



RĪGAS TEHNISKĀ
UNIVERSITĀTE

Guna Sakaine

PIROLO[1,4]BENZODIAZEPĪNU KLASES DABASVIELU TOTĀLĀ SINTĒZE

Promocijas darba kopsavilkums

TOTAL SYNTHESIS OF PYRROLO[1,4] BENZODIAZEPINE NATURAL PRODUCTS

Summary of the Doctoral Thesis



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Materials Science and Applied Chemistry

Guna Sakaine

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorante

Doctoral Student of the Study Programme “Chemistry”

PIROLO[1,4]BENZODIAZEPĪNU KLASES

DABASVIELU TOTĀLĀ SINTĒZE

Promocijas darba kopsavilkums

**TOTAL SYNTHESIS OF
PYRROLO[1,4]BENZODIAZEPINE
NATURAL PRODUCTS**

Summary of the Doctoral Thesis

Zinātniskie vadītāji / Scientific supervisors:

docents *Dr. chem.* / Docent Dr. chem.

GINTS ŠMITS

profesors *Dr. chem.* / Professor Dr. chem.

MĀRIS TURKS

RTU Izdevniecība / RTU Press

Rīga 2020 / Riga 2020

Sakaine, G. Pirolo[1,4]benzodiazepīnu klases dabasvielu totālā sintēze. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2020. 54 lpp.

Sakaine, G. Total Synthesis of Pyrrolo[1,4] benzodiazepine Natural Products. Summary of the Doctoral Thesis. Riga: RTU Press, 2020. 54 p.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-01” 2020. gada 28.–29. septembra lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/10.

Published in accordance with the decision of the Promotion Council “RTU P-01” of September 28–29, 2020, Minutes No. 04030-9.1/10.

<https://doi.org/10.7250/9789934225505>

ISBN 978-9934-22-549-9 (print)

ISBN 978-9934-22-550-5 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2020. gada 17. decembrī Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Asoc. profesore *Dr. chem.* Māra Plotniece,
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Profesors *Dr. chem.* Edgars Sūna,
Latvijas Universitāte, Latvija

Vadošais pētnieks *Dr. chem.* Einārs Loža,
Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Guna Sakaine (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota četru SCI zinātnisko publikāciju un viena publikācijas manuskripta kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā, un to kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejamo informāciju, ir 123 lappuses.

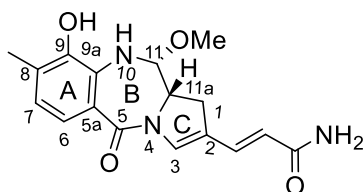
SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	5
Tēmas aktualitāte.....	5
Pētījuma mērķis un uzdevumi	6
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti.....	7
Darba struktūra un apjoms.....	7
Darba aprobācija un publikācijas	7
DARBA REZULTĀTI.....	9
1. Pirololo[1,4]benzodiazepīnu pirolidīna eksocikliskās dubultsaites migrācijas pētījumi un limazepīna C un D pirmā totālā sintēze.....	9
2. Usabamicīnu A un C pirmā totālā sintēze	11
3. Pētījumi par eksocikliskās dubultsaites ievadīšanu PBD un vienkāršotos substrātos, limazepīna E un barmumicīna formālā totālā sintēze.....	12
4. Pētījumi par PBD-kumarīna hibrīda sintēzi.....	20
SECINĀJUMI.....	26
LITERATŪRAS SARAKSTS	28

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

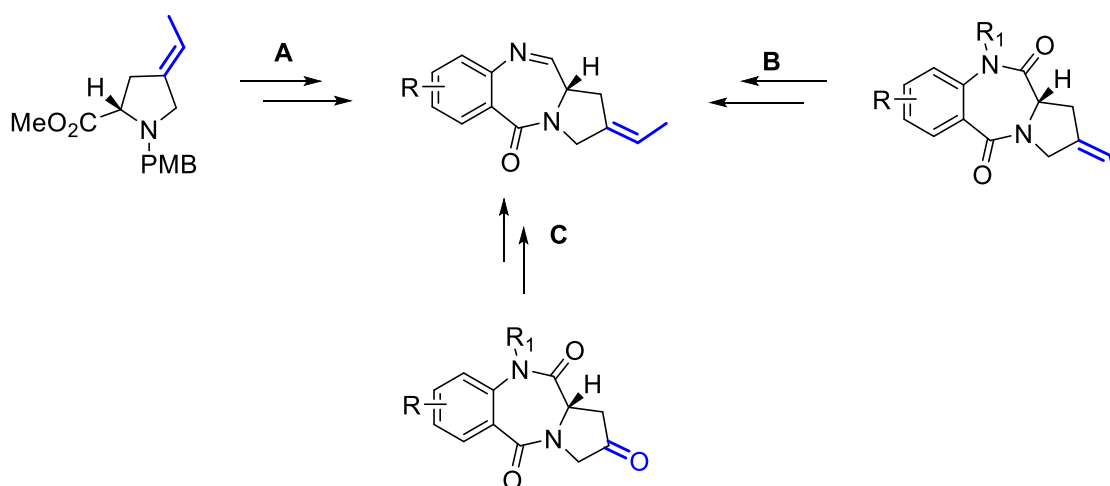
Pirololo[1,4]benzodiazepīni (PBD) ir plaši pētīta dabasvielu klase, kas uzrāda pretvēža aktivitāti, kovalenti un sekvenču selektīvi saistoties ar eksociklisko guanīna aminogrupu DNS ķēdē.¹ Visos dabā sastopamajos PBD hirālais centrs ir ar *S* konfigurāciju, kas ir nozīmīgs nosacījums to aktivitātei. PBD atklāja līdz ar antramicīna izolēšanu pagājušā gadsimta 60. gados, un tas iesāka šīs klases kā potenciāla pretvēža zāļu avota plašus pētījumus.²



Antramicīns.

Ņemot vērā PBD klases savienojumu ievērojamo aktivitāti un pielietojuma iespējas, pēdējos 50 gados ir sintezēti daudzi to analogi, ieskaitot dimērus, kas spēj “saūt” DNS molekulas. Arī no mikroorganismiem tiek izdalītas arvien jaunas šīs klases dabasvielas. PBD dimēri ir kļuvuši par vienu no perspektīvākajām antivielu – zāļu toksisko komponentu konjugātu klasēm.³ PBD dabasvielu un to analogu sintēzes metožu izstrāde vēl aizvien ir aktuāls pētījumu virziens, jo esošās sintēzes metodes ne vienmēr ir pietiekami efektīvas.

Daudzas PBD dabasvielas C2 pozīcijā satur *E* konfigurācijas eksociklisku dubultsaiti. Totālās sintēzes kontekstā šādas trīsaizvietotas dubultsaites konstruēšana bieži vien ir problemātiska.

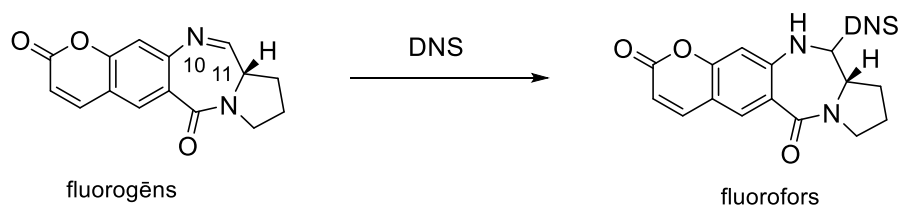


Etilidēnaizvietotāju saturošu PBD sintēze.

Būtiski, ka etilidēnaizvietotāju saturošas dabasvielas uzrāda augstāku bioloģisko aktivitāti (*in vitro* citotoksicitāte) nekā to analogi ar metilidēnaizvietotāju vai bez aizvietotāja.⁴ Etilidēnaizvietotāju saturošas PBD dabasvielas iespējams sintezēt no funkcionalizēta proflīna atvasinājuma (A ceļš)⁵ vai arī, veicot dubultsaites ģeometrijas apgriešanu PBD dilaktāmā (B ceļš).⁶ Ātrākais un efektīvākais veids alkilidēn-PBD sintēzei būtu olefinēšana (C ceļš), tomēr līdz šim literatūrā aprakstīto klasisko olefinēšanas metožu izmantošana PBD sistēmās dod vāju *E/Z* selektivitāti vai arī ir *Z* selektīva.⁶⁻⁸ Padziļināta klasisko olefinēšanas metožu izpēte ļautu iegūt nozīmīgos alkilidēnaizvietotāju saturošos PBD savienojumus daudz vienkāršāk un efektīvāk.

Apskata raksta manuskripts par PBD dabasvielu izdalīšanu, ķīmiju un bioloģisko aktivitāti ir atrodams 1. pielikumā.

Pretvēža zāļu vielu būtisks aspekts ir to lokalizācija šūnā. Lai novērtētu PBD lokalizāciju šūnā un izpētītu, kā tā korelē ar PBD-DNS saistīšanos un citotoksicitāti, ir sintezēti dažādi PBD adukti ar fluorescējošiem savienojumiem, piemēram, 7-aminokumarīniem.^{9, 10} Izmantojot šādu pieeju, klasiskais fluorofors 7-dietilaminokumarīns tiek pievienots molekulai ar alkiltiņņu, tādējādi PBD molekula jau pirms *in vitro* eksperimentiem ir fluorescējoša. Jaunus rezultātus PBD darbības mehānisma pētījumos būtu iespējams iegūt ar fluorogēnu PBD substrātu, kas saistīšanās brīdī ar DNS veidotu fluorescējošu atvasinājumu.



Fluorogēna PBD atvasinājuma saistīšanās ar DNS.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir sintēzes metožu izstrāde pirolo[1,4]benzodiazepīnu klases dabasvielu un to atvasinājumu sintēzei. Darbs ir vērsts uz eksocikliskās dubultsaites selektīvas ievadīšanas metožu izstrādi PBD sistēmā.

Darba mērķa īstenošanai definēti šādi uzdevumi:

- 1) apkopot un analizēt literatūru par PBD klases dabasvielām un to iegūšanas metodēm, īpašu uzmanību pievēršot eksocikliskās dubultsaites ievadīšanai; apkopojumu strukturēt manuskriptā un publicēt kā apskata rakstu;
- 2) pētīt dubultsaites migrācijas reakciju PBD pirolidīnā un noskaidrot, vai tā ir stereospecifiska;
- 3) paplašināt Žiliā–Kočinska (*Julia–Kocienski*) reakcijas pielietojumu eksociklisko dubultsaiti saturošu PBD iegūšanai, veidot jaunus un selektīvākus reaģentus uz tetrazolsulfona cikla bāzes;
- 4) ieteikt un pārbaudīt iespējamās sintēzes metodes fluorogēnam PBD-kumarīna hibrīdam, ko būtu iespējams izmantot PBD darbības mehānisma pētījumiem.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Pētījumu rezultātā veiktas četru PBD dabasvielu – limazepīna C, limazepīna D, usabamicīna A un usabamicīna C – pirmās totālās sintēzes. Limazepīna C un D sintēzē kā atslēgas stadija izmantota dzelzs pentakarbonila katalizēta dubultsaites migrācijas reakcija. Usabamicīna A un C sintēzē B cikla saslēgšanai izmantota šādās sistēmās iepriekš neaprašīta ciklizēšanas pieeja. Izstrādāta Žiliā–Kočinska reakcijas modifikācija, kas ļauj iegūt augstu selektivitāti PBD substrātu olefinēšanā. Izmantojot jaunizstrādāto sulfona reaģentu, veikta divu dabasvielu – limazepīna E un barmumicīna – formālā totālā sintēze. Pārbaudītas iespējamās sintēzes metodes PBD-kumarīna hibrīda iegūšanai.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota četru SCI zinātnisko publikāciju un viena publikācijas manuskripta kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejamo informāciju, ir 123 lappuses.

Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba rezultāti izklāstīti četrās zinātniskajās publikācijās un vienā publikācijas manuskriptā.

1. **Sakaine, G.**, Ture, A., Pedroni, J., Smits, G. Isolation, chemistry, and biology of pyrrolo[1,4]benzodiazepine (PBD) natural products (*iesniegts publicēšanai Med. Res. Rev.*).
2. **Sakaine, G.**, Smits, G., Arsenyan, P. Synthetic studies toward novel pyrrolobenzodiazepine–coumarin hybrids. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2020**, *56*, 572–577.
3. **Sakaine, G.**, Smits, G. Modified Julia–Kocienski reagents for a stereoselective introduction of trisubstituted double bonds: a formal total synthesis of Limazepine E and Barmumycin. *J. Org. Chem.*, **2018**, *83*, 5323–5330.
4. **Sakaine, G.**, Zemribo, R., Smits, G. The first total synthesis of usabamycins A and C. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, *58*, 2426–2428.
5. **Sakaine, G.**, Smits, G., Zemribo, R. Late stage Fe(CO)₅ promoted double bond migration: total synthesis of limazepines C and D. *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 4767–4769.

Darba rezultāti prezentēti četrās konferencēs.

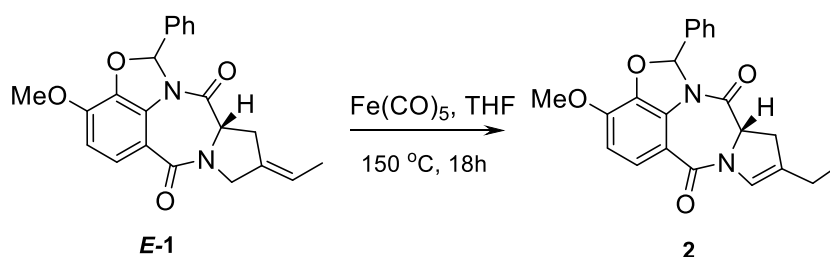
1. **Sakaine, G.**, Smits, G. Modified Julia–Kocienski reagents for a stereoselective introduction of trisubstituted double bonds: a formal total synthesis of Limazepine E. In: *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2018): Program and Abstracts*, Estonia, Tallinn, 1–4 July, 2018. Tallinn: 2018, pp. 130.

2. **Sakaine, G.** Total synthesis of Usabamycin C. In: *Latvijas Universitātes 74. konferences ķīmijas sekcijas tēžu krājums*, Latvia, Rīga, 12 February, 2016. Rīga: 2016, pp. 16.
3. **Sakaine, G., Zemribo, R.** Total synthesis of Limazepine C. In: *22nd Young Research Fellows Meeting*, France, Paris, 4–6 February 2015, Paris: 2015, PO-052.
4. **Sakaine, G., Zemribo, R.** Total synthesis of Limazepine C. In: *9th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry*, Latvia, Riga, 21–22 May, 2015. Riga: 2015, pp. 62.

DARBA REZULTĀTI

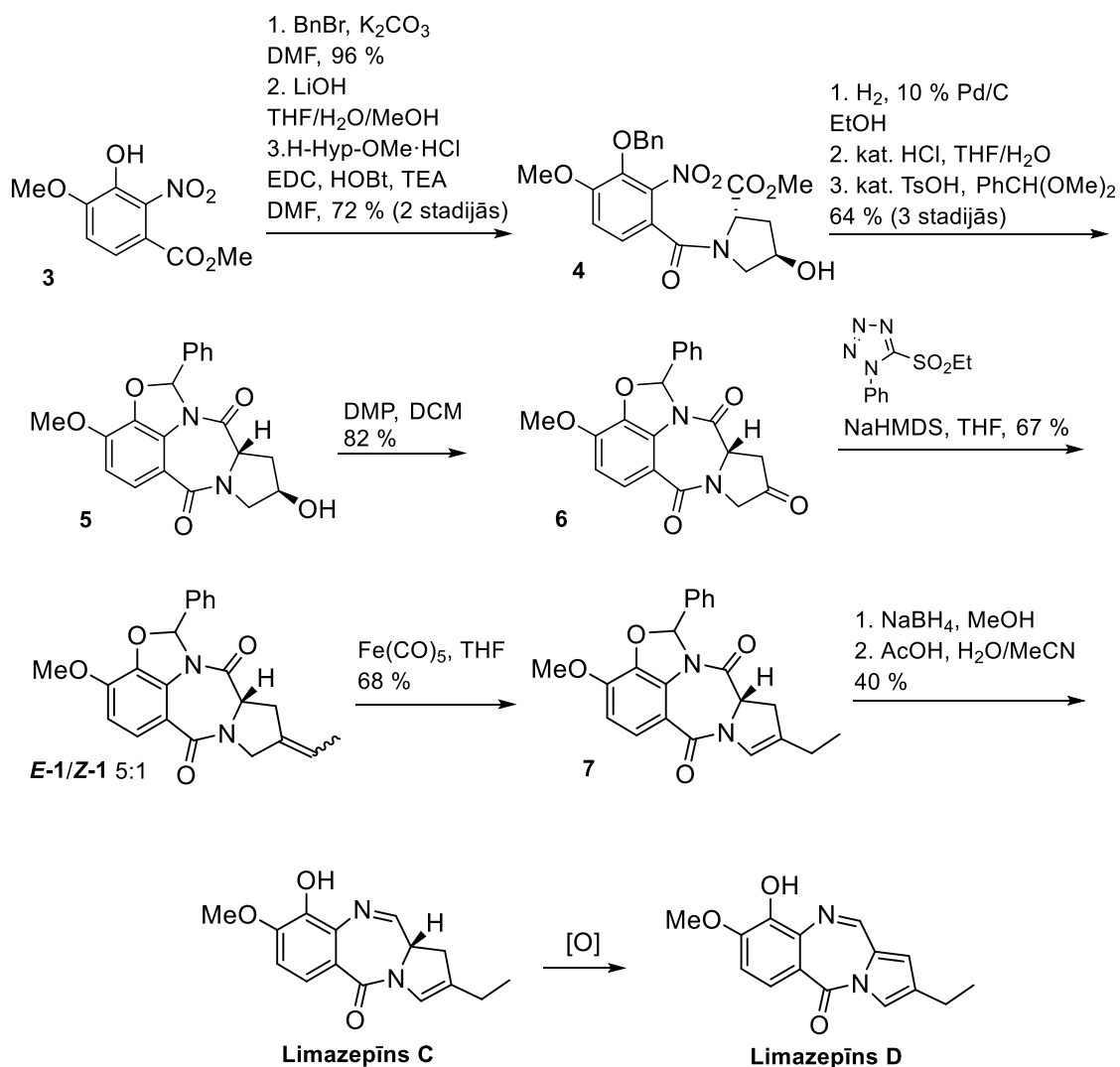
1. Piolo[1,4]benzodiazepīnu pirolidīna eksocikliskās dubultsaites migrācijas pētījumi un limazepīna C un D pirmā totālā sintēze

Jau iepriekš mūsu laboratorijā veiktajā limazepīna E totālajā sintēzē tika izdalīts savienojums **E-1**, kas satur eksociklisku dubultsaiti ar vajadzīgo *E* konfigurāciju.⁵ Tika noskaidrots, ka ir iespējams veikt eksocikliskās dubultsaites migrāciju dzelzs pentakarbonila klātienē un selektīvi iegūt savienojumu **2** kā tīru vēlamo izomēru (1. shēma). Savienojums **2** būtu transformējams arī par citām PBD dabasvielām – limazepīnu C un D.



1. shēma. Eksocikliskās dubultsaites migrācija.

Viens no promocijas darba mērķiem bija pētīt dubultsaites migrācijas reakciju un noskaidrot, vai tā ir stereospecifiska, tas ir, vai eksocikliskās dubultsaites ģeometrija izejvielā ietekmē to, uz kuru pusi ciklā dubultsaite migrēs. Šim mērķim plānojām sintezēt savienojumu ar apgrieztu dubultsaites ģeometriju **Z-1** un pētīt tā dubultsaites migrācijas reakciju. Nepieciešamo substrātu ieguvām vairāku stadiju sekvencē (2. shēma), sākot no nitrobenzoscābes metilesterā **3**. Fenola grupu nitrobenzoscābes metilesterī **3** aizsargājām ar benzilaizsarggrupu un pēc tam hidrolizējām esterī. Iegūto nitrobenzoscābes starpsavienojumu kondensējām ar *trans*-4-hidroksi-L-prolīna metilesteri un ar labu iznākumu izdalījām amīdu **4**. Noskaidrojām, ka ātrākais un efektīvākais veids nitrogrupas reducēšanai ir palādijs katalizēta hidrogenēšana. Tas ļauj vienlaikus arī nošķelt benzilaizsarggrupu un bez iegūtā produkta hromatogrāfiskas attīrīšanas uzreiz veikt ciklizēšanu HCl klātienē. Ciklizēšanas rezultātā veidojās PBD dilaktāms, ko aizsargājām ar benzilidēnamīnāla aizsarggrupu, tādējādi iegūstot spirtu **5** ar labu iznākumu, trijās stadijās veicot tikai vienu hromatogrāfisko attīrīšanu. Pēc oksidēšanas Dess–Martina (*Dess–Martin*) apstākļos bijām ieguvuši ketonu **6**, ko tālāk izmantojām olefinēšanas reakcijai. Vispirms mēģinājām Vītiga (*Wittig*) reakciju, izmantojot dažādas bāzes – kālija *tert*-butoksīdu, nātrija hidrīdu un nātrija heksametildisililamīdu. Lai gan AEŠH/MS analīzēs novērojām produkta veidošanos, visos gadījumos izdevās izdalīt niecīgu daudzumu vielas. Labāko iznākumu (~20 %) ieguvām, kā bāzi izmantojot kālija *tert*-butoksīdu. Raksturojot iegūto dubultsaites izomēru maisījumu ar kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopiju, noskaidrojām, ka reakcija ir neselektīva, tas ir, *E* un *Z* izomēri rodas attiecībā 1:1.



2. shēma. Limazepīna C un D sintēze.

Ar Vitiga (*Wittig*) reakciju neizdevās panākt vēlamo rezultātu, tāpēc mēģinājām Žiliā–Kočinska (*Julia–Kocienski*) apstākļus. Reakcija noritēja ar ievērojami augstāku iznākumu (67%), turklāt šoreiz tā bija selektīva – kā galvenais produkts radās *E* dubultsaites izomērs **E-1** (5:1, noteikts pēc KMR). Eksocikliskās dubultsaites migrācijas reakciju vispirms veicām **E-1/Z-1** maisījumam 1:1, kas iegūts pēc Vitiga reakcijas. Migrācijas reakcija noritēja nepilnīgi, bet radās tikai viens – vēlamais – produkts. Izdalījām arī neizreaģējušo izejvielu, ko raksturojām ar kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopiju, un noskaidrojām, ka **E-1** un **Z-1** dubultsaites izomēru attiecība ir 1:1 jeb tāda pati, kāda tā bija pirms reakcijas. Līdz ar to var secināt, ka reakcija nav stereospecifiska, kas ļauj turpmākajiem pētījumiem izmantot abu vielu maisījumu neatkarīgi no to izomēru attiecības. Turpmākajiem pētījumiem izmantojām dubultsaites izomēru maisījumu **E-1/Z-1** attiecībā 5:1, kas iegūts Žiliā–Kočinska olefinēšanā.

Savienojumu **7** izmantojām dabasvielas limazepīna C iegūšanai, selektīvi reducējot karbonilgrupu ar nātrija borhidrīdu un pēc tam nošķeļot amināla aizsarggrupu etiķskābes klātienē (40% iznākums). Sintezētā limazepīna C kodolmagnētiskās rezonanses spektru signāli atbilst literatūrā¹¹ aprakstītajiem. Attīrot vielu, kā arī uzglabājot to, notiek oksidēšanās, un veidojas limazepīns D. Veicot preparatīvo AEŠH attīrīšanu, ieguvām tīru limazepīnu D

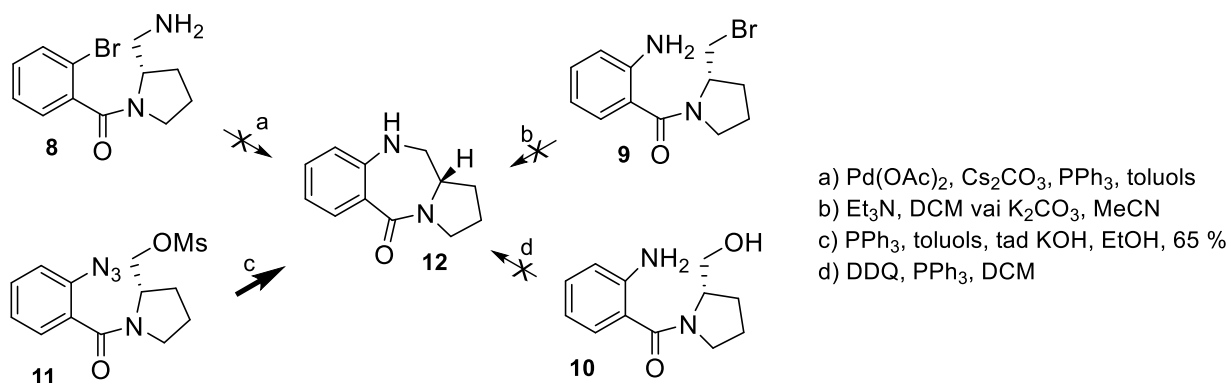
(19 % iznākums), kura ^1H un ^{13}C spektri atbilst literatūrā¹¹ aprakstītās dabasvielas spektriem. Zemais iznākums skaidrojams ar limazepīna C nestabilitāti un vairākkārtējo attīrīšanu.

Šajā nodaļā aprakstīto pētījumu rezultātā tika veikta dabasvielu limazepīna C un limazepīna D pirmā totālā sintēze, kā atslēgas stadiju izmantojot dzelzs pentakarbonila katalizētu alilamīda – ēnamīda dubultsaites migrācijas reakciju. Atrastais dzelzs katalizators ir ievērojami lētāks, salīdzinot ar rutēnija¹² un irīdija¹³ katalizatoriem, kas arī aprakstīti literatūrā līdzīgu transformāciju veikšanai. Tika noskaidrots, ka limazepīns C ir nestabils un oksidējas par limazepīnu D.

Oriģinālpublikācija par šajā nodaļā aprakstītajiem pētījumiem atrodama 2. pielikumā.

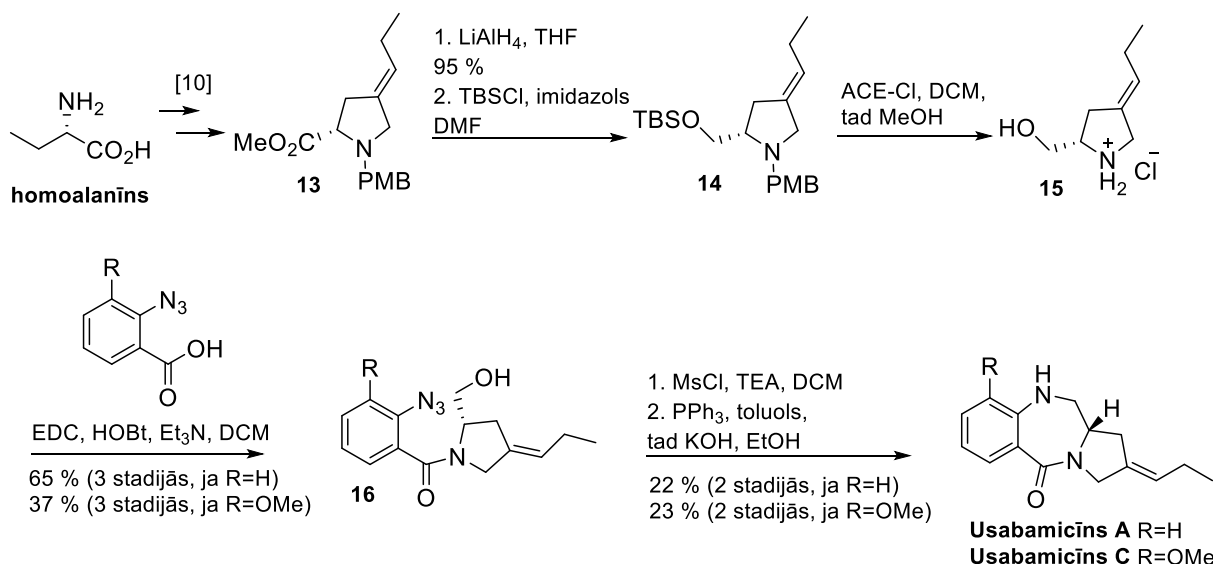
2. Usabamicīnu A un C pirmā totālā sintēze

Usabamicīni A un C ir N10-C11 piesātinātas PBD dabasvielas, kas satur propilidēnaizvietotāju pie C2.¹⁴ Sākotnējie mēģinājumi piesātinātā B cikla iegūšanā bija neveiksmīgi, tāpēc nolēmām vispirms izstrādāt ciklizēšanas metodi, izmantojot modeļvielu, un pēc tam šo metodi izmantot usabamicīnu A un C sintēzei. Šim nolūkam sintezējām modeļvielas **8–11** un pētījām ciklizēšanu, pārbaudot dažādas pieejas: 1) palādijs katalizētu iekšmolekulāru aminēšanu amīnā **8**; 2) antranilskābes atvasinājuma **9** ciklizēšanu ar dažādām bāzēm; 3) aminospirta **10** ciklizēšanu. Tomēr iepriekšminētajos apstākļos vēlmais produkts **12** neveidojās. Visbeidzot, azīda **11** reakcijā ar PPh_3 un tai sekojošā iminofosforāna ciklizācijā un hidrolīzē izdevās ar labu iznākumu iegūt savienojumu **12** (3. shēma).



3. shēma. Modeļvielu **8–11** ciklizācijas pētījumi.

Kad bija izstrādāta metode piesātinātas PBD sistēmas ciklizēšanai, tā tika izmantota gan usabamicīna A, gan usabamicīna C iegūšanai. Iepriekš mūsu laboratorijā veiktajā limazepīna E totālajā sintēzē⁵ eksocikliskā dubultsaite tika ievadīta Airlenda–Klaizena (*Ireland–Claisen*) pārgrupēšanās reakcijā. Šo metodi izmantojām arī usabamicīnu sintēzei, iegūstot propilidēnprolīna būvbloku **13**⁵, kura estera funkciju reducējām un iegūto spirtu aizsargājām ar TBS aizsarggrupu. Abas aizsarggrupas savienojumā **14** nošķēlām ar 1-hloretilhlorformiātu, iegūstot prolīnola sāli **15**. Peptīdsaites veidošanas reakcijā ar atbilstošajām azidobenzoskābēm, kā arī sekojošā mezilēšanas reakcijā ieguvām ciklizēšanas prekursorus **16**. Tālāk izmantojām uz modeļvielas izstrādāto ciklizēšanas metodi un ieguvām plānotās dabasvielas, kuru ^1H un ^{13}C spektri atbilst literatūrā¹⁴ aprakstītajiem (4. shēma).



4. shēma. Usabamicīnu A un C sintēze.

Šajā nodaļā aprakstīto pētījumu rezultātā tika veikta dabasvielu usabamicīna A un usabamicīna C pirmā totālā sintēze. PBD sistēmas B cikla veidošanai tika izmantota iepriekš N10-C11 piesātinātās PBD sistēmās neaprakstīta ciklizēšanas pieeja, kas ietver azīda reakciju ar trifenilfosfīnu un tai sekojošu iminofosforāna starpsavienojuma iekšmolekulāru ciklizāciju un hidrolīzi.

Originālpublikācija par šajā nodaļā aprakstītajiem pētījumiem atrodama 3. pielikumā.

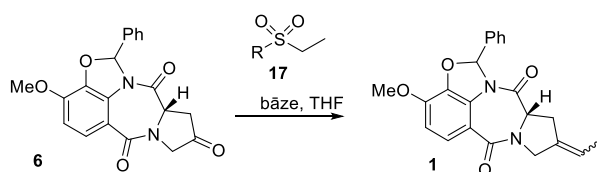
3. Pētījumi par eksocikliskās dubultsaites ievadīšanu PBD un vienkāršotos substrātos, limazepīna E un barmumicīna formālā totālā sintēze

Limazepīnu C un D sintēzes ietvaros bija nepieciešams ievadīt etilidēnaizvietotāju ketona **6** pirolidīna fragmentā (2. shēma). Lai gan līdzīgiem literatūrā aprakstītiem substrātiem *E/Z* selektivitāte Žiliā–Kočinska reakcijā ir 2:1, tomēr mēs, neveicot reakcijas apstākļu optimizāciju, ieguvām atbilstošo alkēnu **1** ar ievērojami augstāku selektivitāti (*E-1/Z-1* 5:1).

Nolēmām optimizēt šo reakciju, pārbaudot dažādus literatūrā aprakstītus olefinēšanas reaģentus un bāzes. Katru no klasiskajiem olefinēšanas reaģentiem **17a**, **17b**, **17c** un **17d** pārbaudījām reakcijā ar trīs bāzēm un noskaidrojām, ka ketona **6** olefinēšanā augstākā *E/Z* selektivitāte (89:11) iegūstama, izmantojot tetrazolilsulfonu reaģentus **17c** un **17d** un KHMDS bāzi (1. tabula).

Izmantojot tetrazolilsulfonu **17d** un KHMDS, veicām arī šķīdinātāja optimizāciju (2. tabula). Lai gan arī dihlormetānā olefinēšanas reakcijas selektivitāte bija 89:11, tomēr iepriekš izmantotais tetrahydrofurāns izrādījās vispiemērotākais šķīdinātājs šai pārvērtībai labāka reakcijas iznākuma dēļ.

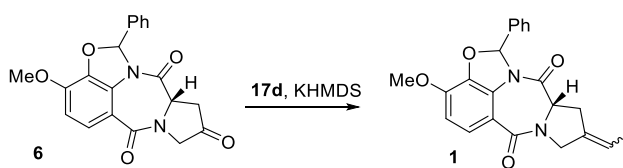
Olefinēšanas reakcijas optimizācija



Sulfons R=	Bāze	Produkta 1 iznākums	<i>E/Z</i>
17a 	LiHMDS	66 %	50:50 ^a
	NaHMDS	16 %	55:45 ^a
	KHMDS	nr	–
17b 	LiHMDS	13 %	50:50 ^a
	NaHMDS	10 %	50:50 ^a
	KHMDS	nr	–
17c 	LiHMDS	73 %	73:27 ^b
	NaHMDS	67 %	80:20 ^b
	KHMDS	75 %	89:11 ^b
17d 	LiHMDS	63 %	56:44 ^b
	NaHMDS	53 %	77:23 ^b
	KHMDS	54 %	89:11 ^b

^a noteikts pēc ¹H KMR datiem; ^b noteikts pēc AEŠH datiem, nr: reakcija nenotika.

Šķīdinātāja optimizācija



Šķīdinātājs	Produkta 1 iznākums	<i>E/Z</i> ^a
THF	54 %	89:11
DMF	53 %	77:26
DME	10 %	84:16
DCM	34 %	89:11
toluols	44 %	60:40
Et ₂ O	24 %	82:18

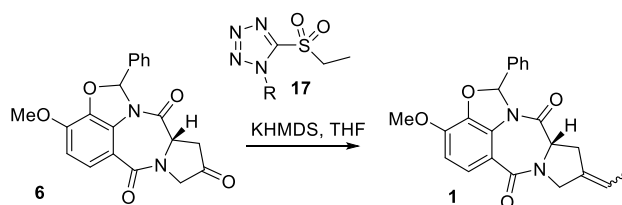
^a noteikts pēc AEŠH datiem.

Pieļāvām, ka stēriskie efekti olefinēšanas reaģentā **17** varētu ietekmēt reakcijas selektivitāti. Sintezējām vairākus literatūrā neaprakstītus telpiski apjomīgus raģentus un pārbaudījām to selektivitāti uz jau iepriekš izmantoto ketonu **6**. Tā kā iepriekš noskaidrojām, ka tieši tetrazolilsulfoni uzrāda visaugstāko selektivitāti, sintezējām tetrazolilsulfonu atvasinājumus **17e–17k**. Jaunsintezētie sulfoni (izņemot sulfonu **17h**, ar kuru reakcija nenotika) tiešām uzrādīja ļoti labu *E/Z* selektivitāti ketona **6** olefinēšanas reakcijā (3. tabula).

Visaugstāko selektivitāti ieguvām ar sulfonu **17j**, kur produkta **1** dubultsaites izomēru *E-1/Z-1* attiecība bija 97:3. Šis rezultāts ļauj izmantot dilaktāmu **1** dabasvielas limazepīna *E* totālajai sintēzei. Būtiski ir tas, ka, izmantojot klasisko olefinēšanu ar mūsu izstrādāto stēriski traucēto sulfona reaģentu, limazepīnu *E* ir iespējams iegūt deviņās lineārās stadijās, salīdzinot ar iepriekš izmantoto 12 stadiju ceļu⁵, kas ir ne vien garāks, bet arī sintētiski ievērojami sarežģītāks.

3. tabula

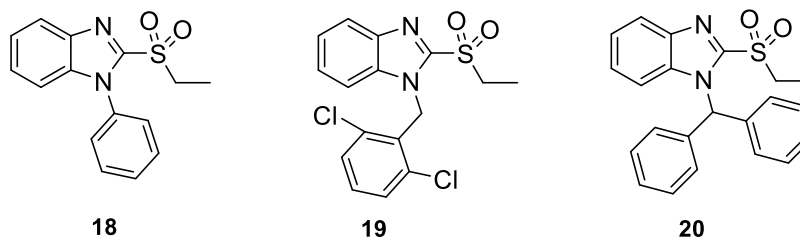
Olefinēšanas reaģenta optimizācija



Sulfons R=	Produkta 1 iznākums	<i>E/Z</i> ^a
17e	68 %	83:17
17f	67 %	94:6
17g	58 %	88:12
17h	nr	—
17i	63 %	95:5
17j	60 %	97:3
17k	30 %	88:12

^a noteikts pēc AESH datiem; nr: reakcija nenotika.

Olefinēšanas pētījumu ietvaros veicām arī dažu benzimidazola sulfonu sintēzi (1. att.), tomēr tie reakcijā ar ketonu **6** neuzrādīja augstu selektivitāti, tādēļ šos pētījumus neturpinājām.



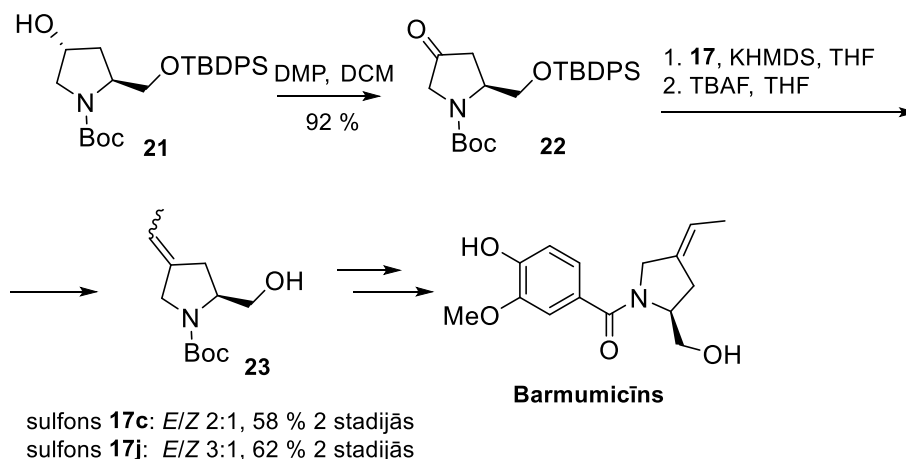
ketona **6** olefinēšana: *E/Z* 68:32

E/Z 71:29

E/Z 70:30

1. att. Benzimidazola sulfoni.

Mūsu izstrādāto Žiliā–Kočinska olefinēšanas modifikāciju pielietojām arī citas dabasvielas – barmumicīna – formālajā totālajā sintēzē (5. shēma). Sintēzi sākām no aizsargāta hidroksiprolinola **21**, ko oksidējām Dess–Martina (*Dess–Martin*) apstākļos. Iegūto ketonu **22** pakļāvām olefinēšanas reakcijai. Lai pārlicinātos par reaģenta efektivitāti, olefinēšanas stadiju veicām ne vien ar jauno, bet arī ar klasisko feniltetrazola reaģentu **17c**. Ketona **19** olefinēšanas reakcijā ar klasisko feniltetrazolilsulfonu **17c** ieguvām *E/Z* selektivitāti 2:1, ar jauno sulfonu **17j** – *E/Z* 3:1. Literatūrā¹⁵ aprakstītajā barmumicīna totālajā sintēzē olefinēšana veikta ar klasisko feniltetrazolilsulfonu un LDA bāzi, iegūstot olefīnu **23** ar 50 % iznākumu un *E/Z* dubultsaites izomēru attiecību 2:1. Līdz ar to var secināt, ka barmumicīna sintēzei, izmantojot mūsu izstrādātos olefinēšanas apstākļus, iespējams uzlabot ne vien literatūrā aprakstīto olefinēšanas reakcijas *E/Z* selektivitāti, bet arī iznākumu.



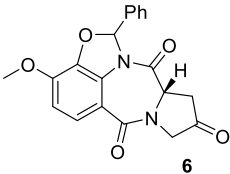
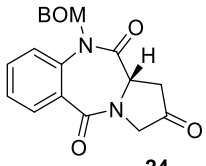
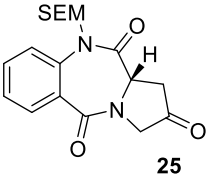
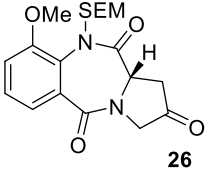
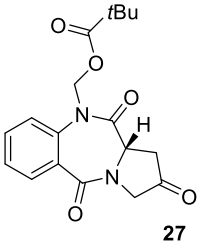
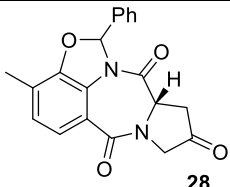
5. shēma. Barmumicīna formālā totālā sintēze.

Barmumicīna formālās totālās sintēzes laikā iegūtie rezultāti (ketona **22** olefinēšana) lika secināt, ka tieši PBD tricikliskās sistēmas (ketona **6** olefinēšana) dod augstāko *E* selektivitāti. Līdz ar to nolēmām izstrādāt plaši lietojamu metodi PBD molekulu olefinēšanai, tas ir, pārbaudīt jaunā olefinēšanas reaģenta ietekmi uz citiem PBD atvasinājumiem. Sākotnēji spekulējām, ka tieši telpiski apjomīgā benzilidēnamināla aizsarggrupa ketonā **6** nosaka augsto

selektivitāti, tāpēc sintezējām vairākus citus PBD savienojumus ar N10 aizsarggrupām un pārbaudījām to olefinēšanas reakciju gan ar klasisko feniltetrazolilsulfonu **17c**, gan ar mūsu izstrādāto sulfonu **17j** (4. tabula).

4. tabula

Citu PBD substrātu olefinēšana Žiliā–Kočinska apstākļos (nepublicēti rezultāti)^a

Substrāts	Olefinēšanas produktu iznākumi un <i>E/Z</i> attiecība ar sulfonu 17c	Olefinēšanas produktu iznākumi un <i>E/Z</i> attiecība ar sulfonu 17j
 <p>6</p>	<i>E/Z</i> 89:11 68 %	<i>E/Z</i> 97:3 45 %
 <p>24</p>	<i>E/Z</i> 73:27 26 %	<i>E/Z</i> 86:14 26 %, 52 % ^b
 <p>25</p>	<i>E/Z</i> 76:24 23 %	<i>E/Z</i> 88:12 32 %
 <p>26</p>	<i>E/Z</i> 73:27 61 %	<i>E/Z</i> 86:14 36 %, 45 % ^b
 <p>27</p>	<i>E/Z</i> 73:27 39 %, 58 % ^b	<i>E/Z</i> 86:14 29 %
 <p>28</p>	<i>E/Z</i> 92:8 29 %, 39 % ^b	<i>E/Z</i> 97:3 35 %, 55 % ^b

^a reakcijas apstākļi KHMDS, THF, –78 °C, 40 min;

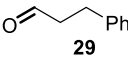
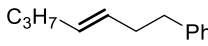
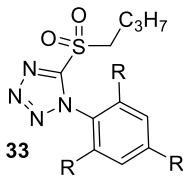
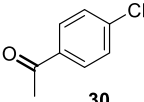
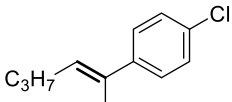
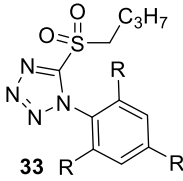
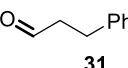
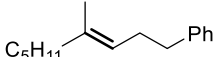
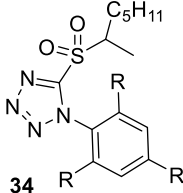
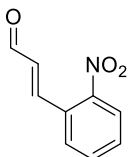
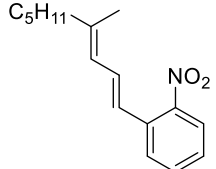
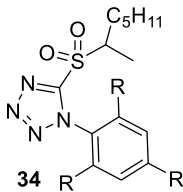
^b iznākums, rēķinot pēc atgūtās izejvielas.

Kā redzams 4. tabulā, arī citi PBD substrāti uzrāda augstu selektivitāti olefinēšanas reakcijā. Izmantojot mūsu izstrādāto sulfonu **17j**, novērojama augstāka *E/Z* selektivitāte, salīdzinot ar klasisko Žiliā–Kočinska reaģentu **17c**. Tomēr substrātos, kuros benzilidēnamīnāla aizsarggrupa aizstāta ar citām – BOM (**24**), SEM (**25**, **26**), pivaloilmetil- (**27**) – uzrādītā selektivitāte ir zemāka nekā ketona **6** gadījumā. Interesanti, ka ketonam **6** strukturāli vislīdzīgākais savienojums **28** uzrāda tieši tādu pašu *E/Z* selektivitāti kā ketons **6**.

Lai noskaidrotu jaunizstrādāto reaģentu pielietojuma robežas, nolēmām tos pārbaudīt arī uz dažiem literatūrā aprakstītiem aldehīdiem un ketoniem (**29**, **30**, **31**, **32**), kuru olefinēšanas reakcija ar līdz šim zināmajām metodēm nav stereoselektīva.

5. tabula

Literatūrā zināmu substrātu Žiliā–Kočinska olefinēšanas salīdzinājums, izmantojot klasisko feniltetrazolilsulfona reaģentu un jaunizstrādāto tricikloheksilfeniltetrazolilsulfona reaģentu (nepublicēti rezultāti)^a

Substrāts	Produkts	Sulfons	R=H	R=cHex
 29		 33	<i>E/Z</i> 87:13 92 %	<i>E/Z</i> 88:12 86 %
 30		 33	<i>E/Z</i> 75:25 48 %	<i>E/Z</i> 30:70 40 %
 31		 34	<i>E/Z</i> 78:22 19 %	<i>E/Z</i> 58:42 56 %
 32		 34	<i>E/Z</i> 54:46	<i>E/Z</i> 43:57

^a reakcijas apstākļi: KHMDS, THF, –78 °C, 40 min.

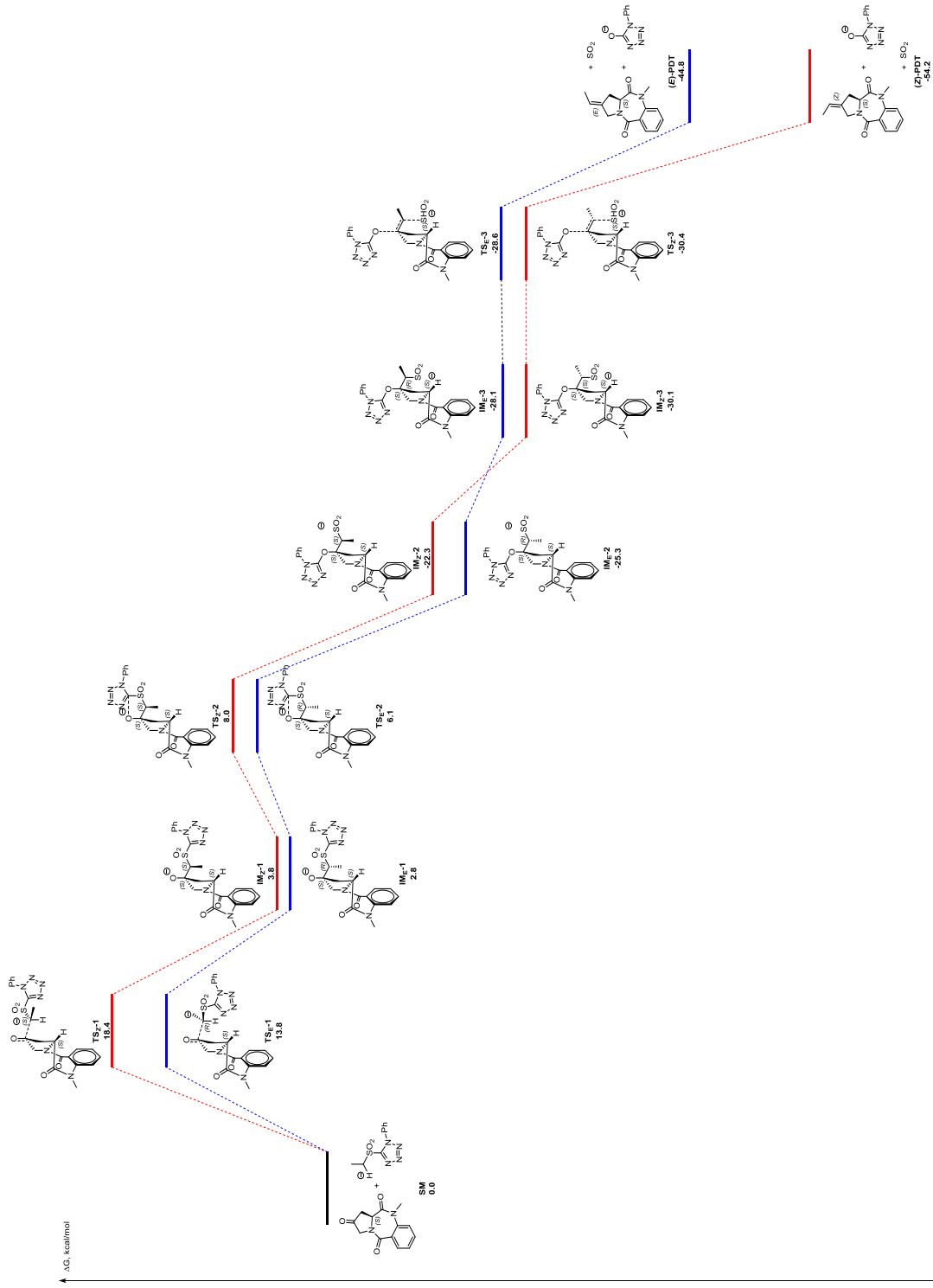
Sintezējām nepieciešamos olefinēšanas reaģentus **33** un **34** un – tāpat kā iepriekš – veicām olefinēšanas reakciju gan ar klasisko feniltetrazola reaģentu **17c**, gan ar jaunizstrādāto cikloheksilaizvietoto reaģentu **17j**. Kā redzams 5. tabulā, vienkāršotu substrātu gadījumā nav novērojama selektivitātes uzlabošanās, izmantojot mūsu izstrādātos olefinēšanas reakcijas apstākļus. Tikai aldehīda **29** olefinēšanā iegūtā *E/Z* izomēru attiecība, izmantojot jaunizstrādāto tricikloheksilfeniltetrazolilsulfona reaģentu un klasisko feniltetrazolilsulfona reaģentu ir līdzīga, savukārt substrātu **30**, **31** un **32** gadījumā, kur olefinēšanas rezultātā rodas trīsaizvietotu dubultsaiti saturoši produkti, selektivitāte samazinās. Interesanti, ka ketona **30** olefinēšanā klasiskais feniltetrazolilsulfons (**33**, R=H) uzrāda labu *E* selektivitāti, savukārt mūsu cikloheksilaizvietotais tetrazolilsulfons (**33**, R=*c*Hex) ir *Z* selektīvs. Tā kā iegūtie rezultāti ir nekonsekventi, visticamāk, atkarībā no substrāta olefinēšanas reakcijā dominē dažādi pārejas stāvokļi. Šis fenomens plaši aprakstīts literatūrā¹⁶.

Vienkāršotos substrātos nenovērojām selektivitātes uzlabošanos, izmantojot mūsu izstrādātos olefinēšanas apstākļus, tāpēc pētījumus šajā virzienā neturpinājām.

Lai pētītu olefinēšanas reakcijas mehānismu PBD molekulās, sadarbībā ar OSI pētnieku *Dr. chem. Arti Kinēnu* tika veikti DFT aprēķini. Tajos izmantots PBD dilaktāms, kas N10 pozīcijā satur metilgrupu, un klasiskais feniltetrazolilsulfons (2. att.). Tika noskaidrots, ka nukleofilā pievienošanās karbonilgrupai ir olefinēšanas ātrumu limitējošā stadija. Otrā stadija ir Smailsa (*Smiles*) pārgrupēšanās, kuras laikā tetrazola vienība migrē no S atoma uz O atomu. Tālāk seko jaunizveidotās C-C saites rotācija, veidojoties stabilākajam rotācijas izomēram, kurā abas aizejošās grupas atrodas anti-periplanārā stāvoklī. Visbeidzot, eliminējoties aizejošajām grupām, veidojas olefīns. Enerģijas starpība abiem iespējamajiem ceļiem ātrumu limitējošajā stadijā ir 4 kcal/mol, līdz ar to vairāk izdevīgais pārejas stāvoklis izraisa *E* konfigurācijas dubultsaites veidošanos.

Šajā nodaļā aprakstīto pētījumu rezultātā tika izstrādāta Žiliā–Kočinska olefinēšanas modifikācija, kas ietver jaunu, stēriski apjomīgu ariltetrazolilsulfonu izmantošanu stereoselektīvai trīsaizvietotas dubultsaites ievadīšanai. Izmantojot izstrādāto olefinēšanas modifikāciju, tika veikta dabasvielu limazepīna *E* un barmumicīna formālā totālā sintēze. Limazepīna *E* gadījumā jaunā metode ļāva šo dabasvielu iegūt deviņās stadijās, kas ir par trīs mazāk, salīdzinot ar iepriekš mūsu grupā izstrādāto 12 stadiju sintēzi⁵. Lai noskaidrotu jaunizstrādāto reaģentu pielietojuma robežas, tie tika pārbaudīti ne vien PBD, bet arī vienkāršotos substrātos. Sadarbībā ar OSI pētnieku *Dr. chem. Arti Kinēnu* tika veikti DFT aprēķini reakcijas mehānisma pētīšanai.

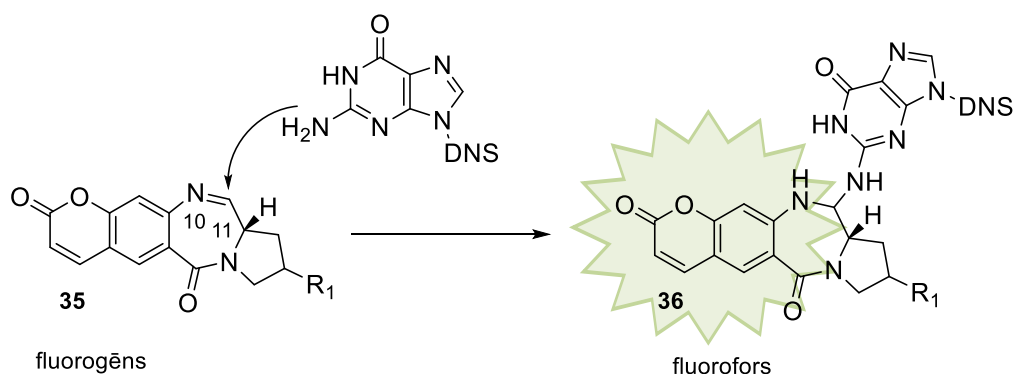
Oriģinālpublicācija par šajā nodaļā aprakstītajiem pētījumiem atrodama 4. pielikumā.



2. att. DFT aprēķini olefinēšanas reakcijai (nepublicēti rezultāti).

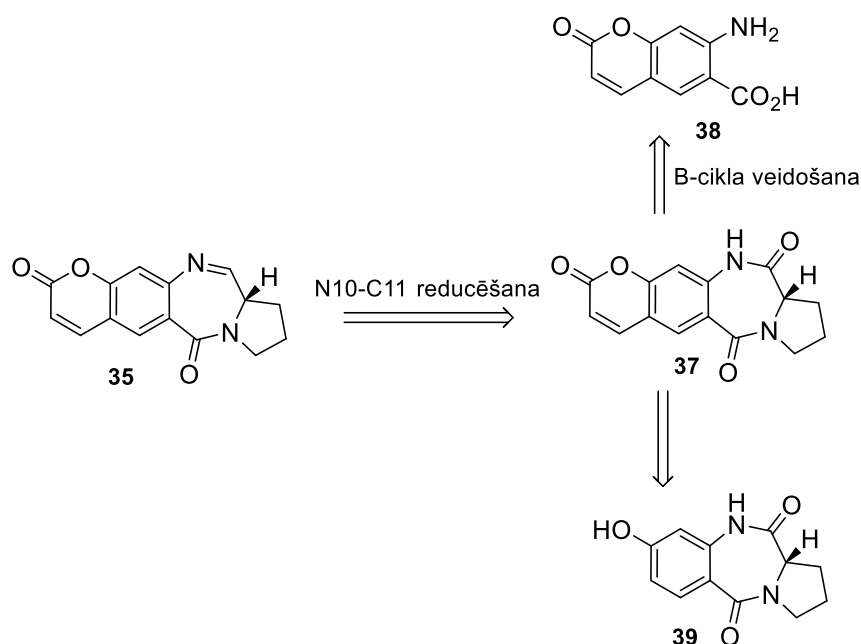
4. Pētījumi par PBD-kumarīna hibrīda sintēzi

Izpratne par DNS mērķsavienojumu lokalizāciju šūnā ir ļoti nozīmīga, jo pastāv varbūtība, ka šie savienojumi iedarbosies ārpus mērķa, kas var mazināt to spēju sasniegt genomu un izraisīt vēlamo reakciju. Salīdzinoši maz pētīta lokalizācija šūnā savienojumiem, kas kovalenti saistās DNS mazajā iedobē, kur neselektīvas reakcijas ar nukleofīliem var būt problemātiskas. Lai novērtētu PBD lokalizāciju šūnā un tās korelāciju ar citotoksicitāti, ir sintezēti PBD un fluorescējošu savienojumu konjugāti, taču, izmantojot šādu pieeju, iegūtais savienojums jau pirms *in vitro* eksperimentiem ir fluorescējošs.⁹ Jaunās metodes balstās uz nefluorescējošu savienojumu spēju nokļūt šūnā un specifiski reaģēt, veidojot reakcijas rezultātā labi fluorescējošu vielu. PBD selektīvi un kovalenti C11 pozīcijā saistās ar eksociklisko guanīna slāpekli DNS ķēdē.¹ 7-Aminokumarīni ir zināmi kā labi fluorescējoši savienojumi, tāpēc viens no promocijas darba uzdevumiem bija izstrādāt sintēzes metodi PBD-kumarīna hibrīda **35** iegūšanai. Šai vielai nevajadzētu būt fluorescējošai, taču tā eventuāli veidotu fluorescējošu 7-aminokumarīna aduktu **36**, saistoties ar DNS guanīna aminogrupu (6. shēma). Savienojumā **35** pirolobenzodiazepīna aromātiskais cikls tiek izmantots kā kumarīna fragmentu veidojošais struktūrelements.



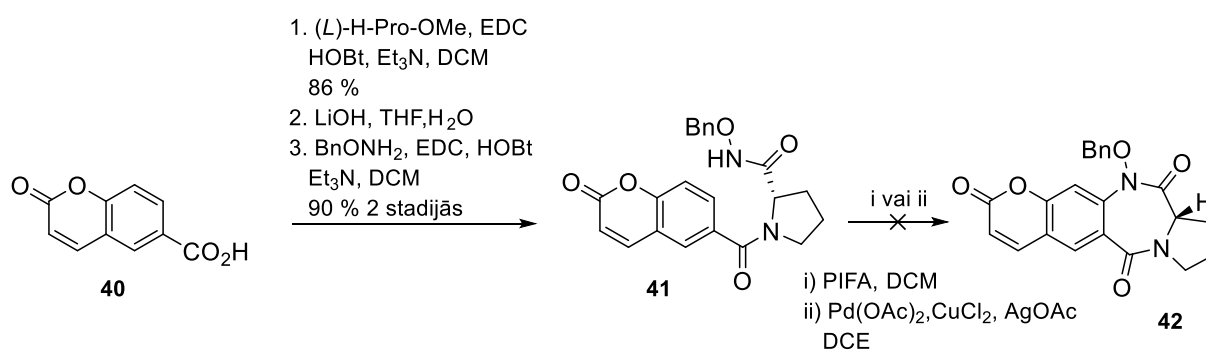
6. shēma. Hipotētiskā PBD-kumarīna hibrīda **35** reakcija ar DNS guanīna aminogrupu.

Ir zināms, ka PBD imīni ir labili augstās reaģētspējas dēļ, tāpēc kā pēdējā stadija mūs interesējošā PBD-kumarīna hibrīda **35** sintēzei bija plānota nestabilās N10-C11 imīna funkcijas ieviešana, reducējot dilaktāmu **37**. Dilaktāma **37** iegūšanai potenciāli iespējamas divas stratēģijas (7. shēma). Viena no stratēģijām būtu PBD B cikla veidošana, kas ļautu iegūt funkcionalizētu kumarīnu **38**. Otra stratēģija balstās uz piranona gredzena ciklizēšanu, kas ļautu iegūt PBD atvasinājumu **39**. Abas šīs stratēģijas tika izmantotas dilaktāma **37** sintēzei.



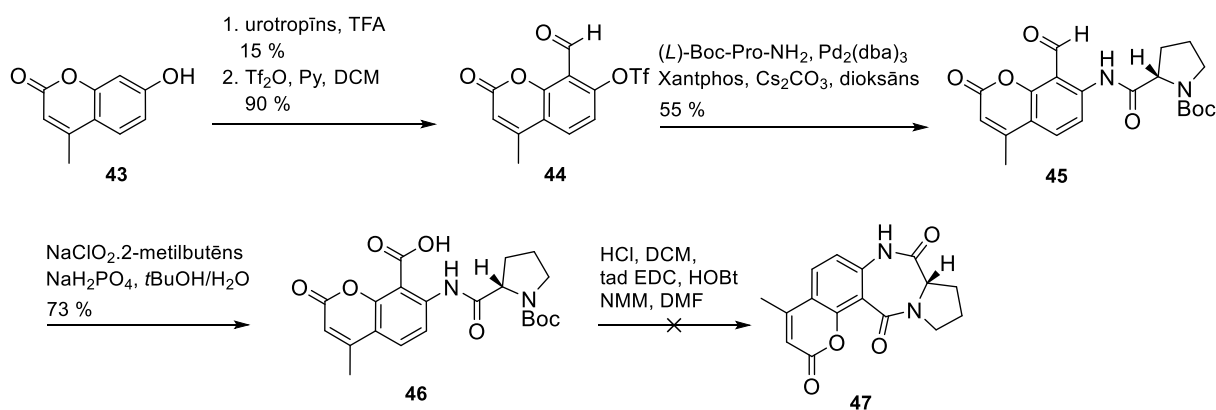
7. shēma. PBD-kumarīna hibrīda **35** retrosintēzes shēma.

Pētījumu iesākām ar B cikla veidošanu uz kumarīnkarbonskābes **40** bāzes. Šai pieejai nepieciešamo izejvielu **41** sintezējām ar augstiem iznākumiem trīs stadiju sekvencē no komerciāli pieejamās kumarīnkarbonskābes **40** (8. shēma). Viena no sintēzes metodēm balstījās uz analogiju ar literatūrā zināmu PIFA mediētu iekšmolekulāru ciklizāciju¹⁷ N-benziloksiamīda grupu saturošā savienojumā **41**. Diemžēl substrāta **41** gadījumā novērojām tikai tā degradāciju, un vēlamais reakcijas produkts **41** maisījumā neveidojās. Izmēģinājām arī palādija katalizētu ciklizāciju, taču arī šajā gadījumā novērojām tikai izejvielas degradāciju.



8. shēma. PBD-kumarīna hibrīda sintēze, izmantojot iekšmolekulāru ciklizāciju.

Otra sintēzes metode balstījās uz palādija katalizētu trifiloksikumarīnkarbaldehīda **44** amidēšanas reakciju¹⁸ (9. shēma).

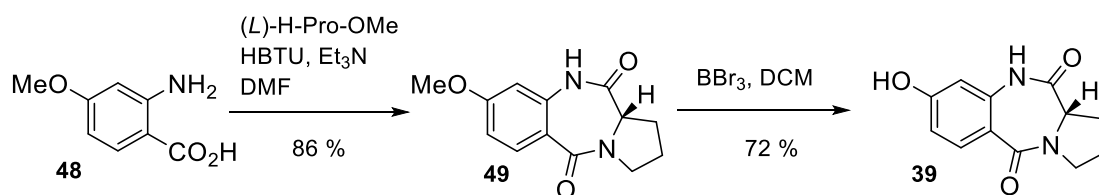


9. shēma. PBD-kumarīna hibrīda sintēze, izmantojot palādijs katalizētu amidēšanu.

Sintēzi sākām no komerciāli pieejamā hidroksikumarīna **43**. To formilējot un pēc tam starpproduktam reaģējot ar trifililanhidrīdu, ieguvām trifililoksikumarīnkarbaldehīdu **44** un veicām palādijs katalizētu amidēšanas reakciju ar prolīnamīdu. Iegūto aldehīdu **45** oksidējām par karbonskābi **46** Pinnika (*Pinnick*) apstākļos. Lai arī veiksmīgi tika nošķelta BOC aizsarggrupa, tomēr iegūtās aminoskābes tālāka konversija par attiecīgo laktāmu **47** netika novērota. Paaugstinot reakcijas temperatūru, notika minētā starpsavienojuma degradācija.

Kā redzams, savienojumam **47** ir cita topoloģija nekā plānotajam kumarīna-PBD hibrīdam **35**. Lai gan literatūrā¹⁹ aprakstītā hidroksikumarīna **43** formilēšana notiek 6. pozīcijā, izmantojot identiskus reakcijas apstākļus, kā vienīgo produktu izdalījām 8. pozīcijā formilētu kumarīnu **44**. Arī reakcijas iznākums bija tikai 15 %, salīdzinot ar 48 %, kas atrodams literatūrā. Savienojuma **47** topoloģijai nevajadzētu ietekmēt dilaktāma reducēšanu un iegūtā imīna spēju saistīties ar DNS, tāpēc izmantojām iegūto 8. pozīcijā formilēto kumarīnu **44**.

Šī stratēģija nedeva vēlamu rezultātu, tad veicām arī otru pieeju, tas ir, kumarīna cikla veidošanu jau esošā PBD sistēmā. Šim nolūkam sintezējām dilaktāmu **39**, ko ar augstiem iznākumiem ieguvām no antranilskābes atvasinājuma **48** (10. shēma).

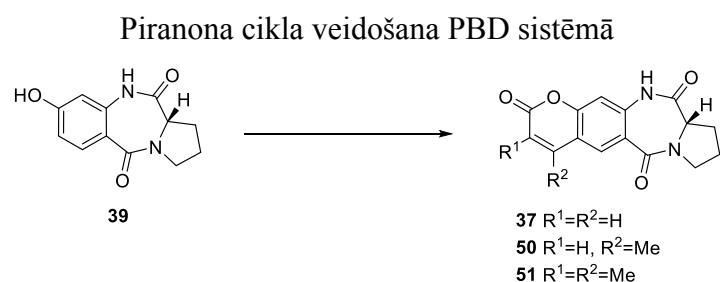


10. shēma. Dilaktāma **39** sintēze.

Lai iegūtu nepieciešamo PBD-kumarīna hibrīdu, izmēģinājām dažādas literatūrā aprakstītas metodes kumarīnu iegūšanai no attiecīgajiem fenoliem (6. tabula). Gan Brensteda (Nr. 1), gan arī Luisa skābes (Nr. 2) katalizētā fenola **39** kondensācijā ar propiolkābi novērojām tikai substrāta **39** degradēšanos. Līdzīgi arī platīna katalizēta ciklizācija (Nr. 3) neizdevās. Arī Luisa skābes (Nr. 4) vai palādijs (Nr. 5) katalizētā etilpropiolāta un fenola **39** ciklizācijas reakcijā novērojām tikai izejvielas **39** degradēšanos. Savukārt fenola **39** Pehmana (*Pechmann*) kondensācija ar ābolskābi deva vēlamu produktu ar 15 % iznākumu (Nr. 6).

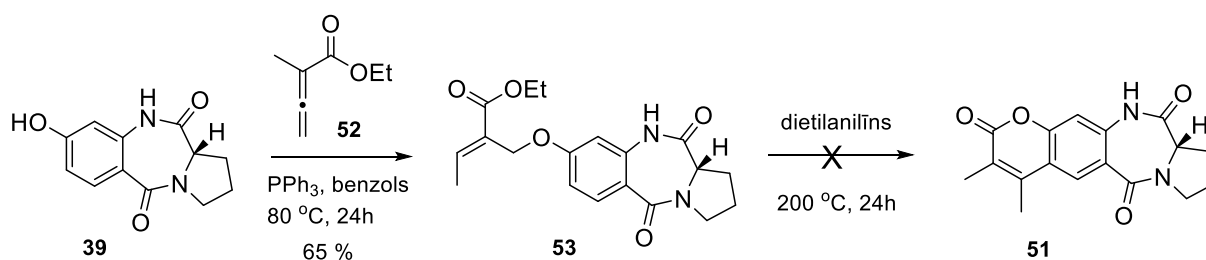
Veicām arī Brensteda (Nr. 7) un Luisa (Nr. 8) skābes katalizētu fenola **39** kondensāciju ar acetetiķesteri, taču arī šajā gadījumā novērojām tikai izejvielas **39** degradēšanos.

6. tabula



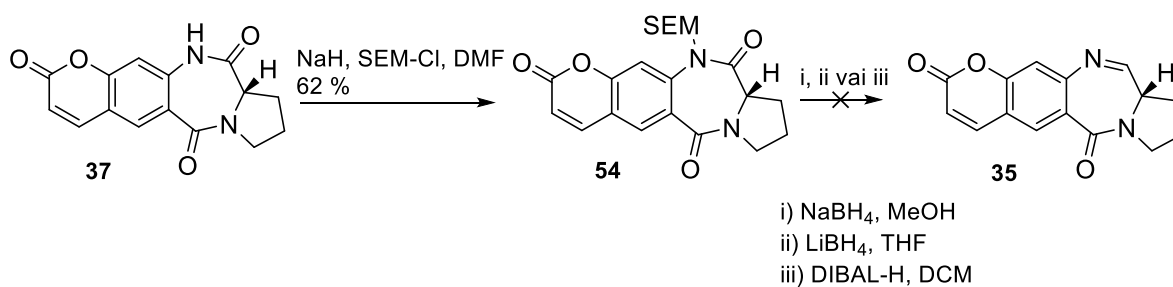
Nr.	Reāģents	Reakcijas apstākļi	Produkts	Iznākums
1		TfOH, hlorbenzols, 1 h, 100 °C ²⁰	37	<5 %
2		Yb(OTf) ₃ , dioksāns, 10 min, 90 °C ²¹		<5 %
3		TFA, K ₂ PtCl ₄ , AgOTf, 24 h, ist. t. ²²		<5 %
4		ZnCl ₂ , dioksāns, 1 h 110 °C ²³	37	<5 %
5		Pd(dba) ₃ ·CHCl ₃ , NaOAc, HCOOH ²⁴		<5 %
6		H ₂ SO ₄ , 0,5 h ist. t., tad 18 h 120 °C ²⁵	37	15 %
7		70 % H ₂ SO ₄ EtOH šķīdums, 16 h, ist. t. ²⁶	50	<5 %
8		AlCl ₃ , nitrobenzols, 3 h, 130 °C ²⁷		<5 %

Dimetilaizvietotu kumarīnu **51** mēģinājām iegūt aktivēta allēna **52** reakcijā ar PBD dilaktāma fenola grupu (11. shēma)²⁸. Sintezējām nepieciešamo allēnu **52** un pakļāvām reakcijai ar PBD substrātu **39**, iegūstot vēlamo starpproduktu **53** ar labu iznākumu. Tālāk plānojām veikt termisku Klaižena pārgrupēšanu, laktonizācijas un dubultsaites izomerizācijas sekvenci, lai iegūtu dilaktāmu **51**, tomēr vēlamais produkts neveidojās. Vienīgais veiksmīgais eksperiments bija dilaktāma **39** reakcija ar ābolskābi, kurā plānotais PBD-kumarīna hibrīda dilaktāms **37** veidojās, taču – ar zemu iznākumu (6. tabula).



11. shēma. Dimetilaizvietota kumarīna **51** sintēze.

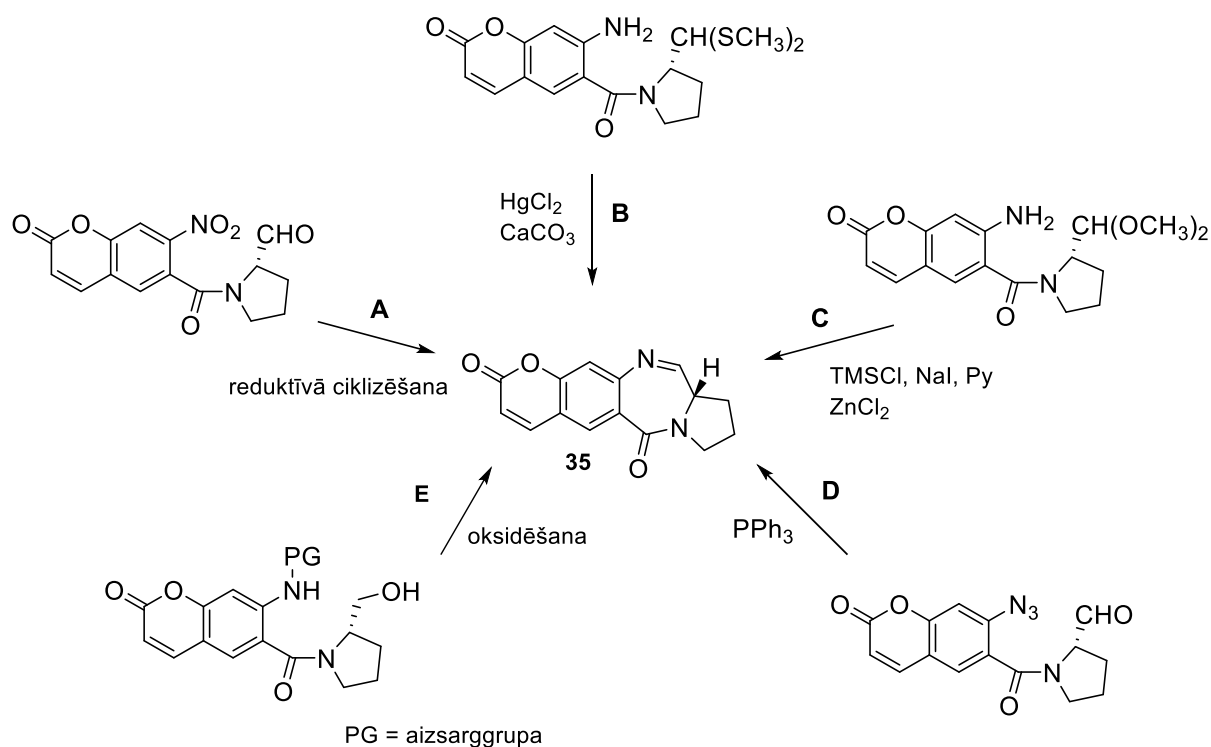
Ieguvuši pietiekamu daudzumu nepieciešamā kumarīna-PBD hibrīda dilaktāmu **37**, plānojām sintezēt PBD darbības mehānisma pētīšanai nepieciešamo PBD-kumarīna hibrīda imīnu **35** (12. shēma). Ir zināms, ka PBD dilaktāma reducēšanai nepieciešama aktivēšana.²⁹ Šim nolūkam aizsargājām amīda **37** slāpekli ar SEM aizsarggrupu un iegūto savienojumu **54** reducējām, izmantojot vairākus reducēšanas reaģentus – NaBH₄, LiBH₄ un DIBAL-H, tomēr plānoto imīnu **35** neieguvām. Analizējot KMR spektrus, novērojām, ka izmaiņas ir notikušas kumarīna ciklā, acīmredzot, tas nav stabils reducēšanas apstākļos. Lai gan plānoto PBD-kumarīna hibrīdu **35** neizdevās iegūt, tika izstrādāta 3 stadiju sintēzes metode tā dilaktāma **37** iegūšanai.



12. shēma. Imīna **35** sintēzes mēģinājumi.

PBD-kumarīna hibrīda **37** amīda grupas reducēšana ir problemātiska, tāpēc turpmākajiem pētījumiem būtu jāizmanto tiešas imīna sintēzes metodes. Literatūrā²⁹ ir zināmas vairākas pieejas PBD imīna cikla saslēgšanai, kur kā elektrofilā grupa tiek izmantots aldehīds, aizsargāts aldehīds (dialkilacetāls vai tioacetāls) un spirta grupa, kas var tikt oksidēta par aldehīdu ciklizēšanas stadijā (13. shēma). Šīs metodes varētu izmantot arī PBD-kumarīna konjugātu sintēzei.

A pieejā aldehīda grupa nav aizsargāta, un vispirms tiktu reducēta nitrogrupa, kas dod iespēju ciklizācijai. B pieejā kā elektrofilo grupu var ieteikt dimetiltioacetālu. Šīs metodes galvenais ieguvums ir tas, ka var izvairīties no C11a hirālā centra racemizācijas. C pieejā aldehīds tiktu aizsargāts dimetilacetāla formā. Pēc aizsarggrupas nošķelšanas viegli skābos apstākļos aldehīds reaģē ar aminogrupu. Šīs metodes trūkums varētu būt bieži novērotā racemizācija. D metode ietver secīgu azidoaldehīda Štaudingera (*Staudinger*) / iekšmolekulāru aza-Vitiga (*aza-Wittig*) reakciju. Substrāta reakcijā ar trifenilfosfīnu *in situ* veidojas iminofosforāns, kas tālāk stājas iekšmolekulārā aza-Vitiga reakcijā. E metodē pēc oksidatīvas ciklizēšanās vispirms veidots N-aizsargāts N10-C11 karbinolamīns, kas pēc aizsarggrupas nošķelšanas veidotu attiecīgo imīnu.



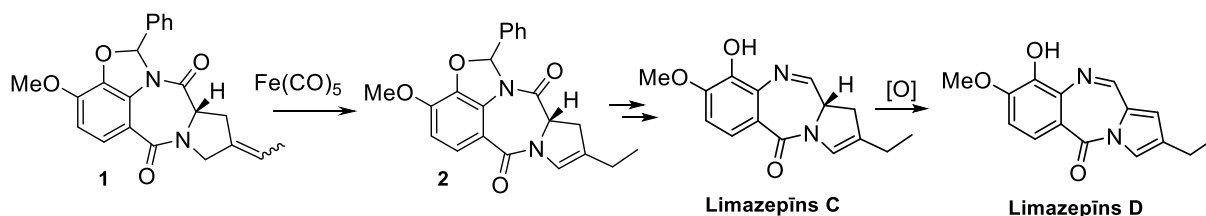
13. shēma. Imīna **35** potenciālās sintēzes metodes.

Šajā nodaļā aprakstītajos pētījumos tika pārbaudītas divas atšķirīgas pieejas PBD-kumarīna konjugātu iegūšanai. No 11 izmēģinātajām metodēm tikai Pehmana kondensācijā izdevās iegūt vēlamo hibrīdu ar 15 % iznākumu. Izstrādātā metodoloģija ļauj iegūt PBD-kumarīna hibrīdu trīs stadijās, sākot no komerciāli pieejamām izejvielām. Diemžēl neizdevās reģioselektīvi reducēt C11 karbonilgrupu, lai iegūtu N10-C11 imīnu, kas eventuāli spētu kovalenti saistīties ar DNS un veidot fluoroforu aduktu.

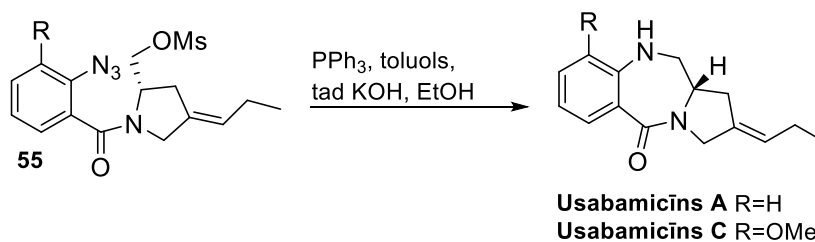
Oriģinālpublikācija par šajā nodaļā aprakstītajiem pētījumiem atrodama 5. pielikumā.

SECINĀJUMI

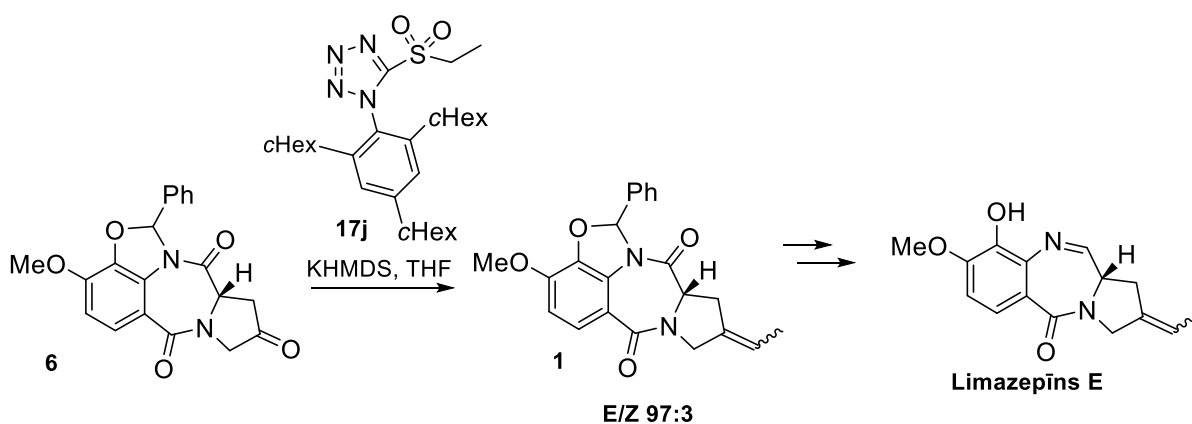
1. Dzelzs pentakarbonila katalizēta dubultsaites migrācija savienojumā (*E,Z*)-**1** ir termodinamiski noteikta: gan *E*-**1**, gan *Z*-**1** dod savienojumu **2**. Šis novērojums ļauj dabasvielas limazepīna C totālajai sintēzei izmantot ketona **1** dubultsaites izomēru maisījumu. Limazepīns C ir nestabils un uzglabājot oksidējas par limazepīnu D.



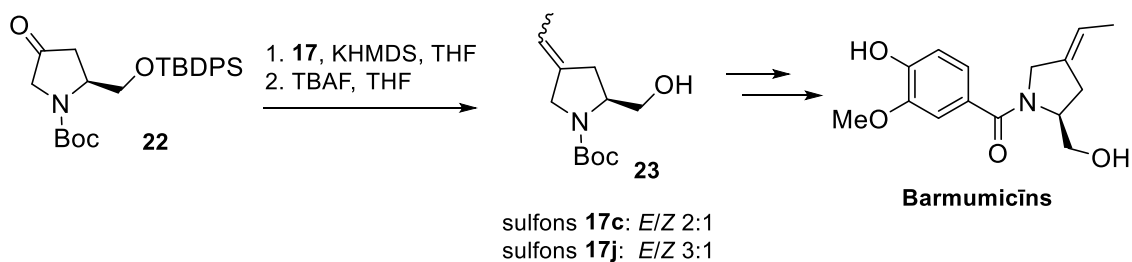
2. Piesātināto B ciklu usabamicīnā A un usabamicīnā C iespējams iegūt, izmantojot šādās sistēmās iepriekš neaprakstītu ciklizēšanas pieeju, kas ietver azīda **55** reakciju ar trifenilfosfīnu un tai sekojošu iminofosforāna starpsavienojuma iekšmolekulāru ciklizāciju un hidrolīzi.



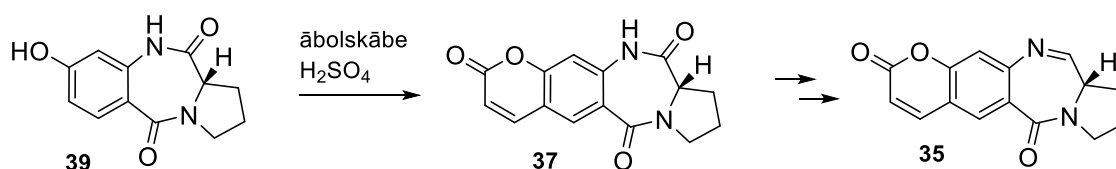
3. Visaugstākā *E/Z* selektivitāte (97:3) ketona **6** olefinēšanas reakcijā iegūstama Žiliā–Kočinska reakcijā, izmantojot mūsu sintezēto sulfonu **17j**. Tas ļauj veikt dabasvielas limazepīna E totālo sintēzi vienkāršā deviņu stadiju sekvencē, salīdzinot ar iepriekš aprakstīto sarežģīto 12 stadiju sintēzi. Mūsu izstrādātā Žiliā–Kočinska olefinēšanas modifikācija ir efektīva ne vien ketona **6**, bet arī citu PBD substrātu olefinēšanai.



4. Mūsu izstrādātā Žiliā–Kočinska olefinēšanas reakcijas modifikācija, izmantojot sulfonu **17j**, uzlabo arī selektivitāti dabasvielas barmumicīna iegūšanai nepieciešamā ketona **22** olefinēšanā, salīdzinot ar klasisko feniltetrazolilsulfonu **17c**.



5. Kumarīna-PBD hibrīda imīna **35** iegūšana ir problemātiska, tomēr ir iespējams iegūt tā dilaktāmu **37**, izmantojot fenola **39** Pehmana kondensāciju ar ābolskābi.



LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Gill, R.; Kaushik, S.; Chaug, J.; Bansal, S.; Shan, A.; Bariwal, J. *Mini-Rew. Med. Chem.* **2014**, *14*, 229–256.
2. Leimgruber, W.; Batcho, A. D.; Czajkowski, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5641.
3. Mantaj, J.; Jackson, P. J. M.; Rahman, K. M.; Thurston, D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 462–488.
4. Gregson, S. J.; Howard, P. W.; Corcoran, K. E.; Barcella, S.; Yasin, M. M.; Hurst, A. A.; Jenkins, T. C.; Kelland, L. R.; Thurston, D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1845–1847.
5. Smits, G.; Zemribo, R. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4406–4409.
6. Mori, M.; Uozumi, Y.; Kimura, M.; Ban, Y. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3793–3806.
7. Junutula, J.; Jammalamadaka, V. Isoquinolidinobenzodiazepines. WO/2016/149546, Sep 23, 2016.
8. Howard, P. W.; Gregson, S.; Taylor, P. W.; Thurston, D. E.; Hadjivassileva, T. S. Pyrrolobenzodiazepines. WO2005085260(A1), Sep 15, 2005.
9. Wells, G.; Suggitt, M.; Coffils, M.; Baig, M. A. H.; Howard, P. W.; Loadman, P. M.; Hartley, J. A.; Jenkins, T. C.; Thurston, D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2147–2151.
10. Rahman, K. M.; Corcoran, D. B.; Bui, T. T.; Jackson, P. J.; Thurston, D. E. *PloS one*, **2014**, *9*, e105021.
11. Fotso, S.; Zabriskie, T. M.; Proteau, P. J.; Flatt, P. M.; Santosa, D. A.; Mahmud, S.; Mahmud, T.; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 690–695.
12. Zacuto, M. J.; Xu, F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6298–6300.
13. Neugnot, B.; Cintrat, J.-C.; Rousseau, B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3575–3579.
14. Sato, S.; Iwata, F.; Yamada, S.; Kawahara, H.; Katayama, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7099–7101.
15. Lorente, A.; Pla, D.; Canedo, L. M.; Albericio, F.; Alvarez, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8508–8515.
16. Robiette, R.; Prospisil, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *5*, 836–840.
17. Correa, A.; Tellitu, I.; Dominguez, E.; Moreno, I.; SanMartin, R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2256–2264.
18. Yin, J.; Buchwald, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043–6048.
19. Gong, P.; Zhai, X.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Ma, J. Preparation of semicarbazone derivatives for treatment and/or prevention of cancer. CN 104230845, Dec 24, 2014.
20. Choi, H.; Kim, J.; Lee, K. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3600–3603.
21. Fiorito, S.; Epifanu, F.; Taddeo, V. A.; Genovese, S. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2939–2942.
22. Oyamada, J.; Kitamura, T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6918–6925.
23. Timonen, J. M.; Nieminen, R. M.; Sareila, O.; Goulas, A.; Moilanen, L. J.; Haukka, M.; Vainiotalo, P.; Moilanen, E.; Aulaskari, P. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3845–3850.
24. Raad, I.; Terreux, R.; Richomme, P.; Matera, E.-L.; Dumonet, C.; Raynaud, J.; Guilet, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6979–6987.
25. Sethna, S.; Phadke, R. (2011). *Organic Reactions*. John Wiley & Sons, Inc.
26. Al-Bayati, Redha I.; Ahamad Mohammed R.; Ahamed, Luma S. *J. Am. Org. Chem.* **2015**, *5*, 125–135.
27. Munro, D. Novel fragrance compound. EP 1036792, Sep 20, 2000.
28. Martin, T. J.; Vakhshori, V. G.; Tran, Y. S.; Kwon, O. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2586–2589.
29. Antonow, D.; Thurston, D. E. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2815–2864.

DOCTORAL THESIS PROPOSED TO RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR THE PROMOTION TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (Ph. D.), the present Doctoral Thesis has been submitted for the defence at the open meeting of RTU Promotion Council on December 17, 2020, at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street, Room 272.

OFFICIAL REVIEWERS

Assoc. Professor Dr. chem. Māra Plotniece
Riga Technical University, Latvia

Professor Dr. chem. Edgars Sūna
University of Latvia, Latvia

Principal scientist Dr. chem. Einārs Loža
Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for the review to Riga Technical University for the promotion to the scientific degree of Doctor of Science (Ph. D.) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis had not been submitted to any other university for the promotion to a scientific degree.

Guna Sakaine (signature)

Date:

The Doctoral Thesis has been prepared as a summary in Latvian and English, which is accompanied by a thematically unified set of 4 SCI scientific publications and 1 manuscript. The publications are written in English and their total volume, including their electronic supporting information is 123 pages.

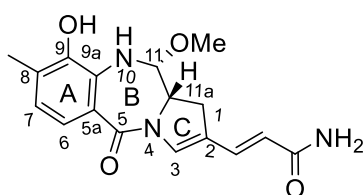
CONTENTS

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS	31
Introduction	31
Aims and Objectives.....	32
Scientific Novelty and Main Results	33
Structure and Volume of the Thesis	33
Publications and Approbation of the Thesis.....	33
MAIN RESULTS OF THE THESIS	35
1. PBD Pyrrolidine Exocyclic Double Bond Migration Studies and the First Total Synthesis of Limazepines C and D	35
2. The First Total Synthesis of Usabamycins A and C.....	37
3. Studies on the Introduction of an Exocyclic Double Bond Into PBD and Simplified Substrates, a Formal Total Synthesis of Limazepine E and Barmumycin.....	38
4. Synthetic Studies Toward PBD-Coumarin Hybrid.....	46
CONCLUSIONS	52
REFERENCES.....	54

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Pyrrolo[1,4]benzodiazepines (PBD) are a broad class of natural products possessing anti-cancer activity by covalently and sequence selectively binding to an exocyclic guanine amino group in the minor groove of DNA.¹ The chiral center of all naturally occurring PBD possesses the *S* configuration, which is essential for their activity. PBD was discovered with the isolation of anthramycin in the 1960s, and that initiated extensive research into this class as a potential anticancer agents.²

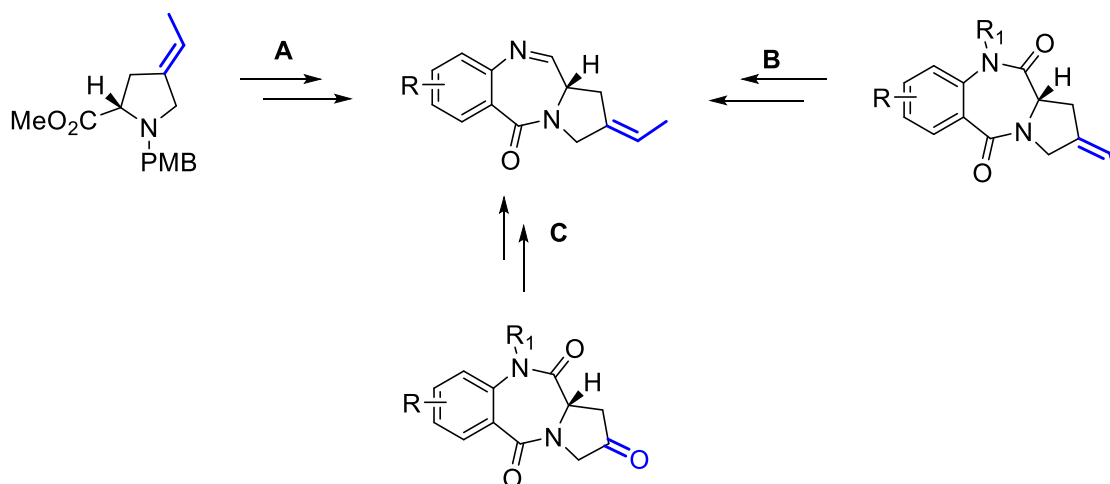


Anthramycin.

Due to the superior anticancer potential of PBDs, many of their analogs have been synthesized over the past 50 years, including dimers capable of “cross-linking” DNA double strand. New natural products of this class are also isolated from microorganisms. PBD dimers have become one of the prominent warhead classes in the antibody–drug conjugate (ADC) development.³ Improved methodologies toward PBD natural products and their synthetic analogues is still an important research direction, since existing synthesis methods are not always sufficiently effective.

A number of naturally occurring PBD possess an *E* configured exocyclic double bond at the C2 position. Synthetically, the construction of such a trisubstituted double bond is often challenging.

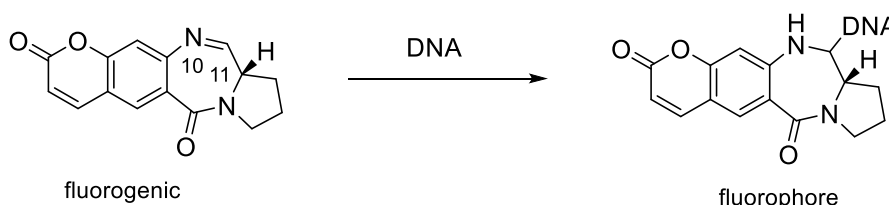
It is important that C2 ethylidene substituted PBD natural products exhibit considerably higher biological activity (*in vitro* cytotoxicity) compared to their methylidene or C2 unsubstituted analogues.⁴ Ethylidene substituted PBD natural products are typically prepared from a prefunctionalized proline derivatives (path A)⁵ or by inversion of double bond geometry in PBD dilactams (path B). The fastest and most efficient way to access alkylidene-PBD would be a late-stage olefination (path C), however, the use of classical olefination methods described so far in PBD systems gives poor *E/Z* selectivity or is *Z* selective.^{6–8} In-depth study of classical olefination methods would allow obtain important alkylidene substituted PBD easier and more efficiently.



Synthesis of PBD containing ethylidene substituent.

A manuscript of the review article on isolation, chemistry, and biological activity of PBD natural products can be found in Appendix 1.

An important aspect of anticancer drugs is their cellular localization. Various PBD adducts with fluorescent compounds, such as 7-aminocoumarins, have been synthesized to evaluate the localization of PBD in the cell and to investigate its correlation with PBD-DNA binding and cytotoxicity.^{9,10} Using this approach, the classical fluorophore 7-diethylaminocoumarin is added with alkyl linker, thereby the PBD molecule is fluorescent already before *in vitro* experiments. In the context of the PBD-DNA alkylation mechanism studies, an attractive alternative would be a fluorogenic PBD that forms a fluorescent derivative only upon binding to DNA.



Binding of a fluorogenic PBD derivative to DNA.

Aims and Objectives

The aim of the Thesis is development of novel synthetic methodologies toward PBD class natural products and their synthetic counterparts. The main focus of the Thesis is the development of efficient methods for a stereoselective introduction of exocyclic double bonds.

The following objectives have been set to reach the aim of the work.

1. To analyze the literature on PBD class natural products and their published total syntheses, paying particular attention to the introduction of a C2 exocyclic double bond substituent and to compile the collected literature in a review article.
2. To investigate the C2 exocyclic double bond migration in the C-ring of PBD and determine if it is stereo- and regioselective.

3. To study the application of Julia–Kocienski reaction for the synthesis of exocyclic double bond containing PBDs; to develop new and more selective reagents for this purpose.
4. To study the synthesis of fluorogenic PBD-coumarin hybrids, which could be further applied for PBD-DNA alkylation mechanism studies.

Scientific Novelty and Main Results

As a result of the research, the first total syntheses of four PBD natural products – limazepine C, limazepine D, usabamycin A, and usabamycin C – were accomplished. Iron pentacarbonyl catalyzed double bond migration reaction was used as a key step in the synthesis of limazepines C and D. In the synthesis of usabamycins A and C, a novel cyclization approach was employed in order to cyclize the B ring. A novel Julia–Kocienski reagents were developed, which allow to introduce a C2 exocyclic double bond substituent in the PDB core with an improved stereoselectivity compared to the previously known reagents. Formal total synthesis of two natural products – limazepine E and barmumycin – was accomplished using the newly developed reagent. The synthesis of novel PBD-coumarin hybrids was studied.

Structure and Volume of the Thesis

The Doctoral Thesis has been prepared as a summary in Latvian and English, which is accompanied by a thematically unified set of 4 scientific publications indexed in SCI databases and 1 manuscript. The publications are written in English and their total volume, including their electronic supporting information is 123 pages.

Publications and Approbation of the Thesis

Results of the Thesis are discussed in 4 publications and 1 publication manuscript:

1. **Sakaine, G.**, Ture, A., Pedroni, J., Smits, G. Isolation, chemistry, and biology of pyrrolo[1,4]benzodiazepine (PBD) natural products (submitted to *Med. Res. Rev.*).
2. **Sakaine, G.**, Smits, G., Arsenyan, P. Synthetic studies toward novel pyrrolobenzodiazepine–coumarin hybrids. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2020**, 56, 572–577.
3. **Sakaine, G.**, Smits, G. Modified Julia–Kocienski reagents for a stereoselective introduction of trisubstituted double bonds: a formal total synthesis of Limazepine E and Barmumycin. *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 5323–5330.
4. **Sakaine, G.**, Zemribo, R., Smits, G. The first total synthesis of usabamycins A and C. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, 58, 2426–2428.
5. **Sakaine, G.**, Smits, G., Zemribo, R. Late stage Fe(CO)₅ promoted double bond migration: total synthesis of limazepines C and D. *Tetrahedron Lett.*, **2015**, 56, 4767–4769.

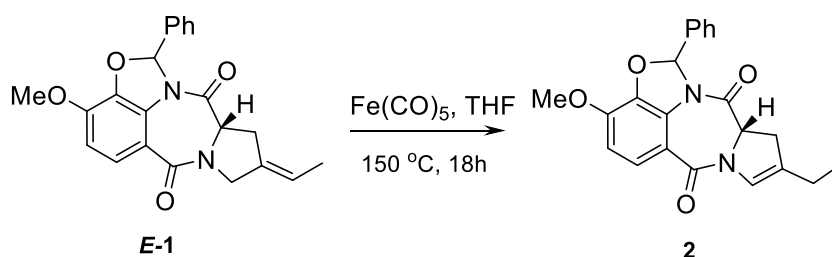
Results of the Thesis were presented at conferences

1. **Sakaine, G.**, Smits, G. Modified Julia–Kocienski reagents for a stereoselective introduction of trisubstituted double bonds: a formal total synthesis of Limazepine E. In: *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2018): Program and Abstracts*, Estonia, Tallinn, 1–4 July 2018. Tallinn: 2018, pp. 130–130.
2. **Sakaine, G.** Total synthesis of Usabamycin C. In: *Latvijas Universitātes 74. konferences ķīmijas sekcijas tēžu krājums*, Latvia, Rīga, 12 February 2016. Rīga: 2016, pp. 16.
3. **Sakaine, G.**, Zemribo, R. Total synthesis of Limazepine C. In: *22nd Young Research Fellows Meeting*, France, Paris, 4–6 February 2015, Paris: 2015, PO-052.
4. **Sakaine, G.**, Zemribo, R. Total synthesis of Limazepine C. In: *9th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry*, Latvia, Riga, 21–22 May 2015. Riga: 2015, pp. 62.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

1. PBD Pyrrolidine Exocyclic Double Bond Migration Studies and the First Total Synthesis of Limazepines C and D

One of the intermediates of the total synthesis of limazepine E done previously in our laboratory was compound **E-1**, which contains an exocyclic double bond with the required *E* configuration.⁵ It was found that it is possible to perform an exocyclic double bond migration reaction in the presence of iron pentacarbonyl and selectively obtain compound **2** as a single regioisomer (Scheme 1).



Scheme 1. Exocyclic double bond migration.

One of the objectives of the dissertation was to study the double bond migration reaction and to find out if it is stereospecific – whether the geometry of the exocyclic double bond in the starting material affects to which position in C-ring the double bond will migrate. For this purpose, we planned to synthesize a compound with inverse double bond geometry **Z-1** and to study its double bond migration reaction. The required substrate was obtained in a sequence of several steps (Scheme 2), starting from nitrobenzoic acid methyl ester **3**. The phenol group in nitrobenzoic acid methyl ester **3** was protected with a benzyl protecting group and the ester group was subsequently hydrolyzed. The obtained nitrobenzoic acid intermediate was condensed with *trans*-4-hydroxy-L-proline methyl ester, and amide **4** was isolated in good overall yield. We found that the fastest and most efficient way for the reduction of the nitro group is palladium-catalyzed hydrogenation. This also allows to cleave the benzyl protecting group at the same time, and without chromatographic purification of the product perform the cyclization in the presence of HCl. A subsequent cyclization resulted in the formation of PBD dilactam, which was protected with a benzyldiene protecting group to give alcohol **5** in good yield and with only one chromatographic purification in three steps. After oxidation under Dess–Martin conditions, we obtained ketone **6**, which was further used for the olefination reaction studies. We first tried the Wittig reaction using different bases – potassium *tert*-butoxide, sodium hydride and sodium bis(trimethylsilyl)amide. Although the formation of the product was observed in the LC/MS, in all cases only a small amount of the product was isolated. The best result (~20 % yield) was obtained using potassium *tert*-butoxide as a base. Characterizing the obtained mixture of double bond isomers by nuclear magnetic resonance spectroscopy, we found that the reaction is non-selective, and the *E* and *Z* isomers are formed in a ratio of 1:1 respectively.

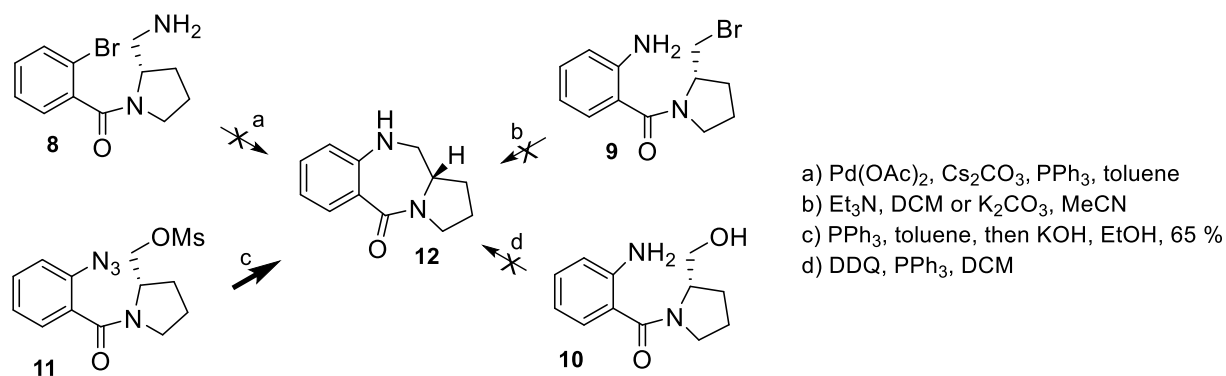
purification, limazepine D was obtained (19 % yield), the NMR spectra of which was in a good agreement with the literature¹¹. The low yield is attributed to the instability and repeated purification of limazepine C.

As a result of the studies described in this chapter, the first total synthesis of PBD natural products limazepine C and limazepine D was accomplished using the iron pentacarbonyl catalyzed allylamide – enamide double bond migration reaction as the key step. The found iron catalyst is significantly cheaper compared to ruthenium¹² and iridium¹³ catalysts, which are typically used for similar transformations. Limazepine C was found to be unstable and oxidizes to limazepine D.

The original publication of the studies described in this chapter can be found in Appendix 2.

2. The First Total Synthesis of Usabamycins A and C

Usabamycins A and C are N10-C11 saturated PBD natural products containing a propylidene substituent at C2.¹⁴ As the initial attempts to obtain a saturated B cycle of these natural products were unsuccessful, we decided to first develop a cyclization method using a model compound and then apply this method to the synthesis of usabamycins A and C.

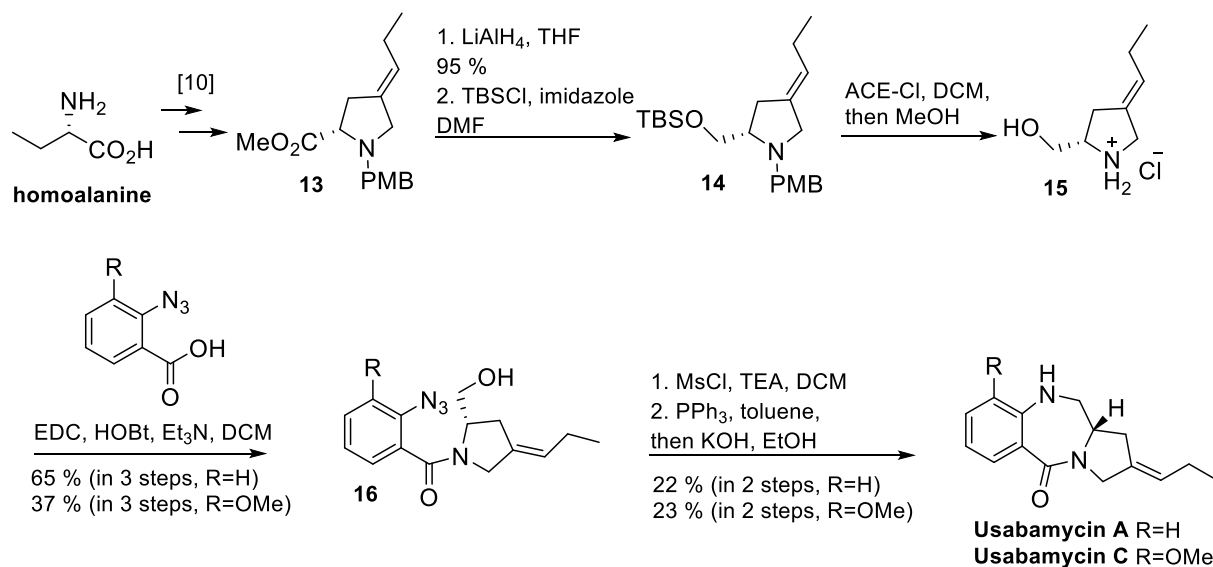


Scheme 3. Cyclization studies of model substrates **8–11**.

For this purpose, we synthesized model substrates **8–11** and studied cyclization by testing different approaches: 1) palladium-catalyzed intramolecular amination of **8**; 2) cyclization of anthranilic acid derivative **9** using different bases; and 3) cyclization of amino alcohol **10**. However, under the above conditions, the desired product **12** was not formed. Finally, the reaction of azide **11** with PPh₃ followed by cyclization and hydrolysis of iminophosphorane afforded compound **12** in decent yield (Scheme 3).

With a cyclization method in hand, we turned our attention towards the total synthesis of usabamycins A and C. In a total synthesis of limazepine E, previously accomplished in our laboratory⁵, the exocyclic double bond was introduced in an Ireland–Claisen rearrangement reaction. This method was also employed in the total synthesis of usabamycins to obtain the propylideneproline building block **13**⁵. The ester group of **13** was reduced and the resulting alcohol was protected with a TBS group. The two protecting groups in compound **14** were cleaved with 1-chloroethyl chloroformate to give the prolinol salt **15**. In the peptide bond

formation reaction with the corresponding azidobenzoic acids and the subsequent mesylation reaction, cyclization precursors **16** were obtained. And finally, employing the previously developed cyclization methodology, usabamycins A and C were obtained, the NMR spectra of which were in a good agreement with the literature¹⁴ (Scheme 4).



Scheme 4. Total synthesis of usabamycins A and C.

The studies described in this chapter resulted in the first total synthesis of the natural products usabamycin A and C. For the formation of the B-ring a novel cyclization approach was employed. It involves the reaction of an azide group with triphenylphosphine followed by intramolecular cyclization and hydrolysis of the iminophosphorane intermediate.

The original publication of the studies described in this chapter can be found in Appendix 3.

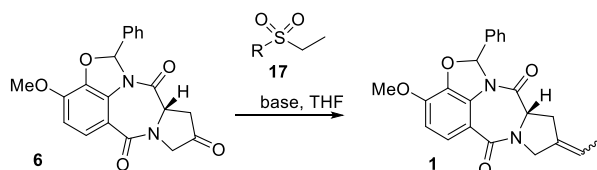
3. Studies on the Introduction of an Exocyclic Double Bond Into PBD and Simplified Substrates, a Formal Total Synthesis of Limazepine E and Barmumycin

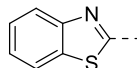

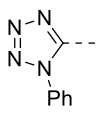
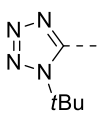
The synthesis of limazepines C and D required the introduction of an ethylidene substituent into the pyrrolidine moiety of ketone **6** (Scheme 2). Although the *E/Z* selectivity for similar substrates in the Julia–Kocienski olefination reactions reported in the literature is 2:1, we obtained the corresponding alkene **1** with significantly higher selectivity without any optimization of the reaction conditions (*E*-**1**/*Z*-**1** 5:1).

We decided to optimize this reaction by testing various olefination reagents and bases described in the literature. Each of the classical olefination reagents **17a**, **17b**, **17c**, and **17d** was tested with 3 different bases. We found that the highest *E/Z* selectivity (89:11) in the olefination of ketone **6** could be obtained using tetrazolyl sulfone reagents **17c** and **17d** and KHMDS as the base (Table 1).

Table 1

Optimization of Olefination Reaction



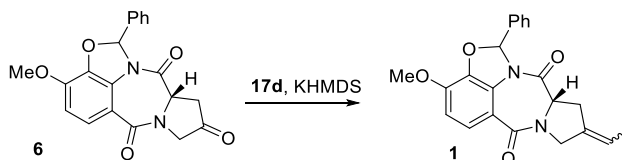
Sulfone R=	Base	Product 1 yield	E/Z
17a 	LiHMDS	66 %	50:50 ^a
	NaHMDS	16 %	55:45 ^a
	KHMDS	nr	—
17b 	LiHMDS	13 %	50:50 ^a
	NaHMDS	10 %	50:50 ^a
	KHMDS	nr	—
17c 	LiHMDS	73 %	73:27 ^b
	NaHMDS	67 %	80:20 ^b
	KHMDS	75 %	89:11 ^b
17d 	LiHMDS	63 %	56:44 ^b
	NaHMDS	53 %	77:23 ^b
	KHMDS	54 %	89:11 ^b

^a determined by ¹H NMR data; ^b determined by HPLC; nr: no reaction.

Solvent optimization was also performed using tetrazolylsulfone **17d** and KHMDS as the base (Table 2). Although the selectivity of the olefination reaction in dichloromethane was 89:11, the previously used tetrahydrofuran proved to be the most suitable solvent for this conversion due to the higher reaction yield.

Table 2

Solvent Optimization



Solvent	Product 1 yield	E/Z ^a
THF	54 %	89:11
DMF	53 %	77:26
DME	10 %	84:16
DCM	34 %	89:11
toluene	44 %	60:40
Et ₂ O	24 %	82:18

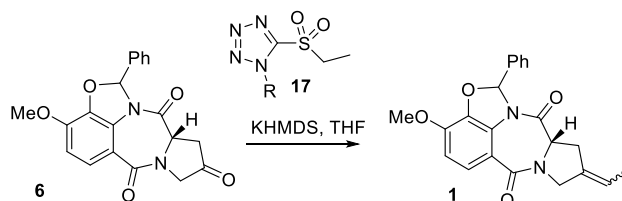
^a determined by HPLC.

We hypothesized that steric effects in the olefination reagent **17** could affect the selectivity of the olefination reaction. We synthesized several sterically demanding reagents previously not described in the literature and tested in the olefination of ketone **6**. The newly synthesized sulfones (except sulfone **17h**, with which the reaction did not occur at all) showed very high *E/Z* selectivity (Table 3).

The highest selectivity was obtained with sulfone **17j**, where the ratio of product **1** double bond isomers *E-1/Z-1* was 97 : 3. The obtained dilactam **1** is an intermediate of the previously reported total synthesis of limazepine E. Importantly, employing olefination with our developed sterically demanding sulfone reagent, it is possible to obtain limazepine E in 9 linear steps compared to the previously published 12-step sequence⁵, which is longer and also synthetically significantly more complex.

Table 3

Olefination Reagent Optimization



Sulfone R=	Product 1 yield	<i>E/Z</i> ^a
17e	68 %	83:17
17f	67 %	94:6
17g	58 %	88:12
17h	nr	—
17i	63 %	95:5
17j	60 %	97:3
17k	30 %	88:12

^a determined by HPLC data; nr: no reaction.

As part of the olefination studies, we also synthesized some benzimidazole sulfones (Fig. 1), however, they did not exhibit high selectivity in the reaction with ketone **6**, therefore we did not continue these studies.

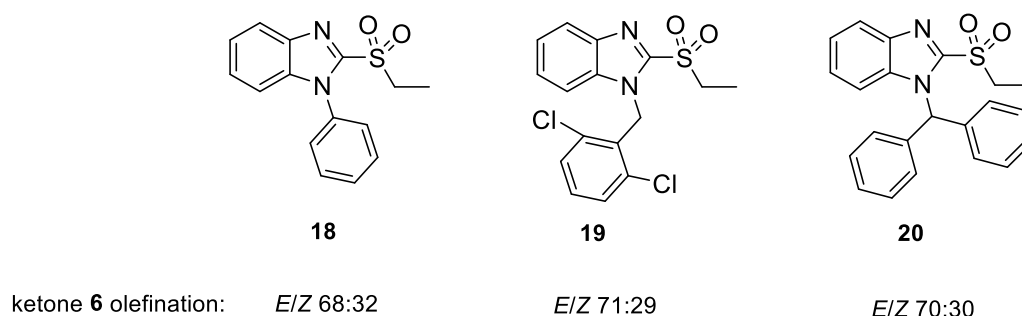
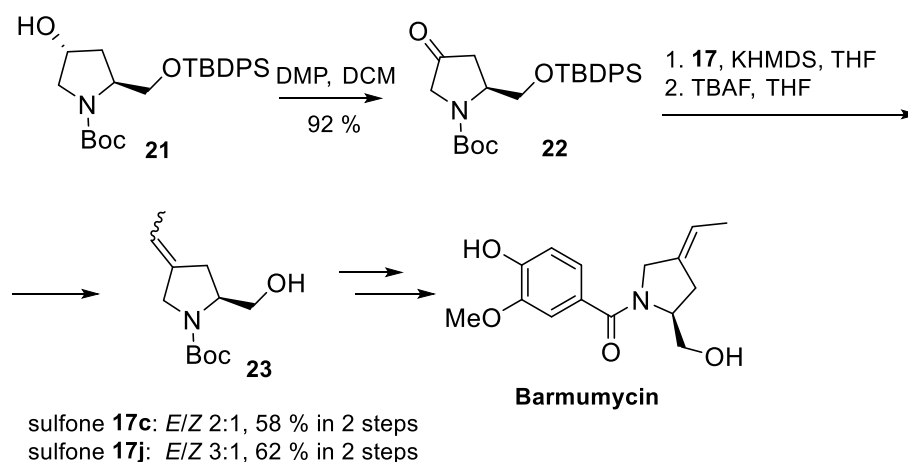


Fig. 1. Benzimidazole sulfones.

We also used our developed modification of the Julia–Kocienski olefination in the formal total synthesis of another natural product, barmumycin (Scheme 5). We started the synthesis with protected hydroxyprolinol **21**, which was oxidized under Dess–Martin conditions. The obtained ketone **22** was subjected to an olefination reaction. To verify the efficiency of the reagent, the olefination reaction was performed with the new and also with the classical phenyltetrazolyl sulfone **17c**. In the olefination reaction of ketone **19** with the classical phenyltetrazolyl sulfone **17c** the *E/Z* selectivity was 2:1, but with the new sulfone **17j** – *E/Z* 3:1. In the total synthesis of barmumycin described in the literature¹⁵, olefination was performed with the classical phenyltetrazolyl sulfone and LDA base to give olefin **23** in 50 % yield and an *E/Z* double bond isomer ratio 2:1. Therefore, it can be concluded that for the synthesis of barmumycin, using our developed olefination conditions, it is possible to improve not only the *E/Z* selectivity but also the reaction yield.



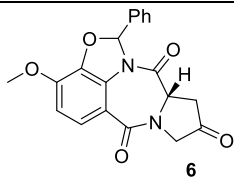
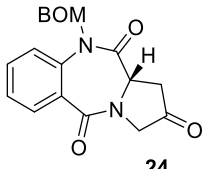
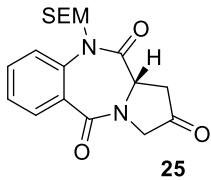
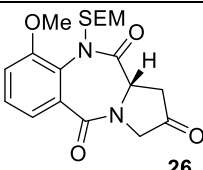
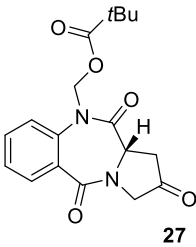
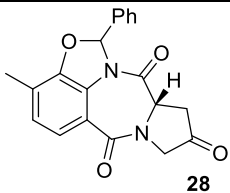
Scheme 5. Formal total synthesis of barmumycin.

The results obtained during the formal total synthesis of barmumycin (olefination of ketone **22**) led to the conclusion that higher *E* selectivity can be achieved in PBD systems (olefination of ketone **6**). Therefore, we decided to further develop a general method for the olefination of PBDs, that is, to test our developed olefination reagent on other PBD substrates.

Since we initially speculated that the bulky benzylidene protecting group in ketone **6** determines high selectivity, we synthesized several other PBD compounds with N10 protecting groups and tested their olefination reaction with both classical phenyltetrazolyl sulfone **17c** and our developed sulfone **17j** (Table 4).

Table 4

Olefination of Other PBD Substrates Under Julia–Kocienski Conditions (unpublished results)^a

Substrate	Yields of olefination products and <i>E/Z</i> ratio with sulfone 17c	Yields of olefination products and <i>E/Z</i> ratio with sulfone 17j
 6	<i>E/Z</i> 89:11 68 %	<i>E/Z</i> 97:3 45 %
 24	<i>E/Z</i> 73:27 26 %	<i>E/Z</i> 86:14 26 %, 52 % ^b
 25	<i>E/Z</i> 76:24 23 %	<i>E/Z</i> 88:12 32 %
 26	<i>E/Z</i> 73:27 61 %	<i>E/Z</i> 86:14 36 %, 45 % ^b
 27	<i>E/Z</i> 73:27 39 %, 58 % ^b	<i>E/Z</i> 86:14 29 %
 28	<i>E/Z</i> 92:8 29 %, 39 % ^b	<i>E/Z</i> 97:3 35 %, 55 % ^b

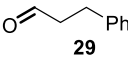
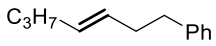
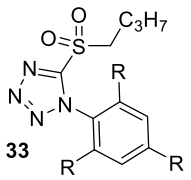
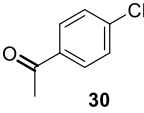
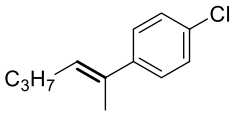
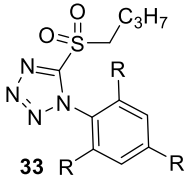
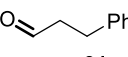
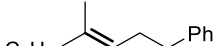
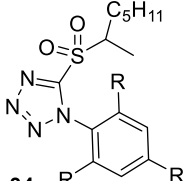
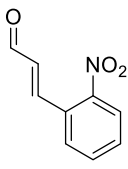
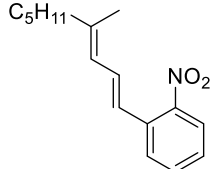
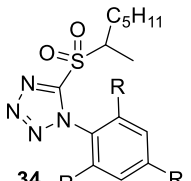
^a KHMDS, THF, -78 °C, 40 min; ^b yield, based on recovered starting material.

Other PBD substrates also show high selectivity in the olefination reaction. Using our developed sulfone **17j**, a higher *E/Z* selectivity is observed compared to the classical Julia–Kocienski reagent **17c**. However, substrates in which the benzylideneamino protecting group has been replaced by others – BOM (**24**), SEM (**25**, **26**), pivaloylmethyl- (**27**) – showed lower selectivity than ketone **6**. Interestingly, the most structurally similar compound **28** exhibits exactly the same *E/Z* selectivity as ketone **6**.

In order to determine the limits of application of the newly developed reagents, we decided to test them on several aldehydes and ketones (**29**, **30**, **31**, **32**) described in the literature, the olefination of which is known to be nonstereoselective.

Table 5

Julia–Kocienski Olefination of Known Substrates Using Classical Phenyltetrazolyl Sulfone Reagent and Newly Developed Tricyclohexylphenyltetrazolyl Sulfone Reagent (unpublished results)^a

Substrate	Product	Sulfone	R=H	R=cHex
 29		 33	<i>E/Z</i> 87:13 92 %	<i>E/Z</i> 88:12 86 %
 30		 33	<i>E/Z</i> 75:25 48 %	<i>E/Z</i> 30:70 40 %
 31		 34	<i>E/Z</i> 78:22 19 %	<i>E/Z</i> 58:42 56 %
 32		 34	<i>E/Z</i> 54:46	<i>E/Z</i> 43:57

^a reaction conditions: KHMDS, THF, –78 °C, 40 min.

We synthesized the required olefination reagents **33** and **34** and performed the olefination reaction with both the classical phenyltetrazolyl reagent **17c** and the newly developed cyclohexyl substituted reagent **17j**. As can be seen from the data in Table 5, in the case of simplified substrates, no improvement in selectivity was observed using the olefination reaction conditions developed by us. Only the ratio of *E/Z* isomers obtained by olefination of aldehyde **29** using the newly developed tricyclohexylphenyltetrazolyl sulfone reagent and the classical phenyltetrazolyl sulfone reagent is similar, but in the case of substrates **30**, **31**, and **32**, where olefination results in trisubstituted double bond products, the stereoselectivity is worse. Interestingly, in the olefination of ketone **30**, the classical phenyltetrazolyl sulfone (**33**, R=H) shows good *E* selectivity, while our cyclohexyl substituted tetrazolyl sulfone (**33**, R=*c*Hex) is *Z* selective. Due to the inconsistency of the obtained results, it is likely that different transition states dominate in the olefination reaction depending on the substrate. This phenomenon is also widely described in the literature.¹⁶ As we did not observe an improvement in selectivity in the simplified substrates using the olefination conditions that we developed, we did not continue our research in this direction.

To study the mechanism of the olefination reaction in PBD molecules, DFT calculations were performed in collaboration with LIOS researcher Dr. Artis Kinēns. PBD dilactam, which contains a methyl group in the N10 position, and the classical phenyltetrazolyl sulfone were used for the calculations (Fig. 2). Nucleophilic addition to the carbonyl group was found to be a rate-limiting step in olefination. The second step is Smiles rearrangement, during which the tetrazole unit migrates from the S atom to the O atom. This is followed by the rotation of the newly formed C-C bond to form the most stable rotational isomer in which the leaving groups is in the anti-periplanar position. Finally, the elimination of the leaving group results in the formation of the double bond. The energy difference between the two possible paths in the rate-limiting step is 4 kcal/mol, thus the more favourable transition state leads to the formation of a double bond of the *E* configuration.

As a result of the studies described in this chapter, a modification of the Julia–Kocienski olefination was developed, which involves the use of new, sterically bulky aryltetrazolyl sulfones for the stereoselective trisubstituted double bond introduction. Formal total synthesis of the natural products limazepine E and barmumycin was accomplished using the developed olefination modification. In the case of limazepine E, the new method allowed us to obtain this natural product in 9 steps, which is 3 less compared with 12-steps synthesis previously developed in our group⁵. In order to determine the applicability of the newly developed reagents, they were tested not only in PBD, but also in simplified substrates. DFT calculations were performed in collaboration with LIOS researcher Dr. Artis Kinēns to study the mechanism of the reaction.

The original publication of the studies described in this chapter can be found in Appendix 4.

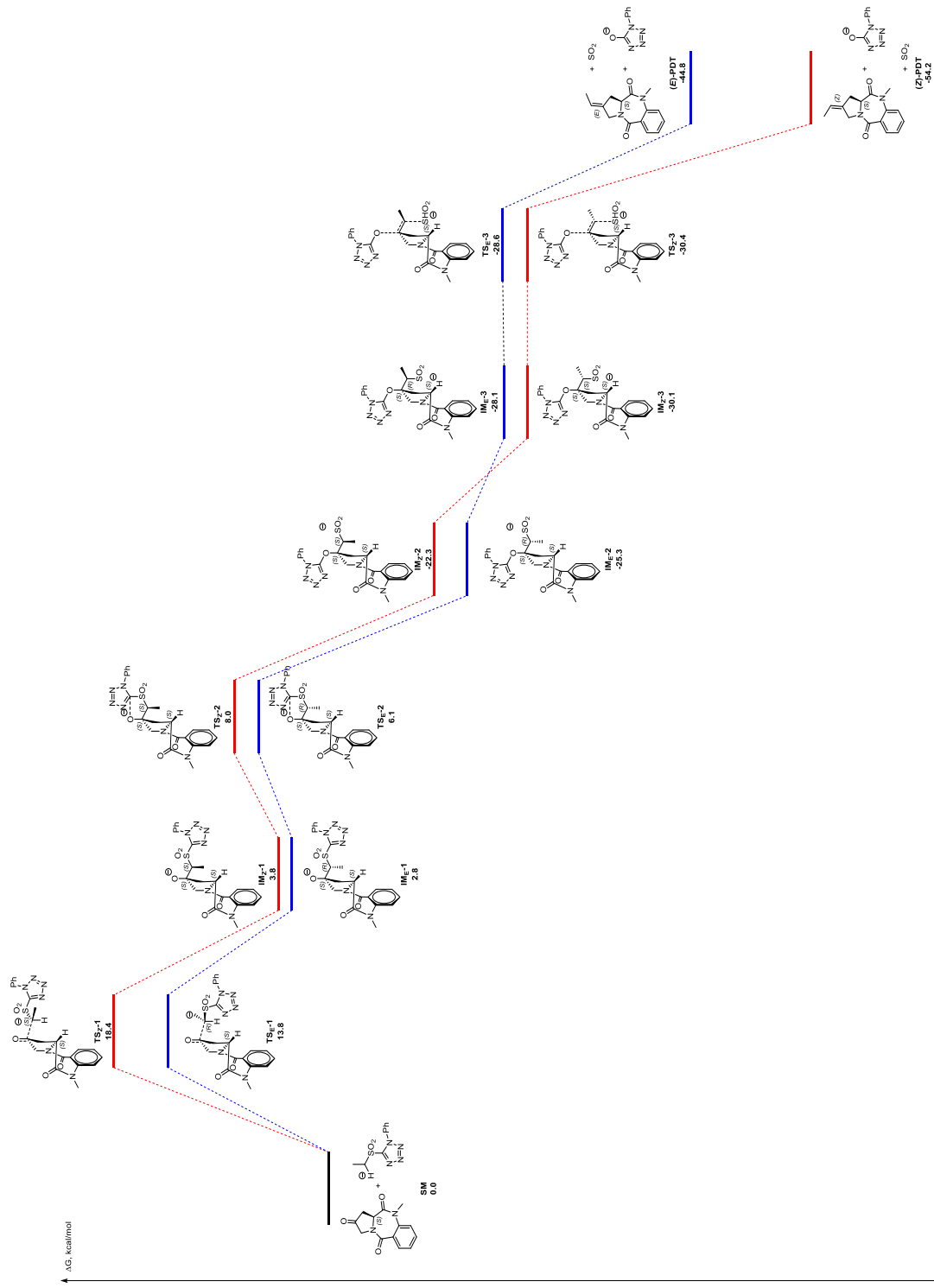
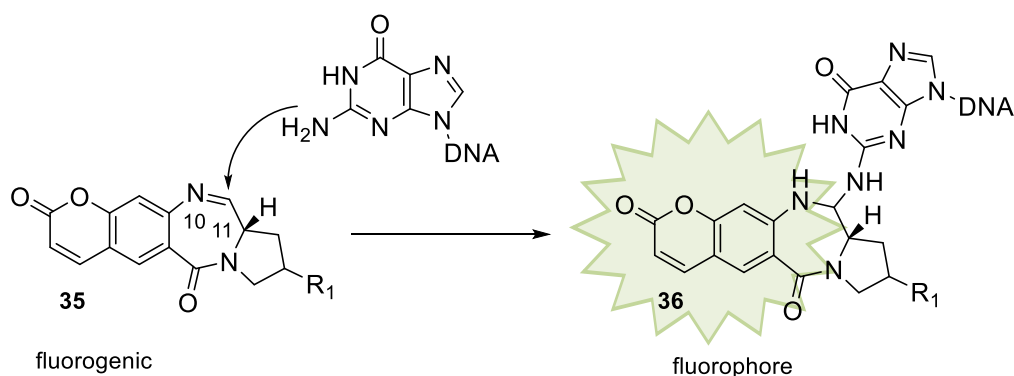


Fig. 2. DFT calculations for olefination reaction (unpublished results).

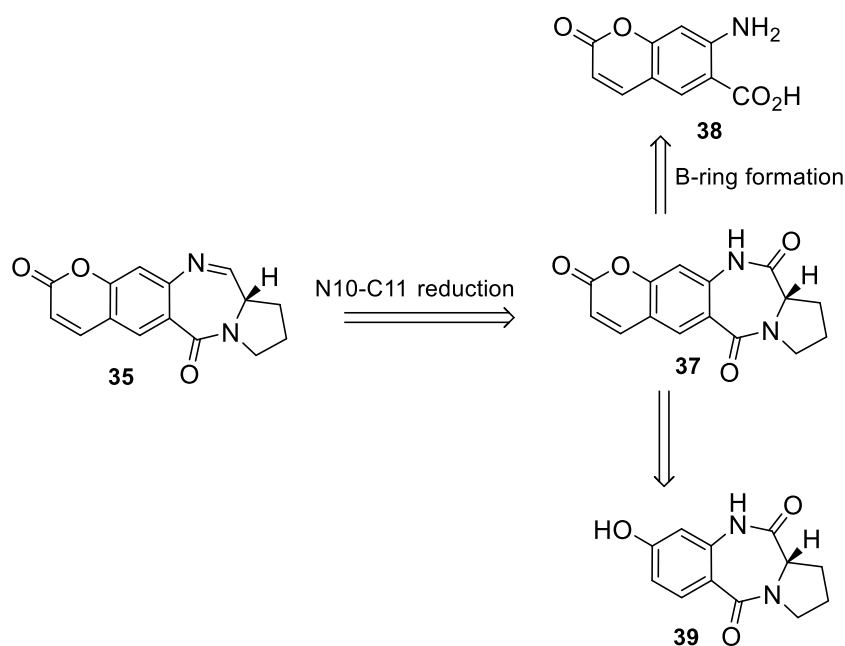
4. Synthetic Studies Toward PBD-Coumarin Hybrid

Understanding the cellular localization of DNA targeted compounds is very important, as there is a possibility that these compounds could act outside the target, which may reduce their ability to reach the genome and elicit the desired response. Cellular localization has not been well studied for compounds that covalently bind within a minor groove of DNA, where non-selective reactions with nucleophiles can be problematic. Conjugates of PBD and fluorescent compounds have been previously synthesized to determine the localization of PBD in the cell and its correlation with cytotoxicity, but using this approach, the resulting compound is fluorescent even before *in vitro* experiments.⁹ Our strategy was to prepare non-fluorescent compounds that enter the cell and react regioselectively by forming a highly fluorescent adduct. PBD selectively and covalently binds at the C11 position to exocyclic guanine nitrogen in the DNA chain.¹ 7-Aminocoumarins are known as good fluorescent compounds, therefore one of the objectives of the Thesis was to synthesize a new type of PBD-coumarin hybrid **35**. This compound should not be fluorescent as such, but should potentially form a fluorescent 7-aminocoumarin adduct **36** by binding to the guanine amino group of DNA (Scheme 6).



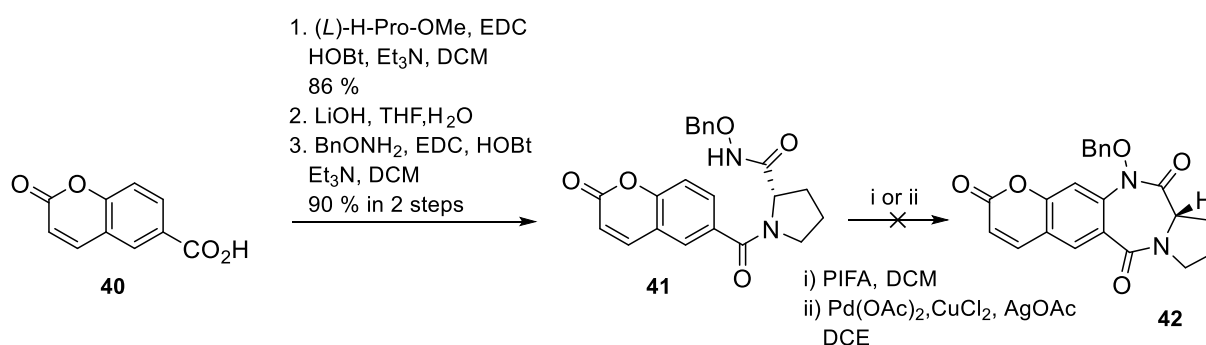
Scheme 6. Hypothetical PBD-coumarin hybrid **35** reaction with guanine amino group of DNA.

PBD imines are known to be labile due to their high reactivity, therefore the introduction of the unstable N10-C11 imine function was planned as the last step of the synthesis. Two strategies for obtaining dilactam **37** were envisioned (Scheme 7). In the first strategy, the B-ring could be formed in an appropriately functionalized coumarin **38**. The second strategy is based on the cyclization of a pyranone ring in the PBD substrate **39**. Both of these strategies were examined for the synthesis of the desired dilactam **37**.



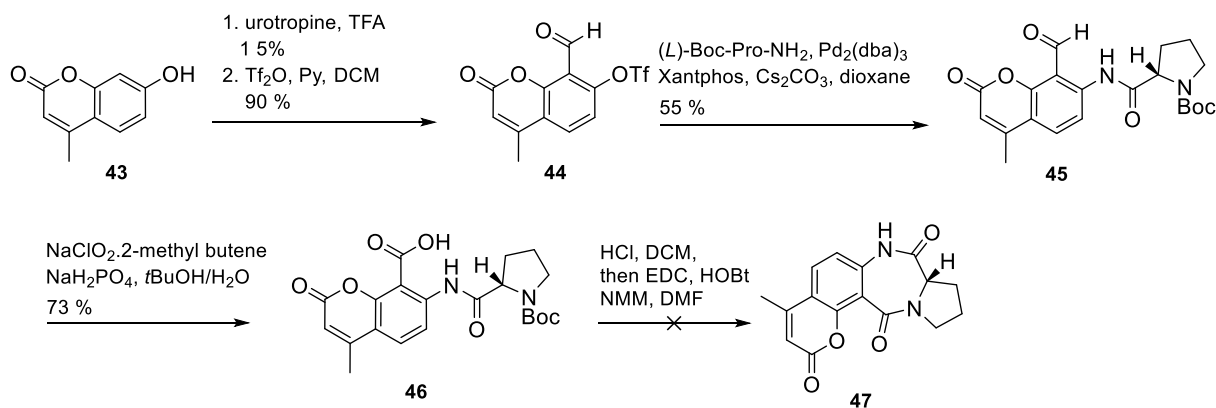
Scheme 7. Retrosynthesis scheme of PBD-coumarin hybrid **35**.

We started the study by examining the B-ring formation. The starting material **41** necessary for this strategy was synthesized in a 3-step sequence from commercially available coumarin carboxylic acid **40** (Scheme 8). One of the synthetic methods was based on an analogy with the known PIFA-mediated intramolecular cyclization¹⁷ in the N-benzyloxycarbonyl group-containing compound **41**. Unfortunately, only degradation of substrate **41** was observed and the desired product **42** was not detected in the reaction mixture. We also tried palladium-catalyzed cyclization, but also in this case we observed only degradation of the substrate.



Scheme 8. Synthesis of PBD-coumarin hybrid using intramolecular cyclization.

The second synthetic strategy was based on a palladium-catalyzed amidation reaction¹⁸ of triflyloxycoumarin carbaldehyde **44** (Scheme 9).

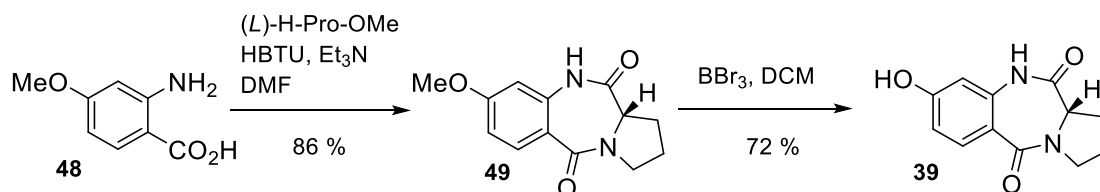


Scheme 9. Synthesis of PBD-coumarin hybrid using palladium-catalyzed amidation.

The synthesis was started from commercially available hydroxycoumarin **43**. By formylating **43** and then reacting the intermediate with triflic anhydride, triflyloxycoumarin carbaldehyde **44** was obtained and a palladium-catalyzed amidation reaction with proline amide was further performed. The resulting aldehyde **45** was oxidized to the corresponding carboxylic acid **46** under Pinnick conditions. Although the Boc protecting group was successfully cleaved, no further conversion of the resulting amino acid to the corresponding lactam **47** was observed. As the reaction temperature was increased, the degradation of the substrate was observed.

As can be seen, compound **47** has a different topology than the planned coumarin-PBD hybrid **35**. Although the formylation of hydroxycoumarin **43** described in the literature¹⁹ is reported to occur at C6 position, we isolated only a C8 formylated coumarin **44**. The reaction yield was only 15% compared to 48% given in the literature. The topology of compound **47** should not affect the reduction of dilactam and the ability of the resulting imine to bind to DNA, therefore we used C 8 formylated coumarin **44** for our studies.

As this strategy did not give the desired result, we also tried the second approach – building a coumarin cycle in a PBD system. For this purpose, we synthesized dilactam **39**, starting from the anthranilic acid derivative **48** (Scheme 10).

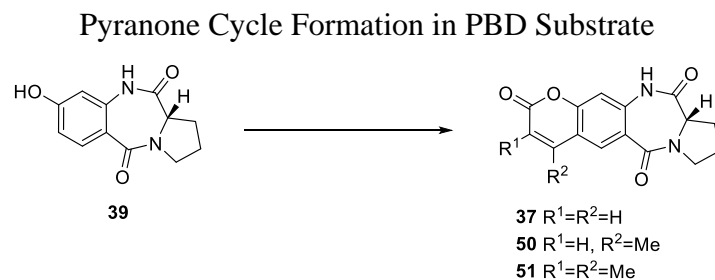


Scheme 10. Synthesis of dilactam **39**.

In order to obtain the required PBD-coumarin hybrid, we tested various methods described in the literature for the synthesis of coumarins from the corresponding phenols (Table 6). The condensation of phenol **39** with propiolic acid catalyzed by Bronsted (Entry 1) or Lewis acid (Entry 2) gave only the degradation of substrate **39**. Similarly, platinum catalyzed cyclization (Entry 3) failed. Also in the cyclization reaction of ethylpropiolate and phenol **39** catalyzed by Lewis acid (Entry 4) or palladium (Entry 5) we observed only

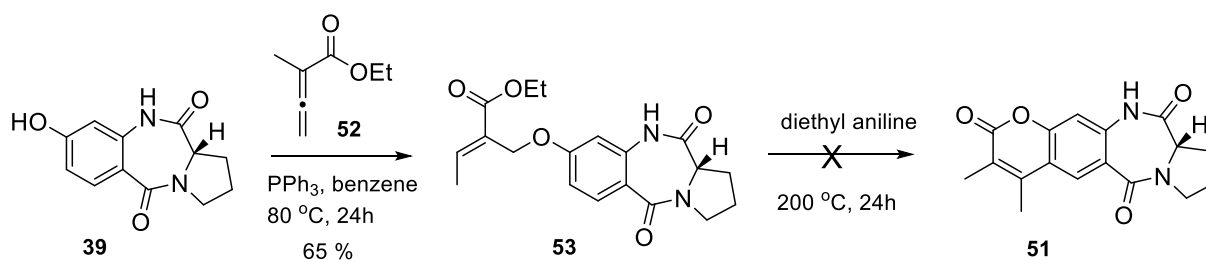
degradation of substrate **39**. In turn, the condensation of phenol **39** with malic acid under Pechmann conditions gave the desired product in 15 % yield (Entry 6). We also tried the acid-catalyzed condensation of phenol **39** with ethyl acetoacetate catalyzed by Bronsted (Entry 7) or Lewis acid (Entry 8), but also in this case we observed only the degradation of substrate **39**.

Table 6



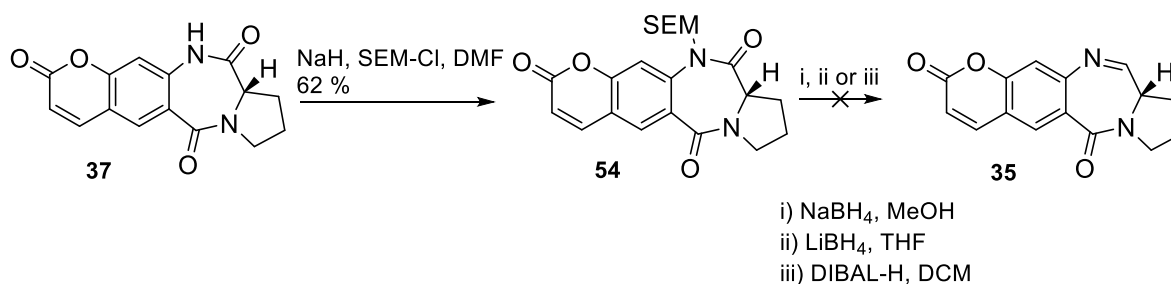
Entry	Reagent	Reaction Conditions	Product	Yield
1		TfOH, chlorobenzene, 1 h, 100 °C ²⁰	37	<5 %
2		Yb(OTf) ₃ , dioxane, 10 min, 90 °C ²¹		<5 %
3		TFA, K ₂ PtCl ₄ , AgOTf, 24 h, r. t. ²²		<5 %
4		ZnCl ₂ , dioxane, 1 h, 110 °C ²³	37	<5 %
5		Pd(dba) ₃ ·CHCl ₃ , NaOAc, HCOOH ²⁴		<5 %
6		H ₂ SO ₄ , 0,5 h r. t., then 18 h 120 °C ²⁵	37	15 %
7		70% H ₂ SO ₄ EtOH solution, 16 h, r. t. ²⁶	50	<5 %
8		AlCl ₃ , nitrobenzene, 3 h, 130 °C ²⁷		<5 %

We tried to obtain dimethyl substituted coumarin **51** by the reaction of allene **52** with the PBD dilactam phenol group (Scheme 11)²⁸. The required allene **52** was synthesized and used in the reaction with PBD substrate **39** to give the desired intermediate **53** in good yield. Next, we planned to perform a thermal Claisen rearrangement, lactonization, and double bond isomerization sequence to obtain dilactam **51**, however, the desired product was not formed. The only successful experiment was the reaction of dilactam **39** with malic acid, where the planned PBD-coumarin hybrid dilactam **37** was formed, but in a low yield (Table 6).



Scheme 11. Synthesis of dimethyl substituted coumarin **51**.

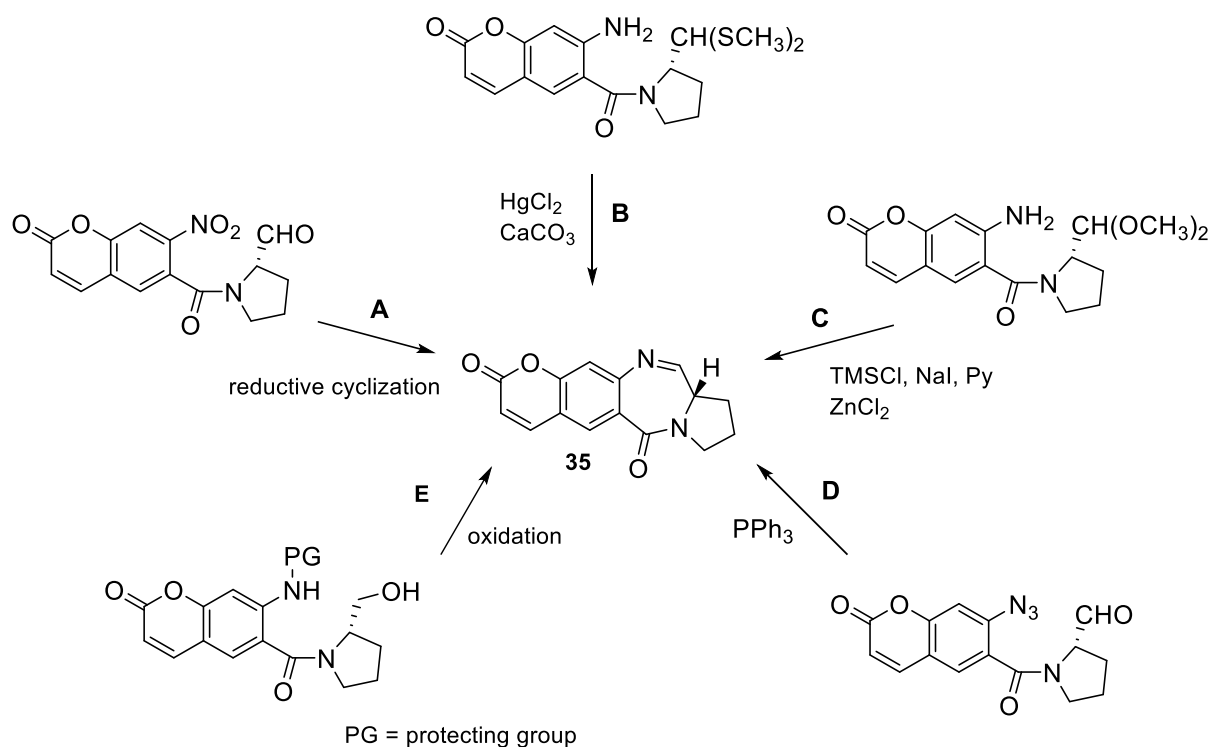
With a sufficient amount of the required coumarin-PBD hybrid dilactam **37** in hand, we planned to synthesize the corresponding imine **35** required to study the PBD mechanism of action (Scheme 12). It is known that the reduction of PBD dilactam requires an activation.²⁹ For this purpose, the nitrogen of amide **37** was protected with a SEM protecting group and the obtained compound **54** was treated with several reducing agents – NaBH₄, LiBH₄, and DIBAL-H, however, the desired imine **35** was not obtained. Analyzing the NMR spectra, we observed that changes have taken place in the coumarin cycle, apparently, it is not stable under reduction conditions. Although the planned PBD-coumarin hybrid **35** was not obtained, a 3- step synthesis method was developed to obtain the corresponding dilactam **37**.



Scheme 12. Imine **35** synthesis attempts.

Since the reduction of the amide group of the PBD-coumarin hybrid **37** is problematic, direct imine synthesis methods should be used for future studies. Several approaches are known in the literature.²⁹ Typically, a condensation of an aldehyde or masked aldehyde (dialkyl acetal or thioacetal) with an amino or azido group in the A ring is employed to effect the B-ring formation (Scheme 13).

In Method A, the nitro group is first reduced, which enables a subsequent cyclization of the resulting amino group with the unprotected aldehyde. In Method B, dimethyl thioacetal can serve as an electrophile in the cyclization. The main advantage of this method is that racemization of the C11a chiral center can be avoided. In Method C, the aldehyde is protected as the dimethyl acetal. After cleavage of the protecting group the liberated aldehyde further reacts with the amino group. The disadvantage of this method could be often observed racemization. Method D involves a Staudinger / intramolecular aza-Wittig reaction sequence of the starting azidoaldehyde. The reaction of substrate with triphenylphosphine *in situ* furnishes iminophosphorane, which is further reacted in the intramolecular aza-Wittig reaction. In Method E, the N-protected N10-C11 carbinolamine would first be formed in the oxidative cyclization. Deprotection would further give the corresponding imine.



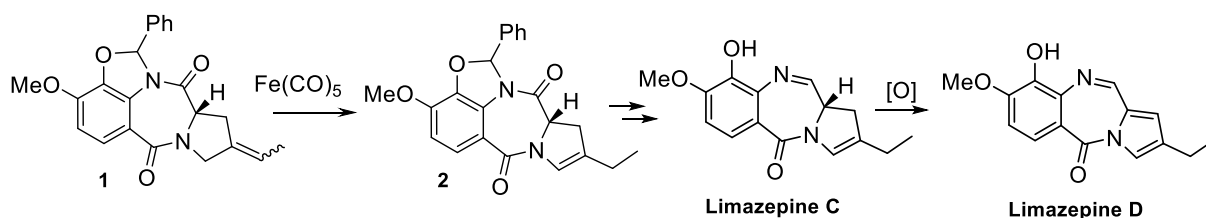
Scheme 13. Imine **35** potential synthesis methods.

The studies described in this chapter examined two different approaches for the preparation of PBD-coumarin conjugates. Of the 11 methods tested, only Pechmann condensation gave the desired hybrid with a 15 % yield. The developed methodology allows obtaining the PBD-coumarin hybrid in 3 steps, starting from commercially available materials. Unfortunately, regioselective reduction of the C11 carbonyl group failed to give the target N10-C11 imine, which could potentially covalently bind to DNA to form a fluorophore adduct.

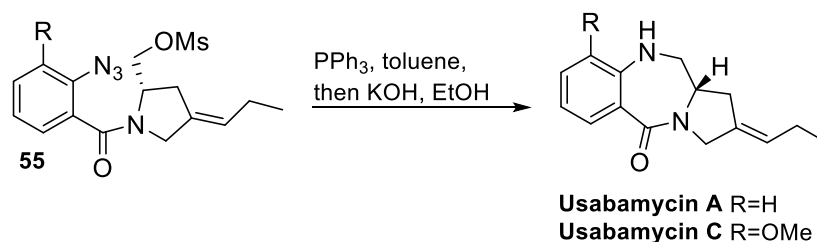
The original publication of the studies described in this chapter can be found in Appendix 5.

CONCLUSIONS

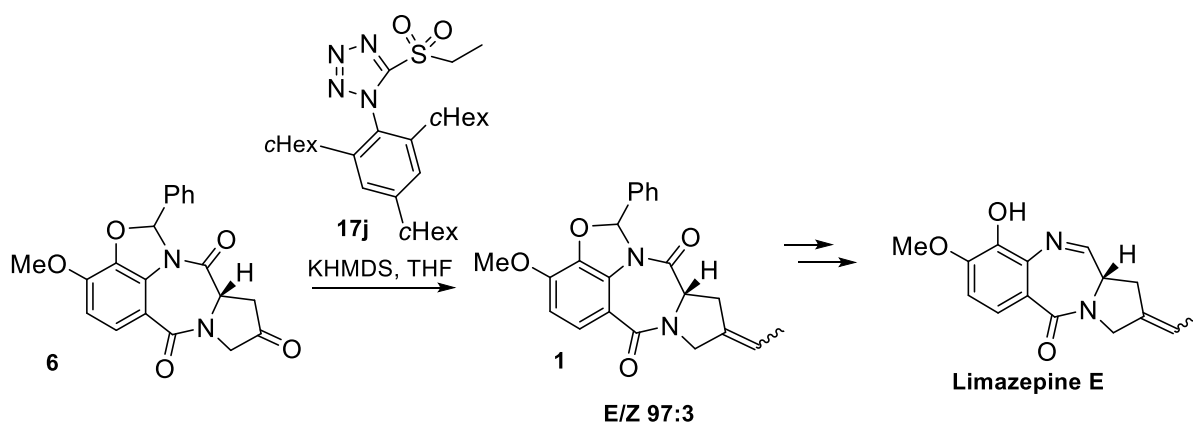
1. Iron pentacarbonyl promoted double bond migration in substrate **1** is thermodynamically determined: both *E*-**1** and *Z*-**1** give compound **2**. This observation allows the use of a mixture of both ketone **1** double bond isomers for the total synthesis of the natural product limazepine C. Limazepine C is unstable and tends to oxidase to limazepine D upon storage.



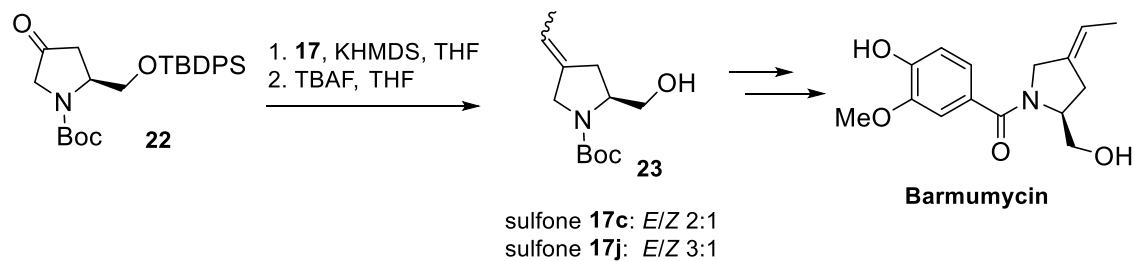
2. The N10-C11 saturated B cycle of usabamycin A and C can be formed employing a previously unknown cyclization approach, which involves the reaction of azide **55** with triphenylphosphine followed by intramolecular cyclization and hydrolysis of the iminophosphorane intermediate.



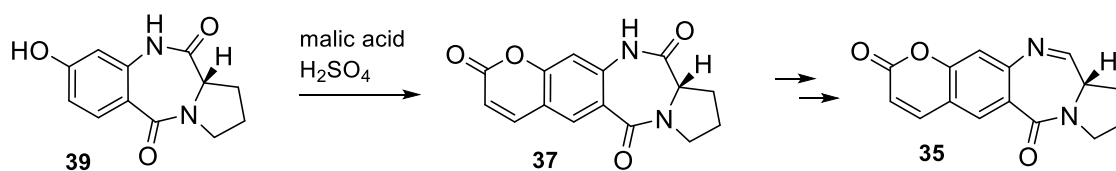
3. The highest *E/Z* selectivity (97:3) in the ketone **6** olefination reaction is obtained employing the Julia–Kocienski reaction with our newly developed sulfone **17j**. This allows accomplish the total synthesis of the natural product limazepine E in 9 steps compared to the previously reported 12-step sequence. Our Julia–Kocienski olefination modification is highly stereoselective not only for ketone **6** but also for other PBD substrates.



4. Our modification of the Julia–Kocienski olefination reaction using sulfone **17j** also improves the selectivity in the olefination of the ketone **22** compared to the classical phenyltetrazolyl sulfone **17c**. Intermediate **23** can be further used for the total synthesis of the natural product barmumycin.



5. The preparation of coumarin-PBD hybrid imine **35** is problematic, however, it is possible to obtain its dilactam **37** using Pechmann condensation of phenol **39** with malic acid.



REFERENCES

1. Gill, R.; Kaushik, S.; Chaug, J.; Bansal, S.; Shan, A.; Bariwal, J. *Mini-Rew. Med. Chem.* **2014**, *14*, 229–256.
2. Leimgruber, W.; Batcho, A. D.; Czajkowski, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5641.
3. Mantaj, J.; Jackson, P. J. M.; Rahman, K. M.; Thurston, D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 462–488.
4. Gregson, S. J.; Howard, P. W.; Corcoran, K. E.; Barcella, S.; Yasin, M. M.; Hurst, A. A.; Jenkins, T. C.; Kelland, L. R.; Thurston, D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1845–1847.
5. Smits, G.; Zemribo, R. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4406–4409.
6. Mori, M.; Uozumi, Y.; Kimura, M.; Ban, Y. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3793–3806.
7. Junutula, J.; Jammalamadaka, V. Isoquinolidinobenzodiazepines. WO/2016/149546, Sep 23, 2016.
8. Howard, P. W.; Gregson, S.; Taylor, P. W.; Thurston, D. E.; Hadjivassileva, T. S. Pyrrolobenzodiazepines. WO2005085260(A1), Sep 15, 2005.
9. Wells, G.; Suggitt, M.; Coffils, M.; Baig, M. A. H.; Howard, P. W.; Loadman, P. M.; Hartley, J. A.; Jenkins, T. C.; Thurston, D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2147–2151.
10. Rahman, K. M.; Corcoran, D.B.; Bui, T. T.; Jackson, P. J.; Thurston, D. E. *PloS one*, **2014**, *9*, e105021.
11. Fotso, S.; Zabriskie, T. M.; Proteau, P. J.; Flatt, P. M.; Santosa, D. A.; Mahmud, S.; Mahmud, T.; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 690–695.
12. Zacuto, M. J.; Xu, F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6298–6300.
13. Neugnot, B.; Cintrat, J.-C.; Rousseau, B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3575–3579.
14. Sato, S.; Iwata, F.; Yamada, S.; Kawahara, H.; Katayama, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7099–7101.
15. Lorente, A.; Pla, D.; Canedo, L. M.; Albericio, F.; Alvarez, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8508–8515.
16. Robiette, R.; Prospisil, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *5*, 836–840.
17. Correa, A.; Tellitu, I.; Dominguez, E.; Moreno, I.; SanMartin, R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2256–2264.
18. Yin, J.; Buchwald, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6043–6048.
19. Gong, P.; Zhai, X.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Ma, J. Preparation of semicarbazone derivatives for treatment and/or prevention of cancer. CN 104230845, Dec 24, 2014.
20. Choi, H.; Kim, J.; Lee, K. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3600–3603.
21. Fiorito, S.; Epifanu, F.; Taddeo, V. A.; Genovese, S. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2939–2942.
22. Oyamada, J.; Kitamura, T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6918–6925.
23. Timonen, J. M.; Nieminen, R. M.; Sareila, O.; Goulas, A.; Moilanen, L. J.; Haukka, M.; Vainiotalo, P.; Moilanen, E.; Aulaskari, P. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3845–3850.
24. Raad, I.; Terreux, R.; Richomme, P.; Matera, E.-L.; Dumonet, C.; Raynaud, J.; Guilet, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6979–6987.
25. Sethna, S.; Phadke, R. (2011). *Organic Reactions*. John Wiley & Sons, Inc.
26. Al-Bayati, Redha I.; Ahamad Mohammed R.; Ahamed, Luma S. *J. Am. Org. Chem.* **2015**, *5*, 125–135.
27. Munro, D. Novel fragrance compound. EP 1036792, Sep 20, 2000.
28. Martin, T. J.; Vakhshori, V. G.; Tran, Y. S.; Kwon, O. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2586–2589.
29. Antonow, D.; Thurston, D. E. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2815–2864.