10 Zhou, J. & Fu, G. C. Palladium-Catalyzed Negishi Cross-Coupling Reactions of Unactivated Alkyl Iodides, Bromides, Chlorides, and Tosylates. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12527-12530, doi:10.1021/ja0363258 (2003).
- 11 Tatsuo, I., Shigeru, A., Norio, M. & Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Alkyl-Alkyl Cross-Coupling Reaction of 9-Alkyl-9-BBN Derivates with Iodoalkanes Possessing β -Hydrogens. *Chem. Lett.* **21**, 691-694, doi:10.1246/cl.1992.691 (1992).
- 12 O'Brien, C. J. *et al.* Easily prepared air- and moisture-stable Pd-NHC (NHC=N-heterocyclic carbene) complexes: a reliable, user-friendly, highly active palladium precatalyst for the Suzuki-Miyaura reaction. *Chem. Eur. J.* **12**, 4743-4748, doi:10.1002/chem.200600251 (2006).
- 13 Achonduh, G. T. *et al.* On the role of additives in alkyl-alkyl Negishi cross-couplings. *Chem. Commun.* **46**, 4109-4111, doi:10.1039/c002759f (2010).
- 14 Ducry, L. & Roberge, D. M. Dibal-H Reduction of Methyl Butyrate into Butyraldehyde using Microreactors. *J. Am. Chem. Soc.*, doi:10.1021/op7002002 (2008).
- 15 Eichenauer, H., Friedrich, E., Lutz, W. & Enders, D. Regiospecific and Enantioselective Aldol Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 206-208, doi:10.1002/anie.197802061 (1978).

- 16 Evans, D. A., Bartroli, J. & Shih, T. L. Enantioselective Aldol Condensations. 2. Erythro-Selective Chiral Aldol Condensations via Boron Enolates. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2127-2129, doi:10.1021/ja00398a058 (1981).
- 17 Crimmins, M. T., King, B. W., Tabet, E. A. & Chaudhary, K. Asymmetric Aldol Additions: Use of Titanium Tetrachloride and (-)-Sparteine for the Soft Enolization of N-Acyl Oxazolidinones, Oxazolidinethiones, and Thiazolidinethiones. *J. Org. Chem.* **66**, 894-902, doi:10.1021/jo001387r (2001).
- 18 Crimmins, M. T. & Chaudhary, K. Titanium Enolates of Thiazolidinethione Chiral Auxiliaries: Versatile Tools for Asymmetric Aldol Additions. *Org. Lett.* **2**, 775-777, doi:10.1021/ol9913901 (2000).
- 19 Oppolzer, W., Blagg, J., Rodriguez, I. & Walther, E. Borane sultam-directed asymmetric synthesis of crystalline, enantiomerically pure syn aldol. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2767-2772, doi:10.1021/ja00163a045 (1990).
- 20 Zimmerman, H. E. & Traxler, M. D. The Stereochemistry of the Ivanov and Reformatsky Reactions. I. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1920-1923, doi:10.1021/ja01565a041 (1957).
- 21 Li, Y., Paddon-Row, M. N. & Houk, K. N. Transition structures of aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3684-3686, doi:10.1021/ja00219a067 (1988).
- 22 Evans, D. A. Studies in Asymmetric Synthesis. The Development of Practical Chiral Enolate Synthons. *Aldrichimica Acta* **15**, 23-32 (1982).
- 23 Achmatowicz, O. *et al.* Basic Terminology of stereochemistry. *Pure and Appl. Chem.* **68**, 2193-2222 (1996).
- 24 Tungen, J. E., M., A. & Hansen, T. V. Stereoselective synthesis of maresin 1. *Tetrahedron Lett.* **56**, 1843-1846, doi:10.1016/j.tetlet.2015.02.080 (2015).
- 25 Fujita, E. & Nagao, Y. Chiral Induction Using Heterocycles. *Adv. Heterocycl. Chem.* **45**, 1-36, doi:10.1016/S0065-2725(08)60328-1 (1989).
- 26 Evans, D. A., Ennis, M. D. & Mathre, D. J. Asymmetric alkylation reactions of chiral imide enolates. A practical approach to the enantioselective syntheses of α -substituted carboxylic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1737-1739, doi:10.1021/ja00370a050 (1982).
- 27 Gibson, F. S., Park, M. S. & Rapoport, H. Bis [[4-(2, 2-dimethyl-1, 3-dioxolyl)] methyl]-carbodiimide (BDDC) and its application to residue-free esterifications, peptide couplings, and dehydrations. *J. Org. Chem.* **59**, 7503-7507 (1994).
- 28 Stephanou, A. S. *et al.* Dissection of the DNA mimicry of the bacteriophage T7 Ocr protein using chemical modification. *J. Mol. Biol.* **391**, 565-576, doi:10.1016/j.jmb.2009.06.020 (2009).
- 29 Li, P. & Xu, J. HOBt and HOAt-derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **41**, 721-724, doi:10.1016/S0040-4039(99)02125-5 (2000).
- 30 Watte, J., Van Gompel, W., Lommens, P., De Buysser, K. & Van Driessche, I. Titania Nanocrystal Surface Functionalization through Silane Chemistry for Low Temperature Deposition on Polymers. *ACS Appl. Mater. Inter.* **8**, 29759-29769, doi:10.1021/acsami.6b08931 (2016).
- 31 Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154 (1963).
- 32 Liu, Q. *et al.* Revealing a Second Transmetalation Step in the Negishi Coupling and Its Competition with Reductive Elimination: Improvement in the Interpretation of the

- Mechanism of Biaryl Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10201-10210, doi:10.1021/ja903277d (2009).
- 33 Casado, A. L., Casares, J. A. & Espinet, P. An Aryl Exchange Reaction with Full Retention of Configuration of the Complexes: Mechanism of the Aryl Exchange between [PdR₂L₂] Complexes in Chloroform (R = Pentahalophenyl, L = Thioether). *Organometallics* **16**, 5730-5736, doi:10.1021/om970721f (1997).
- 34 Osorio-Lozada, A. & Olivo, H. F. Indene-based thiazolidinethione chiral auxiliary for propionate and acetate aldol additions. *Org. Lett.* **10**, 617-620, doi:10.1021/ol702980p (2008).
- 35 Gálvez, E., Romea, P. & Urpí, F. Preparation of (S)-4-isopropyl-N-Proanoyl-1,3-thiazolidine-2-thione. *Org. Synth.* **86**, 70-80, doi:10.15227/orgsyn.086.0070 (2009).
- 36 Yan, T., Lee, H. & Tan, C. «Non-Evans» syn aldol via aldolization of chlorotitanium enolat with TiCl₄/aldehyde complex. *Tetrahedron Lett.* **34**, 3559-3562, doi:10.1016/S0040-4039(00)73635-5 (1993).
- 37 Guz, N. R. & Phillips, A. J. Practical and Highly Selective Oxazolidinethione-Based Asymmetric Acetate Aldol Reactions with Aliphatic Aldehydes. *Org. Lett.* **4**, 2253-2256, doi:10.1021/ol026108w (2002).
- 38 Yan, T., Tan, C., Lee, H., Lo, H. & Huang, T. Asymmetric Aldol Reactions: A Novel Model for Switching between Chelation- and Non-Chelation-Controlled Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2613-2621 (1993).
- 39 Scinzer, D., Bauer, A., Böhm, O. M., Limberg, A. & Codes, M. Total Synthesis of (-)-Epothilone A. *Chem. Eur. J* **5**, doi:0947-6539/99/0509-2483 (1999).
- 40 Wipf, P., Kim, Y. & Fritch, P. C. Total Synthesis and Structure Assignment of the Antitumor Antibiotic Aranorosin. *J. Org. Chem.* **58**, 7195-7203 (1993).
- 41 Klein, D. *Organic Chemistry*. Second Edition edn, (Wiley, 2012).
- 42 Chandrasekhar, S., Sathish, K., Reddy, G. P. K. & Mainkar, P. S. Total synthesis of arenamides A, B and C. *Tetrahedron: Asymmetry* **25**, 348-355, doi:10.1016/j.tetasy.2014.01.004 (2014).
- 43 Chakraborty, T. K. *et al.* Synthesis and conformational studies of peptidomimetics containing furanoid sugar amino acids and a sugar diacid. *J Org Chem* **65**, 7710, doi:10.1021/jo004009v (2000).
- 44 Tullberg, M., Grøtli, M. & Luthman, K. Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating. *Tetrahedron* **62**, 7484-7491, doi:10.1016/j.tet.2006.05.010 (2006).
- 45 Ghosh, S. & Pradhan, T. K. The first total synthesis of emericellamide A. *Tetrahedron Lett.* **49**, 3697-3700, doi:10.1016/j.tetlet.2008.03.107 (2008).
- 46 Pradhan, T. K., Reddy, K. M. & Ghosh, S. Total synthesis of emericellamides A and B. *Tetrahedron Lett.* **24**, 1042-1051, doi:10.1016/j.tetasy.2013.07.012 (2013).
- 47 Dhimitruka, I. & SantaLucia, J. Investigation of the Yamaguchi Esterification Mechanism. Synthesis of a Lux-S Enzyme Inhibitor Using an Improved Esterification Method. *Org. Lett.* **8**, 47-50, doi:10.1021/ol0524048 (2006).
- 48 Kasprzak, A., Zuchowska, A. & Poplawska, M. Functionalization of graphene: does the organic chemistry matter? *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 2018-2026, doi:10.3762/bjoc.14.177 (2018).

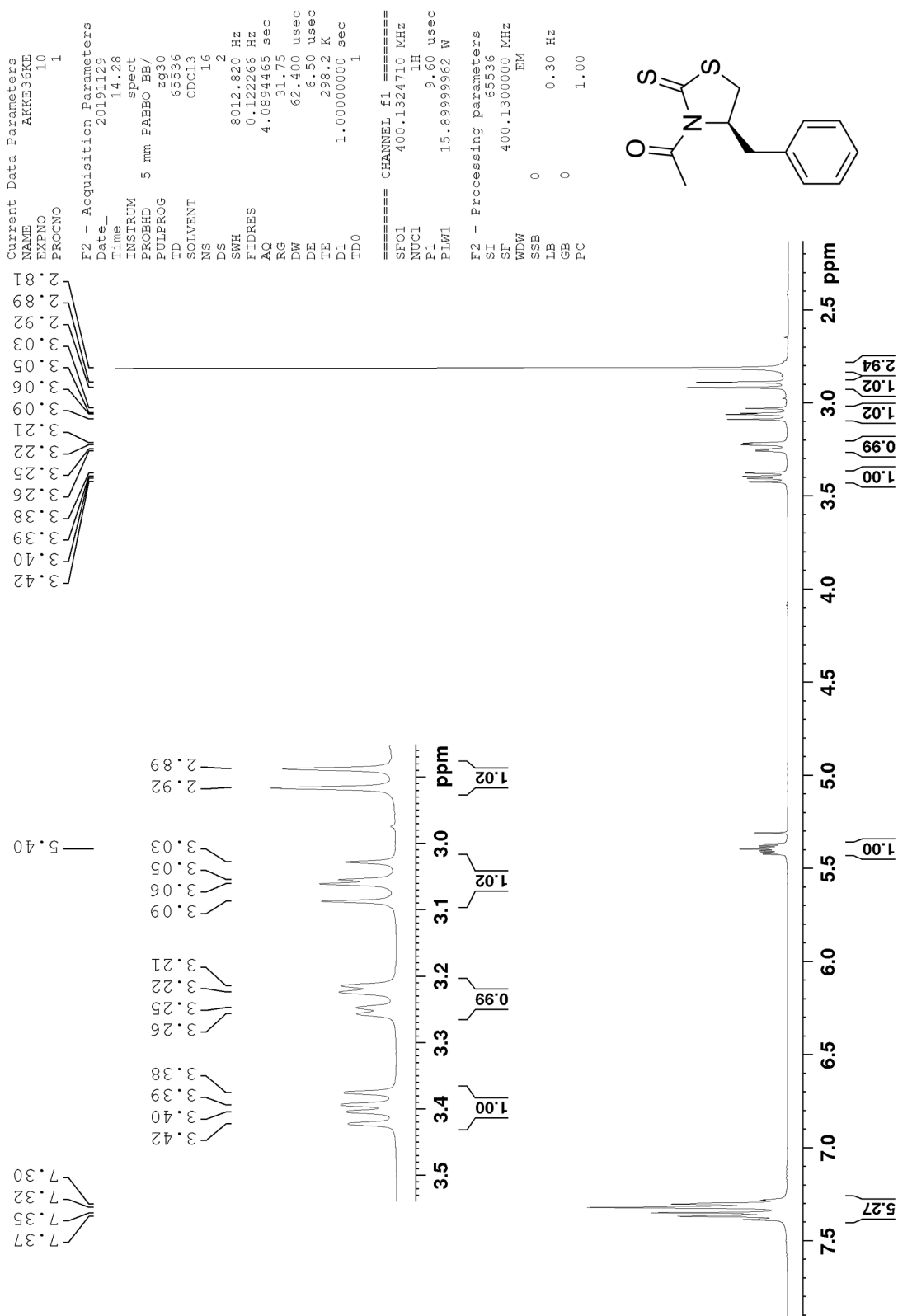
Vedlegg 1, NMR

Vedlegg A, Forbindelse 43



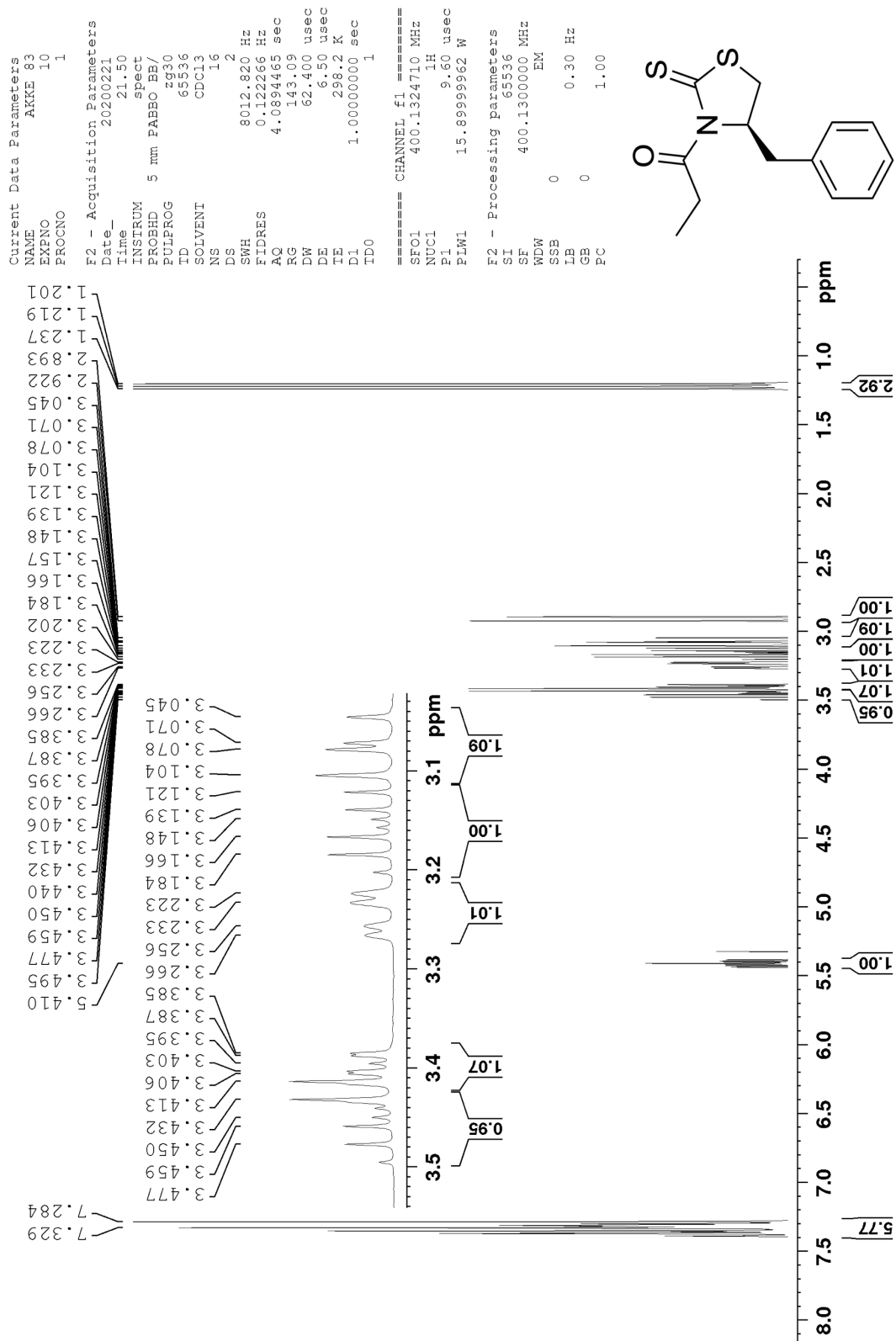
Figur A.1: ¹H-NMR av forbindelse 43.

Vedlegg B, forbindelse 17



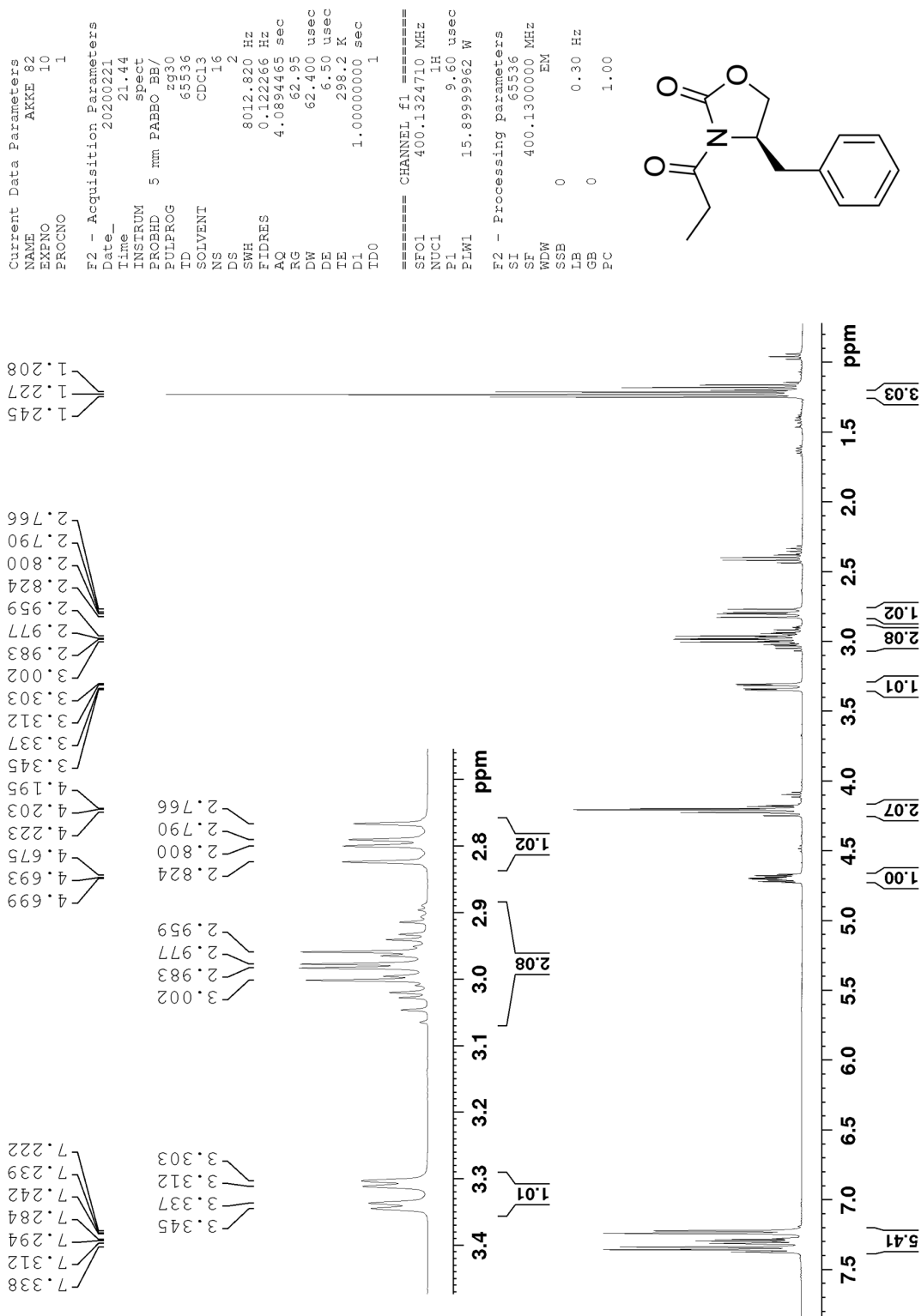
Figur B.1: $^1\text{H-NMR}$ av forbindelse 17.

Vedlegg C, forbindelse 20



Figur C.1: ^1H -NMR av forbindelse 20.

Vedlegg D, forbindelse 21



Figur D.1: ¹H-NMR av forbindelse 21.


```

Current Data Parameters
NAME      AKKE38-2-1
EXNO     11
PROCNO   1

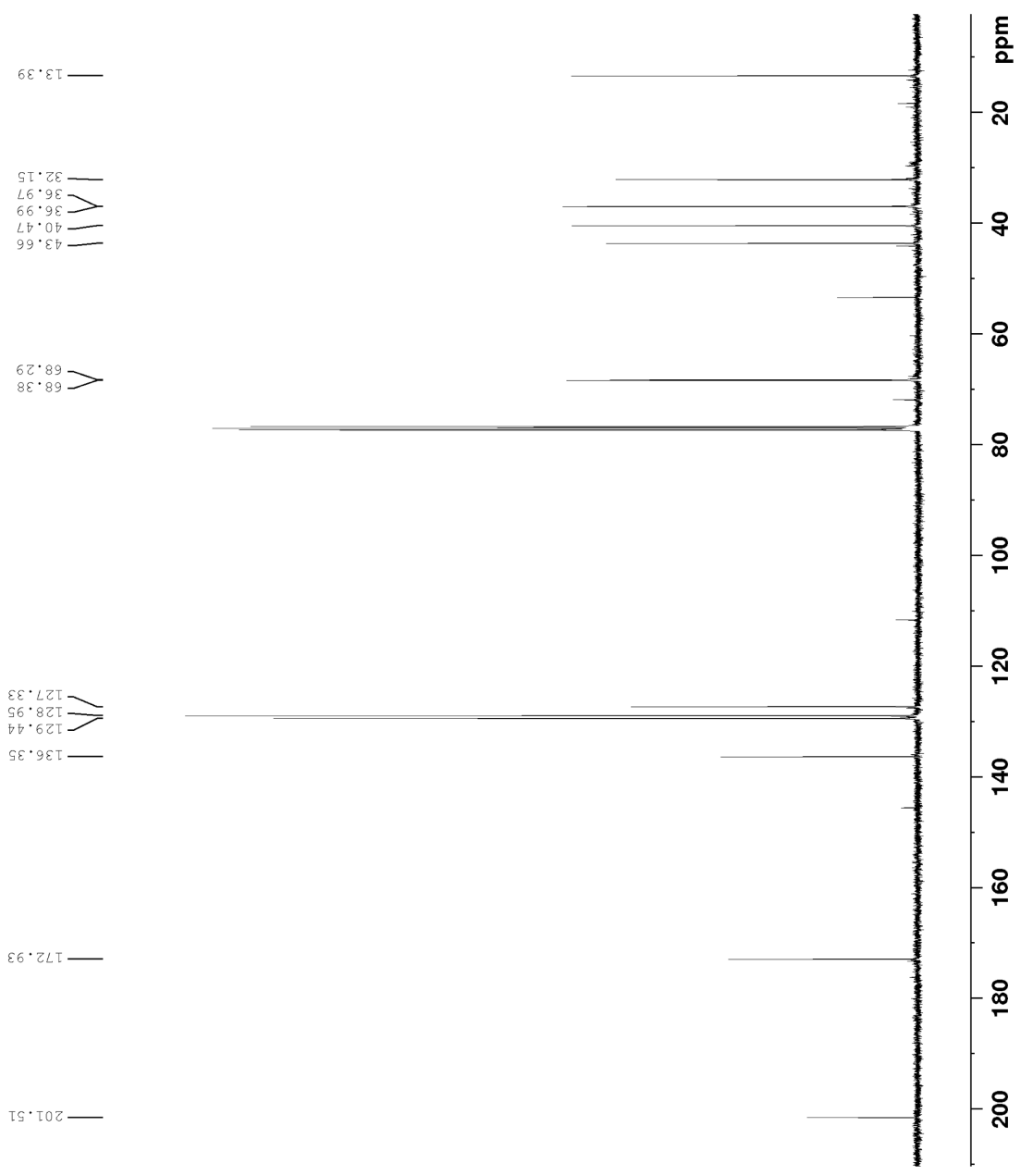
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20200107
Time     20.47
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       4
SWH      24038.461 Hz
FIDRES   0.366798 Hz
AQ       1.3631488 sec
RG       197.38
DW       20.800 usec
DE       6.50 usec
TE       310.2 K
D1       2.0000000 sec
D11      0.0300000 sec
ID0      1

===== CHANNEL f1 =====
SF01    100.6228293 MHz
NUC1    13C
P1      9.85 usec
PLW1    64.19999695 W

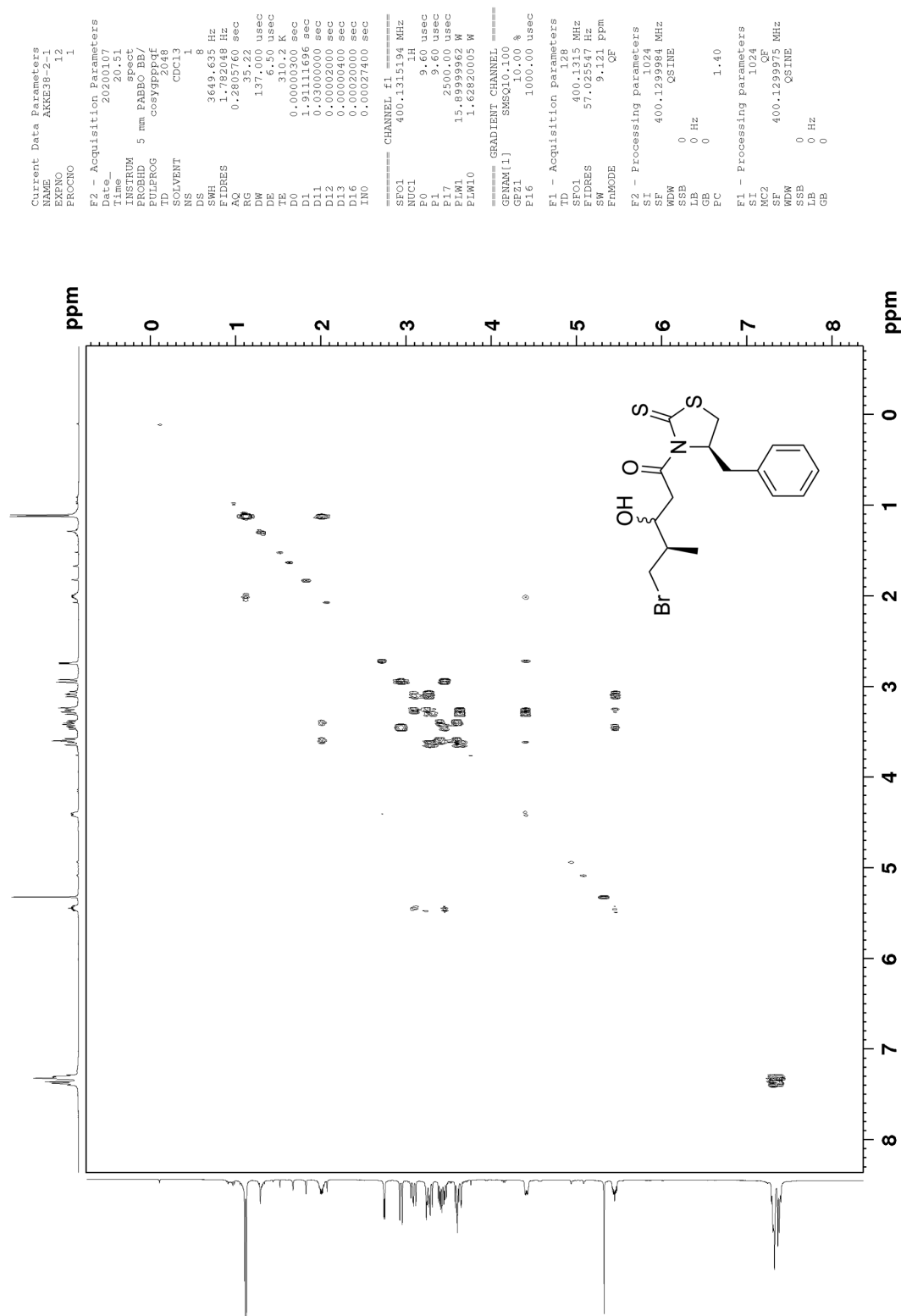
===== CHANNEL f2 =====
SF02    400.1316005 MHz
NUC2    1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2   90.00 usec
PLW2    15.89999962 W
PLW12   0.18091001 W
PLW13   0.09099950 W

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      100.6127685 MHz
EM
WDW     0
SSB     0
LB      1.00 Hz
GB      0
PC      1.40

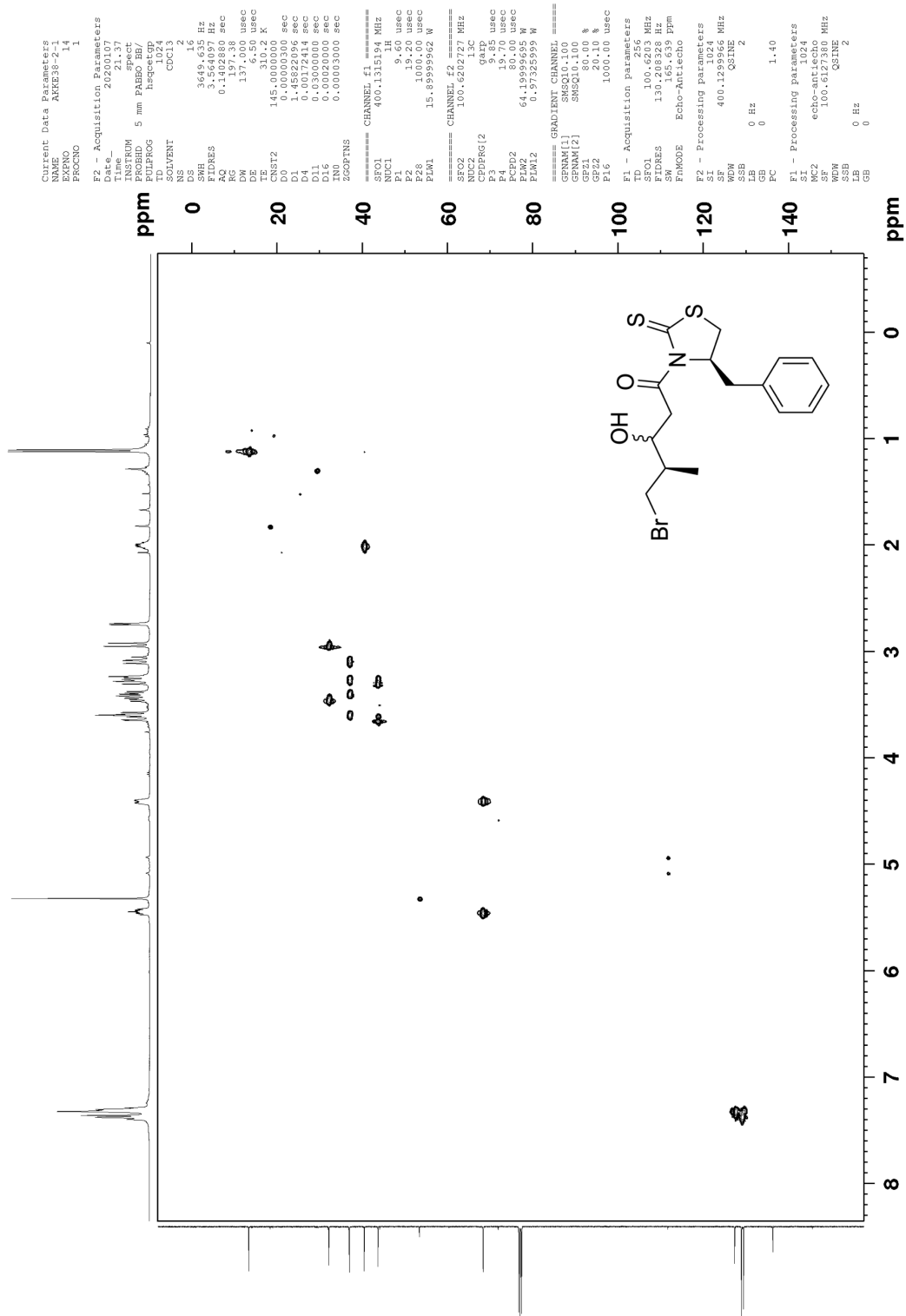
```



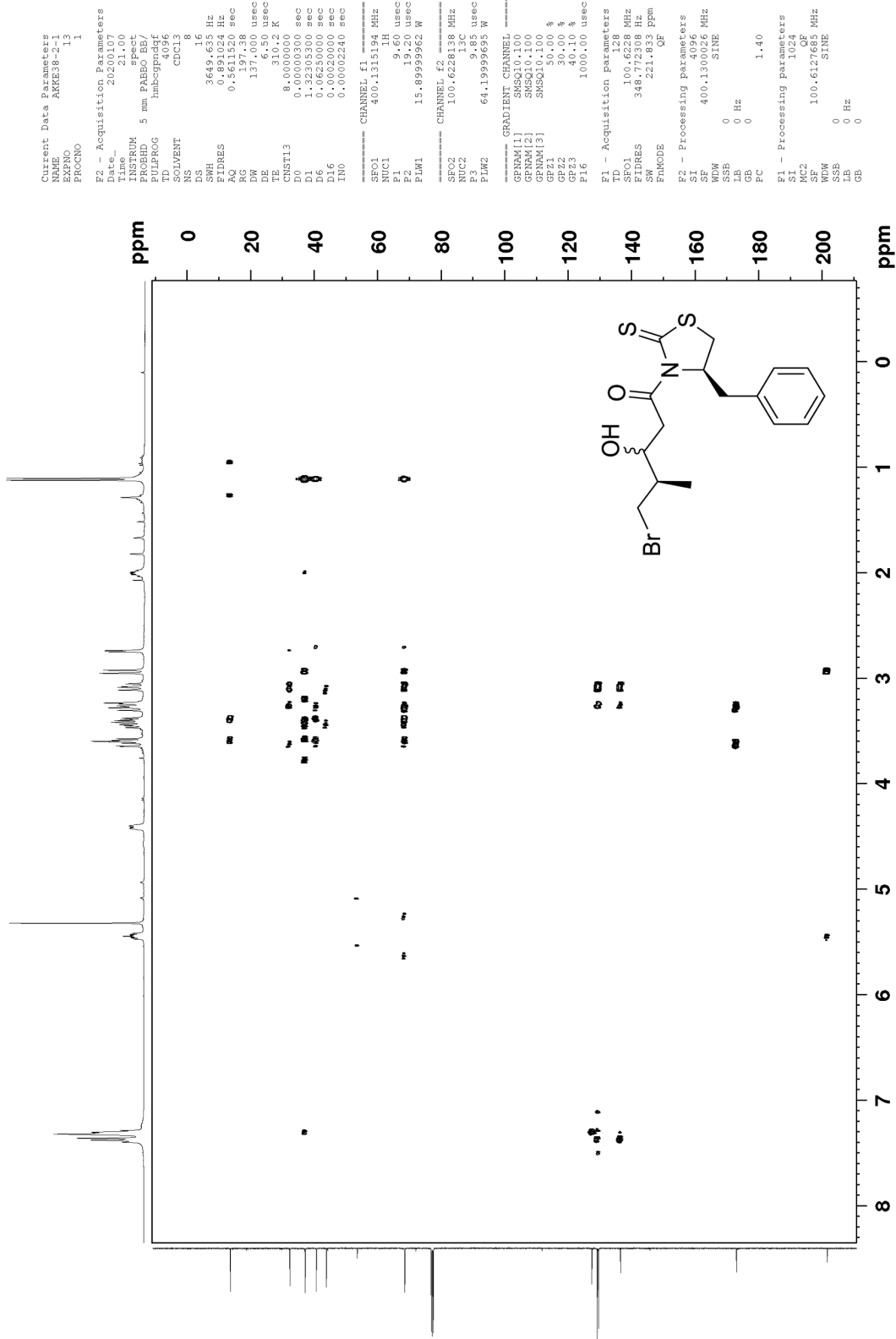
Figur E.2: ¹³C-NMR av forbindelse 44.



Figur E.3: COSY-spekter av forbindelse 44.

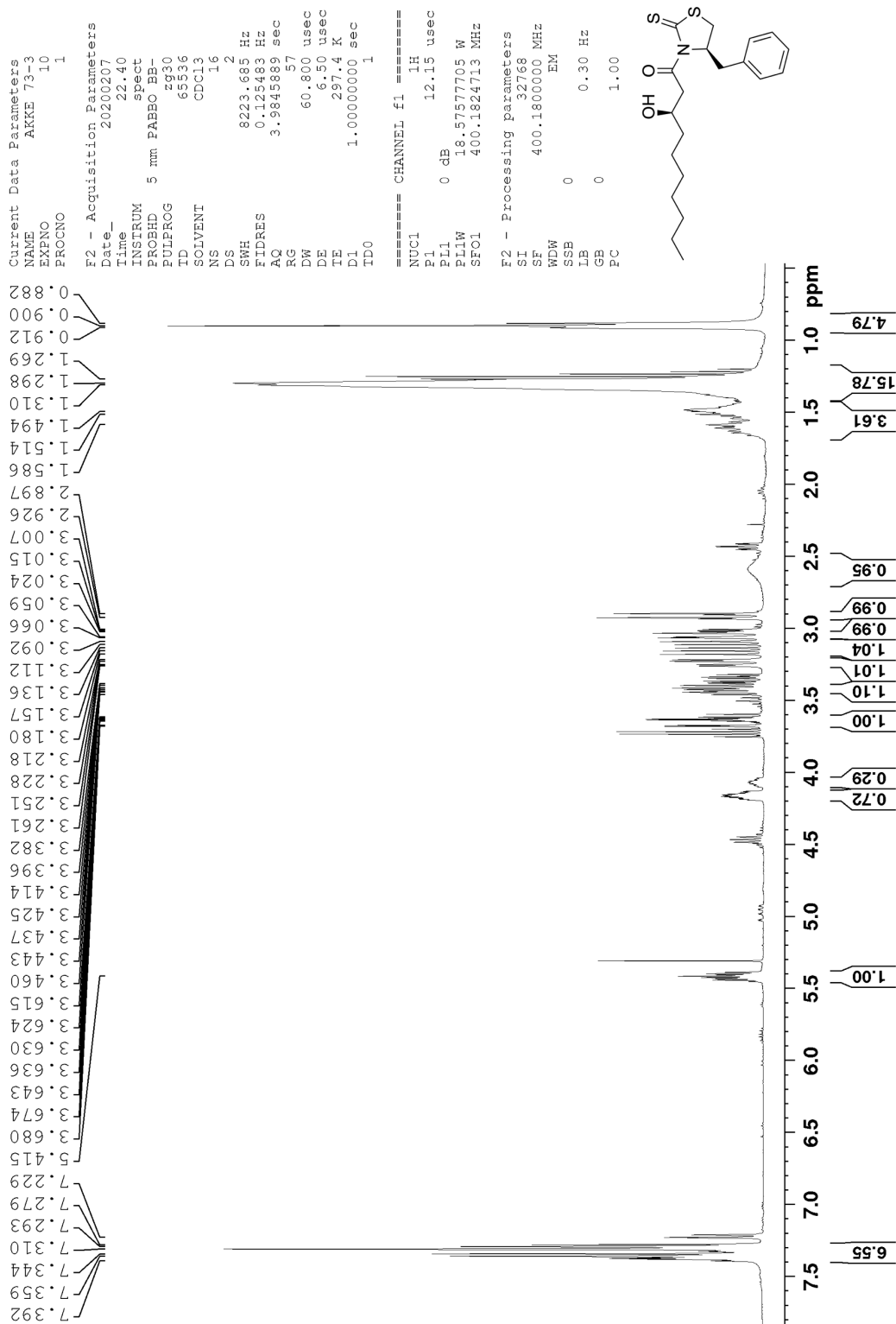


Figur E.4: HSQC-spekter av forbindelse **44**.



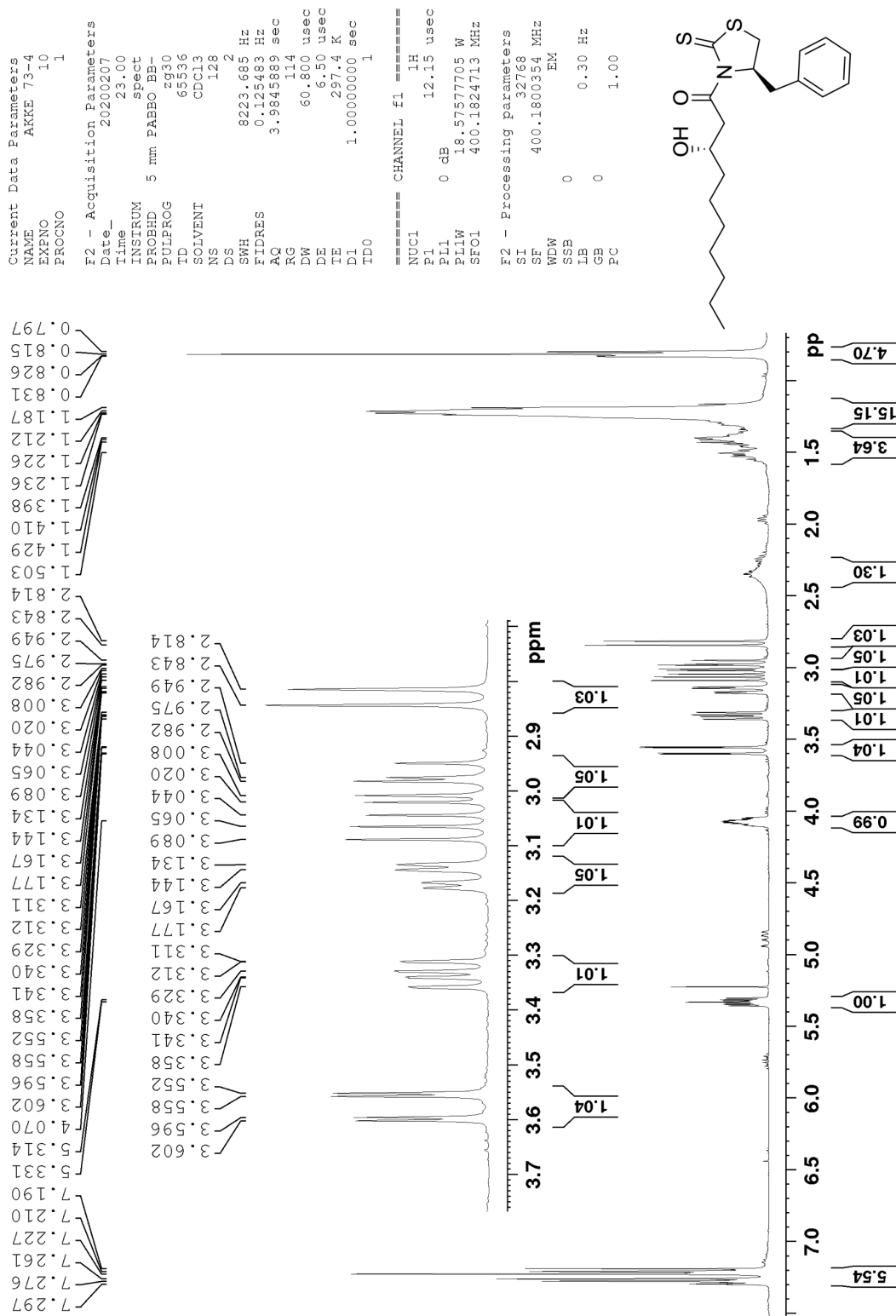
Figur E.5: HMBC-spekter av forbindelse **44**.

Vedlegg F, forbindelse **45a**



Figur F.1: $^1\text{H-NMR}$ av forbindelse **45a**.

Vedlegg F-2, forbindelse **45b**



Figur F-2.1: ¹H-NMR av forbindelse **45b**.

Current Data Parameters
 NAME ARKE 73-4
 F2PNO 12
 FPROGNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20200208
 Time 2.29

INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG cosygpf2f
 TD 2048
 NS 2
 DS 8
 SWH 3649.635 Hz
 FIDRES 1.782048 Hz
 AQ 0.2805760 sec
 RG 64
 DW 137.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 297.4 K
 D0 0.0000300 sec
 D1 0.0000400 sec
 D13 0.0000400 sec
 D16 0.0002000 sec
 INO 0.00027400 sec

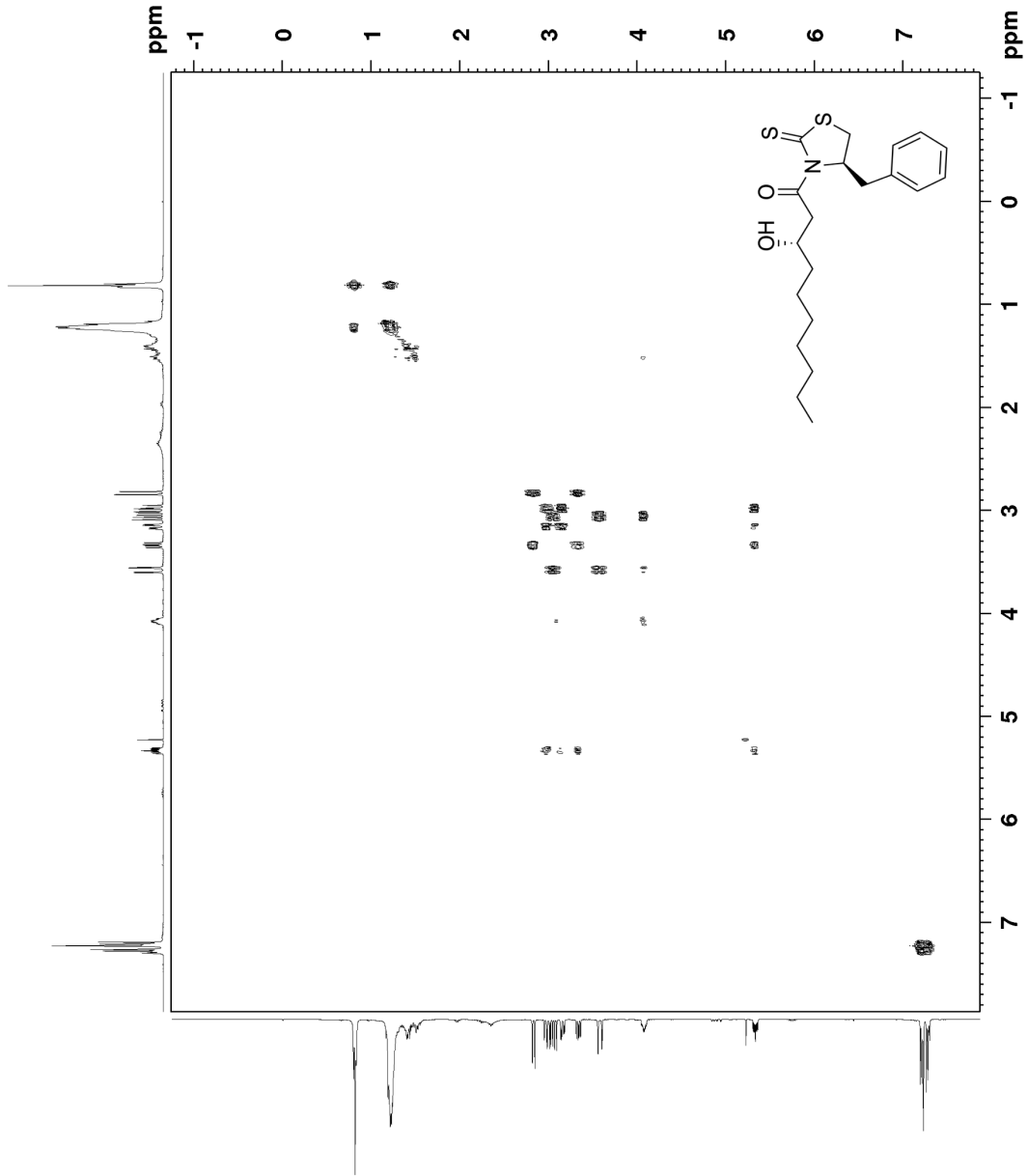
===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P0 12.15 usec
 PL 12.15 usec
 PL1 0 dB
 PLW 16.5757705 W
 SFO1 400.1813587 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GFNAM[1] SINE.100
 GFZ1 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 TD 128
 SFO1 400.1813587 MHz
 FIDRES 57.35857 Hz
 SWH 9.120 Ppm
 FPMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.1800354 MHz
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 QF
 SF 400.1800354 MHz
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0



Figur F-2.2: COSY-spekter av forbindelse 45b.

Current Data Parameters
 NAME AKKE 73-4
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20200207
 Time 23.02
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm F4BBO BB-
 PULPROG noesyph
 TD 2048
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 4
 SWH 3649.635 Hz
 FIDRES 1.782048 Hz
 AQ 0.2805760 sec
 RG 64
 DW 137.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 297.4 K
 D0 0.00012153 sec
 D1 1.97009897 sec
 D8 0.75000000 sec
 IN0 0.00027400 sec

==== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H
 P1 12.15 usec
 PL1 0 dB
 PLW 18.5757705 W
 SFO1 400.1813587 MHz

F1 - Acquisition Parameters

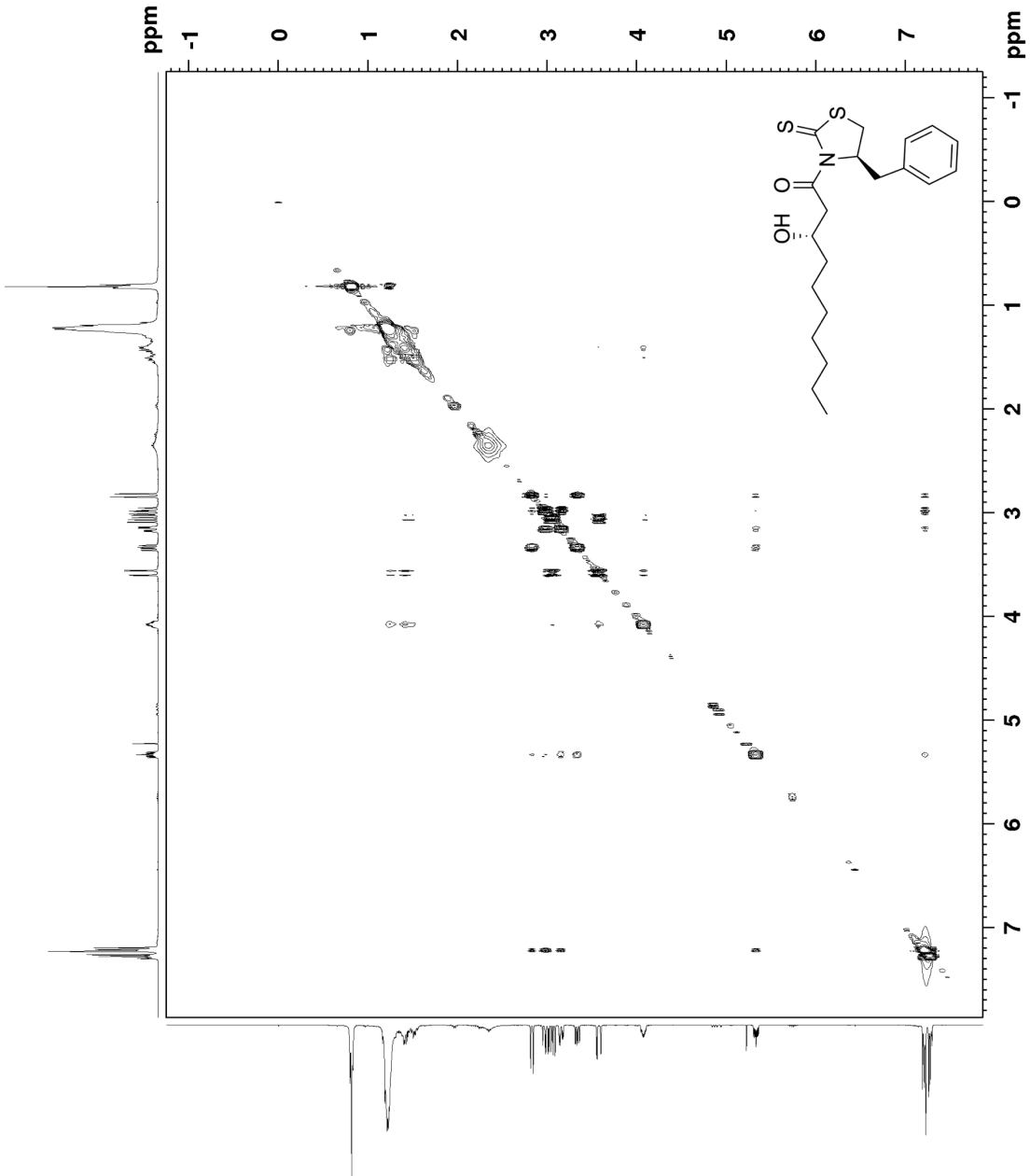
TD 256
 SFO1 400.1814 MHz
 FIDRES 28.512774 Hz
 SW 9.120 Ppm
 FwMODE States-TPEI

F2 - Processing parameters

SI 1024
 SF 400.1800354 MHz
 WDW QSI
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

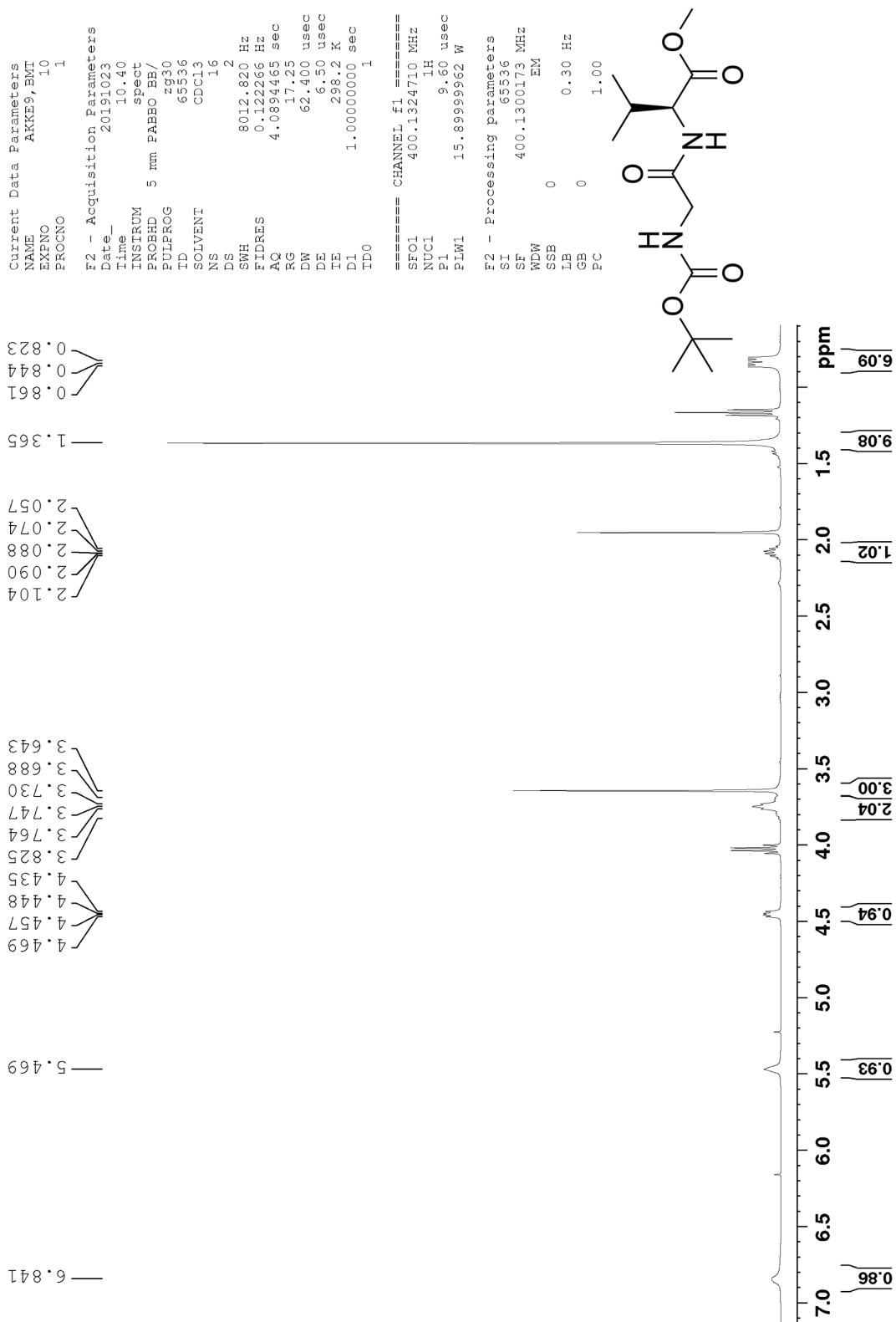
F1 - Processing parameters

SI 1024
 MC2 States-TPEI
 SF 400.1800354 MHz
 WDW QSI
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0



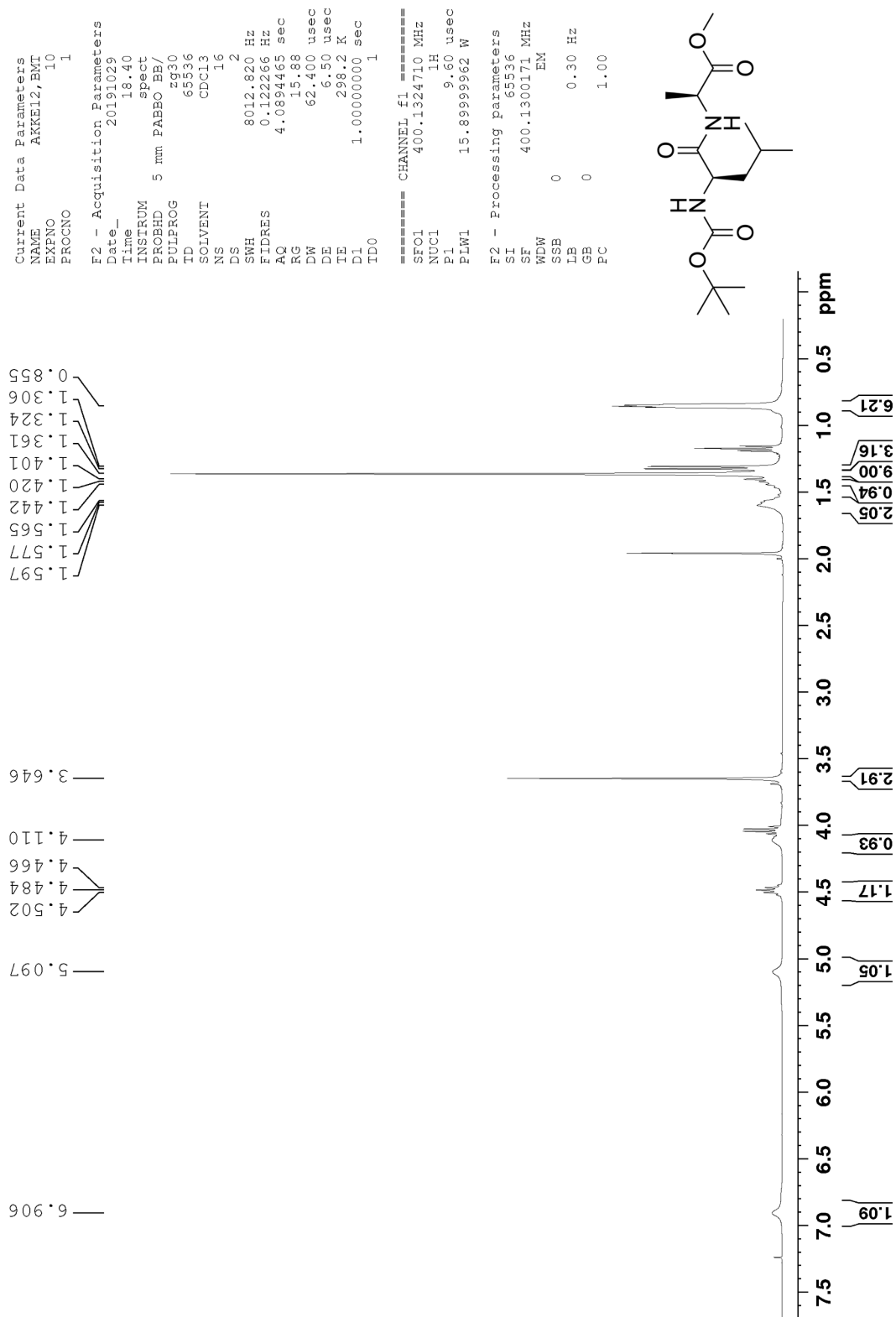
Figur F-2.3: NOESY-spekter av forbindelse 45b.

Vedlegg G, forbindelse 39



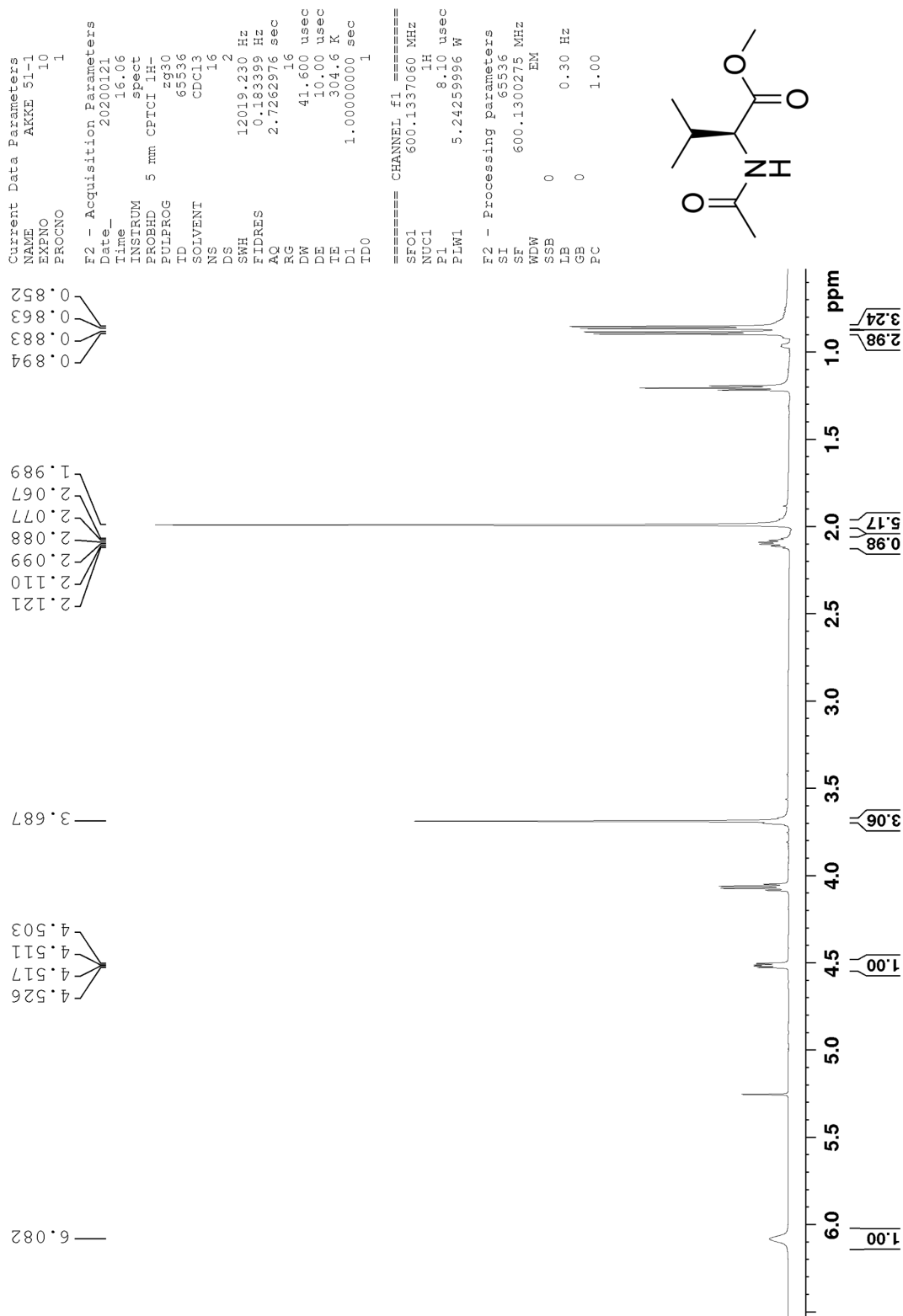
Figur G.1: $^1\text{H-NMR}$ av forbindelse 39.

Vedlegg H, forbindelse 46



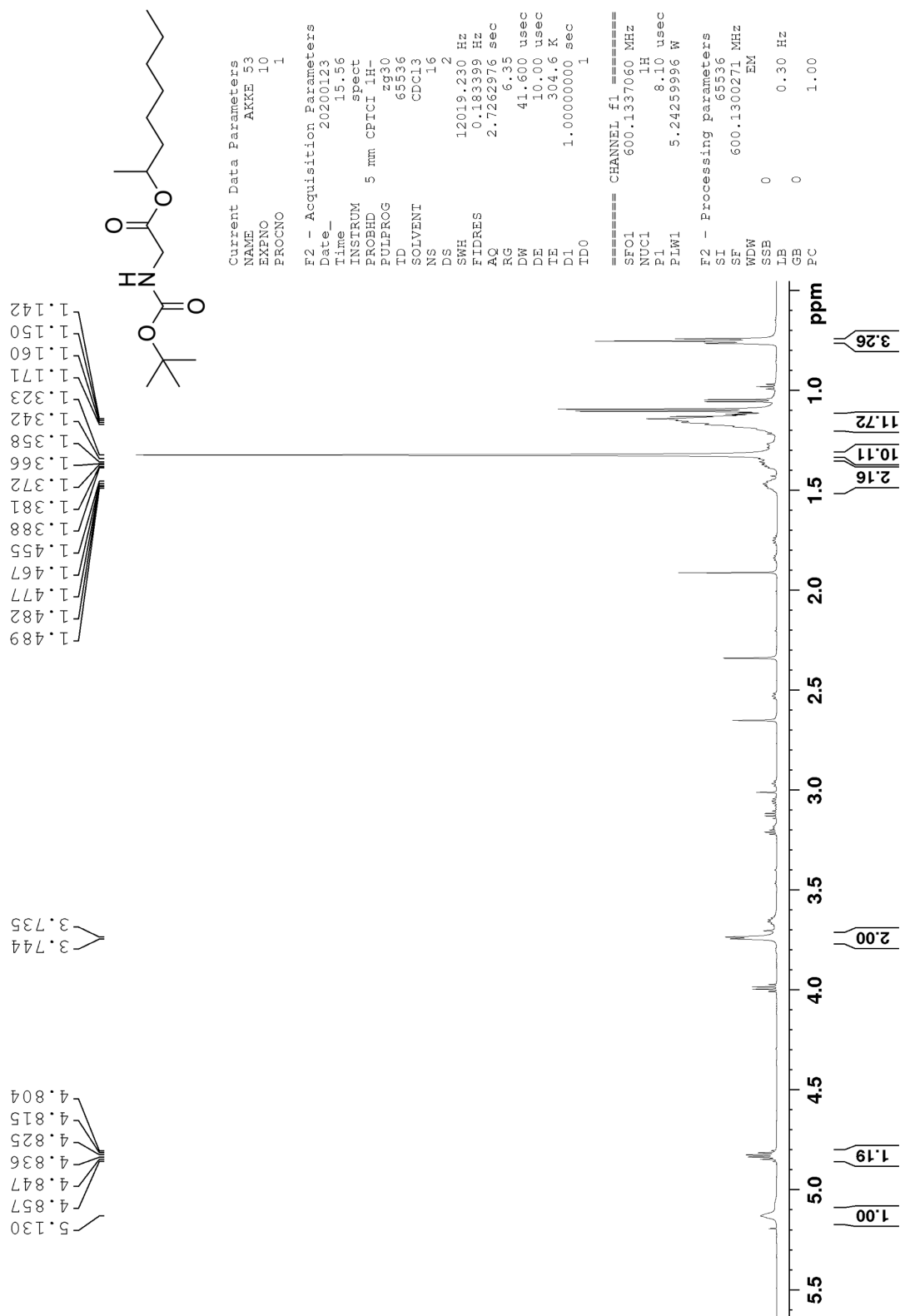
Figur H.1: $^1\text{H-NMR}$ av forbindelse 46.

Vedlegg J, forbindelse **55**



Figur J.1: $^1\text{H-NMR}$ av forbindelse **55**.

Vedlegg K, forbindelse 59



Figur K.1: ¹H-NMR av forbindelse 59.

Vedlegg 2, Poster

Poster

Synthesis of chrysogeamide- and scopularide A and B

Eivind Halvorsen Brenna, Karina Ervik, Eirik Johansson Solum, Bjørg Siw Møller Tannæs

Organisk Kjemisk Vintermøte 2020

SYNTHESIS OF CHRYSOGEAMIDE- AND SCOPULARIDE A AND B

Eivind Halvorsen Brenna^{a, c}, Karina Ervik^{a, c}, Eirik Johansson Solum^{a, b} and Bjørg Siw Møller Tannæs^c

^aMaster of pharmacy, Dept. of Clinical and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, NTNU, Trondheim

^bDept. of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Nord University, Levanger

^cPharmacy, Dept. of Life Science and Health, Faculty of Health Sciences, OsloMet, Oslo



Norwegian University of Science and Technology

E-mail: eivibre@ntnu.no, karinaer@ntnu.no.

OSLOMET

Introduction

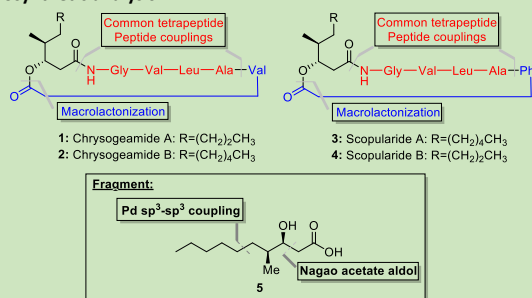
Complex organic molecules, being shaped by the evolutionary process, have emerged from natural sources. These complex molecules have been utilized in the clinic for the treatment of various kinds of infections. Among the diverse microbial phyla in marine ecosystems, the genus *Penicillium* is represented by more than two hundred species. Over the last years several interesting compounds, among them a novel series of cyclohexadepsipeptides, chrysogeamides A–G, nudopetide and scopularides A and B have been isolated from marine-derived *Penicillium*.

Cyclodepsipeptides

Cyclodepsipeptides are a large group of cyclic peptides characterized by the presence of at least one ester bond as part of their backbone.^[1] They have received enduring attention for a wide range of bioactivities. Several representative members have been approved for pharmaceutical use, such as emodepsin^[2] and aplidin^[3].

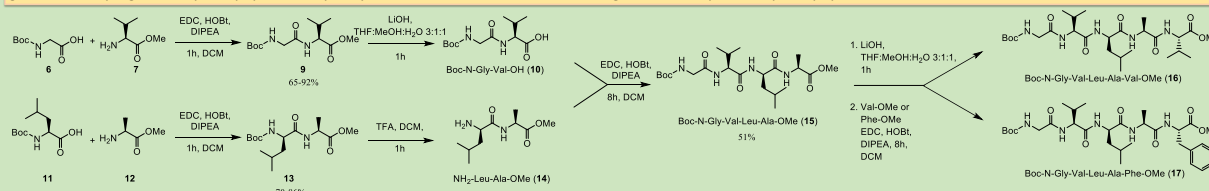
Structurally, the diversity of hydroxy acid building blocks has been well characterized in cyclodepsipeptides.^[1] Two members, the 3-hydroxy-4-methyldecanoic acid (HMDA) **5** and 3-hydroxy-4-methyloctanoic acid (HMOA) moieties are encountered in both chrysogeamides- and scopularides A and B **1-4**. Furthermore, the structural similarities between the four compounds goes even further as the same tetrapeptide **15** are included in all four compounds.

Retrosynthetic analysis



Synthesis of the pentapeptide-fragments

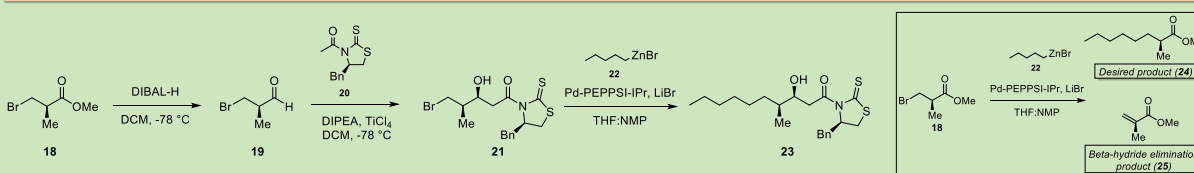
The two key tetrapeptides **16** and **17** are synthesized by using standard peptide couplings methods, employing EDC/HOBt as reagents for the peptide couplings. The common tetrapeptide fragment **15** is a key intermediate, as all four molecules share this structural motif. From this key intermediate valine is added to the C-terminal to get to the chrysogeamide-pentapeptide and phenylalanine to the same C-terminal to get to the scopularide-pentapeptide.



Non-peptide fragment

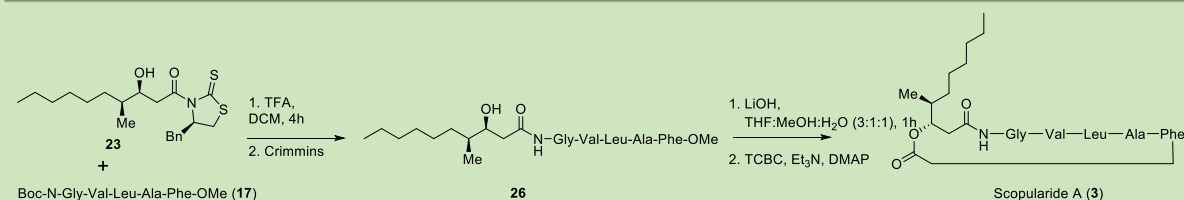
The synthesis of the non-peptide HMDA fragment **23** commenced with a reduction using diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) of the ester **18** to the corresponding aldehyde **19**. Then, an Evans–Nagao acetate aldol reaction yielding intermediate **21**, hereby establishing the correct configuration of the 4-methyl group.^[4] Then, the Pd-PEPPSITM-IPr catalyzed Negishi cross coupling reaction is employed to couple the alkyl zinc-bromide **22** to the primary alkyl bromide **21**. The protocol developed by Organ and co-workers has previously been applied with success in the total synthesis of natural products.^[5] The sp³ – sp³ Negishi cross coupling will be performed with both pentyl zinc-bromide **22** as well as propyl zinc-bromide in order to achieve both the desired non-peptide fragments, HMDA **5/23** and HMOA.

Several efforts were conducted to couple compound **12** directly to the alkyl zinc-bromide **22** using the described Negishi sp³ – sp³ cross coupling reaction. However, the reaction gave limited success, giving the conjugated beta-hydride elimination product **25**. The desired product **24** was not observed. This observation was confirmed with both NMR as well as GC-MS.



Assembly of the fragments and cyclization

The assembly of the non-amino acid fragment and the *N*-deprotected pentapeptide is conducted by a procedure, developed by Crimmins and co-workers.^[6] Then hydrolysis of the methyl ester and subsequently macrocyclization using the Yamaguchi protocol to finish Scopularide A **3**.^[7]



References

- X.-M. Hou, Y.-Y. Li, Y.-W. Shi, Y.-W. Fang, R. Chao, Y.-C. Gu, C.-Y. Wang, C.-L. Shao, *The Journal of Organic Chemistry* **2019**, *84*, 1228-1237.
- G. von Samson-Himmelsjerna, A. Harder, N. C. Sangster, G. C. Coles, *Parasitology* **2005**, *130*, 343-347.
- C. S. Mitsiades, E. M. Ocio, A. Pandiella, P. Maiso, C. Gajate, M. Garayoa, D. Vilanova, J. C. Montero, N. Mitsiades, C. J. McMullan, N. C. Munshi, T. Hideshima, D. Chauhan, P. Aviles, G. Otero, G. Faircloth, M. V. Mateos, P. G. Richardson, F. Mollinedo, J. F. San-Miguel, K. C. Anderson, *Cancer research* **2008**, *68*, 5216.
- J. D. A. Evans, J. Bartroli, T. L. Shih, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 2127-2129; b) Nagao, W. M. Dai, M. Ochiai, M. Shiro, *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 5211-5217.
- a) N. Hadei, E. A. B. Kantchev, C. J. O'Brien, M. G. Organ, *Organic Letters* **2005**, *7*, 3805-3807; b) E. Tungen, M. Aursnes, J. Dalli, H. Arnoldott, C. N. Serhan, T. V. Hansen, *Chemistry* **2014**, *20*, 14575-14578.
- M. T. Crimmins, K. Chaudhary, *Organic Letters* **2000**, *2*, 775-777.
- J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1979**, *52*, 1989-1993.

Acknowledgements

We would like to thank NKS and NTNU for making this trip possible for us.

