

Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*

Synthese Tumor-gerichteter Ansamitocin-Derivate

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Florian Taft
geboren am 14.04.1980 in Celle

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2006 bis April 2009 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 16.04.09

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. M. Kalesse

Tag der Promotion: 26.06.2009

*„Es lohnt sich, die Entdeckungen anderer zu studieren,
dass für uns selbst eine neue Quelle für Ideen entspringt...“*

Gottfried Wilhelm Leibniz (1646 – 1716)

Zusammenfassung

Florian Taft

Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum* – Synthese Tumor-gerichteter Ansamitocin-Derivate

Schlagwörter:

Ansamitocin – *Actinosynnema pretiosum* – Mutasynthese – Folsäure-Konjugate

Die Maytansinoide stellen eine Familie 19-gliedriger makrozyklischer Lactame pflanzlichen (Maytansine) und mikrobiellen (Ansamitocine) Ursprungs dar und wurden erstmals 1972 von KUPCHAN am NCI isoliert. Strukturell gehören diese Polyketide der Klasse der Ansamycin-Antibiotika an und weisen eine hohe zytotoxische Aktivität auf. Trotz erfolgversprechender präklinischer Studien an verschiedenen Tiermodellen musste ihre klinische Entwicklung aufgrund starker Nebenwirkungen eingestellt werden.

In der vorliegenden Dissertation konnte das als *N*-Acetylcysteamin-Thioester aktivierte Tetraketid-Intermediat der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum* stereoselektiv synthetisiert werden. Anschließend wurden *in vivo* Komplementierungsexperimente mit den möglichen tri- und tetraketidischen Biosynthese-Intermediaten durchgeführt. Hierfür wurde die in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) blockierte Mutante *A. pretiosum* HGF073 eingesetzt. Dadurch konnte eindeutig belegt werden, dass die $\Delta^{10,12}$ - $\Delta^{11,13}$ Dien-Migration auf Modul 3 der asmPKS vollzogen wird, wofür ein möglicher Mechanismus *via* vinyloger *syn*-Dehydratisierung durch DH3 postuliert wird.

Durch einen mutasynthetischen Ansatz mit *A. pretiosum* HGF073 konnten mit synthetisierten AHBA-Analoga neuartige, im aromatischen System differierende Ansamitocin-Derivate erzeugt werden. Die Testung der antiproliferativen Aktivitäten gewährte weiterführenden Einsichten in Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR). Darüber hinaus wurden auch Einblicke in die Substratspezifitäten der beteiligten Enzyme ermöglicht.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit konnte die Synthese von Ansamitocin-Folsäure-Konjugaten, abgeleitet von den ermittelten SAR, realisiert werden. Dabei wurden erstmals mutasynthetisch eingeführte Funktionalitäten für eine semisynthetische Modifizierung genutzt. Mit der Etablierung einer STILLE-Kupplung konnte eine effektive Methode zur Anbindung des Disulfid-Linkers an C-19 von Ansamitocin entwickelt werden. Die synthetisierten Folsäure-Konjugate legen den Grundstein für eine mögliche klinische Entwicklung von Tumor-gerichteten Ansamitocin-Derivaten.

Abstract

Florian Taft

Studies towards Ansamitocin Biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum* – Synthesis of Tumour-targeted Ansamitocin Derivatives

key words:

Ansamitocin – *Actinosynnema pretiosum* – Mutasynthesis – Folate-conjugates

The maytansinoids represent a class of 19-membered macrocyclic lactams produced by higher plants (maytansines) and bacteria (ansamitocins) and were first isolated by KUPCHAN at the NCI in 1972. These polyketides are structurally related to ansamycin antibiotics and exhibit high cytotoxic activity. Despite promising studies in different animal models, the clinical development had to be stopped in phase II due to substantial side-effects.

In this Ph. D. thesis, the stereoselective synthesis of the tetraketide intermediate of ansamitocin biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum* was achieved modified as *N*-acetylcysteamine thioester. Subsequently, *in vivo* complementation experiments were carried out with the possible tri- and teraketide biosynthetic intermediates using *A. pretiosum* HGF073, a mutant strain blocked in the biosynthesis of the PKS starter unit 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA). By this means, timing of the $\Delta^{10,12}$ - $\Delta^{11,13}$ diene migration was proven to occur during processing of the nascent polyketide on module 3 of asmPKS, and a possible mechanism *via* vinylogous *syn*-dehydration is proposed.

Additionally, a mutasynthetic approach using *A. pretiosum* HGF073 supplemented with AHBA analogous resulted in novel ansamitocin derivatives differing in the aromatic moiety. The highly active derivatives were biologically evaluated leading to advanced structure-activity relationships (SAR). Beyond these findings, deeper insights were obtained into substrate specificities of the involved enzymes.

The final part of this work dealt with the synthesis of ansamitocin-folate-conjugates deduced from the SAR studies. For the first time, mutasynthetically introduced functionalities were used for further semisynthetic derivatisation. By establishing a STILLE-coupling, the development of an effective method has been made available for attaching the disulfide linker at C-19 of ansamitocin. The successful syntheses of folate-conjugates provide a premium basis for clinical development of tumour-targeted ansamitocin-derivatives.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG	4
2.1	DIE MAYTANSINOIDE	4
2.2	ANSAMITOCIN-BIOSYNTHESE IN <i>ACTINOSYNNEMA PRETIOSUM</i>	7
2.3	STRUKTUR-AKTIVITÄTS-BEZIEHUNGEN.....	11
2.4	MUTASYNTHESE.....	12
2.5	TUMOR-„TARGETING“ DURCH SPEZIFISCH BINDENDE KONJUGATE.....	15
3	ZIELSETZUNG	20
3.1	STUDIEN ZUR ANSAMITOCIN-BIOSYNTHESE IN <i>A. PRETIOSUM</i>	20
3.2	MUTASYNTHETISCHE DERIVATISIERUNG	22
3.3	SYNTHESE TUMOR-GERICHTETER ANSAMITOCIN-DERIVATE	23
4	BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	24
4.1	STUDIEN ZUR ANSAMITOCIN-BIOSYNTHESE IN <i>A. PRETIOSUM</i>	24
4.1.1	<i>Vorarbeiten.....</i>	<i>24</i>
4.1.2	<i>Synthese von Tetraketid 17.....</i>	<i>25</i>
4.1.3	<i>Komplementierungsexperimente</i>	<i>36</i>
4.2	MUTASYNTHETISCHE DERIVATISIERUNG	41
4.2.1	<i>Adressierung der PKS.....</i>	<i>42</i>
4.2.1.1	<i>Vorarbeiten.....</i>	<i>42</i>
4.2.1.2	<i>Synthese der Mutasyntnone</i>	<i>43</i>
4.2.1.3	<i>Verfütterungen</i>	<i>48</i>
4.2.2	<i>Adressierung der post-PKS-Enzyme</i>	<i>57</i>
4.2.2.1	<i>Vorarbeiten.....</i>	<i>57</i>
4.2.2.2	<i>Verfütterungen</i>	<i>59</i>
4.2.3	<i>Mutasyntnese mit weiteren A. pretiosum-Mutanten.....</i>	<i>62</i>
4.2.4	<i>Biologische Aktivitäten.....</i>	<i>63</i>
4.3	SYNTHESE TUMOR-GERICHTETER ANSAMITOCIN-DERIVATE	65
4.3.1	<i>Semisynthetische Derivatisierung</i>	<i>65</i>
4.3.2	<i>Biologische Aktivitäten.....</i>	<i>71</i>

4.3.3	<i>Synthese der Ansamitocin-Folsäure-Konjugate</i>	72
4.3.3.1	Synthese der Amino-Ansamitocine.....	73
4.3.3.2	Synthese des Folsäure-Derivats	75
4.3.3.3	Synthese der Konjugate.....	78
4.3.3	<i>Biologische Aktivitäten</i>	84
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	85
5.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	85
5.2	AUSBLICK	88
6	EXPERIMENTELLER TEIL	93
6.1	ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN CHEMISCH-SYNTHE- TISCHEN ARBEITEN	93
6.2	ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN MIKROBIOLOGISCHEN ARBEITEN	96
6.3	PUFFERLÖSUNGEN UND MOBILE PHASEN.....	98
6.4	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.1	99
6.5	KOMPLEMENTIERUNGSEXPERIMENTE AUS KAPITEL 4.1	113
6.6	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.2.	117
6.7	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.2.	124
6.8	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.3	140
7	ANHANG	165
7.1	KOMPLEMENTIERUNGSEXPERIMENTE.....	166
7.2	MUTASYNTHETISCHE DERIVATISIERUNG	172
7.3	NMR-SPEKTREN	174

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Ac	Acetyl
acac	Acetylacetonat
ACP	Acyl Carrier Protein
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
AIBN	Azobisisobutyronitril
AP-3	Ansamitocin P-3
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalent
Ar	Aryl
<i>asm</i>	Gene der Ansamitocin-Biosynthese in <i>Actinosynnema pretiosum</i>
<i>Asm</i>	Enzyme der Ansamitocin-Biosynthese in <i>Actinosynnema pretiosum</i>
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluoroborat
Bu	Butyl
c	Konzentration
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy
Cp	Cyclopentadienyl
Cy	Cyclohexyl
Cys	Cystein
δ	chemische Verschiebung
Δ	Erhitzen bis zum Rückfluss
Δ^x	Doppelbindung an C-X
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	distorsionless enhancement by polarisation transfer
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
4-DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	DESS-MARTIN-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen
DTT	DL-1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E/Z</i>	entgegen/zusammen (Doppelbindungskonfiguration)

ED	Effektivdosis
<i>ee</i>	enantiomeric excess
EE	Ethylacetat
ER	Enoylreduktase
ESI	electrospray ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	et alii
FAS	Fettsäuresynthase
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FR	Folsäurerezeptor
g	Gramm
G	Glycin
gef.	gefunden
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
H	Histidin
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
Hsp90	heat shock protein 90
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC	inhibitory concentration
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
K_d	Dissoziationskonstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
λ	Wellenlänge
L	Leucin
L	Liter
μ	mikro
m	milli
M	molar
Me	Methyl
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
n	nano
N	Asparagin
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Buthyllithium
NCI	National Cancer Institute
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
nOe	nuclear Overhauser effect
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
P	Prolin

PBS	phosphate buffered saline
PDB	precursor-directed biosynthesis
PE	Petrolether
PEPPSI	pyridine-enhanced precatalyst preparation stabilization and initiation
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase
ppm	parts per million
Pr	Propyl
Pte	Pteroyl
pyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytrispyrrolidinophosphonium-hexafluoroborat
Pyr	Pyridinyl
Q	Glutamin
quant.	quantitativ
R	Arginin
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAR	structure-activity relationship
Sdp.	Siedepunkt
SPDP	3-(2-Pyridyldithio)-propionsäure-succinimidylester
Smp.	Schmelzpunkt
SMPT	4-[1-(2-Pyridyldithio)-ethyl]-benzoesäure-succinimidylester
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteaminyl
t_r	Retentionszeit
TAS-F	Tris-(dimethylamino)-sulfonium-difluortrimethylsilicat
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBACl	Tetrabutylammoniumchlorid
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TE	Thioesterase
Teoc	2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
Tfa	Trifluoracetyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl oder Tetramethylsilan
Trt	Trityl
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolett
W	Tryptophan
YMG	yeast, malt, glucose
Zers.	Zersetzung

2 Einleitung

Interdisziplinäre Arbeiten im Bereich der Naturwissenschaften haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zur Bearbeitung komplexer Fragestellungen ist die Verknüpfung ehemals streng getrennter Fachgebiete unumgänglich geworden. Eine Kombination aus organischer Synthese (Chemie), Arbeit mit Mikroorganismen (Biologie) und biologischer Evaluierung (Medizin) erfährt gerade zur Gewinnung von Naturstoff-Derivaten mit verbessertem Wirkpotential großes Interesse.

Auf ein allgemeines Plädoyer zur Bedeutung der Naturstoffe als Leitstruktur in Hinblick auf die Entdeckung von Wirkstoffen sei hier mit dem Hinweis auf die Literatur¹ verzichtet, um in den nächsten Abschnitten einen Überblick über die bisherigen Arbeiten auf dem Gebiet der Ansamitocine zu geben und die für das Verständnis der vorliegenden Zusammenschrift nötigen Grundlagen zu vermitteln.

2.1 Die Maytansinoide

Im Rahmen eines „Screening“-Programms zur Identifizierung von antitumoral wirksamen Substanzen am National Cancer Institute (NCI) gelang KUPCHAN bereits 1972 die Isolierung des hochwirksamen, zytotoxischen Maytansins **1** aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus serrata* (Abbildung 1).² Die Strukturaufklärung des 19-gliedrigen Makrolactams gelang kurze Zeit später durch Röntgenstrukturanalyse nach Überführung in das 9-(3-Brompropyl)-Derivat.³ Nach der Entdeckung des Namensgebers dieser Gruppe von Makroliden wurden weitere strukturell sehr ähnliche Substanzen unter anderem aus *Colubrina texensis*, *Trewia*

¹ a) A. Genesan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 306-317; b) M. S. Butler, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475-516; c) D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477; d) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037; e) G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60; f) M. Butler, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153; g) M.-Q. Zhang, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 1-11; h) F. von Nussbaum, M. Brandes, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254.; i) I. Paterson, A. A. Anderson, *Science* **2005**, *310*, 451-453; j) J. Clardy, C. T. Walsh, *Nature* **2004**, *432*, 829-837.

² S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmor, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1354-1356.

³ a) S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, A. T. Sneden, W. A. Court, G. J. Thomas, H. P. J. Hintz, R. M. Smith, A. Karim, A. K. Verma, Y. Nagao, R. G. Dailey Jr., V. A. Zimmerly, W. C. Sumner Jr., *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, 2349-2357; b) R. F. Bryan, C. J. Gilmore, R. C. Haltiwanger, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1973**, 897-901.

*nudiflora*⁴ und zwei in Japan beheimateten Moosarten isoliert,⁵ womit bereits 27 unterschiedliche Strukturen allein aus pflanzlichen Quellen gewonnen werden konnten.

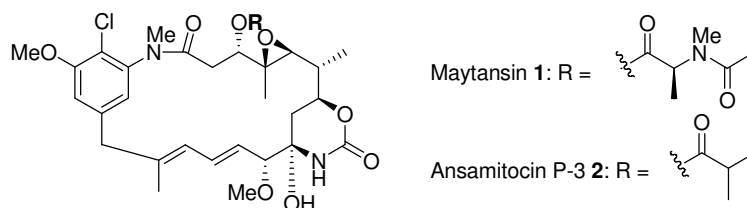


Abbildung 1: Maytansin und Ansamitocin P-3

Die verwandten Ansamitocine wurden 1977 aus dem Bakterium *Actinosynnema pretiosum* isoliert,⁶ wobei die in den Actinomyceten gefundenen Substanzen von den pflanzlichen Maytansinen nur in der Natur ihrer Esterseitenkette an C-3 differieren (Abbildung 1). Zwei der mikrobiell produzierten Ansamitocine (AP-0 und AP-1) waren sogar identisch mit dem bereits bekannten Maytansinol bzw. dem Maytanacin, wobei Gegenstand andauernder Untersuchung ist, ob das parallele Vorkommen in Pflanzen und Mikroorganismen auf einen horizontalen Gentransfer oder ein symbiotisches Verhältnis zurückzuführen ist.⁷ Für einen umfassenden Überblick zur Klasse der Maytansinoide sei auf einen Review-Artikel von CASSADY, CHAN, FLOSS und LEISTNER hingewiesen, der ebenfalls für die in Kapitel 2.2 und 2.3 besprochenen Punkte als Referenz angesehen werden kann.⁸

Gemeinsames Merkmal der Maytansinoide ist eine 19-gliedrige Makrolactam-Struktur, welche sich durch Intergration eines aromatischen Systems in einen aliphatischen Zyklus, der gewissermaßen einen „Henkel“ (*lat. ansa*) bildet, auszeichnet. Strukturell sind sie damit zur Klasse der Ansamycin-Antibiotika⁹ zuzuordnen, denen auch so bekannte und pharmakologisch bedeutende Substanzen wie Geldanamycin **3**,¹⁰ Rifamycin **4**,¹¹

⁴ M. W. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, *Chem. Commun.* **1973**, 390.

⁵ K. Sakai, T. Ichikawa, K. Yamada, M. Yamashita, M. Tanimoto, A. Hikita, Y. Ijuin, K. Kondo, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 845-850.

⁶ E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino, M. Yoneda, *Nature* **1977**, *270*, 721-722.

⁷ C. B. Pullen, P. Schmitz, D. Hoffmann, K. Meurer, T. Boetcher, D. von Bamberg, A. M. Pereira, S. de Castro Franca, M. Hauser, H. Geertsema, A. van Wyk, T. Mahmud, H. G. Floss, E. Leistner, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 377-387.

⁸ J. M. Cassady, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1-26 und darin angegebene Referenzen.

⁹ Einen umfassenden Überblick gibt: S. Funayama, G. A. Cordell, *Ansamycin Antibiotics discovery, classification, biosynthesis and biological activities*, In *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 23*, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier Science B. V. **2000**, 51-106.

¹⁰ C. DeBoer, P. A. Meulman, R. J. Wnuk, D. H. Peterson, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 440-447.

¹¹ H. G. Floss, T.-W. Yu, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 621-632.

Ansatrienin **5**,¹² Naphthomycin **6**¹³ und Rubradirin¹⁴ angehören (Abbildung 2). Biosynthetisch betrachtet basieren alle Ansamycine auf einer gemeinsamen mC_7N -Einheit, von welcher ausgehend das jeweilige Polyketid aufgebaut wird. Deren Ursprung und die weitere biosynthetische Prozessierung sind Gegenstand des nächsten Kapitels.

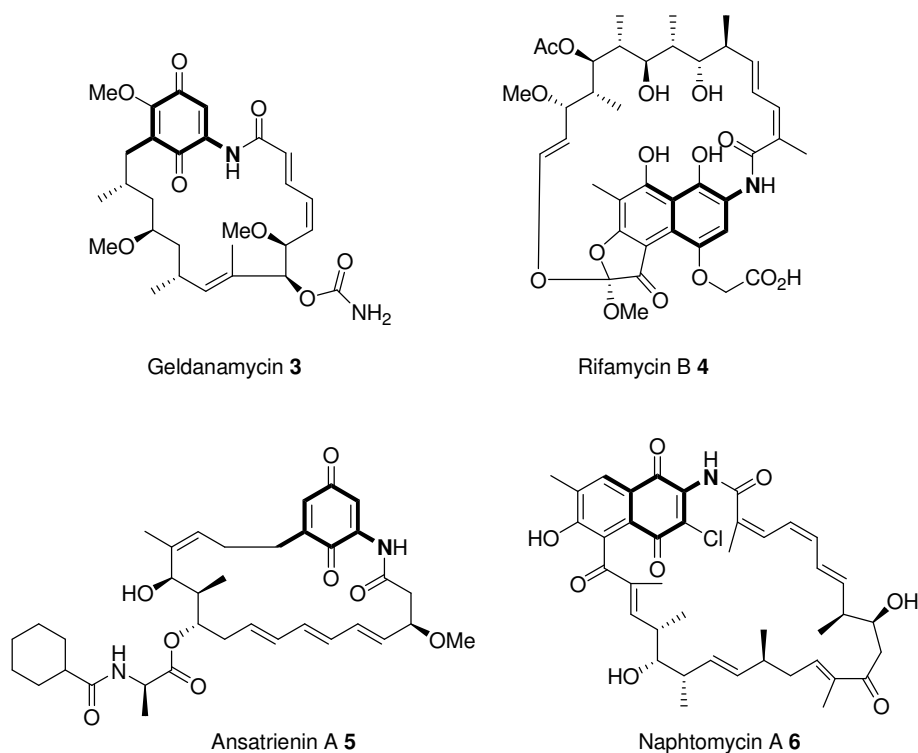


Abbildung 2: Benzenoide und naphthalenoide Ansamycin-Antibiotika (mC_7N -Einheit ist jeweils hervorgehoben).

Trotz ihres verwandten Aufbaus ist das Wirkspektrum der verschiedenen Ansamycin-Antibiotika sehr unterschiedlich, was durch eine große Variation der jeweiligen Wirkorte reflektiert wird. Rifamycin B wird beispielsweise in Form des semisynthetischen Derivats Rifampicin als Inhibitor der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase zur Behandlung mykobakterieller Infektionen wie Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) und Lepra (*M. leprae*) eingesetzt.¹¹ Geldanamycin hingegen wirkt zytostatisch über eine Bindung an die N-terminale Domäne von Hsp90 als kompetitiver Inhibitor von ATP.¹⁵ Die antitumorale Wirkung der Maytansinoide ist durch eine Inhibierung des Aufbaus des eukaryotischen Zytoskeletts begründet. Der antimittotischen Wirkungsweise der Vinca-Alkaloide ähnelnd,¹⁶

¹² a) C. Coronelli, R. C. Pasqualucci, J. E. Thiemann, G. Tamoni, *J. Antibiot.* **1967**, *20*, 329-333; b) W. Weber, H. Zähler, M. Damberg, P. Russ, A. Zeeck, *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. C* **1981**, *2*, 122-139.

¹³ T. H. Williams, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 85-86.

¹⁴ a) B. K. Bhuyan, S. P. Owen, A. Dietz, *Antimicrob. Agts. Chemother.* **1964** **1965**, 91-96; b) C. E. Meyer, *Antimicrob. Agts. Chemother.* **1964** **1965**, 97-99.

¹⁵ C. Prodomus, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *Cell* **1997**, *90*, 65-75.

¹⁶ S. S. Rai, J. Wolff, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14707-14711.

wird die Polymerisation der Mikrotubuli durch Bindung an die Vinblastin-Bindungsstellen¹⁷ der β -Tubulinuntereinheiten verhindert,¹⁸ was zur Hemmung der Mitose in der Metaphase führt.¹⁹

Alle Maytansinoide besitzen eine vergleichbar hohe Aktivität (Maytansin: $ED_{50} = 10^{-4} - 10^{-5}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$) gegenüber humanen KB-Zellen *in vitro* und zeigten neben antileukämischer Aktivität starke inhibitorische Wirkung in fünf tierischen Standard-Tumorsystemen.²⁰ Nach diesen erfolgversprechenden präklinischen Studien ergaben erste klinische Experimente der Phase I eine Dosis-limitierende Toxizität von 1-2 mg/m^2 infolge von Neurotoxizität sowie gastrointestinaler Toxizität. Die aufgrund des positiven Ansprechens einiger Probanden der ersten klinischen Phase²¹ durchgeführten Folgestudien der Phase II resultierten letztlich in einer Einstellung weiterer klinischer Experimente.²²

2.2 Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*

Im Folgenden soll ein Einblick in die generellen Mechanismen der bakteriellen Polyketidsynthese gegeben und darauf aufbauend die Biosynthese von Ansamitocin detailliert vorgestellt werden.

Polyketide werden durch Polyketidsynthasen (PKS) analog zur Fettsäurebiosynthese über repetitive CLAISEN-Kondensationen aus als Coenzym A (CoA)-Thioester aktivierten und optional substituierten Carbonsäuren²³ aufgebaut und gegebenenfalls reduktiv prozessiert.²⁴ So kann in Analogie zu den Fettsäuresynthase-(FAS)-architekturen zwischen modularen (Typ I) PKS und solchen mit freistehenden, iterativ genutzten, monofunktionalen Enzymen (Typ

¹⁷ B. Bhattacharrya, J. Wolff, *FEBS Lett.* **1977**, 75, 159-162.

¹⁸ a) S. Remillard, L. I. Rebhun, G. A. Howie, S. M. Kupchan, *Science* **1975**, 189, 1002-1005; b) E. Hamel, *Pharmacol. Therap.* **1992**, 55, 31-51.

¹⁹ K. Ootsu, Y. Kozai, S. Takeuchi, S. Ikeyama, K. Igarashi, K. Tsukamoto, Y. Sugino, K. Tashiro, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Cancer Res.* **1980**, 40, 1707-1717.

²⁰ B. F. Isell, S. T. Crooke, *Cancer Treatment Revs.* **1978**, 5, 199-207.

²¹ Y. Komoda, T. Kishi, *Anticancer agents based on natural product models*, ed. by J. Douros, J. M. Cassady, Academic Press, New York **1980**, 353-389.

²² a) J. T. Thigpen, C. E. Ehrlich, W. T. Creasman, S. Curry, J. A. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 273-275; b) J. T. Thigpen, C. E. Ehrlich, J. Conroy, J. A. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 427-430; c) M. H. Kalser et al., *Cancer Treatment Rep.* **1985**, 69, 417-420; d) M. J. Ravry, G. A. Omura, R. Birch, *Am. J. Clin. Oncol.* **1985**, 8, 148-150.

²³ Y. A. Chan, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 90-114.

²⁴ a) E. S. Sattely, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 757-793; b) S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1041-1072; c) A. M. Hill, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 256-320; d) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380-416; e) C. W. Carreras, R. Pieper, C. Khosla, *The chemistry and biology of fatty acid, polyketide, and nonribosomal peptide biosynthesis*, In *Topics in Current Chemistry*, Vol. 188, Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, 86-126.

II)²⁵ unterschieden werden. Darüber hinaus gibt es auch PKS vom Typ III, welche CoA-Thioester direkt als Substrat ohne Verwendung eines Acyl-Carrier-Proteins (ACP) nutzen.²⁶ Zudem existieren hybride Varianten aus Typ I/ Typ II-Systemen, Typ I kombiniert mit nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und weitere Kombinationen.²⁷

Modulare PKS (Typ I) bestehen aus großen Multienzym-Komplexen (100 kDa ~ 10 MDa), die kovalent verbundene, katalytisch aktive Domänen beherbergen, welche ihrerseits in Modulen organisiert sind und typischerweise nicht-iterativ genutzt werden.²⁸ Am Beginn der Polyketidsynthese wird ein Initiationsbaustein durch das Lademodul in die Produktionslinie der PKS eingeführt. Dabei erfolgt von einer Acyltransferase (AT) durch selektive Auswahl der als CoA-Thioester aktivierten Carbonsäuren die Übertragung auf die terminale Thiol-Funktionalität der Phosphopantetheinyl-Seitenkette eines benachbarten Acyl-Carrier-Proteins (ACP) (Abbildung 3).

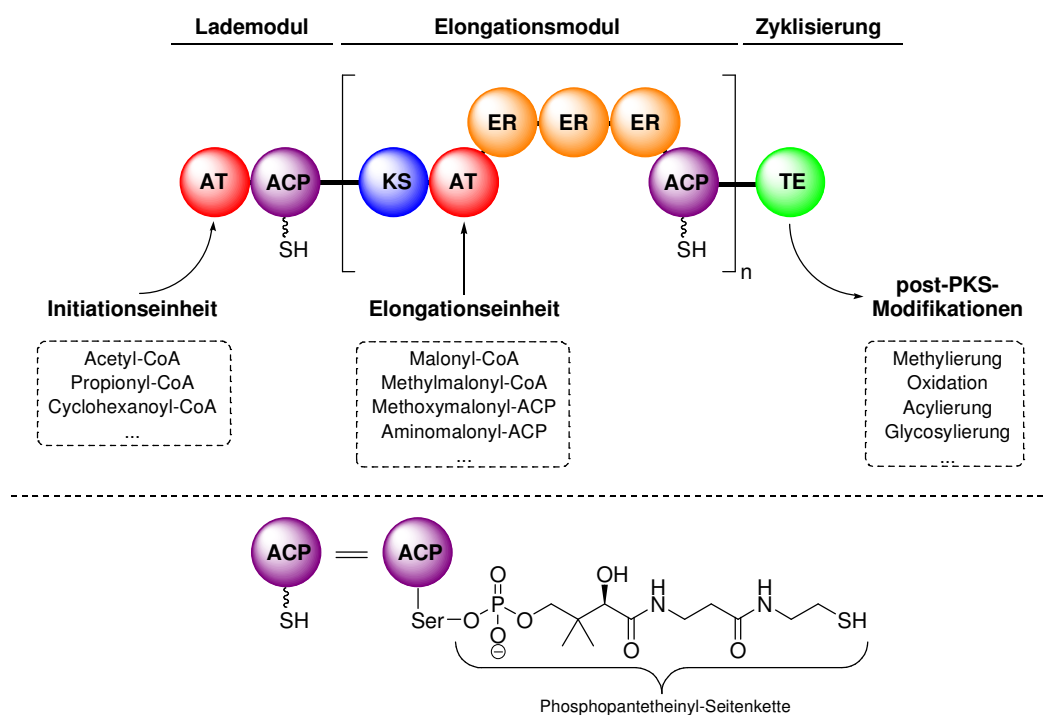


Abbildung 3: Schematische Darstellung bakterieller Typ I Polyketidsynthasen (das ACP wird durch eine Phosphopantetheinyltransferase posttranslational aktiviert).

Nach der Aufladung wird eine dem jeweiligen Produkt charakteristische Abfolge von Elongationsmodulen durchschritten. Diese besteht mindestens aus einer Ketosynthase (KS)

²⁵ C. Hertweck, A. Lutzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162-190.

²⁶ M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79-110.

²⁷ C. T. Walsh, *Science* **2004**, *303*, 1805-1810.

²⁸ a) K. J. Weissman, R. Müller, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 826-848; b) D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *91*, 2465-2497.

als Überträger des wachsenden Polyketids, einer AT zur selektiven Auswahl der Elongationseinheit und eines ACP, auf welches letztere transferiert wird. Somit bleibt das naszierende Polyketid am ACP gebunden und kann zusätzliche reduktive Transformationen erfahren. Eine Ketoreduktase (KR) ermöglicht die stereoselektive Reduktion der neu entstandenen β -Carbonyl-Funktionalität,²⁹ woraufhin durch eine Dehydratase (DH) eine *syn*-Eliminierung zum ungesättigten Produkt erfolgen kann.³⁰ Eine Enoylreduktase (ER) katalysiert schließlich die stereoselektive Reduktion zum gesättigten System,³¹ wobei diese reduktiven Transformierungen im Gegensatz zur FAS optional sind.

Nach der durch die Anzahl der Module festgelegten Kettenverlängerung wird das Polyketid durch eine Thioesterase (TE) von der PKS abgespalten, wobei es zur intramolekularen Zyklisierung oder einer hydrolytischen Abspaltung kommen kann. Zudem existieren zykloligomerisierende Systeme, in denen erst nach intermolekularer Oligomerisierung ein intramolekularer Ringschluss erfolgt. In vielen Fällen finden im Anschluss weitere post-PKS-Modifizierungen statt, die häufig für die biologische Wirkung des Sekundärmetaboliten eine entscheidene Rolle spielen.

Die Biosynthese von Ansamitocin P-3 **2** wurde durch den Arbeitskreis FLOSS aufgeklärt³² und ist in Schema 1 dargestellt. Wie schon in Kapitel 1.1 angedeutet, besitzt die Klasse der Ansamycine als Initiationsbaustein der PKS eine mC_7N -Einheit, die 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure (AHBA, **7**). Ausgehend von UDP-Glucose³³ wird die Startereinheit AHBA über eine Variante des Shikimat-Biosynthesewegs synthetisiert, bei der es über die Bildung von Kanosamin zur Einführung einer Aminogruppe kommt. Die entsprechenden Gene sind in assoziierten Nebengenclustern organisiert (*asm47* \rightarrow *asm22*).^{8, 34} Der Initiationsbaustein der PKS muss bei der Biosynthese der Ansamycine nicht als aktivierter CoA-Thioester vorliegen, sondern wird als freie Säure ähnlich eines NRPS-Mechanismus durch eine Adenylierungsdomäne (ADE) über ein gemischtes Anhydrid mit Adenosinmonophosphat aktiviert und anschließend auf das benachbarte ACP transferiert.³⁵

²⁹ R. Castonguay, W. He, A. Y. Chen, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11614-11616.

³⁰ R. Castonguay, C. R. Valenzano, A. Y. Chen, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11598-11599.

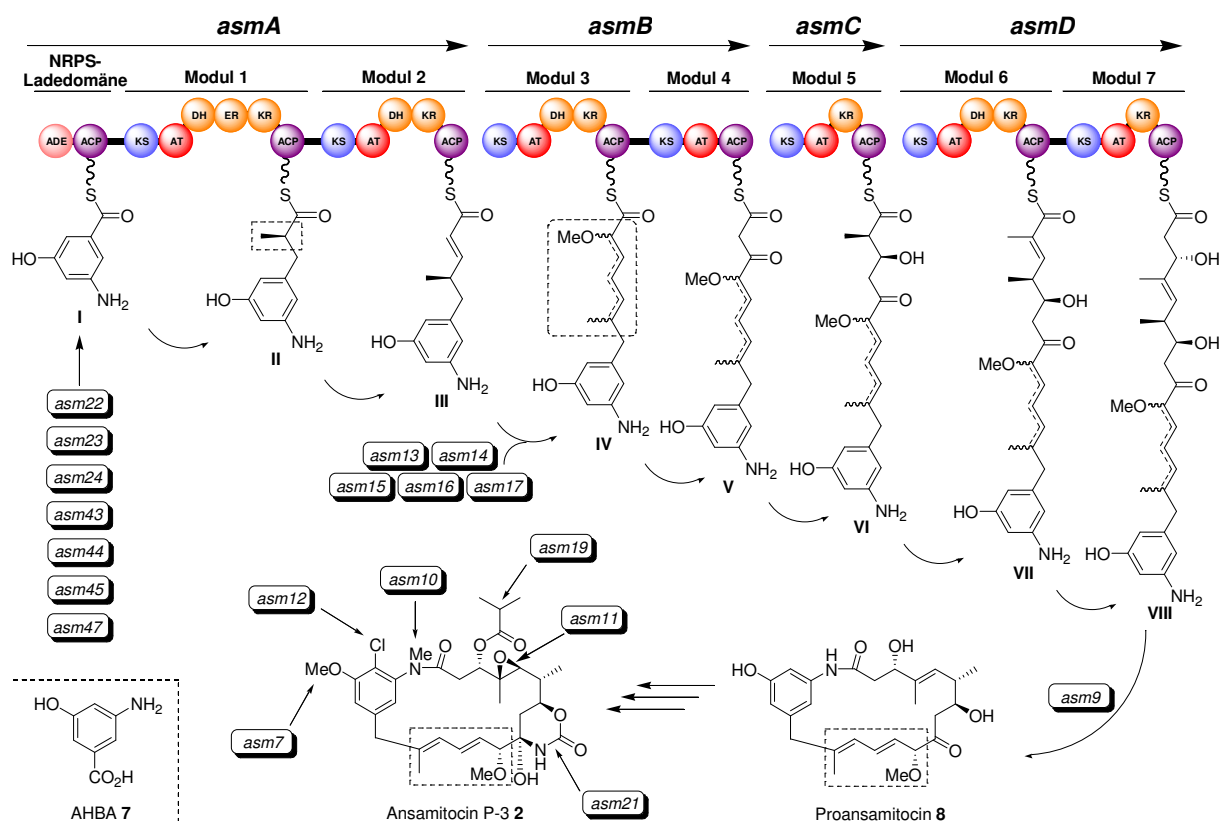
³¹ S. B. Bumpus, N. A. Magarvey, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, C. T. Calderone, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11614-11616.

³² T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7968 – 7973.

³³ UDP-Glucose = Uridindiphosphatglucose

³⁴ C.-G. Kim, A. Kirschning, P. Bergon, P. Zhou, E. Su, B. Sauerbrei, S. Ning, Y. Ahn, M. Breuer, E. Leistner, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7486-7491.

³⁵ S. J. Admiraal, C. T. Walsh, C. Khosla, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6116-6123.



Schema 1: Biosynthese von Ansamitocin P-3 unter Angabe der im Aufbau involvierten Gene (*asm*). Die Position des Diensystems der PKS-gebundenen Polyketide ist nicht bekannt.

Nach der Aufladung wird das vollständige Kohlenstoff-Grundgerüst in sieben Kettenverlängerungsschritten aufgebaut. Besonderheiten in der Ansamitocin-Biosynthese sind die Inkorporierung des ungewöhnlichen Elongationsbausteins Methoxymalonyl-ACP,³⁶ sowie eine Doppelbindungswanderung, welche sich für das in den Maytansinoiden aufzufindende, für Polyketide untypische $\Delta^{11,13}$ -Diensystem verantwortlich zeigt. Die damit verbundene kryptische Stereochemie des Diketids (**II**) an C-14 konnte jüngst aufgeklärt werden,³⁷ der Zeitpunkt der Doppelbindungswanderung ist aber weiterhin unklar, wobei vorgeschlagen wird, dass sich dieser Schritt noch auf der PKS vollzieht.³⁸ Nach der durch die Amidsynthese *Asm9* katalysierten Makrolactamisierung zu Proansamitocin **8** wird das biologisch aktive Produkt erst durch sechs post-PKS-Modifizierungen gebildet, zu denen eine Chlorierung (*Asm12*), zwei Methylierungen (*Asm7*, *Asm10*), eine Acylierung (*Asm19*), eine Epoxidierung (*Asm11*) und eine Carbamoylierung (*Asm21*) zählen.

³⁶ B. J. Carrol, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Zoelzer, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.

³⁷ T. Kubota, M. Brünjes, T. Frenzel, J. Xu, A. Kirschning, H. G. Floss, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1221-1225.

³⁸ P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carrol, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236-14237.

2.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Im Hinblick auf eine gezielte Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten mit verbessertem Wirkprofil sind Kenntnisse über den Einfluss der enthaltenen Strukturelemente auf die zytotoxische Aktivität essentiell. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*engl.* structure-activity relationship, SAR) wurden im Fall der Maytansinoide größtenteils auf Grundlage der natürlichen Derivate, sowie 29 semisynthetisch dargestellter Maytansin-Analoga untersucht (Abbildung 4).³⁹

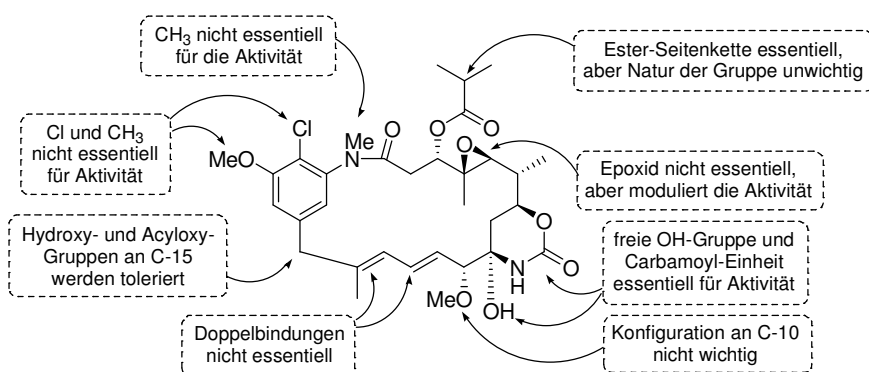


Abbildung 4: Zusammenfassung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Maytansinoide.

Dabei konnte zum einen der grundlegende Einfluss der Ester-Seitenkette auf die Zytotoxizität ermittelt werden, zum anderen stellte sich das Carbinol-Amid als essentiell für die Aktivität heraus,⁴⁰ wobei letzterem eine entscheidende, alkylierende Funktion zugeschrieben wird. Das Fehlen der Ester-Seitenkette oder Bildung des C-3-Epimers resultierte in einem drastischen Einbruch der zytotoxischen Wirkung.

Aufgrund ihrer Komplexität konnten die später abgeschlossenen Totalsynthesen⁴¹ auch nur wenig zum Verständnis beitragen, so dass fortgeschrittene Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durch weitergehende chemische Variationen oder durch Veränderungen des Kohlenstoffgerüsts nicht aufgestellt werden konnten.

³⁹ A. Kawai, H. Akimoto, Y. Kozai, K. Ootsu, S. Tanida, N. Hashimoto, H. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3441-3451.

⁴⁰ S. M. Kupchan, A. T. Sneden, A. R. Branfman, G. A. Howie, L. I. Rebhun, W. E. McIvor, R. W. Wang, T. C. Schnaitman, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 31-37.

⁴¹ Einen umfassenden Überblick über die durchgeführten Totalsynthesen gibt: A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch, *C. R. Chimie* **2008**, *11*, 1523-1543.

2.4 Mutasyntese

Sekundärmetabolite stellen eine wichtige Klasse von Naturstoffen dar, welche sich durch eine hohe strukturelle Diversität mit unterschiedlichsten biologischen Aktivitäten auszeichnen. Durch ihre im Rahmen natürlicher Selektion erfolgten Präevaluierung als potenzielle Liganden für Proteine und Rezeptoren agieren Naturstoffe als entscheidende Quelle zur Wirkstofffindung in den unterschiedlichsten therapeutischen Feldern, vom Einsatz als Antiinfektiva über die Nutzung als Immunsuppressiva bis hin zur Krebstherapie.¹

Nach der Ermittlung einer Naturstoff-basierten Leitstruktur stellt die Erzeugung von Substanzbibliotheken zur Ermittlung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen die Entwicklung eines optimierten Wirkstoffs für den klinischen Einsatz in Aussicht. Bisher dienten diesem Zweck vor allem semisynthetische Veränderungen des Naturstoffs selbst, welche allerdings meist auf einfache Modifizierungen beschränkt sind. Totalsynthetische Zugänge zu neuen Derivaten, welche beliebige Variationen zulassen, sind häufig aufgrund des hohen Aufwands - bedingt durch ihre Komplexität - zur Ermittlung von SARs nicht gerechtfertigt.

Neben diesen Methoden zur Erstellung von Naturstoff-basierten Bibliotheken spielt die gezielte Beeinflussung der Sekundärmetabolit-Biosynthese eine immer wichtigere Rolle.⁴² Die älteste, chemische Synthese und zellulären Metabolismus vereinende Strategie stellt dabei die Vorläufer-dirigierte Biosynthese (*engl. precursor-directed biosynthesis*, PDB) dar (Schema 2, Fall II).⁴³ Diese Technik nutzt die Biosynthesemaschinerie eines Sekundärmetabolit-Produzenten, wobei durch Supplementierung von modifizierten Biosynthese-Vorläufern die Bildung von Derivaten des natürlichen Naturstoffes erreicht werden kann. Trotz der einfachen Durchführbarkeit dieser Methode resultiert die inhärente Konkurrenz zwischen natürlichem und modifiziertem Vorläufer in geringen Ausbeuten der gewünschten Analoga, verbunden mit Schwierigkeiten in Trennung und Isolierung.⁴⁴

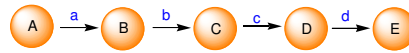
⁴² a) A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3295; b) H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988-7007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6828-6846.

⁴³ R. Thiercke, R. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289.

⁴⁴ a) S. I. Kozhushkov, B. D. Zlatopolskiy, M. Brandl, P. Alvermann B. D. Zlatopolskiy, B. Geers, A. de Meijere, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 854-863; b) B. D. Zlatopolskiy, A. Zeeck, A. de Meijere, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1525-1534; c) P. A. S. Lowden, G. A. Böhm, S. Metcalfe, J. Staunton, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 535-538; d) E. I. Graziani, F. V. Ritacco, M. Y. Summers, T. M. Zabriskie, K. Yu, V. S. Bernan, M. Greenstein, G. T. Carter, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2385-2388; e) F. V. Ritacco, E. I. Graziani, M. Y. Summers, T. M. Zabriskie, K. Yu, V. S. Bernan, G. T. Carter, M. Greenstein, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 1971-1976.

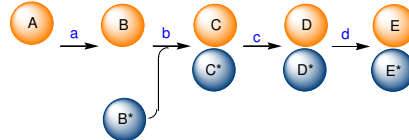
I. Biosynthese von Naturstoffen

Wildtyp



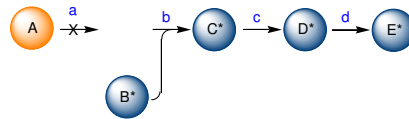
II. Vorläufer-dirigierte Biosynthese (PDB)

Wildtyp



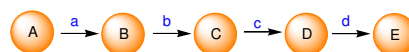
III. Mutasynthese (MBS)

mutierter Organismus

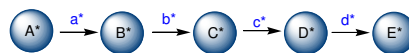


IV. Kombinatorische Biosynthese

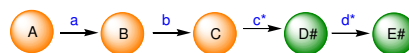
Wildtyp I



Wildtyp II



homologe oder heterologe Expression von Genclustern



Schema 2: Biosynthese-Konzepte zur Darstellung von Naturstoffen und deren Derivaten (a-d = Enzyme, A = Initiationsbaustein, B-D = Biosynthese-Intermediate, E = Naturstoff oder Derivat).^{42a}

Hervorgegangen aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese nutzt der mutasynthetische Ansatz einen genetisch manipulierten Organismus, bei dem ein spezifischer Schritt in der Biosynthese geblockt wurde (Schema 2, Fall III).^{42a, 45} Die Bezeichnung dieses Ansatzes als Mutasynthese wurde von RINEHART geprägt,⁴⁶ wobei die Methode bereits 1963 von BIRCH als Alternative zu PDB vorgeschlagen wurde.⁴⁷ Während damals die Herstellung geeigneter Mutanten nur über ungerichtete Mutagenese und Selektierung der Klone möglich war, erlaubt die steigende Anzahl sequenzierter Genome verbunden mit den enormen Fortschritten in

⁴⁵ a) J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 25-34; b) S. Weist, R. D. Süssmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 141-150; c) W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. & Biol.* **2002**, 9, 1163-1166.

⁴⁶ K. L. Rinehardt Jr., *Pure Appl. Chem.* **1977**, 49, 1361-1384.

⁴⁷ A. J. Birch, *Pure Appl. Chem.* **1963**, 7, 527.

molekularbiologischen Techniken eine direkte Erzeugung der Mutanten, was zu einer Renaissance der Mutasynthese führte.

Weil der modifizierte Vorläufer nicht mit dem natürlichen Substrat konkurrieren muss, kann durch einen mutasynthetischen Ansatz der Einbau der zugefütterten Substanzen stark erhöht und Derivate erzeugt werden, die über PDB nicht zugänglich sind.⁴⁸ Das Potenzial dieses Konzepts konnte besonders eindrucksvoll am Beispiel des Doramectins gezeigt werden, welches ein biologisch aktiveres Derivat des anthelmintisch⁴⁹ wirkenden Avermectins und der erste über Mutasynthese erzeugte kommerzielle Wirkstoff ist.⁵⁰ Auf eine weitere Aufzählung von Beispielen erfolgreicher Mutasynthesen sei mit dem Verweis auf die umfangreichen Reviews zu diesem Thema verzichtet.^{42a, 45}

Als limitierender Faktor bei allen Mutasynthesen sind die Substratspezifitäten aller beteiligten Enzyme zu sehen, so dass die Akzeptanz eines zugefütterten Vorläufers („Mutasynthon“) und seine Prozessierung zum Naturstoff-Derivat nicht immer erfolgreich sein kann. Dennoch erlaubt es diese Technik, mit wenig Aufwand gezielte Veränderungen an einem Naturstoff vorzunehmen, die meist komplementär zu den etablierten synthetischen Verfahren sind, um so weitergehende Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu ermitteln.

Zusätzlich bietet eine Mutante eines Naturstoffproduzenten die Möglichkeit, über Komplementierungsexperimente Einsichten in die Biosynthese zu erlangen, indem hypothetische Biosynthese-Intermediate zugefüttert werden. Eine Akzeptanz des synthetischen Vorläufers lässt dessen Existenz in der Biosynthese erkennen.^{37, 51}

Die Anwendung fortgeschrittener genetischer Manipulationstechniken bietet darüber hinaus einen weiteren prinzipiellen Ansatz (Schema 2, Fall IV). Während die zuvor beschriebenen Methoden die vorgegebene Biosynthesemaschinerie eines Sekundärmetabolit-Produzenten nutzen, verwendet die kombinatorische Biosynthese Gencluster unterschiedlicher Herkunft. Verbunden mit heterologer Expression in besser handhabbaren Produktionswirten kann so theoretisch die Synthese fast beliebiger Strukturen *in vivo* erreicht werden. Die komplexen

⁴⁸ M. A. Gregory, H. Petkovic, R. E. Lill, S. J. Moss, B. Wilkinson, S. Gaisser, P. F. Leadlay, R. M. Sheridan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4835-4838.

⁴⁹ anthelmintisch = wurmabtötend

⁵⁰ C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, M. K. Richards, *J. Antibiotics* **1991**, 357-365.

⁵¹ I. V. Hartung, M. A. Rude, N. A. Schnarr, D. Hunziker, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11202-11203.

Zusammenhänge, die innerhalb eines Organismus herrschen (Interaktionsdomänen, Regulationsfaktoren), sind allerdings noch nicht vollständig verstanden.⁵²

2.5 Tumor-„targeting“ durch spezifisch bindende Konjugate

Die Generierung von Naturstoff-basierten Substanzbibliotheken mit anschließender biologischer Evaluierung stellt eine essentielle Stufe auf dem Weg zur Identifizierung neuer Derivate mit verbessertem pharmakologischen Wirkspektrum und verringerter Toxizität dar. Obwohl diese heuristische Strategie auf „trial and error“ (*engl.* für Versuch und Irrtum) basiert, zeigte ein derartiges Vorgehen im Fall des Geldanamycins bereits erste Erfolge. Die beiden semisynthetisch erzeugten Analoga 17-DMAG⁵³ und 17-AAG⁵⁴ wiesen in ersten Experimenten deutlich reduzierte Nebenwirkungen und ein verbessertes Wirkspektrum auf,⁵⁵ so dass bisher insgesamt 51 Studien der klinischen Phasen I und II mit diesen Substanzen initiiert und teilweise schon abgeschlossen wurden.

Eine alternative Strategie wird durch die Bildung von Konjugaten aus hoch zytotoxischen Wirkstoffen mit spezifisch bindenden, Tumor-gerichteten Antikörpern oder Liganden verfolgt. Hierbei kann ein gerichteter Transport des Zytotoxins zur Tumorzelle erreicht werden. Nach Endozytose kommt es im Endosom zur hydrolytischen oder reduktiven Spaltung des Konjugats, wodurch der zytotoxische Wirkstoff freigesetzt wird. Die dadurch ermöglichte gezielte Freisetzung des Toxins in der neoplastischen Zelle hat zur Folge, dass auch eine geringere Dosierung des Wirkstoffes nötig ist. Die Übertragung einer Tumorselektivität auf Zytotoxika kann so die üblicherweise auftretenden, Dosis-abhängigen Nebenwirkungen stark reduzieren.⁵⁶ Abbildung 5 stellt schematisch das Antikörper-vermittelte Tumor-„targeting“ dar.

⁵² a) H. G. Floss, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 242-257; b) C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 124-134; c) J. Staunton, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 159-164.

⁵³ 17-DMAG = 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin

⁵⁴ 17-AAG = 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin

⁵⁵ E. E. A. Bull, H. Dote, K. J. Brady, W. E. Burgan, D. J. Carter, M. A. Cerra, K. A. Oswald, M. G. Hollingshead, K. Camphausen, P. J. Tofilon, *Clin. Canc. Res.* **2004**, *10*, 8077-8084.

⁵⁶ a) A. M. Thayer, *C&EN June 16* **2008**, 28-32; b) R. V. J. Chari, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *41*, 98-107; c) P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *41*, 120-129; d) A. M. Wu, P. D. Senter, *Nature Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137-1146.

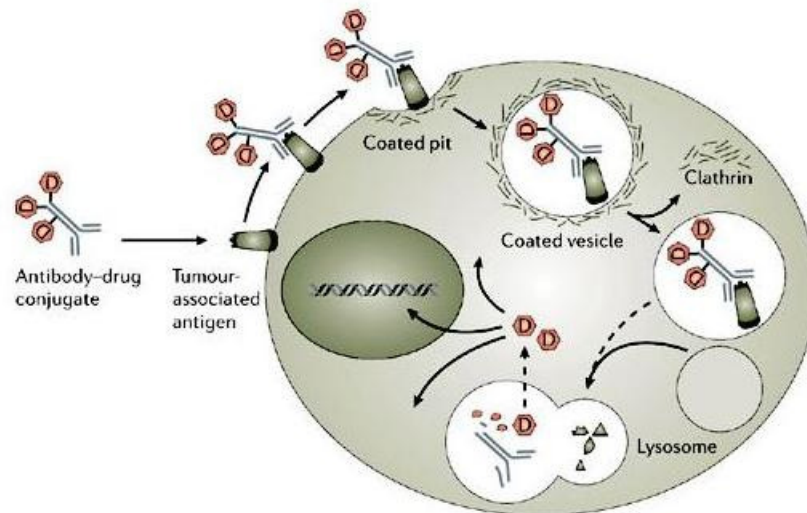


Abbildung 5: Tumor-„targeting“ und Endozytose am Beispiel von Tumor-gerichteten Antikörpern ($D = \text{Toxin}$).
Quelle: D. Schrama, R. A. Reisfeld, J. C. Becker, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 147-159.

Vielversprechende Studien⁵⁷ mit Tumor-adressierenden Antikörpern wurden jüngst mit den Synthesen von Ansamitocin-Immunkonjugaten publiziert (Abbildung 6), die vor allem durch IMMUNOGEN INC. vorangetrieben wurden.

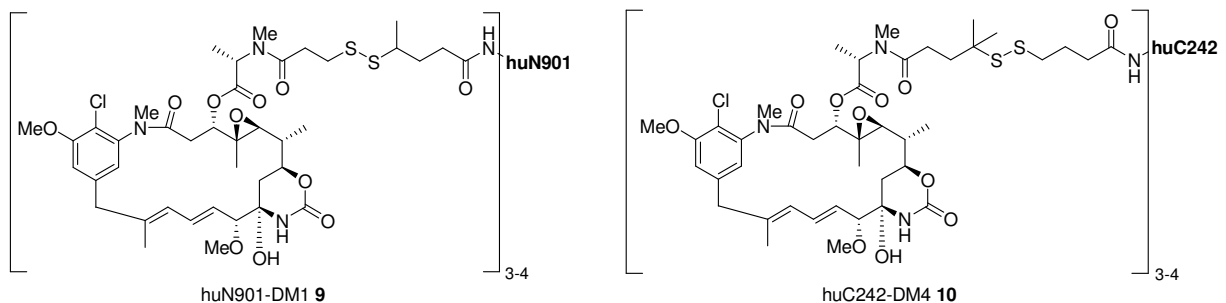


Abbildung 6: Ansamitocin-basierte Immunkonjugate.

Die Komplexität dieser Strukturen gestaltet deren großtechnische Produktion allerdings problematisch, wobei zudem die Bereitstellung großer Mengen von humanisierten monoklonalen Antikörpern⁵⁸ aufwändig ist, so dass allein aus Kosten-Nutzen-Betrachtung

⁵⁷ a) H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison, Y. V. Kovtun, L. M. Garrett, K. Hoffman, R. J. Lutz, V. S. Goldmacher, W. A. Blättler, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4426-4433; b) Y. V. Kovtun, C. A. Audette, Y. Ye, H. Xie, M. F. Ruberti, S. J. Phinney, B. A. Leece, T. Chittenden, W. A. Blättler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3214-3221; c) H. Xie, C. Audette, M. Hoffee, J. M. Lambert, W. A. Blättler, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 1073-1082; d) Liu, B. M. Tadayoni, L. A. Bourret, K. M. Mattocks, S. M. Deer, W. C. Widdison, N. L. Kedersha, P. D. Ariniello, V. S. Goldmacher, J. M. Lambert, W. A. Blättler, R. V. J. Chari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8618-8623.

⁵⁸ O. Behrsing, B. Micheel, *Monoklonale Antikörper: Grundlagen und ihre Bedeutung in Diagnostik und Therapie*, In *Grundlagen der Molekularen Medizin*, 3. Aufl., Springer Heidelberg Berlin, **2008**.

eine klinische Anwendung kritisch gesehen wird.^{56a} Die Entwicklung des bis zur klinischen Phase I vorgedrungenen Immunkonjugats Bivatuzumab Mertansine (anti-CD44-DM1, BIWI-1, BOEHRINGER INGELHEIM) wurde angehalten,⁵⁹ die von Cantuzumab Mertansine (huC242-DM1, IMMUNOGEN INC.) zugunsten eines anderen Konjugates (huC242-DM4 **10**) gestoppt.⁶⁰ Das grundlegende Potenzial dieses Konzeptes konnte aber neben diesen ersten Erfolgen auch durch die Verwendung anderer Antikörper⁶¹ oder Cytotoxine⁶² belegt werden.

Neben den Immunotoxinen stellen Konjugate aus Zytotoxika mit Tumor-spezifischen Liganden eine weitere Möglichkeit für einen gerichteten Wirkstofftransport zur Tumorzelle dar. Als Beispiel eines solchen Tumor-spezifischen Liganden konnte Folsäure **11** (Abbildung 7) bereits mit verschiedenen Zytotoxika wie Mitomycin, Camptothecin, Desacetylvinblastin oder Exotoxin fusioniert und deren verbesserte Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.⁶³

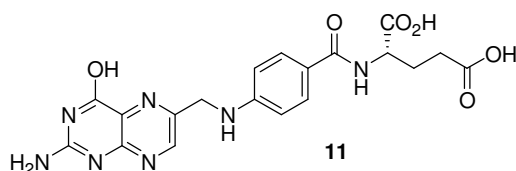


Abbildung 7: Folsäure (Vitamin B₉)

Folsäure (Vitamin B₉ [Deutschland, USA], Vitamin B₁₁ [weltweit]) ist ein für den menschlichen Organismus essenzielles Vitamin, welches durch seine zentrale Stellung in der Purinbiosynthese für die DNA-Replikation notwendig ist. Daher spielt Folsäure eine entscheidende Rolle in der Schwangerschaft und bei sich häufig teilenden Zellen. Während die Verbreitung von Folsäurerezeptoren (FR) auf normalem Gewebe limitiert ist, werden FR auf verschiedensten Tumorzellen überexprimiert, darunter bei Ovarial-,⁶⁴ Lungen-, Brust-,

⁵⁹ Grund dafür waren Hauttoxizitäten

⁶⁰ L. Kelland, *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2006**, *15*, 1309-1318.

⁶¹ a) M. D. Henry, S. Wen, M. D. Silva, S. Chandra, M. Milton, P. J. Worland, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7995-8001; b) P. Tassone, A. Gozzini, V. Goldmacher, M. A. Shammas, K. R. Whiteman, D. R. Carrasco, C. Li, C. K. Allam, S. Venuta, K. C. Anderson, N. C. Munshi, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4629-4636; c) M. Ranson, M. X. Sliwowski, *Oncology* **2002**, *63*, 17-24.

⁶² Der Einsatz von Taxol wird beschrieben in: I. Ojima, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 108-119; Das Anthracyclin Doxorubicin und das En-di-in Calicheamicin wurden ebenfalls in Antikörper-Konjugaten eingesetzt.

⁶³ a) J. A. Reddy, E. Westrick, I. Vlahov, S. J. Howard, H. K. Santhapuram, C. P. Leamon, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 229-236; b) W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350-5355; c) C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, P. J. Kleindl, M. Vetzal, E. Westrick, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1226-1232; d) I. R. Vlahov, H. K. R. Santhapuram, P. J. Kleindl, S. J. Howard, K. M. Stanford, C. P. Leamon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093-5096; e) C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, M. Vetzal, N. Parker, J. S. Nicoson, L.-C. Xu, E. Westrick, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 803-811; f) C. P. Leamon, I. Pastan, P. S. Low, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24847-24854.

⁶⁴ Ovarialkarzinom = Eierstockkrebs

Nieren-, Hirn-, Endometrium-,⁶⁵ und Darmkrebs sowie Krebs der blutbildenden Zellen myeloiden⁶⁶ Ursprungs.⁶⁷ Die auch nach Konjugation mit Wirkstoffen hohe Bindungsaffinität von Folsäure zum FR ($K_d = 10^{-10}$ M) ist zudem vergleichbar mit der von Tumor-spezifischen Antikörpern.

Die Entwicklung des Folsäurerezeptor-„targetings“ wurde vor allem von ENDOCYTE forciert, was auch zur Synthese von Folsäure-Konjugaten mit so bekannten Zytotoxinen wie Taxol (Paclitaxel)⁶⁸, Epothilon⁶⁹ (in Zusammenarbeit mit BRISTOL-MYERS SQUIBB) und Ansamitocin⁷⁰ (in Zusammenarbeit mit IMMUNOGEN INC.) führte (Abbildung 8). Die im Vergleich zu Antikörpern geringe strukturelle Komplexität der Folsäure macht die Synthese solcher Konjugate erheblich einfacher und kostengünstiger, was insbesondere in Hinblick auf ihre klinische Anwendung positiv hervorzuheben ist.

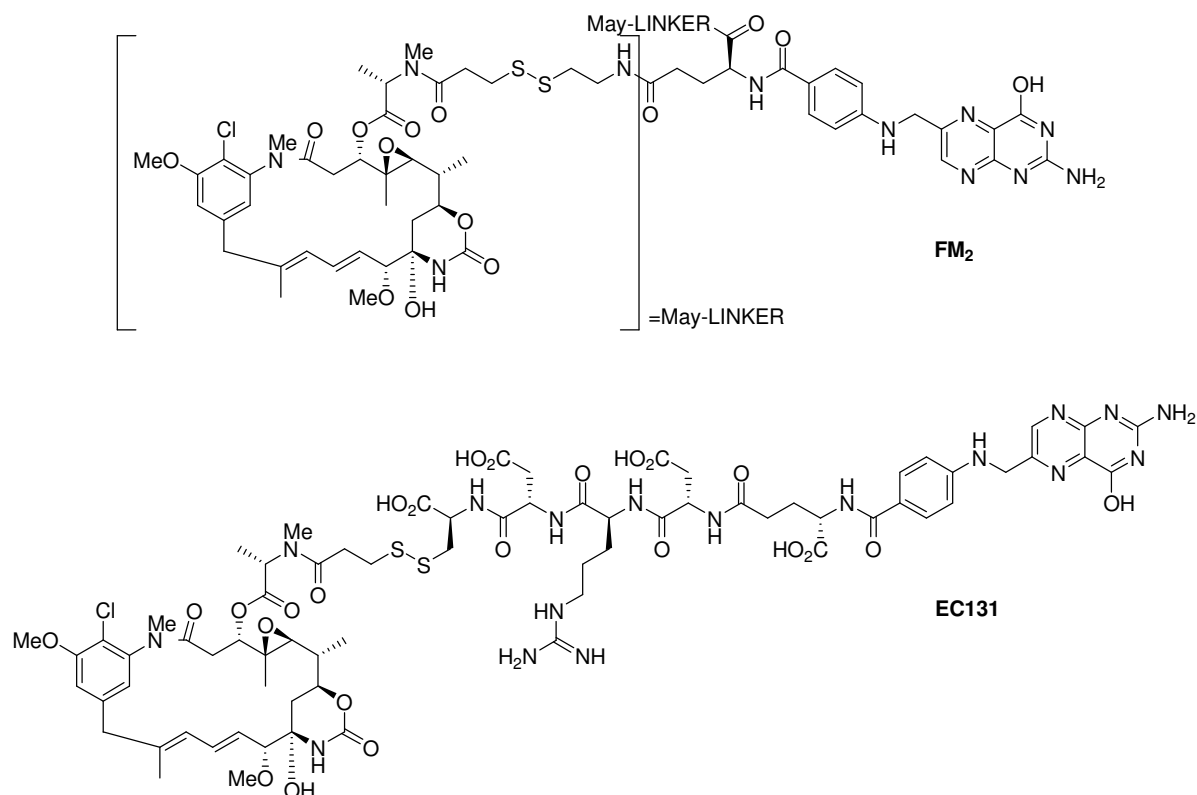


Abbildung 8: Ansamitocin-Folsäure-Konjugate FM₂ und EC131

⁶⁵ Endometrium = Gebärmutter Schleimhaut

⁶⁶ myeloid = aus Knochenmark stammend

⁶⁷ P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1055-1231.

⁶⁸ J. W. Lee, J. Y. Lu, P. S. Low, P. L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *10*, 2397-2414.

⁶⁹ Epopolate (BMS-753493) war zur Zeit dieser Zusammenschrift in klinischen Studien der Phase I und II.

⁷⁰ a) J. A. Reddy, E. Westrick, H. K. R. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzal, I. Vlahov, R. V. J. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6376-6382; b) C. A. Ladino, R. V. J. Chari, L. A. Bourret, N. L. Kedersha, V. S. Goldmacher, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 859-864.

Neben der Auswahl des spezifisch bindenden Moleküls stellte sich auch das Design des Linkers als entscheidend für Aktivität und Selektivität der Konjugate heraus. Der Linker sollte eine hohe Stabilität während der Blutzirkulation besitzen, aber einen schnelle Entlassung der aktiven Zytotoxika in der Tumorzelle gewährleisten. Nachdem sich säurelabile⁷¹ Verknüpfungen als weniger geeignet herausstellten,⁷² konnte durch Entwicklung von Disulfid-basierten Linkern eine geeignete Methode gefunden werden. Die Spaltung erfolgt hierbei reduktiv durch Glutathion⁷³, welches in Zellen in millimolarer Konzentration vorliegt, im Blutkreislauf aber typischerweise nur im mikromolarem Bereich vorhanden ist (Abbildung 9). Durch geeignete Substituenten in Nachbarschaft zur Disulfid-Einheit kann die Stabilität der Bindung in gewünschter Weise beeinflusst werden.

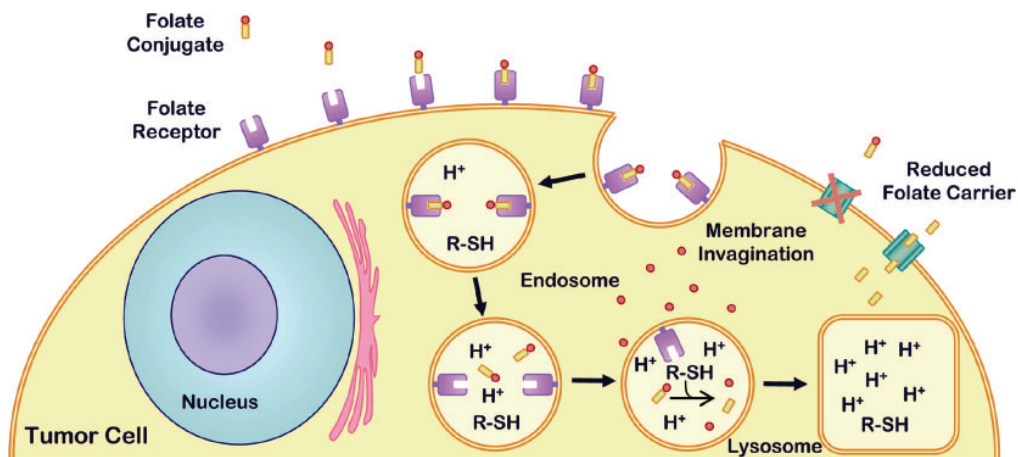


Abbildung 9: Endozytose und Glutathion-vermittelte Spaltung (am Beispiel von FR-„targeting“). Quelle: P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *41*, 120-129.

Die Entwicklung des Tumor-„targetings“ begründet ein erneutes Interesse an den Maytansinoiden. Durch deren gerichteten Transport sollte die Dosis-limitierende Toxizität und die daraus resultierenden Nebenwirkungen umgangen und so ein klinischer Einsatz ermöglicht werden können.

⁷¹ im Endosom liegt ein leicht saures Milieu vor

⁷² J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahos, J. X. Cheng, P. S. Low, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462-468.

⁷³ Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin

3 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation hat auf den ersten Blick recht unterschiedliche Fragestellungen zum Thema, welche allerdings durch ihren gemeinsamen Ursprung im Bakterium *Actinosynnema pretiosum* eng verknüpft sind.

Während der erste Abschnitt dieses Projektes die Aufklärung biosynthetischer Besonderheiten in *A. pretiosum* vorsieht, zielt der zweite Teil auf die Generierung und Evaluierung neuer Ansamitocin-Derivate ab, wodurch weitere Einsichten in Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermöglicht werden sollten. Im dritten Kapitel soll über den Ansatz des Tumor-„targetings“ die Synthese von Ansamitocin-Analoga mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften erarbeitet werden.

Grundlage dieser Studien stellt dabei die in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierte Mutante (HGF073) von *Actinosynnema pretiosum* dar, welche von der Arbeitsgruppe FLOSS erzeugt und zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 10).³² Dadurch werden Komplementierungsexperimente zur Aufklärung der Biosynthese ermöglicht, weiterhin können Substanzbibliotheken zur SAR-Ermittlung mutasynthetisch erstellt werden.



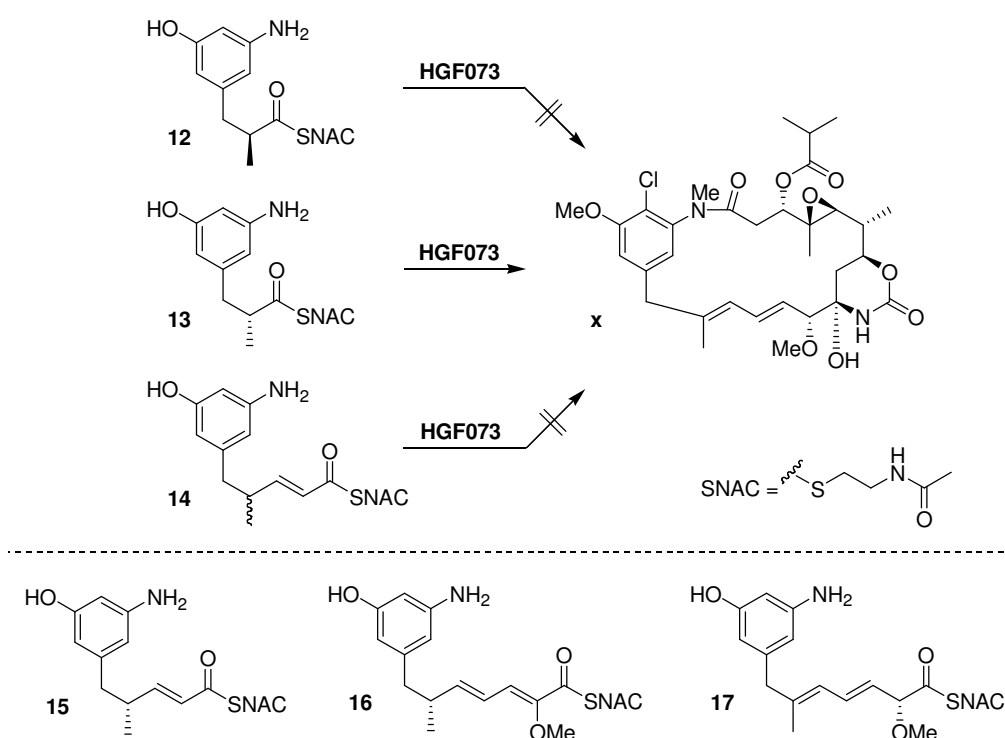
Abbildung 10: *Actinosynnema pretiosum* HGF073 auf YMG-Agar.

3.1 Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum*

Die Biosynthese von Ansamitocin P-3 wurde in Kapitel 2.2 detailliert vorgestellt, wobei schon auf die ungewöhnliche, PKS-untypische $\Delta^{11,13}$ -Doppelbindungsposition in Ansamitocin **2** und Proansamitocin **8** hingewiesen wurde (Schema 1). Ziel des ersten Abschnitts dieser

Arbeit ist die Aufklärung des Zeitpunktes dieser Dien-Migration als letztes ungeklärtes Phänomen in der Ansamitocin-Biosynthese.

Durch chemische Synthese hypothetischer, PKS-gebundener Intermediate und anschließende Komplementierungsexperimente an HGF073 soll so der Zeitpunkt dieser Isomerisierung geklärt werden. Um eine Aufladung der zugefütterten Polyketide auf die korrespondierenden Module zu ermöglichen, werden diese als *N*-Acetylcysteamin-(SNAC)-Thioester synthetisiert. Diese Gruppe stellt ein Mimetikum für die Phosphopantetheinyl-Gruppe eines ACP dar, wodurch eine hohe Akzeptanz dieser SNAC-Ester sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewirkt wird. Zudem wird eine erhöhte Membrangängigkeit dieser Thioester diskutiert.⁷⁴



Schema 3: Bisher erfolgte Komplementierungsexperimente und mögliche Intermediate für die Untersuchung der Doppelbindungswanderung auf der asmPKS.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, konnte durch Komplementierungsexperimente mit den beiden enantiomeren Diketiden (*S*)-**12** und (*R*)-**13** die kryptische Konfiguration an C-14⁷⁵ bestimmt werden.³⁷ Eine racemische Mischung des ebenfalls synthetisierten Triketids **14** wurde in dieser Studie nicht akzeptiert. Somit ergeben sich die in Schema 3 abgebildeten Polyketide **15** - **17** als mögliche Biosynthese-Intermediate auf Modul 2 und 3 und somit als

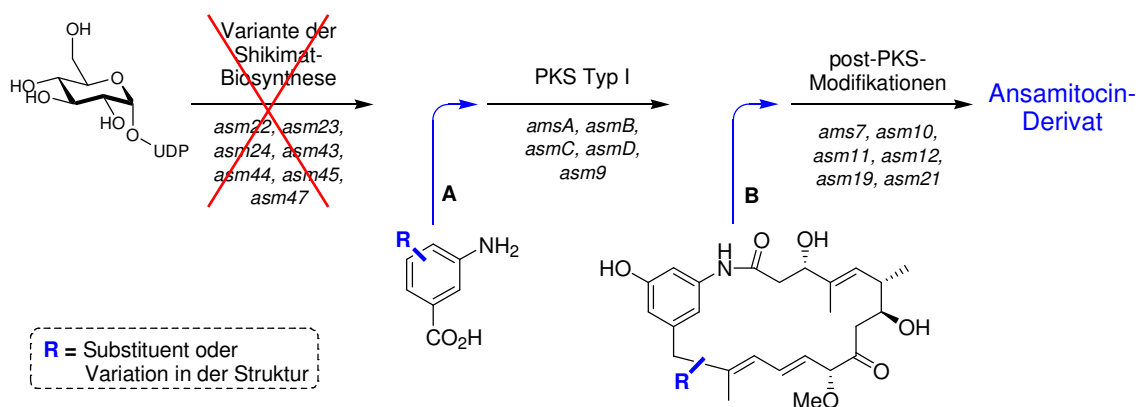
⁷⁴ a) S. Yue, J. S. Duncan, Y. Yamamoto, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1253-1255; b) N. L. Pohl, R. S. Gokhale, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11206-11207; c) C. Khosla, D. E. Cane, F. Kudo, K. Kinoshita, *Chem. Biol.* **2003**, *9*, 131-142.

⁷⁵ Nomenklatur bezogen auf Ansamitocin P-3

Substrate für die Verfütterungsstudien zur Aufklärung der Doppelbindungswanderung. Ein Doppelbindungsisomer von **15** als PKS-gebundene Spezies auf Modul 2 scheint unwahrscheinlich, da dies einen weiteren Doppelbindungs-„shift“ nach Einbau der Glycolat-Einheit auf Modul 3 erfordern würde.

3.2 Mutasynthetische Derivatisierung

Der zweite Abschnitt dieses Projektes sieht die Nutzung der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins geblockten Mutante HGF073 für mutasynthetische Ansätze (siehe Kapitel 2.4) vor. Dies erfordert die Synthese verschiedener Analoga der natürlichen Startereinheit AHBA, welche durch Verfütterung an HGF073 zu Derivaten des Ansamitocins führen können. Grundlage für die geplanten Modifizierungen sind zum einen vorherige Arbeiten auf diesem Gebiet,^{76, 77} zum anderen das Konzept der Bioisosterie, welches eine Methode zur gezielten Auswahl von Funktionalitäten zum Wirkstoffdesign und zur Leitstruktur-Entwicklung darstellt.⁷⁸



Schema 4: Möglichkeiten zur Mutasynthese mit HGF073: A) Adressierung der PKS mit AHBA-Analoga, B) Adressierung der post-PKS-Enzyme mit Proansamitocin-Derivaten.

Neben den Mutasynthesen mit AHBA-Analoga, welche Modifizierungen im aromatischen System von Ansamitocin realisieren können, soll auch die Adressierung der post-PKS-Enzyme durch Verfütterung von Proansamitocin-Derivaten getestet werden. Bei Akzeptanz

⁷⁶ M. Brünjes, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese und Biosynthese von Maytansinoid-Analoga*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

⁷⁷ F. Taft, Diplomarbeit, *Vorläufer-dirigierte Biosynthese von Ansamitocin P-3 und Analoga*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

⁷⁸ a) L. B. Kier, L. H. Hall, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 138-151; b) G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147-3176.

solcher Substrate könnten auch Variationen in der „ansa“-Struktur bewirkt werden (Schema 4).

Ziel dieser Arbeiten soll durch biologische Evaluierung der Mutasynteseprodukte die Ermittlung weitergehender Struktur-Wirkungs-Beziehungen sein, auf deren Grundlage eine Entwicklung von Ansamitocin-Derivaten mit verbessertem Wirkpotenzial ermöglicht werden kann. Weiterhin können diese Studien erste Einblicke in die Substratflexibilität der beteiligten Enzyme liefern, wobei auch nicht vollständig prozessierte Mutasynteseprodukte von Bedeutung sein sollten, da diese einen unmittelbaren Beleg für eine Diskrepanz zwischen Substrat und jeweiligem Enzym liefern.

3.3 Synthese Tumor-gerichteter Ansamitocin-Derivate

Der dritte Teil dieser Dissertation hat zum Ziel, das Konzept des Rezeptor-„targetings“ auf die hoch zytotoxischen Ansamitocine anzuwenden, so dass durch Anbinden eines geeigneten Tumor-spezifischen Liganden über einen Linker ein gezielter Transport der Ansamitocine erreicht werden kann. Aufgrund der zuvor diskutierten Zusammenhänge (Kapitel 2.5) stellt der Folsäurerezeptor ein ideales Ziel für eine solche Strategie dar. Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau der geplanten Tumor-gerichteten Konjugate.

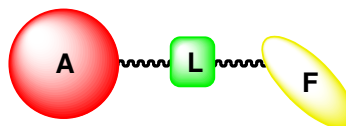


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Tumor-gerichteten Konjugats: A= Ansamitocin(-Derivat), L= Linker, F= Folsäure.

Durch biologische Evaluierung dieser Konjugate sollte eine Selektivitätserhöhung nachweisbar sein. Neben einem Vergleich der Aktivität gegenüber Krebszelllinien, welche Folsäurerezeptoren (FR) exprimieren, und solchen ohne erhöhte FR-Verbreitung, kann eine *in vivo* Validierung dieses Konzeptes durch Behandlung von tumoralen Xenotransplantaten⁷⁹ in Empfängermäusen erfolgen.

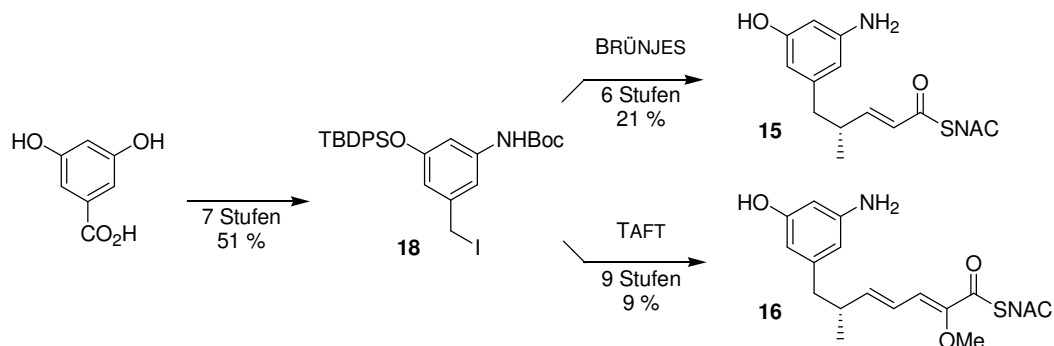
⁷⁹ Xenotransplantat = Heterotransplantat

4 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

4.1 Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum*

4.1.1 Vorarbeiten

Bereits frühere Arbeiten beschäftigten sich mit der Wanderung des Diensystems während der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum* und den daraus resultierenden stereochemischen Besonderheiten.^{76, 77} Die Bestimmung der kryptischen Stereochemie an C-14 legte den Grundstein für das weitere Vorgehen in diesem Projekt. Deshalb sollten die beiden hypothetischen Tetraketide **16** und **17** durch stereoselektive Synthese als Substrate für weitere Fütterungsstudien bereitgestellt werden, ebenso das enantiomerenreine Triketid (*R*)-**15**. Ausgehend von 3,5-Dihydroxybenzoesäure gelang die Synthese von (*R*)-**15** in 13 Stufen,⁷⁶ die Synthese von Tetraketid (*R*)-**16** in 16 Stufen.⁷⁷ Das *N,O*-geschützte Benzylbromid **18** stellte das Schlüsselintermediat dar, welches nach Überführung in das reaktivere Benzyljodid als Substrat für eine stereoselektive EVANS-Alkylierung⁸⁰ verwendet wurde (Schema 5).



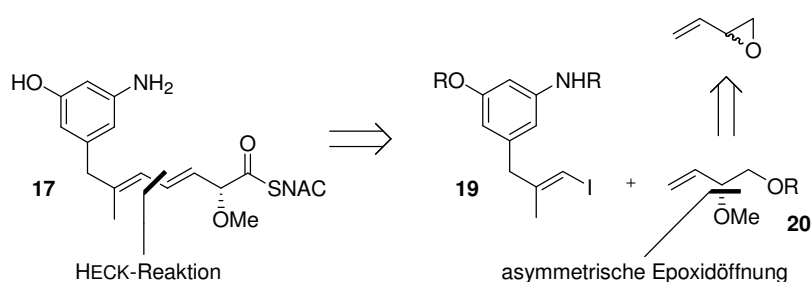
Schema 5: Triketid- und Tetraketidsynthese nach BRÜNJES und TAFT.

Erwähnenswert bei beiden Synthesen ist die Verwendung modifizierter WITTIG- bzw. HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reagenzien, welche den *N*-Acetylcysteamin-Thioester enthalten, so dass eine nachträgliche Veresterung unnötig war.

⁸⁰ a) D. A. Evans, M. D. Ennis, D. J. Mathre, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1737-1739; b) M. B. Andrus, E. L. Meredith, B. B. V. Somar Sekhar, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 259-262.

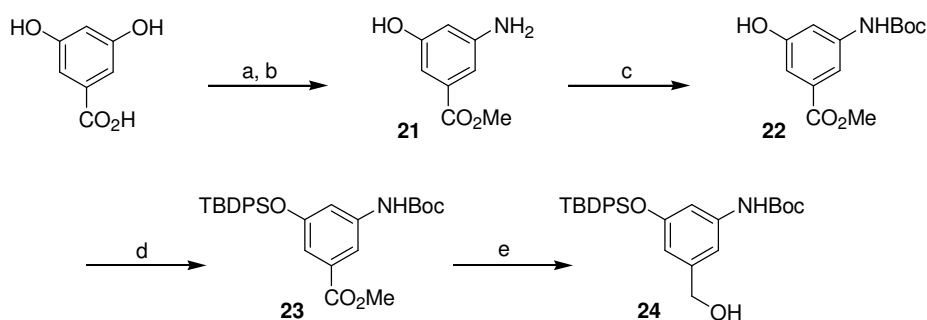
4.1.2 Synthese von Tetraketid **17**

Für die Synthese des isomeren Tetraketids **17** sollte auf die im Arbeitskreis KIRSCHNING vorhandene Expertise zurückgegriffen werden, welche die *seco*-Proansamitocinsynthese⁸¹ mit sich brachte. So bot sich bei der retrosynthetischen Analyse von Tetraketid **17** ein Schnitt zwischen dem Diensystem an, welcher das bekannte Vinyljodid⁸² **19** und ein chirales Vinylglycolderivat **20** als Substrate für eine konvergente HECK-Reaktion ergab (Schema 6). Für die Synthese eines optisch aktiven Vinylglycols erschien eine asymmetrische oder stereoselektive Epoxidöffnung geeignet zu sein.



Schema 6: Retrosynthetische Analyse des Tetraketids **17** ($R = \text{Schutzgruppe}$).

Als Ausgangsverbindung für das aromatische Fragment diente 3,5-Dihydroxybenzoesäure, welche durch leichte Abänderung einer literaturbekannten Vorschrift⁸³ in den Methylester der AHBA **21** überführt werden konnte (Schema 7).



Schema 7: Synthese des Benzylalkohols **24**. Bedingungen: a) konz. NH_3 , NH_4Cl , 180°C ; b) AcCl , MeOH , 65°C , 79 % über 2 Stufen; c) Boc_2O , NaHCO_3 aq., THF , RT , quant.; d) TBDPSCl , Imidazol , 4-DMAP , CH_2Cl_2 , RT ; e) DIBAL , THF , $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 82 % über 2 Stufen.

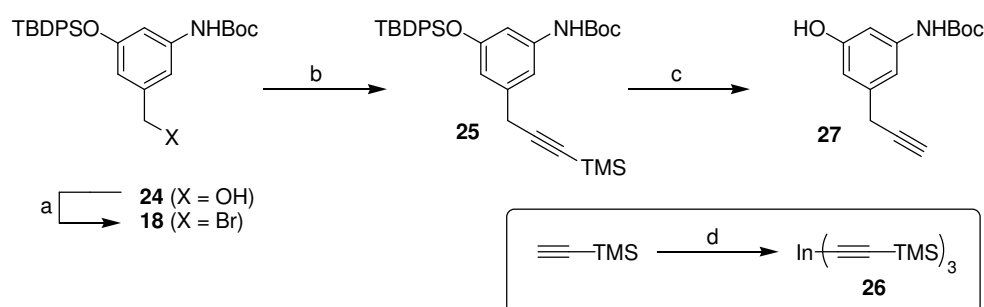
Die Blockierungen der Anilin- und Phenolfunktion erfolgten annähernd quantitativ in bekannter Weise,⁸² wobei sowohl *tert*-Butoxycarbonyl (Boc) als auch *tert*-Butyldiphenylsilyl

⁸¹ T. Frenzel, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese von Maytansinoid-Analoga - Synthese von *seco*-Proansamitocin*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

⁸² T. Frenzel, M. Brünjes, M. Quitschalle, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 135-138.

(TBDPS) für den geplanten Syntheseweg aufgrund ihrer Kompatibilität mit vielen Reagenzien und ihrer hohen Stabilität⁸⁴ geeignet erschienen. Die anschließende Reduktion zum Benzylalkohol **24** erfolgte mit DIBAL, wobei ein vollständiger Umsatz erst durch Erwärmen auf Raumtemperatur erreicht werden konnte. Dies ist durch das elektronenreiche aromatische System und die damit verbundene geringe Reaktivität der Carbonylfunktion gegenüber Nucleophilen zu begründen. Nach erstmaliger säulenchromatographischer Reinigung lag der Benzylalkohol **24** in einer Ausbeute von 82 % über zwei Stufen vor. Da zuvor ausschließlich Umkristallisation und Säure-Base-Extraktion als Reinigungsmethoden zum Einsatz kamen, konnte diese Synthesesequenz problemlos im 100 mmol Maßstab (50 g) durchgeführt werden. Weiterhin ermöglichten diese Techniken eine Ausbeutesteigerung auf 65 % über fünf Stufen verglichen mit der zuvor publizierten Ausbeute von 61 %.⁷⁶

Die Überführung des Benzylalkohols in das Benzylbromid **18** mittels Appel-Reaktion⁸⁵ verlief ohne Schwierigkeiten, allerdings war an dieser Stelle eine Säulenchromatographie zur Abtrennung des gebildeten Triphenylphosphinoxids unumgänglich, so dass ab hier die Ansatzgröße reduziert wurde (Schema 8).



Schema 8: Synthese des Alkins **27**. Bedingungen: a) CBr_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , RT, 86 %; b) kat. $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, **26**, THF, 65 °C, 95 %; c) $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, THF, -10 °C, 92%; d) i. $n\text{BuLi}$, THF, -78 °C, ii. InCl_3 , THF, -78 °C \rightarrow RT, quant.

Bei der anschließenden Alkinylierung erwies sich das elektronenreiche benzyliche System erneut als problematisch. Wie von BRÜNJES gezeigt, führen einfache Substitutionsreaktionen weder mit Lithiumorganyleen noch mit Grignardreagenzien oder unter Kupferkatalyse zum gewünschten Alkin **25**. So konnte die C,C-Knüpfung erst durch Verwendung eines *in situ*

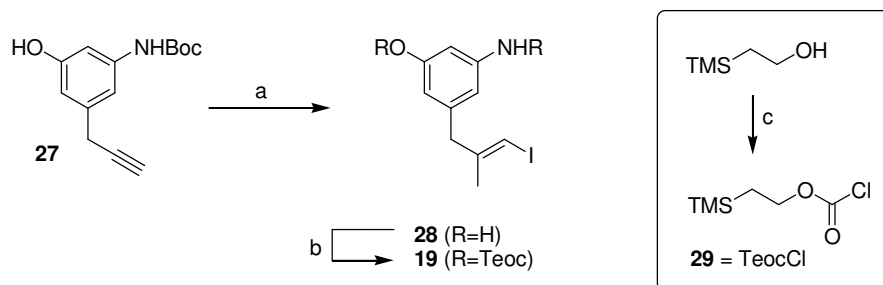
⁸³ A. M. Becker, R. W. Rickards, R. F. C. Brown, *Tetrahedron* **1983**, 39, 4189-4192.

⁸⁴ Zur Stabilität von *tert*-Butylcarbamaten: T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., **1999**; zur Stabilität von Silylethern: T. D. Nelson, R. D. Crouch, *Synthesis* **1996**, 1031-1069.

⁸⁵ G. Appel, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 863-874.

hergestellten Indiumorganyls **26** unter Palladiumkatalyse⁸⁶ bewerkstelligt werden, wobei die ausgezeichnete Ausbeute von 95 % und die Tatsache, dass alle drei Organylreste der Indiumspezies nukleophil übertragen werden können, die aufwendige Reaktionsführung rechtfertigten. Bei der anschließenden Fluorid-induzierten Silylentschützung zum freien Alkin wurde gleichzeitig die Phenolfunktion freigesetzt, wobei Alkin **27** in einer Ausbeute von 92 % isoliert werden konnte. Um die Umlagerung des Alkins zum Allen zu unterdrücken, musste die Entschützung mit TBAF bei -10 °C durchgeführt werden. Die selektive Entschützung konnte auch mit methanolischer Kaliumcarbonat-Lösung⁸⁴ nicht erreicht werden, weshalb die ungewollte Freisetzung des Phenols in Kauf genommen wurde.

Da die folgende Zirkonium-katalysierte Carboaluminierung⁸⁷ nach NEGISHI auch mit freien Alkoholen bekannt ist, wurde Alkin **27** ohne eine erneute Schützung für die Generierung der Vinylidideinheit eingesetzt. Unter den stark LEWIS-sauren Bedingungen kam es zur Freisetzung der Anilinfunktion, so dass als Produkt der Carboaluminierung einzig das ungeschützte Vinylidid **28** in einer Ausbeute von 61 % erhalten wurde (Schema 9). Die Optimierung dieser Stufe gelang auch nicht durch Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, Addition von Wasser)^{76, 88} oder vorherige Umschützung (Teoc-Schutzgruppe).⁷⁷



Schema 9: Synthese von Vinylidid **19**. Bedingungen: a) i. Cp₂ZrCl₂, AlMe₃, 1,2-Dichlorethan, dann **27**, RT; ii. I₂, THF, -30 °C → 0 °C, 61%; b) TeocCl **29**, Pyridin, CH₂Cl₂, RT, 83 %; c) COCl₂ [20 % in Toluol], K₂CO₃, Toluol, -10 °C → RT, 95 %.

Für den weiteren Syntheseverlauf war die Maskierung der zuvor freigesetzten Phenol- und Anilinfunktion nötig, wobei es sich anbot, eine Schutzgruppe zu wählen, die beide Funktionalitäten blockiert, so dass die finale Entschützung in einem einzigen Schritt vollzogen werden kann. Analog zur *seco*-Proansamitocinsynthese fiel die Wahl auf Trimethylsilylethoxycarbonylchlorid (TeocCl) **29**, welches käuflich nicht zu erwerben, durch

⁸⁶ I. Pérez, J. P. Sestelo, L. A. Sarandeses, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4155-4160.

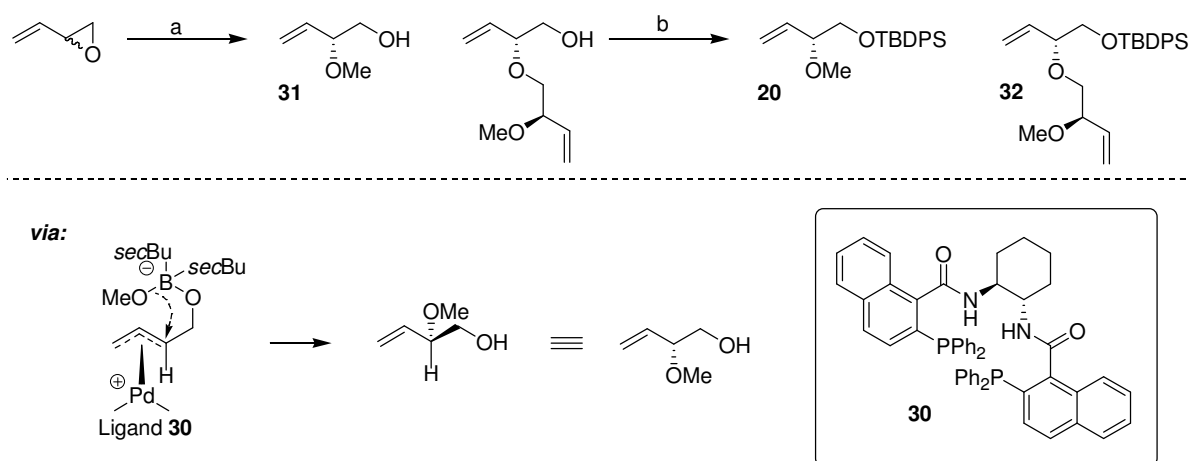
⁸⁷ a) E.-i. Negishi, D. E. Van Horn, T. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6639-6647; b) E.-i. Negishi, D. Y. Kondakov, D. Choueiry, K. Kasai, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9577-9588.

⁸⁸ P. Wipf, S. Lim, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1095-1097; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1068-1071.

Reaktion von 2-Trimethylsilylethanol mit Phosgen aber leicht herzustellen ist.⁸⁹ Dieses Reagenz lässt sich als Lösung [~ 2 M in Toluol, Gehaltbestimmung durch Signalintegrale im $^1\text{H-NMR}$] im Kühlschrank über Monate ohne Reaktivitätsminderung lagern. Die Bildung des Carbamats und des entsprechenden Kohlensäurediesters verlief literaturbekannt⁹⁰ in einem Schritt, so dass das *N,O*-geschützte Vinyljodid **19** in einer Ausbeute von 83 % isoliert werden konnte.

Mit Fertigstellung des Vinyljodids **19** lag nun der erste Kupplungsbaustein für den konvergenten Schritt dieser Synthese, der HECK-Reaktion, vor. Das als zweiter Kupplungspartner benötigte Olefin sollte das stereogene Zentrum, nach der CAHN-INGOLD-PRELOG-Nomenklatur als (*R*)-Konfiguration⁹¹ bezeichnet, mit sich bringen, sowie die Alkoholfunktion, aus welcher später der *N*-Acetylcysteamin-Thioester gebildet werden sollte. Daher schien ein chirales Vinylglycolderivat ein geeigneter Baustein zu sein.

Ein eleganter Zugang zu chiralen Vinylglycolen aus racemischem Butadienmonoepoxid konnte von TROST durch dynamisch-kinetische Racematspaltung in einem Zweikomponenten-Katalysatorsystem⁹² entwickelt werden. Diese asymmetrische Epoxidöffnung erfolgt durch Verwendung zweier Katalysatoren regio- und stereoselektiv. (i) Ein Trialkylboran aktiviert das Epoxid und generiert dabei regioselektiv das sekundäre Kation, welches vom nur schwach nukleophilen Methanol abgefangen werden kann. (ii) Der Palladiumkatalysator bildet einen π -Allylkomplex aus, der durch den chiralen Liganden **30** die Stereokontrolle der Methanoladdition bestimmt (Schema 10).



Scheme 10: Synthese des geschützten Olefins **20**. Bedingungen: a) kat. $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$, kat. (*S,S*)-**30**, kat. $\text{B}(\text{secBu})_3$, MeOH, CH_2Cl_2 , RT; b) TBDPSCl, Imidazol, 4-DMAP, 50 % **20** über 2 Stufen (90 % ee), 11 % **32**.

⁸⁹ R. E. Shute, D. H. Rich, *Synthesis* **1987**, 346-349.

⁹⁰ C. Gioeli, N. Balgobin, S. Josephson, J. B. Chattopadhyaya, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 969-972.

⁹¹ die Konfiguration entspricht der an C-10 des Ansamitocin P-3.

⁹² B. M. Trost, E. J McEachern, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12702-12703.

Die asymmetrische Epoxidöffnung wurde der Literatur folgend mit Tri-*sec*-butylboran und dem chiralen Naphthyl-Liganden (*S,S*)-**30** in Dichlormethan durchgeführt. Entgegen der Literatur⁹² wurde allerdings die Bildung einiger Nebenprodukte beobachtet. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Vinylglycols **31** wurden eine Aufarbeitung und Chromatographie an dieser Stelle unterlassen, um den freien Alkohol *in situ* mit einer den Siedepunkt erhöhenden Schutzgruppe zu versehen. Mit Imidazol, 4-DMAP und TBDPS-Cl gelang die Einführung der TBDPS-Schutzgruppe problemlos, so dass nach säulenchromatographischer Reinigung das geschützte Olefin **20** in einer Ausbeute von 50 % über zwei Stufen isoliert werden konnte. Die nur bedingt akzeptable Ausbeute ist darauf zurückzuführen, dass zur Reinigung mehrere Säulenchromatographien durchgeführt werden mussten, um das als Nebenprodukt der Epoxidöffnung gebildete Dimer **32** abzutrennen, dessen Bildung der Literatur zufolge durch Einsatz von Tri-*sec*Butylboran unterdrückt werden sollte. Nach erfolgloser Erprobung verschiedenster Eluentengemische (Ethylacetat/Petrolether, Ethylacetat/Cyclohexan, Dichlormethan/Petrolether, Diethylether/Pentan) konnte eine Trennung erst durch Wechsel des Silicagels (von Machery-Nagel [Silicagel 60M, 40-63 μm] auf PROSEP [NP Silica Si-60Å, 20-45 μm]) bewerkstelligt werden.

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte über die im Arbeitskreis DUDDECK entwickelte Dirhodium-Methode,⁹³ die eine direkte NMR-spektroskopische Ermittlung des *ee*-Wertes ermöglicht. Dabei wird das Substrat mit dem Dirhodium-Komplex **33** in äquimolarem Verhältnis gemischt und ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht (Abbildung 12).

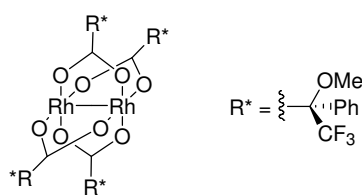


Abbildung 12: Dirhodium-Komplex **33**

Hierbei kommt es zur Ausbildung einer koordinativen Bindung zwischen dem Komplex und weichen LEWIS-Basen, wobei die Koordinationsstelle durch Änderung der chemischen Verschiebung der benachbarten Protonen ersichtlich wird. Im Falle von Enantiomerenpaaren entstehen so diastereomere Komplexe, die unterschiedliche chemische Verschiebungen haben. Ein Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums von Olefin **20** mit dem der Komplex-Olefin-Mischung zeigt einen deutlichen Tieffeld-„shift“ der olefinischen Protonen und der Methoxy-

⁹³ E. D. Gomez, D. Albert, H. Duddeck, S. Kozhushkov, A. de Meijere, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 10, 2278-2280.

Gruppe, was auf eine Koordination von Komplex **33** an das π -System nahe des stereogenen Zentrums schließen lässt. Eine Signaldopplung der olefinischen Protonen tritt kaum auf. Der *ee*-Wert kann durch Integration dieser Signale leicht berechnet werden (Abbildung 13). Durch die Dirhodium-Methode wurde ein Enantiomerenüberschuss von 90 % ermittelt, der publizierte Wert⁹² liegt bei 89 %.

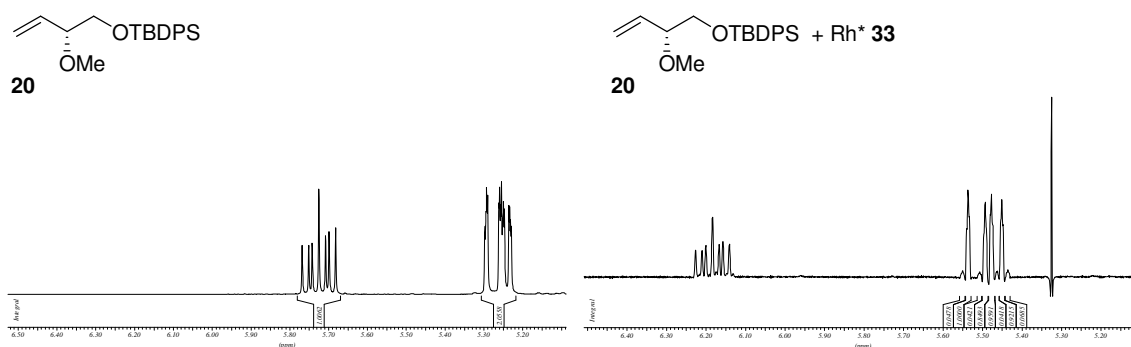
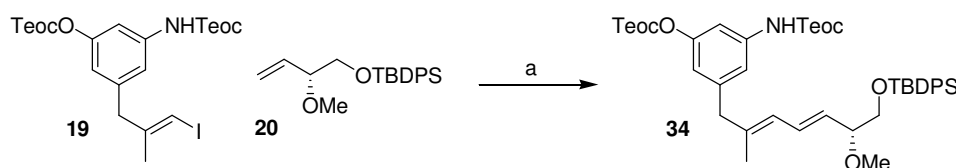


Abbildung 13: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren von Olefin (*R*)-**20** (links) und Olefin (*R*)-**20** mit Komplex **33**.

Die anschließende Kreuzkupplung wurde unter Phasentransfer-Katalyse, der sogenannten JEFFERY-Variante⁹⁴ der HECK-Reaktion, durchgeführt, da diese bereits bei Raumtemperatur eine hohe Stereoselektivität und ausgezeichnete Ausbeuten verspricht. Hierbei wird den Tetraalkylammoniumsalzen eine assistierende Rolle in der Regeneration von Pd(0) zugesprochen. Die Zugabe einer organischen Base (Triethylamin) stellte sich als unbedingt erforderlich heraus,^{94b} wodurch (*E,E*)-Dien **34** in akzeptabler Ausbeute von 65 % bereitgestellt werden konnte (Schema 11). Die Bildung eines isomeren Diens konnte nicht beobachtet werden.



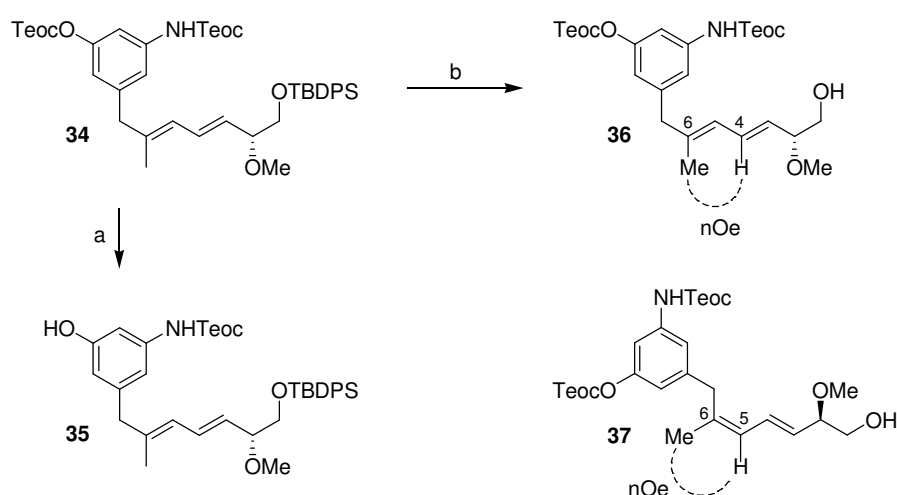
Schema 11: Kupplung zum Dien **34**. Bedingungen: a) Bu₄NBr, Cs₂CO₃, Pd(OAc)₂, NEt₃, DMF, 30 °C, 65 %.

Für den weiteren Syntheseverlauf sollte der primäre Silylether in Gegenwart der Teoc-Gruppen entschützt werden, was sich unerwarteter Weise als der diffizilste Punkt der Synthese herausstellte. Zum einen stellte die selektive Freisetzung des primären Alkohols eine Herausforderung dar, zum anderen erwies sich das neu installierte Diensystem als

⁹⁴ a) T. Jeffery, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 2667-2670; b) T. Jeffery, *Tetrahedron* **1996**, 52, 10113-10130.

ungewöhnlich instabil, was in Isomerisierungs- und Zersetzungsreaktionen resultierte. Ein erster Entschützungsversuch mit TBAF als basische Fluoridquelle führte lediglich zur selektiven Abspaltung des Kohlendäureesters und somit zum Phenol **35** (Schema 12).

Als zweite Methode bot sich eine säurekatalysierte Entschützung an. Ein Vergleich der Halbwertszeiten verschiedener Silylether in salzsaurem Methanol offenbarte allerdings eine geringe Labilität des TBDPS-Ethers (OTBDPS: $t_{1/2} = 225$ min; OTBS: $t_{1/2} < 1$ min).⁸⁴ Dessen ungeachtet wurde die säurekatalysierte Demaskierung (1 % HCl in Methanol) versucht, da Teoc-Gruppen im Allgemeinen kompatibel zu diesen Bedingungen sind und es so zumindest nicht zu der zuvor beobachteten Teoc-Abspaltung kommen sollte. Zwar konnte der Silylether selektiv freigesetzt werden, allerdings führten diese sauren Reaktionsbedingungen zu einer teilweisen Isomerisierung des Diensystems, so dass neben dem gewünschten (*E,E*)-Dien **36** auch das (*Z,E*)-Isomer **37** gebildet wurde (Schema 12).



Schema 12: Entschützungsversuche zum primären Alkohol. Gestrichelte Linien zeigen gemessene nOe-Kontakte an. Bedingungen: a) TBAF [1 M in THF], THF, -10 °C, 94 %; b) HCl [1% in MeOH], $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 57 % **36**, 26 % **37**.

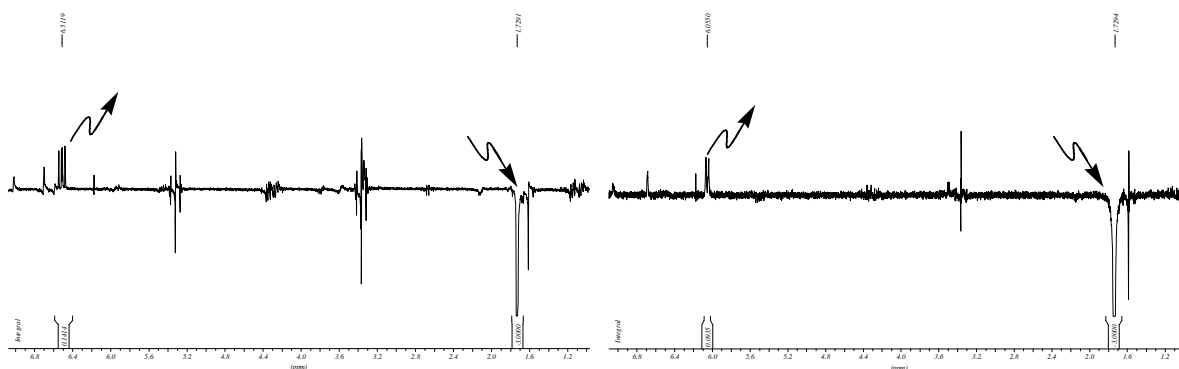
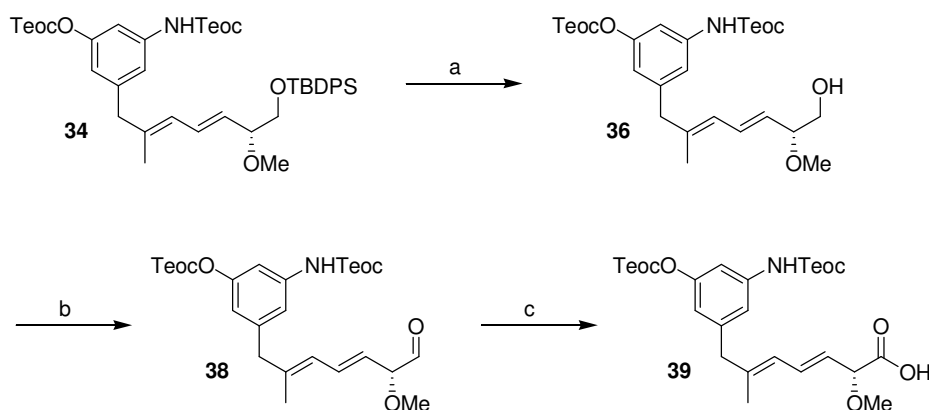


Abbildung 14: Gegenüberstellung der nOe-Spektren von (*E,E*)-**36** (links) und (*Z,E*)-**37** (rechts). Es wurde auf 6-Me eingestrahlt, Antwort-Signal ist bei (*E,E*)-**36** 4-H (6.51 ppm, 14 %), bei (*Z,E*)-**37** 5-H (6.06 ppm, 9 %).

Die Strukturaufklärung gelang durch nOe-Experimente⁹⁵, in denen für das (*E,E*)-Dien **36** ein nOe-Kontakt zwischen 4-H und 6-Me, für das (*Z,E*)-Dien **37** ein nOe-Kontakt zwischen 5-H und 6-Me gemessen wurde (Abbildung 14).

Bei rechtzeitiger Beendigung der Reaktion (~ 2 h) konnte unter diesen Bedingungen das (*E,E*)-Dien **36** in einer Ausbeute von 57 %, (*Z,E*)-Dien **37** zu 26 % isoliert werden. Die Optimierung der Ausbeute und Unterdrückung der Isomerisierung konnte auch in einem aprotischen Lösungsmittel (Dioxan) und bei tieferen Temperaturen nicht erreicht werden. In Dioxan kam es zu keinerlei Reaktion, erst nach Zugabe von Methanol zur Reaktionslösung konnte die Freisetzung des Alkohols bewirkt werden, ebenfalls als Isomerengemisch. Die Reaktionsführung bei 0 °C erzielte ebenfalls keinen Umsatz, bei Erwärmen auf Raumtemperatur konnte wiederum die Bildung des Produktgemisches beobachtet werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Isomerisierung säurekatalysiert verläuft, tiefe Temperaturen und aprotische Lösungsmittel die Bildung des (*Z*)-Isomers inhibieren und Fluorid-basierte Reagenzien im basischen Milieu bevorzugt den Kohlensäurediester abspalten. Somit wurde die Entschützung mit dem HF*Pyridin-Komplex [70 % HF] durchgeführt, welches als nur leicht saures Fluorid-Reagenz erfolgreich in der Totalsynthese von Ascidiatrienolide A zur selektiven Entschützung eines primären TBDPS-Ethers eingesetzt wurde.⁹⁶ Nachdem die Reaktion in THF ebenfalls zur Isomerisierung führte, setzte ein letzter Versuch auf die Kombination aller ermittelten Faktoren, was letztendlich den Durchbruch brachte. Die Zugabe von HF*Pyridin zu einer auf 0 °C gekühlten, mit Pyridin gepufferten Lösung des Silylethers in THF und anschließende Erwärmung auf Raumtemperatur lieferte (*E,E*)-**36** isomerenrein in fast quantitativer Ausbeute (Schema 13).



Schema 13: Synthese von Säure **39**. Bedingungen: a) Pyridin, HF*Pyr [70 % HF], THF, 0 °C → RT, 96 %; b) NaHCO₃, DMP, CH₂Cl₂, RT; c) 2-Methyl-2-buten, NaClO₂, NaH₂PO₄, *t*BuOH, 0 °C → RT, 77 % über 2 Stufen.

⁹⁵ nuclear OVERHAUSER effect, Methode zur halbquantitativen Bestimmung der räumlichen Abstände von Protonen: A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *91*, 476; A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411-415.

⁹⁶ M. S. Congreve, A. B. Holmes, A. B. Hughes, M. G. Looney, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5815-5816.

Da selbst Chromatographie über Silicagel (unbehandelt oder mit Triethylamin [3 % in Petrolether] gespült) zu einer teilweisen Isomerisierung führte, wurden ab diesem Punkt der Synthese zur Reinigung ausschließlich HPLC-Methoden (*reversed phase*) genutzt. Aus dem freien Alkohol sollte nun durch eine Oxidationssequenz die Carbonsäurefunktion generiert werden, wobei nach den gesammelten Erfahrungen saure Bedingungen zu vermeiden waren. Deshalb erschien die einfachste Möglichkeit, die direkte Oxidation mit JONES-Reagenz,⁹⁷ nicht geeignet. Für die Oxidation mit PDC⁹⁸ lieferte die Literatur ebenfalls nur wenige Beispiele, meist an einfachen Systemen, die über keine oxidations- oder säureempfindlichen Funktionalitäten verfügten.⁹⁹ Daher wurde eine Zweistufensequenz gewählt, bestehend aus DESS-MARTIN¹⁰⁰- und PINNICK¹⁰¹-Oxidation.

Die Oxidation zu dem Aldehyd **38** mit dem DESS-MARTIN-Periodinan wurde unter Zusatz von NaHCO₃ durchgeführt, um die bei der Reaktion gebildete Essigsäure zu neutralisieren. Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie (DC) zeigte die Bildung eines Aldehyds an (Färbereagenz: 2,4-Dinitrophenylhydrazin), allerdings wurden zahlreiche Nebenprodukte detektiert, deren Bildung mit der Dekonjugation des Diensystems, sowohl zur neu entstandenen Carbonylfunktion als auch zum aromatischen System, zu begründen ist. Der Versuch, das Rohprodukt säulenchromatographisch zu reinigen, resultierte in einer sofortigen Gelbfärbung der zuvor farblosen Lösung unmittelbar bei Auftragen auf Silicagel. Definierte Verbindungen konnten nicht mehr von der Säule eluiert werden. Deshalb wurde vermutet, dass das Auftreten zahlreicher Nebenprodukte bei der DC auf Zersetzungsreaktionen auf den mit Silicagel beschichteten Platten zurückzuführen ist, was durch zweidimensionale DC¹⁰² bestätigt wurde. Da die Bildung von Aldehyd **38** zumindest massenspektrometrisch belegt wurde, sollte das Rohprodukt gleich der nächsten Oxidation unterzogen werden.

Die PINNICK-Oxidation wurde unter Phosphat-gepufferten Bedingungen bei 0 °C durchgeführt, was in einer sauberen Umsetzung zur Carbonsäure **39** resultierte. Die Oxidation der Doppelbindungen durch das Oxidationsmittel Natriumchlorit wurde durch den Abfänger 2-Methyl-2-buten erfolgreich unterdrückt, so dass Säure **39** durch HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 77 % über zwei Stufen isoliert werden konnte (Schema 13).

⁹⁷ K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones, B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc.* **1946**, 39-45.

⁹⁸ PDC= Pyridiniumdichromat

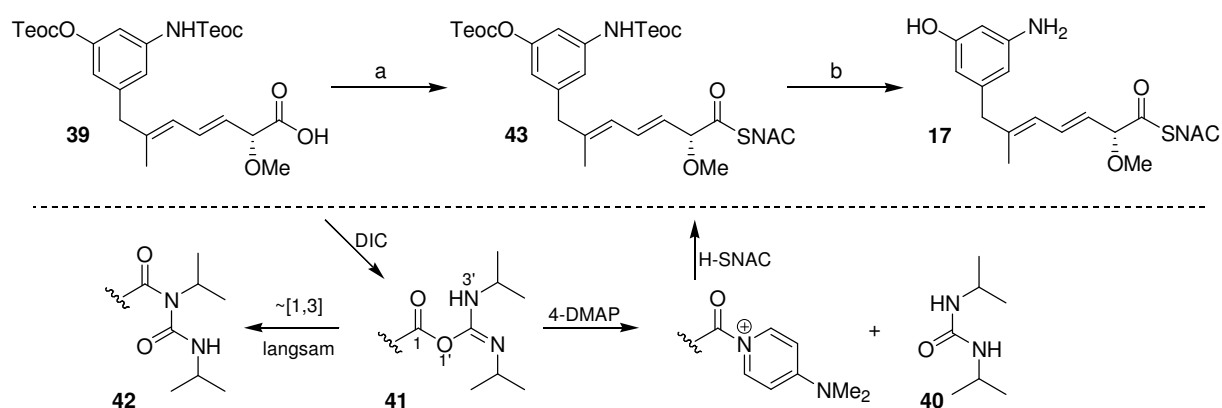
⁹⁹ a) F. M. Menger, X. Y. Chen, S. Brocchini, H. P. Hopkins, D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6600-6608; b) K. T. Mead, H.-L. Yang, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2991-2992; c) S. F. Martin, M. S. Dappen, B. Dupré, C. J. Murphy, J. A. Colapret, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2209-2216.

¹⁰⁰ D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277.

¹⁰¹ B. S. Bal, W. E. Childers, Jr., H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, 37, 2091-2096.

¹⁰² J. Leonhard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis in der organischen Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1996**.

Die folgende Thioesterbildung sollte der Literatur folgend unter Carbodiimid-Aktivierung erfolgen, wobei das sonst übliche Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)¹⁰³ durch das Diisopropylderivat (DIC) ersetzt wurde, welches ein durch Chromatographie besser abtrennbares Harnstoffderivat **40** bildet (Schema 14). Die katalytische Zugabe von 4-DMAP sorgte dabei für eine deutliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit¹⁰⁴ und somit auch der Ausbeute, da nach ca. 3 h das zuerst gebildete *O*-Acylisoharnstoffderivat **41** in einer [1,3]-Umlagerung zum für weitere Acylierung inerten *N*-Acylharnstoffderivat **42** umlagert.¹⁰⁵ Thioester **43** konnte in einer akzeptablen Ausbeute von 60 % nach HPLC-Reinigung erhalten werden.



Schema 14: Thioesterbildung mittels DIC-Aktivierung und finale Entschützung. Bedingungen: a) *N*-Acetylcysteamin, DIC, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 60%; b) ZnCl₂, CH₃NO₂, Ultraschall, RT, 60 %.

Für die finale Entschützung konnte wiederum auf die Vorarbeiten von FRENZEL und BRÜNJES zurückgegriffen werden, wonach eine Abspaltung der Teoc-Gruppen LEWIS-Säure katalysiert mit ZnCl₂ in wasserfreiem Nitromethan erreicht wird.¹⁰⁶ Die Nutzung von Ultraschall zum Lösen des ZnCl₂ war essentiell für einen schnellen Umsatz, so dass SNAC-Tetraketid **17** nach HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 60 % erhalten wurde. Da von FRENZEL gezeigt wurde, dass gängige Reagenzien (HF*Pyridin, HF*NEt₃, TBAF, TAS-F, TFA) zur Teoc-Entschützung sowohl am *seco*-Proansamitocin als auch am Vinylidiodid **19** nicht geeignet sind, wurde zur Optimierung der Ausbeute nur ein weiterer Versuch unternommen. Die Verwendung von KF*2H₂O in Kombination mit TBACl als Quelle von „nacktem“ Fluorid¹⁰⁷, wie es auch bei der Synthese von N_b-Alkoxytryptaminen zur Verwendung kam,¹⁰⁸ führte zur

¹⁰³ Y. S. Tsantrizos, X. Yang, A. McClory, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6609-6614.

¹⁰⁴ W. Steglich, G. Höfle, *Angew. Chem.* **1969**, *81*, 1001.

¹⁰⁵ R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, **2003**.

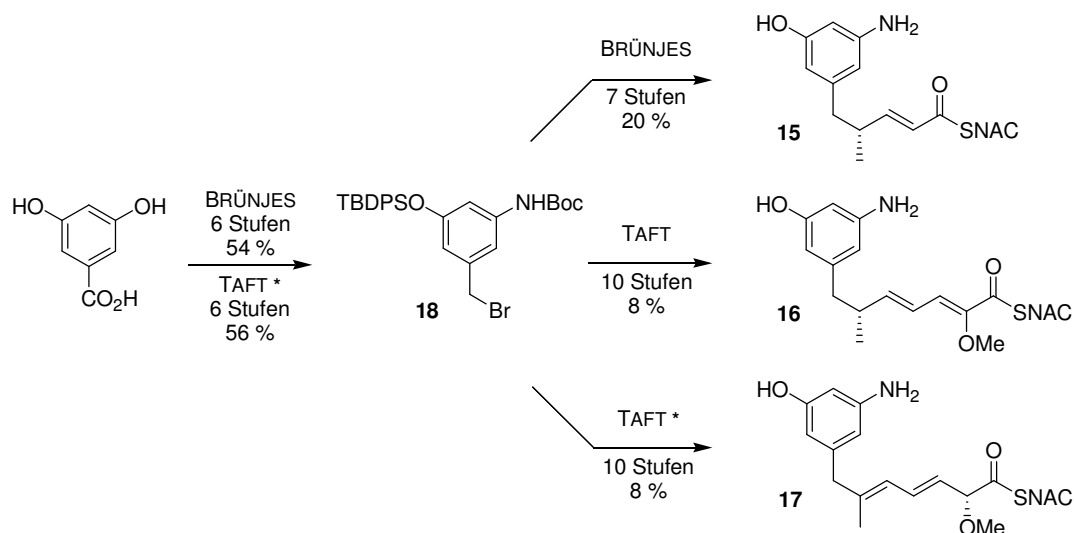
¹⁰⁶ C. Gioeli, N. Balgobin, S. Josephson, J. B. Chattopadhyaya, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 969-972.

¹⁰⁷ L. A. Carpino, A. C. Sau, *J. O. C. Chem. Comm.* **1979**, 514-515.

¹⁰⁸ J. H. van Maarseveen, H. W. Scheeren, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2325-2344.

unsauberen Bildung des einfach geschützten Tetraketids, längere Reaktionszeiten resultierten in vollständiger Zersetzung. Daher wurde an dieser Stelle keine weitere Optimierung unternommen, konnte doch über die vorgestellte Synthese genügend Substanz für die anstehenden Komplementierungsexperimente bereitgestellt werden.

Zusammenfassend konnte der Zugang zu Tetraketid **17** in zehn Stufen ausgehend von Benzylbromid **18**, dem Vorläufer für die Synthese von Triketid **15** und Tetraketid **16**, in einer Ausbeute von 8 % erreicht werden (Schema 15).



Schema 15: Synthetischer Zugang zu den Ketiden (mit * gekennzeichnet: diese Arbeit).

Ausgehend von 3,5-Dihydroxybenzoesäure konnte das Zielmolekül über 16 lineare Stufen in einer Gesamtausbeute von 4 % synthetisiert werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von 82 % pro Stufe. Wie gezeigt, lassen die erarbeiteten Syntheserouten eine effektive Synthese jeweils beider isomerer Ketide zu, was bei Bedarf auch auf die Synthese weiter fortgeschrittener Intermediate der Ansamitocin-Biosynthese übertragen werden könnte.

4.1.3 Komplementierungsexperimente

Nachdem die möglichen biosynthetischen Intermediate Triketid (*R*)-**15** und die beiden isomeren Tetraketide (*R*)-**16** und (*R*)-**17** enantiomerenrein synthetisiert wurden, konnte mit den biosynthetischen Untersuchung der Doppelbindungswanderung begonnen werden (Abbildung 15).

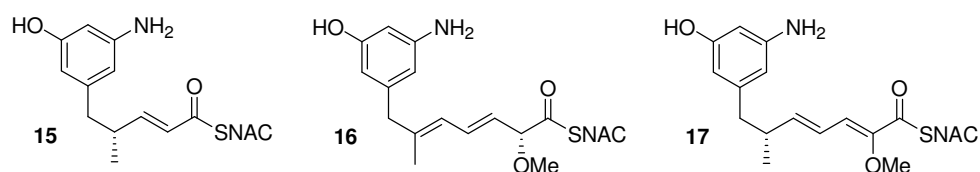


Abbildung 15: Als *N*-Acetylcysteamin-Thioester aktivierte mögliche Biosynthese-Intermediate.

Die Verfütterung der Ketide¹⁰⁹ erfolgte an die in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA **7** blockierten Mutante *Actinosynnema pretiosum* HGF073. Um die Aktivität des Stammes HGF073 zu gewährleisten und somit auch ein negatives Ergebnis bewerten zu können, wurden parallel zu den Komplementierungsexperimenten Kulturen als Positivkontrolle mit Zufütterung von AHBA **7**, sowie als Negativkontrolle ohne jegliche Supplementierung fermentiert.

Der Fermentationsprozess wurde durch tägliche Probenahme mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung über UPLC-MS (ESI)¹¹⁰ überwacht. Die Fermentation der Mutante HGF073 ohne AHBA-Verfütterung zeigte wie erwartet keine Produktion von Ansamitocin P-3, wohingegen bei AHBA-Zugabe Ansamitocin P-3 detektiert werden konnte. Die Identität des Ansamitocins wurde durch ein MSMS-Fragmentierungsexperiment¹¹¹ bei parallelem Vergleich mit authentischem AP-3¹¹² belegt.

Die mit Triketid (*R*)-**15** und Tetraketid (*R*)-**17** supplementierten Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 zeigten ebenfalls Produktion von Ansamitocin P-3. Im Vergleich zu der Diketid-Verfütterung¹¹³ schien die Einbaurrate aber wesentlich geringer zu sein. Zur Quantifizierung der AP-3-Produktion wurden die Kulturen nach der üblichen Fermentationszeit mit Ethylacetat extrahiert, über eine kurze Kieselgelsäule filtriert und anschließend über *reversed phase* HPLC gereinigt. Eine Quantifizierung wurde über den Vergleich des UV-

¹⁰⁹ siehe Experimenteller Teil - Kapitel 6.5

¹¹⁰ UPLC (ultra performance liquid chromatography) -gekoppeltes Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI)

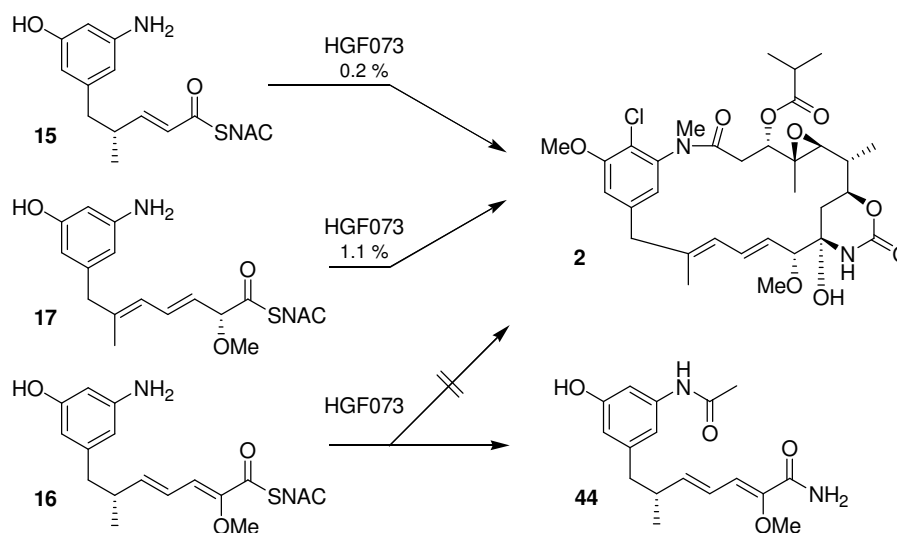
¹¹¹ $m/z = 547 [M - OC(O)CH(CH_3)_2]^+$ durch Abspaltung der Isobutyryl-Seitenkette

¹¹² aus Fermentation isoliertes und vollständig charakterisiertes Ansamitocin P-3 (Kapitel 4.2.1.3)

¹¹³ Die Produktion von AP-3 bei Supplementierung von Diketid (*R*)-**13** im Vergleich zum Wildstamm wurde über die MS-Signalintensität auf 1.4 bis 10 % ermittelt.

Absorptionsintegrals (Fläche unter dem AP-3-Signal, $\lambda = 248 \text{ nm}$) im HPLC-Chromatogramm mit einer zuvor erstellten Kalibrationsgerade vorgenommen. Für die Fermentation von Tetraketid **17** konnte eine Fermentationsausbeute von 1.1 % bezogen auf die AP-3 Produktion bei gleicher molarer Zufütterung von AHBA ermittelt werden (siehe Anhang – Kapitel 7.1).

Die Einbaurrate von Triketid **15** war substantiell geringer, weshalb eine Quantifizierung über UV-Absorption nicht möglich war. Daher wurden nach der HPLC-Reinigung die AP-3 enthaltenen Fraktionen beider Komplementierungsexperimente (mit Tetraketid **17** und mit Triketid **15**) aufkonzentriert und jeweils auf das gleiche Volumen verdünnt. Anschließender Vergleich der UPLC-MS-Signalintensitäten ergab für die Fermentation von Triketid **15** eine Einbaurrate von 0.2 % verglichen mit gleicher molarer Zufütterung von AHBA **7** (siehe Anhang – Kapitel 7.1).

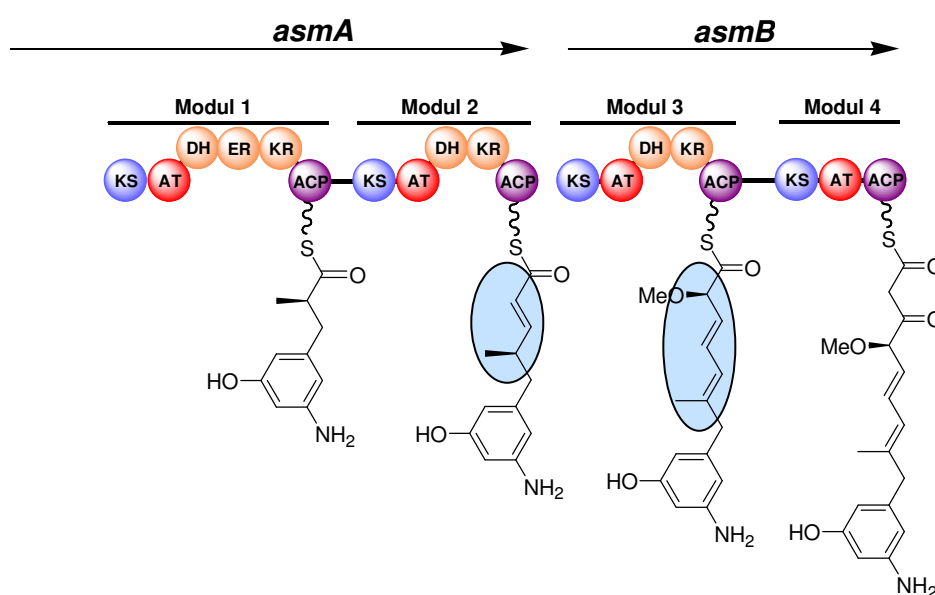


Schema 16: Komplementierungsexperimente an *A. pretiosum* HGF073 mit Ketiden **15**, **16** und **17**. Die prozentuale Ausbeute bezieht sich auf AP-3-Produktion bei gleicher molarer Zufütterung von AHBA **7**.

Im Gegensatz dazu konnte bei Zufütterung von Tetraketid (*R*)-**16** kein AP-3 detektiert werden, weder bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Fermentationsüberstandsproben, noch bei der des Rohextraktes. Ein Vergleich des Chromatogramms der Zufütterung von Tetraketid **16** mit dem der Negativkontrolle zeigte jedoch die Bildung eines neuen Metaboliten. Nach mehrmaliger HPLC-Reinigung konnten $\sim 100 \mu\text{g}$ dieser Verbindung isoliert werden. Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (ein- und zweidimensional) ließen auf die Bildung von acetyliertem Tetraketidamid **44** schließen, was mit einer Detoxifizierungsreaktion des Mikroorganismus begründet werden könnte (Schema 16). Die Bildung eines Amid-Derivats aus den

zugefütterten Benzoesäuren konnte auch in den Mutasynteseexperimenten beobachtet werden (Kapitel 4.2.1.3).

Diese Resultate lassen den Schluß zu, dass das ungewöhnlich positionierte $\Delta^{11,13}$ -Diensystem während der Polyketidsynthese auf Modul 3 der *asmPKS* installiert wird und dass nur Tetraketid **17** mit umgelagertem Diensystem von der Ketosynthase des nächsten Moduls (KS4) als Substrat akzeptiert wird (Schema 17).



Schema 17: Resultate der Komplementierungsexperimente, dargestellt als *asmPKS*-gebundene Intermediate.

Demzufolge könnte die Doppelbindungswanderung durch eine vinyloge *syn*-Eliminierung während der Dehydratisierung auf Modul 3 (DH3) hervorgerufen werden. Der von TOBIAS KNOBLOCH durchgeführte Sequenzvergleich mit 856 anderen bakteriellen Dehydratase konnte diese Hypothese nicht eindeutig belegen, da *asmDH3* offensichtlich eine zur α,β -*syn*-Dehydratisierung befähigte Domäne ist (Motive: PWLADH, DXXXXXQ).^{114, 115} Da keine Kristallstruktur einer PKS Dehydratase vorliegt und da der Sequenzvergleich der bakteriellen DHs einen geringen Grad an Konservierung untereinander zeigt, kann über die mechanistischen Grundlagen dieser vinylogen Dehydratisierung nur spekulativ diskutiert werden.

¹¹⁴ J. Wu, T. J. Zaleski, C. Valenzano, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17393-17404.

¹¹⁵ S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041-1072.

Aus stereoelektronischen Gründen benötigt diese *syn*-1,4-Eliminierung eine vinylog-ekliptische Konformation des Dehydratase-Substrats **45**, bei der eine *syn*-periplanare Anordnung von Proton und Abgangsgruppe vorliegt (Abbildung 16).

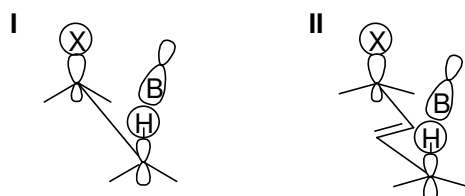
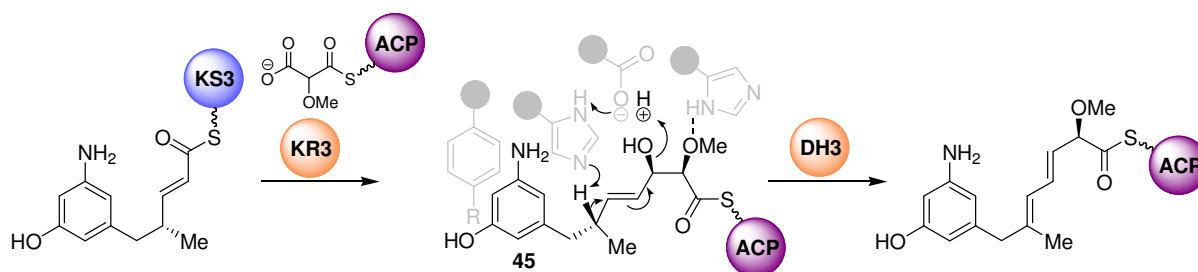


Abbildung 16: Stereoelektronische Voraussetzungen für *syn*-E₂ (I) und vinyloge *syn*-E₂ (II).

Durch die gezeigten Fütterungsstudien konnte die Konfiguration an C-2 (Fermentation von Triketid **15**) und C-6 (Fermentation von Tetraketid **17**) des Dehydratase-Substrats **45** bestimmt werden (Schema 18). Die kryptische Stereochemie an C-3 kann durch die KR3-Sequenz abgeleitet werden (Motive: LDD, AXXXN = B-Typ KR).¹¹⁶ Somit kann die vinyloge Dehydratisierung zum $\Delta^{11,13}$ -Diensystem nur erfolgen, wenn Intermediat **45** in der in Schema 18 gezeigten Konformation fixiert ist.



Schema 18: Postulierter Mechanismus der vinylogen *syn*-Eliminierung durch DH3 (beteiligte Aminosäuren der Dehydratase sind in grau dargestellt).

Dies könnte durch Koordination des aromatischen Systems mit aromatischen Resten (Phenylalanin, Tyrosin) der DH3 und Wasserstoffbrückenbindungen realisiert werden. Der eigentlich die α,β -*syn*-Dehydratisierung katalysierende Histidinrest könnte durch Koordination mit der Methoxygruppe in seiner Funktion blockiert sein, so dass ein weiterer Histidinrest die Deprotonierung an C-6 vornimmt.

Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit der Beobachtung, dass eine *A. pretiosum*-Mutante, welche der KS3 Malonyl-CoA anstelle von Methoxymalonyl-ACP zur Verfügung

stellt, das entsprechende 10-Desmethoxy-ansamitocin P-3 nur in geringer Menge produziert.¹¹⁷ Die Produkte einer α,β -Dehydratisierung, die entsprechend dem vorgeschlagenen Mechanismus aufgrund der hier fehlenden Methoxygruppe nicht inhibiert ist, würden ähnlich des Tetraketids **16** nicht weiter prozessiert werden.

Die geringe Einbaurate bei den Komplementierungsexperimenten scheint ein allgemeines Phänomen zu sein und wurde auch in anderen Studien beobachtet.^{37, 51}

Zusammenfassend konnte durch die Komplementierungsexperimente die Konfiguration an C-14¹¹⁸ bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das PKS-gebundene Triketid noch die Doppelbindung in Konjugation zum Thioester besitzt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das ungewöhnlich positionierte $\Delta^{11,13}$ -Diensystem während der Polyketidsynthese auf Modul 3 der asmPKS installiert wird und dass KS4 als „Torwächter“ nur ein Tetraketid mit umgelagertem Diensystem als Substrat akzeptiert. Die Bildung des umgelagerten Diensystems könnte auf eine vinyloge *syn*-Dehydratisierung zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Doppelbindungsisomerisierung während der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum* wurden kürzlich publiziert.¹¹⁹

¹¹⁶ a) P. Caffrey, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1060-1062; b) R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72-79.

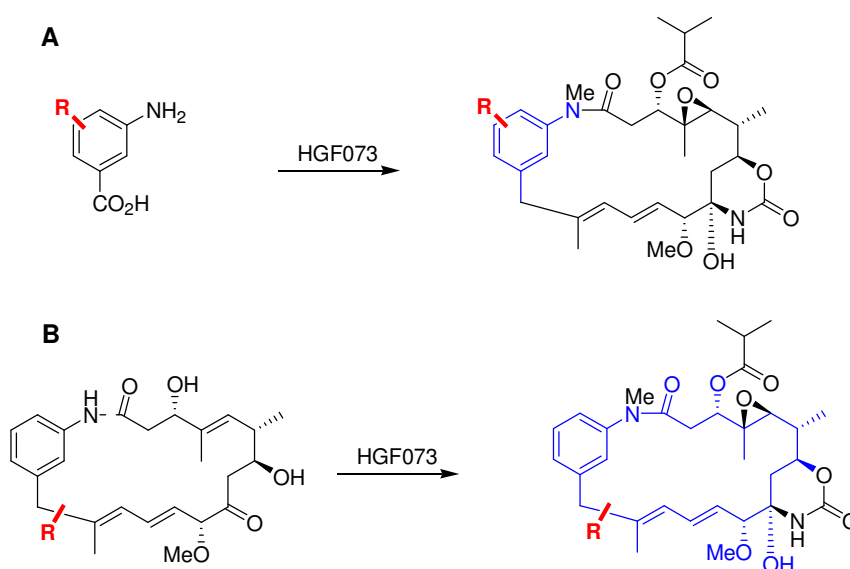
¹¹⁷ B. J. Carrol, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.

¹¹⁸ Nomenklatur bezogen auf Ansamitocin P-3

¹¹⁹ F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.

4.2 Mutasynthetische Derivatisierung

Wie bereits in den Kapiteln 2.4 und 3.2 ausführlich diskutiert, beschäftigt sich dieser Abschnitt mit der mutasynthetischen Erzeugung von möglichst breiter Strukturdiversität in der Klasse der Ansamitocine. Dies hat zum Ziel, weitergehende Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die Klasse der Maytansinoide aufstellen zu können. Mit der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA **7** blockierten Mutante *Actinosynnema pretiosum* HGF073 liegt ein ideales „Arbeitspferd“ für einen solchen mutasynthetischen Ansatz vor. Hierbei lassen sich zwei unterschiedliche Vorgehensweisen anwenden, deren Resultate in den nächsten Kapiteln getrennt vorgestellt werden (Schema 19).



Schema 19: Mutasynthetische Derivatisierung mit HGF073: A) Adressierung der PKS; B) Adressierung der postkettischen Enzyme.

Zusätzlich wurde die Eignung anderer Mutanten¹²⁰ von *Actinosynnema pretiosum* für mutasynthetische Zwecke getestet, worauf in Kapitel 4.2.3 eingegangen wird.

Im Anschluss folgt in Kapitel 4.2.4 die biologische Evaluierung der mutasynthetisch erzeugten Derivate, verbunden mit den daraus abgeleiteten Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

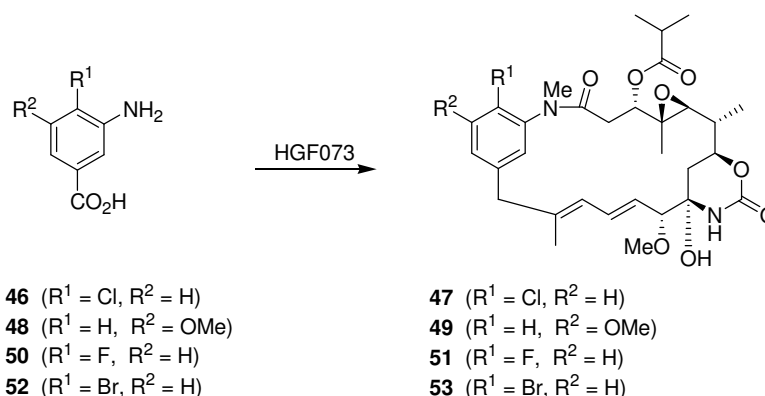
¹²⁰ genetisch manipulierte Stämme mit spezifischer Blockierung von post-PKS-Transformationen, bereitgestellt von P. SPITELLER

4.2.1 Adressierung der PKS

Aufgrund der strukturell einfachen Mutasyntone¹²¹ stellen PKS-adressierende Mutasyntesen einen schnellen und damit einfachen Zugang zu Naturstoff-Derivaten dar. Diese Methode ist aber in der Akzeptanz der zugefütterten Startereinheiten begrenzt, da die modifizierten Bausteine zunächst durch die Ladedomäne erkannt und auf den Polyketidsynthase-Komplex aufgeladen werden müssen. Anschließend darf es auch zu keiner Diskrepanz zwischen dem naszierenden Polyketid-Derivat und den Enzymen des nächsten Moduls kommen. Letztlich gestattet diese Vorgehensweise nur Variationen im Gerüst der Startereinheit, im vorliegenden Fall also am aromatischen System.

4.2.1.1 Vorarbeiten

Erste Vorarbeiten zur Nutzung der Mutante HGF073 für die mutasynthetische Erzeugung eines Ansamitocin-Derivates wurden bereits 2004 von der Arbeitsgruppe GROND getätigt, die zunächst massenspektrometrisch die Bildung von 20-Desmethoxy-ansamitocin P-3 **47** bei Zufütterung von 3-Amino-4-chlorbenzoesäure **46** nachweisen konnte (Schema 20).



Schema 20: Erfolgreiche Vorarbeiten auf dem Feld der Mutasyntese mit HGF073. Die Bildung des Fluor- und des Brom-Derivats **51** und **53** wurde nur massenspektrometrisch nachgewiesen.

Die erste mutasynthetische Darstellung eines Ansamitocin-Derivates **49** in isolierbarer Menge gelang BRÜNJES durch die Verfütterung von 3-Amino-5-methoxybenzoesäure (**48**). In deuterierter Form sollte diese zum 20-(D₃-Methoxy)-ansamitocin P-3 führen,¹²² wobei aber die Deschloro-Verbindung generiert wurde. Inspiriert von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe GROND konnte in weiteren Arbeiten massenspektrometrisch die Bildung der analogen 20-

¹²¹ Mutasyntone = bei der Mutasyntese verwendete Analoga des natürlichen Vorläufers

¹²² 20-D₃-Methoxy-Ansamitocin sollte als interner Standard für die massenspektrometrische Quantifizierung von AP-3 dienen. Die Massendifferenz von 3 Da ermöglicht dann (bei gleichem Ionisierungspotenzial) durch Signalvergleich eine erste Aussage zur injizierten Menge an AP-3.

Desmethoxy-19-halo-ansamitocine **51**⁷⁶ und **53**⁷⁷ mit den fluorierten bzw. bromierten Mutasyntthonen **50** und **52** belegt werden.

Durch diese Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine gewisse Substratflexibilität für die 4-Position des PKS-Initiationsbausteins gegeben ist und dass die phenolische Gruppe keine Voraussetzung für die biosynthetische Prozessierung der Mutasyntthone darstellt. Allerdings wurde ersichtlich, dass für die durch *Asm12* katalysierte Chlorierung ein freies Phenol benötigt wird.

4.2.1.2 Synthese der Mutasyntthone

Die nachfolgend vorgestellten Synthesen der modifizierten Startereinheiten basieren auf den zuvor ermittelten Erkenntnissen zur Substratflexibilität von *A. pretiosum* HGF073. Daher sollten gezielt Modifizierungen in der 4- und 5-Position von 3-Aminobenzoessäure realisiert werden, wozu zunächst die Reihe der 3-Amino-4-halo-benzoessäuren komplettiert werden sollte (Abbildung 17). Da 3-Amino-4-fluorbenzoessäure bereits erfolgreich reaktiv aus der Nitroverbindung dargestellt werden konnte und das Chlorderivat käuflich zu beziehen ist, musste nur ein geeigneter Zugang zur Brom- und Iodverbindung gefunden werden. Weiterhin wurde die Synthese von in 4- und 5-Position unterschiedlich Hydroxy- und Methoxy-substituierter Anologa für Mutasyntthoneexperimente geplant.

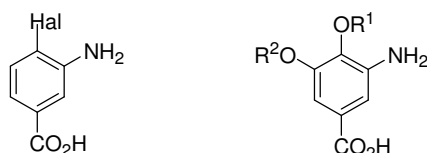


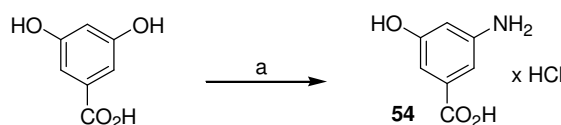
Abbildung 17: Geeignete Mutasyntthone (*Hal* = F, Cl, Br, I; *R*¹, *R*² = H, Me)

Eine Aktivierung der zugefütterten Substrate muss in diesem Fall nicht, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, über SNAC-Thioesterbildung erfolgen, da die Aufladung von AHBA (und somit auch deren Derivate) über eine separate Adenylierungsdomäne erfolgt (siehe Kapitel 2.2).³⁵ Zielmoleküle waren daher die freien Säuren, welche in den meisten Fällen in das entsprechende Hydrochlorid¹²³ überführt wurden.

Für Referenzverfütterungen sollte ebenfalls das Hydrochlorid **54** des natürlichen Vorläufers AHBA synthetisiert werden, welches der Literatur folgend nach der bekannten

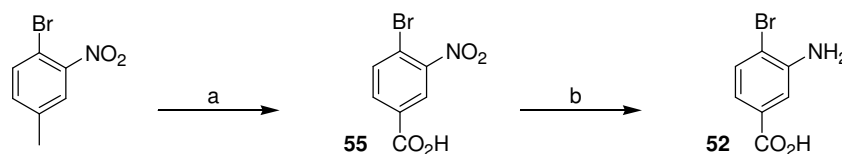
¹²³ Aminobenzoessäure Hydrochloride sind wasserlöslich, wodurch eine einfache Substratzugabe bei der anschließenden Mutasyntthone gegeben ist.

Autoklavenreaktion (Kapitel 4.1) durch Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure hergestellt werden konnte (Schema 21).⁸³



Schema 21: Synthese von AHBA Hydrochlorid **54**. Bedingungen: a) i. NH_3 , NH_3Cl , $180\text{ }^\circ\text{C}$; ii. HCl [6 M], Δ , 58 %.

Ausgangsmaterial für die Synthese von Bromaromat **52** war 4-Brom-3-nitrotoluol, welches durch benzyliche Oxidation¹²⁴ mit Kaliumpermanganat in leicht basischem Milieu zur Nitrobenzoesäure **55** umgesetzt wurde (Schema 22). Die geringe Ausbeute von 21 % wurde von der Tatsache aufgefangen, dass 57 % des Eduktes reisoliert werden konnte und die Trennung dieser Verbindungen durch einfache Säure-Base-Extraktion gelang. Bezogen auf reisoliertes Edukt lag die Ausbeute somit bei 49 %.



Schema 22: Synthese von 3-Amino-4-Brombenzoesäure. Bedingungen: a) KMnO_4 , Na_2CO_3 , H_2O , Δ , 21 %; b) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AcOH , EtOAc , $70\text{ }^\circ\text{C}$, 86 %.

Die Reduktion der Nitroverbindung gelang selektiv mit Zinn(II)chlorid in Ethylacetat,¹²⁵ wobei für einen schnelleren Umsatz eine katalytische Menge Essigsäure zugesetzt wurde. Die Extraktion des Produktes konnte nach der Hydrolyse nur in leicht saurem Milieu ($\text{pH} = 4\text{-}5$)¹²⁶ erfolgen, weshalb ausgefallenes Zinnhydroxid¹²⁷ („Zinnschlämme“) die Isolierung erheblich erschwerte. Dennoch konnte 3-Amino-4-brombenzoesäure (**52**) in einer Ausbeute von 86 % bereitgestellt werden.

Die Synthese von 3-Amino-4-iodbenzoesäure (**56**) wurde literaturbekannt ausgehend von 4-Amino-3-nitrobenzoesäure in einer vierstufigen Sequenz realisiert (Schema 23).¹²⁸ Mittels SANDMEYER-Reaktion¹²⁹ wurde diazotiert und mit Kaliumiodid der Iodsubstituent eingeführt.

¹²⁴ B. Vigne, A. Archelas, J. D. Fourneron, R. Furstoss, *Tetrahedron* **1986**, 42, 2451-2456.

¹²⁵ F. D. Bellamy, K. Ou, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 839-842.

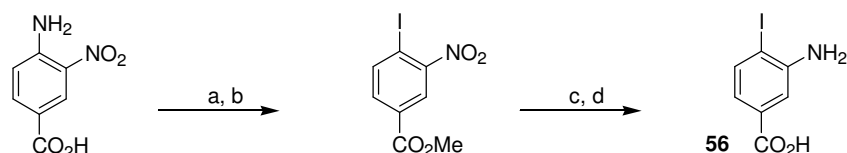
¹²⁶ Isoelektrischer Punkt von Aminobenzenoesäuren

¹²⁷ Zinnhydroxid ist amphoter und liegt nur in stark saurem und basischem Milieu gelöst vor.

¹²⁸ M. D. Collini, J. W. Ellingboe, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7963-7966.

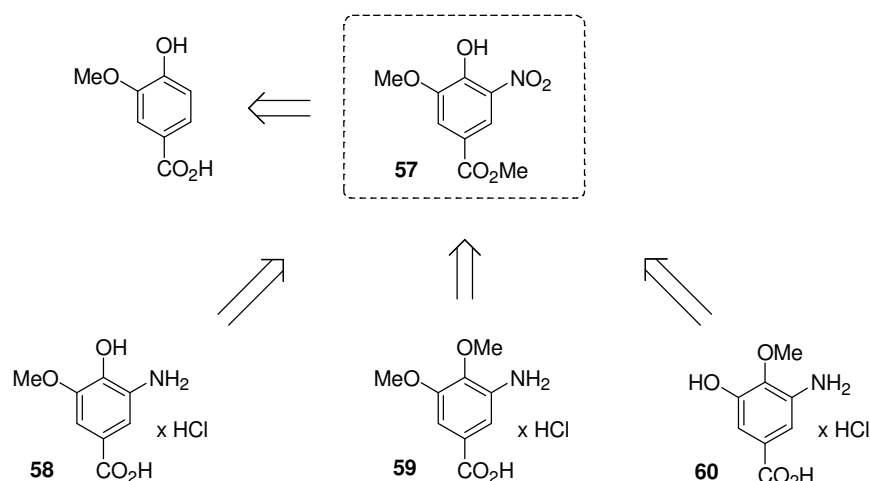
¹²⁹ T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 1633-1635, 2650-2653; T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 18, 1492-1496; T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 1494-1497.

Die Methylesterbildung geschah durch Reaktion mit Thionylchlorid in Methanol, gefolgt von Zinn(II)chlorid vermittelter Reduktion. Durch die als Ester geschützte Säure konnte die Extraktion nach Hydrolyse des Zinnchlorids in basischer Lösung und somit ohne Ausfall des Zinnhydroxids erfolgen, so dass der Mehraufwand der zwei zusätzlichen Stufen gerechtfertigt war. Die Freisetzung der Benzoesäure erfolgte mit Lithiumhydroxid-Lösung in Methanol, wodurch Iodaromat **56** in einer Ausbeute von 47 % über vier Stufen vorlag.



Schema 23: Synthese von 3-Amino-4-iodbenzoesäure. Bedingungen: a) i. H₂SO₄, NaNO₂, 0 °C, ii. KI, H₂SO₄, 100 °C, 51 %; b) SOCl₂, MeOH, RT, 99 %; c) SnCl₂·2H₂O, EtOH, 70 °C, quant.; d) LiOH [1 M], MeOH, 45 °C, 93 %.

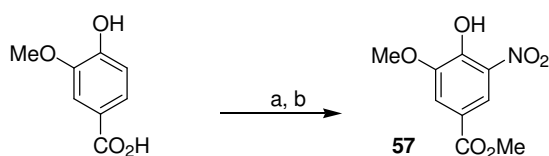
Für die Darstellung der unterschiedlich Hydroxy- bzw. Methoxy-substituierten Aminobenzoensäuren wurden die Arbeiten von TRAXLER *et al.* herangezogen, die die Synthese verschiedener AHBA-Derivate zur Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs des 3-Substituenten in Rifamycin beschreiben.¹³⁰ Ausgangsverbindung war hierbei Vanillin, so dass analog zu dieser Arbeit ein Synthesepan ausgearbeitet wurde, der die Darstellung verschiedener Mutasyntone auf die zentrale Ausgangsverbindung 5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**) zurückführt (Schema 24).



Schema 24: Retrosynthetischer Plan zur Synthese der Mutasyntone **58** – **60**. Zielmoleküle waren die jeweiligen Hydrochloride.

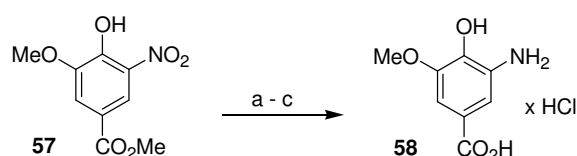
¹³⁰ P. Traxler, O. Ghisalba, *J. Antibiot.* **1982**, 35, 1361-1365.

Bereits 1977 beschrieb MEYERS die Synthese von 5-Nitrovanillinsäuremethylester als Vorläufer für das Westfragment der Maytansinoide,¹³¹ wonach diese Schlüsselverbindung durch selektive Nitrierung in einem Salpersäure/Eisessig-Gemisch aus dem Methylester der Vanillinsäure dargestellt werden konnte (Schema 25). Die Veresterung der Vanillinsäure wurde zuvor unter Schwefelsäure-Katalyse in Methanol durchgeführt, was die Synthese des gemeinsamen Vorläufers **57** über zwei Stufen auch in großem Maßstab (~ 300 mmol) ermöglichte.



Schema 25: Synthese von Schlüsselverbindung **57**. Bedingungen: a) H₂SO₄, MeOH, Δ, quant.; b) HNO₃, AcOH, 0°C, 78 %.

Für die Synthese von Mutasynthon **58** wurde zunächst der Methylester in bekannter Weise verseift (Schema 26). Die Reduktion der Nitrofunktion konnte in dieser Synthesesequenz durch Palladium-katalysierte Hydrierung¹³² erfolgen, da keine halogenierten Aromaten verwendet wurden, die unter diesen Bedingungen dehalogeniert würden. Die Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure lieferte Hydrochlorid **58** in einer Ausbeute von 49 % über drei Stufen.



Schema 26: Synthese von Hydrochlorid **58**. Bedingungen: a) LiOH [1 M], MeOH, 40 °C, 99 %; b) H₂, Pd/C, MeOH; c) HCl [6 M], Δ, 50 % über 2 Stufen.

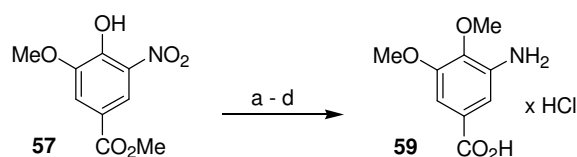
Zur Synthese von 3-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure (**59**) wurde zunächst die freie Hydroxyfunktion des Schlüsselintermediats **57** nach MEUZELAAR *et al.* methyliert,¹³³ gefolgt von der Freisetzung der Säurefunktion mit LiOH. Anschließend wurde wiederum mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse zur Aminobenzoesäure reduziert und das Rohprodukt

¹³¹ a) J. M. Kane, A. I. Meyers, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 9, 771-774; b) A. I. Meyers, K. A. Babiak, A. L. Campbell, D. L. Comins, M. P. Fleming, R. Henning, M. Heuschmann, J. P. Hudspeth, J. M. Kane, P. J. Reider, D. M. Roland, K. Shimizu, K. Tomioka, R. D. Walkup, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5015-5024.

¹³² N. Fujii, J. J. Haresco, K. A. P. Novak, D. Stokoe, I. D. Kuntz, R. K. Guy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12074-12075.

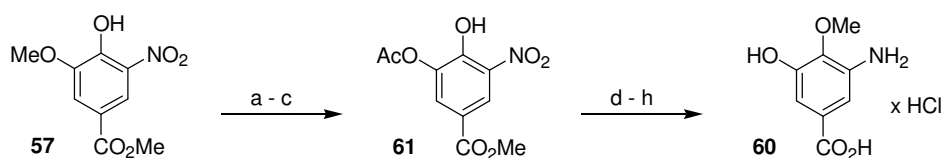
¹³³ G. J. Meuzelaar, M. C. A. van Vliet, L. Maat, R. A. Sheldon, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2315-2321.

unter Zusatz von Aktivkohle aus 6 M Salzsäure umkristallisiert, wodurch Mutasynton **59** in einer Ausbeute von 66 % über vier Stufen synthetisiert werden konnte (Schema 27).



Schema 27: Synthese von Hydrochlorid **59**. Bedingungen: a) Me_2SO_4 , K_2CO_3 , Aceton, Δ , 99 %; b) LiOH [1 M], MeOH , 40°C , 93 %; c) H_2 , Pd/C , MeOH ; d) HCl [6 M], Δ , 72 % über 2 Stufen.

Die Darstellung von 3-Amino-5-hydroxy-4-methoxybenzoesäure (**60**) erforderte zunächst die Freisetzung des phenolischen Methylethers aus **57**, wofür in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben sind.¹³⁴ Nachdem der Einsatz von Aluminiumtrichlorid und Pyridin in Ethylacetat¹³⁵ nur zur Reisolierung des Eduktes führte, wurde die Demethylierung mit Bortribromid¹³⁶ durchgeführt, wobei auch der Methyl ester verseift wurde (Schema 28). Nach erneuter säurekatalysierter Veresterung konnte Phenol **61** durch selektive Acetylierung der reaktiveren 5-Hydroxyfunktion nach MEUZELAAR *et al.* bereitgestellt werden.¹³³



Schema 28: Synthese von Hydrochlorid **60**. Bedingungen: a) BBr_3 [1 M], CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 75 %; b) kat. H_2SO_4 , MeOH , Δ , 95 %; c) Ac_2O , Pyridin, RT, 60 %; d) Me_2SO_4 , K_2CO_3 , Aceton, Δ , quant.; e) NaOMe [2.5 M], MeOH , RT, 70 %; f) LiOH [1 M], MeOH , 40°C , 96 %; g) H_2 , Pd/C , MeOH ; h) HCl [6 M], Δ , 12 % über 2 Stufen.

Nach Methylierung der 4-Hydroxygruppe mit Dimethylsulfat wurde die Acetylschutzgruppe mit Natriummethanolat entfernt. Anschließend konnte Mutasynton **60** durch die bekannte Synthesesequenz aus Verseifung, Reduktion und Überführung in das Hydrochlorid in einer Ausbeute von 5 % über acht Stufen dargestellt werden.

Die teilweise dürftigen Ausbeuten bei der Hydrochloridbildung sind darauf zurückzuführen, dass die Reinigung der Zwischenprodukte meist unterblieb und nur in wenigen Fällen eine Umkristallisation dieser möglich war. Mit der Hydrochlorid-Bildung durch Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure konnte gewährleistet werden, dass die Aminobenzoesäure-

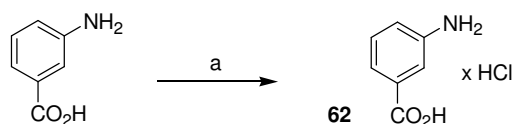
¹³⁴ ein umfassender Review über Ether-Dealkylierung: S. A. Weissmann, D. Zewge, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7833-7863.

¹³⁵ D. A. Learmonth, P. C. Alves, *Synth. Comm.* **2002**, *32*, 641-649.

¹³⁶ J. F. W. McOmie, M. L. Watts, D. E. West, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.

Derivate für die anstehenden Verfütterungen in ausreichender Reinheit vorlagen. Die Extraktion von eventuell nicht auskristallisiertem Produkt wurde aus diesen Gründen unterlassen.

Die Hydrochloridbildung wurde ebenfalls auf unsubstituierte 3-Aminobenzoesäure angewendet, welche bereits in früheren Verfütterungsstudien⁷⁶ erfolglos eingesetzt wurde (Schema 29).



Schema 29: Reinigung von 3-Aminobenzoesäure. Bedingungen: a) HCl [6 M], Δ , 90 %.

Da das Substrat käuflich zu erwerben ist, sollte durch die Umkristallisation und einem erneuten Mutasyntheseexperiment mit **62** ausgeschlossen werden, dass sich Verunreinigungen zuvor negativ auf die Akzeptanz dieses Vorläufers ausgewirkt hatten.

4.2.1.3 Verfütterungen

Für die Mutasynthesestudien an der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins geblockten Mutante HGF073 standen nun eine Palette an verschiedenen käuflich erwerbbaaren und synthetisierten 3-Aminobenzoesäure-Derivaten zur Verfügung (Abbildung 18).

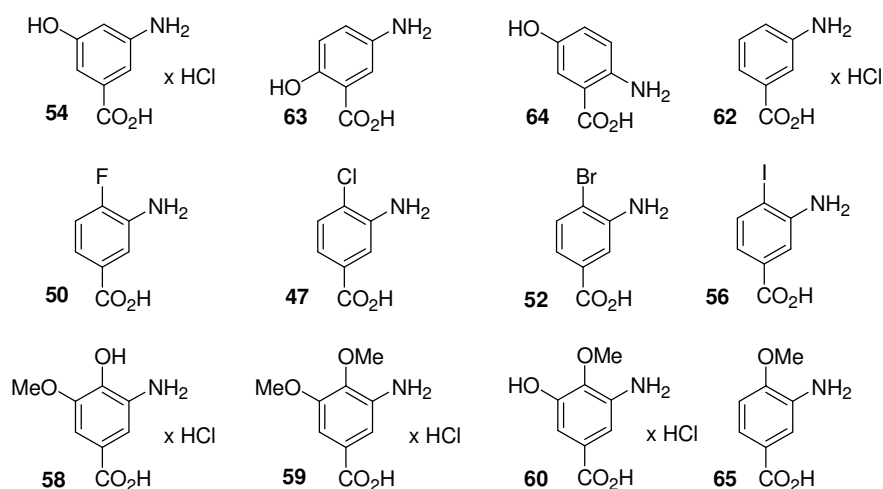
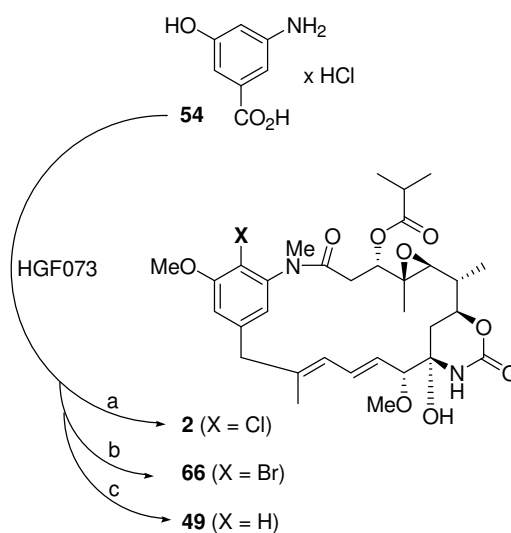


Abbildung 18: Mutasynthese zur Verfütterung an HGF073 (**63**, **64**, **46** und **65** sind käuflich bezogen). Chloraromat **46** wurde in Göttingen im Arbeitskreis GROND verfüttert.

Die Verfütterung der Mutasyntone¹³⁷ erfolgte zunächst in kleinem Maßstab¹³⁸, wobei zur Gewährleistung der Aktivität von *A. pretiosum* HGF073 parallel zu den Verfütterungen neuer Substanzen als Positivkontrolle Kulturen mit AHBA-Supplementierung fermentiert wurden. Nach einer Fermentationsdauer von sieben Tagen wurde der Rohextrakt direkt massenspektrometrisch über UPLC-MS (ESI) auf die Bildung von Mutasynteseprodukten analysiert. Erfolgreiche Experimente wurden in größerem Maßstab¹³⁹ wiederholt, so dass ausreichende Mengen der neuen Derivate für die vollständige NMR-spektroskopische Analyse und biologische Testierung¹⁴⁰ isoliert werden konnten.

Zur Darstellung von Ansamitocin P-3 als Referenz für die Komplementierungsexperimente aus Kapitel 4.1 und zur Erlernung der mikrobiologischen Arbeitsweisen sowie Isolierungstechniken wurde zunächst der natürliche Vorläufer AHBA **54** als Mutasynton verfüttert. Dies führte zur gewünschten Produktion von AP-3 in einer maximalen Fermentationsausbeute von 8 % bezogen auf zugefütterte AHBA bzw. von 76 mg L⁻¹,¹⁴¹ was dem Titer an AP-3 in Kulturen des Wildstamms *A. pretiosum* entspricht (Schema 30).



Schema 30: Verfütterung von AHBA **54** an HGF073. Bedingungen: a) Korea-Medium, 8.0 %; b) Korea-Medium, NaBr [0.1 M], 8.4 %; c) Korea-Medium, NaI [0.1 M], **49** nur massenspektrometrisch nachweisbar.

Arbeiten von WALSH und O'HAGAN über Substratspezifität von Halogenasen¹⁴² ließen das chlorierende Enzym *Asm19* der Ansamitocin-Biosynthese als weitere Stellschraube zur Derivatisierung erkennen. Die gute Akzeptanz von Bromid an Stelle von Chlorid als Substrat

¹³⁷ siehe Experimenteller Teil Kapitel 6.7

¹³⁸ Kulturgröße: 50 mL Korea-Medium

¹³⁹ Kulturgröße: bis 1000 mL Korea-Medium

¹⁴⁰ siehe Kapitel 4.2.3

¹⁴¹ angegebene Konzentrationen beziehen sich auf das Volumen an eingesetztem Korea-Medium

¹⁴² *Chemical Biology: Directing Biosynthesis* **2006**, 11. - 13. September, Cambridge.

von Haloperoxidasen ist für viele Fälle beschrieben,¹⁴³ was sich auch in der Anhäufung Brom-substituierter Sekundärmetabolite in der Klasse der marinen Naturstoffe widerspiegelt.¹⁴⁴ Halogenasen beziehen die Halogene meist als Anionen aus ihrer Umgebung, um dann über einen Redoxmechanismus enzymatisch die Kohlenstoff-Halogen-Bindung zu formen. Für tiefere Einblicke in die Funktionsweise von Halogenasen sei auf den umfassenden Review von WALSH hingewiesen.¹⁴⁵

In der Literatur sind einige Fermentationsverfahren mit Halogensalzzugabe beschrieben, die zunächst eine Enthaloogenierung des Kulturmediums (z.B. über Osmose) vorsahen.¹⁴⁶ Um diese Arbeit zu umgehen und wegen der geringen Kosten für Natriumbromid bzw. Natriumiodid wurde eine hohe Halogenkonzentration (0.1 M) im Medium eingestellt. Die Zugabe von Natriumfluorid wurde neben der toxischen Wirkung auch deshalb nicht als sinnvoll erachtet, da der Einbau von Fluor in biologischen Systemen über einen anderen enzymatischen Mechanismus verläuft,¹⁴⁷ der im Ansamitocin-Produzenten nicht vorliegt. Diese einfache Vorgehensweise führte im Fall der Natriumbromidzugabe selektiv zur Bildung des an C-19 bromierten Ansamitocins **66**. Die Fermentationsausbeute entsprach der des chlorierten Pendants, dessen Bildung selbst nicht beobachtet werden konnte. Die Zugabe von Natriumiodid zur Fermentation führte nicht zur Bildung von 19-Iod-ansamitocin, sondern wirkte sich inhibierend sowohl auf die Gesamtproduktion als auch auf die Aktivität der Halogenase aus, so dass nur massenspektrometrisch die bekannte Deschloroverbindung **49** detektiert werden konnte (Schema 30).

Bei diesen ersten Mutasynteseexperimenten wurde ersichtlich, dass nur 8 % der zugefütterten Substratmenge zum AP-3 umgesetzt und auch nur geringe Mengen von nicht vollständig prozessierten Derivaten detektiert wurden. Eine Steigerung der Fermentationsausbeute konnte also nicht durch höhere Substratzugabe bewirkt werden, vielmehr können sich hohe Vorläufer-Konzentrationen toxisch auf den Mikroorganismus auswirken. Um den toxischen Einfluss des zugefütterten Vorläufers zu vermindern, wurde bei der Penicillin-Fermentation nach HANSEN *et al.* eine geregelte Zugabe des Vorläufers

¹⁴³ a) C. D. Murphy, *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 539-548; b) R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289 und darin angegebene Referenzen.

¹⁴⁴ die Bromidkonzentration ist in mariner Umgebung höher als in terrestrischer.

¹⁴⁵ F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3364-3378.

¹⁴⁶ a) M. J. Hall, B. O. Handford, C. H. Hassall, D. A. S. Phillips, A. V. Rees, *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1973**, *3*, 380-383; b) J. E. Hochlowski, M. Jackson, R. R. Rasmussen, A. M. Buko, J. J. Clement, D. N. Whittern, J. B. McAlpine, *J. Antibiotics* **1997**, *50*, 201-205.

¹⁴⁷ C. Dong, F. L. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J. B. Spencer, D. O'Hagan, J. H. Naismith, *Nature* **2004**, *427*, 561; H. M. Senn, D. O'Hagan, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13643-13655.

Phenoxyessigsäure realisiert.¹⁴⁸ Die pumpengesteuerte Substratzugabe wurde in einem Bioreaktor durch on-line Messung über MIMS¹⁴⁹ geregelt. Ein ähnliches aber weniger komplexes System wurde in der Literatur von WEUSTER-BOTZ *et al.* auch für Schüttelkulturen beschrieben, wobei hier zusätzlich eine pH-Kontrolle vorgenommen wurde.¹⁵⁰

In Analogie zu diesen Arbeiten konnte von TOBIAS KNOBLOCH eine über Spritzenpumpen geführte Zugabe der Mutasythone konstruiert werden. Anstelle der bisher gepulsten Verfütterung 72, 96 und 120 h nach Inokulation des Produktionsmediums ermöglichte dieses Verfahren eine kontinuierliche Supplementierung über einen Zeitraum von 96 h (Abbildung 19).



Abbildung 19: Kontinuierliche Verfütterung über Spritzenpumpe.

Die kontinuierliche Substratzugabe bewirkte bei der Verfütterung des natürlichen Vorläufers AHBA unter NaBr-Bedingungen eine Steigerung der Fermentationsausbeute an 19-Br-AP-3 **66** auf 13.0 %, was einem Titer von 132 mg L⁻¹ entspricht, während die parallel durchgeführte Pulsverfütterung reproduzierbar 8.4 % (86 mg L⁻¹) aufwies (Schema 31). Zusätzlich wurden die an 3-OH unterschiedlich acylierten Derivate (P-2 **67** und P-4 **68**) des

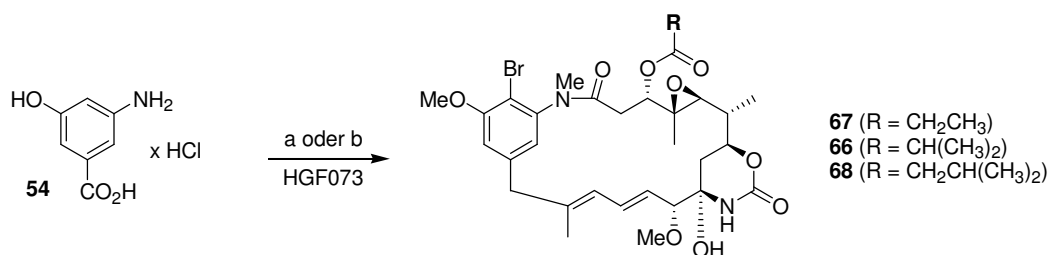
¹⁴⁸ K. F. Hansen, H. Degn, *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 485-490.

¹⁴⁹ MIMS: membrane inlet mass spectrometry

¹⁵⁰ D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, M. Arnold, *Biochem. Eng. J.* **2001**, *7*, 163-170.

Brom-Ansamitocins isoliert, wobei Pulsverfütterung und kontinuierliche Zugabe gleiche Mengen produzierten.

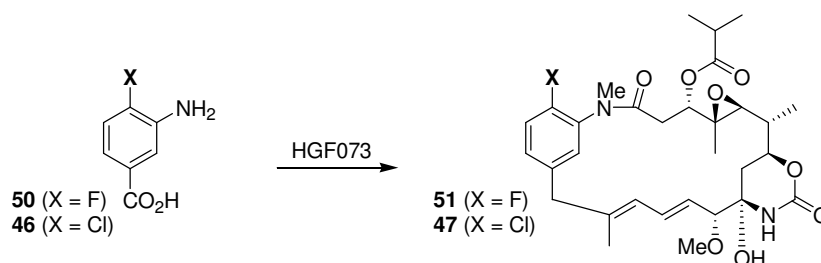
Diese Studien zeigten, dass mit der kontinuierlichen Verfütterung und dem daher nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Vorläufer eine Optimierung der Fermentationsausbeute um 55 % zu erreichen ist.



Schema 31: Studien zur Steigerung der Fermentationsausbeute. Bedingungen: a) Zugabe von **54** pulsweise in drei Portionen, Fermentationsausbeute 1.4 % **67**, 8.4 % **66**, 0.5 % **68**; b) Zugabe von **54** kontinuierlich über Spritzenpumpe, Fermentationsausbeute 1.4 % **67**, 13.0 % **66**, 0.4 % **68**.

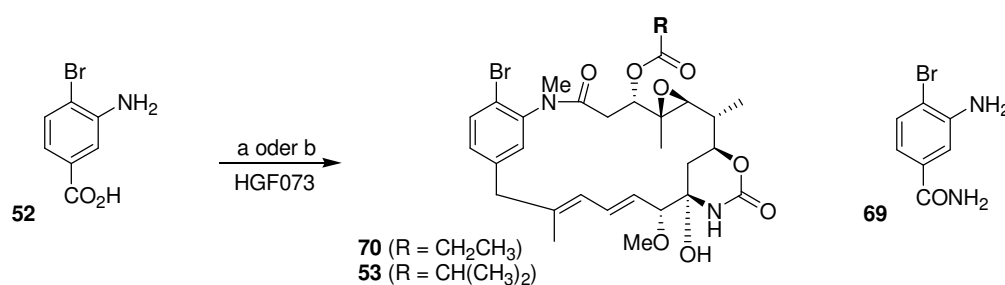
Dieses Vorgehen sollte auch auf die Mutasyntesen mit den AHBA-Derivaten angewendet werden, um eine eventuell inhibierende oder toxische Wirkung der unnatürlichen Vorläufer auf den Ansamitocin-Produzenten zu minimieren.

Die mutasynthetische Darstellung des von BRÜNJES bereits massenspektrometrisch nachgewiesenen Fluor-Ansamitocins **51** wurde zu Beginn dieser Dissertation durchgeführt, also nach dem gepulsten Verfahren. Eine Fermentation mit 800 mL Kulturmedium konnte nur 1.2 mg Produkt bereitstellen, woraus ersichtlich ist, dass der Fluor-Aromat **50** ein eher schlechtes Mutasynton darstellt (Schema 32). Zeitgleich konnte in Göttingen Desmethoxy-Ansamitocin **47** in isolierbarer Menge dargestellt werden, hierbei war die Ausbeute fast doppelt so hoch.



Schema 32: Mutasynthese von Desmethoxy-Analoga. Bedingungen: gepulste Zugabe von **50** bzw. **46**; Fermentationsausbeute 1.5 mg L⁻¹ = 0.17 % **51**, 2.8 mg L⁻¹ = 0.31 % **47** (20-Desmethoxy-ansamitocin P-3 **47** wurde in Göttingen dargestellt).

In den Testverfütterungen von Brombenzoesäure **52** zeigte sich bereits deren gute Akzeptanz, so dass an diesem Substrat der Einfluss der Art der Substratzugabe bei AHBA-Analoga ermittelt werden sollte. Parallel zur kontinuierlichen Supplementierung von Mutasynton **52** erfolgte eine Fermentation mit gepulster Zugabe. Bei der Reinigung des Fermentationsextraktes war das Auftreten einer polaren Verbindung im HPLC-Chromatogramm auffällig, die als Benzamid **69** charakterisiert werden konnte (Schema 33). Offensichtlich wird als Detoxifizierungsmaßnahme der unnatürliche Vorläufer metabolisch umgewandelt und steht dann nicht mehr als Substrat für die PKS zur Verfügung.



Schema 33: Mutasyntese von Demethoxy-Analoga und Studien zur Steigerung der Fermentationsausbeute. Bedingungen: a) gepulste Zugabe von **52**, Fermentationsausbeute 0.3 % **70**, 0.9 % **53**, 62 % **69**; b) kontinuierliche Zugabe von **52**, Fermentationsausbeute 0.2 % **70**, 1.5 % **53**.

In beiden Fällen konnte neben dem P-3-Derivat **53** auch das P-2-Derivat **70** isoliert werden. Der Vergleich beider Arten der Substratzugabe ergab für die kontinuierliche Zugabe eine Steigerung des 19-Brom-20-desmethoxy-AP-3-Titers von 9 mg L^{-1} auf 15 mg L^{-1} , also um 66 %. Erneut war die Menge an P-2-Derivat in beiden Fällen annähernd konstant. Eine kontinuierliche Substratzugabe bewirkt demnach eine selektive Ausbeutesteigerung des P-3-Derivats auch im Fall der unnatürlichen Vorläufer.

Zur Komplettierung der Reihe der 4-Halo-Aminobenzoensäuren wurde auch der Iodaromat **56** verfüttert. Allerdings konnten keinerlei Ansamitocin-Derivate im Rohextrakt der Fermentation nachgewiesen werden. Offensichtlich ist der Iod-Substituent sterisch zu anspruchsvoll, so dass dieser Aromat entweder nicht über das Lademodul auf die PKS gebracht, oder an einer anderen Stelle der Biosynthese nicht weiter prozessiert wird. Zusammenfassend lässt sich für die Reihe der Halobenzoensäuren die in Abbildung 20 gezeigte Substratspezifität aufstellen.

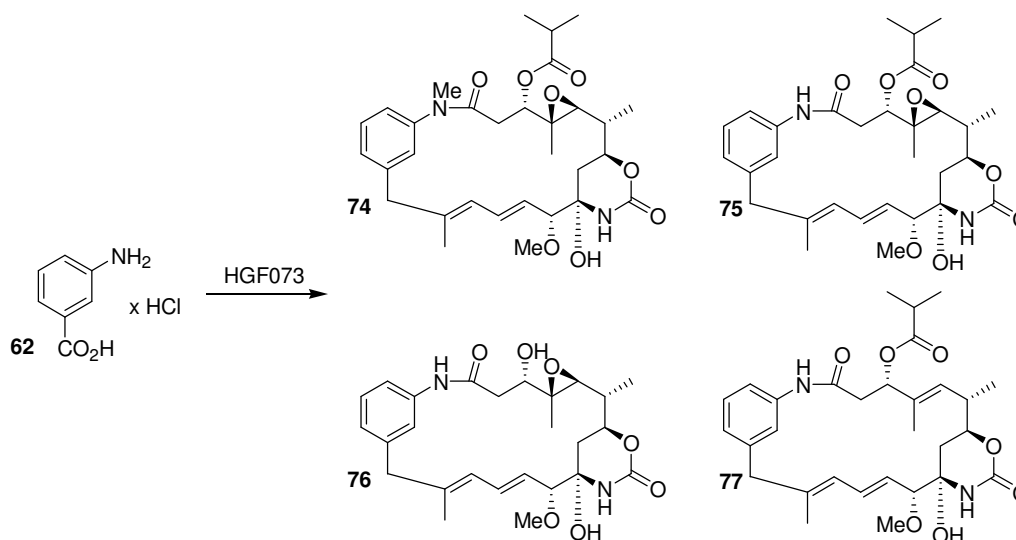
Die Ergebnisse der Mutasyntesen mit den in 4-Position halogenierten 3-Aminobenzoensäuren wurden bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe GROND publiziert.¹⁵¹

¹⁵¹ F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1-4.

Bei Verfütterung von Mutasynton **58** konnten etwa 200 µg des vollständig prozessierten 19-Hydroxy-ansamitocin P-3 **71** aus 400 mL Kultur isoliert werden, wobei schon die optimierte Spritzenpumpenzufütterung genutzt wurde. Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte die Verbindung nur $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch charakterisiert werden, so dass für eine vollständige Analytik die Wiederholung dieser Verfütterung in weit größerem Maßstab nötig sein wird. Die Bildung der Ansamitocin-Derivate **72** und **73** bei Verwendung von 3-Amino-4-methoxybenzoesäure (**65**) konnte nur massenspektrometrisch belegt werden. Dies lässt auf eine eingeschränkte Funktionalität der *N*-Methyltransferase aufgrund des sterischen Anspruchs der Methoxygruppe schließen.

Mutasyntone **59** und **60** wurden nicht zu Ansamitocin-Analoga prozessiert. Weiterhin wurden weder Anthranilsäure-Derivat **63** noch Salicylsäure-Derivat **64** akzeptiert.

Bei der Wiederholung des Mutasynteseexperimentes mit Aminobenzoesäure **62** konnte entgegen früherer Arbeiten⁷⁶ die Bildung von verschiedenen Ansamitocin-Derivaten **74** – **77** beobachtet werden (Schema 35). Dies kann neben der durch die Umkristallisation bewirkten Reinigung auch durch eine sensitivere Analytik¹⁵² begründet sein.

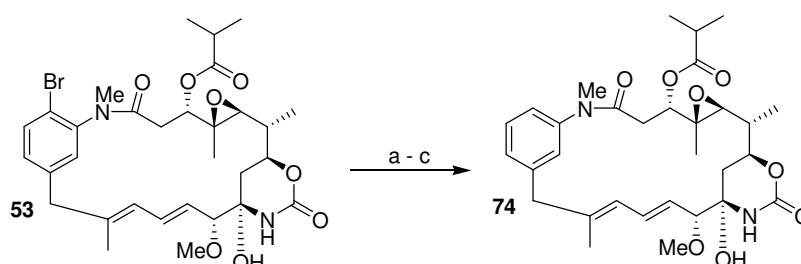


Schema 35: Mutasyntese mit 3-Aminbenzoesäure Hydrochlorid. Bedingungen: Kontinuierliche Zugabe von **62**, Fermentationsausbeute 0.05 % **74**, **75** – **77** nur massenspektrometrisch nachgewiesen.

Eine vollständige Analytik war in diesem Fall aufgrund der nur in geringen Mengen isolierbaren Derivate nicht möglich. Vom vollständig prozessierten 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** konnte ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen werden, die anderen Derivate waren nur massenspektrometrisch zu erfassen.

¹⁵² Seit Januar 2008 konnte ein UPLC-gekoppeltes Massenspektrometer genutzt werden, siehe Experimenteller Teil.

Für die geplanten Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung¹⁵³ stellte das am Aromaten unsubstituierte Ansamitocin-Derivat eine sehr interessante Verbindung dar, so dass eine geeignete Methode zur Darstellung ausreichender Substanzmengen benötigt wurde. Gleichzeitig durchgeführte semisynthetische Modifizierungen an Ansamitocin-Derivaten (Kapitel 4.3) waren Palladium-katalysiert unter STILLE-Bedingungen erfolgreich. Daher sollte Derivat **74** durch Dehalogenierung des in hohen Fermentationsausbeuten darstellbaren 19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** synthetisiert werden (Schema 36). Radikalische Dehalogenierung ohne Palladium-Katalyse wurden wegen ihrer Inkompatibilität zu olefinischen Doppelbindungen nicht getestet. Die zuvor optimierten Bedingungen zur Kupplung mit Alkenylstannanen konnten nicht auf die Dehalogenierung, also eine „Hydridkupplung“, übertragen werden. Systematische Untersuchung von Katalysator und Reaktionsbedingung (Tabelle 1) konnte das unsubstituierte Ansamitocin-Derivat **74** in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 80 % bereitstellen, so dass nun auch eine vollständige Strukturanalytik durchgeführt werden konnte.



Schema 36: Palladium-katalysierte Dehalogenierung. Bedingungen: a) – c) siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Bedingungen der Pd-katalysierten Dehalogenierung.

Eintrag	Katalysator	Bedingungen	Ergebnis
a	Pd[PPh ₃] ₄	Bu ₃ SnH, Toluol, 70 -100 °C	Zersetzung
b	Pd[PPh ₃] ₄	Bu ₃ SnH, Toluol, 60 °C	Edukt/Produkt = 3:1
c	Pd[PtBu ₃] ₂	Bu ₃ SnH, Toluol, 60 °C	80 %

Dies ermöglichte auch die Quantifizierung der Fermentationsausbeute analog zu der Vorgehensweise in Kapitel 4.1.3, so dass aus dem Integral der UV-Absorption ($\lambda = 248$ nm) im HPLC Chromatogramm des Rohextraktes direkt die gebildete Menge an Derivat **74** ermittelt werden konnte. Die Kalibrationsgerade wurde aus einer Verdünnungsreihe der synthetisierten Substanz erstellt (siehe Anhang – Kapitel 7.2).

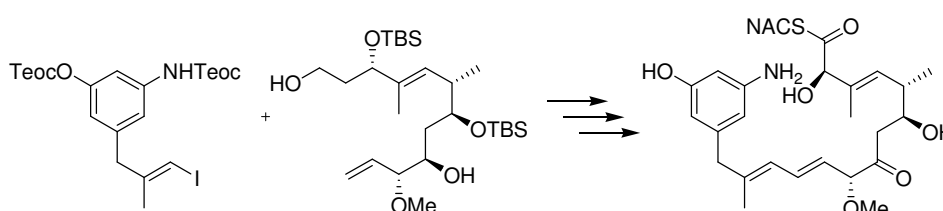
¹⁵³ siehe Kapitel 4.2.4

4.2.2 Adressierung der post-PKS-Enzyme

Die post-PKS-Prozessierung führt nach der Polyketidsynthese letzte strukturelle Veränderungen am Grundgerüst der Polyketide ein. In den meisten Fällen sind es Methylierungen an Sauerstoff-, Stickstoff- oder Kohlenstoffzentren, Oxidationen, Acylierungen sowie Glycosylierungen, wodurch häufig erst der biologisch aktive Naturstoff entsteht.¹⁵⁴ Im Gegensatz zu den Transformationen der PKS, die eine Aufladung der Substrate auf einen Multienzym-Komplex nötig macht, sollten postketidische Enzyme eine weniger rigide Substratspezifität besitzen, was deren breite Nutzung zur Modifizierung von Derivaten des natürlichen Substrats in Aussicht stellt.^{38, 52a}

4.2.2.1 Vorarbeiten

Erste Vorarbeiten im Arbeitskreis KIRSCHNING zielten auf die Synthese der natürlichen Substrate der postketidischen Enzyme, wobei anschließende Fütterungsstudien aufzeigen sollten, dass *in vivo* Transformationen solch komplexer Vorläufer überhaupt möglich sind. Erstes Syntheseziel war das als SNAC-Thioester aktivierte *seco*-Proansamitocin (Schema 1, Intermediat **VIII**), welches von FRENZEL *et. al.* bereits 2005 synthetisiert werden konnte (Schema 37).⁸² Bei dem anschließenden Fütterungsexperiment konnte keine Bildung von Ansamitocin beobachtet werden.⁷⁶ Die Aktivität der bei dieser Studie verwendeten *asmB*-Deletionsmutante HGF051³² konnte allerdings nicht bewiesen werden.¹⁵⁵ Da zu diesem Zeitpunkt keine Substanz dieses komplexen Vorläufers mehr zur Verfügung stand, konnte eine Wiederholung an *A. pretiosum* HGF073 nicht erprobt werden.¹⁵⁶



Schema 37: Synthese des SNAC-Thioesters von *seco*-Proansamitocin nach FRENZEL. Konvergenter Schritt ist eine HECK-Reaktion unter JEFFREY-Bedingungen.

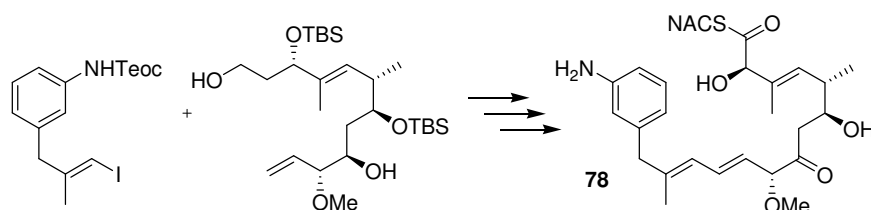
Durch Modifizierung der *seco*-Proansamitocin-Synthese gelang BRÜNJES die Darstellung von 20-Deshydroxy-*seco*-Proansamitocin **78** (Schema 38), welches aber wegen der zuvor

¹⁵⁴ a) C. T. Walsh, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 4-10; b) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.

¹⁵⁵ *asmB* kodiert für die Enzyme von Modul 3 und 4 der PKS, eine Überprüfung der Aktivität könnte also nur durch Komplementierung mit dem Hexaketid oder weiter fortgeschrittenen Intermediaten erfolgen.

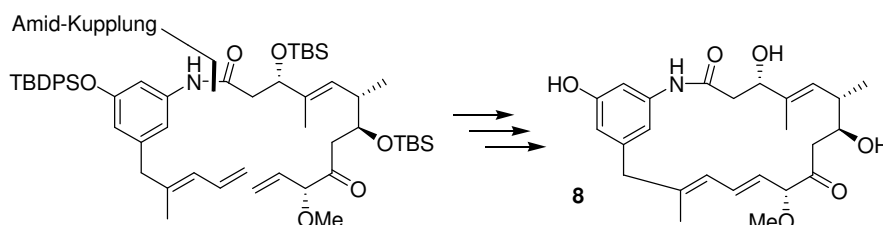
¹⁵⁶ Die Synthese wird zur Zeit von Dipl.-Chem. KIRSTEN HARMROLFS wiederholt.

erfolgslosen Fütterungsstudie mit dem natürlichen Substrat nicht in einem Komplementierungsexperiment eingesetzt wurde. Zeitgleich begonnene Arbeiten¹⁵⁷ zur Expression der Amidsynthase *Asm9* stellten in Aussicht, das für die Zyklisierung verantwortliche Enzym durch heterologe Expression als „chemical tool“ zu erhalten, so dass das *seco*-Proansamitocin-Derivat erst einmal zurückgehalten wurde.



Schema 38: Synthese des als SNAC-Thioesters von *seco*-Proansamitocin-Derivat **78** nach BRÜNJES. Konvergenter Schritt ist eine HECK-Reaktion unter JEFFREY-Bedingungen.

Mit der erfolgreichen Synthese von Proansamitocin **8** konnte durch MEYER das zyklisierte natürliche Substrat für die post-PKS-Transformationen bereitgestellt werden,^{158, 159} wodurch auch ein synthetischen Zugang zu weiteren Proansamitocin-Derivaten ermöglicht wurde (Schema 39).



Schema 39: Synthese von Proansamitocin **8** nach MEYER. Schlüsselschritt ist eine En-Dien-Metathese nach konvergenter Amid-Kupplung mit BOP-Cl.

Die jüngst von FECIK publizierte *in vivo* Prozessierung von zuvor synthetisiertem Narbonolide zu Pikromycin durch eine Mutante von *Streptomyces venezuelae* unterstreicht das Potenzial solcher post-PKS-Transformationen.¹⁶⁰

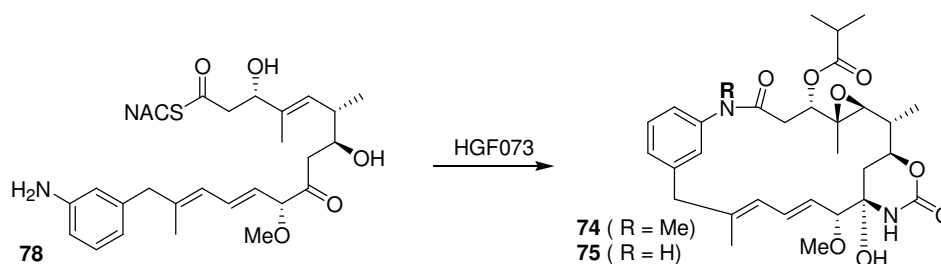
¹⁵⁷ T. Knobloch, Masterarbeit, *Versuche zur Expression des asm9-Amidsynthasegens aus Actinosynnema pretiosum*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2006**.

¹⁵⁸ A. Meyer, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Studien zu hybriden Ansamycin-Antibiotika - Synthese von Proansamitocin*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2006**.

¹⁵⁹ A. Meyer, M. Brünjes, F. Taft, T. Frenzel, F. Sasse, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1489-1492.

¹⁶⁰ a) L. Venkatraman, C. E. Salomon, D. H. Sherman, R. A. Fecik, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9853-9856; b) D. L. Akey, J. D. Kittendorf, J. W. Giraldes, R. A. Fecik, D. H. Sherman, J. L. Smith, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 537-

offenkettiges Substrat zur Testung bereit, mit dem insbesondere eine Aussage über die Flexibilität der Amidsynthese gemacht werden kann. Nach Verfütterung von *seco*-Derivat **78** konnte im Rohextrakt der Fermentation die Bildung der am Aromaten unsubstituierten Ansamitocin-Derivate **74** und **75** massenspektrometrisch belegt werden, wozu MSMS-Fragmentierung¹⁶² herangezogen wurde (Schema 41).



Schema 41: *In vivo* Transformation von *seco*-Derivat **78**. Bedingungen: kontinuierliche Zugabe, 1.1 % **74**.

Die Quantifizierung gelang analog zur Vorgehensweise aus Kapitel 6.2.1.3. Nach Reinigung des Rohextraktes über HPLC wurde das Integral des UV-Signals ($\lambda = 248$) mit der zuvor aus synthetischem Produkt ermittelten Kalibrationsgerade verglichen (siehe Anhang – Kapitel 7.2). Obwohl die Ausbeute nur bei etwa 1.1 % lag, bewirkte die Adressierung ausschließlich postketidischer Enzyme, verglichen mit der Verfütterung des analogen PKS-Vorläufers 3-Aminobenzoesäure, eine Steigerung der Ausbeute um den Faktor 20. Daraus lässt sich als entscheidender Engpass die Aufladung auf die PKS ableiten.

Da die Makrolactamisierung dieses Derivats zuvor mit Kupplungsreagenzien synthetisch scheiterte,¹⁶³ liegt mit *Asm9* ein die chemischen Zyklisierungsmethoden ergänzendes Enzym vor. Die gezeigte Substratflexibilität, die auch durch die erfolgreichen Mutasyntesen mit AHBA-Analoga untermauert wird, sollte den Einsatz von *Asm9* nach erfolgreicher Expression als komplementierendes Werkzeug zur Makrolactamisierung ermöglichen.

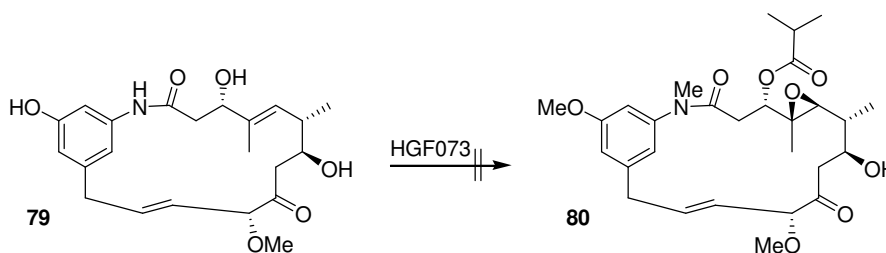
Aufgrund der dürftigen Ausbeuten der hier vorgestellten Mutasyntesen im Verhältnis zu den komplexen und damit wertvollen Substraten eignet sich die Adressierung der post-PKS-Enzyme auf die gezeigte Weise nicht zur präparativen Darstellung von Derivaten. Ein Problem könnte die geringe Membrangängigkeit sein, was im einfachsten Fall durch Verwendung von zellfreiem Extrakt nach Homogenisierung umgangen werden könnte. Die vorgestellten Arbeiten dienen nur einem ersten „Screening“ zur Substratflexibilität, was bei

¹⁶² $m/z = 491$ bzw. $505 [M + Na - \text{HOC(O)CH}(\text{CH}_3)_2]^+$ durch Abspaltung der Isobutyryl-Seitenkette

¹⁶³ als gängige Kupplungsstrategien wurden Carbodiimid-Kupplung, MUKAYAMA-Variante und TROST-Prozedur getestet.

Erfolg die zeitaufwändige und kostspielige Expression der beteiligten Enzyme rechtfertigen kann.

Als weiteres komplexes Derivat zur Untersuchung der Substratflexibilität wurde das Ring-verengte Proansamitocin **79**¹⁵⁸ auf Akzeptanz bezüglich der post-PKS-Enzyme getestet. Aufgrund des um zwei Kohlenstoffatome verkürzten Makrozyklus sollte hier eine stark geänderte Konformation im Vergleich zu Proansamitocin vorliegen (Schema 42).



Schema 42: Postulierte *in vivo* Transformation von Ring-verengtem Proansamitocin **79**.

Ein früheres Mutasyntheseexperiment ließ durch massenspektrometrische Untersuchung vermuten, dass die Verfütterung an *A. pretiosum* HGF073 zur Bildung des Analogons **80** führte. Dieses Ergebnis konnte aber damals nicht durch MSMS-Fragmentierungsexperimente oder Isolierung bestätigt werden.⁷⁶ Die unternommenen Versuche zur Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses schlugen fehl. Durch einen Vergleich der Massenspektren (UPLC-MS) aus der Fermentation mit Derivat **79** und ohne Zufütterung konnte sowohl bei Pulsverfütterung als auch bei kontinuierlicher Zugabe ausschließlich nicht umgesetztes Edukt nachgewiesen werden. Nach Extraktion und Reinigung über *reversed phase* HPLC konnte ebenfalls nur **79** detektiert werden, so dass aus dieser Studie geschlossen werden kann, dass die Konformation des Substrats einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessierung durch die post-PKS-Enzyme in *A. pretiosum* einnimmt.

4.2.3 Mutasynthese mit weiteren *A. pretiosum*-Mutanten

Zusätzlich zu der mutasynthetischen Derivatisierung mit der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierten Mutante HGF073 wurde eine Reihe weiterer Mutanten von *A. pretiosum* für die Erstellung breiterer Diversität getestet. Bei den von PETER SPITELLER bereitgestellten Stämmen handelt es sich um Deletionsmutanten, bei denen nur einige der für die postketidischen Transformationen kodierenden Gene entfernt wurden. Diese sind auch ohne Zufütterung von AHBA zu einer Produktion von Ansamitocin-Derivaten befähigt. Die so gebildeten Abbruchprodukte der AP-3-Biosynthese sollten dann für weitere semi-synthetische Schritte genutzt werden können.

Abbildung 21 fasst die Ergebnisse der Fermentation von den drei Mutanten *Actinosynnema pretiosum* $\Delta asm7$, $\Delta asm10$ und $\Delta asm11$ zusammen.¹⁶⁴

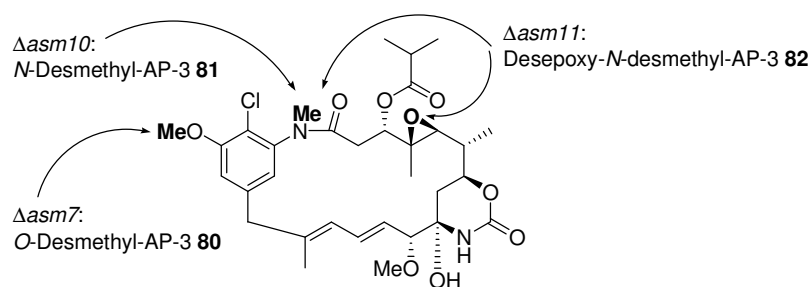


Abbildung 21: Ergebnisse der Fermentation weiterer Blockmutanten. Hervorgehoben sind die post-PKS-Transformationen, die die entsprechenden Deletionsmutanten nicht durchführen. Die Mutante $\Delta asm11$ produziert auch Ansamitocin P-3.

Die ermittelten Mutasyntheseprodukte decken sich mit den publizierten Funktionen der jeweilig geblockten Enzyme.³⁸ Die Produktivität dieser Stämme liegt dabei im Bereich des Wildstammes, so dass eine präparative Nutzung zur Generierung weiterer Diversität möglich ist. Interessanterweise findet bei allen Deletionsmutanten die durch *Asm12* katalysierte Halogenierung statt, so dass hier auch die Möglichkeit zur Einführung einer Bromfunktionalität nach der in Kapitel 4.2.1.3 vorgestellten Weise gegeben ist, die dann auch semi-synthetische Derivatisierung ermöglicht (siehe Kapitel 4.3).

An dieser Stelle sei noch auf eine weitere Deletionsmutante $\Delta asm12/21$ hingewiesen, welche zurzeit von TOBIAS KNOBLOCH bearbeitet wird. Das Produkt dieser Doppelblockmutante ist Proansamitocin, welches dadurch fermentativ darstellbar ist. Auch hier bietet semisynthetische Modifizierung mit anschließender Verfütterung an HGF073 eine vielseitige Derivatisierungsmöglichkeit („Ping-Pong-Prinzip“).

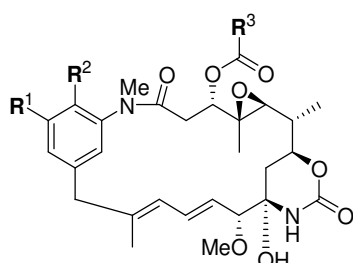
¹⁶⁴ siehe Experimenteller Teil Kapitel 6.7

4.2.4 Biologische Aktivitäten

Die über Mutasyntese erzeugten Ansamitocine wurden von FLORENZ SASSE am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung¹⁶⁵ auf ihre biologische Aktivität getestet. Neben einem ersten Test auf Zytotoxizität an L-929 Mausfibroblasten¹⁶⁶ (Tabelle 2, Einträge 1 und 2) wurden IC₅₀-Werte für verschiedene humane Krebszelllinien (Einträge 3-10) und gesunde humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Eintrag 11) ermittelt, so dass eine erste Aussage über eine eventuell erreichte Selektivitätssteigerung gemacht werden konnte. Als Referenz wurden ebenfalls die IC₅₀-Werte von Ansamitocin P-3 bestimmt.

Tabelle 2: IC₅₀-Werte [nM] der mutasyntetisch erzeugten Ansamitocine. Höhere Aktivitäten als die Referenz AP-3 sind markiert. Aktivitäten für Deschloro-AP-3 **49** und Desmethoxy-AP-3 **47** finden sich in der Literatur.^{151, 159}

Ansamitocine:



- 67** [R¹ = OMe, R² = Br, R³ = CH₂CH₃]
66 [R¹ = OMe, R² = Br, R³ = CH(CH₃)₂]
68 [R¹ = OMe, R² = Br, R³ = CH₂CH(CH₃)₂]
51 [R¹ = H, R² = F, R³ = CH(CH₃)₂]
70 [R¹ = H, R² = Br, R³ = CH₂CH₃]
53 [R¹ = H, R² = Br, R³ = CH(CH₃)₂]
74 [R¹ = H, R² = H, R³ = CH(CH₃)₂]

Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), M1 (primäre embryonale Mausfibroblasten), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), A-498 (Nierenkarzinom), A-549 (Lungenkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF7 (Brustadenokarzinom), HMVEC (primäre mikrovaskuläre Endothelzellen).

Einträge 1-2: tierische Bindegebszellen, Einträge 3-10: humane Krebszelllinien, Eintrag 11: humane Zellen.

Zelllinie	AP-3	67	66	68	51	70	53	74
L-929	0.2	0.9	0.1	1.0	0.7	2.2	1.1	1.7
M1					0.51		0.46	
KB-3-1	0.17		0.19	0.73	0.31	2.20	0.46	0.04
U-937	0.006		0.012	0.046	0.017	0.057	0.046	0.026
A-431	0.08	0.16	0.06	0.23	0.07	0.82	0.15	0.14
A-498	1.7	4.2	1.3	3.7	3.4	>8	6.2	
A-549	0.16		0.07	0.17	0.19	1.73	0.46	0.17
SK-OV-3	0.047	1.351	0.059	0.107	0.059	0.393	0.077	0.070
PC-3	0.055	0.060	0.147	0.114	0.059	0.377	0.154	0.035
MCF7		0.057	0.019	0.058		0.267		
HMVEC	0.024				0.042		0.231	

¹⁶⁵ Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig

¹⁶⁶ Fibroblasten = Bindegewebszellen

Alle getesteten Ansamitocine besitzen eine ausgesprochen hohe antiproliferative Aktivität sowohl gegenüber Krebszellen als auch gegen gesunde humane Zellen. Eine Selektivitätssteigerung, also eine erhöhte zytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen, konnte durch die Derivatisierungen nicht erreicht werden. Allerdings konnten mit 19-Brom-AP-3 **66** und dem unsubstituierten Ansamitocin **74** gegenüber einigen Krebsarten aktivere Derivate hergestellt werden, die sich interessanter Weise in ihrem verbesserten Wirkspektrum ergänzen.

Als Struktur-Wirkungs-Beziehung lässt sich ableiten, dass Substitutionen am aromatischen System des AP-3 zu keinem signifikanten Verlust der Aktivität führen, dass diese aber durchaus die Wirkung modulieren. Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit der Literatur⁸ gezeigt werden, dass die Art der Esterseitenkette an C-3 Einfluss nimmt, wobei das P-3-Derivat generell die höchste Aktivität verzeichnet.

Die Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung der Ansamitocine konnte über Immunfluoreszenz-Markierung und anschließende Anfärbung auch visuell dargestellt werden (Abbildung 22).

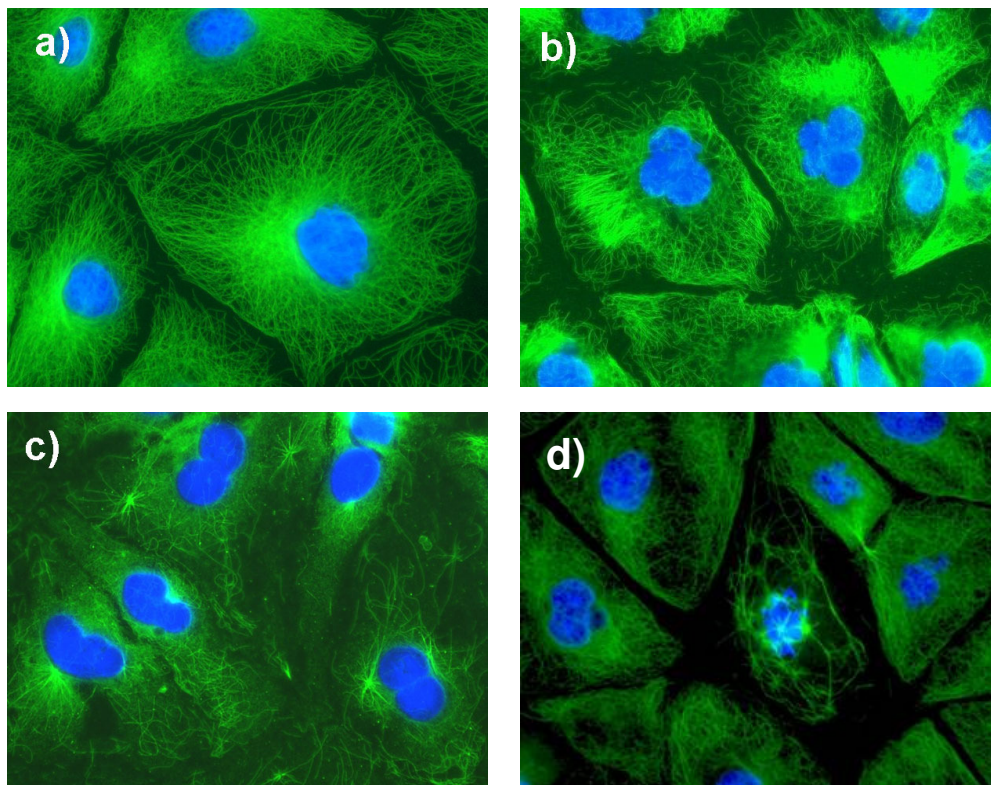


Abbildung 22: Wirkung der Ansamitocine auf L-929 Mousfibroblasten. Immunfluoreszenzmarkierung der Mikrotubuli (grün), Anfärbung der Zellkerne und der Chromosomen (blau): a) unbehandelte Kontrollzellen; b) Maytansin [50 ng/mL]; c) 19-Deschloro-AP-3 **49** [500 ng/mL]; d) 19-Brom-20-Desmethoxy-AP-3 **53** [10 ng/mL].

4.3 Synthese Tumor-gerichteter Ansamitocin-Derivate

Nachdem bisher eine therapeutische Nutzung der extrem cytotoxischen Ansamitocine aufgrund substantieller Nebenwirkungen unterbleiben musste (siehe Kapitel 2.1), stellt der gezielte Transport dieses Wirkstoffes zur Tumorzelle eine klinische Anwendung durch Vergrößerung des therapeutischen Fensters in Aussicht (siehe Kapitel 2.5). Der folgende Abschnitt stellt die einleitenden Studien sowie die Synthese von solchen Tumor-gerichteten Ansamitocinen vor.

4.3.1 Semisynthetische Derivatisierung

Die bisher publizierte Synthesesequenz von Ansamitocin-Konjugaten, die die Anbindung des Linkers über 3-OH von Ansamitocin vorsieht, ist wenig effektiv. Dies ist durch die in schlechten Ausbeuten laufende reduktive Abspaltung der natürlichen Esterseitenkette und einer unter teilweiser Epimerisierung stattfindenden Anbindung des Linkers zu begründen.¹⁶⁷ Daher sollte für die geplante Konjugation ein optimaleres Vorgehen gefunden werden, wobei zu beachten war, dass die erfolgte Transformation am Ansamitocin zu keinem Einbruch der biologischen Aktivität führt. Da durch die mutasynthetische Derivatisierung und die daraus aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen ersichtlich wurde, dass Substitutionen am aromatischen System geduldet werden, schien hier eine Anbindung des Tumor-spezifischen Liganden erfolgsversprechend zu sein. Mit den mutasynthetisch erzeugten Brom-Derivaten des Ansamitocins lagen zudem geeignete Vorläufer für selektive und milde Kreuzkupplungen vor (Abbildung 23).

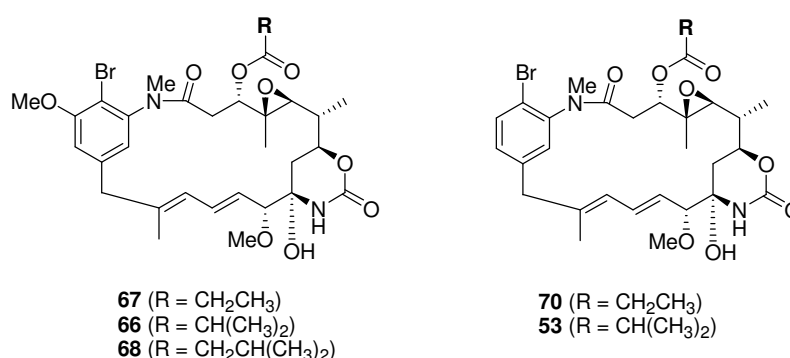
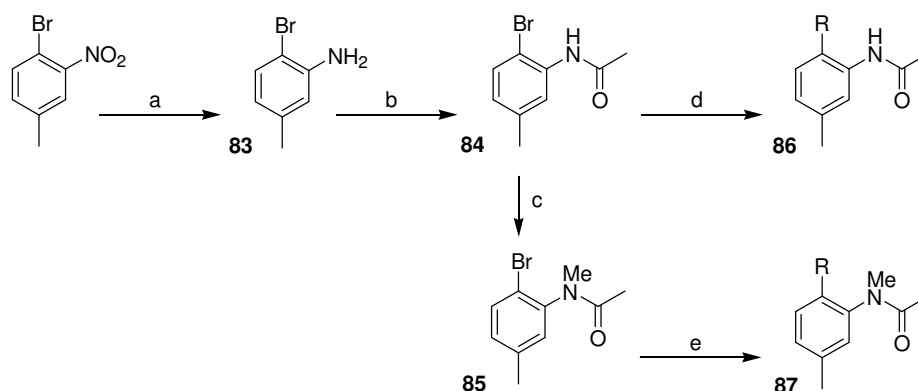


Abbildung 23: Für Pd-katalysierte Kupplungen geeignete Ansamitocin-Derivate.

¹⁶⁷ W. C. Widdison, S. D. Wilhelm, E. E. Cavanagh, K. R. Whiteman, B. A. Leece, Y. Kovtun, V. S. Goldmacher, H. Xie, R. M. Steeves, R. J. Lutz, R. Zhao, L. Wang, W. A. Blättler, R. V. J. Chavi, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392-4408.

Um eine geeignete Variante aus dem weiten Feld der Übergangsmetall-katalysierten C-C-Verknüpfungen ausfindig zu machen, sollte zunächst ein Modellsystem synthetisiert und eine passende Methode evaluiert werden. Ausgehend von 4-Brom-3-nitrotoluol wurde durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid und anschließender Acetylierung als erstes Testsubstrat Amid **84** synthetisiert, welches dann durch *N*-Methylierung in den zweiten Testaromaten **85** überführt wurde (Schema 43).



Schema 43: Synthese der Modellaromaten und Testkupplung. Bedingungen: a) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kat. HOAc, EtOAc, 70 °C, 92 %; b) Ac_2O , Pyridin, Dioxan, RT, 91 %; c) NaH, MeI, THF, 0°C → RT; 82 %; d) siehe Tabelle 3; e) siehe Tabelle 3 (R = Ph, allyl).

Tabelle 3: Ergebnisse der SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung an Testsubstrat **84** und **85** (siehe Schema 40).

Rkt	Boronsäure	Kat./Ligand	Base	Solvens	Temp.	Zeit	Ergebnis
d	PhB(OH) ₂	Pd[PPh ₃] ₄	Na ₂ CO ₃	DME/H ₂ O	95 °C	24 h	84 % 86
d	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	KF	THF	RT	24 h	/
d	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	KF	THF	60 °C	48 h	Spuren
d	PhB(OH) ₂	PEPPSI™	K ₂ CO ₃	Dioxan	60 °C	48 h	26 % 86
d	PhB(OH) ₂	PEPPSI™	Cs ₂ CO ₃	Dioxan	60 °C	48 h	30 % 86
d	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	Cs ₂ CO ₃	Dioxan	60 °C	24 h	61 % 86
d	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	NEt ₃	Dioxan	65 °C	18 h	70 % 86
d	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	Cy ₂ NMe	Dioxan	65 °C	16 h	81 % 86
e	PhB(OH) ₂	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	Cy ₂ NMe	Dioxan	65 °C	15 h	43 % 87
e	Allylboronsre-pinakolester	Pd ₂ dba ₃ /P <i>t</i> Bu ₃	Cy ₂ NMe	Dioxan	65 °C	20 h	Spuren

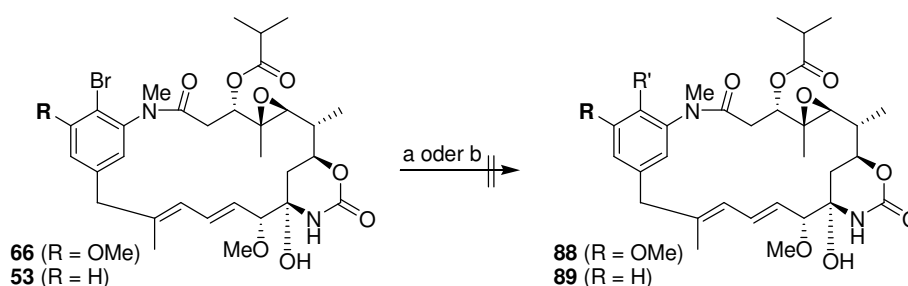
Als erste Kupplung wurde die SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion¹⁶⁸ untersucht, für die diverse Anwendungen in der Naturstoffsynthese beschrieben sind.¹⁶⁹ Neben den Boronsäuren eignen

¹⁶⁸ N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483

¹⁶⁹ S. R. Chemler, D. Trauner, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4676-4701.

sich auch deren Ester und Fluorborate¹⁷⁰ als Kupplungspartner, wodurch gewünschte Reaktivitäten geschaffen werden können. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse dieser Testkupplungen zusammen, die darauf hinweisen, dass mit dem von FU entwickelten Katalysatorsystem Pd₂dba₃/PtBu₃¹⁷¹ die besten Resultate zu erzielen sind. Dadurch konnte ein Übergang von eher harschen Bedingungen (Eintrag 1) zu milderem (Eintrag 8) erreicht werden. Weiterhin ist ersichtlich, dass mit dem *N*-Methyl-Substituent durch sterische Wechselwirkungen die zuvor optimierten Ausbeuten einbrechen (Eintrag 9), und weniger reaktive Boronsäureester (Eintrag 10) nicht mehr reagieren.

Dennoch wurde die FU-Variante der SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion auf die Kupplung von 19-Brom-AP-3 **66** angewendet, wobei der Reaktionsfortschritt direkt massenspektrometrisch über LC-MS verfolgt wurde (Schema 44). Auch nach einer Reaktionsdauer von sieben Tagen konnte kein Kupplungsprodukt detektiert werden, lediglich das Edukt und diverse Zersetzungsprodukte¹⁷² waren erkennbar. Ein Kupplungsversuch mit dem 20-Desmethoxy-Derivat schien aufgrund dieser Resultate nicht mehr sinnvoll.



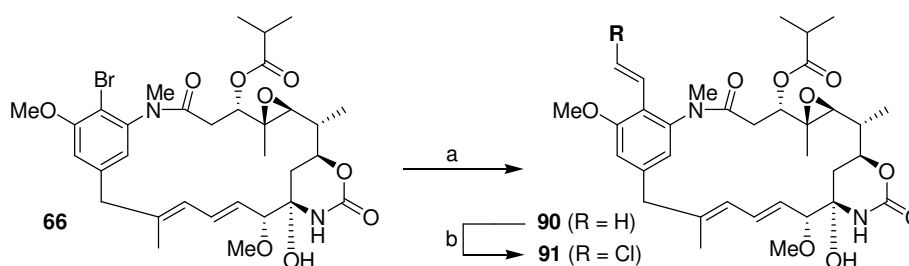
Schema 44: Erfolgreiche Kupplungsversuche. Bedingungen: a) PhB(OH)₂, kat. Pd₂dba₃/PtBu₃, Cy₂NMe, Dioxan, 75 °C, keine Reaktion (R'=Ph); b) i. TMS-Acetylen, *n*BuLi, THF, -78 °C, ii. InCl₃, THF, -78 °C → RT, quant., iii. kat. Pd(dppf)Cl₂, THF, 65 °C, keine Reaktion (R'=TMS-ethinyl).

Grund für dieses Ergebnis schien neben der sterisch abgeschirmten Position an C-19 zusätzlich das elektronenreiche aromatische System zu sein, insbesondere im Fall des an C-20 Methoxy-substituierten Derivats. Wie bei der Synthese von Tetraketid **17** beschrieben, konnte mit der von PÉREZ *et al.* publizierten Palladium-katalysierten Kupplung eines Indiumorganyls beste Ergebnisse an einem elektronenreichen Benzylkörper erhalten werden. Da dort ebenfalls die Kupplung von Arylbromiden beschrieben ist, wurden die Ansamitocine **66** und **53** diesen Bedingungen unterworfen. Abermals konnte nur Zersetzung und in Spuren Dehalogenierung beobachtet werden, was dafür spricht, dass zumindest eine Insertion des Palladiums in die Brom-Kohlenstoffbindung stattfand.

¹⁷⁰ H. A. Stefani, R. Cella, A. S. Vieira, *Tetrahedron* **2007**, 63, 3623-3658.

¹⁷¹ A. F. Littke, C. Dai, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4020-4028.

Um die bisher beobachteten Zersetzungsreaktionen zu unterdrücken, wurde in der Literatur nach milderen Kupplungsbedingungen gesucht. Da für die ohne Basenzusatz ablaufende STILLE-Reaktion¹⁷³ auch Kupplungen an Methoxy-substituierten Aromaten beschrieben sind,¹⁷⁴ wurde mit dem in höheren Fermentationsausbeuten zugänglichen Bromid **66** die Reaktion mit den käuflich bezogenen Vinyl- und Ethinylstannanen erprobt (Schema 45). Tabelle 4 gibt die Ergebnisse der Suche nach geeigneten Bedingungen wieder, wobei zunächst der Übergang zu Toluol¹⁷⁴ als Lösungsmittel den Durchbruch bescherte, so dass das gewünschte Kupplungsprodukt **90** in geringfügiger Ausbeute isoliert werden konnte. Die zuvor schon erfolgreich genutzten FU-Bedingungen lassen sich gemäß der Literatur auch auf STILLE-Kupplungen an sterisch und elektronisch anspruchsvollen Substraten übertragen,¹⁷⁵ wodurch schließlich das Vinyl-Derivat **90** in einer Ausbeute von 36 % dargestellt werden konnte. Als Konkurrenzreaktion wurde Dehalogenierung beobachtet, wodurch es nötig war, die Reaktion nach 20 Stunden abzubrechen. Zusätzlich wurde 45 % des Edukts reisoliert. Mit Tributylethinylstannan gelang die Einführung von der synthetisch interessanten Alkinylfunktionalität nicht.



Schema 45: Stille-Kupplung an Bromid **66**. Bedingungen: a) siehe Tabelle 4; b) CDCl_3 , SiO_2 , 23 %.

Tabelle 4: Bedingungen für STILLE-Kupplung an Bromid **66** (Schema 42).

Stannan	Kat./Ligand	Solvens	Temp.	Zeit	Ergebnis
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{vinyl})$	$\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$	DMF	45 °C	6 h	Spuren im MS
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{vinyl})$	$\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{AsPh}_3$	DMF	65 °C	20 h	Spuren im MS
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{vinyl})$	$\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{AsPh}_3$	Toluol	85 °C	20 h	10 % 90
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{vinyl})$	$\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{PtBu}_3$	Toluol	110 °C	20 h	36 % 90 (45 % reisoliert)
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{ethinyl})$	$\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$	DMF	45 °C	6 h	nur Edukt
$\text{Bu}_3\text{Sn}(\text{ethinyl})$	$\text{Pd}_2\text{dba}_3/\text{PtBu}_3$	Toluol	110 °C	20 h	Edukt und dehalogeniert

¹⁷² erkennbar am Brom-Isotopenmuster im MS.

¹⁷³ a) J. K. Stille, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 504-519; b) J. K. Stille, B. L. Groh, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 813-817.

¹⁷⁴ a) M. E. Krolski, A. F. Renaldo, D. E. Rudisill, J. K. Stille, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1170-1176; b) D. E. Rudisill, J. K. Stille, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5856-5866.

¹⁷⁵ A. F. Littke, L. Schwarz, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6343-6348

Nach der spektroskopischen Untersuchung von 19-Vinyl-ansamitocin P-3 **90** wurde die in Deuteriochloroform gelöste Probe eingengt und über eine kurze Silicagel-Säule filtriert, wodurch bei der anschließenden HPLC-Reinigung eine Reihe von Zersetzungsprodukten nebst einer definierten neuen Verbindung erhalten wurde. Diese konnte nach erneuter umfassender NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Analyse als Chlorvinyl-Derivat **91** identifiziert werden (Schema 45).

Ursache für diese Substitutionsreaktion könnte die Verwendung einer einige Jahre alter CDCl_3 -Ampulle gewesen sein. Da dieses als Lösungsmittel für die Spektroskopie keinen Stabilisator enthielt,¹⁷⁶ könnte durch photochemische Zersetzung von Chloroform unter Sauerstoffeinwirkung Chlor gebildet worden sein (Abbildung 24).¹⁷⁷ Daneben ist unter diesen Bedingungen auch die Bildung von hypochloriger Säure bekannt.¹⁷⁸ Dadurch könnte eine elektrophile Substitution am Styrolsystem möglich sein, die durch den mesomeren Effekt des Methoxy-Substituenten über den in Abbildung 24 vorgeschlagenen Mechanismus vollzogen wird.

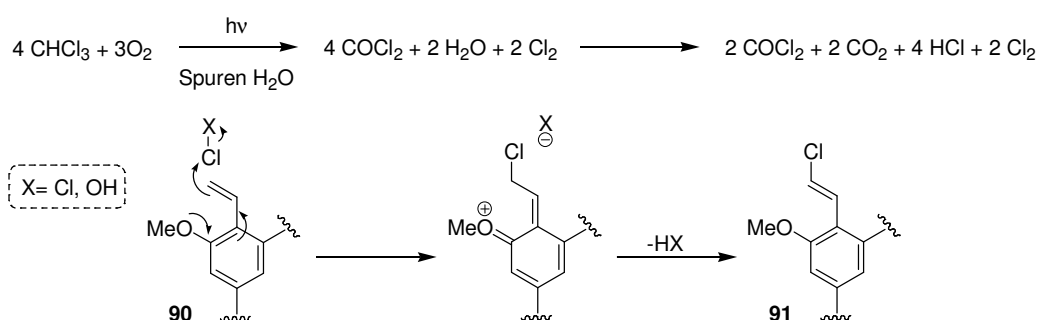


Abbildung 24: Möglicher Mechanismus für die Bildung von Chlorvinyl-Derivat **91**.

Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von HEASLEY *et al.* gestützt, in denen die Reaktion von Methylhypochlorit mit verschiedenen Olefinen untersucht wurde.¹⁷⁹ Dabei konnte bereits nach 5 min eine Chlorierung der β -Position von Styrol beobachtet werden. In den Studien von YAKABE *et al.* zur *vic*-Dichlorierung von Olefinen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.¹⁸⁰ Mit Natriumchlorit unter $\text{Mn}(\text{acac})_3$ -Katalyse wurden bei den Styrol-Substraten monosubstituierte 1-Chlor-2-phenylethen-Derivate erhalten. Interessanterweise war für diese Methode die Verwendung von Silica-Gel oder Aluminiumoxid essentiell, welche nach

¹⁷⁶ üblicherweise wird als Stabilisator Ethanol zugesetzt

¹⁷⁷ C. Bskerville, W. A. Hamor, *Ind. Eng. Chem.* **1912**, *4*, 278-288.

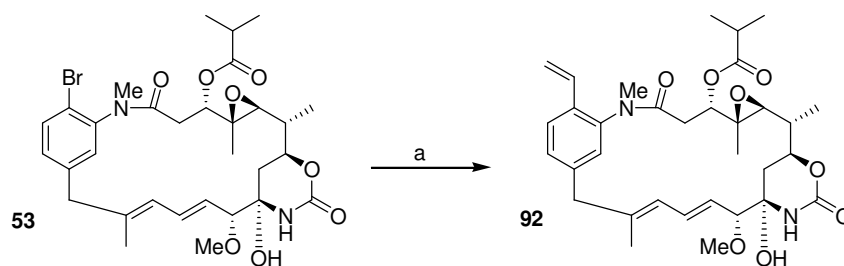
¹⁷⁸ D. G. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 32-40.

¹⁷⁹ V. L. Heasley, D. F. Shellhamer, R. K. Gipe, H. C. Wiese, M. L. Oakes, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4133-4136.

¹⁸⁰ S. Yakabe, M. Hirano, T. Morimoto, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1871-1878.

Behandlung mit einer geringen Menge Wasser als Katalysator für diese Reaktion wirkten. Ein ähnlicher Effekt könnte im vorliegenden Fall bei der Reinigung über Silicagel aufgetreten sein. Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses war nicht möglich.

Die Kupplung des Bromids **53** scheiterte unter FU-Bedingungen, allerdings konnte unter Standardbedingungen mit $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ das gewünschte Vinyl-Derivat **92** in einer ausgezeichneten Ausbeute von 95 % bereitgestellt werden (Schema 46).



Schema 46: STILLE-Reaktion mit Bromid **53**. Bedingungen: a) Tributylvinylstannan, $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$, Toluol, 110 °C, 95 %.

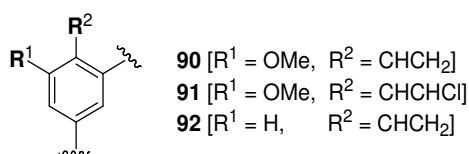
Mit der STILLE-Reaktion konnte somit ein eleganter Zugang zur Anbringung eines Substituenten am Aromaten von Ansamitocin erarbeitet werden, die im Fall von Bromid **53** fast quantitativ verläuft. Für das Methoxy-substituierte Bromid beläuft sich die Ausbeute auf 36 %, bzw. 65 % in Bezug auf reisoliertem Edukt, was noch weitere Optimierungsarbeiten erfordert.

4.3.2 Biologische Aktivitäten

Um sicherzustellen, dass die semisynthetischen Modifizierungen nicht zu einem Verlust der zytotoxischen Wirkung führen, musste zunächst die biologische Aktivität von an C-19 veränderten Derivaten geprüft werden. Neben einem ersten Zytotoxizitätstest an Mausfibroblasten wurden wiederum verschiedene humane Krebszelllinien getestet (Tabelle 5).

Tabelle 5: IC₅₀-Werte [nM] der semisynthetisch erzeugten Ansamitocine. Höhere Aktivitäten als die Referenz AP-3 sind markiert.

Ansamitocine:



Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), A-498 (Nierenkarzinom), A-549 (Lungenkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF7 (Brustadenokarzinom).

Eintrag 1: tierische Bindegebszellen, Einträge 2-9: humane Krebszelllinien.

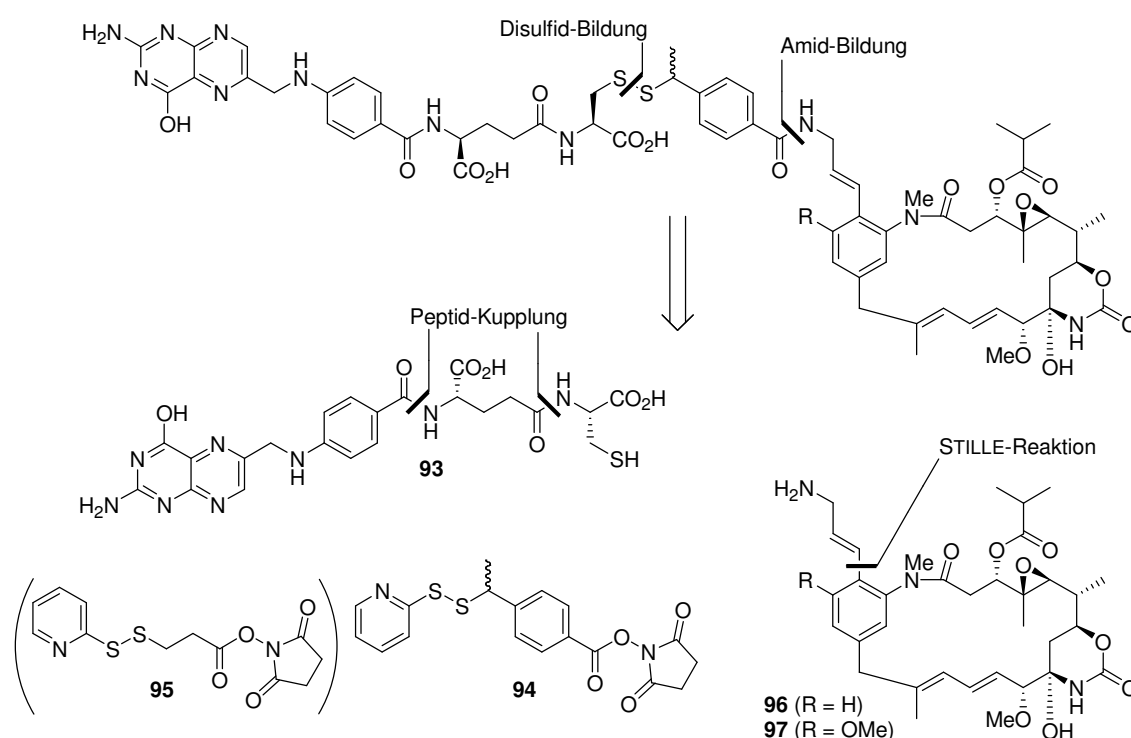
Zelllinie	AP-3	90	91	92
L-929	0.2	1.2	0.2	0.8
KB-3-1	0.17	0.11	0.15	0.67
U-937	0.006	0.061	0.015	0.084
A-431	0.08	0.18	0.04	0.07
A-498	1.7		0.7	3.0
A-549	0.16	0.21	0.08	0.23
SK-OV-3	0.047	0.080	0.045	0.067
PC-3	0.055	0.061	0.061	0.168
MCF7			0.024	

Aus den Zytotoxizitätstests ist ersichtlich, dass die Vinyl-Analoga weiterhin eine hohe antiproliferative Wirkung besitzen und dass mit dem Chlorvinyl-Ansamitocin **91** eine Verbindung dargestellt wurde, die sogar in fünf Krebszellinientests verbesserte Wirkung zeigt. Die Anwesenheit des Methoxysubstituenten an C-20 moduliert bei diesen Derivaten die Aktivität bezüglich verschiedener Zelllinien und ein elektronenziehender Substituent am Styrolsystem scheint vorteilhaft zu sein.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit C-19 sowohl aus chemisch-synthetischer als auch aus pharmazeutischer Sicht eine ideale Position zur Anheftung des Linkers gegeben ist, so dass nun mit der Synthese der Konjugate begonnen werden konnte.

4.3.3 Synthese der Ansamitocin-Folsäure-Konjugate

Aufgrund der in Kapitel 2.5 diskutierten Arbeiten von IMMUNOGEN INC. und ENDOCYTE wurde für die Synthese eines Tumor-gerichteten Ansamitocin-Derivats auf das Konzept des Folsäure-basierten Receptor-„targetings“ gesetzt. Da durch die semisynthetische Derivatisierung bereits eine Position und Möglichkeit zur schonenden Einführung eines Linkers gefunden wurde, konnte darauf aufbauend eine geeignete Syntheseroute erarbeitet werden (Schema 47).



Schema 47: Retrosynthetische Hauptschnitte ($R = H, OMe$)

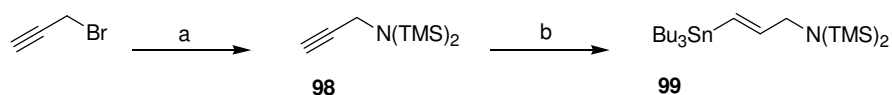
Die retrosynthetischen Hauptschnitte liefern das Folsäure-Derivat **93** mit freier Thiolfunktion, welches über Peptidsynthese aufgebaut werden sollte, einen bifunktionalen Linker **94** (oder **95**) und letztlich Allylamin **96** bzw. **97**, welches durch STILLE-Reaktion mit dem Brom-Ansamitocin **53** bzw. **66** synthetisiert werden sollte. Die Strategie zur Anbindung von Folsäure und Antikörpern an einen Wirkstoff über bifunktionale Linker ist weit verbreitet, so dass hier auf die käuflich erwerbbaaren Reagenzien¹⁸¹ SMPT **94** und SPDP **95** zurückgegriffen werden konnte. Dabei stellt Linker **94** ein durch das Arylsystem und die α -Verzweigung gehindertes Disulfid dar, welches den erzeugten Folsäure-Ansamitocin-Konjugaten eine höhere *in vivo* Stabilität garantieren sollte. Linker **95** hingegen liefert

¹⁸¹ PIERCE, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61105

Konjugate, die unter physiologischen Bedingungen schneller gespalten werden können. Die Reihenfolge der einzelnen Schritte der Synthesesequenz kann variabel gestaltet werden. Durch die Verwendung verschiedener Linker und Ansamitocine stellt sie einen flexiblen Zugang zu einer Reihe von Konjugaten sicher, wodurch erneut Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden können. Um ein erfolgreiches Rezeptor-„targeting“ und somit den gerichteten Transport der Konjugate nachweisen zu können, ist die Nutzung eines weiter entwickelten biologischen „Assays“ nötig, der neben der antiproliferativen Wirkung an Zelllinien auch einen *in vivo* Test mit tumoralen Xenotransplantaten¹⁸² in Empfängermäusen vorsieht. Diese Tests sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe MALEK an der MHH¹⁸³ erfolgen.

4.3.3.1 Synthese der Amino-Ansamitocine

Für die Einführung der Aminofunktion über eine STILLE-Reaktion konnten Arbeiten von MOREAU und Mitarbeitern herangezogen werden, in denen die Darstellung von Bissilyl-geschützten Aminostannanen und deren Einsatz in Kupplungen beschrieben ist.¹⁸⁴ Die nukleophile Substitution von LiHMDS an Propargylbromid in Diethylether lieferte das Bissilyl-geschützte Propargylamin **98**. Entgegen der Literatur verlief die Reaktion bei -20 °C nicht bis zum vollständigen Umsatz, weswegen neben dem Produkt als Hauptkomponente das durch Hydrolyse gebildete Hexamethyldisilazan erhalten wurde (Schema 48). Anschließend wurde durch radikalische Addition mit Tributylzinnhydrid und AIBN als Initiator das Allylstannan **99** generiert, welches nach Destillation als *E/Z*-Gemisch (10:1) vorlag. Auch nach wiederholter Destillation konnte das (*Z*)-Isomer nicht abgetrennt werden, so dass beschlossen wurde, das Gemisch in der Kupplung einzusetzen.



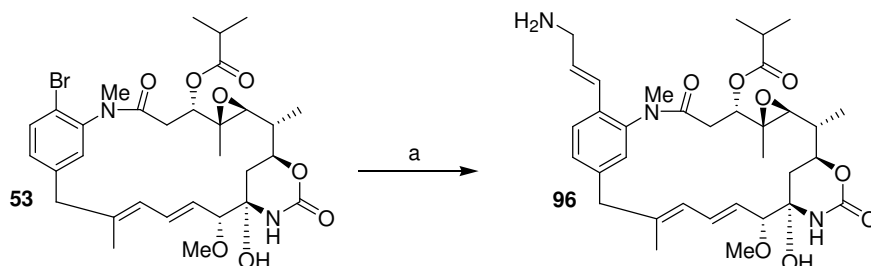
Schema 48: Synthese von Stannan **99**. Bedingungen: a) LiHMDS, Et₂O, -20 °C, 31%; b) Bu₃SnH, AIBN, 65 °C, 74 % (*E/Z* = 10:1).

¹⁸² Xenotransplantat = Heterotransplantat

¹⁸³ Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover

¹⁸⁴ a) R. J. P. Corriu, G. Bolin, J. J. E. Moreau, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, 130, 273-280; b) R. J. P. Corriu, V. Huynh, J. Iqbal, J. J. E. Moreau, C. Vernhet, *Tetrahedron* **1992**, 48, 6231-6244; c) R. J. P. Corriu, V. Huynh, J. J. E. Moreau, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1887-1890.

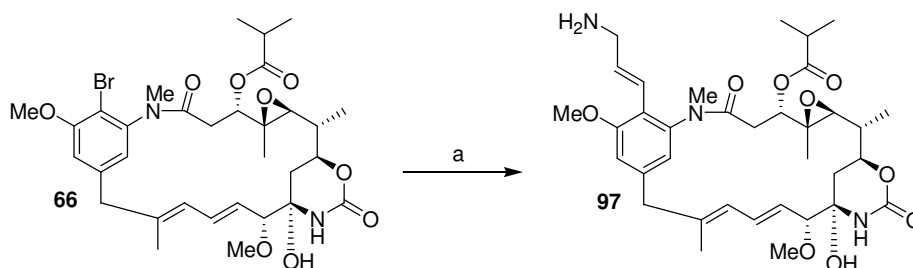
Die Stille-Reaktion mit den Brom-Ansamitocinen wurde unter den zuvor erarbeiteten Reaktionsbedingungen getestet. Die Kupplung mit Bromid **53** gelang in nahezu quantitativer Ausbeute zum gewünschten Amino-Derivat **96** (Schema 49).



Schema 49: Synthese von Amino-Ansamitocin **96**. Bedingungen: a) i. **99**, kat. Pd[PPh₃]₄, Toluol, 110 °C; ii. KF_{aq}, 92 %.

Die Silylschutzgruppen wurden nach Reaktionsende bei der Aufarbeitung mit wässriger KF-Lösung entfernt, so dass gleich das freie Amin erhalten wurde. Dieses ließ sich nur unter gepufferten Bedingungen (NH₄OAc) per HPLC reinigen. Ohne Einsatz von gepufferten mobilen Phasen konnte wegen der freien Aminofunktion keine klare Trennung erzielt werden. Das durch den Einsatz des Stannan-Gemisches gebildete (*Z*)-Isomer konnte auf diese Weise leicht abgetrennt, aufgrund der geringen Menge aber nicht spektroskopisch charakterisiert werden. Offensichtlich ist die Reaktivität des (*E*)-Stannans größer, und so konnte das gewünschte (*E*)-konfigurierte Amin **99** in einer Ausbeute von 92 % isoliert werden.

Die Kupplung des Methoxy-substituierten Bromids **66** wurde unter den ermittelten FU-Bedingungen durchgeführt und auch hier erwies sich das doppelt ortho-substituierte, elektronenreiche System als problematisch. Nach *in situ* Entschützung und HPLC-Reinigung konnte das Amino-Derivat **97** nur in einer Ausbeute von 28 % isoliert werden (Schema 50).



Schema 50: Synthese von Amino-Ansamitocin **97**. Bedingungen: a) i. **99**, kat. Pd[PtBu₃]₂, Toluol, 110 °C; ii. KF_{aq}, 28 %.

Zur Verbesserung der Ausbeute konnte der Einsatz von Additiven in Betracht gezogen werden. Der Zusatz von LiCl wirkt sich beschleunigend auf die Reaktionsgeschwindigkeit der

oxidativen Addition aus, während der Zusatz von CsF zu einer pentakoordinierten Zinnspezies führt, wodurch die Reaktivität für die Transmetallierung erhöht wird.¹⁸⁵ Die Nutzung solcher Additive wurde bereits erfolgreich bei der Synthese von Piericidin A und B gezeigt, wobei die STILLE-Kupplung an einer elektronenreichen benzyllischen Position erst durch Zugabe von LiCl unter FU-Bedingungen realisiert werden konnte.¹⁸⁶ Daher wurden diese Additive auch bei der vorliegenden Synthese erprobt; doch führten alle Variationen der Bedingungen (Solvens, Additiv, Katalysator) entweder zu Zersetzung oder zu keinerlei Reaktion.

Die Amino-Derivate wurden ebenfalls auf ihre antiproliferative Wirkung gegenüber verschiedenen Krebszelllinien an der MHH getestet.¹⁸⁷

4.3.3.2 Synthese des Folsäure-Derivats

Zur Synthese der geplanten Folsäure-Derivate mit freier Thiol-Funktion wurde in der Literatur eine vielversprechende festphasengebundene Syntheseroute gefunden,¹⁸⁸ die auf die von LEAMON *et al.* publizierte Peptidsynthese von Folsäure-Derivaten aufbaut.¹⁸⁹ Da das Substrat bis zum finalen Entschützungsschritt am WANG-Harz¹⁹⁰ gebunden ist, sind einfache Wasch- und Filtrationsschritte zur Produktreinigung und Isolierung möglich.

Das Ausgangsmaterial für die Folsäuresynthese war das käuflich erwerbbares Fmoc-L-Cys(S-Trt)-WANG-Harz¹⁹¹ **100**, welches nach einem Standardprotokoll zunächst zum Quellen gebracht wurde, wonach die Fmoc-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen mit Piperidin entfernt wurde (Schema 51). Anschließend erfolgte die erste Peptidkupplung mit Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu), wobei HOBt und PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytrispyrrolidinophosphoniumhexafluoroborat) als Kupplungsreagenzien eingesetzt wurden.

¹⁸⁵ P. Espinet, A. M. Echavarren, *Angew. Chem Int. Ed.* **2004**, *43*, 4704-4734.

¹⁸⁶ a) M. J. Schnermann, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15704-15705; b) M. J. Schnermann, F. A. Romero, I. Hwang, E. Nakamaru-Ogiso, T. Yagi, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11799-11807.

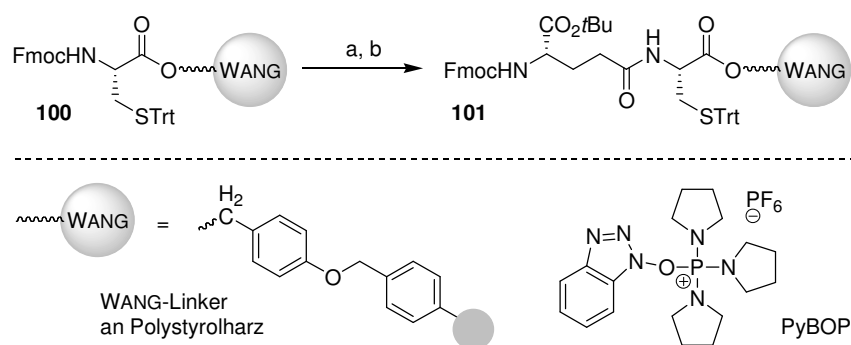
¹⁸⁷ siehe Kapitel 4.3.4

¹⁸⁸ Y. Zhang, L. Guo, R. W. Roeske, A. C. Antony, H. N. Jayaram, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 168-177.

¹⁸⁹ C. P. Leamon, R. B. DePrince, R. W. Hendren, *J. Grug Targeting* **1999**, *7*, 157-169.

¹⁹⁰ Merrifield-Harz (Polystyrol) mit (4-Hydroxymethylphenoxy)methyl-Linker, basenstabil und daher für den Einsatz in der Peptid-Synthese mit Fmoc-Strategie geeignet.

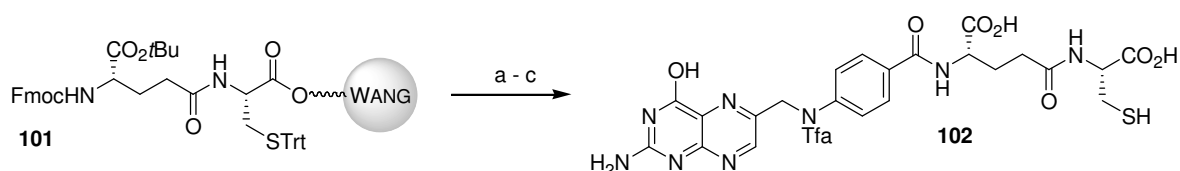
¹⁹¹ WANG bezeichnet im Folgenden Merrifield-Harz mit WANG-Linker.



Schema 51: Synthese von Dipeptid **101**. Bedingungen: a) Piperidin [20 % in NMP]; b) Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu), HOBt, PyBOP, DIEA, NMP.

Analog zur DCC-Kupplung wird zunächst aus der freien Säurefunktion von Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu) ein 1-*N*-Benzotriazolaktivester gebildet, der dann die Aminofunktion der am Harz gebundenen Aminosäure acyliert. Der Einsatz von PyBOP hat im Gegensatz zum auch geläufigen BOP (Benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino)phosphonium-hexafluoroborat) den Vorteil, dass als Fluchtgruppe der Esterbildung kein kanzerogenes HMPA entsteht. Diese Vorgehensweise ermöglichte die Darstellung von Dipeptid **101**, welches nicht analysiert, sondern direkt weiter umgesetzt wurde.

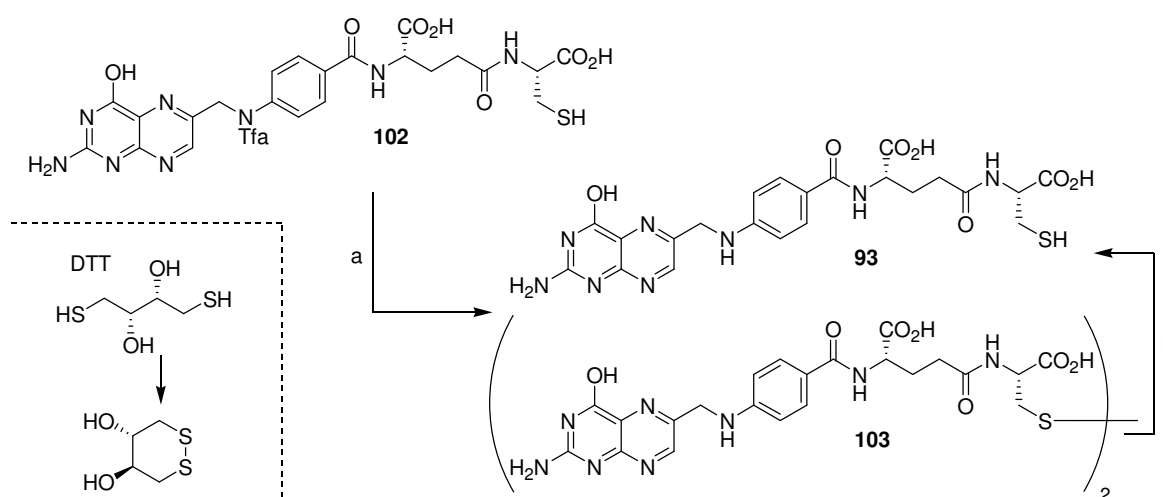
In Analogie zur ersten Kupplung wurde Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu)-L-Cys(S-Trt)-WANG **101** zunächst nach Quellen des Harzes in MMO mittels Piperidin entschützt und anschließend über HOBt/PyBOP-Aktivierung mit N¹⁰-Trifluoracetylpteroinsäure gekuppelt (Schema 52).



Schema 52: Zweite Peptidkupplung und Eintopf-Entschützung/Abspaltung. Bedingungen: a) Piperidin [20 % in NMP]; b) N¹⁰-Trifluoracetylpteroinsäure, HOBt, PyBOP, DIEA, NMP; c) TFA, Phenol, Wasser, HSCH₂CH₂SH, *i*Pr₃SiH, PhSMe, 90 % über 5 Stufen.

Der Einsatz von Tfa-geschützter Pteroinsäure war erforderlich, da nicht blockierte Pteroinsäure in organischen Lösungsmitteln schlecht löslich ist. Nach erfolgter Kupplung konnte das Pteroat-Dipeptid mit einem Gemisch aus TFA, Phenol, Wasser, Ethandithiol, Triisopropylsilan und Thioanisol in einem Schritt von der festen Phase abgespalten und von der *tert*-Butyl- und der Trityl-Schutzgruppe befreit werden. Nach Präzipitieren mit kaltem Ether und Abzentrifugieren konnte so N¹⁰-Tfa-geschütztes Pteroat-Dipeptid **102** in einer Ausbeute von 90 % über 5 Stufen erhalten werden. Die Identität wurde durch UPLC-MS nachgewiesen, wobei keine peptidischen Nebenprodukte detektiert wurden.

Die Entfernung der Tfa-Schutzgruppe erfolgte erst nach Abspaltung von der festen Phase, da die Arbeiten von ZHANG *et al.* zeigten,¹⁸⁸ dass dies zu einer reproduzierbaren Ausbeute von 37 - 38 % führt, wohingegen die ehemals publizierte Vorgehensweise¹⁸⁹ eine unvollständige Entschützung und Peptidspaltung zur Folge hat. Die Entschützung wurde mit wässrigem Piperidin bewirkt, wobei der Zusatz von DTT (DL-1,4-Dithiothreitol) unbedingt erforderlich war, um eine Dimerisierung von Pte-L-Glu-L-Cys **93** über Disulfidbildung zu verhindern (Schema 53).



Schema 53: Synthese von Folsäure-Derivat **93**. Bedingungen: a) Piperidin [1 % in Wasser], DTT, PBS, 38 % **93**; b) DTT, PBS, 80 %.

Die Bildung einer Disulfidgruppe kann schon durch Luftsauerstoff effektiv in wässrigem Medium ablaufen,¹⁹² so dass entgegen der Literatur¹⁸⁸ durch Reinigung über *reversed phase* HPLC auch ein geringer Anteil des Dimers **103** erhalten wurde. Monomeres Folsäure-Derivat konnte wieder durch reduktive Spaltung mit DTT in PBS erzeugt werden. Die Triebkraft dieser Reaktion ist der Entropiegewinn durch Bildung eines cyclischen Disulfids und zwei Thiolmolekülen (Schema 53).

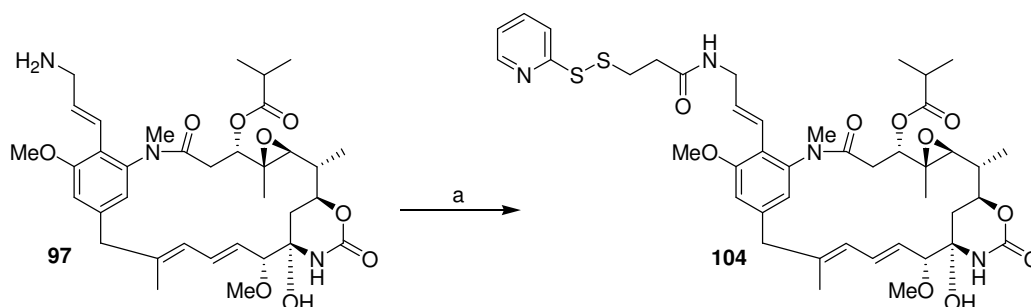
Die beschriebene Festphasenpeptidsynthese stellt einen schnellen und effektiven Zugang zu Folsäure-Derivat **93** dar, wobei nach Vorliegen des freien Thiols unbedingt auf Sauerstoffausschluss geachtet werden muss. Es sollte ständig ein Inertgasstrom durch Lösungen des ungeschützten Thiols geleitet werden, um die Dimerisierung zu unterbinden. Nicht wässrige mobile Phasen bei der HPLC-Reinigung könnten sich ebenfalls ausbeutesteigernd auswirken und sollten bei der Wiederholung dieser Synthese getestet werden.

¹⁹² D. Witt, *Synthesis* **2008**, *16*, 2491-2509.

4.3.3.3 Synthese der Konjugate

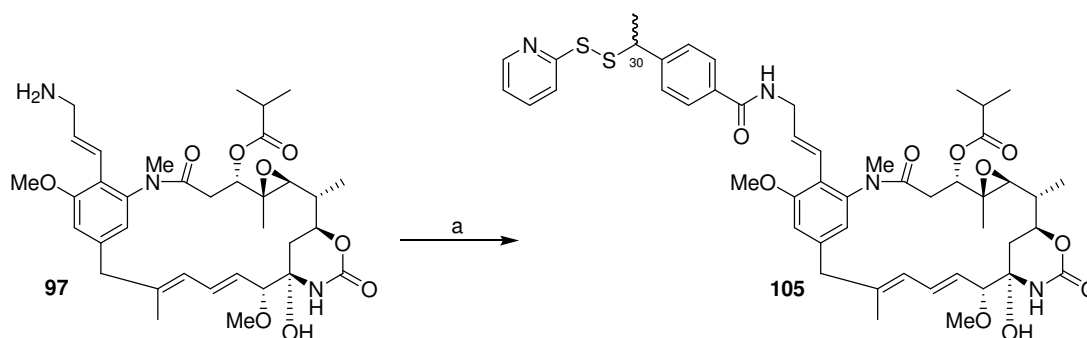
Mit der Bereitstellung der Fragmente konnte nun die Kupplung zu den Folsäure-Ansamitocin-Konjugaten begonnen werden. Die Synthese des Folsäure-Derivats **93** war aufgrund des Einkaufspreises der Pteroinsäure und des mit der Festphasensynthese verbundenen hohen Chemikalienverbrauchs kostenintensiver als die fermentative Darstellung der Ansamitocin-Derivate. Daher wurde beschlossen, den Linker zunächst über die primäre Aminofunktion der Ansamitocin-Derivate anzubringen. Als letzter, konvergenter Schritt sollte das Folsäure-Derivat durch Disulfid-Austauschreaktion gekuppelt werden, da diese Reaktion kompatibel mit allen anderen Funktionalitäten ist, so dass die Synthese der Konjugate schutzgruppenfrei vollendet werden kann.

Als Testsubstrat für die Linker-Anbindung sollte das Methoxy-substituierte Amino-Ansamitocin **97** dienen. Ein erster nur für UPLC-MS-Analytik ausgelegter Ansatz mit dem sterisch ungehinderten Reagenz SPDP **95** konnte massenspektrometrisch die Produktbildung belegen (Schema 54), so dass hierdurch auch die geeignete HPLC-Methode zur Reinigung entwickelt werden konnte.



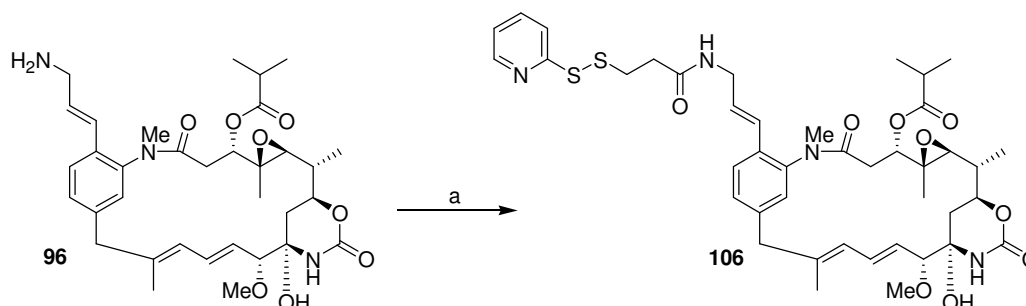
Schema 54: Testreaktion mit SPDP-Reagenz. Bedingungen: a) SPDP [20 mM in DMSO], PBS-EDTA, 4 °C → RT, nur MS.

Die Kupplung mit dem sterisch gehinderten Reagenz SMPT wurde zur Ausbeutebestimmung in größerem Maßstab durchgeführt, wobei die Reaktionsbedingungen entsprechend der Herstellerangabe¹⁸¹ angepasst wurde. Nach Aufarbeitung und HPLC-Reinigung konnte Disulfid-Ansamitocin **105** in einer Ausbeute von 24 % isoliert werden. So ließ sich das Disulfid **105** strukturanalytisch vollständig charakterisieren (Schema 55). Da der verwendete Linker in racemischer Form bezogen wurde, konnte im ¹³C-NMR-Spektrum Signaldopplung für C-30 beobachtet werden. Die Optimierung der Ausbeute konnte nicht mehr vorgenommen werden, da in Folge der nur in schlechten Ausbeuten ablaufenden STILLE-Kupplung kein Substrat mehr zu Verfügung stand.



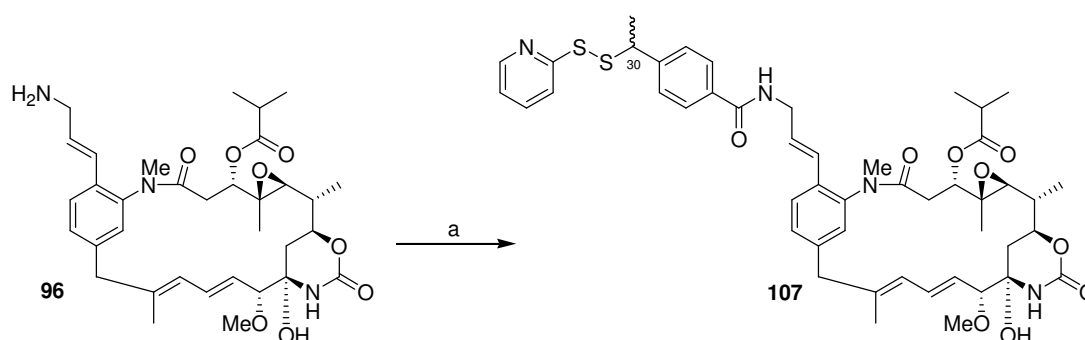
Schema 55: Kupplung mit SMPT-Reagenz. Bedingungen: a) SMPT [20 mM in MeCN], PBS, 4 °C → RT, 24 %.

Mit den ermittelten Bedingungen wurde nun die Kupplung an Desmethoxy-Derivat **96** getestet, welche mit SPDP-Reagenz in PBS-gepufferter wässriger Lösung (pH = 7.3) in guter Ausbeute ablief (Schema 56). Die Kontrolle des Reaktionsfortschrittes per UPLC-MS war bei diesen Kupplungen unbedingt erforderlich, da schon leichte Variationen des pH-Wertes zu wesentlich veränderten Reaktionszeiten führten.



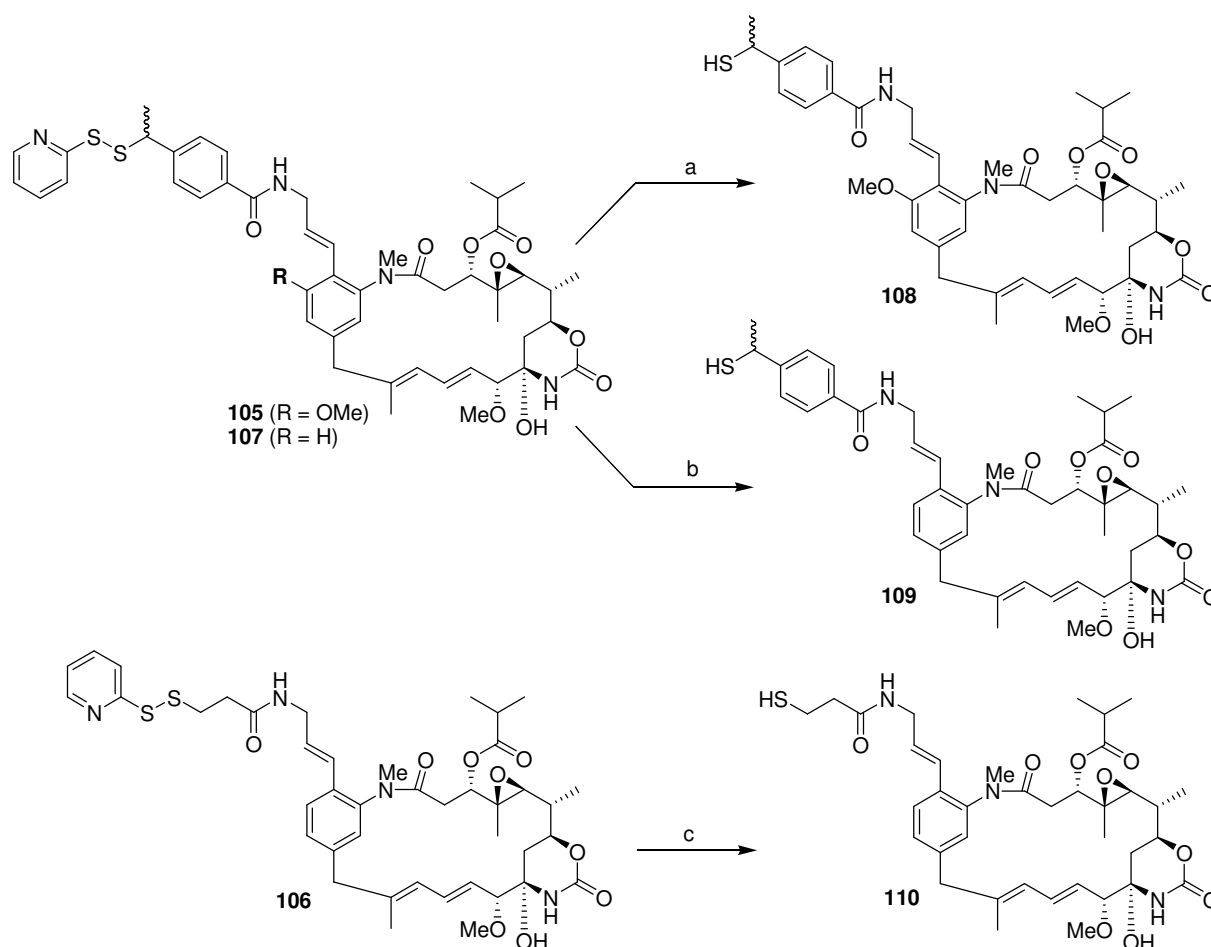
Schema 56: Kupplung mit SPDP-Reagenz. Bedingungen: a) SPDP [20 mM in MeCN], PBS, 4 °C → RT, 79 %.

Die Kupplung mit dem sterisch gehinderten SMPT-Reagenz verlief ebenfalls in sehr guter Ausbeute von 87 %, wobei aus den bereits genannten Gründen im ¹³C-NMR-Spektrum ebenfalls Signaldopplung für C-30 auftrat (Schema 57).



Schema 57: Kupplung mit SMPT-Reagenz. Bedingungen: a) SMPT [20 mM in MeCN], PBS, 4 °C → RT, 87 %.

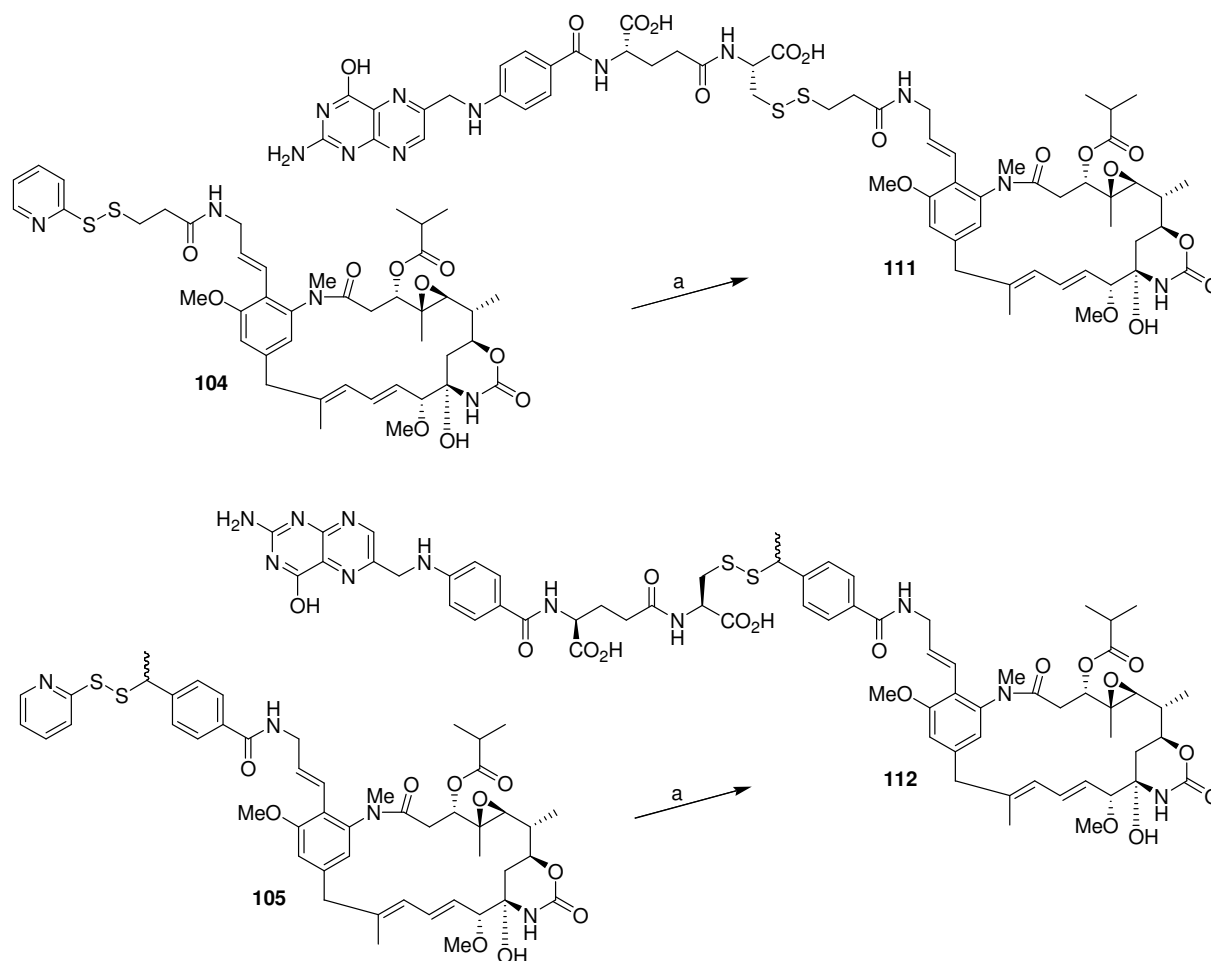
Die synthetisierten Disulfide sollten nun mittels Disulfid-Austauschreaktion zu den finalen Folsäure-Ansamitocin-Konjugaten gekuppelt werden. Diese können über Folsäurerezeptor-„targeting“ durch Endozytose in die Tumorzellen aufgenommen werden und dort nach Endosom-vermittelter Reduktion die freien Thiol-Derivate als Zytotoxine freisetzen (siehe Kapitel 2.5). Mit den aktivierten Disulfiden **105** – **107** lagen optimale Substrate zur Herstellung dieser aktiven Mercapto-Ansamitocine vor, die auf ihre biologische Wirkung getestet werden sollten. Da die Bestätigung der zytotoxischen Wirkung für das verfolgte Konzept essentiell ist, wurde beschlossen, die begrenzte Menge an Methoxy-substituierter Verbindung **105** in dieser Reaktion und nicht zur Herstellung des Folsäure-Konjugats einzusetzen. Die reduktive Disulfidspaltung mit DTT konnte an allen drei Substraten in quantitativer Ausbeute vollzogen werden, so dass die Mercapto-Derivate für die Evaluierung ihrer zytotoxischen Wirkung bereitstanden (Schema 58).



Schema 58: Synthese der Mercapto-Derivate. Bedingungen: a) **105**, DTT, MeCN/PBS, quant.; b) **107**, DTT, MeCN/PBS, quant.; c) DTT, MeCN/PBS, quant.

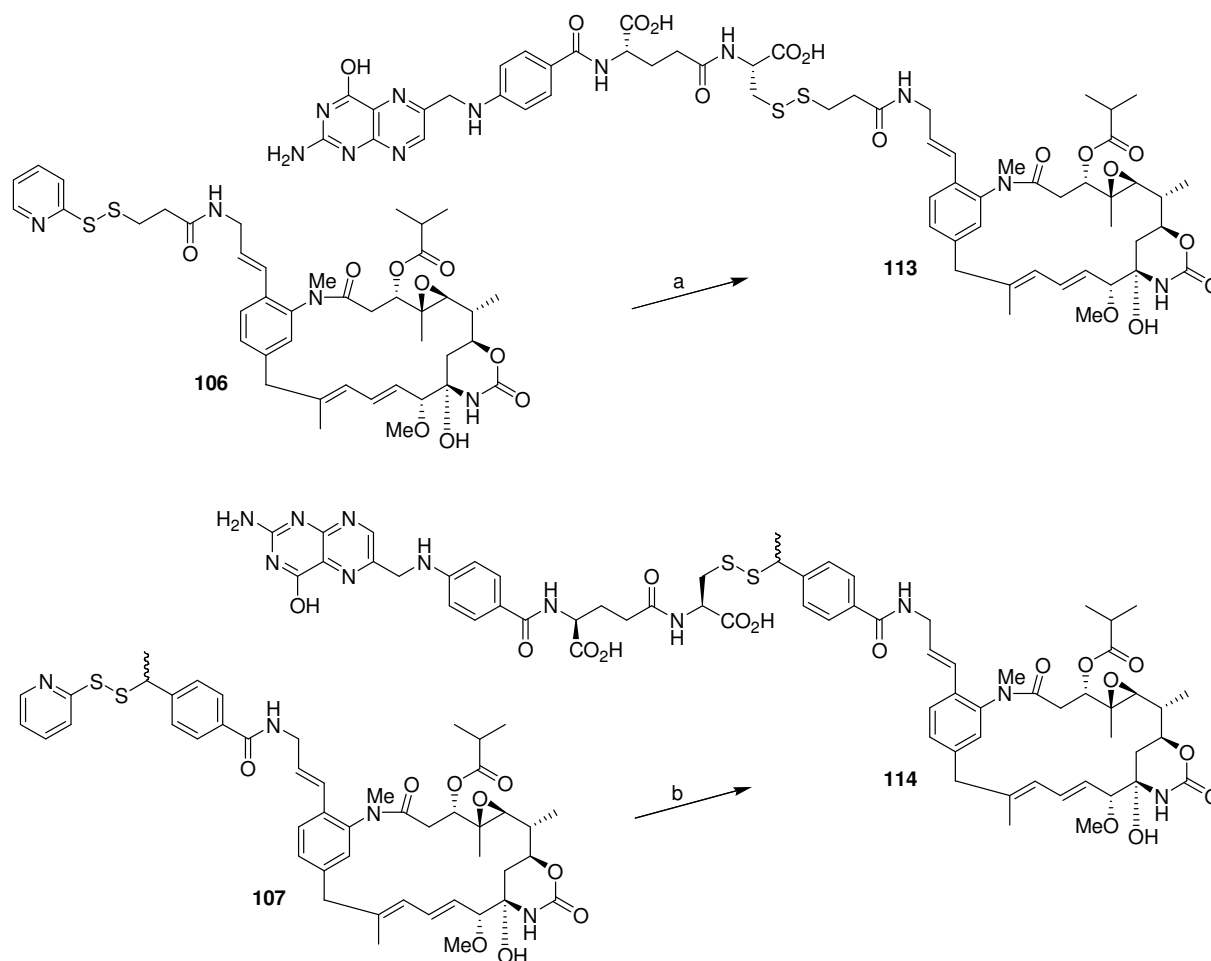
Die finale Konjugation der aktivierten Disulfid-Ansamitocine mit Folsäure sollte über eine Disulfid-Austauschreaktion verlaufen. Die nötige Triebkraft bezieht diese Reaktion aus dem als Abgangsgruppe gebildeten Pyridin-2-thion, wodurch diese Methode zu den weit verbreitetsten für die Bildung von unsymmetrischen Disulfiden gehört.¹⁹²

Diese Reaktion sollte zunächst in einem nur für UPLC-MS-Analytik ausgelegten Ansatz getestet werden, wofür geringe Mengen der Methoxy-substituierten Disulfide **104** und **105** aus vorherigen Testansätzen zur Verfügung standen. Als Kupplungspartner wurde in DMSO gelöstes Folsäure-Derivat **93** verwendet, welches nach der NMR-spektroskopischen Analyse bereitstand. Obwohl in beiden Fällen langsam massenspektroskopisch die Bildung der Konjugate belegt werden konnte, stellte sich diese Reaktionsführung als ungeeignet heraus, da als Nebenreaktion auch die Dimerisierungsprodukte detektiert werden konnten (Schema 59).



Schema 59: Testreaktionen zu Konjugaten **111** und **112**. Bedingungen: a) Pte-L-Glu-L-Cys [5 mM in DMSO], MeCN/PBS, 4 °C → RT, nur MS.

Daher wurde die Kupplung der Ansamitocin-Derivate **106** und **107** in Anlehnung an die Vorschrift von ZHANG *et al.* durchgeführt,¹⁸⁸ wobei Folsäure **93** in Wasser suspendiert und gleichzeitig Inertgas durch die Suspension geleitet wurde, um die Dimerisierung zu unterbinden. Anschließend wurde mit NaHCO₃-Lösung auf pH = 7 eingestellt und das jeweilige Ansamitocin-Derivat als Lösung in Acetonitril zugetropft. Der Reaktionsfortschritt konnte über UPLC-MS verfolgt werden, wobei diese Bedingungen zu einer schnellen Bildung der Konjugate führten (Schema 60).



Schema 60: Synthese der Folsäure-Derivate **113** und **114**. Bedingungen: a) Pte-L-Glu-L-Cys, Wasser, NaHCO₃-Lösung [0.1 M], **106**, MeCN, 4 °C → RT, 76 %; b) Pte-L-Glu-L-Cys, Wasser, NaHCO₃-Lösung [0.1 M], **107**, MeCN, 4 °C → RT, 54 %.

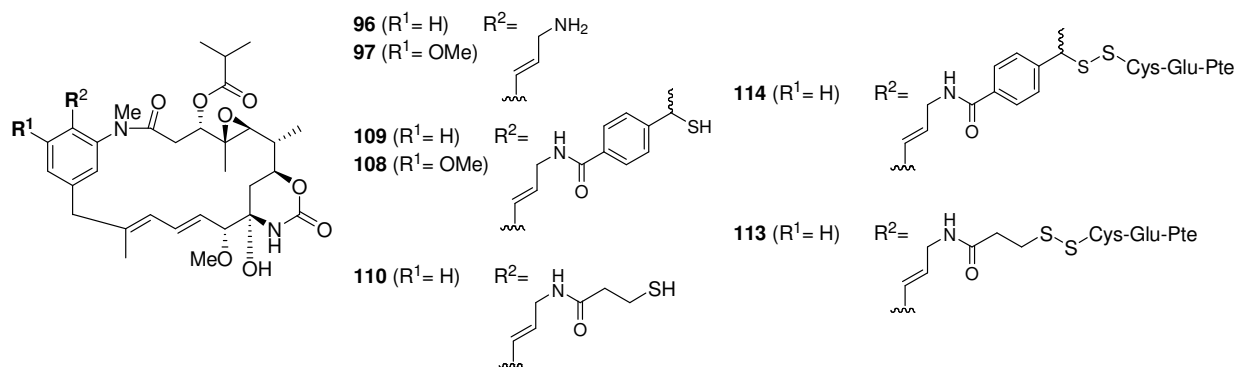
Nach HPLC-Reinigung konnten die mit Folsäure fusionierten Ansamitocine in einer reproduzierbar guten Ausbeute von 54 % bzw. 76 % isoliert werden. Nach vollständiger NMR-spektroskopischer Analyse wurden die Konjugate rechromatographiert, wodurch eine Reinheit von > 95 % nachgewiesen werden konnte.

Durch die erfolgreiche Synthese der Folsäure-Ansamitocin-Konjugate **113** und **114** ist es gelungen, einen neuartigen, über Mutasyntese initiierten Zugang zu solchen Tumorspezifisch etikettierten Wirkstoffen zu entwickeln.

4.3.3 Biologische Aktivitäten

Die Bestimmung der antiproliferativen Aktivitäten der Folsäure-Konjugate an der MHH war zum Zeitpunkt der Zusammenschrift noch nicht abgeschlossen. Erste Resultate konnten allerdings schon erzielt werden, die in Tabelle 6 zusammengefasst sind.

Tabelle 6: IC₅₀-Werte [nM] der semisynthetisch erzeugten Ansamitocine.



Zelllinien: SW-480 (Kolonkarzinom), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), A-549 (Lungenkarzinom).

Eintrag 1: FR-positiv, Folsäure-freies Zellkulturmedium; Eintrag 2: FR-positiv, Folsäure-haltiges Zellkulturmedium; Eintrag 3: FR-negativ.

Zelllinie	AP-3	96	97	108	109	110	113	114
KB-3-1	0.2	6	15	4	4	14	21	13
SW-480		13	15	6	5	42	199	188
A-549	0.2	14	61	24	6	420	>8000	>8000

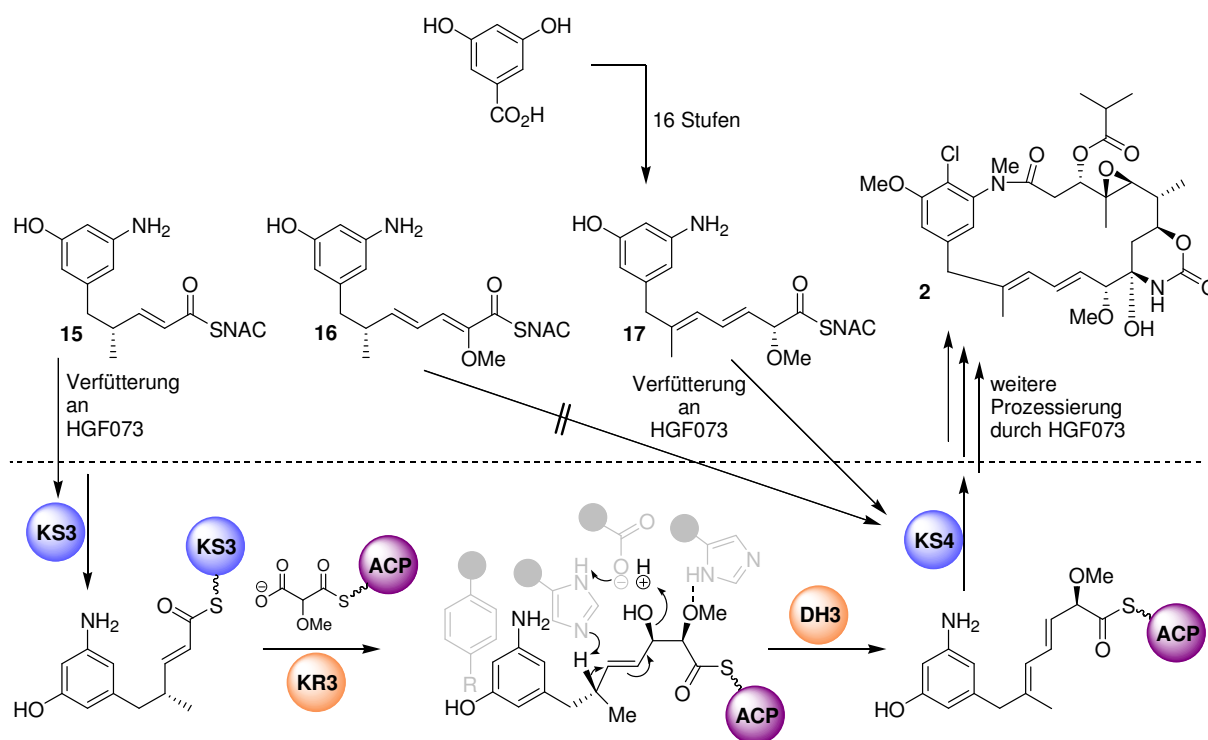
Aus den Zytotoxizitätstests ist ersichtlich, dass die in der Zelle freizusetzenden Toxine **96**, **97** und **108** - **110** gegenüber den bisher getesteten Krebszelllinien antiproliferative Wirkungen im nanomolaren Bereich aufweisen, und somit nur leicht geringere Aktivitäten besitzen als die Referenz AP-3. Die Folsäure-fusionierten Ansamitocine **113** und **114** zeigen gegenüber der FR-positiven¹⁹³ KB-3-1-Zelllinie eine vergleichbar hohe Zytotoxizität (Eintrag 1). Bei Verwendung von Folsäure-haltigem Zellkulturmedium (Eintrag 2) steigen die IC₅₀-Werte der Folsäurekonjugate, da die im Überschuss vorliegende Folsäure als Kompetitor wirkt, und so die Aufnahme der Konjugate **113** und **114** einschränkt. Bei Behandlung von FR-negativen A-549-Zellen mit den Konjugaten **113** und **114** ist keinerlei zytotoxische Wirkung festzustellen (Eintrag 3), wodurch diese ersten Resultate zeigen, dass für die Folsäure-Ansamitocin-Verbindungen eine beachtliche Selektivitätssteigerung erzielt wurde.

¹⁹³ FR-positiv: >6 pmol FR/mg Protein; FR-negativ: <2.5 pmol FR/mg Protein: N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284-293.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die stereoselektive Synthese des als SNAC-Thioester aktivierten Tetraketids **17** erarbeitet werden. Die durchgeführten Komplementierungsexperimente mit der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins blockierten Mutante HGF073 konnten für das PKS-gebundene Triketid die vorgeschlagene (*R*)-Konfiguration bestätigen. Weiterhin konnte durch Verfütterung beider isomerer Tetraketide eindeutig belegt werden, dass das ungewöhnlich positionierte $\Delta^{11,13}$ -Diensystem auf Modul 3 der asmPKS installiert wird. Da von KS4 nur ein umgelagertes Tetraketid als Substrat akzeptiert wird, kann daraus eine hohe Substratspezifität dieser Ketosynthase abgeleitet werden. Unter Zuhilfenahme von Sequenzvergleich wurde für den Mechanismus der Doppelbindungswanderung eine vinyloge *syn*-Dehydratisierung vorgeschlagen. Die von DH3 katalysierte Dehydratisierung stellt somit den Zeitpunkt der Doppelbindungswanderung während der Ansamitocin-Biosynthese dar, womit der letzte, biosynthetisch ungewisse Aspekt in *Actinosynnema pretiosum* aufgeklärt wurde (Schema 61).



Schema 61: Ergebnisse der Komplementierungsexperimente mit synthetisierten Ketiden und daraus abgeleiteter mechanistischer Vorschlag zur Doppelbindungswanderung (beteiligte Aminosäuren der DH3 sind in grau dargestellt)

Der zweite Abschnitt dieses Projektes eröffnete den Zugang zu sieben neuen Ansamitocin-Derivaten über einen mutasynthetischen Ansatz. Diese wurden vollständig charakterisiert und ihre antiproliferative Wirkungen bestimmt. Durch Verwendung einer kontinuierlichen Substratzugabe konnte eine bedeutende Ausbeutesteigerung der Mutasyntheseprodukte bewirkt werden. Die aus diesen Derivaten abgeleiteten SAR-Studien ließen für die Substituenten am aromatischen System einen leicht modulierenden Einfluss erkennen, wobei mit dem unsubstituierten Derivat **74** eine Aktivitätssteigerung gegenüber KB-3-1 Zellen¹⁹⁴ auf das Vierfache erreicht wurde. Der Bromsubstituent an C-19 führte ebenfalls zu einzelnen Aktivitätssteigerungen.

Weiterhin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass gezielt mutasynthetisch eingeführte Funktionalitäten für weitere semisynthetische Modifizierungen genutzt werden können. Die STILLE-Kupplung wurde für Kupplungen an den Brom-Ansamitocinen **53** und **66** etabliert, wodurch fünf weitere Derivate präparativ dargestellt werden konnten. Dieser Zugang ermöglichte weitergehende SAR-Studien, wobei mit dem Chlorvinyl-Derivat eine in fünf Krebszelllinien aktivere Verbindung gefunden wurde. Abbildung 25 fasst die durch Muta- und Semisynthese bis dato neu ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen zusammen.

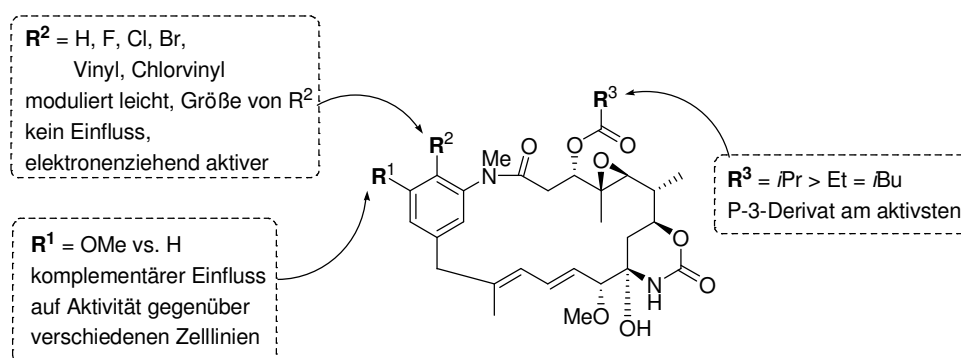
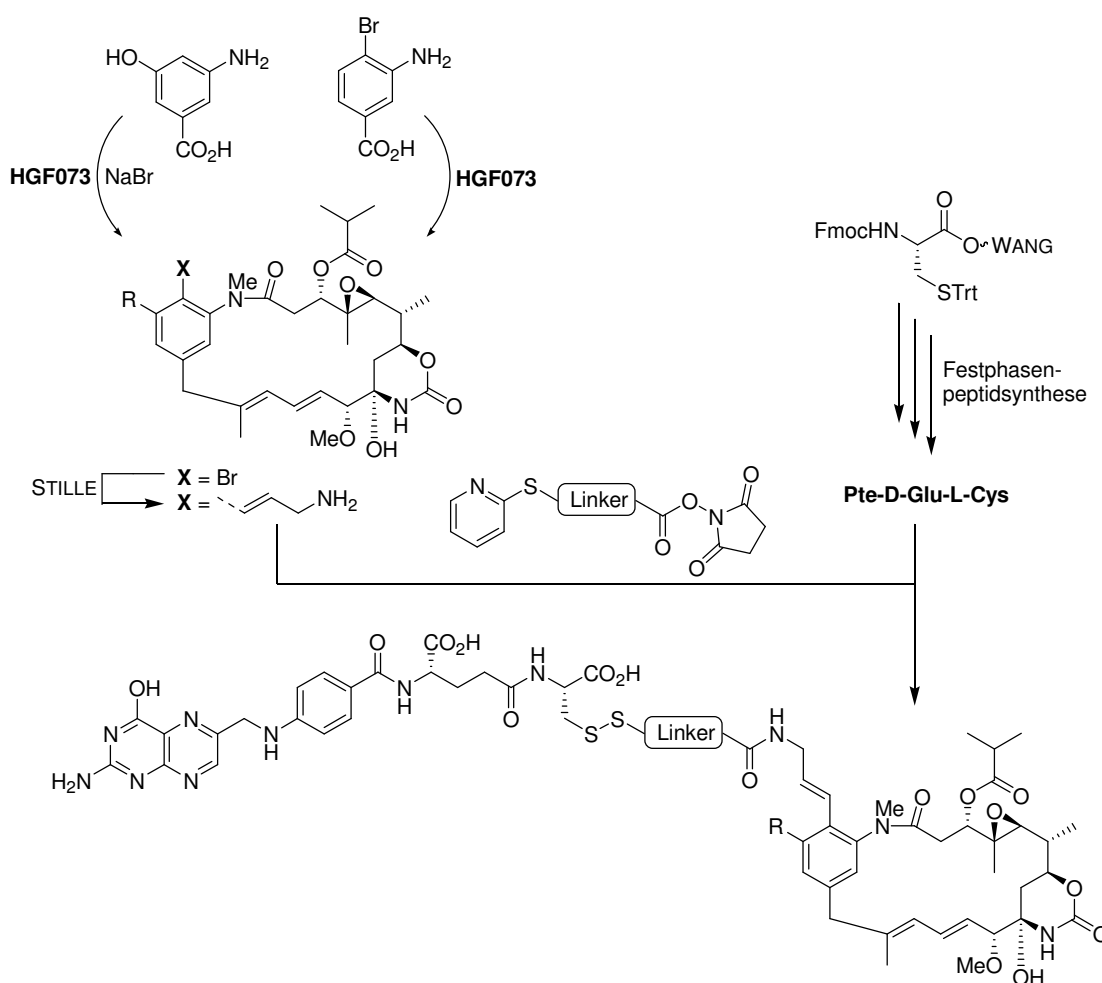


Abbildung 25: Ermittelte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Darüber hinaus konnte durch die mutasynthetischen Experimente eine breite Substratflexibilität der beteiligten Enzyme ermittelt werden, was durch die erfolgreiche *in vivo* Transformierung von *seco*-Proansamitocin-Derivat **78** durch HGF073 zusätzlich untermauert werden konnte. Dies lässt auch den Schluss zu, dass die Amidsynthase *Asm9* nicht nur PKS-gebundene *seco*-Proansamitocine als Substrat erkennt, so dass die heterologe Expression dieses Enzyms eine Nutzung für Makrolactamierungen *in vitro* in Aussicht stellt.

¹⁹⁴ Gebärmutterhalskarzinom

Das Konzept der „Muta-Semisynthese“ konnte zusätzlich erfolgreich zur Synthese von zwei neuartigen Ansamitocin-Folsäure-Konjugaten genutzt werden (Schema 62). Die Anbindung eines Tumor-spezifischen Liganden über den Aromaten von Ansamitocin war zuvor nicht bekannt, wobei die biologische Bewertung der Syntheseintermediate eine gute Akzeptanz für Modifizierungen in diesem Bereich offenbarte. Ausgehend von Brom-Ansamitocin **53** gelang die Synthese der Konjugate **113** und **114** in Ausbeuten von 49 % bzw. 43 %, für die sowohl durch NMR-Analytik als auch über Rechromatographie eine Reinheit von > 95 % bestätigt werden konnte.



Schema 62: Syntheseweg zu den Folsäure-Ansamitocin-Konjugaten ($R = H, OMe$)

Die biologische Bewertung dieser Tumor-spezifisch etikettierten Ansamitocine war zum Zeitpunkt der Zusammenschrift noch nicht abgeschlossen, doch bestätigten die ersten Testergebnisse ausgeprägte Selektivitäten der Folsäure-fusionierten Ansamitocine **113** und **114** gegenüber Folsäurerezeptor überexprimierenden Krebszelllinien.

5.2 Ausblick

Aufbauend auf den erfolgreichen Mutasyntheseexperimenten mit *mC*₇N-basierten Mutasynthongen könnten zukünftig weitere AHBA-Analoga synthetisiert und verfüttert werden. Hierbei sollte ein Schwerpunkt auf semisynthetisch erreichbare Funktionalitäten (Br, I, NH₂, Vinyl, Ethinyl, Azido) gelegt werden, wodurch weitere Derivatisierungsmöglichkeiten bestehen sollten. Die Verfütterung von homologisierten Vorläufern (Abbildung 26) stellt ebenfalls einen äußerst interessanten Aspekt dar, weil diese bei Akzeptanz zu 20-gliedrigen Ansamitocin-Derivaten führen sollten.

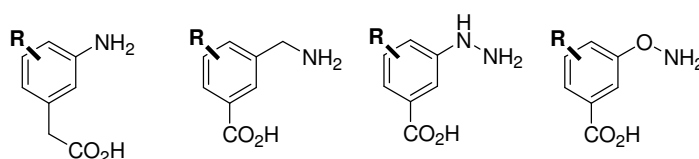


Abbildung 26: homologe AHBA-Analoga, die zur Bildung eines 20-gliedrigen Makrolactams führen können ($R = H, OH, OMe, Hal$)

Die Verfütterung von Heteroaromat-basierten Mutasynthongen könnte in Hinblick auf SAR-Studien wertvolle Einsichten geben. Dabei bieten sich vor allem Pyridin-Analoga¹⁹⁵ und substituierte Fünfring-Aromaten wie Furane, Thiophene oder Pyrrole an.

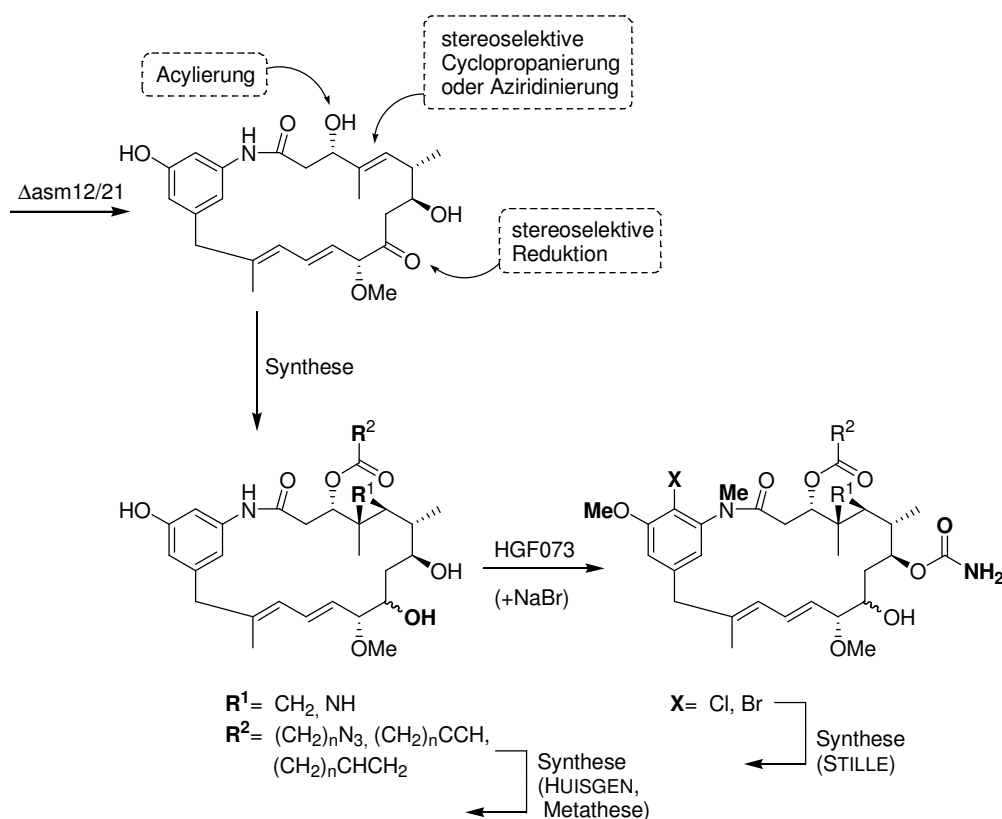
Weitere Diversität in der Klasse der Ansamitocine könnte durch Verwendung anderer Mutanten von *A. pretiosum* realisiert werden (siehe Kapitel 4.2.3). Dabei besitzt die Doppelblockmutante $\Delta asm12/21$ ein besonderes Potenzial. Deren Fermentationsprodukt Proansamitocin **8** könnte zunächst semisynthetisch modifiziert werden. Geeignete Reaktionen wären beispielsweise Acylierungen an 3-OH, eine Hydroxy-gelenkte Cyclopropanierung¹⁹⁶ oder Aziridinierung¹⁹⁷ der Δ^4 -Doppelbindung, sowie die stereoselektive Reduktion der Carbonylfunktion an C-9. Anschließend könnten die für die biologische Aktivität erforderlichen Funktionalitäten mutasynthetisch durch Verfütterung an *A. pretiosum* HGF073 eingeführt werden (Schema 63). Dieses „Ping-Pong-Prinzip“ könnte durch Fermentation unter

¹⁹⁵ SIMONE EICHNER konnte bereits die Akzeptanz von 5-Amino-Nikotinsäure durch die in der AHBA-Biosynthese geblockten Mutante des Geldanamycin-Produzenten nachweisen.

¹⁹⁶ a) J. D. White, W. H. C. Martin, C. Lincoln, J. Yang, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3481-3483; b) M. Lautens, P. H. M. Delanghe, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 798-800; c) T. Tei, T. Sugimura, T. Katagiri, A. Tai, T. Okuyama, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2727-2730.

¹⁹⁷ a) N. A. J. M. Sommerdijk, P. J. J. A. Buynsters, H. Akdemir, D. G. Geurts, J. M. R. Nolte, B. Zwanenburg, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4955-4960; b) H. M. I. Osborn, J. Sweeney, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1693-1715.

Natriumbromid-Bedingungen eine weitere Position für Derivatisierungen erhalten (siehe Kapitel 4.2.2).



Schema 63: Möglichkeiten zur Derivatisierung mit enzymatischen und synthetischen Transformationen („Ping-Pong-Prinzip“).

Die daraus ableitbaren Struktur-Wirkungs-Beziehungen würden einen tieferen Einblick in die strukturellen Voraussetzungen für die biologische Aktivität der Ansamitocine erlauben.

Die synthetisierten Mutasyntone können weiterhin bei Fermentationen mit Mutanten anderer Bakterienstämme eingesetzt werden. In der Arbeitsgruppe KIRSCHNING existiert neben der zuvor schon erwähnten AHBA-Blockmutante des Geldanamycin-Produzenten auch eine AHBA-Blockmutante des Rifamycin-Produzenten. Fermentationsprodukte eines Produzenten könnten wiederum als Substrat für die post-PKS-Enzyme eines anderen Produzenten dienen, wobei mit Proansamitocin eine auch für dieses Projekt interessante Verbindung vorliegt.

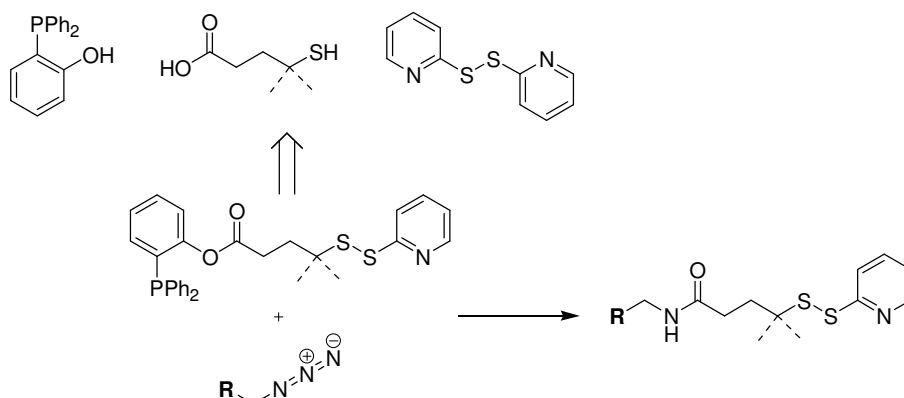
Wie schon in Kapitel 2.1 diskutiert, besitzen diese Ansamycine völlig unterschiedliche biologische Aktivitäten und damit auch Wirkmechanismen. Eine Kombination aus Fermentation und Synthese mit anschließender Aktivitätsuntersuchung könnte unter Zuhilfenahme von Molekülmodellrechnungen (*molecular modelling*) die Ursachen für eine

spezifische Wirkung ausfindig machen, wodurch die Generierung von hybriden Wirkstoffen möglich wäre, beispielsweise Hsp90 inhibierende Ansamitocine.

Auf der Grundlage der erarbeiteten Synthese von Ansamitocin-Folsäure-Konjugaten ist die Generierung von Substanz-Bibliotheken für *in vivo* Aktivitätsstudien möglich. Die variable Synthesestrategie (siehe Schema 62) sollte weitreichende Variationen der Ansamitocine (mutasynthetisch erzeugt), des Linkers (sterische Hinderung, Länge) und der Folsäuregruppierung zulassen. Letztere könnte durch zusätzliche Aminosäuren (Arginin) eine erhöhte Wasserlöslichkeit der Konjugate bewirken.¹⁹⁸

Eine bedeutende Aufwertung würde die vorgestellte Syntheseroute durch eine Optimierung der Kupplung von Brom-Ansamitocin **66** erfahren, da dieses Derivat in denselben Fermentationsausbeuten wie AP-3 zugänglich ist und somit einen idealen Vorläufer darstellt. Neben einer systematischen Untersuchung von Katalysatoren und Additiven für STILLE-Kupplungen sollten auch andere Übergangsmetall-katalysierte Reaktionen (beispielsweise SONOGASHIRA-Kupplung) erprobt werden.¹⁹⁹

Alternativ könnten mutasynthetisch eingeführte Azido- oder Ethinyl-Funktionalitäten für eine HUISGEN-Zyklisierung („Click-Chemie“ nach SHARPLESS)²⁰⁰ oder eine STAUDINGER-Ligation²⁰¹ zum Anbringen des Linkers genutzt werden, welches ihrerseits sehr selektive Transformationen darstellen, die auch ohne Schutzgruppenmanipulation auskommen (Schema 64).



Schema 64: STAUDINGER-Ligation als alternative Linker-Kupplung ($R = \text{Ansamitocin-Derivat}$)

¹⁹⁸ J. A. Reddy, E. Westrick, H. K. R. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzel, I. Vlahov, R. V. J. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6376-6382.

¹⁹⁹ Optimierungsversuche sind zur Zeit Gegenstand der Diplomarbeit von SONIA MAYER

²⁰⁰ a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599;

b) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021; c) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.

²⁰¹ a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010; E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143; c) H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.

Anstelle von Folsäure-Derivaten sollten auch andere Rezeptor-spezifische Liganden mit den Ansamitocinen über die erarbeitete Synthese fusioniert werden können. Dies würde eine Behandlung anderer Tumore ermöglichen, die über das FR-„targeting“ nicht erreichbar sind. Das Somatostatin-Analoga Octreotid **115** (Sandostatin®) beispielsweise ist ein Peptid aus acht Aminosäuren, welches eine Affinität im subnanomolaren Bereich gegenüber dem Somatostatinrezeptor besitzt. Eine Anwendung als Therapeutikum oder zur Szintigrafie²⁰² bei GEP-NET²⁰³ ist zugelassen. Aufgrund der eher seltenen Fälle von GEP-NETs, ist die Entwicklung effektiver Therapeutika wenig vorangeschritten,²⁰⁴ so dass die Synthese von Somatostatin-Analoga-fusionierten Ansamitocinen einen wertvollen Beitrag auf diesem Gebiet leisten könnte (Abbildung 27).

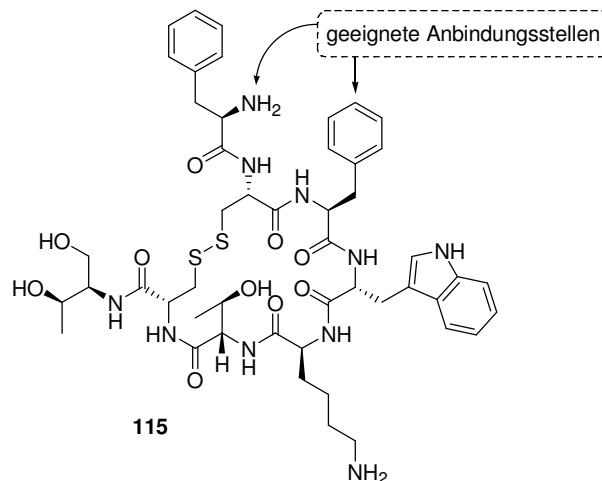


Abbildung 27: Octreotid **115** und geeignete Anbindungsstellen nach KWEKKEBOOM²⁰⁵ und BREEMAN.²⁰⁶

Als weiteres Ziel für den spezifischen Wirkstofftransport könnten Integrine genutzt werden, welches Oberflächenrezeptoren sind, deren Subtyp $\alpha_v\beta_3$ eine wichtige Rolle bei der tumorinduzierten Angiogenese darstellt. Ein zentrales Erkennungsmotiv für Integrin-Antagonisten stellt die RGD-Sequenz²⁰⁷ dar, welche zu sehr selektiver Bindung an verschiedene Integrin-Subtypen führt. Durch Synthese von RGD-basierten Bibliotheken konnte durch KESSLER ein gutes Verständnis in die strukturellen Erfordernisse solcher RGD-

²⁰² Bildgebendes Verfahren in der nuklearmedizinischen Diagnostik, nutzt ¹¹¹In oder ⁶⁸Ga als Radioisotope

²⁰³ Gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumor

²⁰⁴ I. M. Modlin, K. Oberg, D. C. Chung, R. T. Jensen, W. W. de Herder, R. V. Thakker, M. Caplin, G. Delle Fave, G. A. Kaltsas, E. P. Krenning, S. F. Moss, O. Nilsson, G. Rindi, R. Salazar, P. Ruszniewski, A. Sundin, *The Lancet Oncology* **2008**, 9, 61-72.

²⁰⁵ D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, P. P. M. Kooij, M. W. Kronijnenberg, A. Srinivasan, J. L. Erion, M. A. Schmidt, J. L. Bugaj, M. De Jong, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28, 1319-1325.

²⁰⁶ W. A. P. Breeman, M. De Jong, D. J. Kwekkeboom, R. Valkema, W. H. Bakker, P. P. Kooij, T. J. Visser, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, 28, 1421-1429.

²⁰⁷ RGD = Arginin-Glycin-Asparaginsäure

basierten Integrin-Antagonisten ermittelt werden.²⁰⁸ Die Synthese eines RGD-Paclitaxel-Konjugates konnte bereits das Potenzial des Integrin-gerichteten Wirkstofftransports erkennen lassen.²⁰⁹ Die Anbindung von RGD-Peptiden an Ansamitocin-Derivate sollte ebenfalls über die vorgestellte Synthesesequenz möglich sein.

In naher Zukunft wird mit großer Sicherheit die Kombination aus mutasynthetischen Verfahren und klassischer organischer Synthese die Entwicklung von Ansamitocin-Derivaten mit verbessertem Wirkprofil ermöglichen. Das Konzept des Tumor-„targetings“ sollte hierbei einen entscheidenden Beitrag leisten können und ist mit den vorgestellten Studien sicherlich erst in der Anfangsphase.

²⁰⁸ R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440-1456.

²⁰⁹ X. Chen, C. Plascencia, Y. Hou, N. Neamati, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1098-1106.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Hinweise zu den chemisch-synthetischen Arbeiten

Gerätschaften

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Die entsprechenden Glasgeräte wurden vor der Verwendung im Vakuum ausgeheizt, Spritzen und Kanülen wurden bei 90 °C getrocknet und mit Inertgas gespült.

Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren²¹⁰ getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt: Diethylether (Et₂O) und Tetrahydrofuran (THF) wurden über Natriumdraht refluxiert mit Benzophenon als Indikator, Dichlormethan (CH₂Cl₂) wurde über Calciumhydrid refluxiert. Alle weiteren absoluten Lösungsmittel wurden käuflich erworben (FLUKA, ACROS). Bei sauerstoffsensiblen Reaktionen wurde das Lösungsmittel vor Gebrauch durch Spülen mit Inertgas oder nach Ausfrieren im Vakuum (*freeze-pump-thaw degassing*) entgast. Alle Reagenzien, deren Herstellung nicht angegeben ist, stammen von den Firmen ACROS, ALDRICH, FLUKA und ABCR. Bei wässrigen Lösungen handelt es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firmen FLUKA (Korngröße 40-63 µm), MACHERY-NAGEL (Korngröße 40-63 µm) oder PROSEP (Korngröße 20-45 µm) bei leichtem Überdruck durchgeführt. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden einfach destilliert, das Eluentenverhältnis ist in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben.

²¹⁰ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed., Butterworth and Heinemann, Oxford 1996.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien vom Typ 60 F₂₅₄ der Firma MERCK verwendet. Die Indikation erfolgte durch Fluoreszenzdetektion ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und durch unterschiedliche Färbereagenzien¹⁰² (Anisaldehyd-, 2,4-Dinitrophenylhydrazin-, Kaliumpermanganat- oder Ninhydrin-Tauchreagenz) mit anschließender Wärmebehandlung.

HPLC

Analytische HPLC wurde an einer Hewlett Packard 1050 series HPLC-Anlage mit UV-Detektion ($\lambda = 248 \text{ nm}$) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) Säule der Firma MERCK benutzt.

Präparative HPLC wurde an einer MERCK HITACHI LaChrome HPLC-Anlage (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450) durchgeführt. Die verwendeten organischen Lösungsmittel wurden von der Firma ACROS bezogen und vor Gebrauch im Ultraschallbad entgast. Wasser wurde zunächst über eine Filterkartusche gereinigt und anschließend doppelt destilliert. Die verwendeten Säulen, Betriebsbedingungen und Retentionszeiten (t_r) sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von ¹H-NMR Spektren erfolgte mit den Geräten DPX-200 (200 MHz), AVS-400, DPX-400 (400 MHz) und DRX-500 (500 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur. Das verwendete Solvens ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachte Signal.²¹¹ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz), die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, se = Sextett, sep = Septett, m = Multipllett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Abkürzungen geben an: d = doppelt, b = breites Signal.

¹³C-NMR Spektren wurden mit den Geräten AVS-400, DPX-400 (100 MHz) und DRX-500 (125 MHz) der Firma BRUKER aufgenommen. Das verwendete Solvens ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das vom Lösungsmittel verursachte Signal.²¹¹ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren: s = Singulett (entspricht quartärem Kohlenstoff), d = Dublett (tertiärer Kohlenstoff), t = Triplett (sekundärer Kohlenstoff), q = Quartett (primärer

²¹¹ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

Kohlenstoff). Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen α -ständigen Wasserstoffatome wurde nach der DEPT 90 / DEPT 135 Methode bestimmt.

Sofern nötig wurden für eine vollständige Interpretation ^1H - ^1H -Korrelationsspektren (COSY), ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren (HMOC, HMBC, HSQC) oder nOe-Experimente durchgeführt. Bei den Kopplungen mit anderen NMR-aktiven Kernen (^{19}F) handelt es sich ausschließlich um Dubletts, es wird lediglich die Kopplungskonstante $J_{\text{F-C}}$ (in Hz) angegeben.

Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem MICROMASS LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695). Alternativ wurden die Messungen an einer Acquity-UPLC (WATERS) Anlage gekoppelt mit einem Q-Tof Premier Massenspektrometer (WATERS) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI) oder durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). MS/MS-Fragmentierungsexperimente wurden mit Argon als Kollisionsgas bei einer Kollisionsenergie von 15 bis 35 eV durchgeführt. Angegeben sind berechnete und gefundene Masse.

Drehwerte

Spezifische optische Rotationen $[\alpha]$ wurden bei 20°C mit einem Polarimeter Typ 341 der Firma PERKIN-ELMER in einer 10 cm Quarzglaszelle bei $\lambda = 589.3$ nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in $10^{-1} \text{ }^\circ \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$, wobei die Konzentration c definitionsgemäß in 10 mg mL^{-1} angegeben ist.

Siedepunkte

Unkorrigiert; die Siedepunkte und die jeweilige Druckangabe beziehen sich auf bei der Destillation gefundene Werte.

Schmelzpunkte

Unkorrigiert; die Schmelzpunktbestimmung erfolgte an einem Gerät vom Typ IA-9200 der Firma ELECTROTHERMAL bzw. vom Typ OptiMelt der Firma SRS.

6.2 Allgemeine Hinweise zu den mikrobiologischen Arbeiten

Gerätschaften

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in einem S1-Labor unter keimfreien Bedingungen mit durch Autoklavieren sterilisierten Geräten und Nährmedien durchgeführt. Hitzeempfindliche Gerätschaften wurden durch Isopropanoleinwirkung sterilisiert, nicht autoklavierbare Zusätze (L-Valin, Substanzen zur Verfütterung) wurden vor Verwendung als Lösung durch einen Sterilfilter filtriert.

Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden von H. G. FLOSS bzw. P. SPITELLER zur Verfügung gestellt und als Sporensuspension [40 % Glycerin in Wasser] bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert:

- Wildtyp des Ansamitocin-Produzenten *Actinosynnema pretiosum* spp. *auranticum*
- *A. pretiosum* HGF073 (In der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierte Mutante; Replikat des publizierten Stammes HGF056)³²
- *A. pretiosum* Δ asm7 (Mutante mit Blockierung der O-Methyltransferase)³⁸
- *A. pretiosum* Δ asm10 (Mutante mit Blockierung der N-Methyltransferase)³⁸
- *A. pretiosum* Δ asm11 (Mutante mit Blockierung der Epoxidase)³⁸
- *A. pretiosum* Δ asm12/21 (Mutante mit Blockierung der Halogenase und der Carbamoyltransferase)³⁸

Nährmedien

Zur Herstellung der verwendeten Medien wurde ausschließlich bidest. Wasser benutzt.

Tabelle 7: Zusammensetzung verwendeter Medien (absolute Angaben pro Liter)

YMG-Medium	Korea-Medium
4.0 g Yeast-Extract (BACTO)	60.0 g Dextrin (SIGMA)
10.0 g Malt-Extract (SIGMA)	5.25 g Cotton seed flow (PROFLO)
4.0 g D-Glucose monohydrat (FLUKA)	30.0 g D-Maltose monohydrat (SIGMA)
	4.50 g Yeast-Extract (BACTO)
für YMG-Agar-Platten:	0.30 g K_2HPO_4 (FLUKA)
+ 22.0 g Agar (BACTO)	2 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	5.00 g CaCO_3

Inkubator

Die Anzucht der Bakterienstämme auf Agar-Platte geschah bei 30 °C in Inkubatoren der Firmen EDMUND BÜHLER bzw. HERAEUS.

Die Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte in einem Innova 4900 Schüttelschrank der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 29 °C mit einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. Alle Flüssigkulturen wurden in 250 mL Schikanekolben (bis 50 mL Medium) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (bis 125 mL Medium) mit zusätzlichem Stahlfedereinsatz fermentiert.

Spritzenpumpe

Die kontinuierliche Substratzugabe wurde über eine BS-9000-8 Spritzenpumpe mit acht Spritzenplätzen (bis 10 mL) der Firma BRAINTREE SCIENTIFIC realisiert. Die Zuleitung erfolgte über Tefzel®-Kapillaren mit LUER-Lock-Anschluss, welche zusammen mit den Schüttelkolben autoklaviert wurden.

Allgemeine Vorschrift für die Fütterungsstudien

Eine bei -80 °C gelagerte Sporenprobe wurde auf einer YMG-Agar-Platte dünn ausplattiert und bei 30 °C für 72 h inkubiert. Anschließend wurden mehrere gut sporulierte Einzelkolonien selektiert, in Wasser (1 mL) suspendiert und zur Inokulation der YMG-Vorkultur (50 mL) verwendet, welche für 48 h kultiviert wurde. Daraufhin wurden die Hauptkulturen angeimpft (2 mL YMG-Vorkultur je 25 mL Korea-Medium), mit L-Valin [3 % in Wasser] (3 mL je 25 mL Korea-Medium) versetzt und für 168 h kultiviert.

Die Zugabe der sterilen Substratlösung (gelöst in DMSO:Wasser = 1:1; Hydrochloride: gelöst in Wasser) geschah entweder in drei Portionen nach 72, 96 und 120 h oder kontinuierlich mittels Spritzenpumpe (Start nach 48 h, Dauer: 96 h). Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgte immer parallel zu einer Null-Referenz (HGF073 Kultur ohne Zufütterung), sowie einer weiteren Referenz (HGF073 Kultur mit Supplementierung von AHBA) zur Sicherstellung der Aktivität des Stammes.

Zur Produktextraktion wurde mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt, zweimal mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingengt.

6.3 Pufferlösungen und mobile Phasen

Phosphatpuffer-Lösung (pH = 7)

KH_2PO_4 (102.5 g, 0.75 mol) und Na_2HPO_4 (152.4 g, 1.07 mol) wurden in Wasser (1000 mL) gelöst. Vor Gebrauch wurde dieses Konzentrat 1:10 mit Wasser verdünnt.

PBS (phosphate buffered saline)

Na_2HPO_4 (14.2 g, 0.10 mol) und NaCl (8.75 g, 0.15 mol) wurden in Wasser (1000 mL) gelöst. Anschließend wurde mit HCl [1.0 M] auf pH = 7.3 eingestellt.

PBS-EDTA

Na_2HPO_4 (14.2 g, 0.10 mol), NaCl (8.75 g, 0.15 mol) und $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.7 g, 0.02 mol) wurden in Wasser (1000 mL) gelöst. Anschließend wurde mit HCl [1.0 M] auf pH = 7.5 eingestellt.

Mobile Phasen für die HPLC

Die verwendeten mobilen Phasen und der jeweilige Gradient sind in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen angegeben. Verwendete wässrige Pufferlösungen sind:

- **Ammoniumacetat [10 mM]**

NH_4OAc (0.77 g, 10 mmol) wurde in bidest. Wasser (1000 mL) gelöst und vor Verwendung im Ultraschallbad entgast.

- **Trifluoressigsäure [0.1 %]**

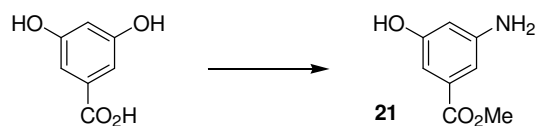
TFA (1 mL) wurde in bidest. Wasser (1000 mL) gelöst und vor Verwendung im Ultraschallbad entgast.

Mobile Phasen für die UPLC

Für die UPLC-MS wurden grundsätzlich mit Ameisensäure [0.1 %] gepufferte mobile Phasen (Acetonitril, Wasser) verwendet.

6.4 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.1

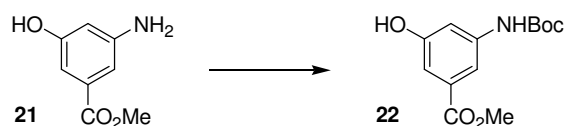
3-Amino-5-hydroxybenzoesäuremethylester (**21**)⁸²



3,5-Dihydroxybenzoesäure (22.5 g, 146 mmol, 1.0 Äq.), Ammoniumchlorid (19.1 g, 358 mmol, 2.45 Äq.) und konzentrierter Ammoniak (30 %, 67.5 mL) wurden in einer Stahlbombe (Modell T304, PARR INSTRUMENT COMPANY) für 40 Stunden auf 180 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt, in Methanol (500 mL) aufgenommen, vorsichtig mit Acetylchlorid (20.8 mL, 292 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und für 36 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Eiswasser aufgenommen und zweimal mit Diethylether extrahiert (die Etherphasen wurden verworfen). Der wässrige Rückstand wurde mit NaHCO₃-Lösung neutralisiert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und aufkonzentriert. Umkristallisation (MeOAc:CHCl₃ = 1:5) lieferte Methylester **21** (19.4 g, 116 mmol, 79 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 8.29 (bs, 1H, OH), 6.86 (dd, *J* = 2.2, 1.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.77 (dd, *J* = 2.2, 1.4 Hz, 1H, H-Ar), 6.42 (dd, *J* = 2.2, 2.2 Hz, 1H, H-Ar), 4.83 (s, 2H, NH₂), 3.80 (s, 3H, OMe) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 29.84 ppm): δ 167.1 (s, COOMe), 158.6 (s, C-Ar), 150.2 (s, C-Ar), 132.2 (s, C-Ar), 107.5 (d, C-Ar), 105.8 (d, C-Ar), 105.3 (d, C-Ar), 51.5 (q, OMe) ppm; HRMS [ESI] *m/z* für C₈H₉NO₃ [M-H]⁻: ber. 166.0504 gef. 166.0498; Smp.: 126 °C (Lit.: 125 - 127 °C).

3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-hydroxybenzoesäuremethylester (**22**)⁸²

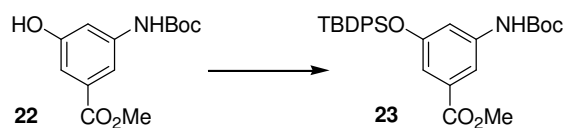


Methylester **21** (19.4 g, 116 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem 1:4 Gemisch THF/NaHCO₃-Lösung (400 mL) gelöst und mit Boc₂O (25.3 g, 116 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Nach einer Stunde wurde NaHCO₃ (11.8 g, 139 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und die Mischung für 44 Stunden bei RT gerührt (Umsatzkontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1).

Das THF wurde im Vakuum entfernt, die verbliebene wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte Umkristallisation (Chloroform) das Phenol **22** (31.0 g, 116 mmol, quant.) als farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , Aceton- $\text{d}_5 = 2.05$ ppm): δ 8.60 (s, 1H), 8.51 (bs, 1H), 7.73 (m, 1H, H-Ar), 7.40 (m, 1H, H-Ar), 7.13 (m, 1H, H-Ar), 3.84 (s, 3H, OMe), 1.48 (s, 9H, Boc) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Aceton- d_6 , Aceton- $\text{d}_6 = 29.84$ ppm): δ 167.1 (s, COOMe), 158.6 (s, C-Ar), 153.6 (s, Boc), 142.0 (s, C-Ar), 132.5 (s, C-Ar), 111.4 (d, C-Ar), 110.8 (d, C-Ar), 110.4 (d, C-Ar), 80.2 (s, Boc), 52.2 (q, OMe), 28.4 (q, Boc) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 268.1185 gef. 268.1181; **Smp.:** 146°C (Lit.: 146 °C).

3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzoesäuremethylester (**23**)⁸²

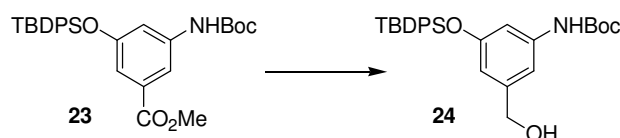


Phenol **22** (31 g, 116 mmol, 1.0 Äq.) wurde in CH_2Cl_2 (300 mL) gelöst und mit Imidazol (9.48 g, 139 mmol, 1.2 Äq.), 4-DMAP (1.42 g, 11.6 mmol, 0.1 Äq.) und TBDPSCl (31 mL, 122 mmol, 1.05 Äq.) versetzt. Nach Rühren über Nacht war die Reaktion abgeschlossen (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1) und es wurde mit NH_4Cl -Lösung (200 mL) hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt konnte säulenchromatographisch (PE:EE = 20:1 \rightarrow 8:1) gereinigt werden. Für die weitere Synthese konnte es aber auch ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Der Methylester **23** (57 g, 113 mmol, 97 %) wurde als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.73 – 7.68 (m, 4H, TBDPS), 7.63 (m, 1H, H-Ar), 7.45 – 7.35 (m, 6H, TBDPS), 7.09 (m, 1H, H-Ar), 6.95 (m, 1H, H-Ar), 6.36 (bs, NH), 3.78 (s, 3H, OMe), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.10 (s, 9H, TBDPS) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 166.6 (s, COOMe), 156.1 (s, C-Ar), 152.3 (s, Boc), 139.3 (s, C-Ar), 135.5 (d, TBDPS), 132.4 (s, C-Ar), 131.6 (s, TBDPS), 130.0 (d, TBDPS), 127.8 (d,

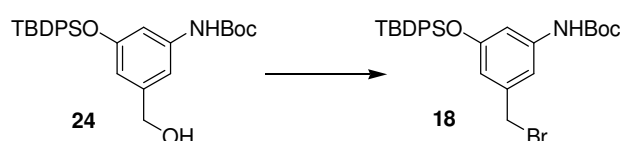
TBDPS), 115.5 (d, C-Ar), 114.2 (d, C-Ar), 112.4 (d, C-Ar), 80.8 (s, Boc), 52.0 (q, OMe), 28.2 (q, Boc), 26.5 (q, TBDPS), 19.5 (s, TBDPS) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{29}H_{36}NO_5Si$ $[M+H]^+$: ber. 506.2363 gef. 506.2367.

3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzylalkohol (**24**)⁸²



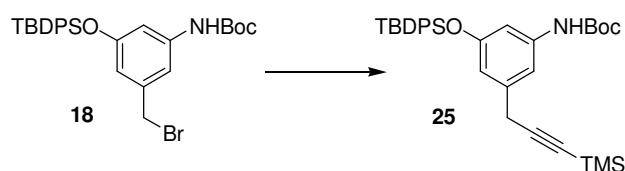
Methylester **23** (57 g, 113 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (300 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde DIBAL [1.2 M in Toluol] (283 mL, 339 mmol, 3.0 Äq.) über einen Zeitraum von 90 min langsam zugetropft, während die Temperatur des Kühlbades schrittweise auf -30 °C eingeregelt wurde. Nach erfolgter Zugabe von DIBAL wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktionsmischung bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1) gerührt. Anschließend wurde mit Natriumkaliumtartrat-Lösung hydrolysiert und das THF im Vakuum entfernt. Nach Zugabe von Ethylacetat (1 L) wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase noch zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 5:1 → 2:1) Benzylalkohol **24** (44 g, 92.1 mmol, 82 %) als farblosen Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.72 – 7.70 (m, 4H, TBDPS), 7.44 – 7.34 (m, 6H, TBDPS), 7.07 (m, 1H, H-Ar), 6.59 (m, 1H, H-Ar), 6.40 (m, 1H, H-Ar), 6.34 (bs, NH), 4.41 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂OH), 1.61 (t, J = 6.1 Hz, CH₂OH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.09 (s, 9H, TBDPS) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 156.3 (s, C-Ar), 152.7 (s, Boc), 143.1 (s, C-Ar), 139.5 (s, C-Ar), 135.6 (d, TBDPS), 132.9 (s, TBDPS), 130.1 (d, TBDPS), 127.9 (d, TBDPS), 112.9 (d, C-Ar), 109.8 (d, C-Ar), 109.1 (d, C-Ar), 80.6 (s, Boc), 65.1 (t, CH₂OH), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 19.6 (s, TBDPS) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{28}H_{36}NO_4Si$ $[M+H]^+$: ber. 478.2414 gef. 478.2411.

3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzylbromid (18**)⁸²**

Benzylalkohol **24** (5.629 g, 11.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit PPh₃ (3.725 g, 14.2 mmol, 1.2 Äq.) in CH₂Cl₂ (100 mL) gelöst, und Tetrabrommethan (4.709 g, 14.2 mmol, 1.2 Äq.) wurde hinzugefügt. Nach ca. 70 min war die Reaktion abgeschlossen (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE/EE = 5:1), das Reaktionsgemisch wurde mit Kieselgel (~10 g) versetzt und das Dichlormethan wurde im Vakuum entfernt (das Rohprodukt wurde auf Kieselgel adsorbiert, essentiell zur Abtrennung des entstandenen Triphenylphosphanoxids). Säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 10:1) lieferte Benzylbromid **18** (5.535 g, 10.2 mmol, 86 %) als farblosen Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.73 – 7.69 (m, 4H, TBDPS), 7.46 – 7.35 (m, 6H, TBDPS), 7.16 (m, 1H, H-Ar), 6.58 (m, 1H, H-Ar), 6.44 (m, 1H, H-Ar), 6.28 (bs, NH), 4.23 (s, 2H, CH₂Br), 1.48 (s, 9H, Boc), 1.10 (s, 9H, TBDPS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 156.3 (s, C-Ar), 152.5 (s, Boc), 139.6 (s, C-Ar), 139.5 (s, C-Ar), 135.6 (d, TBDPS), 132.7 (s, TBDPS), 130.1 (d, TBDPS), 128.0 (d, TBDPS), 115.3 (d, C-Ar), 111.9 (d, C-Ar), 109.9 (d, C-Ar), 80.8 (s, Boc), 33.4 (t, CH₂Br), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 19.6 (s, TBDPS) ppm; HRMS [ESI] *m/z* für C₂₈H₃₅BrNO₃Si [M+H]⁺: ber. 540.1570 gef. 540.1566.

3-[3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-phenyl]-1-trimethylsilylprop-1-in (25**)⁸²***i) Darstellung des Indiumorganyls 26*

TMS-Acetylen (530 µL, 368 mg, 3.75 mmol, 1.5 Äq.) wurde in THF (1 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt, anschließend mit *n*-BuLi [2.5 M in Hexan] (1.50 mL, 3.75 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und für 1 h gerührt. Wasserfreies InCl₃ (246 mg, 1.25 mmol, 0.5 Äq.) wurde im Vakuum ausgeheizt, in THF (2 mL) gelöst und nach Abkühlen auf -78 °C mit dem zuvor

hergestellten Lithiumorganyl versetzt. Die Mischung wurde 30 min gerührt und anschließend auf RT erwärmt.

ii) *Alkinylierung*

Benzylbromid **18** (1.351 g, 2.50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (25 mL) gelöst, mit Pd(dppf)Cl₂*CH₂Cl₂ (65 mg, 0.08 mmol, 0.03 Äq.) versetzt und auf 65 °C erhitzt. Nach Zugabe von Indiumorganyl **26** [~0.25 M in THF] (4.0 mL, 1.0 mmol, 0.4 Äq.) wurde die Reaktionslösung bis zum vollständigen Umsatz (5 h, Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 10:1) gerührt. Anschließend wurde mit Methanol hydrolysiert und die Lösung im Vakuum eingengt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 20:1 → 10:1) lieferte Alkinylierungsprodukt **25** (1.320 g, 2.37 mmol, 95 %) als hellgelben Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.73 – 7.70 (m, 4H, TBDPS), 7.45 – 7.34 (m, 6H, TBDPS), 7.04 (m, 1H, H-Ar), 6.57 (m, 1H, H-Ar), 6.47 (m, 1H, H-Ar), 6.24 (bs, NH), 3.43 (s, 2H, CH₂), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.09 (s, 9H, TBDPS), 0.14 (s, 9H, TMS) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 156.2 (s, C-Ar), 152.6 (s, Boc), 139.3 (s, C-Ar), 138.3 (s, C-Ar), 135.6 (d, TBDPS), 133.0 (s, TBDPS), 130.0 (d, TBDPS), 127.9 (d, TBDPS), 114.2 (d, C-Ar), 111.0 (d, C-Ar), 108.3 (d, C-Ar), 104.0 (s, C-2), 87.1 (s, C-1), 80.6 (s, Boc), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 26.2 (t, C-3), 19.6 (s, TBDPS), 0.2 (q, TMS) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₃H₄₄NO₃Si₂ [M+H]⁺: ber. 558.2860 gef. 558.2873.

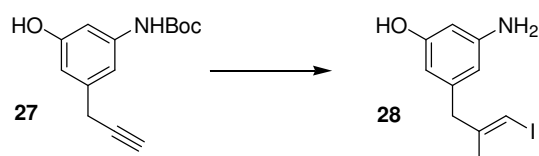
3-[3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-5-hydroxyphenyl]-prop-1-in (27**)**⁸²



Alkinylierungsprodukt **25** (2.63 g, 4.71 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (15 mL) gelöst und auf -10 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von TBAF*3H₂O (2.97 g, 4.62 mmol, 2.0 Äq.) und die Reaktionslösung wurde bei dieser Temperatur bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1) gerührt. Nach Hydrolyse mit NH₄Cl-Lösung wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 5:1 → 2:1) Alkin **27** (1.075 g, 4.35 mmol, 92 %) als gelblichen Schaum.

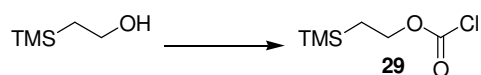
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.94 (bs, 1H, OH), 6.80 – 6.75 (m, 2H, H-Ar), 6.67 (bs, NH), 6.55 (m, 1H, H-Ar), 3.46 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H, CH₂), 2.15 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, ≡CH), 1.50 (s, 9H, Boc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 156.8 (s, C-Ar), 153.2 (s, Boc), 139.4 (s, C-Ar), 138.4 (s, C-Ar), 110.5 (d, C-Ar), 110.2 (d, C-Ar), 104.7 (d, C-Ar), 81.8 (s, C-2), 81.2 (s, Boc), 70.8 (d, C-1), 28.4 (q, Boc), 24.7 (t, C-3) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₄H₁₈NO₃ [M+H]⁺: ber. 248.1287 gef. 248.1298.

(*E*)-1-Iod-2-methyl-3-(3-amino-5-hydroxyphenyl)-prop-1-en (28**)⁸²**



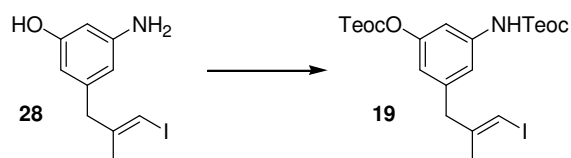
Zu einer Lösung von Cp₂ZrCl₂ (1.70 g, 5.82 mmol, 3.0 Äq.) in Dichlorethan (15 mL) wurde bei 0 °C AlMe₃ [2 M in Heptan] (8.73 mL, 17.46 mmol, 9.0 Äq.) zugetropft und für 30 min bei RT gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0 °C erfolgte die Zugabe von Alkin **27** (480 mg, 1.94 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in Dichlorethan (10 mL). Die Lösung wurde 72 h bei RT gerührt, auf -30 °C gekühlt, mit einer Lösung von Iod (2.95 g, 11.64 mmol, 6.0 Äq.) in THF (10 mL) versetzt und 60 min gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C erwärmt und mit Kaliumnatriumtartrat-Lösung hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 2:1 → EE) das ungeschützte Vinyljodid **28** (345 mg, 1.19 mmol, 61 %) als leicht bräunlichen Feststoff. Alternativ konnte das Rohprodukt auch ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt werden.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.09 – 6.06 (m, 2H, H-Ar), 6.04 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, 1-H), 6.00 (m, 1H, H-Ar), 3.31 (s, 2H, CH₂), 1.74 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, 2-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 159.2 (s, C-Ar), 149.9 (s, C-2), 148.6 (s, C-Ar), 141.7 (s, C-Ar), 109.0 (d, C-Ar), 107.0 (d, C-Ar), 102.0 (d, C-Ar), 76.4 (d, C-1), 46.4 (t, C-3), 23.7 (q, 2-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₀H₁₁INO [M-H]⁻: ber. 287.9885 gef. 287.9877; **Smp.:** 110 - 111 °C (110 – 111 °C).

2-Trimethylsilyl-ethoxycarbonylchlorid (29)⁸⁹

2-Trimethylsilylethanol (5.0 mL, 34.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Toluol (20 mL) gelöst, auf -10 °C gekühlt und mit K₂CO₃ (4.15 g, 30.0 mmol, 0.86 Äq.) versetzt. Nach langsamen Zutropfen von Phosgen [20 % in Toluol] (24.0 mL, 45.4 mmol, 1.3 Äq.) wurde noch 30 min bei -10 °C gerührt, anschließend auf RT erwärmt und weitere 60 min gerührt. Überschüssiges Phosgen wurde mittels Argonstrom ausgetrieben (Waschflasche mit K₂CO₃-Lösung) und die Lösung im Vakuum eingeeengt (45 mbar, Wasserbadtemperatur max. 30 °C). Der Rückstand wurde über Magnesiumsulfat filtriert und mit Diethylether nachgespült. Einengen im Vakuum (45 mbar, 30 °C) lieferte TeocCl **29** (33.0 mmol, 95 %) als 2.0 M Lösung in Toluol (Bestimmung durch Integration der ¹H-NMR-Signale).

¹H-NMR NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.29 – 7.17 (m, 30H, Toluol), 4.43 (m, 2H, CH₂OCOCl), 2.39 (s, 18H, Toluol), 1.15 (m, 2H, TMSCH₂), 0.08 (s, 9H, TMS) ppm.

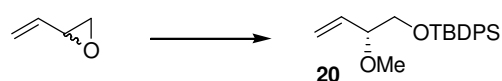
(E)-1-Iod-2-methyl-3-[N,O-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-prop-1-en (19)⁸²

Vinyliodid **28** (541 mg, 1.87 mmol, 1.0 Äq.) wurde in CH₂Cl₂ (20 mL) gelöst und mit Pyridin (0.75 mL, 9.35 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Innerhalb von 4 h wurde TeocCl [2.0 M in Toluol] (4.12 mL, 8.23 mmol, 4.4 Äq.) zugetropft. Nach Reaktionsende (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1) wurde mittels Phosphatpufferlösung [pH = 7] (10 mL) hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Aufkonzentrieren lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 10:1) das geschützte Vinyliodid **19** (903 mg, 1.56 mmol, 83 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.23 (bs, 1H, H-Ar), 7.00 (bs, 1H, H-Ar), 6.66 (m, 1H, H-Ar), 6.59 (bs, 1H, NH), 6.02 (d, J = 1.0 Hz, 1H, 1-H), 4.35 – 4.30 (m, 2H,

Teoc), 4.27 (m, 2H, Teoc), 3.44 (s, 2H, 3-H), 1.77 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, 2-Me), 1.15 – 1.11 (m, 2H, Teoc), 1.06 – 1.02 (m, 2H, Teoc), 0.07 (s, 9H, Teoc), 0.06 (s, 9H, Teoc) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 153.6 (s, Teoc), 153.5 (s, Teoc), 151.8 (s, C-Ar), 146.3 (s, C-Ar), 140.6 (s, C-2), 139.3 (s, C-Ar), 116.3 (d, C-Ar), 116.2 (d, C-Ar), 110.0 (d, C-Ar), 77.6 (d, C-1), 67.6 (t, Teoc), 63.9 (t, Teoc), 45.5 (t, C-3), 23.8 (q, 2-Me), 17.9 (t, Teoc), 17.7 (t, Teoc), -1.3 (q, Teoc), -1.4 (q, Teoc) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{INO}_5\text{Si}_2$ [M-H]: ber. 576.1099 gef. 576.1083.

(3R)-4-(tert-Butyldiphenylsilyloxy)-3-methoxybut-1-en (20)



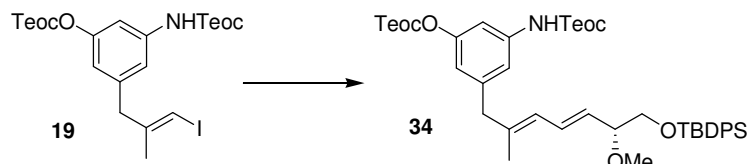
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (43 mg, 0.042 mmol, 0.01 Äq.) wurde zusammen mit dem chiralen Liganden (*S,S*)-**30** (100 mg, 0.126 mmol, 0.03 Äq.) in entgastem CH_2Cl_2 (42 mL) gelöst und mit Methanol (171 μL , 4.20 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Innerhalb von 10 min wurde (*sec*-Bu) $_3\text{B}$ [1M in THF] (42 μL , 0.042 mmol, 0.01 Äq.) zugetropft, wobei sich die Lösung von violett nach gelb färbte. Nach Zugabe von Butadienmonoepoxid (338 μL , 4.20 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Lösung bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 1:1) gerührt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von Imidazol (343 mg, 5.04 mmol, 1.2 Äq.), 4-DMAP (51 mg, 0.42 mmol, 0.1 Äq.) und TBDPSCI (1.07 ml, 4.20 mmol, 1.0 Äq.). Nach Reaktionsende (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 5:1) wurde mit NH_4Cl -Lösung hydrolysiert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum eingengt. Säulenchromatographie (Kieselgel: PROSEP [Korngröße 20-45 μm], Pentan: CH_2Cl_2 = 5:1 \rightarrow 2:1) lieferte Olefin **20** (715 mg, 2.10 mmol, 50 % über 2 Stufen, 90 %*ee* [bestimmt durch die Dirhodium Methode⁹³]) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6 , $\text{C}_6\text{D}_5\text{H} = 7.16$ ppm): δ 7.82 (m, 4H, TBDPS), 7.22 (m, 6H, TBDPS), 5.68 (ddd, $J = 17.3, 10.5, 6.8$ Hz, 1H, 2-H), 5.18 (ddd, $J = 17.3, 2.0, 0.7$ Hz, 1H, 1-H), 5.07 (ddd, $J = 10.5, 2.0, 0.7$ Hz, 1H, 1-H'), 3.85 (dd, $J = 10.4, 6.3$ Hz, 1H, 4-H), 3.74 (dd, $J = 10.4, 5.0$ Hz, 1H, 4-H'), 3.65 (dddd, $J = 6.8, 6.3, 5.0, 0.7, 0.7$ Hz, 1H, 3-H), 3.17 (s, 3H, OMe), 1.20 (s, 9H, TBDPS) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_6D_6 , $\text{C}_6\text{D}_6 = 128.06$ ppm): δ 136.6 (d, C-2), 136.15 (d, TBDPS), 136.14 (d, TBDPS), 134.2 (s, TBDPS), 134.1 (s, TBDPS),

129.97 (d, TBDPS), 129.96 (d, TBDPS), 117.7 (t, C-1), 83.9 (d, C-3), 67.2 (t, C-4), 56.7 (q, OMe), 27.1 (q, TBDPS), 19.6 (s, TBDPS) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{21}H_{28}O_2SiNa$ $[M+Na]^+$: ber. 363.1756 gef. 363.1757; $[\alpha]_D^{20}$: -4.5 ($c = 2.0$, $CHCl_3$).

(2*R*, 3*E*, 5*E*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-methoxy-6-methyl-7-[*N*,*O*-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-hepta-3,5-dien (34)



Vinyliodid **19** (749 mg, 1.30 mmol, 1.0 Äq.) und Olefin **20** (560 mg, 1.64 mmol, 1.25 Äq.) wurden in entgastem DMF (25 mL) gelöst und mit TBAB (419 mg, 1.30 mmol, 1.0 Äq.) und Cs_2CO_3 (466 mg, 1.43 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von $Pd(OAc)_2$ (292 mg, 1.30 mmol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (182 μ L, 1.30 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Lösung für 17 h bei 30 °C gerührt. Nach Reaktionsende (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 5:1) lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 20:1 \rightarrow 10:1) (*E*, *E*)-Dien **34** (669 mg, 0.85 mmol, 65%) als farbloses Öl.

1H -NMR (400 MHz, C_6D_6 , $C_6D_5H = 7.16$ ppm): δ 7.84 (m, 4H, TBDPS), 7.51 (m, 1H, H-Ar), 7.24 (m, 6H, TBDPS), 6.86 (m, 1H, H-Ar), 6.84 (m, 1H, H-Ar), 6.50 (dd, $J = 15.4, 10.9$ Hz, 1H, 4-H), 6.13 (bs, 1H, NH), 5.89 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 5-H), 5.49 (dd, $J = 15.4, 7.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.19 (m, 4H, 2x Teoc), 3.91 (m, 1H, 1-H), 3.78 (m, 2H, 1-H', 2-H), 3.22 (s, 3H, OMe), 3.07 (s, 2H, 7-H, 7-H'), 1.53 (s, 3H, 6-Me), 1.21 (s, 9H, TBDPS), 0.93 (m, 4H, 2x Teoc), -0.08 (s, 9H, Teoc), -0.12 (s, 9H, Teoc) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, C_6D_6 , $C_6D_6 = 128.06$ ppm): δ 154.0 (s, Teoc), 153.3 (s, C-Ar), 152.6 (s, Teoc), 142.3 (s, C-Ar), 140.0 (s, C-6), 137.4 (s, C-Ar), 136.2 (d, TBDPS), 134.3 (s, TBDPS), 134.2 (s, TBDPS), 130.7 (d, C-3), 129.98 (d, TBDPS), 129.96 (d, TBDPS), 129.7 (d, C-4), 126.8 (d, C-5), 116.6 (d, C-Ar), 116.3 (d, C-Ar), 109.9 (d, C-Ar), 83.6 (d, C-2), 67.5 (t, Teoc), 67.0 (t, C-1), 63.4 (t, Teoc), 56.8 (q, OMe), 46.3 (t, C-7), 27.2 (q, TBDPS), 19.6 (s, TBDPS), 18.0 (t, Teoc), 17.5 (t, Teoc), 16.3 (q, 6-Me), -1.6 (q, Teoc), -1.7 (q, Teoc) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{43}H_{63}NO_7Si_3Na$ $[M+Na]^+$: ber. 812.3810 gef. 812.3804; $[\alpha]_D^{20}$: -17.4 ($c = 2.9$, $CHCl_3$).

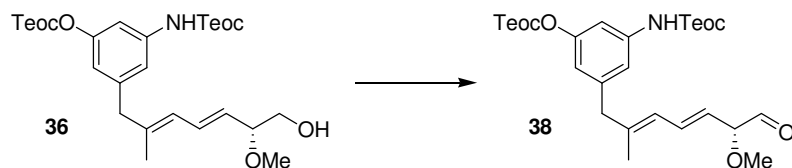
(2R, 3E, 5E)- 2-Methoxy-6-methyl-7-[N,O-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-hepta-3,5-dien-1-ol (36)



Dien **34** (182mg, 0.23 mmol, 1 Äq.) wurde in THF (6 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Pyridin (185 µL, 2.30 mmol, 10 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von HF*Pyridin [~70 % HF] (179 µL, 6.90 mmol, 30 Äq.) wurde auf RT erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1). Anschließend wurde mit Phosphatpufferlösung [pH = 7] (15 mL) und Dichlormethan (10 mL) versetzt, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum eingedampft. Da Chromatographie über Kieselgel (unbehandelt oder mit Triethylamin [3 % in PE] gespült) zu Isomerisierungen des Diensystems führte, wurde das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient H₂O:MeOH = 30:70 → 100 % MeOH in 90 min, Flussrate 6 → 8 mL min⁻¹; t_r = 45.7 min) gereinigt. Der ungeschützte Alkohol **36** (121 mg, 0.22 mmol, 96 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆, C₆D₅H = 7.16 ppm): δ 7.49 (m, 1H, H-Ar), 6.98 (m, 1H, H-Ar), 6.84 (m, 1H, H-Ar), 6.40 (dd, *J* = 15.4, 10.9 Hz, 1H, 4-H), 6.33 (bs, 1H, NH), 5.86 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 5-H), 5.35 (dd, *J* = 15.4, 7.2 Hz, 1H, 3-H), 4.19 (m, 4H, 2x Teoc), 3.55 (m, 3H, 1-H, 1-H', 2-H), 3.10 (s, 3H, OMe), 3.08 (s, 2H, 7-H, 7-H'), 2.06 (bs, 1H, OH), 1.52 (s, 3H, 6-Me), 0.93 (m, 4H, 2x Teoc), -0.07 (s, 9H, Teoc), -0.11 (s, 9H, Teoc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, C₆D₆, C₆D₆ = 128.06 ppm): δ 154.0 (s, Teoc), 153.4 (s, C-Ar), 152.6 (s, Teoc), 142.1 (s, C-Ar), 140.1 (s, C-6), 138.1 (s, C-Ar), 130.5 (d, C-3), 129.4 (d, C-4), 126.5 (d, C-5), 116.6 (d, C-Ar), 116.4 (d, C-Ar), 110.0 (d, C-Ar), 83.4 (d, C-2), 67.1 (t, Teoc), 65.8 (t, C-1), 63.5 (t, Teoc), 56.2 (q, OMe), 46.3 (t, C-7), 18.0 (t, Teoc), 17.6 (t, Teoc), 16.4 (q, 6-Me), -1.6 (q, Teoc), -1.7 (q, Teoc) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₂₇H₄₅NO₇Si₂Na [M+Na]⁺: ber. 574.2632 gef. 574.2628; [α]_D²⁰: -13.3 (c = 2.4, C₆H₆).

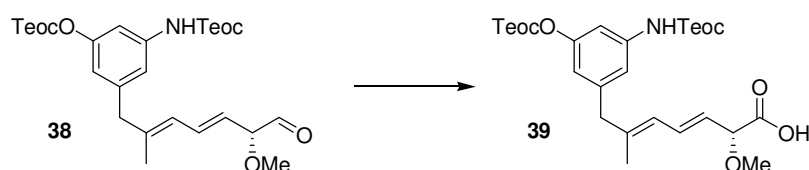
(2*R*, 3*E*, 5*E*)- 2-Methoxy-6-methyl-7-[*N,O*-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-hepta-3,5-dien-1-al (38**)**



Alkohol **36** (88 mg, 0.159 mmol, 1.0 Äq.) wurde in CH_2Cl_2 (20 mL) gelöst und nacheinander mit NaHCO_3 (13 mg, 0.207 mmol, 1.3 Äq.) und DESS-MARTIN-Periodinan (88mg, 0.207 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 90 min bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 2:1), anschließend mit NaHCO_3 - und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (je 5 mL) hydrolysiert und für weitere 30 min intensiv gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige zweimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Einengen im Vakuum (Wasserbadtemperatur max. 30 °C) lieferte Aldehyd **38**, welcher aufgrund seiner Instabilität (Zersetzung bei Dünnschicht- und Flash-Chromatographie auf Kieselgel {unbehandelt oder mit Triethylamin [3 % in PE] gespült}) sofort im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

HRMS [ESI] m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_7\text{Si}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 572.2476 gef. 574.2453.

(2*R*, 3*E*, 5*E*)- 2-Methoxy-6-methyl-7-[*N,O*-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-hepta-3,5-dien-carbonsäure (39**)**

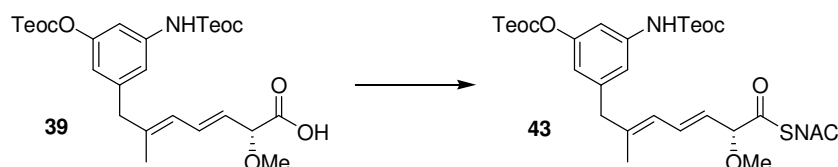


Das Rohprodukt **38** (0.159 mmol, 1 Äq.) aus der DESS-MARTIN-Oxidation wurde zusammen mit 2-Methyl-2-buten (1.3 mL, 12.72 mmol, 80 Äq.) in *tert*-Butanol (3 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zutropfen einer frisch bereiteten Lösung von NaClO_2 [80 %] (161 mg, 1.43 mmol, 9 Äq.) und $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (219 mg, 1.59 mmol, 10 Äq.) in Wasser (3 mL) wurde auf RT erwärmt und bis zum vollständigen Umsatz (75 min) gerührt. Anschließend wurden Phosphatpufferlösung [pH = 6] und Dichlormethan zugegeben, die organische Phase abgetrennt, die wässrige dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na_2SO_4). Nach Einengen im Vakuum lieferte *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20

mm; Gradient H₂O:MeOH = 70:30 → 100 % MeOH in 90 min, Flussrate 6 → 8 mL min⁻¹; t_r = 50.3 min) Carbonsäure **39** (69 mg, 0.122 mmol, 77 % über 2 Stufen) als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.26 (m, 1H, H-Ar), 7.09 (m, 1H, H-Ar), 6.68 (dd, *J* = 15.2, 10.9 Hz, 1H, 4-H), 6.64 (m, 1H, H-Ar), 5.99 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 5-H), 5.61 (dd, *J* = 15.2, 7.0 Hz, 1H, 3-H), 4.33 (m, 2H, Teoc), 4.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 4.23 (m, 2H, Teoc), 3.37 (s, 3H, OMe), 3.35 (s, 2H, 7-H, 7-H'), 1.72 (s, 3H, 6-Me), 1.11 (m, 2H, Teoc), 1.06 (m, 2H, Teoc), 0.08 (s, 9H, Teoc), 0.07 (s, 9H, Teoc) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 174.4 (s, C-1), 156.0 (s, Teoc), 155.2 (s, C-Ar), 153.0 (s, Teoc), 143.1 (s, C-Ar), 141.5 (s, C-6), 140.5 (s, C-Ar), 131.7 (d, C-3), 127.3 (d, C-4), 126.9 (d, C-5), 117.5 (d, C-Ar), 116.9 (d, C-Ar), 110.6 (d, C-Ar), 82.2 (d, C-2), 68.3 (t, Teoc), 64.2 (t, Teoc), 57.3 (q, OMe), 46.9 (t, C-7), 18.6 (t, Teoc), 18.3 (t, Teoc), 16.5 (q, 6-Me), -1.49 (q, Teoc), -1.51 (q, Teoc) ppm; HRMS [ESI] *m/z* für C₂₇H₄₂NO₈Si₂ [M-H]⁻: ber. 564.2449 gef. 564.2443; [α]_D²⁰: -33.5 (c = 1.0, MeOH).

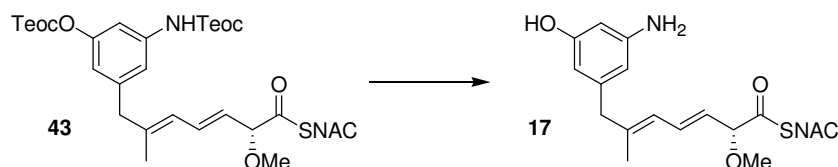
(2*R*, 3*E*, 5*E*)- 2-Methoxy-6-methyl-7-[*N,O*-bis(trimethylsilylethoxycarbonyl)-3-amino-5-hydroxyphenyl]-hepta-3,5-dien-thiocarbonsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-ester (43**)**



Carbonsäure **39** (56 mg, 99 μmol, 1.0 Äq.) wurde in CH₂Cl₂ (1 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit *N*-Acetylcysteamin (43 μl, 396 μmol, 4.0 Äq.), 4-DMAP (1 mg, 10 μmol, 0.1 Äq.) und Diisopropylcarbodiimid (20 μl, 129 μmol, 1.3 Äq.) versetzt. Nach 15 min wurde auf RT erwärmt und die Reaktionslösung bis zum vollständigen Umsatz (3 h, Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (PE:EE = 2:1 → EE) gereinigt. Abschließende Reinigung über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 → 100 % MeOH in 105 min, Flussrate 5 → 8 mL min⁻¹; t_r = 83.0 min) lieferte Thioester **43** (40 mg, 60 μmol, 60 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆, C₆D₅H = 7.16 ppm): δ 7.82 (m, 1H, H-Ar), 7.15 (s, NH), 6.90 (m, 1H, H-Ar), 6.78 (m, 1H, H-Ar), 6.69 (dd, *J* = 15.1, 10.9 Hz, 1H, 4-H), 5.82 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 5-H), 5.65 (dd, *J* = 15.1, 6.5 Hz, 1H, 3-H), 4.83 (bs, NH), 4.22 (m, 4H, 2x Teoc), 4.16 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 2-H), 3.24 (m, 1H, NCH₂), 3.14 (m, 1H, NCH₂'), 3.12 (s, 3H, OMe), 3.02 (s, 2H, 7-H, 7-H'), 2.80 (m, 1H, SCH₂), 2.66 (m, 1H, SCH₂'), 1.49 (s, 3H, NHCOMe), 1.47 (s, 3H, 6-Me), 0.94 (m, 4H, 2x Teoc), -0.07 (s, 9H, Teoc), -0.11 (s, 9H, Teoc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, C₆D₆, C₆D₆ = 128.06 ppm): δ 201.1 (s, C-1), 169.3 (s, NHCOMe), 154.1 (s, Teoc), 153.7 (s, C-Ar), 152.6 (s, Teoc), 141.7 (s, C-6), 140.5 (s, C-Ar), 139.8 (s, C-Ar), 130.5 (d, C-3), 126.7 (d, C-4), 126.2 (d, C-5), 116.5 (d, C-Ar), 116.0 (d, C-Ar), 110.1 (d, C-Ar), 88.2 (d, C-2), 67.0 (t, Teoc), 63.3 (t, Teoc), 57.7 (q, OMe), 46.2 (t, C-7), 39.7 (t, CH₂N), 27.6 (t, SCH₂), 22.7 (q, NHCOMe), 18.0 (t, Teoc), 17.6 (t, Teoc), 16.4 (q, 6-Me), -1.6 (q, Teoc), -1.7 (q, Teoc) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₁H₅₀N₂O₈SSi₂Na [M+Na]⁺: ber. 689.2724 gef. 689.2707; [α]_D²⁰: +12.1 (c = 0.9, C₆H₆).

(2*R*, 3*E*, 5*E*)-2-Methoxy-6-methyl-7-(3-amino-5-hydroxyphenyl)-hepta-3,5-dien-thiocarbonsäure-*S*-(2-acetylamino-ethyl)-ester (17)



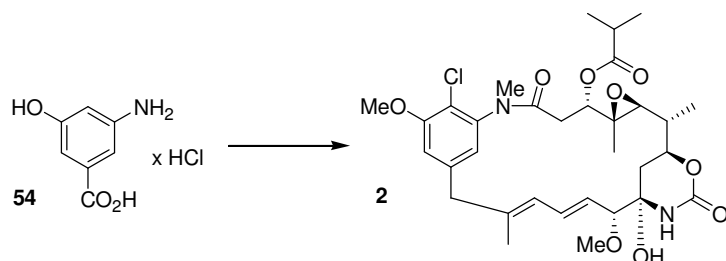
Thioester **43** (31 mg, 46.5 μmol, 1 Äq.) wurde in Nitromethan (4.5 mL) gelöst und mit wasserfreiem ZnCl₂ (95 mg, 698 μmol, 15 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zum vollständigen Umsatz (2 h, Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend mit Phosphatpufferlösung [pH = 7] (25 mL) hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na₂SO₄). Nach Einengen im Vakuum konnte durch *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 → 100 % MeOH in 70 min, Flussrate 5 → 8 mL min⁻¹; t_r = 45.1 min) SNAC-Tetraketid **17** (16 mg, 27.7 μmol, 60 %) als farbloses Öl isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.65 (dd, *J* = 15.1, 11.2 Hz, 1H, 4-H), 6.09 (m, 1H, H-Ar), 6.06 (m, 1H, H-Ar), 6.01 (m, 1H, H-Ar), 5.92 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H,

5-H), 5.47 (dd, $J = 15.1, 7.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.35 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.41 (s, 3H, OMe), 3.32 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2N), 3.18 (s, 2H, 7-H, 7-H'), 3.00 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, SCH_2), 1.91 (s, 3H, NHCOMe), 1.71 (s, 3H, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.00$ ppm): δ 202.0 (s, C-1), 173.5 (s, NHCOMe), 159.2 (s, C-Ar), 149.8 (s, C-Ar), 142.7 (s, C-Ar), 142.2 (s, C-6), 132.5 (d, C-4), 126.6 (d, C-3), 126.1 (d, C-5), 109.3 (d, C-Ar), 107.4 (d, C-Ar), 101.8 (d, C-Ar), 89.1 (d, C-2), 58.1 (q, OMe), 46.2 (t, C-7), 40.0 (t, CH_2N), 28.3 (t, SCH_2), 22.5 (q, NHCOMe), 16.6 (q, 6-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 379.1692 gef. 379.1692; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -2.5 (c = 1.3, MeOH).

6.5 Komplementierungsexperimente aus Kapitel 4.1

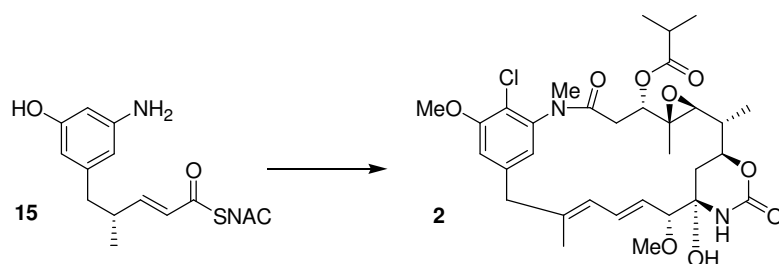
Verfütterung von AHBA Hydrochlorid **54**



Das Komplementierungsexperiment mit AHBA erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von AHBA*HCl **54** (14.2 mg, 75 μ mol, gelöst in 1.5 mL Wasser) erfolgte pulsweise in drei Portionen zu 50 mL Fermentationsmedium. Der Fermentationsprozess wurde überwacht, indem täglich Aliquote (200 μ L Fermentationsmedium entnommen, mit 200 μ L EtOH versetzt, zentrifugiert bei 12000 rpm, 200 μ L Überstand verwendet) direkt über UPLC-MS analysiert wurden (siehe Kapitel 7.1). Nach 12 Tagen erfolgte die Produktextraktion und der Rohextrakt wurde über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 43.9 min) gereinigt. Ansamitocin P-3 **2** enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeeengt, der Rückstand wurde mit MeOH (1 mL) aufgenommen und über UPLC-MS und MSMS-Experimente analysiert (siehe Kapitel 7.1). Ansamitocin P-3 (3.8 mg, 6.0 μ mol, 8 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 76 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden. Es wurde eine Verdünnungsreihe (2 μ g, 20 μ g) erstellt und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 43.9 min) analysiert. Aus der UV-Absorption (λ = 248 nm) wurde eine Kalibrationsgerade für die Quantifizierung der Komplementierungsexperimente mit den Ketiden erstellt (siehe Kapitel 7.1).

UPLC-MS t_r = 2.10 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₂H₄₃ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735 gef. 635.2733; **MSMS** *m/z* für C₂₈H₃₆ClN₂O₇ [M-OC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 547.2211 gef. 547.2202.

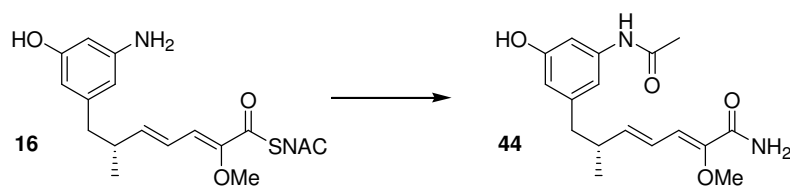
Die spektroskopischen Daten von AP-3 **2** sind in Kapitel 6.6 angegeben.

Verfütterung von Triketid 15

Das Komplementierungsexperiment mit Triketid **15** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Verfütterung von Triketid **15** (5 mg, 15 μmol , gelöst in 1 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte pulsweise in fünf Portionen (je 200 μL) zu 50 mL Fermentationsmedium. Parallel dazu wurde als Referenz je eine Fermentation mit AHBA- und ohne AHBA-Supplementierung durchgeführt. Der Fermentationsprozess wurde überwacht, indem täglich Aliquote (200 μL Fermentationsmedium entnommen, mit 200 μL EtOH versetzt, zentrifugiert bei 12000 rpm, 200 μL Überstand verwendet) direkt über UPLC-MS analysiert wurden (siehe Kapitel 7.1). Nach 12 Tagen erfolgte die Produktextraktion und der Rohextrakt wurde über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min^{-1} ; t_{r} = 43.9 min) gereinigt. Ansanmitocin P-3 **2** enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingengt, der Rückstand wurde mit MeOH (1 mL) aufgenommen und über UPLC-MS und MSMS-Fragmentierungsexperimente analysiert (siehe Kapitel 7.1). Die Quantifizierung erfolgte durch MS-Signalintensitätsvergleich, wobei als Referenz das Komplementierungsexperiment mit Tetraketid **17** diente (siehe Kapitel 7.1). Die Fermentationsausbeute lag bei 0.2 % bezogen auf die AP-3 Produktion bei Zufütterung der gleichen molaren Menge AHBA **54**.

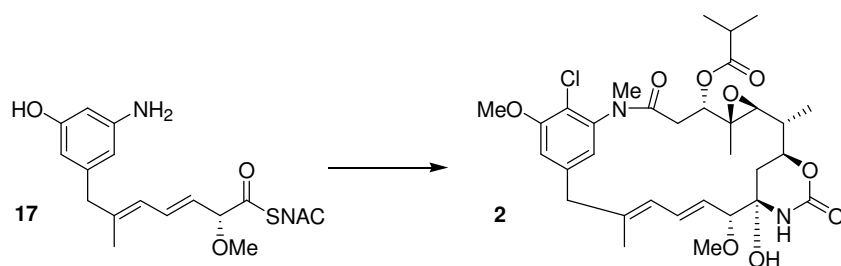
UPLC-MS t_{r} = 2.10 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₂H₄₄ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735 gef. 635.2733; **MSMS** m/z für C₂₈H₃₆ClN₂O₇ [M-OC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 547.2211 gef. 547.2182.

Verfütterung von Tetraketid **16**



Das Komplementierungsexperiment mit Tetraketid **16** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Verfütterung von Tetraketid **16** (8 mg, 21 μmol , gelöst in 1 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte pulsweise in fünf Portionen (je 200 μL) zu 50 mL Fermentationsmedium. Parallel dazu wurde als Referenz je eine Fermentation mit AHBA- und ohne AHBA-Supplementierung durchgeführt. Der Fermentationsprozess wurde überwacht, indem täglich Aliquote (200 μL Fermentationsmedium entnommen, mit 200 μL EtOH versetzt, zentrifugiert bei 12000 rpm, 200 μL Überstand verwendet) direkt über UPLC-MS analysiert wurden (siehe Anhang Kapitel 7.1). Nach 12 Tagen erfolgte die Produktextraktion und der Rohextrakt wurde über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 70 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 37.7 min) gereinigt. Das erhaltene Produkt war noch nicht rein genug, so dass erst nach dreimaliger HPLC-Reinigung (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 70 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 18.6 min) *N*-Acetyl-Tetraketidamid **44** (~ 0.1 mg) isoliert werden konnte.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.25 (m, 1H, H-Ar), 6.98 (m, 1H, H-Ar), 6.64 (m, 1H, H-Ar), 6.57 (d, J = 11.2 Hz, 1H, 3-H), 6.24 (ddd, J = 15.4, 11.2, 1H, 4-H), 6.24 (dd, J = 15.4, 6.7 Hz, 1H, 5-H), 3.56 (s, 3H, OMe), 2.60 (m, 3H, 6-H, 7-H_a, 7-H_b), 2.10 (s, 3H, Ac), 1.08 (d, J = 6.2 Hz, 3H, 6-Me); **UPLC-MS** t_r = 1.27 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₁₇H₂₃N₂O₄ [M+H]⁺: ber. 319.1658 gef. 319.1689.

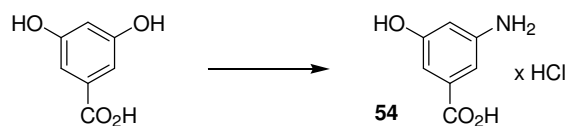
Verfütterung von Tetraketid 17

Das Komplementierungsexperiment mit Tetraketid **17** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Verfütterung von Tetraketid **17** (8 mg, 21 μmol , gelöst in 1 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte pulsweise in fünf Portionen (je 200 μL) zu 50 mL Fermentationsmedium. Parallel dazu wurde als Referenz je eine Fermentation mit AHBA- und ohne AHBA-Supplementierung durchgeführt. Der Fermentationsprozess wurde überwacht, indem täglich Aliquote (200 μL Fermentationsmedium entnommen, mit 200 μL EtOH versetzt, zentrifugiert bei 12000 rpm, 200 μL Überstand verwendet) direkt über UPLC-MS analysiert wurden (siehe Kapitel 7.1). Nach 12 Tagen erfolgte die Produktextraktion und der Rohextrakt wurde über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 43.9 min) gereinigt. Ansanmitocin P-3 **2** enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingedunstet, der Rückstand wurde mit MeOH (1 mL) aufgenommen und über UPLC-MS und MSMS-Fragmentierungsexperimente analysiert (siehe Kapitel 7.1). Die Quantifizierung erfolgte durch UV-Absorptionsvergleich (λ = 248 nm), wobei als Referenz zuvor eine Kalibrationsgerade erstellt wurde (siehe Kapitel 7.1). Die Fermentationsausbeute lag bei 1.1 % bezogen auf die AP-3 Produktion bei Zufütterung der gleichen molaren Menge AHBA **54**.

UPLC-MS t_r = 2.10 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₂H₄₄ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735 gef. 635.2722; **MSMS** m/z für C₂₈H₃₆ClN₂O₇ [M-OC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 547.2211 gef. 547.2211.

6.6 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.2.

3-Amino-5-hydroxybenzoesäure Hydrochlorid (**54**)⁸³

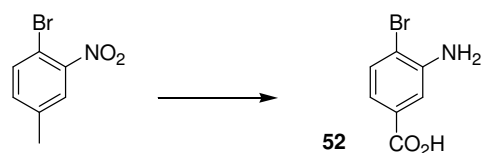


3,5-Dihydroxybenzoesäure (22.5 g, 146 mmol, 1.0 Äq.), Ammoniumchlorid (19.1 g, 358 mmol, 2.45 Äq.) und konzentrierter Ammoniak (30 %, 67.5 mL) wurden in einer Stahlbombe (Modell T304, PARR INSTRUMENT COMPANY) für 40 Stunden auf 180 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockne eingengt, der Rückstand mit halbkonzentrierter Salzsäure aufgenommen (6 M, 50 mL) und für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Auskristallisieren bei 4°C wurde der erhaltene bräunliche Feststoff unter Zusatz von Aktivkohle ein weiteres Mal aus halbkonzentrierter Salzsäure umkristallisiert. Das Hydrochlorid **54** (15.9 g, 84 mmol, 58 %) wurde als kristalliner, farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.52 (m, 1H, H-Ar), 7.49 (m, 1H, H-Ar), 7.06 (m, 1H, H-Ar) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 168.0 (s, COOH), 160.5 (s, C-Ar), 135.2 (s, C-Ar), 133.2 (s, C-Ar), 118.1 (d, C-Ar), 115.7 (d, C-Ar), 115.3 (d, C-Ar) ppm; HRMS [ESI] *m/z* für C₇H₆NO₃ [M-H]⁻: ber. 152.0348 gef. 152.0346; Smp.: 200 - 230 °C (Zers.) (Lit. 199-200 °C (Zersetz.)).

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.²¹²

3-Amino-4-brombenzoesäure (**52**)



4-Brom-3-nitrotoluol (16.16 g, 74.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde zu einer siedenden Lösung aus Na₂CO₃ (3.96 g, 37.4 mmol, 0.5 Äq.) in Wasser (550 mL) gegeben und portionsweise mit KMnO₄ (35.46 g, 224.4 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Mischung wurde über zwei Tage unter Rückfluss erhitzt, auf RT gekühlt, mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH = 5 eingestellt

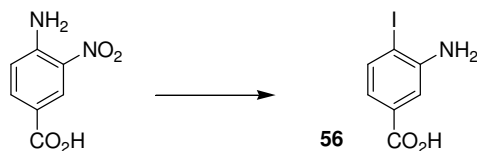
²¹² A. J. Herlt, J. J. Kibby, R. W. Rickards, *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 1319-24.

und für weitere 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde der entstandene Braunstein abfiltriert, das Filtrat mit NaHCO_3 -Lösung leicht basisch eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphasen lieferten nach Trocknen (Na_2SO_4) und Einengen im Vakuum 4-Brom-3-nitrotoluol (9.28 g, 43.0 mmol, 57 % reisoliert). Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, zweimal mit Ethylacetat extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Einengen im Vakuum lieferte 4-Brom-3-nitrobenzoesäure (3.81 g, 15.5 mmol, 21 %) als farblosen Feststoff.

4-Brom-3-nitrobenzoesäure (3.81 g, 15.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethylacetat (30 mL) gelöst und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17.47 g, 77.5 mmol, 5.0 Äq.) und Eisessig (1 mL) versetzt. Die Mischung wurde bei 70 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE:MeOH = 10:1), anschließend mit Eis hydrolysiert und mit NaHCO_3 -Lösung auf pH = 5 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige viermal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na_2SO_4). Einengen im Vakuum lieferte 3-Amino-4-brombenzoesäure (2.87 g, 13.3 mmol, 86 %) als leicht bräunlichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.46 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 7.17 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H, 6-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.0 ppm): δ 168.0 (s, COOH), 146.9 (s, C-3), 133.5 (d, C-5), 132.1 (s, C-1), 120.2 (d, C-6), 117.6 (d, C-2), 114.5 (s, C-4) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrNO}_2$ [M-H] $^-$: ber. 213.9504 gef. 213.9505; **Smp.:** 206 - 210 °C

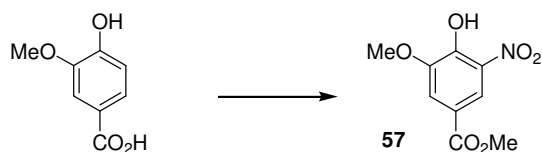
3-Amino-4-iodbenzoesäure (**56**)



3-Amino-4-iodbenzoesäure (**56**) wurde in literaturbekannter Weise¹²⁸ aus 4-Amino-3-nitrobenzoesäure hergestellt, wobei die Veresterung nicht Schwefelsäure-katalysiert, sondern mit Thionylchlorid durchgeführt wurde. 3-Amino-4-iodbenzoesäure konnte in einer Ausbeute von 47 % über vier Stufen dargestellt werden (Literatur: 42 %).

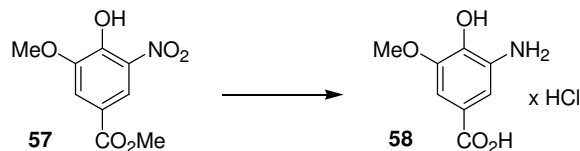
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H), 7.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 6.85 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 5.45 (bs, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.4 (s, COOH), 148.8 (s, C-3), 138.7 (d, C-5), 131.6 (s, C-1), 118.2 (d, C-6), 114.6 (d, C-2), 88.6 (s, C-4) ppm; **HRMS [ESI]** *m/z* für C₇H₅INO₂ [M-H]⁻: ber. 261.9365 gef. 261.9368; **Smp.:** 183 - 206 °C (Zers.).

5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**)^{131b}



5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**) wurde in literaturbekannter Weise aus Vanillinsäure hergestellt. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den berichteten überein.

5-Aminovanillinsäure Hydrochlorid (**58**)

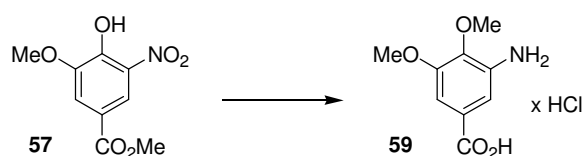


5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**) (3.633 g, 16.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (150 mL) gelöst, mit LiOH_{aq} [1 M] (80 mL, 80 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und für 3 h bei 40 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Anschließend wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, die ausgefallene Säure abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Trocknen im Vakuum lieferte 5-Nitrovanillinsäure (3.369 g, 15.8 mmol, 99 %) als farblosen Feststoff.

5-Nitrovanillinsäure (3.369 g, 15.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (150 mL) gelöst, mit Palladium [10 % auf Aktivkohle] (840 mg, 0.79 mmol, 0.05 Äq.) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde aus halbkonzentrierter Salzsäure umkristallisiert. 5-Aminovanillinsäure Hydrochlorid (**58**) (1.733 g, 7.9 mmol, 49 % ausgehend von 5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**)) wurde als grülicher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.66 (s, 2H, 2-H, 6-H), 3.97 (s, 3H, OMe) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 168.4 (s, COOH), 149.5 (s, C-3), 146.4 (s, C-5), 123.3 (s, C-4), 119.3 (s, C-1), 118.8 (d, C-6), 113.7 (d, C-2), 56.9 (q, OMe) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_4$ [M-H] $^-$: ber. 182.0453 gef. 182.0454; **Smp.**: 215-257 °C (Zers.).

3-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure Hydrochlorid (**59**)



5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**) (4.40 g, 19.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Aceton (15 mL) gelöst, mit K_2CO_3 (4.02 g, 29.1 mmol, 1.5 Äq.) und Dimethylsulfat (3.67 g, 29.1 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Wasser hydrolysiert, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Einengen im Vakuum lieferte 3,4-Dimethoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (4.65 g, 19.3 mmol, 99%) als gelben Feststoff.

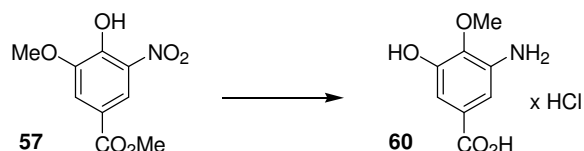
3,4-Dimethoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (4.65 g, 19.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (190 mL) gelöst, mit LiOH_{aq} [1 M] (97 mL, 97 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und für 3 h bei 40 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Anschließend wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, die ausgefallene Säure abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Trocknen im Vakuum lieferte 3,4-Dimethoxy-5-nitrobenzoesäure (4.06 g, 17.9 mmol, 93 %) als farblosen Feststoff.

3,4-Dimethoxy-5-nitrobenzoesäure (4.06 g, 17.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (170 mL) gelöst, mit Palladium [10 % auf Aktivkohle] (930 mg, 0.9 mmol, 0.05 Äq.) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde aus halbkonzentrierter Salzsäure umkristallisiert. 3-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure Hydrochlorid (**59**) (2.99 g, 12.8 mmol, 66 % ausgehend von 5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**)) wurde als grülicher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.76 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-Ar), 7.67 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-Ar), 4.09 (s, 3H, OMe), 3.98 (s, 3H, OMe) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100

MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 167.8 (s, COOH), 153.9 (s, C-5), 147.5 (s, C-3), 127.9 (s, C-4), 125.0 (s, C-1), 118.2 (d, C-6), 115.5 (d, C-2), 62.1 (q, OMe), 56.8 (q, OMe) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₉H₁₀NO₄ [M-H]⁻: ber. 196.0610 gef. 196.0608; **Smp.:** 205 °C (Zers.).

3-Amino-5-hydroxy-4-methoxybenzoesäure Hydrochlorid (**54**)



5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**) (6.93 g, 30.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in CH₂Cl₂ (12 mL) gelöst und bei -78 °C langsam zu Bortribromid [1M in CH₂Cl₂] (30.5 mL, 30.5 mmol, 3.0 Äq.) getropft. Nach Erwärmen auf RT wurde für 48 h gerührt, anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Eis hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige zweimal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit verdünnter Natronlauge [2 M] extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und dreimal mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen der vereinten Etherphasen (MgSO₄) lieferte Einengen im Vakuum 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzoesäure (4.56 g, 22.9 mmol, 75 %) als gelben Feststoff.

3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzoesäure (4.56 g, 22.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (100 mL) gelöst, mit konzentrierter Schwefelsäure (2 mL) versetzt und für 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit Diethylether aufgenommen, mit NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Einengen im Vakuum lieferte 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (4.65 g, 21.8 mmol, 95 %) als gelblichen Feststoff.

3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (4.65 g, 21.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Pyridin (35 mL) gelöst, über einen Zeitraum von 3 h mit Acetanhydrid (2.75 g, 21.8 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und über Nacht gerührt. Nach Einengen im Vakuum wurde der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit NaHCO₃-Lösung auf pH = 8 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert (Ethylacetatphasen wurden verworfen). Anschließend wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH = 4) und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten Ethylacetatphasen wurden getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum eingeeengt. Umkristallisation (CHCl₃) lieferte 3-Acetoxy-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (3.43 g, 13.1 mmol, 60 %).

3-Acetoxy-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (3.43 g, 13.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Aceton (35 mL) gelöst, mit K_2CO_3 (2.778 g, 20.1 mmol, 1.5 Äq.) und Dimethylsulfat (2.54 g, 20.1 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE:PE = 1:1) unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Wasser hydrolysiert, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na_2SO_4). Einengen im Vakuum lieferte 3-Acetoxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (3.61 g, 13.4 mmol, quant.) als bräunlichen Feststoff. 3-Acetoxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (3.61 g, 13.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (40 mL) gelöst und mit Natriummethanolat-Lösung [2.5 M in MeOH] (6.2 mL, 15.5 mmol, 1.15 Äq.) versetzt. Nach drei Stunden war die Reaktion abgeschlossen (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE:PE = 1:1) und es wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit verdünnter Schwefelsäure (0.5 M, 8 mL) aufgenommen, mit verdünnter NaOH-Lösung alkalisch eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert (die Ethylacetatphasen wurden verworfen). Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 5 eingestellt, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (Na_2SO_4). Einengen im Vakuum lieferte 3-Hydroxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (2.13 g, 9.4 mmol, 70 %).

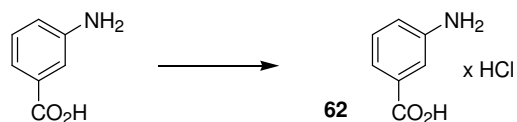
3-Hydroxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (2.13 g, 9.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (90 mL) gelöst, mit $LiOH_{aq}$ [1 M] (47 mL, 47 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und für 3 h bei 40 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Anschließend wurde der Alkohol im Vakuum entfernt, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, zweimal mit Ethylacetat extrahiert und getrocknet (Na_2SO_4). Einengen und Trocknen im Vakuum lieferte 3-Hydroxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäure (1.93 g, 9.1 mmol, 96 %) als farblosen Feststoff.

3-Hydroxy-4-methoxy-5-nitrobenzoesäure (1.93 g, 9.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH (40 mL) gelöst, mit Palladium [10 % auf Aktivkohle] (190 mg, 0.18 mmol, 0.02 Äq.) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde aus halbkonzentrierter Salzsäure umkristallisiert. 3-Amino-5-hydroxy-4-methoxybenzoesäure Hydrochlorid (**60**) (0.31 g, 1.4 mmol, 5 % ausgehend von 5-Nitrovanillinsäuremethylester (**57**)) wurde als grülicher Feststoff erhalten.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.60 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.53 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 4.09 (s, 3H, OMe) ppm; ^{13}C -NMR (100 MHz, Methanol- d_4 ,

Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 167.9 (s, COOH), 151.7 (s, C-5), 146.4 (s, C-3), 127.6 (s, C-4), 125.0 (s, C-1), 119.9 (d, C-6), 116.7 (d, C-2), 61.6 (q, OMe) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_8H_8NO_4$ [M-H]⁻: ber. 182.0453 gef. 182.0451; **Smp.:** 226-258 °C (Zers.).

3-Aminobenzoesäure Hydrochlorid (**62**)

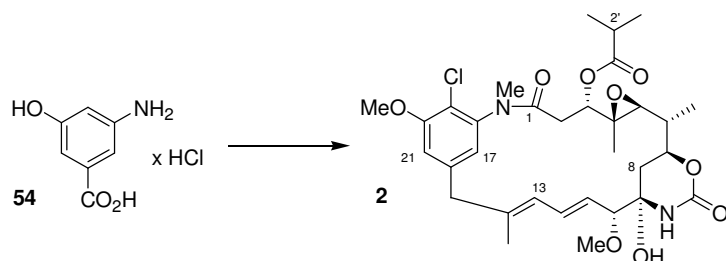


3-Aminobenzoesäure wurde durch Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure in 3-Aminobenzoesäure Hydrochlorid (**62**) überführt.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.15 (ddd, J = 7.3, 1.3, 0.9 Hz, 1H, H-6), 8.07 (dd, J = 1.9, 0.9 Hz, 1H, 2-H), 7.70 (dd, J = 8.2, 7.3 Hz, 1H, 5-H), 7.66 (ddd, J = 8.2, 1.9, 1.3 Hz, 1H, 4-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 167.8 (s, COOH), 134.3 (s, C-3), 132.5 (s, C-1), 131.6 (d, C-5), 131.2 (d, C-6), 128.4 (d, C-4), 125.4 (d, C-2) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_7H_6NO_2$ [M-H]⁻: ber. 136.0399 gef. 136.0400; **Smp.:** 223 - 279 °C (Zers.).

6.7 Mutasyntesen aus Kapitel 4.2.

Ansamitocin P-3 **2**



Die mutasynthetische Darstellung von Ansamitocin P-3 **2** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von AHBA*HCl **54** (14.2 mg, 75 μmol , gelöst in 1.5 mL Wasser) erfolgte in drei Portionen zu 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH} = 80:20 \rightarrow 100\% \text{ MeOH}$ in 30 min, dann 5 min 100% MeOH, Flussrate 2.25 \rightarrow 5 mL min^{-1} ; $t_r = 29.3$ min) gereinigt. Ansamitocin P-3 (3.8 mg, 6.0 μmol , 8.0 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 76 mg L^{-1} als farbloser Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS = 0.00 ppm): δ 6.88 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 21-H), 6.84 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.44 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.82 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.0, 10.6, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 3.99 (s, 3H, 20-OMe), 3.52 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, 15- H_b), 3.16 (s, 3H, NMe), 3.06 (bs, 1H, OH), 2.95 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.60 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.57 (dd, $J = 13.8, 12.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.20 (dd, $J = 13.8, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.64 (m, 1H, 8- H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'- Me_a), 1.26 (m, 1H, 6-H), 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'- Me_b), 0.86 (s, 3H, 4-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3 , TMS = 0.00 ppm): δ 175.7 (s, C-1'), 168.6 (s, C-1), 156.1 (s, C-20), 152.2 (s, NHCOO), 142.6 (s, C-18), 140.1 (s, C-16), 140.0 (s, C-14), 132.8 (d, C-12), 127.6 (d, C-11), 124.4 (d, C-13), 122.0 (d, C-17), 119.5 (s, C-19), 112.9 (d, C-21), 88.4 (d, C-10), 80.9 (s, C-9), 76.9 (d, C-3), 74.3 (d, C-7), 66.4 (d, C-5), 60.4 (s, C-4), 56.7 (q, 10-OMe), 56.6 (q, 20-OMe), 47.2 (t, C-15), 38.8 (d, C-6), 35.8 (t, C-8), 35.5 (q, NMe), 33.9 (d, C-2'), 32.7 (t, C-2), 20.0 (q, 2'- Me_a), 17.9 (q, 2'- Me_b), 15.8 (q, 14-Me),

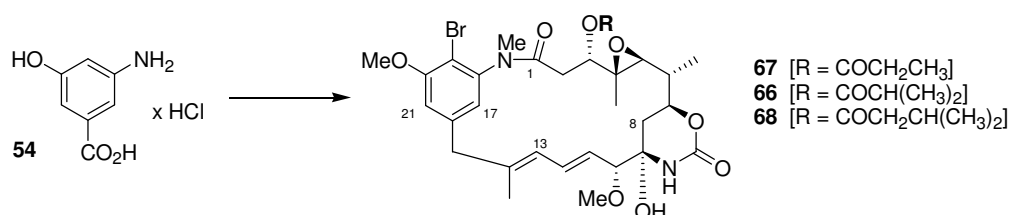
14.6 (q, 6-Me), 12.2 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.10$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{32}H_{43}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 635.2735 gef. 635.2733; **MSMS** m/z für $C_{28}H_{36}ClN_2O_7$ $[M-OC(O)CH(CH_3)_2]^+$: ber. 547.2211 gef. 547.2202.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.²¹³

19-Brom-ansamitocin P-2 **67**

19-Brom-ansamitocin P-3 **66**

19-Brom-ansamitocin P-4 **68**



Die mutasynthetische Darstellung der Brom-Ansamitocine erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Zum Zeitpunkt der Inokulation wurden die Hauptkulturen zusätzlich mit Natriumbromid-Lösung [Konzentration in Hauptkultur: $c(\text{Br}^-) = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$] versetzt.

Die Zufütterung von AHBA*HCl **54** geschah entweder pulsweise oder kontinuierlich:

A] *pulsweise*

AHBA*HCl **54** (100 mg, 525 μmol , gelöst in 10 mL Wasser) wurde in drei Portionen zu 350 mL Fermentationsmedium (7 * 50 mL) zugefüttert.

B] *kontinuierlich*

AHBA*HCl **54** (71 mg, 375 μmol , gelöst in 8 mL Wasser) wurde per Spritzenpumpe zu 250 mL Fermentationsmedium (2 * 125 mL) zugefüttert.

Der Rohextrakt wurde jeweils über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, dann 10 min 100% MeOH, Flussrate 5 \rightarrow 8 mL min⁻¹) gereinigt.

A] *pulsweise*

19-Brom-ansamitocin P-2 **67** ($t_r = 93.4$ min; 5 mg, 7.5 μmol , 1.4 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 14 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

²¹³ ¹H-NMR-Daten: K. Sakai, T. Ichikawa, K. Yamada, M. Yamachita, M. Tanimoto, A. Hikita, Y. Ijuin, K. Kondo, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 845-850; ¹³C-NMR-Daten: K. Hatano, E. Mizuta, S. Akiyama, E. Higashide, Y. Nakao, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 327-333.

19-Brom-ansamitocin P-3 **66** ($t_r = 96.9$ min; 30 mg, 44.1 μmol , 8.4 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 86 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-ansamitocin P-4 **68** ($t_r = 99.1$ min; 2 mg, 2.9 μmol , 0.5 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 6 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

B] *kontinuierlich*

19-Brom-ansamitocin P-2 **67** ($t_r = 93.4$ min; 3.5 mg, 5.3 μmol , 1.4 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 14 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-ansamitocin P-3 **66** ($t_r = 96.9$ min; 33 mg, 48.6 μmol , 13 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 132 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-ansamitocin P-4 **68** ($t_r = 99.1$ min; 1 mg, 1.4 μmol , 0.4 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 4 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-ansamitocin P-2 **67**:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.79 (2x s, 2H, 17-H, 21-H), 6.44 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.24 (s, 1H, 9-NH), 6.17 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.47 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.87 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.26 (ddd, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.99 (s, 3H, 20-OMe), 3.51 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.22 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, NMe), 3.00 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH), 2.95 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.49 (dd, $J = 13.6, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.45 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, 2'-H_a), 2.41 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.19 (dd, $J = 13.6, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (dd, $J = 13.5, 1.7$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.24 (m, 1H, 8-H_b), 1.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 2'-Me), 0.81 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 172.9 (s, C-1'), 168.8 (s, C-1), 157.2 (s, C-20), 152.3 (s, NHCOO), 144.4 (s, C-18), 141.2 (s, C-16), 140.2 (s, C-14), 132.6 (d, C-12), 128.0 (d, C-11), 124.5 (d, C-13), 122.5 (d, C-17), 112.9 (d, C-21), 110.7 (s, C-19), 88.3 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 77.0 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.6 (d, C-5), 60.4 (s, C-4), 56.84 (q, 10-OMe), 56.80 (q, 20-OMe), 47.3 (t, C-15), 38.6 (d, C-6), 35.82 (q, NMe), 35.80 (t, C-8), 32.9 (t, C-2), 27.4 (t, C-2'), 15.9 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.1 (q, 4-Me), 8.9 (q, 2'-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.01$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₁BrN₂O₉Na [M+Na]⁺: ber. 687.1893 gef. 687.1906.

19-Brom-ansamitocin P-3 **66**:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.88 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 17-H), 6.79 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 21-H), 6.44 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.21 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J =$

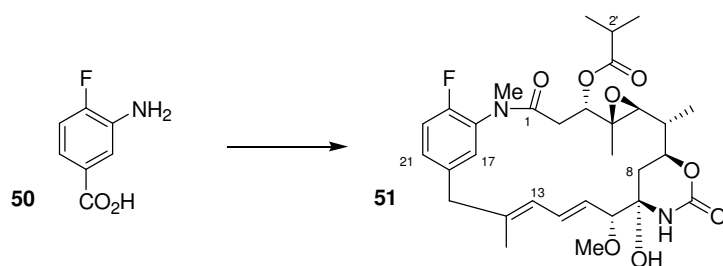
11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.45 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.81 (dd, $J = 12.1, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.99 (s, 3H, 20-OMe), 3.50 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.15 (s, 3H, NMe), 3.03 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH), 2.95 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.60 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.53 (dd, $J = 13.9, 12.1$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.20 (dd, $J = 13.9, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (m, 1H, 8-H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.284 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.283 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (m, 1H, 8-H_b), 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.81 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 175.9 (s, C-1'), 168.7 (s, C-1), 157.3 (s, C-20), 152.3 (s, NHCOO), 144.4 (s, C-18), 141.2 (s, C-16), 140.3 (s, C-14), 132.9 (d, C-12), 127.7 (d, C-11), 124.5 (d, C-13), 122.5 (d, C-17), 112.8 (d, C-21), 110.8 (s, C-19), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 77.0 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.5 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.84 (q, 10-OMe), 56.80 (q, 20-OMe), 47.3 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 35.9 (t, C-8), 35.8 (q, NMe), 34.0 (d, C-2'), 32.8 (t, C-2), 20.2 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 15.9 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.3 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.11$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{BrN}_2\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 701.2050 gef. 701.2053.

19-Brom-ansamitocin P-4 **68**:

Das P-4 Derivat liegt bei Raumtemperatur als 1.5:1-Gemisch zweier Verbindungen - wahrscheinlich zweier Konformere - vor, die sich chromatographisch nicht von einander trennen lassen. Durch Hochtemperaturmessung ($^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 , $T = 300\text{ K} \rightarrow 315\text{ K}$) konnte keine Koaleszenz der aufgespaltenen Signale bewirkt werden, so dass eine Auswertung der NMR-Spektren unterblieb.

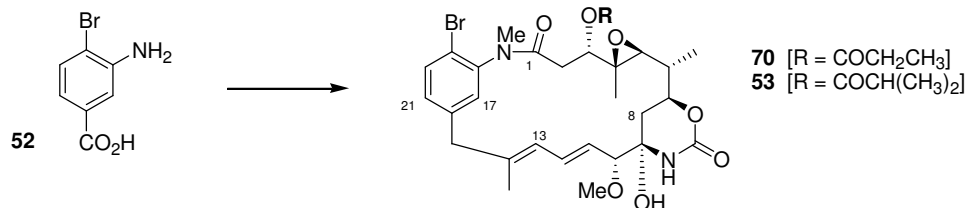
UPLC-MS $t_r = 2.24$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{BrN}_2\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 693.2387 gef. 693.2393; **MSMS** m/z für $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{BrN}_2\text{O}_7$ $[\text{M-OC(O)CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]^+$: ber. 591.1706 gef. 591.1721.

20-Desmethoxy-19-fluor-ansamitocin P-3 **51**



Die mutasynthetische Darstellung von 20-Desmethoxy-19-fluor-ansamitocin P-3 **51** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung des Fluoraromaten **50** (186 mg, 1200 μmol , gelöst in 24 mL DMSO:Wasser = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 800 mL Fermentationsmedium (16 * 50 mL). Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 30 min, dann 5 min 100 % MeOH, Flussrate 2.25 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 31.2 min) gereinigt. 20-Desmethoxy-19-fluor-ansamitocin P-3 **51** (1.2 mg, 2.0 μmol , 0.17 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 1.5 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.23 (m, 2H, 17-H, 21-H), 7.14 (m, 1H, 20-H), 6.45 (dd, J = 15.4, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.23 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, J = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.83 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.28 (ddd, J = 12.1, 10.5, 1.7 Hz, 1H, 7-H), 3.50 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.49 (d, J = 13.0 Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.22 (d, J = 13.0 Hz, 1H, 15-H_b), 3.19 (s, 3H, NMe), 3.06 (d, J = 1.1 Hz, 1H, OH), 2.96 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.68 (dd, J = 13.9, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.62 (sep, J = 6.7 Hz, 1H, 2'-H), 2.22 (dd, J = 13.9, 2.8 Hz, 1H, 2-H_b), 1.67 (s, 3H, 14-Me), 1.64 (m, 1H, 8-H_a), 1.48 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.27 (d, J = 7.3 Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (m, 1H, 8-H_b), 1.21 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.85 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 175.9 (s, C-1'), 169.0 (s, C-1), 157.0 (s, $J_{\text{F-C}}$ = 250.4 Hz, C-19), 152.3 (s, NHCOO), 140.7 (s, C-14), 136.7 (s, $J_{\text{F-C}}$ = 3.9 Hz, C-16), 132.9 (d, C-12), 131.8 (s, $J_{\text{F-C}}$ = 13.4 Hz, C-18), 130.6 (d, $J_{\text{F-C}}$ = 7.6 Hz, C-17), 130.5 (d, C-21), 127.7 (d, C-11), 124.5 (d, C-13), 116.9 (d, $J_{\text{F-C}}$ = 19.9 Hz, C-20), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 76.9 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.5 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 46.5 (t, C-15), 39.0 (d, C-6), 36.4 (q, $J_{\text{F-C}}$ = 1.8 Hz, NMe), 35.9 (t, C-8), 34.0 (d, C-2'), 33.0 (t, C-2), 20.1 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 15.9 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₁FN₂O₈Na [M+Na]⁺: ber. 611.2745 gef. 611.2744.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-2 70**19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 53**

Die mutasynthetische Darstellung der 19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocine erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von Aminobenzoesäure **52** geschah entweder pulsweise oder kontinuierlich:

A] *pulsweise*

Aminobenzoesäure **52** (65 mg, 300 μ mol, gelöst in 6 mL DMSO:Wasser = 1:1) wurde in drei Portionen zu 200 mL Fermentationsmedium (2 * 100 mL) zugefüttert.

B] *kontinuierlich*

Aminobenzoesäure **52** (132 mg, 600 μ mol, gelöst in 12 mL DMSO:Wasser = 1:1) wurde per Spritzenpumpe zu 400 mL Fermentationsmedium (4 * 100 mL) zugefüttert.

Der Rohextrakt wurde jeweils über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100 % MeOH in 100 min, dann 10 min 100% MeOH, Flussrate 5 \rightarrow 8 mL min⁻¹) gereinigt.

A] *pulsweise*

3-Amino-4-brom-benzamid **69** (t_r = 61.0 min; 40 mg, 186 μ mol, 62 %) konnte als Detoxifikationsprodukt in einer Ausbeute von 200 mg L⁻¹ isoliert werden.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-2 **70** (t_r = 97.0 min; 0.5 mg, 0.8 μ mol, 0.3 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 2.5 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** (t_r = 99.1 min; 1.8 mg, 2.8 μ mol, 0.9 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 9 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

B] *kontinuierlich*

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-2 **70** (t_r = 97.0 min; 0.9 mg, 1.4 μ mol, 0.2 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 2.3 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** ($t_r = 99.1$ min; 6.0 mg, 9.2 μmol , 1.5 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 15 mg L⁻¹ als farbloser Feststoff isoliert werden.

3-Amino-4-brombenzamid **69**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 5-H), 7.28 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 2-H), 7.00 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H, 6-H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 172.1 (s, CONH₂), 146.9 (s, C-3), 135.3 (s, C-1), 133.5 (d, C-5), 118.0 (d, C-6), 115.7 (d, C-2), 113.1 (s, C-4) ppm; HRMS [ESI] m/z für C₇H₆BrN₂O [M-H]: ber. 212.9669 gef. 212.9672.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-2 **70**:

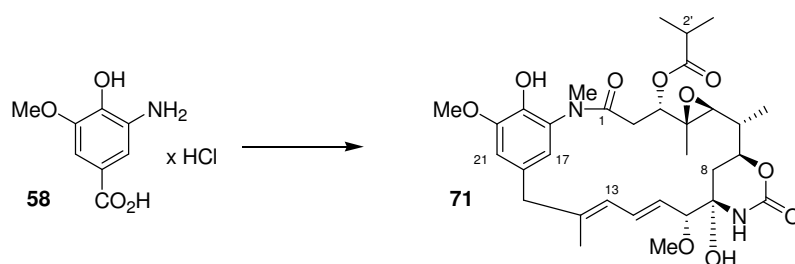
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.63 (m, 1H, 20-H), 7.14 (m, 2H, 17-H, 21-H), 6.43 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.25 (s, 1H, 9-NH), 6.17 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.47 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.86 (dd, $J = 11.9, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.26 (ddd, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.24 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.18 (s, 3H, NMe), 3.01 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH), 2.91 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.48 (dq, $J = 16.7, 7.4$ Hz, 1H, 2'-H_a), 2.45 (dd, $J = 13.7, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.41 (dq, $J = 16.7, 7.4$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.21 (dd, $J = 13.7, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.66 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (m, 1H, 8-H_a), 1.45 (m, 1H, 6-H), 1.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.22 (m, 1H, 8-H_b), 1.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 2'-Me), 0.79 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 172.9 (s, C-1'), 168.9 (s, C-1), 152.3 (s, NHCOO), 143.2 (s, C-18), 141.0 (s, C-16), 140.4 (s, C-14), 133.8 (d, C-20), 132.6 (d, C-12), 130.9 (2x d, C-17, C-21), 128.0 (d, C-11), 124.4 (d, C-13), 121.3 (s, C-19), 88.3 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 77.0 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.7 (d, C-5), 60.3 (s, C-4), 56.9 (q, 10-OMe), 46.7 (t, C-15), 38.6 (d, C-6), 35.9 (t, C-8), 35.8 (q, NMe), 32.8 (t, C-2), 27.4 (t, C-2'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.0 (q, 4-Me), 8.9 (q, 2'-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 2.11$ min; HRMS [ESI] m/z für C₃₀H₄₀BrN₂O₈ [M+H]⁺: ber. 635.1968 gef. 635.1968.

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53**:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 20-H), 7.24 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 17-H), 7.15 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H, 21-H), 6.43 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.21 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.45 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.80 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.2, 10.5, 1.8$ Hz, 1H, 7-H), 3.49 (d,

$J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.24 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.17 (s, 3H, NMe), 3.03 (bs, 1H, OH), 2.95 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.71 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.49 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.22 (dd, $J = 13.9, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.67 (s, 3H, 14-Me), 1.61 (m, 1H, 8-H_a), 1.45 (m, 1H, 6-H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (m, 1H, 8-H_b), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.78 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 175.8 (s, C-1'), 168.7 (s, C-1), 152.3 (s, NHCOO), 143.2 (s, C-18), 141.0 (s, C-16), 140.5 (s, C-14), 133.9 (d, C-20), 132.9 (d, C-12), 130.9 (d, C-17), 130.8 (d, C-21), 127.7 (d, C-11), 124.3 (d, C-13), 121.3 (s, C-19), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 77.0 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.6 (d, C-5), 60.4 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 46.7 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 35.89 (t, C-8), 35.88 (q, NMe), 34.0 (d, C-2'), 32.8 (t, C-2), 20.2 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.2 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 2.19$ min; HRMS [ESI] m/z für $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{BrN}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 649.2125 gef. 649.2122.

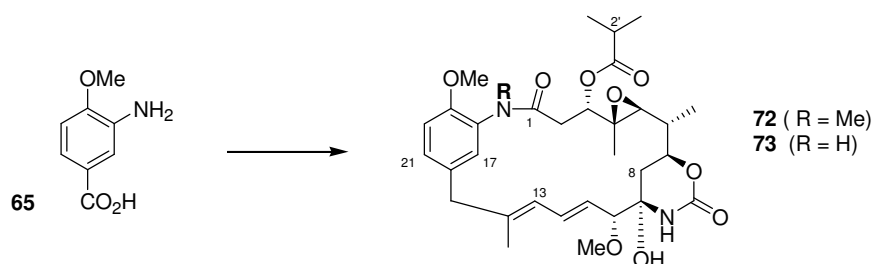
19-Hydroxy-ansamitocin P-3 71



Die mutasynthetische Darstellung von 19-Hydroxy-ansamitocin P-3 **71** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von Aminobenzoesäure Hydrochlorid **58** (132 mg, 600 μmol , gelöst in 12 mL Wasser) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu 400 mL Fermentationsmedium (4 * 100 mL). Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH} = 80:20 \rightarrow 100\%$ MeOH in 100 min, dann 10 min 100 % MeOH, Flussrate $5 \rightarrow 8$ mL min^{-1} ; $t_r = 87.8$ min) gereinigt. Aufgrund der geringen Fermentationsausbeute konnte 19-Hydroxy-ansamitocin P-3 **71** (~0.2 mg, 0.32 μmol , 0.05 %) nicht vollständig ($^{13}\text{C-NMR}$, Testung der antiproliferativen Aktivität) charakterisiert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2 , $\text{CHDCl}_2 = 5.32$ ppm): δ 6.78 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 17-H), 6.74 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 21-H), 6.47 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.19 (s, 1H, 9-NH), 6.14 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.44 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.71 (dd, $J = 12.0, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.22 (ddd, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.95 (s, 3H, 20-OMe), 3.52 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.14 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, OH), 3.122 (s, 3H, NMe), 3.116 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.85 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.71 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.61 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.10 (dd, $J = 13.9, 2.8$ Hz, 1H, 2- H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.59 (m, 1H, 8- H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.242 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.237 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'- Me_a), 1.21 (m, 1H, 8- H_b), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'- Me_b), 0.84 (s, 3H, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 639.2894 gef. 639.2892; m/z für $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: ber. 615.2918 gef. 615.2918.

20-Desmethoxy-19-methoxy-ansamitocin P-3 **72**



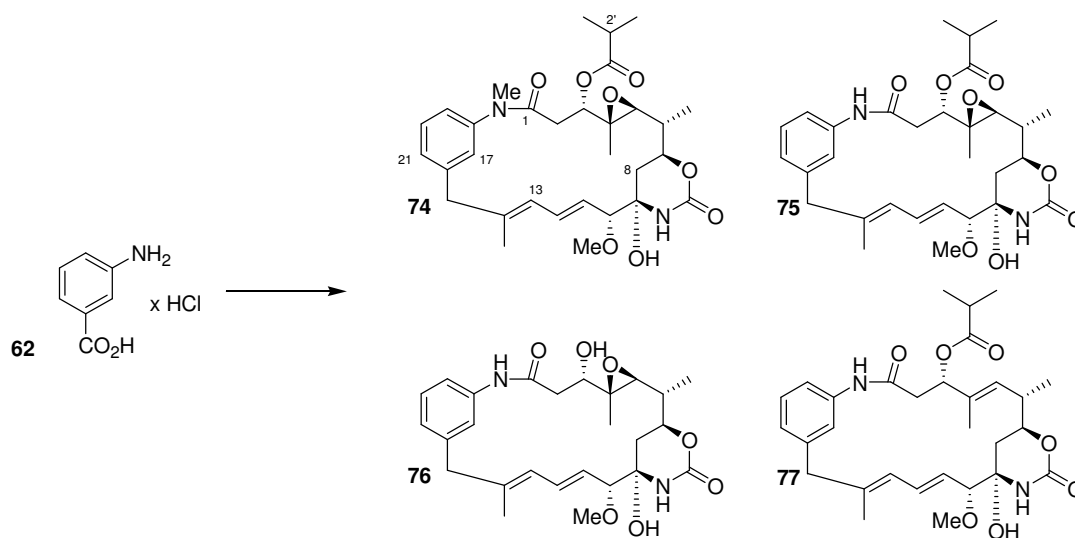
Die mutasynthetische Darstellung von 20-Desmethoxy-19-methoxy-ansamitocin P-3 **72** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von 3-Amino-4-methoxybenzoesäure (**65**) (12.5 mg, 75 μmol , gelöst in 1.5 mL DMSO:Wasser = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und direkt über UPLC-MS analysiert. Massenspektrometrisch konnte neben dem vollständig prozessierten Mutasyntheseprodukt **72** auch ein weniger prozessiertes Derivat **73** detektiert werden.

N-Desmethyl-20-desmethoxy-19-methoxy-ansamitocin P-3 **73**:

UPLC-MS $t_r = 1.80$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 587.2969 gef. 587.2950.

20-Desmethoxy-19-methoxy-ansamitocin P-3 **72**:

UPLC-MS $t_r = 2.04$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{32}H_{45}N_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 601.3125 gef. 601.3130.

19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74**

Die mutasynthetische Darstellung von 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von 3-Aminobenzoessäure Hydrochlorid (**62**) (260 mg, 1500 μ mol, gelöst in 20 mL Wasser) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu 1000 mL Fermentationsmedium (8 * 125 mL). Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient $H_2O:MeOH = 80:20 \rightarrow 100\%$ MeOH in 100 min, dann 10 min 100 % MeOH, Flussrate $5 \rightarrow 8$ mL min^{-1} ; $t_r = 91.2$ min) gereinigt. Die Fermentationsausbeute war so gering, dass die Quantifizierung durch UV-Absorptionsvergleich ($\lambda = 248$ nm) erfolgte, wobei als Referenz zuvor eine Kalibrationsgerade mit semisynthetisch dargestelltem Derivat **74** (*vide infra*) erstellt wurde (siehe Kapitel 7.2). 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** (394 μ g, 0.69 μ mol, 0.05 %) konnte in einer Fermentationsausbeute von 0.4 mg mL^{-1} isoliert werden. Es konnte an dieser Stelle keine vollständige Analytik (^{13}C -NMR, Bio-, „Assay“) erfasst werden. Massenspektrometrisch konnten neben dem vollständig prozessierten Mutasyntheseprodukt **74** auch die Derivate **75** (nicht von *Asm10* prozessiert), **76** (nicht von *Asm10* und *Asm19* prozessiert) und **77** (nicht von *Asm10* und *Asm11* prozessiert) detektiert werden

***N*-Desmethyl-19-deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-0 76:**

UPLC-MS $t_r = 1.68$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{26}H_{35}N_2O_7$ $[M+H]^+$: ber. 487.2444 gef. 487.2453.

***N*-Desmethyl-19-deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 75:**

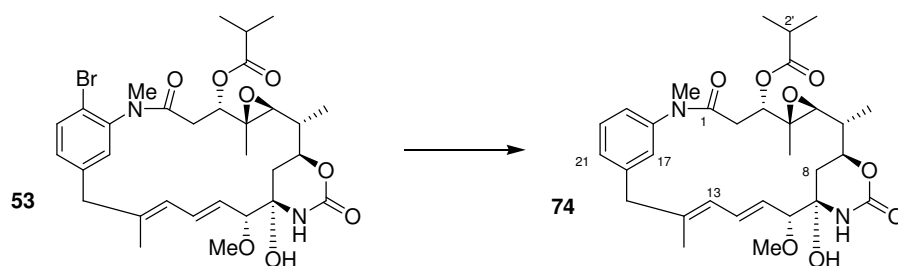
UPLC-MS $t_r = 1.85$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{30}H_{40}N_2O_8Na$ $[M+Na]^+$: ber. 579.2682 gef. 579.2684.

19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 74:

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7.26$ ppm): δ 7.43 (dd, $J = 7.9, 7.7$ Hz, 1H, 20-H), 7.26 (ddd, $J = 7.7, 1.8, 0.8$ Hz, 1H, 21-H), 7.22 (dd, $J = 2.0, 1.8$ Hz, 1H, 17-H), 7.14 (ddd, $J = 7.9, 2.0, 0.8$ Hz, 1H, 19-H), 6.45 (dd, $J = 15.4, 10.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.21 (s, 1H, 9-NH), 6.18 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, $J = 12.0, 2.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.2, 10.5, 1.9$ Hz, 1H, 7-H), 3.51 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.50 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.26 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.23 (s, 3H, NMe), 3.02 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, OH), 2.94 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.67 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.63 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.21 (dd, $J = 13.9, 2.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.65 (m, 1H, 8-H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.285 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.276 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.24 (m, 1H, 8-H_b), 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.81 (s, 3H, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.06$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{43}N_2O_8$ $[M+H]^+$: ber. 571.3019 gef. 571.3011.

***N*-Desmethyl-19-deschloro-4,5-desepoxy-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 77:**

UPLC-MS $t_r = 2.06$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{30}H_{40}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: ber. 563.2733 gef. 563.2723.

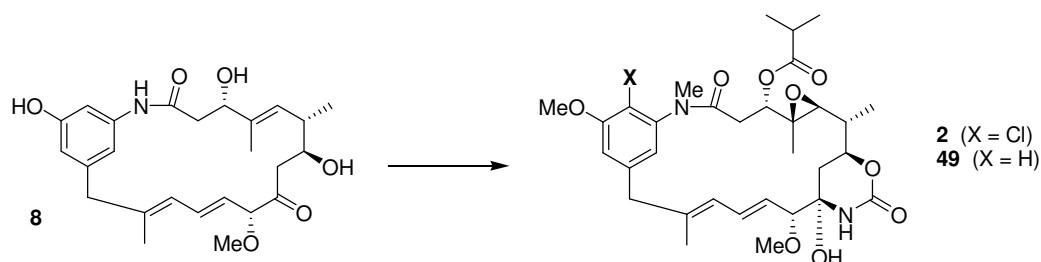
19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 74

Zur semisynthetischen Darstellung von 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** wurde 19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** (2.0 mg, 3.08 μmol , 1.0 Äq.) in entgastem Toluol (2 mL) gelöst und anschließend mit Tributylzinnhydrid (2.2 mg, 7.7 μmol , 1.0 Äq.) versetzt. Nach Entgasen der Lösung (*freeze-pump-thaw*, mind. dreimal) wurde Pd[P(*t*Bu)₃]₂ (0.1 mg, 0.15 μmol , 0.05 Äq.) zugegeben und bei 60 °C bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Phosphatpuffer-Lösung und KF-Lösung hydrolysiert und über Nacht intensiv gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit *n*-Hexan aufgenommen und dreimal mit Acetonitril extrahiert. Nach Aufkonzentrieren der Acetonitrilphasen wurde das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 29.3 min) gereinigt. 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** (1.4 mg, 2.46 μmol , 80 %) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden. Es wurde eine Verdünnungsreihe (8 μg , 40 μg) erstellt und über *reversed phase* HPLC (gleiches Programm) analysiert. Aus der UV-Absorption (λ = 248 nm) wurde eine Kalibrationsgerade für die Quantifizierung der mutasynthetischen Darstellung dieser Verbindung erstellt (siehe Kapitel 7.2).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.43 (dd, J = 7.9, 7.7 Hz, 1H, 20-H), 7.26 (ddd, J = 7.7, 1.8, 0.8 Hz, 1H, 21-H), 7.22 (dd, J = 2.0, 1.8 Hz, 1H, 17-H), 7.14 (ddd, J = 7.9, 2.0, 0.8 Hz, 1H, 19-H), 6.45 (dd, J = 15.4, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.21 (s, 1H, 9-NH), 6.18 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, J = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, J = 12.0, 2.9 Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, J = 12.2, 10.5, 1.9 Hz, 1H, 7-H), 3.51 (d, J = 13.1 Hz, 1H, 15-H_a), 3.50 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.26 (d, J = 13.1 Hz, 1H, 15-H_b), 3.23 (s, 3H, NMe), 3.02 (d, J = 2.2 Hz, 1H, OH), 2.94 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.67 (dd, J = 13.9, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.63 (sep, J = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.21 (dd, J = 13.9, 2.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.65 (m, 1H, 8-H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.285 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me), 1.276 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.24 (m, 1H, 8-H_b), 1.20 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.81 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.0 (s, C-1'), 168.8 (s, C-1), 152.3 (s, NHCOO), 144.6 (s, C-18), 141.6 (s, C-16), 141.0 (s, C-14), 133.0 (d, C-12), 130.2 (d, C-20), 129.0 (d, C-21), 128.5 (d, C-17), 127.4 (d, C-11), 125.5 (d, C-19), 124.4 (d, C-13), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 76.3 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.0 (d, C-5), 60.6 (s, C-4),

56.8 (q, 10-OMe), 47.1 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 37.6 (q, NMe), 35.9 (t, C-8), 34.0 (d, C-2'), 33.5 (t, C-2), 20.1 (q, 2'-Me_a), 18.1 (q, 2'-Me_b), 16.0 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.6 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** t_r = 2.06 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₃N₂O₈ [M+H]⁺: ber. 571.3019 gef. 571.3016.

Fütterungsstudie mit Proansamitocin 8



Die Verfütterung von Proansamitocin **8** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von Proansamitocin **8** (1.2 mg, 2.6 μ mol, gelöst in 1.5 mL DMSO:Wasser = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 25 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde im Vakuum eingengt, in MeOH (1 mL) gelöst und direkt per LC-MS analysiert. Massenspektrometrisch konnte neben dem vollständig prozessierten AP-3 **2** auch das Deschloro-Derivat **49** detektiert werden.

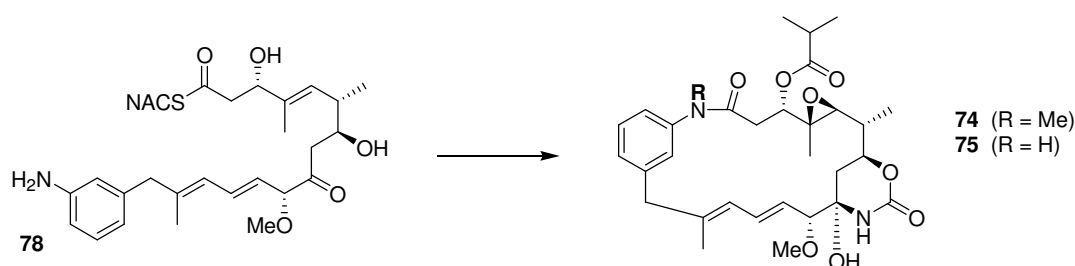
Ansamitocin P-3 **2**:

HRMS [ESI] m/z für C₃₂H₄₄ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735 gef. 635.2728.

19-Deschloro-ansamitocin P-3 **49**:

HRMS [ESI] m/z für C₃₂H₄₅N₂O₈ [M+H]⁺: ber. 601.3125 gef. 601.3138.

Fütterungsstudie mit 20-Desmethoxy-*seco*-Proansamitocin **78**



Die mutasynthetische Darstellung von 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung von 20-Deshydroxy-*seco*-Proansamitocin **78** (1.2 mg, 2.2 μmol , gelöst in 4 mL DMSO:Wasser = 1:1) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu 25 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in MeOH (1 mL) gelöst und direkt über UPLC-MS analysiert. Massenspektrometrisch konnten neben dem vollständig prozessierten Mutasyntheseprodukt **74** auch das nicht durch *Asm10* prozessierte Derivat **75** detektiert werden.

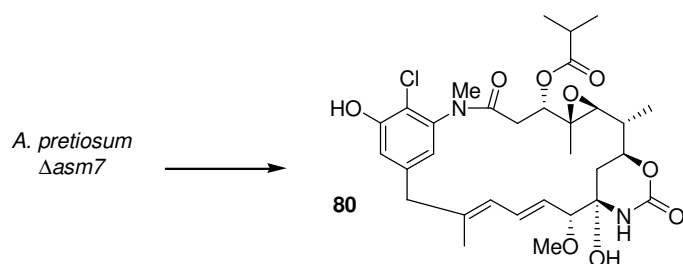
Zur Quantifizierung wurde der Rohextrakt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 45 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 mL min⁻¹; t_r = 31.3 min) gereinigt und die Absorption (λ = 248 nm) mit einer zuvor erstellten Kalibrationsgeraden (siehe Kapitel 7.2) verglichen. Die Ausbeute von 19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74** (14 μg , 0.025 μmol , 1.1 %) war zu gering, um an dieser Stelle eine vollständige Strukturanalytik (NMR) und biologische Testungen (Antiproliferationstest) zu betreiben. Durch Vergleich mit semisynthetischer Substanz (*vide supra*) konnte die Identität belegt werden.

N-Desmethyl-19-deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **75**:

UPLC-MS t_r = 1.85 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₀H₄₀N₂O₈Na [M+Na]⁺: ber. 579.2682 gef. 579.2684; **MSMS** m/z für C₂₆H₃₂N₂O₆Na [M+Na-HOC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 491.2108 gef. 491.2112.

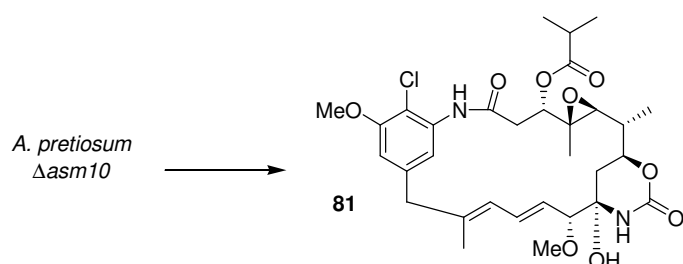
19-Deschloro-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **74**:

UPLC-MS t_r = 2.06 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₃N₂O₈ [M+H]⁺: ber. 571.3019 gef. 571.3004; m/z für C₃₁H₄₂N₂O₈Na [M+Na]⁺: ber. 593.2839 gef. 593.2828; **MSMS** m/z für C₂₇H₃₅N₂O₆ [M-OC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 483.2495 gef. 483.2491; m/z für C₂₇H₃₄N₂O₆Na [M+Na-HOC(O)CH(CH₃)₂]⁺: ber. 505.2315 gef. 505.2305.

***O*-Desmethyl-ansamitocin P-3 80**

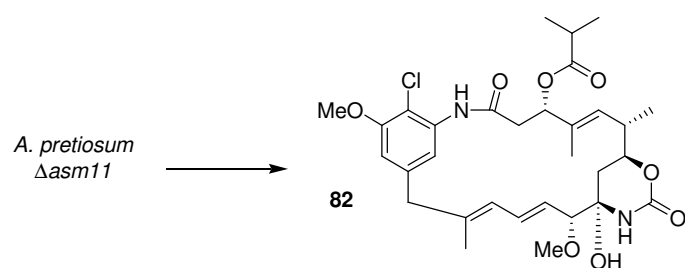
Die mutasynthetische Darstellung von *O*-Desmethyl-ansamitocin P-3 **80** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* $\Delta asm7$ in 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde in MeOH (1 mL) gelöst und direkt massenspektrometrisch untersucht.

UPLC-MS $t_r = 1.75$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{42}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 621.2579 gef. 621.2585.

***N*-Desmethyl-ansamitocin P-3 81**

Die mutasynthetische Darstellung von *N*-Desmethyl-ansamitocin P-3 **81** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* $\Delta asm10$ in 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde in MeOH (1 mL) gelöst und direkt massenspektrometrisch untersucht.

UPLC-MS $t_r = 1.69$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{42}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 621.2579 gef. 621.2576.

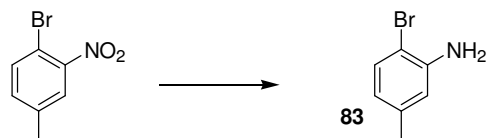
4,5-Desepoxy-*N*-desmethyl-ansamitocin P-3 82

Die mutasynthetische Darstellung von 4,5-Desepoxy-*N*-desmethyl-ansamitocin P-3 **82** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll (Kapitel 6.2) mit *A. pretiosum* $\Delta asm11$ in 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde in MeOH (1 mL) gelöst und direkt massenspektrometrisch untersucht. Neben 4,5-Desepoxy-*N*-desmethyl-Ansamitocin P-3 **82** konnte auch vollständig prozessiertes AP-3 **2** detektiert werden.

UPLC-MS $t_r = 2.18$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{42}ClN_2O_8$ $[M+H]^+$: ber. 605.2630 gef. 605.2619.

6.8 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.3

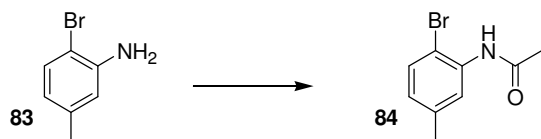
2-Brom-5-methylanilin (**83**)



4-Brom-3-nitrotoluol (1.0 g, 4.63 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethylacetat (20 mL) gelöst und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.22 g, 23.16 mmol, 5.0 Äq.) und Eisessig (0.5 mL) versetzt. Die Mischung wurde bei 70 °C bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 1:1), anschließend mit Eis hydrolysiert und mit K_2CO_3 -Lösung auf pH = 9 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na_2SO_4). Einengen im Vakuum lieferte Anilinderivat **83** (791 mg, 4.25 mmol, 92 %) als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 3-H), 6.63 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 6-H), 6.49 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, 4-H), 3.99 (bs, 2H, NH), 2.23 (s, 3H, 5-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 143.9 (s, C-1), 138.5 (s, C-5), 132.4 (d, C-3), 120.6 (d, C-4), 116.6 (d, C-6), 106.3 (s, C-2), 21.2 (q, 5-Me) ppm; **HRMS** [EI] m/z für $\text{C}_7\text{H}_8\text{BrN}$ [M] $^+$: ber. 184.9840 gef. 184.9841; **Smp.:** 102 - 105 °C.

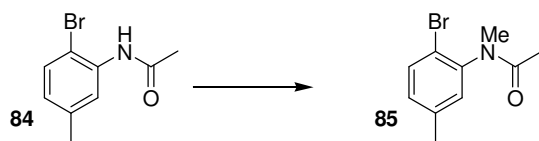
N-(2-Brom-5-methylphenyl)-acetamid (**84**)



2-Brom-5-methylanilin (**83**) (687 mg, 3.69 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dioxan (10 mL) gelöst und mit Pyridin (0.53 mL, 5.54 mmol, 1.5 Äq.) und Acetanhydrid (0.45 mL, 5.54 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Nach 7 h war die Reaktion abgeschlossen und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan aufgenommen, mit verdünnter Schwefelsäure [1 M] gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 2:1) Acetamid **84** (765 mg, 3.35 mmol, 91 %) als farblosen Feststoff.

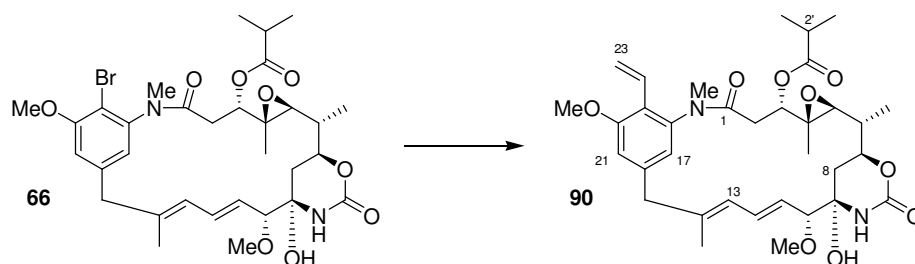
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 6-H), 7.53 (bs, 1H, NH), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 3-H), 6.79 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 2.32 (s, 3H, 5-Me), 2.22 (s, 3H, COMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 168.3 (s, NHCOMe), 138.8 (s, C-1), 135.5 (s, C-5), 131.9 (d, C-3), 126.2 (d, C-4), 122.6 (d, C-6), 110.0 (s, C-2), 25.0 (q, COMe), 21.4 (q, 5-Me) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₉H₁₀BrNO [M]⁺: ber. 226.9946 gef. 226.9945; **Smp.:** 121 - 122 °C.

N-(2-Brom-5-methylphenyl)-*N*-methylacetamid (**85**)



Natriumhydrid [60 %ige Suspension] (43 mg, 1.08 mmol, 1.5 Äq.) wurde zweimal mit n-Hexan gewaschen, auf 0 °C gekühlt und mit Acetamid **84** [0.5 M in THF] (165 mg, 0.72 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Nach 10 min wurde Methyljodid (345 µL, 5.54 mmol, 7.7 Äq.) zugegeben, auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Nach 15 h wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Diethylether und Wasser aufgenommen und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Diethylether extrahiert, die vereinten organischen Phasen getrocknet (Na₂SO₄). Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 3:1 → 2:1) *N*-Methylacetamid **85** (142 mg, 0.59 mmol, 82 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 3-H), 7.07 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 6-H), 7.03 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, 4-H), 3.14 (s, 3H, NMe), 2.32 (s, 3H, 5-Me), 2.22 (s, 3H, COMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 170.5 (s, NMeCOMe), 142.9 (s, C-1), 139.5 (s, C-5), 133.5 (d, C-3), 130.7 (d, C-4), 130.2 (d, C-6), 119.8 (s, C-2), 35.8 (q, NMe), 22.2 (q, COMe), 20.9 (q, 5-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₂H₁₆BrN₂O [M+MeCN+H]⁺: ber. 283.0446 gef. 283.0446; **Smp.:** 71 - 72 °C.

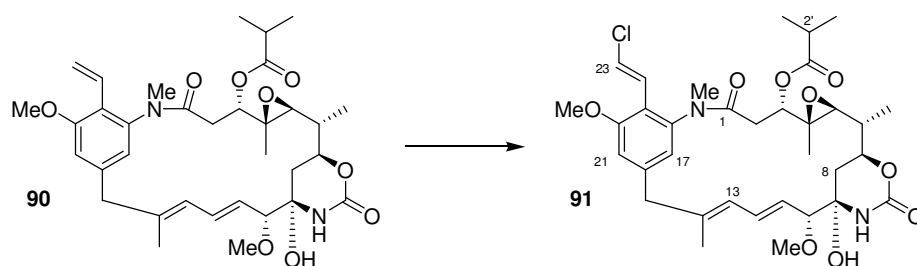
19-Vinyl-ansamitocin P-3 90

19-Brom-ansamitocin P-3 **66** (9 mg, 13.2 μmol , 1.0 \AA q.) wurde in entgastem Toluol (2 mL) gelöst und mit Tributylvinylstannan (10 μL , 33.0 μmol , 2.5 \AA q.) versetzt. Nach Entgasen der Reaktionslösung (*freeze-pump-thaw*, mind. dreimal) wurde $\text{Pd}[\text{P}(t\text{Bu})_3]_2$ (0.3 mg, 0.66 μmol , 0.05 \AA q.) zugegeben und anschließend 20 h bei 110 $^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Phosphatpuffer-Lösung (2 mL) und KF-Lösung (2 mL) hydrolysiert und über Nacht intensiv gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (MgSO_4). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 80:20 \rightarrow 100\% \text{ MeCN}$ in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min^{-1} ; $t_r = 30.7$ min) gereinigt. 19-Vinyl-ansamitocin P-3 **90** (3 mg, 4.8 μmol , 36 %) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden. Weiterhin konnte nicht umgesetztes Edukt **66** (4 mg, 5.9 μmol , 45 %) reisoliert werden. Eine Verbesserung der Ausbeute konnte nicht erreicht werden: Bei längeren Reaktionszeiten oder bei Verwendung von größeren Mengen des Katalysators findet vermehrt Dehalogenierung als Nebenreaktion statt.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 6.80 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.76 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 21-H), 6.57 (dd, $J = 17.9, 12.0$ Hz, 1H, 22-H), 6.45 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.20 (s, 1H, 9-NH), 6.15 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.91 (dd, $J = 17.9, 2.0$ Hz, 1H, 23- H_a), 5.49 (dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, 1H, 23- H_b), 5.45 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.28 (ddd, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.95 (s, 3H, 20-OMe), 3.51 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.20 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15- H_b), 3.09 (s, 3H, NMe), 3.01 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, OH), 2.96 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.72 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.62 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.16 (dd, $J = 13.9, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.64 (m, 1H, 8- H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'- Me_a), 1.28 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (m, 1H, 8- H_b), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'- Me_b), 0.83 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz,

CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.0 (s, C-1'), 169.1 (s, C-1), 158.9 (s, C-20), 152.3 (s, NHCOO), 143.3 (s, C-18), 140.8 (s, C-16), 140.7 (s, C-14), 133.1 (d, C-12), 127.6 (d, C-22), 127.4 (d, C-11), 124.3 (d, C-13), 122.2 (s, C-19), 121.5 (d, C-21), 121.0 (t, C-23), 112.3 (d, C-17), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 77.0 (d, C-3), 74.5 (d, C-7), 66.5 (d, C-5), 60.6 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 56.0 (q, 20-OMe), 47.5 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 36.3 (q, NMe), 35.9 (t, C-8), 34.0 (d, C-2'), 32.9 (t, C-2), 20.2 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 16.0 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₄H₄₆N₂O₉Na [M+Na]⁺: ber. 649.3101 gef. 649.3101.

19-(2-Chlorvinyl)-ansamitocin P-3 **91**

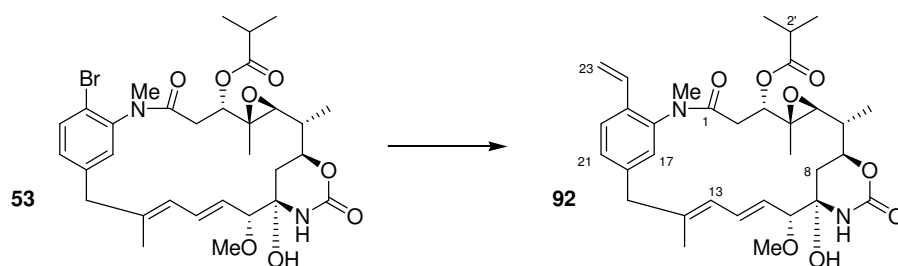


Die NMR-Probe von 19-Vinyl-ansamitocin P-3 **90** (3 mg in 0.7 mL CDCl₃) wurde im Vakuum eingengt, über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 60:40 \rightarrow 100 % MeOH in 45 min, dann 5 min 100 % MeOH, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 17.9 min) gereinigt. Neben zahlreichen nicht identifizierbaren Zersetzungsprodukten wurde als Hauptfraktion Chlorvinylderivat **91** (0.7 mg, 1.1 μ mol, 23 %) isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.18 (d, J = 13.6 Hz, 1H, 23-H), 6.81 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 17-H), 6.77 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 21-H), 6.67 (d, J = 13.6 Hz, 1H, 22-H), 6.44 (dd, J = 15.4, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.20 (s, 1H, 9-NH), 6.15 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.45 (dd, J = 15.4, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, J = 12.0, 3.1 Hz, 1H, 3-H), 4.28 (ddd, J = 12.2, 10.5, 1.8 Hz, 1H, 7-H), 3.97 (s, 3H, 20-OMe), 3.504 (d, J = 12.9 Hz, 1H, 15-H_a), 3.495 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, J = 12.8 Hz, 1H, 15-H_b), 3.12 (s, 3H, NMe), 3.01 (d, J = 2.4 Hz, 1H, OH), 2.96 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.66 (dd, J = 14.0, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.61 (sep, J = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.19 (dd, J = 14.0, 3.1 Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.63 (m, 1H, 8-H_a), 1.47 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me), 1.28 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.25 (m, 1H, 8-H_b), 1.21 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.82 (s, 3H, 4-

Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 175.9 (s, C-1'), 169.1 (s, C-1), 158.6 (s, C-20), 152.3 (s, NHCOO), 143.0 (s, C-18), 141.3 (s, C-16), 140.3 (s, C-14), 133.0 (d, C-12), 127.6 (d, C-11), 125.6 (d, C-23), 124.5 (d, C-13), 123.9 (d, C-22), 121.6 (d, C-21), 119.4 (s, C-19), 112.3 (d, C-17), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 77.1 (d, C-3), 74.5 (d, C-7), 66.5 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 56.1 (q, 20-OMe), 47.5 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 36.8 (q, NMe), 35.9 (t, C-8), 33.9 (d, C-2'), 32.9 (t, C-2), 20.2 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 16.0 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{ClN}_2\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 683.2711 gef. 683.2715.

20-Desmethoxy-19-vinyl-ansamitocin P-3 **92**

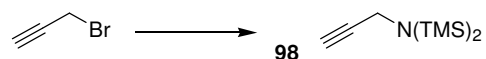


19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** (1.5 mg, 2.3 μmol , 1.0 Äq.) wurde in entgastem Toluol (1 mL) gelöst und mit Tributylvinylstannan (2 μL , 5.8 μmol , 2.5 Äq.) versetzt. Nach Entgasen der Reaktionslösung (*freeze-pump-thaw*, mind. dreimal) wurde $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ (0.1 mg, 0.07 μmol , 0.03 Äq.) zugegeben und anschließend 20 h bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Phosphatpuffer-Lösung (2 mL) und KF-Lösung (2 mL) hydrolysiert und über Nacht intensiv gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (MgSO_4). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand über eine kurze Kieselgelsäule (EE) filtriert und das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH} = 80:20 \rightarrow 100\% \text{ MeOH}$ in 90 min, dann 10 min 100% MeOH, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min^{-1} ; $t_r = 40.1$ min) gereinigt. 20-Desmethoxy-19-vinyl-ansamitocin P-3 **92** (1.3 mg, 2.18 μmol , 95%) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 20-H), 7.25 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, 21-H), 7.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 17-H), 6.66 (dd, $J = 17.6, 11.0$ Hz, 1H, 22-H), 6.44 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.20 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.79 (dd, $J = 17.6, 0.9$ Hz, 1H, 23-H_a), 5.44 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 5.37 (dd,

$J = 11.0, 0.9$ Hz, 1H, 23-H_b), 4.81 (dd, $J = 12.0, 3.1$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.2, 10.4, 1.9$ Hz, 1H, 7-H), 3.491 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.487 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.25 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.14 (s, 3H, NMe), 3.03 (bs, 1H, OH), 2.94 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.63 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.60 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.16 (dd, $J = 13.9, 3.1$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (m, 1H, 8-H_a), 1.45 (m, 1H, 6-H), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.28 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.24 (m, 1H, 8-H_b), 1.21 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.78 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.0 (s, C-1'), 169.1 (s, C-1), 152.3 (s, NHCOO), 141.8 (s, C-18), 141.1 (s, C-16), 141.0 (s, C-14), 133.8 (s, C-19), 133.1 (d, C-12), 130.9 (d, C-22), 129.7 (d, C-21), 129.3 (d, C-17), 127.3 (d, C-11), 126.6 (d, C-20), 124.1 (d, C-13), 117.4 (t, C-23), 88.5 (d, C-10), 81.0 (s, C-9), 76.7 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 66.4 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 46.9 (t, C-15), 38.9 (d, C-6), 36.8 (q, NMe), 35.9 (t, C-8), 34.0 (d, C-2'), 32.9 (t, C-2), 20.2 (q, 2'-Me_a), 18.0 (q, 2'-Me_b), 15.9 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.2 (q, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₃H₄₄N₂O₈Na [M+Na]⁺: ber. 619.2995 gef. 619.2995.

N,N-Bis(trimethylsilyl)propargylamin (**98**)^{184b}



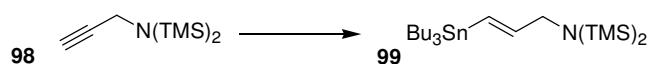
LiHMDS [95 %] (10.0 g, 60 mmol, 2.05 Äq.) wurde in Diethylether (60 mL) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Nach langsamer Zugabe von Propargylbromid (3.1 mL, 29 mmol, 1.0 Äq.) wurde über Nacht bei -20 °C gerührt und anschließend mit eisgekühlter Phosphatpuffer-Lösung [3.8 g KH₂PO₄, 4.5 g Na₂HPO₄·4H₂O, 200 mL Wasser] hydrolysiert. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und die organischen Phasen des Filtrats wurden vereint. Nach Waschen mit NaCl-Lösung und Trocknen über Na₂CO₃ wurde im Vakuum eingengt. Destillation unter vermindertem Druck (70 - 75 °C, 25 mbar) lieferte silylgeschütztes Propargylamin **98** (1.81 g, 9.1 mmol, 31 %) als farblose Flüssigkeit. Die Reaktion lief bei -20 °C entgegen der Literatur nicht bis zum vollständigen Umsatz, daher konnte als erste Fraktion der Destillation (TMS)₂NH (3.52 g, 21.9 mmol, 37 %, Sdp. 44 - 45 °C (60 mbar)) isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 3.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, CH₂N), 2.14 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, HC≡C), 0.15 (s, 18 H, 2x TMS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ =

77.16 ppm): δ 86.3 (s, HC \equiv C), 69.8 (d, HC \equiv C), 34.0 (t, CH₂N), 1.8 (q, TMS) ppm; **Sdp.:** 70 – 75 °C (25 mbar).

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.^{184b}

1,1,1,3,3,3-Hexamethyl-2-(3-tributylstannanyl-allyl)-disilazan (**99**)^{184a}



Propargylamin **98** (1.8 g, 9.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Tributylzinnhydrid (2.7 mL, 9.9 mmol, 1.1 Äq.) und AIBN (15 mg, 0.09 mmol, 0.01 Äq.) versetzt und für 24 h auf 65 °C erhitzt. Nach vollständigem Umsatz (Kontrolle per NMR) wurde das Produkt durch Destillation isoliert. Nach mehrmaliger Kugelrohrdestillation (140 °C, $1.7 \cdot 10^{-1}$ mbar) wurde Aminopropenylstannan **99** (3.25 g, 6.63 mmol, 74 %) als 10:1 Gemisch mit (*E*)- bzw. (*Z*)-konfigurierter Doppelbindung erhalten. Die Bestimmung des Verhältnisses erfolgte durch Integration der vinyllischen ¹H-NMR-Signale.

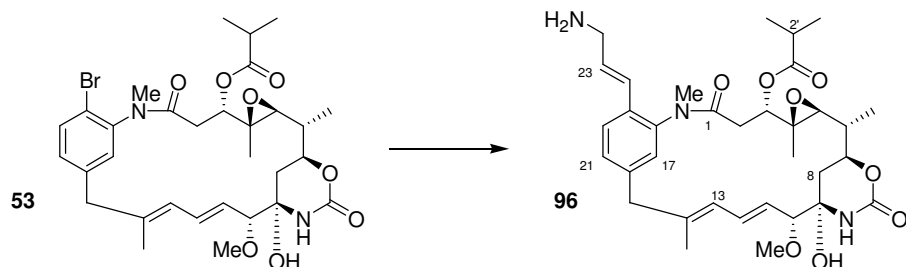
(*E*)- **99**:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.05 (dt, *J* = 18.8, 1.5 Hz, 1H, SnCH=), 5.92 (dt, *J* = 18.8, 3.9 Hz, 1H, =CHCH₂), 3.51 (dd, *J* = 3.9, 1.5 Hz, 2H, CH₂N), 1.60 - 0.80 (m, 27H, 3x Bu), 0.08 (s, 18H, 2x TMS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 151.4 (d, =CHCH₂), 125.5 (d, SnCH=C), 50.4 (t, CH₂N), 29.3 (t, Bu), 27.4 (t, Bu), 13.9 (q, Bu), 9.6 (t, Bu), 2.1 (q, TMS) ppm; **HRMS** [APCI] *m/z* für C₃₀H₃₉NSi₂Na [M+Na]⁺: ber. 492.2519 gef. 492.2523; **Sdp.:** 140 °C ($1.7 \cdot 10^{-1}$ mbar).

(*Z*)- **99**:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.37 (dt, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, =CHCH₂), 5.76 (dt, *J* = 13.0, 2.0 Hz, 1H, SnCH=), 3.46 (dd, *J* = 4.9, 2.0 Hz, 2H, CH₂N), 1.60 - 0.80 (m, 27H, 3x Bu), 0.08 (s, 18H, 2x TMS) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.^{184a}

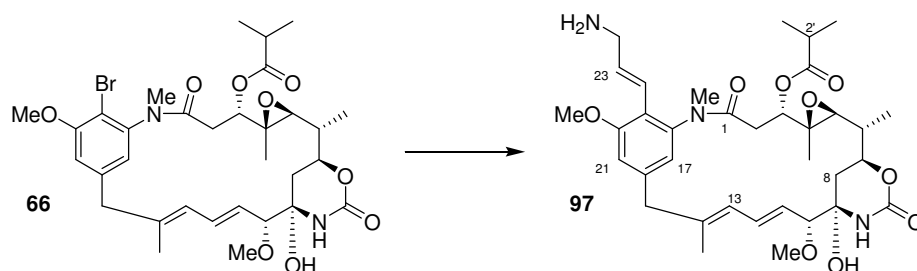
19-(3-Aminoprop-1-enyl)-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **96**

19-Brom-20-desmethoxy-ansamitocin P-3 **53** (10 mg, 15.4 μmol , 1.0 Äq.) wurde in entgastem Toluol (7 mL) gelöst und mit Aminopropenylstannan **99** (15 mg, 30.8 μmol , 2.0 Äq.) versetzt. Nach Entgasen der Reaktionslösung (*freeze-pump-thaw*, mind. dreimal) wurde $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ (0.6 mg, 0.5 μmol , 0.03 Äq.) zugegeben und anschließend 18 h bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Phosphatpuffer-Lösung (4 mL) und KF-Lösung (3 mL) hydrolysiert und über Nacht intensiv gerührt. Mit NaHCO_3 -Lösung wurde pH = 8 eingestellt, die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (MgSO_4). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit n-Hexan aufgenommen und dreimal mit Acetonitril extrahiert. Nach Einengen der Acetonitrilphasen im Vakuum wurde das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient NH_4OAc [0.01 M] : MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min^{-1} ; t_r = 28.3 min) gereinigt. Amino-Derivat **96** (8.8 mg, 14.1 μmol , 92 %) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 20-H), 7.39 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 21-H), 7.23 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 17-H), 6.65 (d, J = 16.0 Hz, 1H, 22-H), 6.61 (dd, J = 15.3, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.39 (dt, J = 16.0, 6.0 Hz, 1H, 23-H), 6.26 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.53 (dd, J = 15.3, 9.1 Hz, 1H, 11-H), 4.73 (dd, J = 12.0, 3.0 Hz, 1H, 3-H), 4.21 (ddd, J = 11.4, 10.7, 1.8 Hz, 1H, 7-H), 3.65 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 24-H), 3.58 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.57 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15- H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.29 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15- H_b), 3.15 (s, 3H, NMe), 2.81 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.74 (sep, J = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.62 (dd, J = 14.0, 12.0 Hz, 1H, 2- H_a), 2.21 (dd, J = 14.0, 3.0 Hz, 1H, 2- H_b), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.58 – 1.45 (m, 3H, 6-H, 8- H_a , 8- H_b), 1.29 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'- Me_a), 1.23 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 6-Me), 1.21 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'- Me_b), 0.81 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 177.7 (s, C-1'), 171.6 (s, C-1), 155.3 (s, NHCOO), 143.9 (s, C-16), 142.7 (s, C-18), 141.5 (s, C-14), 134.3 (d, C-12), 133.3 (s, C-19), 131.3 (d, C-21), 130.5 (d, C-17), 129.4 (d, C-11), 129.3 (d, C-22), 128.2 (d, C-20), 127.9

(d, C-23), 125.7 (d, C-13), 89.9 (d, C-10), 81.8 (s, C-9), 77.3 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.5 (d, C-5), 61.9 (s, C-4), 56.9 (q, 10-OMe), 47.2 (t, C-15), 43.1 (t, C-24), 39.6 (d, C-6), 37.7 (t, C-8), 37.3 (q, NMe), 35.0 (d, C-2'), 34.1 (t, C-2), 20.6 (q, 2'-Me_a), 18.5 (q, 2'-Me_b), 15.8 (q, 14-Me), 14.8 (q, 6-Me), 12.8 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 1.42$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₄H₄₈N₃O₈ [M+H]⁺: ber. 626.3441 gef. 626.3445.

19-(3-Aminoprop-1-enyl)-ansamitocin P-3 **97**

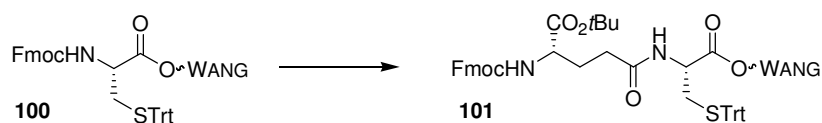


19-Brom-ansamitocin P-3 **66** (15 mg, 22.1 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in entgastem Toluol (6 mL) gelöst und mit Aminopropenylstannan **99** (22 mg, 44.2 μ mol, 2.0 Äq.) versetzt. Nach Entgasen der Reaktionslösung (*freeze-pump-thaw*, mind. dreimal) wurde Pd[P(*t*Bu)₃]₂ (0.3 mg, 0.66 μ mol, 0.03 Äq.) zugegeben und anschließend für 20 h auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde mit Phosphatpuffer-Lösung (5 mL) und KF-Lösung (5 mL) hydrolysiert und über Nacht intensiv gerührt. Mit NaHCO₃-Lösung wurde pH = 8 eingestellt, die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand mit n-Hexan aufgenommen und dreimal mit Acetonitril extrahiert. Nach Einengen der Acetonitrilphasen im Vakuum wurde das Rohprodukt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient NH₄OAc [0.01 M] : MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; $t_r = 25.8$ min) gereinigt. 19-(3-Aminoprop-1-enyl)-ansamitocin P-3 **97** (4.1 mg, 6.25 μ mol, 28 %) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

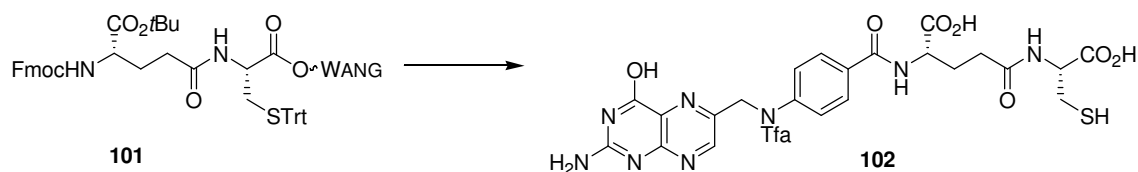
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.11 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.87 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 21-H), 6.65 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, 22-H), 6.64 (dd, $J = 15.3, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.27 (dt, $J = 16.0, 6.6$ Hz, 1H, 23-H), 6.27 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.54 (dd, $J = 15.3, 9.1$ Hz, 1H, 11-H), 4.77 (dd, $J = 12.0, 2.7$ Hz, 1H, 3-H), 4.23 (ddd, $J = 11.4, 10.3, 2.4$ Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OMe), 3.69 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, 24-H), 3.58 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H,

10-H), 3.57 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.29 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.10 (s, 3H, NMe), 2.85 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.753 (dd, $J = 14.0, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.752 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.24 (dd, $J = 14.0, 2.7$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.59 – 1.50 (m, 3H, 6-H, 8-H_a, 8-H_b), 1.30 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.25 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 6-Me), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.86 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (s, C-1'), 171.7 (s, C-1), 160.3 (s, C-20), 155.3 (s, NHCOO), 144.3 (s, C-18), 143.9 (s, C-16), 141.3 (s, C-14), 134.3 (d, C-12), 134.2 (d, C-23), 129.4 (d, C-11), 125.8 (d, C-13), 125.5 (d, C-22), 122.4 (d, C-21), 122.2 (s, C-19), 114.0 (d, C-17), 89.9 (d, C-10), 81.8 (s, C-9), 77.5 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.6 (d, C-5), 61.9 (s, C-4), 56.9 (q, 10-OMe), 56.5 (q, 20-OMe), 47.2 (t, C-15), 44.2 (t, C-24), 39.6 (d, C-6), 37.6 (t, C-8), 37.0 (q, NMe), 35.0 (d, C-2'), 34.1 (t, C-2), 20.7 (q, 2'-Me_a), 18.4 (q, 2'-Me_b), 15.9 (q, 14-Me), 14.8 (q, 6-Me), 12.8 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 1.41$ min; HRMS [ESI] m/z für C₃₅H₅₀N₃O₉ [M+H]⁺: ber. 656.3547 gef. 656.3542.

Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu)-L-Cys(S-Trt)-WANG **101**¹⁸⁸

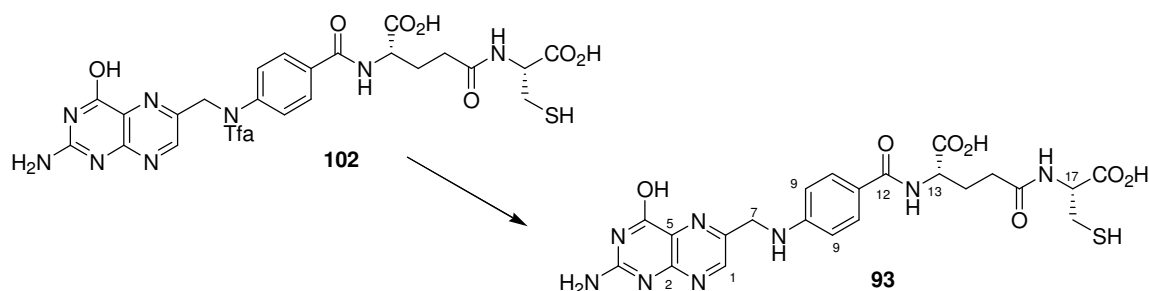


Fmoc-L-Cys(S-Trt)-WANG **100** [0.4 – 0.6 mmol g⁻¹] (2.0 g, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde im Stickstoffstrom auf einer Glasfritte (ISO P16) gespült. Anschließend wurde das Harz in der Glasfritte für 10 min in NMP (15 mL) quellen gelassen und abfiltriert. Nach fünfmaligem Behandeln mit Piperidin [20 % in NMP] (15 mL) für je 5 min wurde zunächst dreimal mit NMP (15 mL), dann dreimal mit *i*PrOH (15 mL) gewaschen. Nachdem das WANG-Harz auf der Glasfritte im Stickstoffstrom trocken gespült wurde, erfolgte die erste Peptidkupplung. Dazu wurde das WANG-Harz in einen Kolben überführt, nacheinander mit Fmoc-Glu(O-*t*Bu) (0.85 g, 2.0 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 5 mL NMP, HOBT*H₂O (0.31 g, 2.0 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 5 mL NMP, PyBOP (1.08 g, 2.0 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 5 mL NMP, und DIEA (0.7 mL, 4.0 mmol, 4.0 Äq.) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das WANG-Harz abfiltriert, zunächst dreimal mit NMP (15 mL), dann dreimal mit *i*PrOH (15 mL) gewaschen. Trocknen des Harzes im Stickstoffstrom lieferte Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu)-L-Cys(S-Trt)-WANG **101** (1.83 g, 1.0 mmol), welches unter Schutzgas im Gefrierschrank aufbewahrt werden konnte.

N¹⁰-Tfa-Pte-L-Glu-L-Cys 102¹⁸⁸

Fmoc-L-Glu(O-*t*Bu)-L-Cys(S-Trt)-WANG **101** (300 mg, 0.163 mmol, 1.0 Äq.) wurde im Stickstoffstrom auf einer Glasfritte (*ISO* P16) gespült. Anschließend wurde das Harz in der Glasfritte für 10 min in NMP (2.5 mL) quellen gelassen und abfiltriert. Nach fünfmaligem Behandeln mit Piperidin [20 % in NMP] (2.5 mL) für je 5 min wurde zunächst dreimal mit NMP (2.5 mL), dann dreimal mit *i*PrOH (2.5 mL) gewaschen. Nachdem das WANG-Harz auf der Glasfritte im Stickstoffstrom getrocknet wurde, erfolgte die zweite Peptidkupplung. Dazu wurde das WANG-Harz in einen Kolben überführt, nacheinander mit N¹⁰-Trifluoracetylpteroin säure (100 mg, 0.245 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 2 mL NMP, HOBT*H₂O (38 mg, 0.245 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 1 mL NMP, PyBOP (132 g, 0.245 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 1 mL NMP, und DIEA (86 µL, 0.45 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das WANG-Harz abfiltriert, zunächst dreimal mit NMP (3 mL), dann dreimal mit *i*PrOH (3 mL) gewaschen. Nach Trocknen im Stickstoffstrom wurde das WANG-Harz mit einer Lösung aus TFA (7.5 mL), Phenol (375 mg), Wasser (375 µL), Ethandithiol (188 µL), Triisopropylsilan (188 µL) und Thioanisol (375 µL) versetzt. Es wurde für 10 min mittels Kanüle Stickstoff durch die Lösung geleitet und anschließend für 2 h bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren des WANG-Harzes wurde das Filtrat mit kaltem Diethylether versetzt und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Trocknen im Vakuum lieferte N¹⁰-Tfa-Pte-L-Glu-L-Cys **102** (94 mg, 0.147 mmol, 90 % über 5 Stufen) als gelben Feststoff.

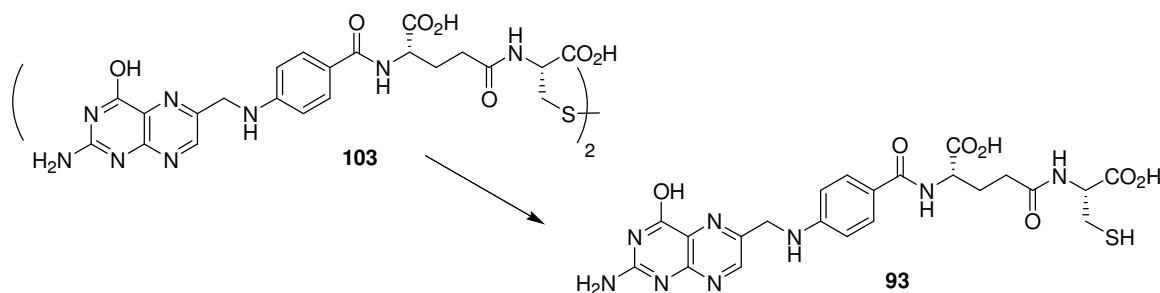
UPLC-MS $t_r = 1.19$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₂₄H₂₄F₃N₈O₈S [M+H]⁺: ber. 641.1390 gef. 641.1388.

Pte-L-Glu-L-Cys 93¹⁸⁸

DTT (106 mg, 0.685 mmol, 5.0 Äq.) wurde in Wasser (23 mL) gelöst und mit Piperidin (23 μ L, 2.74 mmol, 20 Äq.) versetzt. Diese Lösung wurde zu N¹⁰-Tfa-Pte-L-Glu-L-Cys **102** (88 mg, 0.137 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und mittels Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach 2.5 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 25 mm, Vorsäule: 30 mm * 20 mm; Gradient TFA [0.1 % in Wasser] : MeCN [70 % in Wasser] = 100 % TFA \rightarrow 100 % MeCN in 45 min, dann 35 min 100 % MeCN, Flussrate 6 \rightarrow 9 mL min⁻¹; t_r = 38.1 min) gereinigt. Pte-L-Glu-L-Cys **93** (28 mg, 51 μ mol, 38 %) konnte als gelber Feststoff isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 12.83, 12.50 (2x bs, 2H, 13-CO₂H, 17-CO₂H), 8.66 (s, 1H, 1-H), 8.19 (m, 2H, 13-NH, 17-NH), 7.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 10-H), 7.09 (bs, 3H, 7-NH, 3-NH₂), 6.64 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 9-H), 4.50 (s, 2H, 7-H), 4.37 (m, 1H, 17-H), 4.30 (m, 1H, 13-H), 2.82 (m, 1H, 18-H_a), 2.71 (m, 1H, 18-H_b), 2.42 (t, J = 8.5 Hz, 1H, SH), 2.27 (m, 2H, 15-H), 2.04 (m, 1H, 14-H_a), 1.93 (m, 1H, 14-H_b) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 174.3 (s, 13-CO₂H), 172.3 (s, 17-CO₂H), 172.1 (s, C-16), 166.8 (s, C-12), 162.9 (s, C-4), 156.1 (c, C-3), 154.1 (s, C-2), 151.2 (s, C-8), 149.3 (s, C-6), 149.1 (d, C-1), 129.5 (d, C-10), 128.4 (s, C-5), 121.8 (s, C-11), 111.7 (d, C-9), 54.9 (d, C-17), 52.7 (d, C-13), 46.4 (t, C-7), 32.3 (t, C-15), 27.1 (t, C-14), 25.9 (t, C-18) ppm; **UPLC-MS** t_r = 0.92 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₂₂H₂₅N₈O₇S [M+H]⁺: ber. 545.1567 gef. 545.1570.

Pte-L-Glu-L-Cys **93**

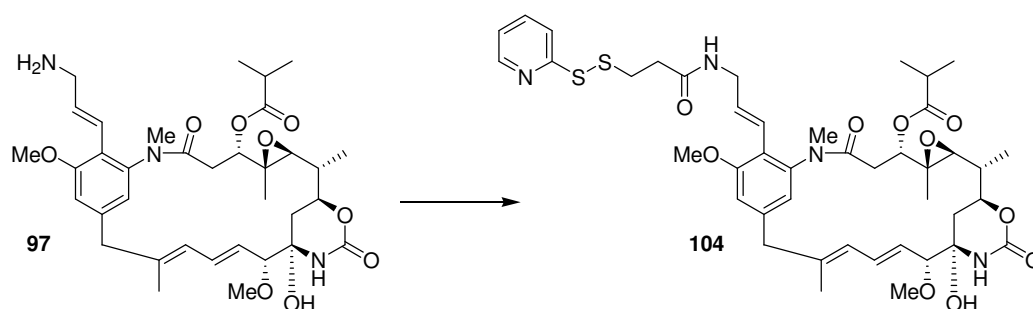


Dimeres (Pte-L-Glu-L-Cys)₂ **103** (1.0 mg, 0.92 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in Wasser (0.5 mL) suspendiert und mit NaHCO₃-Lösung [0.1 M] wurde pH = 7 eingestellt. Über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet, anschließend erfolgte die Zugabe von DTT (1.1 mg, 7.36 μ mol, 8.0 Äq.), gelöst in 1 mL PBS. Nach Reaktionsende (Kontrolle per

UPLC-MS) wurde die Lösung direkt über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient TFA [0.1 % in Wasser] : MeCN [70 % in Wasser] = 100 % TFA \rightarrow 100 % MeCN in 40 min, dann 10 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 27.1 min) gereinigt. Nach Einengen im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung konnte Pte-L-Glu-L-Cys **93** (0.8 mg, 1.47 μmol , 80 %) als gelber Feststoff isoliert werden.

Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor angegebenen überein.

19-{3-[3-(2-Pyridyldithio)propionylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 **104**

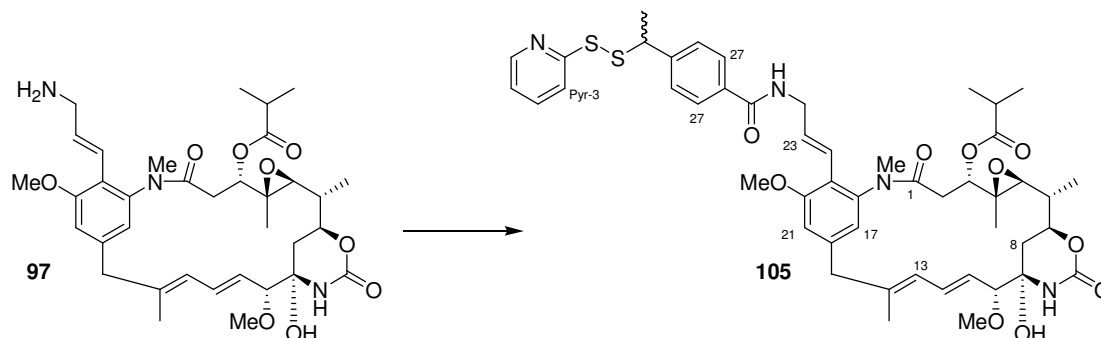


Die Kupplung von Allylamin **97** mit SPDP wurde nur als Testreaktion (< 0.1 mg) durchgeführt, wobei der Reaktionsfortschritt massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Allylamin **97** (1.0 Äq.) wurde in PBS-EDTA (1 mL) gelöst und auf 4 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde über eine Kanüle 10 min Stickstoff geleitet, anschließend wurde SPDP [20 mM in DMSO] (3.0 Äq.) zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingengt. *Reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 27.0 min) lieferte Disulfid **104**.

UPLC-MS t_r = 2.06 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₄₃H₅₇N₄O₁₀ [M+H]⁺: ber. 853.3516 gef. 853.3514.

19-[3-[4-(1-Methyl-1-[2-pyridyldithio])methyl-benzoylamino]prop-1-enyl]-ansamitocin
P-3 105

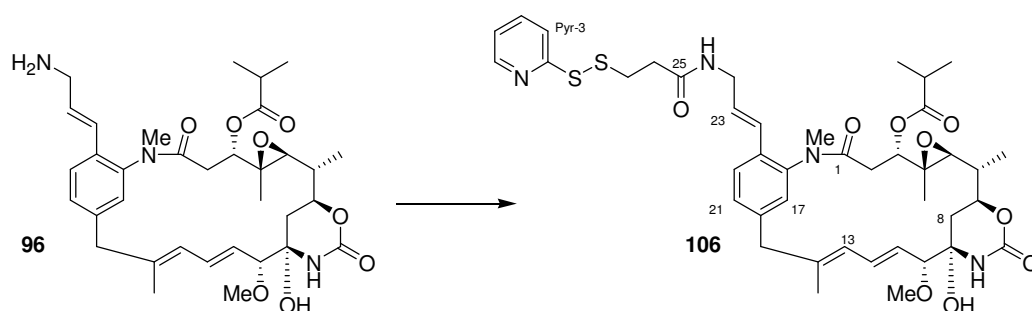


Allylamin **97** (3.0 mg, 4.58 μmol , 1.0 Äq.) wurde in PBS (5 mL) gelöst und auf 4 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde über eine Kanüle 10 min Stickstoff geleitet, anschließend wurde SMPT [20 mM in MeCN] (687 μL , 13.74 μmol , 3.0 Äq.) zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO_4) und im Vakuum eingengt. *Reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 80:20 \rightarrow 100\%$ MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min^{-1} ; $t_r = 35.0$ min) lieferte Disulfid **105** (1.0 mg, 1.08 μmol , 24 %) als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.40 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, Pyr⁶-H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 27-H), 7.55 – 7.50 (m, 2H, Pyr³-H, Pyr⁴-H), 7.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 28-H), 7.06 (m, 1H, Pyr⁵-H), 6.79 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, 17-H), 6.75 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, 21-H), 6.62 (ddd, $J = 16.1, 6.8, 5.8$ Hz, 1H, 23-H), 6.61 (bs, 1H, 24-NH), 6.43 (dd, $J = 15.4, 10.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.42 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, 22-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.15 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.45 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, $J = 12.0, 1.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.33 (ddd, $J = 15.0, 5.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_a), 4.26 (ddd, $J = 13.9, 12.5, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 30-H), 4.08 (ddd, $J = 15.0, 6.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_b), 3.94 (s, 3H, 20-OMe), 3.51 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.16 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.09 (s, 3H, NMe), 3.08 (bs, 1H, OH), 2.86 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.60 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.59 (dd, $J = 13.5, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.30 (dd, $J = 13.5, 1.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.73 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 30-Me), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.53 (m, 1H, 8-H_a), 1.44 (m, 1H, 6-H), 1.27 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.21 (m, 1H, 8-H_b), 1.18 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.76 (s, 3H, 4-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 176.3 (s, C-1'), 169.3 (s, C-1), 166.9 (s, C-25), 160.0 (s, Pyr-2), 159.0 (s, C-

20), 152.3 (s, NHCOO), 148.9 (d, Pyr-6), 144.9 (s, C-29), 143.1 (s, C-18), 141.2 (s, C-16), 140.9 (s, C-14), 137.5 (d, Pyr-4), 133.9 (s, C-26), 133.1 (d, C-12), 132.5 (d, C-23), 128.0 (d, C-28), 127.4 (d, C-27), 127.3 (d, C-11), 124.2 (d, C-13), 122.7 (d, C-22), 121.4 (d, C-21), 121.0 (s, C-19), 120.9 (d, Pyr-5), 120.3 (d, Pyr-3), 112.0 (s, C-17), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 75.0 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 64.7 (d, C-5), 60.8 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 56.0 (q, 20-OMe), 50.2 (d, C-30), 47.2 (t, C-15), 43.4 (t, C-24), 38.8 (d, C-6), 36.7 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 34.0 (t, C-2), 33.9 (d, C-2'), 20.2 (q, 30-Me), 19.9 (q, 2'-Me_a), 18.3 (q, 2'-Me_b), 16.2 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.9 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.31$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₄₉H₆₁N₄O₁₀S₂ [M+H]⁺: ber. 929.3829 gef. 929.3828.

20-Desmethoxy-19-{3-[3-(2-pyridyldithio)propionylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 106

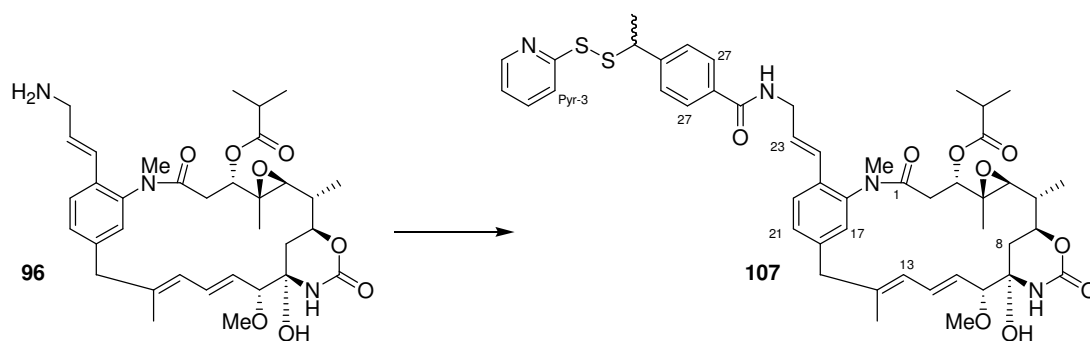


Allylamin **96** (4.8 mg, 7.67 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in PBS (3 mL) gelöst und auf 4 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde über eine Kanüle 10 min Stickstoff geleitet, anschließend wurde SPDP [20 mM in MeCN] (1.15 mL, 23.01 μ mol, 3.0 Äq.) zugegeben und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingedunstet. *Reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min⁻¹; $t_r = 27.5$ min) lieferte Disulfid **106** (5.0 mg, 6.08 μ mol, 79 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.48 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, Pyr⁶-H), 7.66 (m, 2H, Pyr³-H, Pyr⁴-H), 7.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-20), 7.24 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H, 21-H), 7.150 (m, 1H, Pyr⁵-H), 7.146 (bs, 1H, 24-NH), 7.10 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 17-H), 6.50 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, 22-H), 6.45 (dd, $J = 15.4, 10.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.34 (ddd, $J = 15.9, 6.8, 5.8$ Hz, 1H, 23-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.18 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz,

1H, 11-H), 4.80 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.28 (ddd, $J = 11.9, 10.7, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.17 (ddd, $J = 15.5, 5.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_a), 4.07 (ddd, $J = 15.5, 6.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_b), 3.51 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.49 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.23 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, 27-H), 3.10 (s, 3H, NMe), 3.08 (bs, 1H, OH), 2.88 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.70 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, 26-H), 2.64 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.51 (dd, $J = 13.6, 12.1$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.24 (dd, $J = 13.6, 2.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.58 (m, 1H, 8-H_a), 1.43 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.23 (m, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.71 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.3 (s, C-1'), 171.0 (s, C-25), 169.2 (s, C-1), 159.5 (s, Pyr-2), 152.3 (s, NHCOO), 149.3 (d, Pyr-6), 141.5 (s, C-18), 141.3 (s, C-16), 141.2 (s, C-14), 137.6 (d, Pyr-4), 133.2 (d, C-12), 132.8 (s, C-19), 129.5 (d, C-23), 129.3 (d, C-21), 129.2 (d, C-17), 127.1 (d, C-11), 126.9 (d, C-20), 125.1 (d, C-22), 124.0 (d, C-13), 121.4 (d, Pyr-5), 120.9 (d, Pyr-3), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 75.1 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 65.0 (d, C-5), 60.8 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 46.7 (t, C-15), 41.8 (t, C-24), 38.8 (d, C-6), 36.9 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 35.9 (t, C-26), 35.1 (t, C-27), 34.0 (d, C-2'), 33.7 (t, C-2), 19.9 (q, 2'-Me_a), 18.3 (q, 2'-Me_b), 16.0 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.7 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 2.04$ min; HRMS [ESI] m/z für C₄₂H₅₅N₄O₉S₂ [M+H]⁺: ber. 823.3410 gef. 823.3411.

20-Desmethoxy-19-{3-[4-(1-methyl-1-[2-pyridyldithio])methyl-benzoylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 107

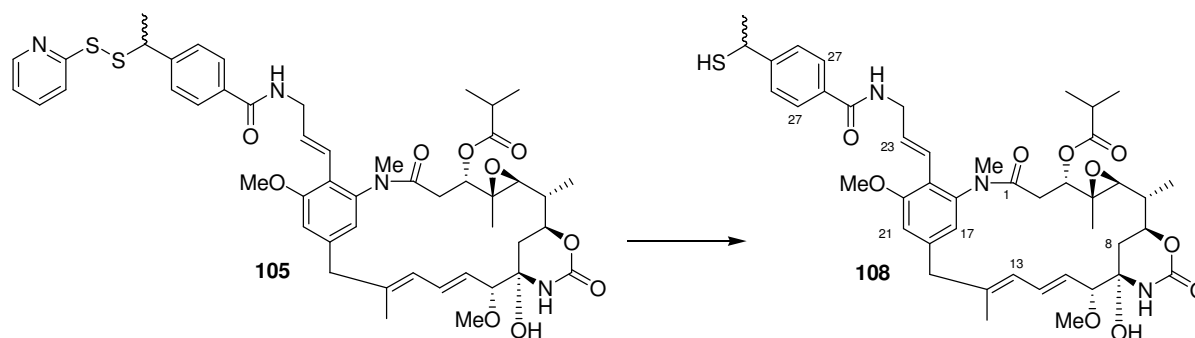


Allylamin **96** (3.2 mg, 5.1 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in PBS (5 mL) gelöst und auf 4 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde über eine Kanüle 10 min Stickstoff geleitet, anschließend wurde SMPT [20 mM in MeCN] (765 μ L, 15.3 μ mol, 3.0 Äq.) zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und

im Vakuum eingeengt. *Reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 80:20 \rightarrow 100\%$ MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min^{-1} ; $t_{\text{r}} = 40.1$ min) lieferte Disulfid **107** (4.0 mg, 4.45 μmol , 87 %) als farblosen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.40 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, Pyr⁶-H), 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 27-H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-20), 7.53 – 7.46 (m, 2H, Pyr³-H, Pyr⁴-H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, 28-H), 7.22 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, 21-H), 7.09 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 17-H), 7.02 (m, 1H, Pyr⁵-H), 6.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 24-NH), 6.49 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, 22-H), 6.41 (dd, $J = 15.4, 10.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.39 (ddd, $J = 15.9, 6.8, 5.8$ Hz, 1H, 23-H), 6.24 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.44 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.81 (dd, $J = 12.0, 2.1$ Hz, 1H, 3-H), 4.37 (ddd, $J = 15.5, 5.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_a), 4.25 (ddd, $J = 12.2, 10.5, 1.6$ Hz, 1H, 7-H), 4.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 30-H), 4.10 (ddd, $J = 15.5, 6.8, 5.6$ Hz, 1H, 24-H_b), 3.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.19 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, OH), 3.14 (s, 3H, NMe), 2.80 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.59 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.45 (dd, $J = 13.4, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.32 (dd, $J = 13.4, 2.1$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.72 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 30-Me), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.54 (m, 1H, 8-H_a), 1.42 (m, 1H, 6-H), 1.26 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.20 (m, 1H, 8-H_b), 1.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.76 (s, 3H, 4-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 176.4 (s, C-1'), 169.4 (s, C-1), 167.1 (s, C-25), 160.2 (s, Pyr-2), 152.3 (s, NHCOO), 149.5 (d, Pyr-6), 145.2 (s, C-29), 141.53, 141.49, 141.45 (3x s, C-18, C-16, C-14), 137.0 (d, Pyr-4), 133.7 (s, C-26), 133.2 (d, C-12), 132.6 (s, C-19), 129.5 (d, C-23), 129.4 (d, C-21), 129.3 (d, C-17), 128.0 (d, C-28), 127.4 (d, C-27), 127.0 (d, C-11), 126.8 (d, C-20), 125.6 (d, C-22), 123.9 (d, C-13), 120.7 (d, Pyr-5), 119.8 (d, Pyr-3), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 74.3 (d, C-3), 74.1 (d, C-7), 64.0 (d, C-5), 60.9 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 50.1 (d, C-30), 46.5 (t, C-15), 42.2 (t, C-24), 38.7 (d, C-6), 37.0 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 34.2 (t, C-2), 34.0 (d, C-2'), 20.3 (q, 30-Me), 19.8 (q, 2'-Me_a), 18.4 (q, 2'-Me_b), 16.1 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 13.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_{\text{r}} = 2.40$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 899.3723 gef. 899.3720.

19-{3-[4-(1-Mercaptoethyl)benzoylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 108

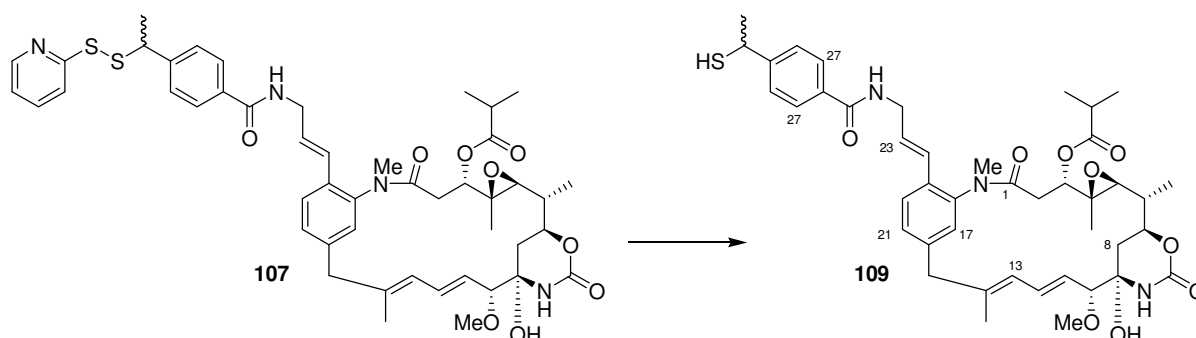


Disulfid **105** (1.0 mg, 1.08 μmol , 1.0 Äq.) wurde in MeCN (1 mL) gelöst und über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Anschließend wurde DTT (1.3 mg, 8.64 μmol , 8.0 Äq.), gelöst in 2 mL PBS, zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Nach Einengen im Vakuum lieferte *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 37.7 min) Mercapto-Derivat **108** (0.9 mg, 1.08 μmol , quant.) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 27-H), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 28-H), 6.81 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 17-H), 6.77 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 21-H), 6.68 (ddd, J = 16.1, 6.8, 5.8 Hz, 1H, 23-H), 6.60 (t, J = 5.6 Hz, 1H, 24-NH), 6.46 (dd, J = 15.4, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.45 (d, J = 16.1 Hz, 1H, 22-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.18 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.48 (dd, J = 15.4, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.88 (dd, J = 12.0, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 4.37 (ddd, J = 15.4, 5.8, 5.6 Hz, 1H, 24-H_a), 4.26 (ddd, J = 12.1, 10.5, 1.7 Hz, 1H, 7-H), 4.25 (dd, J = 7.0, 5.3 Hz, 30-H), 4.12 (ddd, J = 15.4, 6.8, 5.6 Hz, 1H, 24-H_b), 3.94 (s, 3H, 20-OMe), 3.52 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15-H_a), 3.51 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.19 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15-H_b), 3.09 (s, 3H, NMe), 3.05 (bs, 1H, OH), 2.88 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.62 (sep, J = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.60 (dd, J = 13.7, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.33 (dd, J = 13.7, 2.7 Hz, 1H, 2-H_b), 2.03 (d, J = 5.3 Hz, 1H, SH), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.70 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 30-Me), 1.62 (m, 1H, 8-H_a), 1.44 (m, 1H, 6-H), 1.30 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.22 (m, 1H, 8-H_b), 1.20 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.75 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.3 (s, C-1'), 169.3 (s, C-1), 167.0 (s, C-25), 159.0 (s, C-20), 152.3 (s, NHCOO), 149.6 (s, C-29), 143.1 (s, C-18), 141.2 (s, C-16), 140.9 (s, C-14), 133.4 (s, C-26), 133.1 (d, C-12), 132.6 (d, C-23), 127.6 (d, C-28), 127.2 (d, C-11), 126.8 (d, C-27), 124.2 (d, C-13), 122.6 (d, C-22), 121.4 (d, C-21),

121.0 (s, C-19), 112.0 (s, C-17), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 74.9 (d, C-3), 74.4 (d, C-7), 64.6 (d, C-5), 60.8 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 56.0 (q, 20-OMe), 47.1 (t, C-15), 43.3 (t, C-24), 38.8 (d, C-6), 38.5 (d, C-30), 36.7 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 34.0 (t, C-2), 33.9 (d, C-2'), 25.9 (q, 30-Me), 19.9 (q, 2'-Me_a), 18.3 (q, 2'-Me_b), 16.2 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.9 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS t_r = 2.09 min; HRMS [ESI] m/z für C₄₄H₅₈N₃O₁₀S [M+H]⁺: ber. 820.3843 gef. 820.3838.

20-Desmethoxy-19-{3-[4-(1-mercaptoethyl)benzoylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 109

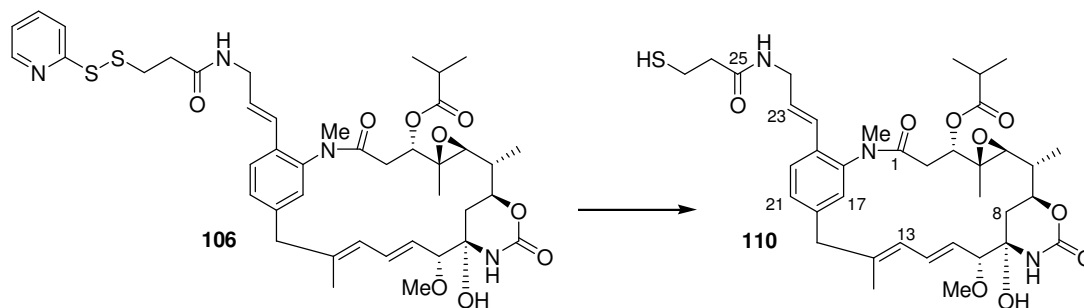


Disulfid **107** (2.0 mg, 2.2 μ mol, 1.0 \ddot{A} q.) wurde in MeCN (2 mL) gelöst und über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Anschließend wurde DTT (2.7 mg, 17.6 μ mol, 8.0 \ddot{A} q.), gelöst in 2 mL PBS, zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Nach Einengen im Vakuum lieferte *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 \rightarrow 5 mL min⁻¹; t_r = 38.6 min) Mercapto-Derivat **109** (1.7 mg, 2.2 μ mol, quant.) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.78 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 27-H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-20), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 28-H), 7.22 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 21-H), 7.09 (d, J = 1.5 Hz, 1H, 17-H), 6.81 (t, J = 5.7 Hz, 1H, 24-NH), 6.49 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 22-H), 6.41 (dd, J = 15.4, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.40 (ddd, J = 15.9, 6.8, 4.8 Hz, 1H, 23-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.44 (dd, J = 15.4, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.82 (dd, J = 12.1, 2.4 Hz, 1H, 3-H), 4.38 (ddd, J = 15.5, 5.7, 4.8 Hz, 1H, 24-H_a), 4.27 (dq, J = 7.0, 5.3 Hz, 30-H), 4.24 (ddd, J = 12.2, 10.5, 1.6 Hz, 1H, 7-H), 4.11 (ddd, J = 15.5, 6.8, 5.7 Hz, 1H, 24-H_b), 3.48 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-

OMe), 3.19 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.14 (s, 3H, NMe), 3.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, OH), 2.80 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.59 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.44 (dd, $J = 13.4, 12.1$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.33 (dd, $J = 13.4, 2.4$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.00 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, SH), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 30-Me), 1.57 (m, 1H, 8-H_a), 1.42 (m, 1H, 6-H), 1.26 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me), 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.19 (m, 1H, 8-H_b), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.67 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.4 (s, C-1'), 169.4 (s, C-1), 167.2 (s, C-25), 152.3 (s, NHCOO), 149.7 (s, C-29), 141.5 (3x s, C-18, C-16, C-14), 133.25 (s, C-26), 133.24 (d, C-12), 132.7 (s, C-19), 129.5 (d, C-23), 129.4 (d, C-21), 129.3 (d, C-17), 127.6 (d, C-27), 127.0 (d, C-11), 126.8 (2x d, C-28, C-20), 125.6 (d, C-22), 123.9 (d, C-13), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 74.3 (d, C-7), 74.0 (d, C-3), 63.9 (d, C-5), 60.9 (s, C-4), 56.7 (q, 10-OMe), 46.5 (t, C-15), 42.2 (t, C-24), 38.7 (d, C-6), 38.5 (d, C-30), 37.0 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 34.2 (t, C-2), 34.0 (d, C-2'), 25.9 (q, 30-Me), 19.7 (q, 2'-Me_a), 18.4 (q, 2'-Me_b), 16.1 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 13.0 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 2.21$ min; HRMS [ESI] m/z für C₄₃H₅₆N₃O₉S [M+H]⁺: ber. 790.3737 gef. 790.3723.

20-Desmethoxy-19-{3-[3-mercapto-propionylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 110

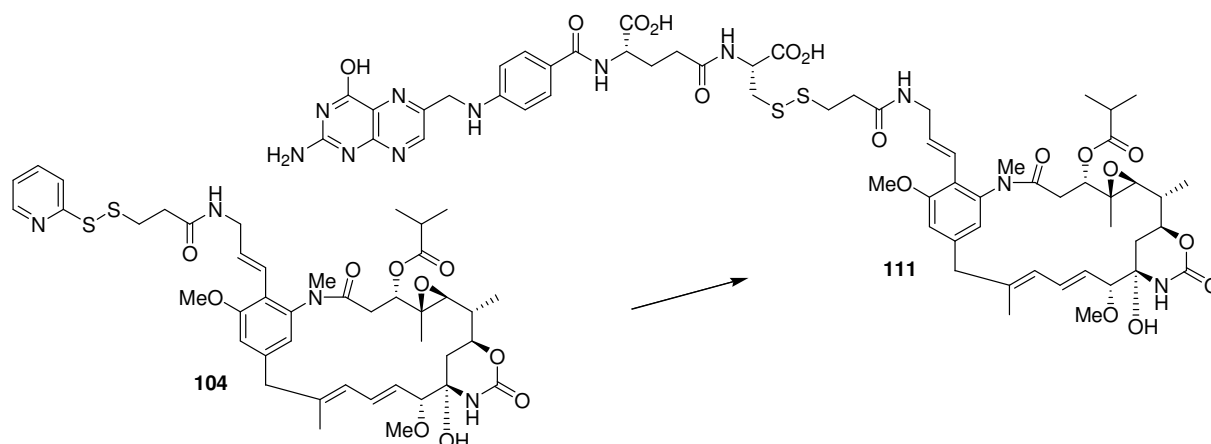


Disulfid **106** (2.0 mg, 2.4 μmol, 1.0 Äq.) wurde in MeCN (2 mL) gelöst und über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Anschließend wurde DTT (3.0 mg, 19.44 μmol, 8.0 Äq.), gelöst in 2 mL PBS, zugetropft und bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC-MS) gerührt. Nach Einengen im Vakuum lieferte *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient H₂O:MeCN = 80:20 → 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.5 → 5 mL min⁻¹; $t_r = 31.7$ min) Mercapto-Derivat **110** (1.7 mg, 2.4 μmol, quant.) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-20), 7.22 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H, 21-H), 7.08 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 17-H), 6.45 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, 22-H),

6.41 (dd, $J = 15.3, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.31 (ddd, $J = 15.9, 6.1, 5.4$ Hz, 1H, 23-H), 6.30 (bs, 1H, 24-NH), 6.23 (s, 1H, 9-NH), 6.15 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.44 (dd, $J = 15.3, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.79 (dd, $J = 12.1, 2.5$ Hz, 1H, 3-H), 4.24 (ddd, $J = 11.9, 10.3, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 4.15 (ddd, $J = 15.5, 5.8, 5.4$ Hz, 1H, 24-H_a), 4.00 (ddd, $J = 15.5, 6.1, 5.8$ Hz, 1H, 24-H_b), 3.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.19 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.13 (s, 3H, NMe), 3.12 (bs, 1H, OH), 2.83 (dt, $J = 8.3, 6.7$ Hz, 2H, 27-H), 2.81 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.61 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.55 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, 26-H), 2.43 (dd, $J = 13.2, 12.1$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.32 (dd, $J = 13.2, 2.5$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.63 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, SH), 1.54 (m, 1H, 8-H_a), 1.43 (m, 1H, 6-H), 1.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.23 (m, 1H, 8-H_b), 1.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.67 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.4 (s, C-1'), 170.9 (s, C-25), 169.4 (s, C-1), 152.3 (s, NHCOO), 141.5 (3x s, C-18, C-16, C-14), 133.2 (d, C-12), 132.6 (s, C-19), 129.37, 129.35, 129.32 (3x d, C-23, C-21, C-17), 127.0 (d, C-11), 126.8 (d, C-20), 125.1 (d, C-22), 123.9 (d, C-13), 88.5 (d, C-10), 81.1 (s, C-9), 74.3 (d, C-7), 74.0 (d, C-3), 64.0 (d, C-5), 60.9 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OMe), 46.5 (t, C-15), 41.5 (t, C-24), 40.5 (t, C-26), 38.7 (d, C-6), 37.0 (q, NMe), 36.0 (t, C-8), 34.2 (t, C-2), 34.0 (d, C-2'), 20.6 (t, C-27), 19.8 (q, 2'-Me_a), 18.5 (q, 2'-Me_b), 16.1 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 13.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 1.84$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₇H₅₂N₃O₉S [M+H]⁺: ber. 714.3424 gef. 714.3420.

19-{3-[3-(Pte-L-Glu-L-Cys-dithio)-propionylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 111

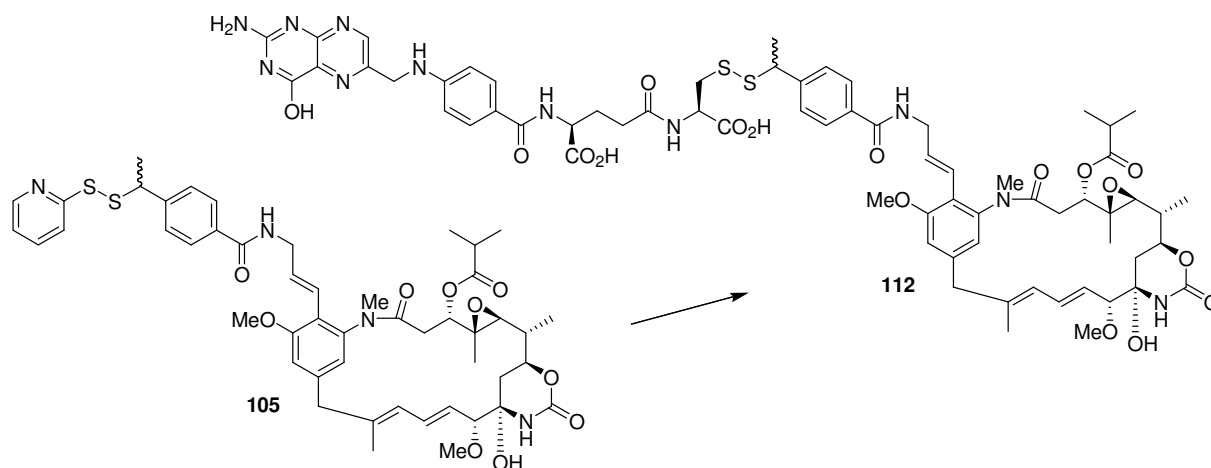


Die Kupplung von Pyridyldithio-Ansamitocin **104** mit Pte-L-Glu-L-Cys **93** wurde nur als Testreaktion (< 0.1 mg) durchgeführt, wobei der Reaktionsfortschritt massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Pyridyldithio-Ansamitocin **104** (0.1 mg, 0.12 μmol , 1.0 \AA q.) wurde in MeCN (0.5 mL) gelöst, mit PBS (0.5 mL) versetzt und auf 4 °C gekühlt. Über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach erfolgter Zugabe von Pte-Glu-Cys **93** [5 mM in DMSO] (24 μL , 0.12 μmol , 1.0 \AA q.) wurde bei RT bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per UPLC-MS).

UPLC-MS $t_r = 1.58$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{60}\text{H}_{74}\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{S}_2$ [M-H]⁻: ber. 1284.4706 gef. 1284.4757.

19-{3-[4-(1-{Pte-L-Glu-L-Cys-dithio}ethyl)benzoylamino]prop-1-enyl]-ansamitocin P-3 112

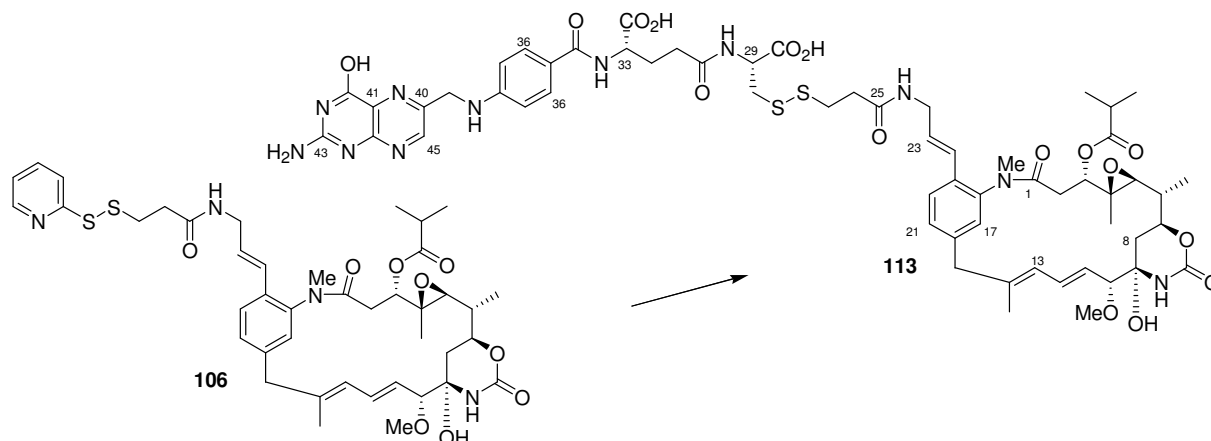


Die Kupplung von Pyridyldithio-Ansamitocin **105** mit Pte-L-Glu-L-Cys **93** wurde nur als Testreaktion (< 0.1 mg) durchgeführt, wobei der Reaktionsfortschritt massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Pyridyldithio-Ansamitocin **105** (0.1 mg, 0.11 μmol , 1.0 \AA q.) wurde in MeCN (0.5 mL) gelöst, mit PBS (0.5 mL) versetzt und auf 4 °C gekühlt. Über eine Kanüle wurde 10 min Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach erfolgter Zugabe von Pte-Glu-Cys **93** [5 mM in DMSO] (22 μL , 0.11 μmol , 1.0 \AA q.) wurde bei RT bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per UPLC-MS).

UPLC-MS $t_r = 1.72$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{N}_{11}\text{O}_{17}\text{S}_2$ [M-H]⁻: ber. 1360.5019 gef. 1360.4988.

20-Desmethoxy-19-{3-[3-(Pte-L-Glu-L-Cys-dithio)-propionylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 113

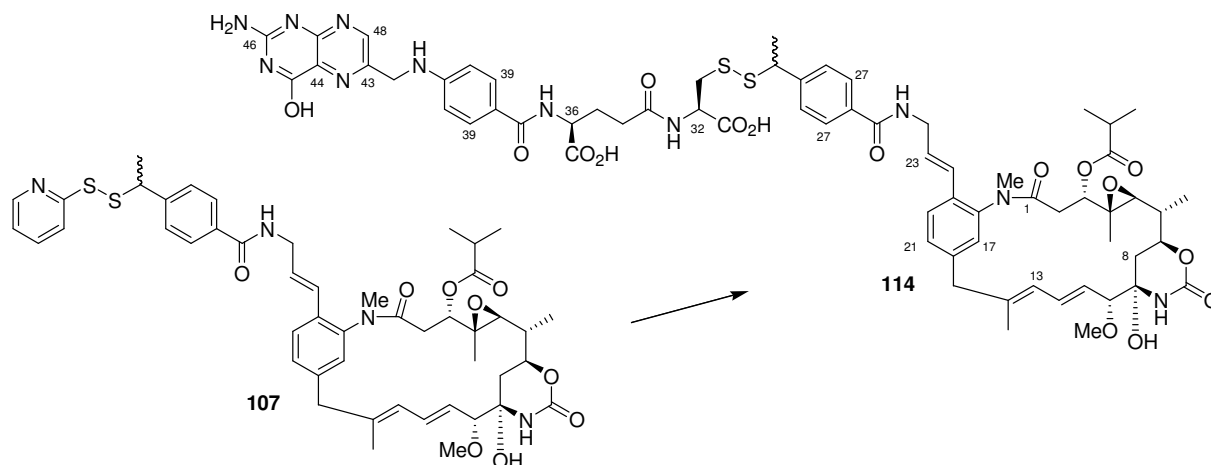


Pte-L-Glu-L-Cys **93** (1.6 mg, 2.94 μmol , 1.0 Äq.) wurde in Wasser (600 μL) suspendiert und über eine Kanüle wurde Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach Einstellen von $\text{pH} = 7$ mit NaHCO_3 -Lösung [0.1 M] wurde zu der nun klaren gelben Lösung Pyridyldithio-Ansamitocin **106** (2.4 mg, 2.94 μmol , 1.0 Äq.), gelöst in 600 μL MeCN, zugetropft. Über eine Kanüle wurde für weitere 10 min Stickstoff durchgeleitet und anschließend bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC) gerührt. Direkte Reinigung über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient TFA [0.1 % in Wasser] : MeCN = 99:1 \rightarrow 100 % MeCN in 55 min, dann 5 min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min^{-1} ; $t_r = 36.2$ min) lieferte Folsäure-Ansamitocin-Konjugat **113** (2.8 mg, 2.23 μmol , 76 %) als gelblichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_5 = 2.50$ ppm): δ 8.68 (s, 1H, 45-H), 8.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 33-NH), 8.21 (m, 2H, 24-NH, 29-NH), 7.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 36-H), 7.63 (m, 1H, 20-H), 7.36 (bs, 1H, 42-OH), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 21-H), 7.19 (s, 1H, 43-NH_a), 7.09 (s, 1H, 43-NH_b), 7.05 (s, 1H, 17-H), 6.99 (s, 1H, 38-NH), 6.91 (s, 1H, 9-NH), 6.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, 37-H), 6.57 (dd, $J = 15.9, 11.7$ Hz, 1H, 12-H), 6.35 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, 22-H), 6.24 (ddd, $J = 15.9, 6.4, 5.8$ Hz, 1H, 23-H), 6.19 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, 13-H), 5.39 (dd, $J = 15.9, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.54 (dd, $J = 12.3, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.51 (s, 2H, 39-H), 4.46 (m, 1H, 33-H), 4.29 (m, 1H, 29-H), 4.08 (ddd, $J = 12.0, 11.2, 1.4$ Hz, 1H, 7-H), 3.85 (m, 2H, 24-H), 3.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.47 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.25 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.23 (s, 3H, 10-OMe), 3.10 (dd, $J = 13.7, 4.6$ Hz, 1H, 28-H_a), 2.98 (s, 3H, NMe), 2.96 (bs, 1H, OH), 2.89 (m, 3H, 27-H, 28-H_b), 2.66 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.63 (sep, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-H), 2.47 (m, 3H, 31-H, 2-H_a), 2.24 (m, 2H, 26-H), 2.05 (m, 1H, 32-H_a), 2.02 (dd, $J = 13.9, 2.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.91 (m, 1H, 32-H_b), 1.59 (s, 3H, 14-Me), 1.43 (m, 2H, 6-H, 8-H_a), 1.31

(m, 1H, 8-H_b), 1.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.10 (2x d, $J = 7.0$ Hz, 6H, 6-Me, 2'-Me_b), 0.75 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 175.4 (s, C-1'), 173.8 (s, 33-CO₂H), 172.0 (s, 29-CO₂H), 171.9 (s, C-30), 169.8 (s, C-25), 168.2 (s, C-1), 166.3 (s, C-34), 160.5 (s, C-42), 153.3 (s, C-43), 151.2 (s, NHCOO), 150.7 (s, C-38), 149.4 (s, C-40), 148.4 (d, C-45), 142.0 (s, C-44), 141.0 (s, C-18), 140.8 (s, C-16), 139.4 (s, C-14), 132.4 (s, C-19), 132.2 (d, C-12), 129.9 (d, C-23), 129.7 (d, C-21), 129.0 (d, C-36), 128.9 (d, C-17), 128.1 (d, C-11), 128.0 (s, C-41), 126.6 (d, C-20), 124.4 (d, C-13), 124.2 (d, C-22), 121.4 (s, C-35), 111.2 (d, C-37), 88.3 (d, C-10), 80.1 (s, C-9), 75.9 (d, C-3), 73.4 (d, C-7), 65.8 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.1 (q, 10-OMe), 52.2 (d, C-33), 51.3 (d, C-29), 45.9 (t, C-39), 45.5 (t, C-15), 40.7 (t, C-24), 39.8 (t, C-28), 37.7 (d, C-6), 36.2 (q, NMe), 36.1 (t, C-8), 35.0 (t, C-26), 33.7 (t, C-27), 33.0 (d, C-2'), 32.3 (t, C-2), 31.9 (t, C-31), 26.6 (t, C-32), 19.8 (q, 2'-Me_a), 17.8 (q, 2'-Me_b), 15.3 (q, 14-Me), 14.5 (q, 6-Me), 11.5 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS $t_r = 1.60$ min; HRMS [ESI] m/z für C₅₉H₇₂N₁₁O₁₆S₂ [M-H]: ber. 1254.4600 gef. 1254.4594.

20-Desmethoxy-19-{3-[4-(1-{Pte-L-Glu-L-Cys-dithio}ethyl)benzoylamino]prop-1-enyl}-ansamitocin P-3 114



Pte-L-Glu-L-Cys **93** (1.15 mg, 2.11 μmol, 1.0 Äq.) wurde in Wasser (600 μL) suspendiert und über eine Kanüle wurde Stickstoff durch die Lösung geleitet. Nach Einstellen von pH = 7 mit NaHCO₃-Lösung [0.1 M] wurde zu der nun klaren gelben Lösung Pyridyldithio-Ansamitocin **107** (1.9 mg, 2.11 μmol, 1.0 Äq.), gelöst in 600 μL MeCN, zugetropft. Über eine Kanüle wurde weitere 10 min Stickstoff durchgeleitet und anschließend bei RT bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per UPLC) gerührt. Direkte Reinigung über *reversed phase* HPLC (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μm, Säule: 250 mm * 8 mm, Vorsäule: 40 mm * 8 mm; Gradient TFA [0.1 % in Wasser] : MeCN = 99:1 → 100 % MeCN in 55 min, dann 5

min 100 % MeCN, Flussrate 2.25 \rightarrow 4 mL min⁻¹; t_r = 37.9 min) lieferte Folsäure-Ansamitocin-Konjugat **114** (1.5 mg, 1.13 μ mol, 54 %) als gelblichen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 8.73 (m, 1H, 24-NH), 8.65 (s, 1H, 48-H), 8.32 (m, 1H, 32-NH), 8.22 (m, 1H, 36-NH), 7.81 (d, J = 7.3 Hz, 2H, 27-H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-20), 7.66 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 39-H), 7.45 (d, J = 7.3 Hz, 2H, 28-H), 7.34 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, 21-H), 7.21 (m, 1H, 43-NH_a), 7.11 (s, 1H, 43-NH_b), 7.06 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 17-H), 7.00 (s, 1H, 38-NH), 6.91 (s, 1H, 9-NH), 6.64 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 40-H), 6.58 (dd, J = 15.3, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.45 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 22-H), 6.37 (ddd, J = 15.9, 5.6, 5.2 Hz, 1H, 23-H), 6.21 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.40 (dd, J = 15.3, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.56 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.48 (s, 2H, 42-H), 4.44 (m, 1H, 32-H), 4.29 (m, 1H, 36-H), 4.25 (d, J = 6.9 Hz, 1H, 30-H), 4.07 (m, 3H, 7-H, 24-H), 3.49 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.48 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15-H_a), 3.23 (d, J = 12.8 Hz, 1H, 15-H_b), 3.22 (s, 3H, 10-OMe), 3.00 (d, J = 2.5 Hz, 1H, OH), 2.98 (s, 3H, NMe), 2.90 (m, 1H, 31-H_a), 2.75 (m, 1H, 31-H_b), 2.67 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.64 (sep, J = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.48 (m, 1H, 2-H_a), 2.25 (m, 2H, 34-H), 2.02 (m, 2H, 2-H_b, 35-H_a), 1.91 (m, 1H, 35-H_b), 1.60 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 30-Me), 1.59 (s, 3H, 14-Me), 1.43 (m, 1H, 6-H, 8-H_a), 1.31 (m, 1H, 8-H_b), 1.18 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.12 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 6-Me), 1.11 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.75 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 175.5 (s, C-1'), 173.8 (s, 36-CO₂H), 171.94 (s, 32-CO₂H), 171.88 (s, C-33), 168.3 (s, C-1), 166.4 (s, C-37), 165.9 (s, C-25), 160.8 (s, C-45), 153.6 (s, C-46), 151.3 (s, NHCOO), 150.8 (s, C-41), 148.9 (s, C-43), 148.6 (d, C-48), 144.8 (s, C-29), 143.0 (s, C-47), 141.0 (s, C-18), 140.9 (s, C-16), 139.5 (s, C-14), 133.7 (s, C-26), 132.4 (s, C-19), 132.2 (d, C-12), 129.9 (d, C-23), 129.7 (d, C-21), 129.0 (d, C-39), 128.9 (d, C-17), 128.2 (d, C-11), 128.0 (s, C-44), 127.5 (d, C-28), 127.4 (d, C-27), 126.5 (d, C-20), 124.4 (2x d, C-13, C-22), 121.3 (s, C-38), 111.2 (d, C-40), 88.3 (d, C-10), 80.1 (s, C-9), 76.0 (d, C-3), 73.4 (d, C-7), 65.8 (d, C-5), 60.5 (s, C-4), 56.2 (q, 10-OMe), 52.3 (d, C-36), 51.2 (d, C-32), 48.4 (d, C-30), 45.9 (t, C-42), 45.5 (t, C-15), 41.0 (t, C-24), 39.9 (t, C-31), 37.7 (d, C-6), 36.3 (q, NMe), 36.1 (t, C-8), 33.1 (d, C-2'), 32.4 (t, C-2), 31.9 (t, C-34), 26.6 (t, C-35), 20.2 (q, 2'-Me_a), 19.9 (q, 30-Me), 17.8 (q, 2'-Me_b), 15.3 (q, 14-Me), 14.6 (q, 6-Me), 11.5 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** t_r = 1.74 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₆₅H₇₆N₁₁O₁₆S₂ [M-H]⁻: ber. 1330.4913 gef. 1330.4918.

7 Anhang

Auf den folgenden Seiten finden sich die Auswertung zu den Komplementierungsexperimenten (Kapitel 4.1). Neben der MS(ESI)-Analyse der Fermentationsüberstände sind die HRMS(ESI)- und MSMS-Spektren dieser Studien abgebildet, sowie die für die Quantifizierung der Einbaurrate benötigten Analysen.

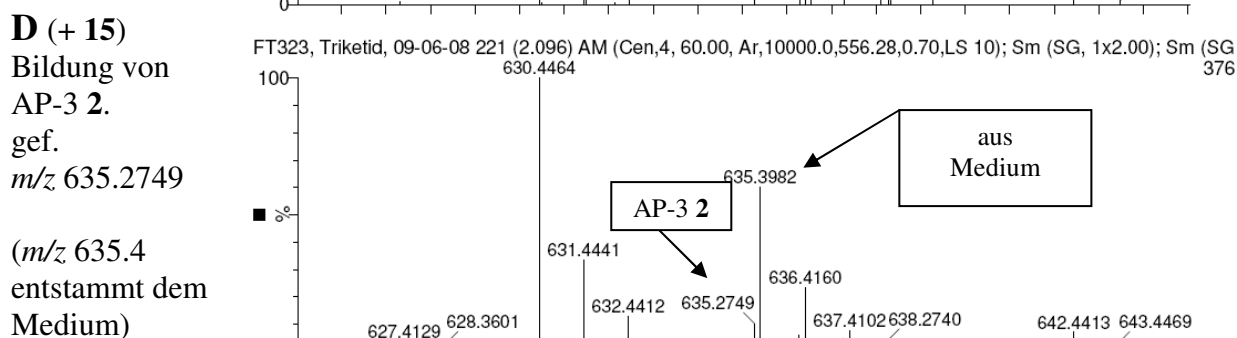
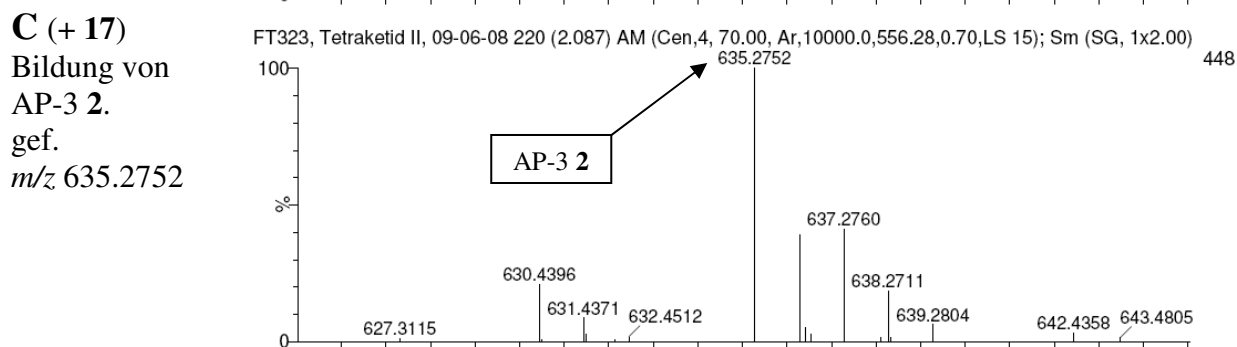
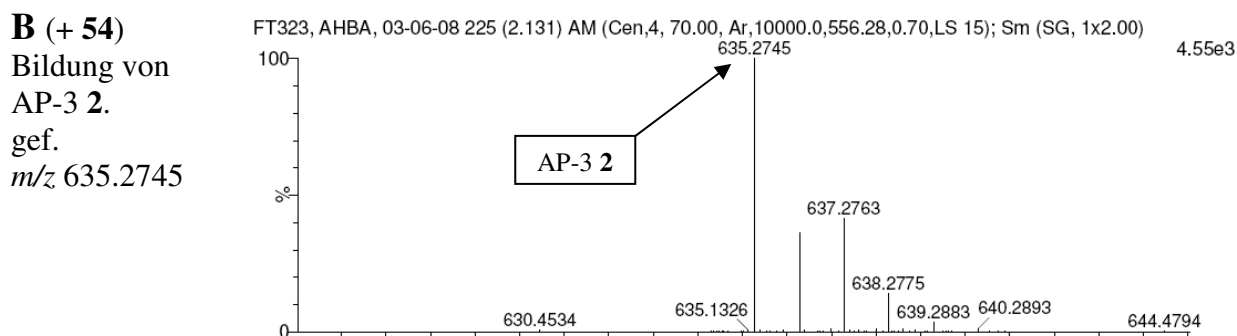
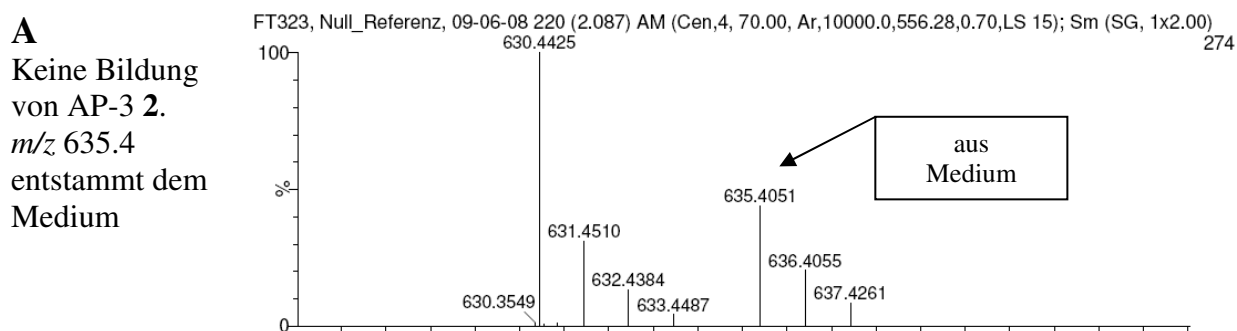
Kapitel 7.2 enthält die für die Quantifizierung der mutasynthetischen Erzeugung von Ansamitocin-Derivat **74** diskutierte Kalibration (Kapitel 4.2).

Weiterhin sind die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren der wichtigsten Verbindungen und aller biologisch getesteten Ansamitocin-Derivate aufgeführt.

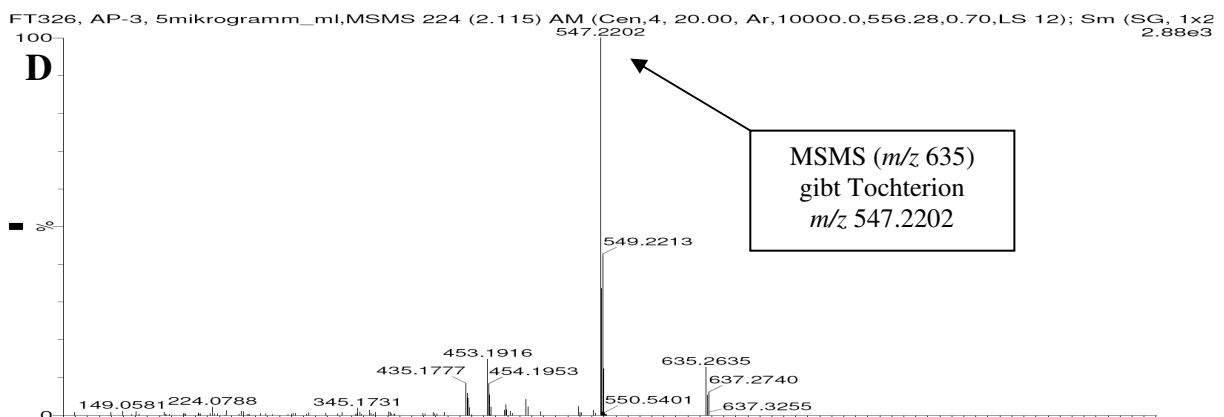
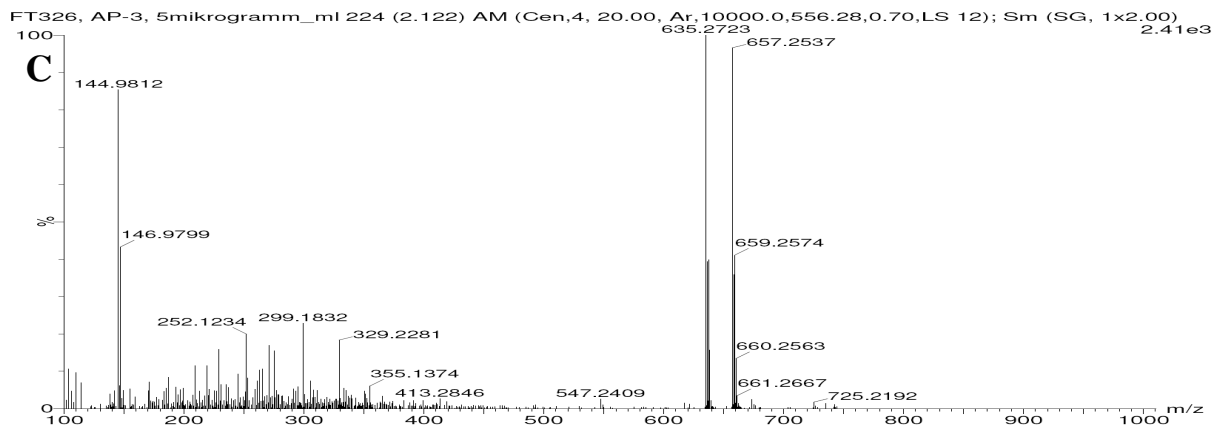
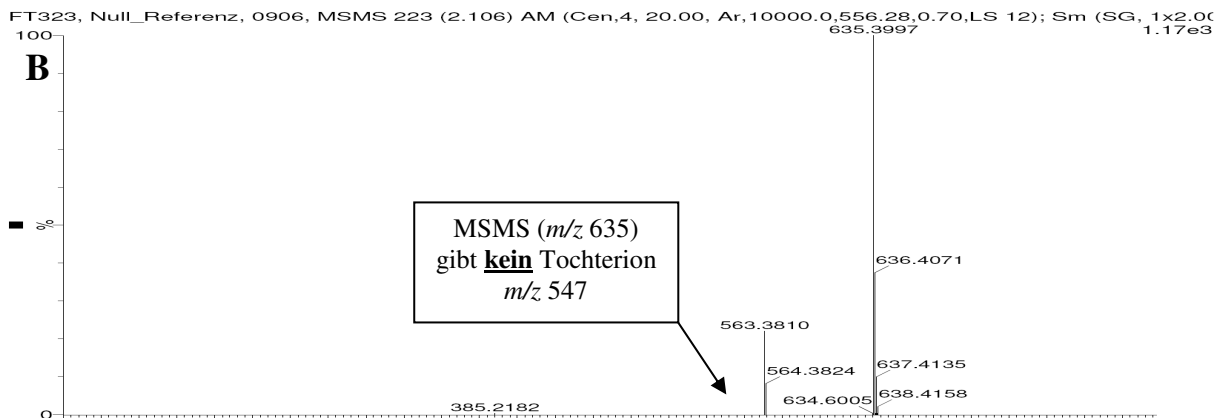
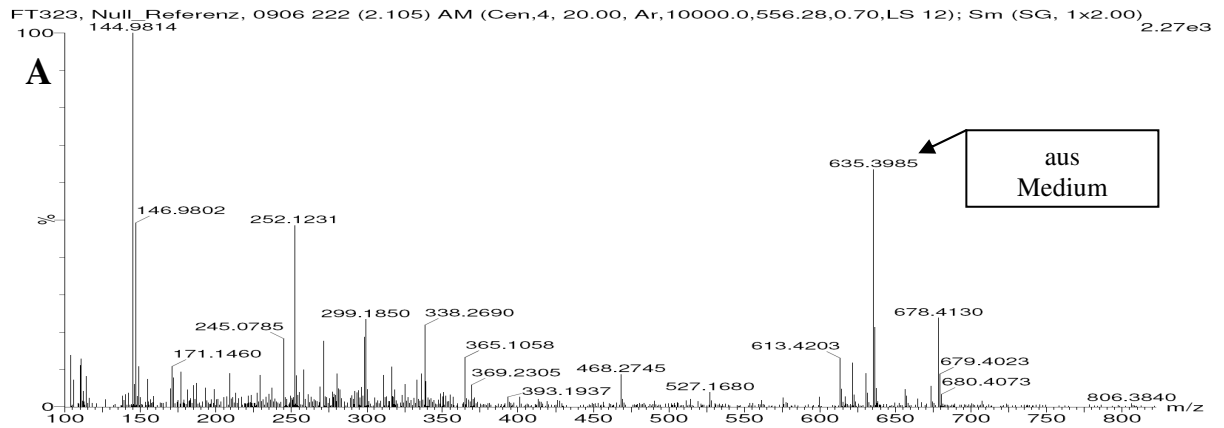
7.1 Komplementierungsexperimente

UPLC-MS(ESI)-Spektren der Aliquote (100 μ l) aus Fermentation mit HGF073 ohne Supplementierung (**A**), mit Zugabe von AHBA **54** (**B**), mit Zugabe von Tetraketid **17** (**C**) und mit Zugabe von Triketid **15** (**D**) (5 μ l injiziert, Gradient MeCN/H₂O 5:95 \rightarrow 95:5 in 4 min, Flussrate 0.4 ml/min, $t_r = 2.1$ min).

m/z für C₃₂H₄₄ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735 (100%), 636.2769 (35%), 637.2706 (32%).

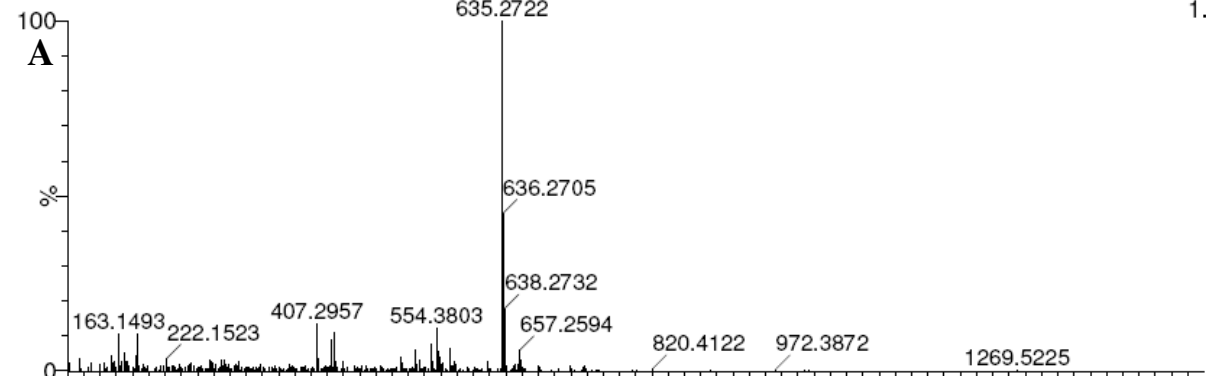


HRMS(ESI)- und MSMS-Spektren von Fermentation ohne Supplementierung (A, B) und mit Zugabe von AHBA 54 (C, D) nach HPLC-Reinigung. m/z für $C_{32}H_{44}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 635.2735; für $C_{28}H_{36}ClN_2O_7$ $[M-OCOCH(CH_3)_2]^+$: ber. 547.2211.

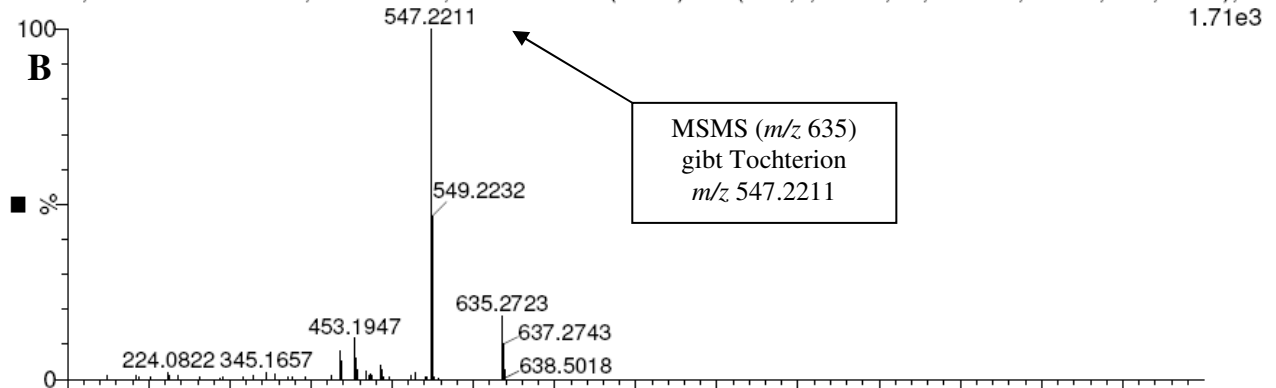


HRMS(ESI)- und MSMS-Spektren von Fermentation mit Tetraketid **17** (A, B) und Triketid **15** (C, D) nach HPLC-Reinigung. m/z für $C_{32}H_{44}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 635.2735; für $C_{28}H_{36}ClN_2O_7$ $[M-OCOCH(CH_3)_2]^+$: ber. 547.2211.

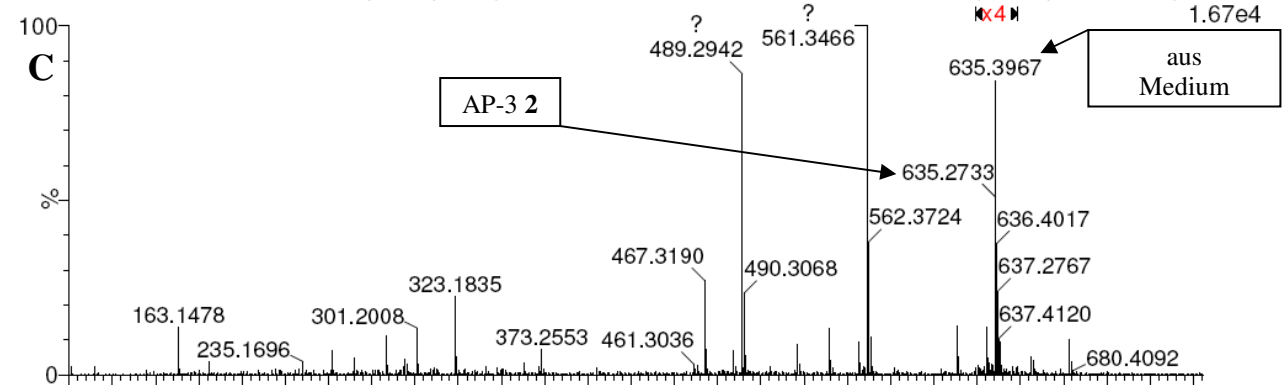
FT323, Tetraketid II, nach HPLC, 10-06-08 219 (2.079) AM (Cen,4, 20.00, Ar,10000.0,556.28,0.70,LS 12); Sm (SG, 1.72e3



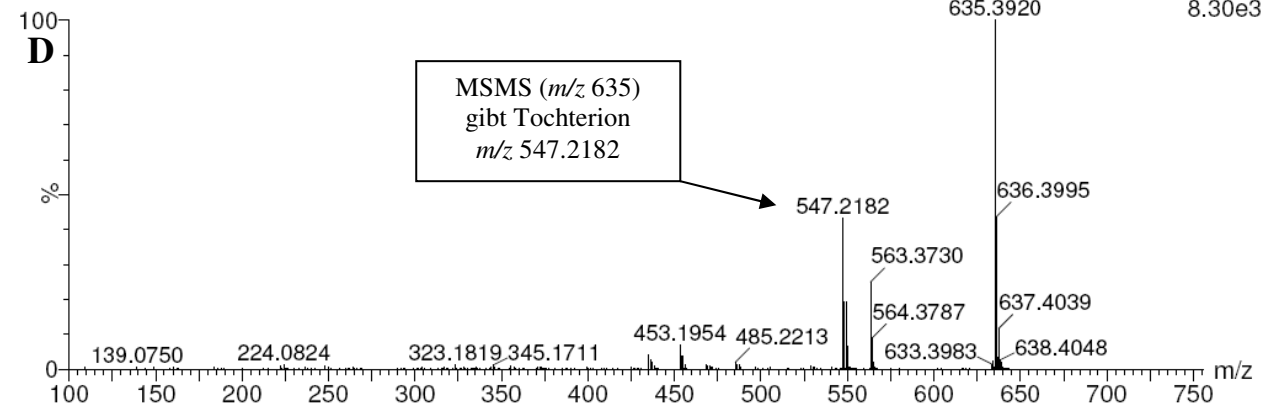
FT323, Tetraketid II MSMS, nach HPLC, 10-06-08 227 (2.131) AM (Cen,4, 20.00, Ar,10000.0,556.28,0.70,LS 12); S 1.71e3



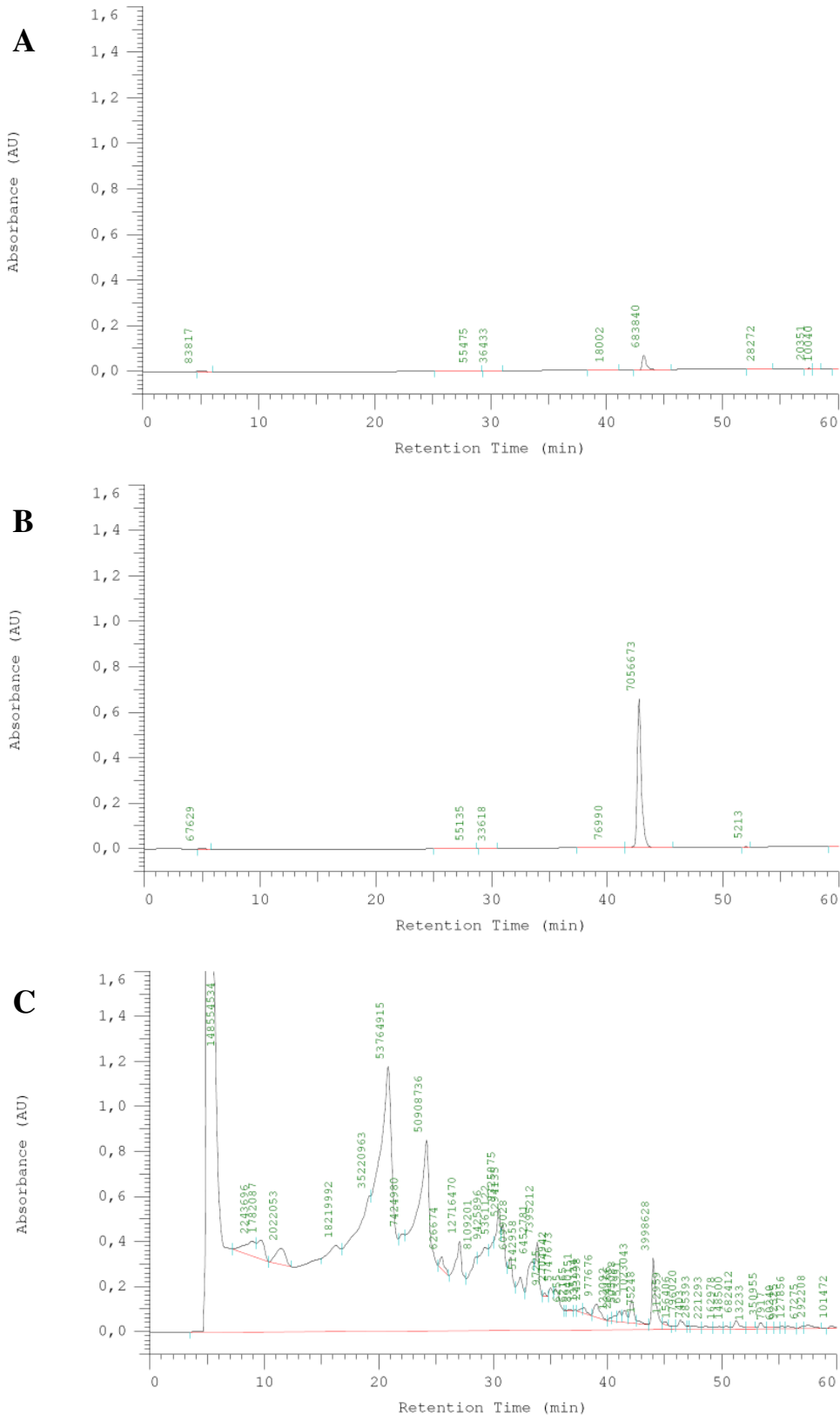
FT323, Triketid nach HPLC 218 (2.070) AM (Cen,4, 20.00, Ar,10000.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 1x2.00)



FT323, Triketid nach HPLC, MSMS 219 (2.070) AM (Cen,4, 70.00, Ar,10000.0,556.28,0.70,LS 10); Sm (SG, 1x2.00, 8.30e3



HPLC-Chromatogramme (UV-Diodenarray-Detektor, $\lambda = 248$ nm) von authentischem AP-3 **2** (2 μg , **A**), von authentischem AP-3 **2** (20 μg , **B**) und Fermentationsextrakt von Tetraketid **17** (**C**). Angegeben sind die Werte der UV-Integrale [Programm siehe Experimenteller Teil - Kapitel 6.5].



Quantifizierung der Einbaurate von Tetraketid **17** über den Vergleich des UV-Absorptionsintegrals ($\lambda = 248$ nm) im HPLC-Chromatogramm.

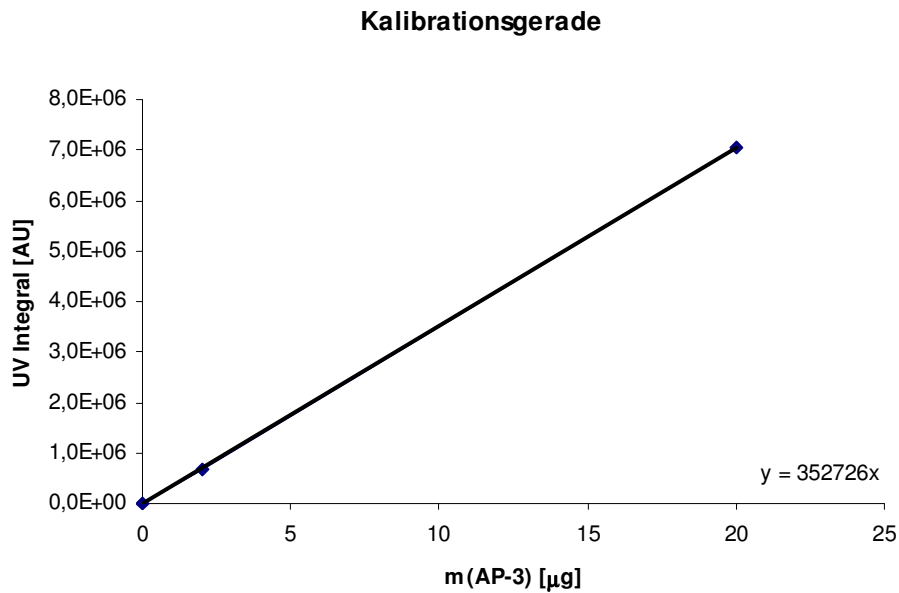


Abbildung 28: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der AP-3 Menge durch Integration des UV-Signals ($\lambda=248$ nm).

Tabelle 8: UV-Integral ($\lambda=248$ nm) im HPLC Chromatogramm in Abhängigkeit der injizierten Substanzmenge.

Probe	m(AP-3) [µg]	UV Integral [AU, $\lambda=248$ nm]
/	0	0
Verdünnungsreihe	2	683840
Verdünnungsreihe	20	7056673
Tetraketid 17 Fermentation	11.3	3998628

Normale Produktion: 76 mg AP-3 von 1500 µmol AHBA **54**

1064 µg AP-3 von 21 µmol AHBA **54**

Fermentation von Tetraketid **17**: 11.3 µg AP-3 von 21 µmol Tetraketid **17**

→ Einbaurate: **1.1 %** bezogen auf Zufütterung der gleichen molaren Menge AHBA **54**.

Quantifizierung der Einbaurrate von Triketid **15** über Vergleich der MS-Signalintensitäten nach HPLC-Reinigung. Die AP-3-enthaltenden Fraktionen der mit Tetraketid **17** (**A**) und Triketid **15** (**B**) supplementierten Kulturen wurden jeweils vereint, eingengt und mit MeCN auf 1 mL verdünnt.

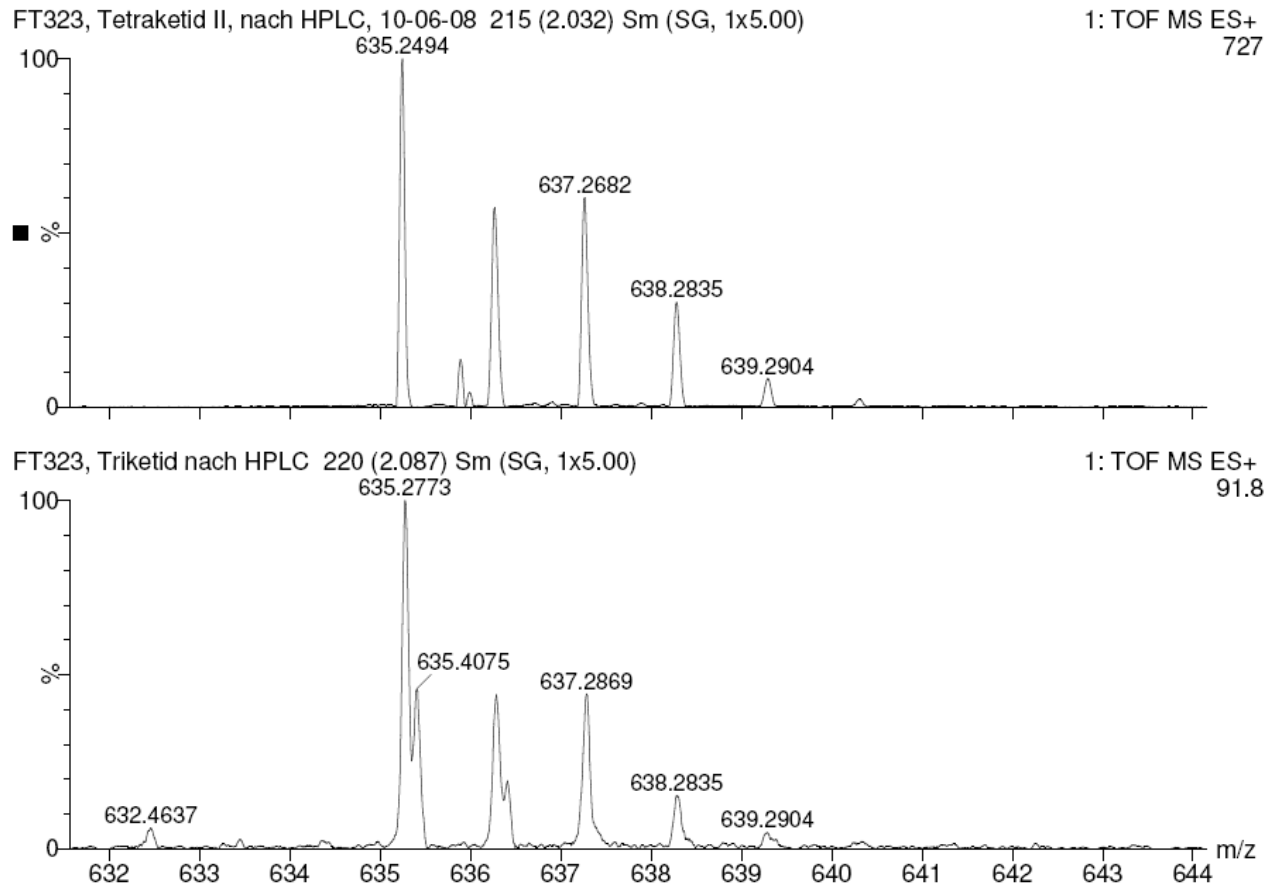


Tabelle 9: Aus MS-Signalintensitäten berechnete Menge an AP-3 für Fermentation von Triketid **15**.

Probe	m(AP-3) [μg]	Signalintensität
Fermentation von Tetraketid 17	11.3	727
Fermentation von Triketid 15	1.43	92

Normale Produktion: 76 mg AP-3 von 1500 μmol AHBA **54**

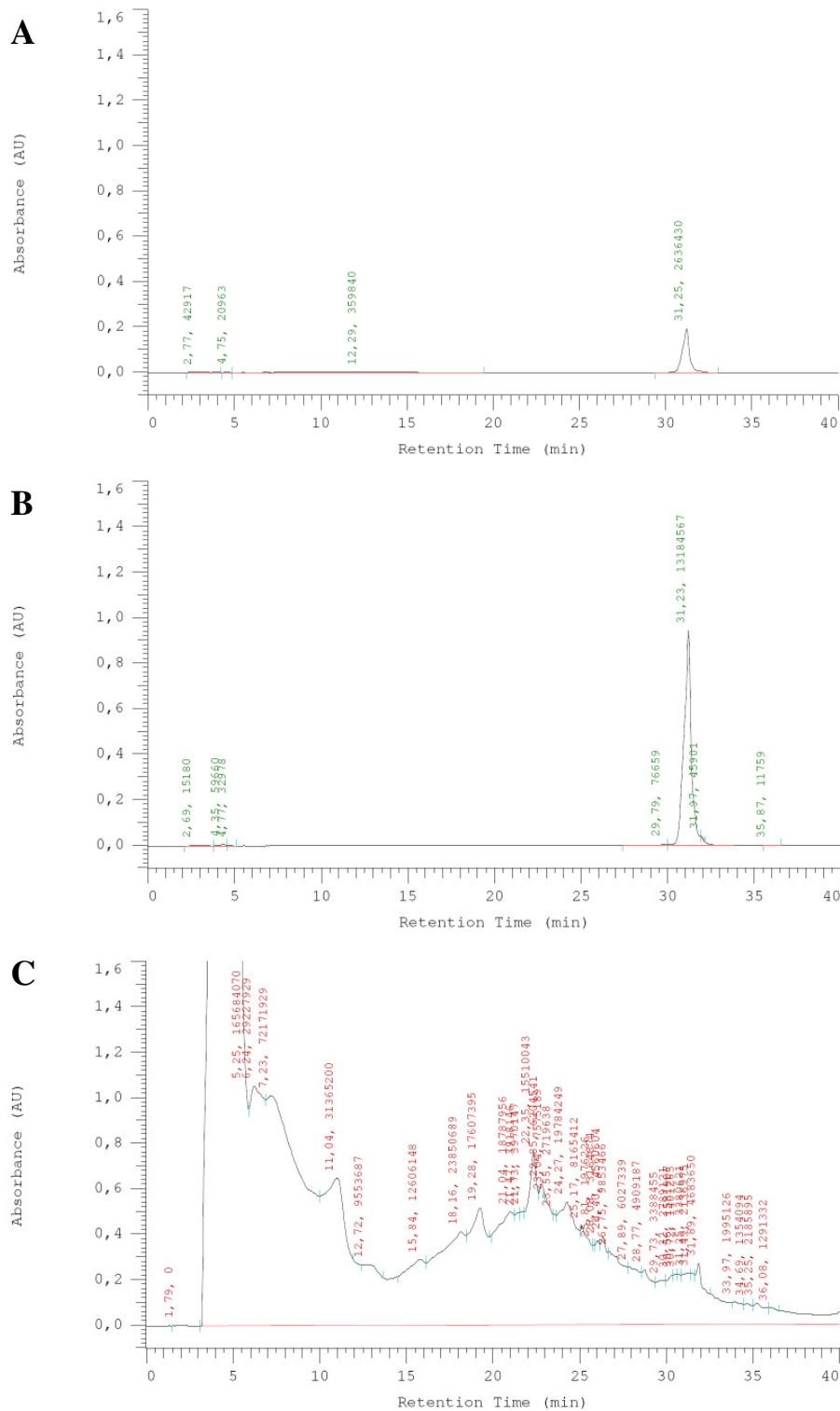
760 μg AP-3 von 15 μmol AHBA **54**

Fermentation von Triketid **15**: 1.43 μg AP-3 von 15 μmol Triketid **15**

→ Einbaurrate: **0.2 %** bezogen auf Zufütterung der gleichen molaren Menge AHBA **54**.

7.2 Mutasynthetische Derivatisierung

HPLC-Chromatogramme (UV-Diodenarray-Detektor, $\lambda = 248$ nm) von semisynthetisch dargestelltem 19-Deschloro-20-deshydroxy-ansamitocin **74** (8 μg , **A**; 40 μg , **B**) und Fermentationsextrakt aus Verfütterung von *seco*-Derivat **78** (**C**). Angegeben sind die Werte der UV-Integrale [Programm siehe Experimenteller Teil - Kapitel 6.7].



Quantifizierung der Fermentationsausbeute der Mutasyntesen mit 3-Aminobenzoessäure Hydrochlorid **62** und 20-Deshydroxy-*seco*-Proansamitocin **78** über Vergleich des UV-Absorptionsintegrals ($\lambda = 248 \text{ nm}$) im HPLC-Chromatogramm.

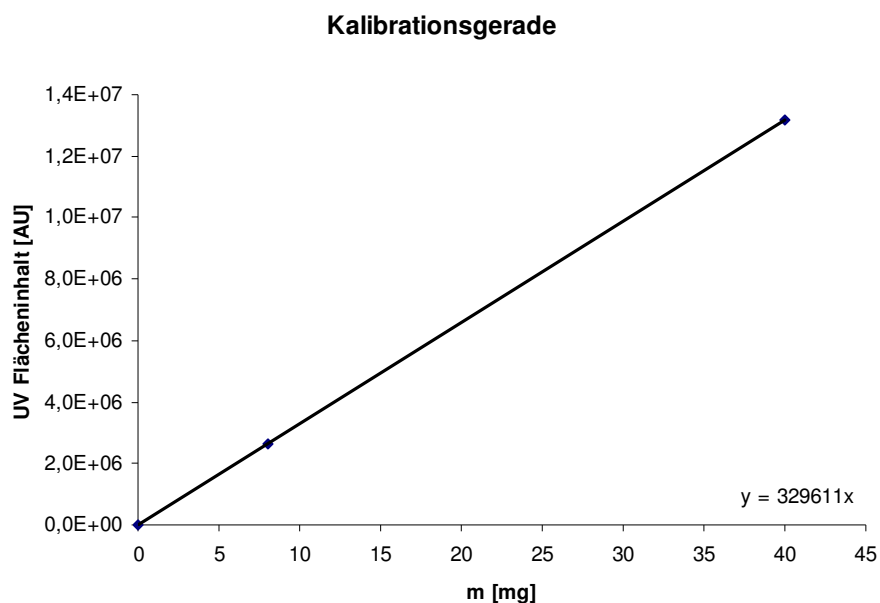
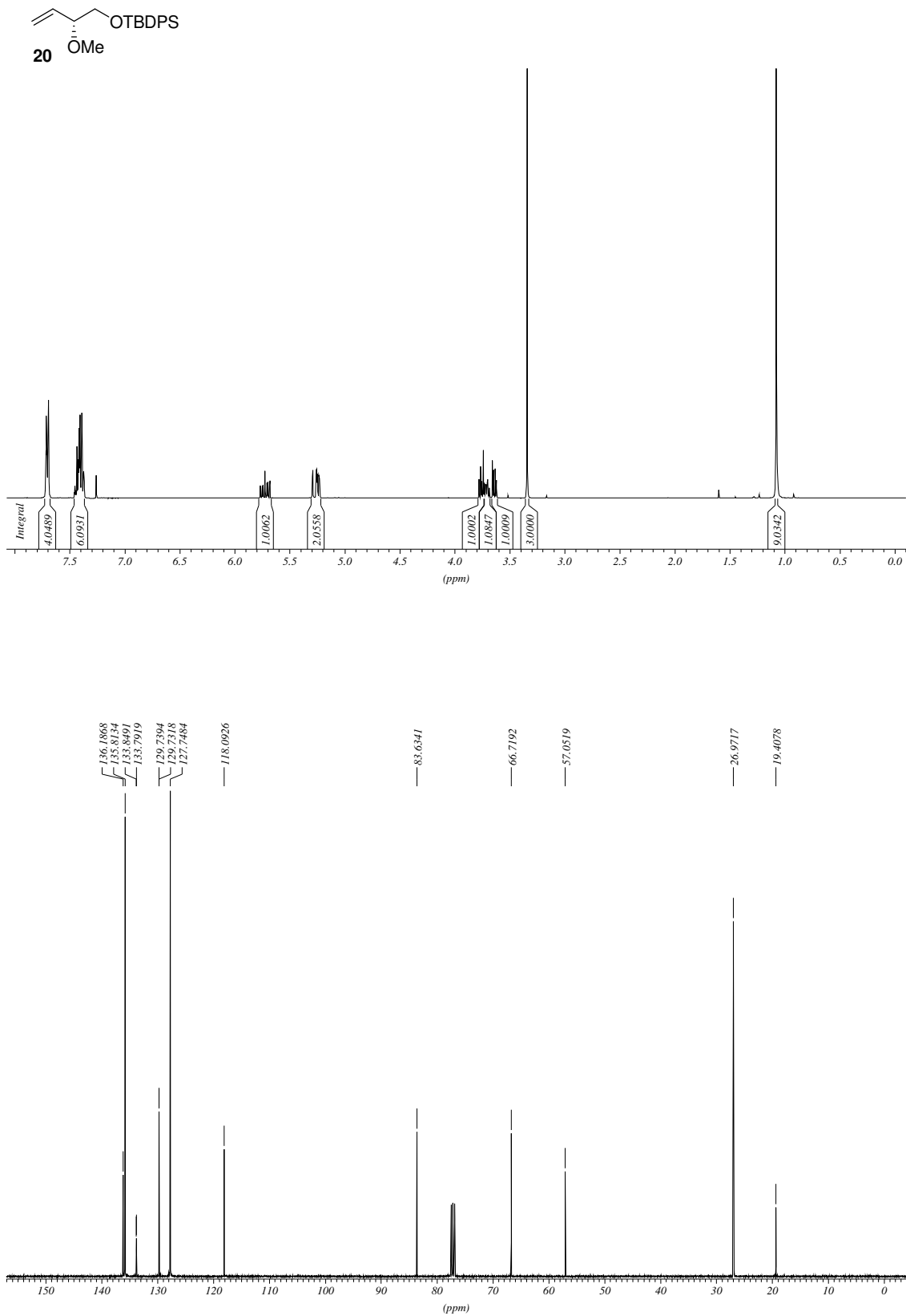


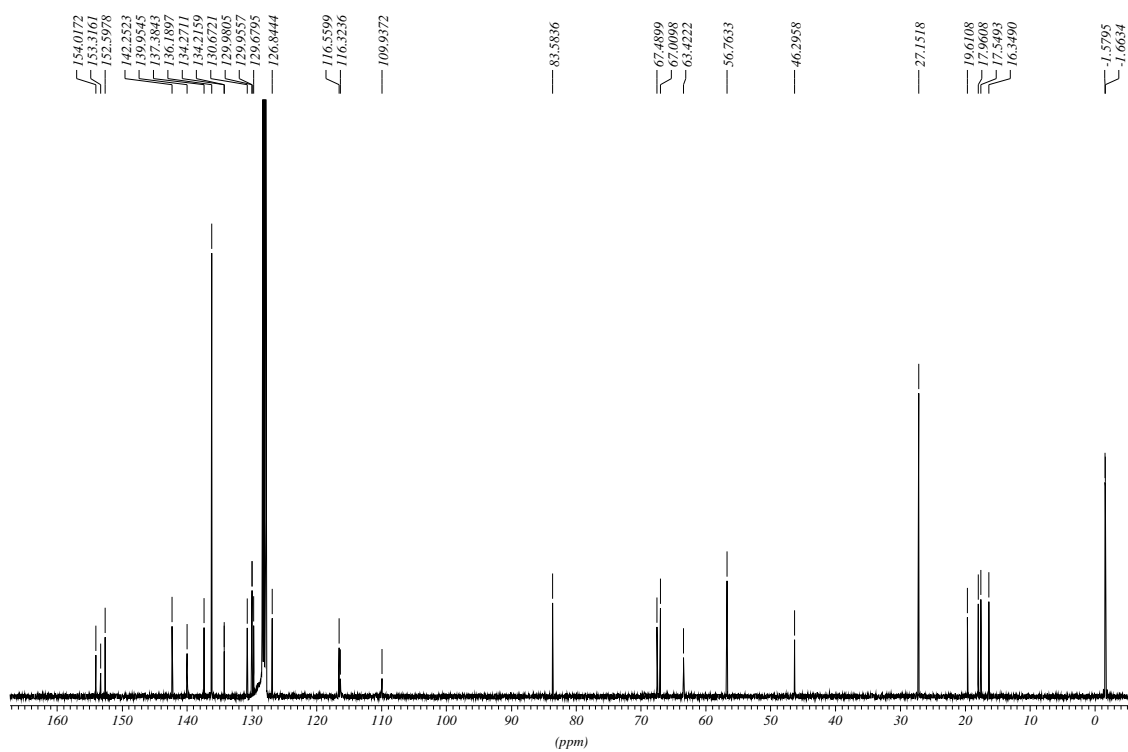
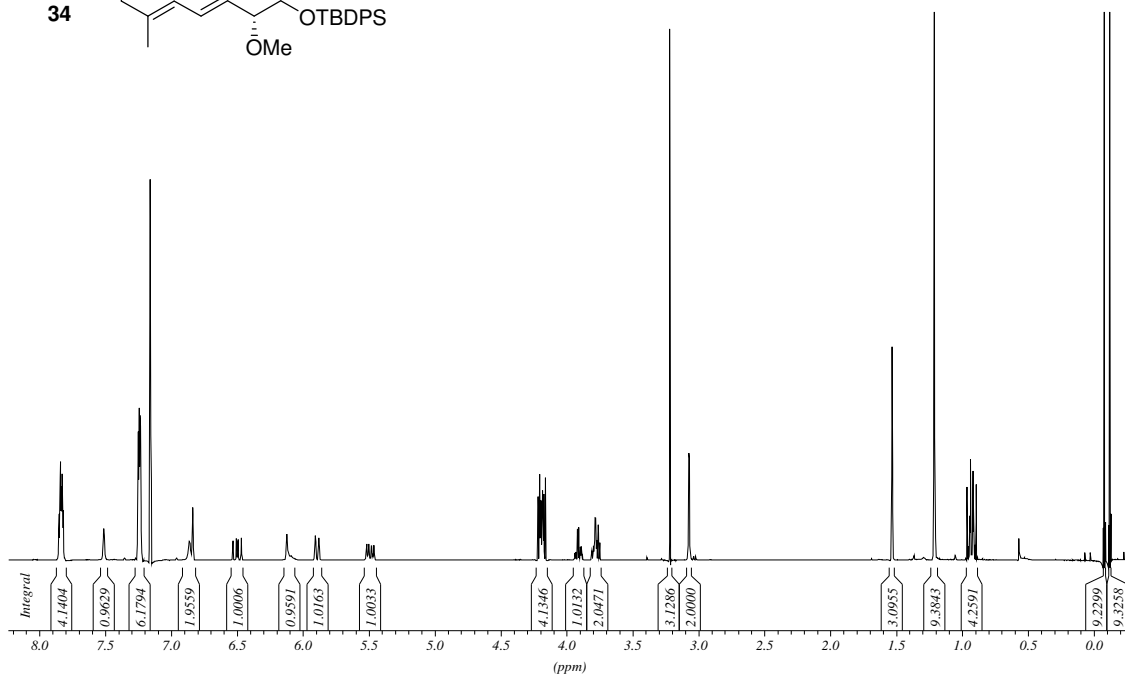
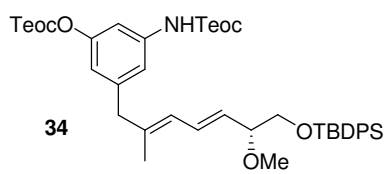
Abbildung 29: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Menge an Derivat **74** durch Integration des UV-Signals ($\lambda = 248 \text{ nm}$).

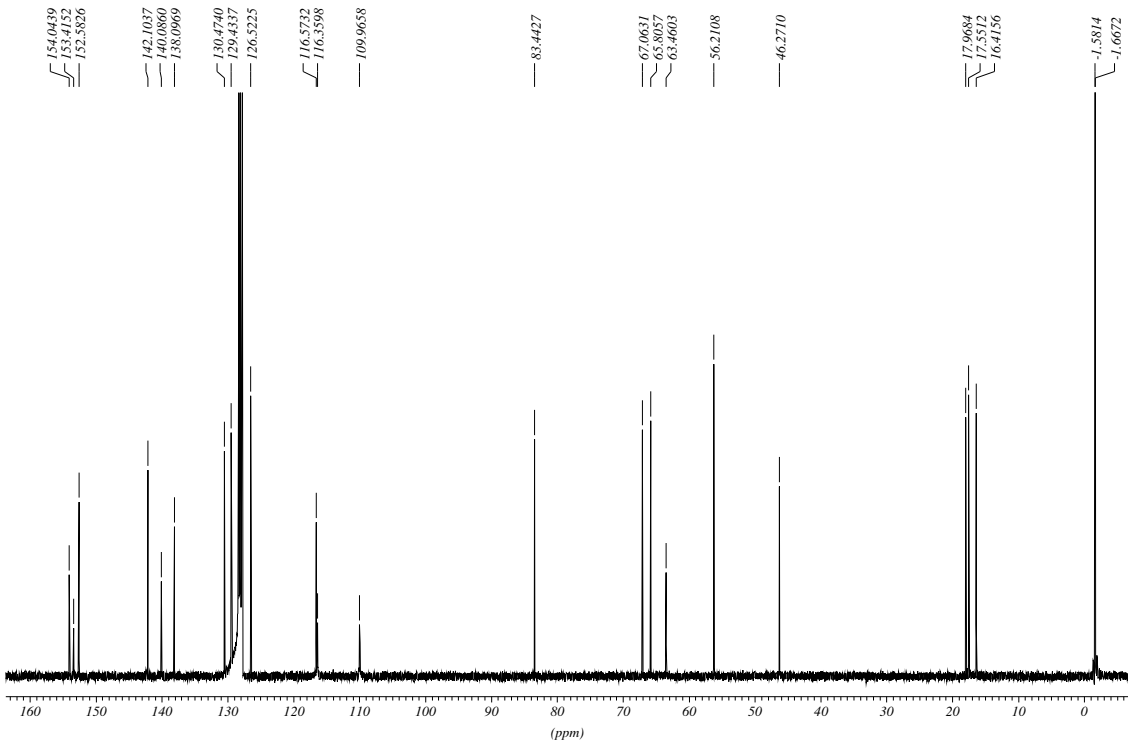
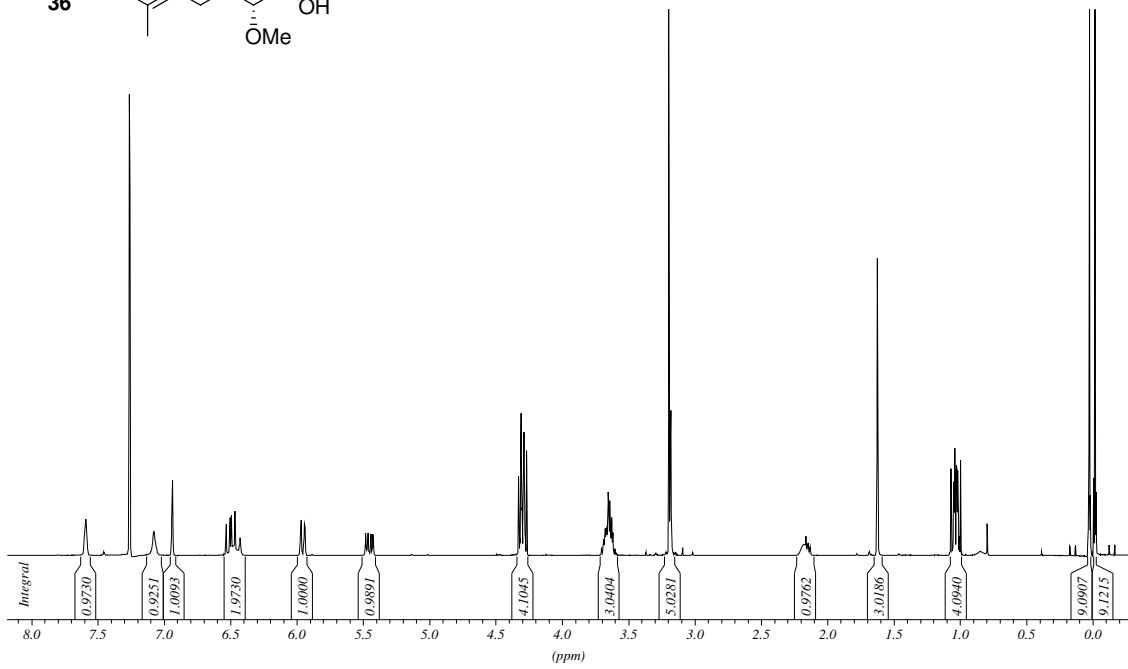
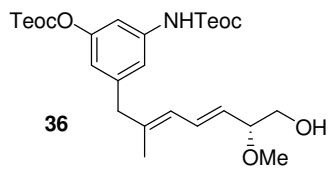
Tabelle 10: UV-Integral ($\lambda = 248 \text{ nm}$) im HPLC Chromatogramm bei verschiedenen Mengen an Derivat **74**.

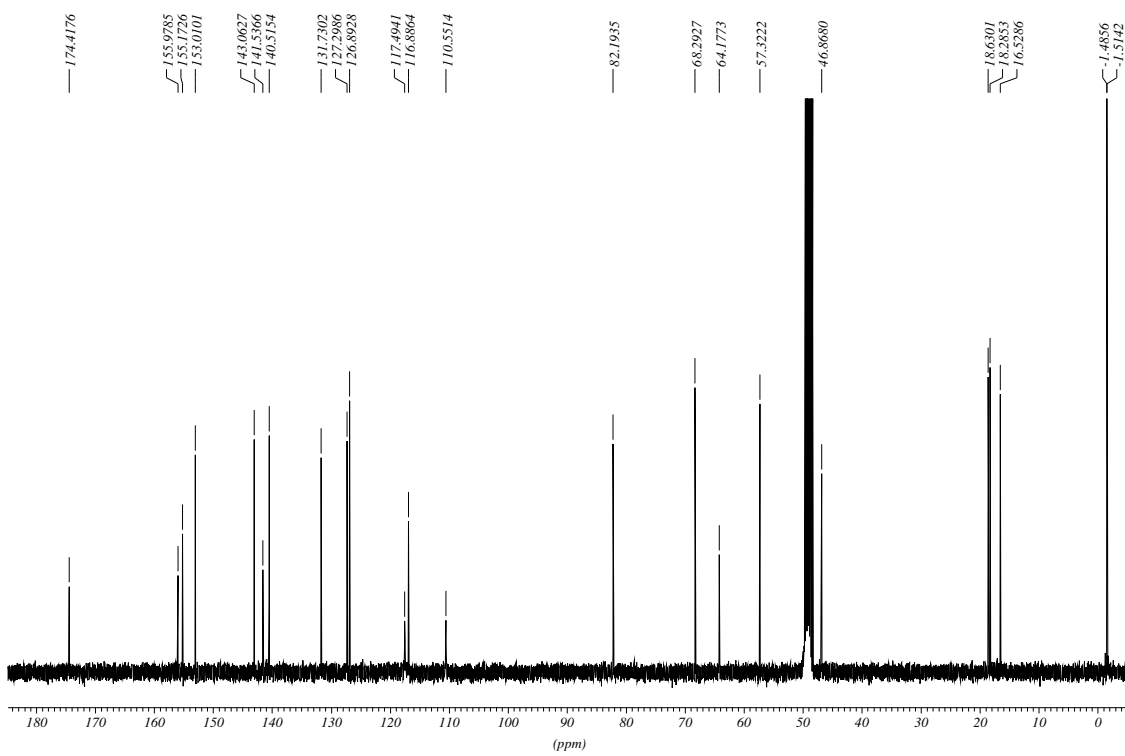
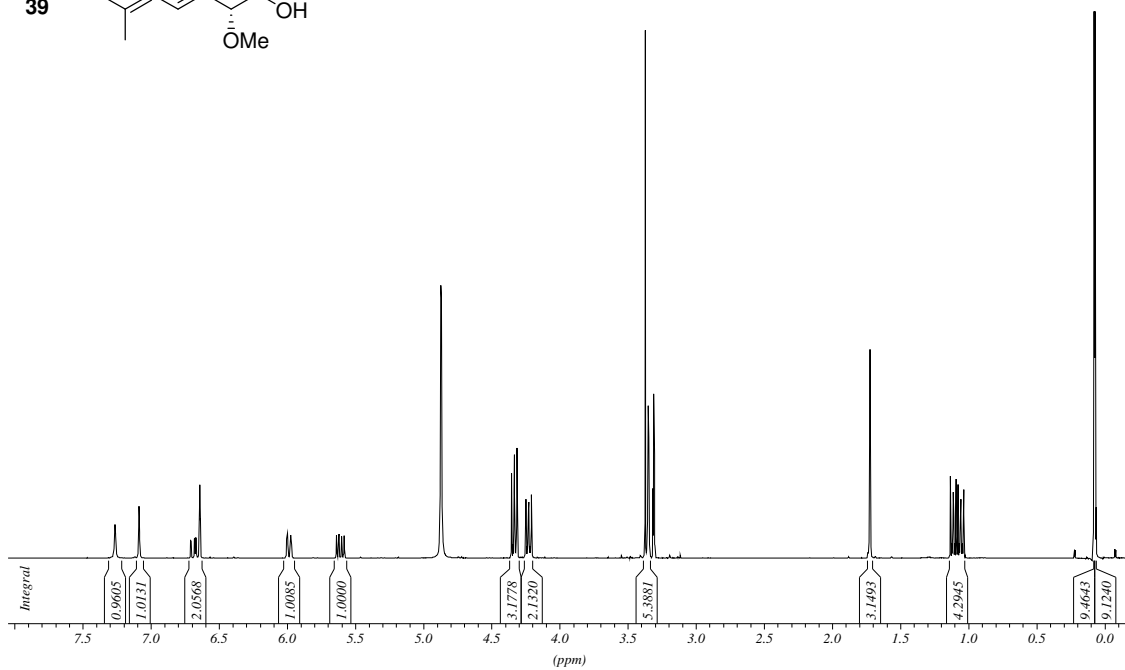
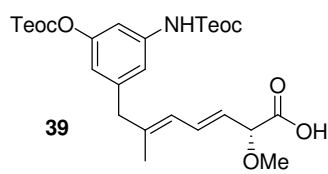
Probe	m(74) [μg]	UV Integral [AU, $\lambda = 248 \text{ nm}$]
/	0	0
Verdünnungsreihe	8	2636382
Verdünnungsreihe	40	13184559
Fermentation von Mutasynton 62	394	129900000
Fermentation von <i>seco</i> -Derivat 78	14	4683650

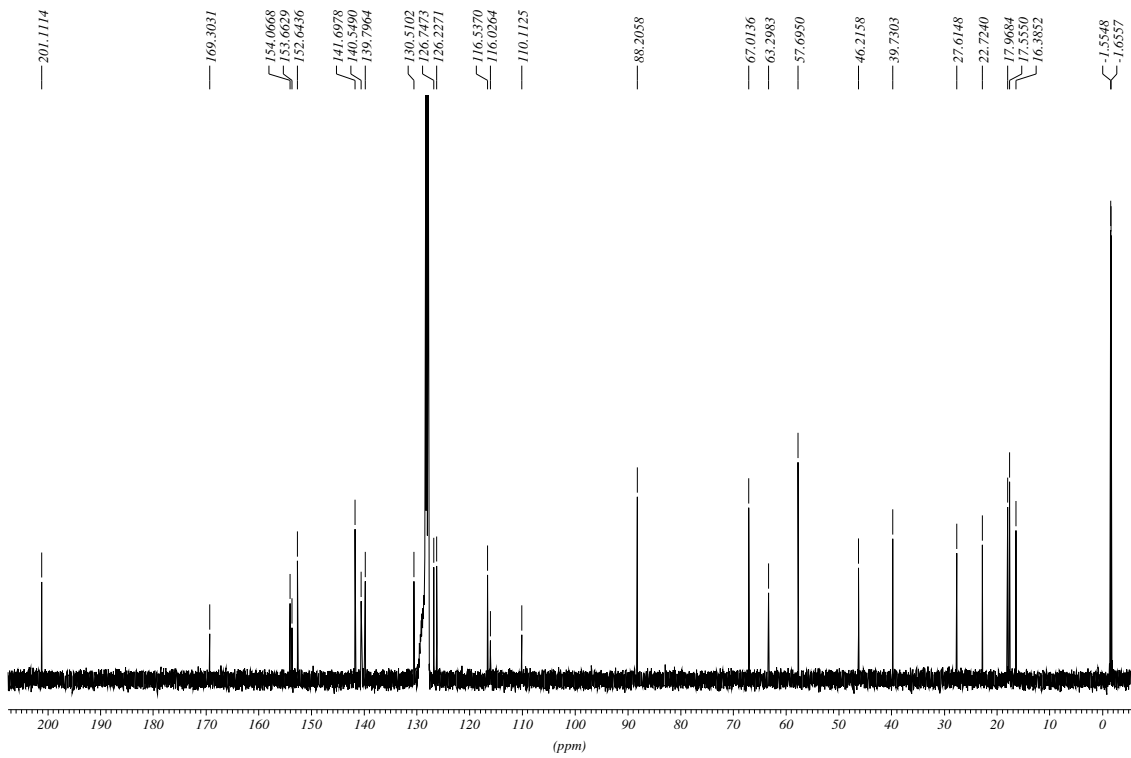
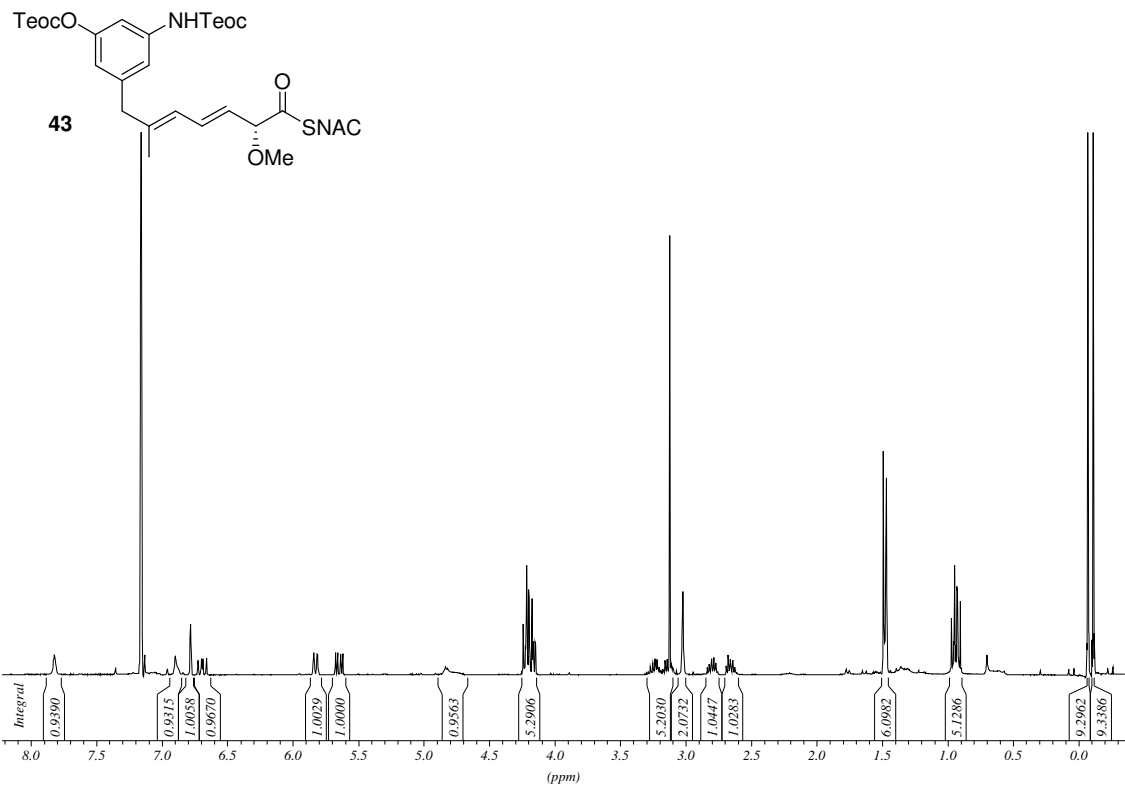
7.3 NMR-Spektren

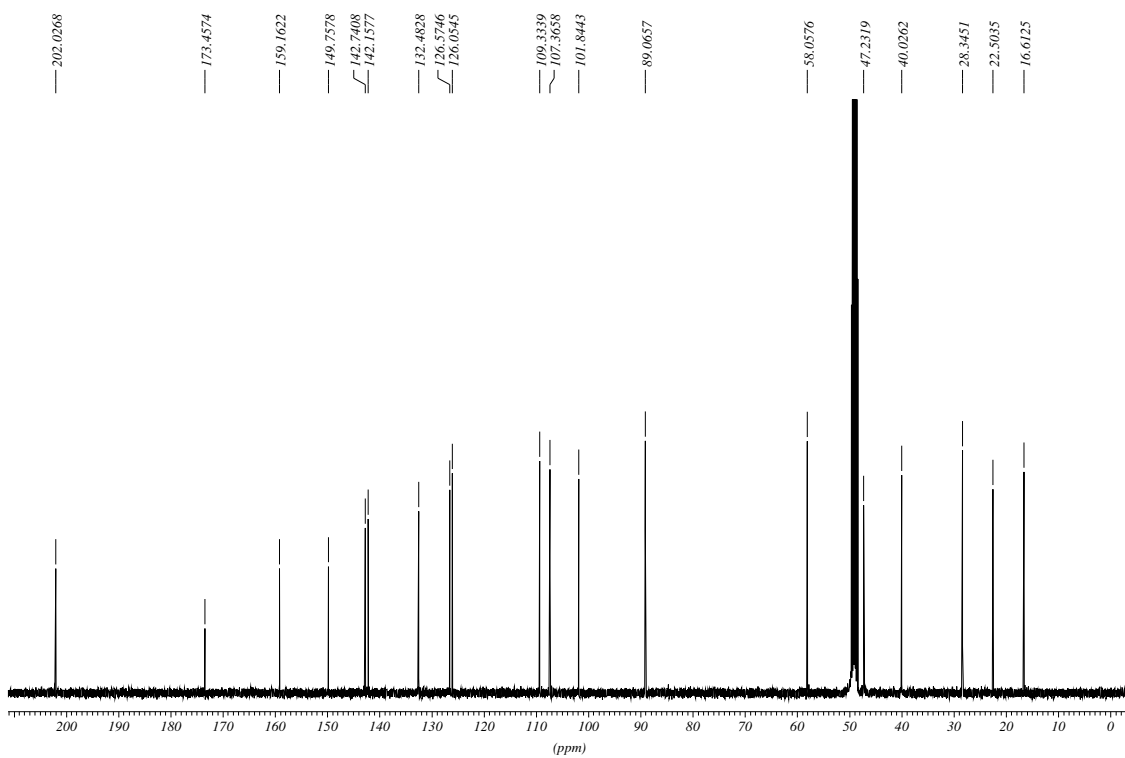
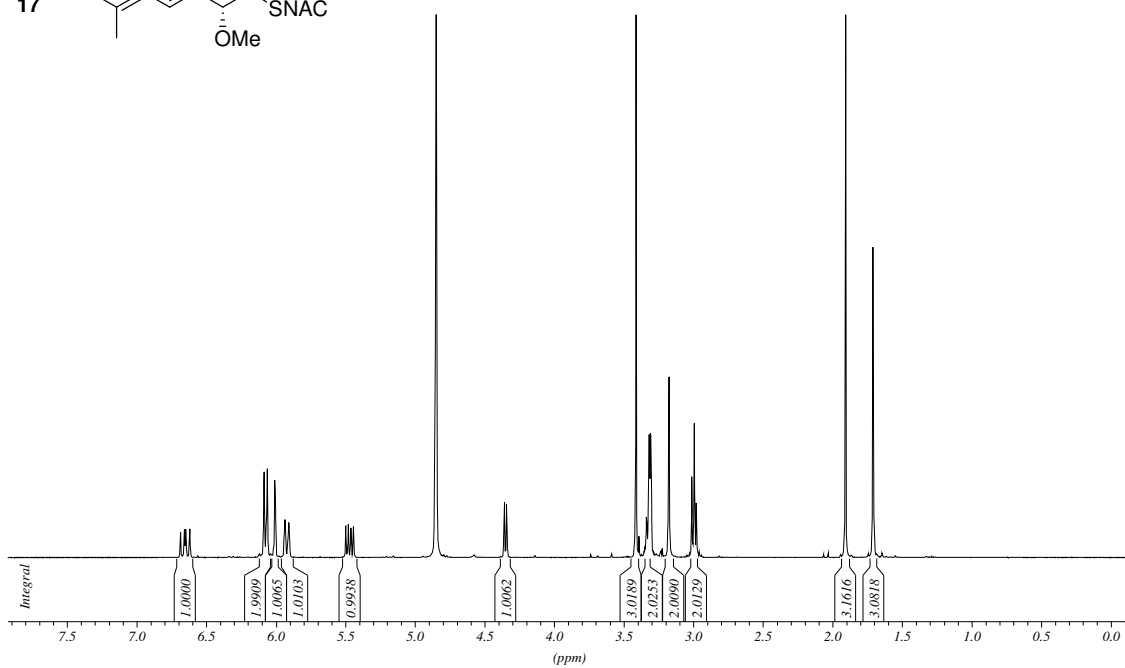
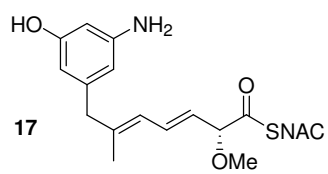


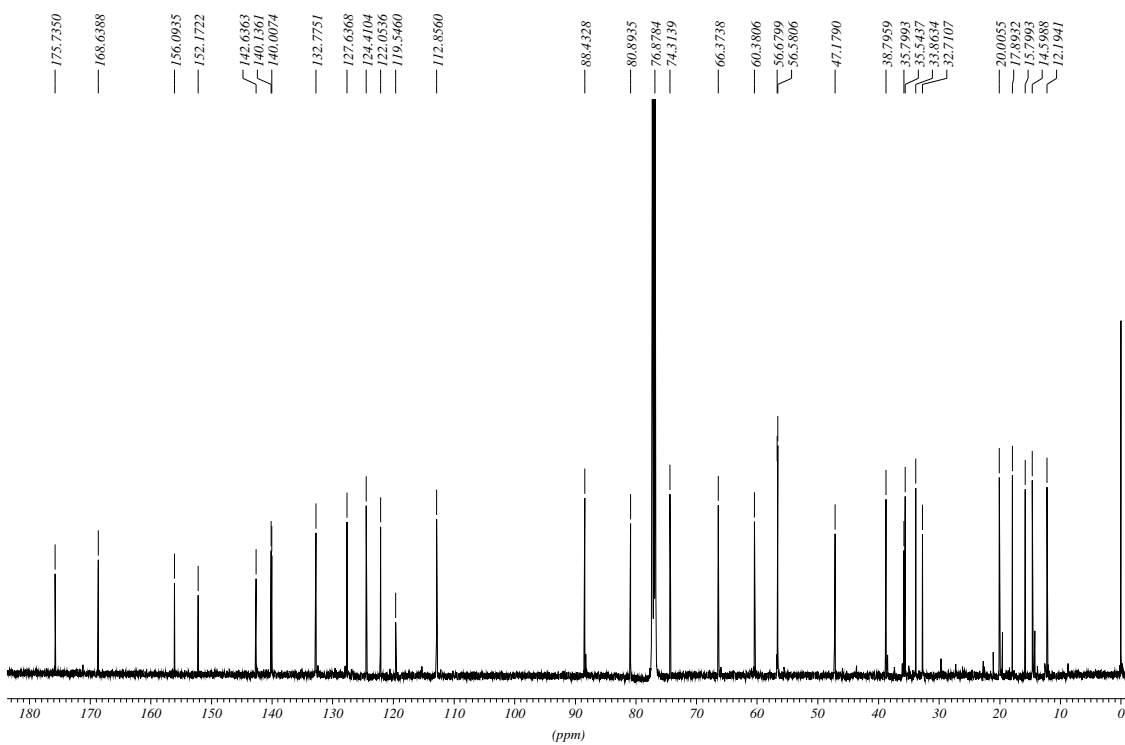


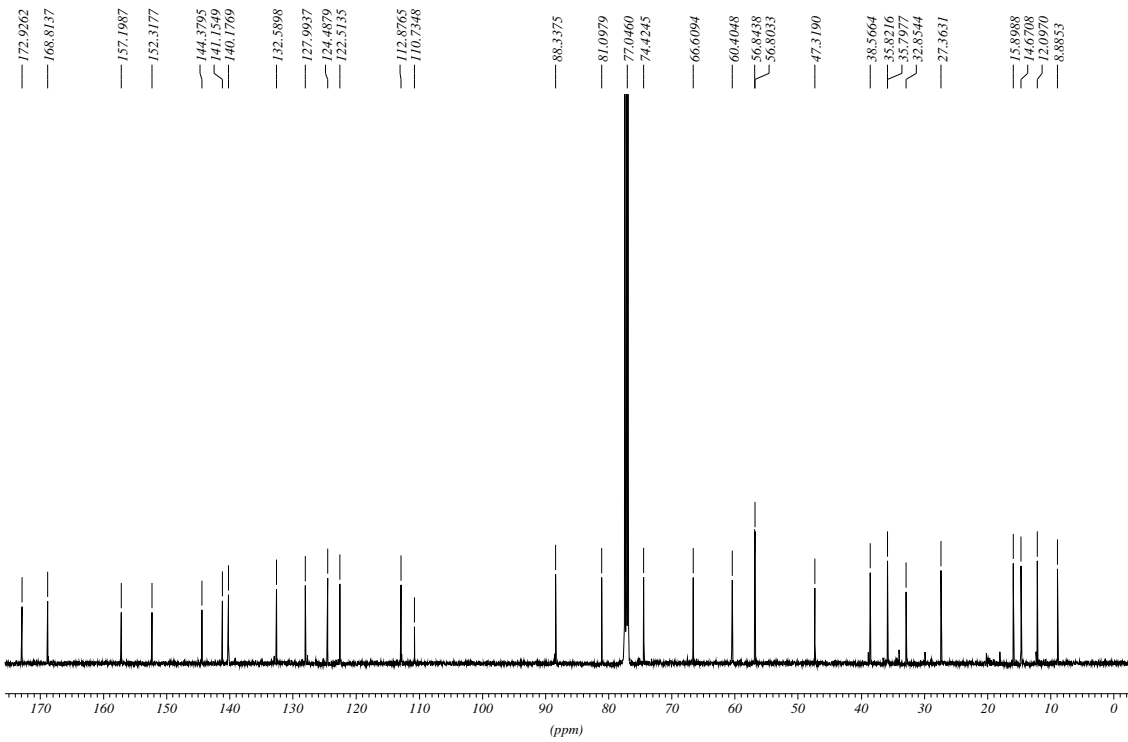


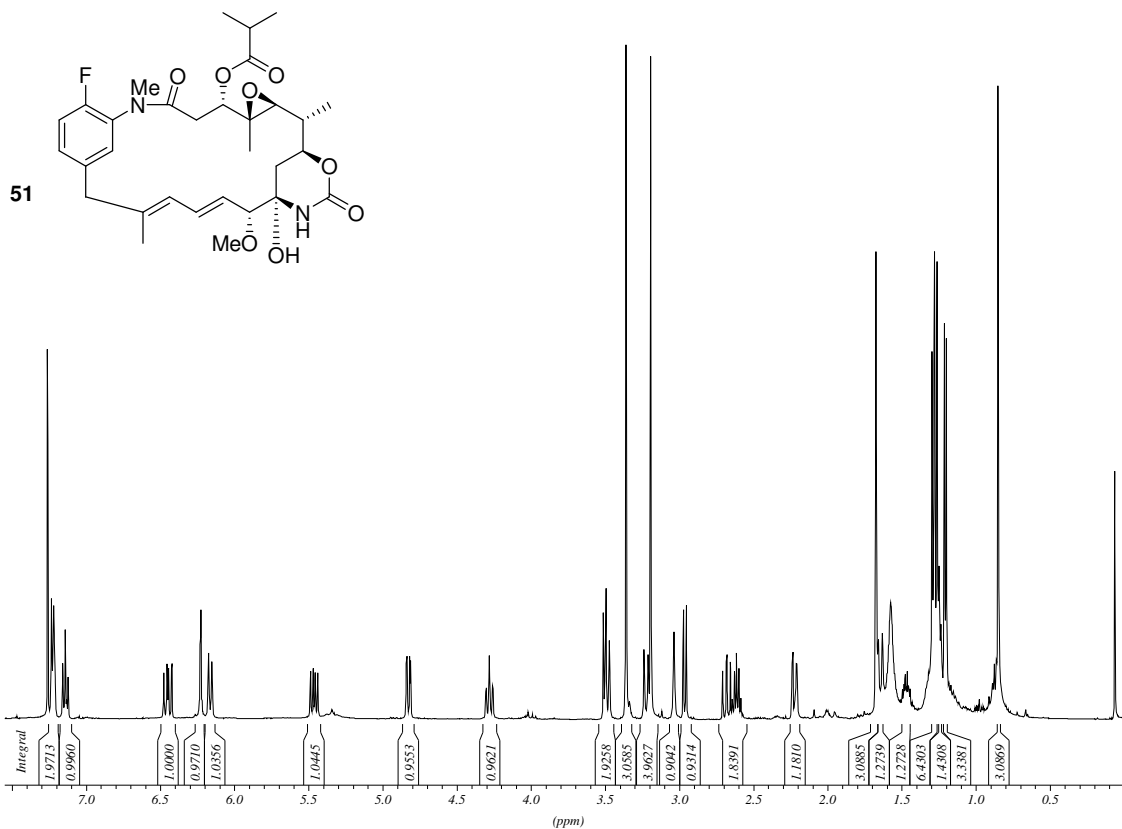




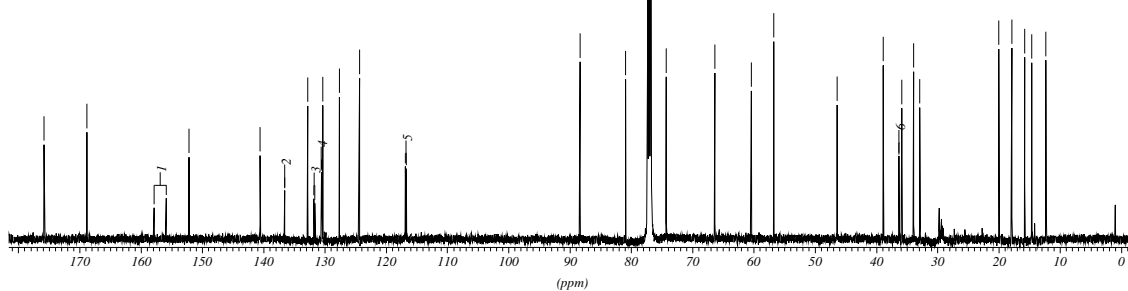


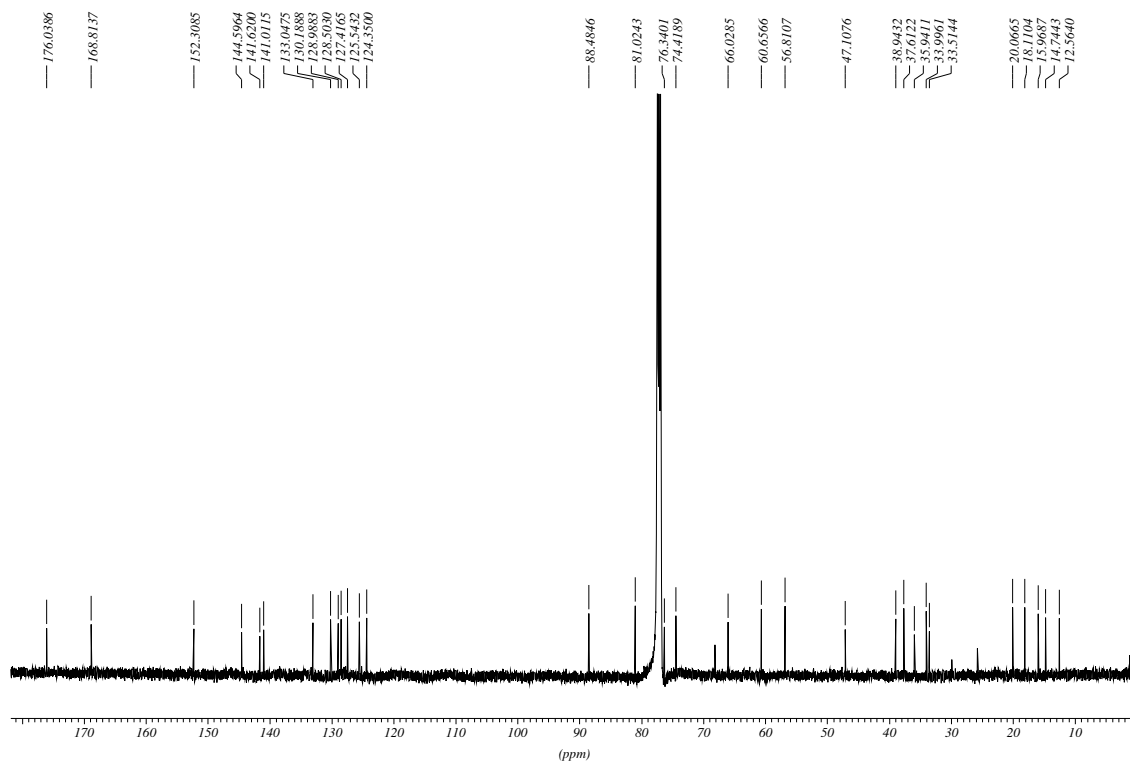
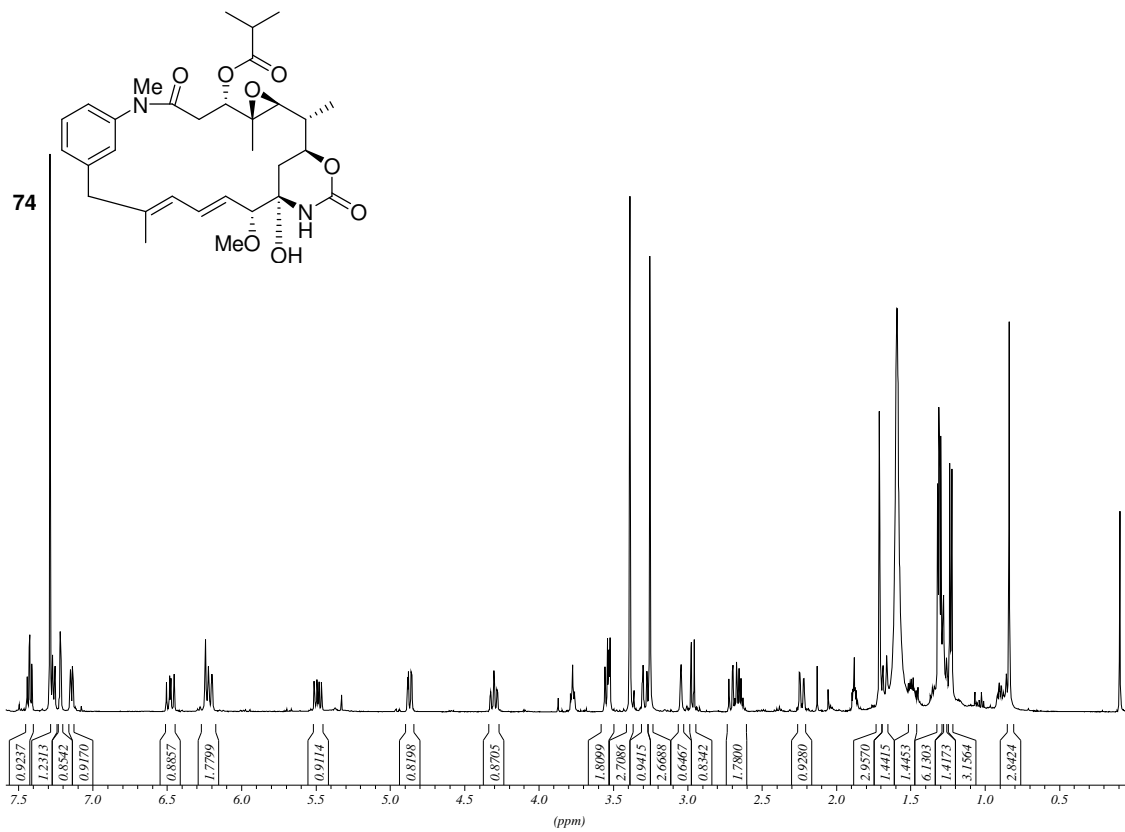


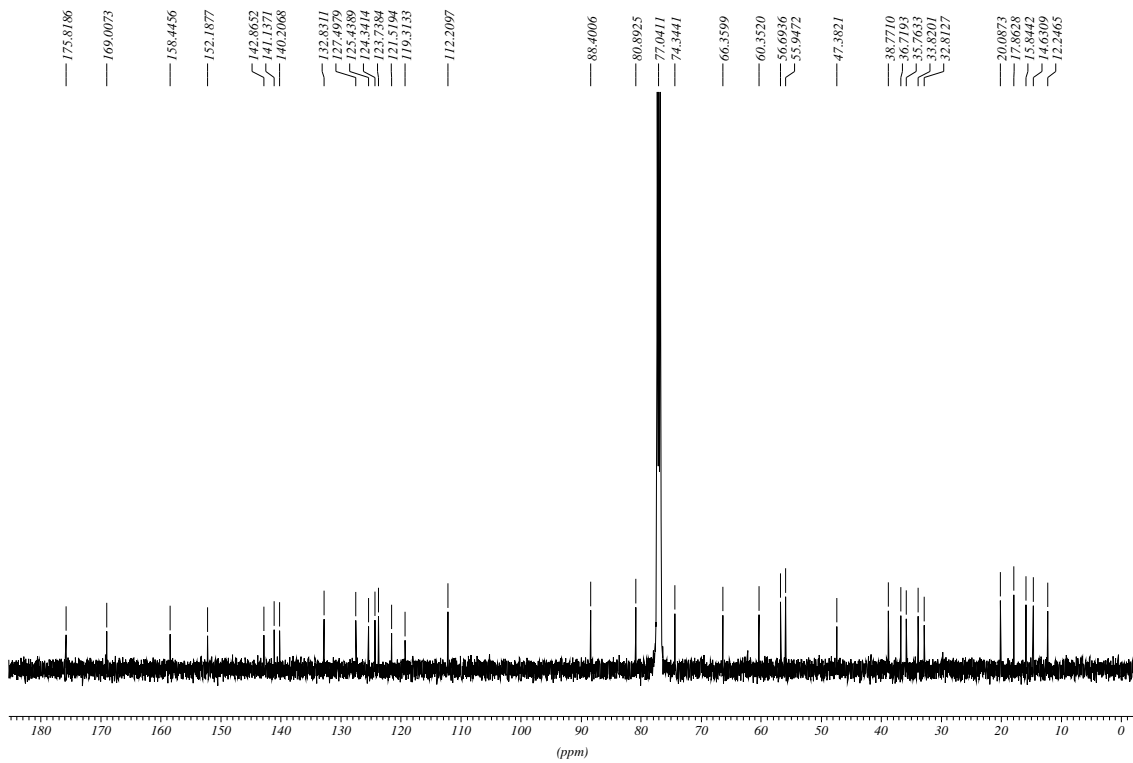
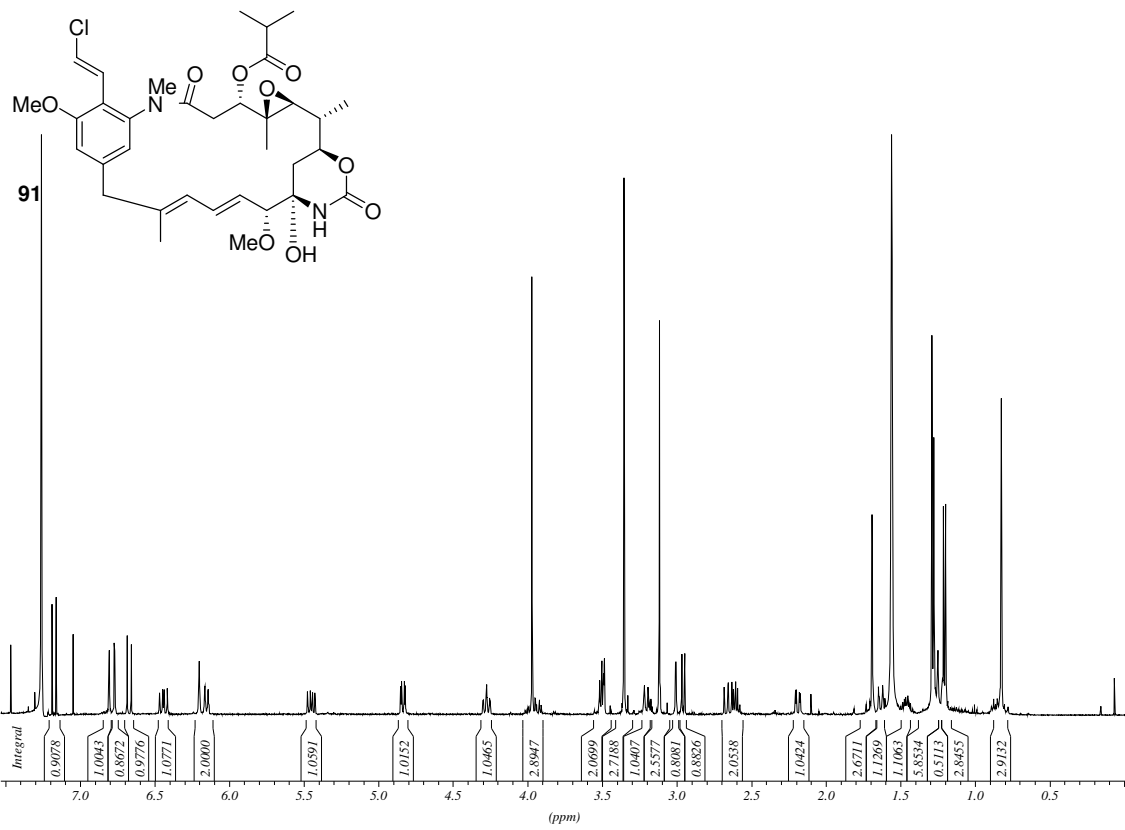


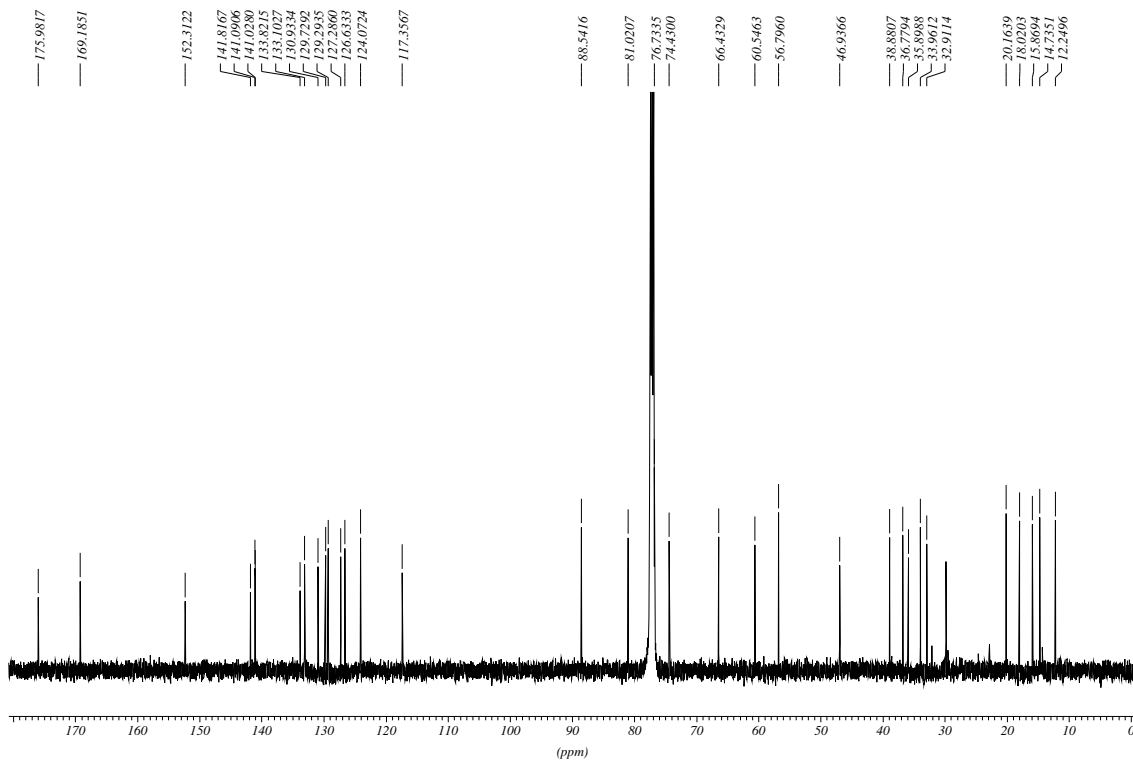
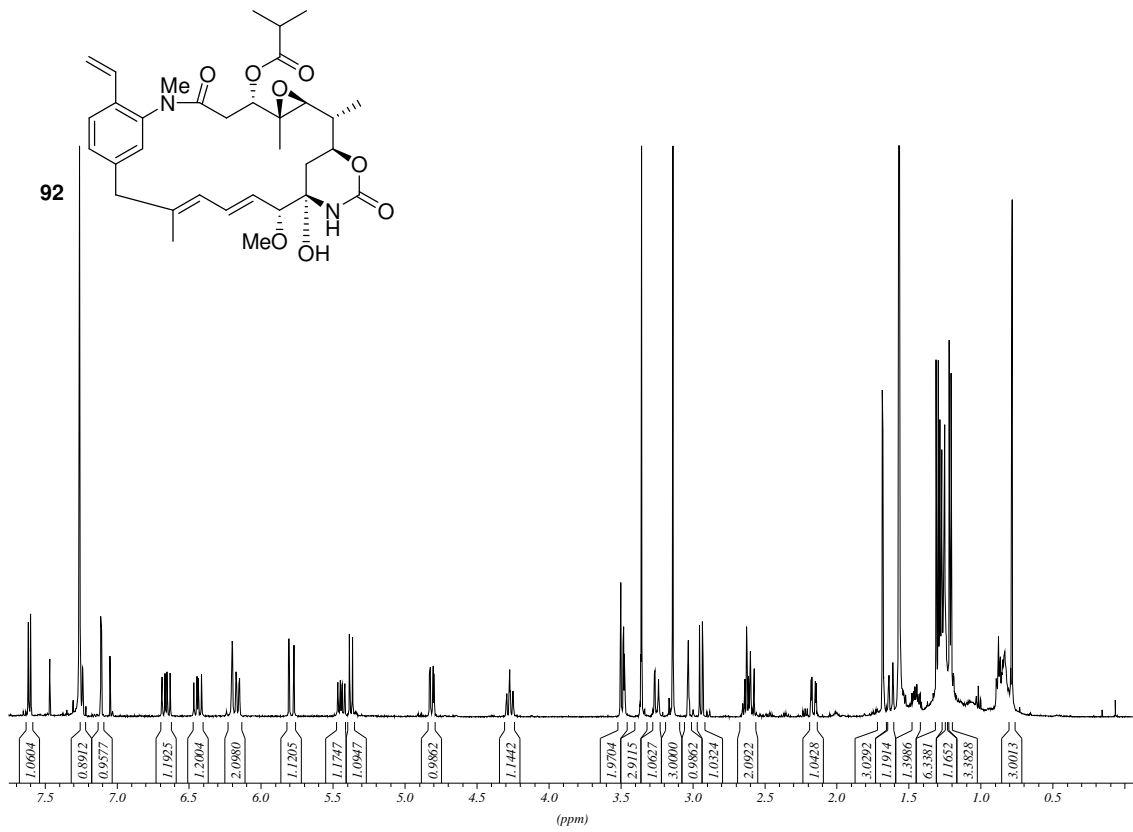


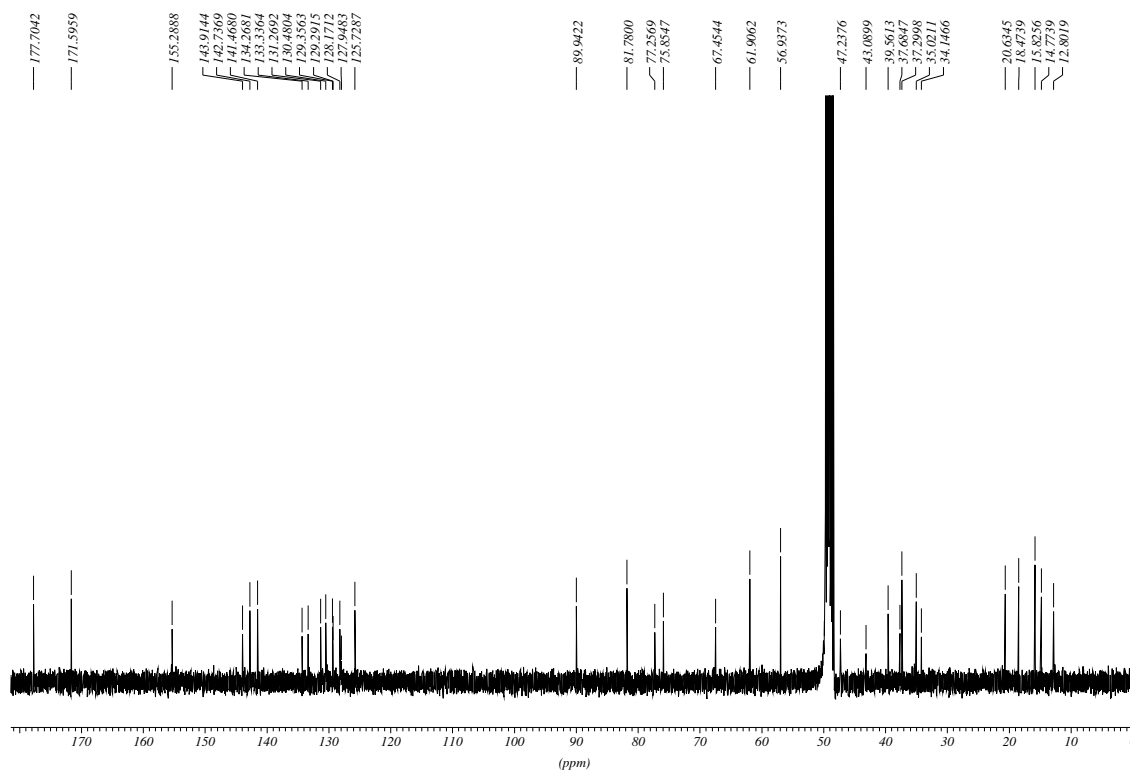
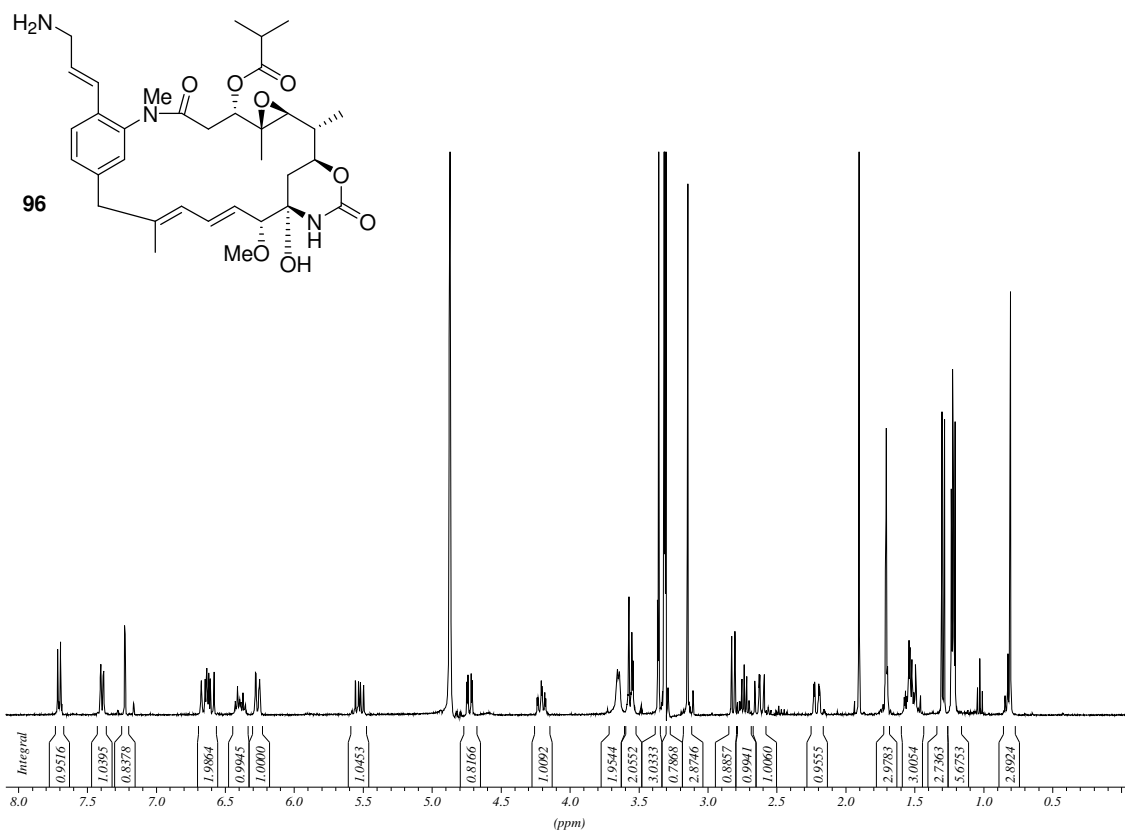
Identifier	Chem. Shift [ppm]	J [Hz]	Multiplicity	Connections
1	157.0249	250.3829	2	J(1,0)
2	136.6793	3.9303	2	J(2,0)
3	131.8195	13.4092	2	J(3,0)
4	130.6401	7.6294	2	J(4,0)
5	116.8861	19.8827	2	J(5,0)
6	36.4044	1.8496	2	J(6,0)

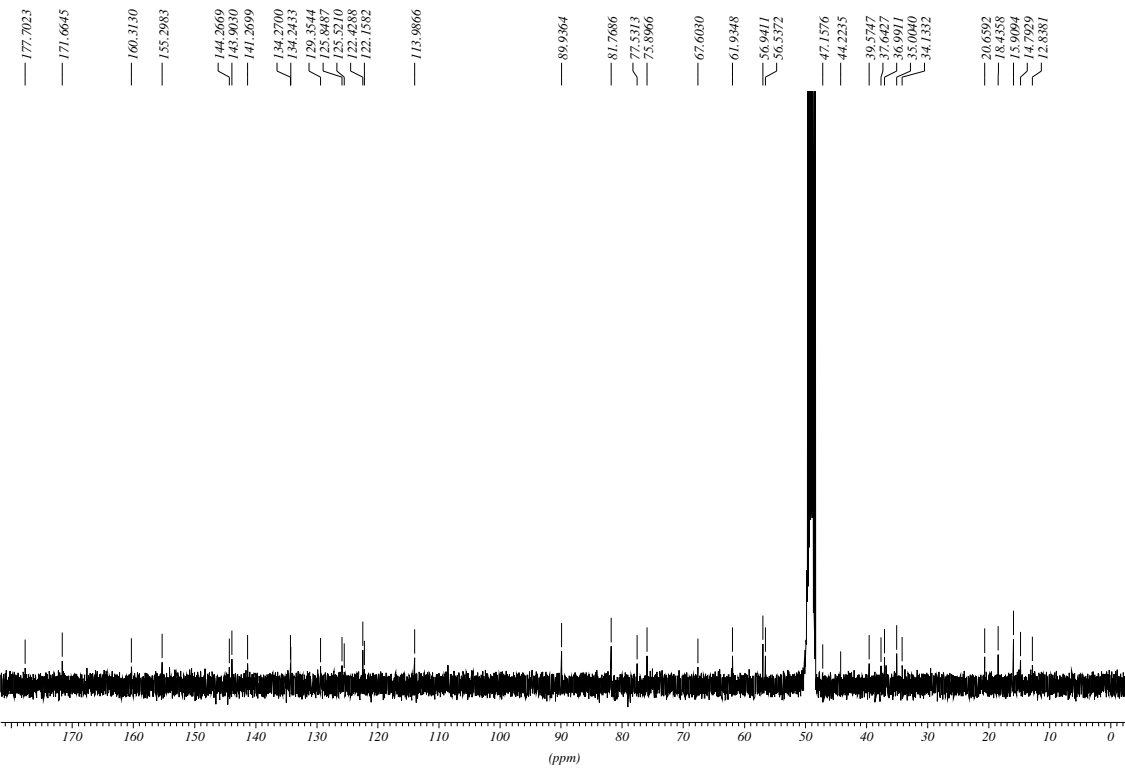
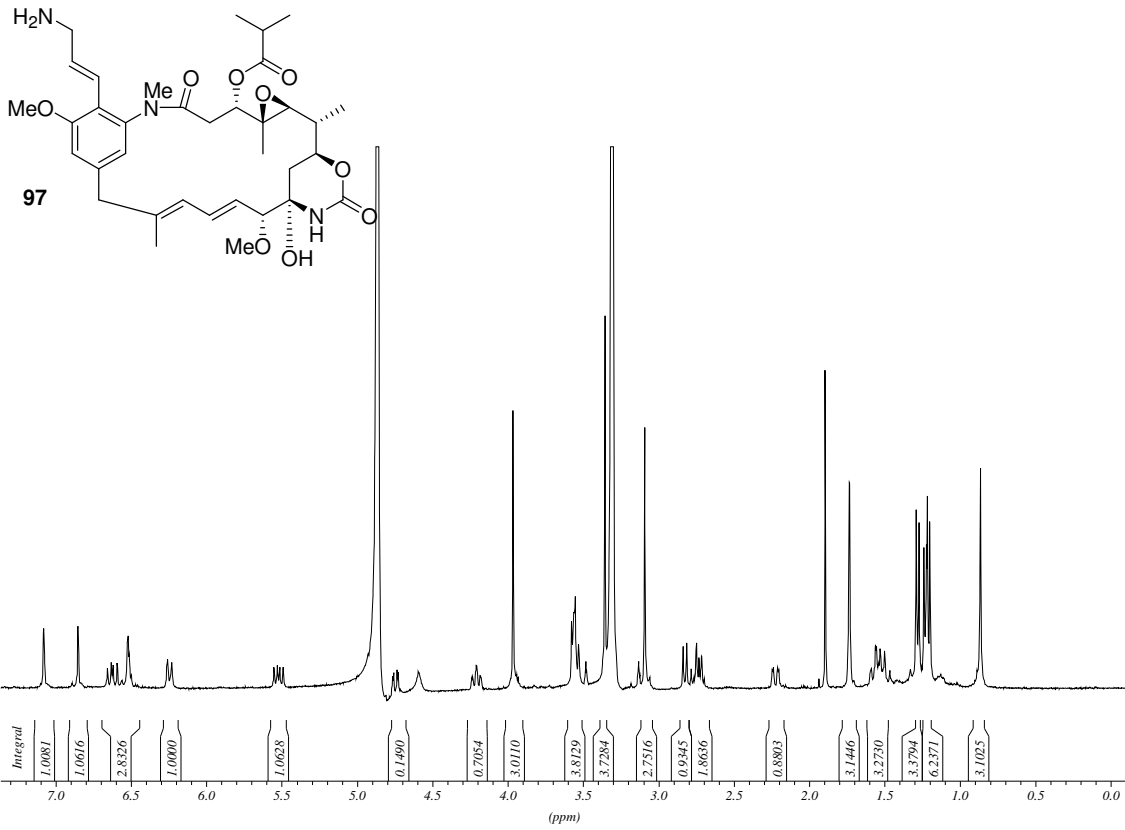


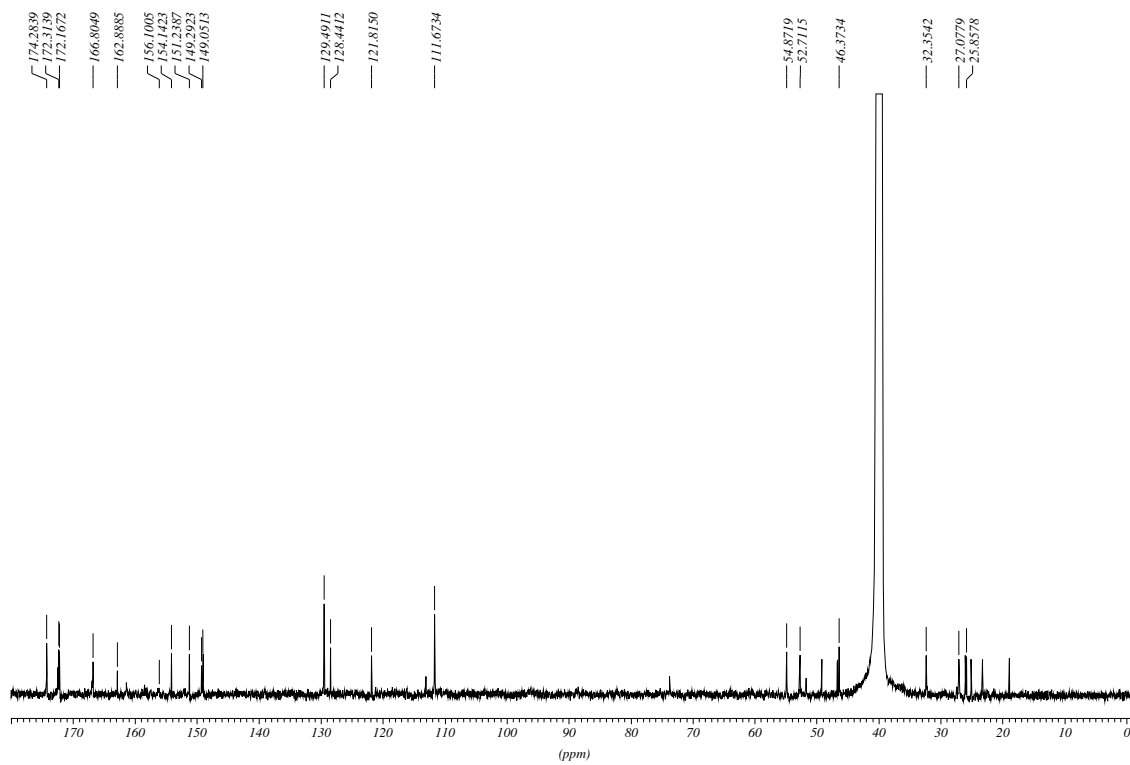
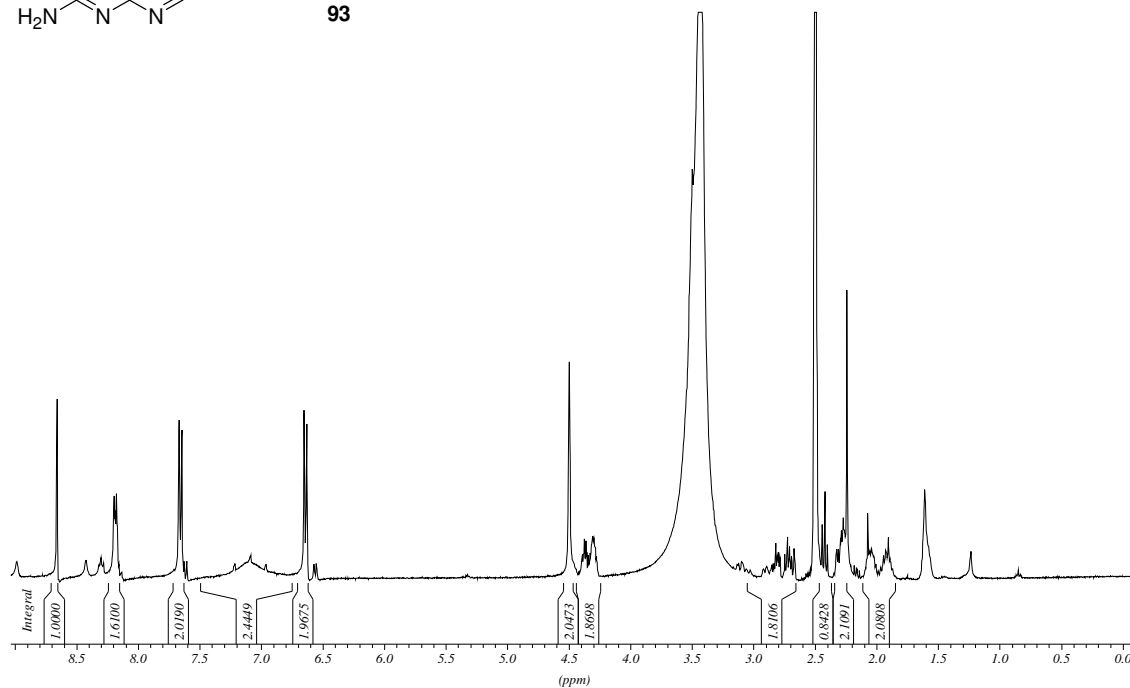
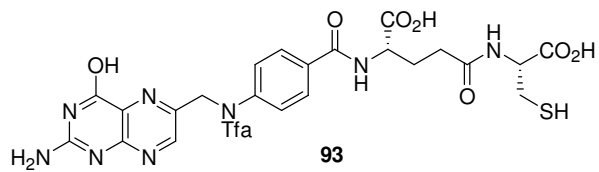


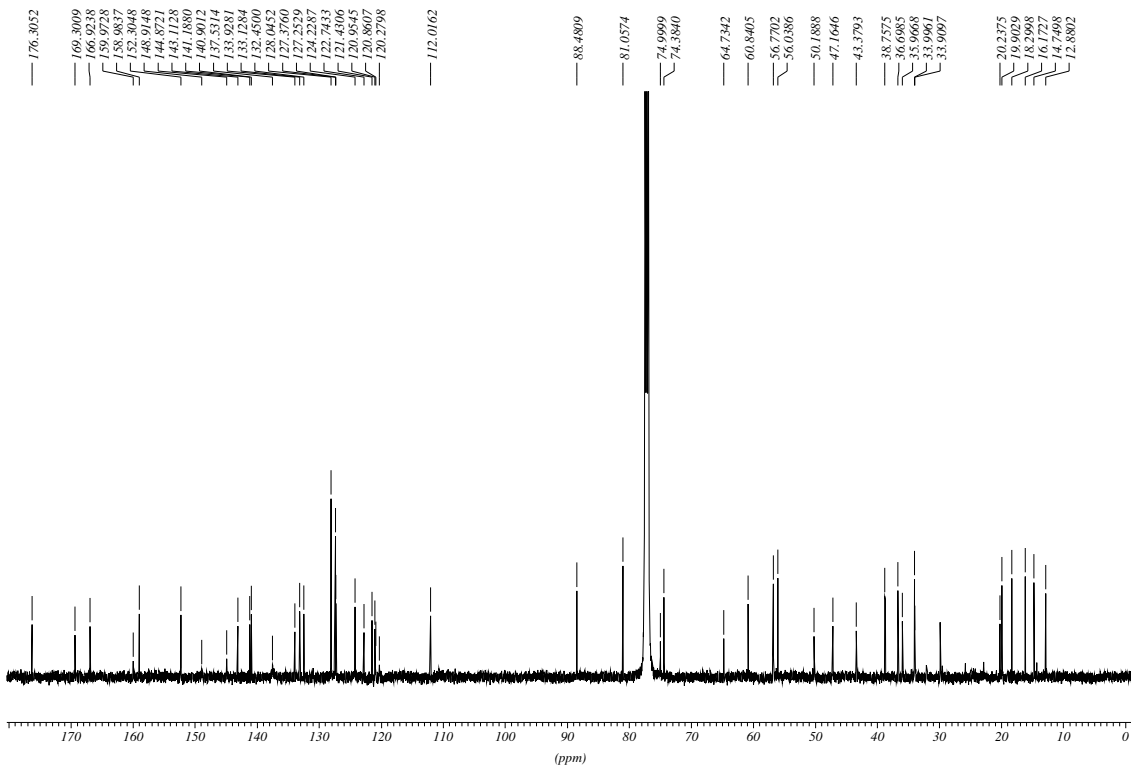
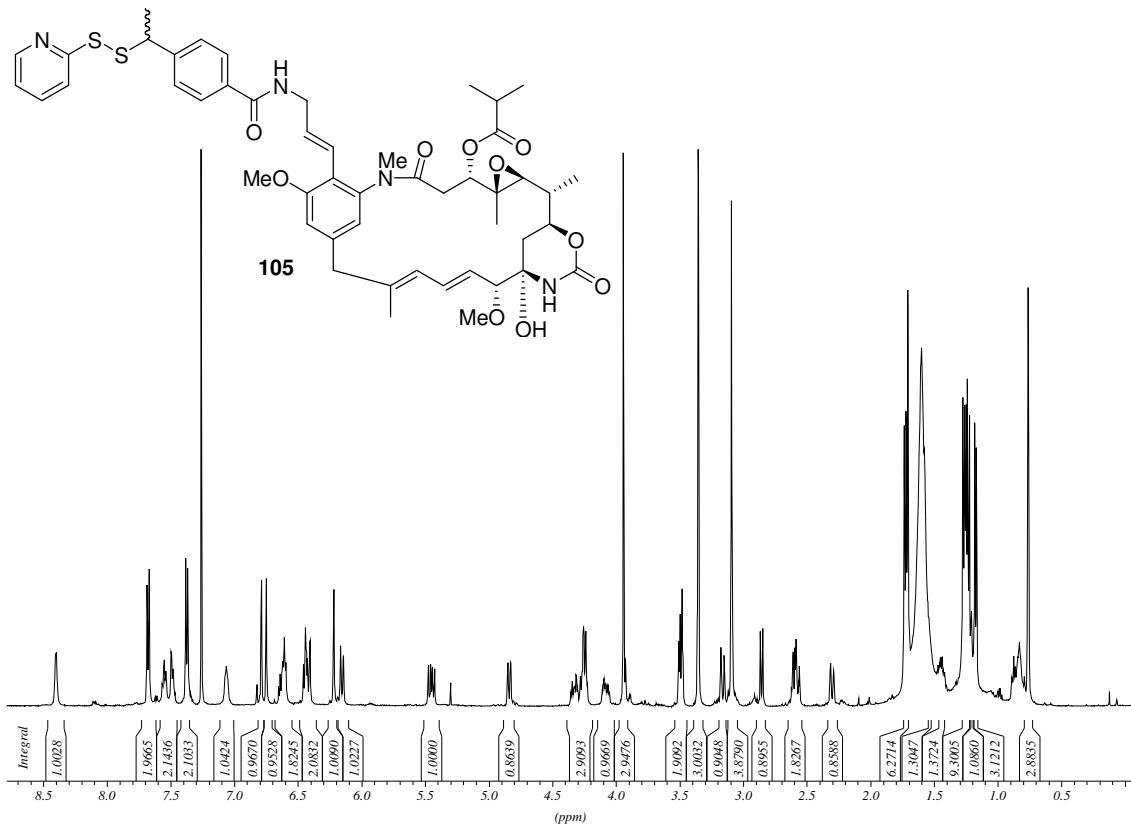


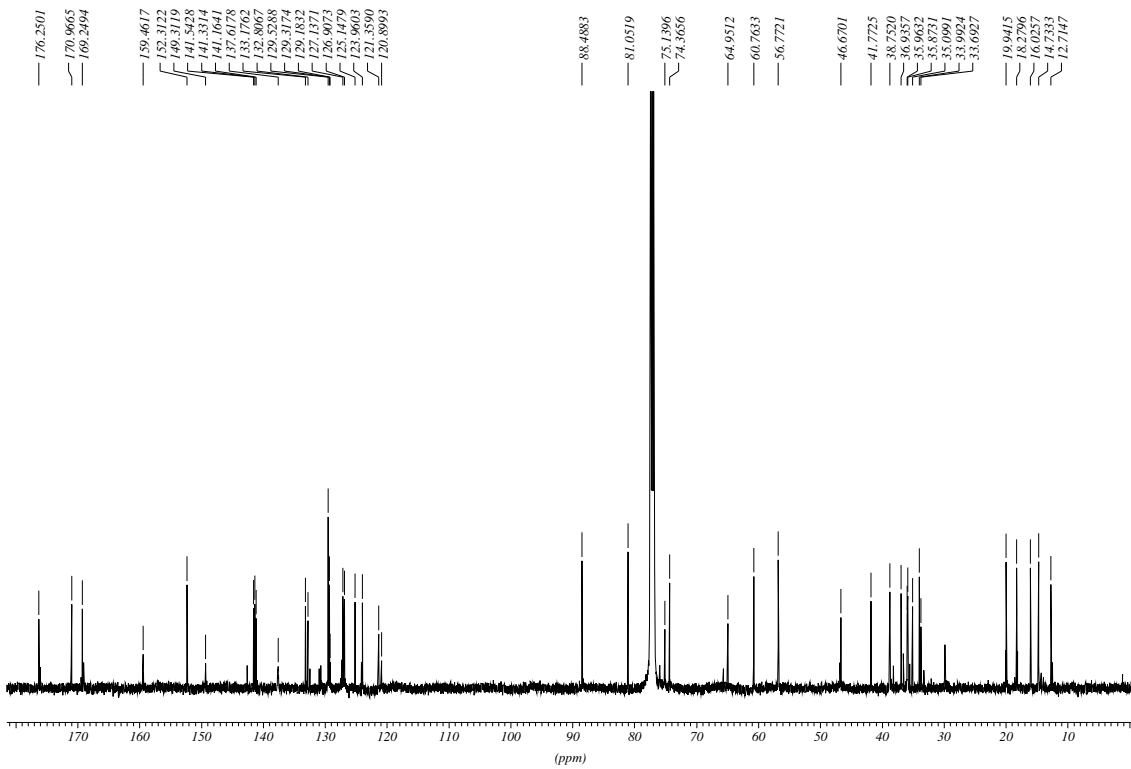
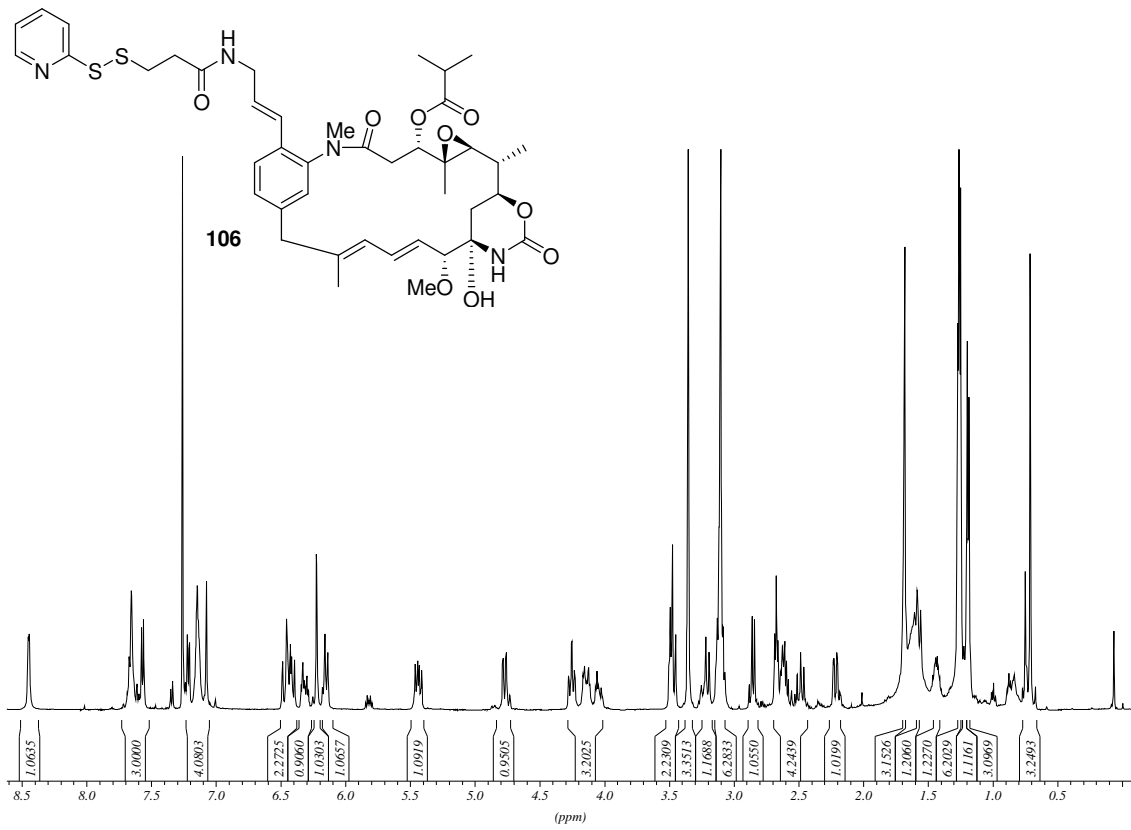


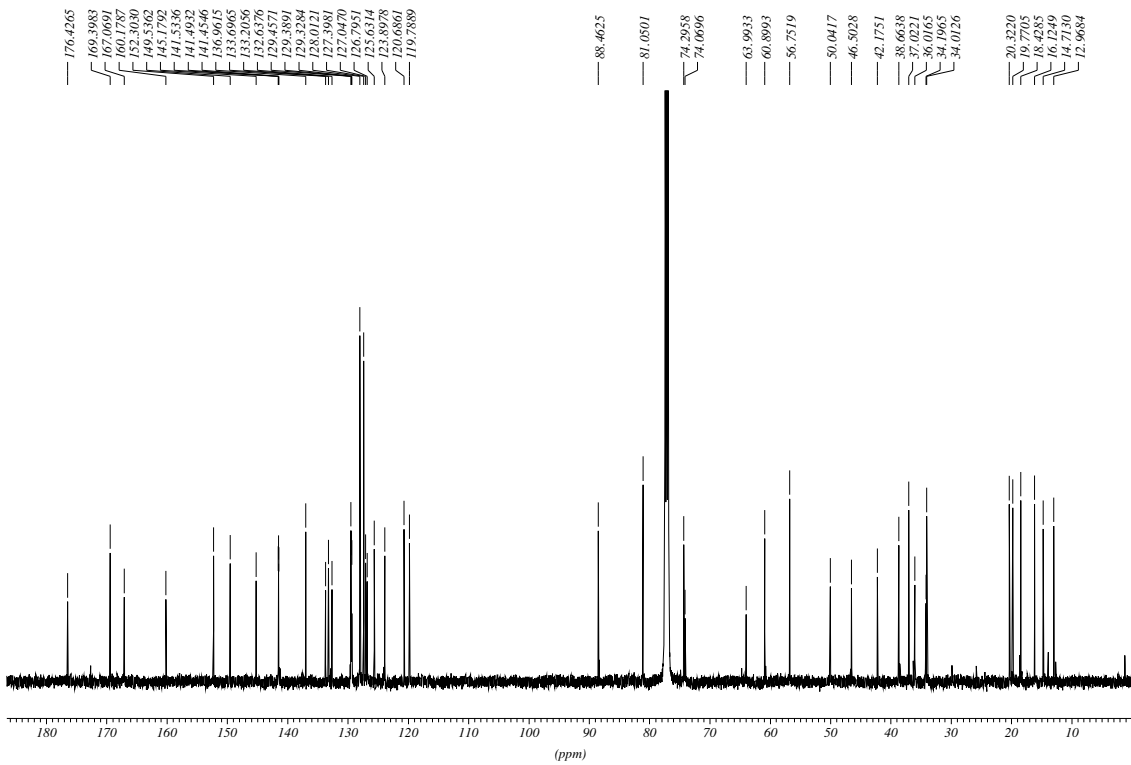
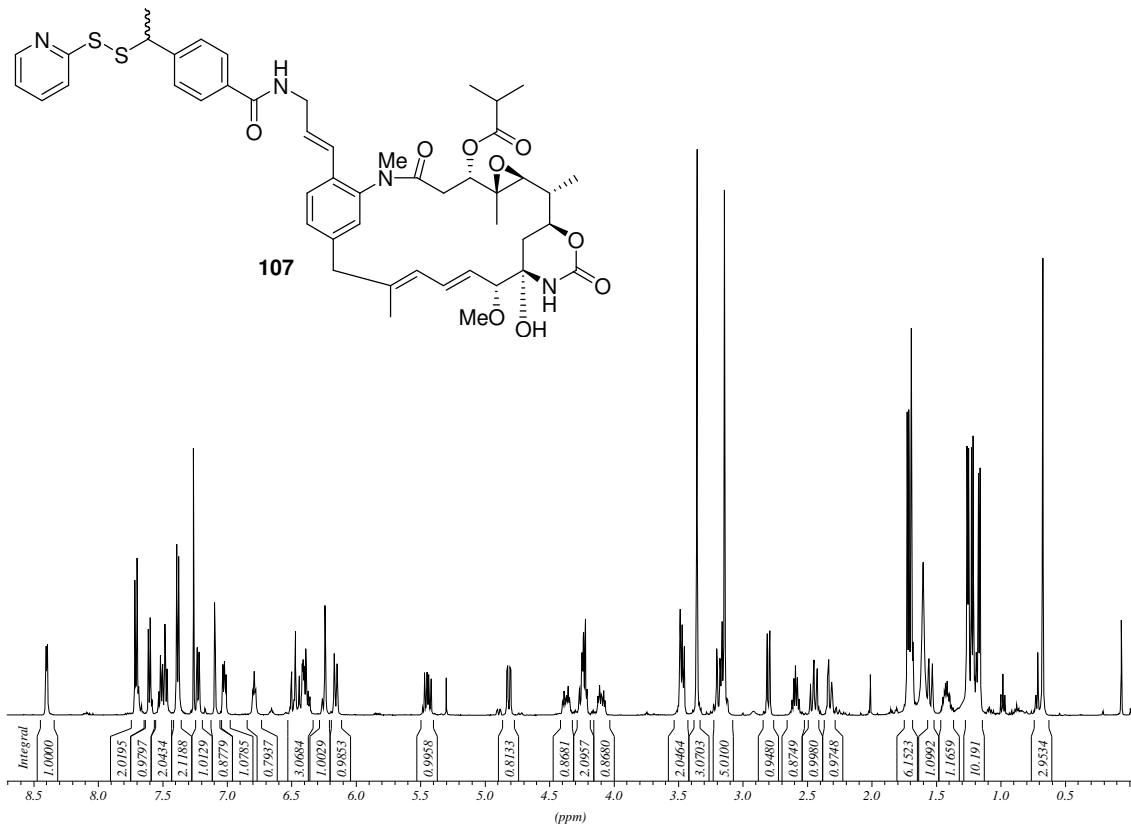


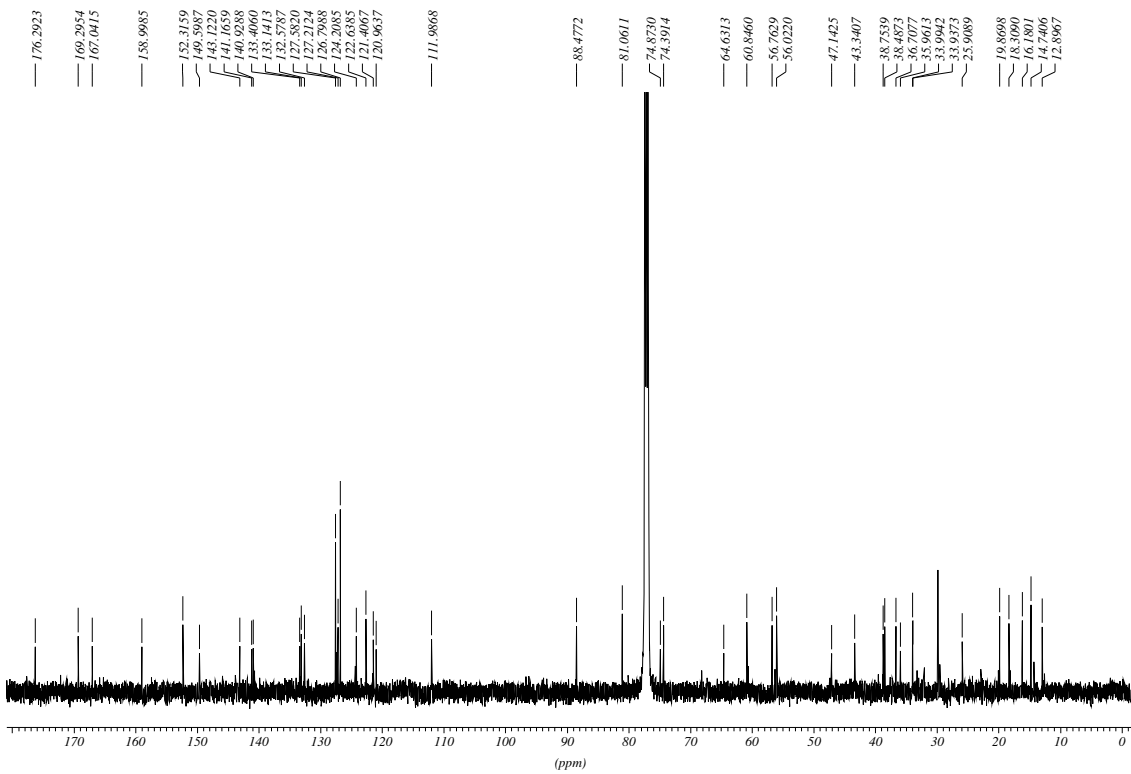
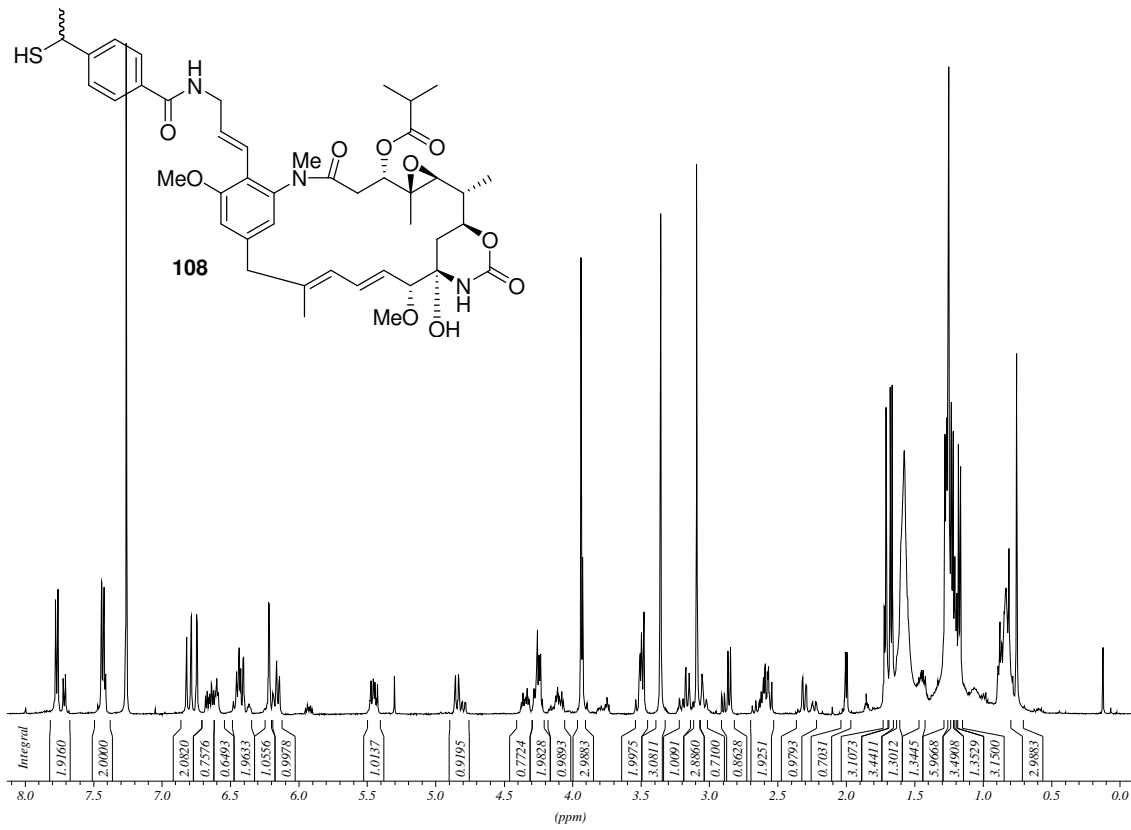


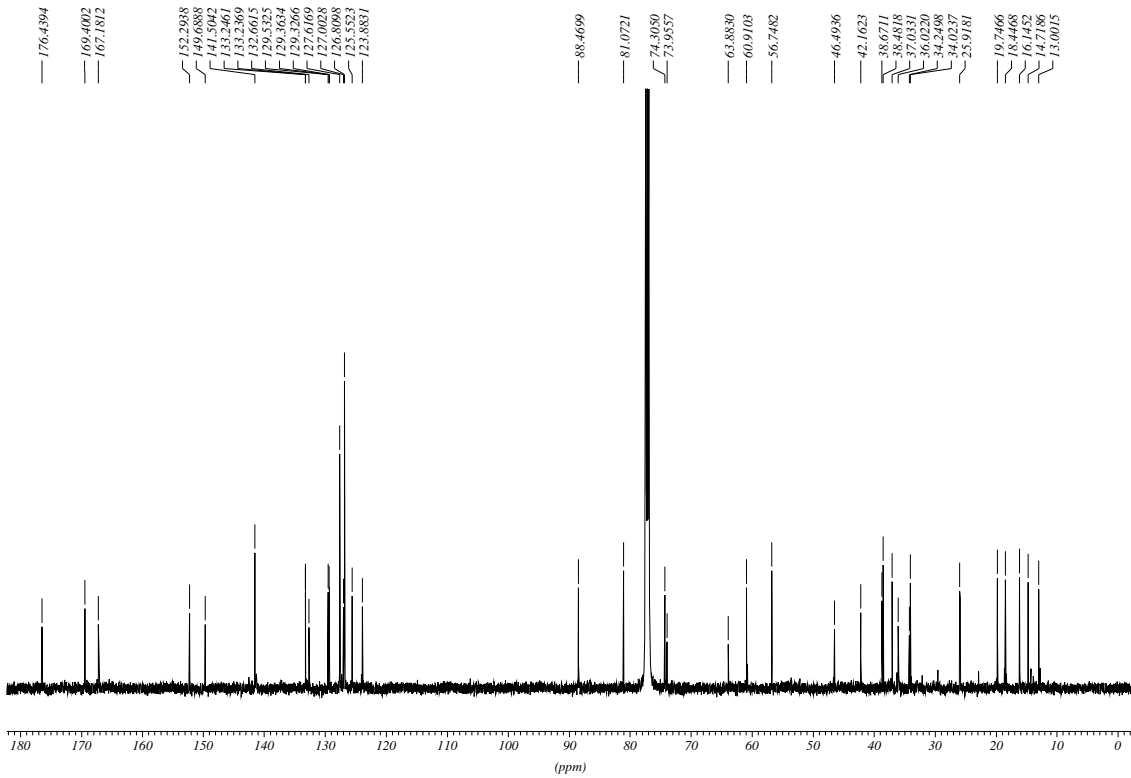
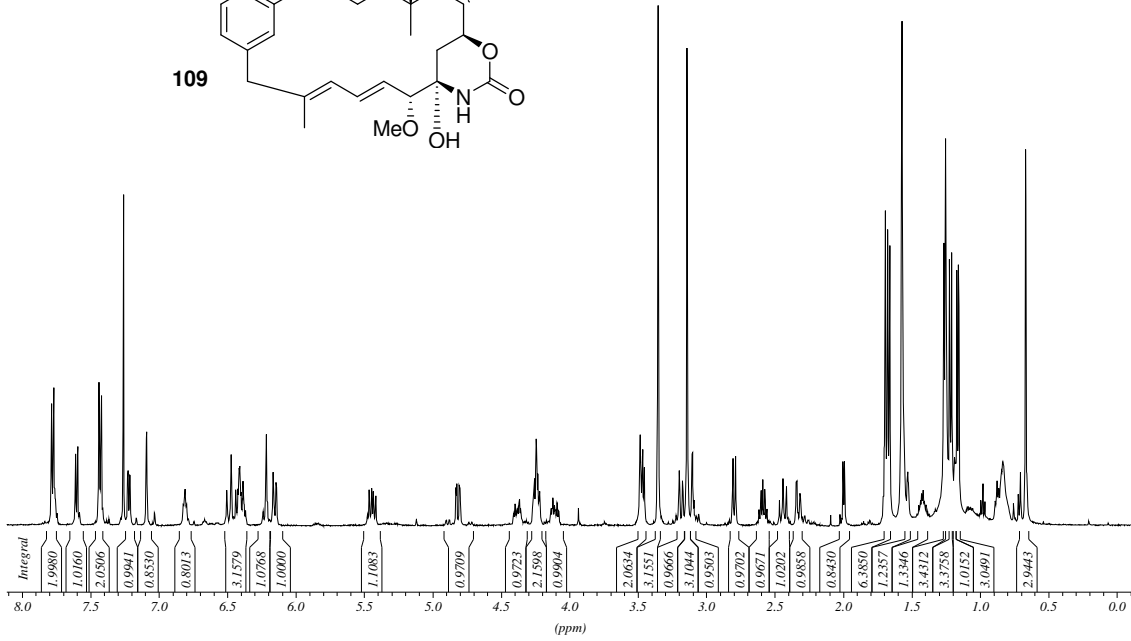
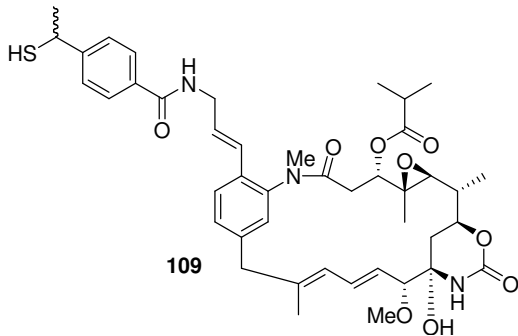


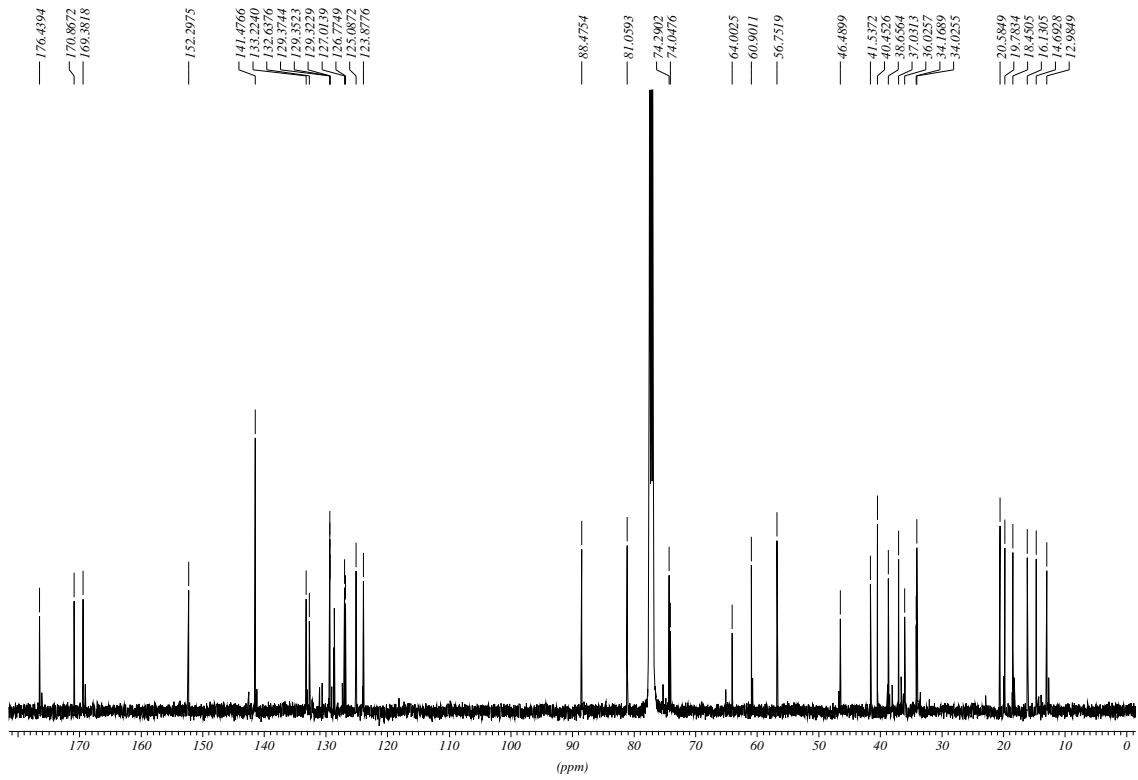
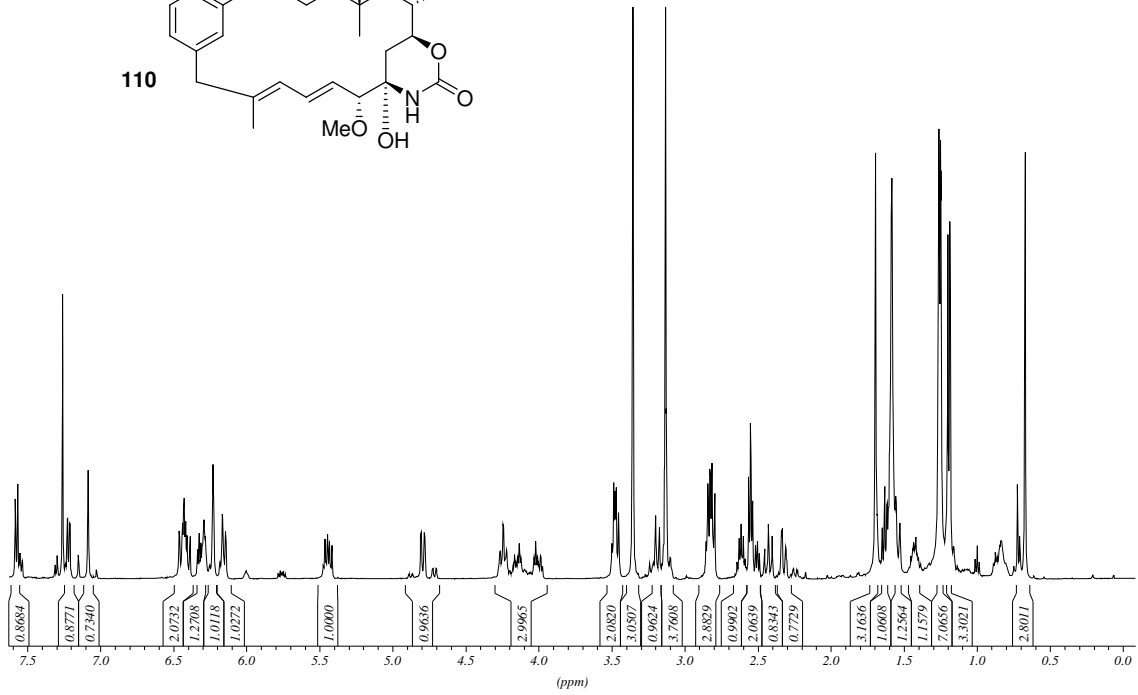
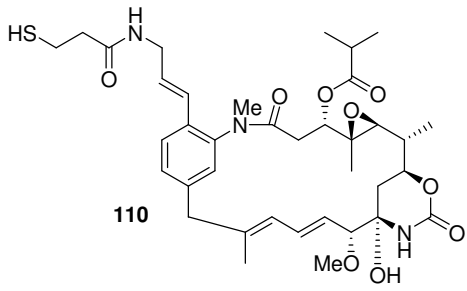


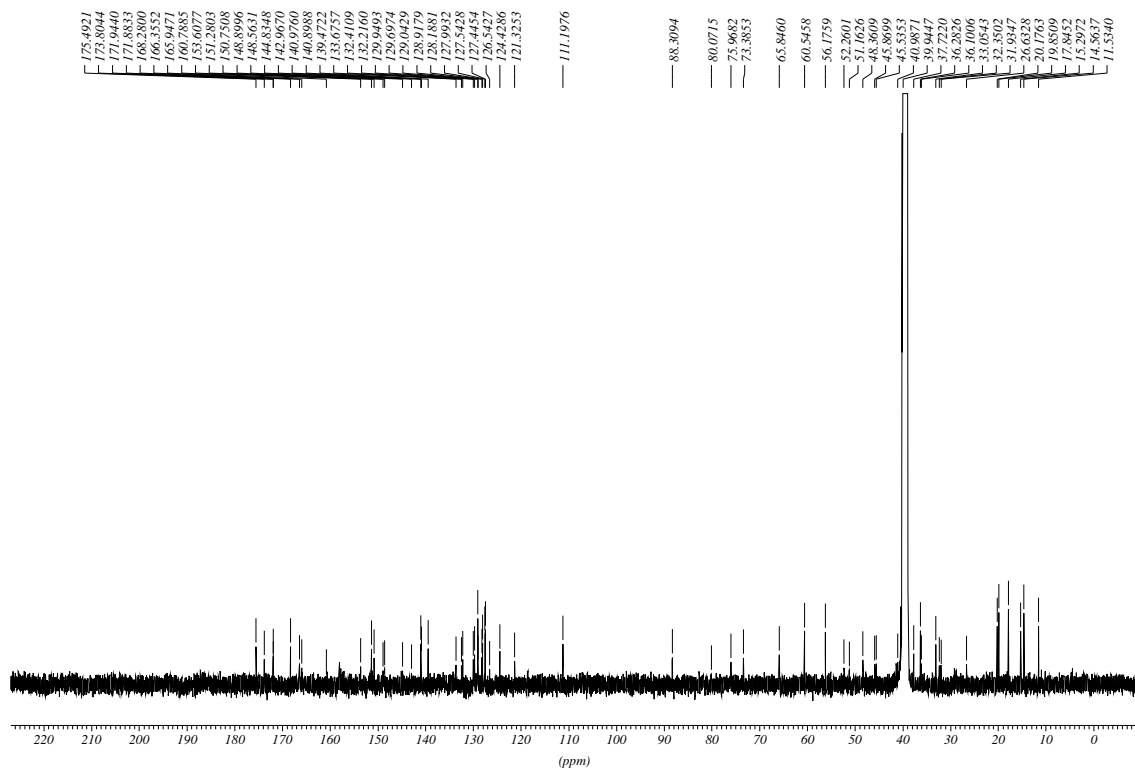












Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die sehr gute Betreuung und Förderung während meiner akademischen Ausbildung und nicht zuletzt für die äußerst interessante Themenstellung, die meine volle Begeisterung weckte. Weiterhin möchte ich mich für die vielen „social events“ bedanken, die zur angenehmen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Markus Kalesse danke ich für die fachlich wertvollen Diskussionen im gemeinsamen Seminar und für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Heinz G. Floss für dieses hochinteressante Projekt, die äußerst inspirierenden Diskussionen während seiner Deutschland-Visiten, sowie die konstruktiven Publikationsbeiträge.

Ein großer Dank gilt Dr. Gerald Dräger, der mir sein umfassendes Wissen auf dem Gebiet der MS und der HPLC vermittelt hat und bei Problemen stets hilfsbereit zur Seite stand.

Den Pionieren auf dem Maytansin-Projekt Dr. Thomas Frenzel, Dr. Marco Brünjes und Dr. Axel Meyer danke ich für die hervorragenden Vorarbeiten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Der „Muta-Gruppe“ Tobias Knobloch, Kirsten Harmrolfs, Simone Eichner und Anja Heutling, sowie den „Zuhörern“ Monika Vogt und Sascha Ceylan danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen. Besonders hervorzuheben ist Tobias Knobloch, der stets sein Wissen und seine Ideen im mikrobiologischen Feld mit mir teilte.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Arbeitskreises Kirschning, die dafür gesorgt haben, dass die Zeit innerhalb und außerhalb des Instituts unvergessen bleibt. Spezieller Dank gilt meinen ehemaligen Laborkollegen Monika Vogt, Sascha Ceylan, Dr. Santosh Mhaske und Thomas Schmidt, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre und damit zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Monika Vogt, Kirsten Harmrolfs, Simone Eichner, Tobias Knobloch, Richard Dehn und Sascha Ceylan danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Praktikanten Sonja Gocke, Rebecca Ulc, Jonathan Bloh, Christian Luginsland, Jörg Schmidt-Hagen und David Dewald danke ich für das Aufrechterhalten der „pipeline“. Außerdem danke ich Jürgen Fischer für die sukzessive Versorgung mit Mutasynthonen.

Ein herzlicher Dank gebührt *A. p.* HGF073 für die häufige Wochenend-Arbeit und die hohe Toleranz, sowie für zahlreiche Totalsynthesen.

Den Mitarbeitern der spektroskopischen Abteilung Dr. Dieter Albert, Dr. Edgar Hofer, Dr. Thomas Hackl, Dagmar Körtje und Monika Rettstadt danke ich für die zügige und kompetente Bearbeitung der NMR-Proben und die Bereitstellung der häufig langen Messzeiten. Dank auch an Rainer Nötel für die prompte Bedienung und Hilfsbereitschaft in der massenspektrometrischen Abteilung.

Der Besetzung des Sekretariats danke ich für die schnelle und reibungslose Arbeit. Monika Griese darüber hinaus auch für die Versorgung mit „Literatur und Socken“.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich in jeglicher Hinsicht für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums herzlich danken. Der größte Dank gebührt Melanie Müller, die mir stets verständnisvoll und unterstützend zur Seite stand und somit ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Florian Taft, geb. am 14.04.1980 in Celle, ledig

Studium

- | | |
|-------------------|--|
| 03/2006 – 04/2009 | Promotion am Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover (Prof. A. Kirschning): „ <i>Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum – Synthese Tumor-gerichteter Ansamitocin-Derivate</i> “ |
| 06/2005 – 01/2006 | Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Universität Hannover (Prof. A. Kirschning): „ <i>Vorläufer-dirigierte Biosynthese von Ansamitocin P-3 und Analoga</i> “ (Note: 1.0) |
| 10/2000 – 01/2006 | Chemiestudium an der Universität Hannover, Schwerpunkt Organische Chemie, Abschluss: Diplom-Chemiker (Gesamtnote „sehr gut“) |

Zivildienst

- | | |
|-------------------|--|
| 09/1999 – 07/2000 | Zivildienst, Behindertentransport DRK, Celle |
|-------------------|--|

Schule

- | | |
|-------------|--|
| 1986 – 1999 | Schulausbildung |
| Juni 1999 | Abitur (Note 1.6), Gymnasium Ernestinum, Celle |

Publikationen

- [1] „*Timing of the $\Delta_{10,12}$ - $\Delta_{11,13}$ Double Bond Migration During Ansamitocin Biosynthesis in Actinosynnema pretiosum*“, F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.
- [2] „*Highly Active Ansamitocin Derivatives: Mutasynthesis Using an AHBA Blocked Mutant*“, F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1057-1060.
- [3] „*Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering*“, A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3295.
- [4] „*Chemoenzymatic Approaches toward Dechloroansamitocin P-3*“, A. Meyer, M. Brünjes, F. Taft, T. Frenzel, F. Sasse, A. Kirschning *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1489-1492.

Wissenschaftliche Vorträge

- [1] „*Mutasynthetic Approaches towards Novel Ansamitocin Derivatives*“, F. Taft, T. Knobloch, K. Harmrolfs, F. Sasse, A. Kirschning. VAAM International Workshop: Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria **2008**, 29. September – 01. Oktober, Berlin
- [2] „*Mutasynthetic Approaches towards Novel Ansamitocin Derivatives*“, F. Taft, T. Knobloch, K. Harmrolfs, F. Sasse, A. Kirschning. ORCHEM **2008**, 01. – 03. September, Weimar
- [3] „*Mutasynthetic Approaches towards Novel Ansamitocin Derivatives*“, F. Taft, M. Brünjes, A. Meyer, A. Kirschning. 28. Tübinger-Göttinger Gespräche zur Chemie von Mikroorganismen **2007**, 19. – 21. September, Retzbach-Zellingen