

Syntese og biologisk testing av sinkbindende substanser mot metallo- β -laktamase (MBL)

Masteroppgave i Farmasi

Espen Frøvd



Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

SYNTESE OG BIOLOGISK TESTING AV SINKBINDENDE SUBSTANSER MOT METALLO- β -LAKTAMASE (MBL)

Masteroppgave i farmasi

Espen Frøvold

Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

© Espen Frøvd

2015

Syntese og biologisk testing av sinkbindende substanser mot Metallo- β -laktamase (MBL)

Espen Frøvd

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

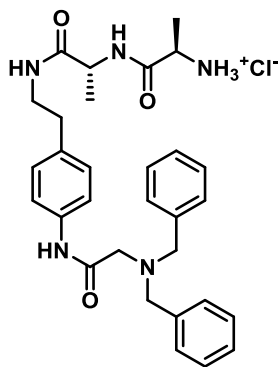
Sammendrag

Antibiotikaresistens er et økende problem og er av WHO rangert som en av de tre største truslene mot menneskers helse for de neste tiårene. Allerede i dag er det estimert at mer enn 25.000 dødsfall årlig i Europa er forbundet med antibiotikaresistens.

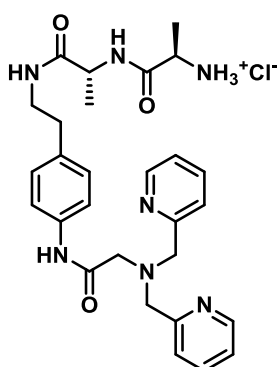
En av de klinisk mest relevante mekanismene bak resistens er β -laktamaser. β -laktamaser inaktiverer antibiotika ved hydrolyse. I dag finnes det inhibitorer mot serin β -laktamase, men det fortsatt ingen inhibitorer mot metallo- β -laktamase (MBL) som har nådd klinisk utvikling. MBL er avhengig av sink for å utføre hydrolyse. En mulig mekanisme for å hemme MBL er ved å binde sink, slik at hydrolysen blir hindret.

OAA4033 er en substans med sinkbindende egenskaper med effekt på MBL. Den som har vist svært lovende egenskaper som adjuvant på MBL positive resistente bakterier testet med β -laktam antibiotika.

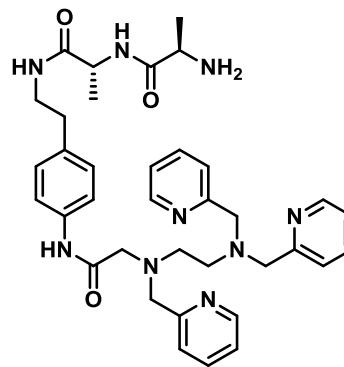
I denne oppgaven har det blitt syntetisert en negativ kontrollsubstans til **OAA4033** uten sinkbindende egenskaper (**EF-1013**) og en analog med sterkere sinkbindende egenskaper (**EF-1046**), for å studere effekten av endringer i den sinkbindende delen. Substansene er testet ut på MBL positive Gram negative patogene bakterier, resistente mot meropenem. Gitt sammen med meropenem som adjuvant, hadde **EF-1046** betydelig effekt på bakteriens resistens, mens **EF-1013** hadde ingen effekt på bakteriens resistens mot meropenem. Ingen av substansene er bakteriedrepende i seg selv



EF-1013



OAA4033



EF-1046

Forord

Denne oppgaven er utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo i perioden august 2014 til mai 2015.

Arbeidet med oppgaven har vært utfordrende, lærerikt og inspirerende. Jeg har vært privilegert som har fått jobbe med så dyktige og engasjerte fagpersoner. Det har vært givende å jobbe med et felt som er så dagsaktuelt og hvor behovet for forskning er stort. Jeg håper at arbeidet kan bidra til bedre helse for medmennesker som er rammet av sykdom.

Jeg vil ført og fremst få takke mine veiledere professor Pål Rongved for inspirasjon og veiledning underveis og ikke minst førstelektor Ove Alexander Høgmoen Åstrand for den beste oppfølging og veiledning man kan tenke seg. Det har vært svært inspirerende og en fornøyelse å ha dere som veiledere.

Videre vil jeg få takke alle de ansatte på avdelingen og mine medstudenter for all hjelp og støtte.

Jeg vil takke familie og gode venner for oppmuntring, støtte, lykkeønskninger og bønn igjennom hele studietiden. «*Alt makter jeg i ham som gjør meg sterk. Likevel gjorde det meg godt at dere sto sammen med meg*» Fil 4. 13-14

Sist, men ikke minst vil jeg takke min forlovede og fremtidige kone Cathrine, for all omsorg, kjærlighet og støtte. Takk for at du alltid er der for meg

Blindern, mai 2015

Espen Frøvoll

Liste over forkortelser

δ	Kjemiskshiftverdi
$^{\circ}\text{C}$	Grader celsius
d	tetthet (g/mL)
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
COSY	Correlation spectroscopy
DCM	Diklormetan
DIPEA	N,N-Diisopropyletylamin
DMAP	4-Dimetylamino pyridin
DMF	Dimetylformamid
DMSO	Dimetyl sulfoxide
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HIV	Human immunodeficiency virus infection
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HRMS	High-resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
VI	

MBL	Metallo- β - laktamase
MEM	Meropenem
MMP	Matrise- metalloproteinaser
MRSA	Meticillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
Mw	Molekylvekt
NDM- 1	New Delhi metallo- β -laktamase-1
NMR	Kjernemagnetisk ressonansspektroskopi
NMM	<i>N</i> -Metylmorfolin
OMP	Ytre membranproteiner
PBP	Penicillinbindende proteiner
R _f	Retensjonsfaktor
SAR	Struktur aktivitets forhold
TFA	Trifluoreddiksyre
TLC	Tynnsjiktskromatografi
TPEN	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrakis(2-pyridylmetyl)etylenediamin
VIM- 2	Verona integronkodet metallo- β -laktamase
WHO	Verdens helseorganisasjon

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Antibiotikaresistens	1
1.1.1	Infeksjoner og bakterier	1
1.1.2	Antibiotikaresistens	2
1.1.3	Utvikling av resistens	4
1.1.4	Resistensmekanismer	4
1.2	Metallo- β -laktamaseinhibitorer	5
1.2.1	Metallo β -laktamase	5
1.2.2	Egenskaper og biologiske rolle for sink.....	6
1.2.3	Utvikling av nye legemidler	7
1.2.4	Sinkbindere som MBL-inhibitor	8
1.3	Bakgrunn og mål for oppgaven	9
1.3.1	Bakgrunn for oppgaven	9
1.3.2	Konkrete mål for oppgaven.....	10
1.3.3	Molekylenes egenskaper	10
1.3.4	Syntesevei Målmolekyl- 1.....	12
1.3.5	Syntesevei Målmolekyl-2.....	13
1.4	Boc-beskyttelse og avbeskyttelse	14
1.5	Amidbindinger og peptidkoblinger	15
1.6	Aminsyntese	18
1.6.1	Reduktiv aminering	18
1.6.2	<i>N</i> -alkylering.....	18
1.6.3	Valg av metode.....	19
2	Resultater og diskusjon	20
2.1	Syntese.....	20
2.1.1	Målmolekyl-1	20
2.1.2	Målmolekyl-2	25
2.2	Strukturoppklaring	31
2.2.1	Strukturoppklaring av substans 3	31
2.2.2	Strukturoppklaring av Målmolekyl-1	33
2.2.3	Strukturoppklaring Målmolekyl- 2.....	36

2.3	Biologiske resultater	39
3	Konklusjon	41
4	Veien videre	42
5	Eksperimentell del.....	44
5.1	Syntese av 1	45
5.2	Syntese av 2.....	47
5.3	Syntese av 3.....	49
5.4	Syntese av 4.....	53
5.5	Syntese av 5.....	55
5.6	Syntese av 6.....	57
5.7	Syntese av Målmolekyl-1	60
5.8	Syntese av 7.....	64
5.9	Syntese av 8.....	67
5.10	Syntese av 9	69
5.11	Syntese av 10	71
5.12	Syntese av 11	73
5.13	Syntese av 12	76
5.14	Syntese av 13	78
5.15	Syntese av Målmolekyl- 2	81
	Litteraturliste	85

Indeks for figurer og tabeller

Figurer

Figur 1.1 Cellevegg Gram positiv og negative bakterier	2
Figur 1.2 MBL mekanisme	5
Figur 1.3 Klavulansyre og amoxicillin	8
Figur 1.4 TPEN	9
Figur 1.5 Struktur av OAA4033 , Målmolekyl- 1 og Målmolekyl-2	10
Figur 1.6 Sinkbinding OAA4033 og Målmolekyl-2	11
Figur 1.7 Syntesevei Målmolekyl-1	12
Figur 1.8 Syntesevei Målmolekyl- 2	13
Figur 1.9 syntesevei substans 9	14
Figur 1.10 Boc-beskyttelse av amin.....	14
Figur 1.11 Fjerning av Boc-gruppe med TFA.....	15
Figur 1.12 Amiddannelse ved kondensasjon.....	15
Figur 1.13 Amiddannelse med syrehalid katalysert av DMAP.....	16
Figur 1.14 HBTU og HATU	16
Figur 1.15 Mekanisme HATU.....	17
Figur 1.16 Reduktiv aminering	18
Figur 1.17 Mekanisme <i>N</i> -alkylering	19
Figur 1.18 Valg av metode	19
Figur 2.1 Nye substanser i syntesen av Målmolekyl-1	21
Figur 2.2 Alternative synteseveier Målmolekyl-1	24
Figur 2.3 Struktur og syntesevei for nye substanser i syntese av Målmolekyl-2	25
Figur 2.4 Syntesevei 9	28
Figur 2.5 Illustrasjon av alternativ syntesevei Substans 9	30
Figur 2.6 Posisjonsnummerert struktur av substans 3	31
Figur 2.7 Posisjonsnummerert struktur av Målmolekyl-1	33
Figur 2.8 Posisjonsnummerert struktur av Målmolekyl-2	36
Figur 2.9 Struktur meropenem	39

Figur 4.1 Alternative strukturer.....	43
Figur 5.1.1 ¹ H NMR Substans 1	46
Figur 5.2.1 ¹ H NMR Substans 2	48
Figur 5.2.2 ¹³ C NMR Substans 2	48
Figur 5.3.1 ¹ H NMR Substans 3	50
Figur 5.3.2 ¹³ C NMR Substans 3	51
Figur 5.3.3 COSY Substans 3	51
Figur 5.3.4 HSQC Substans 3	52
Figur 5.3.5 HMBC Substans 3	52
Figur 5.4.1 ¹ H NMR Substans 4	54
Figur 5.4.2 ¹³ C NMR Substans 4	54
Figur 5.5.1 ¹ H NMR Substans 5	56
Figur 5.6.1 ¹ H NMR Substans 6	58
Figur 5.6.2 ¹³ C NMR substans 6	59
Figur 5.7.1 ¹ H NMR Målmolekyl- 1	61
Figur 5.7.2 ¹³ C NMR Målmolekyl- 1	62
Figur 5.7.3 COSY Målmolekyl-1	62
Figur 5.7.4 HSQC Målmolekyl-1	63
Figur 5.7.5 HMBC Målmolekyl-1	63
Figur 5.8.1 ¹ H NMR Substans 7	65
Figur 5.8.2 ¹³ C NMR Substans 7	66
Figur 5.9.1 ¹ H NMR Substans 8	68
Figur 5.9.2 ¹³ C NMR Substans 8	68
Figur 5.10.1 ¹ H NMR Substans 9	70
Figur 5.10.2 ¹³ C NMR Substans 9	70
Figur 5.11.1 ¹ H NMR Substans 10	72
Figur 5.11.2 ¹³ CNMR Substans 10	72

Figur 5.12.1 ^1H NMR Substans 11	74
Figur 5.12.2 ^{13}C NMR Substans 11	75
Figur 5.13.1 ^1H NMR Substans 12	77
Figur 5.13.2 ^{13}C NMR Substans 12	77
Figur 5.14.1 ^1H NMR Substans 13	79
Figur 5.14.2 ^{13}C NMR Substans 13	80
Figur 5.15.1 ^1H NMR Målmolekyl-2	82
Figur 5.15.2 ^{13}C NMR Målmolekyl-2	83
Figur 5.15.3 COSY Målmolekyl-2	83
Figur 5.15.4 HSQC Målmolekyl-2	84
Figur 5.15.5 HMBC Målmolekyl-2	85

Tabeller

Tabell 1 Strukturoppklaring substans 3	32
Tabell 2 Strukturoppklaring Målmolekyl-1	34
Tabell 3 Strukturoppklaring Målmolekyl-2	37
Tabell 4 Biologiske resultater OAA4033	40
Tabell 5 Biologiske resultater substans 9, 11, 12, 13, Målmolekyl-1 og Målmolekyl-2	40

1 Innledning

1.1 Antibiotikaresistens

Oppdagelsen og utviklingen av moderne antibiotika er en av de største prestasjonene i moderne medisin. Disse legemidlene gjorde oss i stand til å bekjempe patogene bakterielle infeksjoner og har reddet utallige menneskeliv. Helt siden penicillinet ble utviklet har man oppdaget og kjent til bakteriestammer som raskt blir resistente mot ulike typer antibiotika. Stadig utvikling av nye antibiotika med nye virkningsmekanismer har gjort oss i stand til å behandle bakterielle infeksjoner.(1)

Bakteriell resistens mot antibiotika er imidlertid i ferd med å bli et stort problem på verdensbasis.(2-4) Antibiotikaresistens er økende og påvirker et meget bredt spekter av menneskelige sykdommer, inkludert tuberkulose, kolera, malaria og HIV / AIDS. Av spesiell bekymring er økningen i antallet menneskelige patogener som utvikler multiresistens mot vanlige antibiotika. Dette gir nye smittsomme sykdommer som vi mangler effektiv behandling mot. Dette gjør at sykdommer som tidligere lot seg behandle, ikke lar seg behandle med dagens antibiotika.(5) Dette er noen av årsakene til at Verdens Helseorganisasjon (WHO) har oppført antibiotikaresistens som en av de tre største truslene mot menneskers helse for de neste tiårene.(2, 3) Antibiotikaresistens vil også være en trussel for dyrehelse og skape store utfordringer for matproduksjon.(6)

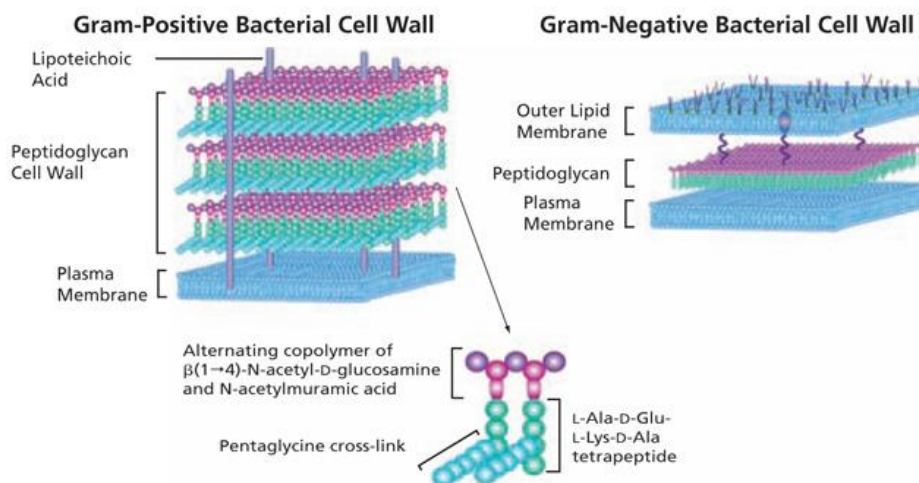
Hvert år er smittsomme sykdommer skyld nesten to tredjedeler av all dødelighet hos barn under 5 år på verdensbasis. Allerede i dag er det estimert at mer enn 25.000 dødsfall årlig i Europa er forbundet med antibiotikaresistens(6) og at den årlige økonomiske byrden av resistente bakterier utgjør mer enn 1,5 milliarder euro.(5) Dette understreker viktigheten av å utvikle nye behandlinger mot infeksjøs sykdommer og særlig mot resistente bakterier.

1.1.1 Infeksjoner og bakterier

I følge Bjørn Myrvang vil en infeksjon foreligge «når mikroorganismer øker i antall og forårsaker skade på slimhinner og hud, og når mikroorganismer invaderer dypereliggende vev»(7) Infeksjoner kan forårsakes av bakterier, virus, sopp eller parasitter.(7)

Bakterier er mikroorganismer som er encellede prokaryote celler. Det som kjennetegner prokaryote celler er at de kun har ett kromosom, de har ikke cellekjerne og har ikke mitokondrier i motsetning til eukaryote celler. Bakteriene har ulikt utseende og de kan orientere seg på ulike måter. Bakterier kan ha form som kokker, staver eller spiraler. Kokkene kan orientere seg i kjeder som streptokokker, eller i uregelmessige klaser som stafylokokker.(8)

Bakterier kan deles inn i ulike klasser, blant annet Gram positive og Gram negative bakterier.(8) Dette er en inndeling relatert til i hvilken grad bakterier lar seg gramfarge, som bestemmes av mengde peptidoglykan i bakterienes cellevegg. Gram positive bakterier har et tykt lag med peptidoglykan i celleveggen som beskytter plasmamembranen og farges tydelig, mens Gram negative har et periplasma som inneholder lite peptidoglykan i celleveggen og farges i mindre grad.(8) Forskjell i cellevegg er vist i figur 1.1



Figur1.1 Cellevegg Gram positiv og negative bakterier(9)

1.1.2 Antibiotikaresistens

At en bakterie er resistent mot antibiotika betyr at antibiotika ikke har effekt på bakterieveksten og er uvirksom mot infeksjonen man behandler.(10) Det finnes ulik grad og type av antibiotikaresistens. Noen resistente stammer er kun resistent mot en klasse antibiotika, men lar seg greit behandle av et annet antibiotikum med ulik virkningsmekanisme. Multiresistente bakterier er bakterier som er resistente mot to eller flere klasser av antibiotika og pan-resistente bakterier er resistente mot alle tilgjengelige antibiotika. De to sistnevnte typene er de farligste fordi de er vanskeligste å behandle.(1)

Selv om resistente Gram-positive bakterier utgjør en betydelig trussel, er fremveksten av multiresistente stammer av patogene Gram-negative bakterier som *Escherichia coli* av særlig bekymring. Pan-resistens eller ekstrem legemiddelresistens er ofte brukte begreper for å beskrive klinisk viktige isolater av *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* og *Enterobacteriaceae*. Disse er resistente mot nesten alle antibiotika.(11) Resistens hos disse bakteriene skyldes blant annet β -laktamaser. β -laktamaser er enzymer som inaktiverer β -laktam antibiotika ved hydrolyse. (1) Med tanke på at β -laktam antibiotika er den viktigste og mest brukte gruppen av antibiotika, er β -laktamaser en av de viktigste mekanismene bak antibiotikaresistens og den som har størst klinisk relevans for resistente Gram-negative bakterier.(12)

Forekomst av antibiotikaresistens i Norge

Ved hjelp av overvåkningsprogrammet NORM har man i Norge god oversikt over antibiotikaresistens hos mikrober ved noen sentrale sykdomstilstander.(6) Selv om resistensproblemene er beskjedne i Norge i forhold til andre land, er den stigende også her. Det registreres en økning av resistens mot β -laktam antibiotika, aminoglykosider og fluorokinoloner. Man ser også at resistens er blitt et betydelig problem i behandlingen av tuberkulose og gonore.(6)

Noen eksempler på infeksjoner hvor det har blitt registrert en økning i resistens er enterobakterier. Resistens mot ampicillin og tetracyklin hos *Salmonella* smittende pasienter i Norge har økt fra 20 % til 50 % i tidsrommet 2001 - 2012. Hos pasienter med *E.coli* infeksjon har forekomsten av ESBL økt fra under 1 % i urin og blodkultur i 2003 til henholdsvis 2,2 % og 5,5 % i 2012. Det blir også meldt om stadig flere MRSA-funn. Det ble meldt inn 1210 tilfeller i 2012. MRSA utgjør dog kun 1 % av alle stafylokokkisolat fra blodkultur.(6)

Forekomst av antibiotikaresistens globalt

Det fremkommer av WHO's overvåkningsrapport av antimikrobiell resistens(13), at antibiotikaresistens har blitt et stort problem og er blant de største globale helsemessige utfordringen vi står overfor. De konstaterer at det har blitt observert svært høye rater av resistens i bakterier som forårsaker allmenne infeksjøs sykdommer som urinveisinfeksjon og luftveisinfeksjon. Særlig *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pneumoniae* har høye rater av antibiotikaresistens. Tar man *E.coli* som eksempel

viser nasjonale rapporter i 5 av 6 WHO regioner 50 % resistens mot både 3. generasjons ceflasporiner og fluorkinoloner. Det samme nivået ser man for resistens blant *Streptococcus pneumoniae* mot methicillin (MRSA).(13)

1.1.3 Utvikling av resistens

Bakterier kan utvikle resistens mot antibiotika via ulike mekanismer. Det kan skje ved en tilfeldig mutasjon eller ved horisontal genoverføring via konjugasjon, transformasjon eller transduksjon.(10)

Konjugasjon er en mekanisme for overføring av genmateriale som innebærer direkte kontakt mellom en donor-bakterie og en mottager-bakterie. Genmateriale overføres fra donor-bakterien til mottager-bakterien i form av et plasmid. Plasmidet kopierer seg selv og overfører en kopi til mottager-bakterien.(10)

Ved transformasjon blir fritt DNA fra omgivelsene tatt opp i en mottakercelle. Bakterien vil først binde DNA reversibelt for så bli irreversibel bundet til DNA-bindende proteiner i celleveggen. Noen celler er spesielt kompetente til å transformere DNA fra omgivelsene.(10)

Ved transduksjon er det virus (bakteriofag) som tar med seg DNA fra en celle og overfører til en annen. Det er to måter dette kan gjøres på, enten generalisert eller spesialisert transduksjon. Ved generalisert transduksjon kan alt genom fra donorkromosomet bli transportert til mottager ved hjelp av bakteriofag. Ved spesialisert transduksjon er det kun en bestemt sekvens av vertsgenomet som overføres som en integrert del av virusets genom(10)

1.1.4 Resistensmekanismer

Det er ulike mekanismer bak antibiotikaresistens. En av mekanismene kan være endring i aktivt sete i penicillin bindende protein (PBP). PBP er et protein som er involvert i de siste trinnene i syntese av peptidoglykan. Ved endret konfirmasjon i det aktive setet, senkes affiniteten til β -laktam antibiotika. Dette gjør at til β -laktam antibiotika binder seg dårligere til PBP og får redusert effekt på celleveggsyntesen.(14)

Effluxpumper er en transportmekanisme som bakteriene kan utvikle. Denne transportmekanismen frakter antibiotika ut fra periplasma og ut til omgivelsene. Effluxpumper er en viktig mekanisme innen «multidrug» resistens i mange Gram-negative

patogene bakterier.(1)

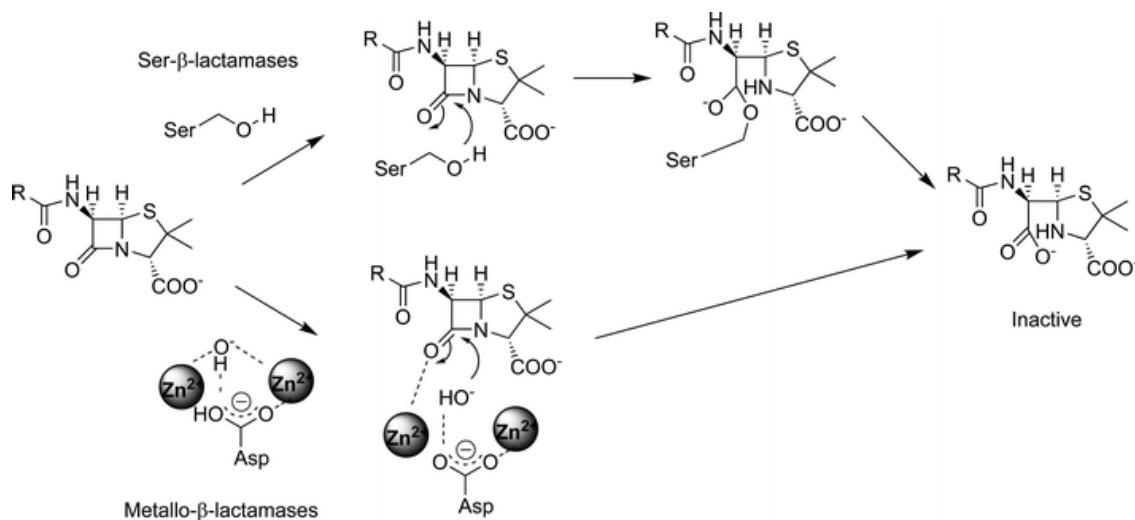
Redusert uttrykk av ytre membranprotein (OMP) er en mekanisme som gir dårligere permeabilitet for antibiotika. Antibiotika kommer seg inn i bakteriecellen enten ved diffusjon igjennom den ytre membranen eller ved transport igjennom transportproteiner. Punktmutasjon i disse proteinene kan gi redusert funksjonalitet og senket permeabilitet til β -laktamer. Man ser ofte reduksjon av transportproteiner sammen med uttrykk av β -laktamaser.(14)

β -laktamaser er den vanligste og viktigste mekanismen for resistens i Gram negative bakterier. β -laktamaser er enzymer som bryter ned β -laktam-antibiotika ved hydrolyse. β -laktamasene kan deles i serin-enzymmer og sinkenzymmer. Basert på aminosyresekvens deles serin β -laktamasene i de 3 gruppene A, C og D. Klasse B av β -laktamasene er sink enzymer kjent som metallo- β -laktamaser.(1)

1.2 Metallo- β -laktamaseinhibitorer

1.2.1 Metallo β -laktamase

I klassifiseringen av β -laktamaser er metallo- β -laktamaser (MBL) klasse B. MBL kan deles inn i de tre undergruppene B1, B2 og B3 basert på aminosyresekvensen, hvilke substrater som hydrolyseres og krav til metallioner. Disse enzymene inaktiverer β -laktam antibiotika ved å hydrolysere β -laktam ringen ved hjelp av sinkatomer i det aktive sete. MBL har ingen sekvensiell eller strukturell likhet til serin β -laktamasene. (12) Mekanisme vist i figur 1.2.



Figur 1.2 MBL mekanisme(15)

Metallo- β -laktamaser hydrolyserer et svært bredt spekter av β -laktamer. Det omfatter nesten alle β -laktamene unntatt monobaktamer som aztreonam. MBL har blitt oppdaget i mange patogene bakteriestammer og blir spredt raskt ved blant annet konjugasjon. Selv om MBL er en stor helsemessig trussel, er det foreløpig ingen kliniske egnede inhibitorer av dem.(16-18)

Det er allment akseptert at den katalytiske rollen til sink-ionet er at den fungerer som en Lewis syre.(19) Som en Lewis syre vil sink koordinere til elektronene i karbonyl-oksygenet i β -laktamer, som er Lewis baser, vist i figur 1.2. Dette gir et mer elektronfattig karbonylkarbon, som blir mer mottagelig for nukleofilt angrep. I tillegg til dette vil sink-ionet være stabiliserende for det negativt ladet tetrahedriske intermedietet som dannes. Sink kan også være en kilde til nukleofilt hydroksid ved å binde vann, ved hjelp fra et nærliggende aspargin. (19)

1.2.2 Egenskaper og biologiske rolle for sink

Sink er grunnstoff nummer 30 i den periodiske system og er et metall med molekylvekt på 65,38 g/mol. Det er det 24. mest forekommende grunnstoffet på jorda og har en gjennomsnittlig konsentrasjon på 75 ppm.(20) Som andre metallioner er sink en Lewis syre og den vil kunne orientere seg mot til Lewis baser.

Sink er nødvendig for alle former for liv og er til stede i alle organismer. Hos mennesker er sink det spormetallet vi har nest mest av, kun slått av jern.(20) Sink er altså et viktig sporstoff og konsentrasjon i kroppen er strengt regulert. Omtrent 90 % av all sink i kroppen er bundet i sinkfinger-proteiner eller enzymer, mens 10 % er løst bundet.(21) Sink er en nødvendig bestanddel i karbon anhydrase som regulerer CO₂ i blodet og som er viktig for transport av CO₂ til lungene. Tilstander som er forbundet med forstyrrelser i sink-homeostasen er kreft, neurodegenerative sykdommer som Alzheimers og Parkinsons, diaré og infertilitet hos menn. For mye sink kan føre til gastrointestinale problemer og hemme opptak av kobber og jern. (22, 23)

I 1996 kjente man til at omtrent 300 metallo-enzymmer med et eller flere sinkatomer som hadde enten en katalytisk aktivitet, eller strukturelt formål.(24) I 2011 var over 6170 strukturer av sinkbindende proteiner ble rapportert til Protein Data Bank.(25) Sinkenzymmer finnes i alle enzym-klasser og blant de viktige sink metallo-enzymene finner man alkohol dehydrogenase,

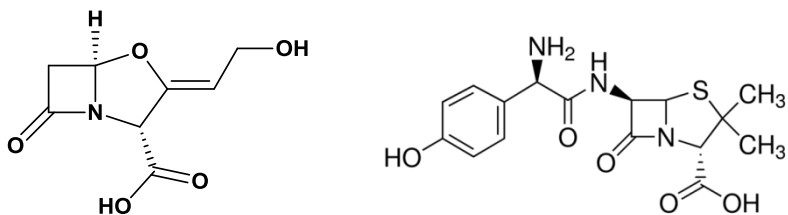
karbon anhydrases, metallo- β -laktamaser, insulinnedbrytende enzymer, og matrise-metalloproteinaser (MMP).(24, 25)

1.2.3 Utvikling av nye legemidler

For å imøtekomme den helsetrusselen som multiresistente bakterier utgjør, er det stort behov for innovasjon av nye virkestoff. Bedre hygiene og en riktigere bruk må også ligge til grunn, men er ikke nok i seg selv til å bekjempe multiresistente bakterier. Dagens internasjonale mobilitet vanskeliggjør dette. Man kan velge ulike strategier for utvikling av nye virkestoff. En mulighet er å utvikle og innføre nye og mer potente derivater av eksisterende antibiotika. Utfordringen med dette er at det bare vil gi midlertidige løsninger, siden eksisterende resistensmekanismer raskt vil tilpasse seg for å imøtekomme de nye derivatene.

En alternativ måte å bekjempe utviklingen av resistens hos bakterier er å angripe mekanismen som fører til resistens, som å inhibere enzymer som inaktiverer antibiotika. En viktig gruppe av slike enzymer er β -laktamaser.(1, 26) Som nevnt inaktiverer disse enzymene β -laktam antibiotika ved hydrolyse. β -laktam antibiotika har vært den historiske hjørnesteinen i antibakteriell kjemoterapi og inkluderer penicilliner, cefalosporiner, monobaktamer og karbapenemer. β -laktamaser er den mest utbredte og klinisk viktigste motstandsmekanismen til resistente bakterier.(1, 26)

Det har blitt utviklet inhibitorer av klasse A serin β -laktamaser som klavulansyre, sulbactam og tazobacta. Disse er adjuvanter. De har ikke antibakteriell effekt i seg selv, men viker ved å binde seg irreversibelt til serin β -laktamaser og på den måten ødelegge resistens hos bakterier. β -laktam antibiotika får igjen effekt på bakterier som ellers ville vært resistente. Augmentin (amoxicillin og klavulansyre,), hvor klavulansyre er adjuvanten, har vært en kommersiell suksess og har vært med å gjenopprette aktiviteten og til amoxicillin.(14) Denne suksessen med kombinasjonen av β -laktam antibiotika og β -laktamaseinhibitor har inspirert flere forskningsgrupper til å bruke den samme tilnærmingen til å utvikle inhibitorer mot blant annet MBL. Likevel er det ennå ingen molekyler med aktivitet mot MBL som har nådd klinisk utvikling.(14, 27, 28)



Figur 1.3 Klavulansyre og amoxicillin (29) (30)

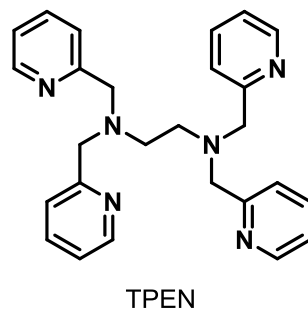
Metallo β -laktamaser fremstår som det viktigste målet for å bekjempe resistensutvikling. En ny MBL-inhibitor vil forlenge den terapeutiske levetiden til nåværende β -laktamer. Dette er bakgrunnen for at vi ønsker å utvikle adjuvanter som inhiberer MBL og som sammen med β -laktam antibiotika hemmer vekst av resistente bakterier med metallo- β -laktamase.

1.2.4 Sinkbindere som MBL-inhibitor

Et mulig angrepspunkt for å inhibere MBL er å binde sink, enten i selve enzymet eller i omgivelsene. På denne måten vil enzymet enten ikke ha tilgang på sink, eller at sink i enzymet blir sterisk blokkert. Slik kan hydrolysen hemmes ved at man enten blokkerer hydrolysen sterisk eller ved at enzymet ikke har sink tilgjengelig.

Sink nødvendig for aktiviteten til flere viktige enzymer, (24, 25) og man kan tenke seg at disse også blir hemmet av sinkbindere. Klarer man å hemme en så basal mekanisme vil det være en større utfordring for bakteriene å utvikle resistens, siden det krever en større genetisk endring for å overkomme virkestoffene.

TPEN (figur 1.4) som er en sterk sinkbinder som har vist inhiberende effekt på MBL. (31) Det kan likevel være problematisk å bruke denne og andre sinkbindere dirkete med β -laktam antibiotika grunnet toksisitet. (32) Substansene vil ha en høy logP-verdi som gjør at de enkelt går over cellemembraner. logP er et mål på hydro- og lipofilitet. En substans med høy logP-verdi er mest lipofilt. For å kunne dra nytte av sinkbindere, må man for det første gjøre dem selektive for bakterier og for det andre gjøre dem mer hydrofile, de vil si senke log-P.



Figur 1.4 TPEN

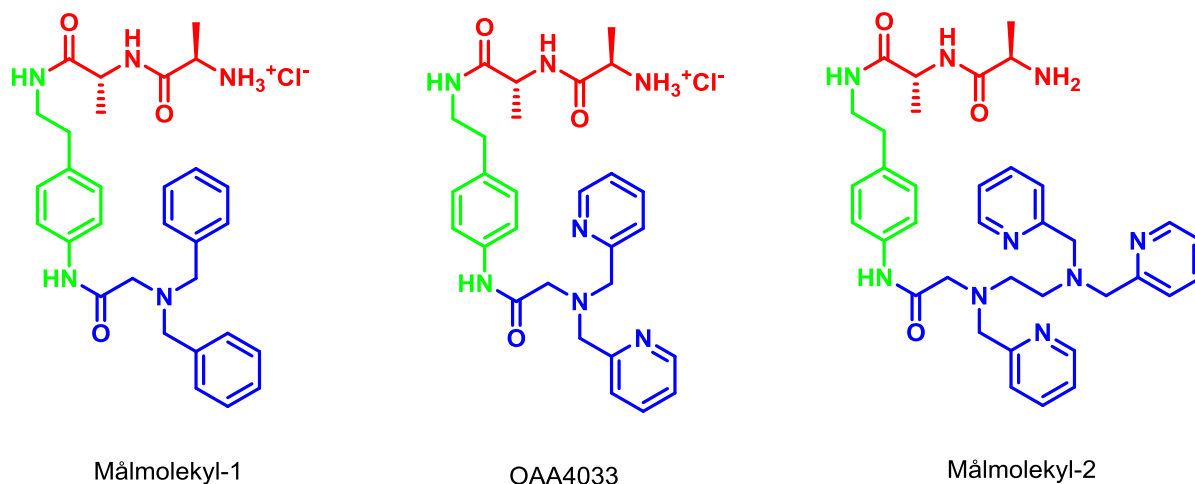
For å gjøre substansene mer selektive for bakterier, må man finne angrepspunkt hos bakterier som man ikke finner i humane celler. Et av dem er penicillin bindende proteiner (PBP). Dersom man kobler et peptid med linkende struktur som penicillin på en sinkbindende substans, vil denne kunne binde til PBP.(1) På den måten bør substansen tas opp i bakterieceller mer selektivt. Samtidig vil peptidet regulere log-P verdien på substansen ned, slik at den ikke så lett går over cellemembraner og blir mindre toksisk for humane celler.

1.3 Bakgrunn og mål for oppgaven

Det overordnede målet med oppgaven er å syntetisere og studere biologisk effekt av sinkbindende MBL-inhibitorer på MBL positive resistente bakterier. Legemiddelkandidatene vil være adjuvanter og skal testes i kombinasjon med β -laktam antibiotika. Målet er å generere kunnskap om struktur aktivitetsforhold (SAR) til våre sinkbindende substanser.

1.3.1 Bakgrunn for oppgaven

Utgangspunktet for oppgaven er forskningsarbeidet som har blitt gjort på sinkbindende stoffer med effekt på MBL, gjort av ZincChel gruppen. I dette arbeidet har **OAA4033** blitt utviklet av Ove Alexander Høgmoen Åstrand.(33) Denne har vist svært lovende egenskaper som adjuvant på MBL positive resistente bakterier testet med β -laktam antibiotika. Strukturen til **OAA4033** kan deles inn i 3 deler; vektor merket i rødt, linker merket i grønt og sinkbinderdel merket i blått i figur 1.5.



Figur 1.5 Struktur av **OAA4033**, **Målmolekyl- 1** og **Målmolekyl-2**

1.3.2 Konkrete mål for oppgaven

De konkrete målene er å syntetisere en negativ kontrollsubstans (**Målmolekyl-1**) med strukturellhet til **OAA4033** uten sinkbinderegenskaper og en substans med forsterkende sinkbinderegenskaper (**Målmolekyl-2**), men med samme linker og vektor som **OAA4033**. Målmolekylene skal testes ut på resistente MBL positive bakterier som adjuvanter, gitt sammen med β -laktam antibiotika. Hensikten er å studere effekten av endringer i den sinkbindende delen av **OAA4033**. Struktur er vist i figur 1.5.

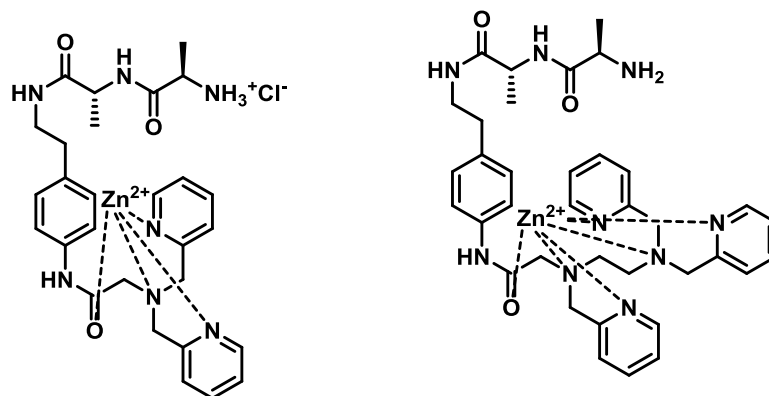
1.3.3 Molekylens egenskaper

Vektoren i **OAA4033** og **Målmolekyl-1** og **2** er peptidet *D*-alanyl-*D*-alanine (*D*-Ala-*D*-Ala), som etterlikner strukturen til penicilliner og byggesteiner i bakteriens cellevegg. Strukturlikheten gjør at peptidet vil binde seg selektivt til penicillinbindende proteiner (PBP), som kun finnes i bakterier.(1) Peptidet senker også logP-verdien, noe som gjør molekylet mer hydrofilt og mindre toksisk for humane celler. Linkeren har til hensikt å binde sammen peptidet og den sinkbindende delen. Den er også med å regulere logP-verdien til molekylet.

Det antas at den sinkbindende delen av molekylet sammen med vektoren er de farmakoforedelene av molekylet. Som tidligere nevnt er MBL avhengig av ett eller to sinkatomer for å hydrolyse β -laktam antibiotika.(12) Hensikten til den sinkbindende delen er å binde sinkatomene for å blokkere effekten av MBL. På denne måten vil bakterien på ny bli følsom mot β -laktam antibiotika.

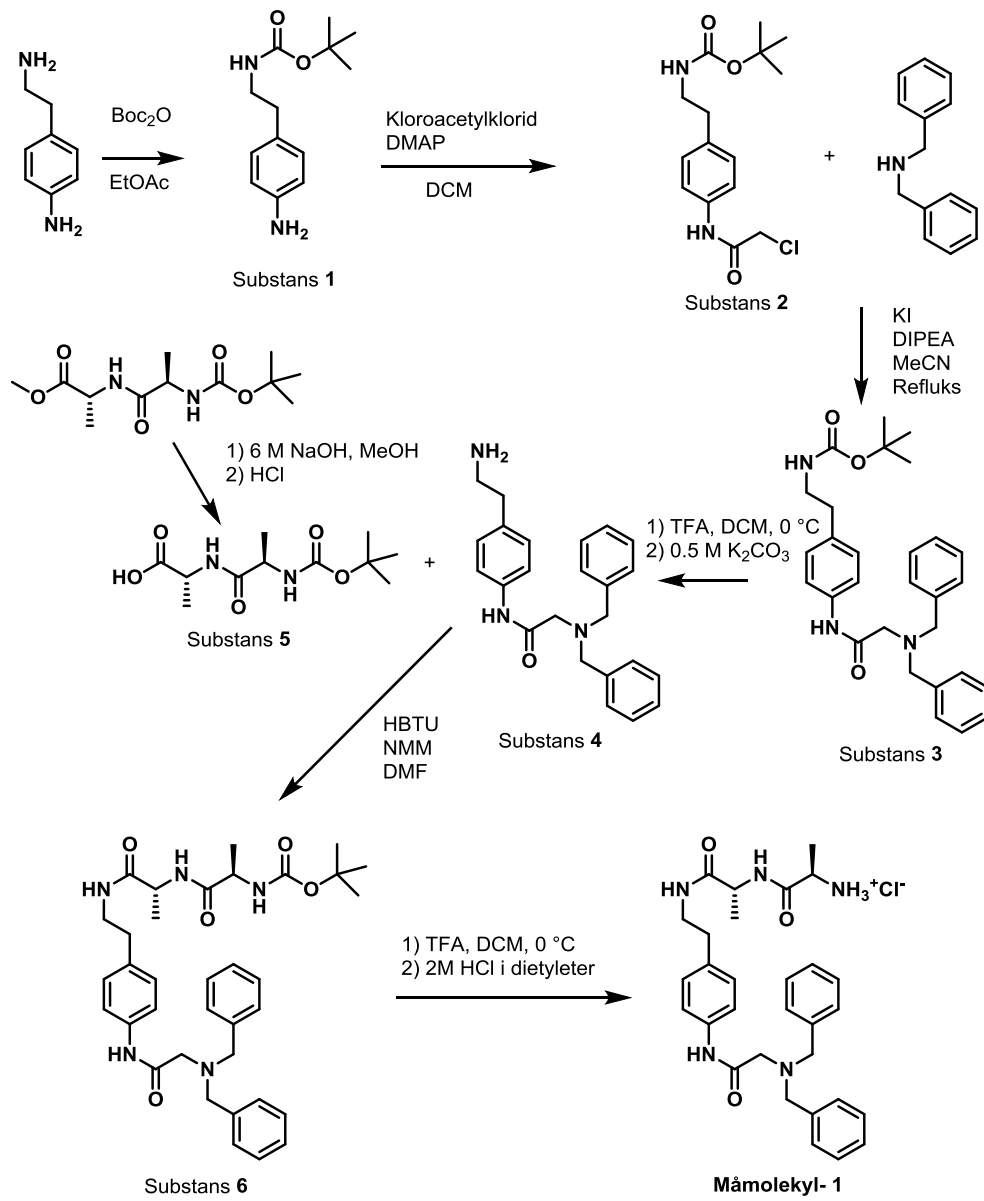
I **Målmolekyl-1** er de sinkbindende egenskapene til **OAA4033** fjernet ved å bytte ut pyridinene med benzen. Hensikten er å studere struktur aktivitets forhold (SAR) for **OAA4033**, for å bekrefte at den sinkbindende delen og dets egenskaper er viktig for effekten.

I **Målmolekyl-2** er den sinkbindende delen forsterket ved å legge til et tertiært amin og pyridin i forhold til **OAA4033**. **OAA4033** er en 4 pod sinkbinder, mens **Målmolekyl-2** vil være en 6 pod sinkbinder illustrert i figur 1.6. Bakgrunnen for dette er å studere om forsterking av sinkbinderegenskapene gir bedre effekt og om eventuelt de styrkede sinkbinderegenskapene, gjør substansen for toksisk.



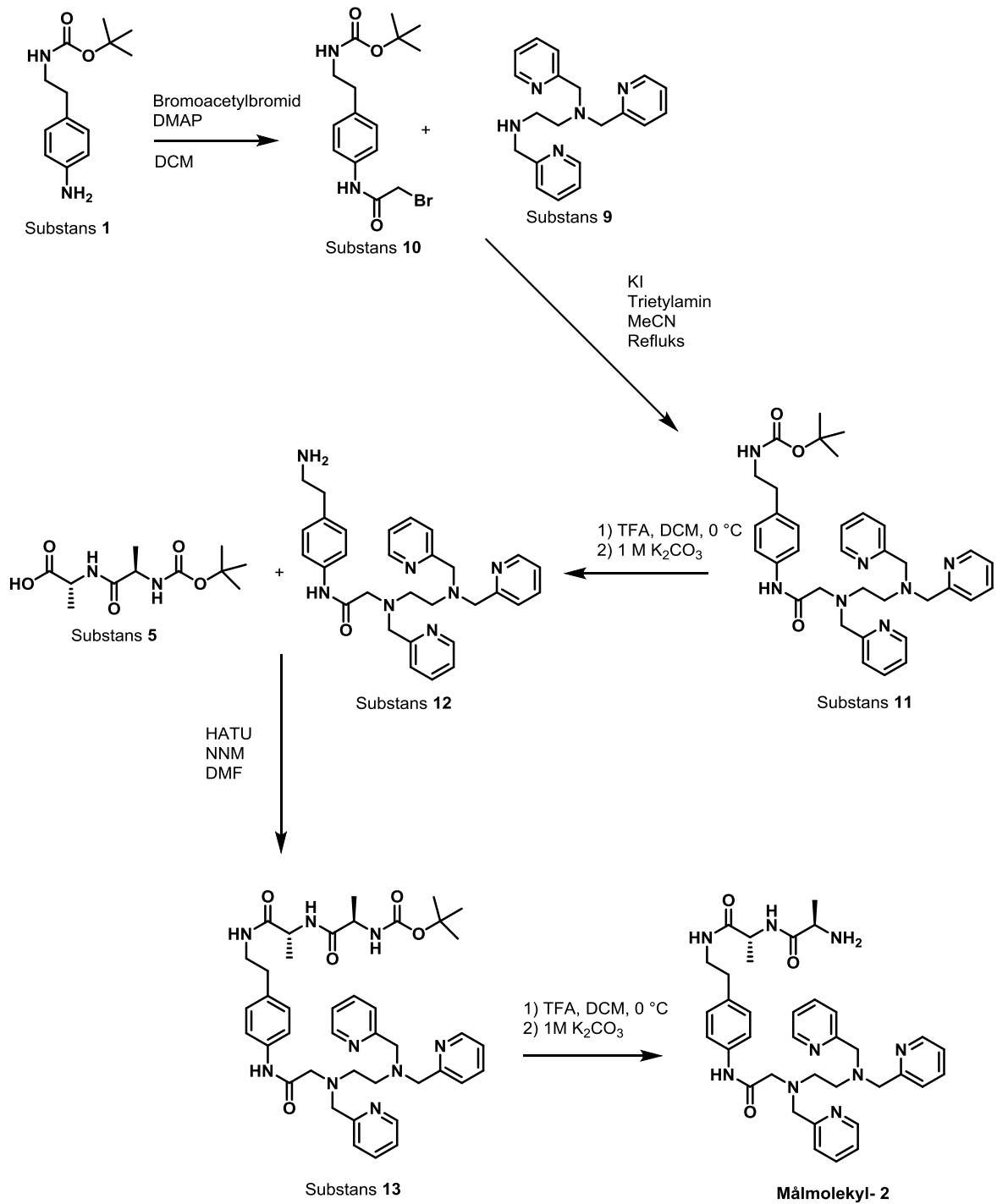
Figur 1.6 Sinkbinding **OAA4033** og **Målmolekyl-2**

1.3.4 Syntesevei Målmolekyl- 1

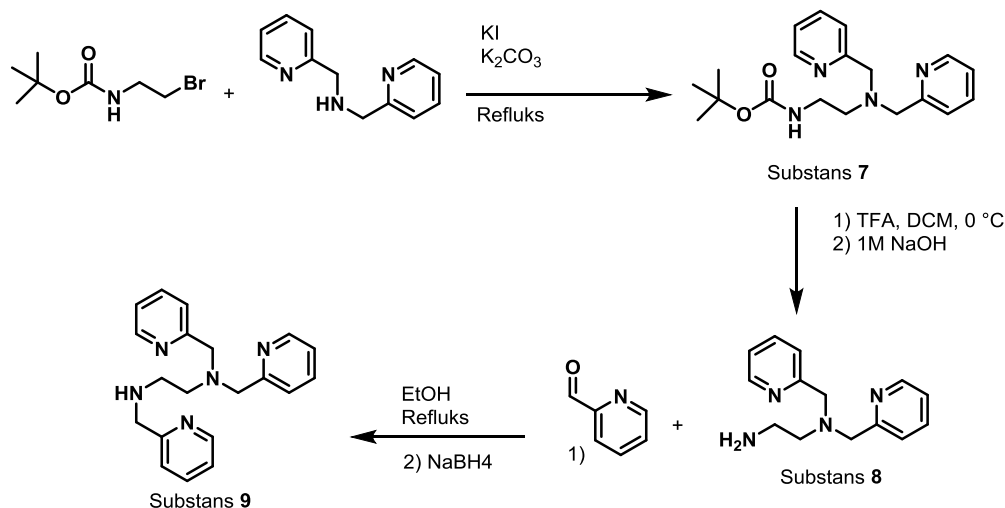


Figur 1.7 Syntesevei Målmolekyl-1

1.3.5 Syntesevei Målmolekyl-2



Figur 1.8 Syntesevei Målmolekyl- 2

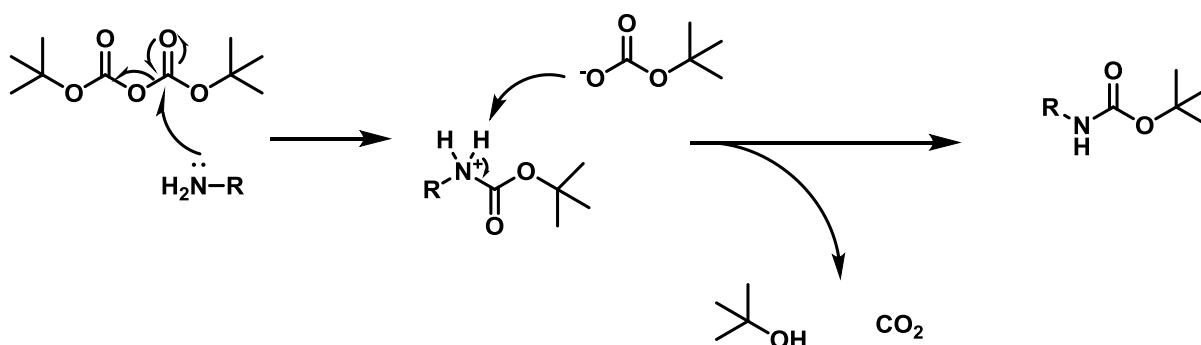


Figur 1.9 syntesevei substans 9

1.4 Boc-beskyttelse og avbeskyttelse

Bruk av *tert*-Butoxycarbonyl gruppen (Boc) er en av de vanligste måtene å beskytte aminogrupeer på i organisk syntese. Noen av grunnene til det er at Boc er inert mot katalytisk hydrogenolyse og er motstandsdyktig mot basisk og nukleofile reagenser.(34)

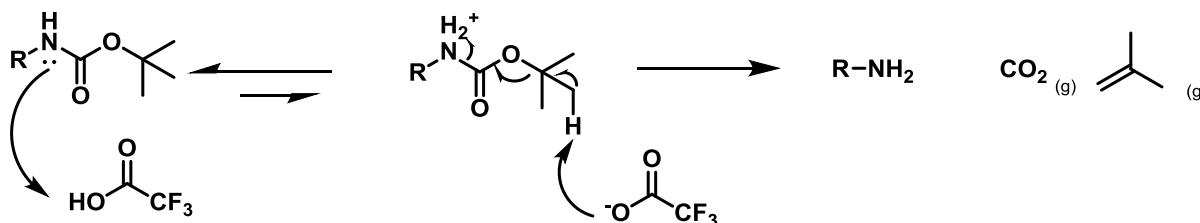
Et av de vanligste reagensene for å innføre Boc-gruppe på et amin, er di-*tert*-butyl dikarbonat.(35) Mekanismen bak beskyttelsen av aminet er at aminet vil angripe en av karbonylsidene av di-*tert*-butyl dikarbonat som resulterer i at *tert*-butyl-karbonat går ut som en «leaving group» og tar opp protonet fra det proponerte aminet vist i figur 1.10. *tert*-butyl-karbonat bryter sammen til CO₂ (g) og *tert*-butanol.(35)



Figur 1.10 Boc-beskyttelse av amin

Fjerningen av Boc-gruppen gjøres ofte ved hjelp av sure betingelser. Det er vanlig å bruke trifluoeddiksyre, enten i ren form eller i en blanding med diklormetan.(34, 35) En foreslått mekanisme er at nitrogenet i amidet protoneres. Dette vil føre til at protonene i *tert*-butyl-

gruppen blir sure og basen av trifluoreddiksyre vil plukke opp et av disse protonene. Det vil så skje en kaskade-reaksjon hvor vi sitter igjen med det frie aminet, karbondioksid og isobutylen. Likevekten er forskjøvet mot venstre, men når først kaskadereaksjonen er skjedd er den ikke reverserbar og dette driver likevekten mot høyre.(36) Mekanisme vist i figur 1.11

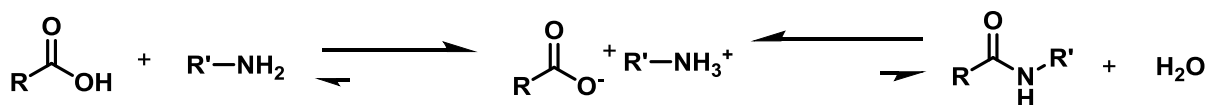


Figur 1.11 Fjerning av Boc-gruppe med TFA

1.5 Amidbindinger og peptidkoblinger

Amider er grupper hvor en karbonylgruppe er bundet til et nitrogen. Proteiner og peptider er polymerer av aminosyrer koblet sammen i amidgrupper. Amider er nøytrale, stabile og er både hydrogensbindings akseptor og donor(37) Man finner amid-grupper i over 25 % av alle legemidler(38).

Amider kan syntetiseres fra syre og amin ved avspaltning av vann en kondensasjonsreaksjon som utføres, etter samme prinsipp som esterdannelse. Ulikt fra esterdannelse, som er en likevekts reaksjon, vil blandingen av amidet og karboksylsyren danne et stabilt salt. Den høye stabiliteten til saltet gjør at likevekten i reaksjonen er svært forskjøvet mot det stabile saltet.(39) Skal man få en direkte kondensasjon fra saltet må man aktivere det ved hjelp av høy temperatur (160-180 °C).(40, 41) Dette er vist i figur 1.12.

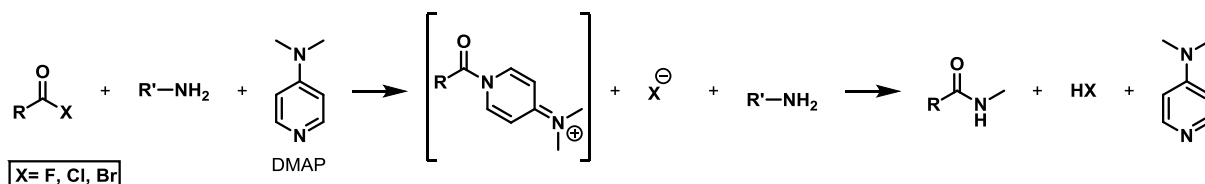


Figur 1.12 Amiddannelse ved kondensasjon

For å få reaksjonen til å gå med akseptable reaksjonsbetingelser må syren aktiveres. Det er utviklet flere strategier som er mulig å bruke.(42) I arbeidet med amiddannelser har jeg brukt syrehalidet av karboksylsyren og karboksylsyren med uronium reagensene HATU og HBTU som er koblingsreagenser.

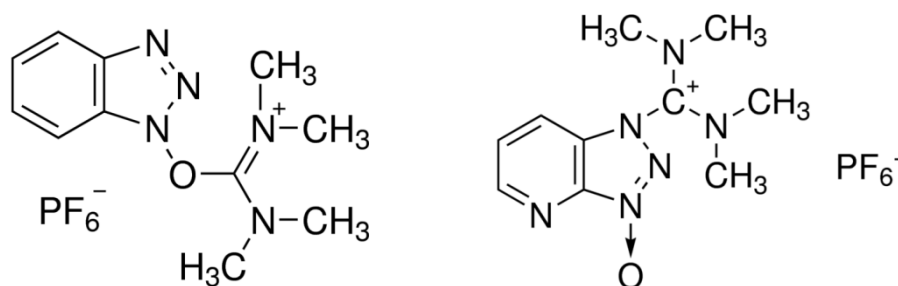
Når man peptidkobler med syrehalider vil halogenet være den utgående gruppen. Det tilsettes base slik at aminet ikke danner salt med den utgående syren og blir inaktiv. Koblingen gjøres

under tørre og inerte reaksjonsbetingelser.(42) Reaksjonen kan akselereres ved hjelp av DMAP.(43) DMAP er en katalysator og vil gå inn å danne et intermediat med syrehalidet. Nitrogenet i pyridinringen vil binde seg til karbonyllen, bli et kation og en god elektrofil vist i figur 1.13.(44, 45) Bruk av syrehalider har dog sine begrensinger når det kommer til peptidkoblinger. Ikke alle syrer er tilgjengelig eller lar seg omdanne til syrehalider. I tillegg er det fare for hydrolyse, rasemisering og eventuelt kløyving av beskyttelsesgrupper.(44, 45)



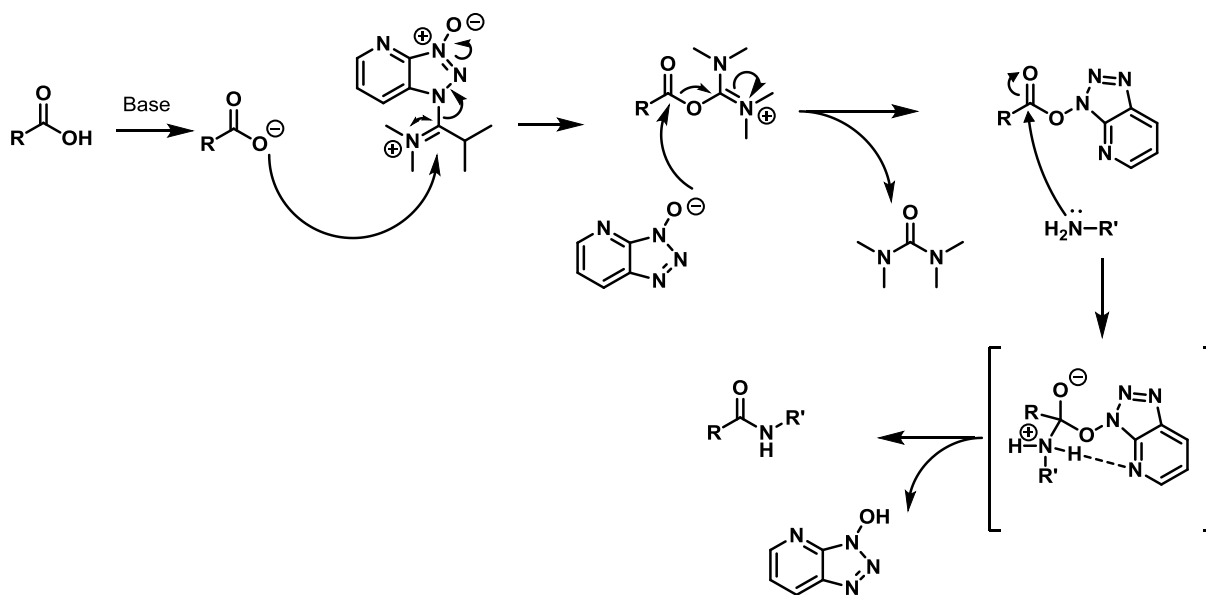
Figur 1.13 Amiddannelse med syrehalid katalysert av DMAP

En annen metode som er benyttet er bruk av uranium-saltene HATU og HBTU som koblingsreagenser. Prinsippet er å danne en aktivert ester med en god utgående gruppe. Aktiverte estere er vanligvis enklere å hydrolysere og er mottakelig for angrep fra et vidt spekter av nukleofile.(42) De viktigste egenskapene knyttet til amidannelse er at de reagerer rent med aminer og under milde reaksjonsbetingelser vil man vanligvis redusere rasemisering.(46, 47)



Figur 1.14 HBTU(til venstre) og HATU (til høyre)(48, 49)

Dersom man bruker HATU som eksempel så dannes det en aktivert ester fra 1-hydroxy-7-azabenzotriazol.(42) Man aktiverer syren ved hjelp av base. Den deprotonerte syren vil angripe nukleofilt slik at det dannes et O-acyl(tetramethyl)isouronium salt. Dette er ustabil og esteren vil angripes av anionet av 1-hydroxy-7-azabenzotriazol (OAt) og danne den aktiverte esteren. Når den aktiverte esteren er dannet vil karbonyllen, som følge av den økte elektrofillisiteten i karbonylkarbonet, bli mer mottakelig for nukleofilt angrep fra aminet og amidet vil dannes.(42) Mekanisme vist i figur 1.15



Figur 1.15 Mekanisme HATU

DMAP vs. HATU

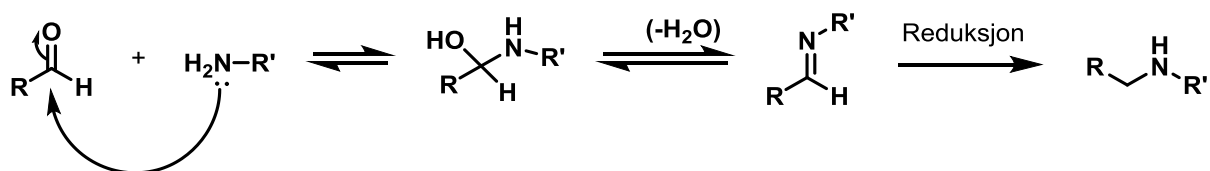
Både DMAP og HATU brukes i amiddannelse og peptidkoblingsreaksjoner. De har ulike egenskaper som gjør at de er egnet til hvert sitt bruk. Likheten mellom dem er at de gjør karbonylet mottakelig for nukleofilt angrep fra aminet. DMAP er en katalysator(43, 45) og blir ikke forbrukt i reaksjonen, i motsetning til HATU som forbrukes og ender opp med å bli delt til to ulike substanser (vist i figur 1.15).(42) Den viktigste praktiske forskjellen er at ved bruk av DMAP kan man få rasemisering, noe som gir en blanding av ulike enantiomerer. Dette skyldes at DMAP er en god base og kan deprotonere protoner α til karbonyler, siden de ofte har lav pKa-verdi. HATU derimot er en svakere base og bevarer den stereometriske strukturen til komponentene ved i liten grad deprotonere protoner α til karbonyl. Ønsker man å bevare den stereometriske strukturen i molekylet, bør man ikke benytte DMAP.

1.6 Aminsyntese

1.6.1 Reduktiv aminering

En måte å syntetisere primære, sekundære eller tertiære aminer på er ved å gjøre en reduktiv aminering.(37) Prinsippet er først å danne iminet, for så redusere dette til det ønskede aminet. Elektronene fra aminet vil angripe aldehydet. Det vil danne seg en likevekt mellom hemiaminalet og iminet. Ved å fjerne vannet kan man forskyve likevekten mot imin-formen.(37) Mekanismen er vist i figur 1.16

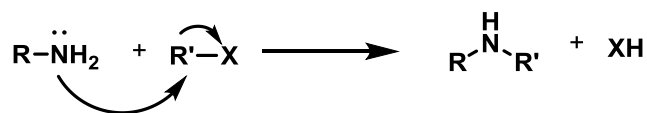
Neste steg er å redusere iminet til aminet.(37) Reduksjonen kan gjøres med H_2 over nikkell, eller mer selektivt med reduksjonsmiddel som $NaBH_3CN$ eller $LiBH_3CN$. Disse reduksjonsmidlene er særlig selektive og effektive i reductive amineringer. $NaBH_3CN$ og $LiBH_3CN$ er milde reduksjonsmidler og tilsvarer $NaBH_4$, men er dårlig egnet til å redusere eksempelvis aldehyder og ketoner som benyttes i imin-dannelsen. $NaBH_4$ og $LiAlH_4$ og andre sterke reduksjonsmiddel kan også brukes, men særlig $LiAlH_4$ er ugunstig å bruke for våre reaksjoner fordi $LiAlH_4$ kan redusere pyridiner.(37)



Figur 1.16 Reduktiv aminering

1.6.2 N-alkylering

En alternativ måte å danne aminer på er *N*-alkylering. Dette gjøres ved en nukleofil substitusjonsreaksjon med et amin og et alkylhalid. Elektronparet til aminet vil gjøre et nukleofilt angrep på halid-karbonet, vist i figur 1.17. Halogenet vil trekke på elektronene slik at karbonet blir mer mottakelig for nukleofilt angrep. Dette kan være vanskelig å kontrollere om man bare ønsker å reagere inn en alkylgruppe, fordi nukleofilisiteten til nitrogen øker med antall substituenten.(37)

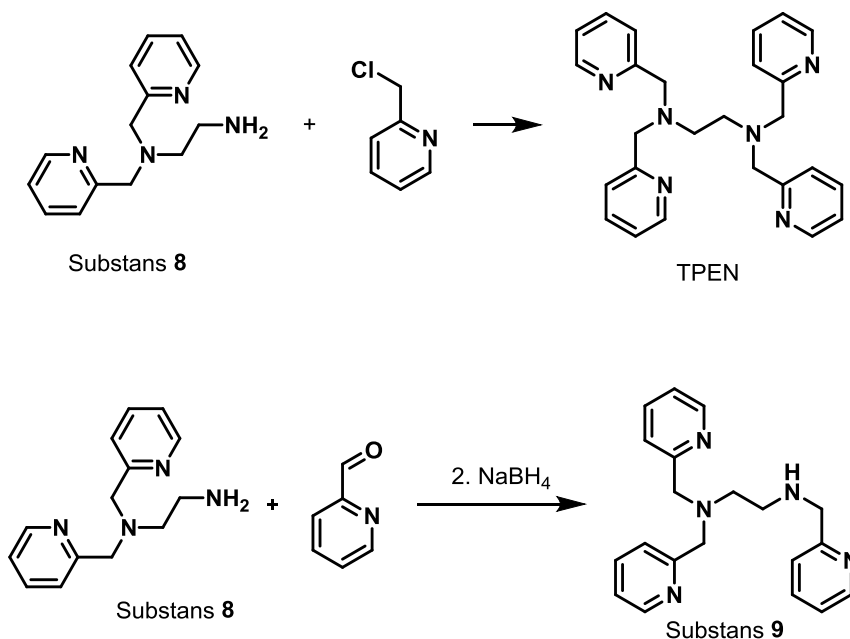


Figur 1.17 Mekanisme *N*-alkylering

1.6.3 Valg av metode

I syntese av substans **9** vist i figur 1.9, gjennomføres det en reduktiv aminering hvor det brukes et aldehyd og et primært amin. Målet er å reagere inn aldehydet en gang, slik at det er kun det nye sekundære aminet som dannes. Dette kan man løse ved for det første ikke å reagere med overskudd aldehyd. For det andre kan man benytte NaBH_4 som reduksjonsmiddel. Både aldehyder og ketoner blir enkelt redusert til alkoholer når man bruker NaBH_4 som reduksjonsmiddel.(37) Når aldehydet reduseres til alkohol, vil den ikke kunne reagere med aminet og man får stoppet reaksjonen. NaBH_4 kan også benyttes til å redusere iminer til aminer.(37)

Bakgrunnen for å utføre en reduktiv aminering og ikke en *N*-alkylering er ønsket om kun å reagere inn klorometylpyridin en gang på det primære aminet og danne det sekundære aminet. Dersom man hadde gjort en alkylering med klorometylpyridin, ville dette kunne reagert inn to ganger på samme aminet og dannet det tertiære aminet og man hadde endt opp med å syntetisere TPEN, dette er vist i figur 1.18



Figur 1.18 Valg av metode

2 Resultater og diskusjon

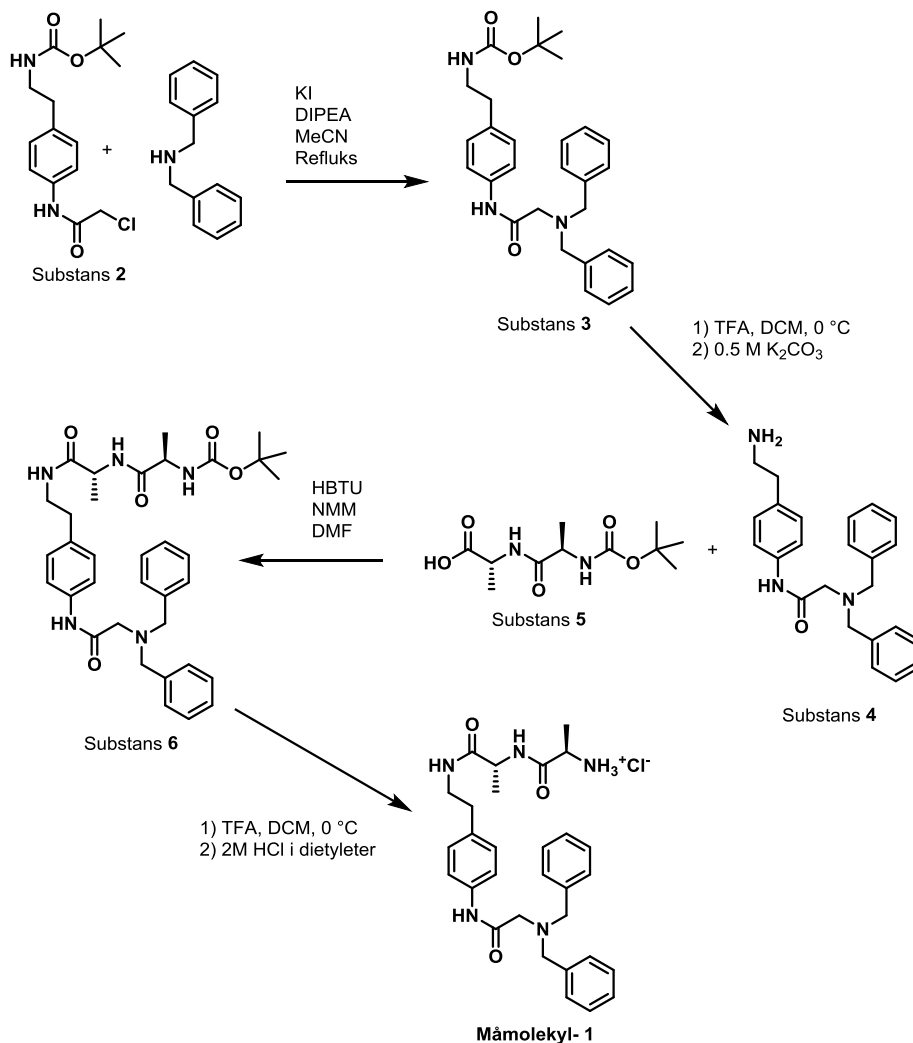
Forsøkene er beskrevet i detalj med prosedyre og resultater i Kapittel 5. Analyse og strukturoppklaring av synteseproduktene er gjort ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR vist i kapittel 5. **Målmolekylene-1** og **2** og mellomproduktet **3** er strukturoppklart ved hjelp av COSY, HSQC og HMBC i tillegg til ^1H NMR og ^{13}C NMR. Alle nye substanser har også blitt analysert ved hjelp av HRMS. I strukturoppklaringen har jeg benyttet læreboken Spectrometric identification of organic compounds av Silverstein m.fl.(50) og ChemBioDraw Ultra 14.0(51) som hjelpemidler i tillegg til MestReNova(52) som databehandlingsprogrm.

2.1 Syntese

2.1.1 Målmolekyl-1

Syntesene frem til **Målmolekyl-1** (vist i Kapittel 1.3.4) gikk svært tilfredsstillende. Syntesen er basert på de erfaringene og prosedyrene gruppen allerede hadde fra syntesen av **OAA4033**, mens opparbeidelsen er nyutviklet for disse substansene. I syntesen av **Målmolekyl-1** har de nye substansene **3**, **4** og **6** blitt syntetisert i tillegg til **Målmolekyl-1**. Strukturene vist i figur 2.1. Disse er karakterisert ved hjelp av ^1H NMR, ^{13}C NMR og HRMS. I tillegg er **Målmolekyl-1** og substans **3** strukturoppklart ved hjelp av COSY, HSQC og HMBC i kapittel 2.2.1 og kapittel 2.2.2

I enkelte av NMR spektrene finner man noen rester av startmaterialer. Det gjelder spesielt i de første mellomproduktene i syntesen. Mellomproduktene ble ikke fullstendig rensset opp da det var lagt opp til grundigere opprensing ved hjelp av flash kromatografi senere i synteseveien. Dersom man skulle ha rensset det opp grundigere ville flash kromatografi trolig vært den beste metoden. Stoffene vil antagelig ha god nok forskjell rentensjon til den stasjonære fasen, til å gi tilfredsstillende separasjon.



Figur 2.1 Nye substanser i syntesen av Målmolekyl- 1

Substans 3

Substans **3** er den første nye substansen som ble syntetisert. Den ble syntetisert ved en *N*-alkylering, vist i figur 2.1. Utbyttene har vært relativt gode, fra 68 % til 80 %. I syntesen av substans **3** ble opparbeidelse utviklet. Det ble benyttet flashkromatografi med eluent 1:1 etylacetat: heptan basert på TLC. I motsetning til **OAA4033**, ble det benyttet silikagel som stasjonærfase. Dette er mulig fordi forbindelsen ikke har pyridiner i molekylet, som har for mye retensjon til silikakolonne. Syntesen og resultater er beskrevet i kapittel 5.3. NMR viste at reaksjonen og opparbeidelsen var vellykket og substans **3** er strukturoppklart i kapittel 2.2.1.

Substans 4

I syntesen av substans **4** ble boc-gruppen fjernet for å kunne gjøre en peptidkobling i neste trinn vist i figur 2.1. Beskyttelsesgruppen ble fjernet med trifluoreddiksyre i diklormetan, som er en av de vanligste måtene å fjerne boc-grupper på (34, 35). Reaksjonen ga nesten kvantitativt utbytte på 93 %. Syntese og resultater er beskrevet i kapittel 5.4

Substans 6

Substans **6** er det siste mellomproduktet før **Målmolekyl-1**. Substans **4** ble koblet til NHBoc-*D*-Ala-*D*-ala-OH (substans **5**) vist i figur 2.1. HBTU ble benyttet som koblingsreagens sammen med NNM for å redusere muligheten for rasemisering i peptidet. Under opparbeidelse av reaksjonen, da DMF skulle fortynnes med vann, ble det observert utfelling. Det ble testet forskjellige opparbeidelser. Råproduktet ble forsøkt opparbeidet ved ekstraksjon og med flashkromatografi. Det ekstraherte produktet var renere enn utfelling uten videre opparbeidelse. Produktet som var opparbeidet ved flash kromatografi var renere enn produktet som kun var ekstrahert. Utbyttet var på 91 %. Syntese og resultater er vist i kapittel 5.6.

Målmolekyl-1

Målmolekyl-1 ble dannet fra substans **6** etter avbeskyttelse av aminet i peptidet på samme måte som substans **4** vist i figur 2.1. Etter av-beskyttelsen ble HCl saltet felt ut ved å bruke 2M HCl i dietyleter. Utbyttet lå på 80 %. Syntesen og resultater er beskrevet i kapittel 5.7 og strukturoppklaring er vist i kapittel 2.2.2.

Substans 2 (linker)

Strukturelt brukes samme linker i både **Målmolekyl-1** og **Målmolekyl-2**. Gruppen hadde allerede erfaring med å bruke bromoacetylbromid i syntese av linker til liknende substanser. Under arbeidet med **Målmolekyl-1** var det ønske om å bruke kloroacetylklorid, for å undersøke om det var bedre egnet for vår linker.

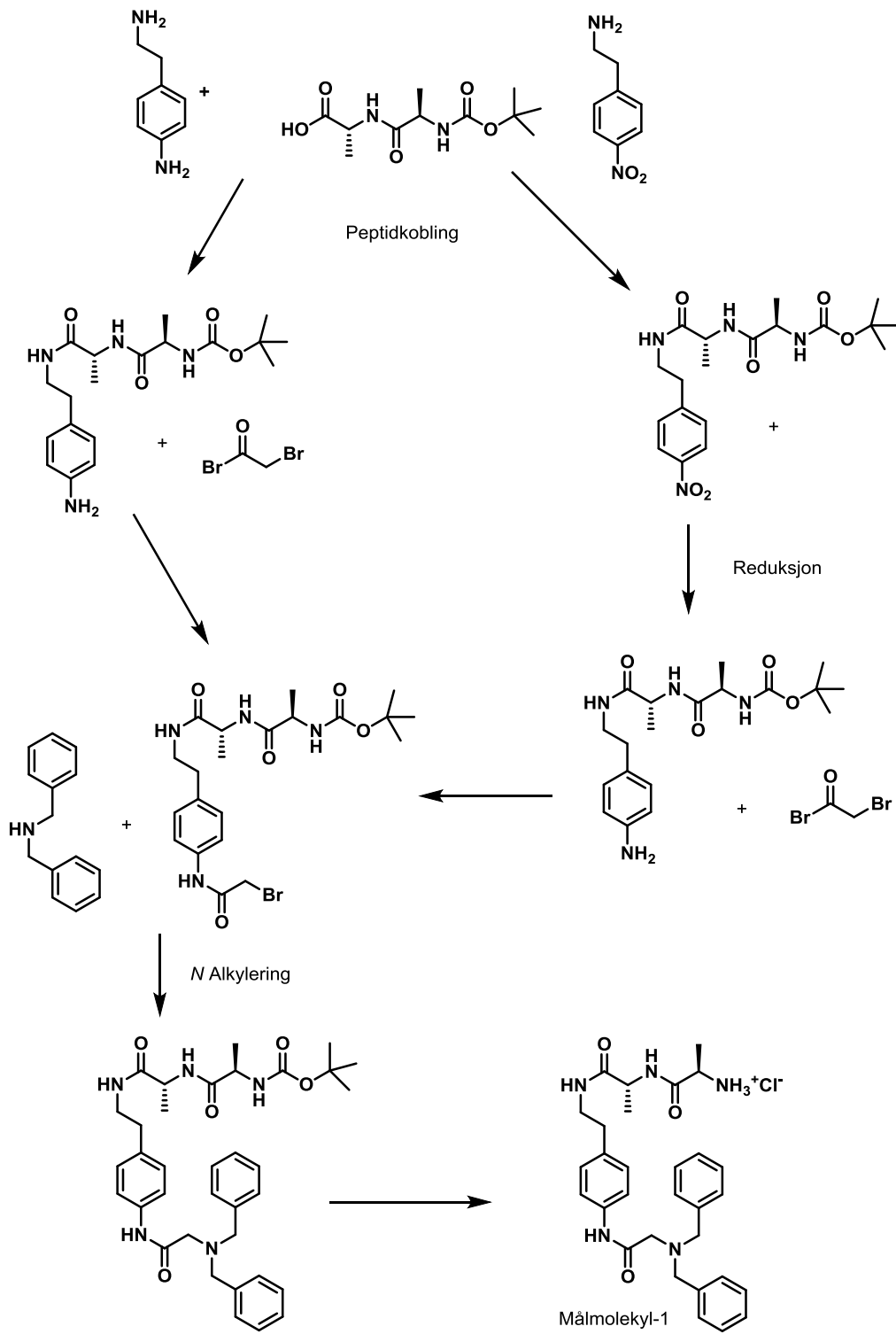
I syntese av substans **2** ble kloroacetylklorid benyttet, vist i kapittel 1.3.4. Det ble brukt tilnærmet samme prosedyre som av gruppen tidligere hadde benyttet, ved bruk av bromoacetylbromid. Opparbeidelsen var å dampe inn reaksjonsblandingen og vaske råproduktet med diklormetan, etterfulgt av filtrering. Denne opparbeidelsen viste seg ikke å

være reproduserbar. Da forsøket ble gjentatt var vasking med diklormetan en uegnet som opparbeidelsesmetode for råproduktet. Det ble på gruppen utviklet en opparbeidelse hvor man brukte en silika-plugg til å rense linkeren, som fungerte. Får å få enklere opparbeidelse ble det i syntesen av **Målmolekyl-2** brukt bromoacetylbromid for å syntetisere linker (substans **10**)

Alternative synteseveier Målmolekyl-1

Syntesetrinnene har gitt gode utbytter på mellom 70- 90 %, noe som tyder på egnede reaksjonsvalg og opparbeidelse. Alternative synteseveier er illustrert i figur 2.2. Et av alternativene er å begynne syntesen med å koble peptidet på 2-(4-nitrofenyl)etan-1-amin. Etter peptidkoblingen på det primære alifatiske aminet, reduserer man så nitro-gruppen til anilinet, for videre syntese til **Målmolekyl-1**, vist i figur 2.2.

Et annet alternativ som ikke ble forsøkt var å gjøre en peptidkobling direkte på 4(aminoetyl)-anilin, vist i figur 2.2. Den primære alifatiske aminogruppen er en bedre nukleofil enn den anilinske aminogruppen, og kunne reagere relativt selektivt med det aktiverte peptidet. For å unngå mulige opprensingsproblemer med en blanding av de to mulige regioisomere, ble det besluttet å bruke reaksjonssekvensen vist i kapittel 1.3.4.

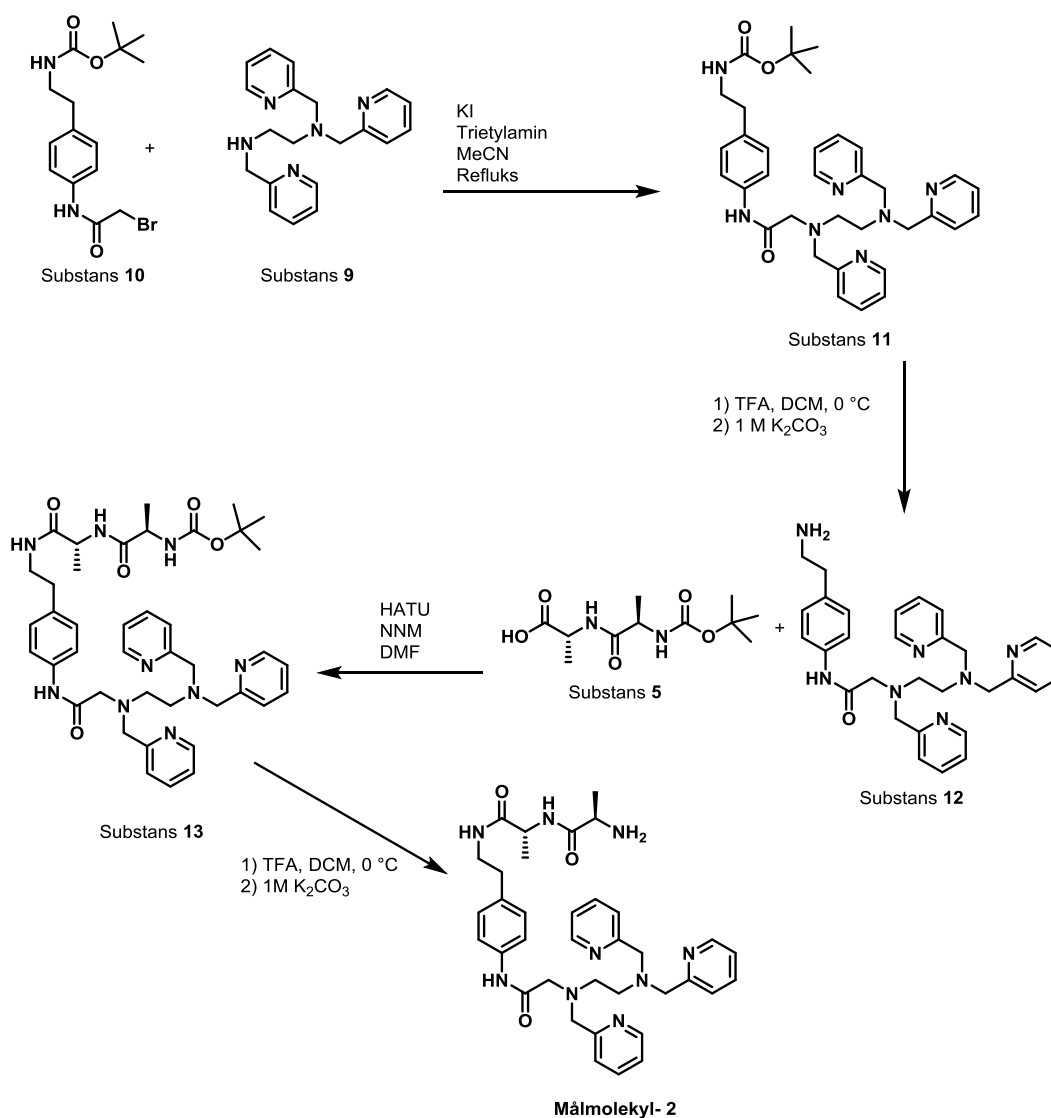


Figur 2.2 Alternative synteseveier Målmolekyl- 1

2.1.2 Målmolekyl-2

Syntesen frem til **Målmolekyl-2** gikk tilfredsstillende. Synteseveien er vist i kapittel 1.3.5. Syntesen er basert på kjemi utviklet for **OAA4033**. De største utfordringene i synteserinnene frem til **Målmolekyl-2** var i opparbeidelsen. Produktene og startmaterialene er svært like. Substansene i synteseveiene innehar mange nitrogenatomer i henholdsvis aminer, pyridiner og amider. Dette gir begrensninger på hvilke opparbeidelsesmetoder man kan bruke.

For utenom **Målmolekyl-2**, er substans **12** og substans **13** i synteseveien helt nye substanser. I tillegg er substans **11** kun syntetisert på gruppen tidligere. **Målmolekyl-2** er strukturoppklart ved hjelp av COSY, HSQC og HMBC (vist i kapittel 2.2.3) og substansene **11-13** er analysert med HRMS i tillegg til ^1H NMR og ^{13}C NMR.



Figur 2.3 Struktur og syntesevei for nye substanser i syntese av Målmolekyl- 2

Substans 11

Etter samme prinsipp som substans **3** ble substans **11** syntetisert ved en *N*-alkylering, vist i figur 2.3. NMR viste rent produkt, men utbyttet var dårlig. Reaksjonen hadde et utbytte på 27 %. Det kan være opparbeidelsen som gir det lave utbyttet. Til forskjell fra substans **3** må man i opparbeidelsen av substans **11** bruke nøytral alumina istedenfor silika som stasjonærfase i flashkromatografi. Utfordringene knyttet til dette er beskrevet og diskutert senere i kapitlet på side 29-30. Forsøket er kun utført en gang. Det kan derfor ikke utelukkes utbyttet ville blitt bedre ved enten å endre reaksjonsbetingelsene, eller gjenta forsøket. NMR og HRMS viser ønsket substans. Syntese og data er vist i kapittel 5.12

Substans 12

Substans **12** ble dannet fra substans **11** ved å fjerne Boc-gruppen med trifluoreddiksyre i diklormetan vist i figur 2.3 Substans **12** ble opparbeidet ved ekstraksjon med basisk vannfase. På grunn av pyridiner og aminer i molekylet, er det ikke egnet for syrevask. Utbytte på 62 % er akseptabelt. NMR og HRMS viser ønsket substans. Syntese og data er vist i kapittel 5.13

Substans 13

I syntesen av substans **13** ble det utført en peptidkobling på det primære aminet i substans **12**. HATU ble benyttet som koblingsreagens vist i figur 2.3. I likhet med HBTU er HATU et uronium salt. Sammen med HATU ble NNM benyttet. De er svake baser som gjør at man får mindre rasemisering i peptidet. Utbyttet var på 53 %. Mye av årsaken til at utbyttet ikke er høyere, er antagelig opparbeidelsen slik som for substans **11**. Den optiske renheten for substansen er ikke målt. NMR og HRMS viser ønsket substans. Syntese og data er vist i kapittel 5.14.

Målmolekyl-2

Målmolekyl-2 ble dannet ved at Boc-gruppen på peptidet ble fjernet. Avbeskyttelsen ble gjort på samme måte som substans **12** vist i figur 2.3 **Målmolekyl-2** ekstrahert med basisk vannfase og diklormetan. Utbytte var på 86 % var positivt. Strukturoppklaring er vist i kapittel 2.2.3 og syntese og data er vist i kapittel 5.15.

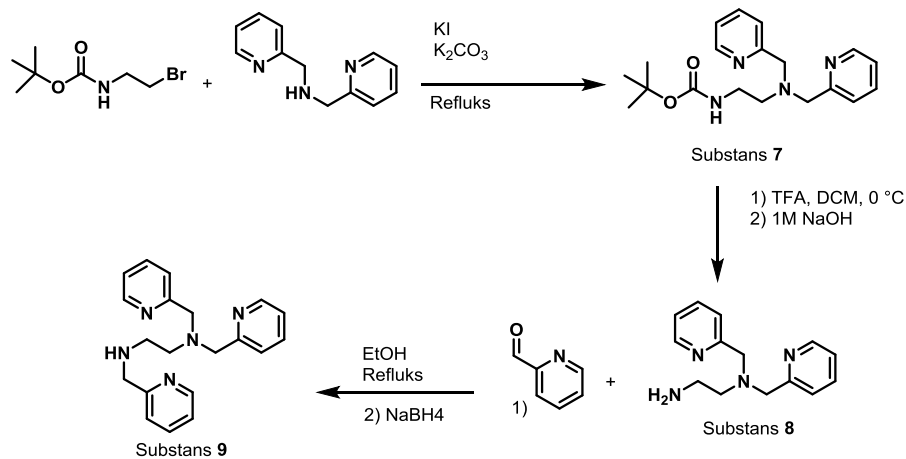
Substans 10 (linker)

Som nevnt ble det besluttet å benytte bromoacetyl bromid istedenfor kloroacetyl klorid i syntesen av linker (substans **10**) i synteseveien til **Målmolekyl-2**. Etter konsentrering under redusert trykk ble råproduktet forsøkt vasket med diklormetan etter tidligere prosedyre. Dette fungerte dårlig, da råproduktet lot til å være godt løselig i diklormetan. TLC viste stor forskjell i retensjon mellom produkt og det som antagelig er DMAP. Det ble derfor utført flashkromatografi med silika som stasjonærfase og eluent med 1:3 heptan:etylacetat. Massen var dårlig løselig i eluenten, det ble derfor utført «dry-loading». Produktet var et hvitt pulver med et gult skjær i seg.

¹H NMR indikerte at dette var rent. Deler av pulveret ble likevel forsøkt vasket med metanol. Det viste seg at pulveret var dårlig løselig i metanol, men metanolen ble gul farget og pulveret ble helt hvitt etter tørking. Dette kan tyde på at man kunne vasket råproduktet med metanol, istedenfor å utføre en flashkromatografi. Dette vil følges opp av gruppen når substans **10** igjen skal syntetiseres.

Utfordringer knyttet til syntese

Den største synteserelaterte utfordringen var i syntesen av substans **9** vist i figur 2.4. Reaksjonen er en reduktiv aminering hvor iminet først dannes for så å bli redusert til amin. Det ble først forsøkt med en prosedyre med en lang imindannelse og kort reduksjon under vanlig atmosfære. Dette var forsøkt tidligere på gruppen med hell, men jeg hadde problemer med at NMR resultatene var uklare eller viste urent produkt på tross av at det var opparbeidet ved hjelp av flashkromatografi



Figur 2.4 Syntesevei 9

Etter å ha forsøkt den første prosedyren tre ganger uten å lykkes, ble det forsøkt en prosedyre basert på en prosedyre gjort av S. Futuokas gruppe(53). Dette gav suksess og er den prosedyren som er beskrevet i kapittel 5.10. Endringene som ble gjort var å gjøre reaksjonen under tørre betingelser, kombinert med å tilsette kjemiske sives for å fjerne vann som dannes i reaksjonen. Imindannelsen er en likeveksreaksjon. Vann fra omgivelser og reaksjonen kan ha drevet likevekten i uønsket retning og at dette kan ha vært årsaken til problemene som oppstod. Ved å fjerne vannet fra reaksjonen ved hjelp av kjemiske sives, vil man drive likevekten i ønsket retning. I tillegg ble det utført en kort imindannelse og en lang reduksjon etter prosedyren som ble benyttet av Fukuoka (53).

Etter endring av prosedyre satt man igjen med rent produkt etter opparbeidelse ved flashkromatografi med nøytral alumina som stasjonærfase. Selv om endring i prosedyren hjalp, kan man ikke se bort fra at problemet lå i opparbeidelsen fra begynnelsen av. Utfordringer knyttet til bruk av alumina som stasjonærfase i flashkromatografi er beskrevet senere i kapitlet på side 29-30. TLC viste biprodukt både over og under produktet i R_f-verdi, noe som i begynnelsen gjorde opparbeidelsen krevende.

Som følge av at jeg måtte bruke mange forsøk på å syntetisere substans 9 måtte jeg gjenta syntesen av substans 7 og 8 en rekke ganger, vist i figur 2.4. Substans 7 dannes ved en *N*-alkylering. Det beste utbyttet var målt til 54 %. Reaksjonen var tidkrevende. Reaksjonen ble varmet opp til reflux over flere dager for å få akseptable utbytter. Det var også en tendens til at utbyttene gikk opp ved større batcher. Som for de andre substansene i synteseveien, ble substans 7 opparbeidet med kromatografi på aluminakolonner, noe som kan gi lavere utbytter.

Substans **8** dannes ved å fjerne boc-gruppen med trifluoreddiksyre i diklormetan. Her var utbyttene vært oppe i 85 %.

Utfordringer knyttet til opparbeidelse

Substansene som er syntetisert er seige oljer. På grunn av dette, er normal destillasjon uegnet som opparbeidelsesmetode. Substansene har høye kokepunkter og ved nedkjøling vil alt stoff gått tapt i apparaturen, på de skalaene som det har blitt arbeidet på. Stoffene lar seg ikke krystallisere derfor er omkrystallisering også utelukket.

Ekstraksjon kan til en viss grad brukes, men er ikke optimal. Stoffene består av flere basiske aminer. Ved nøytral eller sur pH i vannfasen vil substansene protoneres og kan gå over i vannfasen. Derfor er syrevask uegnet i opparbeidelsen og basisk vannfase (pH>10) bør benyttes.

Av opparbeidelsesmetoder sitter man igjen med flashkromatografi. Stoffene i denne synteseveien har svært mange nitrogenatomer i henholdsvis pyridiner, aminer og amider i strukturene. Aminer og pyridiner er basiske og vil ha sterkt retensjon til silika spå grunn av en syre/base reaksjon. Silika er en Lewis syre og aminene og pyridinene er basiske. Det vil derfor være vanskelig å få den igjennom en silikakolonne. Silikagel er derfor ikke er egnet som stasjonærfase i flashkromatografi for substansene i synteseveien frem til **Målmolekyl-2**. Man må derfor benytte nøytral alumina, som er en svakere Lewis syre, som stasjonærfase. Dette gir en del utfordringer.

Blant de største utfordringene med alumina er knyttet til separasjon og korrelasjon mellom nøytral alumina pulver (stasjonærfase i flashkromatografi) og nøytral alumina TLC-plater. I lab-arbeidet har jeg erfart at selv om det kan se ut som om man har god separasjon på TLC-plater, er det ikke alltid optimal separasjonen på kolonnen. Både på TLC-platene og kolonnene oppstår det haledannelse. Haledannelse vil si at stoffene fordeler seg i lange bånd. Dette gjør at de ulike substansene i råproduktet kan overlappes. På den måten kan flere av fraksjonene inneholde stoffblandinger. Dette kan være krevende å oppdage på TLC og det har vært bidratt til dårlige utbytter, fordi flere av fraksjonene inneholder blandinger av stoffer.

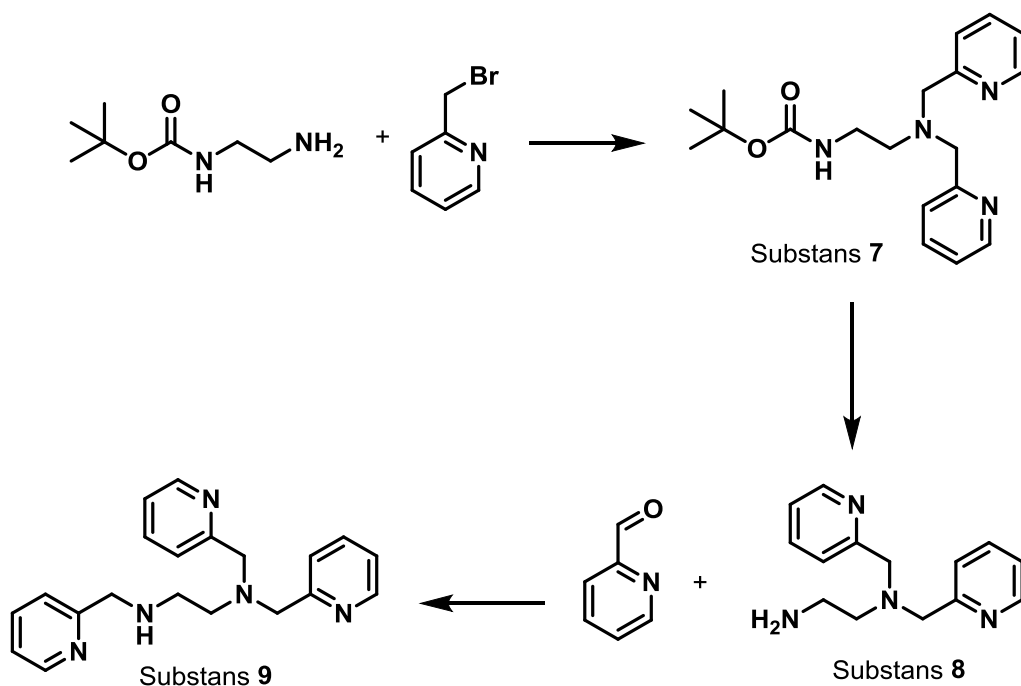
Alumina-pulveret som er benyttet (VWR, 0,063-0,200 mm) er den beste som er tilgjengelig. Denne typen har større partikler enn silikagel. Dette gjør at en aluminakolonne har krevd grundigere fukting og pakking enn kolonnene med silikagel. Dette er viktig for å få en så god

seperasjon som mulig. Alumina TLC-plater er mye skjørere enn silika TLC-plater. De tåler lite mekanisk belastning, og man får ofte «flisete» kanter når man kutter dem til. Små biter av aluminaen på planene kan falle av. I disse tilfellene vil eluent trekkes opp ujevnt på tvers av platene og resultatene kan bli misvisende.

Alternativ syntesevei

Både **Målmolekyl-1** og **Målmolekyl-2** er ganske like i oppbygning. Slik det ble foreslått for **Målmolekyl-1** i figur 2.2, kan man begynne med å koble på peptidet på linker før man kobler på den sinkbindende delen. For **Målmolekyl-2** kan dette være forenklet løsning, særlig med tanke på opparbeidelse. Ved å koble på den sinkbindende delen senere i syntesen, kan man redusere bruken av nøytral alumina som stasjonærfase i flashkromatografi. Mellomproduktet «linker+vektor» kan opparbeides med silikagel som stasjonærfase som gir enklere og bedre separasjon. Dette vil kunne bedre utbyttet totalt for synteseveien, dersom det lar seg gjøre.

Et annet sted i synteseveien hvor det er alternative synteser er syntesen frem til substans **9**. Denne byggesteinen i synteseveien til **Målmolekyl-2** kan syntetiseres på ulike måter. Et alternativt er å starte med Boc etylendiamin og reagere inn to ganger med bromometylpyridin.(53) Da sitter man igjen med substans **8**. Dette er vist i figur 2.5

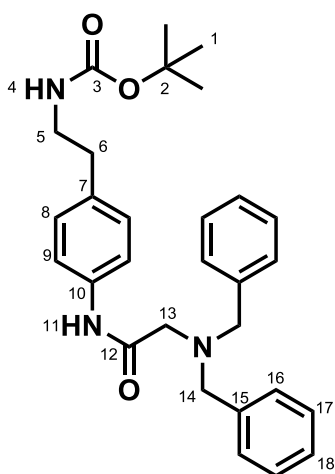


Figur 2.5 Illustrasjon av alternativ syntesevei Substans **9**

2.2 Strukturoppklaring

2.2.1 Strukturoppklaring av substans 3

Substans 3 er en ny substans som i dette kapittelet er strukturoppklart. Strukturen med posisjonsnummerering er vist i figur 2.6 og dataene er samlet opp i tabell 1. Syntese og resultater er vist i kapittel 5.3 I strukturoppklaringen har jeg benyttet læreboken Spectrometric indentification of organic compounds av Silverstein m.fl (50) og ChemBioDraw Ultra 14.0(51) som hjelpemidler i tillegg til MestReNova(52) som databehandlingsprogram



Figur2.6 Posisjonsnummerert struktur av substans 3

Posisjon	δ H (ppm)	Splittingsmønster	Koblingskonstant J (Hz)	δ C (ppm)
1	1.37	s	-	28.23
2	-	-	-	77.43
3	-	-	-	155.45
4	6.83	t	5.7	-
5	3.09	dd	8.2, 5.7	41.56
6	2.63	dd	8.2, 6.4	34.88
7	-	-	-	134.35
8	7.11	d	8.2	128.86 – 128.63
9	7.48	d	8.1	119.28
10	-	-	-	136.55
11	9.54	s	-	-
12	-	-	-	168.68
13	3.21	s	-	56.09
14	3.76	s	-	57.52
15	-	-	-	138.51

16	7.42	d	7.0	128.86 – 128.63
17	7.35	t	7.4	128.27
18	7.28 – 7.23	m	-	127.06

Tabell 1 Strukturoppklaring substans 3

Protonsignalet for 1 gir en karakteristisk singlett som integrerer for 9 protoner og er protonene i Boc-gruppen. Disse protonene har ingen nabo-protoner, men HMBC viser en kobling mellom protonene i 1 og karbonet i 2. Karbonet i 3 har ingen protoner knyttet til seg og har høy kjemisk skift noe som kjennetegner karboner i karbamater. I HMBC ser vi en kobling mellom karbonet i 3 og protonene i 5, noe som bekrefter at disse er plassert i nærheten av hverandre. I posisjon 4 finner vi et proton som ikke kobler til noe karbon med kjemisk skift på 6.83 ppm som er vanlig for amidprotoner. Signalet i protonspektret oppgis til å være en dublett av en dublett, men ser ut som en triplett. COSY bekrefter at naboprotonene er protonene i 5. I posisjon 6 finner man en triplett på 2.63 ppm som integrerer for to proton. I COSY finner man kobling til protonene i 5 og i HMBC finner man kobling mellom protonene i 6 og karbonene i 5 og 7, det er også kobling mellom karbonet i 6 og protonene i 5 og 8.

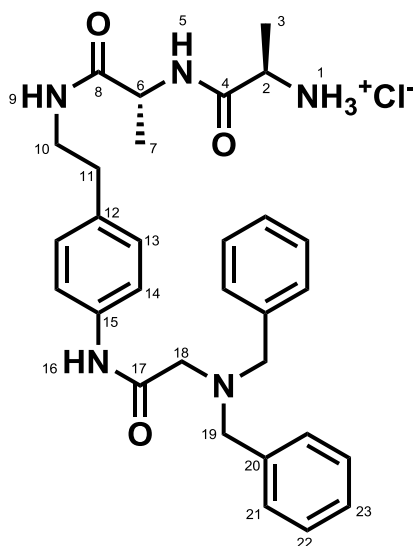
Karbonet i 7 kobler ikke til noe proton i HSQC, men det har kobling til protonene i 5, 6 og 8 i HMBC. For posisjon 8 finner man en dublett i det aromatiske området i protonspektret som i COSY kobler til protonene i 9 og i HMBC kobler til karbonene 6,9 og 10. Protonene i 8 kobler til karbonsignalet 128.63–128.86 ppm. I karbonspektret fremkommer det at det er to selvstendige topper som ligger i hverandre. Det ser ut som at forholdet mellom dem er 1:2. Sammenlikner man høyden på toppene med de andre signalene kan det se ut som at den ene integrerer for 2 karbon og den andre for 4. For posisjon 9 ser man i HMBC kobling mellom karbonet i 9 og protonet 11 i tillegg til protonene i 8. Karbonet i 10 kobler ikke til noe eget proton i HSQC men HMBC viser kobling til protonene i 8 og 11. Protonet i 11 gir en singlett på 9.54 ppm i protonspektret kobler ikke til noe karbon i HSQC. I HMBC finner man kobling mellom protonet i 11 og karbonene i 9, 10 og 12. Karbonet i 12 kobler ikke til noe eget proton men kobler videre til protonene i 13. Dette bekrefter at det er en amidbinding i den gitte posisjon 11-12.

13 er en singlett og COSY bekrefter at det ikke er noen naboprotoner. I HMBC er det andre koblinger enn mellom proton i 13 og karbonet i 12 og mellom karbonet i 13 og proton i 14. Protonene i 14 kobler videre til karbon i 15 og 16 i HMBC. Karbonet i 15 kobler ikke til noe eget proton i COSY men til protoner i 16 og 17 i HMBC. Posisjon 16 skal ha signaler som integrerer for 4 protoner og karboner, og gi en dublett i protonspektret. Det samme skal 17,

bortsett fra at denne skal som en triplett. 18 skal integrere for 2 proton og 2 karbon og gi en triplett. I HSQC finner man disse mønstrene igjen. 18 kommer som en multipllett i protonspektret.

2.2.2 Strukturoppklaring av Målmolekyl-1

Målmolekyl-1 er en ny substans som i dette kapittelet er strukturoppklart. Strukturen med posisjonsnummerering er vist i figur 2.7 og dataene er samlet opp i tabell 2. Syntese og resultater er vist i kapittel 5.7 I strukturoppklaringen har jeg benyttet læreboken Spectrometric identification of organic compounds av Silverstein m.fl (44) og ChemBioDraw Ultra 14.0(51) som hjelpemidler i tillegg til MestReNova(52) som databehandlingsprogram



Figur 2.7 Posisjonsnummerert struktur av Målmolekyl-1

Posisjon	δ H (ppm)	Splittingsmønster	Koblingskonstant (J Hz)	δ C (ppm)
1	8.30-8.21	m	-	-
2	3.93- 3.80	m	-	47.95
3	1.35	d	6.9	17.13
4	-	-	-	168.93
5	8.63	d	7.6	-
6	4.26	p	7.1	48.38
7	1.19	d	7.0	18.47
8	-	-	-	171.43
9	8.14	t	5.6	-
10	3.36 – 3.14	m	-	40.15
11	2.66	t	7.2	34.27

12	-	-	-	135.87
13	7.14	d	8.2	129.54
14	7.48 – 7.35	m	-	119.51
15	-	-	-	135.05
16	10.67	s	-	-
17	-	-	-	-
18	3.93- 3.80	m	-	51.70
19	4.49	s	-	57.53
20				
21	7.66 – 7.60	m	-	131.50
22	7.48 – 7.35	m	-	128.71
23	7.48 – 7.35	m	-	128.82

Tabell 2 Strukturoppklaring Målmolekyl-1

Protonene i 1 kommer som en multipllett som ser ut som en dublett, noe som stemmer overens med at de har et naboproton i posisjon 2 som de også kobles med i COSY. Vi finner også kobling mellom protonene 2 og 3. Dette underbygges med kobling mellom karbonene og protonene i HMBC i posisjon 2 og 3 og at protonsignalet i 3 er en dublett som viser at naboposisjonen har ett proton. Karbonet i 4 kobler ikke til noe eget proton i HSQC, men til protonene i 5, 3 og antagelig 6 og 4 i HMBC. Protonet i 5 kommer som en dublett i protonspektret og viser i COSY kobling til protonet i 6 og i HMBC kobling til karbonet i 4. Protonet i 5 kobler ikke til noe eget karbon og er dermed amid. Protonet kommer som en pentett i protonspektret, som stemmer overens med at protonet har 4 naboprotoner. I COSY finner man kobling til både protonene i 7 og 5 og i HMBC kobler protonene i 6 til karbonene i 7 og 8, dette stadfester 6 sin posisjon. 7 kommer som en tydelig dublett med kobling til 6 i COSY og HMBC. I tillegg ser man også i HMBC kobling mellom protonene i 7 og karbonet i 8. Dette karbonet kobler ikke til noe eget proton og har høy ppm verdi i karbonspektret. Når man i tillegg ser kobling til amidprotonet i 9 i HMBC kan det konkluderes med at dette er amidkarbonet i 8.

Man kan slå fast at protonet i 9 er et amidproton av flere grunner. I tillegg å ha høy ppm verdi ser man at toppen kommer som en tripllett i protonspektret, noe som betyr at protonet har to naboprotoner. Det stemmer godt med plasseringen da posisjon 9 har to naboprotoner i posisjon 10. Kobling mellom protonet i 9 og karbonet i 8 i HMBC er allerede vist. I tillegg finner man kobling til nabokarbonet 10, mens det i HSQC ikke er noe eget karbon protonet i 9 kobler med. Protonene i 10 kobler med protonene i 11 i COSY og i HMBC ser det ut som at det er kobling mellom karbonene og protonene i 10 og 11. Protonsignalet for 11 er en tripllett,

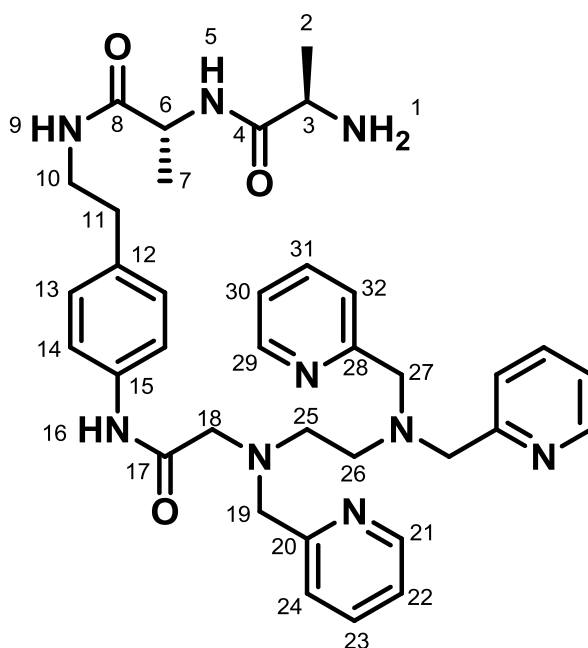
som stemmer godt siden den har to naboprotoner i 10. I HMBC ser man kobling mellom protonene i 11 og karbonet i både 12 og 13 og mellom karbonet i 11 og protonene i 13. HSQC viser ingen kobling til proton for karbonsignalet i 135.87 ppm, dermed er dette karbonet i 12. For 13 er det i COSY kobling til naboprotonene i 14. 13 er en klar dublett som bekrefter at den har ett naboproton. Signalet for 14 ligger inne i en multipllett med flere signal. antydning til en dublett her også. HMBC bekrefter posisjoneringen med kobling mellom proton og karbon for 13 og 14. Man finner også kobling mellom karbonet i 15 og protonene i 14, men karbonet i 15 kobler ikke til eget proton.

Ut fra kjemisk skift og splitting antas det at protonet ved 10.67 ppm er amidprotonet i 16. Det viser ingen kobling til andre proton i COSY eller til karbon i HSQC. Det er dog heller ingen tydelig koblinger til andre karboner. Signal for karbonet i 17 finnes ikke i spektret. Dette skulle kommet i samme område som karbonene i 4 og 8 i ^{13}C NMR. Det antas at protonene i 18 kommer sammen med protonet i 2 i multipletten fordi det i HSQC vises kobling mellom protonene til to ulike karbon. Karbonet for 2 er tydelig, men det er vanskelig å finne noen tydelig topp i ^{13}C NMR dataene.

Signalene for 21-23 er noe vanskelig å skille fra hverandre. I ^1H NMR integrerer de resterende signalene for 4 og 6 protoner. Det er kobling mellom disse protonsignalene i COSY og mellom proton og karbon i HMBC. Basert på karakteriseringen av EF-1004 som er en byggestein i synteseveien, antas det at de 4 protonene i 21 kommer ved 7.60-7.66 ppm, og de resterende for 22 og 23 ligger i multipllett på 7.35-7.48 ppm.

2.2.3 Strukturoppklaring Målmolekyl- 2

Målmolekyl-2 er en ny substans som i dette kapittelet er strukturoppklart. Strukturen med posisjonsnummerering er vist i figur 2.8 og dataene er samlet opp i tabell 3. Syntese og resultater er vist i kapittel 5.15. I strukturoppklaringen har jeg benyttet læreboken *Spectrometric identification of organic compounds* av Silverstein m.fl.(50) og ChemBioDraw Ultra 14.0(51) som hjelpemidler i tillegg til MestReNova(52) som databehandlingsprogram



Figur 2.8 Posisjonsnummerert struktur av Målmolekyl-2

Posisjon	δ H (ppm)	Splittingsmønster	Koblingskonstant (J Hz)	δ C (ppm)
1	-	-	-	-
2	1.27	d	7.0	21.60
3	3.40	q	7.0	50.58
4	-	-	-	176.15
5	7.66	d	7.6	-
6	4.34	p	7.0	48.48
7	1.32	d	7.0	17.58
8	-	-	-	172.22
9	6.41	t	5.9	-
10	3.53-3.43	m	-	40.62
11	2.82-2.72	m	-	35.09
12	-	-	-	134.32
13	7.40	d	7.6	123.22

14	7.59-7.53	m	-	120.14
15	-	-	-	137.01
16	10.44	s	-	-
17	-	-	-	170.09
18	3.29	s	-	58.77
19	3.75 – 3.71	m	-	61.05
20	-	-	-	158.14
21	8.52-8.51	m	-	149.65
22	7.15-7.09	m	-	122.66
23	7.15-7.09	m	-	123.18
24	7.59-7.53	m	-	136.69
25	2.69	t	6.5	51.63
26	2.82-2.72	m	-	52.14
27	3.75 -3.71	m	-	60.53
28	-	-	-	159.22
29	8.48	dt	4.8, 1.4	149.16
30	7.15-7.09	m		122.20
31	7.15-7.09	m		129.25
32	7.59-7.53	m	-	136.56

Tabell 3Strukturoppklaring Målmolekyl-2

I spektrene vises ikke aminprotonene for atomnummer 1, noe som er vanlig i CDCl_3 . COSY viser en kobling mellom protonene i 2 og 3. Disse er forventet å ha et lavere kjemisk skift enn 7 og 6 siden de sitter ved et amin som er mindre elektronegativt enn amid. 4 er ett av tre amidkarboner. Det forventes at amidkarbonene 4 og 8 skal ha en høyere ppm enn 17 fordi 17 er et anilinsk amid og at amidene 4 og 8 er lokalisert i nærheten av hverandre. 5 kobler ikke til noe karbon men COSY viser kobling til protonet i 6. I HMBC finner man kobling mellom protonet i 5 og med karboner i 4, 6. Dette viser at disse posisjonene er bundet sammen. COSY viser kobling mellom protonet i 6 og 7 og i HMBC ser man kobling mellom protonet i 6 og karbon i 8. Dette viser at de er posisjonert ved siden av hverandre.

Protonet i 9 kobler ikke til noe karbon men COSY viser kobling protonene i 10 og HMBC viser kobling mellom protonet i 9 og karbonet i 8 og 10. COSY viser også at 10 kobler med protonene i 11. I HMBC ser man kobling mellom proton i 11 og karbonet i 12, som er et av 5 aromatiske karbon som selv ikke kobler til proton. Av disse er 12 forventet å ha lavest ppm verdi siden de andre sitter i nærheten av nitrogen som er mer elektronegativt.

Ut fra mønster i koblinger og i protonspekter antas det at 13 og 14 er lokalisert ved hverandre. Ut fra $^1\text{H-NMR}$ og HSQC ser protonsignalet på 7.53-7.59 ppm ut til å integrere for 2+1+2

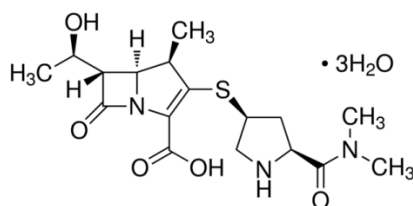
proton, hvor av 1+2 ligger tett på hverandre i karbon spektret og utgjør protonene i henholdsvis posisjon 24 og 32. De resterende 2 protonene sitter på et karbon med lavere ppm verdi enn de 3 andre protonene, derav 14. Karbon 15 antas å ha høyere ppm enn 12 på grunn av nærhet til nitrogen og lavere enn 20 og 28 siden de har flere nitrogen rundt seg. 16 har en høy ppm verdi som kjennetegner amider. Den kobler ikke til noe proton i COSY eller karbon i HSQC, men vi ser kobling til karbonene i 15 og 17 posisjon. 17 kobler ikke til proton i HSQC men kobler i HMBC til protonene i 18 og ut fra ppm er det siste amidkarbonet. 18 er en singlett for 2 proton som ikke kobler ed andre proton i COSY.

I proton kommer signalene for 19 og 27 i et signal som ser ut som 2 singletter og integrerer for 6 proton. HSQC viser kobling til 2 ulike karbon, hvor det ene signalet er for ett karbon og det andre for to. Man finner kobling i HMBC mellom protonene i 19 og 27 med karbon i 20 og 28. Dette viser at 19 og 27 er posisjonen mellom de tertiære aminene og pyridinene.

20 viser et enkelt karbon uten kobling til proton i det aromatiske området. Nærheten til nitrogen trekker opp ppm- verdien. Dette har også betydning for 21 og 29. Disse vil ha høyere ppm-verdi på grunn av nærhet til nitrogen i pyridinringen. Disse vil komme høyere i ppm verdi enn de andre aromatiske posisjonene. 22, 23, 30 og 31 vil få en temmelig lik ppm i proton. Til grunn for plasseringen ligger HSQC og antatte ppm verdier for posisjonene.

2.3 Biologiske resultater

Målmolekyl-1, **Målmolekyl-2**, substans **9** og **11-13** har blitt biologisk testet på MBL-positive Gram negative bakterier. Dette har blitt gjort av Ørjan Samuelsen og hans gruppe ved Universitetssykehuset i Nord-Norge i Tromsø, som gruppen samarbeider med. Testen som har blitt utført er rask og effektiv måte å måle effekten av adjuvanter på mengde Meropenem som trengs for å stoppe bakterieveksten.



Figur 2.9 Struktur meropenem (54)

Substansene har blitt testet alene for å sjekke om de er bakterostatisk eller bitericid, altså om stoffene hemmer bakterievekst eller dreper bakterien. I våre teorier er substansene adjuvanter og skal virke biterostatisk gitt sammen med β -laktam antibiotika. Stoffene har blitt testet sammen med meropenem som er et moderne β -laktam antibiotika og som bakteriestammene er resistente mot. Bakteriestammene som substansene er blitt testet på er *P. aeruginosa* og *K. pneumoniae* som har metallo- β -laktamasene Verona integronkodet metallo- β -laktamase (VIM-2) og New Delhi metallo β -laktamase (NDM-1)

Tallene i resultatene er forholdstall som gir en indikasjon på hvor fortynnet løsningen med meropenem og testsubstans kan være før man ser bakterievekst. Dess høyere tall, der mindre fortynnet og dess mer konsentrert er løsningen av testsubstanser før man ser hemmende effekt på bakterievekst.

Man ser av tabell 4 og 5 at meropenem alene (MEM) har forholdstall på 32-64 for begge bakteriestammene, noe som i praksis betyr at bakteriene er resistente mot meropenem. I tabell 5 er **Målmolekyl-1** merket som EF-1013 og **Målmolekyl-2** merket som EF-1046. Gitt alene har hverken EF-1013 eller EF-1046 effekt på bakterieveksten. De er derfor ikke bitericid. Derimot ser man stor forskjell mellom **Målmolekyl-1** og **Målmolekyl-2** i effekt når de er testet med meropenem. Man ser at EF-1013 (**Målmolekyl-1**) har et forholdstall 64 og har ingen effekt på bakterienes resistens mot meropenem. EF-1046 (**Målmolekyl-2**) har forholdstall på 2 og $\leq 0,25$ svekker den bakterielle resistensen mot meropenem betraktelig.

I tabell 5 ser man også at **9** (EF-1043), **11**(EF-1040), **12** (EF-1044) og **13** (EF-1045) har tilsvarende effekt som **Målmolekyl-2** på *K. pneumoniae* og noe bedre effekt på *P. aeruginosa*. Forskjellen i effekt er dog liten og med tanke på testens karakter, skal man ikke legge så mye i det, men det er med å understreke viktigheten den sinkbindende delen av molekylet og dets egenskaper.

Sammenlikner man resultatene for **OAA4033** i tabell 4 med resultatene for substansene som er syntetisert i tabell 5, kan resultatene tyde på at den sinkbindende delen er viktig og nødvendig for effekt på MBL. **Målmolekyl-1**, som ikke har sinkbindende egenskaper, har ingen effekt på resistens mot meropenem. For **Målmolekyl-2** og for de tilhørende mellomproduktene med forsterkende sinkbinderegenskaper, er det observert bedre effekt enn for **OAA4033** på begge bakteriestammene.

Ref. no Species MBL	MBL-positive Gram-negatives	
	K34-7	K66-45
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	VIM-2	NDM-1
MEM (prev. results multiple exp.)	32-64	32-64
MEM (30/09/14)	32	64
MEM (18/09/15)	64	64
MEM+OAA4033 (prev. results)	≤1	≤0,5
MEM+OAA4033 batch I (2013)	1	≤0,5
MEM+OAA4033 batch II (03/09/14)	4-8	4
MEM+OAA4033 batch III (30/09/14)	32	16
MEM+OAA4033 batch IV (18/09/15)	16	8

Tabell 4 Biologiske resultater OAA4033

Ref. no Species MBL	MBL-positive Gram-negatives	
	K34-7	K66-45
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	VIM-2	NDM-1
MEM	32-64	32-64
MEM+EF1043	0,5	≤0,25
MEM+EF-1040	1	≤0,25
MEM+EF-1044	1	≤0,25
MEM+EF-1045	1	≤0,25
MEM+EF-1046	2	≤0,25
MEM+EF-1013	64	64
EF1043	1000	≥1000
EF-1040	≥1000	≥1000
EF-1044	≥1000	≥1000
EF-1045	≥1000	≥1000
EF-1046	≥1000	≥1000
EF-1013	≥1000	1000
OAA4033	≥1000	≥1000

Tabell 5 Biologiske resultater substans 9, 11, 12, 13, Målmolekyl-1 og Målmolekyl-2

3 Konklusjon

Syntesen

Syntesene har vært vellykkede. Det foreligger $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ og HRMS resultater av alle nye substanser. I tillegg er substans **3** og **Målmolekyl-1** og **Målmolekyl-2** har blitt strukturoppklart ved hjelp av COSY, HSQC og HMBC. Basert på disse resultatene kan man konkludere med at **Målmolekyl-1**, **Målmolekyl-2** og de nye substansene **3,4,6,12 og 13** er mest sannsynlig blitt syntetisert.

Biologisk aktivitet

De biologiske resultatene viser oss at **Målmolekyl-1** ikke har effekt på bakterienes resistens for meropenem. Siden **Målmolekyl-1** var en negativ kontrollsubstans for OAA-4033, var dette et forventet resultat. Man kan derfor konkludere med effekten til **OAA4033** er knyttet til den sinkbindende delen av molekylet.

De biologiske testene viser at substansene **11**, **12**, **13** og **Målmolekyl-2** ikke er bakteriedrepende i seg selv, men ødelegger bakteriens resistens mot meropenem. Resultatene ser ut til å være enda bedre for disse substansene enn for **OAA4033**. Man kan på bakgrunn av dette konkludere med at substansene har inhiberende effekt på MBL i resistente MBL-positive Gram negative bakterier. Gitt sammen med meropenem som adjuvant har substansene hemmende effekt på bakterievekst. Resultatene antyder at en sterkere sinkbinder kan ha bedre effekt på bakterieveksten enn en moderat sinkbinder.

4 Veien videre

Selv om målene for oppgaven er oppnådd, har resultatene gitt grunnlag for mye videre forskningsarbeid. De biologiske resultatene gir grunnlag for å syntetisere opp **Målmolekyl-2** (EF-1046) for videre biologisk testing og videre struktur aktivitets studier (SAR).

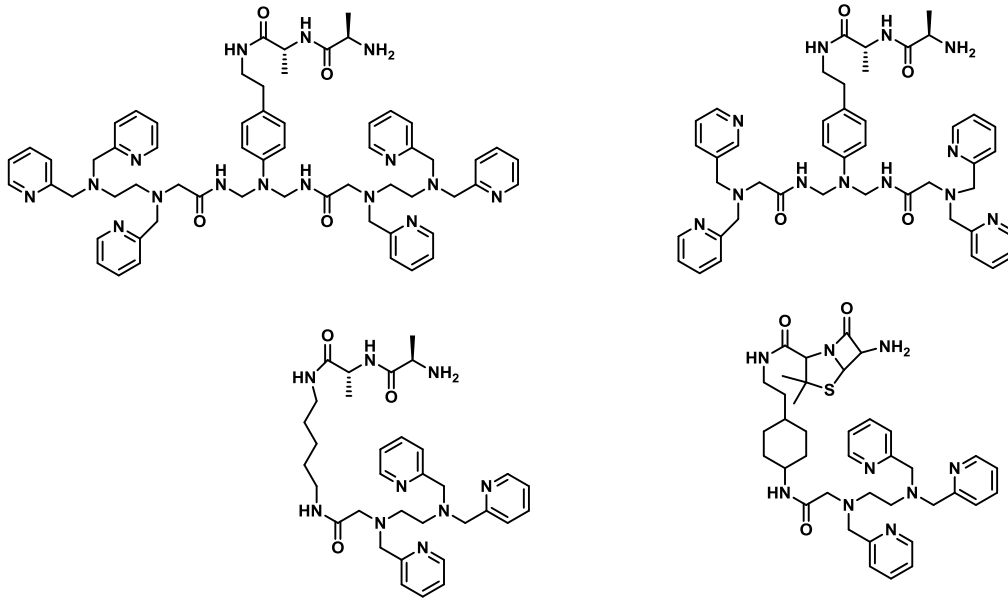
Optimalisering av syntese og opparbeidelse

Som nevnt i resultatkapitlet hadde flere av syntesetrinnene i syntesen av **Målmolekyl-2** dårlige utbytter. Noe av dette skyldes krevende opparbeidelse. I videre arbeid vil det være naturlig å gjøre optimaliseringsarbeid knyttet til opparbeidelsen. Det kan være å finne bedre egnede eluentsystemer som gir bedre separasjon.

Et grep i synteseveien som hadde vært særlig interessant og studert var å koble peptid med linker før man kobler på den sinkbinende delen i syntesen av **Målmolekyl-2** (EF-1046). Dette fordi man vil spare seg for en alumina- flash. Trolig kan «peptid+linker» opparbeides ved silika flashkromatografi, som er enklere og gir bedre resultat enn alumina. Ved å ha ett trinn mindre med sinkbindende del, vil man redusere bruken av alumina med en flash. Dette vil forenkle syntesen og bedre utbytte.

Alternative strukturer

Man kan også se på helt nye strukturer. Man kan beholde den sinkbindende delen og teste ut alternative linkere og vektorer for å studere effekten av dette. Noe som også kunne vært spennende er å utvide den sinkbindende delen ytterligere, ved å gjøre den større eller legge til sinkbindende deler i molekylet. Noen forslag til mulige strukturer er vist i Figur 4.1



Figur 4.1 Alternative strukturer

5 Eksperimentell del

Materialer

Reagensene som har blitt brukt er kjøpt inn fra Sigma-Aldrich og VWR. Reagensene er brukt uten videre rensing. Utbytter er ikke korrigert.

Metoder og instrumenter

Synteseproduktene har blitt analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR. I tillegg er substans **3** og **Målmolekyl-1** og **Målmolekyl-2** analysert ved COSY, HSQC og HMBC. Disse NMR programmene sier hvilke proton som sitter ved hverandre, hvilke proton som sitter på hvilke karbon og hvilke proton og karbon som er naboer.

I tillegg er TLC brukt som et hjelpemiddel i opparbeidelsen.

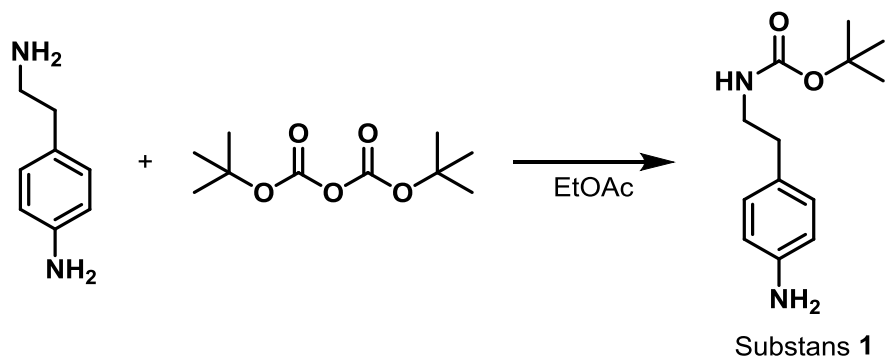
Kjernemagnetisk ressonanspektroskopi (NMR)

^1H NMR og ^{13}C NMR, COSY, HSQC og HMBC er tatt opp på AVI-600MHz, AVII-400MHz og DPX-300MHz instrumenter. Koblingskonstantene (J) blir rapportert i hertz (Hz) og kjemisk skiftverdi rapporteres i parts per million (δ). Spektrene justert i forhold til løsemidlene som er brukt, henholdsvis DMSO (2.50 for ^1H NMR og 39.52 ppm for ^{13}C NMR), D_2O (4.8 for ^1H NMR) og CDCl_3 (7.26 ppm for ^1H NMR og 77.16 ppm for ^{13}C NMR)

Tynnsjiktskromatografi (TLC)

Tynnsjiktskromatografi (TLC) ble utført med TLC aluminiumsplater med henholdsvis silikagel 60 F_{254} og Aluminium oxide 60 F_{254} neutral

5.1 Syntese av 1



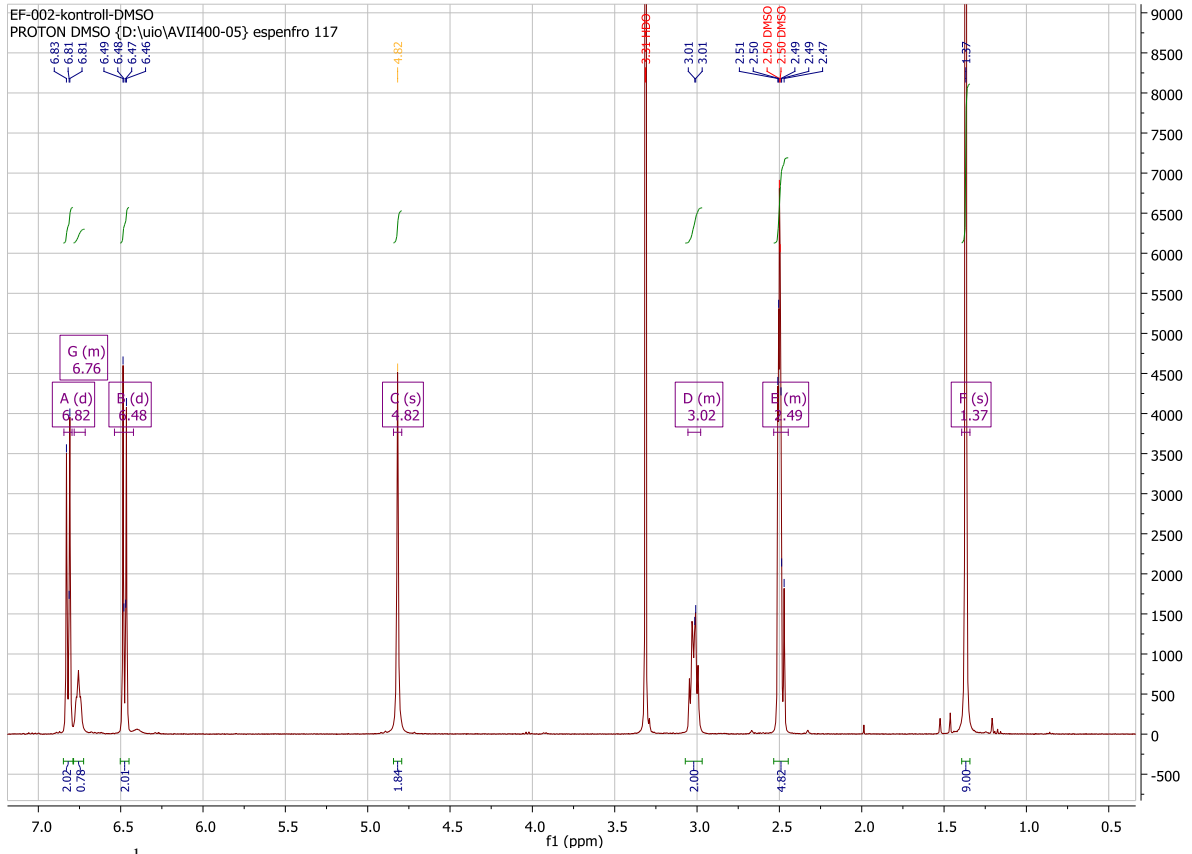
Kjemikale	Mw	d (g/mL)	Mengde	mmol	eq
4-(2-aminoethyl)anilin	136.19	1.034	4.8 mL	36.44	1
di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate	218.25	-	8.265 g	37.97	1.04

Prosedyre

4-(2-aminoethyl)anilin (4.8 mL, 36.44 mmol) ble løst i 50 mL etylacetat og satt på vannbad og omrøring. di-*tert*-butyl dicarbonate (8,265 g, 37.87 mmol) ble løst i 50 mL etylacetat og tilsatt dråpevis under kraftig omrøring. Løsningen ble tykk og slørete med hvitgul farge under tilsetningen. Gikk over til å bli gjennomsiktig og gyllen. Reaksjonen sto til omrøring over natten. Reaksjonen ble så konsentrert under redusert trykk og omkrystallisert. Råproduktet løste seg ved 15 mL varm etylacetat. Det ble så tilsatt 60 mL varm heptan og satt på isbad. Krystallene ble filtrert, vasket med moderlut og tørket over avsug. NMR vise rent produkt.

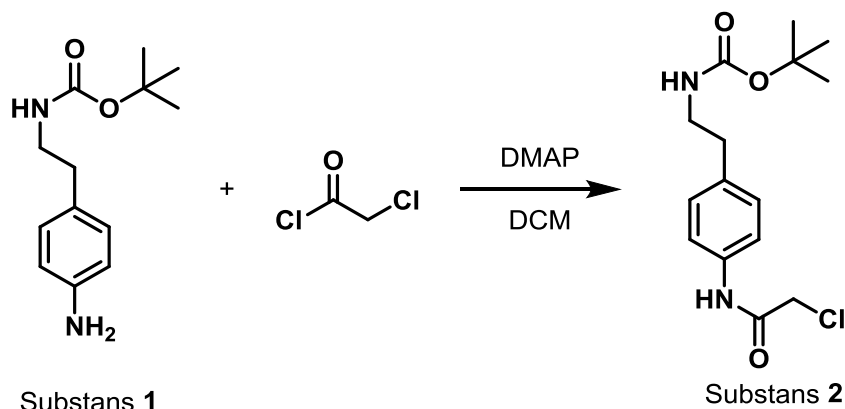
Utbytte: 7.202 g, 84 %

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 6.82 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.78 – 6.72 (m, 1H), 6.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.82 (s, 2H), 3.06 – 2.98 (m, 2H), 2.53 – 2.45 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).



Figur 5.1.1 ¹H NMR Substans 1

5.2 Syntese av 2



Kjemikalie	Mw	d (g/mL)	Mengde	mmol	eq
Substans 1	263.32	-	1.45 g	6.14	1
2-kloroacetylklorid	112.94	1.417	0.59 mL	7.40	1.2
DMAP	122.17	-	1.22 g	9.95	1.6

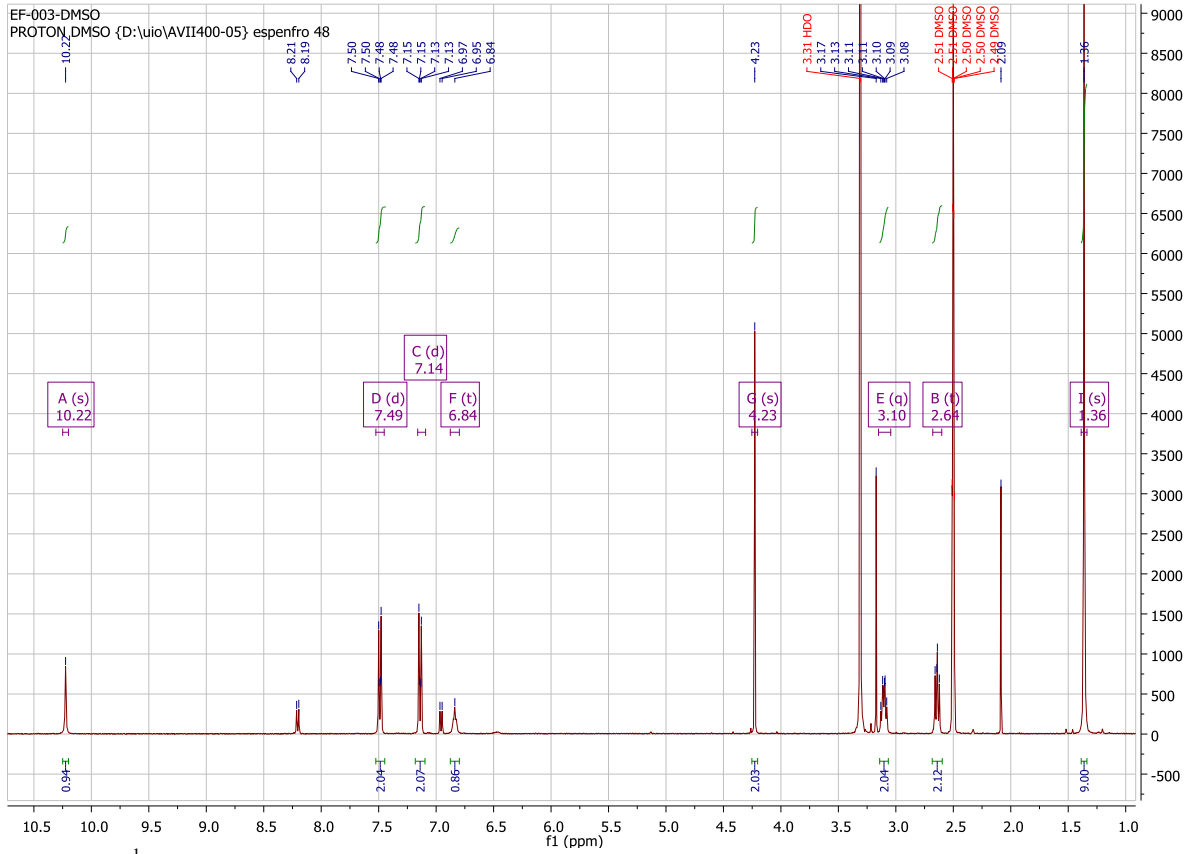
Substans 1 (1.45 g, 6.14 mmol) ble løst i 70 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad. DMAP (1.22 g, 9.95mmol) ble tilsatt og løst. 2-kloroacetylklorid (0.59 mL, 7.40 mmol) ble løst i 30 mL diklormetan og tilsatt dråpevis over 20 minutter under kraftig omrøring. Reaksjonen ble så satt til omrøring i romtemperatur i 2,5 time. Løsningen gikk fra svakt gulaktig til mer rødlig farge. Løsningen ble konsentrert under redusert trykk. Satt igjen med et rødgrått pulver. Dette ble vasket med små mengder kald diklormetan. Pulveret ble filtrert og tørket på rotavapor. Produktet var et hvitt pulver med et rødlig skjær.

Utbytte: 1,551 g, 81 %

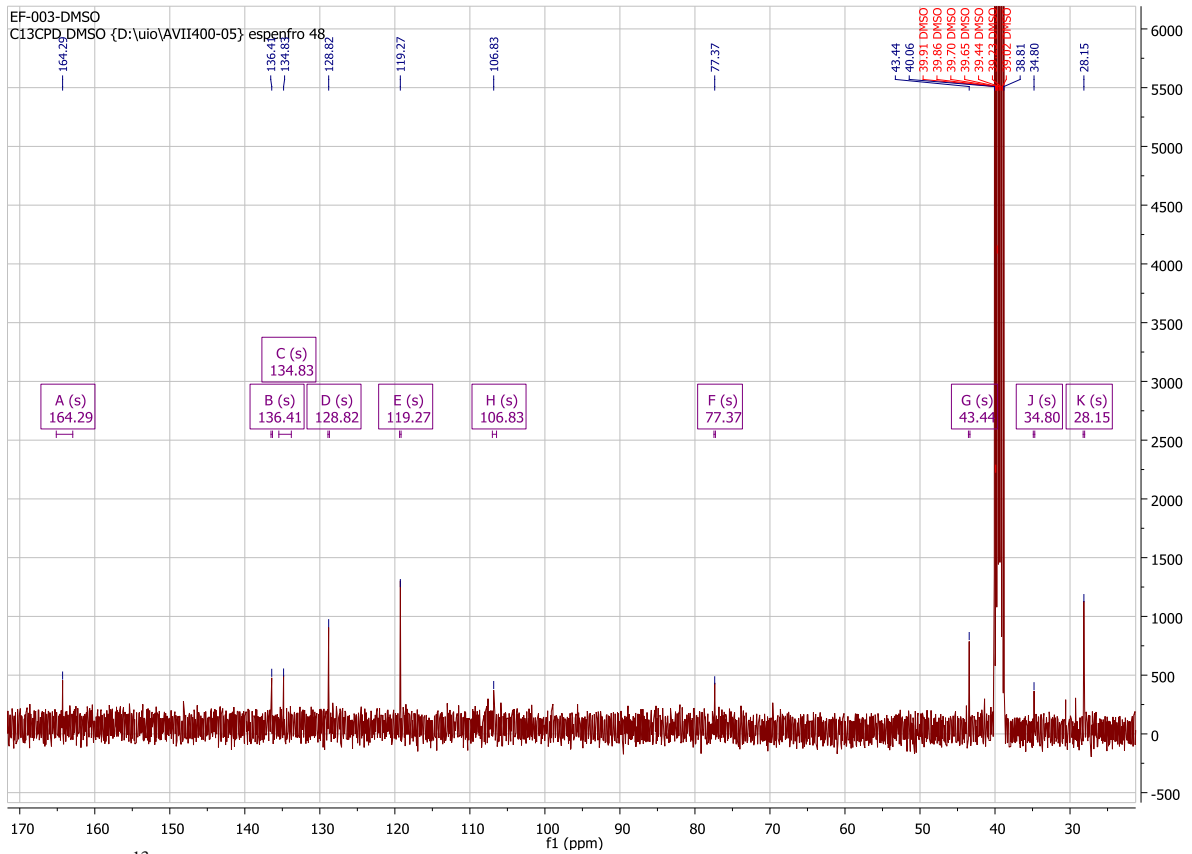
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 10.22 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.84 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.10 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 1.36 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 164.29 (s), 136.41 (s), 134.83 (s), 128.82 (s), 119.27 (s), 106.83 (s), 77.37 (s), 43.44 (s), 34.80 (s), 28.15 (s).

Kommentar: NMR viser ønsket produkt, men ikke helt rent. Mulig rester av startmateriale. Det ble ikke opparbeidet videre da det kom grundigere opparbeidelse med flash-kromatografi i senere trinn. Karbonspektret er ikke optimalt, men gir en pekepinn.

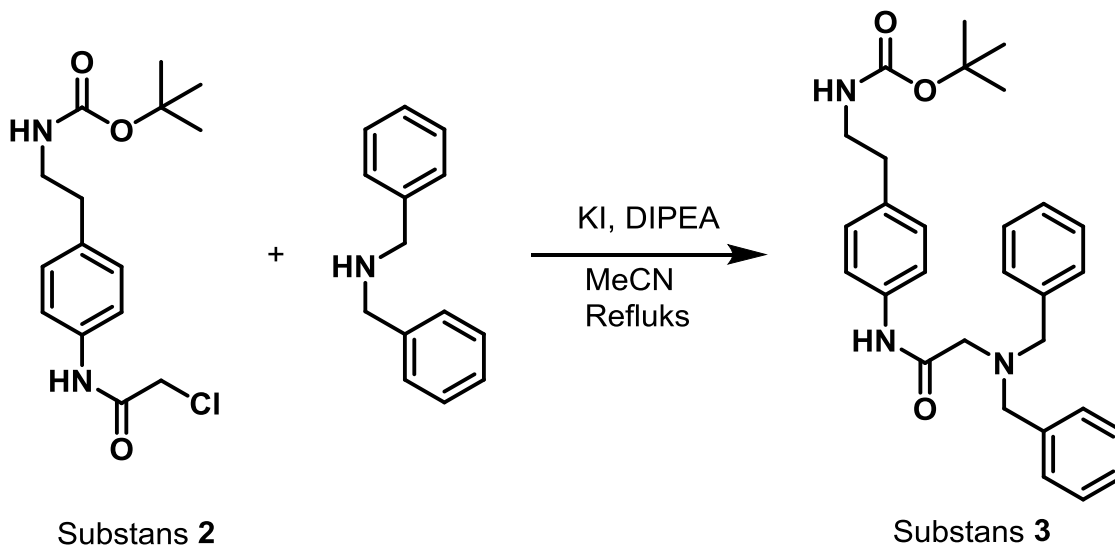


Figur 5.2.1 ¹H NMR Substans 2



Figur 5.2.2 ¹³C NMR Substans 2

5.3 Syntese av 3



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 2	312.79	-	1.002 g	3.20	1
KI	166.00	-	0.597 g	3.60	1.13
Dibenzylamin	197.28	1.026	0.74 mL	3.85	1.20
DIPEA	129.24	0.742	5.50 mL	31.58	10

Prosedyre:

Substans 2 (1.002 g, 3.20 mmol) og KI (0.597 g, 3.60 mmol) ble løst i 350 mL MeCN og satt på omrøring. Dibenzylamin (0.74 mL, 3.85 mmol) ble tilsatt. DIPEA (5.5 mL, 31.58 mmol) ble tilsatt og reaksjonen ble varmet opp til refluks over natten. Reaksjonen ble stoppet etter ca. 17 timer og nedkjølt til romtemperatur. Løsningen ble først filtrert (uløst KI) og så konsentrert under redusert trykk. Satt igjen med en rød seig masse. Det ble observert noe krystalldannelse. Råproduktet ble opparbeidet videre ved hjelp av flash-kromatografi. Det ble benyttet silikagel som stasjonærfase og eluentsystemet 20 % - 50 % etylacetat i heptan. Satt igjen med en lysgul olje som frøs i kjøleskapet.

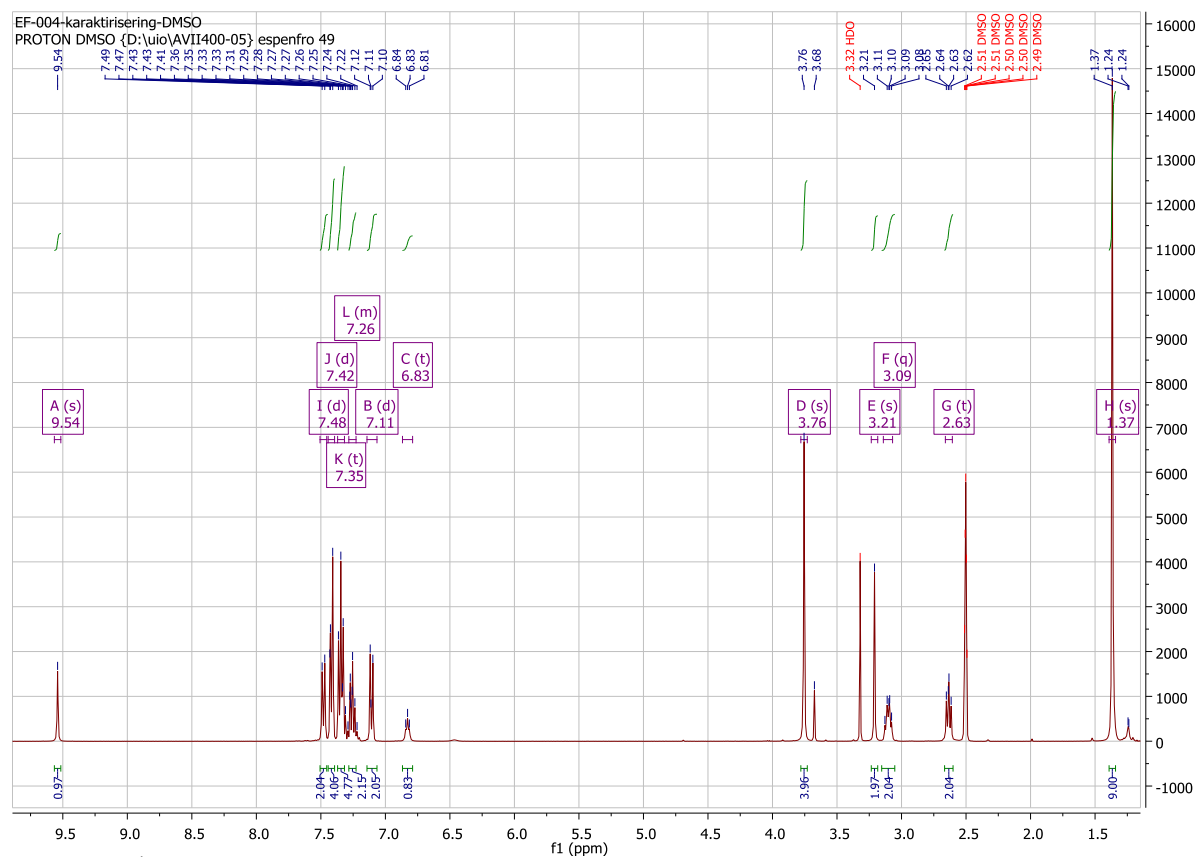
Utbytte: 1.032 mg, 68 %

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.54 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H), 7.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.28 – 7.23 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.83 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.76 (s, 4H), 3.21 (s, 2H), 3.09 (dd, $J = 8.0, 5.6$ Hz, 2H), 2.63 (dd, $J = 8.4, 6.4$ Hz, 2H), 1.37 (s, 9H).

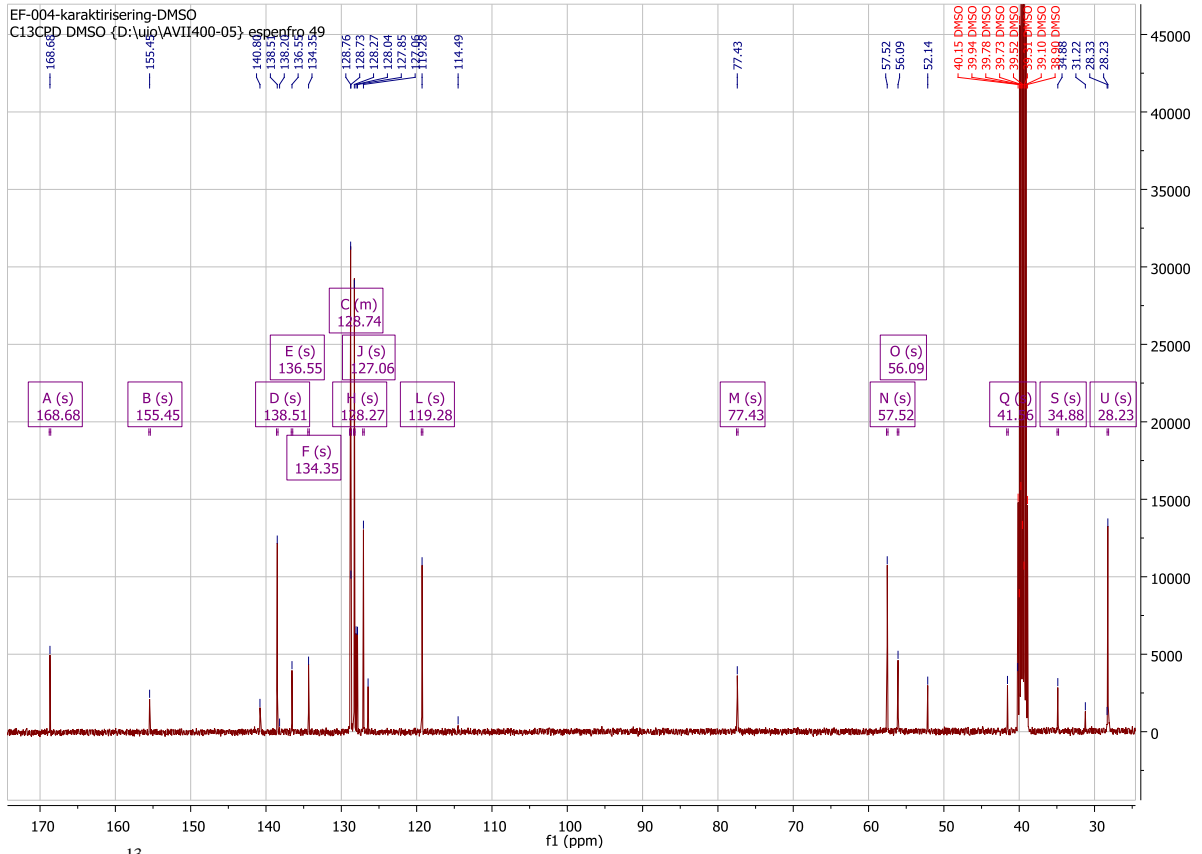
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.68 (s), 155.45 (s), 138.51 (s), 136.55 (s), 134.35 (s), 128.90 – 128.66 (m), 128.27 (s), 127.06 (s), 119.28 (s), 77.43 (s), 57.52 (s), 56.09 (s), 41.56 (s), 34.88 (s), 28.23 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 474.2756

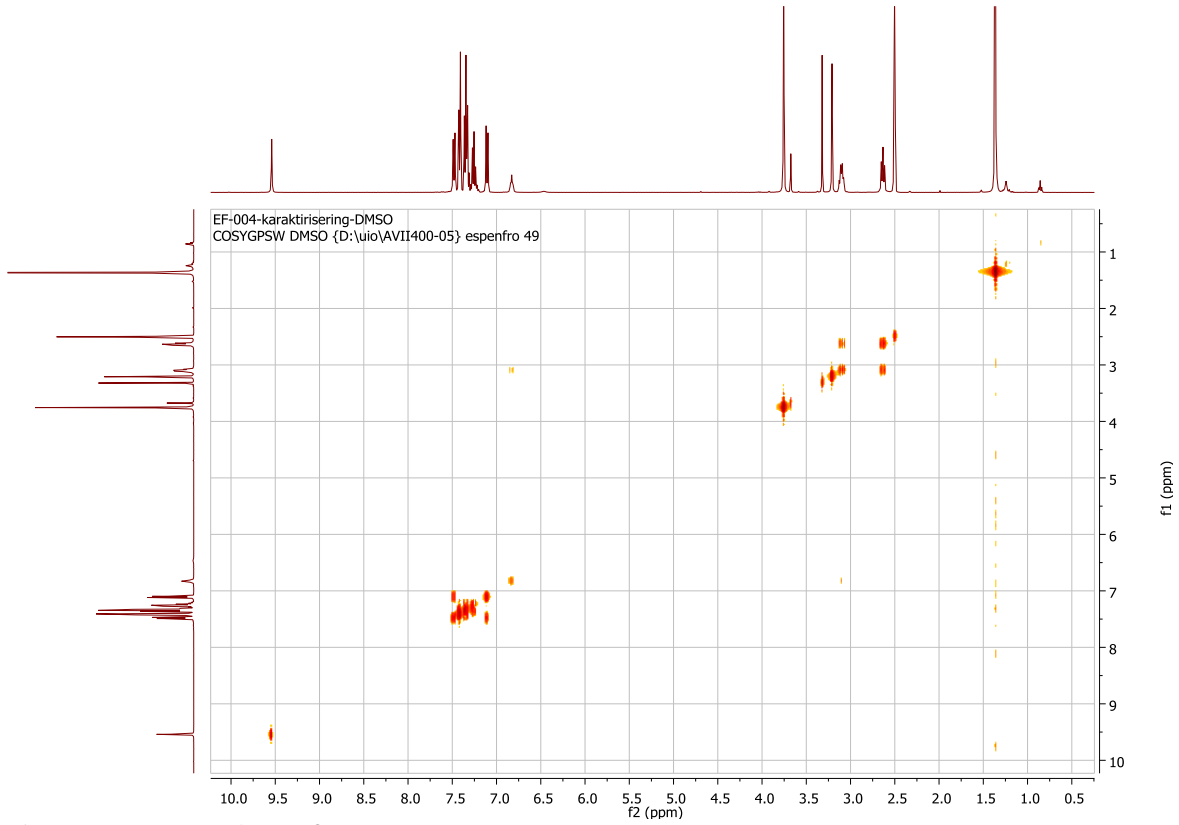
Funnet: 474.2763



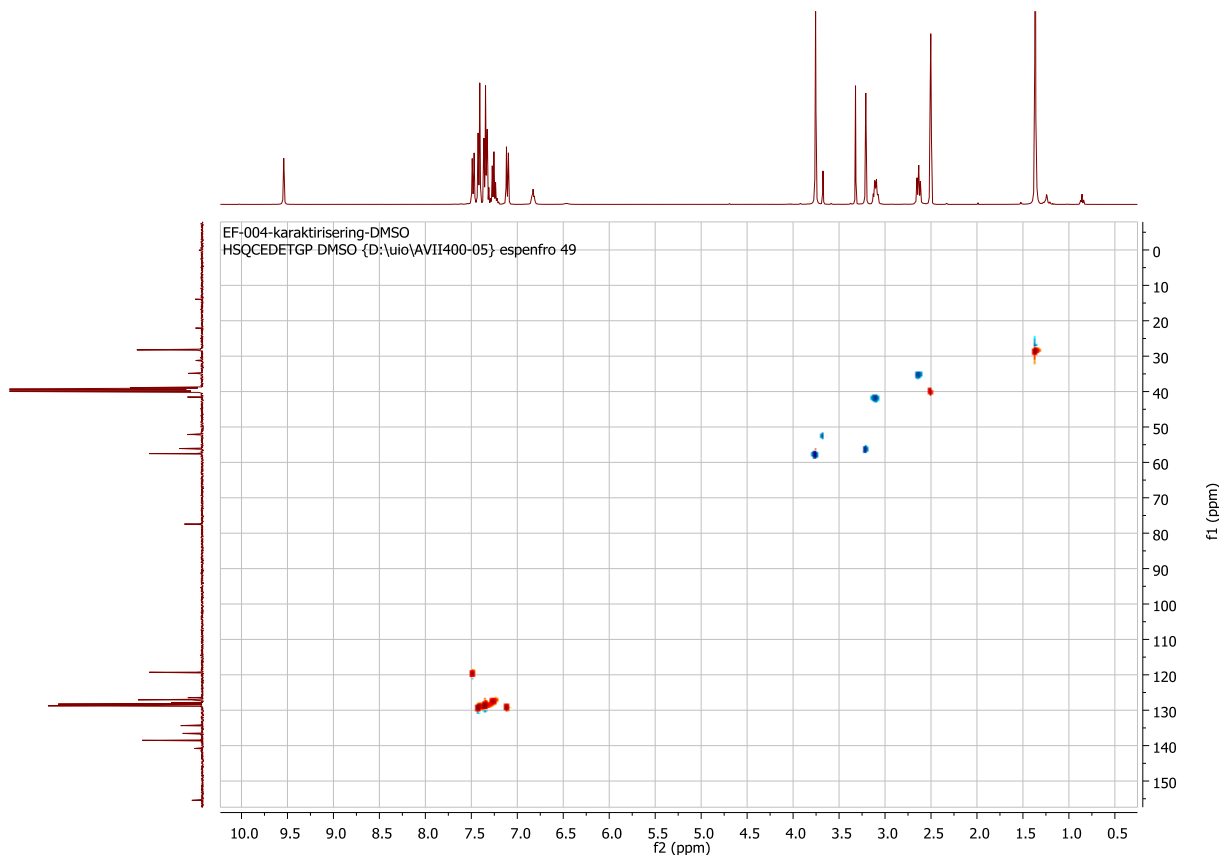
Figur 5.3.1 ^1H NMR Substans 3



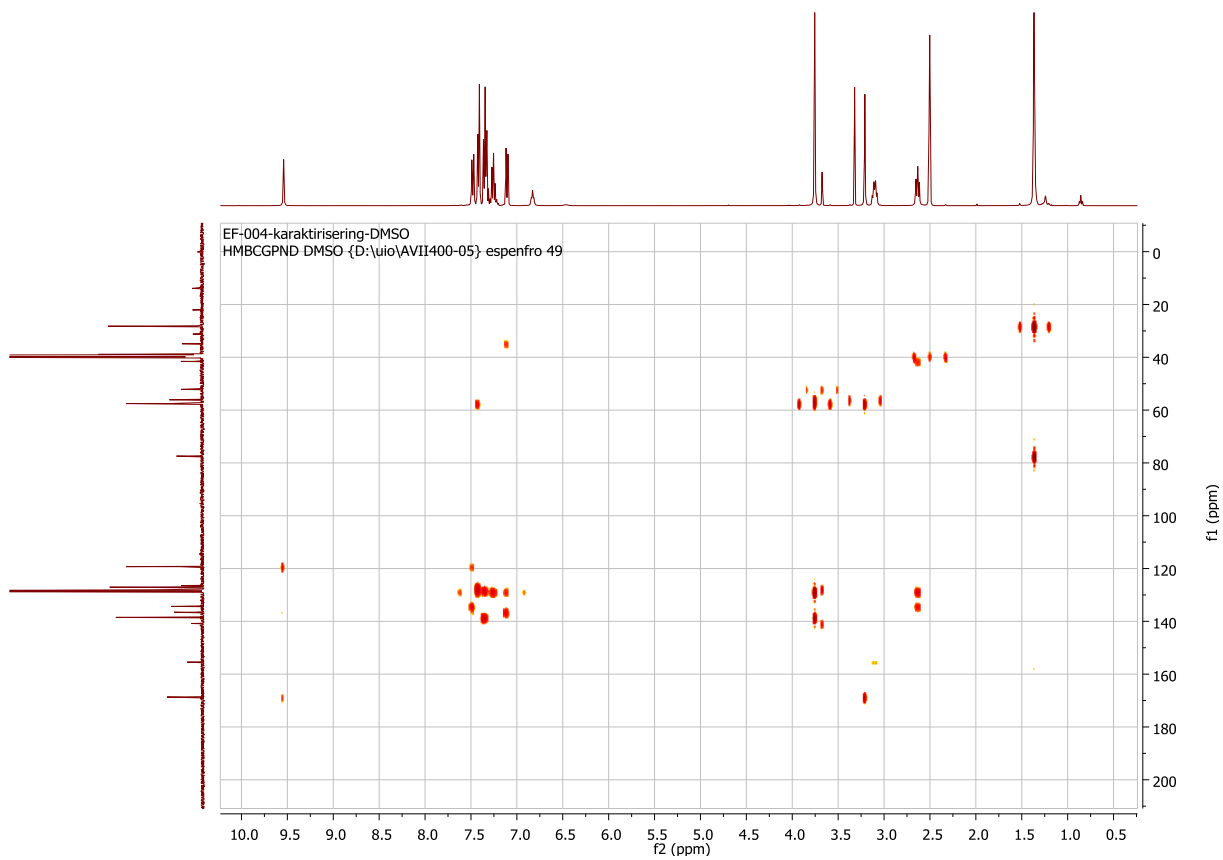
Figur5.3.2 ¹³C NMR Substans 3



Figur 5.3.3 COSY Substans 3

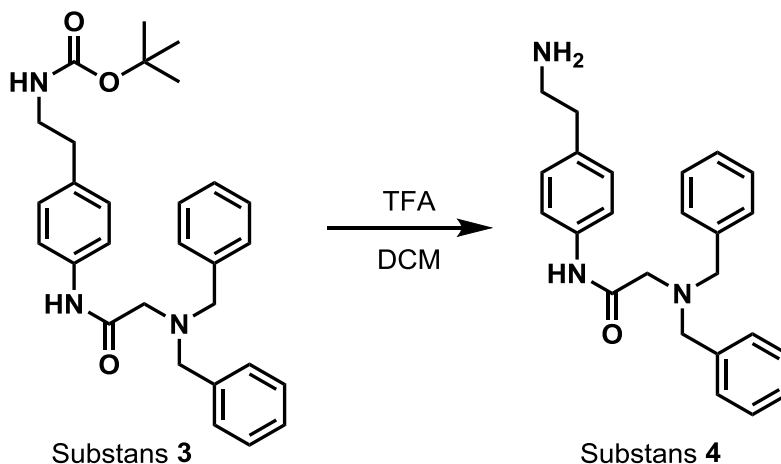


Figur 5.3.4 HSQC Substans 3



Figur 5.3.5 HMBC Substans 3

5.4 Syntese av 4



Kjemikalie	Mw	d (g/ml)	Mengde	mmol	eq
Substans 3	473.62	-	550 mg	1.16	1
Trifluoreddiksyre	114.02	1.489	6 mL	78.35	68

Prosedyre

Substans 3 (550 mg, 1.16 mmol) ble løst i 25 mL diklormetan og satt på omrøring og isbad. Trifluoreddiksyre (6 mL, 78.35 mmol) ble løst i 25 mL diklormetan og tilsatt dråpevis over ca. 5 minutter. Reaksjonen ble satt til omrøring i romtemperatur i 1 time. Løsningen ble så redusert på rotavapor. Råproduktet ble så løst i 25 mL etylacetat og ekstrahert med 0.5 M K_2CO_3 . Vannfasen ble ekstrahert med 2 x 25 mL etylacetat. De organiske fasene ble først vasket med 25 mL 0.5 M K_2CO_3 og tørket over K_2CO_3 . Løsningen ble filtrert og konsentrert under redusert trykk. Satt igjen med en lys olje.

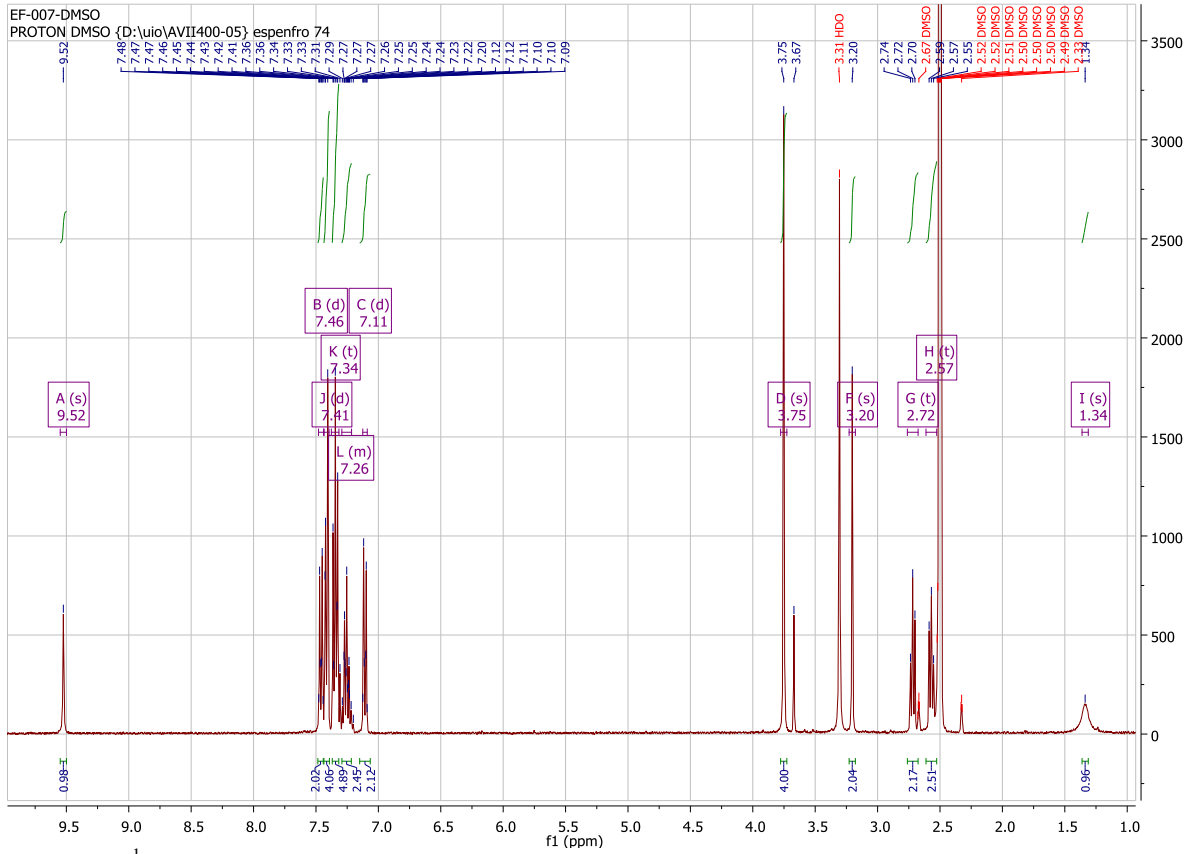
Utbytte: 404 mg, 93 %

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.52 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H), 7.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.29 – 7.21 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.75 (s, 4H), 3.20 (s, 2H), 2.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.34 (s, 1H).

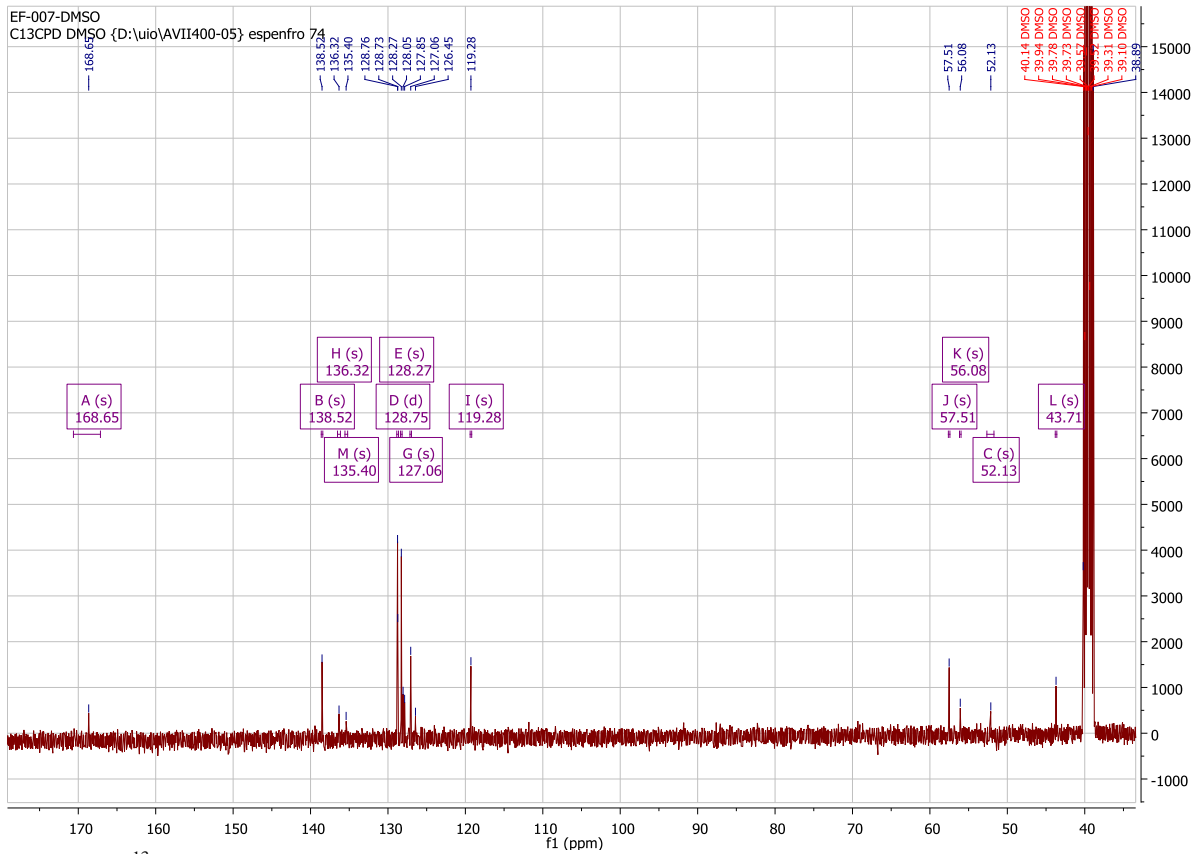
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.65 (s), 138.52 (s), 136.32 (s), 135.40 (s), 128.75 (d, $J = 2.8$ Hz), 128.27 (s), 127.06 (s), 119.28 (s), 57.51 (s), 56.08 (s), 52.13 (s), 43.71 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for $C_{24}H_{27}N_3O$ $[M+H]^+$: 374.2232

Funnet: 374.2234

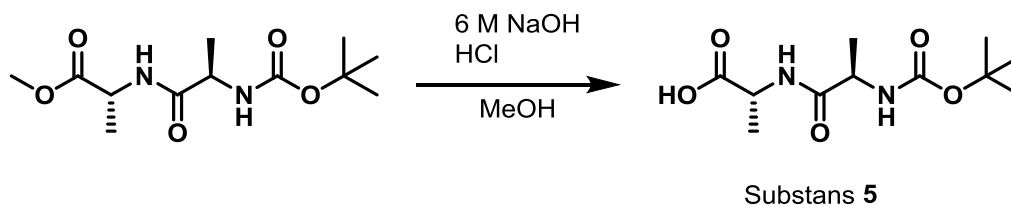


Figur 5.4.1 ¹H NMR Substans 4



Figur 5.4.2 ¹³C NMR Substans 4

5.5 Syntese av 5

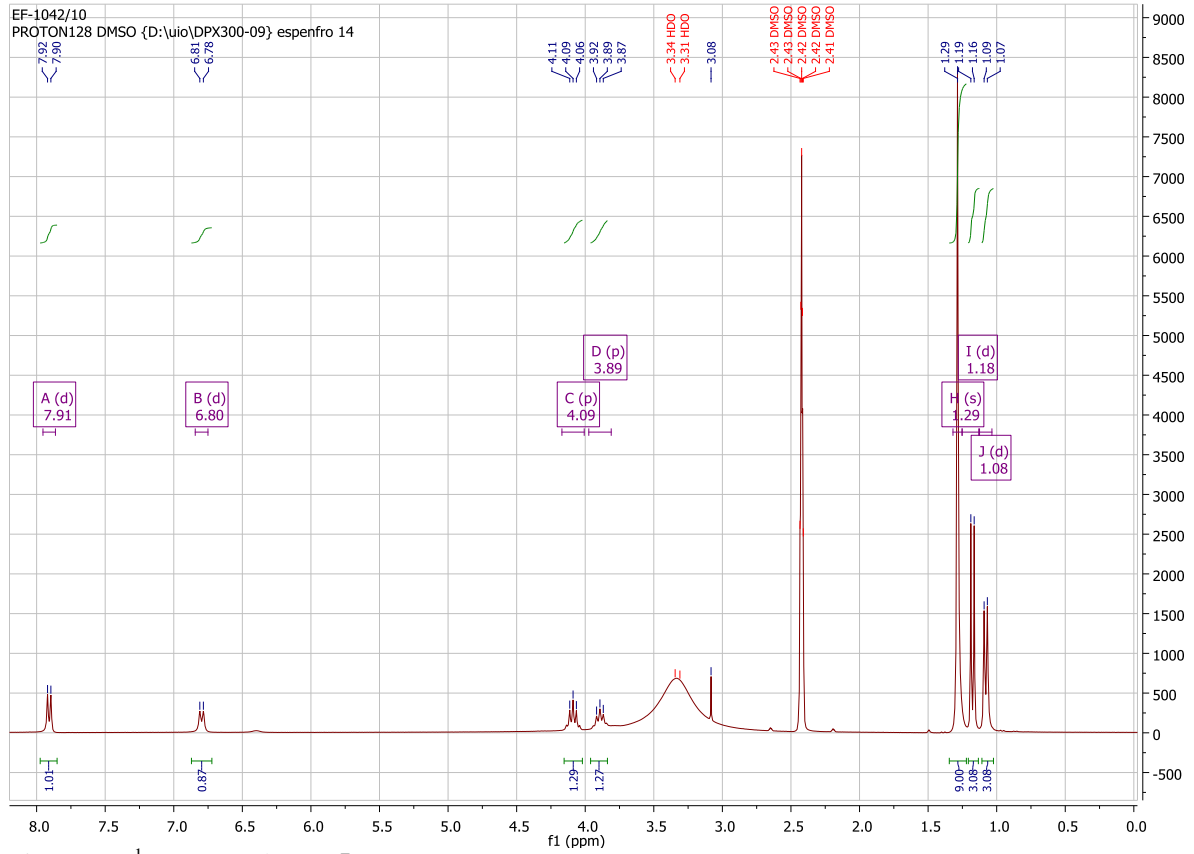


Kjemikalie	Mw	Mengde	mmol	eq
Metyl(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)- <i>D</i> -alanyl- <i>D</i> -alaninat	274,32	1,04 g	3,79	1
6 M NaOH		6 mL		

Prosedyre

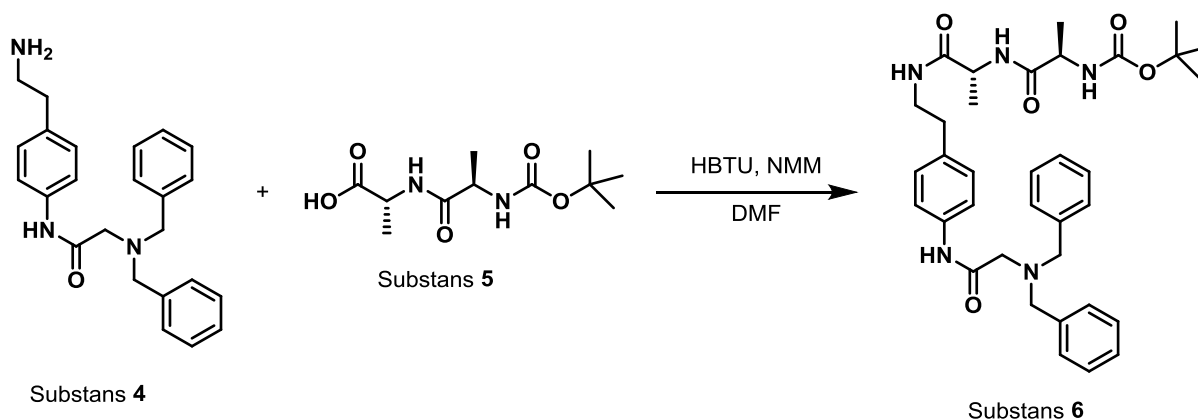
Metyl(*tert*-butoxycarbonyl)-*D*-alanyl-*D*-alaninat (1,04 g, 3,79 mmol) ble forsøkt løst i 6 mL kald 6M NaOH. Det løste seg dårlig. Det ble tilsatt metanol til alt løste seg, det ble tilsatt 18 mL. Sto på omrøring på isbad i 30 min og i romtemperatur i 1,5 time. Den tilsatte metanolen ble fjernet under redusert trykk. Den resterende vannfasen ble kjølt ned til 0 °C. Reaksjonen ble nøytralisert og surgjort først med 4M HCl dråpevis til pH 3. Deretter ble 2 M HCl tilsatt dråpevis til det oppsto en utfelling av hvitt pulver ved omtrent pH 2. Pulveret ble filtrert av og tørket. Utbytte: 894 mg, 91 %

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.91 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.09 (p, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.89 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.29 (s, 9H), 1.18 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.08 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H).



Figur 5.5.1 ¹H NMR Substans 5

5.6 Syntese av 6



Kjemikalie	Mw	d (g/mL)	Mengde	mmol	eq
Substans 4	373.22	-	0.404 g	1.082	1
Substans 5	260.29	-	0.285 g	1.095	1
HBTU	379.24	-	0.413 g	1.089	1
NMM	101.15	0.918	115 μL	1.044	1

Prosedyre

Substans 4 (0.404 g, 1.082 mmol) ble løst i 4 mL DMF. Substans 5 (0.285 g, 1.095 mmol) og HBTU (0.413 g, 1.089 mmol) ble tilsatt og løst. Reaksjonen ble satt på omrøring og kjølt ned mot 0 °C på isbad. NMM (115 μL , 1.044 mmol) ble så tilsatt. Reaksjonen sto på isbad i 30 minutter og i romtemperatur i 3 timer. Reaksjonen ble så forsøkt fortynnet med 200 mL vann. Det oppsto en utfelling. Utfellingen ble filtrert av. Restene i kolben ble løst i 50 mL etylacetat og ekstrahert med vannfasen. Vannfasen ble videre ekstrahert med 3 x 20mL etylacetat. De samlede organiske faser ble dampet inn på rotavapor.

Det ble tatt NMR for å undersøke renheten til det utfelte pulveret og på det som var ekstrahert. NMR viste at det ekstraherte var renest.

Det filtrerte ble opparbeidet videre ved hjelp av flash-kromatografi. Det ble benyttet silikagel som stasjonærfase og 25 % - 0 % heptan i etylacetat som eluent. Råproduktet var dårlig løselig i eluenten, det ble derfor «dryloadet». NMR viste rent produkt.

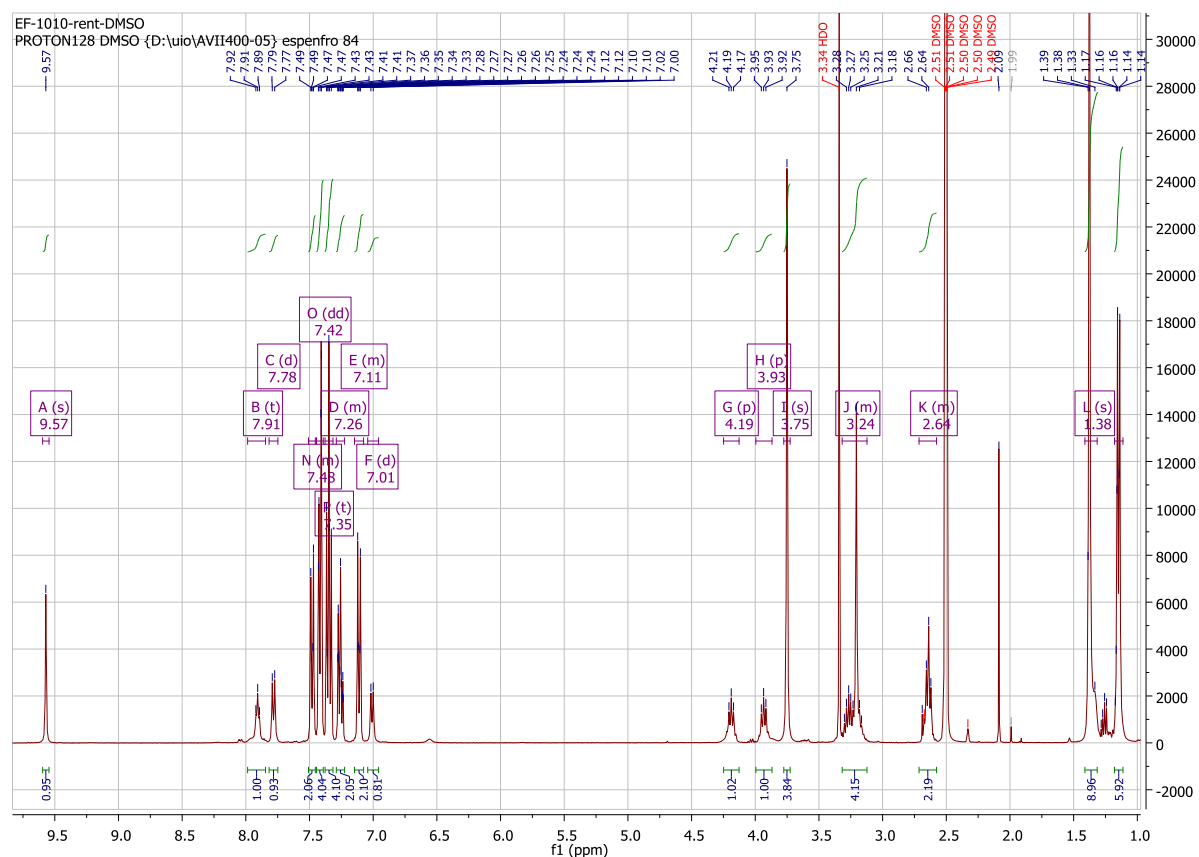
Utbytte 567 mg, 91 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.57 (s, 1H), 7.91 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.42 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 4H), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), 7.15 – 7.08 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.19 (p, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.93 (p, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.75 (s, 4H), 3.32 – 3.12 (m, 4H), 2.71 – 2.58 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.15 (dd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 6H).

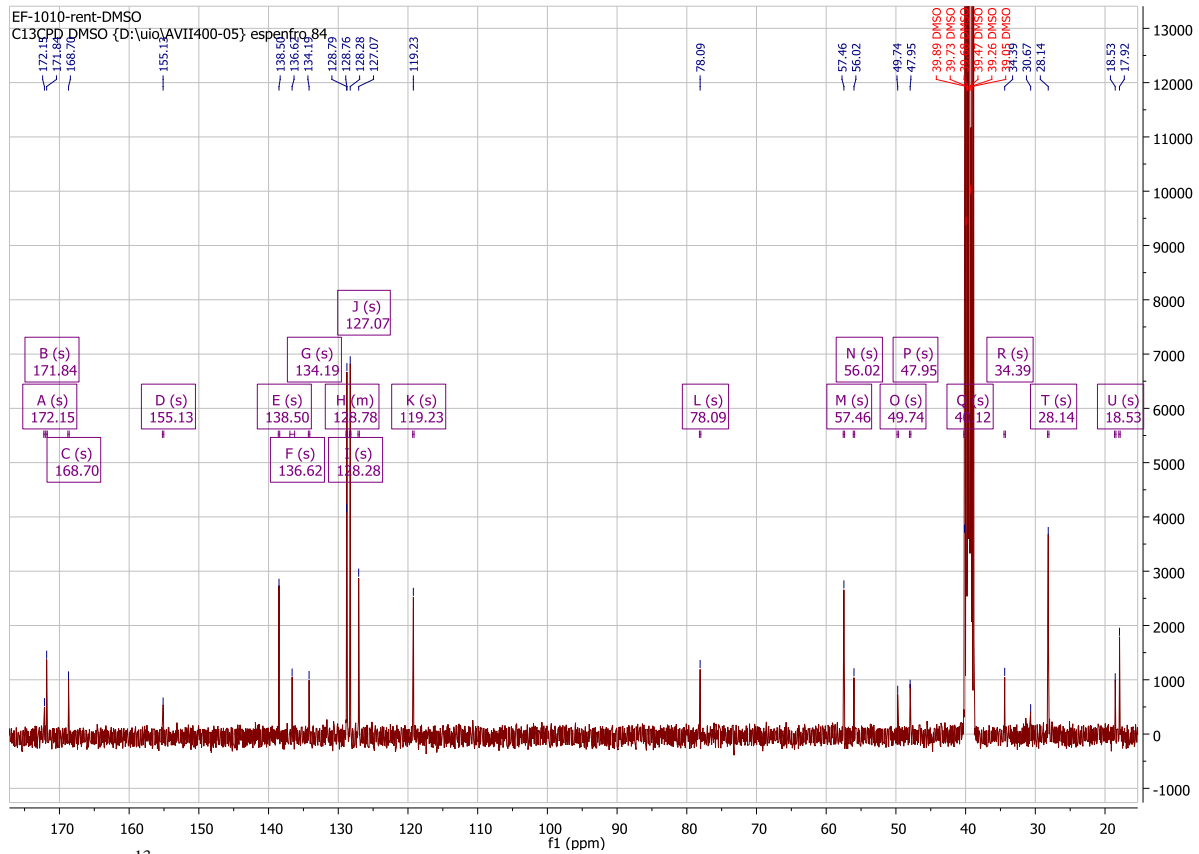
¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.15 (s), 171.84 (s), 168.70 (s), 155.13 (s), 138.50 (s), 136.62 (s), 134.19 (s), 128.89 – 128.66 (m), 128.28 (s), 127.07 (s), 119.23 (s), 78.09 (s), 57.46 (s), 56.02 (s), 49.74 (s), 47.95 (s), 40.12 (s), 34.39 (s), 28.14 (s), 18.53 (s), 17.92 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for C₃₅H₄₅N₅O₅ [M+H]⁺: 616.3498

Funnet: 616.3511

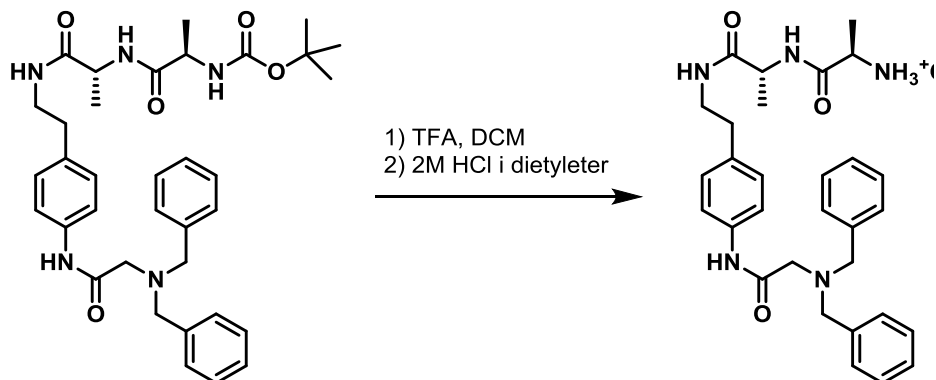


Figur 5.6.1 ¹H NMR Substans 6



Figur 5.6.2 ^{13}C NMR substans 6

5.7 Syntese av Målmolekyl-1



Kjemikalie	Mw	Tetthet	Mengde	mmol	eq
Substans 6	615,34	-	224 mg	0,36	1
Trifluoreddiksyre	114,02	1.489	2 mL	26,12	72

Posedyre

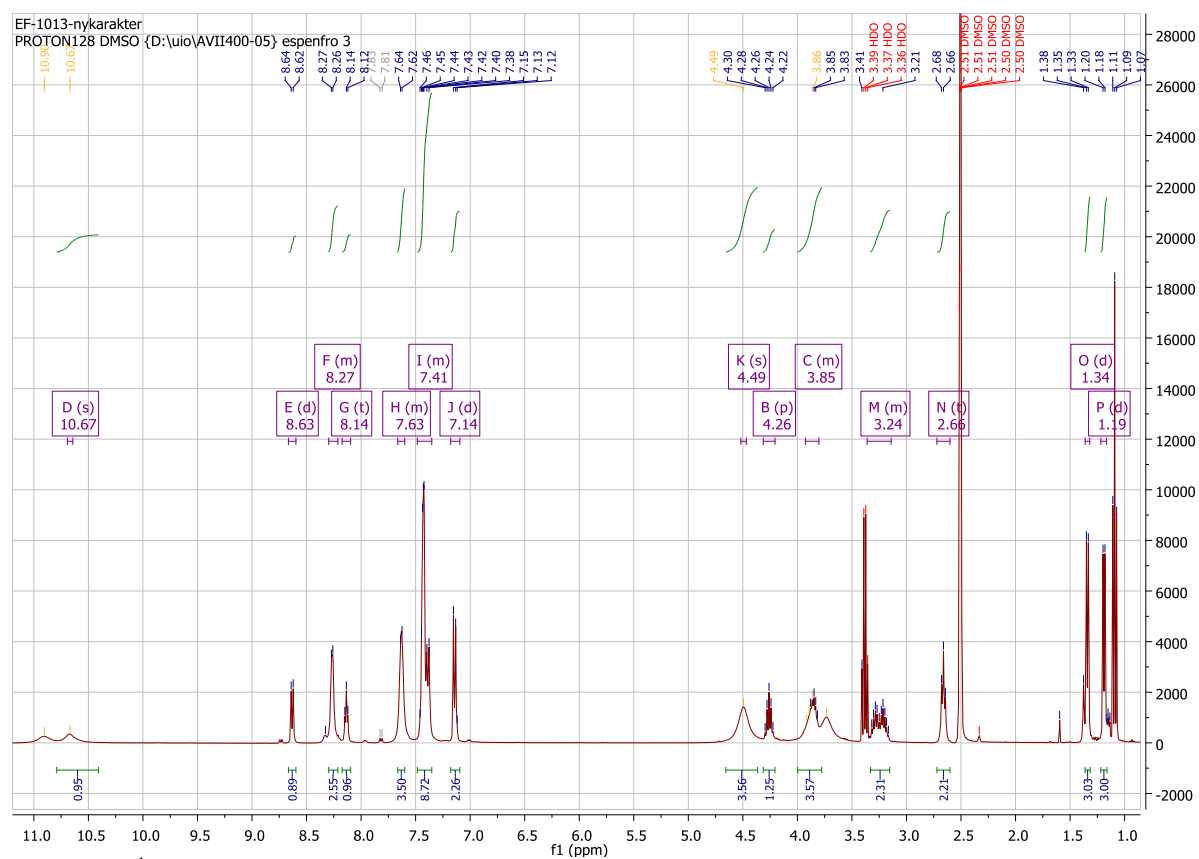
Substans **6** (224 mg, 0.36 mmol) ble løst i 25 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad under omrøring. Trifluoreddiksyre (2 mL, 26.13 mmol) ble løst i 25 mL diklormetan og tilsatt dråpevis over 5-10 minutters tid. Blandingen ble satt til omrøring i 1 time i romtemperatur. Løsningen ble så konsentrert under redusert trykk. Satt igjen med en lys olje. Oljen ble reløst i tørr diklormetan og tilsatt 2M HCl i dietyleter (2 mL). Det oppstod en utfelling. Utfellingen ble filtret og vasket med moderlut. Satt igjen med et hvitt pulver. Pulveret ble tørket over avsug og på høyvakumpumpe. Utbytte: 160 mg, 80 %

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.67 (s, 1H), 8.63 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.30 – 8.21 (m, 2H), 8.14 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 4H), 7.48 – 7.35 (m, 8H), 7.14 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.49 (s, 4H), 4.26 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 3.93 – 3.80 (m, 4H), 3.36 – 3.14 (m, 2H), 2.66 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.19 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

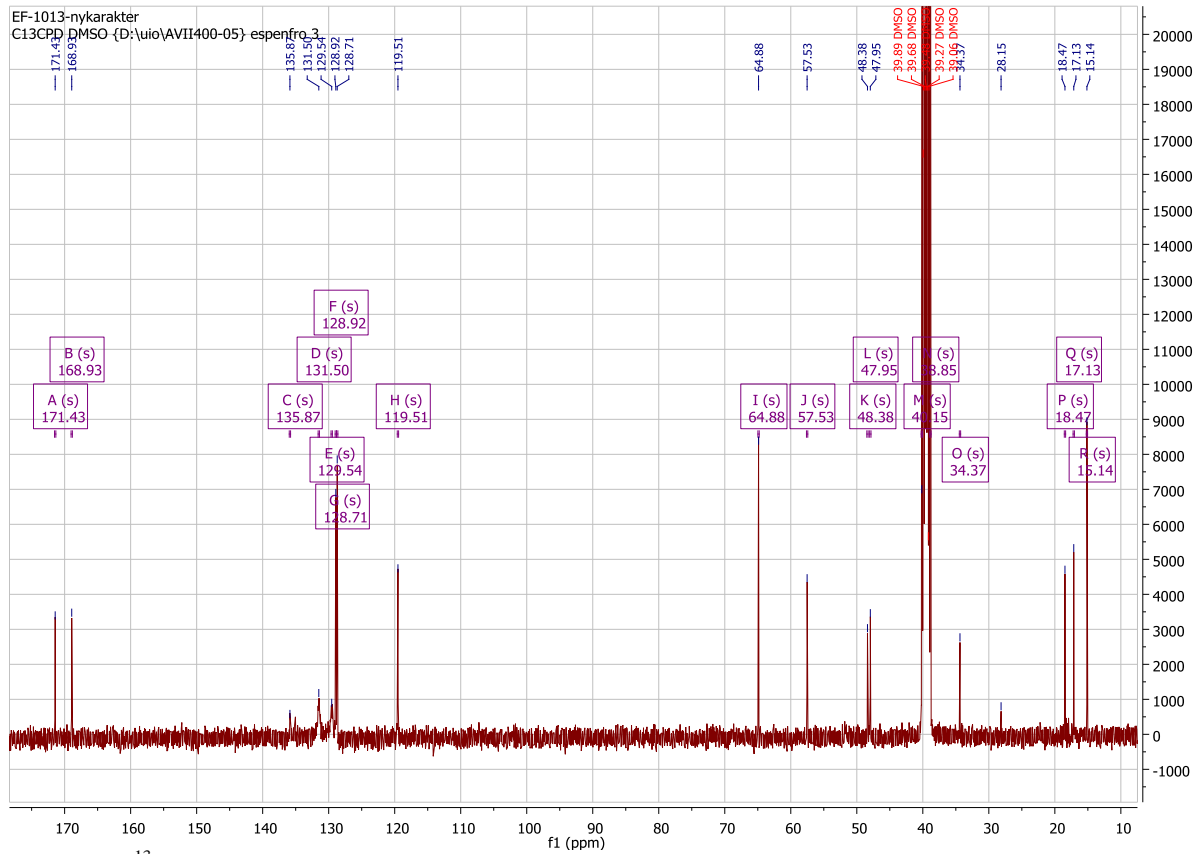
¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 171.43 (s), 168.93 (s), 135.87 (s), 131.50 (s), 129.54 (s), 128.92 (s), 128.71 (s), 119.51 (s), 64.88 (s), 57.53 (s), 48.38 (s), 47.95 (s), 40.15 (s), 38.85 (s), 34.37 (s), 18.47 (s), 17.13 (s), 15.14 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for C₃₀H₃₈N₅O₃ [M-Cl]⁺: 516.2974

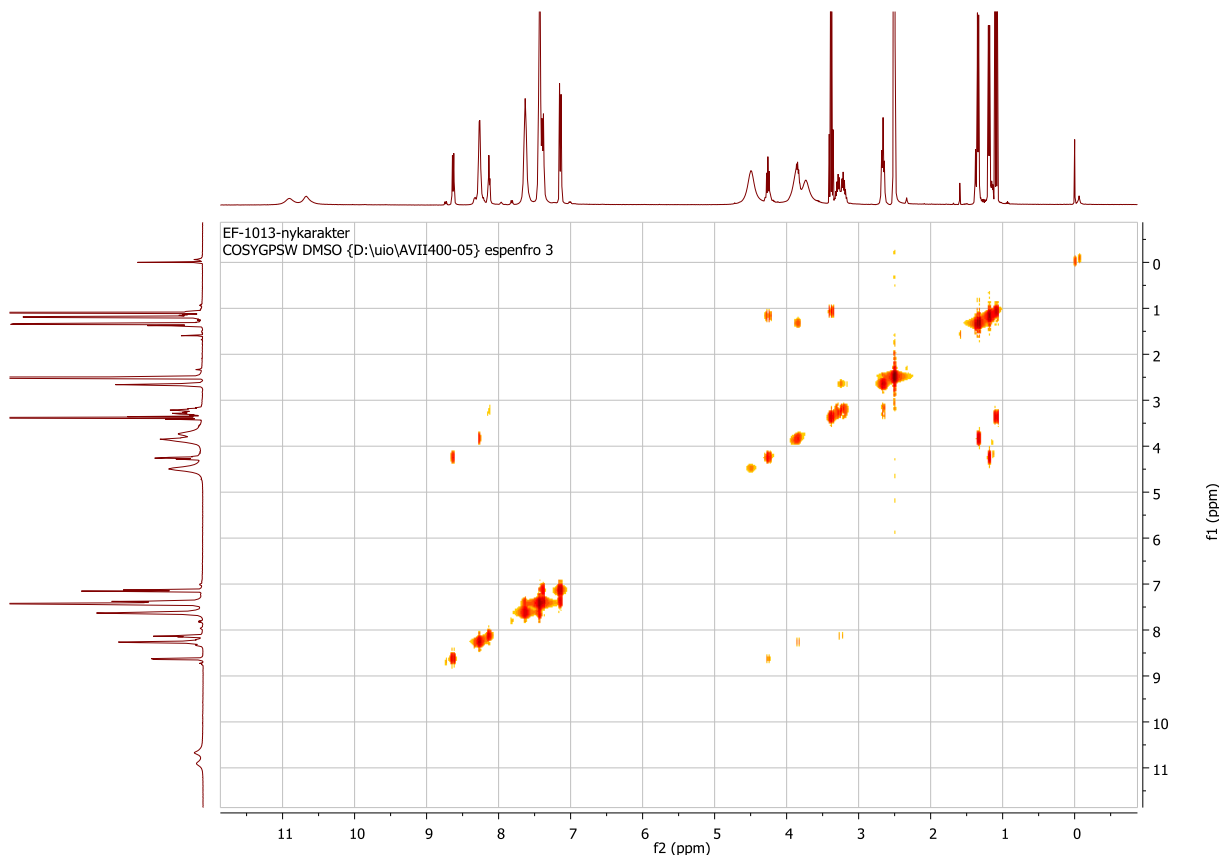
Funnet: 516.2985



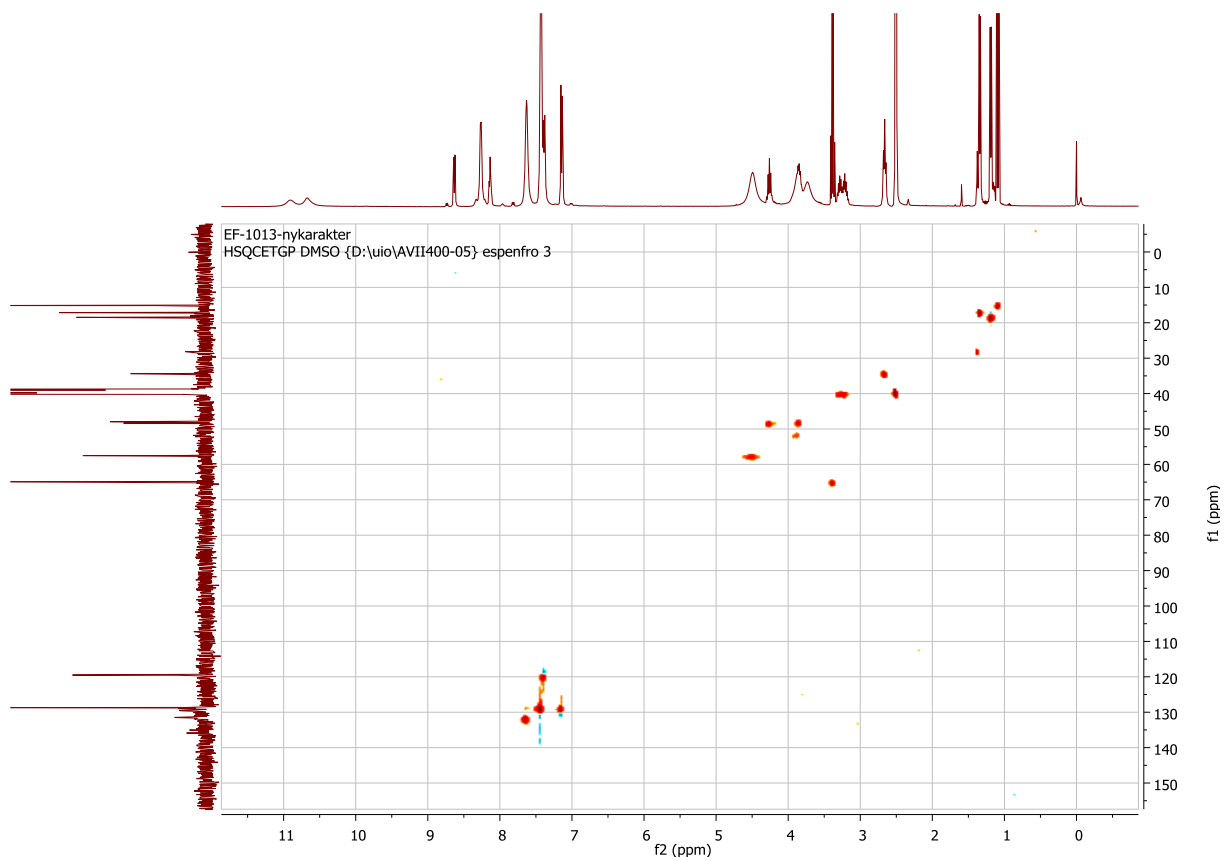
Figur 5.7.1 ¹H NMR Målmolekyl- 1



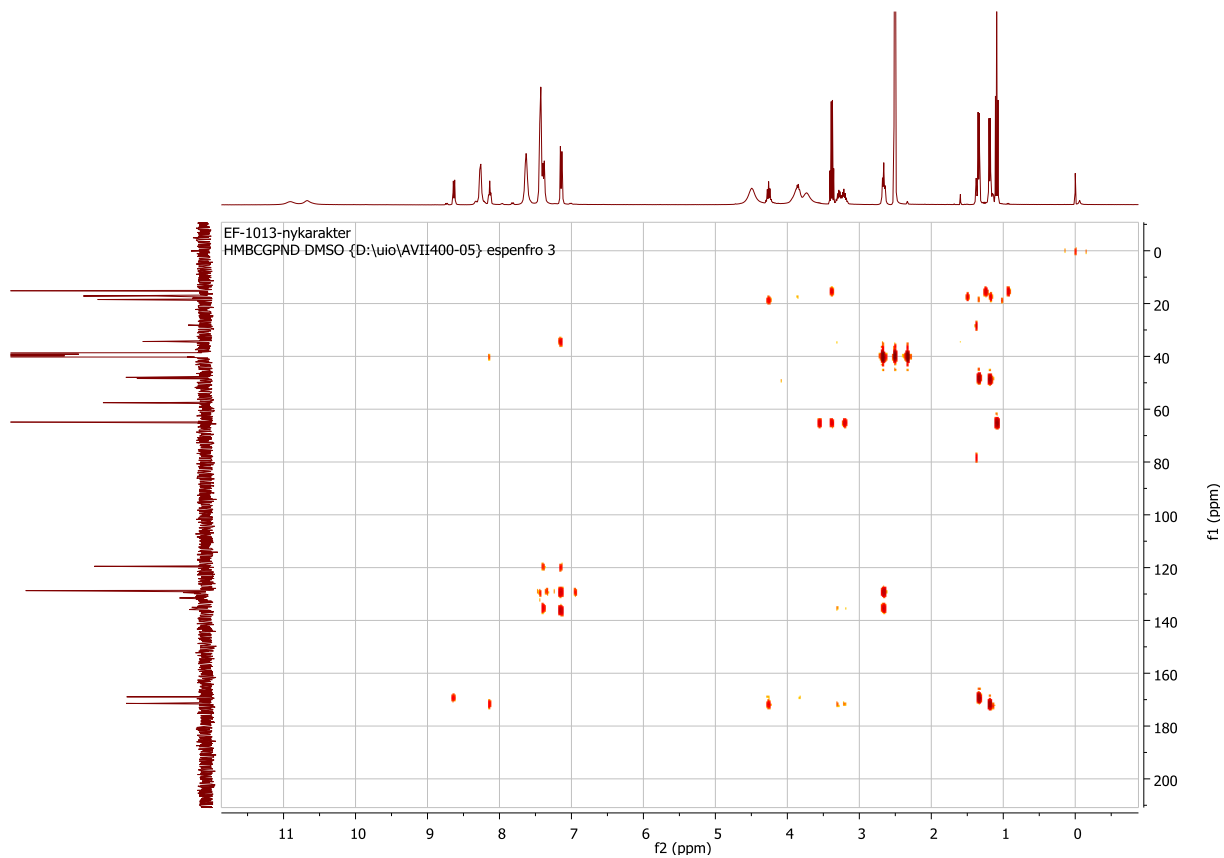
Figur 5.7.2 ^{13}C NMR Målmolekyl- 1



Figur 5.7.3 COSY Målmolekyl-1

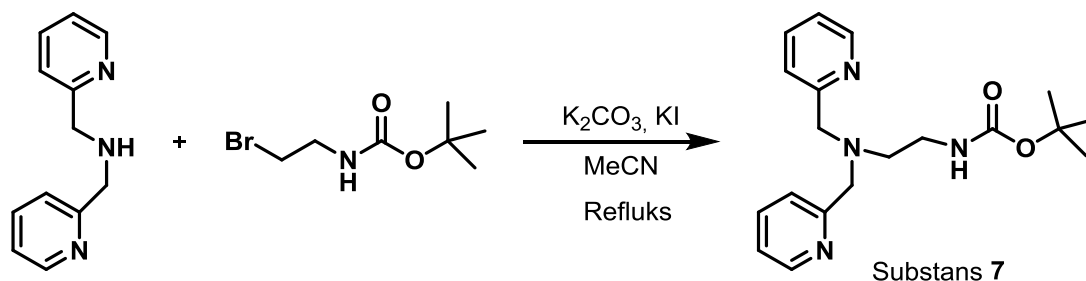


Figur 5.7.4 HSQC Målmolekyl-1



Figur 5.7.5 HMBC Målmolekyl-1

5.8 Syntese av 7



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
2-(Boc-amino)etyl bromid	223.67		5.643 g	25.23	1.0
Di-(2-picolyl)amin	199.25	1.107	5.5 mL	30.55	1.2
K_2CO_3	138.21		5.574 g	40.33	1.6
KI	166.01		2.549 g	15.35	0.6

Prosedyre

2-(Boc-amino)ethyl bromid (5,643 g, 25,23 mmol) ble løst i 100 mL MeCN og K_2CO_3 (5,574 g, 40,33 mmol) og KI (2,549 g, 15,35 mmol) ble tilsatt. Blandingen ble satt til omrøring under nitrogengass. Dipicolylamin (5,5 mL, 30,55 mmol) ble tilsatt og reaksjonen varmet opp til reflux over helgen. Reaksjonen ble så kjølt ned til romtemperatur. Blandingen hadde fått en dyp rødfarge. Blandingen ble filtrert og filtratet ble vasket med dietyler. Løsningen ble konsentrert under redusert trykk. Etter oppkonsentrering var råproduktet en rød olje, denne ble reløst i 100 mL diklormetan og ekstrahert med 3 x 100 mL 2M NaOH. Den organiske fasen ble tørket over K_2CO_3 . TLC viste ønsket stoff med R_f 0,75 og utgangsstoff med R_f 0,23 på nøytral alumina TLC plate med 5 % MeOH i diklormetan. Råproduktet ble rensert opp ved hjelp av flashkromatografi. Nøytral alumina ble benyttet som stasjonærfase og 1 % MeOH i diklormetan ble benyttet som eluent. Dette ga en gul olje.

Utbytte: 4,67 g, 54 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.56 – 8.50 (m, 2H), 7.67 – 7.55 (m, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 2H), 5.82 (s, 1H), 3.85 (s, 4H), 3.21 (m, 2H), 2.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.69, 156.54, 149.46, 136.78, 123.40, 122.40, 79.02, 60.58, 53.88, 38.91, 28.88.

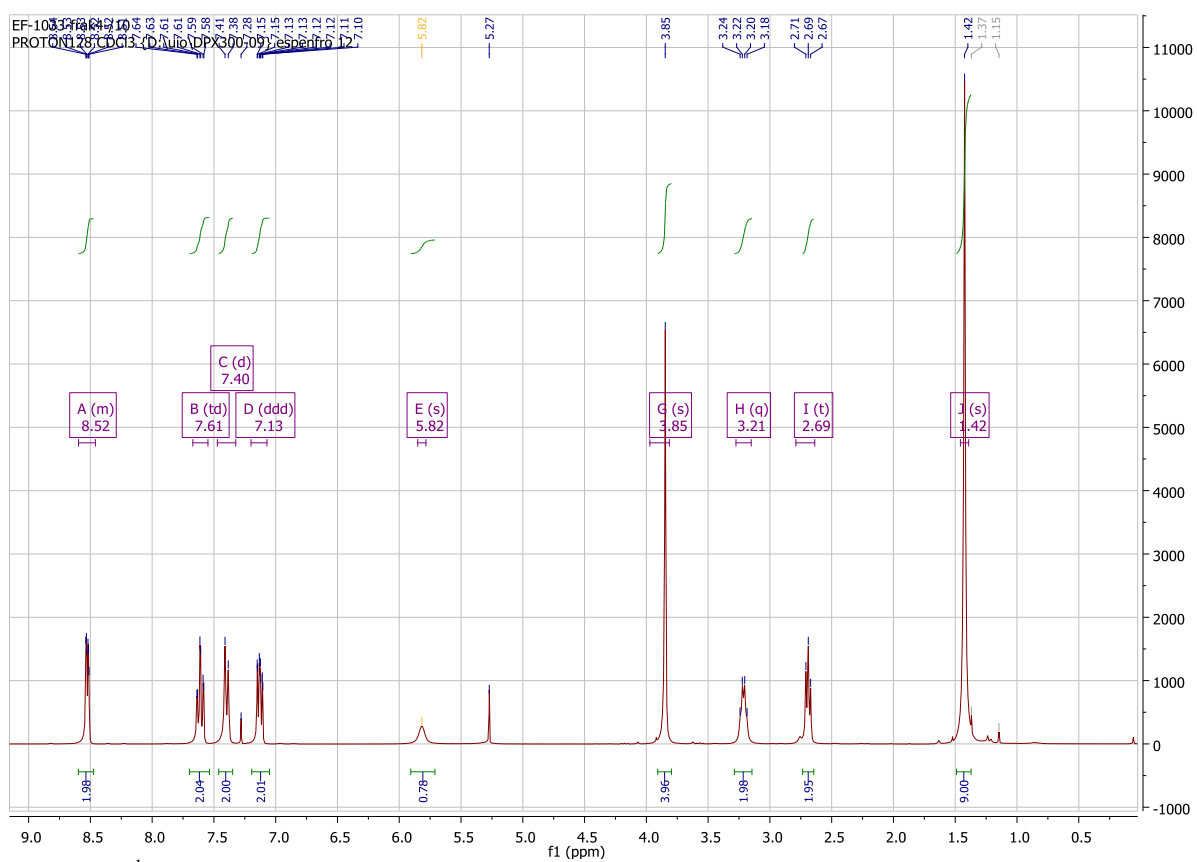
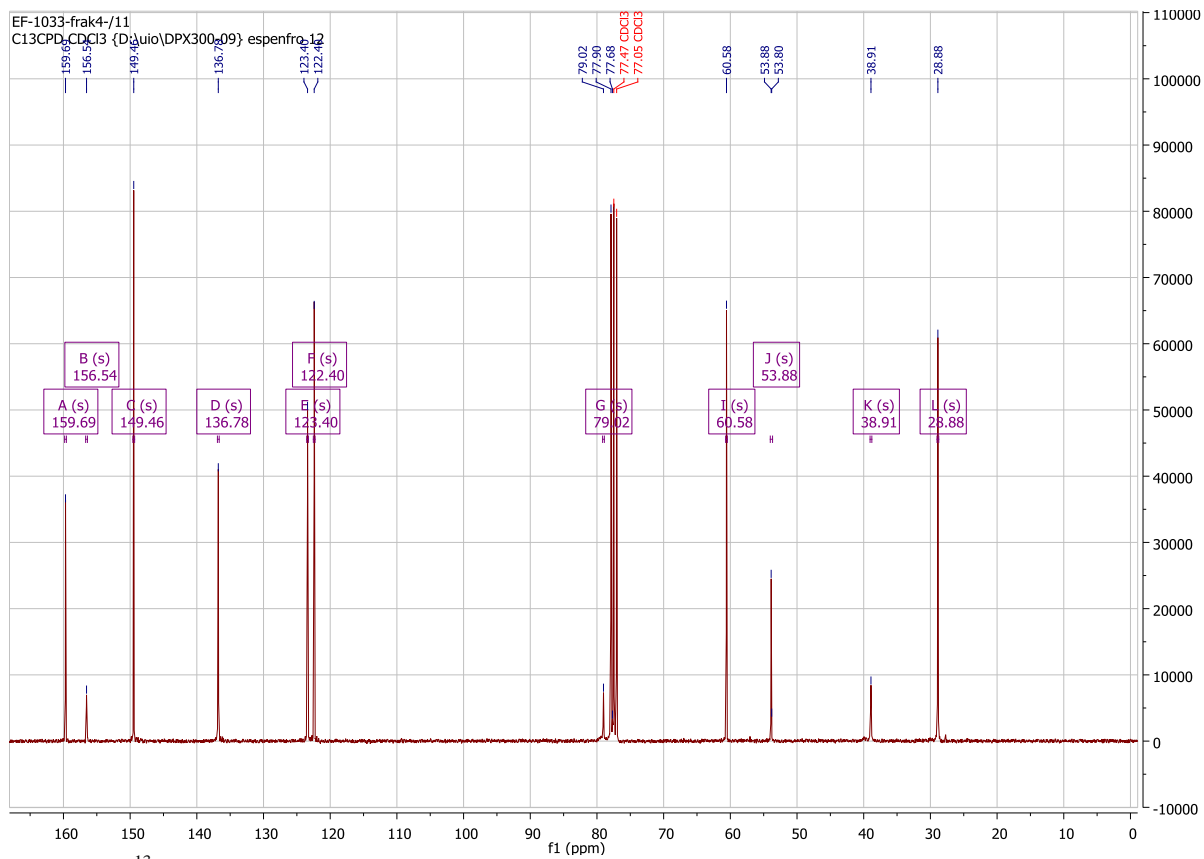
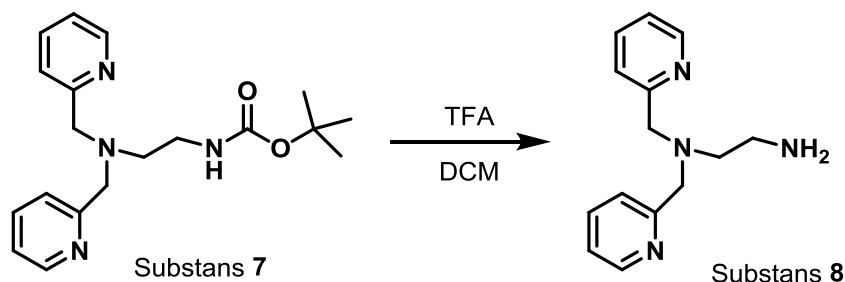


Figure 5.8.1 ¹H NMR Substans 7



Figur 5.8.2 ^{13}C NMR Substans 7

5.9 Syntese av 8



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 7	342.21		833 mg	2.43	1
Trifluoreddiksyre	114.02	1.489	11 mL	143.65	59

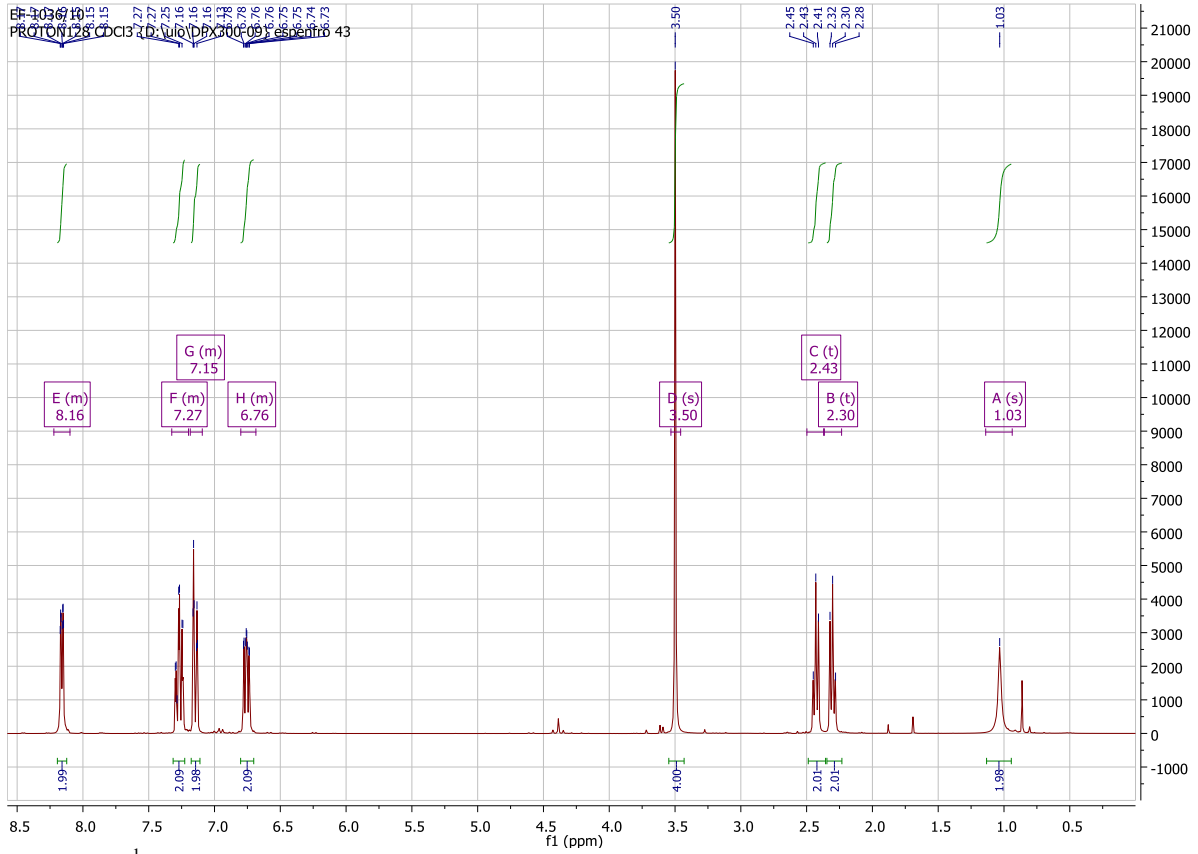
Prosedyre

Substans 7 (833 mg, 2,43 mmol) ble løst i 50 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad. Trifluoreddiksyre ble fortynnet med 25 mL diklormetan og ble tilsatt reaksjonen dråpevis under omrøring. Etter tilsetning sto reaksjonen på omrøring i 30 min på isbad og 2,5 time i romtemperatur. Løsningen ble så konsentrert under redusert trykk. Den gulaktige oljen ble reløst i 50 mL 1M NaOH. Etter reløsingen hadde løsningen pH 14. Vannfasen ble ekstrahert med 3 x 50 mL diklormetan. De samlede organiske fasene ble tørket over K₂CO₃, filtret og konsentrert under redusert trykk.

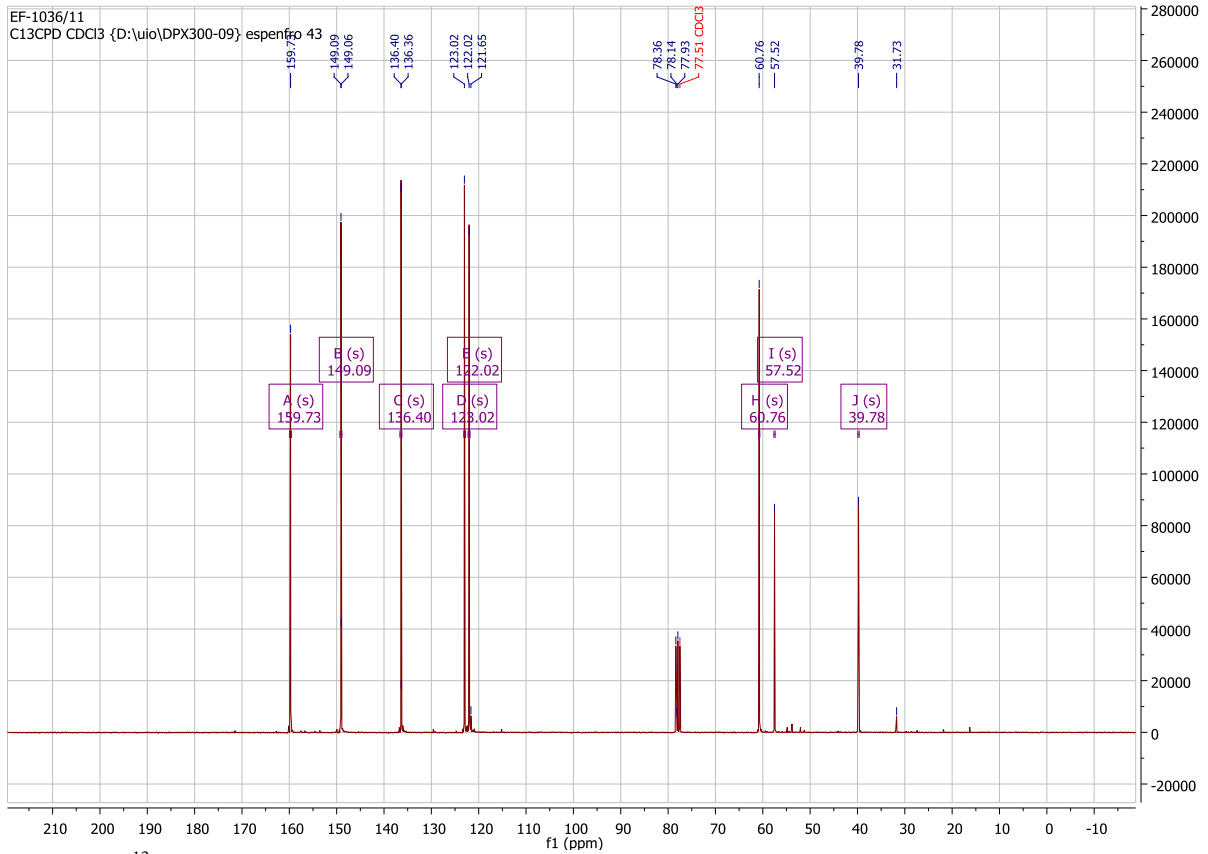
Utbytte 500 mg, 85 %

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.22 – 8.10 (m, 2H), 7.32 – 7.20 (m, 2H), 7.18 – 7.09 (m, 2H), 6.80 – 6.69 (m, 2H), 3.50 (s, 4H), 2.43 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.03 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.73 (s), 149.09 (s), 136.40 (s), 123.02 (s), 122.02 (s), 60.76 (s), 57.52 (s), 39.78 (s).

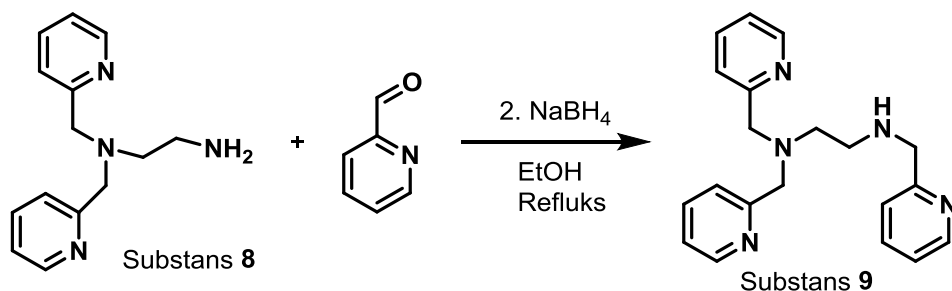


Figur 5.9.1 ^1H NMR Substans 8



Figur 5.9.2 ^{13}C NMR Substans 8

5.10 Syntese av 9



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 8	242.33		500 mg	2.06	1
2-Pyridincarboxaldehyd	107.11	1.126	196 µL	2.06	1
NaBH ₄	37.83		243 mg	6.42	3

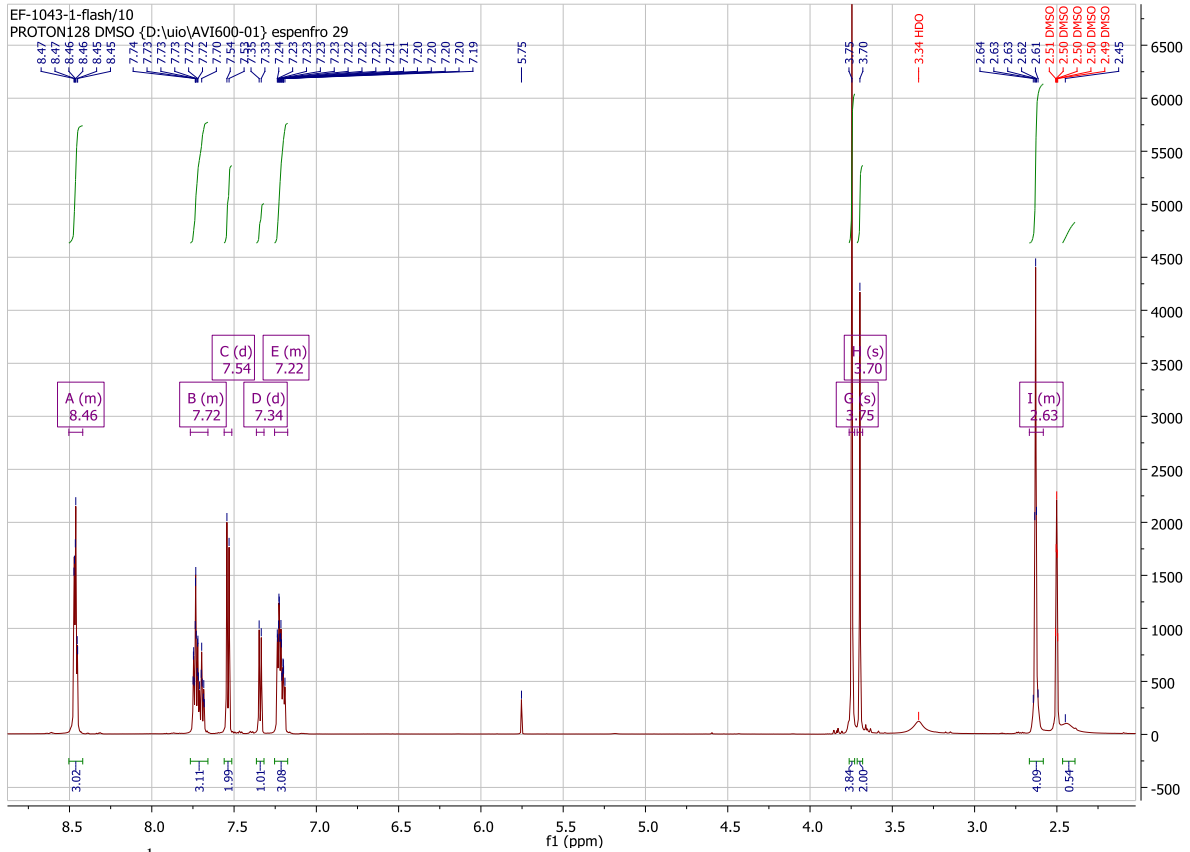
Prosedyre

Substans 8 (500 mg, 2,06 mmol) ble løst i 10 mL absolutt etanol. 2-Pyridincarboxaldehyd (196 µL, 2,06 mmol) ble tilsatt sammen med kjemiske sives 3 Å. Dette ble satt på omrøring under nitrogenpass. Reaksjonen ble varmet til refluks i 1,5-2 timer, for så bli kjølt ned til romtemperatur. NaBH₄ (243 mg, 6,42 mmol) og ytterligere 4 mL absolutt etanol ble tilsatt. Gass ble tatt av og reaksjonen sto på omrøring i romtemperatur over natten. Reaksjonen ble så forsøkt filtrert og konsentrert under redusert trykk. Massen ble reløst i 25 mL diklormetan og ekstrahert med 3 x 25 mL 1 M NaOH. Ønsket substans har R_f-verdi på 0,52 når man benytter nøytral alumina TLC og eluent 5 % MeOH i diklormetan. TLC viser at det er andre substanser i råproduktet med høyere og lavere R_f verdi. Råproduktet ble opparbeidet videre ved flashkromatografi hvor nøytral alumina ble benyttet som stasjonærfase og 1-5 % MeOH i diklormetan som eluent. Satt igjen med en lys gul olje.

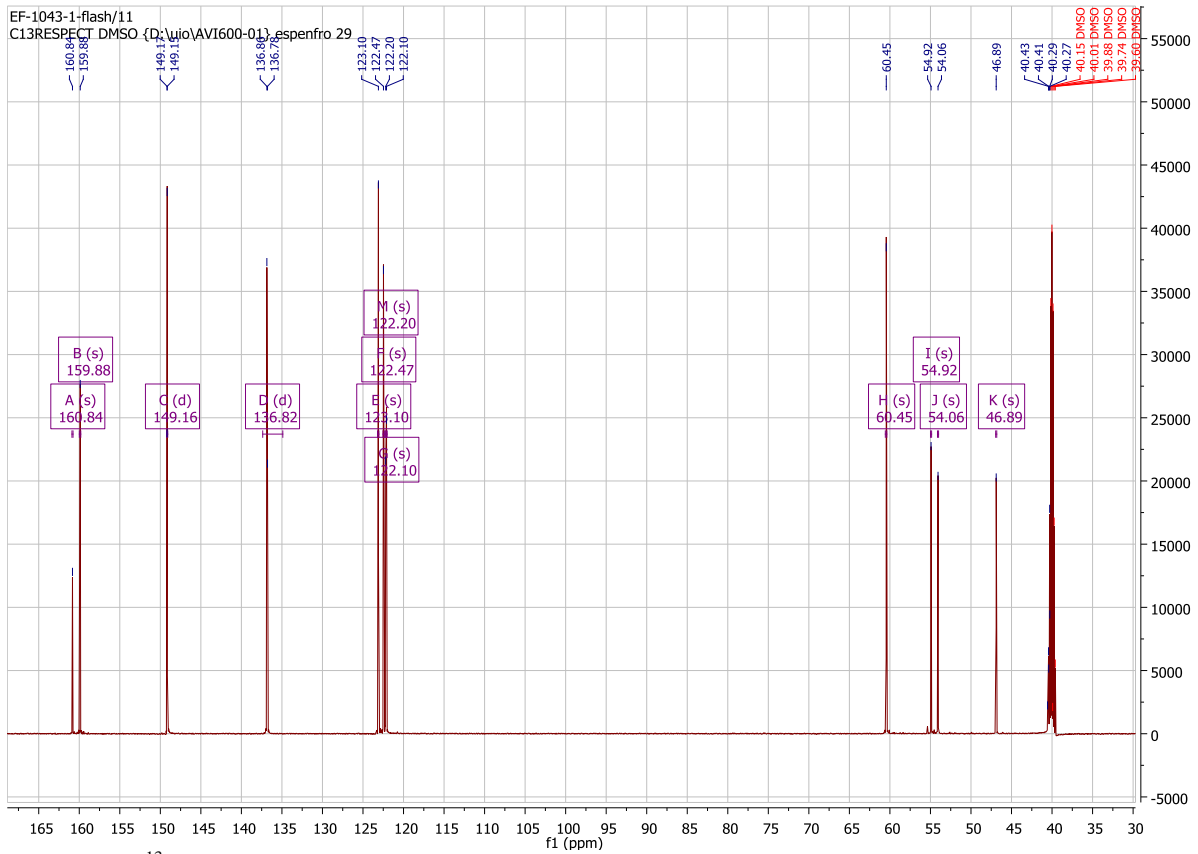
Utbytte: 315 mg, 46 %

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.50 – 8.42 (m, 3H), 7.77 – 7.66 (m, 3H), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.25 – 7.17 (m, 3H), 3.75 (s, 4H), 3.70 (s, 2H), 2.67 – 2.58 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 160.84 (s), 159.88 (s), 149.16 (d, *J* = 3.2 Hz), 136.82 (d, *J* = 12.1 Hz), 123.10 (s), 122.47 (s), 122.20 (s), 122.10 (s), 60.45 (s), 54.92 (s), 54.06 (s), 46.89 (s).

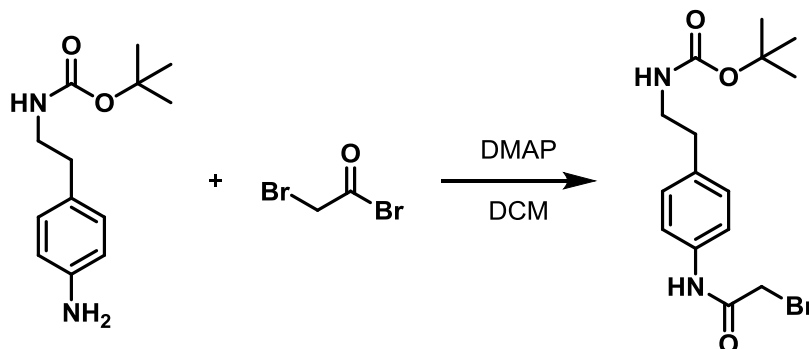


Figur 5.10.1 ¹H NMR Substans 9



Figur 5.10.2 ¹³C NMR Substans 9

5.11 Syntese av 10



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 1	236.32		3.185 g	13.48	1
Bromoacetylbromid	201.84	2.317	1.23 mL	14.12	1.05
DMAP	122.17		2.667 g	21.83	1.62

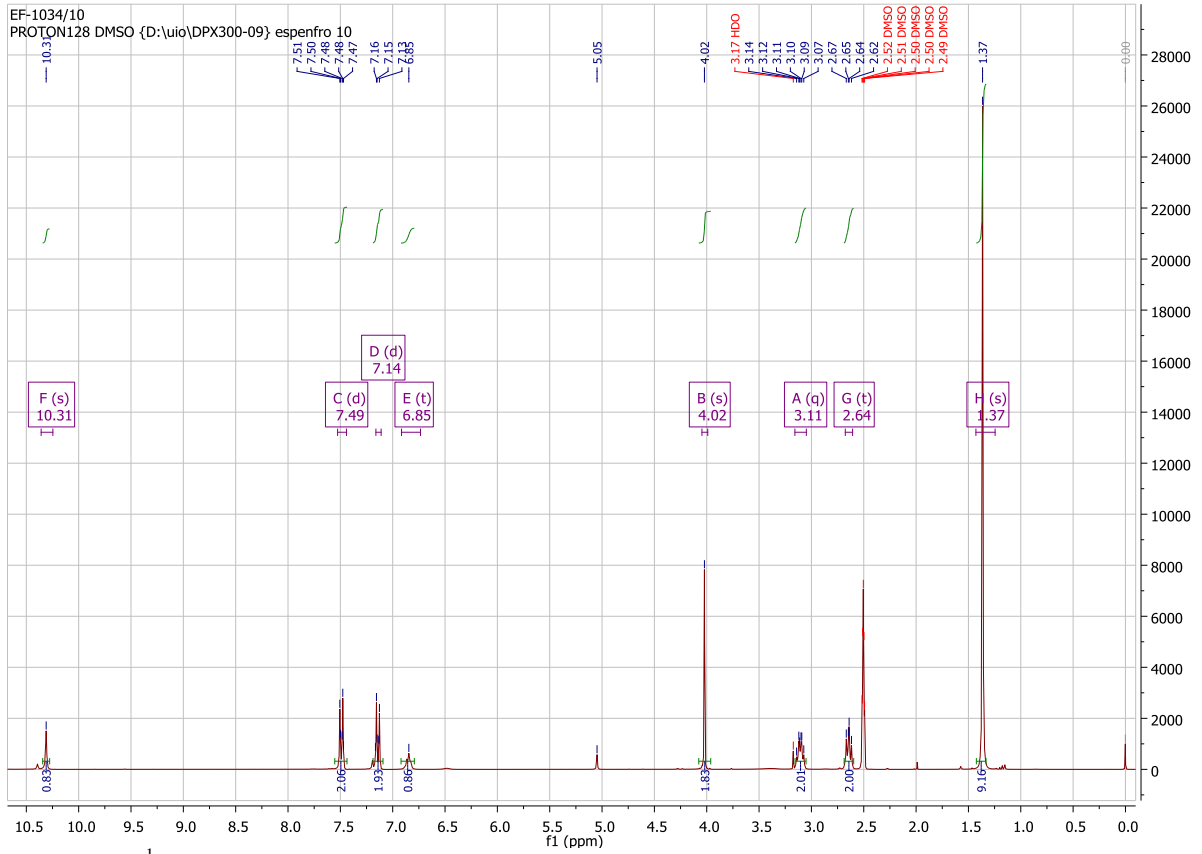
Prosedyre

Substans 1 (3.185 g, 13.48 mmol) ble løst i 160 mL diklormetan og kjølt ned til 0 °C på isbad. DMAP (2.667 g, 21.83 mmol) ble tilsatt, alt på en gang. Bromoacetylbromid (1.23 mL, 14.12 mmol) ble løst i 60 mL diklormetan og tilsatt dråpevis, 10 minutter etter DMAP var tilsatt. Reaksjonen sto til omrøring på isbad i 30 minutter og i romtemperatur i 1 time. Reaksjonen ble så dampet av. Satt igjen med lys-oransje skumaktig masse. Det ble tatt TLC av råproduktet. TLC viste tilfredsstillende forskjell i retensjon med eluentsystemet etylacetat 75 % og heptan 25 %. Råproduktet ble opparbeidet videre ved hjelp av flashkromatografi. Silikagel ble benyttet som stasjonærfase og eluentsystemet etylacetat 75 % heptan 25 % ble benyttet. Satt igjen med hvitt pulver. Utbytte 2 g, 43 %

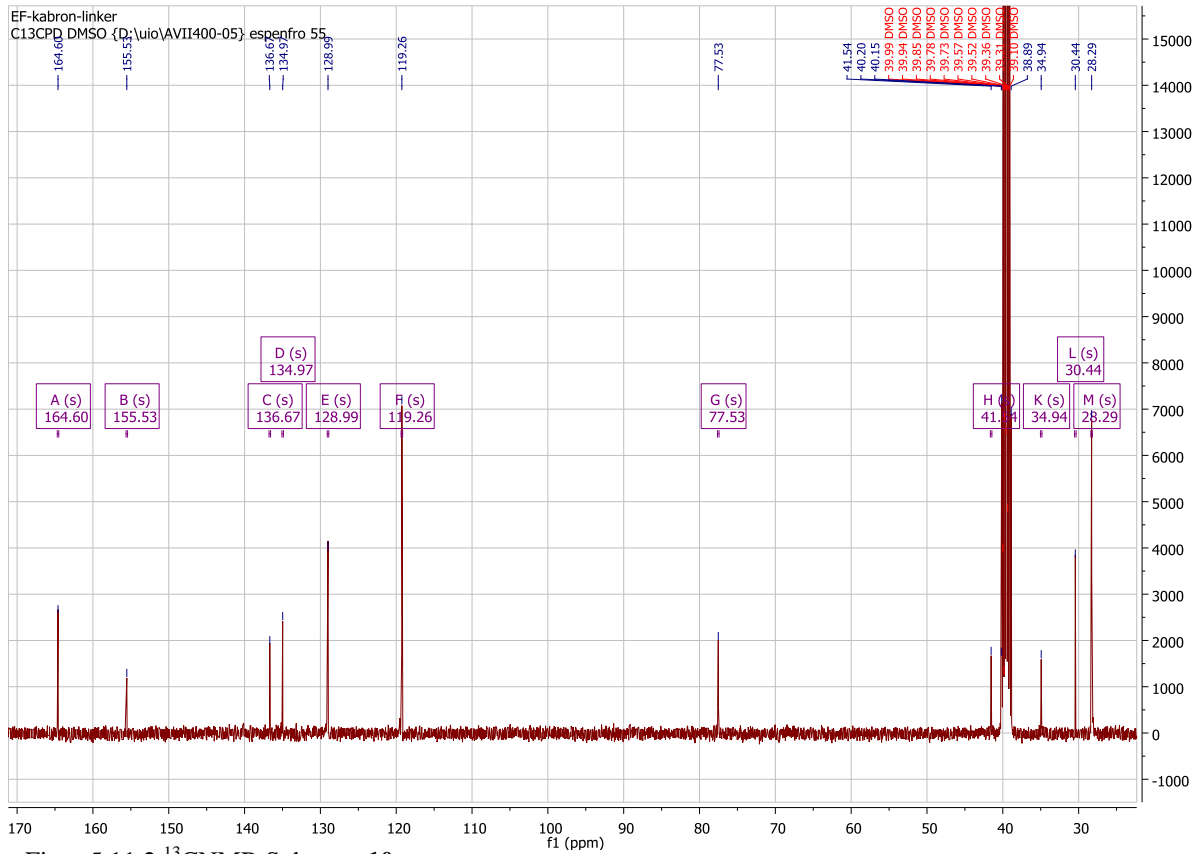
Kommentar: Pulveret som var igjen etter flash hadde et gulaktig skjær i seg. Det ble forsøkt vasket med metanol men god hell. Det kan være det holder å vaske råproduktet med metanol istedenfor flashkromatografi.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.31 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.85 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.11 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.60 (s), 155.53 (s), 136.67 (s), 134.97 (s), 128.99 (s), 119.26 (s), 77.53 (s), 41.54 (s), 34.94 (s), 30.44 (s), 28.29 (s).

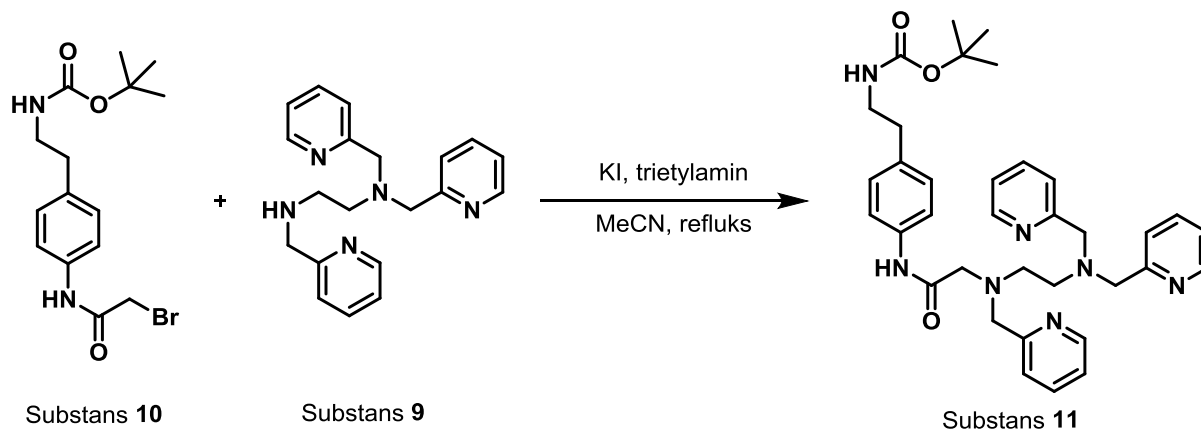


Figur 5.11.1 ¹H NMR Substans 10



Figur 5.11.2 ¹³C NMR Substans 10

5.12 Syntese av 11



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 9	333.44		315 mg	0.945	1.00
Substans 10	357.25		387 mg	1.083	1.15
KI	166.01		187 mg	1.126	1.20
Trietylamin	101.14	0.726	1.32 mL	9.47	10

Prosedyre

Substans 9 (315 mg, 0.945 mmol) og Substans 10 (387mg, 1.083 mmol) ble løst i 300 mL MeCN og satt til omrøring. KI (187 mg, 1.126 mmol) og trietylamin (1.32 mL, 9.47 mmol) ble tilsatt og løst. Reaksjonen ble varmet opp til reflux og sto over natten. Reaksjonen ble så kjølt ned til romtemperatur og konsentrert under redusert trykk. Massen ble reløst i etylacetat og ekstrahert med 1M K₂CO₃. Den organiske fasen ble tørket over K₂CO₃. Råproduktet var grønnaktig. Det ble opparbeidet videre ved flash kromatografi. Det ble benyttet nøytral alumina som stasjonærfase og eluentsystemet som ble benyttet var 0-5 % MeOH i diklormetan.

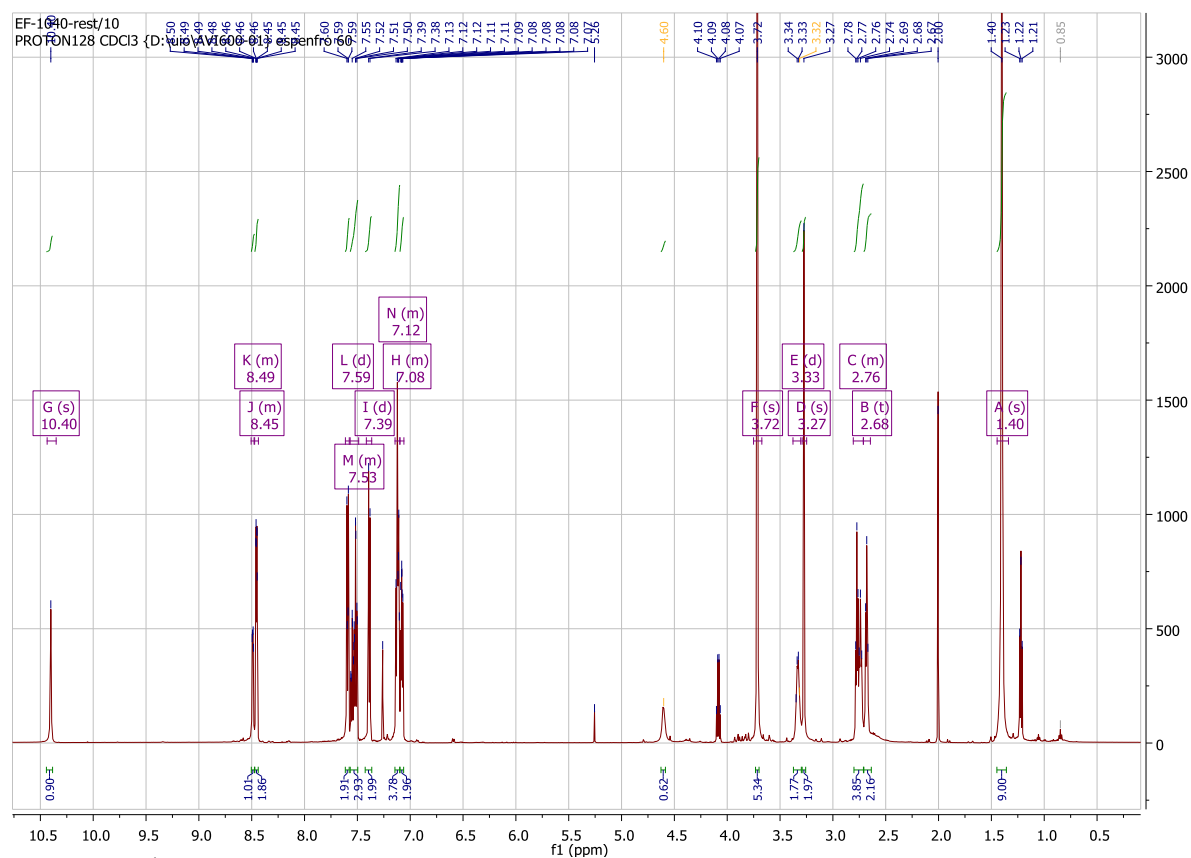
Utbytte: 155 mg, 27 %

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.40 (s, 1H), 8.51 – 8.48 (m, 1H), 8.47 – 8.44 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.57 – 7.49 (m, 3H), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.14 – 7.10 (m, 4H), 7.10 – 7.06 (m, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.81 – 2.71 (m, 4H), 2.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.40 (s, 9H).

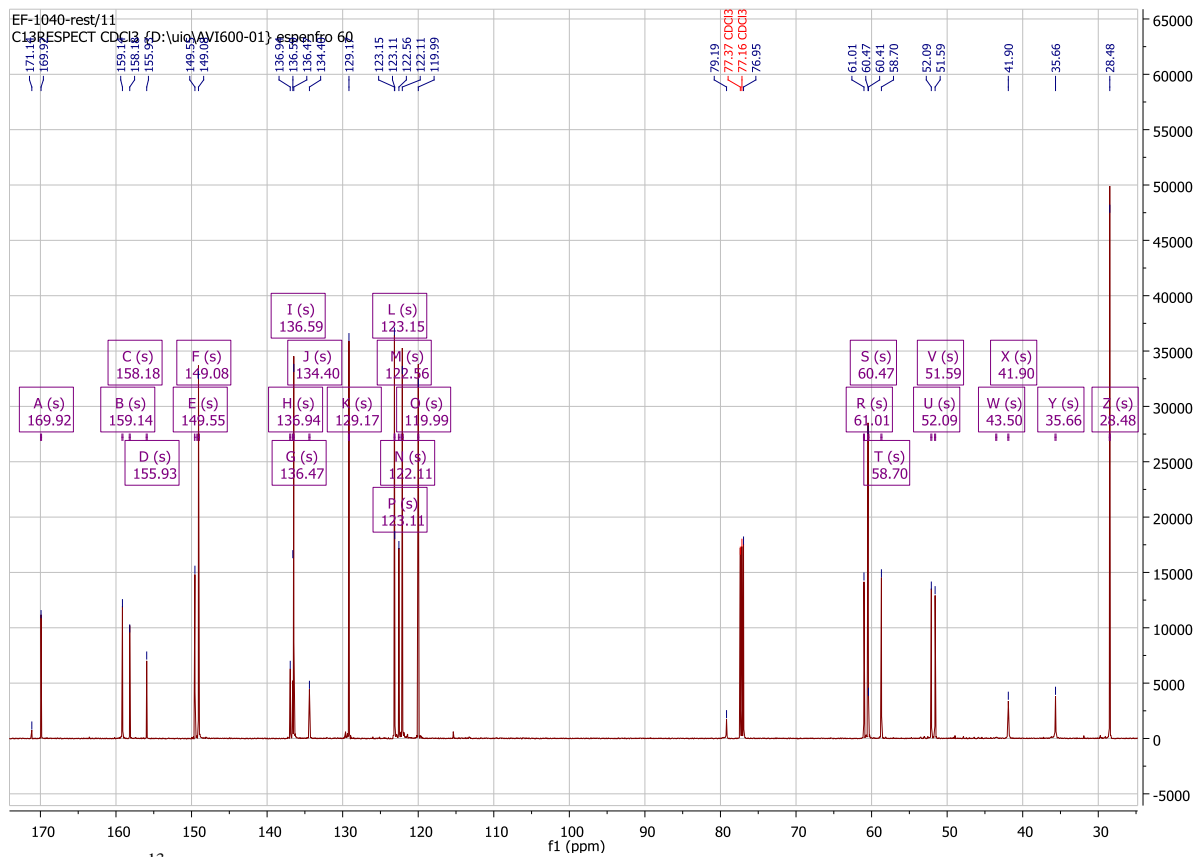
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 169.92 (s), 159.14 (s), 158.18 (s), 155.93 (s), 149.55 (s), 149.08 (s), 136.94 (s), 136.59 (s), 136.47 (s), 134.40 (s), 129.17 (s), 123.15 (s), 123.11 (s), 122.56 (s), 122.11 (s), 119.99 (s), 61.01 (s), 60.47 (s), 58.70 (s), 52.09 (s), 51.59 (s), 43.50 (s), 41.90 (s), 35.66 (s), 28.48 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 610.3505

Funnet: 610.3511

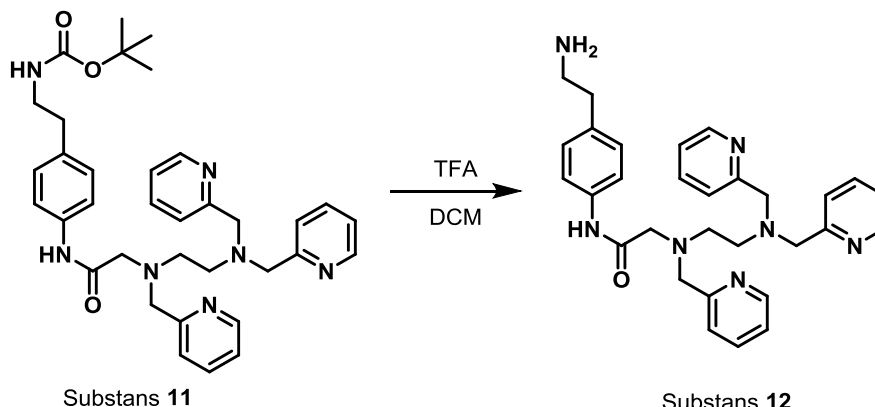


Figur 5.12.1 ^1H NMR Substans **11**



Figur 5.12.2 ¹³C NMR Substans 11

5.13 Syntese av 12



Kjemikalie	Mw	d	Mengde	mmol	eq
Substans 11	609.78	-	135 mg	0.221	1
Trifluoreddiksyre	114.01	1.489	1 mL	13.06	59

Prosedyre

Substans **11** (135 mg, 0.221 mmol) ble løst i 10 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad. Trifluoreddiksyre (1 mL, 13.06 mmol) ble fortynnet i 10 mL diklormetan og tilsatt dråpevis under kraftig omrøring. Reaksjonen sto til omrøring i romtemperatur i 2 timer. Løsningen ble så konsentrert under redusert trykk og reløst i 20 mL diklormetan. Løsningen ble ekstrahert med 3 x 20 mL 1 M K₂CO₃. Den organiske fasen ble tørket over K₂CO₃ og konsentrert under redusert trykk. Satt igjen med en grønnaktig olje.

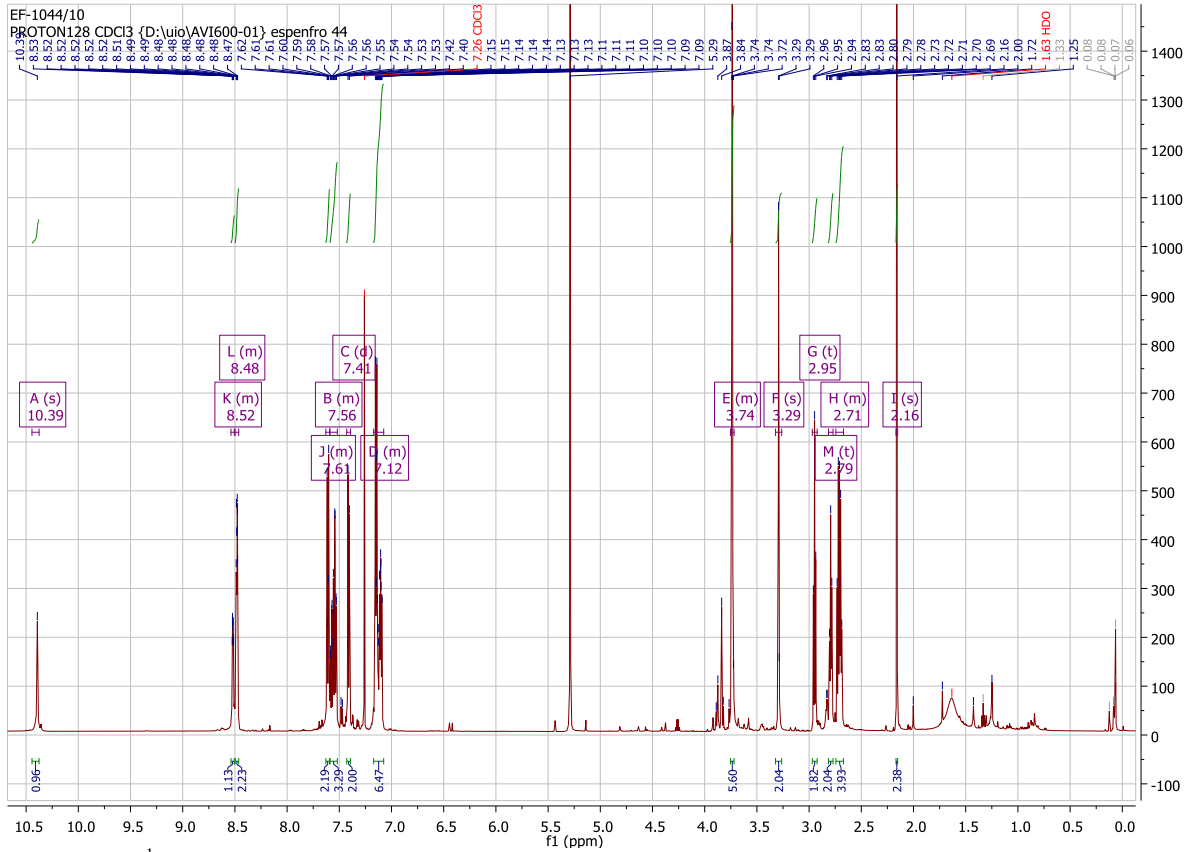
Utbytte: 70 mg, 62 %

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.39 (s, 1H), 8.54 – 8.51 (m, 1H), 8.50 – 8.46 (m, 2H), 7.63 – 7.59 (m, 2H), 7.59 – 7.52 (m, 3H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.17 – 7.07 (m, 6H), 3.75 – 3.72 (m, 6H), 3.29 (s, 2H), 2.95 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.74 – 2.67 (m, 4H), 2.16 (s, 2H).

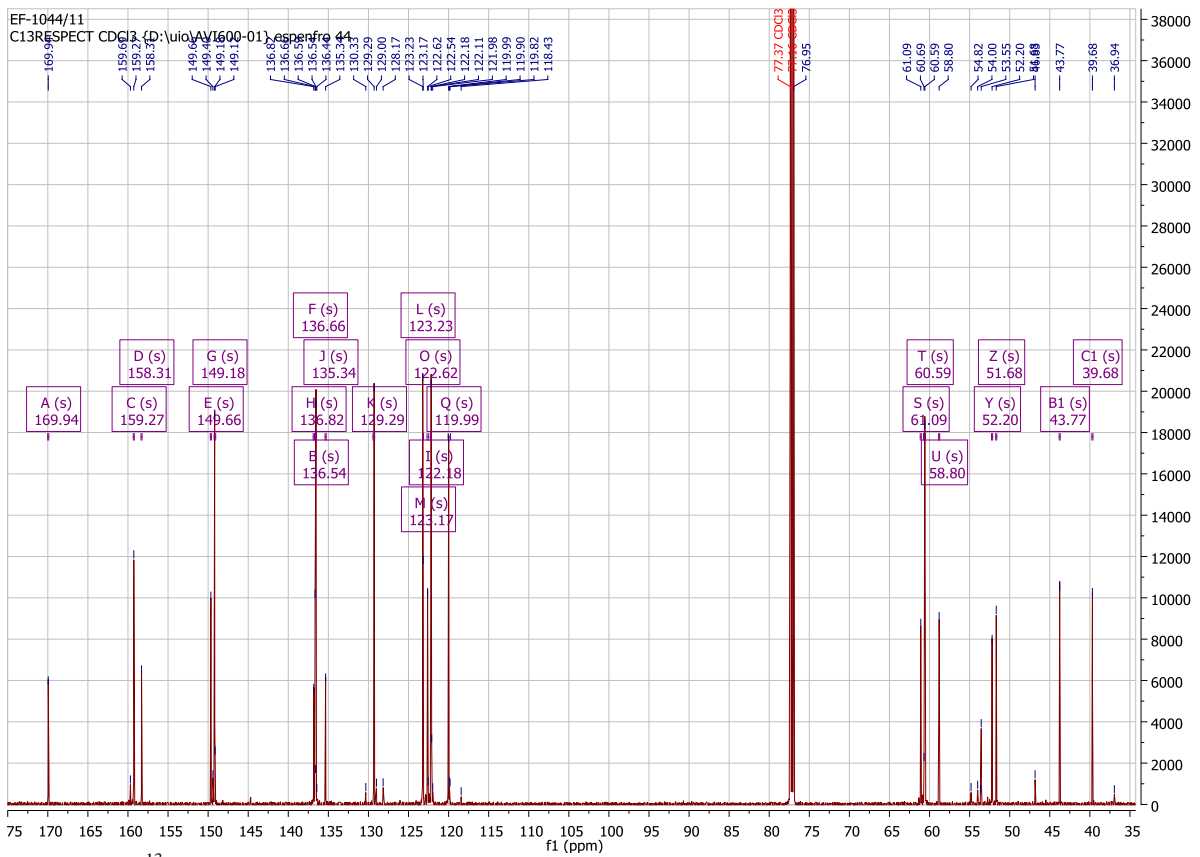
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 169.94 (s), 159.27 (s), 158.31 (s), 149.66 (s), 149.18 (s), 136.82 (s), 136.66 (s), 136.54 (s), 135.34 (s), 129.29 (s), 123.23 (s), 123.17 (s), 122.62 (s), 122.18 (s), 119.99 (s), 61.09 (s), 60.59 (s), 58.80 (s), 52.20 (s), 51.68 (s), 43.77 (s), 39.68 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for C₃₀H₃₅N₇O [M+H]⁺: 510.2981

Funnet: 510.2987

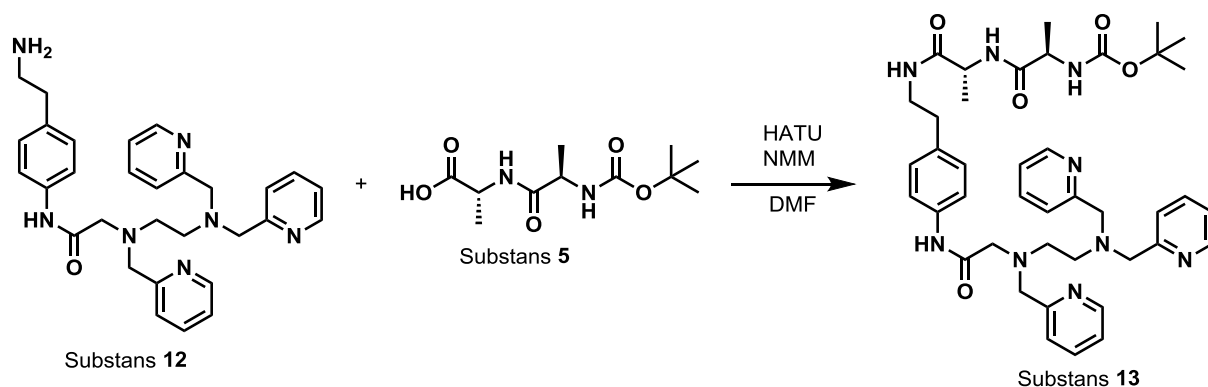


Figur 5.13.1 ¹H NMR Substans 12



Figur 5.13.2 ¹³C NMR Substans 12

5.14 Syntese av 13



Kjemikalie	Mw	d(g/mL)	Mengde	mmol	eq
Substans 12	509.66	-	70 mg	0.137	1
Substans 5	260.29	-	37 mg	0.142	1.04
HATU	380.23	-	88 mg	0.231	1.69
NMM	101.18	0.918	20 μ L	0.181	1.32

Substans **12** (70 mg, 0.137 mmol) ble løst i 1 mL DMF og kjølt ned mot 0 °C på isbad. Substans **5** (37 mg, 0.142 mmol), HATU (88 mg, 0.231 mmol) og NMM (20 μ L, 0.181 mmol) ble tilsatt og løst. Reaksjonen sto på isbad i 30 minutter og i romtemperatur over natten. Løsningen ble så fortynnet med 200 mL 1M K₂CO₃. Den fortynnede løsningen ble ekstrahert med 1 x 30 mL og 4 x 20 mL etylacetat. De samlede organiske fasene ble tørket over K₂CO₃ konsentrert under redusert trykk. Råproduktet ble så opparbeidet ved hjelp av flash-kromatografi. Det ble benyttet nøytral alumina som stasjonærfase og 0 - 5 % MeOH i diklormetan. Satt igjen med en grønn gul oljeaktig masse.

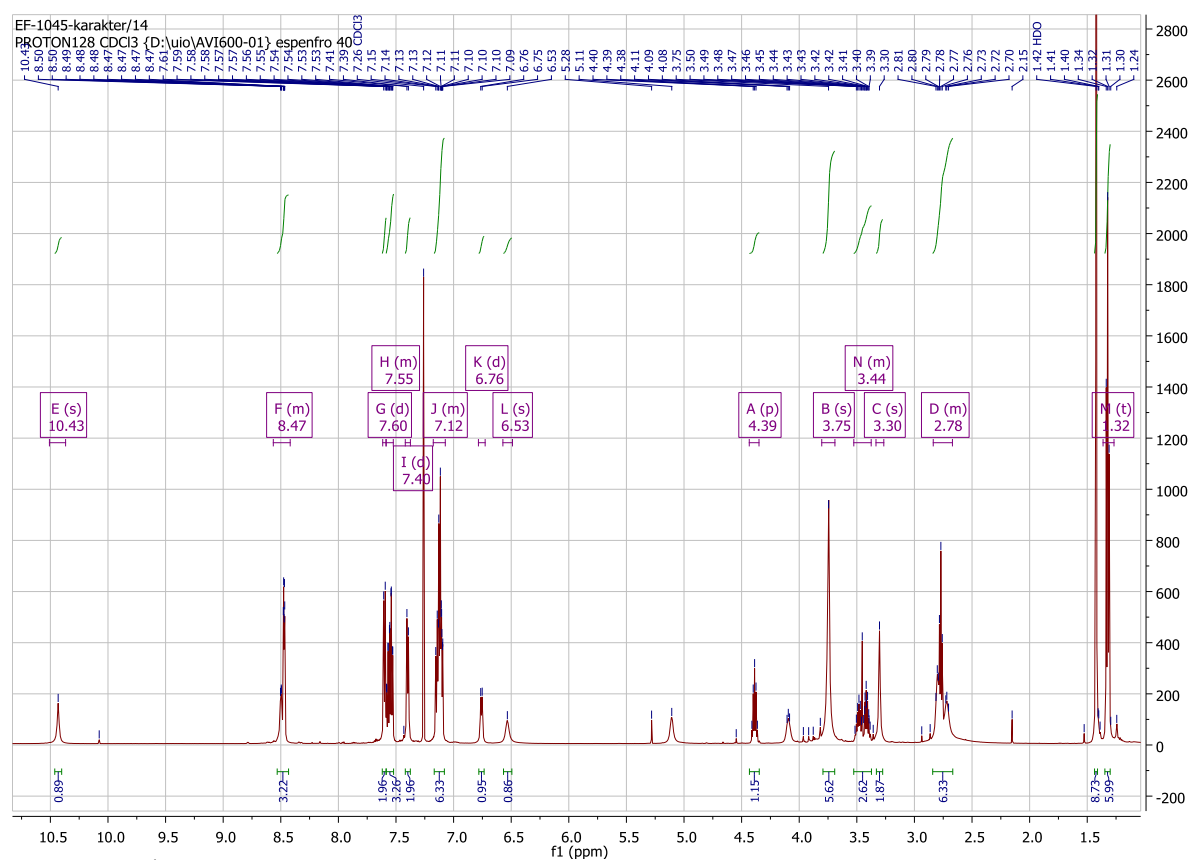
Utbytte: 55 mg, 53 %

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.43 (s, 1H), 8.56 – 8.42 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.59 – 7.52 (m, 3H), 7.40 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.18 – 7.07 (m, 6H), 6.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.39 (p, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.53 – 3.38 (m, 3H), 3.30 (s, 2H), 2.84 – 2.67 (m, 6H), 1.42 (s, 9H) 1.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H).

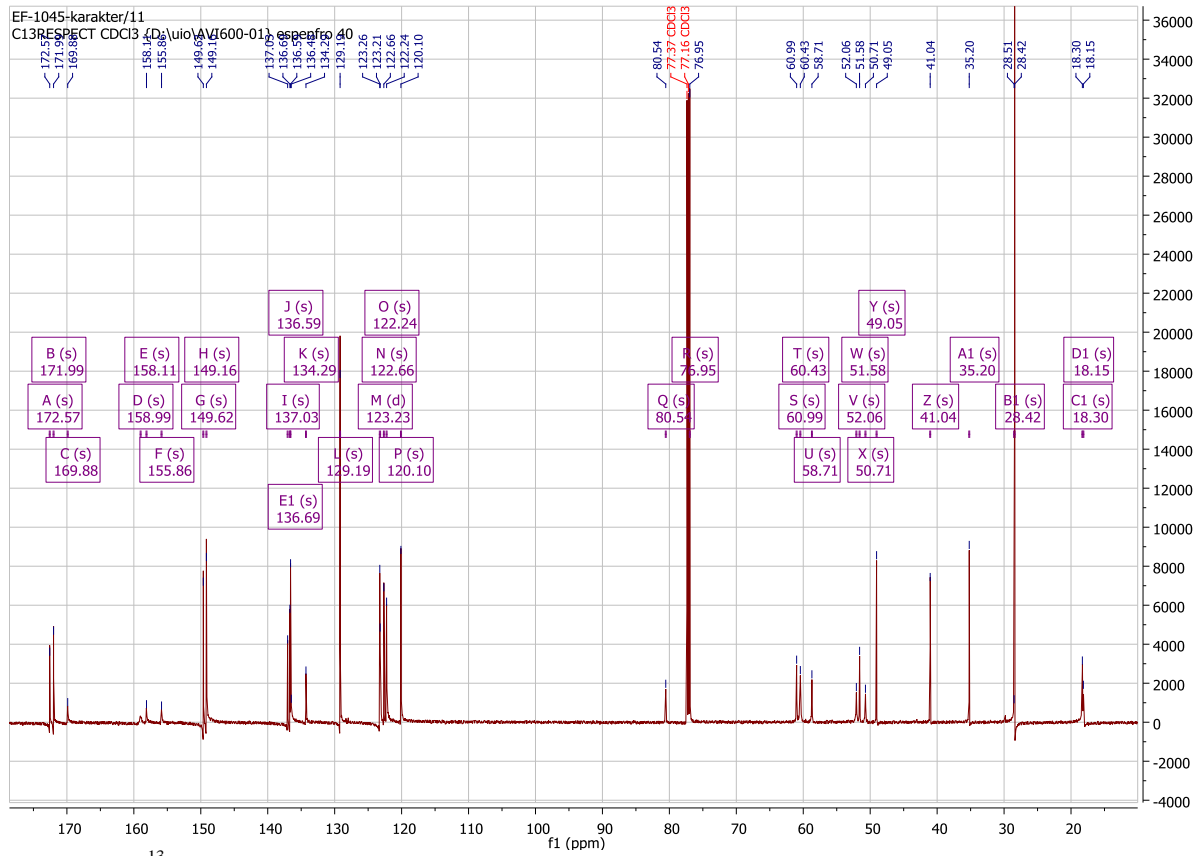
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.57 (s), 171.99 (s), 169.88 (s), 158.99 (s), 158.11 (s), 155.86 (s), 149.62 (s), 149.16 (s), 137.03 (s), 136.69 (s), 136.59 (s), 134.29 (s), 129.19 (s), 123.23 (d, $J = 8.2$ Hz), 122.66 (s), 122.24 (s), 120.10 (s), 80.54 (s), 76.95 (s), 60.99 (s), 60.43 (s), 58.71 (s), 52.06 (s), 51.58 (s), 50.71 (s), 49.05 (s), 41.04 (s), 35.20 (s), 28.42 (s), 18.30 (s), 18.15 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 752.4247

Funnet: 752.4263

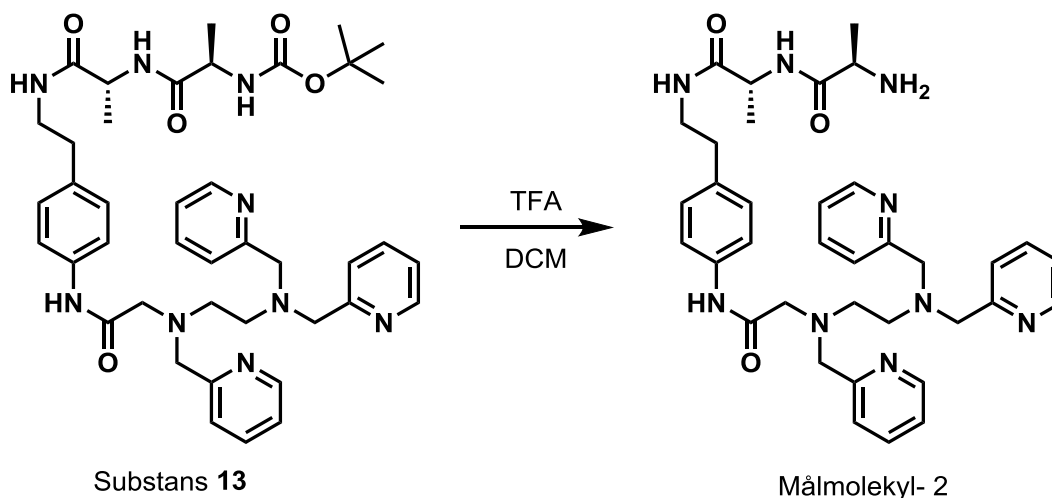


Figur 5.14.1 ^1H NMR Substans 13



Figur 5.14.2 ¹³C NMR Substans 13

5.15 Syntese av Målmolekyl- 2



Kjemikalie	Mw	d(g/mL)	Mengde	mmol	eq
Substans 13	751.93		44 mg	0.059	1
TFA	114.02	1.489	270 μ L / 1mL	3.51/ 13	60 / 220

Prosedyre

Substans **13** (44 mg, 0.059 mmol) ble løst i 4 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad. Trifluoreddiksyre (270 μ L, 3.51 mmol) ble fortynnet i 4 mL diklormetan og tilsatt dråpevis. Reaksjonen sto på omrøring på isbad i 15 min og i romtemperatur i 1,5 time. Løsningen ble så konsentrert under redusert trykk. Massen ble reløst i 10 mL diklormetan og ekstrahert med 3 x 10 mL 1M K₂CO₃. De samlede vannfasene ble ekstrahert 10 mL diklormetan. De samlede organiske fasene ble tørket over K₂CO₃, filtret og konsentrert under redusert trykk

NMR viste at mesteparten av produktet var startmateriale, forsøket ble gjentatt.

Substans **13** ble løst i 1 mL diklormetan og kjølt ned mot 0 °C på isbad. Trifluoreddiksyre (1mL, 13 mmol) ble tilsatt dråpevis. Sto på omrøring på isbad i 30 min og i romtemperatur i 1,5 time. Løsningen ble så konsentrert under redusert trykk. Massen ble reløst i 10 mL diklormetan og ekstrahert med 3 x 10 mL 1M K₂CO₃. De samlede vannfasene ble ekstrahert 10 mL diklormetan. De samlede organiske fasene ble tørket over K₂CO₃, filtret og konsentrert under redusert trykk. NMR viste rent sluttprodukt.

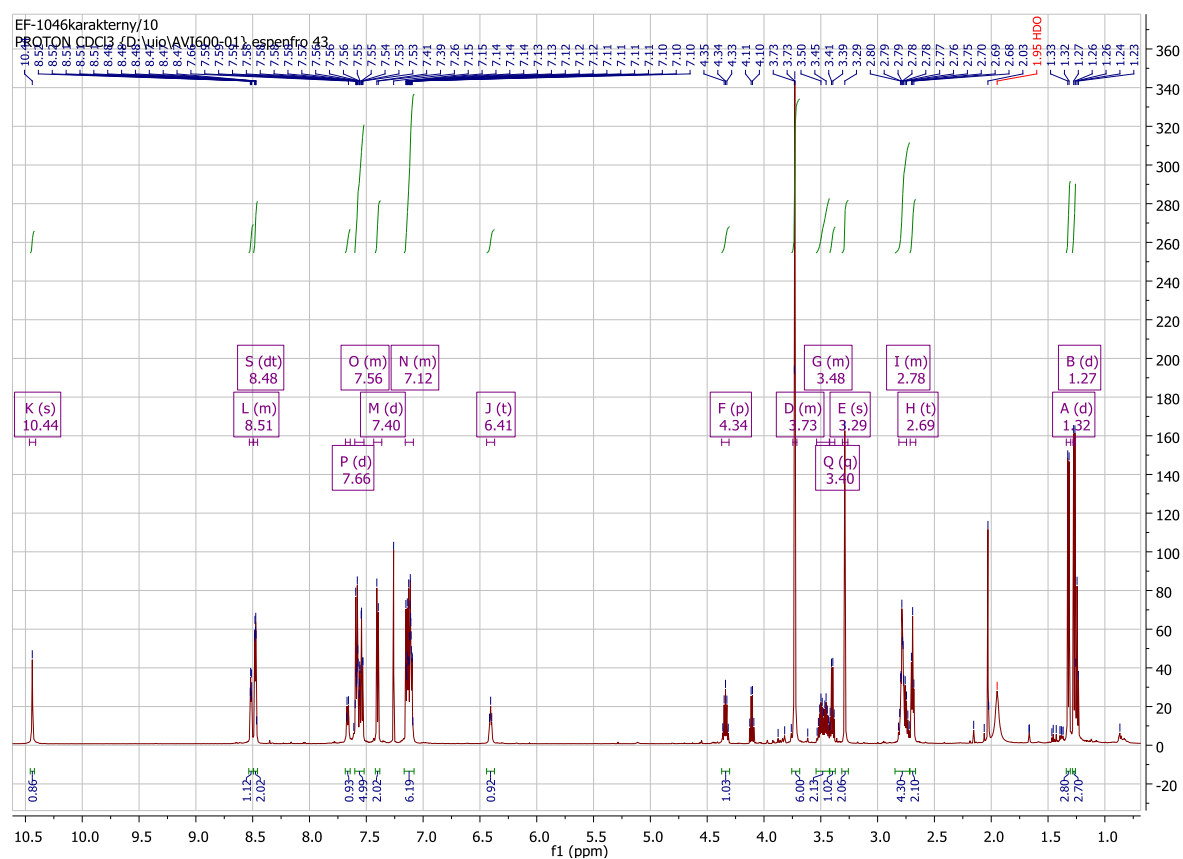
Utbytte: 33 mg, 86 %

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 10.44 (s, 1H), 8.53 – 8.50 (m, 1H), 8.48 (dt, $J = 4.8, 1.4$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.60 – 7.52 (m, 5H), 7.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.16 – 7.09 (m, 6H), 6.41 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.34 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.75 – 3.71 (m, 6H), 3.54 – 3.42 (m, 2H), 3.40 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.29 (s, 2H), 2.81 – 2.75 (m, 4H), 2.69 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

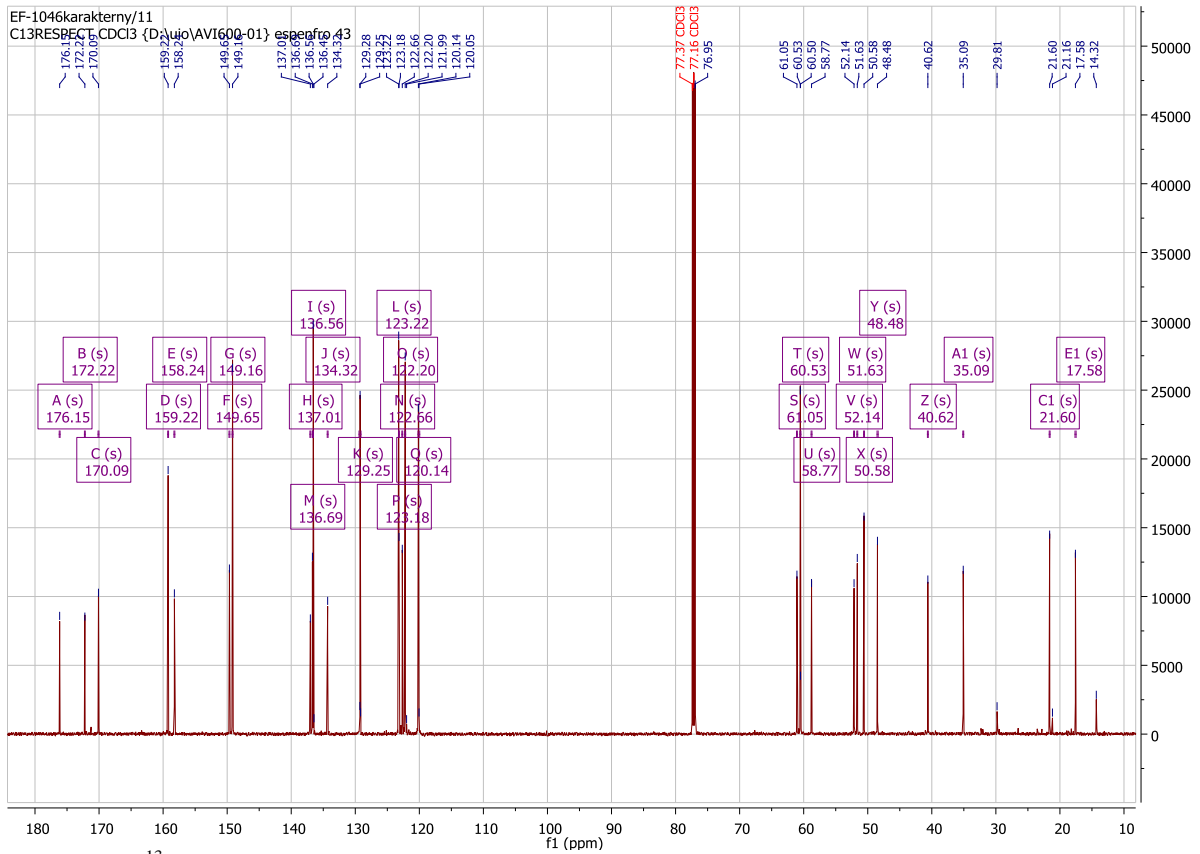
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 176.15 (s), 172.22 (s), 170.09 (s), 159.22 (s), 158.24 (s), 149.65 (s), 149.16 (s), 137.01 (s), 136.69 (s), 136.56 (s), 134.32 (s), 129.25 (s), 123.22 (s), 123.18 (s), 122.66 (s), 122.20 (s), 120.14 (s), 61.05 (s), 60.53 (s), 58.77 (s), 52.14 (s), 51.63 (s), 50.58 (s), 48.48 (s), 40.62 (s), 35.09 (s), 21.60 (s), 17.58 (s).

HRMS: (TOF MS ES⁺): Kalkulert masse for $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 652.3723

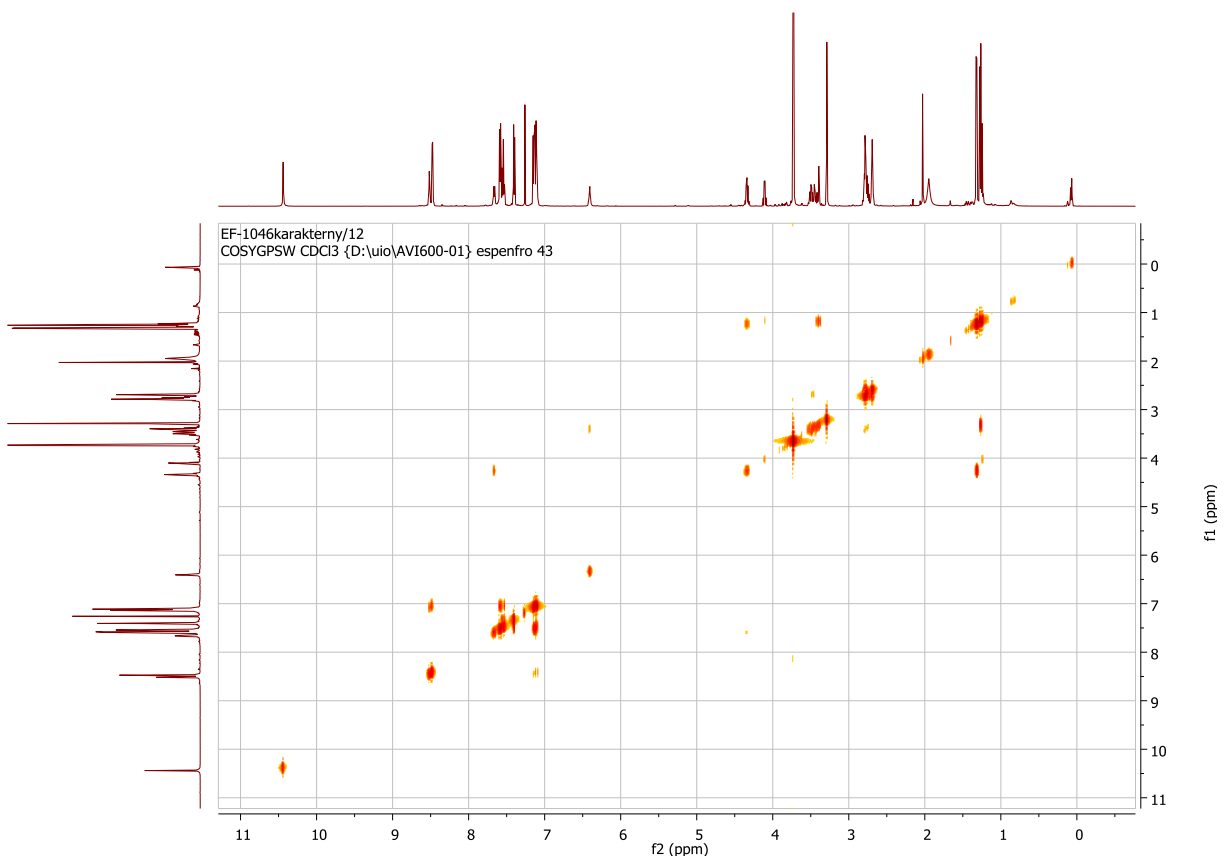
Funnet: 652.3727



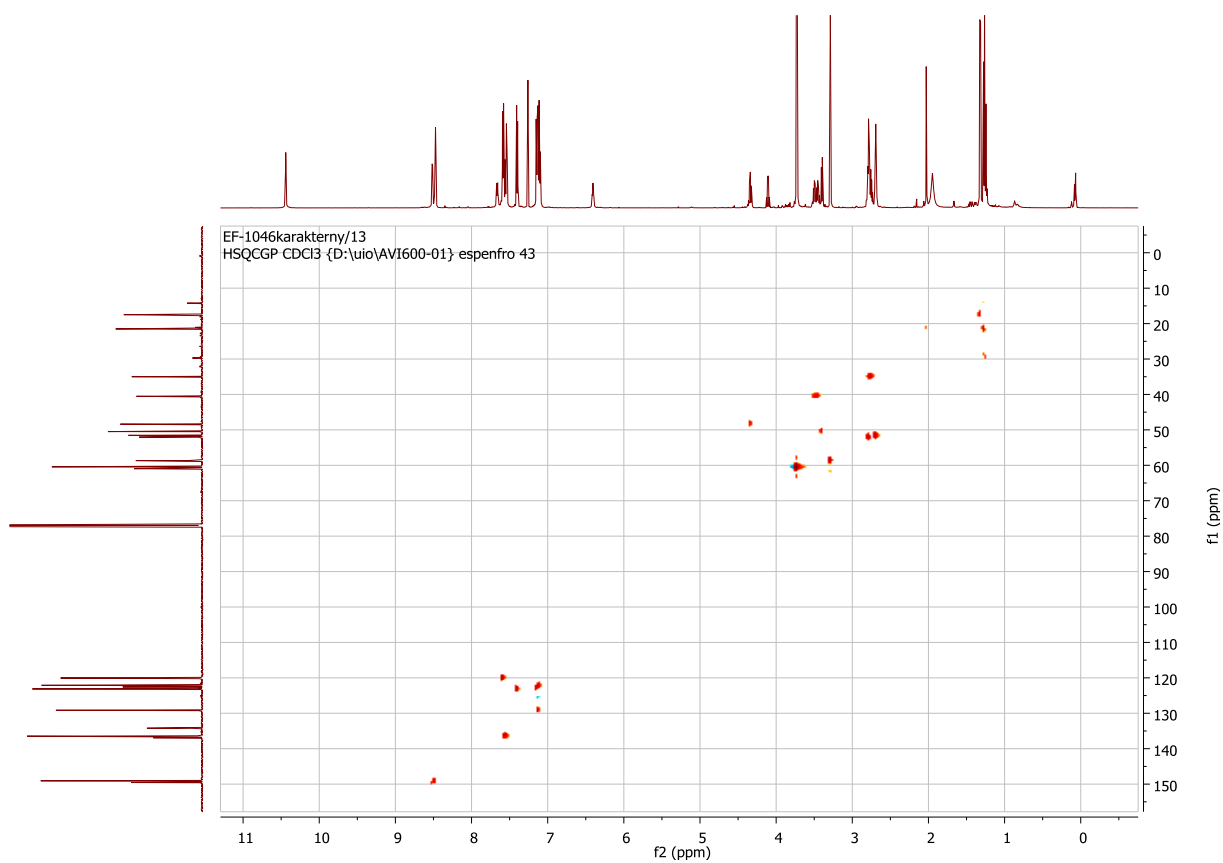
Figur 5.15.1 ^1H NMR Mål molekyl- 2



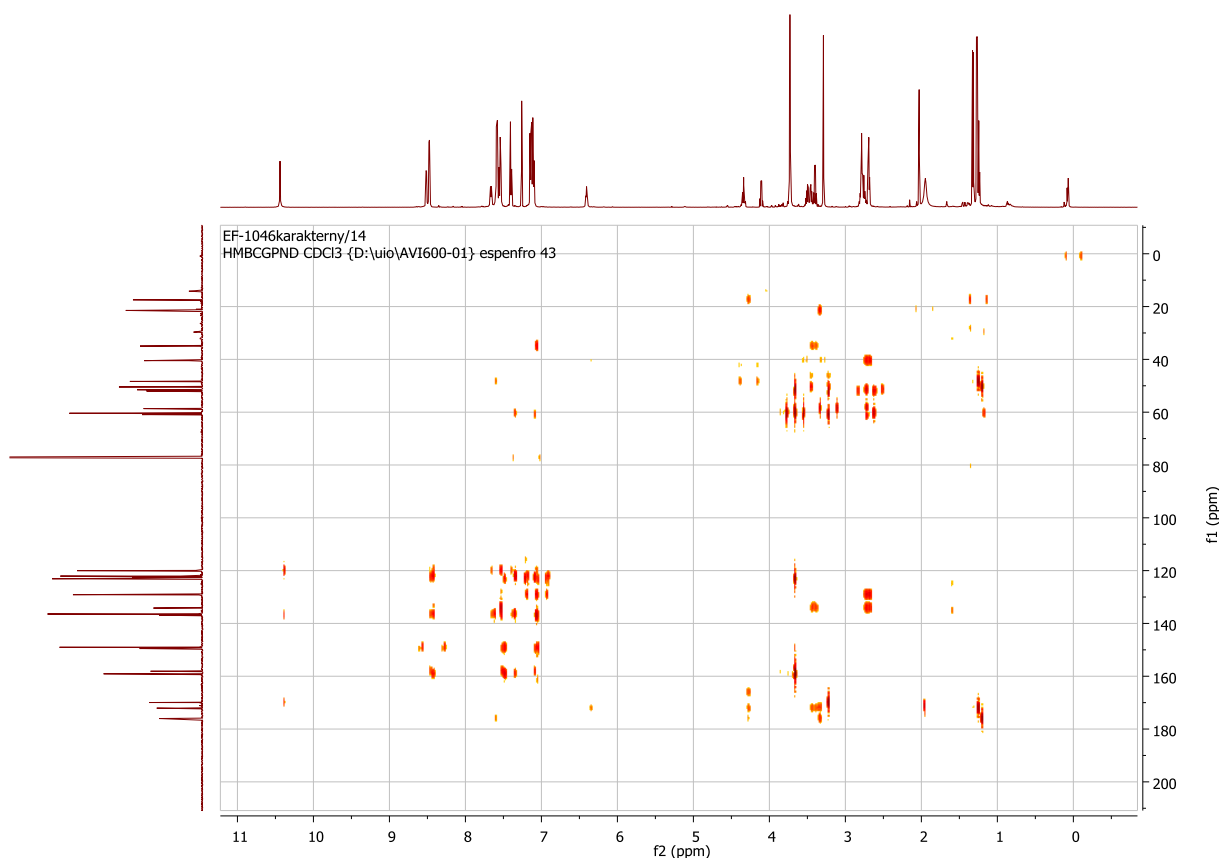
Figur 5.15.2 ¹³C NMR Målmolekyl-2



Figur 5.15.3 COSY Målmolekyl-2



Figur 5.15.4 HSQC Målmolekyl-2



Figur 5.15.5 HMBC Målmolekyl-2

Litteraturliste

1. Walsh C. Antibiotics: actions, origins, resistance: American Society for Microbiology (ASM); 2003.
2. Verdens helseorganisasjon. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. WHO, 2012.
3. Verdens helseorganisasjon. Infectious disease report: Removing obstacles to healthy development. WHO 1999.
4. Drawz SM, Bonomo RA. Clinical Microbiology Reviews 2010;23:160-201
5. ECDC, EMEA. ECDC/EMEA joint technical report: The bacterial challenge: time to react. European Centre for Disease Control and Prevention European Medicines Agency, 2009.
6. Steinbakk M, m.fl. Antibiotikaresistens- kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Folkehelseinstituttet, 2014.
7. Myrvang B. Infeksjon [https://sml.snl.no/infeksjon.:](https://sml.snl.no/infeksjon.) Store medisinske leksikon; 2015 [updated 042715].
8. Thougard H, Varlund V, Møller Madsen R. Mikrobiologi. København, Danmark: Nyt Teknisk Forlag; 2005.
9. Sigma-Aldrich. Cellevegg gram positiv og negativ bakterier. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/peptidoglycans.html>.
10. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D, editors. BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS. 12 th ed: Pearson Benjamin Cummings; 2009.
11. Leiros H-KS, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard GA, McSweeney SM. Structural Basis of 5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance THE CRYSTAL STRUCTURE OF NimA FROM DEINOCOCCUS RADIODURANS. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(53):55840-9.
12. Frère JM. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. Molecular microbiology. 1995;16(3):385-95.
13. Verdens helseorganisasjon. Antimicrobial resistance: global report on surveillance Verdens helseorganisasjon WHO, 2014.
14. Drawz S, Bonomo R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clinical microbiology reviews. 2010;23(1):160-201.

15. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun.* 2011;47(14):4055-61.
16. Pitout JD. Infections with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Drugs.* 2010;70(3):313-33.
17. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews.* 2005;18(2):306-25.
18. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical pharmacology.* 2007;74(12):1686-701.
19. Page MI, Badarau A. The Mechanisms of Catalysis by Metallo Bioinorganic chemistry and applications. 2008;2008.
20. Emsley J. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements: Oxford University Press; 2011.
21. Maret W, Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical reviews.* 2009;109(10):4682-707.
22. Donadelli M, Dalla Pozza E, Costanzo C, Scupoli M, Scarpa A, Palmieri M. Zinc depletion efficiently inhibits pancreatic cancer cell growth by increasing the ratio of antiproliferative/proliferative genes. *Journal of cellular biochemistry.* 2008;104(1):202-12.
23. Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends in pharmacological sciences.* 2000;21(10):395-401.
24. Hooper NM. Zinc Metalloproteases in Health and Disease;. Taylor & Francis Ltd. 1996

25. Andreini C, Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes. *Journal of inorganic biochemistry.* 2012;111:150-6.
26. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2014;58(4):1835-46.
27. Bebrone C, Lassaux P, Vercheval L, Sohier JS, Jhaes A, Sauvage E, et al. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on ss-lactamase inhibition. *Drugs.* 2010;70(6):651-79.
28. Perez-Llarena FJ, Bou G. β -Lactamase inhibitors: the story so far. *Current medicinal chemistry.* 2009;16(28):3740-65.

29. The European Bioinformatics Institute. Klavulansyre. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:48947>.
30. Sigma-Aldrich. Amoxicillin. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8523?lang=en®ion=NO>.
31. Siemann S, Brewer D, Clarke AJ, Dmitrienko GI, Lajoie G, Viswanatha T. IMP-1 metallo- β -lactamase: effect of chelators and assessment of metal requirement by electrospray mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002;1571(3):190-200.
32. Florence T, Powell H, Stauber J, Town R. Toxicity of lipid-soluble copper (II) complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*: amelioration by humic substances. *Water Research*. 1992;26(9):1187-93.
33. Høgmoen Åstrand OA. Drug discovery and design: Lead identification and discoveries made with zinc chelators, Liver X Receptor modulator and prodrug strategies. Oslo: Faculty of Mathematics and Natural sciences, University of Oslo; 2013.
34. Kocienski PJ. Protecting groups: Thieme; 2005.
35. Wuts PG, Greene TW. Greene's protective groups in organic synthesis: John Wiley & Sons; 2006.
36. Coutant C, Jacquinet J-C. 2-Deoxy-2-trichloroacetamido-D-glucopyranose derivatives in oligosaccharide synthesis: from hyaluronic acid to chondroitin 4-sulfate trisaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 1995(12):1573-81.
37. Solomons TWG, Fryhle C. Organic Chemistry. 10th ed: WILEY; 2011.
38. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry*. 1999;1(1):55-68.
39. Ulijn RV, Moore BD, Janssen AE, Halling PJ. A single aqueous reference equilibrium constant for amide synthesis–hydrolysis. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 2002(5):1024-8.
40. Jursic BS, Zdravkovski Z. A simple preparation of amides from acids and amines by heating of their mixture. *Synthetic communications*. 1993;23(19):2761-70.
41. Beckwith A, Zabicky J. The chemistry of amides. *Synthesis of Amides*. 1970:105-9.
42. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005;61(46):10827-52.

43. Ragnarsson U, Grehn L. Novel amine chemistry based on DMAP-catalyzed acylation. *Accounts of chemical research*. 1998;31(8):494-501.
44. Xu S, Held I, Kempf B, Mayr H, Steglich W, Zipse H. The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols—A Mechanistic Study (DMAP= 4-(Dimethylamino) pyridine). *Chemistry-A European Journal*. 2005;11(16):4751-7.
45. Hassner A, Krepski LR, Alexanian V. Aminopyridines as acylation catalysts for tertiary alcohols. *Tetrahedron*. 1978;34(14):2069-76.
46. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(10):4397-8.
47. Carpino LA, El-Faham A, Albericio F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron letters*. 1994;35(15):2279-82.
48. Sigma-Aldrich. HBTU.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/12804?lang=en®ion=NO>.
49. Sigma-Aldrich. HATU.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/445460?lang=en®ion=NO>.
50. Silverstein R, Webster F, Liemle D. Spectrometric identification of organic compounds. 7th ed: John Wiley & Sons; 2005.
51. PerkinElmer Informatics. ChemBioDraw Ultra 14.0 <http://www.cambridgesoft.com/>.
52. Mestrelab Research. MestReNova 7. <http://mestrelab.com/>.
53. Fukuoka S, Kida T, Nakajima Y, Tsumagari T, Watanabe W, Inaba Y, et al. Thermo-responsive extraction of cadmium (II) ion with TPEN-NIPA gel. Effect of the number of polymerizable double bond toward gel formation and the extracting behavior. *Tetrahedron*. 2010;66(9):1721-7.
54. Sigma Aldrich. Struktur meropenem.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/1392454?lang=en®ion=NO>.