

**Darstellung neuer Ansamycin-Derivate über Mutasynthese
in Kombination mit Semisynthese**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
Der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation

von
Dipl- Chem. Simone Eichner
Geboren am 18.01.1979 in Hannover

2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis März 2011 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 selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfestellung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

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

Hannover, den 24.03.11

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. M. Kalesse

Tag der Promotion: 24.06.2011

Zusammenfassung

Simone Eichner

Zugänge zu neuen Ansamycin-Derivaten über Mutasynthese in Kombination mit Semisynthese

Schlagworte: Mutasynthese, Semisynthese, Geldanamycin, Ansamitocin

Geldanamycin und Ansamitocin sind 19-gliedrige Macrolactame, welche strukturell zur Klasse der Ansamycin-Antibiotika gehören. Beide Substanzen zeichnen sich durch eine hohe zytotoxische Aktivität aus. Klinische Entwicklungsstudien in Phase II mussten jedoch aufgrund des Auftretens starker Nebenwirkungen abgebrochen werden.

In der vorliegenden Dissertation konnte durch einen mutasynthetischen Ansatz über Supplementierungsexperimente von AHBA-Analoga an *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1 eine Bibliothek an neuen Geldanamycin-Derivaten erzeugt und für SAR-Studien genutzt werden. Außerdem konnten über diesen Ansatz neue Einblicke in die Substratflexibilität des Organismus gewonnen werden. Hier ist insbesondere die Bildung von sieben neuen Lacton-Derivaten zu nennen, die bei Supplementierungsexperimenten mit Hydroxymethyl-substituierten Startereinheiten isoliert wurden.

Durch semisynthetische Derivatisierung konnten einige der Mutasyntheseprodukte chemisch modifiziert werden. So konnte eine zusätzliche Vielfalt in die Bibliothek der Geldanamycin-Derivate gebracht werden

In einem zweiten Ansatz dieser Arbeit wurde ein kombinatorischer Ansatz aus Mutasynthese und Semisynthese angewendet, der zur Generierung neuer Ansamitocin-Derivate führte. Hierfür wurde ausgehend von Proansamitocin, dem Fermentationsprodukt der *Actinosynnema pretiosum* Mutante Δ asm 12/21, durch chemische Modifikation und anschließenden Einsatz in Verfütterungsexperimenten mit den Mutanten *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1 und *Actinosynnema pretiosum* HGF073 neue Naturstoffderivate erzeugt werden. Über diesen Ansatz konnten neue Ansamitocin-Derivate erzeugt werden, welche einerseits in SAR-Studien eingesetzt wurden, um den Einfluss einzelner funktioneller Gruppen auf die biologische Aktivität zu verstehen. Andererseits eröffneten diese Experimente Einblicke in die Enzymaktivität und Selektivität der post-PKS-Enzyme beider Bakterienstämme.

Abstract

Simone Eichner

Accessing new Ansamycin Derivatives via a Combined Mutasynthesis Semisynthesis Approach

Key words: mutasynthesis, semisynthesis, geldanamycin, ansamitocin

Geldanamycin and ansamitocin are 19-membered macrolactams belonging structurally to the class of ansamycin antibiotics. Both substances show a strong cytotoxic activity. Clinical studies had to be stopped in phase II due to strong side effects.

In this thesis new geldanamycin derivatives were generated by a mutasynthetic approach. By supplementation of AHBA-analogues to a mutant strain of *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1 a library was generated. These substances can be subjected to SAR studies. Furthermore this work offered new insights into the substrate flexibility of the organism. Most noteworthy is the formation of seven new lactone-derivatives which were isolated after supplementation of hydroxymethyl-substituted starter units.

Some of the mutasynthesis products were further modified by semisynthetic derivatisation. This provided additional diversity for the library of geldanamycin derivatives.

The second part of this thesis is centred on the generation of ansamitocin derivatives. Again new natural product derivatives were obtained by a combination of mutasynthesis and semisynthesis. Starting with proansamitocin the fermentation product of *Actinosynnema pretiosum* mutant Δ asm 12/21 chemical modification followed by feeding experiments with *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1 and *Actinosynnema pretiosum* HGF073 furnished new ansamycin derivatives. On the one hand these derivatives were subjected to SAR-studies to understand the influence of distinct functional groups for the biological activity. On the other hand these experiments provided insights into the activity and selectivity of the decorating enzymes of both bacteria strains.

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Einleitung	6
2.1	Ansamycine	6
2.1.1	Geldanamycin	8
2.1.2	Ansamitocine	21
2.2	Mutasynthese	25
3	Zielsetzung	28
3.1	Geldanamycin-Mutasynthese	28
3.2	Kombination aus Semisynthese und Mutasynthese.....	29
4	Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse.....	31
4.1	Synthese der Mutasynthone.....	31
4.2	Untersuchungen zu den Fermentationsbedingungen der AHBA-(-)-Mutante von <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	44
4.2.1	Untersuchungen zur Fermentation in verschiedenen Fermentations-medien.....	45
4.2.2	Untersuchungen zur Fermentation mit verschiedenen Medien-Zusätzen.....	46
4.2.3	Untersuchungen zur Fermentation mit verschiedenen Ansatzgrößen	48
4.2.4	Anlegen von Kryo-Kulturen	48
4.3	Mutasynthesen mit PKS-adressierenden Mutasynthonen	49
4.3.1	Allgemeine Vorgehensweise bei den Verfütterungsexperimenten.....	49
4.3.2	Mutasynthesen mit <i>meta</i> -Halogen-substituierten Aminobenzoesäuren und 3-Aminobenzoesäure	53
4.3.3	Mutasynthesen mit <i>meta</i> -Alkoxy-substituierten Aminobenzoesäuren.....	55
4.3.4	Mutasynthesen mit weiteren <i>meta</i> -substituierten Aminobenzoesäuren.....	56
4.3.5	Mutasynthesen mit mehrfach-substituierten Aminobenzoesäuren	59
4.3.6	Mutasynthesen von 4-substituierten Aminobenzoesäuren	61
4.3.7	Mutasynthesen von 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure und 6-Aminobenzo-[1,3]- dioxol-4-carbonsäure	63
4.3.8	Mutasynthesen mit strukturell ungewöhnlichen Mutasynthonen	63
4.3.9	Mutasynthesen von verschiedenen <i>meta</i> -substituierten benzyllischen Aminobenzoesäuren	66
4.3.10	Mutasynthesen von verschiedenen <i>meta</i> -substituierten Hydroxymethyl- benzoesäuren.....	77

4.3.11	Mutasynthesen mit stark strukturell veränderten Startbausteinen	80
4.3.12	Mutasynthesen mit drei verschiedenen Hydroxymethylbenzoesäuren	82
4.3.13	Geldanamycinderivate durch Semisynthese.....	83
4.3.14	Biologische Aktivitäten der Geldanamycin-Derivate	86
4.3.15	NMR-Analytik von Geldanamycin-Derivaten	89
4.4	Proansamitocin-Derivate durch Mutasynthese/Semisynthese	91
4.4.1	Mutasynthese mit Proansamitocin, 10- <i>epi</i> -Proansamitocin und ähnlichen Strukturen.....	91
4.4.2	Darstellung von carbamoyliertem Proansamitocin mit AP-3-Seitenkette	95
4.4.3	Darstellung von Proansamitocin-Derivaten mit nicht zyklischem Carbamat	97
4.4.4	Darstellung von acylierten Proansamitocinen mit nichtzyklischen Carbamaten	101
4.4.5	Darstellung von C-1 reduziertem Proansamitocin	105
4.4.6	Darstellung von hydriertem Proansamitocin.....	107
4.4.7	Biologische Aktivitäten der Proansamitocin-Derivate.....	108
4.4.8	NMR-Analytik der Proansamitocin-Derivate	110
5	Zusammenfassung und Ausblick	112
5.1	Zusammenfassung	112
5.2	Ausblick	114
6	Experimenteller Teil	118
6.1	Allgemeine Hinweise zu den chemischen Arbeiten.....	118
6.2	Synthese der Mutasynthone	121
6.3	Mutasyntheseexperimente	164
6.3.1	Allgemeine Hinweise zu den mikrobiologischen Arbeiten	164
6.3.2	Darstellung der mutasynthetisch hergestellten Geldanamycin-Derivate	170
6.3.3	Darstellung der mutasynthetisch hergestellten Proansamitocin-Derivate.....	196
6.4	Semisyntheseexperimente	219
6.4.1	Semisynthese mit Proansamitocin-Derivaten	219
6.4.2	Semisyntheseexperimente mit Geldanamycin-Derivaten	242
7	Anhang	248
7.1	Massenspektrometrische Daten.....	248
7.2	Ausgewählte NMR-Spektren	255

1 Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-desmethoxygeldanamycin
Ac	Acetyl
ACP	Acyl Carrier Protein
ADP	Adenosindiphosphat
17-AG	17-Amino-17-desmethoxygeldanamycin
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
AP-3	Ansamitocin P-3
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalent
<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
BPI	base peak intensity (engl.)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
c	Konzentration
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy
δ	chemische Verschiebung
Δ	Erhitzen bis zum Rückfluss
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	distorsionless enhancement by polarisation transfer
DH	Dehydratase
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
17-DMAG	17-(2-Dimethylaminoethyl)amino-17-desmethoxygeldanamycin
4-DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	DESS-MARTIN-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen
EE	Essigsäureethylacetat
ER	Enoylreduktase
ESI	electrospray ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	et alii
g	Gramm
GI ₅₀	<i>growth inhibition</i> - die Konzentration, die die mitochondriale Aktivität zu 50% hemmt
GPM	Geldanamycin-Produktions-Medium
h	Stunde
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation (engl.)

HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
Hsp	heat shock protein (engl.)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC	inhibitory concentration
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
λ	Wellenlänge
L	Liter
μ	mikro
m	milli
M	molar
M	Masse
Me	Methyl
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
n	nano
<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
PDB	precursor-directed biosynthesis
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
Pr	Propyl
quant.	quantitativ
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAR	structure-activity relationship
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
t_R	Retentionszeit
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TE	Thioesterase
Tf	Triflat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

TMS	Trimethylsilyl oder Tetramethylsilan
Ts	Tosyl
UDP	Uridindiphosphat
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolett
X-Phos	2-Dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl
YMG	yeast, malt, glucose
Zers.	Zersetzung

2 Einleitung

„Totgesagte leben länger!’ Dieses Sprichwort gilt auch für die Naturstoff-Forschung. Nachdem Naturstoffe als Leitverbindungen durch die Einführung kombinatorischer Synthesetechniken in den Hintergrund gedrängt worden waren, haben sie ihren Rang in der pharmazeutischen Forschung zurückerlangt. Durch Entwicklungen auf diesem Gebiet, das moderne Genomik mit angewandter Biologie und Chemie kombiniert, können Herausforderungen wie das vermehrte Auftreten multiresistenter Bakterien bewältigt werden, da neue Arzneistoffe und Leitstrukturen identifiziert, produziert und in ihrer Struktur verändert werden können.“¹

Die Aussage dieses Zitats von 2005 trifft auch heute noch zu. So bleiben multiresistente Bakterien ein ernstzunehmendes Problem und eine Kombination verschiedener Disziplinen aus Biologie und Chemie ist eine viel versprechende Strategie dieser Herausforderung zu begegnen. Genau diese Kombination findet sich bei der Anwendung von mutasynthetischen Techniken wieder und ist damit auch Gegenstand dieser Arbeit, um neue Ansamycin-Derivate zu erzeugen.

2.1 Ansamycine

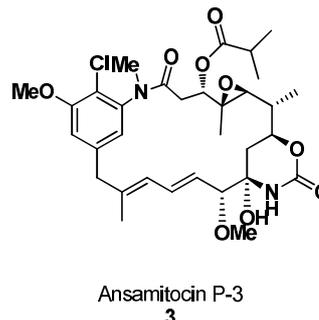
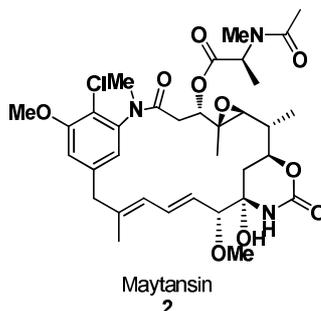
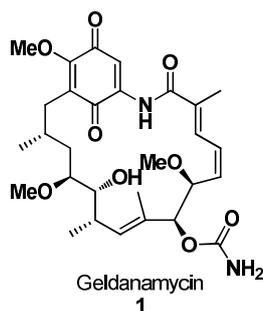
Die Substanzklasse der Ansamycine umfasst eine Reihe von Naturstoffen, die alle als gemeinsames Strukturmerkmal eine aromatische C₇N-Einheit besitzen, sowie ein Polyketid-Rückgrat, welches in Form eines Henkels (*griech.* „ansa“) einen anschließenden Lactam-Ring bildet. Die Ansamycine werden in zwei Klassen eingeteilt, wobei diese durch ihren unterschiedlichen aromatischen Kern gekennzeichnet sind. Zum einen gibt es die Klasse derer mit benzenischem Ringsystem, zu denen Geldanamycin **1**, Ansamitocin **2** und Maytansin **3** gehören, und zum anderen gibt es die Klasse derer mit naphthalenischem Ringsystem, zu denen Rifamycin **4**, Streptovaricin **5** und Actamycin **6** gehören (siehe Abbildung 1).^{2,3}

¹ H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988 – 7007.

² a) K. L. Rinehart jr, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 57-64; b) V. Prelog, W. Oppolzer, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 2279-2287.

³ A. Stratmann, *Biospektrum* **2004**, *10*, 249-253.

benzenische Ansamycine



naphthalenische Ansamycine

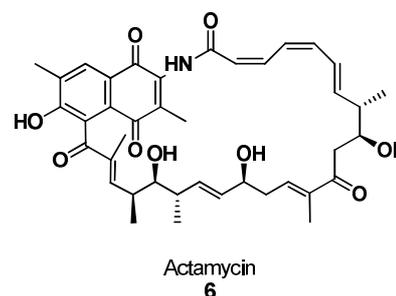
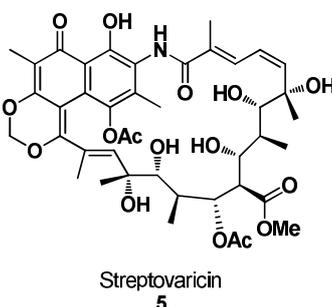
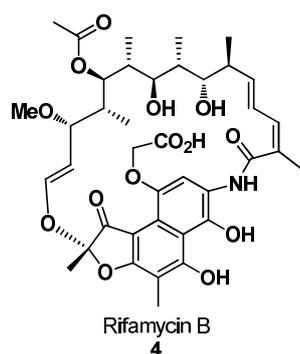


Abbildung 1: Benzenische und naphthalenische Ansamycine.⁴

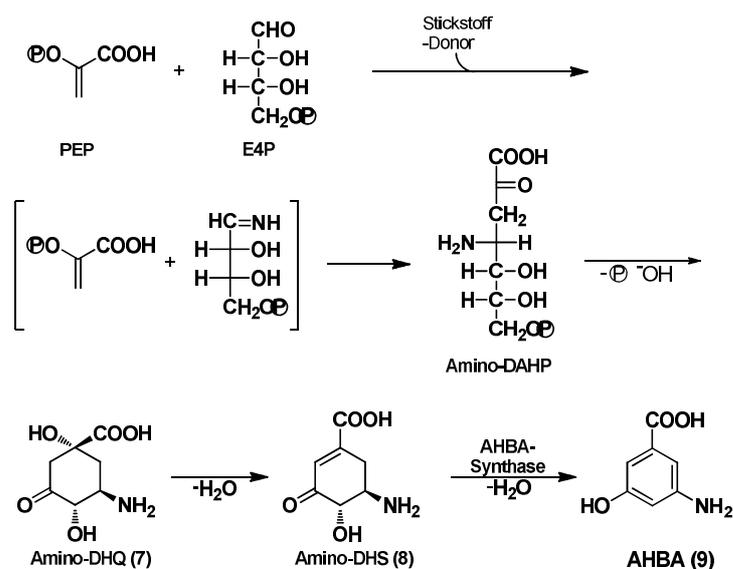
Die biologische Aktivität der Ansamycine ist unterschiedlich. Die Ansamycine mit einem naphthalenischen Ringsystem sind meist antibakterielle bzw. antifungale Substanzen, wohingegen die Ansamycine mit einem benzenischen Ringsystem oft eine cytotoxische Aktivität gegenüber eukaryotischen Zellen zeigen.⁵

Die Biosynthese aller Ansamycine beinhaltet die Synthese von Aminohydroxybenzoesäure **9** (AHBA), welche die Startereinheit für die Polyketid-Synthase darstellt. Die AHBA **9** wird über eine Variante des Shikimat-Biosyntheseweges aufgebaut. Abweichend vom Shikimat-Biosyntheseweg sind die Einführung einer Aminogruppe sowie die Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Imino-Erythrose-4-Phosphat (siehe Schema 1).⁶

⁴ S. Eichner, Diplomarbeit, *Zugänge zu Geldanamycin-Derivaten über Mutasynthese*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2007**.

⁵ I. W. Allen, D. A. Ritchie, *Mol. Gen. Genet.* **1994**, *243*, 593-599.

⁶ a) C.-G. Kim, T.-W. Yu, C. B. Fryhle, S. Handa, H. G. Floss, *J. Biol. Chem.* **1997**, *11*, 6030-6040; b) K. Arakawa, R. Müller, T. Mahmud, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10644-10645.



Schema 1: Syntheseweg für die Bildung von mC_7N -Einheiten (wie AHBA (9)).⁶ (PEP: Phosphoenolpyruvat, E4P: Erythrose-4-phosphat, Amino-DAHP: 3,4-Didesoxy-4-amino-*D*-arabinose-heptulonsäure-7-phosphat, Amino-DHQ: 5-Desoxy-5-amin-3-deshydrochinasäure 7, Amino-DHS: 5-Desoxy-5-amin-3-deshydroshikimisäure 8).⁴

Untersuchungen von FLOSS *et al.* zeigen, dass Imino E4P aus UDP-Glukose aufgebaut wird.^{7,8}

Die Biosynthese aller Ansamycine erfolgt durch eine modulare Typ I-Polyketid-Synthase, welche deutliche Ähnlichkeit zu den modularen Fettsäuresynthasen besitzt, wie sie bei Pilzen und Vertebraten vorliegen.³

2.1.1 Geldanamycin

2.1.1.1 Allgemeines zu Geldanamycin

Geldanamycin **1** ist ein macrozyklisches Lactam, welches erstmals 1970 von DEBOER *et al.* aus dem Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* var. *nova* isoliert⁹ und als das erste benzochinoide Ansamycin-Antibiotikum identifiziert wurde.¹⁰ Der Bakterienstamm wurde hierbei aus einer Bodenprobe aus Kalamazoo (Michigan) isoliert.

⁷ C.-G. Kim, T.-W. Yu, C. B. Fryhle, S. Handa, H. G. Floss, *J. Biol. Chem.* **1997**, *11*, 6030-6040.

⁸ K. Arakawa, R. Müller, T. Mahmud, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10644-10645.

⁹ C. DeBoer, P. A. Meulman, R. J. Wunk, D. H. Peterson, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 442-447.

¹⁰ K. Sasaki, K. L. Rinehart, G. Slomp, M. F. Grostic, E. C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 7591-7593.

Geldanamycin **1** ist ein 19-gliedriger Makrozyklus mit einem Carbamat an C-7, einem Diensystem an C2-C5 und einem chinoiden aromatischen System (siehe Abbildung 2).

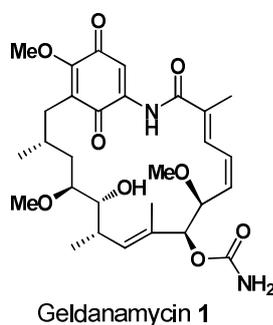


Abbildung 2: Geldanamycin 1.

Geldanamycin **1** zeigte bei Untersuchungen zur biologischen Aktivität *in vitro* Wachstumsinhibierung von einzelligen Bakterien und Pilzen. Zudem zeigte es *in vivo* eine Aktivität gegen den parasitischen Nematoden *Syphacia oblevata*.⁹

In späteren am National Cancer Institut (NCI) durchgeführten *in vitro* screenings an diversen eukaryotischen Zelllinien zeigte Geldanamycin eine hohe Wirksamkeit in Form einer 50%igen Wachstumsinhibierung (GI₅₀) bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich.¹¹

In verschiedenen biologischen Tests zeigte Geldanamycin **1** jedoch auch hepatotoxische Wirkung.¹¹ Außerdem ist die Verbindung chemisch instabil, sowie schlecht wasserlöslich.¹¹

Erst 1994 identifizierten WHITESELL *et al.* das Hitzeschockprotein 90 [engl. Heat Shock Protein 90 (Hsp90)] als Target für Geldanamycin **1**.¹² Spätere Kristallstrukturanalysen von an Hsp90 komplexiertem Geldanamycin **1** zeigten, dass die Verbindung an die ATP-Bindungstasche der N-terminalen Domäne von Hsp90 bindet.¹³

Zwischen 1970 und 2000 wurden diverse weitere Antibiotika entdeckt, die strukturell dem Geldanamycin **1** stark ähneln sind, wie zum Beispiel Macbecin **10** und **15**,¹⁴ Herbimycin **11-13**¹⁵ und Reblastatin **16**^{16,17} (siehe Abbildung 3).

¹¹ J. G. Supko, R. L. Hickmann, M. R. Grever, L. Malspeis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1995**, *36*, 305-315.

¹² L. Whitesell, E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8324-8328.

¹³ C. E. Stebbins, A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl, N. P. Pavletich, *Cell*, **1997**, *89*, 239-250.

¹⁴ M. Muroi, K. Haibara, M. Asai, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1123-1130.

¹⁵ a) S. Omura, Y. Iwai, Y. Takahashi, N. Sadakane, A. Nakagawa, H. Oiwa, Y. Hasegawa, T. Ikai, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 255-261; b) L. Z. Lin, G. Blasko, G. A. Cordell, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 1161-1165.

¹⁶ T. Takatsu, M. Ohtsuki, A. Muramatsu, R. Enokita, S. I. Kurakata, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1310-1312.

¹⁷ K. Patel, M. Piogentini, A. Rascher, Z.-Q. Tian, G. O. Buchanan, R. Regentin, Z. Hu, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1625-1633.

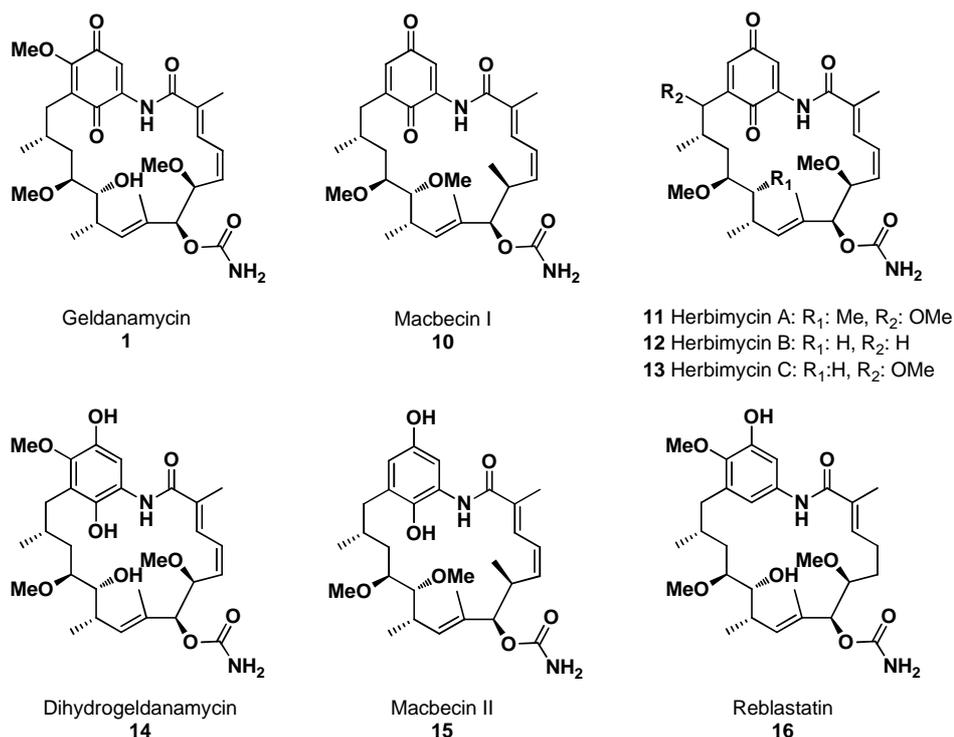


Abbildung 3: Geldanamycin **1** und strukturell verwandte Naturstoffe.⁴

Sie zeigen alle eine ähnliche biologische Aktivität, wobei hervorzuheben ist, dass Reblastatin weniger zytotoxisch ist, jedoch mit einer höheren Affinität an Hsp90 bindet.^{16,18,19,20}

Auf die biologische Aktivität von Geldanamycin **1** in Bezug auf Hsp90 wird in Kapitel 2.1.1.4 gesondert eingegangen.

Aufgrund der interessanten biologischen Aktivität von Geldanamycin und der chemischen Instabilität, sowie der Hepatotoxizität wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um Derivate mit erhöhter Stabilität und verminderter Toxizität zu erhalten.^{21,22,23,24}

¹⁸ J. L. Janin, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7503-7510.

¹⁹ a) M. Muroi, M. Itawa, Y. Kosai, M. Asai, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 205-212; b) Y. Ono, Y. Kozai, K. Ootsu, *Gann* **1982**, *73*, 938-944.

²⁰ P. Stead, S. Latif, A. P. Blackaby, P. J. Sidebottom, A. Deakin, N. L. Taylor, P. Life, J. Spaul, F. Burrell, R. Jones, J. Lewis, I. Davidson, T. Mander, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 657-663.

²¹ J. R. Porter, C. C. Fritz, K. M. Depew, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 412-420.

²² Y. Fukuyo, C. R. Hunt, N. Horikoshi, *Cancer Lett.* **2010**, *290*, 24-35

²³ T. Taldone, W. Sun, G. Chiosis, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2225-2235.

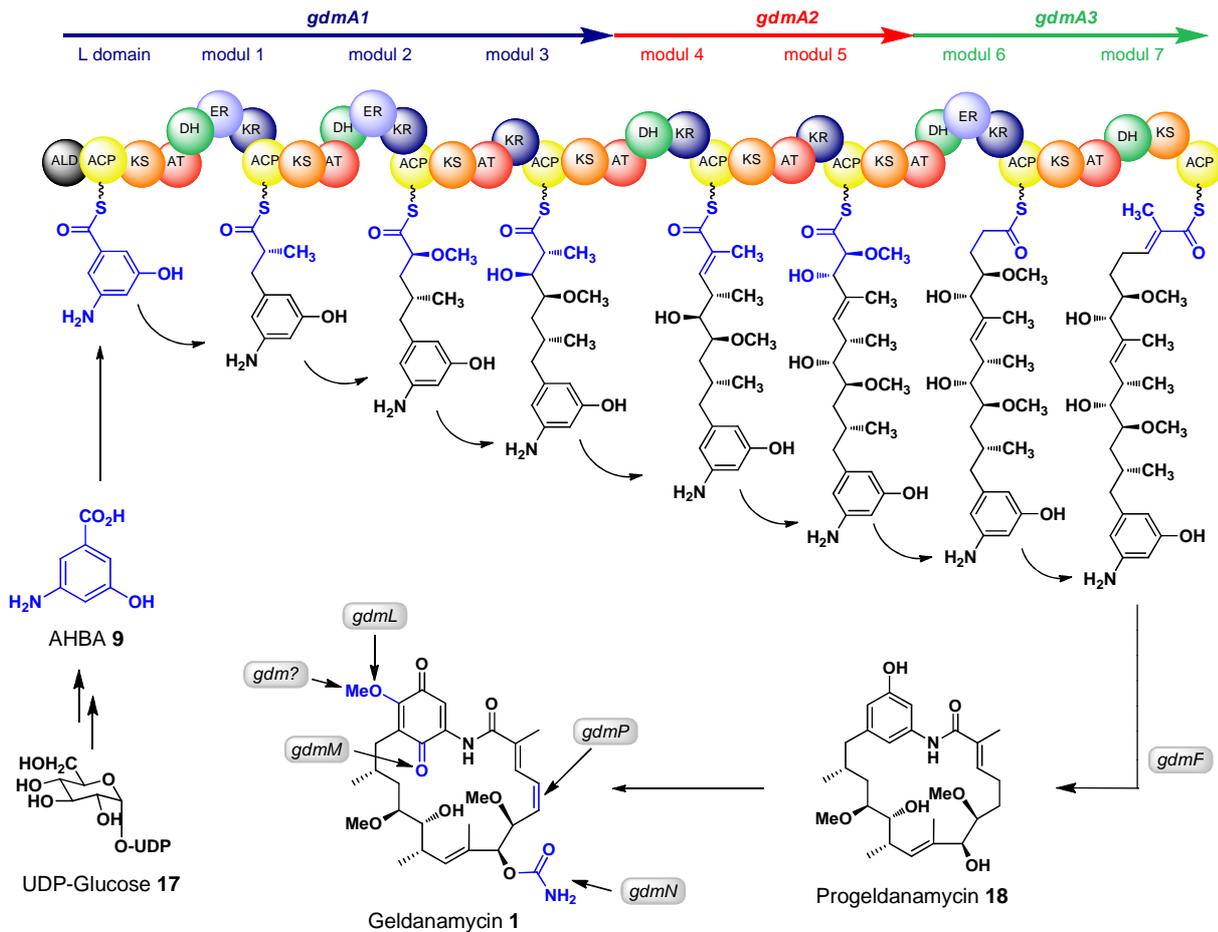
²⁴ M. A. Biamonte, R. Van de Water, J. W. Arndt, R. H. Scannevin, D. Perret, W.-C. Lee, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3-17.

2.1.1.2 Geldanamycin-Biosynthese in *S. hygroscopicus*

Die Biosynthese von Geldanamycin **1** im Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* erfolgt, wie bereits in Kapitel 2.1 erwähnt, über eine modulare Typ I-Polyketidsynthase. Geldanamycin wird wie alle Ansamycine ausgehend von AHBA als Initiationsbaustein der PKS biosynthetisiert. Die AHBA **9** wird über einen Shikimat-ähnlichen Biosyntheseweg aufgebaut (siehe Schema 1). Dieser Startbaustein muss nicht als CoA-Thioester vorliegen, sondern wird als freie Säure einem NRPS-ähnlichem Mechanismus folgend durch eine Adenylierungsdomäne (ALD) über ein gemischtes Anhydrid mit Adenosinmonophosphat aktiviert und auf das benachbarte *acyl-carrier-protein* (ACP) transferiert.²⁵ Es folgen sieben Module, die in drei einzelnen Enzymkomplexen (gdmA1-gdmA3) organisiert sind.²⁶ Jedes Modul enthält ein bis drei Domänen, für die Veränderung der funktionellen Gruppen durch eine Ketoreduktase (KR), eine Dehydratase (DH) und eine Enoylreduktase (ER). Die sieben Verlängerungseinheiten sind eine Malonyl-, vier Methylmalonyl- und zwei Methoxymalonyl-CoA-Einheiten. Anschließend wird das so erhaltene *seco*-Progeldanamycin durch eine Amidsynthase (gdmF) zum Progeldanamycin **18** zyklisiert und es folgen fünf weitere post-PKS-Modifizierungen, die der Verbindung ihre biologische Aktivität geben. Diese Enzyme sind die gdmL, welche für die Oxidation an C-17 verantwortlich ist, gdmM, welche die Oxidation an C-21 katalysiert, gdmP, welche für die Oxidation an C4-C5 verantwortlich ist, gdmN, welche die Carbamoylierung an C-7 katalysiert und ein noch unbekanntes Enzym, das die *O*-Methylierung an C-17 katalysiert (siehe Schema 2).²⁶

²⁵ S. J. Admiraal, C. T. Walsh, C. Khosla, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6116-6123.

²⁶ a) A. Rascher, Z. Hu, N. Viswanathan, A. Schirmer, R. Reid, W. C. Nierman, M. Lewis, C. R. Hutchinson, *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *218*, 223-230; b) A. Rascher, Z. Hu, G. O. Buchanan, R. Reid, C. R. Hutchinson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4862-4871.



Schema 2: Geldanamycin-Biosynthese in *S. hygroscopicus*.

Die Abfolge der post-PKS-Schritte ist bislang noch nicht zur Gänze aufgeklärt. HONG *et al.* haben über die Generierung verschiedener Deletionsmutanten herausgefunden, dass die Hydroxylierung an C-17, die anschließende *O*-Methylierung sowie die Oxidation an C-21 vor der Carbamoylierung an C-7 verlaufen und dass die letzte post-PKS-Modifizierungen die Dehydrierung an C4-C5 ist.²⁷ Ähnliche Ergebnisse lieferten auch von NI *et al.* veröffentlichte Ergebnisse mit Deletionsmutanten.²⁸ Außerdem konnte die Gruppe um HONG *et al.* zeigen, dass die spontane Oxidation zum Chinon nach erfolgter Oxidation an C-21 stattfindet.²⁹

²⁷ a) Y.-S. Hong, D. Lee, W. Kim, J.-K. Jeong, C.-G. Kim, J. K. Sohng, J.-H. Lee, S.-G. Paik, J. J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11142-11143; b) J. C. Shin, Z. Na, D. Lee, W. Kim, K. Lee, Y.-M. Shen, S.-G. Paik, Y.-S. Hong, J. J. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1101-1108.

²⁸ S. Ni, L. Wu, H. Wang, Y. Wang, W. He, Y. Li, C. Jia, S. Li, Y. Wang, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 623-625.

²⁹ D. Lee, K. Lee, X. F. Can, N. T. Dat, S. K. Boovanahalli, M. Lee, J. C. Shin, W. Kim, J. K. Jeong, J. S. Lee, C.-H. Lee, J.-H. Lee, Y.-S. Hong, J. J. Lee, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 146-248.

2.1.1.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen im Geldanamycin

Ausführliche Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Geldanamycin und Derivaten wurden von Y. L. JANIN durchgeführt (siehe Abbildung 4).¹⁸

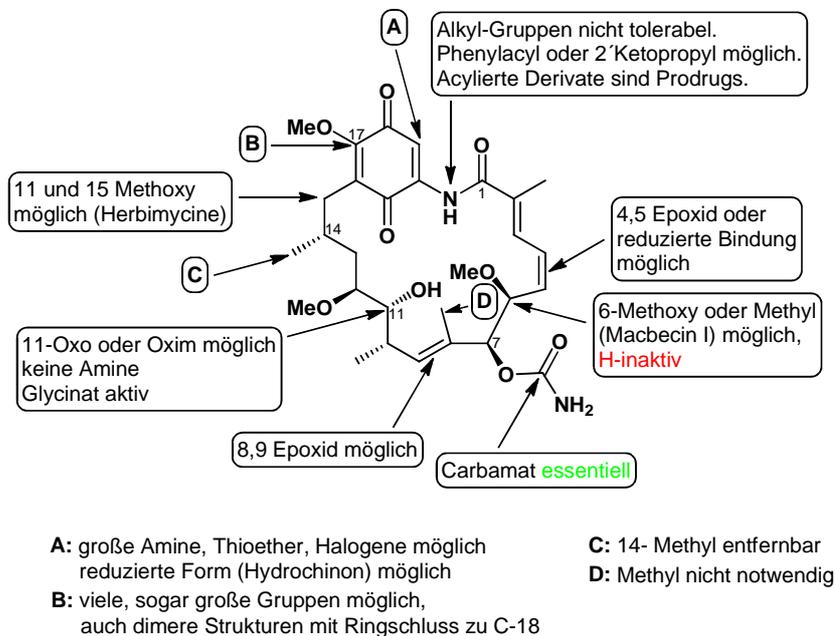


Abbildung 4: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen im Geldanamycin.

Es wird deutlich, dass das Geldanamycin **1** eine Vielzahl an Variationen am Grundgerüst toleriert, ohne an biologischer Aktivität einzubüßen. Die wichtigste funktionelle Gruppe für die biologische Aktivität, ist das Carbamat an C-7; ohne dieses ist Geldanamycin **1** inaktiv. Über Kristallstrukturanalysen wurde herausgefunden, dass die Aminopurin-Substruktur des ADP **19** mit Hsp90 über drei fest gebundene Wassermoleküle und den Asp79-Carboxylrest wechselwirkt. Die Carbamat-Gruppe des Geldanamycins **1** interagiert mit zwei dieser Wassermoleküle und dem Aspartat-Rest (siehe Abbildung 5).³⁰ Geldanamycin **1** stellt somit ein ATP-Mimetikum dar.

³⁰ a) G. Rastelli, Z. Q. Tian, Z. Wang, D. Myles, Y. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5016-5021; b) C. E. Stebbins, A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl, N. P. Pavletich, *Cell* **1997**, *89*, 239-250.

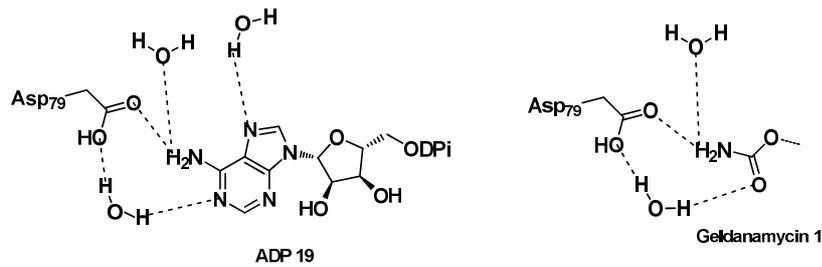


Abbildung 5: Wechselwirkung von ATP 19 bzw. Geldanamycin 1 mit Asp₇₉ und H₂O.

2.1.1.4 Biologische Aktivität von Geldanamycin

Geldanamycin 1 und Geldanamycin-Derivate binden wie schon in Kapitel 2.1.1.1 erwähnt an die *N*-terminale Bindungstasche von ATP in Hsp90 und unterbinden so die Chaperon-Funktion dieses Proteins.

Es existieren vier Hsp90-Formen: Hsp90 α und Hsp90 β im Cytoplasma, GRP94 im endoplasmatischen Retikulum und TRAP1 in den Mitochondrien. In der Zelle liegt das Hsp90 überwiegend als Dimer vor, wobei jede Untereinheit aus drei Domänen besteht,^{31,32} die *N*-terminale Domäne, welche die ATP-Bindungstasche trägt, eine mittlere Domäne, welche für die Bindung der *Client*-Proteine³³ zuständig ist und eine *C*-terminale Domäne, welche für die Dimerisierung und die Bindung zahlreicher *Co-Chaperone* zuständig ist (siehe Abbildung 6).

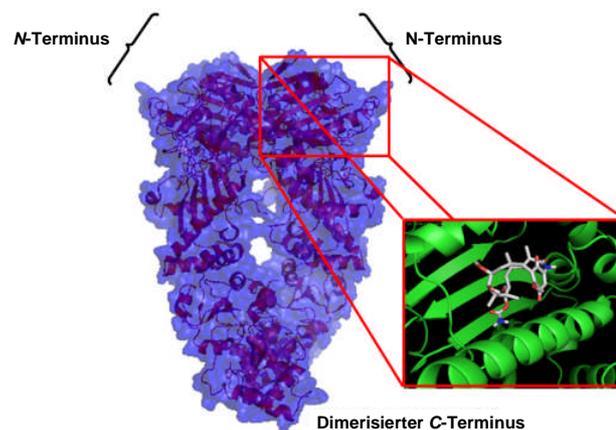


Abbildung 6: Kristallstruktur von Hsp90 mit der *N*-terminalen Bindungstasche, an welche Geldanamycin 1 gebunden ist (Ausschnitt) übernommen aus *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4983-4987.³⁴

³¹ L. H. Pearl, C. Prodromou, *Adv. Protein Chem.* **2002**, *59*, 157-185.

³² C. Prodromou, L. H. Pearl, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 301-323.

³³ von Hsp90 abhängige Proteine

³⁴ A. S. Duerfeld, B. S.J. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4983-4987.

Die Bindung von ATP und ADP an Hsp90 bestimmt die Konformation des Proteins und beeinflusst so die Fähigkeit, mit anderen Chaperonen und *Client*-Proteinen zu interagieren.³⁵ Der Hsp90-Chaperon-Zyklus ist ein dynamischer Prozess in dem die *Client*-Proteine und die *Co-Chaperone*³⁶ wie Hsp70, Hsp40, HIP und HOP in einem intermediären Komplex vorliegen.^{37,38} Unter dem Einfluß von ATP-Bindung und anschließender Hydrolyse wird aus diesem Komplex ein aktiver Komplex welcher verschiedene Proteine (p23, p50/cdc37) und Immunophiline beinhaltet und die Reifung der *Client*-Proteine katalysiert. Ist diese Bindungstasche von ATP durch Hsp90-Inhibitoren blockiert, können die *Client*-Proteine ihre eigentliche Konformation nicht erlangen und es kommt zur Ubiquitinierung und zum Abbau durch das Proteasom (siehe Abbildung 7).^{37,38}

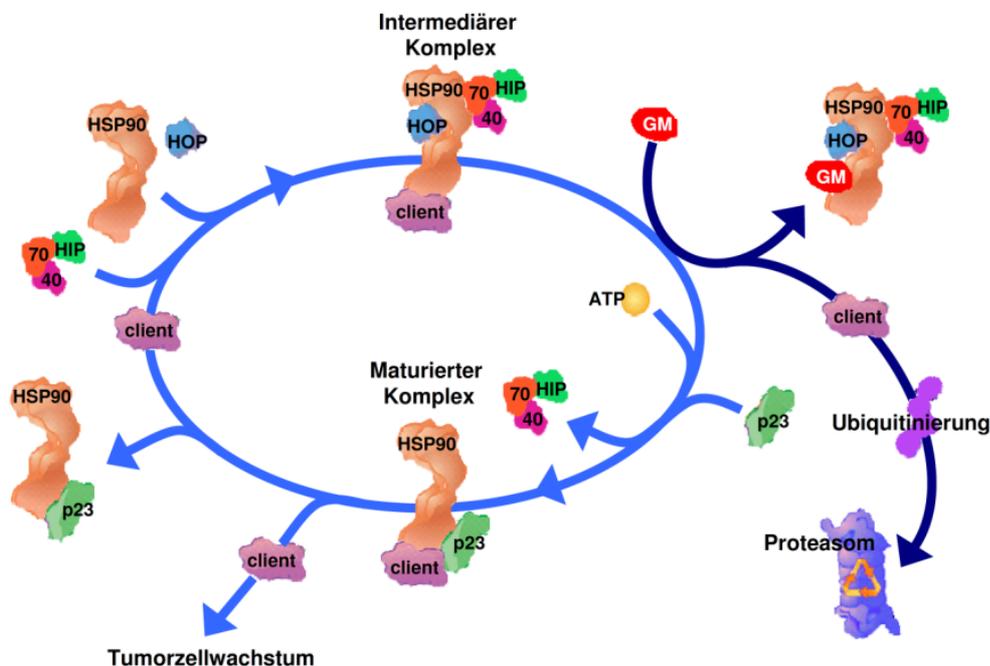


Abbildung 7: Hsp90-Zyklus übernommen aus *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3-17.³⁹

In Krebs-Zellen sind viele dieser *Client*-Proteine onkogen und im Gegensatz zu Medikamenten, welche ein bestimmtes Target haben, resultiert aus der Inhibierung von Hsp90

³⁵ a) B. Panaretou, C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *EMBO J.* **1998**, *17*, 4829-4836; b) W. M. J. Obermann, H. Sonderrmann, A. A. Russo, N. P. Pavletich, F. U. Hartl, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 901-910.

³⁶ sogenannte "Partnerproteine"

³⁷ L. Whitesell, S. L. Lindquist, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761-772.

³⁸ A. Kamal, L. Thao, J. Sensintaffar, L. Zhang, M. F. Boehm, L. C. Fritz, F. J. Burrows, *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 283-290.

³⁹ M. A. Biamonte, R. Van de Water, J. W. Arndt, R.H. Scannevin, D. Perret, W.-C. Lee, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3-17.

ein kombinatorischer Ansatz, wobei durch die Ubiquitinierung und dem damit verbundenen Abbau der *Client*-Proteine mehrere Targents gleichzeitig involviert sind. So kann die Resistenzbildung reduziert werden.^{40,41}

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die Hsp90 zu einer guten biologischen Zielstruktur macht, ist die Tatsache, dass Tumorzellen viel sensitiver auf Hsp90-Inhibitoren reagieren, als normale Zellen.⁴² Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass in Tumorzellen aufgrund von Hypoxie, niedrigem pH-Wert sowie niedriger Nährstoffkonzentration viele Proteine denaturiert vorliegen und somit Hsp90 überexprimiert wird.⁴³ Außerdem liegt das Hsp90 in Tumorzellen in einem aktiven, komplexierten Zustand vor, welcher auch Superchaperon-Komplex genannt wird. Dieser Komplex zeigt eine höhere Bindungsaffinität sowohl zu ATP als auch zu Hsp90-Inhibitoren. In normalen Zellen hingegen liegt das Hsp90 in einer latenten, unkomplexierten Form vor, wodurch die Bindungsaffinität um das 100-fache verringert ist (siehe Abbildung 8).⁴⁴

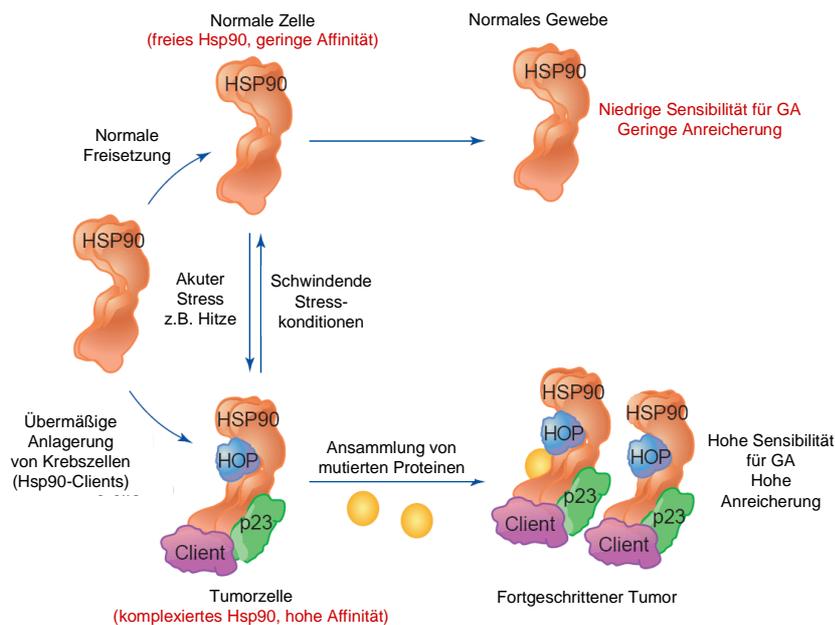


Abbildung 8: Modell für die Tumorselektivität von Hsp90 übernommen aus *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 283-290.^{45,4}

⁴⁰ P. Workman, F. Burrows, L. Neckers, N. Rosen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 202-216.

⁴¹ P. Workman, *Cancer Lett.* **2004**, *206*, 149-157.

⁴² G. Chiosis, L. Neckers, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 279-284.

⁴³ D. B. Solit, G. Chiosis, *Drug Discovery Today*, **2008**, *13*, 38-43.

⁴⁴ A. Kamal, L. Thao, J. Sensintaffar, L. Zhang, M. F. Boehm, L. C. Fritz, F. J. Burrows, *Nature* **2003**, *425*, 407-410.

⁴⁵ A. Kamal, M. F. Boehm, F. Burrows, *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 283-290.

Im Detail nimmt Geldanamycin **1** bei der Bindung an Hsp90 eine „C-clamp“-Struktur an,^{46,47} wobei das makrozyklische Amid eine thermodynamisch ungünstige cis-trans Isomerisierung durchlaufen muss. Es wird vermutet, dass das Hsp90 diese Isomerisierung begünstigt (siehe Abbildung 9).^{48,49}

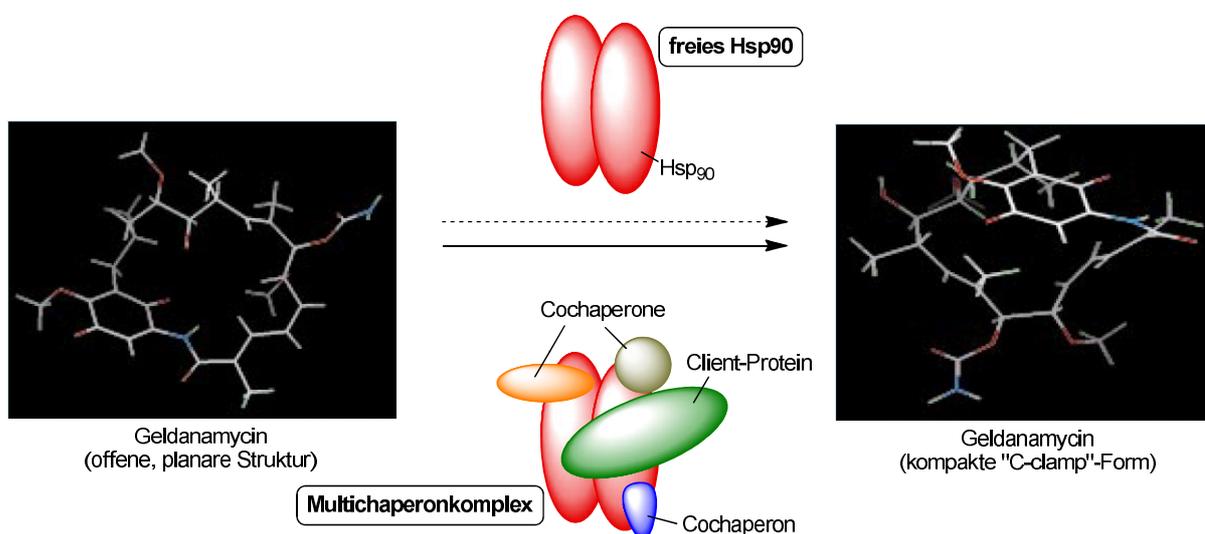


Abbildung 9: Konformationswechsel von Geldanamycin **1** übernommen aus *Nature* **2003**, *425*, 357-359.^{49,4}

Wie bereits in Kapitel 2.1.1.1 erwähnt, wurde beim Einsatz von Geldanamycin **1** als Anti-Tumor-Medikament in klinischen Studien der Phase I eine hohe Lebertoxizität festgestellt, weshalb die Studien eingestellt wurden.¹¹ Dies kann durch den Ersatz der OMe-Gruppe durch diverse Amine teilweise unterbunden werden, da hierdurch das Chinon an Reaktivität verliert. Durch semisynthetische Derivatisierung wurde versucht Substanzen zu generieren, die eine verringerte Toxizität bei gleich bleibender biologischer Aktivität aufweisen. Ein viel versprechendes Derivat ist 17-Allylamino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AAG oder Tanespimycin **20**), welches eine ähnliche Aktivität wie Geldanamycin **1** bei verminderter Toxizität zeigte^{50,51} und seit 1999 in 30 klinischen Tests bis hin zu Phase 3 als Einzelmedikament, sowie in Kombination mit anderen Antitumormitteln untersucht

⁴⁶ C. Prodromou, S. M. Roe, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *Cell* **1997**, *90*, 65-75.

⁴⁷ S. M. Roe, C. Prodromou, R. O'Brien, J. E. Ladbury, P. W. Piper, L. H. Pearl, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 260-266.

⁴⁸ Y. S. Lee, M. G. Marcu, L. Neckers, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 991-998.

⁴⁹ L. Neckers, Y.-S. Lee, *Nature* **2003**, *425*, 357-359.

⁵⁰ T. W. Schulte, L. M. Neckers, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, *42*, 273-279.

⁵¹ E. A. Sausville, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2155-2158.

wurde.^{52,53} Ein weiteres, semisynthetisch hergestelltes Medikament welches sich in der klinischen Phase 2 befindet, ist 17-(2-Dimethylaminoethyl)amino-17-desmethoxygeldanamycin (17-DMAG, Alveospimycin **21**) (siehe Abbildung 10). Diese Verbindung zeigt neben aktiver Hsp90-Inhibierung auch eine höhere Wasserlöslichkeit, was die Anwendung als Medikament vereinfachen sollte.^{54,55} Ein weiteres Geldanamycin-Derivat in der klinischer Phase 2 ist 17-Amino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AG **22**).⁵⁶

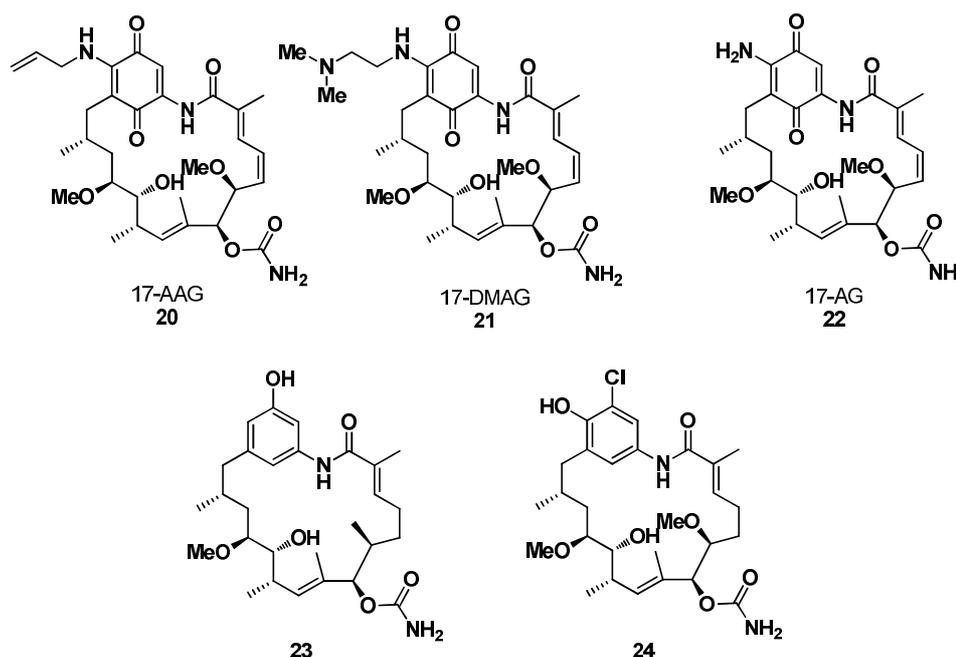


Abbildung 10: Semisynthetisch und biosynthetisch hergestellte Geldanamycin-Derivate in klinischen Studien.

In den letzten Jahren wurden vermehrt phenolische Ansamycine als Hsp90-Inhibitoren durch Biosynthese mit genetisch veränderten Organismen hergestellt (siehe Abbildung 10). Generell weisen Derivate ohne Chinonsystem eine erhöhte chemische Stabilität bei vergleichbarer Affinität zu Hsp90 auf.⁵⁷ Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da auch Geldanamycin-

⁵² S. Modi, A. T. Stopeck, M. S. Gordon, D. Mendelson, D. B. Solit, R. Bagatell, W. Ma, J. Wheeler, N. Rosen, L. Norton G. F. Cropp, R. G. Johnson, A. L. Hannah, C. A. Hudis, *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 5410-5417.

⁵³ Y. S. Kim, S. V. Alarcon, S. Lee, M. J. Lee, G. Giaccone, L. Neckers, J. B. Trepel, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1479-1492.

⁵⁴ Z. Q. Tian, Y. Liu, D. Zhang, Z. Wang, S. D. Dong, C. W. Carreras, Y. Zhou, G. Rastelli, D. V. Santi, D. C. Myles, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5317-5329.

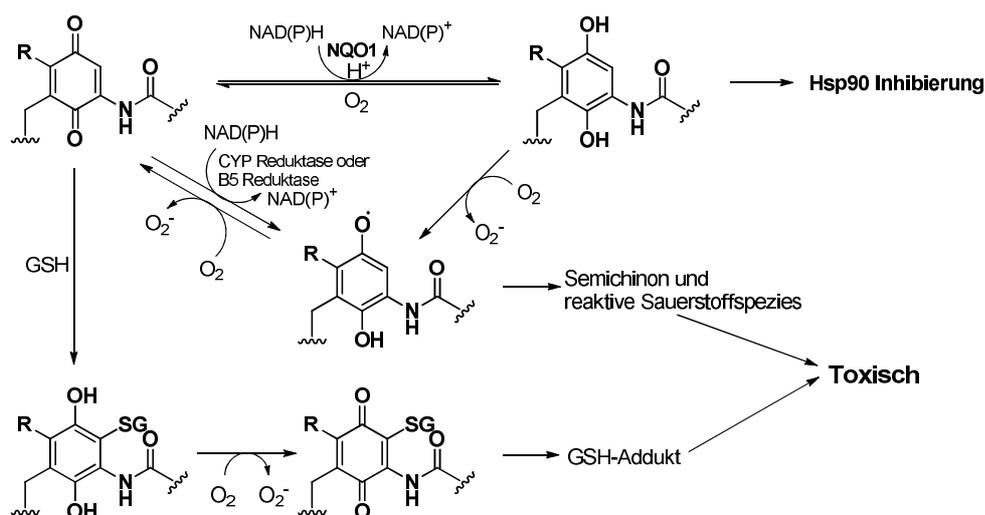
⁵⁵ M. Hollingshead, M. Alley, A. M. Burger, S. Borgel, C. Pacula-Cox, H. H. Fiebig, E. A. Sausville, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 115-125.

⁵⁶ M. J. Egorin, E. G. Zuhowski, D. M. Rosen, D. L. Sentz, J. M. Covey, J. L. Eiseman, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2001**, *47*, 291-302.

⁵⁷ M. Q. Zhang, S. Gaisser, M. Nur-E-Alam, L. S. Sheehan, W. A. Gaitatzis, G. Peck, N. J. Coates, S. J. Moss, M. Radzom *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5494-5497.

Derivate, die ein Chinon enthalten, unter physiologischen Bedingungen zum Dihydrochinon reduziert werden und dann an Hsp90 binden.⁵⁸

Die beim Geldanamycin **1** beobachtete Hepatotoxizität ist mit dem Chinonsystem verbunden. Dabei entfaltet sich die toxische Wirkung auf zwei Wegen. Zum einen können das chinoide Geldanamycin **1** oder entsprechende Derivate im Körper durch Ein-Elektronen-Reduktasen in den Leber-Mikrosomen umgewandelt werden, was einen Ein-Elektronen-Redox-Zyklus der Chinone auslöst und zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, welche für die Toxizität verantwortlich sind (siehe Schema 3).⁵⁹ NADPH Cytochrom P450 Reduktase und NADH Cytochrom-*b*5 Reduktase sind die bekanntesten Ein-Elektronen-Reduktasen, die einen Redoxzyklus auslösen können. Von den Geldanamycin-Derivaten geht Geldanamycin **1** am ehesten den Redoxzyklus ein, bei 17-AAG **20** ist dieses weniger ausgeprägt, was auch die unterschiedliche Hepatotoxizität von 17-AAG **20** und Geldanamycin **1** erklären könnte.⁶⁰



Schema 3: Toxizität von Geldanamycin **1** und chinoiden Derivaten.⁶¹

Der zweite Mechanismus basiert auf dem Abbau von Glutathion (GSH **25**),⁶² welches durch Michael-Addition an das chinoide System bindet. Solche Glutathionaddukte **26** sind für

⁵⁸ S. C. Ommoha, S. R. Mukund, E. T. Coulstock, B. Sengerová, J. Shaw, S. H. McLaughlin, S. E. Jackson, *J. Mol. Biol.* **2007**, 372, 287-297.

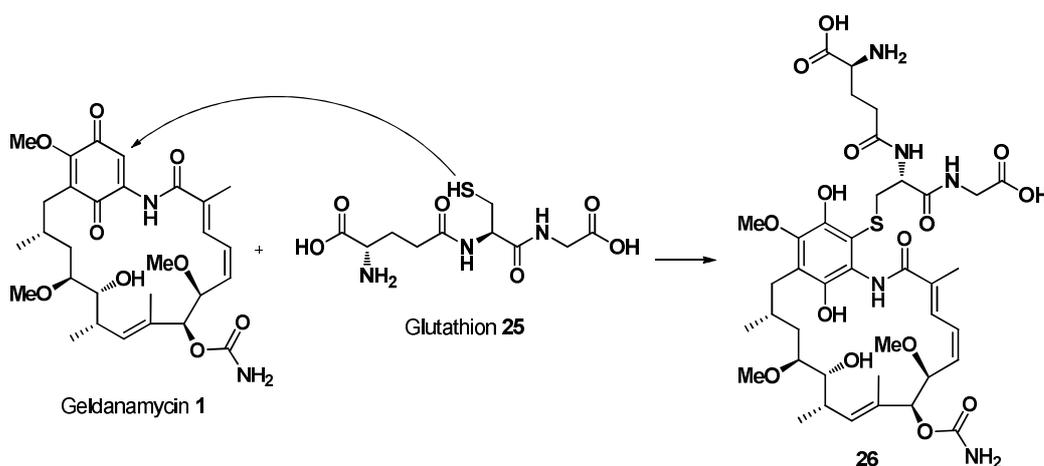
⁵⁹ a) D. Ross, *Pharmacol. Ther.* **1988**, 37, 231-249; b) G. Powis, *Free. Radic. Biol. Med.* **1989**, 6, 63-101; c) D. Ross, H. D. Beall, D. Siegel, R. D. Traver, D. L. Gustafson, *Br. J. Cancer Suppl.* **1996**, 27, S1-S8.

⁶⁰ H. P. Behrsing, K. Amin, C. Ip, L. Jimenez, C. A. Tyson, *Toxicol. In Vitro* **2005**, 19, 1079-1088.

⁶¹ W. Guo, P. Reigan, D. Siegel, D. Ross, *Drug Metab. Dispos.* **2008**, 36, 2050-2057.

⁶² GSH (auch γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine), ist ein Pseudotripeptid, das aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet wird. Es ist in fast allen Zellen in hoher Konzentration enthalten und gehört zu den wichtigsten Antioxidantien im Körper. Gleichzeitig ist es ein Reservoir für Cystein.

verschiedene Geldanamycin-Derivate beschrieben.^{63,64} Der Glutathionabbau spielt eine entscheidende Rolle für die Toxizität, da gebundenes Glutathion nicht mehr als Radikalfänger wirken kann. Die Abreicherung von Glutathion **25** in Zellen kann zur Arylierung von intrazellulären Nucleophilen führen.^{59,65} Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Benzochinon-Ansamycinen in Tumorzellen reziprok mit der Glutathionkonzentration korreliert. Das heißt, dass Zellen mit hohen Glutathionkonzentrationen resistent gegen Geldanamycin **1** waren, während bei abnehmender Glutathionkonzentration die Empfindlichkeit gegenüber Geldanamycin **1** anstieg.



Schema 4: Glutathionaddukt **25** von Geldanamycin **26**.⁶³

Weitere Einsatzgebiete für Hsp90-Inhibitoren sind neurodegenerative Erkrankungen wie Tauopathie zu denen Alzheimer und frontotemporale Demenz gehören. Bei diesen Erkrankungen kommt es zu einer Ansammlung des Tau-Proteins⁶⁶ im Gehirn, genauer gesagt in den Neuronen. Bei Alzheimer wird das Tau-Protein durch zu viele Phosphatgruppen funktionsunfähig und verklumpt, wodurch der Nährstofftransport zusammenbricht und die Nervenzellen und ihre Synapsen absterben.^{67,68} Hsp90 ist im Fall dieser Tauopathien vermehrt in aktiver Form in den Zellen vorhanden und fördert die Aktivität von den Proteinen p35 sowie cdk5, welche für die abnorme Phosphorylierung des Tau-Proteins verantwortlich sind.

⁶³ R. L. Cysyk, R. J. Parker, J. J. Barchi Jr., P. S. Steeg, N. R. Hartman, J. M. Strong, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 376-381.

⁶⁴ W. Lang, G. W. Caldwell, J. Li, G. C. Leo, W. J. Jones, J. A. Masucci, *Drug Metab Dispos* **2007**, *35*, 21-29.

⁶⁵ T. J. Monks, S. S. Lau, *Crit. Rev. Toxicol.* **1992**, *22*, 243-270.

⁶⁶ Das Protein stabilisiert die röhrenförmigen Proteine des Zellskeletts (Mikrotubuli), welche für den Nährstofftransport in den Zellen verantwortlich sind.

⁶⁷ W. Luo, A. Rodina, G. Chiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 9511-9516.

⁶⁸ C. A. Dickey, A. Kamal, K. Lundgren, N. Klosak, R. M. Bailey, J. Dunmore, P. Ash, S. Shoraka, J. Zlatkovic, C. B. Eckman, C. Patterson, D. W. Dickson, N. S. Nahman jr, M. Hutton, F. Burrows, L. Petrucelli, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 648-658.

Durch die Inhibierung von Hsp90 kann in diesem Fall die pathogene Aktivität unterbunden werden und es resultiert die Eliminierung von aggregiertem Tau-Protein.⁶⁸ Mit Hilfe von Hsp90-Inhibitoren könnte also in naher Zukunft die Lebensdauer von Neuronen verlängert werden und damit ein neuer Therapie-Ansatz zugänglich sein.

Außerdem können Hsp90-Inhibitoren für die Bekämpfung von Viren, Pilzen, und Malaria eingesetzt werden, da sie das in diesen Spezies vorhandene Hsp90 inhibieren. Bei Pilzkrankungen führt es dazu, dass keine Abwehrstoffe mehr produziert werden können und der Pilz so für andere Medikamente angreifbar wird.⁶⁹ Im Falle einer Virusinfektion führt die Hsp90-Inhibierung zu einer drastischen Absenkung der Replikationsfähigkeit des Virus, ohne dass es zu vermehrten Mutationen des Virus kommt.⁷⁰ Dieser Befund wurde für verschiedene Viren wie Poliovirus, Rhinovirus, Coxsackievirus und Hepatitis C-Virus⁷¹ nachgewiesen. Im Fall von Malaria führt die Inhibierung von Hsp90 zum Absterben der Parasiten auch bei bereits resistenten Arten wie *Plasmodium falciparum*.⁷²

2.1.2 Ansamitocine

2.1.2.1 Allgemein

Die Ansamitocine gehören zur Familie der Maytansinoide. Maytansin **27** wurde 1972 von KUPCHAN *et al.* aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus serrata* isoliert.⁷³ Die Ansamitocine wurden 1977 von HIGASHIDE *et al.* aus dem Actinomyceten *Actinosynnema pretiosum* isoliert.⁷⁴ Sie sind 19-gliedrige Macrolactame mit einem cyclischen Carbamat an C-7/C-9 und einer Esterseitenkette an C-3, welche die Namensgebung der entsprechenden Ansamitocine bestimmt. Es gibt eine Vielzahl von Derivaten, wobei die in der Natur am häufigsten vorkommenden Ansamitocin P-3 **28** (mit einem Isobuttersäureester), P-2 **29** (mit einem Propionsäureester) und P-4 **30** (mit einem Isovaleriansäureester) sind (siehe Abbildung 11).

⁶⁹ A. Casadevall, *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 1414-1416.

⁷⁰ R. Geller, M. Vignuzzi, R. Andino, J. Frydman, *Genes Dev.* **2007**, *21*, 195-205.

⁷¹ G. Shan, Z. Peng, Y. Li, D. Li, Y. Li, S. Meng, L. Gao, J. Jiang, Z. Li, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 177-182.

⁷² R. Kumar, A. Musiyenko, S. Barik, *Malaria Journal* **2003**, doi:10.1186/1475-2875-2-30.

⁷³ S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmore, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1354-1356.

⁷⁴ E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino, M. Yoneda, *Nature* **1977**, *270*, 721-722.

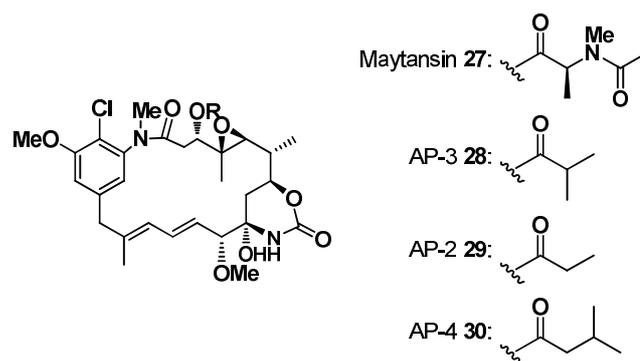


Abbildung 11: Maytansin 27 und Ansamitocin P-2 29, P-3 28 und P-4 30.

In Bezug auf die pflanzlichen Maytansinoide wird in der Literatur eine symbiotische Beziehung zwischen Pflanzenzellen und Bakterien diskutiert.⁷⁵

Die Maytansinoide zeigen alle eine extrem hohe Aktivität gegenüber humanen KB-Zellen *in vitro* sowie eine starke inhibitorische Wirkung in diversen eukaryotischen Standard-Tumorsystemen.⁷⁶

Die cytotoxische Wirkung der Maytansine ist begründet durch eine Inhibierung des Aufbaus des eukaryotischen Zytoskeletts. Die Polymerisation der Mikrotubuli wird durch die Bindung der β -Tubulinuntereinheiten an die Vinblastin-Bindungsstellen verhindert,⁷⁷ was zur Hemmung der Mitose in der Metaphase führt.⁷⁸

Klinische Studien der Phase 2 mit Ansamitocinen mussten in den 1980er Jahren aufgrund von Dosis-limitierender Toxizität wie Neurotoxizität und gastrointestinaler Toxizität eingestellt werden. Die Ansamitocine waren also wenig spezifisch, sind aber dennoch nicht von der Bildfläche verschwunden. So versuchen mehrere Gruppen mit der Anbindung von Tumor-adressierenden Antikörpern, bevorzugt über C-3-Seitenketten, die Ansamitocine selektiver für die Anwendung in der Tumorthherapie zu gestalten.⁷⁹

⁷⁵ 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.

⁷⁶ B. F. Isell, S. T. Crooke, *Cancer Treatment Revs.* **1978**, *5*, 199-207.

⁷⁷ 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.

⁷⁸ 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.

⁷⁹ 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.

2.1.2.2 Ansamitocin Biosynthese in *A. pretiosum*

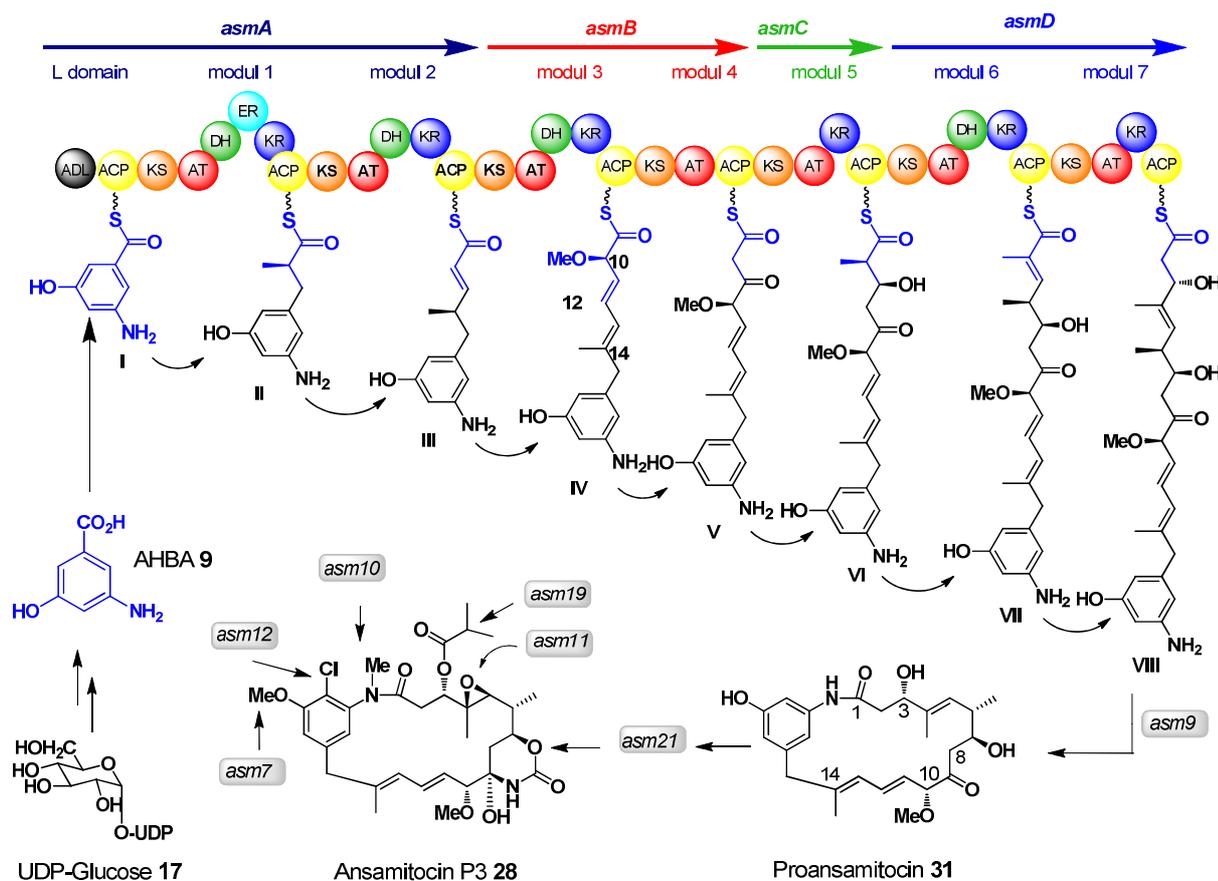
Die Biosynthese von Ansamitocin findet an einer modularen Typ I-PKS statt. Diese wurde 2002 von FLOSS *et al.* durch Verfütterungsexperimente mit ^{13}C - und ^{14}C -markierten Intermediaten,^{80,81} sowie durch die Generierung zahlreicher Deletionsmutanten aufgeklärt.⁸²

Wie schon in Kapitel 2.1.1.2 für das Geldanamycin **1** beschrieben, wird zu Beginn der Biosynthese der Initiationsbaustein AHBA (**9**) durch eine Adenylierungsdomäne (ADE) auf das benachbarte ACP übertragen. Es folgen sieben Module, die in vier einzelnen Enzymkomplexen (asm A-D) organisiert sind. Jedes Modul enthält null bis drei Domänen für die Veränderung der funktionellen Gruppen durch Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER). Die sieben Verlängerungseinheiten sind drei Propionat-, drei Acetat- und eine Glycolateinheit. Anschließend wird das so erhaltene *seco*-Proansamitocin durch eine Amidsynthese zum Proansamitocin zyklisiert und es folgen sechs post-PKS-Modifizierungen, die der Verbindung ihre biologische Aktivität geben. Diese Enzyme sind die Asm12, welche die Chlorierung katalysiert, Asm7 und Asm10, welche jeweils eine Methylierung katalysieren, Asm 11, welche für die Epoxidierung verantwortlich ist, die Asm21, welche das Carbamat generiert, sowie die Asm 19, welche die Esterseitenkette einführt (siehe Schema 5).

⁸⁰ K. Hatano, S.-I. Akiyama, M. Asai, R. W. Rickards, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1415-1417.

⁸¹ K. Hatano, E. Mizuta, S.-I. Akiyama, E. Higashide, Y. Nakao, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 327-333.

⁸² T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Prod. Nat. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7968-7973.



Schema 5: Ansamitocin P3-Biosynthese 28.

Zwei Besonderheiten dieser Biosynthese sind zum einen eine Doppelbindungenwanderung, welche auf der PKS stattfindet, was von KIRSCHNING *et al.* 2009 belegt wurde,^{83,84} und zum anderen die ungewöhnliche Glycolat-Verlängerungseinheit in Modul 3, die mittels eines Methoxymalonyl-ACP Vorläufers in die Biosynthese eingebracht wird.^{85,86}

2.1.2.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen im Ansamitocin

Um gezielte semisynthetische, sowie mutasynthetische Derivatisierungen am Ansamitocin vorzunehmen ohne die biologische Aktivität zu verlieren, sind Kenntnisse über den Einfluss

⁸³ T. Kubota, M. Brünjes, T. Frenzel, J. Xu, A. Kirschning, H. G. Floss, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1221-1225.

⁸⁴ F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.

⁸⁵ B. J. Carroll, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Zoelzer, T. W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.

⁸⁶ S. C. Wenzel, R. M. Williamson, C. Grünanger, J. Xu, K. Gerth, R. A. Martinez, S. J. Moss, B. J. Carroll, S. Grond, C. J. Unkefer, R. Müller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14325-14336.

der einzelnen Gruppen am Ansamitocin essentiell. Diese sogenannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR (*engl.* structure-activity-relationship)) wurden anhand der natürlich vorkommenden Maytansine beschrieben, sowie anhand von Derivaten die semisynthetisch veränderte Seitenketten aufwiesen (siehe Abbildung 12).⁸⁷

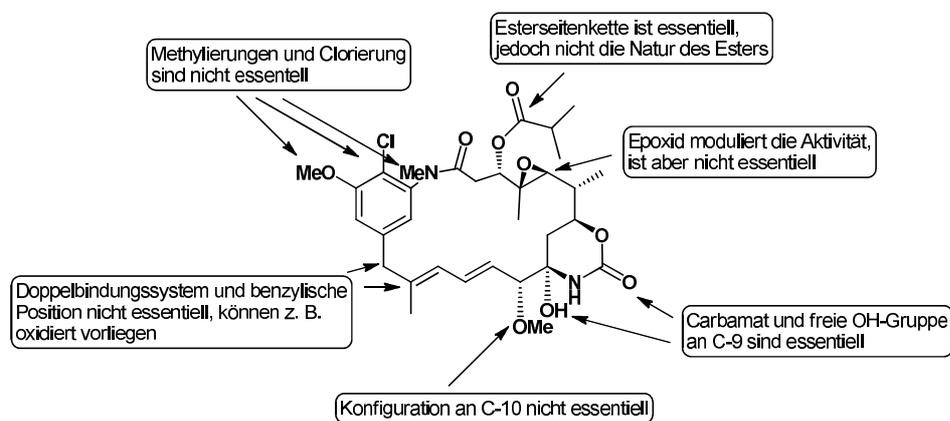


Abbildung 12: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Ansamitocinen.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, sind das Carbamat an C-7/C-9, sowie die halbaminalische freie OH-Gruppe an C-9 und eine Esterseitenkette essentiell für die biologische Aktivität. Die Natur der Esterseitenkette spielt hierbei keine entscheidende Rolle. Alle anderen Strukturelemente in Ansamitocin bzw. Maytansin haben keinen gravierenden Einfluss auf die biologische Aktivität.⁸⁸

2.2 Mutasyntese

Heutzutage werden eine Vielzahl von Naturstoffen fermentativ gewonnen. Substanzen wie zum Beispiel Epothilon werden von BRISTOL-MYERS-SQUIBB und NOVARTIS in großen Fermentern industriell produziert.⁸⁹

Die biosynthetische Generierung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten kann durch vier Konzepte realisiert werden, wobei eines der Konzepte die Mutasyntese ist (Schema 6).⁹⁰

⁸⁷ A. Kawai, H. Akimoto, Y. Kozai, K. Ootsu, S. Tanida, N. Hashimoto, H. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 3441-3451.

⁸⁸ 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.

⁸⁹ a) BRISTOL-MYERS-SQUIBB Company, *US 7 767 432 B2*, **2010**; b) NOVARTIS AG, *EP 1 054 994 B1*, **1999**.

⁹⁰ A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3245-3259.

Um Bibliotheken von Naturstoffderivaten zu erstellen, bleibt zum einen die klassische Totalsynthese, welche in den meisten Fällen sehr zeit- und kostenintensiv ist, oder die Semisynthese, welche oft durch die Komplexität des Naturstoffs und die Anwesenheit zahlreicher funktioneller Gruppen beschränkt ist.

Ein früherer Ansatz, um Naturstoffbibliotheken auf einem anderen, zeit- und kostengünstigeren Weg zu erstellen, ist die Vorläufer-dirigierte Biosynthese (*engl.* precursor-directed biosynthesis, PDB) (siehe Schema 6).⁹¹ Hier wird die Biosynthesemaschinerie eines Sekundärmetabolit-Produzenten genutzt um durch Zufütterung von modifizierten Biosynthese-Vorläufern Naturstoffderivate zu generieren. Diese Methode birgt jedoch zwei wesentliche Nachteile. Zum einen besteht eine inhärente Konkurrenz zwischen natürlichem und unnatürlichem Intermediat, wodurch das Naturstoffderivat oft nur in geringen Mengen gebildet wird. Zum anderen ist die Reinigung und Isolierung der verschiedenen Sekundärmetabolite in Gegenwart des Naturstoffs oft schwierig.

Einen weiterentwickelten Ansatz, der erstmals 1963 von BIRCH als Alternative zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese vorgeschlagen wurde⁹² und 1977 erstmals von RINEHART *et al.* zur Generierung von Neomycin-Derivaten angewendet wurde,⁹³ stellt die Mutasynthese dar. Hierbei wird ein genetisch veränderter Organismus verwendet, bei dem ein spezifischer Schritt in der Biosynthese geblockt wurde (siehe Schema 6). Die Herstellung geeigneter Mutanten konnte damals nur über ungerichtete Mutagenese mit anschließender Selektion der Klone erfolgen. Mit fortschreitender Entwicklung in der Mikrobiologie und Molekulargenetik war es später möglich, gezielt genmanipulierte Organismen bereitzustellen und diese in Mutasyntheseexperimente einzusetzen.⁹⁰

Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber der Vorläufer-dirigierten Biosynthese ist, dass der modifizierte Vorläufer nicht mit dem natürlichen Substrat konkurrieren muss, was zum einen die Aufladung auf die PKS stark begünstigt und zum anderen die Reinigung und Trennung der entstehenden Derivate vereinfacht. Zwei eindrucksvolle Beispiele sind die Generierung von Avermectin-Derivaten von DUTTON *et al.* aus dem Jahre 1991⁹⁴ sowie die

⁹¹ R. Tiercke, R. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289.

⁹² A. J. Birch, *Pure Appl. Chem.* **1963**, *7*, 527.

⁹³ K. L. Rinehart, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361-1384.

⁹⁴ S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Pacey, J. C. Ruddock, C. J. Dutton, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357-365.

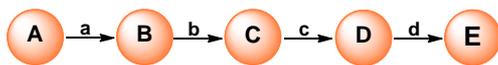
Generierung von Erythromycin-Derivaten von JACOBSEN *et al.* aus dem Jahre 1997.⁹⁵
 Inhaltliche Details zu diesem Thema können diversen Reviews entnommen werden.^{96,90}

Limitierende Faktoren der Mutasyntese können die Substratflexibilitäten der einzelnen Enzyme sein, die dazu führen, dass nicht alle zugeführten Intermediate zum Naturstoff prozessiert werden.

Ein weiteres durch den Fortschritt in der Gentechnik mögliches Konzept ist die kombinatorische Biosynthese, bei der die Gene verschiedener Organismen kombiniert werden, um so zu neuen Biosynthesewegen und somit Naturstoffderivaten zu gelangen (Schema 6). Die entstehenden Substanzen sind dann sogenannte Hybride, da sie sich aus zwei Naturstoffen zusammensetzen.⁹⁷

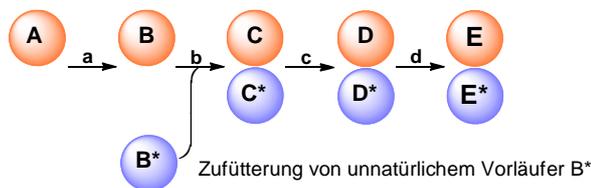
I. Biosynthese von Naturstoffen

Wildtyp-Organismus



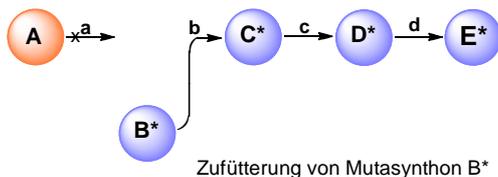
II. Vorläuferdirigierte Biosynthese

Wildtyp-Organismus



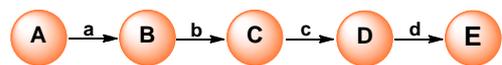
III. Mutasyntese

mutierter Organismus

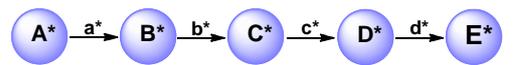


IV. Kombinatorische Biosynthese

Wildtyp-Organismus 1

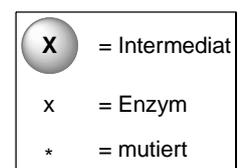
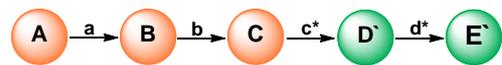


Wildtyp-Organismus 2



Gen-Kombination

Hybrid-Typ-Organismus



Schema 6: Biosynthetische Konzepte zur Erzeugung von Naturstoff-Derivaten.^{4,90}

⁹⁵ a) C. R. Hutchinson, D. E. Cane, C. Koshla, J. R. Jacobsen, *Science* **1997**, 277, 367-369; b) A. T. Keatinge-Clay, D. E. Cane, C. Koshla, J. R. Jacobsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1171-1177.

⁹⁶ 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.

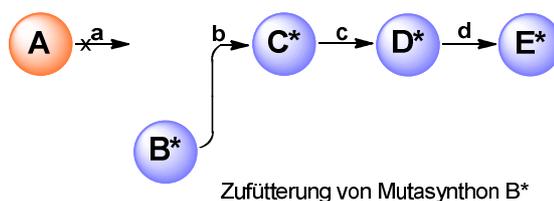
⁹⁷ a) H. G. Floss, *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 242-257; b) C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, 3, 124-134; c) J. Staunton, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 159-164.

3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Erzeugung neuer Derivate von Geldanamycin **1** und Ansamitocin-P3 **28**. Diese sollen zum einen durch Mutasythese generiert werden und zum anderen über einen kombinierten Ansatz aus Mutasythese und Semisynthese. Beide Substanzen, Geldanamycin und Ansamitocin, gehören in die Klasse der Ansamycine und haben rein strukturell einige Gemeinsamkeiten. Die Verbindung dieser beiden Themen liegt in der Verwendung der Blockmutante von *S. hygrosopicus*, die sowohl für die Mutasytheseexperimente mit AHBA-Analoga, als auch für die Mutasythese mit den post-PKS-adressierenden Proansamitocinderivaten eingesetzt wurde.

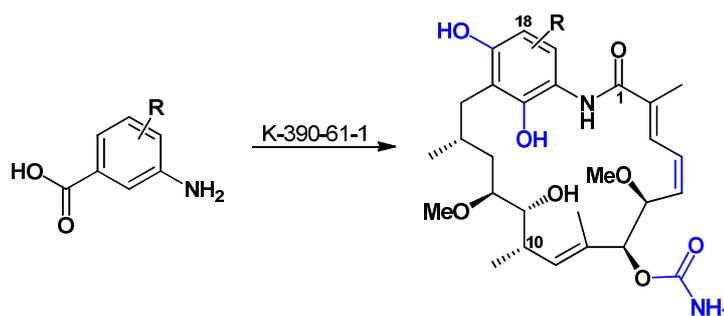
3.1 Geldanamycin-Mutasythese

Hier sollten verschiedene AHBA-Analoga an die Mutante von *S. hygrosopicus* verfüttert werden, um einerseits unter biosynthetischen Aspekten einen Eindruck von der Substratflexibilität der *S. hygrosopicus* Mutante K390-61-1 zu bekommen und um andererseits neue Geldanamycin-Derivate in ausreichenden Mengen für SAR-Studien und vollständige Strukturaufklärung zu generieren (Schema 7). Außerdem sollen über diesen Ansatz verschiedene funktionelle Gruppen in das Geldanamycin-Gerüst eingeführt werden, um dieses anschließend semisynthetisch weiter gezielt modifizieren zu können.



Schema 7: Schematische Darstellung der Mutasythese.

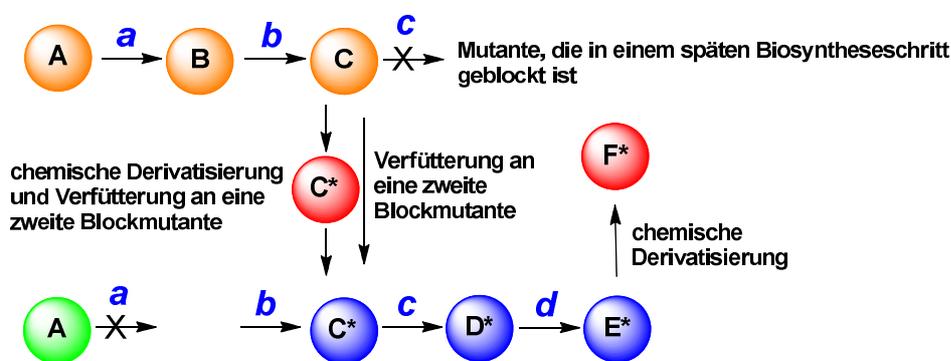
In Schema 8 ist die Umsetzung eines Aminobenzoesäure-Derivats zu einem Geldanamycin-Derivat mit möglichen PKS-Modifizierungen gezeigt.



Schema 8: Fütterungsexperimente mit der AHBA(-)-Mutante K390-61-1 (in blau dargestellt sind mögliche post-PKS-Modifizierungen).

3.2 Kombination aus Semisyntese und Mutasyntese

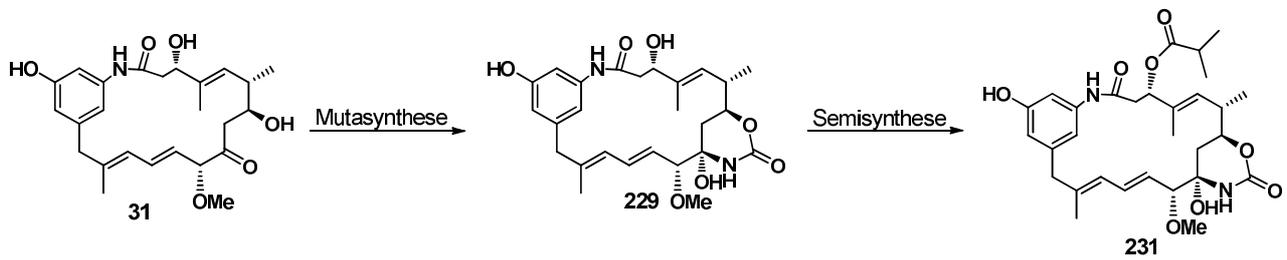
Der zweite Teil dieser Dissertation hatte zum Ziel, fermentativ gewonnenes Proansamitocin **31** direkt, oder nach chemischer Modifizierung in Mutasynteseexperimenten mit den beiden Mutanten *S. hygroscopicus* K360-61-1 und *A. pretiosum* HGF073 einzusetzen. Anschließend sollte in einigen Fällen eine weitere chemische Modifizierung folgen (siehe Schema 9).



Schema 9: Naturstoffsynthese basierend auf einem iterativen Ansatz aus Semisyntese und Mutasyntese.

Hierbei sollte zum einen untersucht werden, welche post-PKS-Enzyme die Derivate weiter modifizieren und zum anderen sollten nach der Fermentation noch weitere semisynthetische Veränderungen vorgenommen werden. Durch eine solche Strategie ist die gezielte Erzeugung eines aktiven Naturstoffderivats aus einem inaktiven Fermentationsprodukt denkbar. Im Falle des Proansamitocins **31** kann zum Beispiel das Carbamat durch Mutasyntese eingeführt

werden. Die Esterseitenkette an C-3 kann dann chemisch durch Veresterung installiert werden (siehe Schema 10).



Schema 10: Mögliche Kombination aus Mutasythese und Semisynthese von Proansamytocin **31**.

4 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

4.1 Synthese der Mutasyntnone

In diesem Kapitel werden die Synthesen für die modifizierten Startereinheiten (Mutasyntnone) vorgestellt. Dies sind in den meisten Fällen verschieden substituierte 3-Aminobenzoessäuren. In Verfütterungsexperimenten sollten sie Einblicke in die Substratflexibilität der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA **9** blockierten Mutante von *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1 eröffnen. Zusätzlich sollte die Einbringung funktioneller Gruppen spätere semisynthetische Derivatisierungen ermöglichen. Neben den 3-Aminobenzoessäuren wurden auch Hydroxymethylbenzoessäuren synthetisiert. Auf diese besonderen Mutasyntnone wird in Kapitel 4.3 näher eingegangen.

Die Ausgangsverbindung für die Synthese von 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäure (**36**) war der kommerziell erhältliche 2,3-Dihydroxybenzoessäuremethylester (**32**) welcher zuerst mit Diiodmethan zum Benzo[1,3]dioxol-4-carbonsäuremethylester (**33**) in moderaten Ausbeuten zyklisiert wurde (siehe Schema 11).⁹⁸ Anschließend wurde diese Verbindung regioselektiv mit Br₂ halogeniert.⁹⁹

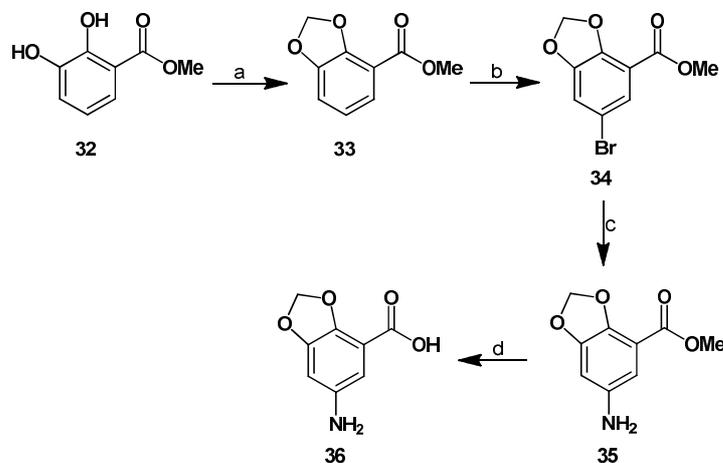
Der so erhaltene 6-Brom-benzo[1,3]dioxol-4-carbonsäuremethylester (**36**) sollte nun in einer HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zum Amin **35** umgesetzt werden. Hier wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zum einen wurde probiert, mit LiN(TMS)₂ als Ammonium-Quelle, Pd₂(dba)₃ als Katalysator und (2'-Dicyclohexylphosphanyl-biphenyl-2-yl)-dimethylamin als elektronenreichem Liganden direkt das primäre Amin **35** zu erhalten.¹⁰⁰ Hier konnte jedoch kein Umsatz zum gewünschten Produkt beobachtet werden. Des Weiteren wurde probiert, ein sekundäres Amin mit einer später leicht zu entfernenden Schutzgruppe einzuführen. Hierfür wurde 4-Methoxyanilin ausgewählt.¹⁰⁰ Diese Reaktion lieferte ausschließlich das Amid, durch Reaktion des Esters. Daher wurde ein anderes Katalysatorsystem gewählt. In einigen Veröffentlichungen von WOLF *et al.* wurde Kupfer in Form von Cu₂O für derartige

⁹⁸ P. A. Plé, T. P. Green, L. F. Hennequin, J. Curwen, M. Fennell, J. Allen, C. Lambert-van der Brempt, G. Costello, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 871-887.

⁹⁹ X. Wang, X. Pan, Y. Cui, Y. Chen, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10659-10666.

¹⁰⁰ M. C. Harris, X. Huang, S. L. Buchwald, *Org.Lett.* **2002**, *4*, 2885-2888.

Überführungen von Halogeniden in Amine verwendet.¹⁰¹ Versuche, den 6-Brombenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäuremethylester (**34**) über Cu₂O-Katalyse mit wässrigem Ammoniak in das Amin **35** zu überführen lieferte den 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäuremethylester (**35**) in einer geringen Ausbeute von 7 %. Es wurden Gemische aus Zersetzungsprodukt, Amid, Säure und Ester **35** erhalten, was die Reinigung des Produkts sehr schwierig gestaltete. Da diese Reaktion sehr unsauber verlief und nur eine geringe Ausbeute erbrachte, wurde nach einer neuen Möglichkeit gesucht, das Bromid durch ein primäres Amin zu ersetzen. Hierfür wurde als Kupferquelle CuI und als Ligand 2,4-Pentandion gewählt. Ammoniak wurde nur in geringen Mengen zugegeben, was die unerwünschte Umsetzung zum Amid verringern sollte.¹⁰² Diese Reaktion verlief ebenfalls sehr unsauber; aber nach mehreren Reinigungsschritten konnte hierbei mit einer Ausbeute von 30 % der 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäuremethylester (**35**) erhalten werden. Diese eher mäßigen Ausbeuten sind in der Literatur von TAILLEFER *et al.* für Bromide, die Ester enthalten, bereits beschrieben, da der Ester teilweise hydrolysiert. Der so erhaltene Ester **35** wurde nachfolgend mit 1M LiOH-Lösung in einer Ausbeute von 92 % zur 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäure (**36**) umgesetzt (siehe Schema 11).

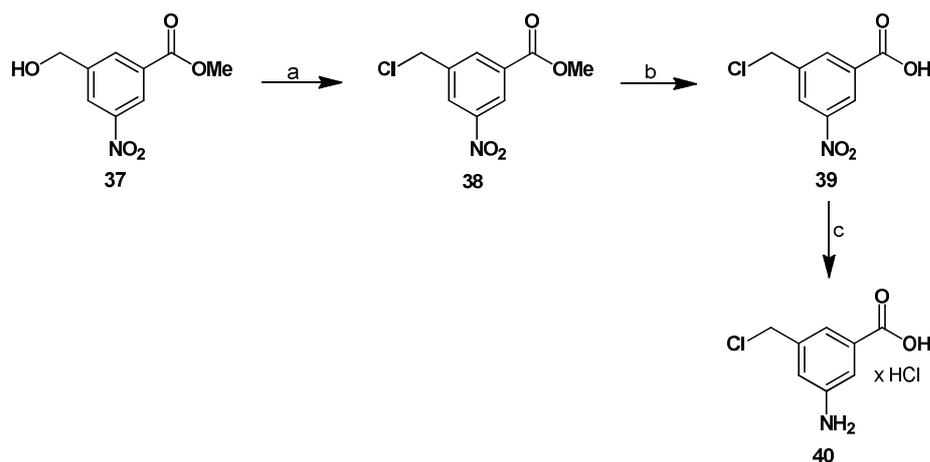


Schema 11: Synthese von 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäure (**36**). Bedingungen: a) i. KF, DMF, 30 min, RT, ii. CH₂I₂, 30 h, 110 °C, **68** %; b) NaOAc, Eisessig, Br₂, 12 h, RT, **84** %; c) Cs₂CO₃, CuI, 2,4-Pentandion, DMF, NH₃, 12 h, 70 °C, **30** %, d) MeOH, LiOH, 4 h, RT, **92** %.

¹⁰¹ a) H. Xu, C. Wolf, *Chem. Commun.*, **2009**, 1715–1717; b) H. Xu, C. Wolf, *Chem. Commun.* **2009**, 3035–3037.

¹⁰² N. Xia, M. Taillefer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 343–345.

Die Synthese von 3-Amino-5-chlormethylbenzoesäure Hydrochlorid **40** startete mit 3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester (**37**), welcher in einer S_N2-Reaktion mit Thionylchlorid zum Benzylchlorid **38** umgesetzt wurde (siehe Schema 12). Diese Verbindung wurde anschließend in guten Ausbeuten mit 1M LiOH-Lösung verseift und die Nitrogruppe mit SnCl₂ zum Amin reduziert. Diese Verbindung wurde wegen besserer Lagerfähigkeit direkt in das Hydrochlorid-Salz **40** überführt.



Schema 12: Synthese von 3-Amino-5-chlormethylbenzoesäure Hydrochlorid **40**. Bedingungen: a) Pyridin, Thionylchlorid, 12 h, RT, **55 %**; b) THF, LiOH, 5 h, RT, **87 %**; c) i. EE, SnCl₂·2H₂O, 5 h, Δ; ii. halbkonz. HCl, Δ, **96 %**.

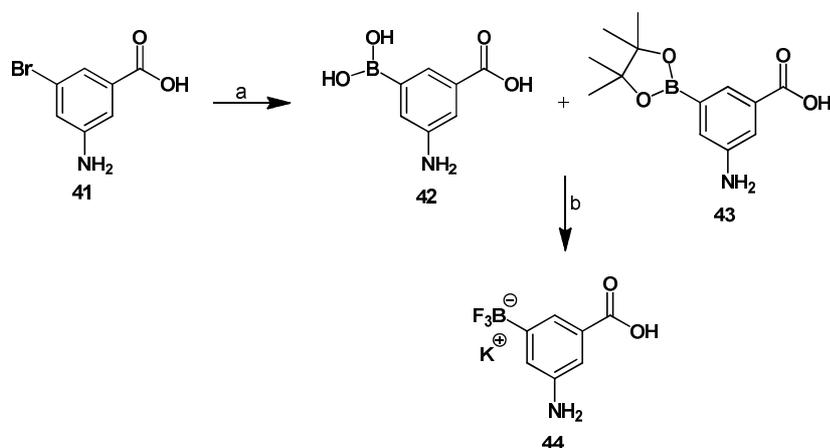
3-Nitro-5-Fluoroboratbenzoesäure **44** wurde ausgehend von 3-Amino-5-brombenzoesäure (**41**) durch eine SUZUKI-MIYAURA-Kupplung und anschließende Umsetzung zum Fluoroborat **44** hergestellt.¹⁰³ Da verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt hatten, dass sowohl freie Carbonsäuren, wie auch freie Amine in die Palladium-katalysierte Kupplung mit dem Bis(pinacolato)diboron eingesetzt werden können,¹⁰⁴ wurde die Reaktion mit der zur Verfügung stehenden 3-Amino-5-brombenzoesäure (**41**) durchgeführt.

Die SUZUKI-MIYAURA-Kupplung lieferte hierbei den Pinacol-Boronsäureester **43**, der zur Abtrennung des Palladium-Katalysators über Kieselgel filtriert wurde. Bei dieser Filtersäule wurde der Boronsäureester **43** teilweise hydrolysiert, woraus ein Gemisch aus freier Boronsäure **42** und Boronsäureester **43** resultierte und daher keine Ausbeute bestimmt werden konnte. Dieses Gemisch wurde in der darauf folgenden Reaktion mit KHF₂-Lösung (2.5 M)

¹⁰³ T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.

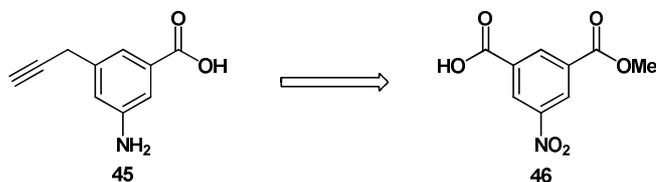
¹⁰⁴ a) E. F. DiMauro *et al.*, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5671-5686, b) R. Angell *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4428-4432. c) A. J. Folkes *et al.*, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5522-5532.

zum Fluoroborat **44** umgesetzt.¹⁰⁵ Dieses wurde mit einer Ausbeute von 73 % über 2 Stufen erhalten (siehe Schema 13).



Schema 13: Synthese von 3-Nitro-5-Fluoroboratbenzoesäure **44**. Bedingungen: a) KOAc, Bis(pinacolato)-diboron, PdCl₂(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, DMF, 10 min, 200 Watt, 120 °C, MW; b) MeOH, KHF₂, 3 h, RT, **73 %** über 2 Stufen.

Die Retrosynthese der 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**) ist in Schema 14 gezeigt.

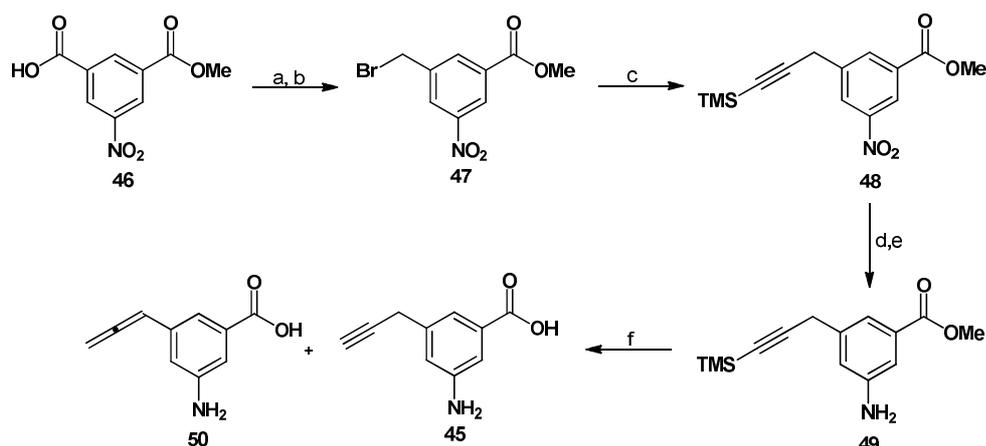


Schema 14: Retrosynthese von 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**).

Die Synthese dieses aromatischen Bausteins wurde bereits in einer früheren Arbeit untersucht. Hierbei konnte jedoch nur ein Gemisch bestehend aus Alkin **45** und Allen **50** erhalten werden (siehe Schema 15).⁴

In dieser Arbeit wurde die gezeigte Syntheseroute modifiziert. Ausgehend von 3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester (**48**) wurde versucht, mit 1M LiOH-Lösung gleichzeitig den Ester zu verseifen und das Alkin zu entschützen, um so 3-Nitro-5-prop-2-ynylbenzoesäure zu erhalten.

¹⁰⁵ a) S.Darses, G. Michaud, J.-P. Genêt, *Eur. J. Org.* **1999**, 1875-1883. b) G. A. Molander, B. Biolatto, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 4302-4314.



Schema 15: Bekannte Synthese zu 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**). Bedingungen: a) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, Δ , 15 min, **73 %**; b) PBr_3 , Pyridin abs., Et_2O , RT, 30 min, **88 %**; c) TMS-Acetylen, THF, -78°C , $n\text{-BuLi}$, 1.5 h, ii. InCl_3 , THF, -78°C , 30 min, 45 min, RT, iii. THF, $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{DCM}$, 65°C , Ethynylindiumlösung, 5 h, **48 %**; d) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EE, Δ , 4 h, **78 %**; e) $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.5 M in THF), THF, -20°C , 1 h, **99 %**; LiOH , CH_3OH , RT, 18 h, **98 %**.⁴

Diese Umsetzung führte jedoch in quantitativer Ausbeute zur 3-Benzylallen-5-nitrobenzoesäure (**51**) (siehe Schema 16). Da die Allenbildung unter basischen Bedingungen aufgrund der Konjugation zum Aromaten stark bevorzugt ist, wurden Versuche unternommen, den Ester mit H_2SO_4 ¹⁰⁶ oder Thionylchlorid¹⁰⁷ sauer zu hydrolysieren. Diese Umsetzungen lieferten die Säure nur in Spuren und führten teilweise zur Zersetzung des Edukts.

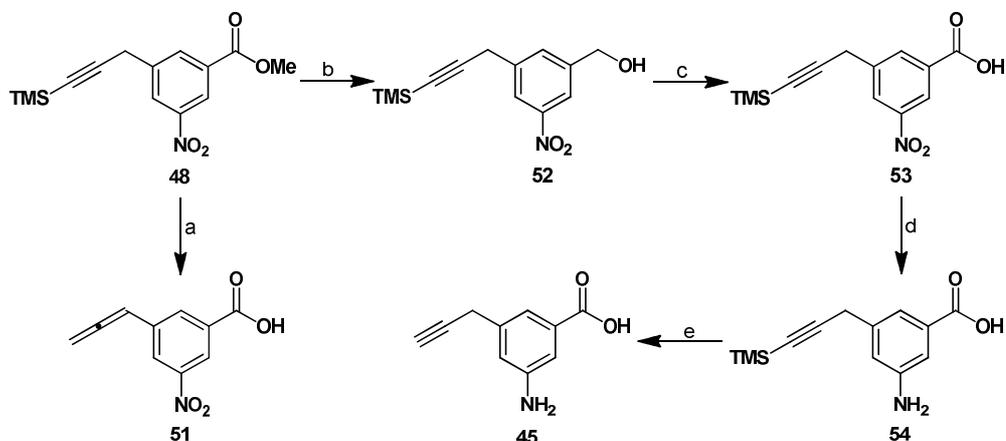
Ein neuer Ansatz startete mit dem aus Vorarbeiten bekannten 3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester (**48**), welcher mit DIBAL-H in quantitativer Ausbeute zum [3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-phenyl]-methanol (**52**) umgesetzt wurde.¹³⁸ Der so erhaltene Alkohol **52** wurde anschließend mit dem JONES-Reagenz zur Säure **53** oxidiert. Diese Reduktions-Oxidations-Sequenz ermöglichte es, den Ester ohne basische Reaktionsbedingungen in die Säure zu überführen. Die Nitrogruppe in der 3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäure (**53**) wurde dann mit SnCl_2 zum Amin **54** reduziert und abschließend die TMS-Gruppe mit TBAF entfernt. Somit konnte das fertige Mutasynton **45** in guten Ausbeuten erhalten werden. Ein Problem der gesamten Synthese dieser Aminobenzoesäure war jedoch die Indium-vermittelte Kupplung mit dem Benzylbromid **47**,¹⁰⁸ welche am vorhandenen aromatischen System mit einer Nitrogruppe in

¹⁰⁶ a) J. F. Marlier, M. H. O'Leary, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2175-2177; b) W. A. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92(18)*, 5419-5422.

¹⁰⁷ C. L. M. Goodyer, E. C. Chinje, M. Jaffar, I. J. Stratford, M. D. Threadgill, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4189-4206.

¹⁰⁸ I. Pérez, J. Pérez Sestelo, L. A. Sarandeses, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4155-4160.

meta-Position nur geringe Ausbeuten von 48% lieferte (siehe Schema 15). Hier wurden verschiedene weitere Ansätze untersucht, wie z. B. eine Kupfer-katalysierte Kupplung des Benzylbromids **47** mit Trimethylsilylethynyl-GRIGNARD-Reagenz¹⁰⁹ und eine GRIGNARD-Reaktion mit 3-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester, der in das entsprechende GRIGNARD-Reagenz umgesetzt wurde und mit 3-Brompropinyltrimethylsilan versetzt wurde.¹¹⁰ Da diese Umsetzungen fehl schlugen und vermutet wurde, dass der Ester ein Problem in dieser Reaktion darstellen könnte, wurde die GRIGNARD-Reaktion noch einmal nach einer Methode von KNOCHEL *et al.* durchgeführt. Laut Literatur werden unter den dort verwendeten Reaktionsbedingungen Ester toleriert.¹¹¹ Leider konnte auch unter diesen Bedingungen kein Produkt erhalten werden. Eine andere Möglichkeit, das Alkin in der gewünschten Position einzuführen, bestand in einer NEGISHI-Kupplung. Hier wurde wiederum das Benzylbromid **47** verwendet und mit einem Zink-Organyl umgesetzt.¹¹² Diese Reaktion zeigte jedoch keinen Umsatz. Eine letzte Möglichkeit war die HECK-Alkinylierung oder auch kupferfreie-SONOGASHIRA-Kupplung mit PdCl₂(CH₃CN)₂ als Katalysator, X-Phos als Ligand und Cs₂CO₃ als Base. Diese Reaktion lieferte das Kupplungsprodukt in einer Ausbeute von 23%.¹¹³



Schema 16: Synthese von 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**). Bedingungen: a) CH₃OH, LiOH, 12 h, RT, **quant.**; b) CH₂Cl₂, -60 °C, DIBAL-H, RT, 2 h, **quant.**; c) Aceton, JONES Reagenz, 1 h, RT, *iso*-Propanol, 2 min, **quant.**; d) EE, SnCl₂·2H₂O, 3 h, Δ, **quant.**; e) THF, -20 °C, TBAF·3H₂O, 24 h, **97 %**.

¹⁰⁹ V. Gopalsamuthiram, W. D. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13936-13937.

¹¹⁰ M. E. Jung, J. A. Hagenah, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1889-1902.

¹¹¹ G. Varchi, C. Kofink, D. M. Lindsay, A. Ricci, P. Knochel, *Chem. Commun.* **2003**, 396-397.

¹¹² M. Qian, E. Negishi, *Tet. Lett.* **2005**, *46*, 2927-2930.

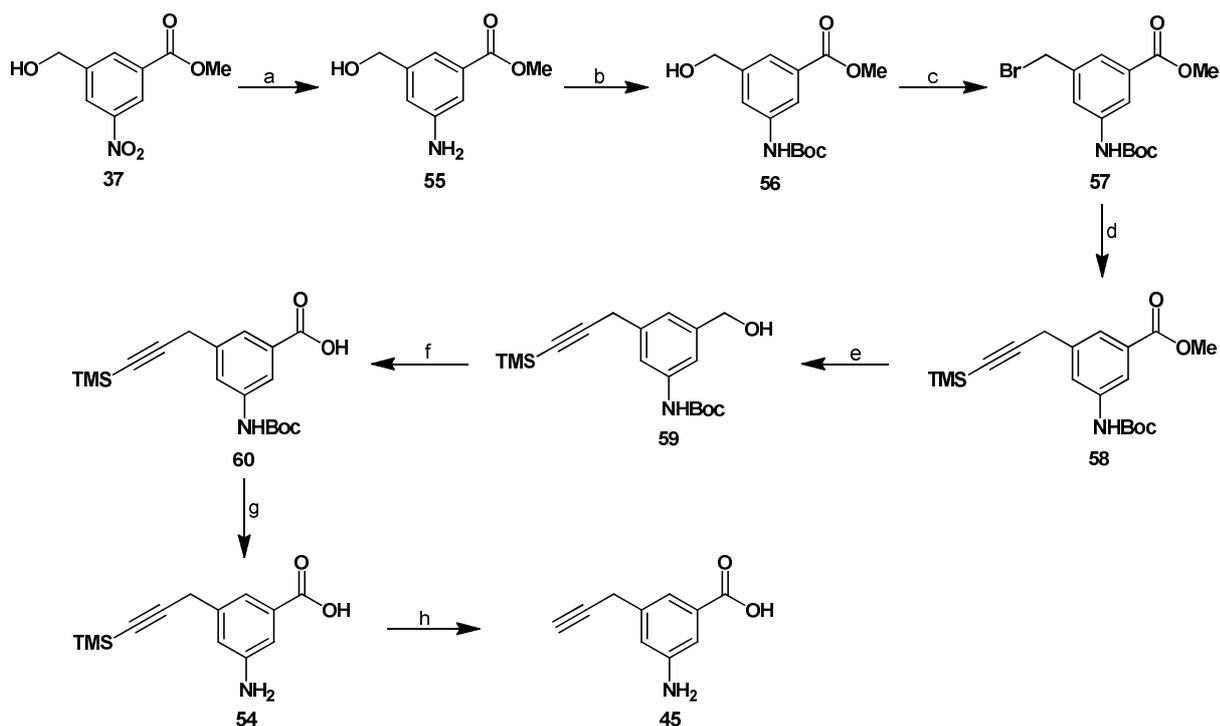
¹¹³ C. H. Larsen, K. W. Anderson, R. E. Tundel, S. L. Buchwald, *Synlett*, 2006, 2941-2946.

Aufgrund der geringen Ausbeute der Indium-vermittelten Kupplung und der Tatsache, dass zwei Synthesestufen zusätzlich nötig waren, nämlich die Reduktions-Oxidations-Sequenz anstelle der Verseifung, um das gewünschte Produkt zu erhalten, wurde eine neue Strategie entwickelt. Hierbei wurde von 3-Nitro-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester (**37**) ausgegangen, welcher zuerst mit Palladium auf Kohle in quantitativer Ausbeute zum Amin **55** reduziert wurde (siehe Schema 17). Das Amin **55** wurde anschließend Boc-geschützt und es erfolgte die S_N2-Reaktion zum Benzylbromid **57**. Der so erhaltene 3-Brommethyl-5-*tert*-butoxycarbonylaminobenzoäuremethylester (**57**) wurde dann in der Indium-vermittelten Kupplung eingesetzt. Durch die Überführung der Nitrogruppe in eine geschützte Aminogruppe ist das aromatische System elektronenreicher und die Kupplung gelang in einer guten Ausbeute von 83 %. Es folgten die Schritte, wie in der vorherig geplanten Synthesestrategie: Zum einen die DIBAL-H-Reduktion und zum anderen die JONES-Oxidation. Anschließend erfolgte die Boc-Entschützung desamins und am Schluss die TMS-Entschützung des Alkins, die abweichend von vorherigen Arbeiten mit KF durchgeführt wurde, da TBAF-Reste nur schwer vollständig zu entfernen konnten. So konnte mit dieser Synthesestrategie das Mutasynton 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**) in durchweg guten Ausbeuten über alle 8 Stufen erhalten werden (siehe Schema 17).

Die Synthese von 7-Aminobenzofuran-5-carbonsäure (**66**) startete mit dem 4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäuremethylester (**61**) welcher mit Allylbromid in guten Ausbeuten zum Allylether umgesetzt (siehe Schema 18) und anschließend in eine CLAISEN Umlagerung eingesetzt wurde. Hierfür wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zum einen wurde die Reaktion in der Mikrowelle mit SiC in Toluol bei Temperaturen von 200-220°C und verschiedenen Reaktionszeiten durchgeführt. Zum anderen wurde das Lösungsmittel durch die ionische Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumbis(trifluormethansulfon)imid¹¹⁴ ersetzt bzw. die Reaktion ohne Lösungsmittel¹¹⁵ durchgeführt. Die Ergebnisse aller Reaktionsbedingungen waren ähnlich. Die Ausbeuten bewegten sich immer in einem Bereich von 40-60%. Die beste Ausbeute wurde in Toluol mit SiC für 2 h bei 200°C erzielt.

¹¹⁴ I. R. Baxendale, A.-L. Lee, S. V. Ley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* **2002**, 1850-1857.

¹¹⁵ P. A. Plé, T. P. Green, L. F. Hennequin, J. Curwen, M. Fennell, J. Allen, C. Lambert-van der Brempt, G. Costello, *J. Med Chem.* **2004**, *47*, 871-887.



Schema 17: Synthese von 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**). Bedingungen: a) EtOH, Pd/C, H₂, 24 h, RT, **98 %**; b) EtOH, Boc₂O, 40 °C, 12 h, **94 %**; c) i. PPh₃, Imidazol, CH₂Cl₂, 0 °C, Br₂, 30 min, ii. 90 min, RT, **90 %**; d) i. TMS-Acetylen, THF, -78 °C, *n*-BuLi, 1.5 h, ii. InCl₃, THF, -78 °C, 30 min, dann 45 min, RT, iii. THF, Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, 65 °C, Ethynylindiumlösung, 5 h, **83 %**; e) CH₂Cl₂, 0 °C, DIBAL-H, 1.5 h, **91 %**; f) Aceton, JONES Reagenz, 1.5 h, **90 %**; g) CH₂Cl₂, TFA, 3.5 h, RT, **quant.**; h) CH₃OH, KF, 50 °C, 2 h, **71 %**.

Das erhaltene umgelagerte Produkt **62** sollte dann in einer Ozonolyse und anschließender Eliminierung des Halbacetals mit Phosphorsäure zu Furan **65** zyklisiert werden.¹¹⁵ Diese Reaktionsfolge lieferte jedoch nur geringe und nicht reproduzierbare Ausbeuten von 15 %. Auch der Versuch, das Halbacetal nach der Ozonolyse mit *p*-TsOH zu eliminieren, schlug fehl.¹¹⁶ Außerdem verlief diese Reaktion sehr unsauber. Eine andere Möglichkeit, das Halbacetal für die anschließende Eliminierungsreaktion herzustellen, war die Reaktionsfolge Dihydroxylierung/Periodat-Spaltung.¹¹⁷ Bei dieser Reaktion wurde jedoch nicht das gewünschte Halbacetal gebildet, sondern der Alkohol **67**. Dieser entstand nach Öffnung des intermediär gebildeten Osmatesters durch die phenolische OH-Gruppe. Diese Reaktion verläuft intramolekular und sollte somit gegenüber der Hydrolyse kinetisch begünstigt sein. Um dieses zu verhindern, sollte die phenolische Hydroxygruppe in **62** methyliert werden¹¹⁸ und anschließend die Doppelbindung durch Ozonolyse oder Dihydroxylierung/Periodat-

¹¹⁶ D. E. Fuerst, B. M. Stoltz, J. L. Wood, *Org. Lett.* **2000**, 2, 3521-3523.

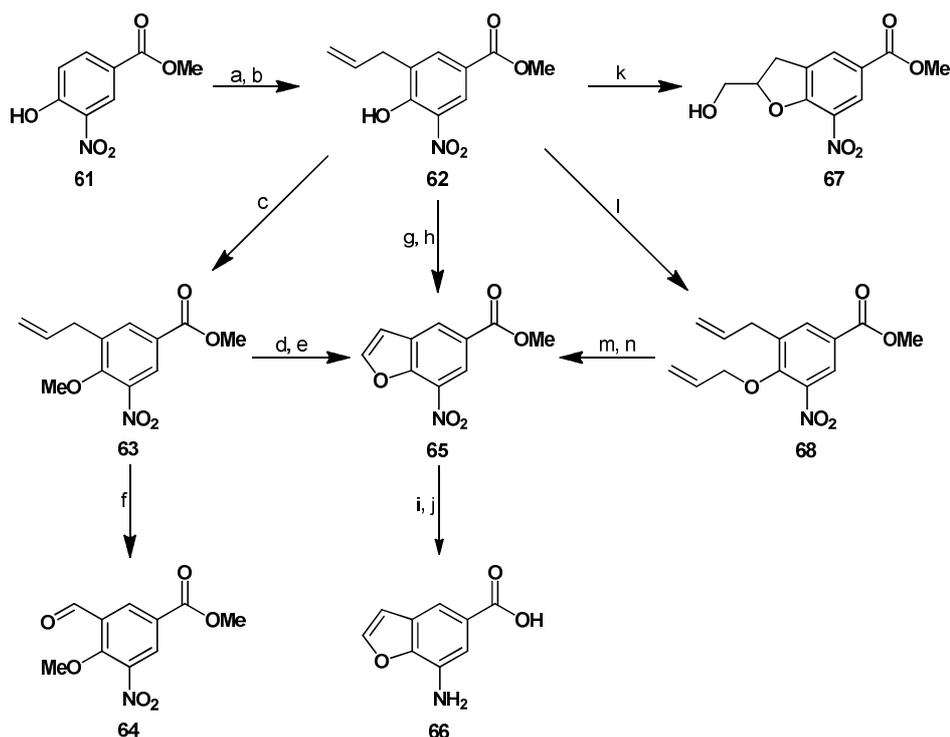
¹¹⁷ W. He, B.-L. Zhang, S.-Y. Zhou, X.-L. Sun, S.-Y. Zhang, *Synth. Comm.* **2007**, 37, 361-367.

¹¹⁸ K. Tamura, Y. Kato, A. Ishikawa, Y. Kato, M. Himori, M. Yoshida, Y. Takashima, T. Suzuki, Y. Kawabe, O. Cynshi, T. Kodama, E. Niki, M. Shimizu, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3083-3093.

Spaltung zum Aldehyd umgesetzt werden.¹¹⁸ Leider kam es während der Dihydroxylierung zur Isomerisierung der Doppelbindung, so dass nach der Periodatspaltung nur Aldehyd **64** isoliert wurde. Die Methylierung gelang in guter Ausbeute von 89 %. Leider gelang es anschließend nicht, die Methylgruppe von der Phenol-Funktion zu entfernen. Es wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zum einen wurde probiert, die Methylgruppe mit TMSI,¹¹⁸ und zum anderen mit BBr₃¹¹⁹ zu entfernen. Beide Versuche, das Phenol freizusetzen, scheiterten jedoch. So musste die Strategie erneut umgestellt werden. Jetzt sollte das Furan **65** über eine Metathese hergestellt werden. Hierfür wurde zuerst, ausgehend von 3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (**62**) der 3-Allyl-4-allyloxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (**68**) über eine S_N2-Reaktion mit Allylbromid hergestellt. Diese Reaktion verlief in sehr guten Ausbeuten.¹²⁰ Die beiden Allyl-Gruppen wurden anschließend mit dem auf Ruthenium basierenden Katalysator [RuClH(CO)(PPh₃)₃] isomerisiert und nach ¹H-NMR-Analytik direkt per Metathese zum Furan **65** eingesetzt. Die Isomerisierung verlief nach einigen Optimierungen in akzeptablen Ausbeuten von ca. 70%. So musste sowohl die Temperatur von 65°C auf 90°C, wie auch die Reaktionszeit von 14 h auf 24 h erhöht werden, da, ansonsten unter den Literaturbedingungen nur Ausbeuten von 40% erhalten wurden.¹²⁰ Die Metathese zum Furan **65** verlief mit GRUBBS II-Katalysator in weniger guten Ausbeuten von 35%. Mit dem GRUBBS-HOYVEDA-Katalysator konnte die Ausbeute auf 40% gesteigert werden. In der Literatur ist das vorliegende Substitutionsmuster am Aromaten nicht beschrieben, die meisten Beispiele weisen nur einen zusätzlichen Substituenten auf. Hier kann wahrscheinlich durch intensive Optimierung der Bedingungen (Katalysator, Lösungsmittel, Temperatur) die Ausbeute noch gesteigert werden. Der hergestellte 3-Allyl-4-allyloxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (**65**) konnte anschließend in guten Ausbeuten zum Amin reduziert und der Ester verseift werden und stand anschließend als Mutasython **65** zur Verfügung.

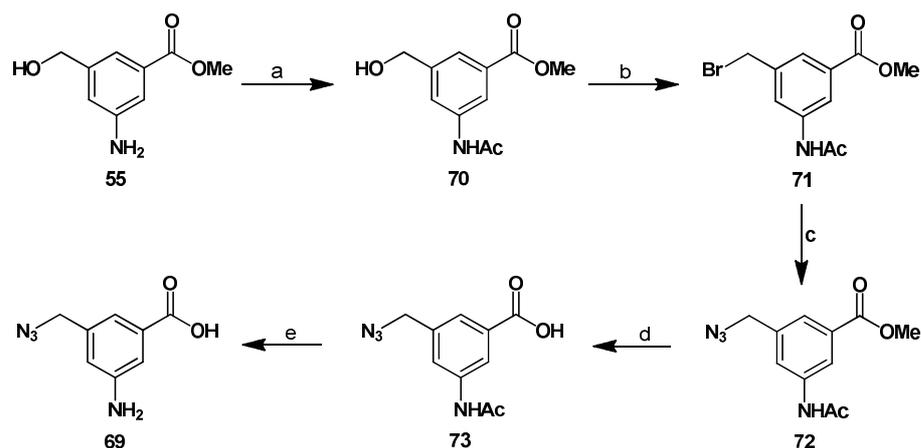
¹¹⁹ J. F. W. McOmie, M. L. Watts, D. E. West, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2289-2292.

¹²⁰ W. A. L. Otterlo, G. L. Morgans, L. G. Madley, S. Kuzvidza, S. S. Moleele, N. Thornton, C. B. de König, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7746-7755.



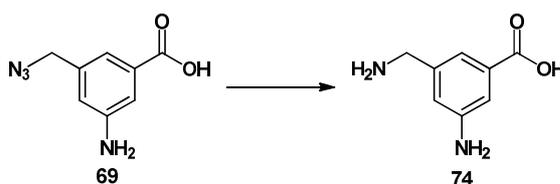
Schema 18: Synthese von 7-Aminobenzofuran-5-carbonsäure (**66**). Bedingungen: a) Aceton, K_2CO_3 , Allylbromid, 24 h, Δ , **81 %**; b) Toluol, SiC, 2 h, 200 °C, 250 Watt, MW, **63 %**; c) Aceton, K_2CO_3 , Me_2SO_4 , 6 h, **quant.**; d) CH_2Cl_2 , -78 °C, 20 min, O_3 , Dimethylsulfid, **72 %**; e) CH_2Cl_2 , 0 °C, TMSI, 3 h, RT, **0 %** oder CH_2Cl_2 , -78 °C, BBr_3 , RT, 24 h, **0 %**; f) THF/ H_2O , $NaIO_4$, OsO_4 , 48 h, RT, **89 %**; g) CH_3OH , -78 °C, 40 min, O_3 , Dimethylsulfid; h) H_3PO_4 , 20 min, 100 °C, **15 %** über zwei Stufen; i) CH_3OH , LiOH, 4 h, RT, **quant.**; j) EE, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 h, Δ , **quant.**; k) THF/ H_2O , OsO_4 , $NaIO_4$, **97 %**; l) Aceton, K_2CO_3 , Allylbromid, 24 h, Δ , **quant.**; m) Toluol, $[RuClH(CO(PPh_3)_3)]$, 72 h, 90 °C, **70 %**; n) Toluol, GRUBBS-HOVEYDA, 5.5 h, 90 °C, **40 %**.

Die Synthese von 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure (**69**) startete mit 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester (**55**), wobei zuerst das Amin als Acetat geschützt wurde. Dann folgte eine S_N2 -Reaktion zum Benzylbromid **71** oder Benzylchlorid, wobei die Umsetzung zum Bromid **71** in besseren Ausbeuten verlief. Außerdem verlief die anschließende Reaktion zum Benzylazid **72** mit dem Bromid **71** in sehr guten Ausbeuten von 93 %. Der entstandene 3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester (**72**) wurde nachfolgend mit LiOH verseift und das Amin entschützt, beides in guten bis sehr guten Ausbeuten (Schema 19).



Schema 19: Synthese von 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure (**69**). Bedingungen: a) Acetanhydrid, Triethylamin, THF, 4 h, RT, **74** %; b) Triphenylphosphan, Imidazol, DCM, Br₂, 4 h, 0 °C → RT, **79** %; c) Natriumazid, 12 h, 80 °C, **93** %; d) MeOH, 1M LiOH, 4 h, 60 °C, **98** %; e) H₂O, konz. HCl, 12 h, Δ, **66** %.

Ausgehend von der als Mutasynton zur Verfügung stehenden 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure (**69**) konnte die 3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure (**74**) hergestellt werden (siehe Schema 20). Hierfür wurde das Benzylazid **69** mit Palladium auf Kohle unter Wasserstoffatmosphäre für 72 h gerührt. Um die Vergiftung des Katalysators durch das Amin zu vermeiden, wurde Essigsäure zugesetzt. Das Benzylamin **74** konnte in guten Ausbeuten von 78 % erhalten werden.

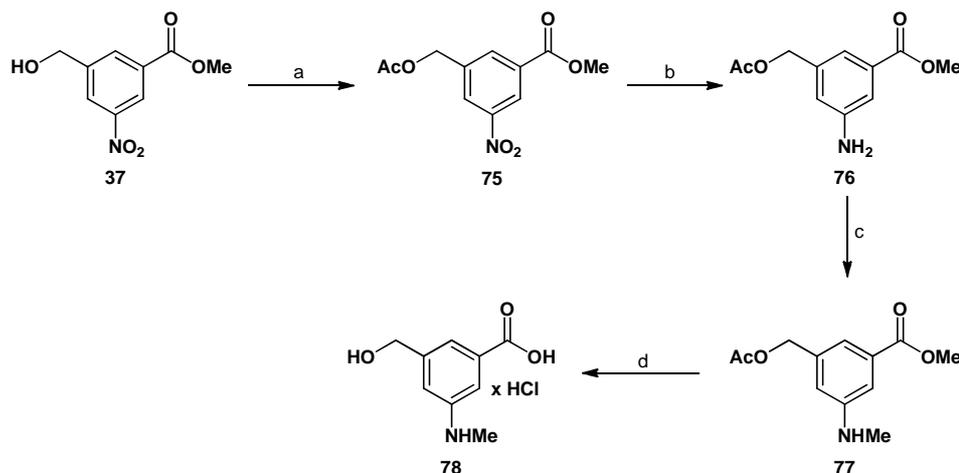


Schema 20: Synthese von 3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure (**74**). Bedingungen: CH₃OH, Essigsäure, Pd/C, H₂, 72 h, RT, **78** %.

Das HCl-Salz der 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure (**75**) wurde ausgehend von 3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester (**37**) über eine reduktive Aminierung mit Formalin und NaBH₃CN als Schlüsselschritt hergestellt (siehe Schema 21). Hierfür wurde der Benzylalkohol **37** in einer Mikrowellen-beschleunigten Reaktion zuerst in quantitativen Ausbeuten acyliert.¹²¹ Anschließend folgte die Reduktion der Nitro-Gruppe mit SnCl₂ zum Amin **76**. Die dann folgende N-Methylierung mit Formalin und NaBH₃CN lieferte nur einen

¹²¹ F. Rajabi, M. R. Saidi, *Synth. Commun.* **2005**, 35, 483-491.

geringen Umsatz des N-methylierten Produkts **77**, wobei neben dem reisolierten Edukt **76** auch noch das Imin erhalten wurde. Die Ausbeuten waren hier ähnlich denen in der Literatur für analoge Beispiele.¹²² Nachdem das *N*-methylierte Produkt **77** hergestellt war, musste der Benzylalkohol entschützt und der Ester verseift werden, was in einer Stufe mit LiOH realisiert werden konnte. Die entstandene Aminosäure wurde anschließend aus halbkonz. HCl umkristallisiert um das entsprechende Hydrochlorid **78** zu erhalten.



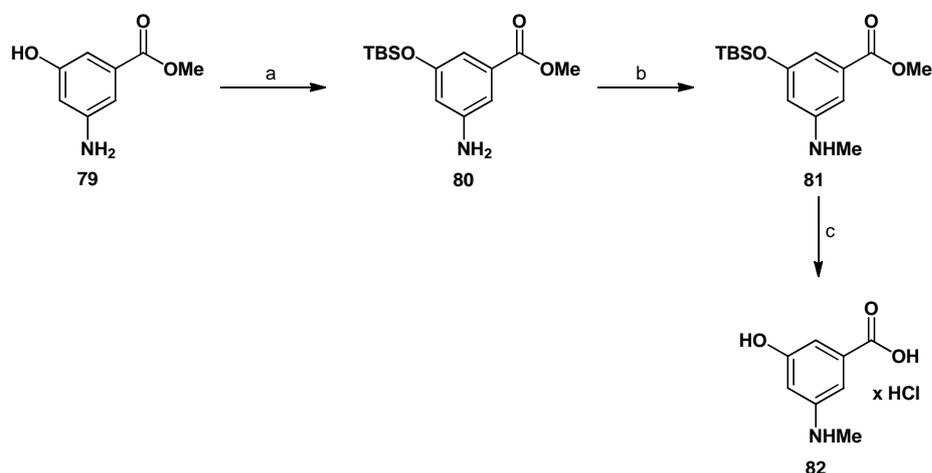
Schema 21: Synthese von 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure Hydrochlorid (**78**). Bedingungen: a) NaOH, Acetanhydrid, 4 min, 120 °C, MW, **quant.**; b) EE, SnCl₂·2H₂O, 3 h, Δ, **99 %**; c) CH₃OH, Formalin, NaBH₃CN, 3.5 h, 0 °C → RT, **35 %**; d) CH₃OH, 1M LiOH, 4 h, RT, dann halbkonz. HCl, **87 %**.

Die Synthese zum Salz der 3-Hydroxy-5-methylaminobenzoessäure (**82**) beinhaltet als Schlüsselschritt ebenfalls eine N-Methylierung (siehe Schema 22). Diese wurde jedoch im Falle dieses Amins mit einer neuen Methode nach GONZÁLEZ *et al.* realisiert.¹²³ Hierfür wurde zuerst aus 3-Amino-5-hydroxy-benzoessäuremethylester (**79**) der 3-Amino-5-(*tert*-butyl-dimethylsilyloxy)-benzoessäuremethylester (**80**) durch TBS-Schätzung hergestellt, welcher anschließend in einer Monomethylierung mit Cu(OAc)₂ und MeB(OH)₂ eingesetzt wurde. Diese Kupfer-(II)-vermittelte Kupplung von Anilinen und Methylboronsäure stellt einen neuen Ansatz für die selektive Monomethylierung dar. Diese Umsetzung lieferte bessere Ausbeuten als die reduktive Aminierung von Formalin. Daneben bildete sich kein

¹²² T. Watanabe, T. Suzuki, Y. Umezawa, T. Takeuchi, M. Otsuka, K. Umezawa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 741-752.

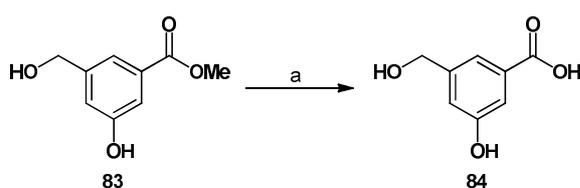
¹²³ I. González, J. Mosquera, C. Guerrero, R. Rodriguez, J. Cruces, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1677-1680.

Imin, was die säulenchromatographische Reinigung vereinfachte. Das *N*-Methyl-Derivat **81** wurde anschließend mit LiOH verseift und gleichzeitig die TBS-Gruppe entfernt. Die so erzeugte *N*-Methyl-aminobenzoessäure **82** wurde abschließend aus halbkonz. HCl umkristallisiert.



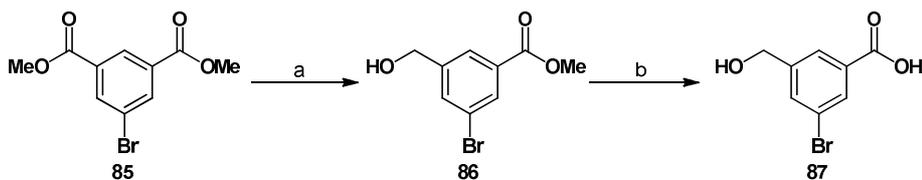
Schema 22: Synthese von 3-Hydroxy-5-methylaminobenzoessäure Hydrochlorid (**82**). Bedingungen: a) CH_2Cl_2 , Imidazol, DMAP, TBS-Cl, 24 h, RT, **92 %**; b) Dioxan, Pyridin, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, 30 min, RT, dann $\text{MeB}(\text{OH})_2$, 24 h, Δ , **66 %**; c) CH_3OH , LiOH, 3 h, RT, dann halbkonz. HCl, **91 %**.

3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoessäure (**84**) konnte ausgehend von 3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoessäuremethylester (**83**) durch Verseifung mit LiOH in quantitativer Ausbeute hergestellt werden (siehe Schema 23).



Schema 23: Synthese von 3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoessäure (**84**). Bedingungen: a) CH_3OH , LiOH, 2 h, RT, **quant.**

Für die Synthese von 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoessäure (**87**) wurde von 5-Bromisophthalsäuredimethylester (**85**) ausgegangen, welcher zuerst mit NaBH_4 selektiv mono-reduziert und der entstandene Monoester **86** verseift wurde. Beide Stufen konnten in guten Ausbeuten realisiert werden (siehe Schema 24).



Schema 24: Synthese von 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure (**87**). Bedingungen: a) THF, CH₃OH, NaBH₄, 1,5 h, 70 °C, **86** %; b) CH₃OH, LiOH, 2 h, RT, **97** %.

4.2 Untersuchungen zu den Fermentationsbedingungen der AHBA(-)-Mutante von *Streptomyces hygroscopicus*

Zu Beginn der mutasynthetischen Arbeiten mit der in der Biosynthese blockierten AHBA(-)-Mutante *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1, sollte sichergestellt werden, dass diese in ihrer Produktion und ihrem Wachstum stabil ist. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden verschiedene Fermentationsmedien getestet, zum anderen die Kolbengröße sowie die Medienmenge variiert. Zum Vergleich der einzelnen Testfermentationen wurde beginnend dieser Arbeiten über eine Verdünnungsreihe eine Geldanamycin-Kalibriergerade für die UV-Detektion der HPLC erstellt, um die Produktion der einzelnen Kulturen vergleichen zu können (siehe Diagramm 1). Dieses Vorgehen bietet sich an, da Geldanamycin bei 305 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist.

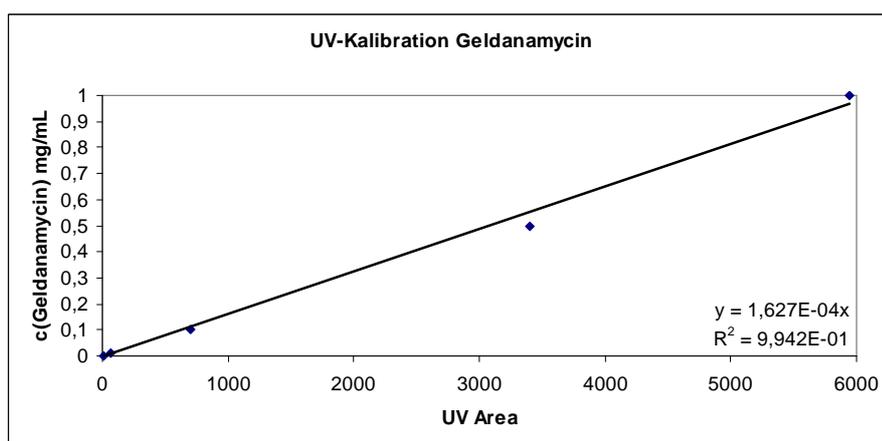


Diagramm 1: Geldanamycin-Kalibriergerade.

4.2.1 Untersuchungen zur Fermentation in verschiedenen Fermentationsmedien

Für diese Untersuchungen wurden zunächst mehrere für die Fermentation von Geldanamycin-produzierenden Streptomycceten bekannte Medien hergestellt und mit dem Bakterienstamm der Mutante K390-61-1 angeimpft. Es erfolgte die Zufütterung von AHBA und schließlich nach 6 Tagen die Kontrolle der Geldanamycin-Produktion. Jede Fermentation wurde zweimal durchgeführt. Verwendet wurden das aus der Literatur bekannte Geldanamycin-Produktionsmedium (GPM) (Glukose Monohydrat (40 g/L), Pepton (2.5 g/L), Trypton (2.5 g/L), Hefe Extrakt (2.5 g/L), Gerber's oatmeal (5g/L), Brer Rabbit molasses (10 mL/L)) von DEBOER *et al.*,⁹ das Geldanamycin-Produktionsmedium ohne den Zusatz von Melasse und den Ersatz von „GERBER's oatmeal“ gegen „Haferbrei von ALNATURA“ (GPMd), BENNETT's Medium (Glukose Monohydrat (50 g/L), Hefe Extakt (3 g/L), Rinder Extrakt (3 g/L), NZ-Amin-A (2 g/L)) mit dem Zusatz von Detergenz Tween 80 (10 mL/L), Bennett's Medium mit dem Zusatz von Detergenz Triton X100 (10 mL/L),¹²⁴ CMC-Medium (Glukose Monohydrat (15 g/L), CaCO₃ (2 g/L), NaCl (2.5 g/L), Hefe Extrakt (5 g/L), Sojabohnen-Pulver (5 g/L), Carboxymethylcellulose (10 g/L)),¹²⁵ FM1-Medium (Glukose Monohydrat (25 g/L), Sojabohnen-Pulver (20 g/L), NaCl (3 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), CaCO₃ (1 g/L)),¹²⁶ Korea-Medium (Dextrin (60 g/L), Cotton seed flow (5.25 g/L), D-Maltose-Monohydrat (30 g/L), Hefe-Extrakt (4.5 g/L), CaCO₃ (5 g/L), K₂HPO₄ (0.3 g/L), FeSO₄·7H₂O (2 mg/L))¹²⁷ und Bioreaktormedium (Glukose Monohydrat (5 g/L), Glycerol (25 g/L), Hefe-Extrakt (2 g/L), Pepton (4 g/L), CaCO₃ (30 mg/L)).¹²⁸ Die Ergebnisse sind in Diagramm 2 zusammengestellt.

¹²⁴ L. F. Dobson, C. C. O' Cleirigh, D. G. O' Shea, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 79, 859-866.

¹²⁵ S. B. Ilić, S. S. Konstantinović, V. B. Veljković, D. S. Savić, M. L. Lazić, G. Gojgić-Cvijović, *Curr. Microbiol.* **2008**, 57, 8-11.

¹²⁶ V. Gesheva, *Curr. Microbiol.* **2008**, 57, 133-138.

¹²⁷ S. Bandi, Y. J. Kim, S. O. SA, Y.-K. Chang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 15, 930-937.

¹²⁸ S. J. Yang, Y. J. Kim, Y.-S. Hong, Y. K. Chang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 18, 897-900.

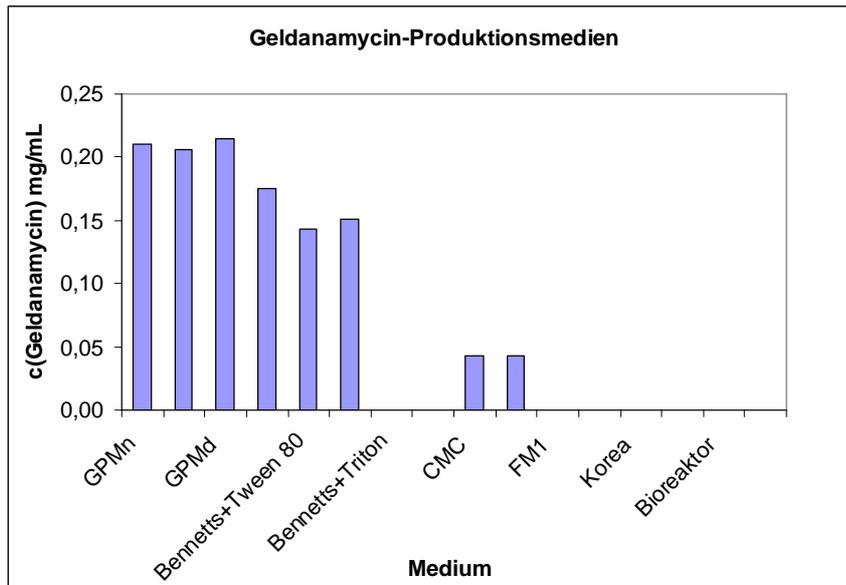


Diagramm 2: Vergleich der Produktion von Geldanamycin in verschiedenen Fermentationsmedien.

Es zeigte sich im Vergleich des „normalen“ Geldanamycin-Produktionsmediums (GPM) mit den Zusätzen aus den USA und dem „neuen“ Geldanamycin-Produktionsmedium (GPMd), dass für die Produktion von Geldanamycin **1** keine Melasse notwendig ist (Vergleich Eintrag 1-4 in Diagramm 2). Außerdem kann anstelle von „GERBER´s oatmeal“ auf „Haferflocken von ALNATURA“ zurückgegriffen werden. Die Ergebnisse dieser Produktionstests lagen alle in einem ähnlichen Bereich.

Die Produktion in BENNETT´s-Medium mit Tween 80-Zusatz lag ein wenig unter der in den GP-Medien und die im CMC-Medium lag sogar nur bei ca.20% in Bezug auf die GP-Medien. In allen anderen getesteten Medien wie BENNETT´s-Medium mit Triton X100, FM1-Medium, Korea-Medium und Bioreaktormedium zeigte die AHBA-(-)-Mutante keine Produktion von Geldanamycin.

Mit Hilfe dieser Test kann als bestes Fermentationsmedium (GPMd) identifiziert werden: Die Produktion ist in den bislang verwendeten GP-Medien am höchsten, der Verzicht auf Melasse, sowie der Ersatz von oatmeal gegen Haferflocken vereinfachen die Durchführung der Fermentation.

4.2.2 Untersuchungen zur Fermentation mit verschiedenen Medien-Zusätzen

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Medienzusätze bei Verwendung von GPMd getestet. Zum einen wurde der Zusatz von MgSO_4 erprobt, da das Vorhandensein von Mg^{2+} -Ionen im Fermentationsmedium die Produktion erhöhen soll.¹²⁹ Zum anderen wurde der Einfluss von Xanthan geprüft, um sicher zu stellen, dass die Produktion durch das hierdurch viskosere Medium und den hiermit eventuell erniedrigten Sauerstoffeintrag nicht zurückgeht. Beide Zusätze sollen bewirken, dass der Organismus in frei verteilten feinen Filamenten wächst und sich nicht zu Pellets zusammenballt.

Für diese Testreihe wurden verschiedene Medien angesetzt: GPMd mit Xanthan sowie das gleiche Medium ohne Xanthan. Es wurden 3 verschiedene Bedingungen getestet: GPMd ohne Zusätze, GPMd mit MgSO_4 und GPMd mit Xanthan. Die Kolbengröße bei diesen Testansätzen war 250 mL mit einem Medienvolumen von 40 mL. Es wurde zwei Mal zugefüttert. Die Ergebnisse sind in Diagramm 3 dargestellt.

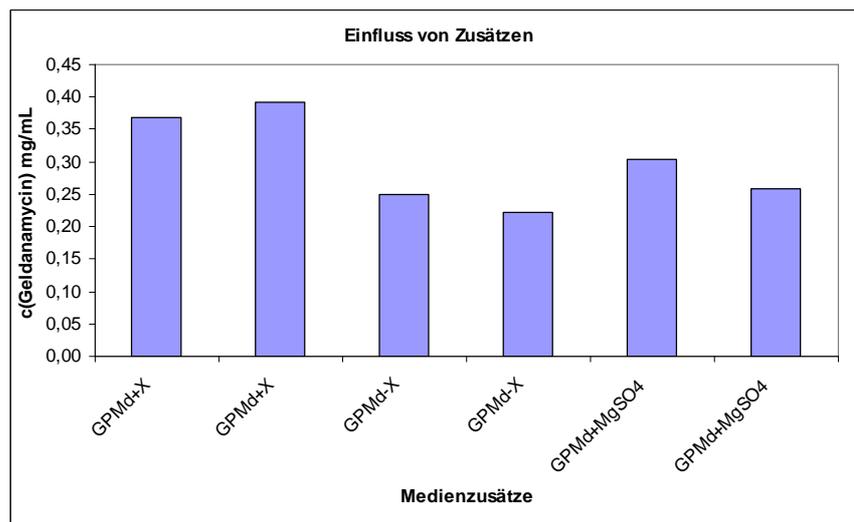


Diagramm 3: Vergleich der Produktion von Geldanamycin unter Verwendung von verschiedenen Fermentationszusätzen, X = Xanthan.

Es zeigt sich, dass sich der Zusatz von Xanthan erheblich positiv auf die Geldanamycin-Produktion auswirkt, wohingegen der Zusatz von MgSO_4 nur eine leichte Erhöhung der Produktion bewirkt.

¹²⁹ L. F. Dobson, D. G. O'Shea, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 119-126.

4.2.3 Untersuchungen zur Fermentation mit verschiedenen Ansatzgrößen

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Optimierung der Produktion von Geldanamycin **1** war die Ansatzgröße. Hierfür wurden zwei Testreihen durchgeführt. Verwendet wurden für die erste Testreihe 500 mL Schikanekolben, die mit 75 mL, 100 mL und 125 mL Medium gefüllt waren. Die Ergebnisse dieser Testreihe sind in Diagramm 4 zu sehen.

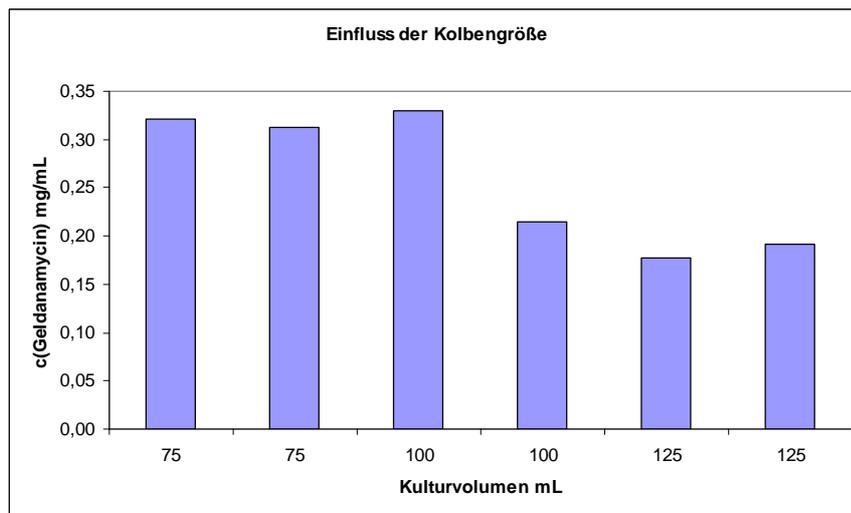


Diagramm 4: Vergleich der Produktion von Geldanamycin unter Verwendung verschieden großer Medientolumina.

Wie in Diagramm 4 zu sehen, sinkt die Produktion mit der Erhöhung des Volumens des Fermentationsmediums deutlich ab. Ein optimales Fermentationsvolumen ist der Meßserie nach 75-100 mL.

Diese Versuchsreihe wurde zur Kontrolle ein weiteres Mal durchgeführt. Auch hier zeigte sich die Tendenz zu geringeren Medientolumina, jedoch war auch deutlich zu erkennen, dass die Mutante K390-61-1 in ihrer Produktion instabil ist.

4.2.4 Anlegen von Kryo-Kulturen

Um eine stabilere und reproduzierbare Produktion von Geldanamycin **1** und den entsprechenden Derivaten zu erhalten, wurde ein *Screening* in 24-well-Platten durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst aus einer noch vorhandenen Vorkultur 4 Verdünnungsreihen angelegt (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000). Aus diesen Verdünnungsreihen wurde mit Hilfe eines Drigalski-Spatels jeweils 100 µL der entsprechenden Verdünnungsreihe auf R5-Agar mit Neomycin zur Selektion ausplattiert. Die Platten wurden 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden 24 Einzelkolonien ausgewählt und in 24-well-Platten überimpft. Die Platten wurden zwei Tage bei 28 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend wurden 24 Hauptkulturen in 24-well-Platten angeimpft. Diesen Hauptkulturen wurden nach 24 und 48 h im Inkubator bei 28 °C und 180 rpm AHBA **9** zugefüttert. Nach weiteren 24 h wurden Proben für den Produktionsnachweis genommen. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Produktion der ausgewählten Kolonien. Von besonders gut produzierenden Kolonien wurden anschließend Vorkulturen (40 mL GYP-Medium in 250 mL Fermentationskolben) inokuliert und diese zwei Tage im Schüttelschrank bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Diese Vorkulturen wurden anschließend zum Anlegen der Kryo-Kulturen verwendet (1:1 Mischung aus Vorkultur und Kryo-Medium).¹³⁰

4.3 Mutasynthesen mit PKS-adressierenden Mutasynthonen

Mit den in Kapitel 4.1 synthetisierten Mutasynthonen und weiteren in der Arbeitsgruppe Kirschning vorhandenen Aminobenzoesäuren, sowie käuflich erhältlichen Substraten, standen insgesamt 55 Benzoessäure-Derivate als Startbausteine für Verfütterungsexperimente mit der AHBA(-)-Mutante K390-61-1 zur Verfügung. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Testfermentationen und Scale-Up-Fermentationen mit der AHBA(-)-Mutante K390-61-1 beschrieben. Der Übersicht halber sind die aromatischen Startbausteine hierfür in Gruppen zusammengefasst.

4.3.1 Allgemeine Vorgehensweise bei den Verfütterungsexperimenten

¹³⁰ persönliche Korrespondenz H. P. Fiedler

In diesem Absatz wird die prinzipielle Vorgehensweise für erste Testfermentationen mit neuen Mutasyntonen, sowie für Fermentationen im großen Maßstab für die Isolierung neuer Naturstoffderivate erläutert.

Für ein erstes Verfütterungsexperiment mit einem neuen Mutasynton wird zunächst eine Vorkultur mit 40 mL GYP-Medium aus einer Kryo-Kultur bzw. von einer Kolonie auf Agar inokuliert. Diese wird für zwei Tagen im Schüttelkolben bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend werden aus der Vorkultur Hauptkulturen in GPMd-Medium angeimpft. Bei Testansätzen beträgt das Volumen des Hauptkulturmediums 30 mL. Nachdem die Hauptkulturen 24 Stunden unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert wurden, wird mit der Zufütterung begonnen. Hierfür werden 1.25 µmol des entsprechenden Startbausteins in 1 mL DMSO bzw. je nach Struktur der Benzoesäure auch in einem DMSO/H₂O-Gemisch (1:1) gelöst, steril filtriert und portionsweise in 24 h-Abständen über vier Tage supplementiert. Zusätzlich wird einer Kultur der natürliche Startbaustein AHBA **9** als Referenz für die Produktivität der Kulturen zugefüttert. Eine weitere Kultur ohne Zufütterung wird als Nullreferenz genutzt. Nach 24 Stunden werden aus der Fermentationsbrühe Proben für chromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen entnommen.

In Abbildung 13 sind die entsprechenden UPLC-MS-Diagramme anhand eines Beispiels gezeigt. In Diagramm a ist die BPI (base peak intensity (engl.)) niedrigste Höchstintensität (deutsch)¹³¹ der Nullreferenz gezeigt, in Diagramm b der BPI der Testfermentation von 3-Aminobenzoesäure (**88**), und in den Diagrammen c-d sind die jeweiligen EICs¹³² der möglichen gebildeten Derivate dargestellt.

¹³¹ Das niedrige Höchstintensität Chromatogramm ist dem TIC ähnlich, jedoch, das es ein kleines Fenster um nur die intensivste Spitze zu irgendeiner Zeit überwacht. Dies heißt, daß das BPI die Intensität der intensivsten Spitze an jedem Moment in der Analyse darstellt. BPIs haben häufig einen saubereren Blick als TICs, weil eine Menge kleineren Spitzen, die zusammen in einem TIC summieren, um einen großen Hintergrund zu produzieren, ignoriert werden.

¹³² extrahiertes Ionenchromatogramm.

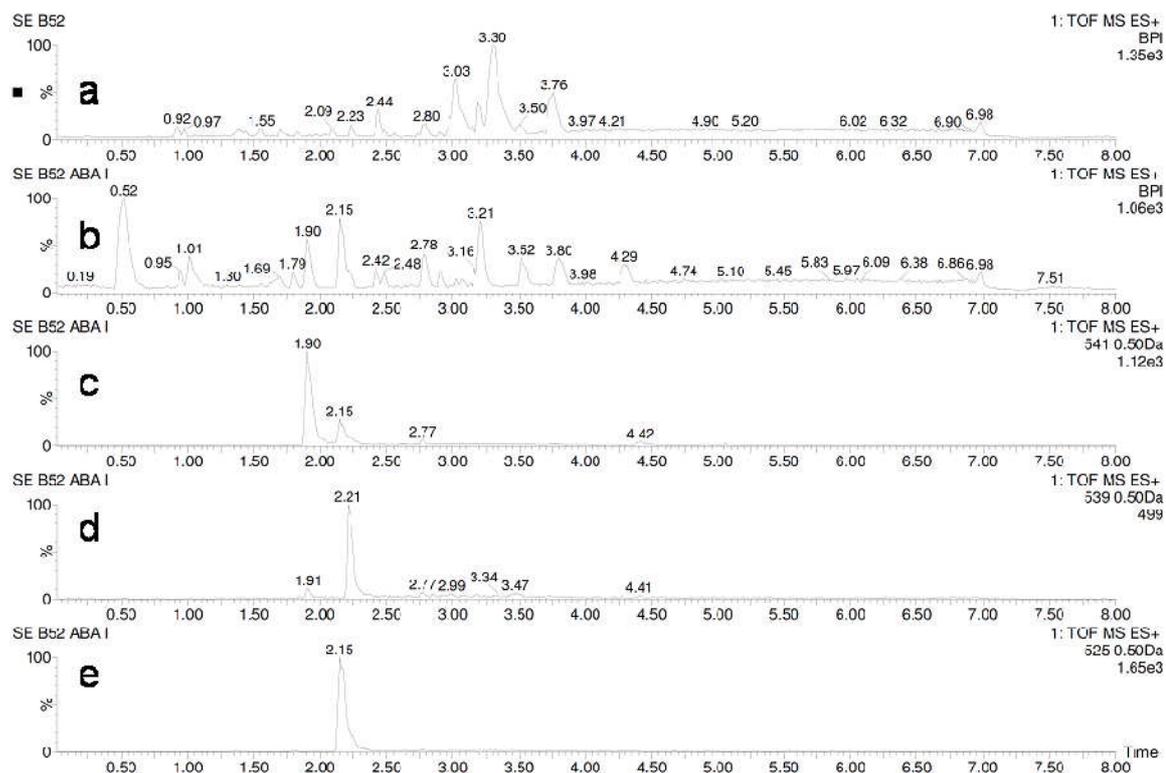


Abbildung 13: UPLC-Diagramme der Fermentation von 3-Aminobenzoesäure **88**.

Falls das UPLC-MS-Diagramm Hinweise auf die Produktion von Naturstoffderivaten gibt, wird im entsprechenden Massenspektrum nach den H^+ bzw. Na^+ -Addukten, doppelt ionisierten Addukten, sowie nach charakteristischen Fragmenten gesucht. In Abbildung 14 ist für das Beispiel der Verfütterung von 3-Aminobenzoesäure **88** ein Massenspektrum gezeigt.

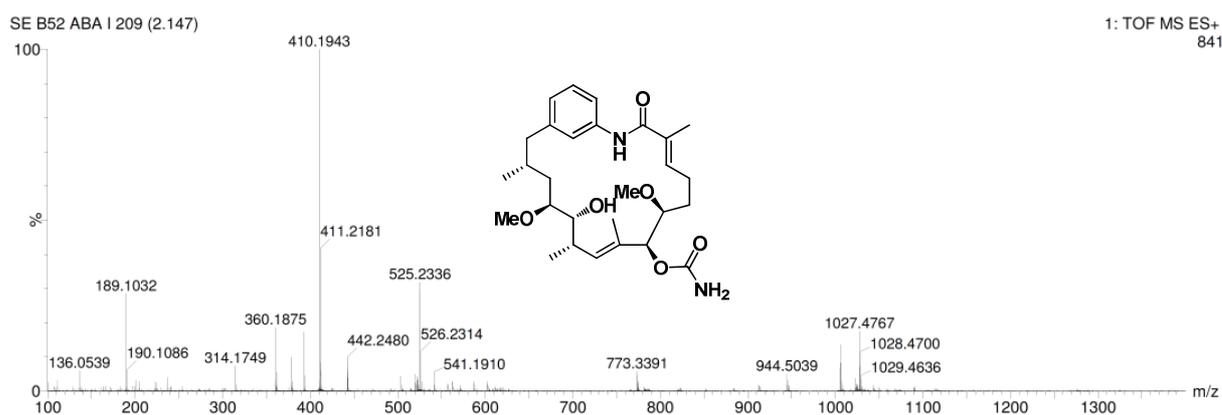


Abbildung 14: Massenspektrum zu einem Derivat der Testfermentation von 3-Aminobenzoesäure **88**. 1027 $[2M+Na]^+$, 1005 $[2M+H]^+$, 503: $[M+H]^+$; 525 $[M+Na]^+$, 442 $[M-C(O)NH_2-H_2O+H]^+$, 410 $[M-C(O)NH_2-H_2O-MeOH+H]^+$.

In dem Diagramm sind deutlich H^+ - und Na^+ -Addukte, sowie doppelt ionisierte Addukte zu sehen. Des Weiteren sind für Geldanamycin-Derivate charakteristische Fragmente zu sehen, wie zum Beispiel das Fragment mit der Masse von 410, welches die Molekülmasse vermindert um das Carbamat und vermindert um eine Methoxygruppe darstellt.

Um neue Geldanamycin-Derivate in ausreichenden Mengen für eine Strukturaufklärung durch NMR-spektroskopische Untersuchungen und für die Durchführung von biologischen Tests zu erhalten, werden die entsprechenden Fermentationen im großen Maßstab wiederholt. Hierfür werden wie zuvor für die Testansätze Vorkulturen angeimpft. Mit diesen Vorkulturen werden dann 48 h später 16 Hauptkulturen (500 mL Schikane-Kolben mit je 75 mL GPMd-Medium) angeimpft. Die Zufütterung zu den Hauptkulturen beginnt wie bei den Testansätzen 24 h später. Die entsprechenden Mutasyntone werden allerdings nicht alle 24 h sequentiell zugefüttert, sondern kontinuierlich über vier Tage mittels Spritzenpumpe (siehe Abbildung 15).



Abbildung 15: Automatische Zufütterung durch Spritzenpumpe.

Reicht ein insgesamt 1200 mL Fermentationsmedium umfassender Ansatz nicht aus um ausreichend Material für NMR-Analysen und biologische Tests zu erhalten, wird der Fermentationsansatz entsprechend oft wiederholt, bis ausreichend Material zu Verfügung steht. Bei Geldanamycin-Derivaten, die nur in sehr geringen Ausbeuten produziert wurden (< 0.1 mg/L), wurde auf eine wiederholte Fermentation und damit auf die Strukturaufklärung per NMR-Spektroskopie verzichtet, da der Aufwand nicht vertretbar gewesen wäre.

4.3.2 Mutasynthesen mit *meta*-Halogen-substituierten Aminobenzoesäuren und 3-Aminobenzoesäure

In diesem Abschnitt werden die Fermentationen der Aminobenzoesäure **88** und die der drei in *meta*-Position halogenierten Aminobenzoesäuren **89**, **41**, **90** (siehe Abbildung 16) vorgestellt.

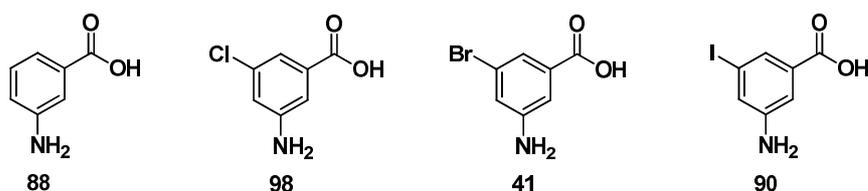


Abbildung 16: 3-Aminobenzoesäure und *meta*-halogenierte Aminobenzoesäuren .

Chloraminobenzoesäure **89** sowie Iodaminobenzoesäure **90** wurden von T. KNOBLOCH und Bromaminobenzoesäure **41** von K. HARMROLFS synthetisiert und zur Verfügung gestellt.^{133,134} 3-Aminobenzoesäure (**88**) ist käuflich erhältlich. Die vier aromatischen Aminosäuren wurden von der Mutante K390-61-1 angenommen, auf die PKS geladen und zu neuen Geldanamycin-Derivaten prozessiert. In UPLC-MS-Messungen zeigte sich, dass im Fall der 3-Aminobenzoesäure (**88**) und der Chloraminobenzoesäure **89** mehrere post-PKS-Enzyme Dekorationen am Gerüst des Progeldanamycin-Derivats vorgenommen haben, wohingegen es bei der Verfütterung der Bromaminobenzoesäure **41** nur zur Bildung von zwei Geldanamycin-Derivaten kam, nämlich zum an C-7 carbamoylierten Progeldanamycin-Derivats **97** und zum zusätzlich an C-17 oxidierten Derivat **98**. Im Fall der Verfütterung des iodierten Startbausteins **90** konnten nur geringe Mengen des carbamoylierten Progeldanamycin-Derivats **99** massenspektrometrisch detektiert werden. In dieser Testfermentation wurde außerdem ein C-7-carbamoyliertes *seco*-Progeldanamycinderivat gefunden, welches als freie Säure **101** vorlag. Dies deutet darauf hin, dass zum einen das Aufladen des Startbausteins auf die PKS mit dem sterisch anspruchsvollen Iod-Substituenten gehindert ist, da nur geringe Mengen an Produkten detektiert werden konnten. Zum anderen kann die Aussage getroffen werden, dass die Zyklisierung erschwert ist, da relativ viel nicht zyklisiertes Produkt gefunden wurde.

¹³³ T. Knobloch, Dissertation, *Studien zur Flexibilität der Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum*, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2010.

¹³⁴ K. Harmrolfs, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Synthesewege zu neuen Ansamitocin-derivaten*, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2010.

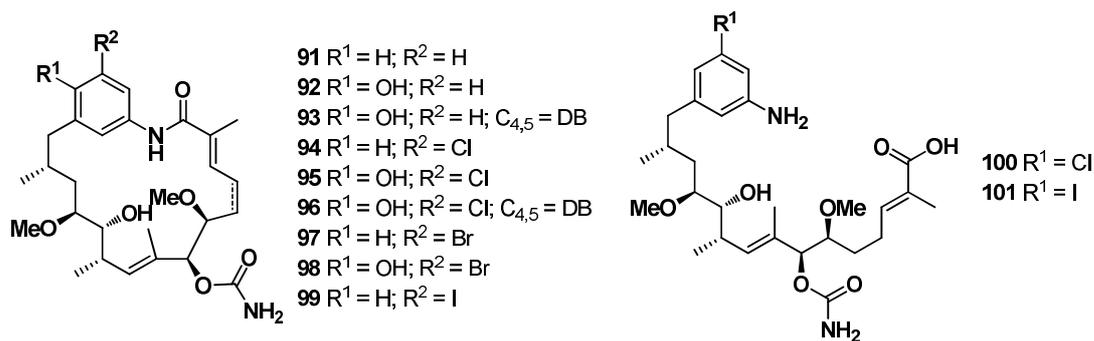


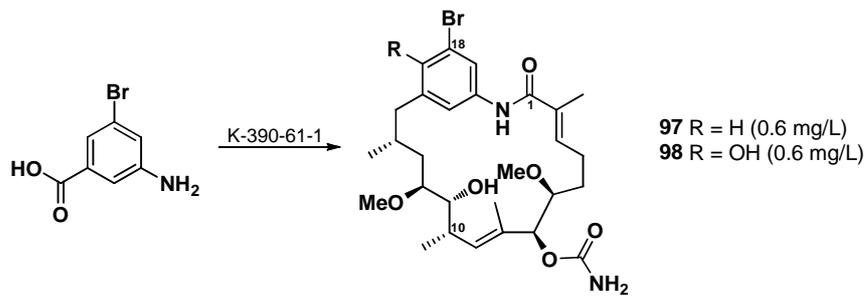
Abbildung 17: Produkte der Fermentationen von Aminbenzoesäure und *meta*-halogenierten Aminbenzoesäuren.

Die Fermentationen der 3-Aminbenzoesäure (**88**), der Chloraminbenzoesäure **89** und der Iodaminbenzoesäure **90** sollten nicht im größeren Maßstab wiederholt werden. Auf die Fermentation der Chloraminbenzoesäure wurde verzichtet, da diese schon von MENZELLA *et al.* fermentiert und die Produkte isoliert wurden, obwohl die Arbeitsgruppe teilweise andere Produkte isolierte als die hier massenspektrometrisch detektierten.¹³⁵ Die Fermentation der 3-Aminbenzoesäure (**88**) wurde von zwei Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt und die Produkte isoliert.^{3,136} In diesem Fall wurden die gleichen Produkte isoliert, die auch in dieser Arbeit massenspektrometrisch detektiert wurden. Die Fermentation der Iodaminbenzoesäure **90** verlief in so geringen Ausbeuten, dass eine Wiederholung im großen Maßstab nicht sinnvoll war.

Lediglich die Fermentation mit Bromaminbenzoesäure **41** wurde im großen Maßstab wiederholt. Da die Umsetzung nur mäßige Ausbeuten ergab, musste diese Fermentation wiederholt werden. Aus einem Gesamtfermentationsansatz von 1500 mL wurden hierbei 0.9 mg 17-Desmethoxy-18-bromreblastatin **98** und 0.9 mg 17-Des-*O*-methyl-18-bromreblastatin **99** isoliert (siehe Abbildung 17). Die Ausbeuten waren mit 0.6 mg/L sehr gering für Mutasynteseexperimente.

¹³⁵ H. G. Menzella, T.-T. Tran, J. R. Carney, J. Lau-Wee, J. Galazzo, C. D. Reeves, C. Carreras, S. Mukadam, S. Eng, Z. Zhong, P. B. M. W. M. Timmermans, S. Murli, G. W. Ashley, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1518–1521.

¹³⁶ W. Kim, J. S. Lee, D. Lee, X. F. Cai, J. C. Shin, K. Lee, C.-H. Lee, S. Ryu, S.-G. Paik, J. J. Lee, Y.-S. Hong, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1491-1494.



Schema 25: Fermentation von 3-Amino-5-brombenzoesäure **41**.¹³⁷

4.3.3 Mutasyntesen mit *meta*-Alkoxy-substituierten Aminobenzoensäuren

Eine andere Klasse von Startbausteine ist in Abbildung 18 gezeigt, hierbei handelt sich um Ether der AHBA, die von M. BRÜNJES synthetisiert wurden und in der Gruppe zur Verfügung standen.¹³⁸

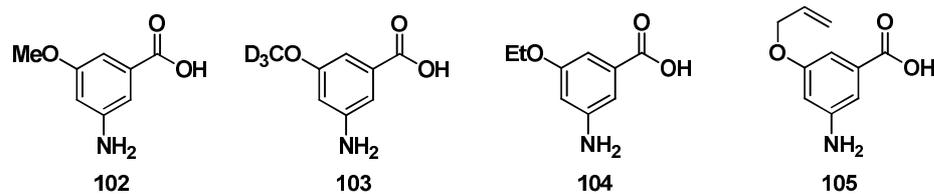


Abbildung 18: *meta*-Alkoxy-substituierte Aminobenzoensäuren **102-105**.

Die vier aromatischen Aminosäuren **102-105** wurden von der Mutante K390-61-1 angenommen, auf die PKS geladen und zu Geldanamycin-Derivaten zyklisiert. In allen Fällen wurden die an C-7 carbamoylierten Derivate gefunden. Die Experimente mit 3-Amino-5-methoxybenzoesäure **102** lieferten zusätzlich ein Derivat, welches neben dem Carbamat an C-7 noch eine Hydroxygruppe an C-17 und eine Doppelbindung an C4-C5 aufweist. Die Fermentation dieses Bausteins mit der Isolierung von 17-Desmethoxy-18-methoxyreblastatin **106** ist bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben worden.⁴ Das zweite Fermentationsprodukt konnte nur in Spuren erhalten werden, so dass die Fermentation wiederholt wurde.

¹³⁷ S. Eichner, H. G. Floss, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1801-1805.

¹³⁸ M. Brünjes, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese und Biosynthese von Maytansinoid-Analoga*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

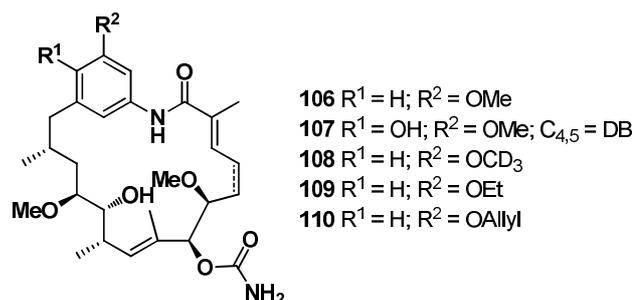


Abbildung 19: Produkte der Fermentationen mit *meta*-Alkoxy-substituierte Aminobenzoesäuren.

Die Wiederholung der Fermentation von 3-Amino-5-methoxybenzoesäure **102** wurde in einem Maßstab von insgesamt 980 mL Fermentationsmedium durchgeführt, um auch das zweite Fermentationsprodukt in ausreichenden Mengen zu isolieren. Die beiden Geldanamycin-Derivate konnten in moderaten bis guten Ausbeuten isoliert werden. So wurde in einer Ausbeute von 7.1 mg/L das bereits bekannte 17-Desmethoxy-18-*O*-methylreblastatin **106** und mit einer Ausbeute von 2.6 mg/L das 4,5-Dehydro-17-des-*O*-methyl-18-*O*-methylreblastatin **107** erhalten (Abbildung 19).

4.3.4 Mutasyntesen mit weiteren *meta*-substituierten Aminobenzoesäuren

Weitere ebenfalls in *meta*-Position substituierte Startereinheiten sind in Abbildung 20 zusammengestellt. Die Verbindungen **111-114** wurden von T. KNOBLOCH synthetisiert und bereitgestellt.¹³³ Die Verbindungen **115-116** wurden von O. MANCUSO im Rahmen ihrer Diplomarbeit synthetisiert und bereitgestellt,¹³⁹ auch wie Verbindung **119** von B. THOMASZEWSKI im Rahmen ihrer Diplomarbeit synthetisiert wurde.¹⁴⁰ Verbindung **118** stellte K. HARMROLFS bereit¹³⁴ und Verbindung **117** war käuflich erhältlich.

¹³⁹ O. Mancuso, Diplomarbeit, *Mutasyntese von Tumor-adressierenden Ansamitocinen*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2010**.

¹⁴⁰ B. Thomaszewski, Diplomarbeit, *Neue Ansamitocin-Derivate durch Mutasyntese*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2010**.

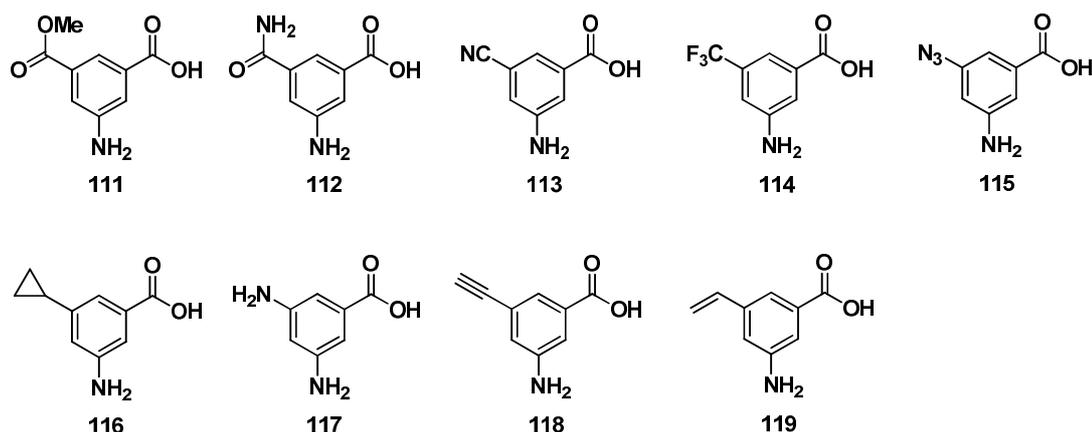


Abbildung 20: *meta*-substituierte Aminobenzoensäuren **111-119**.

Von diesen neun in *meta*-Position derivatisierten AHBA-Analoga wurden im Rahmen der mutasynthetischen Experimente sieben zu Geldanamycin-Derivaten umgesetzt. Lediglich Amid **112** und das Trifluormethylderivat **114** wurden nicht prozessiert. Ein offensichtlicher Grund für das nicht erfolgte Aufladen des Amids **112** ist nicht ersichtlich, da der strukturell ähnliche Methylester **111** aufgeladen und prozessiert wurde. Allerdings konnte das zyklisierte carbamoylierte Produkt **123** in dieser Fermentation auch nur in geringen Mengen massenspektrometrisch nachgewiesen werden, was auf Probleme der Aufladung auf die PKS schließen lässt. Für den CF₃-substituierten Aromaten **114** kann vermutet werden, dass sich sein sehr elektronenarmer aromatischer Ring evtl. ungünstig auf die Aufladung auf die PKS auswirkt, oder dass die Substanz toxisch auf den Organismus wirkt.

Die anderen sieben in Abbildung 20 gezeigten AHBA-Derivate wurden auf die PKS aufgeladen und zu sieben neuen Naturstoffderivaten umgesetzt. In allen Verfütterungsexperimenten wurden zyklisierte Produkte mit einer Carbamoyl-Gruppe an C-7 detektiert. Im Fall von Alkin **118** und Diamin **117** wurden zudem wieder Derivate detektiert, die zusätzlich zu der Carbamoylgruppe eine Hydroxygruppe an C-17 aufweisen (siehe Abbildung 21). Außerdem wurden in einigen Fällen offenkettige *seco*-Derivate gefunden, wobei die offenkettigen Amide Detoxifizierungsprodukte darstellen, wie sie schon in Arbeiten von F. TAFT, K. HARMROLFS und T. KNOBLOCH für die AHBA(-)-Mutante von *A. pretiosum* HGF073 beschrieben wurden.^{141,133,134} Mit dem Diamin **117** wurden weitere Transformationen durchgeführt; deshalb wird es gesondert abgebildet und beschrieben.

¹⁴¹ F. Taft, Dissertation, *Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum; Synthese Tumorgerichteter Ansamitocin-Derivate*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2009**.

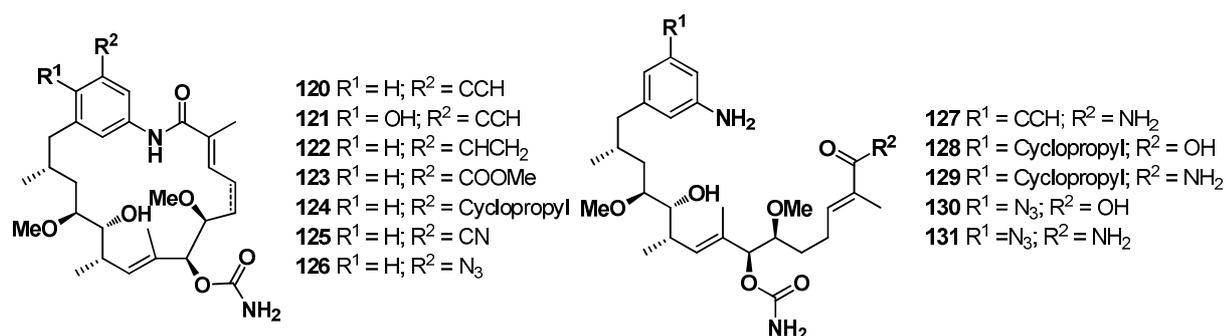


Abbildung 21: Produkte der Fermentationen mit *meta*-substituierten Aminobenzoesäuren.

Das Diamin **117** wurde wie die zuvor beschriebene Aminobenzoesäure **88** von HONG *et al.* fermentiert und die entsprechenden Produkte isoliert.¹³⁶ Die drei dort beschriebenen Produkte wurden auch in der vorliegenden Arbeit massenspektroskopisch nachgewiesen, jedoch wurden außerdem verschiedene zyklisierte und ein offenkettiges Fermentationsprodukt gefunden (siehe Abbildung 22). Es wurden zwei zyklische Detoxifizierungsprodukte detektiert, wobei das eine eine Carbamoylfunktion an C-7, OH an C-17 und Acetylgruppe an NH₂ trägt und ein Derivat das darüber hinaus die Doppelbindung an C4-C5 enthält. Zusätzlich zu diesen Amino-Derivaten wurden Geldanamycin **1** und Dihydrogeldanamycin **14** in der Fermentationsbrühe detektiert, was auf eine Umwandlung des Anilins zum Phenol hindeutet.

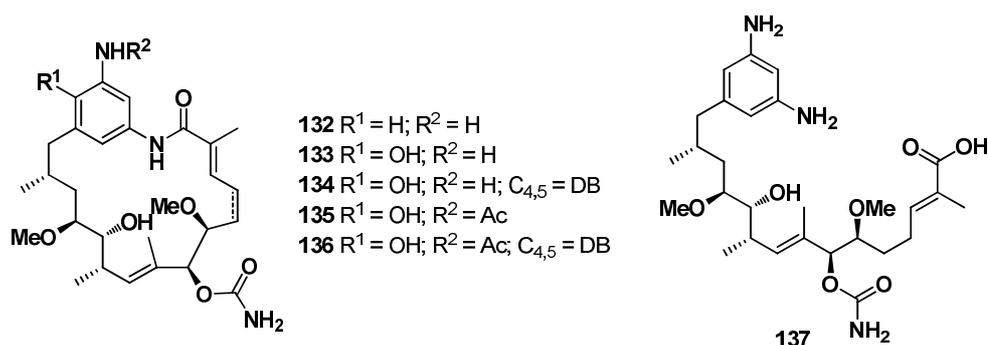
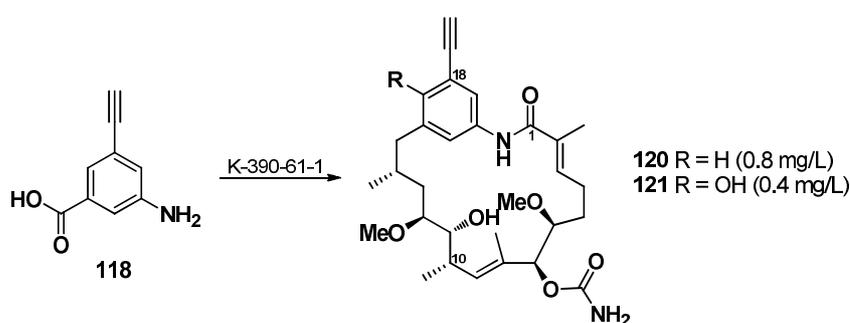


Abbildung 22: Produkte der Fermentationen mit Diaminobenzoesäure **88**.

Auch die Acylierung des Amins, ist das Ergebnis eines weiter oben bereits erwähnten Detoxifizierungsprozesses.^{141,133,134} Es scheint jedoch auch so, dass die Carbamoylierung des Amins die Folge eines solchen Prozesses ist oder es handelt sich bei der Carbamoyltransferase um ein sehr wenig selektives Enzym.

Da die Testfermentation mit Ethinylaminobenzoesäure **118** Hinweise auf eine gute Ausbeute gaben, wurde entschieden diese, im großen Maßstab zu fermentieren, um die isolierten Geldanamycinderivate anschließend semisynthetisch durch HUISGEN-Cycloaddition weiter zu derivatisieren. Durch diese weitere Derivatisierung können neue Strukturen für SAR-Studien erzeugt werden. Da nach der ersten Fermentation von 1200 mL nicht ausreichend Material für entsprechende NMR-Analytik, biologische Tests und die weitere Umsetzung zur Verfügung stand, wurde die Fermentation im 600 mL-Maßstab wiederholt. Aus insgesamt 1800 mL Fermentationsmedium konnten 1.5 mg 17-Desmethoxy-18-ethinylreblastatin **120** (0.8 mg/L) und 0.7 mg 17-Desmethyl-18-ethinylreblastatin **121** (0.4 mg/L) isoliert werden (siehe Schema 26), was eine eher geringen Fermentationsausbeute von ca. 0.6 mg/L entspricht. Um ausreichend Material für semisynthetische Derivatisierung zu isolieren hätten somit mindestens 10 L fermentiert werden müssen, was als nicht praktikabel eingestuft wurde.



Schema 26: Fermentation mit 3-Amino-5-ethinylbenzoesäure **118**.

Weitere Fermentationen von hier vorgestellten Aminobenzoesäuren im großen Maßstab wurden nicht durchgeführt, jedoch stellen auch die Vinyl-Aminobenzoesäure **119**, das Cyclopropylderivat **116** sowie das Azid **115** interessante und teilweise semisynthetisch nutzbare Substrate dar.

4.3.5 Mutasyntesen mit mehrfach-substituierten Aminobenzoesäuren

Von den 55 in Mutasynteseexperimenten eingesetzten Mutasyntesen waren sechs 4,5-disubstituierte Aminobenzoesäure-Derivate mit verschiedenen Substituenten an Position 4 und Position 5 (siehe Abbildung 23).

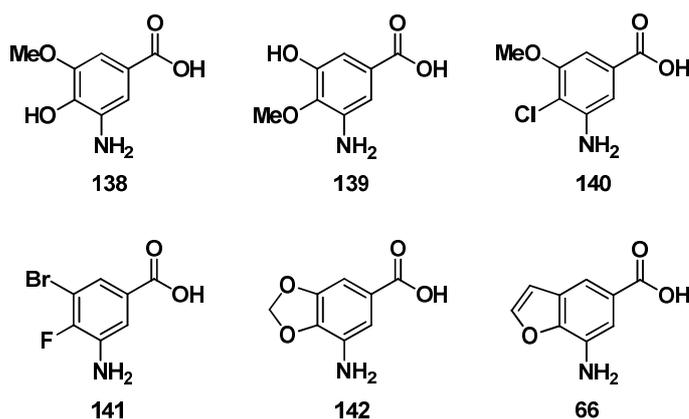


Abbildung 23: Mehrfach substituierte Aminobenzoensäuren **138-142** und **66**.

Von diesen AHBA-Derivaten werden alle bis auf die Chloraminobenzoensäure **140** auf die PKS des Organismus geladen und zu Geldanamycin-Derivaten umgesetzt. In vier Fällen wurden zyklisierte Verbindungen mit der Carbamoyl-Gruppe an C-7 massenspektrometrisch detektiert. Die Verfütterung von 3-Amino-4-hydroxy-5-methoxybenzoensäure **158** resultierte in einem zusätzlichen Derivat, das neben der Carbamoyl-Gruppe an C-7 an C-17 oxidiert war, wohingegen in der Fermentation des Ether-Derivats **142** nur ein offenkettiges *seco*-Progeldanamycin-Derivat **148** detektiert wurde, welches zum Amid detoxifiziert wurde. Ein solches offenkettiges *seco*-Progeldanamycin-Derivat wurde zusätzlich auch in der Fermentation des Benzofurans **66** detektiert. (siehe Abbildung 24).

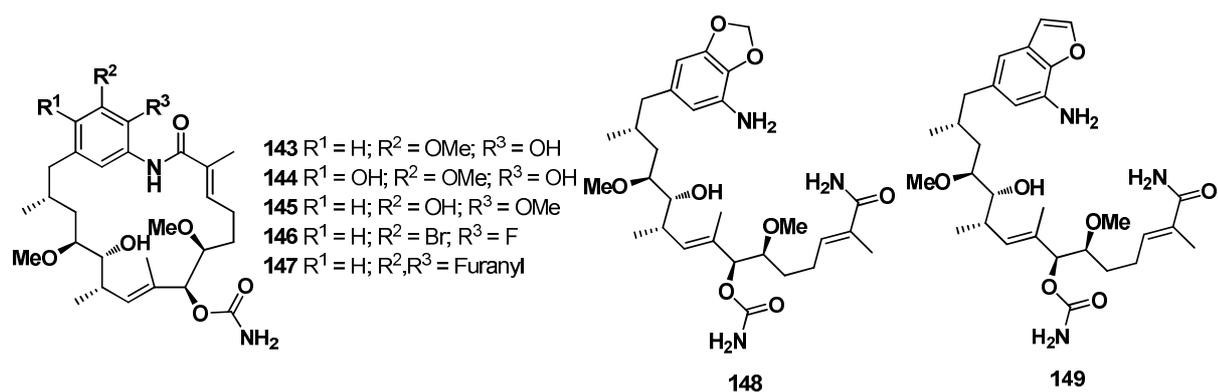


Abbildung 24: Produkte der Fermentationen mit mehrfach-substituierte Aminobenzoensäuren.

Die Zyklisierung zum Progeldanamycin-Derivat scheint hier abhängig von der Größe der Substituenten zu sein, da in der Verfütterung von 3-Amino-4-methoxy-5-hydroxybenzoensäure **139** das zyklisierte Produkt nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen

wurde. Die 4-Chlor-5-methoxy-3-aminobenzoessäure **140** wurde nicht zum Produkt umgesetzt, was wahrscheinlich an Schwierigkeiten bei der Aufladung des Startbausteins auf die PKS lag. Die Mutasyntese zum Furanderivat **147** ist hier gesondert zu erwähnen. Dies ist nach unserem Wissen das erste bicyclisch-aromatische Geldanamycin-Derivat, das jemals beschrieben wurde. Eine Wiederholung der Fermentation dieses Mutasyntons für eine Strukturaufklärung per NMR konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

Ein anderes interessantes Derivat, das so in der Natur nicht vorkommt, ist das Geldanamycin-Derivat **146** der Verfütterung von 3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoessäure **141**. Dieses wurde im Rahmen der Doktorarbeit von A. HEUTLING mutasyntetisch in einem großen Fermentationsansatz zum entsprechenden Geldanamycin-Derivat **146** umgesetzt.¹⁴²

4.3.6 Mutasyntesen von 4-substituierten Aminobenzoessäuren

Die fünf in Abbildung 25 gezeigten Aminobenzoessäuren **150-154** wurden alle zu Geldanamycin-Derivaten umgesetzt, wobei die Zyklisierung mit zunehmender Größe der Substituenten schwieriger zu werden scheint.

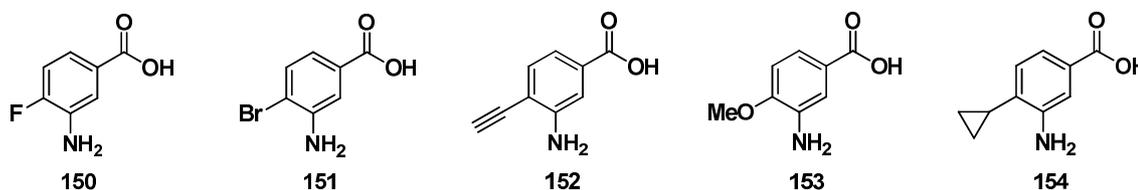


Abbildung 25: 4-substituierte Aminobenzoessäuren **150-154**.

Nach der Verfütterung von Fluoraminobenzoessäure **150** wurden zwei Produkte gefunden, zum einen das an C-7 carbamoylierte Geldanamycinderivat **155** und zum anderen das an C-7-carbamoylierte und an C-17 oxidierte Derivat **156**. Wie bereits aus vorherigen Arbeiten⁴ und aus der Literatur¹³⁶ bekannt, wurde die an dieser Position chlorierte Aminobenzoessäure nur zu einem offenkettigen *seco*-Progeldanamycin-Derivat umgesetzt. Ein ähnliches Ergebnis lieferten auch Supplementierungsexperimente mit der Bromaminobenzoessäure **151**, wobei in der Fermentationsbrühe das *seco*-Amid **159** entdeckt wurde, welches jedoch nur in Spuren

¹⁴² Anja Heutling, *unveröffentlichte Ergebnisse*, 2009.

nach mehreren durchgeführten Fermentationen massenspektrometrisch detektiert werden konnte. Bei der Fermentation mit Alkin **152** und Methylether **153** konnten die zyklisierten Geldanamycin-Derivate **157** und **158** nur in Spuren nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in der Fermentation des Alkins **152** jedoch das offenkettige *seco*-Progeldanamycin-Derivat in Form der Säure **160** wie auch in Form des Amids **161** gefunden, das, wie erwähnt, ein Detoxifizierungsprodukt darstellt. Im Fall der Cyclopropyl-Aminobenzoesäure **154** konnte nur das offenkettige *seco*-Amid **162** detektiert werden (siehe Abbildung 26).

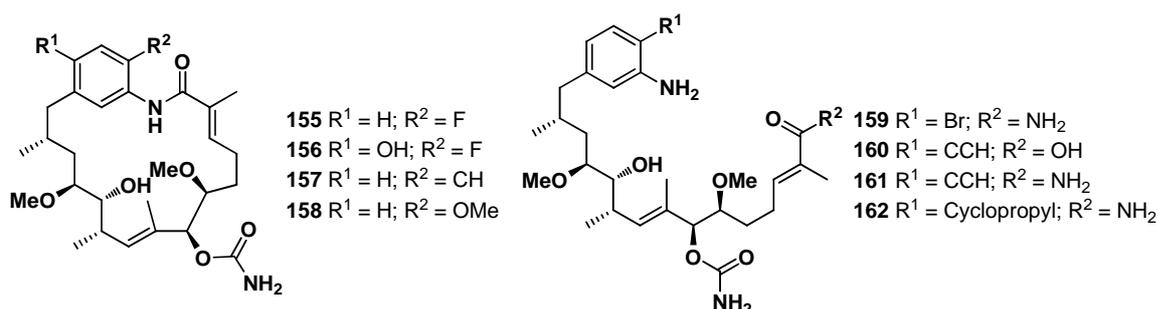
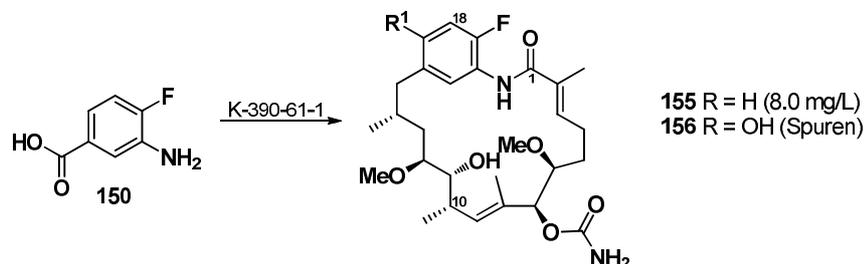


Abbildung 26: Produkte der Fermentationen mit 4-substituierte Aminobenzoesäuren.

Da alle Fermentationen bis auf die der Fluoraminoabenzoesäure **150** nach der Testfermentation nur geringe Ausbeuten versprochen, wurde nur dieser Aromat im großen Maßstab einer mutasynthetischen Fermentation unterzogen. Eine vorangegangene Fermentation hatte hier nicht ausreichend Material geliefert.⁴ Aus insgesamt 1500 mL Fermentationsmedium wurden in dieser Fermentation 12 mg des an C-7 carbamoylierten Reblastatinderivats **155** isoliert, was mit 8 mg/L eine gute Fermentationsausbeute bedeutet. Das zusätzlich an C-17 oxidierte Derivat **156** konnte nur in Spuren gefunden werden (Abbildung 27).



Schema 27: Fermentation mit 3-Amino-4-fluorbenzoesäure (**150**).

4.3.7 Mutasyntesen von 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure und 6-Aminobenzo[1,3]-dioxol-4-carbonsäure

Die in diesem Abschnitt behandelte 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure **163** ist käuflich erhältlich. Die Mutasynteseexperimente mit 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure **163** und 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carbonsäure **164** (siehe Abbildung 27) zeigten kein positives Ergebnis.

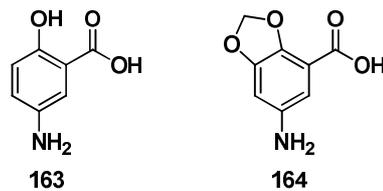


Abbildung 27: 5-Amino-2-hydroxybenzoesäure **163** und 6-Aminobenzo[1,3]-dioxol-4-carbonsäure **164**.

Beide AHBA-Derivate konnten nicht zu Geldanamycin-Derivaten umgesetzt werden. Als Grund wird die Substitution an C-6 angenommen. Wie auch schon von F. TAFT während seiner Dissertation gezeigt, werden derart substituierte aromatische Aminosäuren auch von der AHBA(-)-Mutante des *A. pretiosum* nicht zu Naturstoffderivaten prozessiert. Wahrscheinlich behindert ein Substituent an dieser Position die Aufladung auf die PKS.¹⁴¹

4.3.8 Mutasyntesen mit strukturell ungewöhnlichen Mutasyntongen

Die in Abbildung 28 gezeigten Mutasyntongen sind Verbindungen, welche ein durch die Umsetzung mit dem Organismus strukturell interessantes Naturstoffderivat ergeben würden. Außerdem können sie Grenzen in der Substratflexibilität der AHBA(-)-Mutante von *S. hygrosopicus* aufzeigen.

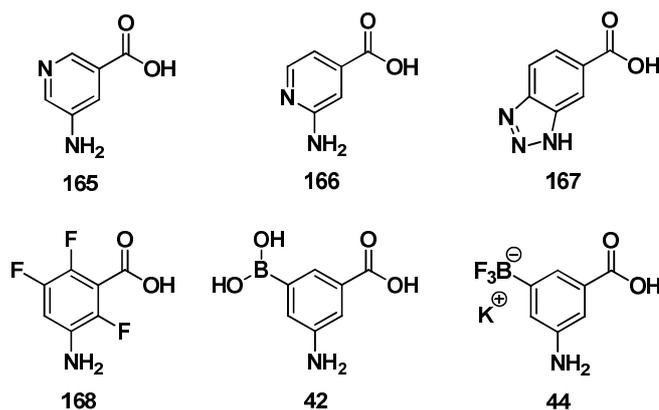


Abbildung 28: Ungewöhnliche Aminobenzoensäuren **165-168**, **42** und **44**.

Triazol **167** wurde für Testfermentationen von O. MANCUSO zur Verfügung gestellt,¹³⁹ das Trifluorderivat **168** und die Boronsäure **42** waren käuflich erhältlich, genauso wie die beiden Pyridinderivate **165** und **166**, wobei die 2-Amino-pyridin-4-carbonsäure **166** aufgrund von Löslichkeitsproblemen vor der Zufütterung in das Hydrochlorid der Aminosäure überführt werden musste.

Alle hier aufgeführten AHBA-Derivate wurden zu Geldanamycin-Derivaten umgesetzt. Die beiden Pyridinderivate **165** und **166** wurden jeweils zum zyklisierten und an C-7 carbamoylierten Naturstoffderivat umgesetzt. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um die erste Geldanamycin-Mutasynthese mit Heteroaromaten (siehe Abbildung 29).

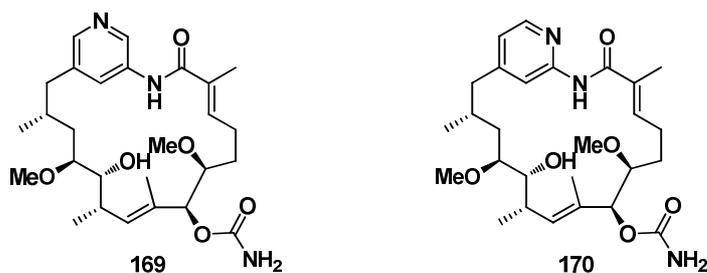
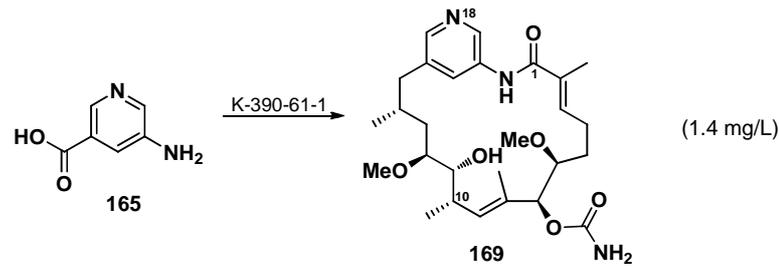


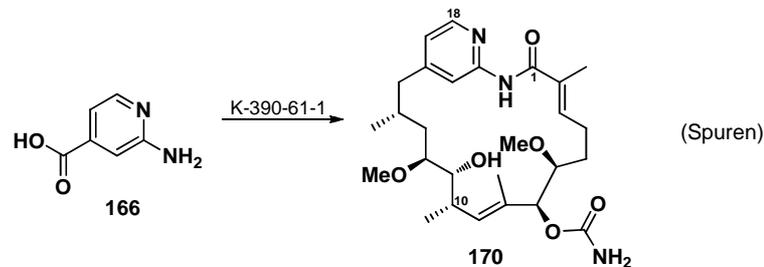
Abbildung 29: Produkte der Fermentationen mit 5-Aminonikotinsäure (**165**) und 2-Aminoisotikotinsäure (**166**).

Beide Fermentationen wurden aufgrund der interessanten neuen Strukturen im großen Maßstab wiederholt. Die Mutasynthese von 5-Aminonikotinsäure **165** mit einem Fermentationsansatz von 1000 mL lieferte hierbei 1.4 mg Naturstoff, was einer Ausbeute von 1.4 mg/L entspricht (siehe Schema 28).



Schema 28: Fermentation mit 5-Aminonikotinsäure (**165**).

Auch das Pyridinderivat **166** wurde im großen Maßstab fermentiert. Hier wurde nach vier Fermentationen mit jeweils 1200 mL Fermentationsmedium das Produkt nur in Spuren isoliert (siehe Schema 29), weshalb von einer Strukturaufklärung über NMR-Spektroskopie abgesehen wurde.



Schema 29: Fermentation mit 2-Aminonikotinsäure (**166**).

Die Fermentation der Trifluoraminobenzoesäure **168** sowie die der Triazolverbindung **167** führten zu neuen cyclisierten Geldanamycin-Derivaten die an C-7-carbamoyliert waren. Im Fall des Triazolderivats **167** wurde zusätzlich das offenkettige *seco*-Derivat **173** gefunden (siehe Abbildung 30).

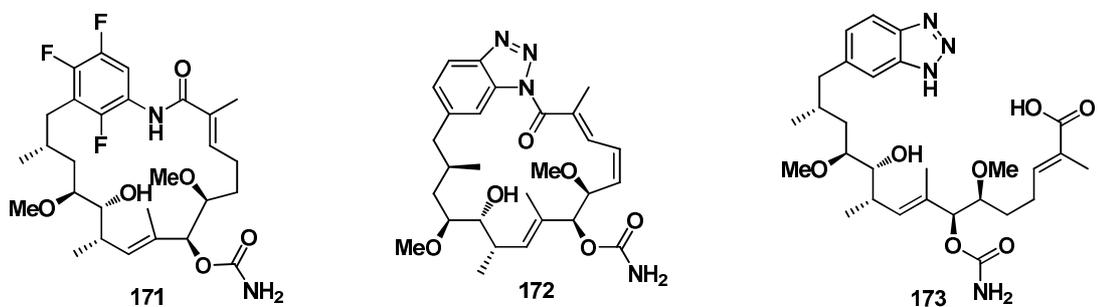


Abbildung 30: Produkte der Fermentationen mit Trifluoraminobenzoesäure **168** und Triazolderivat **167**.

Eine Besonderheit trat bei der Fermentation der Boronsäure **42** und des Fluoroborats **44** auf. Die Mutasyntesen mit diesen beiden AHBA-Derivaten lieferten die gleichen Produkte wie bei der Verfütterung von Aminobenzoesäure **88** und zusätzlich wurden Dihydrogeldanamycin **14** und Geldanamycin **1** in der Fermentationsbrühe gefunden (siehe Abbildung 31).

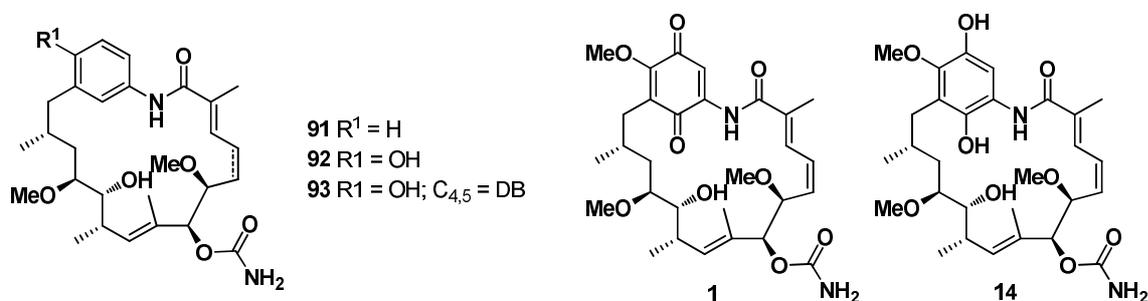


Abbildung 31: Produkte der Fermentationen mit Boronsäure **42** und Trifluoroborat **44**.

Es scheint also im Organismus (*S. hygroscopicus*) Enzyme zu geben, die wahrscheinlich vor dem Aufladen auf die PKS das Borat gegen H oder OH ersetzen. Da bislang keine publizierten Ergebnisse von Bor-Verbindungen in solchen Experimenten bekannt sind und daher auch keine biosynthetischen Studien durchgeführt wurden, kann für die Hydrolyse bzw. im Fall der Produkte **1/14** für die Oxidation nur schwer eine Erklärung gefunden werden. Es steht jedoch fest, dass die Oxidation nicht nach der Umsetzung der Bor-Verbindung zur Aminobenzoesäure stattfindet, da es während der Fermentation von 3-Aminobenzoesäure (**88**) nicht zur Bildung von Dihydrogeldanamycin **14** und Geldanamycin **1** kommt.

4.3.9 Mutasyntesen von verschiedenen *meta*-substituierten benzylichen Aminobenzoesäuren

In diesem Abschnitt werden die Verfütterungen von weiteren in *meta*-Position substituierten Aminobenzoesäuren erläutert (siehe Abbildung 32). Die Allylaminobenzoesäure **175** wurde hierfür von D. SCHWARZER im Rahmen seiner Bachelorarbeit bereitgestellt.¹⁴³

¹⁴³ D. Schwarzer, Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2009.

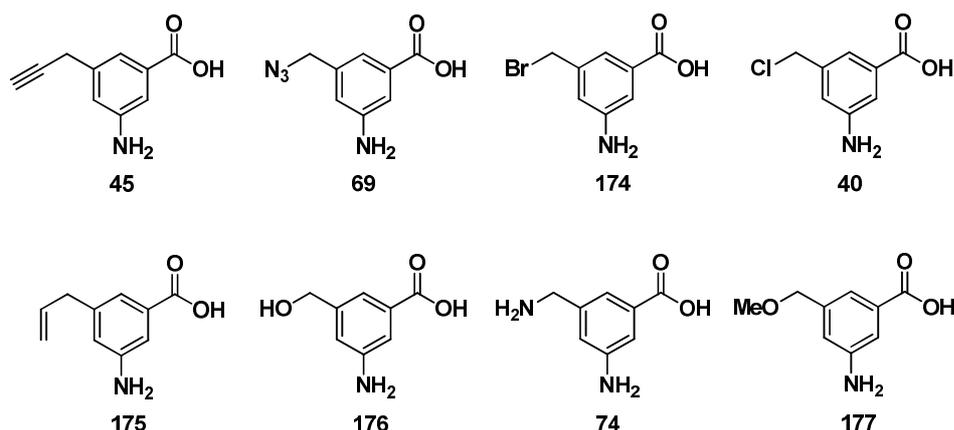


Abbildung 32: Verschiedene in *meta*-Position substituierte benzyliche Aminobenzoensäuren.

Von den verfütterten AHBA-Derivaten wurden alle bis auf die beiden Benzylhalogenide **40** und **174** auf die PKS geladen und zu zyklisierten Geldanamycin-Derivaten prozessiert.⁴ Anzunehmen ist, dass die Benzylhalogenide zu reaktiv sind und in der Fermentationsbrühe anderweitig reagieren, bevor sie aufgeladen werden können.

Die massenspektrometrisch detektierten Naturstoff-Derivate des benzylichen Methylethers **177** und des Allyl-Derivats **175** sind in Abbildung 33 dargestellt.

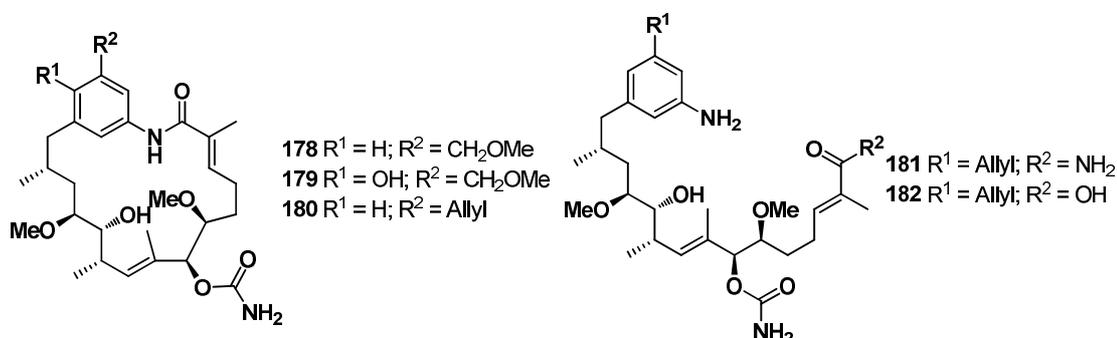


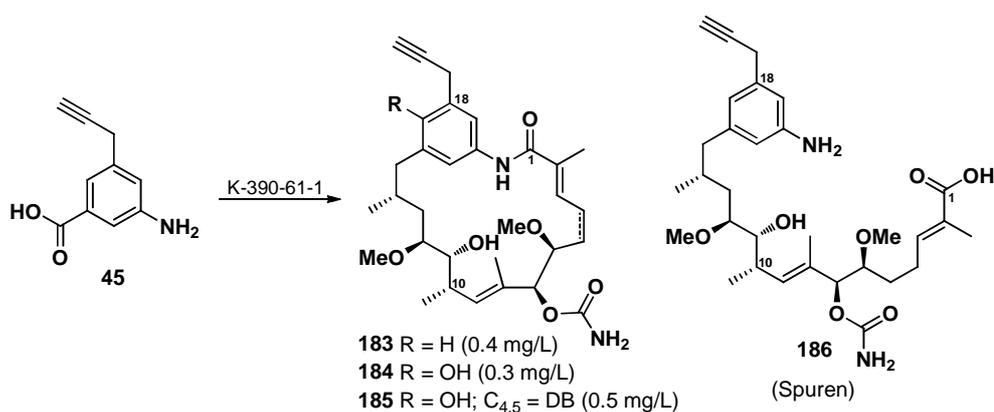
Abbildung 33: Produkte der Fermentationen mit Methylether **177** und Allylderivat **175**.

Bei der Fermentation des benzylichen Methylethers **177**⁴ wurden zwei neue zyklische Geldanamycin-Derivate **178** und **179** gefunden, wohingegen bei der Fermentation von Allylderivat **175** nur ein zyklisiertes an C-7 carbamoyliertes- **180** sowie die beiden *seco*-Derivate, Amid **181** und die Säure **182** detektiert wurden (siehe Abbildung 33).

Die Test-Mutasynthesen mit Propargylderivat **45**, Benzylazid **37** und Benzylalkohol **69** zeigten in den massenspektrometrischen Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse in

Form von diversen neuen Naturstoffderivaten bei guten Umsätzen, so dass entschieden wurde, diese Mutasyntese im großen Maßstab zu wiederholen.

Bei der Mutasyntese des Propargylderivats **45** wurden aus insgesamt 2500 mL Fermentationsansatz drei verschiedene neue Geldanamycinderivate isoliert (siehe Schema 30).



Schema 30: Fermentation mit 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**).

Die Mengen der isolierten Derivate lagen zwischen 0.7 mg und 1.2 mg, was einer mäßigen Fermentationsausbeute von 1.2 mg/L entspricht. Damit liegt die Ausbeute in einem Bereich, der nur bedingt für anschließende semisynthetische Derivatisierungen geeignet ist. Dennoch wurde eine Modellreaktion mittels Click-Chemie durchgeführt (siehe Kapitel 4.3).

Massenspektrometrischen Untersuchungen deuteten außerdem darauf hin, dass ein Detoxifizierungsprodukt, nämlich das *seco*-Geldanamycin-Derivat **186** entstanden war, welches jedoch nicht isoliert werden konnte. Außerdem wurden massenspektrometrisch zwei Geldanamycin-Derivate detektiert, welche eine Methylgruppe an Position 18 des aromatischen Teils tragen. Zum einen waren das das zyklische an C-7 carbamoylierte Geldanamycin-Derivat **187** und zum anderen **188**, welches noch zusätzlich an C-17 oxidiert war (siehe Abbildung 34).

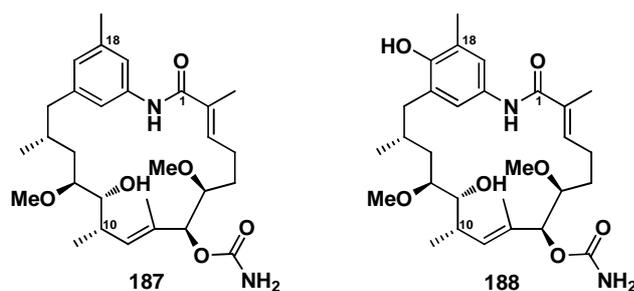


Abbildung 34: Massenspektrometrisch detektierte ungewöhnliche Fermentationsprodukte aus der Fermentation mit 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure (**45**).

Die Generierung solcher Geldanamycin-Derivate deutet auf einen reduktiven Abbau hin, welchen der Organismus sowohl vor der Aufladung, als auch nach der Aufladung auf die PKS vornehmen könnte. Beispiele, nach welchem Mechanismus ein solcher Abbau ablaufen kann, sind in der Literatur bislang nicht beschrieben.

In der Testfermentation des Benzylamins **74** wurden ebenfalls die Abbauprodukte **187** und **188** massenspektrometrisch detektiert (siehe Abbildung 34). Der Organismus muss also auch in diesem Fall vor oder nach der Aufladung auf die PKS den aromatischen Startbaustein verändert haben.

Der große Fermentationsansatz mit Benzylazid **69** musste aufgrund sehr geringer Ausbeuten und einer Vielzahl an Produkten viermal wiederholt werden. Hierbei entstanden mehrere offenkettige und zyklisierte Produkte (siehe Abbildung 35). Auch in dieser Fermentation entstanden die ungewöhnlichen 18-Methylderivate **187** und **188**.

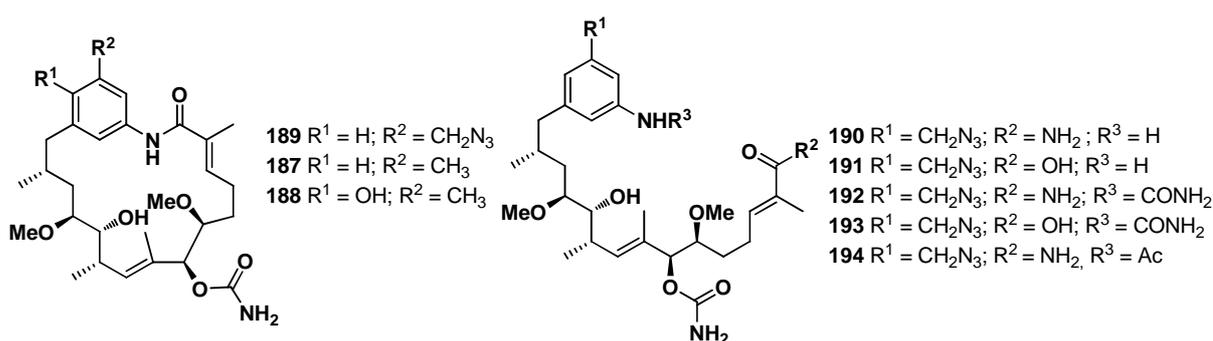


Abbildung 35: Produkte der Fermentationen mit 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure (**69**).

Aus insgesamt 3600 mL Fermentationsmedium konnten 0.6 mg *seco*-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-*N*-acetyl-reblastatinamid **194** isoliert und per NMR-Analytik vollständig charakterisiert werden. Dies entspricht einer sehr geringen Fermentationsausbeute von

0.2 mg/L. Alle anderen massenspektrometrisch detektierten Produkte konnten in Spuren erhalten werden. Da das Hauptprodukt dieser Fermentation ein mit der Amidbildung und *N*-Acylierung doppeltes Detoxifizierungsprodukt darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Fall die Zyklisierung zum Amid stark erschwert ist.

Die Fermentation von Benzylalkohol **176** hingegen, die massenspektrometrisch auf eine gute Produktion von einer Vielzahl neuer Metabolite hinwies, verlief auch im großen Maßstab vielversprechend. So konnten aus insgesamt 1500 mL Fermentationsmedium acht Substanzen isoliert werden, von denen fünf Geldanamycin-Derivate und drei völlig neue Lacton-Derivate darstellten (siehe Abbildung 36).

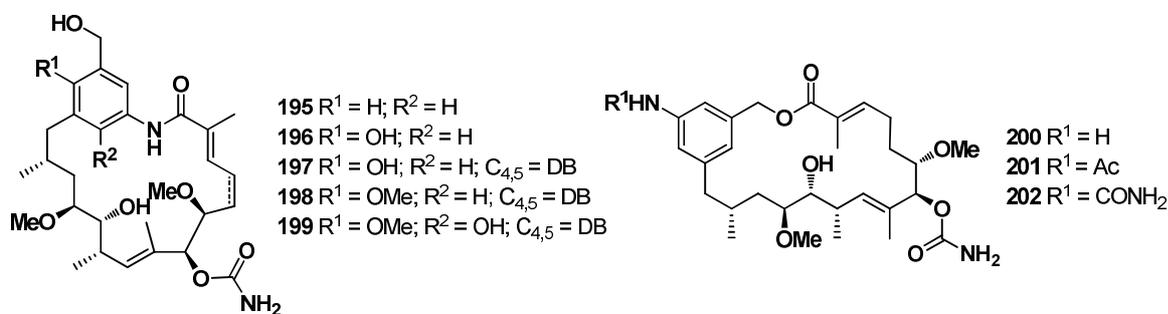
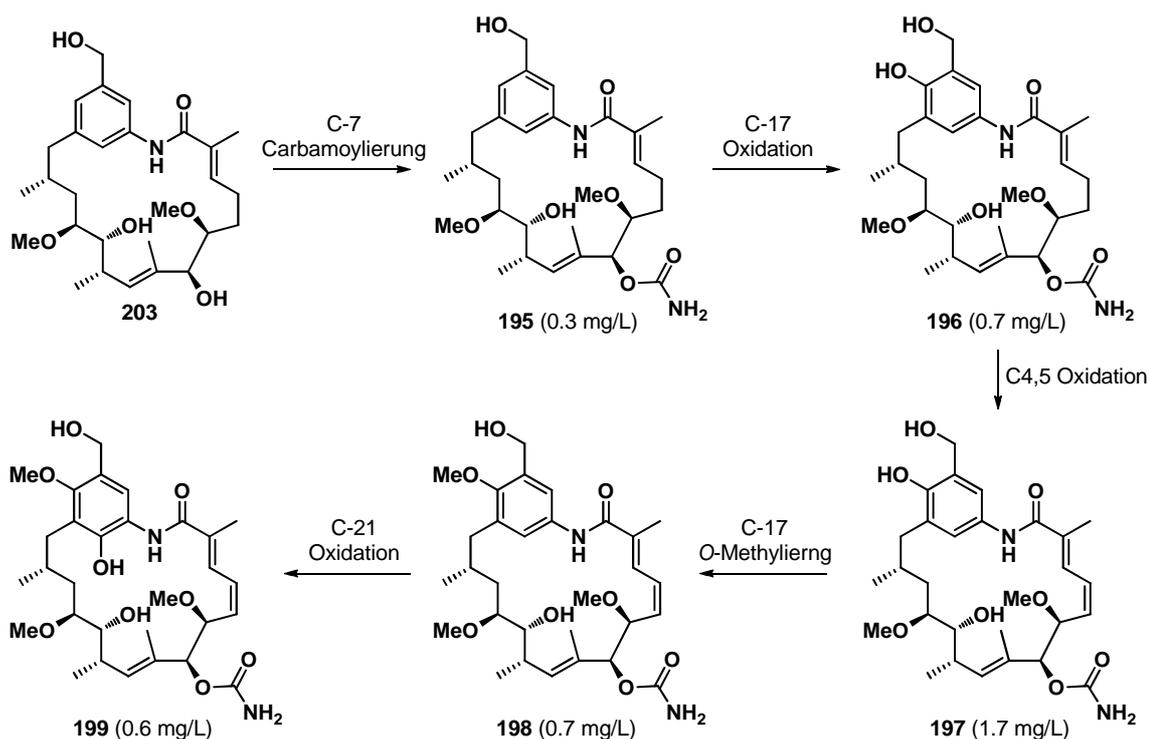


Abbildung 36: Produkte der Fermentation von 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäure (**174**).

Die neuen Geldanamycin-Derivate ließen sich in eine Reihenfolge entsprechend der post-PKS-Modifizierungen einordnen. In dieser Fermentation sind das erste Mal alle möglichen post-PKS-Modifizierungen an einem zyklisierten mutasynthetisch hergestellten Progeldanamycin-Derivat abgelaufen und es konnten erstmals alle Intermediate auf dem Weg zum vollständig dekorierten Produkt isoliert werden (siehe Schema 31).



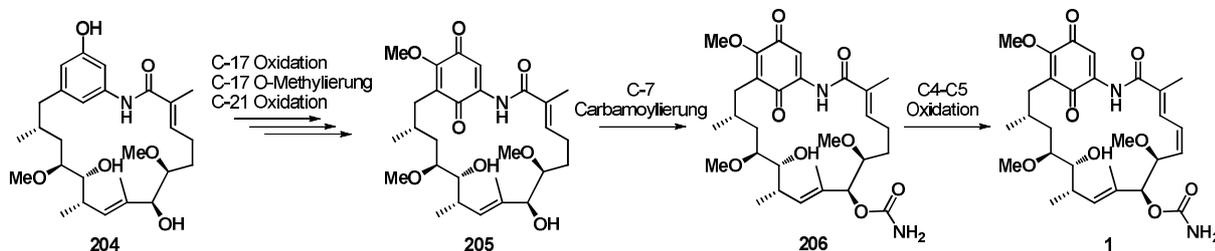
Schema 31: Reihenfolge der post-PKS-Modifikationen.

Dieser Befund ermöglichte es, die Reihenfolgen der dekorierenden späten Biosyntheseschritte zweifelsfrei zu bestimmen: So wird zuerst an C-7 carbamoyliert, dann an C-17 oxidiert, gefolgt von der Dehydrierung der C4-C5-Bindung. Diese post-PKS-Modifizierungen waren aus vorherigen Experimenten bekannt. Völlig neu waren die beiden Derivate **198** und **199**, die durch *O*-Methylierung des C-17-Alkohols und durch die anschließende Oxidation an C-21 gebildet wurden. Die einzige post-PKS-Modifizierung, die in diesem Fall nicht ablaufen konnte, da die entsprechende Hydroxygruppe an Position 18 des aromatischen Systems fehlte, war die spontane Oxidation zum Chinon.

Es scheint also offensichtlich, dass die Einführung der Carbamoylgruppe der erste post-PKS-Schritt ist, dann die Oxidation an C-17 erfolgt, anschließend die Einführung der Dehydrierung an C_{4,5}, danach die *O*-Methylierung an C-17 und zum Schluss die Oxidation an C-21. Im Fall des Naturstoffs Geldanamycin **1** wird als letzter Schritt das Dihydrochinon zum Chinon oxidiert.

Die hier beobachtete Reihenfolge der post-PKS-Modifizierungen steht nicht vollständig im Einklang mit bisher veröffentlichten Studien. In der Literatur wurde bislang folgende Reihenfolge für die post-PKS-Modifizierungen angenommen: C-17-Oxidation mit anschließender *O*-Methylierung, dann C-21-Oxidation. Hiernach schließt sich die Oxidation

zum Chinon an; wann genau dieser Schritt passiert ist unklar. Nach diesen Schritten soll die Carbamoylierung an C-7 stattfinden und anschließend die C4-C5-Dehydrierung (siehe Schema 32).¹⁴⁴



Schema 32: Bislang in der Literatur beschriebene Reihenfolge der post-PKS-Schritte.¹⁴⁴

Grundlage für die Hypothese waren Untersuchungen an einer gel8-Blockmutante von *S. hygroscopicus subsp. Duamyceticus* JCM4427, welche unfähig war, die Carbamoylierung an C-7 vorzunehmen. Das Ergebnis der Fermentation dieser Blockmutante war die Isolierung von zwei neuen Naturstoffen, nämlich 4,5-Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **205** als Hauptprodukt und 4,5 Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxy-17-hydroxygeldanamycin **206** als Nebenprodukt.

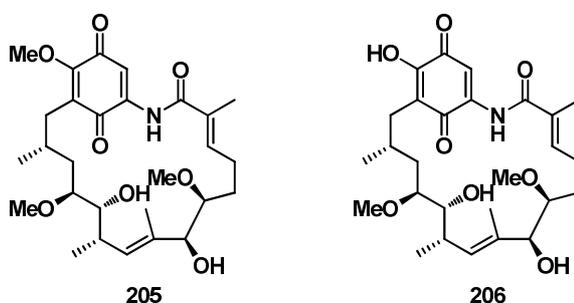


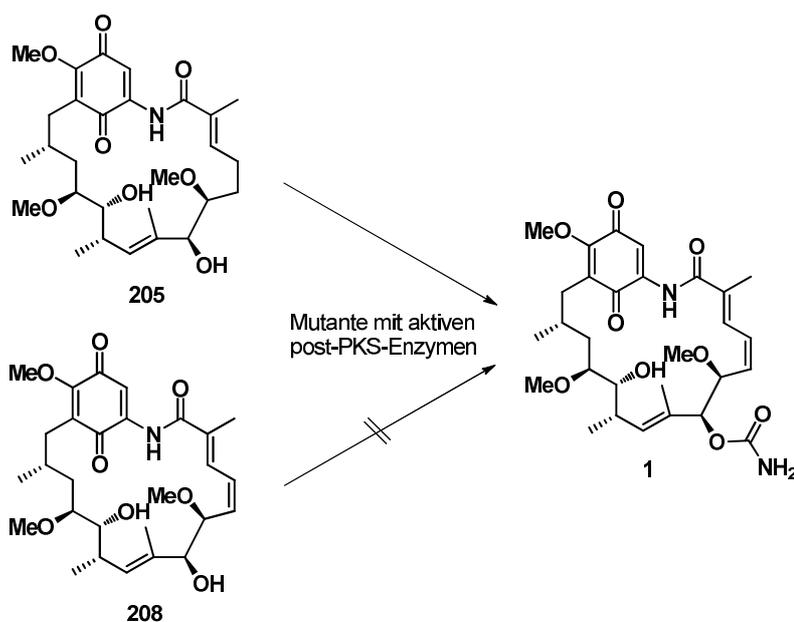
Abbildung 37: 4,5-Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **205** und 4,5 Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxy-17-hydroxygeldanamycin **206**.

Durch Verfütterung von 4,5-Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **205** an eine Mutante deren Ladedomäne durch ein Resistenzgen inaktiviert war, und die anschließende Isolierung von Geldanamycin **1** und einer Verbindung, der die Doppelbindung fehlt, wurde laut Literatur bewiesen, dass die Carbamoylierung nach den drei post-PKS-Schritten C-17-Oxidation, C-17-*O*-Methylierung und C-21-Oxidation stattfindet. Außerdem wollten die

¹⁴⁴ Y.-S. Hong, D. Lee, W. Kim, J.-K. Jeong, C.-G. Kim, J. K. Sohng, J.-H. Lee, S.-G. Paik, J. J. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11142-11143.

Autoren damit auch bewiesen sehen, dass die C4-C5-Dehydrierung am Ende stattfindet, da diese erst in der zweiten Verfütterung mit der Mutante eingeführt wurde, deren post-PKS-Enzyme vollständig aktiv waren. Unklar ist in diesem Fall, dass hier dennoch ein Produkt isoliert wurde, dem trotz eingeführten Carbamates weiterhin die Doppelbindung fehlt.¹⁴⁴

Eine andere Arbeitsgruppe (Ni *et al.*) isolierte aus einer anderen Mutante von *S. hygrosopicus* 17997, die auch eine Inaktivierung des *gdmN* trägt zwei Substanzen, zum einen 4,5-Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **205** und zum anderen nach längerer Inkubationszeit das 7-*O*-Descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **208**. Auch diese beiden Substanzen wurden an eine weitere Mutante mit aktiven post-PKS-Enzymen verfüttert. Hierbei kam heraus, dass die Carbamoylierung vor der Oxidation an C4-C5 stattfinden muss, da das verfütterte 7-*O*-Descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **208** nicht carbamoyliert wurde.¹⁴⁵



Schema 33: Verfütterung von 4,5-Dihydro-7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **205** und 7-*O*-descarbamoyl-7-hydroxygeldanamycin **208** an eine Mutante mit aktiven post-PKS-Enzymen.¹⁴⁵

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass hier nicht ein einziges Produkt ohne Carbamat vorliegt. Sogar die offenkettigen Derivate, die in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurden, tragen alle das Carbamat an C-7. Vermutlich handelt es sich bei der Carbamoyltransferase um ein sehr flexibles Enzym, welches erst mit der zusätzlichen *cis*-Doppelbindung an C4-C5 nicht mehr in der Lage ist, die Amidinyl-Gruppe zu übertragen.

¹⁴⁵ S. Ni, L. Wu, H. Wang, W. He, Y. Li, C. Jia, S. Li, Y. Wang, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 623-625.

Eventuell ist dies auf eine mit der Dehydrierung einhergehende Konformationsveränderung zurückzuführen. Die Ergebnisse der Fermentation von Benzylalkohol **174** zeigen eindeutig, dass die Dehydrierung zur Doppelbindung nach der Oxidation an C-17 und vor der Oxidation an C-21 stattfindet, und dass die *O*-Methylierung normalerweise nach der Oxidation an C-21 stattfindet, da keinerlei Derivate gefunden wurden, die auf eine abweichende Reihenfolge hindeuten. Auch bei Betrachtung aller anderen Verfütterungsexperimente dieser Arbeit wurde kein Geldanamycin-Derivat isoliert, das der oben beschriebenen Reihenfolge widerspricht.

In Bezug auf die Ergebnisse von NI *et al.* muss allerdings angenommen werden, dass auch die C4-C5-Oxidase ein eher flexibles Enzym zu sein scheint, da hier die Doppelbindung erst nach der Oxidation an C-17, der nachfolgenden *O*-Methylierung an C-17 und der Oxidation an C-21 eingeführt wird.

Die Serie der in diesem Experiment isolierten Derivate sollte auch für biologische Tests interessant sein, um zu zeigen wie die biologische Aktivität mit den Modifizierungen durch die post-PKS-Enzyme korreliert.

Ein anderes sehr interessantes Ergebnis dieser Fermentation stellt die Entstehung völlig neuer Lacton-Naturstoffe dar. Es konnten drei Lacton-Derivate isoliert werden, welche alle an C-7 carbamoyliert waren (siehe **Abbildung 38**).

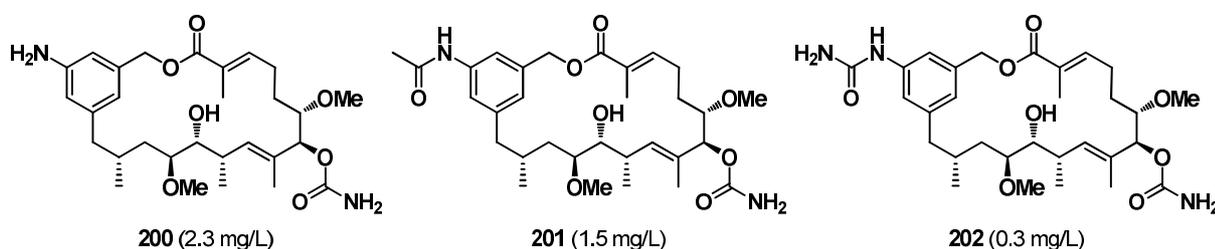


Abbildung 38: Isolierte Lacton-Derivate.

So entstand ein Derivat, das eine freie, aromatische Aminofunktion trägt (**200**), ein weiteres, das an der Aminogruppe acyliert wurde (**201**) und schließlich eines, welches am Anilin amidinoyliert wurde (**202**). Es ist davon auszugehen, dass die beiden letztgenannten Derivate Detoxifizierungsmaßnahmen des Organismus erfahren haben.

Um diese Lactonbildung zu erklären, sind mehrere Aspekte in Betracht zu ziehen: Die Nukleophilie des Anilins und des Benzylalkohols, sowie das Enzym, das diesen Ringschluss katalysiert, die Amidsynthase.

Um die Bildung der Lactone neben den sonst ausschließlich gebildeten Lactamen zu verstehen, wurden qualitative Moleküldynamik-Studien zu den beiden möglichen

Ringschlüssen von T. EICHNER durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Lactonbildung werden die Ergebnisse der Studien von T. EICHNER hier kurz erläutert.

Die Moleküldynamikrechnungen zeigen, dass die Amidsynthase beim Eindringen des Aromaten in die Bindungstasche eine Konformationsänderung durchlaufen muss. Anschließend ist die Seitenkette in der Bindungstasche der Amidsynthase wasserausschliessend eng gepackt, sodass der aromatische Teil des *seco*-Progeldanamycin-Derivats in der Tasche nicht mehr rotieren kann (siehe Abbildung 39).

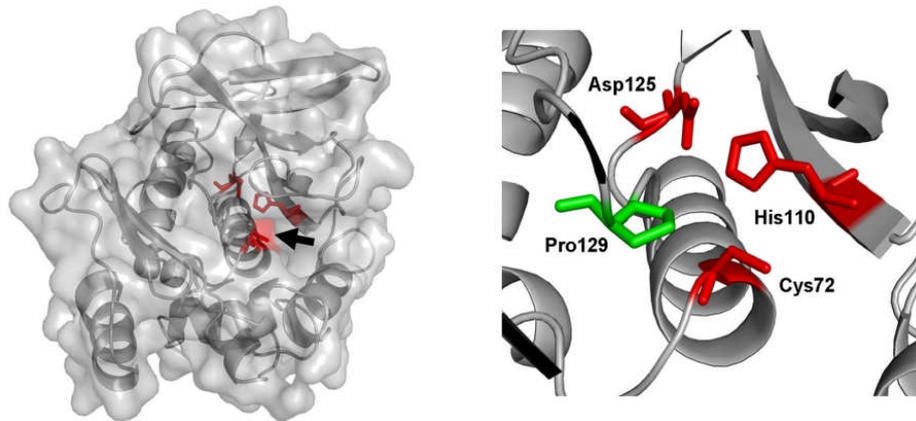


Abbildung 39: li. Darstellung der Oberfläche der Amidsynthase des Geldanamycin-Produzenten; re.: Darstellung der katalytischen Triade in der Amidsynthase.¹⁴⁶

Dabei spielt die Orientierung des Aromaten bei Eintritt in die Bindungstasche eine entscheidende Rolle. Beim natürlichen Substrat kann der Aromat zwei Konformationen einnehmen, die beide einen Ringschluss ermöglichen. Im Falle eines Hydroxymethyl-substituierten Aromaten ist in einer Konformation die Amidbildung wegen sterischer Hinderung durch den zusätzlichen Substituenten erschwert, es kommt zur Lactonisierung. In diesem Fall wird also eine kinetische Reaktionskontrolle beobachtet (Eintritt in die Bindungstasche). Da in der Bindungstasche kein Konformationswechsel mehr möglich ist, wird das Lacton gebildet. Diese kinetische Kontrolle spielt beim natürlichen Substrat keine Rolle, da in jedem Fall das gleiche Produkt gebildet wird. Die Modeling Studien stehen noch am Anfang, und enthalten einige Einschränkungen. Weitere Untersuchungen müssen die hier vorgestellte Hypothese noch bestätigen.¹⁴⁷

¹⁴⁶ T. Eichner, persönliche Korrespondenz.

¹⁴⁷ Die Simulationszeit muss erhöht werden und einige strukturelle Einschränkungen während der Simulation müssen aufgehoben werden. Auch entsprechen die Annäherungswinkel nicht voll und ganz den erwarteten Werten. Möglicherweise ergeben sich neue Konformationen, die auch im Einklang mit biologischen Erkenntnissen über die Zyklisierung stehen.

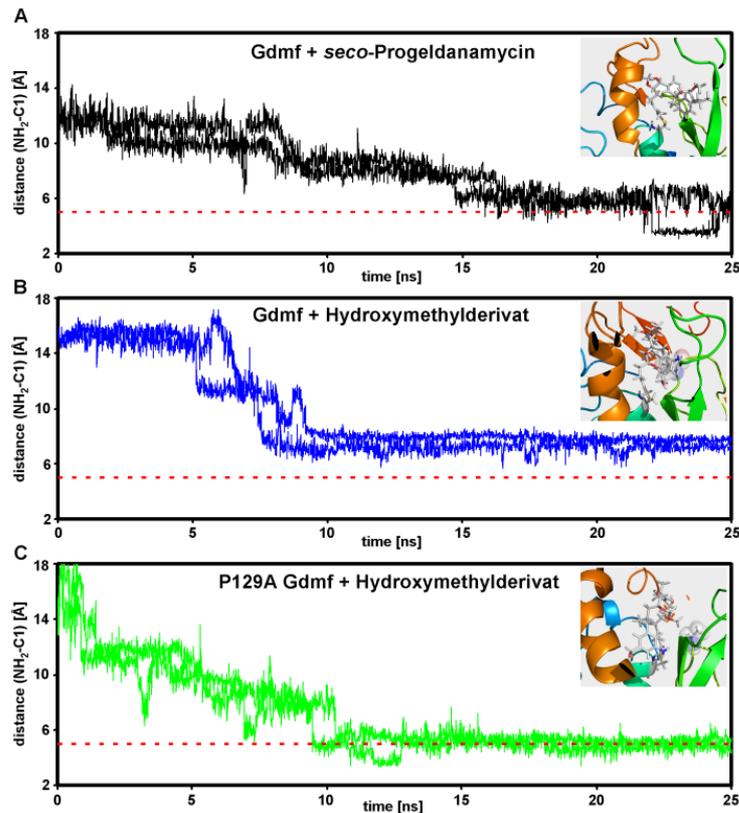


Abbildung 40: Zeitlicher Verlauf des Abstandes zwischen Amin und Carbonylkohlenstoff während der Moleküldynamiksimulationen.

In Abbildung 40 sind die Abstände der Aminogruppe zum Carbonyl-Kohlenstoffatom während der Moleküldynamiksimulationen gezeigt. In **A** ist *seco*-Progeldanamycin simuliert, in **B** das Hydroxymethyl-Derivat. Es ist deutlich zu sehen, dass im Fall **B** das Anilin im Mittel einen größeren Abstand zum Carbonylzentrum aufweist. Wenn man annimmt, dass eine Reaktion bzw. Bindungsbildung erst bei einem Abstand von $<4\text{\AA}$ eingeleitet wird, wird deutlich, dass das Amin sich kaum weit genug an die Carbonylgruppe des Thioesters annähert, um die Zyklisierung einzugehen. Auch hier sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese ersten Ergebnisse zu bestätigen.

Da die Lactonbildung bei den Verfütterungsexperimenten an die Mutante *A. pretiosum* HGF073 nicht beobachtet wurde, sondern ausschließlich der Ringschluss über das Anilin stattgefunden hat, liegt es nahe, die beiden Enzyme zu vergleichen.

```

GdmF      1  FDVAKYLRRIQVSESIPATLDTLRHLHKKHLMMAVFPYDNSTAPDR.....LPASRHLTNVPLDLVFEHVVTIEGHGGVYELNRLFHTLLA
Asm9      1  YDTNTYLARLGVVET.RPDRAALTAHRAHLRALHYDNTAAATQDGPVNDLA.....DLVDATFDGLVTFAGRGGICFELNLLFHRLLT

GdmF      85  ELGYDVRMVAQAVRQANGAFGPEREITFDLVRLDGRTHLVVGFEGPSYSEPLRLSEEEQHGYGAYRVTEHDGYRVVERRPKESGWQPV
Asm9      85  DLGFTTTLVLSAGVADEEGGSPDLAIFRTAVHLDGEVLLAVVGFAGPSYLDPIRLAPDEQVQHGAFRVVEQDGRHLVLRRSRTTDWRPL

GdmF      175  YRFRPELADPSGWDVAVRLDSLDDYAQDS.VLAGTTFRSRATDNGKIVLIGRRCFTVE..DGVERTKVLVKADEFQDTVD.LILA
Asm9      175  YEFATTPRTL.S..DWDGFTPRRLRYLDRAVIAGTTLICRAVDGHRALVGRKHLVVRDGH..ETVTTLLDPAEHARVSAEIRTI CAD

```

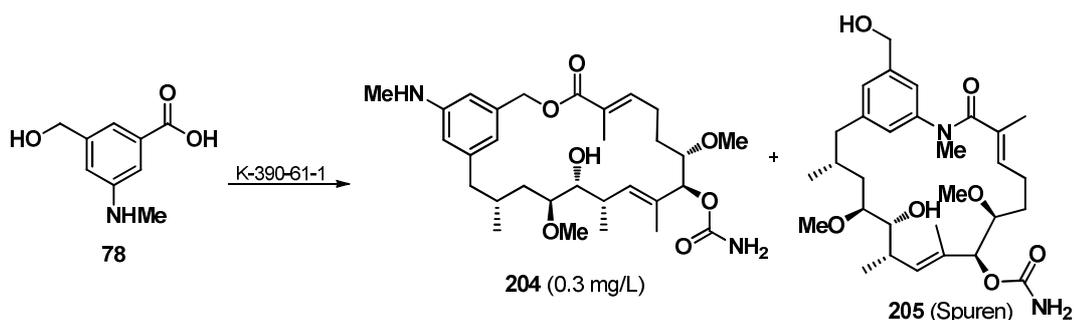
Abbildung 41: *Sequence Alignment* der Amidsynthasen vom Geldanamycin- (GdmF) und Ansamitocin-Produzenten (Asm9).

Hierfür wurde ein *Sequence Alignment* der beiden Enzyme angefertigt, welches offenbart, dass im Falle der Amidsynthase des Geldanamycin-Produzenten im aktiven Zentrum eine starre Aminosäure, Prolin (Pro129) vorliegt, die Amidsynthase im Ansamitocin-Produzenten trägt hier Alanin (siehe Abbildung 41, grün hervorgehoben). Durch eine Mutagenese-Simulation konnte gezeigt werden, dass beim Austausch von Prolin gegen Alanin in der Amidsynthase des Geldanamycin-Produzenten das Amin wieder eine Konformation einnehmen kann, die den Ringschluss zum Lactam ermöglicht (Abbildung 40, C). Dies stützt die oben beschriebene Hypothese, da es mit den experimentellen Ergebnissen aus der Fermentation mit dem Ansamitocin-Produzenten übereinstimmt. Auch hier sind noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Modeling Studien bis hierher eine Hypothese liefern, die im Einklang mit experimentellen Beobachtungen steht, weitere Simulationen müssen diese Hypothese untermauern. Bei Übertragung der simulierten Mutation in den Organismus *S. hygroscopicus* K390-61-1 wäre es vielleicht möglich, die Ausbeuten der Mutasyntheseexperimente zu steigern, wenn der Ringsschluss, wie postuliert, durch die sterische Hinderung der Prolingruppe gehemmt wird. Beim Geldanamycin-Produzenten liegen die Fermentationsausbeuten um einen Faktor 5-10 niedriger als beim Ansamitocin-Produzenten *A. pretiosum* HGF073, was diese Hypothese stützt.^{133,141}

4.3.10 Mutasynthesen von verschiedenen *meta*-substituierten Hydroxymethylbenzoesäuren

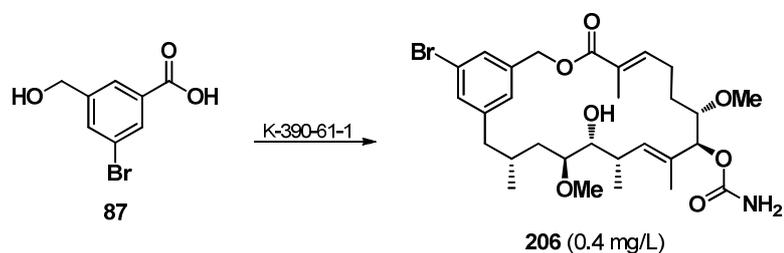
Um die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.9, die Lactonbildung, weiter zu untersuchen, wurden drei weitere Benzylalkohole in Verfütterungsexperimenten eingesetzt (siehe Abbildung 42, Herstellung der Alkohole siehe Kapitel 4.1).



Schema 35: Mutasynthese mit 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure (**78**).

Das *N*-methylierte Geldanamycin-Derivat **205** konnte nur in Spuren nachgewiesen werden. Auf weitere Fermentationen wurde verzichtet, da weit über 10 L Fermentationsansatzgröße notwendig gewesen wären, um eine ausreichende Menge des Geldanamycin-Derivats **205** für NMR-Analytik und biologische Tests zu isolieren.

Das dritte Benzylalkohol-Derivat, das Bromid **87**, lieferte in der Testfermentation ebenfalls ein positives Ergebnis. Dieses Mutasyntheton wurde gewählt, da Brom sterisch relativ anspruchsvoll ist, die elektronischen Eigenschaften des Aromaten verändert und das erwartete Mutaprodukt eine funktionelle Gruppe für spätere semisynthetische Modifizierungen enthält. Die massenspektrometrische Analyse deutete jedoch an, dass die Produktion des Brom-Lactons **206** geringer ausfiel, als im Fall des *N*-Methyl-Lactons **204** und des Phenol-Lactons **203**. Dennoch wurde entschieden, wie schon in den beiden ersten Fällen, eine große Fermentation durchzuführen. Aus einem Gesamtfermentationsansatz von 1600 mL wurden schließlich 0.6 mg Brom-Lacton **206** isoliert, was einer geringen Ausbeute von 0.4 mg/L entspricht (siehe Schema 36).



Schema 36: Mutasynthese mit 3-Brom-5-(hydroxymethyl)benzoessäure (**87**).

Trotz der eher schlechten Fermentationsausbeute war ausreichend Material für NMR-Analytik und biologische Tests vorhanden. Ein Grund für die geringe Ausbeute könnten zum einen der sterische Anspruch des Brom-Substituenten sein, oder die elektronische Veränderung im

aromatischen Ring, die von aktivierend im Fall des OH- und *N*-Methyl-Substituenten zu desaktivierend, durch den Brom-Substituenten wechselt.

4.3.11 Mutasyntesen mit stark strukturell veränderten Startbausteinen

In diesem Abschnitt werden die Mutasyntesen mit stark veränderten Startbausteinen vorgestellt, die im Falle der Aufladung auf die PKS, Prozessierung und anschließender Zyklisierung strukturell interessante Progeldanamycin-Derivate liefern würden. Im Fall von **207** und **208** wären sogar die Ringgrößen abweichend. Benzylamin **207** wurde von K. HARMROLFS synthetisiert und bereitgestellt,¹³⁴ der verlängerte Säurebaustein **208** von B. THOMSZEWSKI,¹⁴⁰ und Dihydroxybaustein **209** war käuflich erhältlich (siehe Abbildung 43).

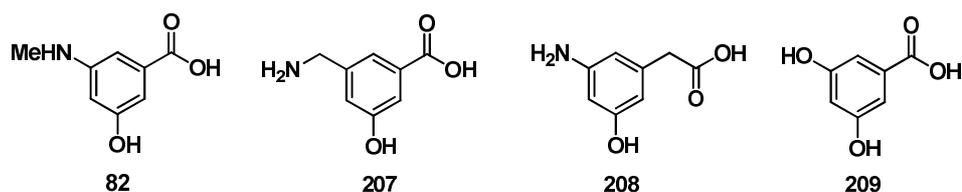


Abbildung 43: Stark strukturell veränderte Startereinheiten.

Die Mutasynthese mit 3,5-Dihydroxybenzoesäure **209** lieferte keine neuen Naturstoffderivate. Hierbei bestand die Hoffnung, dass der Organismus diesen Startbaustein zum Lacton-Geldanamycin-Derivat zyklisiert. Es wurden jedoch weder ein zyklisiertes, noch ein *seco*-Geldanamycin-Derivat massenspektrometrisch nachgewiesen, obwohl von Hong *et al.* ein *seco*-Derivat in einer Fermentation mit diesem Mutasynton **209** beschrieben wurde.¹³⁶

In der Testfermentation mit *N*-Methyl-AHBA **82** wurden zwei Geldanamycin-Derivate detektiert, die die gleichen Massen haben wie Geldanamycin **1** und Dihydrogeldanamycin **14**. Die veränderten Retentionszeiten deuteten auf die Entstehung von polaren Verbindungen hin. Eine mögliche Struktur, die unter Berücksichtigung der post-PKS-Schritte zu diesem Polaritätsunterschied passen könnte, wären zwei 17-Desmethylderivate **210** und **211** (siehe Abbildung 44).

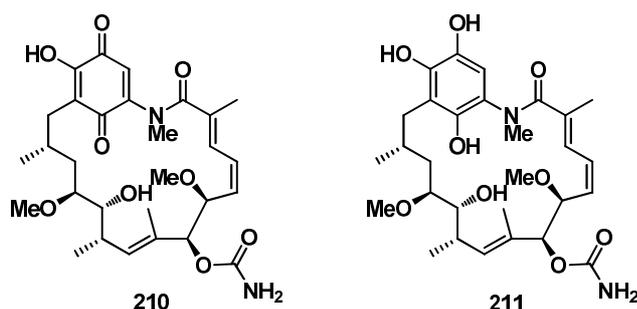


Abbildung 44: Mutasyntese mit *N*-Methyl-AHBA **82**.

Da die isolierten Derivate die ersten *N*-methylierten Geldanamycinderivate wären, wurde diese Fermentation aufgrund der interessanten Ergebnisse, mehrmals im großen Maßstab durchgeführt. Auch nach insgesamt 3 L Fermentation konnten jedoch nur Spuren der Produkte isoliert werden, der Aufwand für weitere Arbeiten wäre unverhältnismäßig gewesen. Wie sich bereits in Kapitel 4.3.8 mit dem Triazolderivat **165** und in Kapitel 4.3.10 mit dem *N*-Methyl-Derivat **78** gezeigt hat, scheinen diese substituierten Aniline zwar angenommen und auf die PKS geladen zu werden, aber die Zyklisierung ist das Nadelöhr dieser Prozessierung, da in allen Fällen nur Spuren des gewünschten Naturstoffs isoliert werden können.

Ein weiteres interessantes Mutasynton, welches im Fall der Aufladung und Prozessierung zu einem um ein Kohlenstoffatom erweiterten Ring führen würde, ist das Phenyllessigsäurederivat **208**. Diese Umsetzung erfolgte nicht wie gewünscht; statt dessen wurde die verlängerte Säure vor der Aufladung auf die PKS zu AHBA **9** gekürzt, was wahrscheinlich auf einen oxidativen Abbau der homologisierten Benzoesäure durch den Organismus zurückzuführen ist. So wurden statt des Derivats mit einem um ein Kohlenstoffatom größeren Ring, Geldanamycin **1** und Dihydrogeldanamycin **14** detektiert. Diese Umsetzung zur AHBA wurde bereits von B. THOMASZEWSKI im Rahmen ihrer Diplomarbeit bei der Verfütterung an den Ansamitocin-Produzenten *A.pretiosum* HGF 073 beschrieben.¹⁴⁰

Ein weiterer interessanter Startbaustein ist das Homo-AHBA-Derivat **207**. Hier sollte, falls der Ringschluss über das Benzylamin ablaufen würde, auch ein um eine CH₂-Gruppe erweiterter Naturstoff entstehen (siehe Abbildung 45).

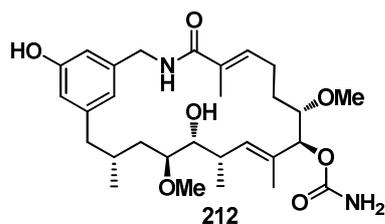


Abbildung 45: Mögliches Produkt der Mutasynthese mit Benzylamin-AHBA **207**.

Die erwartete Masse wurde in der Fermentationsbrühe detektiert, allerdings deuten die Ergebnisse auf eine extrem geringe Produktion hin, so dass eine Wiederholung im großen Maßstab als nicht realisierbar betrachtet wurde.

4.3.12 Mutasynthesen mit drei verschiedenen Hydroxymethylbenzoesäuren

Um die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.9 weiter zu untersuchen, wurden wie in Kapitel 6.2 beschrieben, drei verschieden substituierte Hydroxymethylbenzoesäuren synthetisiert und der AHBA(-)-Mutante von *S. hygroscopicus* zugefüttert. Bei diesen Hydroxymethylbenzoesäuren handelt es sich um 3-(Hydroxymethyl)benzoesäure **213**, 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure **214** und 4-(Hydroxymethyl)benzoesäure **215** (siehe Abbildung 46).

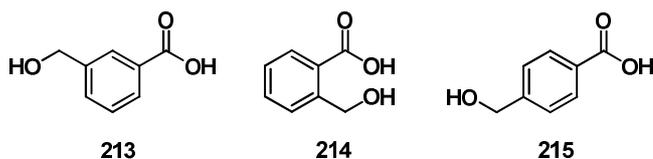


Abbildung 46: Verschiedene Hydroxymethylbenzoesäuren **213-215**.

Die beiden letztgenannten Mutasynthone würden im Falle der Aufladung auf die PKS und die Prozessierung zum Geldanamycin-Derivat einen um ein Kohlenstoffatom kleineren bzw. einen um ein C-Atom größeren Ring als die bisher bekannten Lactone ergeben.

Von diesen drei aromatischen Startbausteinen, wurde nur die 3-(Hydroxymethyl)benzoesäure **213** zu einem neuen Geldanamycin-Derivat **216** umgesetzt (siehe Abbildung 47).

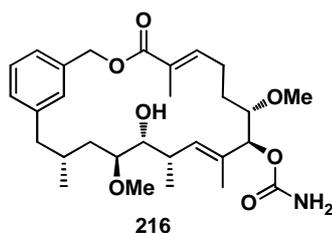


Abbildung 47: Produkt der Mutasyntese mit 3-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**213**).

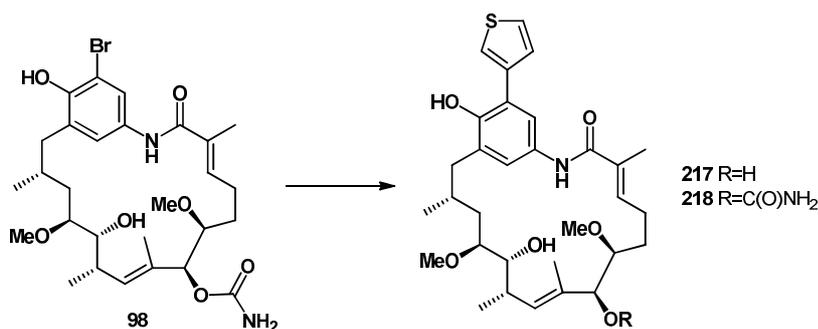
Dieses Ergebnis war nach den vorher gewonnenen Erkenntnissen zu 3-Hydroxymethylbenzoesäuren nicht unerwartet. Mit den beiden anderen Hydroxymethylbenzoesäuren sollte getestet werden, ob diese *meta*-Beziehung wichtig für die Aufladung des Startmoleküls ist. Da von beiden Molekülen auch keinerlei *seco*-Produkte in der Fermentationsbrühe gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass diese Startbausteine nicht auf die PKS geladen wurden.

4.3.13 Geldanamycinderivate durch Semisyntese

Einige der mutasynthetisch dargestellten Geldanamycin-Derivate lassen sich durch ihre funktionellen Gruppen gut in Semisyntesen einsetzen, um weiter modifizierte Derivate zu erhalten. In diesem Kapitel sollen drei Beispiele vorgestellt werden.

Zum einen wurde 17-Des-*O*-methyl-18-bromreblastatin **98** in einer SUZUKI-MIYAURA-Kupplung mit Thiophenboronsäure umgesetzt. Das so erhaltene Produkt ist ein neues Geldanamycin-Derivat, welches für SAR-Studien eingesetzt werden kann. Für die Kupplung wurden sorgfältig Bedingungen ausgewählt, die für eine ähnliche Umsetzung gute Resultate gezeigt haben. So wurde eine Vorschrift gewählt, in der das Substrat auch in *ortho*-Position zum Bromid eine Hydroxygruppe und in *meta*-Position einen größeren Rest trägt.¹⁴⁸ Diese Bedingungen zuerst in einem kleinen Ansatz getestet, und nachdem massenspektrometrische Analysen die Produktbildung bestätigten, wurde ein größerer Ansatz mit 1.2 mg von **98** durchgeführt (siehe Schema 37).

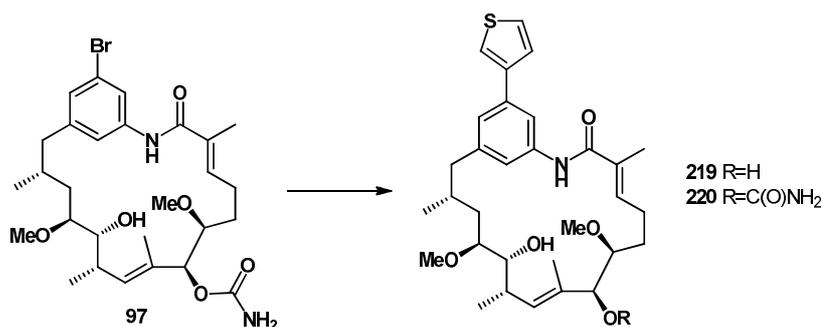
¹⁴⁸ a) H.-b. Liu, M. Wang, Y. Wang, Q. Gu, L.-c. Sun, *Syn. Comm.* **2007**, *37*, 3815-3826; b) Y. Yue, M. Turlington, X.-Q. Yu, L. Pu, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8681-8689.



Schema 37: SUZUKI-MIYAJURA-Kupplung von 17-Des-*O*-methyl-18-bromreblastatin **98** zu 17-Des-*O*-methyl-18-thiophenreblastatin **218**. Bedingungen: DME/H₂O (3:1), K₂CO₃, Thiophen-3-boronsäure, Pd(PPh₃)₄, 24 h, 90 °C, 25 %.

Die Reaktion verlief in mäßiger Ausbeute von 25 %. Das Edukt **98** wurde in 42 % Ausbeute reisoliert. Außerdem kam es zur Bildung zweier Nebenprodukte; und zwar zum einen zur Bildung von 17-Des-*O*-methyl-7-descarbamoyl-18-bromreblastatin und zum anderen von 17-Des-*O*-methyl-7-descarbamoyl-18-thiophenreblastatin **217**. Diese beiden Derivate wurden allerdings nur in Spuren gebildet. Sie konnten zwar isoliert werden, jedoch war die Aufnahme von NMR-Daten nicht möglich, da die Menge zu gering war. Festzuhalten ist, dass es unter den gewählten Bedingungen zum Verlust der Carbamoylgruppe an C-7 kommen kann. Unter den basischen Reaktionsbedingungen wird das Carbamat hydrolysiert. Dieses stellte ein interessantes Ergebnis dar, denn so können allgemein durch Generierung von Descarbamoyl-Derivate, weiterführende SAR-Studien durchgeführt werden. Diese Descarbamoyl-Derivate sind, ansonsten bisher nur über den Fermentationsweg und Einsatz entsprechender Blockmutanten zugänglich. Wie die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben, ist die Carbamoyltransferase sehr unselektiv, da sie sogar die offenkettigen *seco*-Derivate an C-7 carbamoyliert.

Neben dem 17-Des-*O*-methyl-18-bromreblastatin **98** wurde auch 17-Desmethoxy-18-bromreblastatin **97** in die SUZUKI-MIYAJURA-Kupplung mit Thiophenboronsäure eingesetzt. (siehe Schema 38).



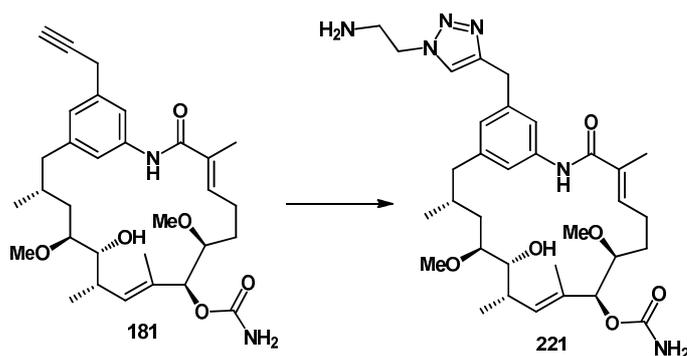
Schema 38: SUZUKI-MIYAUURA-Kupplung von 17-Desmethoxy-18-bromreblastatin **97** zu 17-Desmethoxy-18-thiophenreblastatin **220**. Bedingungen: DME/H₂O (3:1), K₂CO₃, Thiophen-3-boronsäure, Pd(PPh₃)₄, 24 h, 90 °C, **62 %**.

Diese Reaktion verlief in guten Ausbeuten von 62 % zum gewünschten Produkt **220**. Außerdem wurde mit einer Ausbeute von 30 % das descarbamoylierte Produkt **219** erhalten. Das Edukt **97** wurde vollständig umgesetzt. Hier wurden die gleichen Bedingungen angewendet, wie in der vorherigen Reaktion mit dem phenolischen Substrat **98**. Im Vergleich dazu läuft die Kupplung in Gegenwart des *ortho*-OH-Substituenten schlechter ab, was auf sterische Hinderung hindeutet.

Die als Nebenreaktion stattfindende Carbamat-Spaltung könnte evtl. durch Minimieren der Reaktionszeit unterdrückt werden, jedoch können hierzu nur Spekulationen angestellt werden, da eine systematische Optimierung aufgrund der geringen Substratmengen nicht möglich war.

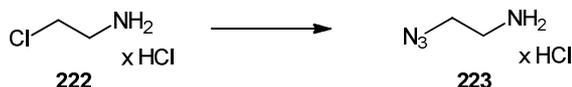
Eine zweite Variante einer Semisynthese an Geldanamycin-Derivaten stellte die HUISGEN-Cycloaddition dar.¹⁴⁹ Hier wurde das 17-Desmethoxy-18-propargylreblastatin **181** eingesetzt und mit 2-Azido-1-ethylamin **222** umgesetzt, um das resultierende Geldanamycin-Derivat **221** polarer, also wasserlöslicher zu machen.

¹⁴⁹ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565-598.



Schema 39: HUISGEN-Cycloaddition von 17-Desmethoxy-18-propargylreblastatin **181** zu Triazolderivat **221**; Bedingungen: ^tBuOH/THF/H₂O (1/2/3), CuBr·SMe₂, 2-Azido-1-ethylamin, 24 h, RT.

Das 2-Azido-1-ethylamin **223** musste hierfür aus dem käuflichen 2-Chlor-1-ethylamin **222** hergestellt werden.¹⁵⁰



Schema 40: Synthese von 2-Azidoethyl-amin Hydrochlorid **223**. Bedingungen: H₂O, NaN₃, 2 d, 70 °C; dann HCl, 92 %.

Die Reaktion erfolgte laut massenspektrometrischer Kontrolle mit gutem Umsatz zum gewünschten Produkt, jedoch bereitete die anschließende Isolierung der Verbindung große Schwierigkeiten, was auf der Polarität des Produktes **221** zurückzuführen ist. Es konnten nur minimale Mengen des Cycloadditionsprodukts isoliert werden, die jedoch zu gering für detaillierte NMR-spektroskopische Untersuchungen waren.

4.3.14 Biologische Aktivitäten der Geldanamycin-Derivate

Die in Kapitel 4.3 dargestellten neuen Geldanamycin-Derivate wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig von F. SASSE *et al.* auf ihre biologische Aktivität untersucht. Hierfür wurden MTT-Tests¹⁵¹ an verschiedenen humanen Krebszelllinien

¹⁵⁰ S. Blake, R. Capone, M. Mayer, J. Yang, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1614-1624

¹⁵¹ Der Nachweis der Zellvitalität beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan durch in der Zelle vorhandene Enzyme/Reduktasen.

durchgeführt. Die zum Ende dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Biologische Aktivitäten I (antiproliferative Aktivität IC₅₀ [nM] von Geldanamycin-Derivaten).

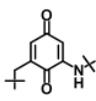
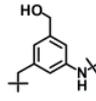
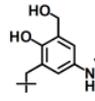
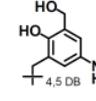
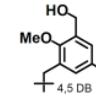
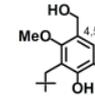
Zelllinie (Ursprung)							
KB-3-1 (Cervix-Karzinom)	53	109	470	73	123	34	>8000
U-937 (Lymphom)	9	188	93	62	142	21	2600
PC-3 (Prostata-Karzinom)	18	n.d.	300	42	118	36	2800
SK-OV-3 (Ovarial-Karzinom)	125	113	1060	54	264	46	4000
MCF-7 (Brust-Karzinom)	n.d.	38	320	18	123	120	870
A-431 (Epidermoid-Karzinom)	18	60	840	62	228	17	1900

Wie in Tabelle 1 zu sehen, zeigen vor allem das Fluor-Derivat **155** und das Brom-Derivat **97** eine biologische Aktivität ähnlich der von Geldanamycin. Für die getestete SK-OV-3-Krebszelllinie zeigt sich beim Einsatz dieser beiden Derivate sogar eine erhöhte Aktivität. Hervorzuheben ist auch, dass das Brom-Derivat **97**, welches keine zusätzlich OH-Gruppe an C-17 des Aromaten trägt, bei fast allen Tests eine um den Faktor 10 geringere biologische Aktivität besitzt. Dieser Befund kann eventuell auf eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung des oxidierten Derivats **98** zurückzuführen sein, welches dadurch stärker an Hsp90 binden kann.

Der Vergleich der beiden Methoxyderivate **106** und **107** stützt diese Hypothese leider nicht. Hier ist jedoch durch die Methoxygruppe von vornherein schon ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor vorhanden. Entscheidend für die geringere Aktivität des oxidierten Derivats könnte evtl. die Konformation sein. Das Derivat **106** ohne die Doppelbindung an C4-C5 ist flexibler und könnte somit besser in die Bindungstasche von Hsp90 passen, allerdings geht auch das Diensystem wichtige van der Waals-

Wechselwirkungen in der Bindungstasche ein.¹³ Das Pyridin-Derivat **167** zeigt leider keine Aktivität.

Tabelle 2: Biologische Aktivitäten der Benzylalkoholderivate (antiproliferative Aktivität IC₅₀ [nM] von Geldanamycin-Derivaten).

Zelllinie (Ursprung)						
L-292 (Mausfibroblasten)	n.d.	880	6380	>7000	2930	1700
KB-3-1 (Cervix-Karzinom)	53	40	850	1250	370	130
U-937 (Lymphom)	9	50	60	710	410	490
PC-3 (Prostata-Karzinom)	18	240	2280	5760	2450	690
SK-OV-3 (Ovarial-Karzinom)	125	110	990	3480	500	290
MCF-7 (Brust-Karzinom)	n.d.	90	1150	3840	n.d.	n.d.
A-431 (Epidermoid-Karzinom)	18	60	690	2200	970	420
HUVEC (humane Nabelschnurvenen Epithelzellen)	n.d.	70	380	1540	340	160

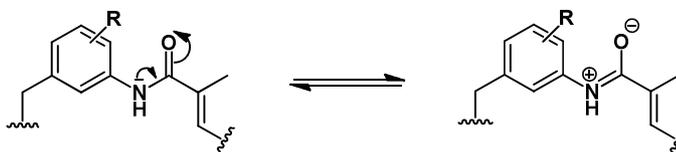
Die Ergebnisse der biologischen Aktivitäten der fünf Benzylalkohol-Derivate sind unerwartet (siehe Tabelle 2). Sie zeigen durchweg eine geringere Aktivität als Geldanamycin **1**. Evtl. hängt dies mit ungünstigen Wasserstoffbrückenbindungsgeometrien zusammen. Diese scheinen im Fall des oxidierten Derivats **197** gegenüber den einfacheren Derivaten **195** und **196** zuzunehmen. Auch in dieser Testreihe zeigt sich, dass die Aktivität abnimmt, sobald die Doppelbindung eingeführt ist und die konformative Flexibilität des Makrozyklus eingeschränkt wird, was die Vermutung aus der vorherigen Testreihe bestätigen würde. Interessanterweise zeigt die Verbindung mit einer zusätzlichen Methyl-Gruppe am C-17 wieder eine erhöhte Aktivität. Hier kann spekuliert werden, dass die Methylgruppe evtl. dafür sorgt, dass der Benzylalkohol nicht mehr frei drehbar ist, und es somit zu einer für die Bindung an das Enzym günstigeren Konformation kommt. Außerdem ist diese

Methoxygruppe laut Röntgenstrukturanalyse des Hsp90-Geldanamycin-Komplexes Akzeptor für eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lys58.¹³ Das gleiche gilt für das vollständig dekorierte Derivat **199**, wobei dieses wiederum eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-21 trägt, wie sie auch beim Dihydrogeldanamycin **14** vorhanden ist und im Falle des Dihydrogeldanamycins eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asp54 eingeht. Dies wurde über die Röntgenstrukturanalyse von Dihydrogeldanamycin im Komplex mit Hsp90 nachgewiesen.⁵⁸

Die neuen Lacton-Derivate zeigen leider keine biologische Aktivität in den durchgeführten Assays. Sie werden auf gegen weitere Targets untersucht.

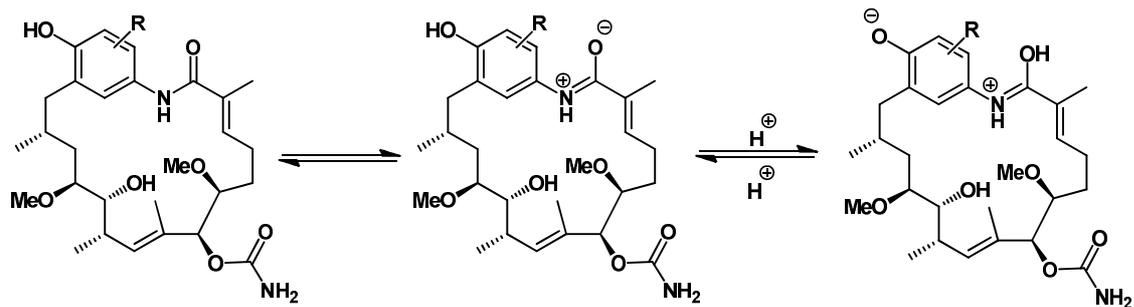
4.3.15 NMR-Analytik von Geldanamycin-Derivaten

Die NMR-Analytik der neuen Geldanamycin-Derivate bereitete Schwierigkeiten, welche sich aufgrund der Amid-Resonanz dieses Systems in breiten Signalen sowohl in den ¹H- als auch in den ¹³C-Spektren äußerte (siehe Schema 41).



Schema 41: Amid-Resonanz.

Derivate, die am Aromaten nicht oxidiert sind, wurden in den meisten Fällen in Methanl-d₄ gemessen, wobei auch hier einige Signale sehr breit waren. Vor allem die Signale von 3-H, 21-H, 4-H und 5-H waren hiervon betroffen. Sobald eine zusätzliche Oxidation am Aromaten stattgefunden hatte, wurden zusätzlich die Signale der 14-Methylgruppe sehr breit und es konnten keine Kopplungen mehr erkannt werden. Auch die ¹³C-Signale der entsprechenden Substanzen wiesen dann extrem breite Signale auf, die teilweise sehr schlecht zu erkennen waren und nur noch über HSQC- und HMBC-Messungen zugeordnet werden konnten. Der Grund für diese breiten Signale ist auf das dann Zwitterionische System zurückzuführen (siehe Schema 42).



Schema 42: Darstellung des Zwitterionischen Systems nach erfolgter Oxidation am Aromaten.

Aufgrund dieser starken Signalverbreiterungen musste ein alternatives, deuteriertes Lösungsmittel gefunden werden. So wurden CD_2Cl_2 und THF-d_8 bei verschiedenen Temperaturen getestet. Als beste Variante erwies sich nach diesen Tests THF-d_8 bei einer Temperatur von 323 K. Hierbei waren zwar in den meisten Fällen die Signale von 3-H auch noch breit, jedoch war bei den übrigen Signalen die Feinstruktur erkennbar (siehe Abbildung 48).

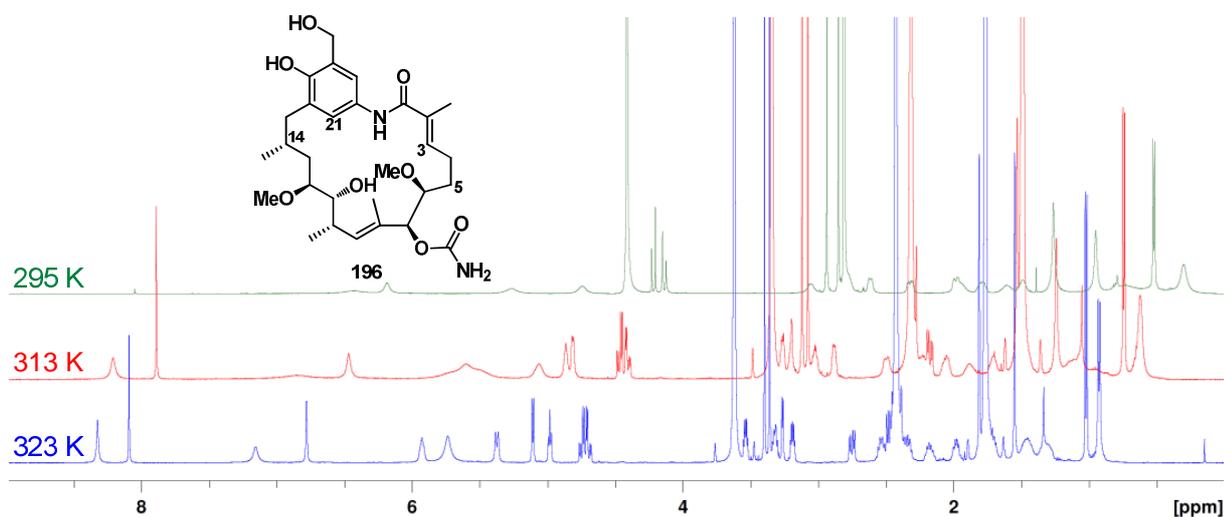


Abbildung 48: $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Geldanamycin-Derivat **196** in THF-d_8 bei verschiedenen Temperaturen.

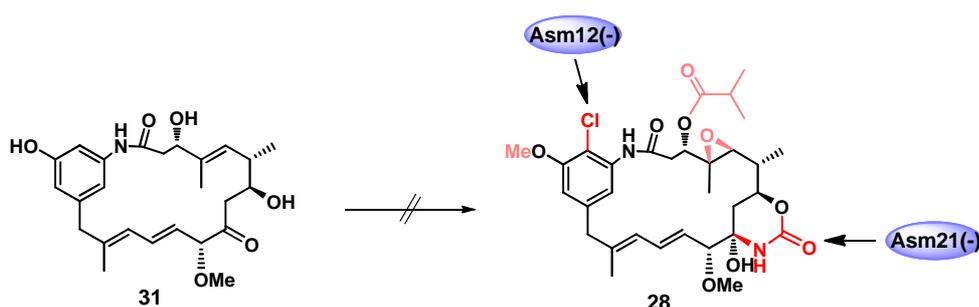
In Abbildung 48 ist deutlich zu sehen, wie sich die Signale mit zunehmender Temperatur ändern. Vor allem in Bezug auf die 14-Methylgruppe, welche ganz rechts im Bild zu sehen ist, ist die Veränderung beeindruckend. Auch im olefinischen und aromatischen Bereich zwischen 4 und 9 ppm ist deutlich zu sehen, wie eine Erhöhung der Temperatur die Signalschärfe verbessert.

4.4 Proansamitocin-Derivate durch Mutasynthese/Semisynthese

Ein weiteres Thema dieser Arbeit war die Kombination aus Semisynthese und Mutasynthese, um ausgehend von Proansamitocin neue Ansamitocin-Derivate zu generieren. Die Mutasyntheseexperimente in diesem Kapitel wurden sowohl mit der Mutante des Geldanamycinproduzenten *S. hygrosopicus* K390-61-1 wie auch mit der Mutante des Ansamitocinproduzenten *A. pretiosum* HGF073 durchgeführt.

4.4.1 Mutasynthese mit Proansamitocin, 10-*epi*-Proansamitocin und ähnlichen Strukturen

Aus früheren Arbeiten mit der *A. pretiosum* Mutante HGF073 war bekannt, dass die Verfütterung von Proansamitocin **31** zu Ansamitocin P3 **28** führt.¹⁵² Des Weiteren war mit der Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21, die von P. SPITELLER zur Verfügung gestellt wurde, die Möglichkeit gegeben, gezielt Proansamitocin in Mengen von ca. 100 mg/L fermentativ zu erhalten. Dieser Organismus ist eine im Chlorierungs- und im Carbamoylierungsschritt blockierte Deletionsmutante, was eine weitere Prozessierung durch die übrigen post-PKS-Enzyme nahezu verhindert.



Schema 43: Proansamitocin **31** und Darstellung der geblockten post-PKS-Enzyme.

Es sollte getestet werden, ob und in welcher Form die post-PKS-Enzyme der Mutante des Geldanamycin-Produzenten *S. hygrosopicus* K390-61-1 das supplementierte, dem

¹⁵² A. Meyer, M. Brünjes, F. Taft, T. Frenzel, F. Sasse, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1489-1492.

Progeldanamycin strukturell verwandte, Proansamitocin **31** und entsprechende Derivate modifiziert. Es bestand die Hoffnung, dass diese Mutante Veränderungen am aromatischen System herbeiführen würde. Dafür wurden das von A. MEYER synthetisch hergestellte 17-gliedrige Lactam **227**¹⁵³ sowie vier Proansamitocin-Derivate **31**, **224-226** ausgewählt, welche alle aus einer Fermentation der Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 isoliert wurden. In den von T. KNOBLOCH und A. SCHULZ durchgeführten Fermentationen mit der Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 stellte sich heraus, dass neben Proansamitocin **31** auch andere Fermentationsprodukte **224-226** in geringen Ausbeuten entstehen.¹³³

Die fünf im Rahmen dieser Arbeit supplementierten Derivate waren Proansamitocin **31**, 10-*epi*-Proansamitocin **224**, die zwei Alkohole **225** und **226** und das 17-gliedrige Lactam **227** (siehe Abbildung 49).

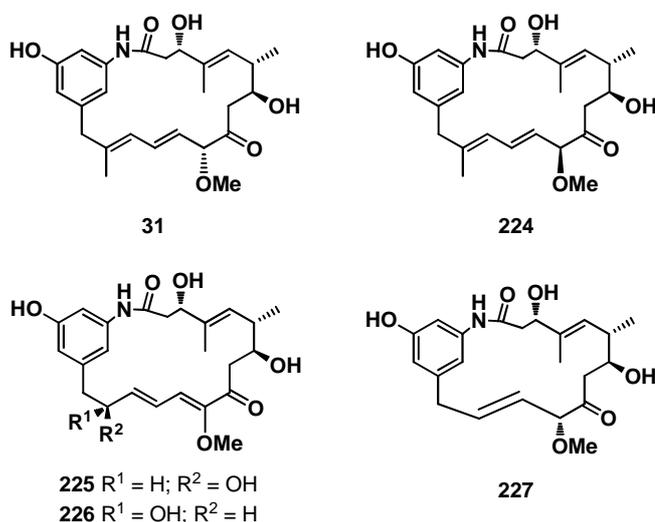


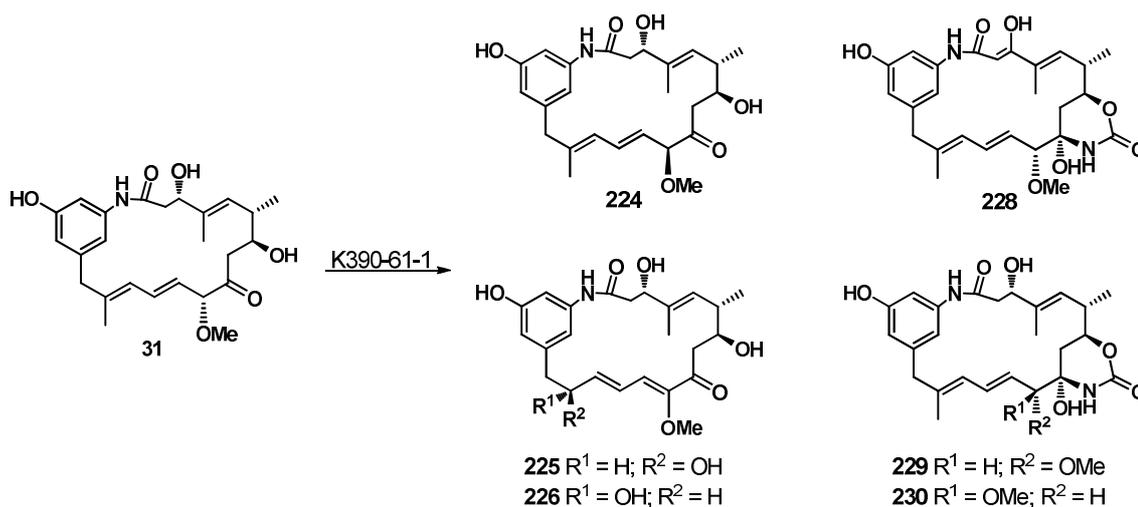
Abbildung 49: Proansamitocin **31**, 10-*epi*-Proansamitocin **224**, Alkohol **225** und **226** und 17-gliedriges Lactam **227**.

Das 10-*epi*-Proansamitocin **224** entsteht vermutlich durch eine chemische Epimerisierung bedingt durch die benachbarte Carbonylgruppe. Die beiden Alkohole **225** und **226** wurden, wie von T. KNOBLOCH beschrieben, über eine unselektive Epoxidierung mit anschließender Ringöffnung oder über eine oxidierende Lewis-Säure-vermittelte Umlagerungs-Hydratisierungs-Sequenz aufgebaut.¹³³

Diese fünf genannten Substanzen wurden in 30 mL Fermentationsansätzen verfüttert. Die Zufütterung erfolgte in diesen Fermentationen immer mittels einer Spritzenpumpe.

¹⁵³ A. Meyer, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Studien zu hybriden Ansamycin-Antibiotika - Synthese von Proansamitocin*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2006**.

Im Fall des Proansamitocins **31** wurde mit einer Ausbeute von 21 % das carbamoylierte Proansamitocin **229** erhalten. Außerdem wurde neben dem reisolierten Edukt **31**, epimerisiertes Proansamitocin **224**, carbamoyliertes 10-*epi*-Proansamitocin **230** und die beiden oben erwähnten Alkohole **225** und **226** in Spuren erhalten. Zudem wurde zusätzlich ein neues an C-3 oxidiertes, carbamoyliertes Proansamitocin **228**, das als Enol vorlag, in einer Ausbeute von 7 % isoliert.



Schema 44: Produkte der Fermentation mit Proansamitocin **31**.

Auf eine Reinigung der bereits bekannten Substanzen wurde verzichtet, so dass nur das carbamoylierte Proansamitocin **229** und das enolisierte carbamoylierte Proansamitocin **228** isoliert und vollständig charakterisiert vorliegen (siehe Abbildung 50).

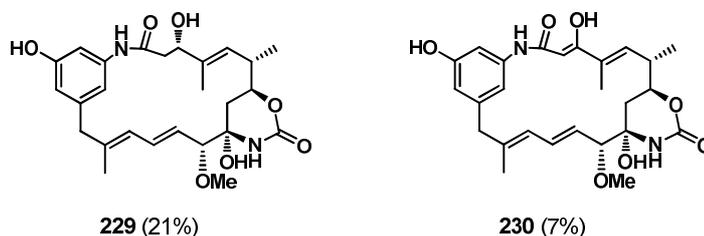
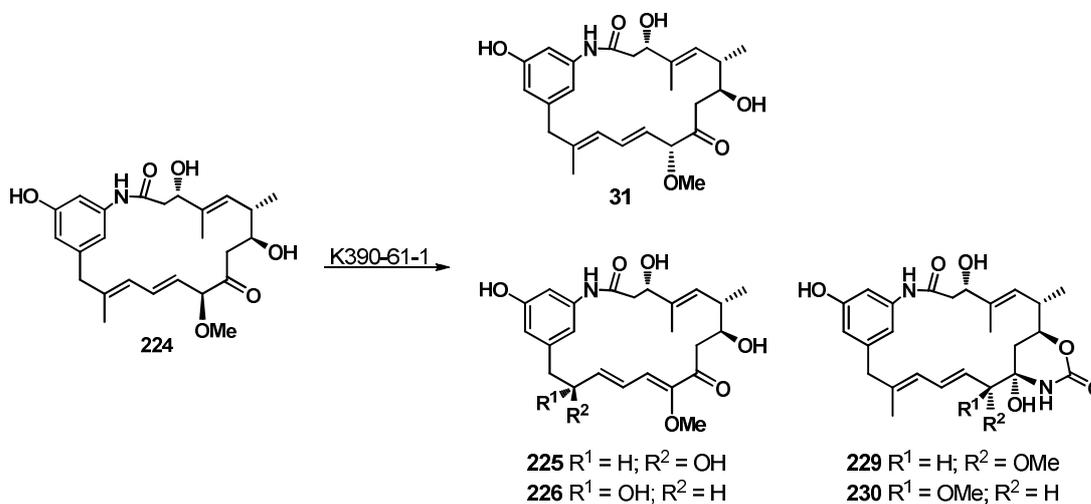


Abbildung 50: Isolierte und charakterisierte Produkte der Fermentation von Proansamitocin **31**.

Die Verfütterung des 10-*epi*-Proansamitocins **224** lieferte ein ähnliches Produktspektrum. Das Hauptprodukt aus der Zufütterung von 5 mg 10-*epi*-Proansamitocin **224** war das carbamoylierte 10-*epi*-Proansamitocin **230**, welches mit einer Ausbeute von 18% isoliert werden konnte (siehe Abbildung 51). Auch hier wurde das Edukt **224** reisoliert, sowie

Proansamitocin **31** und carbamoyliertes Proansamitocin **229** in geringen Mengen erhalten. Die beiden Alkohole **225** und **226**, sowie das an C-3 oxidierte Proansamitocin-Derivat **228** wurden nur massenspektrometrisch nachgewiesen (siehe Schema 45).



Schema 45: Produkte der Fermentation mit 10-*epi*-Proansamitocin **224**.

Es ist anzunehmen, dass die Epimerisierung unter den Fermentationsbedingungen stattfindet. Außerdem scheint das Proansamitocin **31** kinetisch stabiler zu sein, da bei der Verfütterung des *epi*-Proansamitocins **224** ca. 50 % des Edukts wieder zum Proansamitocin **31** zurück epimerisiert wurden.

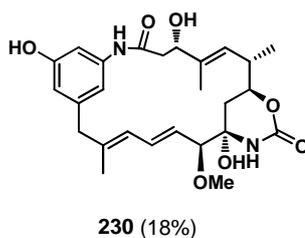


Abbildung 51: Isoliertes und charakterisiertes Produkt der Fermentation mit 10-*epi*-Proansamitocin **224**.

Von den beiden Alkoholen **225** und **226** wurden in dem einen Fall 5 mg und in dem anderen Fall 0.8 mg zugefüttert. Beide Fermentationen zeigten keinerlei Umsetzungen zu substituierten Proansamitocin-Derivaten. In beiden Fällen wurden lediglich die Edukte reisoliert.

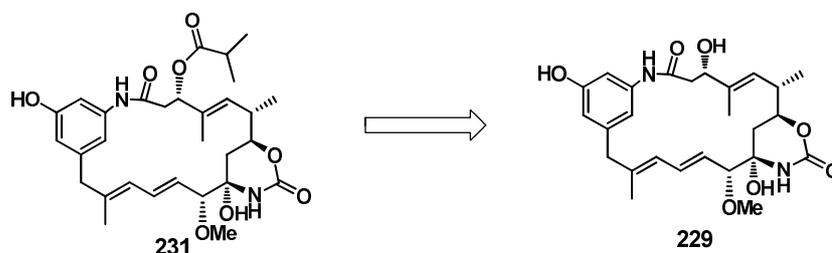
Die Verfütterung des Lactams **227**, welches einen um zwei Kohlenstoffatome kleineren 17-gliedrigen Ring aufweist, wodurch aus dem Dien-System eine einfache Doppelbindung

wird, zeigte ebenfalls keine weitere Prozessierung durch die post-PKS-Enzyme. Hier konnte nur das Edukt reisoliert werden.

Ein Grund für die negativen Ergebnisse der drei letztgenannten Fermentationen könnte die Umgebung der zu carbamoylierenden OH-Gruppe sein, oder vielmehr die lokale Konformation des Moleküls in der Umgebung der OH-Gruppe, welche sich im Fall der beiden Alkohole durch die jetzt konjugierte Carbonylgruppe deutlich ändert. Im Fall des 17-gliedrigen Lactams **227** wird die Konformation durch den kleineren Ring ebenfalls eine andere sein als im Proansamitocin **31**. Die veränderten Konformationen machen es der Carbamoyltransferase wahrscheinlich unmöglich diese Reaktionen zu katalysieren, da die Moleküle vermutlich nicht in das aktive Zentrum des Enzyms gelangen können.

4.4.2 Darstellung von carbamoyliertem Proansamitocin mit AP-3-Seitenkette

In diesem Abschnitt wird die weitere Umsetzung des carbamoylierten Proansamitocins **229** zum an C-3 veresterten carbamoylierten Proansamitocin-Derivat **231** beschrieben. In Schema 46 ist die Retrosynthese gezeigt.



Schema 46: Retrosynthese zum carbamoylierten C-3-veresterten Proansamitocin-Derivat **231**.

Dieses Produkt ist ansonsten nur über eine Blockmutante von *A. pretiosum* in geringen Ausbeuten zugänglich. Daher konnte dieses Proansamitocin-Derivat bislang nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden.¹⁵⁴ Da dieses Derivat die beiden Substituenten aufweist, die für die biologische Aktivität am wichtigsten sind, den Ester an C-3 und das Carbamat an C-7, C-9 eröffnet eine gezielte Synthese die Möglichkeit, den Einfluss dieser

¹⁵⁴ P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carroll, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236-14237.

Substituenten gezielt zu untersuchen. Hier sind zum Beispiel Variationen des Esters denkbar um SAR-Studien durchzuführen.

Um die Esterseitenkette an C-3 einzuführen, sollte zunächst das Phenol des carbamoylierten Proansamitocins **229** selektiv in den TBS-Ether überführt werden. Die selektive Silylierung von Phenolen in Gegenwart aliphatischer Alkohole sollte bei Temperaturen von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in guten Ausbeuten gelingen.¹⁵⁵ Diese Reaktion verlief jedoch unselektiv, es wurden Gemische aus doppelt geschütztem, einfach geschütztem Produkt und Edukt **229** erhalten. Aufgrund dieser Ergebnisse musste eine andere Strategie gefunden werden. Es wurde entschieden beide Alkohole, also den Alkohol an C-3 und das Phenol an C-18, zu acylieren und anschließend den phenolischen Ester selektiv zu verseifen.

In der Literatur sind zwei Beispiele für Veresterungen des Alkohols an C-3 im Ansamitocin mit Carbonsäuren beschrieben.^{156,157} Die Ausbeuten in der Literatur liegen jedoch mit 20-60 % im unteren Bereich. Als Kupplungsreagenzien wurden dabei zum einen DCC und 4-DMAP benutzt,¹⁵⁶ und zum anderen DCC und ZnCl_2 .¹⁵⁷ Aufgrund der mäßigen Ausbeuten wurde nicht auf die Vorschriften aus der Literatur zurückgegriffen, sondern auf eine von K. HARMROLFS in ihrer Dissertation verwendete Veresterung mit der Reagenzkombination DIC/DMAP.¹³⁴ Unter diesen Bedingungen wurde der Diester **232** in guten Ausbeuten von 84 % erhalten.

Anschließend musste das Phenol selektiv entschützt werden, um ein aktives Proansamitocin-Derivat **231** zu erhalten. Eine Herausforderung bei der Entschätzung unter basischen Bedingungen ist es, die Eliminierung des Esters an C-3 zu vermeiden, da diese Gruppe schon unter milden basischen Bedingungen ($\sim \text{pH } 9$) zur Eliminierung neigt.¹⁵⁸ Für die gewünschte Umsetzung wurden zwei Reaktionsbedingungen in Betracht gezogen. Zum einen eine Phenol-Entschätzung mit 1M NaHCO_3 in CH_3OH ¹⁵⁹ und zum anderen eine Entschätzung mit Pyrrolidin.¹⁶⁰ Es wurde entschieden, die Entschätzung mit 1M NaHCO_3 zuerst an einem Modellsystem zu testen, da das doppelt acylierte Proansamitocin-Derivat **232** nur in

¹⁵⁵ T. Saito, T. Suzuki, M. Morimoto, C. Akiyama, T. Ochiai, K. Takeuchi, T. Matsumoto, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11633-11644.

¹⁵⁶ A. Kawai, H. Akimoto, Y. Kozai, K. Ootsu, S. Tanida, N. Hashimoto, H. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3441-3451.

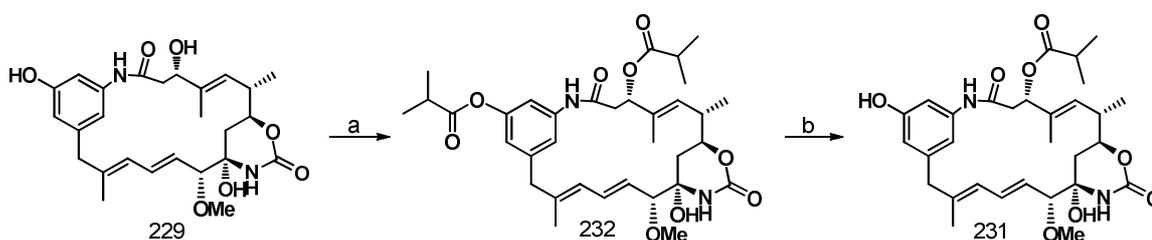
¹⁵⁷ W. C. Widdison, S. D. Wilhelm, E. E. Cavanagh, K. R. Whiteman, B. A. Leece, Y. Kovtun, V. S. Goldmacher, H. Xie, R. M. Steeves, R. J. Lutz, R. Zhao, L. Wang, W. A. Blättler, R. V. J. Chari, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392-4408.

¹⁵⁸ S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, R. G. Dailey, V. A. Zimmerly, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3706-3708.

¹⁵⁹ G. Buchi, S. M. Weinreb, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 746-752.

¹⁶⁰ F. Lu, J. Ralph, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3681-3694.

geringen Mengen verfügbar war. Als Modellsystem wurde Ansamitocin P-2 gewählt, welches in Methanol gelöst und mit 1M NaHCO₃ versetzt wurde. Diese Mischung wurde insgesamt 24 h gerührt. Es wurden regelmäßige massenspektrometrische Kontrollen durchgeführt um sicherzugehen, dass die Estergruppe an C-3 unter diesen Bedingungen nicht eliminiert. Da dies nicht der Fall war, wurde diese Variante der Entschützung gewählt und auf das doppelt acylierte Proansamitocin-Derivat **232** angewendet. Die Reaktion verlief sehr sauber und es wurde das C-3-acylierte Proansamitocin-Derivat **231** in sehr guten Ausbeuten von 95 % erhalten (siehe Schema 47). Die Entschützungsvariante mit Pyrrolidin wurde aufgrund der sehr guten Resultate mit NaHCO₃ nicht mehr getestet.



Schema 47: Synthese von carbamoyliertem C-3-veresterten Proansamitocin **231**. Bedingungen: a) CH₂Cl₂, DMAP, DIC, *iso*-Buttersäure, 1 h, RT, **84 %**; b) CH₃OH, NaHCO₃, 3 h, RT, **95 %**.

Durch diese in guten Ausbeuten verlaufende Veresterungs-/Entschützungssequenz kann ein breites Spektrum von verschiedensten Esterseitenketten in Proansamitocin-Derivate eingebracht werden, wodurch eine Bibliothek an unterschiedlichen Seitenketten für SAR-Studien erstellt werden kann.

4.4.3 Darstellung von Proansamitocin-Derivaten mit nicht zyklischem Carbamat

In diesem Kapitel werden Veränderungen am C-9-Carbonyl von Proansamitocin **31** durchgeführt und in anschließenden Fermentation untersuchen, wie flexibel die *post*-PKS-Enzyme vom Geldanamycin-Produzenten *S. hygroscopicus* bzw. vom Ansamitocin-Produzenten *A. pretiosum* bezüglich des Substrates sind. Insbesondere sollte getestet werden, ob die beiden mutierten Organismen in der Lage sind, auch an dem System, welches jetzt ein 1,3-Diol an C-7, C-9 aufweist, die wichtige Amidinyl-Gruppe zu installieren. Hierfür wurden drei Moleküle ausgewählt. Zum einen die beide 1,3-Diole **233** und **234** und zum anderen 9-Methyl-Diol **235** (siehe Abbildung 52).

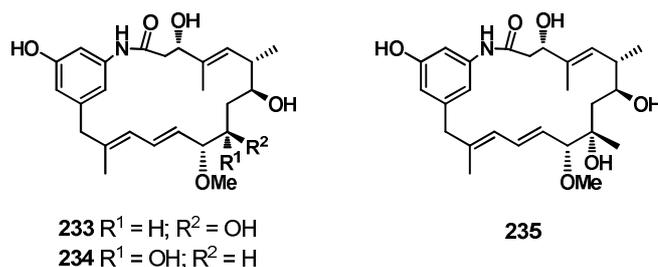
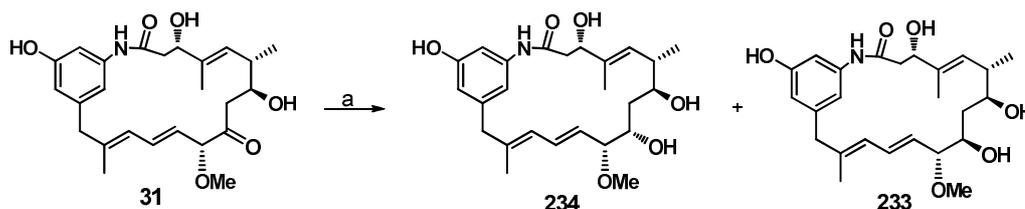


Abbildung 52: 1,3-*anti*-Diol **233**, 1,3-*syn*-Diol **234** und 9-Methyl-Diol **235**.

Das 9-Methyl-diol **235** wurde für die entsprechenden Fermentationsversuche von F. TAFT zur Verfügung gestellt.¹⁶¹ Es wurde ausgehend von Proansamitocin **31** über TBS-Schätzung und Methylgrignard-Addition hergestellt. Dabei bildete sich selektiv das 1,3-*anti*-Diol.

Um die beiden Diole **233** und **234** zu erhalten, wurden mehrere Reaktionsbedingungen erprobt (siehe Schema 48).



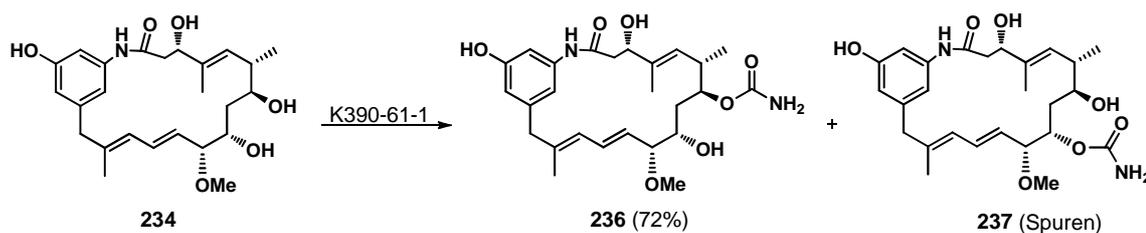
Schema 48: Synthese zu 1,3-*anti*-Diol **234** und 1,3-*syn*-Diol **233**. Bedingungen: a) THF, (*S*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin, BH₃·SMe₂, -40 °C, 2 h, **57** %; oder THF, (*R*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin, BH₃·SMe₂, -40 °C, 2 h, **86** %; oder THF, LiBH₄, -78 °C, 1.5 h, **94** %.

Es war geplant, das 1,3-*anti*-Diol **234** aufgrund der dem Naturstoff AP-3 **28** entsprechenden Stereochemie zu synthetisieren. Erste Versuche mit (*S*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin und Boran führten zu einer Selektivität von 8:1 (*anti*:*syn*). Die Ausbeuten lagen für diese Umsetzung lediglich bei 57 %. Es kam zur Bildung von Nebenprodukten, auf die später noch näher eingegangen wird. Ein Versuch, die Reaktion mit (*R*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin zu wiederholen, um die Selektivität zu verändern, ergab ein ähnliches Ergebnis und zwar mit einer Selektivität von 5:1 (*anti*:*syn*) bei einer Ausbeute von 86 %. Das CBS-Reagenz ist hier nicht in der Lage eine Reagenz-kontrollierte Stereoinduktion herbeizuführen; die Umsetzung scheint in diesem Fall durch die Konformation und globale Stereochemie des Makrozyklus vorbestimmt zu werden.

¹⁶¹ Florian Taft, *unveröffentlichte Ergebnisse*, 2009.

Aufgrund der geringen Ausbeute bei der CBS-Reduktion und der mäßigen Reagenzkontrolle, wurde die Reduktion mit LiBH_4 untersucht. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurden mit einer guten Ausbeute von 94% und einer Selektivität von 3:1 (*anti:syn*) die beiden Alkohole 1,3-*anti*-Diol **234** und 1,3-*syn*-Diol **233** erhalten. Mechanistisch sollte die Reduktion mit LiBH_4 bevorzugt das 1,3-*syn*-Diol liefern,¹⁶² jedoch überwiegt auch hier die Substratkontrolle. Da nun beide Alkohole verfügbar waren und auch chromatographisch getrennt werden konnten, wurde entschieden, beide Diole separat in der Fermentation mit der AHBA(-)-Mutante von *S. hygrosopicus* einzusetzen.

Im Falle des 1,3-*anti*-Diols **234** wurden in zwei 30 mL Fermentationsansätzen 5 mg über eine Spritzenpumpe zugefüttert. Die Umsetzung verlief in einer guten Ausbeute von 72 % zu dem an C-7 carbamoylierten Produkt **236**. Außerdem konnte Edukt **234** reisoliert und Spuren eines wahrscheinlich an C-9 carbamoylierten Proansamitocin-Derivats **237** massen-spektrometrisch nachgewiesen werden; jedoch waren die Mengen hier zu gering, um dies zweifelsfrei bestimmen zu können (siehe Schema 49).



Schema 49: Fermentation mit 1,3-*anti*-Diol **234**.

Die Fermentation von *syn*-Diol **233** wurde im gleichen Maßstab durchgeführt und lieferte ebenfalls das an C-7 carbamoylierte Derivat **238** als Hauptprodukt, jedoch nur in einer Ausbeute von 60 % (siehe Schema 50). In dieser Fermentation konnte kein Edukt **233** reisoliert und kein an C-9 carbamoyliertes Produkt gefunden werden, jedoch ein neben der Carbamoylierung zusätzlich an C-3 oxidiertes β -Keton **239**, welches bevorzugt in der Enolform vorlag. Dieses Produkt wurde in einer Ausbeute von 18 % erhalten und konnte vollständig charakterisiert.

¹⁶² S. E. Bode, M. Wolberg, M. Müller, *Synthesis* **2006**, 557-588.

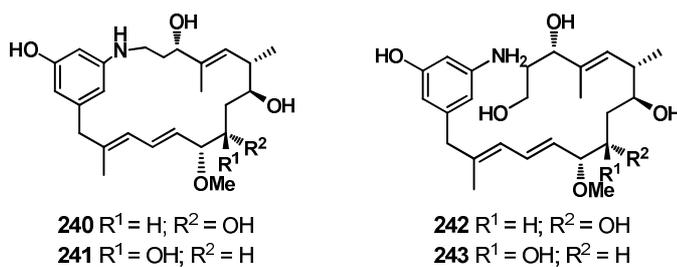
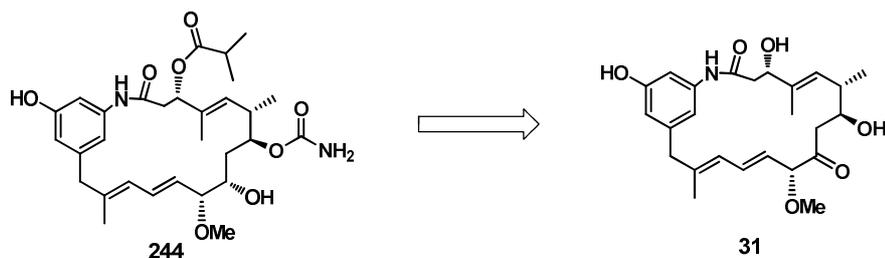


Abbildung 53: Nebenprodukte der CBS-Reduktionen.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Verfütterungsexperimenten der Diole **234** und **233** sollte das Diol **234** unter NaBr-Zugabe an den Ansamitocin-Produzenten verfüttert werden. Durch die Zugabe von NaBr zur Fermentationsbrühe soll die Halogenase, welche unter normalen Umständen die Chlorierung an C-19 des Aromaten durchführt, stimuliert werden dort ein Bromatom zu installieren. Zwar wurde bereits bei der Supplementierung des 1,3-*anti*-Diols **234** kein chloriertes Derivat detektiert¹³⁴, dennoch bestand die Hoffnung, dass durch einen Überschuss von NaBr die Halogentransferase stimuliert werden könnte. Leider fand keine Bromierung statt und es wurden die gleichen Derivate wie in der Fermentation ohne NaBr erhalten.

4.4.4 Darstellung von acylierten Proansamitocinen mit nichtzyklischen Carbamaten

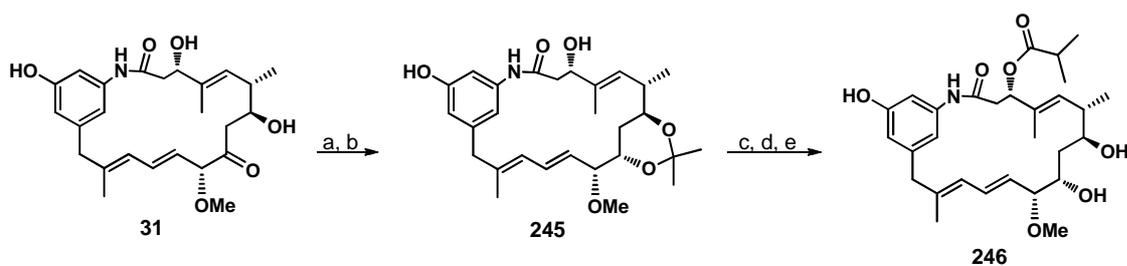
Aufgrund der Tatsache, dass die 1,3-Diole von beiden Blockmutanten umgesetzt wurden, sollte im Folgenden eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt neben der biologisch wichtigen Carbamat-Einheit an C-7 auch noch die biologisch wichtige Esterseitenkette an C-3 einzuführen. Zuerst musste also ein Diol mit Esterseitenkette synthetisiert werden, welches anschließend durch die beiden Organismen carbamoyliert und eventuell durch weitere post-PKS-Enzyme noch anderweitig verändert werden konnte (siehe Schema 51). Dieses dann zusätzlich carbamoylierte Produkt sollte in SAR-Studien eingesetzt werden, um zu untersuchen, wie sich nicht zyklische Carbamate beim Proansamitocin auf die biologische Aktivität auswirken. Es wurde das 1,3- *anti*-Diol gewählt, da dieses die gleiche Stereochemie der Hydroxygruppen an C-7 und C-9 aufweist, wie im Naturstoff AP-3 **28**.



Schema 51: Retrosynthese zum nicht zyklischen, carbamoylierten an C-3-veresterten Proansamitocin-Derivat **244**.

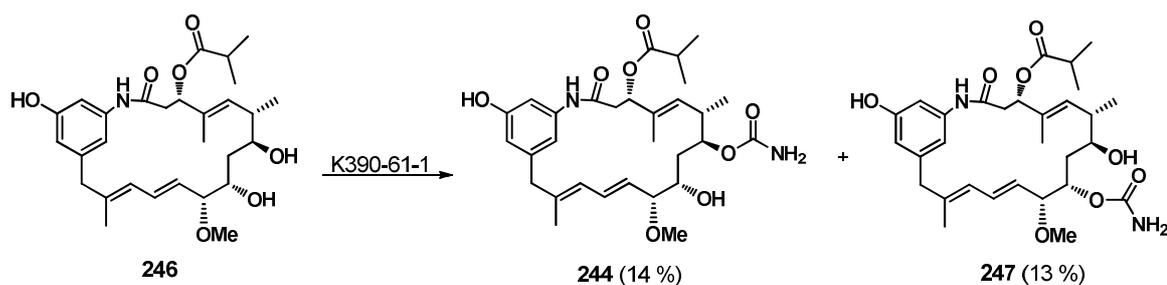
Hierfür wurde Proansamitocin **31** wie oben beschrieben mit LiBH_4 reduziert. Nach der Trennung der Diastereomere über präp. HPLC wurde das 1,3-*anti*-Diol **234** in guten Ausbeuten von 90 % als Acetonid geschützt. Das so erhaltene 1,3-*anti*-Acetonid **245** wurde schließlich über die in Kapitel 4.4.2 beschriebene Veresterung zweifach mit der P-3-Seitenkette (Isobuttersäure) acyliert. Diese Reaktion verlief auch mit diesem Substrat in guten Ausbeuten von 90 %. Anschließend musste das Acetonid entfernt werden, was mit PPTS in wasserfreiem CH_3OH gelang, die Ausbeute lag hier bei 88 %. Die Verwendung von absolutem, trockenem Lösungsmittel ist hierbei sehr wichtig.

Um das Mutasynton **246** für die anschließende Fermentation zu erhalten, musste das Phenol wieder frei gesetzt werden. Dies gelang mit der ebenfalls im Kapitel 4.4.2 vorgestellten Entschützungsvariante mit NaHCO_3 in CH_3OH in sehr guten Ausbeuten von 91 % (siehe Schema 52).



Schema 52: Synthese von C-3-verestertem Proansamitocin-Derivat **246**. Bedingungen: a) THF, LiBH_4 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 h, **94** %; b) Dimethoxypropan, CH_2Cl_2 , PPTS, 2 h, RT, **90** %; c) CH_2Cl_2 , DMAP, DIC, *iso*-Buttersäure, 1 h, RT, **90** %; d) CH_3OH , PPTS, 5 h, RT, **88** %; e) CH_3OH , NaHCO_3 , 3h, RT, **91** %.

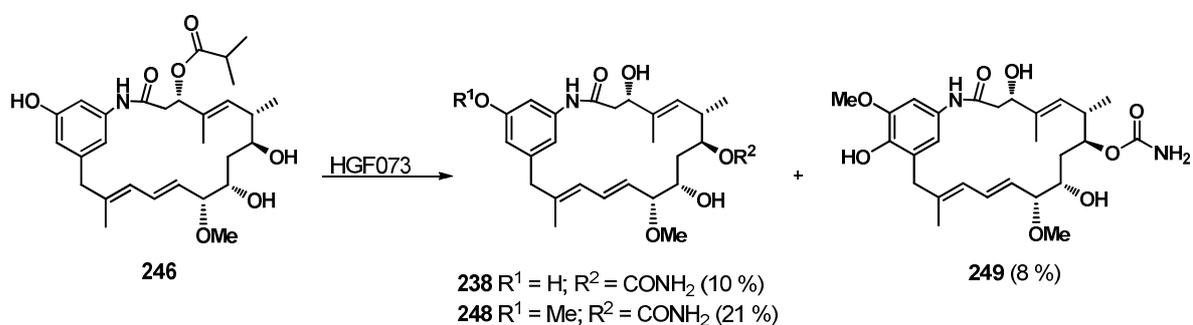
Das synthetisierte Proansamitocin-Derivat **246** wurde anschließend sowohl an die AHBA(-)-Mutante des Geldanamycin-Produzenten, als auch an die entsprechende Mutante des Ansamitocin-Produzenten verfüttert. Im Fall der Verfütterung an die AHBA(-)-Mutante von *S. hygroscopicus* wurde in geringen Ausbeuten das an C-7 carbamoylierte Produkt **244** (14%) sowie das an C-9 carbamoylierte Produkt **247** (13%) erhalten (siehe Schema 53).



Schema 53: Fermentation mit an C-3-verestertem Proansamitocin-Derivat **246** mit der Mutante K390-61-1.

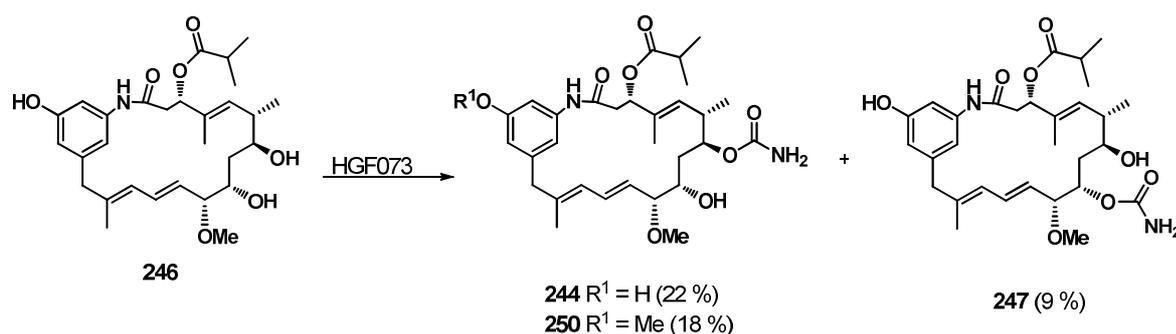
Außerdem wurde das Edukt **246** zu 60 % reisoliert. Im Vergleich zu dem nicht veresterten 1,3-*anti*-Diol-Derivat **234** ist zu sagen, dass die Carbamoyltransferase bei Anwesenheit der Esterseitenkette an C-3 zum einen weniger produktiv und zum anderen weniger selektiv ist. Wahrscheinlich spielt die sterische Hinderung eine große Rolle, da die Carbamoylierung an C-7 schlechter abläuft, dafür jedoch mehr C-9-Carbamat gebildet wird.

Die Verfütterung des an C-3 veresterten 1,3-*anti*-Diols **246** an die AHBA(-)-Mutante von *A. pretiosum* lieferte ein sehr breit gefächertes Produktspektrum. Es wurden mehrere Derivate erhalten, die keine Seitenkette mehr trugen, was bedeutet, dass es unter den Fermentationsbedingungen zur Hydrolyse des Esters gekommen war. Diese Beobachtung kann nur auf eine Umsetzung durch den Organismus zurückzuführen sein, da die Fermentation bei neutralem pH-Wert erfolgt. Zwei der Produkte ohne Esterseitenkette wurden an C-7 carbamoyliert. Diese beiden Substanzen sind die gleichen wie sie in der Fermentation von 1,3-*anti*-Diol **234** erhalten wurden¹³⁴ (siehe Kapitel 4.4.3). Zudem wurde ein nicht-carbamoyliertes Derivat **249** ohne Esterseitenkette gefunden, welches aber zusätzlich *O*-methyliert war und noch dazu eine phenolische Funktion an C-17 aufwies.



Schema 54: Fermentation mit C-3-verestertem Proansamitocin-Derivat **246** mit der Mutante HGF073 I.

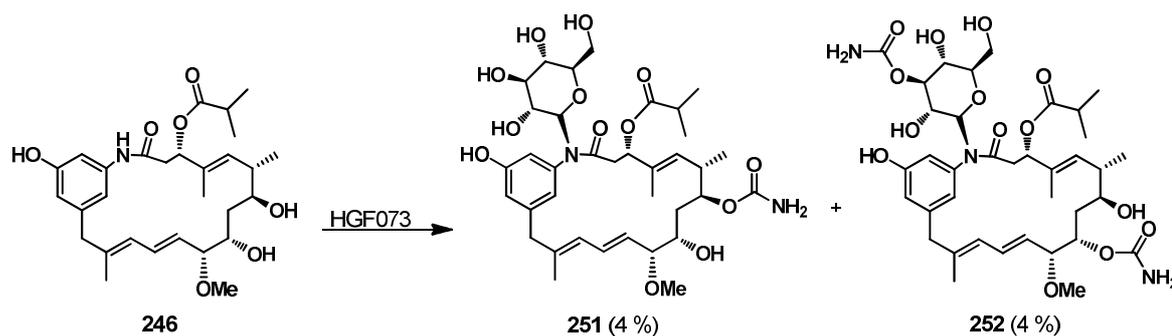
Neben den erwähnten Derivaten ohne Esterseitenkette an C-3, wurden auch die erwarteten Derivate gefunden, die sowohl den Ester an C-3, als auch das Carbamat an C-7 aufwiesen. Ein Derivat **250** war zusätzlich *O*-methyliert. Zudem wurde auch in dieser Fermentation ein an C-9 carbamoyliertes Produkt **247** isoliert. Die Ausbeute des an C-9 carbamoylierten Produkts **247** lag mit 9 % unter der des an C-7 carbamoylierten Produkts **244**, welche bei 22 % lag. Auch im Fall des Ansamitocin-Produzenten scheint also die Selektivität der Carbamoyltransferase bei vorhandener Seitenkette an C-3 stark abzunehmen.



Schema 55: Fermentation mit C-3-veresterten Proansamitocin-Derivat **246** mit der Mutante HGF073 II.

Des Weiteren wurden noch zwei glycosylierte Derivate gefunden: Sie unterscheiden sich durch die Carbamoylierung, welche in dem einen Derivat **252** an C-9 und in dem anderen Derivat **251** an C-7 stattgefunden hat. Außerdem war in dem an C-9 carbamoylierten Produkt **252** zusätzlich noch ein weitere Carbamat-Gruppe vorhanden. Vermutlich war einer der Alkohole der Glukose carbamoyliert. Da in diesen beiden Fällen zu wenig Substanz für eine detaillierte ^{13}C -NMR-Analytik vorhanden war, musste auf Vergleichsspektren zurückgegriffen werden, um so die Position der C-7 bzw. C-9 Carbamoyl-Gruppe festzulegen. Außerdem mussten auch in Bezug auf die Zucker Vergleichsspektren herangezogen werden. Hierfür boten sich Ergebnisse von T. KNOBLOCH an, der auch im Rahmen seiner Arbeiten glycosylierte Ansamitocin-Derivate isolierte.¹⁶³ Durch ^{13}C -NMR-Analytik konnte er belegen, dass sich das Glycosid am Amid-Stickstoffatom befindet und dass die 3-Position des Zuckers das zusätzliche Carbamat trägt. Auch in der Literatur werden *N*-glycosylierte Derivate von Ansamitocin beschrieben.^{163,164} Es kann also vermutet werden, dass hier eine vergleichbare Struktur vorliegt; ein *N*-Glycosid das zusätzlich an C-3' der Glucose carbamoyliert ist.

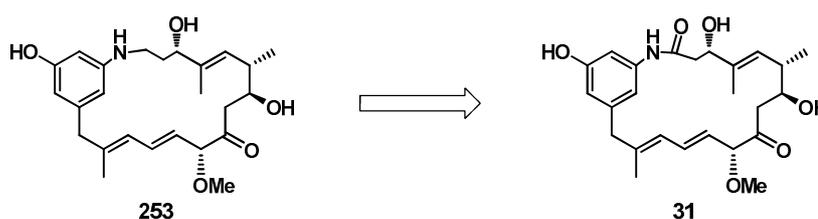
¹⁶³ a) J. Ma, P.-J. Zhao, Y.-M. Shen, *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 670-673; b) C. Lu, L. Bai, Y. Shen, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 348-350.



Schema 56: Fermentation mit C-3-verestertem Proansamitocin-Derivat **246** mit der Mutante HGF073 III.

4.4.5 Darstellung von C-1 reduziertem Proansamitocin

In diesem Kapitel wird die Generierung eines Amin-Proansamitocins **253** beschrieben, welches anschließend in einer Fermentation eingesetzt werden sollte, um zu testen, welche post-PKS-Enzyme das Substrat weiter modifizieren. Zudem stellt dieses Intermediat ein interessantes Derivat für SAR-Studien dar, da mithilfe dieses Substrates in biologischen Tests Rückschlüsse auf die Bedeutung des Amids gezogen werden können. Die Idee zu diesem Molekül gaben die Nebenprodukte der CBS-Reduktion am Proansamitocin **31**. Die Retrosynthese ist in Schema 57 dargestellt.



Schema 57: Retrosynthese zum Amin-Proansamitocin-Derivat **253**.

Formal muss bei der Realisierung der abgebildeten Retrosynthese das Amid selektiv in Gegenwart des Ketons an C-9 reduziert werden. Da dies chemisch nicht zu realisieren ist,

¹⁶⁴ C. E. Snipes, D. O. Duebelbeis, M. Olson, D. R. Hahn, W. H. Dent, J. R. Gilbert, T. L. Werk, G. E. Davis, R. Lee-Lu, P. R. Grauper, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1578-1581.

muss entweder das Keton geschützt werden oder nach Erzeugung des Amins durch Oxidation regeneriert werden.

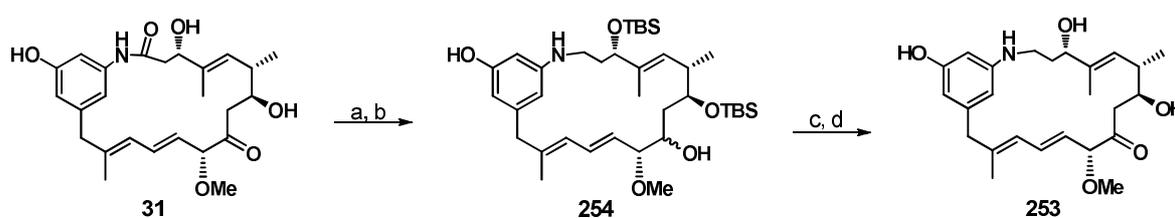
Erste Überlegungen führten dazu, die Carbonylgruppe an C-9 als Acetal zu schützen, um anschließend die Reduktion durchführen zu können. Daraufhin sollte die Carbonylgruppe freigesetzt werden.¹⁶⁵ Die Umsetzung zum Acetal verlief jedoch in sehr geringen, nicht reproduzierbaren Ausbeuten. Ein Problem dieser Umsetzung war, dass unter den sauren Bedingungen wahrscheinlich der Alkohole an C-7 eliminiert und danach in einer MICHAEL-Addition MeOH addiert. Hinweise auf einen solchen Prozess wurden in massenspektrometrischen Untersuchungen gefunden. Da die Entschützung des Acetals unter den gleichen Reaktionsbedingungen ablaufen würde, und es dann auch wieder zu einer Eliminierung mit anschließender MICHAEL-Addition kommen könnte, wurde von dieser Strategie Abstand genommen.

Ein alternativer Zugang zum Amin-Proansamitocin **253** ist eine Schützungs-Reduktions-Oxidations-Entschützens-Sequenz. Für die Realisierung dieser Strategie mussten zuerst alle Alkohole des Proansamitocins **31** geschützt werden. Hierfür wurden sowohl die TES- wie auch die TBS-Schützung in Betracht gezogen. Beide Silylierung konnten in guten Ausbeuten über 90 % realisiert werden.

Die anschließende Reduktion zum Amin sollte nun analog zur CBS-Reduktion mit BH_3 realisiert werden. Hierfür wurde das TES-geschützte Proansamitocin bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ mit dem Boran gerührt. Diese Umsetzung führte lediglich zur Reduktion der Carbonylgruppe an C-9, jedoch nicht zum gewünschten Amin. Auch eine Temperaturerhöhung und die Verlängerung der Reaktionszeit lieferte nicht das gewünschte Produkt. Es wurde entschieden die Reduktion mit NaBH_4 durchzuführen. Da die TES-Schutzgruppen für diese Reduktion zu instabil waren, wurde auf das TBS-geschützte Proansamitocin zurückgegriffen. Eine erste Umsetzung mit NaBH_4 lieferte Ausbeuten um die 15 %, sowie ein breites Produktspektrum. Zum einen wurde ein an C-9 reduziertes einfach TBS-entschütztes Proansamitocin-Derivat erhalten, außerdem wurde ein zweifach TBS-entschütztes an C-9 reduziertes Proansamitocin-Derivat, ein an C-9 reduziertes zweifach TBS-entschütztes Amin-Proansamitocin, sowie das gewünschte Produkt **254** isoliert. Die Reduktion wurde in diesen Fällen wie folgt durchgeführt: Das Edukt, welches in Benzol gelöst war, wurde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zu einer Lösung von NaBH_4 in Diethylether getropft und anschließend wurde bei RT mehrere Stunden gerührt. Die Zeit spielte bei dieser Umsetzung keine große Rolle, denn auch wenn die Reaktion über 16 h bei RT rührte, ergab

¹⁶⁵ E. Wenkert, T. E. Goodwin, *Synth. Comm.* **1977**, 7, 409-415.

sich das gleiche Produktspektrum. Eine leichte Ausbeuteerhöhung ergab schließlich die Erhöhung der Temperatur nach dem Zusammengeben. Die Zusammenführung der beiden Reagenzien erfolgte wieder bei 0°C, nur wurde anschließend 30 min unter Rückfluss auf 50 °C erhitzt. Mit dieser Variante konnte die Ausbeute auf 26 % erhöht werden. Außerdem ist zu sagen, dass das C-9 reduzierte, Phenol-entschützte Derivat auch noch einmal für die Reduktion genutzt werden könnte, was die Ausbeute steigern sollte. Auch in der entsprechenden Literatur werden solche Umsetzungen als schwierig und mit schlechten Ausbeuten beschrieben.¹⁶⁶ Das so erhaltene Diastereomergemisch wurde anschließend in einem Testansatz mit DMP zum Keton oxidiert und auch die abschließende Entschützung mit TBAF konnte erfolgreich massenpektrometrisch nachgewiesen werden (siehe Schema 58). Für den Abschluss dieser Mutasynthese steht jetzt noch das *Scale-up* dieser Reaktionen und die erfolgreiche Verfütterung an die beiden Mutanten aus.

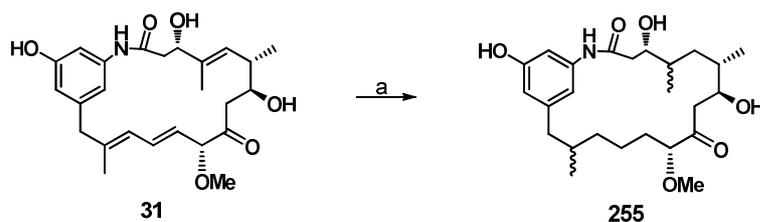


Schema 58: Synthese von Amin-Proansamitocin **253**. Bedingungen: a) CH_2Cl_2 , 2,6-Lutidin, TBSOTf, RT, 2 h, **92 %**; b) LiAlH_4 , Et_2O , 20 min, 45 °C, **26 %**; c) CH_2Cl_2 , DMP, NaHCO_3 , 1 h, RT, **nur MS**; d) THF, TBAF, 6 h, RT, **nur MS**.

4.4.6 Darstellung von hydriertem Proansamitocin

Eine andere Möglichkeit, den Ring von Proansamitocin zu verändern, stellt die katalytische Hydrierung dar. Dieses hydrierte Proansamitocin kann zum einen untersucht werden, inwieweit die post-PKS-Enzyme der beiden Produzenten das jetzt gesättigte und somit flexiblere Substrat dekorieren. Zum anderen können über biologische Tests Rückschlüsse auf den Einfluss eines starren oder flexiblen Substrats gezogen werden. Die Hydrierung, welche mit Pd/C als Katalysator durchgeführt wurde, lieferte in guten Ausbeuten jedoch mit geringer Stereoselektivität vier Diastereomere des hydrierten Proansamitocins, wobei ein Diastereomer nur in Spuren gebildet wurde (siehe Schema 59).

¹⁶⁶ B. H. Lee, M. F. Clothier, S. S. Johnson, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *11*, 553-554.



Schema 59: Darstellung von hydriertem Proansamitocin. Bedingungen: CH₃OH, Pd/C, H₂, 24 h, RT, **39%** (Hauptdiastereomer).

Weiterhin gibt es ein Hauptdiastereomer welches in einer Ausbeute von 39 % isoliert werden konnte und zwei Diastereomere, die zu gleichen Teilen entstanden waren; nämlich jeweils zu 19 %. Leider scheiterten Kristallisationsversuche und so konnten die Substanzen den entsprechenden Strukturen nicht zugeordnet werden.

Trotz der unzureichenden Strukturaufklärung wurde das oben erwähnte Hauptdiastereomer in einem Testansatz der Mutante des Ansamitocin-Produzenten *A. pretiosum* zugefüttert. In ersten massenspektrometrischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass nur das carbamoylierte Derivat **256** entstanden war (siehe Schema 60).

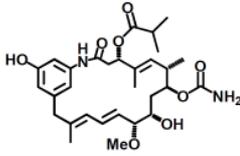
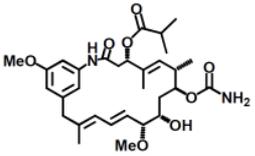


Schema 60: Testfermentation mit hydriertem Proansamitocin **255**.

4.4.7 Biologische Aktivitäten der Proansamitocin-Derivate

Die in Kapitel 4.4 dargestellten neuen Ansamitocinderivate wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig von F. SASSE *et al.* auf ihre biologische Aktivität untersucht. Hierfür wurden MTT-Tests¹⁵¹ an verschiedenen humanen Krebszelllinien durchgeführt. Die zum Ende dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Biologische Aktivitäten der Proansamitocin-Derivate (antiproliferative Aktivität IC₅₀ [nM]) von Ansamitocin-Derivate.

Zelllinie (Ursprung)	Ansamitocin P-3		
L-929 (Maus- fibroblasten)	0.2	>7000	>7000
KB-3-1 (Cervix- Karzinom)	0.17	>3497	3497
U-937 (Lymphom)	0.0055	n.d.	n.d.
PC-3 (Prostata- Karzinom)	0.055	>7000	>7000
SK-OV-3 (Ovarial- Karzinom)	0.047	>7000	4016
A-431 (Epidermoid- Karzinom)	0.079	>7000	5937
HUVEC (humane Nabelschnurvenen- Epithelzellen)	n.d.	>7000	4365

Die Ergebnisse der biologischen Tests zeigen, dass die Proansamitocin-Derivate **244** und **250**, die beide ein nicht zyklisches Carbamat an C-7 tragen nicht zytotoxisch sind. Beide Derivate zeigen trotz eingeführter Isobutyryl-Seitenkette an C-3, die beim Ansamitocin P-3 **28** entscheidend für die Aktivität ist, keine biologische Aktivität. Ein Grund für die Inaktivität könnte die Konformation der rechten Hemisphäre des Moleküls sein, wo im Naturstoff AP-3 **28** ein 6-Ring-Carbamat vorliegt. In den beiden Derivaten **244** und **250** liegt hier ein offenkettiges Carbamat vor, welches in beiden Fällen an C-7 gebunden ist. Die für die biologische Aktivität wichtige Hydroxygruppe an C-9 liegt in beiden Derivaten mit der richtigen Stereochemie vor. Es ist also festzuhalten, dass die 6-Ring-Konformation wichtig für die biologische Aktivität ist, da sie die Hydroxygruppe an C-9 in eine ganz bestimmte Stellung bringt. Die offenkettigen Carbamat-Varianten hingegen scheinen diese räumliche Struktur nicht annehmen zu können und sind daher inaktiv.

4.4.8 NMR-Analytik der Proansamitocin-Derivate

Nachdem das Proansamitocin **31** sowohl semisynthetisch wie auch mutasynthetisch verändert vorlag, zeigten sich in den meisten NMR-Spektren zwei Konformere.

Die Tatsache, dass zwei Konformationen in den entsprechenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen zu sehen sind liegt daran, dass das Molekül in Lösung zwei langlebige Konformationen einnehmen kann. Diese langlebigen Konformationen verhalten sich in NMR-Messungen wie zwei unterschiedliche Moleküle.¹⁶⁷

Um nur einen Datensatz für das Molekül zu erhalten, kann durch Temperaturerhöhung versucht werden, den chemischen Austausch zwischen den beiden Konformeren zu beschleunigen, so dass die Konformationen schnell ineinander übergehen. Es kommt dann erst zu einem sehr breiten Signal, welches nach Überschreitung des Koaleszenz-Punktes¹⁶⁸ zu einem scharfen Signal wird.

In Bezug auf die Proansamitocine wurde versucht, durch Erhöhung der Temperatur, diesen Koaleszenz-Punkt zu überschreiten, um einen einzelnen Signalsatz zu erhalten. Der Koaleszenzpunkt konnte in diesem Fall jedoch nicht erreicht werden da er über der maximalen Messtemperatur lag. Es wurde entschieden, die Messungen bei niedrigen Temperaturen durchzuführen, um die Signale beider Konformere getrennt voneinander zuordnen zu können (siehe Abbildung 54).

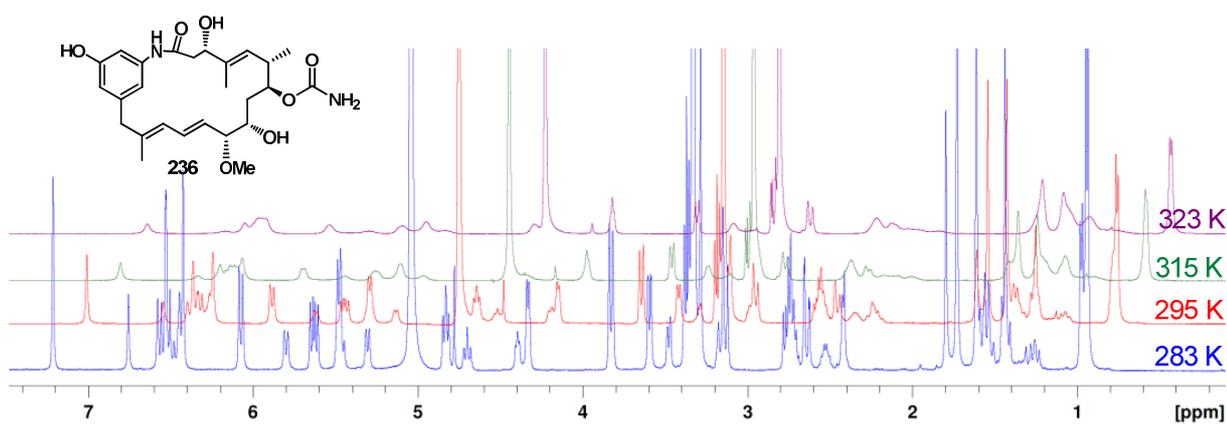


Abbildung 54: ¹H-NMR-Messungen von dem Proansamitocin-Derivat **236** in Methanol-d₄ bei verschiedenen Temperaturen.

¹⁶⁷ G. Quinkert, E. Egert, C. Griesinger, *Aspekte der Organischen Chemie*, VCH Weinheim, **1995**.

¹⁶⁸ Hier ist die Austauschgeschwindigkeit von derselben Größenordnung wie die Differenz der chemischen Verschiebungen.

In der Abbildung ist deutlich zu sehen, wie die Signale aller Protonen mit zunehmender Temperatur immer breiter werden. Vor allem anhand der aromatischen und olefinischen Protonen links im Bild ist dieses deutlich zu erkennen. Auch die Methylgruppe bei ca. 1 ppm wird immer breiter. Allerdings ist auch bei 323 K noch keine Feinstruktur erkennbar.

In Abbildung 54 ist ebenfalls zu sehen, dass bei 283 K beide Konformere inklusive Feinstruktur deutlich erkennbar sind. Die gute Signalqualität dieser Analyse ermöglichte es, die Signale beider Konformere in der Mischung zweifelsfrei zuzuordnen

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AHBA(-)-Mutante von *S. hygrosopicus* eine Vielzahl an Mutasynthonsen auf die PKS auflädt, zu *seco*-Progeldanamycin-Derivaten prozessiert, zyklisiert und anschließend über post-PKS-Enzyme weiter modifiziert. Dabei wurden 54 Mutasynthone eingesetzt, von denen lediglich zehn nicht zu neuen Geldanamycin-Derivaten umgesetzt wurden (siehe Abbildung 55).

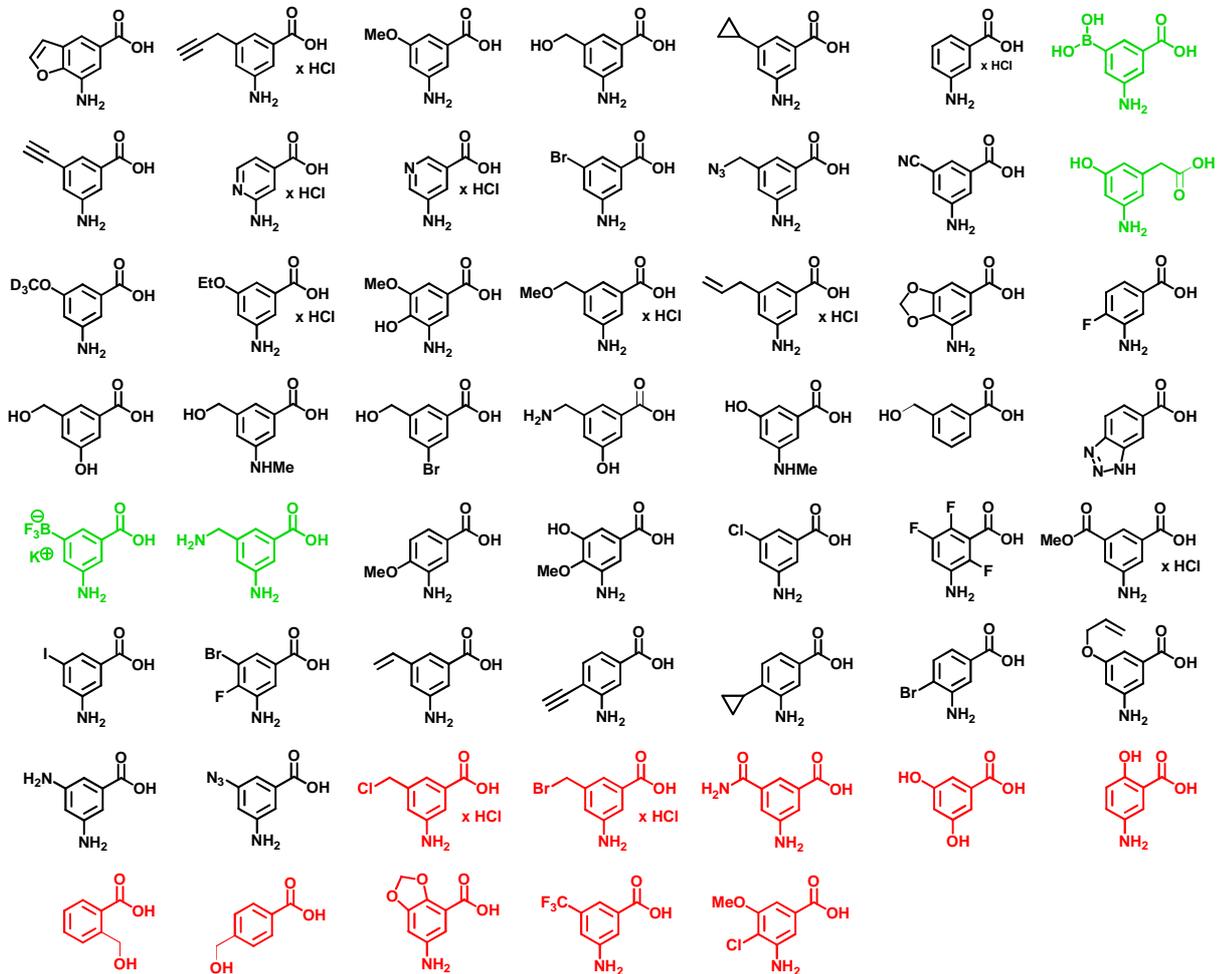
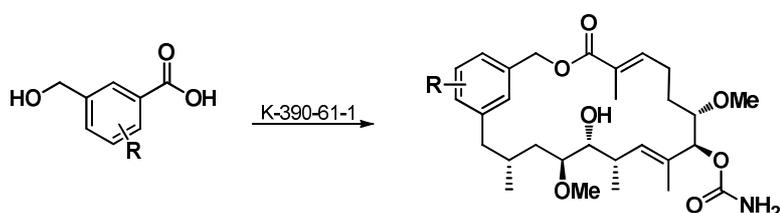


Abbildung 55: Während dieser Arbeit verfütterte Startbausteine (in rot: nicht angenommenen Mutasynthone; in grün: durch den Organismus veränderten Mutasynthone; in schwarz: Mutasynthone die zu erwarteten Mutasynthese-Produkten führten).

Einige dieser Startbausteine wurden vor der Aufladung und Prozessierung vom Organismus verändert, und danach erst weiter umgesetzt. Über diesen mutasynthetischen Zugang konnte eine Vielzahl von neuen Geldanamycin-Derivaten isoliert und charakterisiert werden. So wurde effektiv eine Bibliothek von neuen Verbindungen erstellt.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Geldanamycin-Amidsynthese nicht sehr selektiv zu sein scheint, da dieses Enzym auch den Benzylalkohol in *meta*-substituierten (Hydroxymethyl)benzoesäuren zu Lactonderivaten zyklisieren kann (siehe Schema 61), anstatt ausschließlich die Lactamderivate zu bilden.



Schema 61: Verfütterungen von *meta*-substituierten (Hydroxymethyl)benzoesäuren.

Ein weiterer interessanter Einblick in die Biosynthese konnte durch die Verfütterung von 3-Amino-5-(hydroxymethyl)benzoesäure **174** erreicht werden. So ist dies die erste bekannte Mutasynthese von Geldanamycin, bei der alle möglichen post-PKS-Modifizierungen nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis ermöglichte es neue Rückschlüsse auf die Reihenfolge der post-PKS-Schritte zu ziehen.

Außerdem wurden die neuen Geldanamycin-Derivate **97**, **98** und **181** erfolgreich in semisynthetische Derivatisierungen eingesetzt, wobei Derivatisierungen zum Beispiel über SUZUKI-MIYAURA-Kupplungen oder HUISGEN-Cycloaddition erreicht wurden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Proansamitocin **31** ein optimales Ausgangssubstrat für eine Vielzahl von semisynthetischen Veränderungen darstellt, da es stabil unter den meisten Reaktionsbedingungen ist. Mithilfe der Semisynthese konnten viele neue Proansamitocin-Derivate dargestellt werden. Diese neuen Derivate konnten selbst schon in SAR-Studien eingesetzt werden, und oder durch weitere Verfütterungsexperimente sowohl an den Ansamitocin-Produzenten, wie auch an den Geldanamycin-Produzenten zu weiteren neuen Proansamitocin-Derivaten führen, die dann wiederum in SAR-Studien eingesetzt wurden (siehe Abbildung 56). Diese SAR-Studien zeigten, dass Proansamitocin-Derivate mit nicht zyklischem Carbamat an C-7 bei gleicher Stereochemie der

Hydroxygruppe an C-9 wie im AP-3 **28** keine biologische Aktivität aufweisen, was wahrscheinlich auf eine veränderte Konformation zurückzuführen ist.

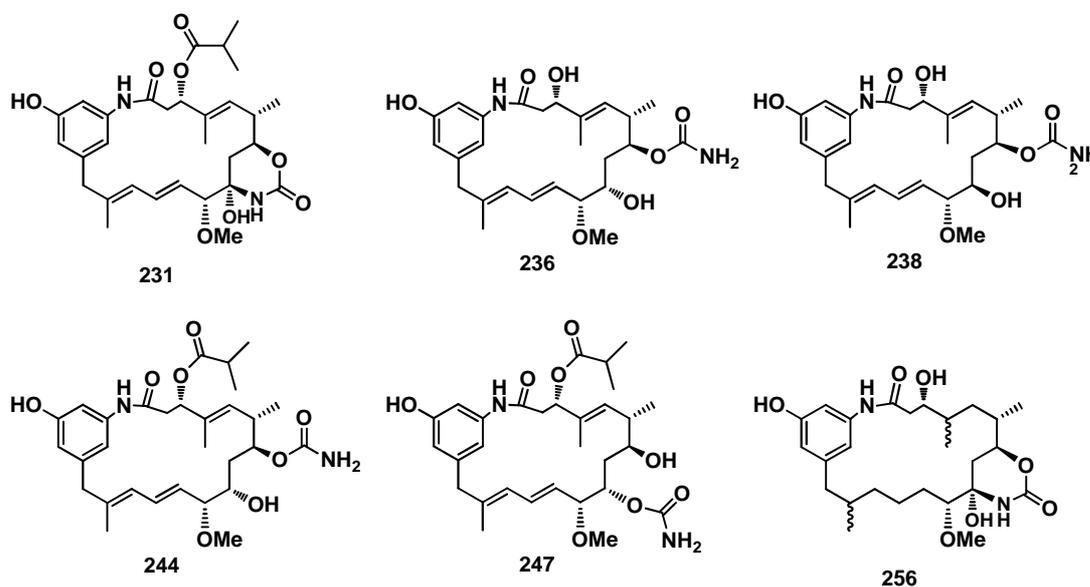


Abbildung 56: Über einen kombinierten Mutasyntese/Semisynthese-Ansatz dargestellte Derivate.

Durch die Verfütterungen wurde außerdem die Substratflexibilität der verschiedenen Enzyme beleuchtet. So ist zum Beispiel festzuhalten, dass in fast allen Verfütterungen an den Ansamitocin-Produzenten immer nur die Carbamoyltransferase und die Methyltransferase aktiv waren. Diese beiden Enzyme sind also eher flexibel. Alle anderen post-PKS-Enzyme des Ansamitocin-Produzenten scheinen substratspezifisch zu sein, da diese Enzyme auch bei leicht veränderten Substraten keine Reaktivität zeigten. Genau wie die Carbamoyltransferase des Ansamitocin-Produzenten scheint auch die des Geldanamycin-Produzenten sehr flexibel zu sein. Über alle anderen Enzyme dieses Produzenten kann hier keine Aussage gemacht werden, da die verfütterten Proansamitocin-Derivate eine zu große strukturelle Abweichung von dem in der Natur vorkommenden Progeldanamycin aufweisen.

5.2 Ausblick

Im Hinblick auf die Mutasynteseexperimente von Geldanamycin gäbe es folgende im großen Maßstab zu wiederholende Verfütterungsexperimente, die es erlaubten, die neuen Geldanamycin-Derivate biologisch zu testen und zum anderen, bisher nicht verfügbare

Derivate darzustellen. Interessante, im kleinen Maßstab nachgewiesene Derivate sind zum Beispiel das Triazolderivat **170**, oder auch das Furanderivat **147** sowie das Cyclopropylderivat **124** (siehe Abbildung 57).

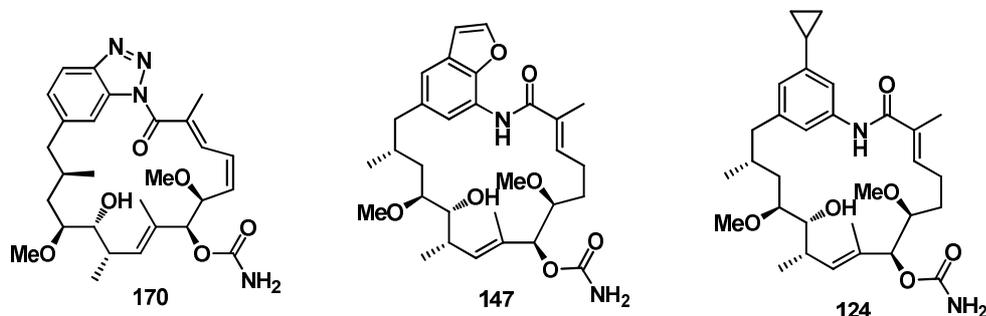


Abbildung 57: Interessante neue Fermentationsprodukte.

Auch der gezielte Einbau von Heteroaromaten könnte noch breiter untersucht werden. Wie die Arbeit gezeigt hat, ist der Einbau von Nikotinsäurederivaten möglich. Deshalb sollten zum Beispiel Thiophenderivate **257** und **258**, Furanerivate wie **259**, Pyrrolderivate wie **260** oder das Pyrimidinderivat **261** dahingehend untersucht werden, ob sie auf die PKS des Geldanamycinproduzenten aufgeladen und prozessiert werden können (siehe Abbildung 58).

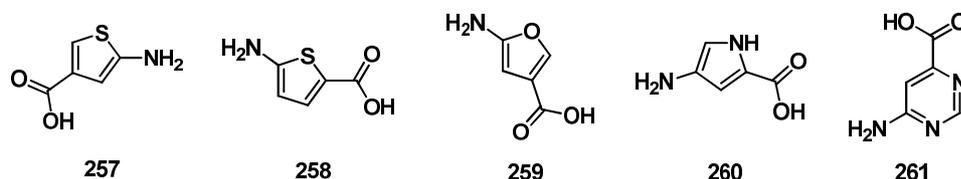
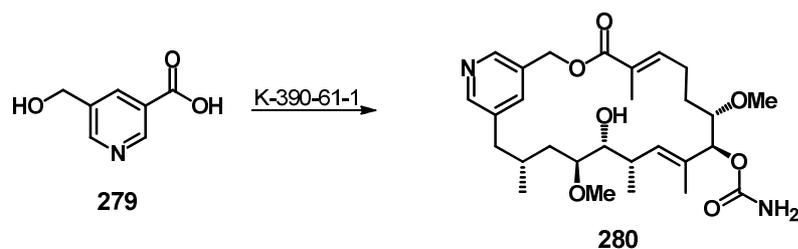


Abbildung 58: Interessante heteroaromatische-Mutasythone.

Auch wäre es interessant, das Semisynthespektrum der Geldanamycin-Derivate zu erweitern; so zum Beispiel mit weiteren C-C-Kreuzkupplungen oder neuen Versuchen zur HUISGEN-Cycloaddition mit weniger polaren Verbindungen.

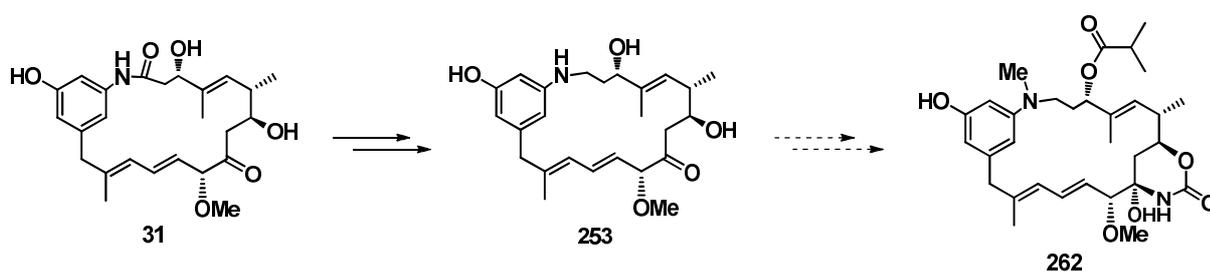
In Bezug auf die Lacton-Derivate wäre es interessant, auch hier heteroaromatische Startbausteine wie 5-(Hydroxymethyl)nikotinsäure **279** einzusetzen, um so zum Beispiel das heteroaromatische Lacton-Derivate **280** zu erhalten (siehe Schema 62).



Schema 62: Mutasynthese mit 5-(Hydroxymethyl)nikotinsäure **279**.

Außerdem sollte das positive Ergebnis der simulierten Mutagenese zeitnah aufgegriffen und mikrobiologisch umgesetzt werden. Mit dem mutagenetisch erzeugten Organismus sollte dann die Supplementierung des Hydroxymethyl-Startbausteins wiederholt werden, um die Vorhersage der simulierten Mutagenese zu bestätigen. Außerdem wäre ein solcher Organismus interessant, wenn es dadurch gelänge, die Fermentationsausbeuten der Mutasynthesen zu steigern. Viele der durchgeführten Mutasyntheseexperimente zeigten vor allem bei größeren Substituenten am aromatischen System nur geringe Ausbeuten, die eventuell durch den Austausch der sterisch anspruchsvollen Aminosäure Prolin gegen Alanin erhöht werden könnten. Das Eindringen der *seco*-Progeldanamycin-Derivate in das aktive Zentrum der Amidsynthase würde so erleichtert was zu einer erhöhten Zyklisierungsrate führen würde.

Im Hinblick auf die Semisynthese/Mutasynthese-Experimente des Proansamitocins müsste zunächst die Synthese zu dem an C-1-reduzierten Proansamitocin **253** im größeren Maßstab wiederholt werden (siehe Abbildung 58).



Schema 63: Darstellung von acyliertem, carbamoyliertem und *N*-methyliertem Proansamitocin.

Mit einer nachfolgenden Testfermentation können dann erste Rückschlüsse auf die Umsetzung dieses Substrates durch die post-PKS-Enzyme gezogen werden. Vorangegangene Verfütterungsexperimente lassen bereits vermuten, dass nur die Carbamoylierung und eventuell noch die *O*-Methylierung stattfinden werden. Die Seitenkette müsste nachträglich

chemisch eingeführt werden. Für diese Umsetzung muss ein Weg gefunden werden, das reaktive Amin selektiv zu schützen damit es nicht ebenfalls acyliert wird. Interessant wäre natürlich auch eine dauerhafte *N*-Methylierung (siehe Abbildung 58), da diese auch im natürlichen Ansamitocin P-3 **28** vorliegt.¹⁶⁹

Zusätzliche mögliche Derivatisierungen wären die selektive Hydrierung, eventuell mit Lindlar-Katalysator, um nicht alle olefinischen Doppelbindungen zu hydrieren und somit ebenfalls neue Derivate zu erhalten.

¹⁶⁹ a) P. W. Dyer, J. Fawcett, G. A. Griffith, M. J. Hanton, C. Oliviert, A. R. Patterson, S. Suhard, *Chem. Comm.* **2005**, 3835-3837; b) R. F. Borch, A. I. Hassid, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 1673-1674.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Hinweise zu den chemischen 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 80 °C getrocknet und mit Inertgas gespült.

Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren¹⁷⁰ getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt oder 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.

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 Färbereagenzien¹⁷¹

¹⁷⁰ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed., Butterworth and Heinemann, Oxford 1996.

¹⁷¹ J. Leonhard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis in der organischen Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996.

(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 ($\lambda = 305$ nm) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m, 125 mm · Ø 4 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 4 mm · Ø 4 mm) 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 [$\lambda = 220$ -400 nm]) durchgeführt. Hierfür kamen folgende stationäre Phasen zur Anwendung: C-18 (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, 250 mm · Ø 25 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 30 mm · Ø 20 mm); C-18 (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, 250 mm · Ø 8 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm · Ø 8 mm); CN (TRENTEC Reprisil 100 CN 5 μ m, 250 mm · Ø 8 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm · Ø 8 mm).

Alternativ wurde präparative HPLC an einer Varian HPLC-Anlage (Pumpen Prepstar Model 218, Variabler Wellenlängendetektor Prostar [$\lambda = 248$ nm]) mit paralleler Massendetektion (Micromass Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phase C-18 (TRENTEC Reprisil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, 250 mm · Ø 25 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 30 mm · Ø 20 mm) 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 sofern nicht anders angegeben. Das verwendete Solvens ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachte Signal.¹⁷² 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,

¹⁷² H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.

t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, se = Sextett, sep = Septett, m = Multipllett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Abkürzungen geben an: d = doppelt, b = breites Signal.

^{13}C -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.¹⁷² 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 Kohlenstoff). Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen α -ständigen Wasserstoffatome wurde aus dem HSQC-Spektrum bestimmt.

Sofern nötig wurden für eine vollständige Interpretation ^1H - ^1H -Korrelationsspektren (COSY), ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren (HMQC, 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.

Schmelzpunkte

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

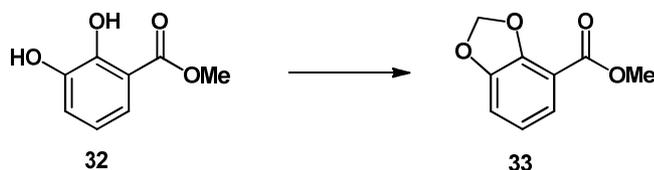
6.2 Synthese der Mutasyntone

ortho-Benzylalkohol **214** wurde wie in der Literatur beschrieben ausgehend von Phtalid hergestellt.¹⁷³ Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.¹⁷⁴

meta-Benzylalkohol **213** wurde aus Isophthalsäuredimethylester gemäß Referenz 175 hergestellt.¹⁷⁵ Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.¹⁷⁶

para-Benzylalkohol **215** wurde aus 4-(Hydroxymethyl)benzoesäuremethylester hergestellt.¹⁷⁷ Die NMR-Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein.¹⁷⁴

Benzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **33**



2,3-Dihydroxybenzoesäuremethylester **32** (5 g, 29.94 mmol, 1 Äq.) und Kaliumfluorid (8.64 g, 148.70 mmol, 5 Äq.) werden in DMF (80 mL) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Dann wird Diiodmethan (2.87 mL, 35.70 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und die Mischung wird 30 h auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Mischung über Kieselgur filtriert, in H₂O (100 mL) gegeben und dreimal mit Diethylether extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen einmal mit NaOH-Lösung (150 mL, 1M) extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Beim Abkühlen kristallisiert Benzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **33** als farbloser Feststoff aus (3.62 g, 20.06 mmol, 68 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.41 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.4 Hz, H-aromat.), 6.98 (dd, 1H, *J* = 8.0, 1.4 Hz, H-aromat.), 6.86 (dd, 1H, *J* = 8.0, 8.0 Hz, H-aromat.), 6.10 (s,

¹⁷³ J. Hessert, *Chem. Ber.* **1877**, 10, 1445-1450.

¹⁷⁴ M. Trincado, H. Grützenbacher, F. Vizza, C. Bianchini, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 2751-2757.

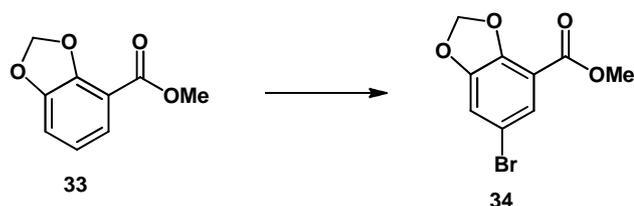
¹⁷⁵ a) JE IL PHARMACEUTICAL CO, LTD. WO2004/113281; b) **2004** und BRISTOL-MYERS SQUIBB, WO2009/15166, **2009**.

¹⁷⁶ G.A. Reed, D.R. Dimmel, E.W. Malcolm, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6372-6376

¹⁷⁷ Y. Kita, A. Shuji, N. Ajimura, M. Yoshigi, T. Tsugoshi, H. Yasuda, Y. Tamura *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4150-5158.

2H, CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 164.9 (s, COOMe), 148.7 (s, C-aromat.), 148.4 (s, C-aromat.), 122.8 (d, C-aromat.), 121.2 (d, C-aromat.), 112.9 (d, C-aromat.), 112.3 (s, C-aromat.), 101.9 (t, CH₂), 52.1 (q, CH₃) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₉H₈O₄ [M]⁺: 180.0422, gefunden: 180.0423; **Schmelzpunkt**: 59.8-60.4 °C.

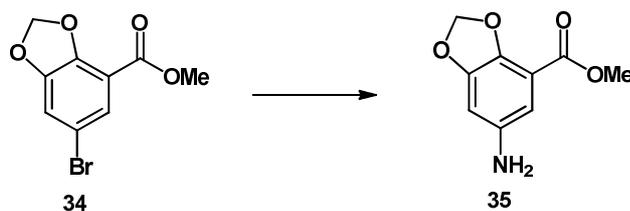
6-Brombenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **34**



Benzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **33** (300 mg, 1.67 mmol, 1 Äq.) und Natriumacetat (313 mg, 4.18 mmol, 2.5 Äq.) werden in Eisessig (8 mL) gelöst bzw. suspendiert. Dann wird Brom (0.1 mL, 1.67 mmol, 1 Äq.) zugetropft und die Mischung wird 12 h bei RT gerührt.

Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in dest. Wasser (50 mL) aufgenommen und zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und der Diethylether im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE = 20/1 → 10/1 → 5/1) wird 6-Brombenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **34** als farbloser Feststoff (360 mg, 1.40 mmol, 84 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.55 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 7.08 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 6.12 (s, 2H, CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 163.9 (s, COOMe), 149.9 (s, C-aromat.), 148.2 (s, C-aromat.), 125.2 (d, C-aromat.), 115.8 (d, C-aromat.), 112.9 (s, C-aromat.), 102.9 (t, CH₂), 52.5 (q, CH₃) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₉H₇O₄Br [M]⁺: 257.9528, gefunden: 257.9528; **Schmelzpunkt**: 95.3 – 97.1 °C.

6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester 35*Vorschrift 1:*

6-Brombenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **34** (454 mg, 1.54 mmol, 1 Äq.) wird zusammen mit Cu₂O (11 mg, 0.077 mmol, 0,05 Äq.), NMP (1 mL) und NH₃ (28 %) (1 mL) in ein Mikrowellenglas gegeben, verschlossen und 48 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die Mischung über Kieselgel filtriert, mit Essigsäureethylester nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE = 5/1 → 2/1 → 1/2) wird 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **35** als beige-farbener Feststoff (22 mg, 0.11 mmol, 7 %) erhalten.

Vorschrift 2:

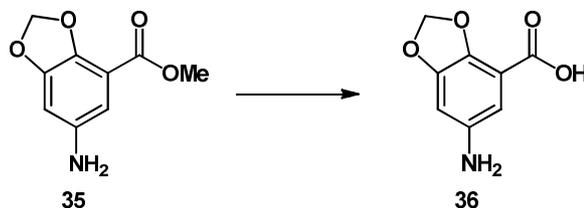
6-Brombenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **34** (400 mg, 1.36 mmol, 1 Äq.) wird zusammen mit Cs₂CO₃ (884 mg, 2.71 mmol, 2 Äq.), CuI (27 mg, 0.14 mmol, 0.1 Äq.) und 2,4-Pentadion (56 µL, 0.54 mmol, 0.4 Äq.) in DMF (3 mL) gelöst, mit NH₃ (28 %) (400 µL) versetzt und 12 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Mischung über Kieselgel filtriert, mit Essigsäureethylester nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum entfernt.

Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE = 5/1 → 2/1 → 1/2) wird 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethylester **35** als beigefarbener Feststoff (80 mg, 0.41 mmol, 30 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.69 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-aromat.), 6.53 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-aromat.), 3.85 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 174.5 (s, COOMe), 150.9 (s, C-aromat.), 143.7 (s, C-aromat.), 143.6 (s, C-aromat.), 113.3 (s, C-aromat.), 107.8 (d, C-aromat.), 103.4 (d, C-aromat.), 102.8 (t, CH₂), 52.3 (q, CH₃) ppm; **HRMS (ESI) *m/z***

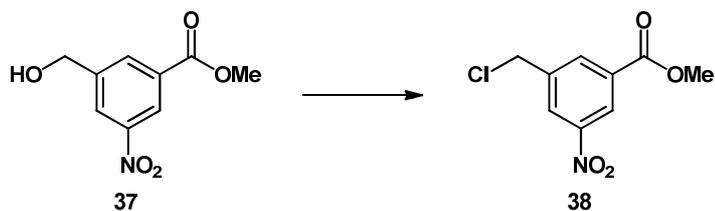
berechnet für $C_9H_{10}NO_4$ $[M+H]^+$: 196.0610, gefunden: 196.0612; **Schmelzpunkt:** 151.2-153.2 °C.

6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäure **36**



6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäuremethyl ester **35** (50 mg, 0.26 mmol, 1 Äq.) wird in CH_3OH (5 mL) gelöst, mit 1M LiOH (0.13 mL, 1.13 mmol, 5 Äq.) versetzt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2 M HCl auf pH 5 angesäuert und die wässrige Phase mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 6-Aminobenzo[1,3]dioxol-4-carboxylsäure **36** (44 mg, 0.24 mmol, 92 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

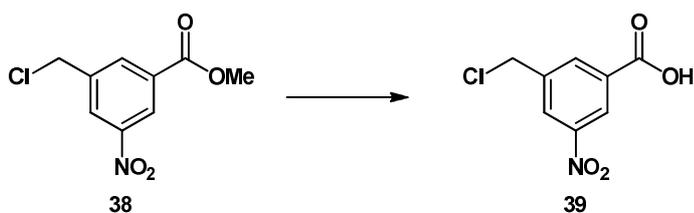
1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 7.06 (s, 1H, H-aromat.), 6.80 (s, 1H,), 6.08 (s, 2H, CH_2) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 166.3 (s, COOH), 151.4 (s, C-aromat.), 147.0 (s, C-aromat.), 133.5 (s, C-aromat.), 113.7 (s, C-aromat.), 105.9 (d, C-aromat.), 105.8 (d, C-aromat.), 104.0 (t, CH_2) ppm; **HRMS (ESI) m/z** berechnet für $C_8H_8NO_4$ $[M+H]^+$: 182.0453, gefunden: 182.0457; **Schmelzpunkt.:** 175.1-175.2 °C.

3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester 38

3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **37** (250 mg, 81.18 mmol, 1 Äq.) wird in Pyridin (3 mL) gelöst und auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dann wird Thionylchlorid (0.15 mL, 0.13 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Die Mischung wird 12 h bei RT gerührt.

Anschließend wird die Lösung mit 1M HCl und Diethylether ausgeschüttelt, bis das Pyridin vollständig in die wässrige Phase übergegangen ist. Die wässrige Phase wird anschließend mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäure-methylester **38** (150 mg, 0.65 mmol, 55 %) als farbloser Feststoff erhalten.

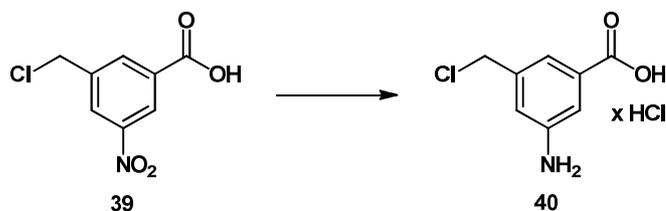
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.82 (dd, 1H, $J = 1.7, 1.7$ Hz, H-aromat.), 8.46 (dd, 1H, $J = 1.7, 1.7$ Hz, H-aromat.), 8.39 (s, 1H, H-aromat.), 4.50 (s, 2H, CH_2), 4.00 (s, 3H, CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 164.7 (s, COOMe), 153.4 (s, C-aromat.), 140.1 (s, C-aromat.), 135.2 (d, C-aromat.), 132.6 (s, C-aromat.), 127.4 (d, C-aromat.), 124.5 (d, C-aromat.), 53.1 (t, CH_2), 44.2 (q, CH_3) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}_4\text{Cl}$ $[\text{M}]^+$: 229.0141, gefunden: 229.0143; **Schmelzpunkt**: 77.6-78.4 $^{\circ}\text{C}$.

3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäure 39

3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäuremethyl-ester **38** (4.9 g, 21.34 mmol, 1 Äq.) wird in THF (100 mL) gelöst, mit 1M LiOH-Lösung (107 mL, 1.07 mmol, 5 Äq) versetzt und 5 Stunden bei RT gerührt. Das THF wird anschließend im Vakuum entfernt, die wässrige Phase wird mit halbkonz. HCl auf pH 5-6 angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäure **39** (4 g, 18.6 mmol, 87 %) als hellbrauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.74 (dd, 1H, *J* = 1.7, 1.7 Hz, H-aromat.), 8.52 (dd, 1H, *J* = 1.7, 1.7 Hz, H-aromat.), 8.44 (dd, 1H, *J* = 1.7, 1.7 Hz, H-aromat.), 4.84 (s, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 167.1 (s, COOH), 149.9 (s, C-aromat.), 142.2 (s, C-aromat.), 136.3 (s, C-aromat.), 128.1 (d, C-aromat.), 126.1 (d, C-aromat.), 124.9 (d, C-aromat.), 44.9 (t, CH₂Cl) ppm; HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₈H₅NO₄Cl [M-H]⁻: 213.9907, gefunden: 213.9909; **Schmelzpunkt**: 104.6-105.6 °C.

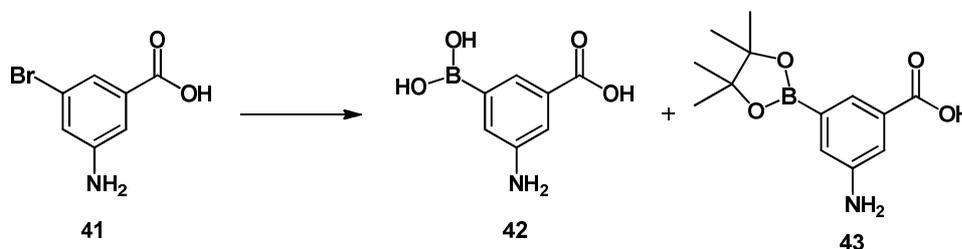
3-Amino-5-chlormethylbenzoesäure Hydrochlorid **40**



3-Chlormethyl-5-nitrobenzoesäure **39** (3 g, 14.00 mmol, 1 Äq.) wird in Essigsäureethylester (150 mL) gelöst und mit SnCl₂·2 H₂O (9.5 g, 42.00 mmol, 3 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 5 h bei 80 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert und anschließend mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend mehrmals mit halbkonz. Salzsäure extrahiert. Die Phasen werden getrennt. Der in der wässrigen Phase ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wird 3-Amino-5-chlormethylbenzoesäure Hydrochlorid **40** (3 g, 13.5 mmol, 96 %) als farbloser Feststoff erhalten.

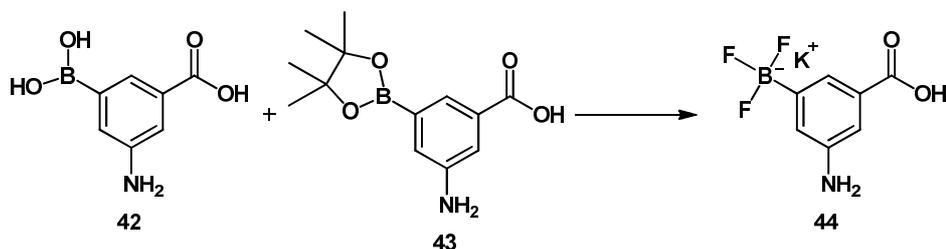
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 8.20 (dd, 1H, $J = 1.6, 1.6$ Hz, H-aromat.), 8.02 (dd, 1H, $J = 1.6, 1.6$ Hz, H-aromat.), 7.74 (dd, 1H, $J = 1.6, 1.6$ Hz, H-aromat.), 4.91 (br. s, 2H, NH_2), 4.79 (s, 2H, CH_2) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 167.4 (s, COOH), 142.5 (s, C-aromat.), 134.8 (s, C-aromat.), 132.9 (s, C-aromat.), 131.1 (d, C-aromat.), 128.4 (d, C-aromat.), 125.0 (d, C-aromat.), 45.2 (t, CH_2Cl) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2\text{Cl}$ $[\text{M-H}]^-$: 184.0165, gefunden: 184.0164; **Schmelzpunkt**: 172.8 °C (Zersetzung).

3-Nitro-5-boronsäurebenzoesäure **42** und 3-Nitro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzoesäurer **43**



3-Amino-5-brombenzoesäure **41** (100 mg, 0.46 mmol, 1 Äq.), Kaliumacetat (227 mg, 2.32 mmol, 5 Äq.), Bis(pinacolato)diboron (176 mg, 0.70 mmol, 1.5 Äq.) und $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (34 mg, 0.04 mmol, 9 mol%) werden in einem Mikrowellenglas vorgelegt und mit Dimethylformamid (1 mL) versetzt. Diese Mischung wird in der Mikrowelle 10 min bei 200 Watt auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 50 °C entfernt. Die Mischung wird mit Wasser (50 mL) versetzt, mit 1 M HCl auf pH 5-6 gebracht und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produktgemisch 3-Amino-5-boronsäurebenzoesäure **42** und 3-Amino-5-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzoesäure **43** wird ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt.

3-Nitro-5-fluoroboratbenzoesäure **44**

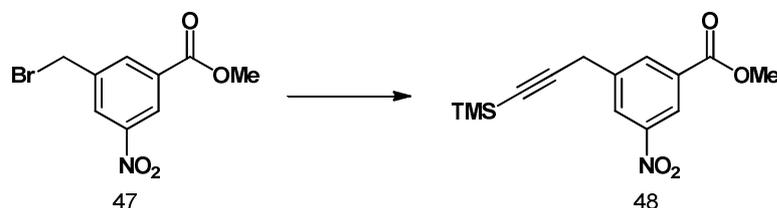


Das Gemisch aus 3-Nitro-5-boronsäurebenzoesäure **42** und 3-Nitro-5-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzoesäure **43** (55 mg, 0.46 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (4 mL) gelöst und mit KHF₂-Lösung (4.5 M) (0.75 mL) versetzt. Diese Mischung wird 3 h bei RT gerührt.

Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und mit CH₂Cl₂ und heißem Aceton gewaschen. Es werden 3-Nitro-5-fluoroboratbenzoesäure **44** (87 mg, 0.36 mmol, 73 % über 2 Stufen) als hellbeiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, DHO = 4.79 ppm): δ 8.10 (dd, 1H, *J* = 2.1, 2.0 Hz, H-aromat.), 7.70 (dd, 1H, *J* = 2.1, 1.9 Hz, H-aromat.), 7.54 (dd, 1H, *J* = 2.0, 1.9 Hz, H-aromat.) ppm;
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ 174.1 (s, COOH), 147.2 (s, C-aromat.), 135.9 (s, C-aromat.), 132.3 (s, C-aromat.), 130.1 (d, C-aromat.), 127.0 (d, C-aromat.), 120.9 (d, C-aromat.) ppm;
HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₇H₆NO₂F₃B [M]⁻: 204.0444, gefunden: 204.0437;
Schmelzpunkt: 156.1-156.4 °C.

3-Nitro-5-(3-trimethylsilanylprop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester **48**

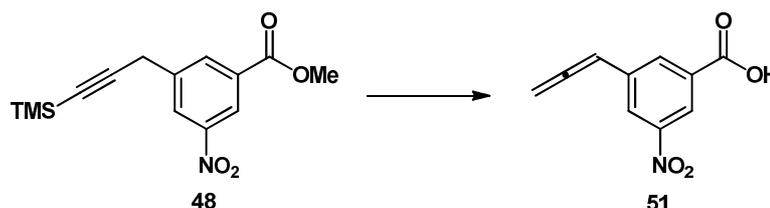


3-Bromomethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **47** (100 mg, 0.37 mmol, 1 Äq.), PdCl₂(MeCN)₂ (2 mg, 7 μmol, 2 mol%) und Cs₂CO₃ (125 mg, 0.38 mmol, 1.1 Äq.) werden in THF (1 mL) gelöst, mit TMS-Acetylen (76 μL, 0.55 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und 24 h bei 65 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Reaktionsmischung über Kieselgel filtriert, das Filtrat

im Vakuum eingeengt und säulenchromatographisch (PE/EE = 40/1 → 20/1) gereinigt. Es wird 3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure-methylester **48** (24 mg, 0.08 mmol, 23 %) als gelber Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.74 (s, 1H, H-aromat.), 8.45 (s, 1H, H-aromat.), 8.35 (s, 1H, H-aromat.), 3.99 (s, 3H, CH₃), 3.80 (s, 2H, CH₂), 0.22 (s, 9H, TMS) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.1 (s, COOMe), 148.6 (s, C-aromat.), 139.4 (s, C-aromat.), 134.9 (d, C-aromat.), 132.0 (s, C-aromat.), 127.0 (d, C-aromat.), 123.1 (d, C-aromat.), 105.2 (s, C-Alkin), 89.7 (s, C-Alkin), 53.0 (q, CH₃), 26.0 (t, CH₂), 0.06 (q, TMS) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₄H₁₇NO₄Si [M]⁺: 291.0927, gefunden: 291.0926.

3-Nitro-5-(propa-1,2-dien-1-yl)benzoesäure **51**



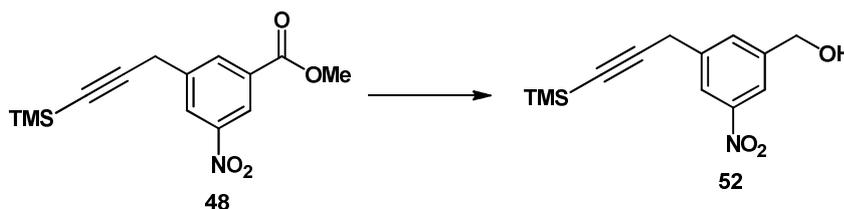
3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester **48** (211 mg, 0.72 mmol, 1 Äq.) wird in Methanol (5 mL) gelöst, mit 1M LiOH-Lösung (3.45 mL, 3.45 mmol, 5 Äq.) versetzt und 12 h bei RT gerührt.

Danach wird das CH₃OH im Vakuum entfernt, die Mischung mit halbkonz. HCl auf pH 5 angesäuert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es wird 3-Nitro-5-(propa-1,2-dien-1-yl)benzoesäure **51** (147 mg, 0.72 mmol, quant.) als hellbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.56 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.8 Hz, H-aromat.), 8.26 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.8 Hz, H-aromat.), 8.25 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.8 Hz, H-aromat.), 6.41 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, H-Alle), 5.35 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz, 2H-Alle) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 211.6 (s, C-Alle), 173.0 (s, COOH), 168.2 (s, C-aromat), 150.1 (s, C-aromat.), 138.3 (d, C-aromat.), 133.9 (s, C-aromat.),

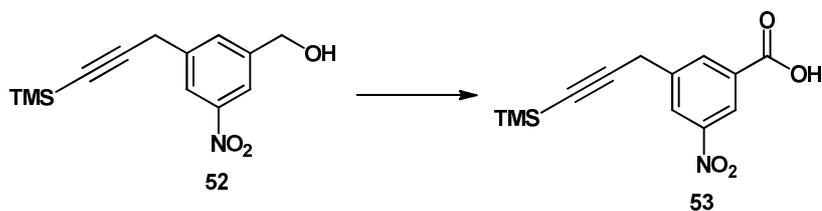
125.0 (d, C-aromat.), 123.2 (d, C-aromat.), 92.9 (d, Allen), 80.2 (t, Allen) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{10}H_6NO_4$ $[M-H]^-$: 204.0297, gefunden: 204.0303; **Schmelzpunkt**: 131.8 °C (Zersetzung).

[3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-phenyl]-methanol **52**



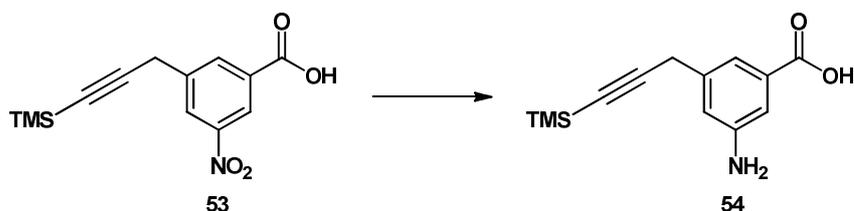
3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester **48** (200 mg, 0.67 mmol, 1 Äq.) wird in CH_2Cl_2 abs. (5 mL) gelöst und auf $-60^\circ C$ gekühlt. Dann wird DIBAL-H (1.7 mL, 1M in Hexan, 1.72 mmol, 2.5 Äq.) zugetropft, die Mischung anschließend auf RT erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird wieder auf $-60^\circ C$ abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von Essigsäureethylester (1 mL) beendet. Anschließend wird die Mischung mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit K-Na-Tartrat-Lösung über Nacht gerührt. Die wässrige Phase wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE = 6/1 \rightarrow 5/1 \rightarrow 4/1 \rightarrow 3/1) werden [3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-phenyl]-methanol **52** (176 mg, 0.67 mmol, quant.) als gelbes Öl erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7.26$ ppm): δ 8.16 (s, 1H, H-aromat.), 8.12 (s, 1H, H-aromat.), 7.68 (s, 1H, H-aromat.), 4.82 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH_2OH), 3.74 (s, 2H, CH_2), 1.90 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, OH), 0.21 (s, 9H, TMS) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77.16$ ppm): δ 148.8 (s, C-aromat.), 143.1 (s, C-aromat.), 138.9 (s, C-aromat.), 132.2 (d, C-aromat.), 122.2 (d, C-aromat.), 120.1 (d, C-aromat.), 102.3 (s, C-Alkin), 89.0 (s, C-Alkin), 64.1 (t, CH_2OH), 26.1 (q, CH_3), 0.1 (q, TMS) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $C_{13}H_{17}NO_3Si$ $[M]^+$: 263.0978, gefunden: 263.0979.

3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure 53

[3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)phenyl]-methanol **52** (100 mg, 0.38 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (5 mL) gelöst und mit JONES-Reagenz (0.2 mL, 0.48 mmol, 1.25 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird *iso*-Propanol (5 mL) zugegeben und 2 min gerührt. Danach wird dest. Wasser zugegeben (6 mL), dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäure **53** (104 mg, 0.38 mmol, quant.) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 8.50 (s, 1H, H-aromat.), 8.42 (s, 1H, H-aromat.), 8.33 (s, 1H, H-aromat.), 3.98 (s, 2H, CH₂), 0.18 (s, 9H, TMS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 165.4 (s, COOH), 148.0 (s, C-aromat.), 139.6 (s, C-aromat.), 134.6 (d, C-aromat.), 132.7 (s, C-aromat.), 126.2 (d, C-aromat.), 122.1 (d, C-aromat.), 103.8 (s, C-Alkin), 88.1 (s, C-Alkin), 24.6 (t, CH₂), 0.0 (q, TMS) ppm; HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₃H₁₄NO₄Si [M-H]⁻: 276.0692, gefunden: 276.0688.

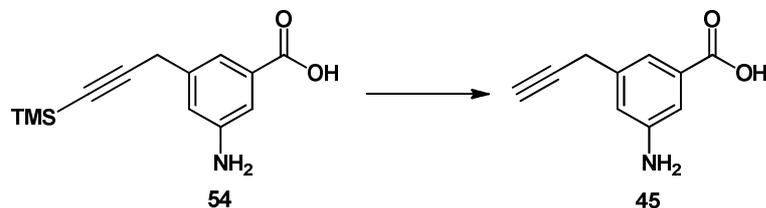
3-Amino-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäure 54

3-Nitro-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäure **53** (94 mg, 0.34 mmol, 1 Äq.) wird in Essigsäureethylester (5 mL) gelöst, mit SnCl₂·2 H₂O (240 mg, 1.06 mmol, 3 Äq.) versetzt und

für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird NaHCO_3 -Lsg. zugesetzt und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Dann werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Amino-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **54** (83 mg, 0.34 mmol, quant.) als braunes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_5 = 2.50$ ppm): δ 7.05 (dd, 1H, $J = 2.1, 1.8$ Hz), 7.04 (dd, 1H, $J = 1.8, 1.5$ Hz), 6.71 (dd, 1H, $J = 2.1, 1.5$ Hz), 5.36 (br.s, 1H, NH_2), 3.58 (s, 2H, CH_2), 0.15 (s, 9H, TMS) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** : (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 149.0 (s, COOH), 137.0 (s, C-aromat.), 118.8 (s, C-aromat.), 117.2 (s, C-aromat.), 116.3 (d, C-aromat.), 115.8 (d, C-aromat.), 113.1 (d, C-aromat.), 105.6 (s, C-Alkin), 86.1 (s, C-Alkin), 25.2 (t, CH_2), 0.2 (q, TMS) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{Si}$ $[\text{M-H}]^-$: 246.0950, gefunden: 246.0950.

3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure **45**

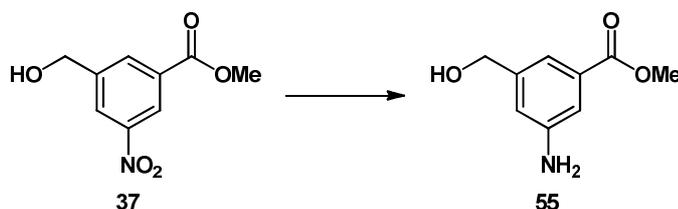


3-Amino-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäure **54** (75 mg, 0.30 mmol, 1 Äq.) wird in THF (4 mL) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Dann wird TBAF·3 H_2O (194 mg, 0.30 mmol, 2 Äq.) in THF (0.7 mL) zugegeben. Es wird 24 h bei dieser Temperatur gerührt, danach mit Ammoniumchlorid-Lsg. hydrolysiert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 3-Amino-5-prop-2-ynylbenzoesäure **45** (50 mg, 0.29 mmol, 97 %) als brauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_5 = 2.50$ ppm): δ 12.59 (br. s, 1H, COOH), 7.06 (dd, 1H, $J = 1.4, 0.9$ Hz, H-aromat.), 7.04 (dd, 1H, $J = 1.8, 0.9$ Hz, H-aromat.), 6.74 (dd, 1H, $J = 1.8, 1.4$ Hz, H-aromat.), 5.36 (br. s, 2H, NH_2), 3.52 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, CH_2), 3.05 (t, 1H,

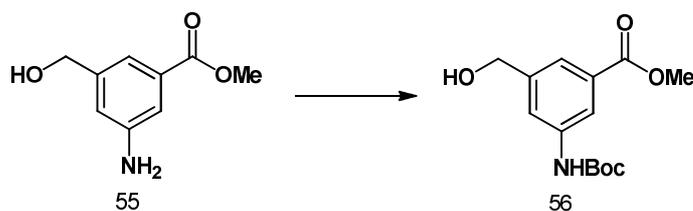
$J = 2.5$ Hz, H-Alkin) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, DMSO- d_6 , DMSO- $d_6 = 39.52$ ppm): δ 167.8 (s, COOH), 149.0 (s, C-aromat.), 137.1 (s, C-aromat.), 131.5 (s, C-aromat.), 117.2 (d, C-aromat.), 116.1 (d, C-aromat.), 113.0 (d, C-aromat.), 82.4 (s, C-Alkin), 73.1 (d, C-Alkin), 23.8 (t, CH_2) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_2$ $[\text{M-H}]^-$: 174.0055 gefunden: 174.0560; **Schmelzpunkt**: 160.0-160.1 °C.

3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **55**



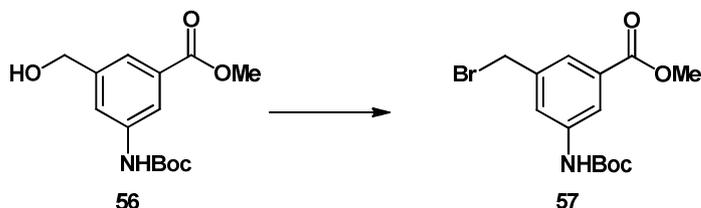
3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **37** (505 mg, 2.37 mmol, 1 Äq.) wird in Ethanol (15 mL) gelöst, mit Pd/C (10%) (53 mg, 0.5 mmol, 20 mol%) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre 24 h bei RT gerührt. Nach Reaktionsende wird die Lösung über Kieselgur filtriert und im Vakuum eingedunstet. Es wird 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **55** (422 mg, 2.33 mmol, 98 %) als hellbrauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , DMSO- $d_5 = 2.50$ ppm): δ 7.08 (dd, 1H, $J = 1.3, 1.8$ Hz, H-aromat.), 7.06 (dd, 1H, $J = 1.3, 1.8$ Hz, H-aromat.), 6.77 (dd, 1H, $J = 1.3, 1.8$ Hz, H-aromat.), 5.34 (s, 2H, NH_2), 5.14 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, OH), 4.39 (d, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2), 3.79 (s, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , DMSO- $d_6 = 39.52$ ppm): δ 166.9 (s, COOMe), 148.9 (s, C-aromat.), 143.7 (s, C-aromat.), 130.0 (s, C-aromat.), 116.3 (d, C-aromat.), 114.6 (d, C-aromat.), 112.6 (d, C-aromat.), 62.7 (t, CH_2OH), 51.8 (q, CH_3) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_3$ $[\text{M+H}]^+$: 182.0817, gefunden: 182.0818; **Schmelzpunkt**: 95.2-97.2 °C.

3-tert-Butoxycarbonylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester 56

3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **55** (12.66 g, 69.87 mmol, 1 Äq.) wird in Ethanol (150 mL) gelöst, langsam mit Boc_2O (16.77 g, 76.85 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und bei 40°C 12 h gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (CH_2Cl_2 : CH_3OH 50:1) wird 3-tert-Butoxycarbonylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **56** (18.54 g, 65.90 mmol, 94 %) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.84 (s, 1H, H-aromat.), 7.74 (s, 1H, H-aromat.), 7.70 (s, 1H, H-aromat.), 6.69 (br.s, 1H, NH) 4.71 (s, 2H, CH_2OH), 3.91 (s, 3H, CH_3), 1.71 (br.s, 1H, OH), 1.52 (s, 9H, Boc) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 166.9 (s, COOMe), 152.8 (s, COOBoc), 142.5 (s, C-aromat.), 139.0 (s, C-aromat.), 131.2 (s, C-aromat.), 122.5 (d, C-aromat.), 121.3 (d, C-aromat.), 118.7 (d, C-aromat.), 81.2 (s, Boc), 64.8 (t, CH_2OH), 52.4 (q, CH_3), 28.4 (q, Boc) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$: 281.1263, gefunden: 281.1261; **Schmelzpunkt**: 140.4 - 140.8 $^\circ\text{C}$.

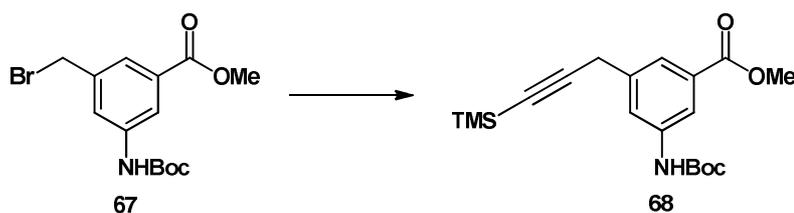
3-Bromomethyl-5-tert-butoxycarbonylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester 57

PPh_3 (23.32 g, 88.2 mmol, 1.35 Äq.) und Imidazol (6.72 g, 98.78 mmol, 1.5 Äq.) werden in CH_2Cl_2 (250 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wird Brom (4.38 mL, 85.61 mmol,

1.3 Äq.) zugetropft. Anschließend wird 3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **56** (18.51 g, 65.85 mmol, 1 Äq.) gelöst in CH₂Cl₂ (100 mL) vorsichtig bei dieser Temperatur zugegeben und 30 min gerührt. Anschließend wird 90 min bei RT gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von dest. Wasser (100 mL) beendet, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (CH₂Cl₂/ CH₃OH 50/1) wird 3-Brommethyl-5-*tert*-butoxycarbonylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **57** (20.29 g, 59.12 mmol, 90 %) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.81 (s, 1H, H-aromat.), 7.81 (s, 1H, H-aromat.), 7.73 (s, 1H, H-aromat.), 6.61 (br.s, 1H, NH) 4.48 (s, 2H, CH₂Br), 3.91 (s, 3H, CH₃), 1.53 (s, 9H, Boc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 166.4 (s, COOMe), 152.6 (s, Boc), 139.3 (s, C-aromat.), 139.2 (s, C-aromat.), 131.6 (s, C-aromat.), 124.7 (d, C-aromat.), 123.2 (d, C-aromat.), 119.4 (d, C-aromat.), 81.4 (s, Boc), 52.5 (q, CH₃), 32.6 (t, CH₂Br), 28.4 (q, Boc) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₄H₁₈BrNO₄ [M]⁺: 343.0419, gefunden: 343.0421; **Schmelzpunkt**: 115.6-116.8 °C.

3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoesäuremethylester **58**



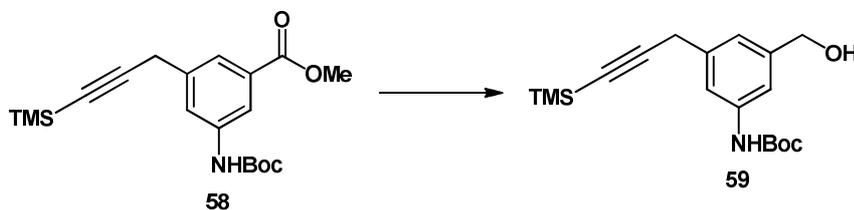
TMS-Acetylen (4 mL, 28.41 mmol, 1.95 Äq.) wird in THF abs. (15 mL) gelöst und bei -78 °C tropfenweise mit *n*-BuLi (11.4 mL, 2.5 M in Hexan, 28.31 mmol, 1.95 Äq.) versetzt. Anschließend wird 1.5 h bei -78 °C gerührt.

Indiumchlorid (2.28 g, 10.20 mmol, 0.7 Äq.) wird in THF abs. (15 mL) gelöst. Bei -78 °C wird die hergestellte Lösung des lithiierten TMS-Acetylens zugegeben. Es wird 30 min bei -78 °C und danach 45 min bei RT gerührt.

3-Brommethyl-5-*tert*-butoxycarbonylaminobenzoensäuremethylester **57** (5.00 g, 14.57 mmol, 1.0 Äq.) wird in THF abs. (60 mL) gelöst und mit Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (0.22 g, 0.29 mmol, 2 mol%) versetzt. Diese Lösung wird auf 65 °C erwärmt, Ethynylindiumlösung (23 mL, 6.90 mmol, 0.47 Äq.) wird zugetropft und anschließend 48 h bei 65 °C gerührt. Nach dieser Zeit werden Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (0.05 g, 0.07 mmol, 0.4 mol%) und Ethynyl-indiumlösung (10 mL, 3.00 mmol, 0.2 Äq.) nachgegeben und weitere 5 h bei 65 °C gerührt. Danach wird die Mischung mit CH₃OH hydrolysiert und Kieselgel zugesetzt. Das Lösungsmittel wird am Vakuum abgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10/1) wird 3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoensäure-methylester **58** als gelber Feststoff (4.36 g, 10.08 mmol, 83 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.81 (s, 1H, H-aromat.), 7.72 (s, 1H, H-aromat.), 7.69 (s, 1H, H-aromat.), 6.54 (br. s, 1H, NH), 3.90 (s, 3H, CH₃), 3.66 (s, 2H, CH₂), 1.53 (s, 9H, Boc), 0.22 (s, 9H, TMS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ 166.9 (s, COOMe), 152.7 (s, Boc), 138.3 (s, C-aromat.), 138.0 (s, C-aromat.), 131.2 (s, C-aromat.), 123.8 (d, C-aromat.), 122.4 (d, C-aromat.), 117.9 (d, C-aromat.), 103.5 (s, C-Alkin), 88.0 (s, Boc), 81.1 (s, C-Alkin), 52.3 (q, CH₃), 28.4 (q, Boc), 26.2 (t, CH₂), 0.06 (q, TMS) ppm; HRMS (EI) *m/z* berechnet für C₁₉H₂₇NO₄Si [M]⁺: 361.1709, gefunden: 361.1712; **Schmelzpunkt**: 116.2 °C.

[3-Hydroxymethyl-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-phenyl]-carbaminsäurebutylester **59**

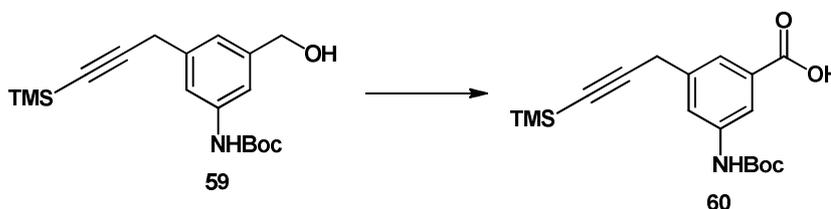


3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilylprop-2-ynyl)-benzoensäuremethylester **58** (181 mg, 0.50 mmol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ abs. (20 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt, langsam mit DIBAL-H (1.25 mL, 1.25 mmol, 2.5 Äq.) versetzt und für 1.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch die Zugabe von 1 mL Essigsäureethylester

beendet. Dann wird die Mischung mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit K-Na-Tartrat-Lösung über Nacht gerührt. Die wässrige Phase wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10/1 \rightarrow 5/1 \rightarrow 3/1) wird [3-Nitro-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-phenyl]-methanol **59** (152 mg, 0.46 mmol, 91%) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.86 (s, 1H, H-aromat.), 7.73 (s, 1H, H-aromat.), 7.70 (s, 1H, H-aromat.), 6.63 (br. s, 1H, NH), 3.90 (s, 3H, CH_3), 3.66 (s, 2H, CH_2), 1.52 (s, 9H, Boc), 0.20 (s, 9H, TMS) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 166.9 (s, COOBoc), 152.7 (s, C-aromat.), 138.9 (s, C-aromat.), 138.0 (s, C-aromat.), 131.2 (d, C-aromat.), 123.8 (d, C-aromat.), 122.4 (d, C-aromat.), 103.5 (s, C-Alkin), 88.0 (s, C-Alkin), 81.1 (s, Boc), 52.3 (t, CH_2), 28.4 (q, Boc), 26.2 (t, CH_2), 0.16 (q, TMS) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{Si}$ $[\text{M}]^+$: 333.1761, gefunden: 333.1760.

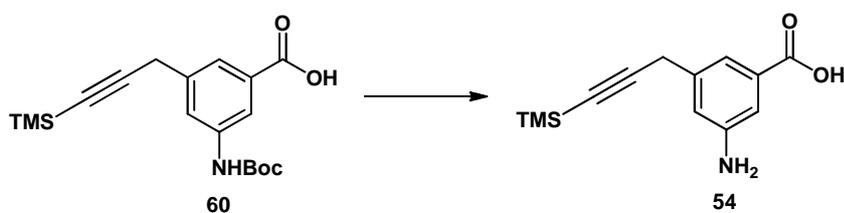
3-tert-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **60**



[3-Hydroxymethyl-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-phenyl]-carbaminsäurebutylester **59** (2.83 g, 8.49 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (100 mL) gelöst, mit JONES Reagenz (4.3 mL, 10.23 mmol, 1.2 Äq.) versetzt und für 1.5 h gerührt. Dann wird die Reaktion durch die Zugabe von *iso*-Propanol (110 mL) und H_2O (110 mL) beendet. Die wässrige Phase wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden anschließend einmal mit NaCl-Lsg. ges. extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-tert-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilanyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **60** (2.64 g, 7.60 mmol, 90 %) als beigefarbene Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 9.59 (br. s, COOH), 7.95 (s, 1H, H-aromat.), 7.71 (s, 1H, H-aromat.), 7.51 (s, 1H, H-aromat.), 3.72 (s, 2H, CH₂), 1.48 (s, 9H, Boc), 0.16 (s, 9H, TMS) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.1 (s, COOH), 152.7 (s, COOBoc), 140.0 (s, C-aromat.), 137.2 (s, C-aromat.), 131.3 (s, C-aromat.), 122.4 (d, C-aromat.), 121.6 (d, C-aromat.), 117.3 (d, C-aromat.), 104.9 (s, C-Alkin), 86.8 (s, C-Alkin), 79.4 (s, Boc), 28.1 (q, Boc), 25.1 (t, CH₂), 0.05 (q, TMS) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₈H₂₅NO₄Si [M]⁺: 347.1553, gefunden: 347.1550; **Schmelzpunkt**: 128.5 °C.

3-Amino-5-(3-trimethylsilyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **54**

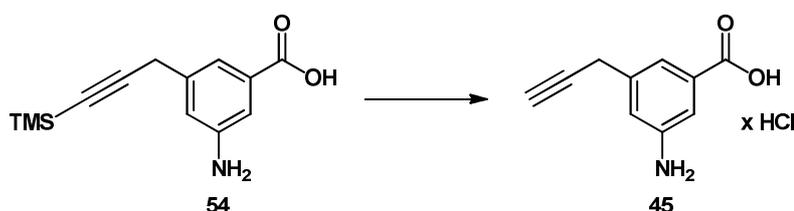


3-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-(3-trimethylsilyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **60** (2.62 g, 7.54 mmol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ (250 mL) gelöst, mit TFA (23.2 mL, 301.6 mmol, 40 Äq.) versetzt und 3.5 h bei RT gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von Na₂CO₃/NaHCO₃-Lsg. beendet, das CH₂Cl₂ im Vakuum entfernt, mit HCl (2 M) auf pH 5 angesäuert und die zurückbleibende wässrige Phase fünfmal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Amino-5-(3-trimethylsilyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **54** (1.87 g, 7.54 mmol, quant.) als hellbraunes Öl erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.05 (dd, 1H, *J* = 2.1, 1.8 Hz, H-aromat.), 7.04 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.5 Hz, H-aromat.), 6.71 (dd, 1H, *J* = 2.1, 1.5 Hz, H-aromat.), 5.36 (br.s, 1H, NH₂), 3.58 (s, 2H, CH₂), 0.15 (s, 9H, TMS) ppm; **¹³C-NMR**: (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 149.0 (s, COOH), 137.0 (s, C-aromat.), 118.8 (s, C-aromat.), 117.2 (s, C-aromat.), 116.3 (d, C-aromat.), 115.8 (d, C-aromat.), 113.1 (d,

C-aromat.), 105.6 (s, C-Alkin), 86.1 (s, C-Alkin), 25.2 (t, CH₂), 0.2 (q, TMS) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₁₃H₁₆NO₂Si [M-H]⁻: 246.0950, gefunden: 246.0950.

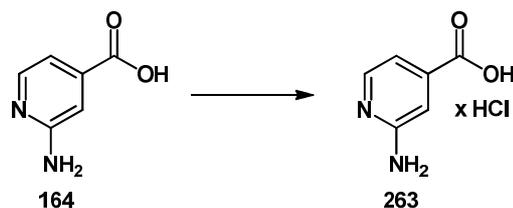
3-Amino-5-prop-2-inylbenzoesäure Hydrochlorid **45**



3-Amino-5-(3-trimethylsilyl-prop-2-ynyl)-benzoesäure **54** (500 mg, 2.02 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (50 mL) gelöst, mit KF (1.96 g, 18.14 mmol, 9 Äq.) versetzt und bei 50°C zwei Tage gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das CH₃OH im Vakuum entfernt, die wässrige Phase mit H₂O verdünnt und mit HCl (2 M) auf pH 4 angesäuert. Dann wird die wässrige Phase mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückgebliebene braune Feststoff wird aus halbkonz. HCl umkristallisiert. Es wird 3-Amino-5-prop-2-inylbenzoesäure Hydrochlorid **45** (652 mg, 1.42 mmol, 71 %) als braune Kristalle erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 12.59 (br. s, 1H, COOH), 7.06 (dd, 1H, $J = 1.4, 0.9$ Hz, H-aromat.), 7.04 (dd, 1H, $J = 1.8, 0.9$ Hz, H-aromat.), 6.74 (dd, 1H, $J = 1.8, 1.4$ Hz, H-aromat.), 5.36 (br.s, 2H, NH₂), 3.52 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, CH₂), 3.05 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz, H-Alkin) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.8 (s, COOH), 149.0 (s, C-aromat.), 137.1 (s, C-aromat.), 131.5 (s, C-aromat.), 117.2 (d, C-aromat.), 116.1 (d, C-aromat.), 113.0 (d, C-aromat.), 82.4 (s, C-Alkin), 73.1 (d, C-Alkin), 23.8 (t, CH₂) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₁₀H₈NO₂ [M-H]⁻: 174.0555, gefunden: 174.0560; **Schmelzpunkt:** 160.0-160.1 °C.

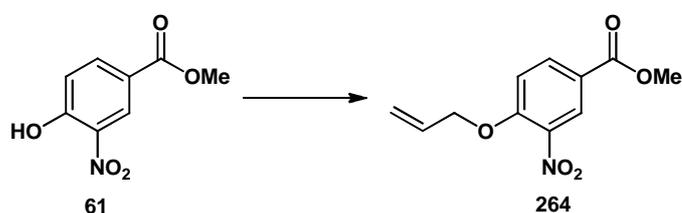
2-Aminoisonicotinsäure Hydrochlorid 263



2-Aminoisonicotinsäure **164** (500 mg, 3.62 mmol, 1 Äq.) wird in halbkonz. HCl (3 mL) gelöst und für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung bei 4 °C auskristallisiert. Die entstandenen Kristalle werden abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wird 2-Aminoisonicotinsäure Hydrochlorid **263** (590 mg, 3.40 mmol, 94 %) als farblose Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₅ = 2.50 ppm): δ 8.50 (br. s, 2H, NH₂), 8.05 (dd, 1H, *J* = 6.1, 0.3 Hz, H-aromat.), 7.50 (dd, 1H, *J* = 1.9, 0.3 Hz, H-aromat.), 7.09 (dd, 1H, *J* = 6.1, 1.9 Hz, H-aromat.) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₆ = 39.52 ppm): δ 164.4 (s, COOH), 155.0 (s, C-aromat.), 144.2 (s, C-aromat.), 137.0 (s, C-aromat.), 114.4 (d, C-aromat.), 110.3 (d, C-aromat.) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₆H₅N₂O₂ [M-H]⁻: 137.0351, gefunden: 137.0349; **Schmelzpunkt**: 256.8-257.0 °C.

4-Allyloxy-3-nitrobenzoesäuremethylester 264



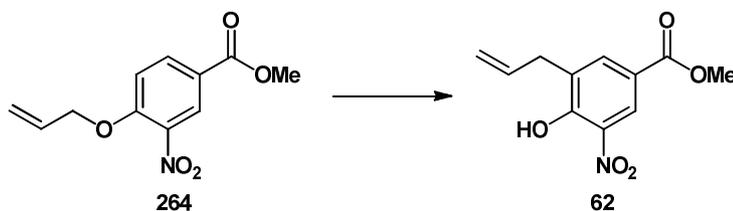
4-Hydroxy-3-nitrobenzoesäuremethylester **61** (10 g, 50.7 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (250 mL) gelöst. Dann werden K₂CO₃ (14.02 g, 101.4 mmol, 2 Äq.) und Allylbromid (13.15 mL, 152.1 mmol, 3 Äq.) zugegeben und es wird 24 h unter Rückfluss erhitzt.

Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Die Filtrat wird im Vakuum eingedunstet, der Rückstand in Essigsäureethylester und Wasser aufgenommen und die

wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wird 4-Allyloxy-3-nitrobenzoesäuremethylester **264** (9.69 g, 40.86 mmol, 81 %) als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.45 (dd, 1H, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-aromat.), 7.42 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-aromat.), 6.79 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-aromat.), 6.07 (ddt, 1H, $J = 17.0, 10.7, 5.3$ Hz, H-allyl.), 5.41 (dd, 1H, $J = 17.0, 1.3$ Hz, H-allyl.), 5.31 (dd, 1H, $J = 10.7, 1.3$ Hz, H-allyl.), 4.62 (ddd, 2H, $J = 5.3, 1.3, 1.3$ Hz, CH_2), 3.86 (s, 3H, CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 165.1 (s, COOMe), 155.2 (s, C-aromat.), 139.7 (d, C-allyl.), 135.2 (s, C-aromat.), 131.1 (d, C-aromat.), 127.4 (s, C-aromat.), 122.8 (d, C-aromat.), 119.1 (d, C-allyl.), 114.4 (d, C-aromat), 70.4 (t, CH_2), 52.6 (q, CH_3), 45.2 (q, CH_3) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$: 237.0637, gefunden: 237.0638; **Schmelzpunkt**: 103.4-103.5 °C.

3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62**



Vorschrift 1:

4-Allyloxy-3-nitrobenzoesäuremethylester **264** (1.50 g, 6.32 mmol, 1Äq.) wird in einem Mikrowellenglas in Toluol (10 mL) gelöst, mit SiC (800 mg) versetzt, verschlossen und 2 h bei 200 °C und 250 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wird die Mischung über Kieselgur filtiert, mit Diethylether gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 30/1 \rightarrow 4/1) wird 3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62** (0.95 g, 3.98 mmol, 63 %) als gelber Feststoff erhalten.

Vorschrift 2.

3-Nitro-4-oxyallylbenzoesäuremethylester **264** (2.00 g, 8.43 mmol, 1Äq.) wird in ein Mikrowellenglas gegeben und 30 min in der Mikrowelle auf 200 °C erhitzt. Das entstandene braune Öl wird säulenchromatographisch (PE/EE 30/1 → 4/1) gereinigt. Es wird 3-Nitro-4-hydroxy-5-allylbenzoesäuremethylester **62** (1.13 g, 4.76 mmol, 57 %) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ = 11.25 (d, 1H, *J* = 0.4 Hz, OH), 8.70 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-aromat.), 8.11 (dd, 1H, *J* = 2.5, 0.4 Hz, H-aromat.), 5.98 (ddt, 1H, *J* = 10.1, 6.7 Hz, H-allyl.), 5.14 (ddt, 2H, *J* = 10.1, 1.4 Hz, H-allyl.), 3.93 (s, 3H, Me), 3.51 (dt, 2H, *J* = 6.7, 1.4 Hz, CH₂) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ = 165.15 (s, COOMe), 156.44 (s, C-aromat.), 137.73 (d, C-aromat.), 134.47 (d, C-allyl.), 133.31 (s, C-aromat.), 132.14 (s, C-aromat.), 125.48 (s, C-aromat.), 121.99 (d, C-aromat.), 117.63 (t, C-allyl.), 52.65 (q, CH₃), 33.79 (t, CH₂) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₁NO₅ [M]⁺: 237.0637, gefunden: 237.0636; **Schmelzpunkt:** 53.4 °C.

7-Nitrobenzofuran-5-carboxylsäuremethylester 65

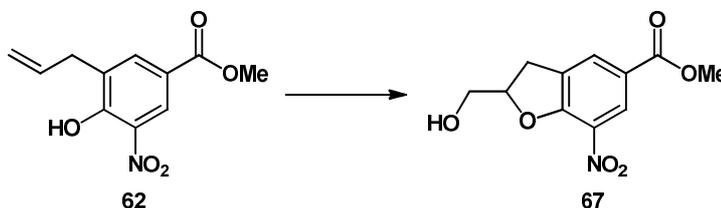
3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62** (340 mg, 1.43 mmol, 1Äq.) wird in CH₃OH (20 mL) gelöst, auf -78°C gekühlt und 40 min Ozon durch die Lösung geleitet. Nach dieser Zeit wird Dimethylsulfid (0.7 mL) zugegeben und die Mischung wird auf RT erwärmt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der zurückgebliebene gelbe Feststoff mit Diethylether und Wasser versetzt. Die organische Phase wird mit Wasser und NaCl-Lsg. ges. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Der ausgefallene Feststoff wird mit Phosphorsäure (3 mL, 85%) versetzt und 20 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird mit Wasser verdünnt und mehrmals mit

Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und NaCl-Lsg. ges. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 20/1 → 10/1 → 5/1) wird 7-Nitrobenzofuran-5-carboxylsäuremethylester **65** (46 mg, 0.28 mmol, 15 %) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.86 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H-aromat.), 8.64 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H-aromat.), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-aromat.), 7.03 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-aromat.), 4.01 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.4 (s, C-COOMe), 149.2 (s, C-aromat.), 148.7 (d, C-aromat.), 131.9 (s, C-aromat.), 129.7 (s, C-aromat.), 129.7 (s, C-aromat.), 125.9 (s, C-aromat.), 122.6 (d, C-aromat.), 107.7 (d, C-aromat.), 52.9 (q, CH₃) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₀H₇NO₅ [M]⁺: 221,0324, gefunden: 221.0323; **Schmelzpunkt:** 136.5 °C.

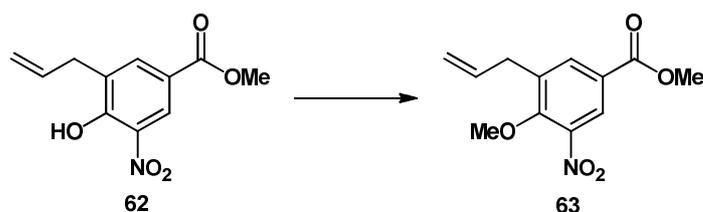
2-Hydroxymethyl-7-nitro-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylsäuremethylester **67**



3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62** (2 g, 8.43 mmol, 1 Äq.) wird in einem THF/H₂O-Gemisch (70 mL) gelöst und dann mit OsO₄ in *tert*-Butanol (28 µL, 0.007 µmol, 0.08 mol%, 2.5 M) und NaIO₄ (3.8 g, 17.77 mmol, 2.1 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 48 h bei RT gerührt. Danach wird Natriumthiosulfat-Lsg. ges. zugegeben und die wässrige Phase wird zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 5/1 → 2/1) wird 2-Hydroxymethyl-7-nitro-2,3-dihydrobenzofuran-5-carboxylsäuremethylester **67** (1.86 g, 7.33 mmol, 87 %) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.64 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 8.08 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 5.21 (dddd, 1H, *J* = 9.5, 7.0, 6.5, 3.4 Hz, CH), 3.93 (s, 3H, CH₃), 3.57 (dd, 1H, *J* = 10.3, 3.4 Hz, CH₂OH), 3.55 (dd, 1H, *J* = 16.6, 9.5 Hz, CHOH), 3.47 (dd, 1H, *J* = 10.3, 7.0 Hz, CH), 3.20 (dd, 1H, *J* = 16.6, 6.5 Hz, CH) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.1 (s, COOMe), 157.5 (s, C-aromat.), 132.4 (s, C-aromat.), 131.8 (s, C-aromat.), 131.3 (d, C-aromat.), 126.9 (d, C-aromat.), 123.7 (s, C-aromat.), 85.2 (d, CH), 52.7 (t, CH₃), 35.1 (t, CH₂), 7.6 (t, CH₂) ppm; **HRMS (EI) *m/z*** berechnet für C₁₁H₁₀NO₅ [M-H₂O+H]⁺: 236.0559, gefunden: 236.0558; **Schmelzpunkt:** 112.4-112.5 °C.

3-Allyl-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **63**

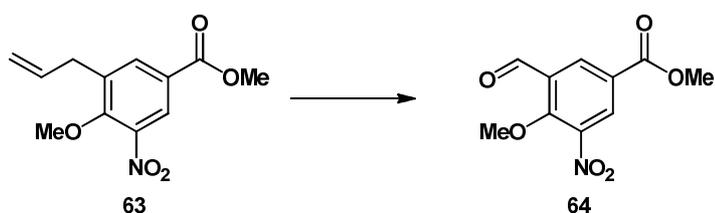


3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62** (500 mg, 2.11 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (20 mL) gelöst, mit K₂CO₃ (440 mg, 3.17 mmol, 1.5 Äq.) und Me₂SO₄ (0.3 mL, 3.17 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und 6 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird Wasser zugegeben und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Allyl-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **63** (530 mg, 2.11 mmol, quant.) als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.33 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 8.09 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H-aromat.), 5.95 (ddt, 1H, *J* = 16.9, 10.0, 6.3 Hz, H-allyl.), 5.17 (dd, 1H, *J* = 10.0, 1.3 Hz, H-allyl.), 5.11 (dd, 1H, *J* = 16.9, 1.3 Hz, H-allyl.), 3.96 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 3.50 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.0 (s, COOMe), 155.1 (s, C-aromat.), 143.8 (s, C-aromat.), 137.0 (s, C-aromat.), 135.8 (d, C-allyl.), 135.2 (d, C-aromat.), 125.9 (d, C-aromat.), 125.2 (d, C-aromat.), 117.7 (d, C-allyl.), 62.9 (q, CH₃), 52.7 (q, CH₃), 33.9 (t, CH₂) ppm; **HRMS (EI)**

m/z berechnet für $C_{12}H_{13}NO_5$ $[M]^+$: 251.0794, gefunden: 251.0794; **Schmelzpunkt**: 49.9-50.1 °C.

3-Formyl-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **64**

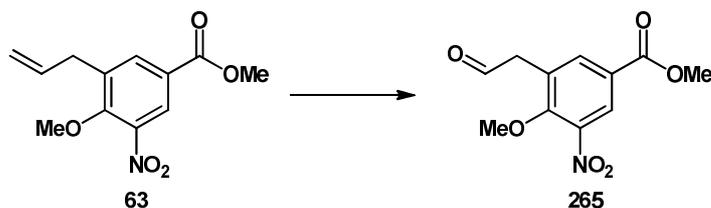


3-Allyl-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **63** (500 mg, 1.99 mmol, 1Äq.) wird in einem THF/H₂O-Gemisch (2 mL) gelöst, mit NaIO₄ (894 mg, 4.18 mmol, 2.1 Äq.) und OsO₄ in *tert.* Butanol (7 µL, 0.0017 mmol, 0.08 mol%, 2.5 M) versetzt und 48 h bei RT gerührt.

Danach wird ges. Natriumthiosulfat-Lösung zugegeben und die wässrige Phase wird zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 5/1 → 2/1) wird 3-Formyl-4-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethyl-ester **64** (423 mg, 1.77 mmol, 89 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 10.41 (s, 1H, H-Aldehyd), 8.71 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-aromat.), 8.69 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-aromat.), 4.13 (s, 3H, CH₃), 3.98 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 186.9 (d, C-Aldehyd), 164.0 (s, COOMe), 159.0 (s, C-aromat.), 143.9 (s, C-aromat.), 134.5 (d, C-aromat.), 131.8 (d, C-aromat.), 131.3 (s, C-aromat.), 126.6 (s, C-aromat.), 65.3 (q, CH₃), 53.1 (q, CH₃) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{12}H_{10}NO_6$ $[M+H]^+$: 240.0508, gefunden: 240.0505; **Schmelzpunkt**: 90.7-90.8 °C

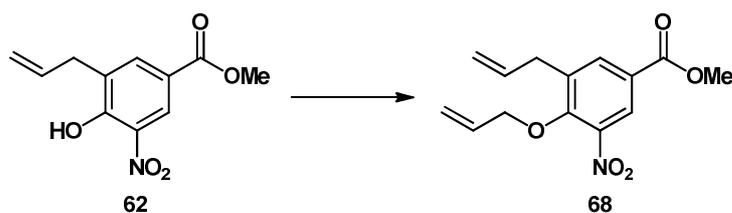
4-Methoxy-3-nitro-5-(2-oxo-ethyl)-benzoesäuremethylester **265**



3-Allyl-5-amino-4-methoxybenzoesäuremethylester **63** (300 mg, 1.19 mmol, 1 Äq.) wird in CH_2Cl_2 abs. (10 mL) gelöst und auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird 20 min Ozon durch die Lösung geleitet. Anschließend werden 1.5 mL Dimethylsulfid (1.5 mL) zugegeben, die Lösung auf RT erwärmt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit dest. Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel (PE/EE 20/1 \rightarrow 10/1 \rightarrow 5/1). Es werden 4-Methoxy-3-nitro-5-(2-oxo-ethyl)-benzoesäuremethylester **265** (218 mg, 0.86 mmol, 72 %) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 9.84 (t, 1H, $J = 1.5$ Hz, H-Aldehyd), 8.48 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-aromat.), 8.10 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-aromat.), 3.94 (s, 3H, CH_3), 3.90 (d, 2H, $J = 1.5$ Hz, CH_2), 3.88 (s, 3H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 197.15 (d, C-Aldehyd), 164.7 (s, COOMe), 155.7 (s, C-aromat.), 136.8 (d, C-aromat.), 129.7 (s, C-aromat.), 126.9 (d, C-aromat.), 126.9 (s, C-aromat.), 125.9 (s, C-aromat.), 62.6 (q, CH_3), 52.9 (q, CH_3), 45.2 (t, CH_2) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_6$ $[\text{M}]^+$: 253.0586, gefunden: 253.0587.

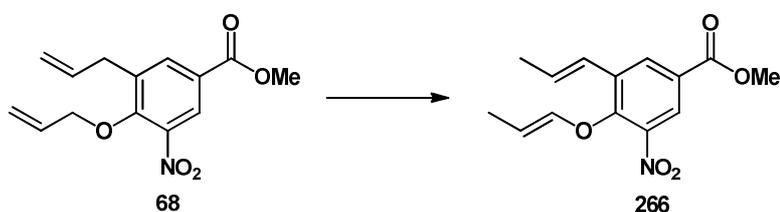
3-Allyl-4-allyloxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **68**



3-Allyl-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **62** (600 mg, 2.53 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (20 mL) gelöst, mit K_2CO_3 (700 mg, 5.06 mmol, 2 Äq.) und Allylbromid (0.7 mL, 7.59 mmol, 3 Äq.) versetzt und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird der Feststoff abfiltriert, mit Aceton gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in dest. Wasser und Essigsäureethylester aufgenommen, die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Allyl-4-allyloxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **68** (701 mg, 2.53 mmol, quant.) als gelbes Öl erhalten.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7.26$ ppm): $\delta = 8.34$ (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-aromat.), 8.10 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H-aromat.), 6.04 (ddt, 1H, $J = 17.0, 10.4, 5.9$ Hz, H-allyl.), 5.95 (ddt, 1H, $J = 17.2, 9.9, 6.5$ Hz, H-allyl.), 5.39 (dd, 1H, $J = 17.0, 1.2$ Hz, H-allyl.), 5.31 (dd, 1H, $J = 10.4, 1.2$ Hz, H-allyl.), 5.18 (dd, 1H, $J = 9.9, 1.4$ Hz, H-allyl.), 5.12 (dd, 1H, $J = 17.2, 1.4$ Hz, H-allyl.), 4.53 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, CH_2), 3.51 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz, CH_2) ppm; ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 77.16$ ppm): $\delta = 165.0$ (s, COOMe), 153.8 (s, C-aromat.), 144.2 (s, C-aromat.) 137.3 (d, C-allyl.), 135.7 (d, C-aromat.) 135.2 (d, C-allyl.), 132.3 (s, C-aromat.), 126.0 (s, C-aromat.), 125.1 (d, C-aromat.), 119.6 (t, C-allyl.) 117.8 (t, C-allyl.) 76.4 (t, CH_2), 52.8 (q, CH_3), 34.0 (t, CH_2) ppm. **HRMS (EI)** m/z berechnet für $C_{14}H_{15}NO_5$ $[M]^+$: 277.0950, gefunden: 277.0948.

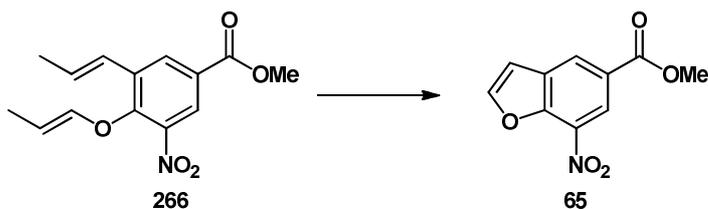
3-Nitro-5-propenyl-4-propenyloxybenzoesäuremethylester **266**



3-Allyl-4-allyloxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **68** (380 mg, 1.38 mmol, 1 Äq.) wird in trockenem und entgastem Toluol (5 mL) gelöst. Danach wird $[RuClH(CO(PPh_3)_3)]$ (180 mg, 0.19 mmol, 14 mol%) hinzugegeben und es wird 72 h bei $90^\circ C$ gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Mischung über Kieselgel filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, und es werden 3-Nitro-5-propenyl-4-propenyloxybenzoesäuremethylester **266**

(266 mg, Rohprodukt) als baunes Öl erhalten (Gemisch mit Edukt, Umsatzbestimmung über $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum). Das Produkt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäuremethylester **65**



Vorschrift 1:

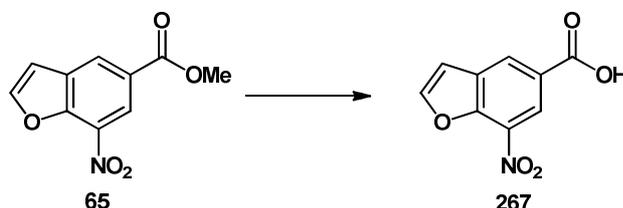
3-Nitro-5-propenyl-4-propenyloxybenzoessäuremethylester **266** (140 mg, 0.49 mmol, 1 Äq.) werden in trockenem und entgastem Toluol (2.5 mL) gelöst, mit Grubbs II-Katalysator (40 mg, 0.05 mmol, 10 mol %) versetzt und das Reaktionsgemisch 3 h bei 90 °C gerührt. Nach dieser Zeit wird eine weitere Spatelspitze des Katalysators hinzugegeben. Nach insgesamt 4.5 h wird die Reaktion beendet und mit Essigsäureethylester über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (PE/EE 20/1) gereinigt. Es wird 7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäuremethylester **65** (40 mg, 0.17 mmol, 35 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

Vorschrift 2:

3-Nitro-5-propenyl-4-propenyloxybenzoessäuremethylester **266** (500 mg, 1.81 mmol, 1 Äq.) werden in trockenem und entgastem Toluol (5 mL) gelöst, dann werden Grubbs-Hoveyda-Katalysator (40 mg, 0.06 mmol, 34 mol%) hinzugefügt und das Gemisch wird für 4 h bei 90 °C gerührt. Nach dieser Zeit wird eine weitere Spatelspitze des Katalysators hinzugegeben. Die Reaktion wird nach insgesamt 5.5 h beendet und mit Essigsäureethylester über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (PE/EE 20/1) gereinigt. Es wird 7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäuremethylester **65** (140 mg, 0.73 mmol, 40 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

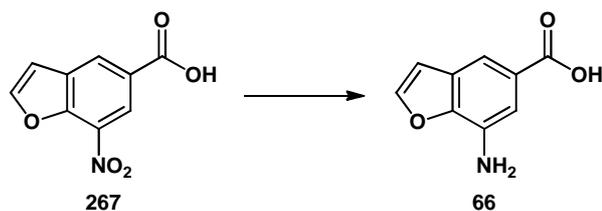
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.86 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H-aromat.), 8.64 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H-aromat.), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-aromat.), 7.03 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H-aromat.), 4.01 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.4 (s, COOMe), 149.2 (s, C-aromat.), 148.7 (d, C-aromat.), 131.9 (s, C-aromat.), 129.7 (s, C-aromat.), 129.7 (s, C-aromat.), 125.9 (s, C-aromat.), 122.6 (d, C-aromat.), 107.7 (d, C-aromat.), 52.9 (q, CH₃) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₀H₇NO₅ [M]⁺: 221.0324, gefunden: 221.0323; **Schmelzpunkt:** 136.5 °C.

7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäure **267**



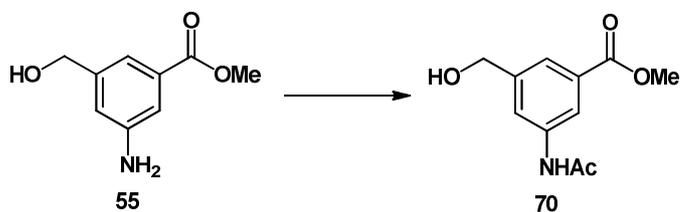
7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäuremethylester **65** (20 mg, 0.09 mmol, 1Äq.) wird in CH₃OH (5 mL) gelöst, mit LiOH (0.45 mL, 0.45 mmol, 5 Äq., 1M) versetzt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit HCl (2 M) neutralisiert, das CH₃OH im Vakuum entfernt, mit dest. Wasser verdünnt und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäure **267** (18.5 mg, 0.09 mmol, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.76 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H-aromat.), 8.69 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H-aromat.), 8.12 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-aromat.), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H-aromat.) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 167.7 (s, COOH), 150.5 (d, C-aromat.), 150.3 (s, C-aromat.), 144.8 (s, C-aromat.), 133.4 (d, C-aromat.), 130.7 (s, C-aromat.), 127.7 (d, C-aromat.), 123.0 (d, C-aromat.), 108.8 (d, C-aromat.) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₉H₄NO₅ [M-H]⁻: 206.0089, gefunden: 206.0087; **Schmelzpunkt:** 261.6-262.1 °C.

7-Aminobenzofuran-5-carbonsäure 66

7-Nitrobenzofuran-5-carbonsäure **267** (0.23 mg, 0.11 mmol, 1 Äq.) wird in Essigsäureethylester (3 mL) gelöst und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mg, 0.44 mmol, 4 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird mit NaHCO_3 -Lsg. ges. neutralisiert und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Es wird 7-Aminobenzofuran-5-carboxylsäure **66** (19.5 mg, 0.11 mmol, quant.) als beigefarbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_5 = 2.50$ ppm): δ 7.99 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H-aromat.), 7.50 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H-aromat.), 7.22 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H-aromat.), 6.94 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H-aromat.) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$:** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 168.1 (s, COOH), 146.1 (s, C-aromat.), 145.6 (d, C-aromat.), 133.5 (s, C-aromat.), 127.4 (s, C-aromat.), 126.5 (s, C-aromat.), 110.9 (d, C-aromat.), 109.7 (d, C-aromat.), 107.7 (d, C-aromat.) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_3$ $[\text{M-H}]^-$: 176.0348, gefunden: 176.0347; **Schmelzpunkt:** 161.8-167.0 °C (Zersetzung).

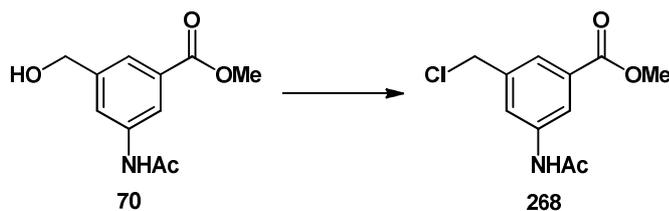
3-Acetylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester 70

3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **55** (3.45 g, 19.04 mmol, 1 Äq.) wird in THF (50 mL) gelöst. Anschließend werden Acetanhydrid (1.8 mL, 19.04 mmol, 1 Äq.) und Triethylamin (2.65 mL, 19.04 mmol, 1 Äq.) zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Anschließend

werden nochmals Acetanhydrid (0.9 mL, 9.52 mmol, 0.5 Äq.) und Triethylamin (1.33 mL, 9.52, 0.5 Äq.) zugegeben und weitere 2 h bei RT gerührt. Dann wird die Reaktion durch die Zugabe von ges. NaHCO₃-Lsg. beendet, es wird Essigsäureethylester zugegeben, die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird bei 4 °C kristallisiert. Die entstandenen Kristalle werden abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wird 3-Acetylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **70** (3.16 g, 14.17 mmol, 74 %) als braune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 10.13 (s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, H-aromat.), 7.78 (s, 1H, H-aromat.), 7.59 (s, 1H, H-aromat), 5.35 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, OH), 4.52 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz, CH₂), 3.84 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, Ac) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 39.52 ppm): δ 168.5 (s, Ac), 166.2 (s, COOMe), 143.9 (s, C-aromat.), 139.5 (s, C-aromat.), 129.8 (s, C-aromat.), 121.5 (d, C-aromat.), 121.2 (d, C-aromat.), 117.8 (d, C-aromat.), 65.4 (t, CH₂OH), 52.1 (q, CH₃), 24.0 (q, Ac) ppm; HRMS (EI) *m/z* berechnet für C₁₁H₁₃NO₄ [M]⁺: 223.0845, gefunden: 223.0846; **Schmelzpunkt**: 149.4-150.4 °C.

3-Acetylamino-5-chloromethylbenzoesäuremethylester **268**

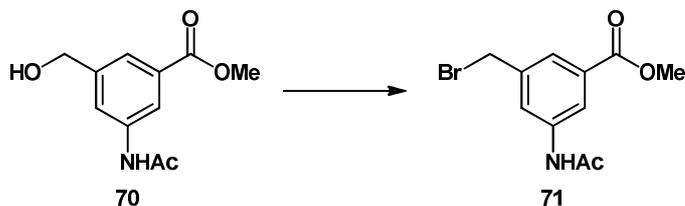


3-Acetylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **70** (2.26 g, 10.13 mmol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ (50 mL) gelöst und mit Pyridin (1.8 mL, 22.30 mmol, 2.2 Äq.) versetzt. Die Mischung wird auf 0°C gekühlt, dann wird Thionylchlorid (1.62 mL, 22.30 mmol, 2.2 Äq.) zugetropft und es wird 12 h bei RT gerührt. Durch die Zugabe von dest. Wasser wird die Reaktion beendet. Es wird CH₂Cl₂ (50 mL) zugegeben, die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je einmal mit Wasser, HCl (2 M) und NaCl-Lsg. ges. gewaschen. Dann wird die organische

Phase über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel (PE/EE 2/1 \rightarrow 1/1). Es wird 3-Acetylamino-5-chloromethylbenzoesäuremethylester **268** (1.10 g, 4.55 mmol, 45 %) als hellbrauner Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.01 (s, 1H, H-aromat.), 7.93 (s, 1H, H-aromat.), 7.81 (s, 1H, H-aromat.), 7.40 (br. s, 1H, NH), 4.59 (s, 2H, CH_2Cl), 3.92 (s, 3H, CH_3), 2.21 (s, 3H, Ac) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 168.6 (s, Ac), 166.3 (s, COOMe), 139.1 (s, C-aromat.), 138.6 (s, C-aromat.), 131.5 (s, C-aromat.), 125.4 (d, C-aromat.), 124.3 (d, C-aromat.), 120.6 (d, C-aromat.), 52.5 (t, CH_2Cl), 45.5 (q, CH_3), 24.8 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}]^+$: 241.0506, gefunden: 241.0507; **Schmelzpunkt**: 132.1-133.2 °C.

3-Acetylamino-5-bromomethylbenzoesäuremethylester **71**

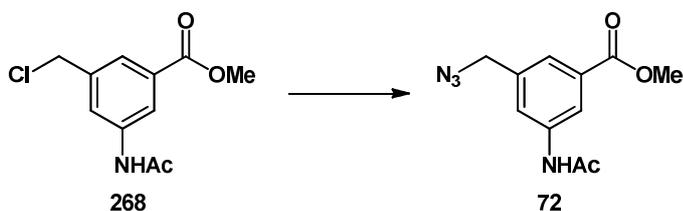


Triphenylphosphan (800 mg, 3.00 mmol, 1.35 Äq.) und Imidazol (230 mg, 3.4 mmol, 1.5 Äq.) werden in CH_2Cl_2 (9 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird Brom (0.15 mL, 2.9 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben. Diese Mischung wird anschließend zu 3-Acetylamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **70** (510 mg, 2.20 mmol, 1 Äq.) in CH_2Cl_2 (7 mL) gegeben und 4 h bei RT gerührt. Danach wird Wasser zugegeben und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 2/1) wird 3-Acetylamino-5-bromomethylbenzoesäuremethylester **71** (500 mg, 1.75 mmol, 79 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.02 (s, 1H, H-aromat.), 7.89 (s, 1H, H-aromat.), 7.81 (s, 1H, H-aromat.), 7.37 (br. s, 1H, NH), 4.48 (s, 2H, CH_2Br), 3.92 (s, 3H,

CH₃), 2.20 (s, 3H, Ac) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 168.6 (s, Ac), 166.3 (s, COOMe), 139.4 (s, C-aromat.), 138.7 (s, C-aromat.), 131.6 (s, C-aromat.), 126.0 (d, C-aromat.), 124.7 (d, C-aromat.), 120.6 (d, C-aromat.), 52.5 (t, CH₂Br), 32.4 (q, CH₃), 24.8 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₂BrNO₃ [M]⁺: 284.9998, gefunden: 285.0000; **Schmelzpunkt**: 162.9-164.4 °C.

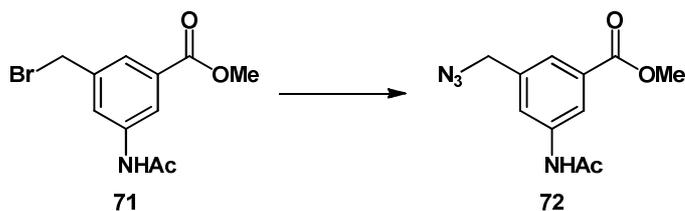
3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester **72**



3-Acetylamino-5-chloromethylbenzoesäuremethylester **268** (1.10 g, 4.55 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (15 mL) gelöst und mit dest. Wasser (5 mL) und Natriumazid (1.77 g, 27.30 mmol, 6 Äq.) versetzt. Die Mischung wird unter Rückfluss 12 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Aceton im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst. Die organische Phase wird mehrmals mit dest. Wasser und einmal mit NaCl-Lsg. ges. gewaschen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel (PE/EE 1/1). Es wird 3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäure-methylester **72** (0.97 g, 3.91 mmol, 86 %) als hellbrauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.95 (s, 1H, H-aromat.), 7.94 (s, 1H, H-aromat.), 7.73 (s, 1H, H-aromat.), 7.53 (br. s, 1H, NH), 4.39 (s, 2H, CH₂N₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, Ac) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 168.7 (s, Ac), 166.4 (s, COOMe), 138.8 (s, C-aromat.), 137.2 (s, C-aromat.), 131.5 (s, C-aromat.), 124.8 (d, C-aromat.), 123.8 (d, C-aromat.), 120.4 (d, C-aromat.), 54.4 (t, CH₂N₃), 52.6 (q, CH₃), 24.7 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₂N₄O₃ [M]⁺: 248.0909, gefunden: 248.0908; **Schmelzpunkt**: 106.4-108.1 °C.

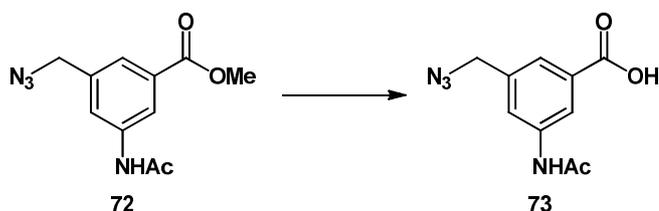
3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester **72**



3-Acetylamino-5-bromomethylbenzoesäuremethylester **71** (488 mg, 1.70 mmol, 1 Äq.) wird in Aceton (10 mL) und Wasser (5 mL) gelöst, Natriumazid (660 mg, 10.20 mmol, 6 Äq.) zugegeben und 12 h bei 80°C unter Rührfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird das Aceton im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mehrmals mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester **72** (390 mg, 1.57 mmol, 93 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.95 (s, 1H, H-aromat.), 7.94 (s, 1H, H-aromat.), 7.73 (s, 1H, H-aromat.), 7.53 (br. s, 1H, NH), 4.39 (s, 2H, CH₂N₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, Ac) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 168.7 (s, Ac), 166.4 (s, COOMe), 138.8 (s, C-aromat.), 137.2 (s, C-aromat.), 131.5 (s, C-aromat.), 124.8 (d, C-aromat.), 123.8 (d, C-aromat.), 120.4 (d, C-aromat.), 54.4 (t, CH₂N₃), 52.6 (q, CH₃), 24.7 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₂N₄O₃ [M]⁺: 248.0909, gefunden: 248.0908; **Schmelzpunkt**: 106.4-108.1 °C.

3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäure **73**

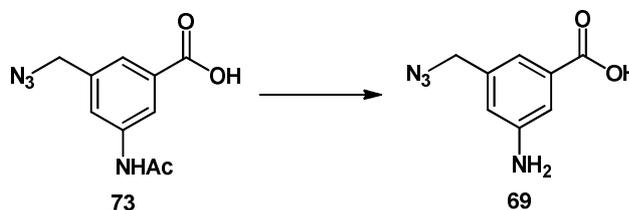


3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester **72** (8.35 g, 33.65 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (400 mL) gelöst, mit LiOH-Lsg. (168 mL, 168 mmol, 5 Äq. 1 M) versetzt und 4 h bei

60°C gerührt. Anschließend wird das CH₃OH im Vakuum entfernt, mit HCl (2 M) auf pH 2 angesäuert und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäure **73** (7.72 g, 33.01 mmol, 98 %) als hellbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 10.18 (s, 1H, NH), 8.14 (dd, *J* = 2.0, 1.7 Hz, 1H, H-aromat.), 7.84 (s, 1H, *J* = 1.7, 1.5 Hz, H-aromat.), 7.58 (s, 1H, *J* = 2.0, 1.5 Hz, H-aromat), 4.51 (s, 2H, CH₂), 2.06 (s, 3H, Ac) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 39.52 ppm): δ 168.7 (s, Ac), 166.9 (s, COOH), 139.9 (s, C-aromat.), 136.8 (s, C-aromat.), 131.6 (s, C-aromat.), 123.5 (d, C-aromat.), 122.4 (d, C-aromat.), 119.3 (d, C-aromat.), 53.2 (t, CH₂N₃), 24.0 (q, Ac) ppm; **HRMS(EI)** *m/z* berechnet für C₁₀H₁₀N₄O₃ [M]⁺: 234.0753, gefunden: 234.0754; **Schmelzpunkt**: 151.5 °C.

3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure **69**

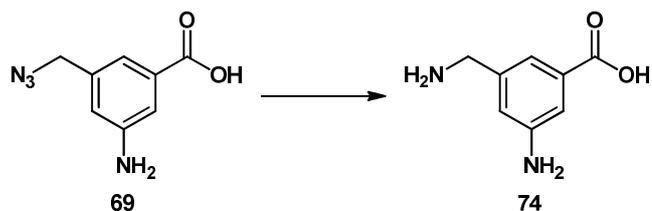


3-Acetylamino-5-azidomethylbenzoesäure **73** (8.00 g, 34.16 mmol, 1 Äq.) wird in dest. Wasser (100 mL) und HCl (11.2 mL, konz.) gelöst und 12 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Mischung mit NaOH (2 M) auf pH 5 gebracht und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure **69** (4.35 g, 22.4 mmol, 66 %) als hellbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.14 (dd, *J* = 2.2, 1.5 Hz, 1H, H-aromat.), 7.06 (dd, 1H, *J* = 1.5, 1.0 Hz, H-aromat.), 6.74 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.0 Hz, H-aromat), 5.50 (br. s, 2H, NH₂), 4.35 (s, 2H, CH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.6 (s, COOH), 149.3 (s, C-aromat.), 136.5 (s, C-aromat.), 131.7

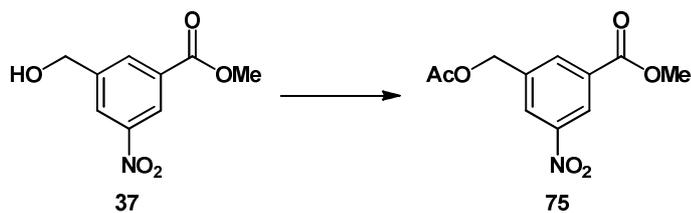
(s, C-aromat.), 117.3 (d, C-aromat.), 116.4 (d, C-aromat.), 114.2 (d, C-aromat.), 53.6 (t, CH₂N₃) ppm; **HRMS(ESI)** m/z berechnet für C₈H₉N₄O₂ [M+H]⁺: 193.0726, gefunden: 193.0725; **Schmelzpunkt**: 129.1-129.2 °C.

3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure **74**



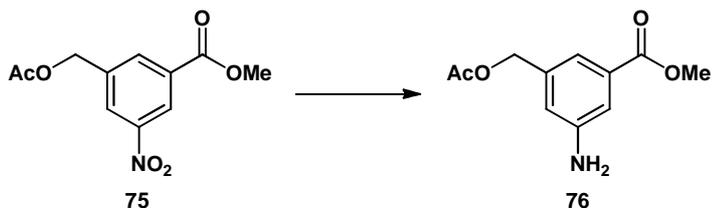
3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure **69** (300 mg, 0.156 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (5 mL) gelöst und mit Eisessig (2 mL) und Pd/C (170 mg, 0.0156 mmol, 10 mol% Äq.) versetzt. Diese Mischung wird unter Wasserstoffatmosphäre 72 h heftig gerührt. Anschließend wird über Kieselgur und Sand filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/CH₃OH 5/1 → CH₃OH) wird 3-Amino-5-aminomethylbenzoesäure **74** (201 mg, 1.21 mmol, 78 %) als rotbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.18 (dd, 1H, J = 1.8, 1.6 Hz, H-aromat.), 7.07 (dd, 1H, J = 1.6, 1.4 Hz, H-aromat.), 6.60 (dd, 1H, J = 1.8, 1.4 Hz, H-aromat.), 5.04 (br.s, 2H, NH₂), 3.72 (s, 2H, CH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.4 (s, COOH), 143.5 (s, C-aromat.), 133.8 (s, C-aromat.), 132.9 (s, C-aromat.), 130.6 (d, C-aromat.), 127.7 (d, C-aromat.), 126.0 (d, C-aromat.), 45.5 (t, CH₂NH₂) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₈H₉N₂O₂ [M-H]⁻: 165.0664, gefunden: 165.0665; **Schmelzpunkt**: 183.3-189.2 °C (Zersetzung).

3-Acetoxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester 75

3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **37** (2.5 g, 11.84 mmol, 1Äq.) wird zusammen mit NaOH (54 mg, 1.35 mmol, 0.1 Äq.) in ein Mikrowellen-Glas gegeben, mit Acetanhydrid (2.22 mL, 23.68 mmol, 2 Äq.) versetzt, verschlossen und 4 min bei 120 °C in die Mikrowelle gegeben. Nach dem Abkühlen auf RT wird die Mischung mit dest. Wasser und Essigsäureethylester versetzt und die wässrige Phase zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Acetoxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **75** (2.99 g, 11.84 mmol, quant.) als hellgelber Feststoff erhalten.

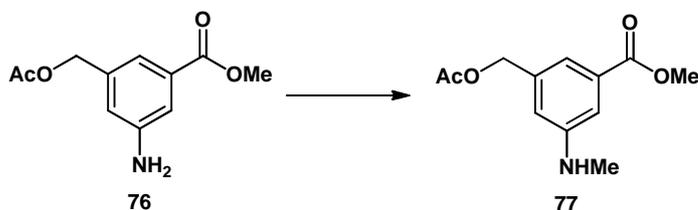
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.80 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.2 Hz, H-aromat.), 8.40 (dd, 1H, *J* = 1.9, 1.8 Hz, H-aromat.), 8.33 (dd, 1H, *J* = 1.9, 1.2 Hz, H-aromat.), 5.23 (t, 2H, CH₂), 3.99 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, Ac) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 170.6 (s, Ac), 164.8 (s, COOMe), 148.6 (s, C-aromat.), 138.9 (s, C-aromat.), 134.5 (d, C-aromat.), 132.3 (s, C-aromat.), 126.7 (d, C-aromat.), 124.3 (d, C-aromat.), 64.5 (t, CH₂), 53.0 (q, CH₃), 20.9 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₁₁H₁₁NO₆ [M]⁺: 253.0586, gefunden: 253.0584; **Schmelzpunkt**: 55.1-55.3 °C.

3-Acetoxymethyl-5-aminobenzoesäuremethylester 76

3-Acetoxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester **75** (3.50 g, 13.82 mmol, 1 Äq.) wird in Essigsäureethylester (100 mL) gelöst, mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (15.6 g, 41.47 mmol, 3 Äq.) versetzt und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird NaHCO_3 -Lsg. ges. zur Neutralisation zugegeben und es wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Dann werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Acetoxymethyl-5-aminobenzoesäuremethylester **76** (3.05 g, 13.68 mmol, 99 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.39 (dd, 1H, $J = 1.7, 1.4$ Hz, H-aromat.), 7.29 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.7$ Hz, H-aromat.), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.4$ Hz, H-aromat.), 5.04 (s, 2H, CH_2), 3.89 (s, 3H, CH_3), 3.84 (br. s, 2H, NH_2), 2.10 (s, 3H, Ac) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 170.9 (s, Ac), 167.1 (s, COOMe), 146.9 (s, C-aromat.), 137.5 (s, C-aromat.), 131.6 (s, C-aromat.), 119.3 (d, C-aromat.), 118.9 (d, C-aromat.), 115.7 (d, C-aromat.), 65.9 (t, CH_2), 52.3 (q, CH_3), 21.1 (q, Ac) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ $[\text{M}]^+$: 223.0845, gefunden: 223.0846; **Schmelzpunkt**: 76.5 °C.

3-Acetoxymethyl-5-methylaminobenzoesäuremethylester **77**

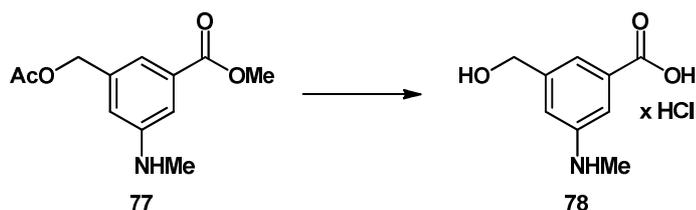


3-Acetoxymethyl-5-aminobenzoesäuremethylester **76** (2.80 g, 12.54 mmol, 1 Äq.) wird in CH_3OH (30 mL) gelöst und bei 0°C mit Formalin (1.5 mL, 20 mmol, 1.6 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 0.5 h bei dieser Temperatur gerührt, dann wird portionsweise NaBH_3CN (0.79 g, 12.54 mmol, 1 Äq.) zugegeben. Es wird noch 1 h bei 0°C und 2 h bei RT gerührt. Danach wird zum Beenden der Reaktion Ammoniumchlorid-Lsg. (20 mL) zugegeben. Es wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel (PE/EE 10/1 \rightarrow 5/1). Es wird 3-Acetoxymethyl-

5-methylaminobenzoensäuremethylester **77** als farbloser Feststoff erhalten (1.05 g, 4.39 mmol, 35 %).

¹H-NMR: (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.26 (dd, 1H, *J* = 1.5, 1.0 Hz, H-aromat.), 7.19 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.5 Hz, H-aromat.), 6.82 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.0 Hz, H-aromat.), 5.05 (s, 2H, CH₂), 3.87 (s, 3H, CH₃), 2.79 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 3H, Ac) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.6 (s, Ac), 169.0 (s, COOMe), 151.8 (s, C-aromat.), 138.8 (s, C-aromat.), 132.2 (s, C-aromat.), 117.9 (d, C-aromat.), 117.2 (d, C-aromat.), 113.3 (d, C-aromat.), 67.1 (t, CH₂), 30.4 (q, CH₃), 52.5 (q, CH₃), 20.1 (q, Ac) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₁₂H₁₅NO₄ [M+H]⁺: 238.1079, gefunden: 238.1071; **Schmelzpunkt:** 58.9-59.1 °C.

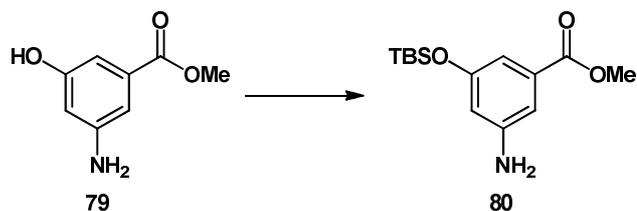
3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoensäure Hydrochlorid **78**



3-Acetoxymethyl-5-methylaminobenzoensäuremethylester **77** (0.9 g, 3.79 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (10 mL) gelöst, mit LiOH-Lsg. (23 mL, 23.00 mmol, 5 Äq., 1 M) versetzt und 4 h bei RT gerührt. Nach Ende der Reaktion wird mit HCl (2 M) angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückgebliebene hellbraune Feststoff wird aus halbkonz. HCl umkristallisiert. Es wird 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoensäure Hydrochlorid **78** (0.87 g, 4.02 mmol, 87 %) als hellbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.71 (s, 1H, H-aromat.), 7.69 (s, 1H, H-aromat.), 7.49 (s, 1H, H-aromat.), 4.55 (s, 2H, CH₂), 2.84 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.7 (s, COOH), 145.0 (s, C-aromat.), 141.7 (s, C-aromat.), 131.9 (s, C-aromat.), 123.5 (d, C-aromat.), 121.5 (d, C-aromat.), 118.4 (d, C-aromat.), 62.1 (t, CH₂OH), 34.2 (q, CH₃) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₉H₁₀NO₃ [M-H]⁻: 180.0661, gefunden: 180.0667; **Schmelzpunkt:** 175.9-176.1 °C.

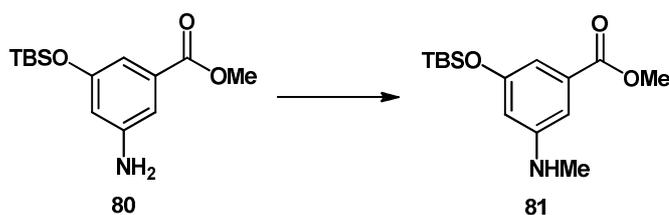
3-Amino-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxy)-benzoesäuremethylester **80**



3-Amino-5-hydroxybenzoesäuremethylester **79** (1.3 g, 7.78 mmol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ abs. (20 mL) gelöst und mit Imidazol (0.64 g, 9.34 mmol, 1.2 Äq.), DMAP (9.5 mg, 0.08 mmol, 0.01 Äq.) und TBS-Cl (1.41 g, 9.34 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 12 h bei RT gerührt. Anschließend werden Imidazol (0.11 g, 1.62 mmol, 0.2 Äq.) und TBS-Cl (0.24 g, 1.59 mmol, 0.2 Äq.) zugegeben. Nach weiteren 6 h Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von Phosphatpuffer beendet. Die wässrige Phase wird zweimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (PE/EE 10/1 → 5/1 → 2/1) wird 3-Amino-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxy)-benzoesäuremethylester **80** (2.01 g, 7.16 mmol, 92%) als hellroter Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.97 (dd, 1H, *J* = 1.9, 1.7 Hz, H-aromat.), 6.89 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.7 Hz, H-aromat.), 6.36 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.9 Hz, H-aromat.), 3.86 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 9H, TBS), 0.19 (s, 6H, TBS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 167.2 (s, COOMe), 156.8 (s, C-aromat.), 147.7 (s, C-aromat.), 132.1 (s, C-aromat.), 111.6 (d, C-aromat.), 111.4 (d, C-aromat.), 109.7 (d, C-aromat.), 52.2 (q, CH₃), 25.8 (q, TBS), 18.3 (s, TBS), -4.3 (q, TBS) ppm; HRMS (EI) *m/z* berechnet für C₁₄H₂₃NO₃Si [M]⁺: 281.1447, gefunden: 281.1446; **Schmelzpunkt**: 61.1-61.2 °C.

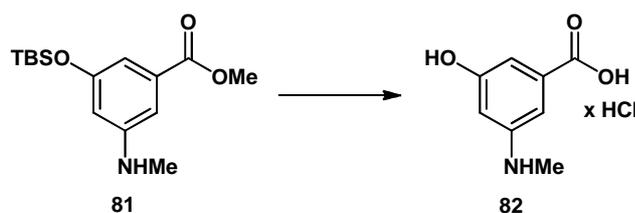
3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-5-methylaminobenzoäuremethylester **81**



3-Amino-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxy)-benzoesäuremethylester **80** (140 mg, 0.50 mmol, 1 Äq.) wird in Dioxan (8 mL) gelöst, dann werden Pyridin (0.15 mL, 1.87 mmol, 3.5 Äq.) und Cu(OAc)₂ (240 mg, 1.33 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Anschließend werden 80 mg MeB(OH)₂ (1.33 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben und für 24 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 10/1 → 5/1) wird 3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-5-methylaminobenzoesäuremethylester **81** (97 mg, 0.33 mmol, 66 %) als beigefarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.91 (dd, 1H, *J* = 1.9, 1.7 Hz, H-aromat.), 6.85 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.7 Hz, H-aromat.), 6.27 (dd, 1H, *J* = 2.2, 1.9 Hz, H-aromat.), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (br. s, 1H, NH), 2.84 (s, 3H, CH₃), 0.98 (s, 9H, TBS), 0.20 (s, 6H, TBS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 167.5 (s, COOMe), 156.8 (s, C-aromat.), 150.9 (s, C-aromat.), 131.9 (s, C-aromat.), 110.3 (d, C-aromat.), 108.7 (d, C-aromat.), 107.1 (d, C-aromat.), 52.2 (q, OCH₃), 30.9 (q, CH₃), 25.8 (q, TBS), 18.3 (s, TBS), -4.2 (q, TBS) ppm; HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₅H₂₆NO₃Si [M+H]⁺: 296.1682, gefunden: 296.1682; **Schmelzpunkt**: 75.0-75.1 °C.

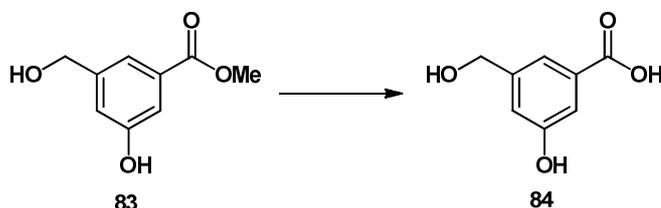
3-Hydroxy-5-methylaminobenzoesäure Hydrochlorid **82**



3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxy)-5-methylaminobenzoesäuremethylester **81** (500 mg, 1.69 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (10 mL) gelöst, mit LiOH-Lsg. (8.45 mL, 8.45 mmol, 5 Äq., 1 M) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückgebliebene beige Feststoff wird aus halbkonz. HCl umkristallisiert. Es wird 3-Hydroxy-5-methylaminobenzoesäure Hydrochlorid **82** (314 mg, 1.54 mmol, 91%) als hellbraune Kristalle erhalten.

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 10.3 (s, COOH), 7.31 (s, 1H, H-aromat.), 7.22 (s, 1H, H-aromat.), 7.00 (s, 1H, H-aromat.), 2.81 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR:** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.6 (s, COOH), 158.5 (s, C-aromat.), 141.9 (s, C-aromat.), 133.1 (s, C-aromat.), 113.6 (d, C-aromat.), 113.5 (d, C-aromat.), 111.5 (d, C-aromat.), 34.6 (q, CH₃) ppm; **HRMS (ESI) *m/z*** berechnet für C₈H₈NO₃ [M-H]⁻: 166.0504, gefunden: 166.0506; **Schmelzpunkt:** 209.1-212.0 °C (Zersetzung).

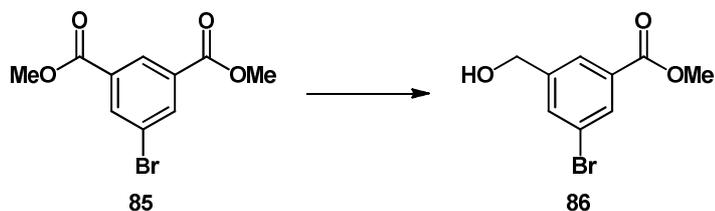
3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoesäure **84**



3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **83** (303 mg, 1.66 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (5 mL) gelöst, mit LiOH-Lsg. (8.32 mL, 8.31 mmol, 5 Äq., 1 M) versetzt und 2 h bei RT gerührt.

Die Mischung wird anschließend mit HCl (2 M) auf pH 3 angesäuert und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird 3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoesäure **84** (279 mg, 1.66 mmol, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

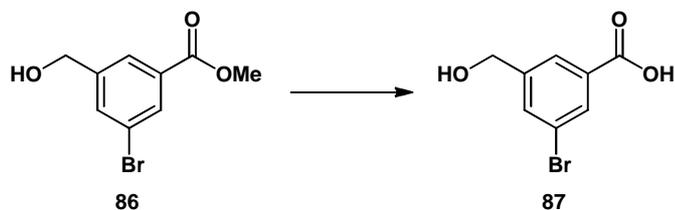
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 9.66 (br. s, 1H, COOH), 7.35 (d, 1H, *J* = 1.8, 1.0 Hz, H-aromat.), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.2, 1.8 Hz, H-aromat.), 6.95 (d, 1H, *J* = 2.2, 1.0 Hz, H-aromat.), 5.23 (br. s, 1H, arom.-OH), 4.46 (s, 2H, CH₂), 3.37 (br. s, 1H, OH) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.4 (s, COOH), 157.3 (s, C-aromat.), 144.6 (s, C-aromat.), 131.7 (s, C-aromat.), 118.0 (d, C-aromat.), 117.7 (d, C-aromat.), 114.2 (d, C-aromat.), 62.5 (t, CH₂OH) ppm; **HRMS (ESI) *m/z*** berechnet für C₈H₇O₄ [M-H]⁻: 167.0344, gefunden: 167.0350; **Schmelzpunkt:** 126.7-127.1 °C.

3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester 86

5-Bromisophthalsäuredimethylester **85** (1.00 g, 5.66 mmol, 1 Äq.) wird in THF (30 mL) gelöst, mit CH₃OH (3 mL) und NaBH₄ (139 mg, 5.66 mmol, 1 Äq.) versetzt und 1.5 h bei 70 °C gerührt.

Nach dieser Zeit wird die Mischung mit NaHCO₃-Lsg. ges. hydrolysiert und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (PE/EE 4/1 → 2/1) wird 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **86** (766 mg, 3.13 mmol, 86 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.07 (s, 1H, H-aromat.), 7.93 (s, 1H, H-aromat.), 7.72 (s, 1H, H-aromat.), 4.73 (s, 2H, CH₂), 3.92 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 165.7 (s, COOMe), 143.5 (s, C-aromat.), 134.2 (d, C-aromat.), 132.2 (s, C-aromat.), 131.7 (d, C-aromat.), 126.5 (d, C-aromat.), 122.8 (s, C-aromat.), 64.1 (t, CH₂OH), 52.6 (q, CH₃) ppm; **HRMS (EI)** *m/z* berechnet für C₉H₉BrO₃ [M]⁺: 243.9735, gefunden: 243.9734; **Schmelzpunkt**: 46.0-46.6 °C.

3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure 87

3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **86** (700 mg, 2.86 mmol, 1 Äq.) wird in CH₃OH (10 mL) gelöst, mit LiOH-Lsg. (10.0 mL, 10.00 mmol, 3.5 Äq., 1 M) versetzt und 2 h bei RT gerührt.

Die Mischung wird anschließend mit HCl (2 M) auf pH 4 angesäuert und das CH₃OH im Vakuum entfernt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Es wird 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure **87** (640 mg, 2.77 mmol, 97 %) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 13.31 (br. s, 1H, COOH), 7.90 (dd, 1H, *J* = 1.7, 0.8 Hz, H-aromat.), 7.89 (dd, 1H, *J* = 2.5, 0.8 Hz, H-aromat.), 6.95 (dd, 1H, *J* = 2.5, 1.7 Hz, H-aromat.), 5.49 (br. s, 1H, OH), 4.55 (s, 2H, CH₂) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.1 (s, COOH), 146.1 (s, C-aromat.), 133.1 (d, C-aromat.), 132.9 (s, C-aromat.), 129.9 (d, C-aromat.), 126.1 (d, C-aromat.), 121.5 (s, C-aromat.), 61.7 (t, CH₂OH) ppm; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₈H₆BrO₃ [M-H]⁻: 228.9500, gefunden: 228.9507; **Schmelzpunkt**: 181.7-183.7 °C.

6.3 Mutasyntheseexperimente

6.3.1 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

S. gygroscopicus K390-61-1 (In der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierte Mutante)

A. pretiosum HGF073 (In der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierte Mutante; Replikat des publizierten Stammes HGF056)⁸²

A. pretiosum $\Delta asm12/21$ (Mutante mit Blockierung der Halogenase und der Carbamoyltransferase)¹⁵⁴

Der verwendete Stamm von *S. hygrosopicus* wurde von H. G. Floss zur Verfügung gestellt und als Stechagarkultur bei +4°C gelagert.

Alle verwendeten *A. pretiosum* Bakterienstämme wurden von H. G. FLOSS bzw. P. SPITELLER zur Verfügung gestellt und als Sporensuspension [40 % Glycerin in Wasser] bei -80 °C gelagert.

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 28 °C mit einer Schüttelfrequenz von 180 rpm. Alle Flüssigkulturen wurden in 250 mL Schikanekolben (bis 40 mL Medium) oder 500 mL Schikanekolben (bis 125 mL Medium). Die Fermentation der *A. pretiosum* Mutante HGF073 wurde mit zusätzlichem Stahlfedereinsatz durchgeführt.

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 Hinweise zu den Arbeiten mit der Mutante K390-61-1

Für die Fermentationen werden verschiedene Nährmedien verwendet. Die entsprechenden Substanzen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Zum einen werden Agarplatten aus R5-Medium benötigt, sowie GYP-Medium für die Vorkulturen und Geldanamycin-Produktionsmedium (GPM oder GPMd) für die Hauptkulturen. Für das Vorkultur-, sowie das Hauptkulturmedium wird außerdem Xanthan (3g/L) hinzugefügt, welches dispertes Wachstum fördern soll. Die entsprechenden Medien werden grundsätzlich alle mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

R2YE-Platten	
Hefe-Extrakt (DIFCO)	1.00 g
Saccharose (ACROS)	20.60 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (ROTH)	0.95 g
D-Glukose monohydrat (FLUKA)	2.00 g
K ₂ SO ₄	0.05 g
Casamino acids (DIFCO)	0.02 g
Agar (BACTO)	4.40 g
bidest.Wasser	160 mL

R5-Medium-Platten	
Saccharose (ACROS)	36.05 g
K ₂ SO ₄ (FLUKA)	0.09 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	3.54 g
Glukose monohydrat (FLUKA)	3.50 g
Casamino acids (DIFCO)	0.04 g
Hefe-Extrakt (DIFCO)	1.75 g
TES Puffer (ROTH)	2.01 g
Agar (BACTO)	7.70 g
Spurenelement-Lösung	0.07 mL
bidest.Wasser	350 mL

Spurenelement-Lösung	
ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	10 mg
bidest. Wasser	100 mL

Zu der Lösung der R5-Medium-Platten werden nach dem Autoklavieren 0.35 mL KH_2PO_4 -Lsg. (0.5 %), 0.14 mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lsg. (5 M), 0.53 mL L-Prolin-Lsg. (20 %) und 0.25 mL NaOH-Lsg. (1N) hinzugefügt.

GYP-Medium	
Hefe-Extrakt (DIFCO)	1.00 g
Pepton (FLUKA)	4.00 g
<i>D</i> -Glukose-Monohydrat (FLUKA)	4.00 g
bidest. Wasser	400 mL

Fermentations-Medium (GPM-Medium)	
<i>D</i> -Glukose-Monohydrat (FLUKA)	40.00 g
Pepton (FLUKA)	2.50 g
Trypton (BACTO)	2.50 g
Baby-Oatmeal (GERBER)	5.00 g
Hefe-Extrakt (DIFCO)	2.50 g
Melasse (Beer Rabbit)	10 mL
bidest. Wasser	1000 mL

Fermentations-Medium ohne Melasse (GPMd-Medium)	
<i>D</i> -Glukose-Monohydrat (FLUKA)	40.00 g
Pepton (FLUKA)	2.50 g
Trypton (BACTO)	2.50 g
Haferbrei (ALNATURA)	5.00 g
Hefe-Extrakt (DIFCO)	2.50 g
bidest. Wasser	1000 mL

Kryo-Medium	
Glycerin	20 g
Sacharose	10 g
bidest. Wasser	70 mL

Die Anzucht der Mutante K-390-61-1 erfolgt auf R5-Medium-Platten, auf denen 250 μL Neomycin-Lösung (10 mg/mL) verteilt werden. Die Dauer der Anzucht beträgt 7-8 Tage. Nach dieser Zeit werden Teile von verschiedenen Kolonien mit einer Impf-Öse abgenommen und in einem sterilen Eppendorfhütchen mit sterilen Glasperlen und 1 mL sterilem Wasser zerkleinert. Die Lösung wird anschließend zum Animpfen der Vorkultur (40 mL, GYP-Medium) verwendet.

Außerdem werden aus einer gut produzierenden Vorkultur, Kryo-Kulturen angeimpft. Hierfür werden 200 μL Vorkulturmedium mit 200 μL Kryokulturmedium gemischt und diese dann bei -80°C gelagert. Diese Kryokulturen können wie die Kolonien von Agar zum Animpfen einer Vorkultur genutzt werden. Hierfür wird die entsprechende Kryokultur aufgetaut und mit 100 μL Kryomedium eine 40 mL Vorkultur (GYP-Medium) angeimpft.

Die Vorkultur wird im Inkubator für 2 Tage bei 28°C und 180 rpm geschüttelt und anschließend zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Für Testkulturen im 30 mL-Maßstab werden 250 mL Schikanekolben mit 30 mL GPMd-Medium verwendet. Diese werden mit 1 mL der Vorkultur angeimpft. Für die Isolierung neuer Geldanamycinderivate werden entsprechend größere Ansätze in 500 mL Schikanekolben, 75 mL GPMd-Medium und mit 2 mL der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkulturen werden im Inkubator bei 28°C und 180 rpm für insgesamt 6-7 Tage inkubiert. Nach 24 h wird mit der Zufütterung begonnen, welche insgesamt 4 Tage dauert. Die entsprechenden Startbausteine sind in H_2O oder $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ gelöst und steril filtriert. Es werden insgesamt 75 μmol (in 30 mL Hauptkultur) bzw. 188 μmol (in 75 mL Hauptkultur) des entsprechenden Aromaten zugegeben, wobei die Zufütterung alle 24 h in insgesamt vier Portionen, oder über eine Spritzenpumpe über 4 Tage mit einer Flussrate von 1-2 $\mu\text{mol}/\text{h}$ (je nach Ansatzgröße) erfolgt. Als Referenz für die Produktivität des Stammes wird bei jedem Verfütterungsexperiment in einem Kolben AHBA oder ein anderes bekanntes Mutasynton zugefüttert und außerdem wird eine Nullreferenz mitlaufen gelassen.

Nach 6-7 Tagen werden die Kulturen in der Zentrifuge je dreimal mit Essigester extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum bis auf 5 mL eingengt. Das Konzentrat wird über eine kurze Kieselgelsäule mit Essigester vorgereinigt. Die so erhaltenen Extrakte werden im Vakuum eingengt und über eine Sephadex-LH20-Säule sowie anschließende präparative und semipräparative HPLC weiter gereinigt.

Allgemeine Hinweise zu den Arbeiten mit der Mutante HGF073

Für die Fermentationen werden verschiedene Nährmedien verwendet. Die entsprechenden Substanzen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Zum einen werden Agarplatten aus YMG-Medium benötigt, sowie YMG-Medium für die Vorkulturen und Korea-Medium für die Hauptkulturen. Die entsprechenden Medien werden grundsätzlich alle mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

YMG-Platten	
Hefe-Extrakt (BACTO)	1.00 g
Malz-Extrakt (SIGMA)	2.5 g
<i>D</i> -Glukose monohydrat (FLUKA)	1.00 g
Agar (BACTO)	5.50 g
Bidest. Wasser	250 mL

YMG-Medium	
Hefe-Extrakt (BACTO)	1.00 g
Malz-Extrakt (SIGMA)	2.50 g
<i>D</i> -Glukose monohydrat (FLUKA)	1.00 g
bidest. Wasser	250 mL

Korea-Medium	
Dextrin (SIGMA)	60.0 g
Cotton seed flow (PROFLO)	5.25 g
<i>D</i> -Maltose monohydrat (SIGMA)	30.0 g
Hefe-Extrakt (BACTO)	4.50 g
K ₂ HPO ₄ (FLUKA)	0.30 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg
CaCO ₃	5.00 g

Eine bei -80 °C gelagerte Sporenprobe wird auf einer YMG-Agar-Platte dünn ausplattiert und bei 30 °C für 72 h inkubiert. Anschließend werden mehrere gut sporulierte Einzelkolonien selektiert, in Wasser (1 mL) suspendiert und zur Inokulation der YMG-Vorkultur (50 mL) verwendet, welche für 48 h kultiviert wird. Daraufhin werden die Hauptkulturen angeimpft

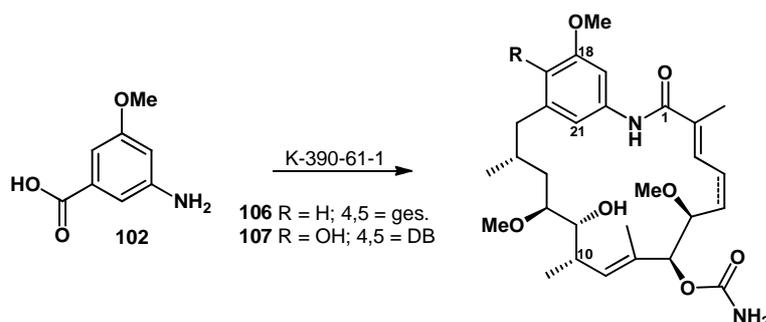
(2 mL YMG-Vorkultur je 25 mL Korea-Medium), mit L-Valin [3 % in Wasser] (3 mL je 25 mL Korea-Medium) versetzt und für 168 h kultiviert.

Die Zugabe der sterilen Substratlösung (gelöst in DMSO) geschieht kontinuierlich mittels Spritzenpumpe (Start nach 48 h, Dauer: 96 h). Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgt 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.

Nach 6-7 Tagen werden die Kulturen in der Zentrifuge je dreimal mit Essigester extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum bis auf 2 mL eingengt. Das Konzentrat wird über eine kurze Kieselgelsäule mit Essigester vorgereinigt. Die so erhaltenen Extrakte werden im Vakuum eingengt und anschließend über semipräparative HPLC weiter gereinigt.

6.3.2 Darstellung der mutasynthetisch hergestellten Geldanamycin-Derivate

17-Desmethoxy-18-*O*-methyl-reblastatin **106** und 4,5-Oxi-17-des-*O*-methyl-18-*O*-methyl-reblastatin **107**



Die Mutasynthese zum 17-Desmethoxy-18-*O*-methyl-reblastatin **106** und 4,5-Oxi-17-des-*O*-methyl-18-*O*-methyl-reblastatin **107** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Amino-5-methoxybenzoesäure **102** in vierzehn 70 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 980 mL GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über präp. HPLC (C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 60/40 \rightarrow 50/50 in 15 min, dann 50/50 \rightarrow 20/80 in 75 min, dann 20/80 \rightarrow 10/90 in 15 min, dann 10/90 \rightarrow 100 CH_3OH in 10 min; Fluss 5.5 \rightarrow 7.0 mL/min) und semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient

H₂O/CH₃CN 90/10 → 50/50 in 48 min, dann 50/50 → 30/70 in 5 min, dann 5 min 30/70 halten; Fluss 2.50 mL/min) 17-Desmethoxy-18-*O*-methyl-reblastatin **106** (7.0 mg, 7.1 mg/L) und 4,5-Oxi-17-Des-*O*-methyl-18-*O*-methyl-reblastatin **107** (2.4 mg, 2.6 mg/L) als farblose Feststoffe erhalten.

17-Desmethoxy-18-*O*-methyl-reblastatin **106**

präp. HPLC ($t_R = 59.49$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 34.21$ min)

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.52 (s, 1H, NH), 6.88 (s, 1H, 17-H), 6.47 (s, 1H, 19-H), 6.40 (s, 1H, 21-H), 5.87 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, 3-H), 5.30 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, 9-H), 5.10 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, 7-H), 4.62 (s, 2H, NH₂), 3.78 (s, 3H, 20-OMe), 3.65-3.62 (m, 1H, 11-H), 3.40 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.27 (m, 1H, 6-H), 3.11-3.09 (m, 1H, 12-H), 2.70 (dd, 1H, $J = 13.2, 4.6$ Hz, 15-H_a), 2.46-2.43 (m, 1H, 10-H), 2.37 (dd, 1H, $J = 13.2, 6.1$ Hz, 15-H_b), 2.40-2.30 (m, 1H, 4-H_a), 2.21-2.11 (m, 1H, 4-H_b), 2.04 (s, 1H, 11-OH) 1.96-1.90 (m, 1H, 14-H), 1.87 (s, 3H, 2-Me), 1.57-1.52 (m, 1H, 13-H_a) 1.46 (s, 3H, 8-Me), 1.43-1.38 (m, 1H, 5-H_a), 1.35-1.30 (m, 1H, 5-H_b), 1.25-1.20 (m, 1H, 13-H_b), 1.07 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 10-Me), 0.80 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, CDCl₃, CDCl₃ = 77.2 ppm): δ 160.1 (s, C-1), 155.9 (s, COONH₂), 152.8 (s, C-20), 142.2 (s, C-19), 139.97 (s, C-16), 134.4 (d, C-3), 132.3 (s, C-2), 131.6 (d, C-9), 130.3 (s, C-8), 116.6 (d, C-21), 112.8 (d, C-19), 104.7 (d, C-17), 81.3 (d, C-7), 81.1 (d, C-12), 80.0 (d, C-6), 73.8 (d, C-11), 58.8 (q, C-12-OMe), 56.7 (q, C-6-OMe), 55.3 (q, C-20-OMe), 42.9 (t, C-15), 34.3 (d, C-10), 32.8 (d, C-13), 31.2 (d, C-14), 29.3 (d, C-5), 24.1 (d, C-4), 18.6 (q, C-14-Me), 17.3 (q, C-10-Me), 13.4 (q, C-2-Me), 12.4 (q, C-8-Me) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für: C₂₉H₄₂N₂O₈ [M+Na]⁺: 555.3046, gefunden: 555.3049.

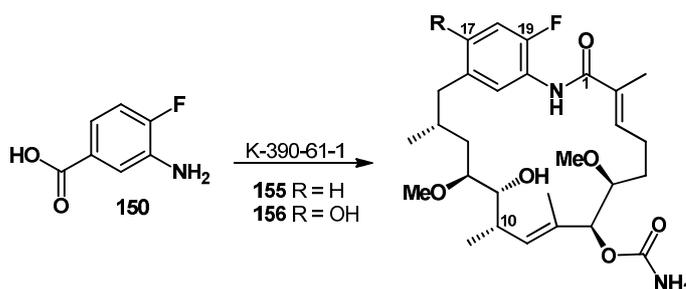
4,5-Dehydro-17-des-*O*-methyl -18-*O*-methyl-reblastatin **107**

präp. HPLC ($t_R = 57.59$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 32.75$ min)

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, CD₂Cl₂, CHDCl₂, CH₂Cl₂ = 5.32 ppm): δ 8.51 (br. s, 1H, NH), 7.80 (br. s, 1H, 19-H), 7.03 (br. s, 1H, 3-H), 6.51 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz, 4-H) 6.33 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, 21-H), 5.79 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, 9-H), 5.68 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, 5-H), 5.01 (ps. s, 1H, 7-H), 4.71 (br. s, 2H, NH₂), 4.31 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, 6-H), 3.74 (s, 3H, 12-OMe), 3.60-3.57 (m, 1H, 11-H), 3.41 (s, 3H, 18-OMe), 3.41 (ps. s, 1H, 12-H) 3.19 (s, 3H, 6-OMe), 2.82 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, 10-H), 2.72 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, 15-H_a), 2.51-2.33 (m, 1H, 15-H_b), 1.86 (s,

3H, 2-Me), 1.83-1.79 (m, 1H, 14-H), 1.75 (s, 3H, 8-Me), 1.63-1.57 (m, 1H, 13-H_a), 1.33-1.30 (m, 1H, 13-H_b), 0.98 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 14-Me), 0.93 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, 10-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, CD_2Cl_2 , $\text{CD}_2\text{Cl}_2 = 53.5$ ppm): δ 156.1 (s, COONH_2), 152.5 (s, C-1), 146.5 (s, C-18), 138.4 (s, C-2), 137.4 (s, C-17), 132.8 (d, C-5), 131.8 (d, C-9), 129.9 (s, C-8), 128.1 (s, C-20), 127.4 (s, C-16), 127.2 (d, C-4), 126.0 (d, C-3), 111.0 (d, C-21), 102.6 (d, C-19), 83.0 (d, C-12), 81.7 (d, C-7), 80.7 (d, C-6), 74.5 (d, C-11), 57.5 (q, C-12-OMe), 56.6 (q, C-18-OMe), 55.6 (q, C-6-OMe), 40.5 (t, C-15), 37.5 (d, C-14), 32.6 (d, C-10), 29.7 (d, C-13), 22.7 (q, C-14-Me), 13.9 (q, C-10-Me), 12.7 (q, C-2-Me), 12.3 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.69$ min (CH_3CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für: $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 569.2839, gefunden: 569.2839.

17-Desmethoxy-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **155** und 17-Des-*O*-methyl-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **156**



Die Mutasynthese zum 17-Desmethoxy-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **155** und 17-Des-*O*-methyl-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **156** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit Amino-4-fluorbenzoesäure **150** in zwanzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1500 mL GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über präp. HPLC (C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 60/40 \rightarrow 50/50 in 15 min, dann 50/50 \rightarrow 20/80 in 75 min, dann 20/80 \rightarrow 10/90 in 15 min, dann 10/90 \rightarrow 100 CH_3OH in 10 min; Fluss 5.5 \rightarrow 7.0 mL/min) und semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 80/20 \rightarrow 30/70 in 55 min, dann 30/70 \rightarrow 100 CH_3OH in 30 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 \rightarrow 3.00 mL/min) 17-Desmethoxy-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **155** (12 mg, 8 mg/L) und 17-Des-*O*-methyl-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **156** (Spuren) erhalten.

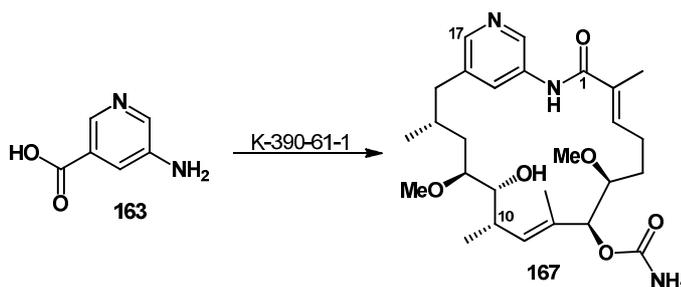
17-Desmethoxy-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **155**

präp. HPLC ($t_R = 60.07$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 56.51$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.80 (br. s, 1H, NH), 7.24-7.20 (m, 1H, 21-H) 6.93 (ps. t, 1H, $J_{H-H} = 8.0$ Hz, 18-H), 6.83 (dd, 1H, $J_{F-H} = 6.3$ Hz, $J_{H-H} = 2.7$ Hz, 17-H), 5.85 (td, 1H, $J = 6.4, 0.5$ Hz, 3-H), 5.30 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, 9-H), 5.11 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, 7-H), 4.84 (br. s, 2H, NH_2), 3.63 (dd, 1H, $J = 8.5, 3.5$ Hz, 11-H), 3.38 (s, 3H, 12-OMe), 3.34 (s, 3H, 6-OMe), 3.27 (dt, 1H, $J = 7.4, 5.4$ Hz, 6-H), 3.12 (dt, 1H, $J = 8.5, 3.5$ Hz, 12-H), 2.72 (dd, 1H, $J = 13.6, 6.0$ Hz, 15- H_a) 2.52 (ddd, 1H, $J = 13.6, 4.8$ Hz, 15- H_b), 2.48-2.42 (m, 1H, 10-H), 2.38-2.29 (m, 1H, 4- H_a), 2.21-2.12 (m, 1H, 4- H_b), 2.10-2.03 (m, 1H, 5- H_a), 1.93 (m, 1H, 14-H), 1.84 (s, 3H, 2-Me), 1.68-1.61 (m, 1H, 13- H_a), 1.50 (s, 3H, 8-Me), 1.48-1.41 (m, 1-H, 5- H_b), 1.24-1.14 (m, 1H, 13- H_b), 1.07 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 10-Me) 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz 14-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm): δ 171.8 (s, C-1), 158.9 (d, $J_{F-C} = 243.6$ Hz, C-19), 156.3 (s, COONH_2), 138.9 (s, C-16), 135.0 (s, C-2), 134.7 (d, C-3), 131.8 (d, C-9), 130.4 (s, C-8), 128.9 (d, C-17), 128.0 (s, $J_{F-C} = 18.0$ Hz, C-20), 121.4 (d, $J_{F-C} = 8.4$ Hz, C-21), 115.8 (d, $J_{F-C} = 24.5$ Hz, C-18), 81.3 (d, C-7), 81.1 (d, C-12) 80.4 (d, C-6), 74.1 (d, C-11), 58.9 (q, C-12-OMe), 56.9 (q, C-6-OMe), 35.1 (t, C-15), 34.5 (d, C-10), 33.1 (t, C-13), 31.4 (d, C-14), 29.6 (t, C-5), 24.5 (t, C-4), 18.6 (q, C-14-Me), 17.5 (q, C-10-Me), 13.6 (q, C-2-Me), 12.6 (q, C-8-Me) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{FN}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 543.2846, gefunden: 543.2844.

17-Des-*O*-methyl-18-deshydroxy-19-fluor-reblastatin **156**

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{FN}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 559.2796, gefunden: 559.2798.

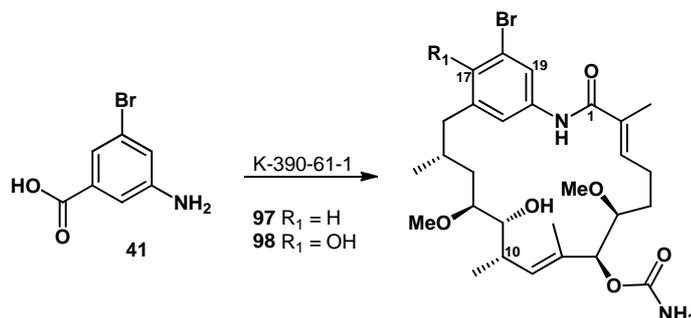
18-Aza-reblastatin 167

Die Mutasynthese zum 18-Azareblastatin **167** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 5-Aminonikotinsäure **163** in vierzehn 70 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1000 mL GPMd-Medium wird hierbei nach Reinigung über präp. HPLC (C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min) und semipräp. HPLC (C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 30/70 in 52 min, dann 30/70 5 min halten; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min) 18-Azareblastatin **167** (1.4 mg, 1.4 mg/L) als farbloser Feststoff erhalten.

18-Aza-reblastatin **167**

präp. HPLC ($t_R = 46.5$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 25.36$ min)

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.36 (s, 1H, 18-H), 8.12 (s, 1H, 17-H), 7.35 (s, 1H, 20-H), 5.80 (s, 1H, 3-H), 5.27 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 9-H), 4.93-4.90 (m, 1H, 7-H), 3.57 (dd, 1H, $J = 10.0, 3.3$ Hz, 11-H), 3.43 (s, 3H, 12-OMe), 3.36 (s, 3H, 6-OMe) 3.31-3.28 (m, 1H, 6-H), 3.11 (dt, 1H, $J = 10.2, 3.3$ Hz, 12-H), 2.75 (dd, 1H, $J = 13.6, 5.0$ Hz, 15-H_a), 2.65 (dd, 1H, $J = 13.6, 5.0$ Hz, 15-H_b), 2.42 (dd, 1H, $J = 10.0, 9.0$ Hz, 10-H), 2.42-2.37 (m, 1H, 4-H_a), 2.32-2.27 (m, 1H, 4-H_b), 2.19-2.13 (m, 1H, 14-H), 1.87 (s, 3H, 2-Me), 1.67-1.59 (m, 2H, 13-H), 1.38 (s, 3H, 8-Me) 1.30-1.24 (m, 1H, 5-H_a), 1.20-1.13 (m, 1H, 5-H_b), 1.02 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 10-Me) 0.81 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 171.1 (s, C-1), 159.1 (s, COONH₂), 147.5 (d, C-17), 141.3 (d, C-18), 138.0 (s, C-19), 137.6 (d, C-3), 135.3 (d, C-20), 134.5 (d, C-9), 132.2 (s, C-2), 131.4 (s, C-8), 130.5 (s, C-16), 83.5 (d, C-7), 81.7 (d, C-12), 81.0 (d, C-6), 75.0 (d, C-11), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.3 (q, C-6-OMe), 40.4 (t, C-15), 35.9 (d, C-10), 31.1 (t, C-13), 31.0 (d, C-14), 30.3 (t, C-5), 24.4 (t, C-4), 18.5 (q, C-14-Me), 17.5 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-2-Me), 12.1 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.25$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₇H₄₁N₃NaO₆ [M+Na]⁺: 526.2893, gefunden: 526.2890.

17-Desmethoxy-18-brom-reblastatin 97 und **17-Des-*O*-methyl-18-brom-reblastatin 98**

Die Mutasynthese zum 17-Desmethoxy-18-brom-reblastatin **97** und 17-Des-*O*-methyl-18-Brom-reblastatin **98** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit Amino-3-brombenzoesäure **41** in zwanzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1500 mL GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über präp. HPLC (C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 60/40 \rightarrow 50/50 in 15 min, dann 50/50 \rightarrow 20/80 in 75 min, dann 20/80 \rightarrow 10/90 in 15 min, dann 10/90 \rightarrow 100 CH_3OH in 10 min; Fluss 5.5 \rightarrow 7.0 mL/min) und semipräp. HPLC (C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 80/20 \rightarrow 30/70 in 55 min, dann 30/70 \rightarrow 100 CH_3OH in 30 min, dann 100 CH_3OH 10 min halten; Fluss 2.25 \rightarrow 3.0 mL/min) 17-Desmethoxy-18-brom-reblastatin **97** (0.9 mg, 0.6 mg/L) und 17-Des-*O*-methyl-18-brom-reblastatin **98** (0.9 mg, 0.6 mg/L) als farblose Feststoffe erhalten.

17-Desmethoxy-18-brom-reblastatin 97

präp. HPLC ($t_R = 81.17$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 57.36$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.35 (br. s, 1H, 19-H), 7.10 (s, 1H, 17-H), 6.79 (s, 1H, 21-H), 5.76 (br. s, 1H, 3-H), 5.26 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, 9-H), 4.87 (unter H_2O , 1H, 7-H), 3.55 (m, 1H, 11-H), 3.44 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 6-H), 3.10 (dt, 1H, $J = 10.0, 3.0$ Hz, 12-H), 2.72 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.0$ Hz, 15- H_a), 2.52 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.0$ Hz, 15- H_b), 2.43-2.38 (m, 1H, 10-H), 2.35-2.28 (m, 1H, 4- H_a), 2.16-2.07 (m, 1H, 4- H_b), 2.04-1.95 (m, 1H, 14-H), 1.85 (s, 3H, 2-Me), 1.66-1.59 (m, 2H, 13-H), 1.45 (s, 3H, 8-Me), 1.23-1.15 (m, 2H, 5-H), 1.03 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 10-Me) 0.79 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 174.7 (s, C-1), 159.1 (s, COONH_2), 143.9 (s, C-20), 141.6 (s, C-16), 136.9 (d,

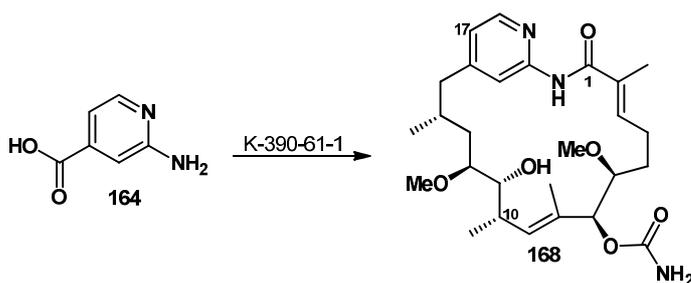
C-3), 134.2 (d, C-9), 131.9 (s, C-2), 131.5 (s, C-8), 130.8 (d, C-17), 125.6 (d, C-21), 123.4 (d, C-19), 123.0 (s, C-18), 83.4 (d, C-7), 81.7 (d, C-12), 81.0 (d, C-6), 75.0 (d, C-11), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.2 (q, C-6-OMe), 43.4 (t, C-15), 36.0 (d, C-10), 31.2 (t, C-13), 30.5 (d, C-5), 28.1 (t, C-14), 24.5 (t, C-4), 18.4 (q, C-14-Me), 17.7 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-2-Me), 12.4 (q, C-8-Me) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{28}H_{41}BrN_2NaO_6$ $[M+Na]^+$: 603.2046, gefunden: 603.2047.

17-Des-*O*-methyl-18-brom-reblastatin **98**

präp. HPLC ($t_R = 60.37$ min); semipräp. HPLC ($t_R = 34.93$ min)

1H -NMR (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 7.26 (br. s, 1H, 19-H), 6.73 (s, 1H, 21-H), 5.74 (br. s, 1H, 3-H), 5.22 (br. s, 1H, 9-H), 4.87 (unter H_2O , 1H, 7-H), 3.55 (br. s, 1H, 11-H), 3.44 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 6-H), 3.11-3.0 (m, 1H, 12-H), 2.97-2.93 (m, 1H, 15- H_a), 2.50-2.42 (m, 1H, 15- H_b), 2.50-2.42 (m, 1H, 10-H), 2.33-2.27 (m, 1H, 4- H_a), 2.16-2.10 (m, 1H, 4- H_b), 2.07-2.02 (m, 1H, 14-H), 1.82 (s, 3H, 2-Me) 1.79-1.70 (m, 1H, 5- H_a), 1.66-1.53 (m, 1H, 5- H_b), 1.45 (s, 3H, 8-Me), 1.34-1.29 (m, 1H, 13- H_a), 1.26-1.17 (m, 1H, 13- H_b), 1.02 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, 10-Me), 0.81 (br. s, 3H, 14-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 171.7 (s, C-1), 159.1 (s, $COONH_2$), 151.2 (s, C-17), 136.5 (d, C-3), 134.5 (d, C-9), 132.9 (s, C-20), 132.4 (s, C-2), 131.4 (s, C-16), 130.4 (s, C-8), 119.2 (d, C-19), 118.8 (d, C-21) 111.7 (s, C-18), 83.6 (d, C-6), 82.1 (d, C-12), 81.1 (d, C-7), 75.2 (d, C-11), 59.7 (q, C-12-OMe), 57.3 (q, C-6-OMe), 37.7 (t, C-15), 35.8 (d, C-10), 31.8 (t, C-5), 31.2 (d, C-14), 30.8 (t, C-13), 24.5 (t, C-4), 19.3 (q, C-14-Me), 17.7 (q, C-10-Me), 13.8 (q, C-2-Me), 12.3 (q, C-8-Me) ppm; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{28}H_{41}BrN_2O_7$ $[M+H]^+$: 597.2175, gefunden: 597.2175.

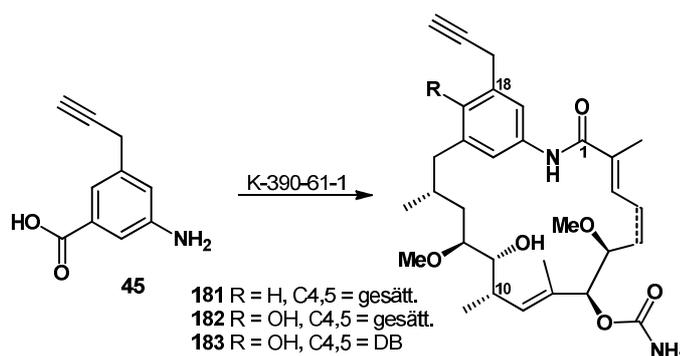
19-Aza-reblastatin **168**



Die Mutasynthese zum 19-Azareblastatin **168** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 2-Aminopyridin-4-carbonsäure **164** in sechsundvierzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 4.8 L GPMd-Medium wird hierbei nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 30/70 in 52 min, dann 30/70 5 min halten, Fluss 2.5 mL/min) 19-Azareblastatin **168** ($t_R = 17.12$ min) in Spuren erhalten.

UPLC-MS $t_R = 1.25$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₇H₄₁N₃NaO₆ [M+Na]⁺: 526.2893, gefunden: 526.2890.

Mutasynthese mit 3-Amino-5-prop-2-inylbenzoesäure **45**



Die Mutasynthese von 3-Amino-5-prop-2-inylbenzoesäure **45** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Amino-5-prop-2-inylbenzoesäure **45** in dreiunddreißig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 2.5 L GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über mehrere HPLC-Läufe folgende Geldanamycin-Derivate erhalten.

17-Desmethoxy-18-benzylalkinyl-reblastatin **181**

1 mg (0.4 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 30/70 in 75 min, dann 30/70 → 100 CH₃OH in 15 min; Fluss 15 mL/min); $t_R = 56.57$ min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 57.82 min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.10 (br. s, 1H, 19-H), 6.95 (s, 1H, 17-H), 6.68 (s, 1H, 21-H), 5.70 (br. s, 1H, 3-H), 5.22 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, 9-H), 4.87 (unter H₂O, 1H, 7-H), 3.60-3.57 (m, 1H, 11-H), 3.57 (s, 2H, arom.-CH₂), 3.43 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.31-3.24 (m, 1H, 6-H), 3.08 (ddd, 1H, *J* = 10.5, 2.7, 2.7 Hz, 12-H), 2.76 (dd, 1H, *J* = 13.0, 4.0 Hz, 15-H_a), 2.55 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz, Alkin-H), 2.50 (dd, 1H, *J* = 13.0, 5.4 Hz, 15-H_b), 2.41-2.35 (m, 1H, 10-H), 2.32-2.24 (m, 1H, 4-H_a), 2.13-2.05 (m, 1H, 4-H_b), 2.03-1.97 (m, 1H, 14-H), 1.83 (s, 3H, 2-Me), 1.66 (ddd, 1H, *J* = 13.7, 10.5, 4.5 Hz, 13-H_a), 1.38 (s, 3H, 8-Me), 1.26-1.16 (m, 1H, 5-H_a), 1.16-1.06 (m, 1H, 5-H_b), 1.06-0.98 (m, 1H, 13-H_b), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 10-Me) 0.76 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 175.3 (s, C-1), 159.1 (s, COONH₂), 141.8 (s, C-16), 140.3 (s, C-20), 138.4 (s, C-18), 136.3 (d, C-3), 134.4 (d, C-9), 132.2 (s, C-2), 131.4 (s, C-8), 127.8 (d, C-17), 125.3 (d, C-21), 120.4 (d, C-19), 83.6 (d, C-7), 82.4 (s, C-Alkin), 81.8 (d, C-12), 80.9 (d, C-6), 74.4 (d, C-11), 72.1 (d, C-Alkin), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.0 (q, C-6-OMe), 43.8 (t, C-15), 36.0 (d, C-10), 33.6 (t, C-13), 31.3 (t, C-14), 31.2 (d, C-5), 25.0 (t, arom.-CH₂), 24.3 (t, C-4), 18.3 (q, C-14-Me), 18.0 (q, C-10-Me), 13.9 (q, C-2-Me), 12.2 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** t_r = 2.23 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₁H₄₄N₂O₆ [M+Na]⁺: 563.3097, gefunden: 563.3091.

17-Des-*O*-methyl-18-benzylalkinyl-reblastatin **182**

0.7 mg (0.3 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 30/70 in 75 min, dann 30/70 → 100 CH₃OH in 15 min; Fluss 15 mL/min); t_R = 49.70 min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 20 min, dann 75/25 → 65/35 in 10 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 52.12 min

Es fehlt das Signal von C-20 aufgrund zu geringer Substanzmengen.

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 9.82 (br. s, 1H, arom.-OH), 8.93 (br. s, 1H, NH), 7.09 (s, 1H, 19-H), 6.75 (s, 1H, 21-H), 6.18 (br.s, 1H, 3-H), 5.94 (br. s, 2H, NH₂), 5.46 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, 9-H), 5.15 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 7-H), 3.53 (d, 2H, *J* = 2.8 Hz, arom.-CH₂), 3.53-3.50 (m, 1H, 11-H), 3.41 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz, 11-OH), 3.39-3.36

(m, 1H, 6-H), 3.36 (s, 3H, 6-OMe), 3.32 (s, 3H, 12-OMe), 3.18 (ddd, 1H, $J = 9.7, 5.5, 3.8$ Hz, 12-H), 2.62 (dd, 1H, $J = 13.5, 4.9$ Hz, 15-H_a), 2.56 (dq, 1H, $J = 9.2, 6.8, 6.0$ Hz, 10-H), 2.37 (unter H₂O, 1H, Alkin-H), 2.37 (unter H₂O, 2H, 4-H), 2.28 (dd, 1H, $J = 13.5, 6.9$ Hz, 15-H_b), 1.86 (s, 3H, 2-Me) 1.73 (unter THF, 1H, 14-H), 1.73 (unter THF, 2H, 5-H), 1.60 (s, 3H, 8-Me), 1.57-1.50 (m, 1H, 13-H_a), 1.42 (ddd, 1H, $J = 14.2, 6.8, 5.5$ Hz, 13-H_b), 1.00 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 10-Me), 0.86 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 173.4 (s, C-1), 158.5 (s, COONH₂), 146.2 (s, C-17), 136.5 (d, C-3), 133.3 (s, C-2), 132.9 (s, C-16), 132.8 (d, C-9), 131.7 (s, C-8), 127.5 (d, C-19), 123.4 (s, C-21), 84.5 (d, C-12), 83.5 (s, C-Alkin), 81.8 (d, C-6), 80.2 (d, C-7), 76.0 (d, C-11), 58.7 (q, C-6-OMe), 57.2 (q, C-12-OMe), 42.6 (t, C-15), 42.3 (d, C-14), 35.7 (t, C-13), 35.2 (d, C-10), 30.7 (t, C-5), 25.5 (unter THF, t, C-4), 20.8 (q, C-14-Me), 20.0 (t, arom.-CH₂), 15.9 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-8-Me), 13.1 (q, C-2-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.24$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₁H₄₄N₂O₇Na [M+Na]⁺: 579.3046, gefunden: 579.3027.

4,5-Dehydro-17-desmethoxy-18-benzylalkinyl-reblastatin **183**

1.2 mg (0.5 mg/L); farbloser Feststoff

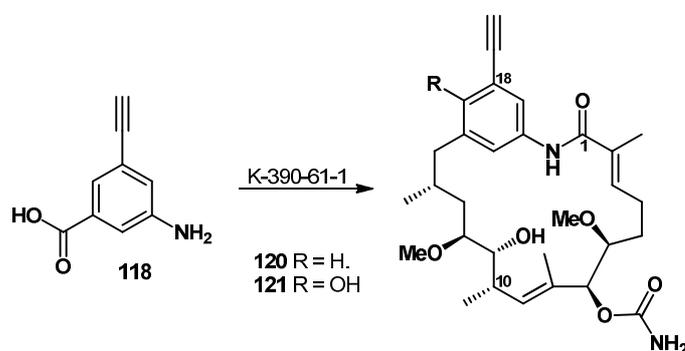
1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/ CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 30/70 in 75 min, dann 30/70 → 100 CH₃OH in 15 min; Fluss 15 mL/min); $t_R = 52.57$ min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/ CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 20 min, dann 75/25 → 65/35 in 10 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 47.53$ min

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.67 (s, 1H, NH), 8.60 (br. s, arom.-OH), 8.03 (s, 1H, 19-H), 7.07 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 3-H), 6.75 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, 21-H), 6.53 (dd, 1H, $J = 11.4, 10.9$ Hz, 4-H), 5.77-5.61 (m, 1H, 5-H), 5.77-5.61 (m, 1H, 9-H), 5.77-5.61 (m, 2H, NH₂), 5.03 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, 7-H), 4.36 (dd, 1H, $J = 7.0, 4.5$ Hz, 6-H), 4.16 (br. s, 1H, 11-OH), 3.58 (unter THF, 1H, 11-H), 3.47 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, arom.-CH₂), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.35-3.32 (m, 1H, 12-H), 3.16 (s, 3H, 12-OMe), 2.84 (dd, 1H, $J = 13.4, 1.7$ Hz, 15-H_a), 2.81-2.75 (m, 1H, 10-H), 2.37 (unter H₂O, 1H, Alkin-H), 2.37 (unter H₂O, 1H, 15-H_b), 2.00 (s, 3H, 2-Me), 1.89-1.85 (m, 1H, 14-H), 1.73 (unter THF, 1H, 13-H_a), 1.73 (unter THF, 3H, 8-Me), 1.69-1.63 (m, 1H, 13-H_b), 0.98 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) 0.93 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, 10-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 169.1 (s, C-1), 157.1 (s, COONH₂), 144.3 (s, C-17), 137.3 (s, C-2), 135.3 (d, C-9), 133.1 (s, C-8), 132.7 (d, C-5), 129.4 (s, C-20), 128.4 (s, C-18), 128.0 (s, C-16), 127.4 (d, C-4), 126.4

(d, C-3), 125.6 (d, C-19), 118.2 (d, C-21), 83.3 (s, C-Alkin), 82.7 (d, C-12), 82.6 (d, C-6), 81.8 (d, C-7), 75.4 (d, C-11), 71.1 (C-Alkin), 57.3 (q, C-6-OMe), 56.7 (q, C-12-OMe), 41.8 (t, C-15), 36.3 (t, C-13), 33.7 (d, C-10), 29.3 (d, C-14), 25.5 (unter THF, t, arom. CH₂), 23.0 (q, C-14-Me), 13.2 (q, C-10-Me), 13.2 (q, C-8-Me), 13.0 (q, C-2-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.29$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₁H₄₃N₂O₇ [M+H]⁺: 555.3070, gefunden: 555.3082.

Mutasynthese von 3-Amino-5-ethinylbenzoesäure **118**



Die Mutasynthese von 3-Amino-5-ethinylbenzoesäure **118** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Amino-5-ethinylbenzoesäure **118** in vierundzwanzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1.8 L GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über mehrer HPLC-Läufe folgende Geldanamycin-Derivate erhalten.

17-Desmethoxy-18-alkinyl-reblastatin **120**

1.5 mg (0.8 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 30/70 in 75 min, dann 30/70 → 100 CH₃OH in 15 min; Fluss 15 mL/min); $t_R = 52.28$ min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 70/30 in 40 min, dann 70/30 → 65/35 in 10 min, dann 65/35 → 45/55 in 20 min, dann 45/55 → 35/65 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 38.93$ min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.19 (br. s, 1H, 19-H), 7.05 (s, 1H, 17-H), 6.81 (s, 1H, 21-H), 5.69 (br. s, 1H, 3-H), 5.22 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, 9-H),

4.90 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, 7-H), 3.61-3.57 (m, 1H, 11-H), 3.54 (s, 1H, Alkin-H), 3.43 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.31-3.27 (m, 1H, 6-H), 3.08-3.06 (m, 1H, 12-H), 2.74 (dd, 1H, $J = 12.9, 2.6$ Hz, 15-H_a), 2.53 (dd, 1H, $J = 12.9, 5.1$ Hz, 15-H_b), 2.40-2.34 (m, 1H, 10-H), 2.33-2.25 (m, 1H, 4-H_a), 2.14-2.07 (m, 1H, 4-H_b), 2.06-1.99 (m, 1H, 14-H), 1.85 (s, 3H, 2-Me), 1.65 (ddd, 1H, $J = 13.7, 9.9, 3.8$ Hz, 13-H_a), 1.40 (s, 3H, 8-Me), 1.26-1.16 (m, 1H, 5-H_a), 1.14-1.08 (m, 1H, 5-H_b), 1.07-0.96 (m, 1H, 13-H_b), 1.03 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 10-Me) 0.75 (d, 3H, $J = 5.6$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 174.1 (s, C-1), 159.1 (s, COONH₂), 142.1 (s, C-16), 140.4 (s, C-20), 136.6 (d, C-3), 134.1 (d, C-9), 133.9 (s, C-18), 132.1 (s, C-2), 131.7 (d, C-17), 131.5 (s, C-8), 128.0 (d, C-21), 124.1 (d, C-19), 84.0 (s, Alkin), 83.5 (d, C-7), 81.5 (d, C-12), 80.8 (d, C-6), 79.0 (d, C-Alkin), 74.6 (d, C-11), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.1 (q, C-6-OMe), 43.4 (t, C-15), 36.0 (d, C-10), 33.1 (t, C-13), 31.1 (d, C-5), 30.9 (t, C-14), 24.3 (t, C-4), 18.1 (q, C-10Me), 18.0 (q, C-14Me), 13.8 (q, C-2Me), 12.3 (q, C-8Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.14$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₃N₂O₆[M+H]⁺: 527.3121, gefunden: 527.3120.

17-Desmethyl-18-alkinyl-reblastatin **121**

0.7 mg (0.4 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 30/70 in 75 min, dann 30/70 → 100 CH₃OH in 15 min; Fluss 15 mL/min); $t_R = 37.68$ min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 70/30 in 40 min, dann 70/30 → 65/35 in 10 min, dann 65/35 → 45/55 in 20 min, dann 45/55 → 35/65 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 38.19$ min

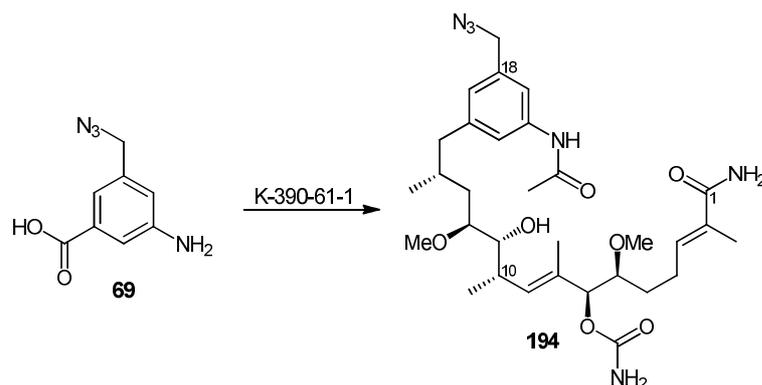
3. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 70/30 in 40 min, dann 70/30 → 65/35 in 10 min, dann 65/35 → 45/55 in 20 min, dann 45/55 → 35/65 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 54.69$ min

(Die Signale von C-16, C-18 und C-20 sowie die Zuordnung von C-17 und C-19 fehlen aufgrund zu geringer Substanzmengen)

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.34 (s, 1H, aromat.-OH) 7.43 (s, 1H, NH), 7.34 (br.s, 1H, 19-H), 6.82 (d, 1H, 21-H), 5.83 (br.s, 1H, 3-H), 5.71 (br.s, 2H, NH₂), 5.28 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 9-H), 5.06 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, 7-H), 3.71 (s, 1H, Alkin-H), 3.54 (ddd, 1H, $J = 16.3, 8.2, 3.6$ Hz, 11-H), 3.36 (s, 3H, 6-OMe) 3.32 (s, 3H, 12-OMe), 3.29-2.26 (m, 1H, 6-H), 3.24 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, 11-OH), 3.13 (ddd, 1H, $J = 8.2, 3.8, 3.8$ Hz, 12-H), 2.79 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.9$ Hz, 15-H_a), 2.50-2.45 (m, 1H, 10-H), 2.41 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.4$

Hz, 15-H_b), 2.40-2.32 (m, 1H, 4-H_a), 2.26-2.16 (m, 1H, 4-H_b), 2.09-2.01 (m, 1H, 14-H), 1.94 (s, 3H, 2-Me), 1.80-1.73 (m, 1H, 13-H_a), 1.50 (s, 3H, 8-Me) 1.42-1.30 (m, 2H, 5-H), 1.22-1.13 (m, 1H, 13-H_b), 0.99 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 10-Me) 0.86 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 171.9 (s, C-1), 160.8 (s, COONH₂), 156.7 (s, C-17), 135.0 (s, C-2), 134.8 (d, C-3), 133.0 (s, C-8), 132.9 (d, C-9), 131.7 (s, C-16), 130.4 (s, C-20), 129.1 (d, C-19), 109.9 (s, C-18), 83.9 (s, C-Alkin), 82.6 (d, C-12), 81.8 (d, C-6), 81.6 (d, C-Alkin), 81.1 (d, C-7), 75.0 (d, C-11), 58.8 (q, C-6-OMe), 57.1 (q, C-12OMe), 36.9 (t, C-15), 35.5 (d, C-10), 35.2 (t, C-13), 32.3 (d, C-14), 31.0 (t, C-5), 23.8 (t, C-4), 20.0 (q, C-14-Me), 17.3 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-2-Me), 13.1 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.93$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₂N₂O₇ [M+Na]⁺: 565.2890, gefunden: 565.2899.

seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-*N*-acetyl-reblastatinamid **194**



Die Mutasynthese von 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure **69** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure **69** in achtundvierzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus 3.6 L GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über mehrere HPLC-Läufe folgende Geldanamycin-Derivate erhalten.

seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-*N*-acetyl-reblastatinamid **194**

0.6 mg (0.2 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 69.65 min

2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 55.82 min

3. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃OH 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min); t_R = 98.22 min

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 9.28 (s, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, 19-H), 7.13 (s, 1H, 21-H), 6.80 (s, 1H, 17-H), 6.68 (br. s, 1H, NH₂), 6.35 (dd, 1H, *J* = 7.2, 6.3 Hz, 3-H), 6.23 (br. s, 1H, NH₂), 5.97 (br. s, 1H, NH₂), 5.68 (br. s, 1H, NH₂), 5.28 (d, 1H, *J* = 10.1 Hz, 9-H), 5.01 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, 7-H), 4.28 (s, 2H, CH₂-aromat.), 3.53-3.50 (m, 1H, 11-H), 3.39 (s, 3H, 6-OMe), 3.32-3.28 (m, 1H, 6-H), 3.27 (s, 3H, 12-OMe), 3.19-3.17 (m, 1H, 12-H), 2.68 (dd, 1H, *J* = 13.1, 5.2 Hz, 15-H_a), 2.40-2.35 (m, 1H, 10-H), 2.30-2.20 (m, 2H, 4-H), 2.30-2.20 (m, 1H, 15-H_b), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.95-1.89 (m, 1H, 14-H), 1.81 (s, 3H, 2-Me), 1.68-1.65 (m, 1H, 13-H_a), 1.63 (s, 3H, 8-Me), 1.55-1.45 (m, 2H, 5-H), 1.09 (ddd, 1H, *J* = 14.0, 9.5, 2.2 Hz, 13-H_b), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 10-Me), 0.78 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C:-NMR** (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 170.7 (s, C-1), 170.0 (s, Ac), 156.4 (s, COONH₂), 143.0 (s, C-16), 140.8 (s, C-20), 136.6 (s, C-18), 131.9 (d, C-3), 131.8 (s, C-8), 131.6 (d, C-9), 124.1 (d, C-17), 119.7 (s, C-21), 116.7 (d, C-19), 81.7 (d, C-6), 81.6 (d, C-12), 79.2 (d, C-7), 74.3 (d, C-11), 58.6 (q, C-6-OMe), 56.4 (q, C-12-OMe), 55.1 (t, CH₂-aromat.), 45.2 (t, C-15), 44.3 (t, C-4), 35.7 (t, C-13), 35.3 (d, C-10), 32.3 (d, C-14), 30.9 (t, C-5), 19.2 (q, C-14-Me), 17.7 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-8-Me), 12.6 (q, C-2-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.29 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₁H₄₉N₆O₇ [M+H]⁺: 617.3663, gefunden: 617.3674.

17-Desmethoxy-18-azidomethyl-reblastatin **187**

UPLC-MS t_R = 1.83 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₉H₄₄N₅O₆ [M+H]⁺: 558.3292, gefunden: 558.3290.

seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-reblastatin **191**

UPLC-MS t_R = 2.18 min (CH₃OH); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₉H₄₆N₅O₇ [M+H]⁺: 576.3397, gefunden: 576.3389.

seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-reblastatinamid **190**

UPLC-MS $t_R = 2.02$ min (CH₃OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₉H₄₇N₆O₆ [M+H]⁺: 575.3557, gefunden: 575.3542.

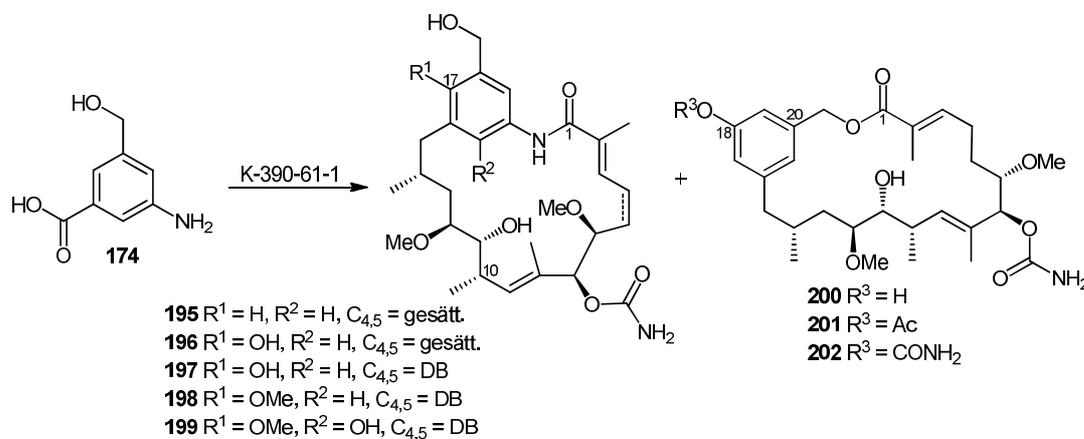
seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-*N*-carbamoyl-reblastatin **193**

UPLC-MS $t_R = 2.17$ min (CH₃OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₇N₆O₈ [M+H]⁺: 619.3455, gefunden: 619.3455.

seco-17-Desmethoxy-18-azidomethyl-*N*-carbamoyl-reblastatinamid **192**

UPLC-MS $t_R = 1.99$ min (CH₃OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₈N₇O₇ [M+H]⁺: 618.3615, gefunden: 618.3619.

Mutasythese mit 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäure **174**



Die Mutasythese mit 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäure **174** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäure **174** in zwanzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1.5 L GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über mehrere HPLC-Läufe folgende Geldanamycin-Derivate erhalten:

17-Desmethoxy-18-hydroxymethyl-reblastatin **195**

0.5 mg (0.3 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 57.04 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 67.25 min

3. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 46.50 min

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.07 (br. s, 1H, 19-H), 6.92 (s, 1H, 17-H), 6.71 (s, 1H, 21-H), 5.73 (br. s, 1H, 3-H), 5.23 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, 9-H), 4.89 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, 7-H), 4.58 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, arom. CH_{2a}), 4.55 (d, 1H, *J* = 14.1 Hz, arom CH_{2b}), 3.59-3.58 (m, 1H, 11-H), 3.43 (s, 3H, 6-OMe), 3.35 (s, 3H, 12-OMe), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 6-H), 3.09-3.07 (m, 1H, 12-H), 2.80 (dd, 1H, *J* = 13.1, 4.1 Hz, 15-H_a), 2.49 (dd, 1H, *J* = 13.1, 5.5 Hz, 15-H_b), 2.40-2.34 (m, 1H, 10-H), 2.33-2.25 (m, 1H, 4-H_a), 2.14-2.06 (m, 1H, 4-H_b), 2.03-1.95 (m, 1H, 14-H), 1.82 (s, 3H, 2-Me), 1.68-1.58 (m, 2H, 13-H), 1.36 (s, 3H, 8-Me), 1.25-1.17 (m, 1H, 5-H_a), 1.16-1.09 (m, 1H, 5-H_b), 1.03 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 10-Me) 0.77 (d, 3H, *J* = 4.3 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 174.3 (s, C-1), 159.1 (s, COONH₂), 143.6 (s, C-18), 140.1 (s, C-16), 137.3 (s, C-20), 136.3 (d, C-3), 134.4 (d, C-9), 132.8 (s, C-2), 131.3 (s, C-8), 126.5 (d, C-17), 125.6 (d, C-21), 119.4 (d, C-19), 83.7 (d, C-7), 82.0 (d, C-12), 80.9 (d, C-6), 74.4, (d, C-11), 64.7 (t, arom. CH₂), 59.9 (q, C-6-OMe), 57.0 (q, C-12-OMe), 43.8 (t, C-15), 36.0 (d, C-10), 31.2 (t, C-13), 30.9 (d, C-5), 26.2 (d, C-14), 24.4 (t, C-4), 21.2 (q, C-14-Me), 18.2 (q, C-10-Me), 13.9 (q, C-2-Me), 12.1 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** t_r = 1.43 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₉H₄₅N₂O₇ [M+H]⁺: 533.3227, gefunden 533.3251.

17-Des-*O*-methyl-18-hydroxymethyl-reblastatin **196**

1.3 mg (0.7 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); $t_R = 57.04$ min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 63.00$ min

3. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 37.50$ min

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-*d*₈, THF-*d*₇ = 1.73 ppm): δ 8.29 (br. s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, arom.-OH), 7.12 (br. s, 1H, 21-H), 6.74 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, 19-H), 5.89 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, 3-H), 5.70 (br. s, 2H, NH₂), 5.34 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 9-H), 5.07 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, 7-H), 4.95 (t, 1H, $J = 5.1$ Hz, Benzyl-OH), 4.71 (dd, 1H, $J = 13.1, 5.1$ Hz, arom.-CH_{2a}), 4.66 (dd, 1H, $J = 13.1, 5.1$ Hz, arom.-CH_{2b}), 3.41 (dt, 1H, $J = 8.8, 3.4$ Hz, 6-H), 3.50 (ddd, 1H, $J = 8.0, 3.9, 3.9$ Hz, 11-H), 3.36 (s, 3H, 6-OMe), 3.32 (s, 3H, 12-OMe), 3.30-3.26 (m, 1H, 6-H), 3.23 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz, 11-OH), 3.15 (dt, 1H, $J = 8.0, 3.9$ Hz, 12-H), 2.71 (dd, 1H, $J = 13.9, 6.0$ Hz, 15-H_a), 2.52-2.48 (m, 1H, 10-H), 2.44 (dd, 1H, $J = 13.9, 6.0$ Hz, 15-H_b), 2.35- 2.27 (m, 1H, 4-H_a), 2.17- 2.10 (m, 1H, 4-H_b), 1.98-1.93 (m, 1H, 14-H), 1.78 (s, 3H, 2-Me), 1.70-1.65 (m, 1H, 13-H_a), 1.51 (s, 3H, 8-Me), 1.46-1.39 (m, 2H, 5-H), 1.32- 1.24 (m, 1H, 13-H_b), 0.99 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 10-Me), 0.89 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 323 K, THF-*d*₈, THF-*d*₈ = 25.5 ppm): δ 170.8 (s, C-1), 157.3 (s, COONH₂), 152.5 (s, C-17), 134.6 (d, C-3), 134.0 (s, C-2), 133.4 (d, C-9), 132.5 (s, C-20), 131.6 (s, C-8), 128.9 (s, C-16), 126.9 (s, C-18), 125.7 (d, C-21), 119.1 (d, C-19), 83.1 (d, C-12), 81.8 (d, C-6), 81.1 (d, C-7), 75.4 (d, C-11), 64.7 (t, arom.-CH₂), 58.8 (q, C-6-OMe), 57.3 (q, C-12OMe), 36.5 (t, C-15), 35.4 (d, C-10), 35.1 (t, C-13), 32.6 (d, C-14), 31.1 (t, C-5), 25.0 (t, C-4), 20.4 (q, C-14-Me), 17.0 (q, C-10-Me), 13.7 (q, C-2-Me), 13.0 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.43$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₉H₄₄N₂O₈Na [M+Na]⁺: 571.2995, gefunden 571.2988.

4,5-Dehydro-17-des-*O*-methyl -18- hydroxymethyl-reblastatin **197**

2.8 mg (1.7 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 57.04 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 63.00 min

3. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 27.00 min

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.67 (s, 1H, NH), 8.53 (br. s, 1H, Phen.-OH), 8.00 (s, 1H, 21-H), 7.11 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz, 3-H), 6.79 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, 19-H), 6.56 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz, 4-H), 5.72-5.66 (m, 1H, 5-H), 5.72-5.66 (m, 1H, 9-H), 5.72-5.66 (m, 2H, NH₂), 5.06 (ps.s, 1H, 7-H), 4.47 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, arom.-CH₂), 4.40 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, 6-H), 4.06 (br. s, 1H, 11-OH), 3.78 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, Benzyl-OH), 3.61-3.55 (m, 1H, 11-H), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.35-3.32 (m, 1H, 12-H), 3.16 (s, 3H, 12-OMe), 2.86 (dd, 1H, *J* = 13.5, 3.2 Hz, 15-H_a), 2.80-2.75 (m, 1H, 10-H), 2.44 (dd, 1H, *J* = 13.5, 9.0 Hz, 15-H_b), 1.98 (s, 3H, 2-Me), 1.93-1.86 (m, 1H, 14-H), 1.79-1.73 (m, 1H, 13-H_a), 1.73 (unter THF, 3H, 8-Me) 1.69-1.65 (m, 1H, 13-H_b), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 10-Me), 0.96 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, T = 323K, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 168.8 (s, C-1), 157.2 (s, COONH₂), 144.4 (s, C-17), 137.4 (s, C-2), 135.33 (s, C-8), 135.30 (s, C-18), 135.30 (d, C-5), 133.1 (d, C-9), 129.1 (s, C-20), 127.7 (s, C-16), 127.4 (d, C-4), 126.3 (d, C-3), 124.7 (d, C-21), 117.3 (d, C-19), 82.6 (d, C-12), 82.4 (d, C-6), 81.9 (d, C-7), 75.4 (d, C-11), 65.3 (t, arom.-CH₂), 57.3 (q, C-12-OMe), 56.7 (q, C-6-OMe), 41.9 (t, C-15), 36.3 (t, C-13), 33.7 (d, C-10), 29.7 (d, C-14), 23.2 (q, C-14-Me), 13.2 (q, C-8-Me), 13.1 (q, C-10-Me), 13.0 (q, C-2-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.42 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₉H₄₂N₂O₈Na [M+Na]⁺: 569.2839, gefunden 569.2843.

4,5-Dehydro-18- hydroxymethyl-reblastatin **198**

1.0 mg (0.7 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 74.00 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 67.00 min

(C-8, C-16 und C-20 können aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht zugeordnet werden)

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.67 (s, 1H, NH), 8.02 (br. s, 1H, 21-H), 7.09 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, 3-H), 6.72 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, 19-H), 6.54 (dd, 1H, *J* = 11.5, 11.2 Hz, 4-H), 5.72-5.67 (m, 1H, 5-H), 5.72-5.67 (m, 1H, 9-H), 5.72-5.67 (m, 2H, NH₂) 5.03 (ps. s, 1H, 7-H), 4.37 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz, 6-H), 4.30 (ps. s, 2H, arom.-CH₂), 3.58 (unter THF, 1H, 11-H), 3.35 (s, 3H, 12-OMe), 3.34-3.32 (m, 1H, 12-H), 3.25 (s, 3H, 17-OMe), 3.16 (s, 3H, 6-OMe), 2.86-2.83 (m, 1H, 15-H_a), 2.81-2.76 (m, 1H, 10-H), 2.44-2.39 (m, 1H, 15-H_b), 2.01 (s, 3H, 2-Me), 1.91-1.83 (m, 1H, 14-H), 1.79-1.73 (m, 1H, 13-H_a), 1.73 (unter THF, 3H, 8-Me), 1.73 (unter THF, 1H, 11-OH), 1.73 (unter THF, 1H, Benzyl-OH), 1.69-1.64 (m, 1H, 13-H_b), 0.98 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 10-Me), 0.93 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 168.6 (s, C-1), 158.8 (s, COONH₂), 137.4 (s, C-2), 135.4 (d, C-5), 132.8 (d, C-9), 131.9 (s, C-17), 130.7 (s, C-18), 127.3 (d, C-4), 126.2 (d, C-3), 125.7 (d, C-19), 118.4 (d, C-21), 82.6 (d, C-12), 81.8 (d, C-6), 80.1 (d, C-7), 76.6 (d, C-11), 75.5 (t, arom.-CH₂), 57.6 (q, C-17-OMe), 57.3 (q, C-12-OMe), 56.9 (q, C-6-OMe), 42.2 (t, C-15), 36.4 (t, C-13), 34.0 (d, C-10), 29.6 (d, C-14), 23.0 (q, C-14-Me), 13.4 (q, C-8-Me), 13.1 (q, C-10-Me), 13.0 (q, C-2-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.74 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₀H₄₄N₂O₈Na [M+Na]⁺: 583.2995, gefunden 583.3002.

4,5-Dehydro-18- hydroxymethyl -21-hydroxy-reblastatin **199**

0.9 mg (0.6 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 57.04 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 67.25 min

3. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 37.00 min

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.56 (br. s, 1H, NH), 7.71 (br. s, 1H, H-19), 7.32 (s, 1H, 21-OH), 7.01 (br. s, 1H, 3-H), 6.51 (t, 1H, *J* = 11.3 Hz, 4-H), 5.76-5.61 (m, 1H, 5-H), 5.76-5.61 (m, 1H, 9-H), 5.76-5.61 (m, 2H, NH₂), 5.02 (ps. s, 1H, 7-H), 4.53 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, arom.-CH_{2a}), 4.49 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, arom.-CH_{2b}), 4.39-4.31 (m, 1H, 6-H), 3.58-3.54 (m, 1H, 11-H), 3.33 (s, 3H, 6-OMe), 3.32 (s, 3H, 17-OMe), 3.32-3.29 (m, 1H, 12-H), 3.16 (s, 3H, 12-OMe), 2.79 (dd, 1H, *J* = 13.6, 8.8 Hz, 15-H_a), 2.82-2.74 (m, 1H, 10-H), 2.62 (dd, 1H, *J* = 13.6, 3.6 Hz, 15-H_b), 1.99 (s, 3H, 2-Me), 1.94-1.89 (m, 1H, 14-H), 1.79-1.73 (m, 1H, 13-H_a), 1.73 (unter THF, 3H, 8-Me) 1.73-1.66 (m, 1H, 13-H_b), 1.00 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 14-Me) 0.92 (d, 3H, *J* = 7.1 Hz, 10-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 169.5 (s, C-1), 157.2 (s, COONH₂), 151.8 (s, C-17), 147.8 (s, C-21), 137.2 (s, C-2), 135.3 (d, C-5), 133.2 (d, C-9), 131.3 (d, C-19), 127.3 (d, C-4), 126.2 (d, C-3), 121.6 (s, C-8), 119.2 (s, C-18), 117.0 (s, C-16), 114.8 (s, C-20), 82.8 (d, C-12), 82.5 (d, C-6), 82.0 (d, C-7), 75.2 (d, C-11), 74.2 (t, arom.-CH₂), 57.7 (q, C-6-OMe), 57.2 (q, C-17-OMe), 56.7 (q, C-12-OMe), 36.0 (t, C-13), 33.6 (d, C-10), 33.4 (t, C-15), 30.1 (d, C-14), 23.7 (q, C-14-Me), 13.1 (q, C-8-Me), 13.0 (q, C-2-Me), 11.8 (q, C-10-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.52 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₀H₄₄N₂O₉Na [M+Na]⁺: 599.2945, gefunden 599.2943.

17-Amino-lacton **200**

3.4 mg (2.3 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 83.00 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 78.20 min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.68 (dd, 1H, J = 7.3, 1.4 Hz, 3-H), 6.55 (t, 1H, J = 1.3 Hz, 17-H), 6.51 (d, 1H, J = 1.3 Hz, 19-H), 6.51 (d, 1H, J = 1.3 Hz, 21-H), 5.49 (dq, 1H, J = 10.2, 1.1 Hz, 9-H), 5.07 (d, 1H, J = 11.8 Hz, arom.-CH_{2a}), 4.95 (d, 1H, J = 8.4 Hz, 7-H), 4.87 (unter H₂O, 1H, arom. CH_{2b}), 3.47 (s, 3H, 12-OMe), 3.41 (dt, 1H, J = 8.8, 3.4 Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.27 (s, 3H, 6-OMe), 3.19 (ddd, 1H, J = 9.7, 6.0, 2.5 Hz, 12-H), 2.61-2.56 (m, 1H, 10-H), 2.61-2.56 (m, 1H, 15-H_a), 2.41-2.35 (m, 1H, 15-H_b), 2.41-2.35 (m, 1H, 4-H_a), 2.27- 2.19 (m, 1H, 4-H_b), 1.88-1.81 (m, 1H, 14-H), 1.85 (s, 3H, 2-Me), 1.58-1.52 (m, 1H, 13-H_a), 1.58 (s, 3H, 8-Me), 1.47-1.28 (m, 1H, 5-H_a), 1.41- 1.28 (m, 1H, 5-H_b), 1.47-1.28 (m, 1H, 13-H_b), 0.97 (d, 3H, J = 6.7 Hz, 10-Me), 0.90 (d, 3H, J = 6.6 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 169.3 (s, C-1), 159.2 (s, COONH₂), 148.7 (s, C-18), 143.7 (s, C-16), 143.3 (d, C-3), 138.1 (s, C-20), 136.7 (d, C-9), 131.1 (s, C-8), 129.1 (s, C-2), 120.2 (d, C-17), 117.5 (d, C-21), 114.1 (d, C-19), 84.9 (d, C-7), 82.1 (d, C-6), 81.7 (d, C-12), 76.3 (d, C-11), 67.8 (t, arom.-CH₂), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.1 (q, C-6-OMe), 45.5 (t, C-15), 37.1 (t, C-13), 34.8 (d, C-10), 33.3 (d, C-14), 31.5 (t, C-5), 25.6 (t, C-4), 20.7 (q, C-14-Me), 15.1 (q, C-10-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.50 min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₉H₄₄N₂O₇Na [M+Na]⁺: 555.3046, gefunden 555.3043.

17-Acetylamino-lacton **201**

2.3 mg (1.5 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); t_R = 87.00 min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 75.80 min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.43 (t, 1H, J = 1.6 Hz, 19-H), 7.30 (t, 1H, J = 1.6 Hz, 21-H), 6.98 (s, 1H, 17-H), 6.72 (dd, 1H, J = 7.5, 1.4 Hz, 3-H), 5.50 (dd, 1H, J = 10.2, 1.0 Hz, 9-H), 5.16 (d, 1H, J = 12.1 Hz, arom.-CH_{2a}), 5.02 (d, 1H, J = 12.1 Hz, arom.-CH_{2b}), 4.97 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 3.50 (s, 3H, 12-OMe), 3.43 (dt, 1H, J = 8.7, 3.5 Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.30 (s, 3H, 6-OMe), 3.22 (m, 1H, 12-H), 2.72 (dd, 1H, J = 13.1, 6.7 Hz, 15-H_a), 2.60 (tdd, 1H, J = 12.4, 10.3, 6.6 Hz, 10-H), 2.47 (dd, 1H, J = 13.2, 7.2 Hz, 15-H_b), 2.44-2.37 (m, 1H, 4-H_a), 2.30- 2.22 (m, 1H, 4-H_b),

2.14 (s, 3H, Ac), 1.93-1.89 (m, 1H, 14-H), 1.88 (s, 3H, 2-Me), 1.58-1.55 (m, 1H, 13-H_a), 1.56 (s, 3H, 8-Me), 1.53-1.46 (m, 1H, 5-H_a), 1.46-1.42 (m, 1H, 5-H_b), 1.37-1.31 (m, 1H, 13-H_b), 1.00 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 10-Me), 0.92 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 295 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ 171.7 (s, Ac), 169.1 (s, C-1), 159.2 (s, COONH₂), 143.7 (s, C-16), 143.4 (d, C-3), 140.0 (s, C-18), 138.1 (s, C-20), 136.6 (d, C-9), 131.2 (s, C-8), 129.1 (s, C-2), 125.8 (d, C-21), 121.7 (d, C-17), 118.5 (d, C-19), 84.8 (d, C-7), 82.1 (d, C-6), 81.9 (d, C-12), 76.3 (d, C-11), 67.4 (t, arom.-CH₂), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.2 (q, C-6-OMe), 45.3 (t, C-15), 37.0 (t, C-13), 34.9 (d, C-10), 33.4 (d, C-14), 31.4 (t, C-5), 25.6 (t, C-4), 23.8 (q, Ac), 20.6 (q, C-14-Me), 15.3 (q, C-10-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 1.76$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₁H₄₆N₂O₈Na [M+Na]⁺: 597.3152, gefunden 597.3171.

17-Urea-lacton **202**

0.5 mg (0.3 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); $t_R = 76.00$ min

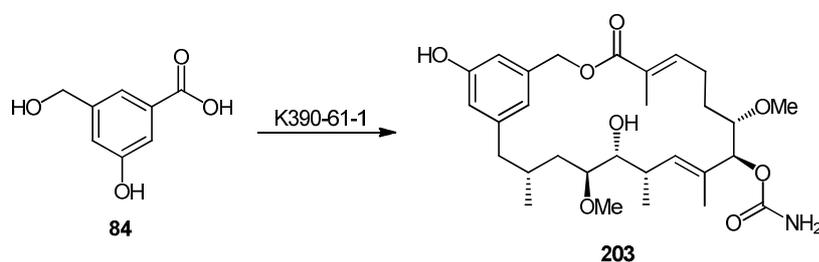
2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 71.00$ min

(keine vollständige Zuordnung aufgrund zu geringer Mengen es fehlen: C-18 und C-Harnstoff) (Aufnahme von NH-2D-Spektren zur Strukturaufklärung (in THF))

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.23 (t, 1H, $J = 1.6$ Hz, 19-H), 7.10 (t, 1H, $J = 1.6$ Hz, 21-H), 6.86 (t, 1H, $J = 1.6$ Hz, 17-H), 6.69 (tq, 1H, $J = 7.5$, 1.4 Hz, 3-H), 5.48 (dq, 1H, $J = 10.0$, 1.4 Hz, 9-H), 5.14 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, arom.-CH_{2a}), 5.00 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, arom.-CH_{2b}), 4.94 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, 7-H), 3.47 (s, 3H, 12-OMe), 3.41 (dt, 1H, $J = 8.6$, 3.4 Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.29 (s, 3H, 6-OMe), 3.21-3.18 (m, 1H, 12-H), 2.68 (dd, 1H, $J = 13.1$, 6.8 Hz, 15-H_a), 2.58 (qd, 1H, $J = 16.7$, 6.1 Hz, 10-H), 2.44 (dd, 1H, $J = 13.2$, 7.2 Hz, 15-H_b), 2.40-2.35 (m, 1H, 4-H_a), 2.27-2.22 (m, 1H, 4-H_b), 1.89-1.84 (m, 1H, 14-H), 1.86 (d, 3H, $J = 1.4$ Hz, 2-Me), 1.57-1.51 (m, 1H, 13-H_a), 1.54 (d, 3H, $J = 1.4$ Hz, 8-Me), 1.47-1.40 (m, 2H, 5-H), 1.39-1.36 (m, 1H, 13-H_b), 0.98 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 10-Me), 0.90 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 14-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 169.2 (s, C-1), 159.4 (s, COONH₂), 143.6 (d, C-3),

143.4 (s, C-16), 138.0 (s, C-20), 136.7 (d, C-9), 131.2 (s, C-8), 129.1 (s, C-2), 124.4 (d, C-17), 120.9 (d, C-21), 117.7 (d, C-19), 84.8 (d, C-7), 82.1 (d, C-6), 81.8 (d, C-12), 76.3 (d, C-11), 67.5 (t, aromat.-CH₂), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.2 (q, C-6-OMe), 45.4 (t, C-15), 37.1 (t, C-13), 34.9 (d, C-10), 33.3 (d, C-14), 31.4 (t, C-5), 25.6 (t, C-4), 15.2 (q, C-10-Me), 14.5 (q, C-14-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.64$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₆N₃O₈[M+H]⁺: 576.3285, gefunden: 576.3288.

Mutasynthese mit 3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)benzoesäure **84**



Die Mutasynthese von 3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)benzoesäure **84** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)benzoesäure **84** in sechzehn 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1.2 L GPMd-Medium wird hierbei nach Reinigung über HPLC folgendes Geldanamycin-Derivat erhalten.

18-Hydroxy-lacton **203**

3.2 mg (2.7 mg/L); farbloser Feststoff

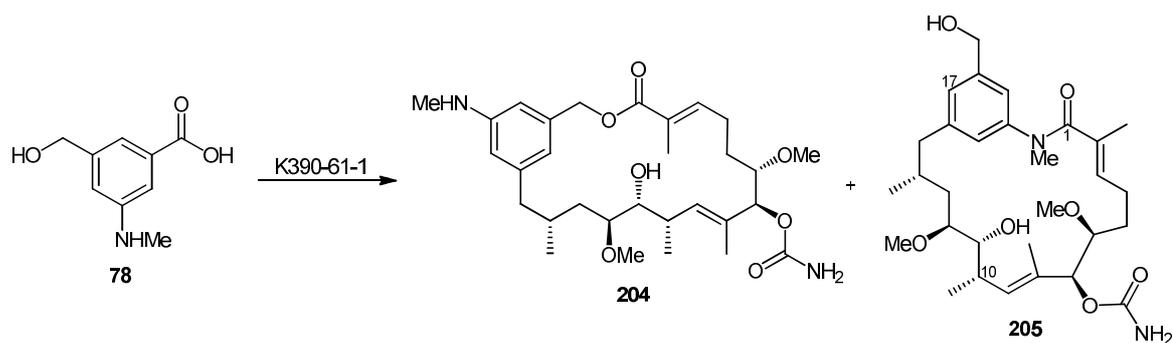
1. HPLC: ((präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃OH 60/40 → 50/50 in 15 min, dann 50/50 → 20/80 in 75 min, dann 20/80 → 10/90 in 15 min, dann 10/90 → 100 CH₃OH in 10 min; Fluss 5.5 → 7.0 mL/min); $t_R = 82.56$ min

2. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 57.82$ min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.70- 6.68 (m, 1H, 3-H), 6.68 (t, 1H, $J = 1.3$ Hz, 21-H), 6.56 (dd, 1H, $J = 1.5, 1.3$ Hz, 19-H), 6.55 (dd, 1H, $J = 1.5, 1.2$

Hz, 17-H), 5.48 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, 9-H), 5.10 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, arom.-CH_{2a}), 4.96 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, arom.-CH_{2b}), 4.94 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 7-H), 3.47 (s, 3H, 12-OMe), 3.41 (td, 1H, $J = 8.6, 3.4$ Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.30 (s, 3H, 6-OMe), 3.19 (ddd, 1H, $J = 9.6, 5.8, 2.2$ Hz, 12-H), 2.63 (dd, 1H, $J = 12.9, 6.9$ Hz, 15-H_a), 2.58 (dq, 1H, $J = 10.2, 6.4, 6.2$ Hz, 10-H), 2.41-2.37 (m, 1H, 4-H_a), 2.39 (dd, 1H, $J = 13.0, 7.1$ Hz, 15-H_b), 2.27-2.20 (m, 1H, 4-H_b), 1.87-1.82 (m, 1H, 14-H), 1.85 (s, 3H, 2-Me), 1.57-1.51 (m, 1H, 13-H_a), 1.54 (s, 3H, 8-Me), 1.45-1.36 (m, 2H, 5-H), 1.31 (ddd, 1H, $J = 14.3, 9.2, 2.1$ Hz, 13-H_b), 0.98 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, 10-Me), 0.89 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 169.2 (s, C-1), 159.2 (s, COONH₂), 158.4 (s, C-18), 144.4 (s, C-16), 143.3 (d, C-3), 138.6 (s, C-20), 136.7 (d, C-9), 131.2 (s, C-8), 129.1 (s, C-2), 121.4 (d, C-21), 117.0 (d, C-17), 113.7 (d, C-19), 84.8 (d, C-7), 82.1 (d, C-6), 81.8 (d, C-12), 76.3 (d, C-11), 67.5 (t, arom.-CH₂), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.1 (q, C-6-OMe), 45.4 (t, C-15), 37.0 (t, C-13), 34.9 (d, C-10), 33.3 (d, C-14), 31.4 (t, C-5), 25.6 (t, C-4), 20.6 (q, C-14-Me), 15.2 (q, C-10-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; UPLC-MS $t_R = 2.28$ min; HRMS (ESI) m/z berechnet für C₂₉H₄₃NNaO₈ [M+Na]⁺: 556.2886, gefunden: 556.2875.

Mutasynthese mit 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure **78**



Die Mutasynthese von 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure **78** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Hydroxymethyl-5-methylaminobenzoessäure **78** in siebenunddreißig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 2.8 L GPMd-Medium werden hierbei nach Reinigung über HPLC folgende Geldanamycinderivate erhalten.

18-Methylamino-lacton **204**

1 mg (0.3 mg/L); farbloser Feststoff

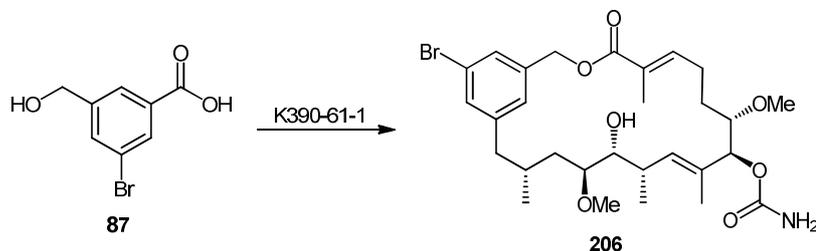
1. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 10 min, dann 70/30 → 55/45 in 20 min, dann 55/45 → 45/55 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); t_R = 86.59 min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.68 (tq, 1H, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 3-H), 6.50 (t, 1H, *J* = 1.3 Hz, 21-H), 6.40 (t, 1H, *J* = 1.3 Hz, 17-H), 6.40 (t, 1H, *J* = 1.3 Hz, 19-H), 5.48 (dd, 1H, *J* = 10.2, 1.3 Hz, 9-H), 5.09 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, arom.-CH_{2a}), 4.95 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, arom.-CH_{2b}), 4.94 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, 7-H), 3.47 (s, 3H, 12-OMe), 3.41 (td, 1H, *J* = 8.7, 3.3 Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.27 (s, 3H, 6-OMe), 3.21-3.16 (m, 1H, 12-H), 2.76 (s, 3H, N-Me) 2.61-2.56 (m, 1H, 10-H), 2.59 (dd, 1H, *J* = 13.1, 7.3 Hz, 15-H_a), 2.41-2.36 (m, 1H, 4-H_a), 2.39 (dd, 1H, *J* = 13.1, 7.0 Hz, 15-H_b), 2.27-2.19 (m, 1H, 4-H_b), 1.88-1.83 (m, 1H, 14-H), 1.85 (d, 3H, *J* = 1.4 Hz, 2-Me), 1.57-1.53 (m, 1H, 13-H_a), 1.54 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz 8-Me), 1.46-1.36 (m, 2H, 5-H), 1.33-1.29 (m, 1H, 13-H_b), 0.97 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, 10-Me), 0.90 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 169.4 (s, C-1), 159.2 (s, COONH₂), 151.5 (s, C-18), 143.6 (s, C-16), 143.3 (d, C-3), 138.0 (s, C-20), 136.7 (d, C-9), 131.1 (s, C-8), 129.2 (s, C-2), 119.0 (d, C-21), 114.6 (d, C-17), 111.1 (d, C-19), 84.9 (d, C-7), 82.1 (d, C-6), 81.8 (d, C-12), 76.3 (d, C-11), 68.0 (t, arom.-CH₂), 59.8 (q, C-12-OMe), 57.1 (q, C-6-OMe), 45.7 (t, C-15), 37.1 (t, C-13), 34.8 (d, C-10), 33.3 (d, C-14), 31.5 (t, C-5), 25.6 (t, C-4), 20.7 (q, C-14-Me), 15.1 (q, C-10-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.13 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₀H₄₇N₂O₇ [M+H]⁺: 547.3383 gefunden: 547.3370.

17-Desmethoxy-18-hydroxymethyl-*N*-methyl-reblastatin **205**

(Spuren)

UPLC-MS t_R = 1.89 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₀H₄₇N₂O₇ [M+H]⁺: 547.3383 gefunden: 547.3392.

Mutasynthese mit 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure 87

Die Mutasynthese von 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure **87** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher als Startereinheit 3-Brom-5-hydroxymethylbenzoesäure **87** in einundzwanzig 75 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus insgesamt 1.6 L GPM-Medium wird hierbei nach Reinigung über HPLC folgendes Geldanamycinderivat erhalten.

18-Brom-lacton 206

0.6 mg (0.4 mg/L); farbloser Feststoff

1. HPLC: ((semipräp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 95.25$ min

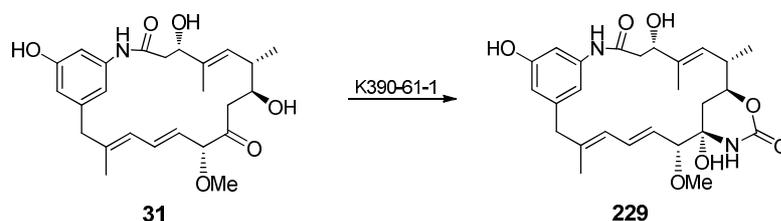
2. HPLC: ((semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/CH₃CN 95/5 → 80/20 in 40 min, dann 80/20 → 75/25 in 10 min, dann 75/25 → 65/35 in 20 min, dann 65/35 → 55/45 in 15 min, dann 100 CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min); $t_R = 67.81$ min

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.34 (dd, 1H, $J = 1.7$, 1.6 Hz, 19-H), 7.30 (dd, 1H, $J = 1.7$, 1.1 Hz, 17-H), 7.20 (dd, 1H, $J = 1.6$, 1.1 Hz, 21-H), 6.71 (tq, 1H, $J = 7.5$, 1.5 Hz, 3-H), 5.47 (dd, 1H, $J = 10.0$, 1.0 Hz, 9-H), 5.17 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, arom.-CH_{2a}), 5.04 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, arom.-CH_{2b}), 4.87 (unter H₂O, 1H, 7-H), 3.47 (s, 3H, 6-OMe), 3.41 (td, 1H, $J = 8.7$, 3.5 Hz, 6-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 11-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, 12-OMe), 3.19 (ddd, 1H, $J = 9.4$, 5.4, 2.2 Hz, 12-H), 2.74 (dd, 1H, $J = 13.1$, 6.5 Hz, 15-H_a), 2.56 (ddq, 1H, $J = 10.0$, 6.6, 6.5 Hz, 10-H), 2.44 (dd, 1H, $J = 13.1$, 7.5 Hz, 15-H_b), 2.42-2.36 (m, 1H, 4-H_a), 2.29-2.22 (m, 1H, 4-H_b), 1.89-1.83 (m, 1H, 14-H), 1.86 (d, 3H, $J = 1.5$ Hz, 2-Me), 1.54 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, 8-Me), 1.53-1.49 (m, 1H, 13-H_a), 1.46-1.38 (m, 2H, 5-H), 1.34-1.29 (m, 1H, 13-H_b), 0.99 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 10-Me), 0.87 (d, 3H,

$J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 168.9 (s, C-1), 159.2 (s, COONH_2), 145.5 (s, C-16), 143.6 (s, C-3), 140.0 (s, C-20), 136.5 (d, C-9), 133.1 (d, C-17), 131.2 (s, C-8), 129.6 (d, C-19), 129.0 (s, C-2), 128.9 (d, C-21), 122.9 (s, C-18), 84.7 (d, C-7), 82.0 (d, C-6), 82.0 (d, C-12), 76.1 (d, C-11), 66.5 (t, aromat.- CH_2), 59.9 (q, C-6-OMe), 57.3 (q, C-12-OMe), 44.8 (t, C-15), 36.8 (t, C-13), 35.0 (d, C-10), 33.4 (d, C-14), 31.4 (t, C-5), 25.7 (t, C-4), 20.5 (q, C-14-Me), 15.5 (q, C-10-Me), 12.5 (q, C-2-Me), 11.6 (q, C-8-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.71$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{NO}_7\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 618.2042, gefunden: 618.2042.

6.3.3 Darstellung der mutasynthetisch hergestellten Proansamitocin-Derivate

Carbamoyliertes Proansamitocin **229**



Die Mutasynthese zum carbamoylierten Proansamitocin **229** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher Proansamitocin **31** (6 mg, 13.5 μmol , 1 Äq.) in zwei 30 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus 60 mL Geldanamycin-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über 1. semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) und 2. semipräp. HPLC (C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 80/20 \rightarrow 30/70$ in 80 min, dann 30/70 \rightarrow 100 CH_3OH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) 1.4 mg carbamoyliertes Proansamitocin **229** (2.8 μmol , 21 %) und 0.5 mg 2,3-Dehydro-C-7-Carbamoyliertes- Proansamitocin **228** (1.0 μmol , 7 %) als farblose Feststoffe erhalten.

Carbamoyliertes Proansamitocin **229**

1. semipräp. HPLC ($t_R = 74.35$ min); 2. semipräp. HPLC ($t_R = 75.07$ min)

Konformer 1:

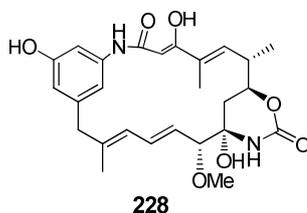
¹H-NMR (500 MHz, 283 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 9.01 (s, 1H, NH), 8.17 (s, 1H, 18-OH), 7.60 (s, 1H, 21-H), 6.57 (s, 1H, NH-C-9), 6.54-6.49 (m, 1H, 12-H), 6.30 (s, 1H, 17-H), 6.24 (s, 1H, 19-H), 6.16 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, 13-H), 5.63 (dd, 1H, $J = 15.0, 9.2$ Hz, 11-H), 5.51 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, 5-H), 5.15 (s, 1H, 9-OH), 4.64 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, 3-OH), 4.27 (ddd, 1H, $J = 11.4, 9.0, 2.0$ Hz, 7-H), 4.09-4.03 (m, 1H, 3-H), 4.09-4.03 (m, 1H, 3-OH), 3.51 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 10-H), 3.39 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, 15-H_a), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.03 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, 15-H_b), 2.74-2.64 (m, 2H, 2-H), 2.52-2.45 (m, 1H, 6-H), 1.90-1.68 (m, 1H, 8-H_a), 1.62 (s, 3H, 14-Me), 1.58 (s, 3H, 4-Me), 1.23 (dd, 1H, $J = 14.5, 9.0$ Hz, 8-H_b), 1.12 (d, 3H, $J = 5.8$ Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 170.6 (s, C-1), 158.6 (s, C-18), 152.5 (s, COONH), 142.9 (s, C-16), 141.5 (s, C-20), 140.2 (s, C-14), 138.6 (s, C-4), 134.4 (d, C-12), 127.4 (d, C-11), 127.4 (d, C-13), 125.7 (d, C-5), 112.4 (d, C-17), 111.3 (d, C-21), 103.9 (d, C-19), 89.6 (d, C-10), 82.0 (s, C-9), 78.5 (d, C-7), 73.0 (d, C-3), 56.1 (q, C-10-OMe), 47.1 (t, C-15), 39.7 (t, C-2), 38.4 (d, C-6), 36.3 (t, C-8), 18.4 (q, C-6-Me), 16.7 (q, C-14-Me), 14.7 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 285 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 9.04 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, 18-OH), 6.56 (s, 1H, NH-C9), 6.54-6.49 (m, 1H, 12-H), 6.48 (s, 1H, 21-H), 6.45 (s, 1H, 17-H), 6.32 (s, 1H, 19-H), 6.09 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, 13-H), 5.53-5.46 (m, 1H, 11-H), 5.53-5.46 (m, 1H, 5-H), 5.09 (s, 1H, 9-OH), 4.09-4.03 (m, 1H, 7-H), 4.09-4.03 (m, 1H, 3-H), 4.09-4.03 (m, 1H, 3-OH), 3.52 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, 10-H), 3.40 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, 15-H_a), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.12 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, 15-H_b), 2.74-2.64 (m, 1H, 2-H_a), 2.52-2.45 (m, 1H, 6-H), 2.04 (dd, 1H, $J = 15.7, 11.1$ Hz, 2-H_b), 1.90-1.68 (m, 1H, 8-H_a), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.36 (s, 3H, 4-Me), 1.23 (dd, 1H, $J = 14.5, 9.0$ Hz, 8-H_b), 1.13 (d, 3H, $J = 5.1$ Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 285 K, THF-d₈, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 175.5 (s, C-1), 159.4 (s, C-18), 152.4 (s, COONH), 143.2 (s, C-16), 140.2 (s, C-20), 140.1 (s, C-14), 137.5 (s, C-4), 133.3 (d, C-12), 129.6 (d, C-11), 126.2 (d, C-13), 125.6 (d, C-5), 116.4 (d, C-17), 115.0 (d, C-21), 109.1 (d, C-19), 90.0 (d, C-10), 81.5 (s, C-9), 77.6 (d, C-7), 72.1 (d, C-3), 56.6 (q, C-10-OMe), 47.4 (t, C-15), 39.1 (d, C-6), 38.1 (t, C-2), 36.9 (t, C-8), 18.1 (q, C-6-Me), 16.1 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 2.09$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{26}H_{35}N_2O_7$ $[M+H]^+$: 487.2444, gefunden: 487.2447.

2,3-Dehydro-C-7-carbamoyliertes-Proansamitocin **228**



1. semipräp..HPLC ($t_R = 75.97$ min); 2. semipräp. HPLC ($t_R = 77.39$ min)

(Die Signale von C-1, C-2 und C-3 sowie das Signal von 2-H können aufgrund des Austausches in MeOH nicht zugeordnet werden; außerdem können die ^{13}C -Signale des zweiten Konformers aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht zugeordnet werden)

Konformer 1:

1H -NMR (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 7.68 (dd, 1H, $J = 1.2, 1.0$ Hz, 21-H), 6.79 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 5-H), 6.65 (dd, 1H, $J = 15.2, 10.9$ Hz, 12-H), 6.40 (dd, 1H, $J = 1.9, 1.0$ Hz, 17-H), 6.28 (dd, 1H, $J = 1.9, 1.2$ Hz, 19-H), 6.09 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 13-H), 5.62 (dd, 1H, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 11-H), 4.55 (ddd, 1H, $J = 12.0, 9.9, 2.1$ Hz, 7-H), 3.60 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 10-H), 3.36 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.11 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, 15- H_b), 2.86 (ddq, 1H, $J = 9.9, 9.2, 6.7$ Hz, 6-H), 2.11 (dd, 1H, $J = 13.9, 2.1$ Hz, 8- H_a), 1.84 (s, 3H, 4-Me), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.50 (dd, 1H, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 8- H_b), 1.26 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ^{13}C -NMR (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 166.4 (s, COONH), 158.6 (s, C-18), 147.1 (s, C-4), 143.2 (s, C-16), 139.8 (s, C-14), 138.3 (s, C-20), 135.9 (d, C-5), 134.4 (d, C-12), 128.9 (d, C-13), 126.9 (d, C-11), 113.1 (d, C-17), 111.6 (d, C-21), 104.5 (d, C-19), 88.1 (d, C-10), 82.3 (s, C-9), 79.1 (d, C-7), 56.5 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.6 (d, C-6), 35.5 (t, C-8), 17.0 (q, C-6-Me), 17.0 (q, C-14-Me), 12.0 (q, C-4-Me) ppm;

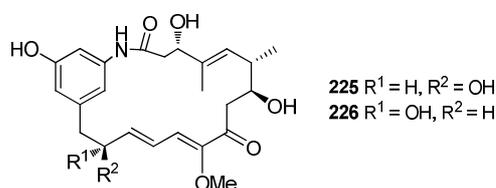
Konformer 2:

1H -NMR (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 6.65 (dd, 1H, $J = 15.5, 10.8$ Hz, 12-H), 6.58 (dd, 1H, $J = 1.2, 1.0$ Hz, arom.-H), 6.48 (dd, 1H, $J = 1.6, 1.0$ Hz, arom.-H), 6.28 (dd, 1H, $J = 1.6, 1.2$ Hz, arom.-H), 6.20 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, 5-H), 6.16 (d, 1H,

$J = 10.8$ Hz, 13-H), 5.53 (dd, 1H, $J = 15.5, 9.1$ Hz, 11-H), 4.13 (ddd, 1H, $J = 12.0, 10.5, 1.7$ Hz, 7-H), 3.61 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, 10-H), 3.44 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, 15-H_a), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, 10-OMe), 3.11 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, 15-H_b), 2.79-2.75 (m, 1H, 6-H), 1.70 (s, 3H, 4-Me), 1.69-1.66 (m, 1H, 8-H_a), 1.58 (s, 3H, 14-Me), 1.58-1.57 (m, 1H, 8-H_b), 1.32 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, 6-Me);

UPLC-MS $t_R = 2.15$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₆H₃₂N₂O₇Na [M+Na]⁺: 507.2107, gefunden: 507.2101.

Alkohol **225** und Alkohol **226**



Diastereomer 1:

1. semipräp. HPLC ($t_R = 53.92$ min)

UPLC-MS $t_R = 1.18$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₃NO₇Na [M+Na]⁺: 482.2155, gefunden: 482.2139.

Diastereomer 2:

1. semipräp. HPLC ($t_R = 57.55$ min)

UPLC-MS $t_R = 1.21$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₃NO₇Na [M+Na]⁺: 482.2155, gefunden: 482.2153.

Proansamitocin **31**

1. semipräp. HPLC ($t_R = 64.43$ min)

UPLC-MS $t_R = 1.42$ min (CH₃CN); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₃NO₆Na [M+Na]⁺: 466.2206, gefunden: 466.2206.

Konformer 2:

Die Signale des zweiten Konformers können aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht zugeordnet werden.

UPLC-MS $t_R = 2.24$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{26}H_{34}N_2NaO_7$ $[M+Na]^+$: 509.2264, gefunden: 509.2255.

10-*epi*-Proansamitocin 224

1. semipräp. HPLC ($t_R = 64.45$ min)

UPLC-MS $t_R = 1.98$ min (CH_3OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{25}H_{33}NO_6Na$ $[M+Na]^+$: 466.2206, gefunden: 466.2204.

Proansamitocin 31

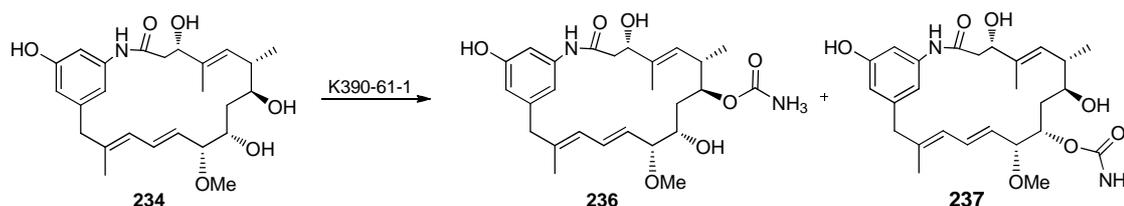
1. semipräp. HPLC ($t_R = 68.64$ min)

UPLC-MS $t_R = 2.18$ min (CH_3OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{25}H_{33}NO_6Na$ $[M+Na]^+$: 466.2206, gefunden: 466.2205.

Carbamoyliertes Proansamitocin 229

1. semipräp. HPLC ($t_R = 74.24$ min)

UPLC-MS $t_R = 2.20$ min (CH_3OH); **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{26}H_{34}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: 509.2264, gefunden: 509.2276.

Carbamoylierte Proansamitocine 236 und 237

Die Mutasynthese zu den carbamoylierten Proansamitocinen **236** und **237** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher 1,3-*anti*-Diol-Proansamitocin **234** (5 mg, 11.2 μ mol, 1 Äq.) in zwei 30 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus 60 mL Geldanamycin-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase; Gradient H_2O/CH_3OH 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) 3.9 mg C-7-carbamoyliertes Proansamitocin **236** ($t_R = 75.12$ min)

(8.0 μmol , 72 %) und C-9-carbamoyliertes Proansamitocin **237** ($t_{\text{R}} = 68.72 \text{ min}$) (Spuren) erhalten.

C-7-carbamoyliertes Proansamitocin **236**

Konformer 1.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31 \text{ ppm}$): δ 7.19 (s, 1H, 21-H), 6.56-6.46 (m, 1H, 12-H), 6.51 (s, 1H, 19-H), 6.41 (s, 1H, 17-H), 6.05 (d, 1H, $J = 10.8 \text{ Hz}$, 13-H), 5.61 (dd, 1H, $J = 15.1, 8.6 \text{ Hz}$, 11-H), 5.47-5.43 (m, 1H, 5-H), 4.81 (ps. t, 1H, $J = 9.1 \text{ Hz}$, 7-H), 4.31 (dd, 1H, $J = 6.3, 2.8 \text{ Hz}$, 3-H), 3.81 (dd, 1H, $J = 11.1, 2.2 \text{ Hz}$, 9-H), 3.57 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.2 \text{ Hz}$, 10-H), 3.34 (d, 1H, $J = 13.7 \text{ Hz}$, 15- H_a), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10-OMe), 3.12 (d, 1H, $J = 13.7 \text{ Hz}$, 15- H_b), 2.77-2.69 (m, 1H, 2- H_a), 2.77-2.69 (m, 1H, 6-H), 2.62 (dd, 1H, $J = 14.3, 2.8 \text{ Hz}$, 2- H_b), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.59 (s, 3H, 4-Me), 1.57-1.49 (m, 1H, 8- H_a), 1.26-1.21 (m, 1H, 8- H_b), 0.92 (d, 3H, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 6-Me); **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0 \text{ ppm}$): δ 171.8 (s, C-1), 160.3 (s, COONH), 158.5 (s, C-18), 143.4 (s, C-16), 140.7 (s, C-20), 139.4 (s, C-14), 138.4 (s, C-4), 132.6 (d, C-12), 128.4 (d, C-11), 128.2 (d, C-5), 128.0 (d, C-13), 113.1 (d, C-17), 112.6 (d, C-21), 105.5 (d, C-19), 87.4 (d, C-10), 76.2 (d, C-7), 74.4 (d, C-3), 71.1 (d, C-9), 56.6 (q, C-10-OMe), 46.5 (t, C-15), 42.0 (t, C-2), 37.8 (d, C-6), 35.9 (t, C-8), 17.7 (q, C-6-Me), 16.9 (q, C-14-Me), 13.6 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

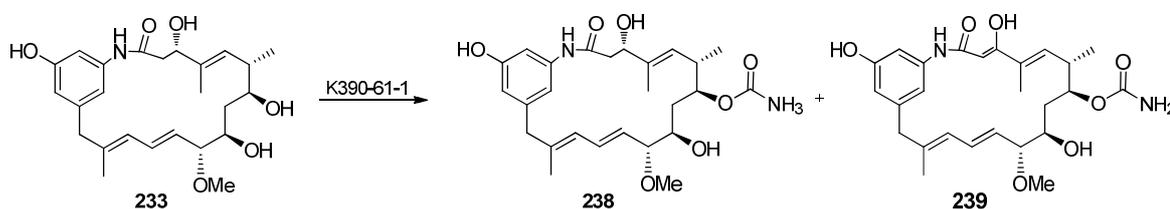
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31 \text{ ppm}$): δ 6.74 (s, 1H, 21-H), 6.56 (s, 1H, 17-H), 6.51-6.42 (m, 1H, 12-H), 6.42 (s, 1H, 19-H), 5.78 (d, 1H, $J = 10.7 \text{ Hz}$, 13-H), 5.47-5.43 (m, 1H, 11-H), 5.29 (d, 1H, $J = 9.7 \text{ Hz}$, 5-H), 4.68 (ps. t, 1H, $J = 10.5 \text{ Hz}$, 7-H), 4.38 (dd, 1H, $J = 6.4, 2.8 \text{ Hz}$, 3-H), 3.81 (dd, 1H, $J = 11.1, 2.2 \text{ Hz}$, 9-H), 3.46 (dd, 1H, $J = 9.6, 2.2 \text{ Hz}$, 10-H), 3.36 (d, 1H, $J = 13.7 \text{ Hz}$, 15- H_a), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.14 (d, 1H, $J = 13.7 \text{ Hz}$, 15- H_b), 2.53-2.48 (m, 1H, 6-H), 2.41-2.39 (m, 2H, 2-H), 1.78 (s, 3H, 14-Me), 1.57-1.49 (m, 1H, 8- H_a), 1.44 (s, 3H, 4-Me), 1.26-1.21 (m, 1H, 8- H_b), 0.96 (d, 3H, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 6-Me); **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 285 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0 \text{ ppm}$): δ 175.9 (s, C-1), 160.4 (s, COONH), 159.2 (s, C-18), 143.5 (s, C-16), 140.0 (s, C-20), 140.0 (s, C-14), 138.8 (s, C-4), 132.7 (d, C-12), 128.8 (d, C-11), 128.3 (d, C-5), 126.6 (d, C-13), 119.5 (d, C-21), 116.0 (d, C-17), 110.6 (d, C-19), 87.5 (d, C-10), 75.7 (d, C-7), 73.7 (d, C-3), 70.1 (d, C-9), 56.3 (q, C-10-OMe), 46.8 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 38.6 (t, C-2), 38.3 (t, C-8), 17.7 (q, C-6-Me), 17.0 (q, C-14-Me), 14.1 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 2.23$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für: $C_{26}H_{36}N_2NaO_7$ $[M+Na]^+$: 511.2420, gefunden: 511.2424.

C-9-carbamoyliertes Proansamitocin **237**

UPLC-MS $t_R = 2.09$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für: $C_{26}H_{36}N_2NaO_7$ $[M+Na]^+$: 511.2420, gefunden: 511.2411.

Carbamoylierte Proansamitocine **238** und **239**



Die Mutasynthese zu den carbamoylierten Proansamitocinen **238** und **239** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher 1,3-*syn*-Diol-Proansamitocin **233** (4 mg, 9.0 μ mol, 1 \AA q.) in einer 30 mL Kultur zugefüttert wird. Aus 30 mL Geldanamycin-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient H_2O/CH_3OH 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) 2.6 mg carbamoyliertes Proansamitocin **238** ($t_R = 70.16$ min) (2.6 mg, 5.4 μ mol, 60 %) und carbamoyliertes 2,3-Dehydro-Proansamitocin **239** ($t_R = 75.20$ min) (0.8 mg, 1.6 μ mol, 18 %) erhalten.

carbamoyliertes Proansamitocin **238**

Konformer 1:

1H -NMR (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 6.99 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.6$ Hz, 21-H), 6.57 (dd, 1H, $J = 14.9, 10.9$ Hz, 12-H), 6.51 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.8$ Hz, 19-H), 6.42 (dd, 1H, $J = 1.8, 1.6$ Hz, 17-H), 6.06 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 13-H), 5.55 (dd, 1H, $J = 14.9, 6.3$ Hz, 11-H), 5.40 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 5-H), 4.70 (ddd, 1H, $J = 7.0, 3.9, 3.5$ Hz, 7-H), 4.43 (dd, 1H, $J = 8.6, 5.8$ Hz, 3-H), 3.54-3.49 (m, 1H, 9-H), 3.54-3.59 (m, 1H, 10-H), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10-OMe), 3.27-3.22 (m, 2H, 15-H), 2.74 (ddt, 1H, $J = 8.4, 6.8, 3.9$ Hz, 6-H), 2.58-2.56 (m, 2H, 2-H), 1.93 (ddd, 1H, $J = 15.0, 3.5, 3.4$ Hz, 8- H_a), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.63

(s, 3H, 4-Me), 1.51 (ddd, 1H, $J = 15.0, 7.0, 6.7$ Hz, 8-H_b), 0.70 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 171.0 (s, C-1), 159.9 (s, COONH), 158.5 (s, C-18), 143.2 (s, C-16), 140.2 (s, C-20), 139.8 (s, C-14), 137.7 (s, C-4), 131.8 (d, C-12), 129.8 (d, C-11), 128.5 (d, C-5), 127.7 (d, C-13), 113.6 (d, C-17), 113.5 (d, C-21), 106.3 (d, C-19), 86.9 (d, C-10), 77.4 (d, C-7), 75.9 (d, C-3), 74.5 (d, C-9), 56.8 (q, C-10-OMe), 46.7 (t, C-15), 44.3 (t, C-2), 37.3 (d, C-6), 35.7 (t, C-8), 16.84 (q, C-14-Me), 16.78 (q, C-6-Me), 11.3 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.67 (s, 1H, 17-H), 6.60-6.53 (m, 1H, 12-H), 6.60-6.53 (m, 1H, 21-H), 6.51 (s, 1H, 19-H), 6.06 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, 13-H), 5.45 (dd, 1H, $J = 15.0, 9.4$ Hz, 11-H), 5.07 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 5-H), 4.68 (ddd, 1H, $J = 11.4, 9.0, 2.4$ Hz, 7-H), 4.02 (dd, 1H, $J = 7.9, 5.6$ Hz, 3-H), 3.54-3.49 (m, 1H, 9-H), 3.46 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz, 15-H_a), 3.35-3.31 (m, 1H, 10-H), 3.25 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz, 15-H_b), 2.62-2.60 (m, 1H, 2-H_a), 2.48-2.43 (m, 1H, 6-H), 2.29 (dd, 1H, $J = 12.7, 7.9$ Hz, 2-H_b), 1.81 (dd, 1H, $J = 14.3, 7.4, 2.4$ Hz, 8-H_a), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.60 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (ddd, 1H, $J = 14.3, 11.4, 3.3$ Hz, 8-H_b), 0.91 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 285 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 174.1 (s, C-1), 160.4 (s, COONH), 159.6 (s, C-18), 143.5 (s, C-16), 141.4 (s, C-14), 139.6 (s, C-20), 137.7 (s, C-4), 133.5 (d, C-12), 130.1 (d, C-5), 129.4 (d, C-11), 126.3 (d, C-13), 120.5 (d, C-21), 117.1 (d, C-17), 112.9 (d, C-19), 90.5 (d, C-10), 77.2 (d, C-7), 74.6 (d, C-3), 72.0 (d, C-9), 56.3 (q, C-10-OMe), 46.9 (t, C-15), 41.1 (d, C-2), 39.9 (t, C-6), 39.2 (t, C-8), 17.5 (q, C-6-Me), 16.5 (q, C-14-Me), 11.6 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 1.99$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für: C₂₆H₃₆N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 511.2420, gefunden: 511.2426.

carbamoyliertes 2,3-Dehydro Proansamitocin **239**

Konformer 1:

(Die Signale von C-1, C-2 und C-3 sowie das Signal von 2-H können aufgrund des Austausches in Methanol-d₄ nicht zugeordnet werden.)

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.54 (dd, 1H, $J = 1.5, 1.2$ Hz, 21-H), 6.88 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, 5-H), 6.52 (dd, 1H, $J = 15.3, 11.0$ Hz, 12-H), 6.40 (dd, 1H, $J = 1.2, 0.9$ Hz, 19-H), 6.37 (dd, 1H, $J = 1.5, 0.9$ Hz, 17-H), 6.08 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz,

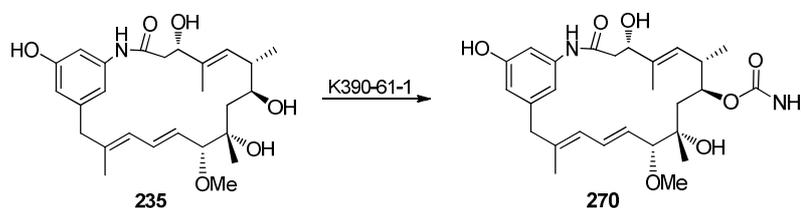
13-H), 5.62 (dd, 1H, $J = 15.3, 6.9$ Hz, 11-H), 4.87 (unter H_2O , 1H, 7-H), 3.77 (ddd, 1H, $J = 6.8, 6.5, 3.9$ Hz, 9-H), 3.58 (dd, 1H, $J = 6.9, 6.8$ Hz, 10-H), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10 OMe), 3.23 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, 15- H_a), 3.23 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, 15- H_b), 3.12 (ddq, 1H, $J = 10.1, 7.2, 6.9$ Hz, 6-H), 1.95 (ddd, 1H, $J = 15.1, 6.5, 3.1$ Hz, 8- H_a), 1.78 (s, 3H, 4-Me), 1.75-1.72 (m, 1H, 8- H_b), 1.67 (s, 3H, 14-Me), 1.08 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, 6-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.0$ ppm): δ 158.6 (s, COONH), 155.6 (s, C-18), 148.8 (d, C-5), 143.3 (s, C-16), 140.5 (s, C-20), 138.8 (s, C-4), 138.2 (s, C-4), 130.9 (d, C-12), 129.3 (d, C-11), 128.8 (d, C-13), 113.3 (d, C-17), 112.7 (d, C-21), 105.0 (d, C-19), 85.9 (d, C-10), 76.6 (d, C-7), 73.0 (d, C-9), 56.8 (q, C-10-OMe), 46.2 (t, C-15), 39.4 (d, C-6), 32.9 (t, C-8), 17.0 (q, C-14-Me), 16.7 (q, C-6-Me), 11.8 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2

Die Signale des zweiten Konformers können aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht zugeordnet werden.

UPLC-MS $t_R = 2.13$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 509.2264 gefunden: 509.2248.

carbamoyliertes 9-Methyl-proansamitocin **270**



Die Mutasynthese zum carbamoylierten 9-Methyl-proansamitocin **270** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher 9-Methyl-proansamitocin **235** (1.5 mg, 3.3 μmol , 1 Äq.) zu einer 30 mL Kulturen gefüttert wird. Aus 30 mL Geldanamycin-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) carbamoyliertes 9-Methyl-proansamitocin **270** ($t_R = 74.45$ min) (1.2 mg, 2.5 μmol , 75 %) erhalten.

carbamoyliertes 9-Methyl-proansamitocin **270***Konformer 1:*

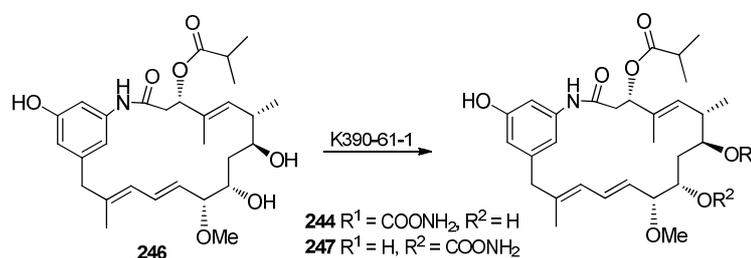
¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.09 (s, 1H, 21-H), 6.57 (dd, 1H, J = 15.9, 10.6 Hz, 12-H), 6.41 (s, 1H, 19-H), 6.36 (s, 1H, 17-H), 6.04 (d, 1H, J = 10.6 Hz, 13-H), 5.61 (dd, 1H, J = 15.9, 8.2 Hz, 11-H), 5.48 (d, 1H, J = 8.7 Hz, 5-H), 4.96 (dd, 1H, J = 8.7, 4.4 Hz, 7-H), 4.48 (dd, 1H, J = 10.1, 3.1 Hz, 3-H), 3.42 (d, 1H, J = 8.2 Hz, 10-H), 3.35-3.23 (m, 2H, 15-H), 3.32 (s, 3H, 10-OMe), 2.86 (dq, 1H, J = 8.7, 6.9, 4.4 Hz, 6-H), 2.66 (dd, 1H, J = 13.7, 10.1 Hz, 2-H_a), 2.55 (dd, 1H, J = 13.7, 3.1 Hz, 2-H_b), 1.79 (s, 3H, 14-Me), 1.79-1.75 (m, 1H, 8-H_a), 1.63 (s, 3H, 4-Me), 1.44 (dd, 1H, J = 15.3, 8.7 Hz, 8-H_b), 1.24 (s, 3H, 9-Me), 0.79 (d, 3H, J = 6.9 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 171.0 (s, C-1), 159.8 (s, COONH), 158.6 (s, C-18), 143.4 (s, C-16), 140.3 (s, C-20), 138.7 (s, C-14), 138.0 (s, C-4), 132.4 (d, C-12), 129.9 (d, C-11), 128.5 (d, C-13), 128.4 (d, C-5), 113.5 (d, C-17), 113.3 (d, C-21), 106.1 (d, C-19), 90.0 (d, C-10), 75.8 (d, C-3), 75.3 (d, C-7), 74.3 (s, C-9), 57.2 (q, C-10-OMe), 46.2 (t, C-15), 43.3 (t, C-2), 37.4 (d, C-8), 37.2 (t, C-6), 24.5 (q, C-9-Me), 17.6 (q, C-6-Me), 17.3 (q, C-14-Me), 10.9 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.78 (s, 1H, 21-H), 6.54 (s, 1H, 17-H), 6.44-6.39 (m, 1H, 12-H), 6.43 (s, 1H, 19-H), 5.64 (d, 1H, J = 11.0 Hz, 13-H), 5.37 (dd, 1H, J = 15.3, 9.0 Hz, 11-H), 5.21 (d, 1H, J = 9.7 Hz, 5-H), 4.82 (dd, 1H, J = 10.0, 9.5 Hz, 7-H), 4.45- 4.43 (m, 1H, 3-H), 3.20 (d, 1H, J = 9.0 Hz, 10-H), 3.35-3.23 (m, 2H, 15-H), 3.18 (s, 3H, 10-OMe), 2.58-2.52 (m, 1H, 2-H_a), 2.52-2.46 (m, 1H, 6-H), 2.33 (dd, 1H, J = 14.5, 2.0 Hz, 2-H_b), 1.81 (s, 3H, 14-Me), 1.68-1.65 (m, 1H, 8-H_a), 1.45 (s, 3H, 4-Me), 1.33-1.27 (m, 1H, 8-H_b), 1.20 (s, 3H, 9-Me), 0.92 (d, 3H, J = 6.6 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 285 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 178.0 (s, C-1), 160.0 (s, COONH), 159.4 (s, C-18), 143.1 (s, C-16), 139.9 (s, C-20), 139.7 (s, C-14), 138.9 (s, C-4), 132.7 (d, C-12), 130.1 (d, C-11), 128.3 (d, C-5), 127.0 (d, C-13), 120.0 (d, C-21), 116.1 (d, C-17), 110.9 (d, C-19), 90.0 (d, C-10), 74.6 (d, C-7), 74.3 (s, C-9), 73.9 (d, C-3), 56.7 (q, C-10-OMe), 46.6 (t, C-15), 41.8 (t, C-8), 39.8 (d, C-6), 39.0 (t, C-2), 22.6 (q, C-9-Me), 17.3 (q, C-14-Me), 13.6 (q, C-6-Me), 12.2 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS t_R = 2.07 min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₇H₃₈N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 525.2577, gefunden: 525.2578.

C-7-Carbamoyliertes-3-O-isobutyryl-proansamitocin 244 und C-9-Carbamoyliertes-3-O-isobutyryl-proansamitocin 247



Die Mutasynthese zum C-7-Carbamoylierten-3-O-isobutyryl-proansamitocin **244** und C-9-Carbamoylierte-3-O-isobutyryl-proansamitocin **247** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante K390-61-1, welcher 3-O-Isobutyryl-proansamitocin **246** (8.0 mg, 15.5 μmol , 1 Äq.) in zwei 30 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus 60 mL Geldanamycin-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über 1. semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 mL/min) und eine 2. semipräp. HPLC (CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 60/40 in 70 min, dann 60/40 \rightarrow 40/60 in 10 min, dann 10 min 40/60 halten; Fluss 2.25 mL/min) werden C-7-Carbamoyl-3-O-isobutyryl-proansamitocin **244** (t_{R} (C-18) = 67.70 min; t_{R} (CN) = 49.17 min) (1.2 mg, 2.1 μmol , 14 %) und C-9-Carbamoyliertes-3-O-isobutyryl-proansamitocin **247** ((C-18) = 63.17 min; t_{R} (CN) = 46.59 min) (1.1 mg, 2.0 μmol , 13 %) erhalten.

C-7-carbamoyliertes-3-O-isobutyryl-proansamitocin 244

Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.33 (s, 1H, 21-H), 6.57-6.54 (m, 1H, 12-H), 6.39 (s, 1H, 17-H), 6.38 (s, 1H, 19-H), 6.01 (d, 1H, J = 10.9 Hz, 13-H), 5.57 (dd, 1H, J = 15.3, 7.8 Hz, 11-H), 5.38-5.36 (m, 1H, 3-H), 5.38-5.36 (m, 1H, 5-H), 4.83 (ddd, 1H, J = 9.8, 7.2, 1.7 Hz, 7-H), 3.79-3.77 (m, 1H, 9-H), 3.67 (dd, 1H, J = 7.8, 1.8 Hz, 10-H), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 15- H_a), 3.21 (d, 1H, J = 14.7 Hz, 15- H_b), 2.82-2.75 (m, 1H, 6-H), 2.75-2.73 (m, 2H, 2-H), 2.60 (sep, 1H, J = 7.0 Hz, Acyl-H), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.67 (s, 3H, 4-Me), 1.60-1.55 (m, 1H, 8- H_a), 1.51-1.46 (m, 1H, 8- H_b), 1.16 (d, 6H, J = 7.0 Hz, Acyl), 0.88 (d, 3H, J = 6.8 Hz, 6-Me); **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.0 ppm): δ 177.5 (s, C-Acyl), 169.5 (s, C-1), 160.3 (s,

COONH), 159.1 (s, C-18), 143.2 (s, C-16), 140.6 (s, C-20), 138.7 (s, C-14), 134.9 (s, C-4), 131.7 (d, C-12), 128.6 (d, C-11), 128.5 (d, C-13), 126.2 (d, C-5), 113.4 (d, C-21), 112.5 (d, C-17), 105.4 (d, C-19), 87.0 (d, C-10), 76.0 (d, C-7), 75.1 (d, C-3), 71.2 (d, C-9), 56.9 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.7 (t, C-2), 37.6 (d, C-6), 35.3 (d, Acyl), 34.5 (t, C-8), 19.4 (q, 2xAcyl), 17.7 (q, C-6-Me), 17.2 (q, C-14-Me), 14.6 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.57 (s, 1H, arom.-H), 6.52 (s, 1H, arom.-H), 6.46-6.43 (m, 1H, 12-H), 6.39 (s, 1H, arom.-H), 5.74 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, 13-H), 5.34 (dd, 1H, $J = 15.9, 9.0$ Hz, 11-H), 5.38-5.36 (m, 1H, 3-H), 5.12-5.09 (m, 1H, 5-H), 4.64 (dd, 1H, $J = 11.7, 9.5, 1.0$ Hz, 7-H), 3.79-3.77 (m, 1H, 9-H), 3.48 (dd, 1H, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 10-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 15-H_a), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.16 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz, 15-H_b), 2.73-2.66 (m, 1H, 2-H_a), 2.60 (sep., 1H, $J = 7.0$ Hz, Acyl-H), 2.56-2.48 (m, 1H, 2-H_b), 2.56-2.48 (m, 1H, 6-H), 1.84 (s, 3H, 14-Me), 1.47 (s, 3H, 4-Me), 1.40-1.33 (m, 1H, 8-H_a), 1.33-1.24 (m, 1H, 8-H_b), 1.16 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, Acyl), 0.88 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.5 (s, C-Acyl), 170.3 (s, C-1), 160.3 (s, COONH), 159.1 (s, C-18), 143.5 (s, C-16), 140.8 (s, C-14), 139.8 (s, C-20), 135.4 (s, C-4), 132.4 (d, C-12), 128.7 (d, C-11), 128.2 (d, C-5), 126.2 (d, C-13), 118.2 (d, C-arom.), 116.9 (d, C-arom.), 111.5 (d, C-arom.), 87.2 (d, C-10), 75.4 (d, C-7), 74.7 (d, C-3), 69.8 (d, C-9), 56.5 (q, C-10-OMe), 46.4 (t, C-15), 39.0 (t, C-6), 37.9 (d, C-8), 37.5 (t, C-2), 35.3 (d, Acyl), 19.6 (q, 2xAcyl), 17.6 (q, C-6-Me), 17.4 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 2.29$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₂N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 581.2839, gefunden: 581.2838.

C-9-Carbamoyliertes-3-*O*-isobutyryl-proansamitocin **247**

Konformer 1:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.38 (s, 1H, 21-H), 6.58 (dd, 1H, $J = 15.1, 11.2$ Hz, 12-H), 6.42 (s, 1H, 19-H), 6.41 (s, 1H, 17-H), 6.03 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, 13-H), 5.62 (dd, 1H, $J = 15.1, 7.0$ Hz, 11-H), 5.39 (dd, 1H, $J = 11.3, 5.9$ Hz, 3-H), 5.31 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, 5-H), 5.19-5.16 (m, 1H, 9-H), 3.93 (dd, 1H, $J = 7.0, 1.5$ Hz, 10-H), 3.49-3.46 (m, 1H, 7-H), 3.38 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 15-H_a), 3.31-3.25 (m, 1H, 15-H_b), 2.77-2.75 (m, 2H, 2-H), 2.65-2.62 (m, 1H, 6-H), 2.59 (sep., 1H,

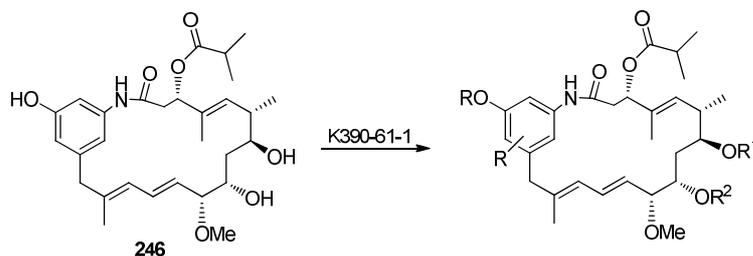
$J = 6.8$ Hz, Acyl-H), 1.81-1.78 (m, 1H, 8-H_a), 1.75 (s, 3H, 14-Me), 1.71 (s, 3H, 4-Me), 1.40-1.35 (m, 1H, 8-H_b), 1.15 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, Acyl), 0.91 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.5 (s, C-Acyl), 169.7 (s, C-1), 160.2 (s, COONH), 158.9 (s, C-18), 143.2 (s, C-16), 140.7 (s, C-20), 138.8 (s, C-14), 135.1 (s, C-4), 131.1 (d, C-12), 128.5 (d, C-11), 128.5 (d, C-13), 127.5 (d, C-5), 113.3 (d, C-aromat.), 112.3 (d, C-21), 105.2 (d, C-aromat.), 85.1 (d, C-10), 74.5 (d, C-3), 74.3 (d, C-9), 73.2 (d, C-7), 57.5 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.5 (t, C-2), 39.9 (d, C-6), 35.4 (d, Acyl), 34.1 (t, C-8), 19.5 (q, Acyl), 19.3 (q, Acyl), 18.2 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.58 (s, 1H, arom.-H), 6.53 (s, 1H, arom.-H), 6.48 (dd, 1H, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 12-H), 6.42 (s, 1H, arom.-H), 5.73 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, 13-H), 5.48 (dd, 1H, $J = 15.1, 8.8$ Hz, 11-H), 5.43 (dd, 1H, $J = 11.4, 6.0$ Hz, 3-H), 5.32-5.30 (m, 1H, 9-H), 4.87 (unter H₂O, 1H, 5-H), 3.62 (dd, 1H, $J = 8.8, 1.4$ Hz, 10-H), 3.28 (s, 3H, 10-OMe), 3.25-3.21 (m, 2H, 15-H), 3.07 (dd, 1H, $J = 10.5, 9.7$ Hz, 7-H), 2.73-2.70 (m, 1H, 2-H_a), 2.60 (sep., 1H, $J = 6.7$ Hz, Acyl-H), 2.46 (dd, 1H, $J = 15.3, 11.4$ Hz, 2-H_b), 2.26-2.21 (m, 1H, 6-H), 1.86 (s, 3H, 14-Me), 1.50-1.45 (m, 1H, 8-H_a), 1.47 (s, 3H, 4-Me), 1.19 (d, 6H, $J = 6.7$ Hz, Acyl), 1.07 (dd, 1H, $J = 14.4, 10.5$ Hz, 8-H_b), 0.95 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.4 (s, C-Acyl), 169.7 (s, C-1), 160.2 (s, COONH), 158.9 (s, C-18), 143.4 (s, C-16), 141.7 (s, C-20), 141.4 (s, C-14), 134.4 (s, C-4), 132.7 (d, C-12), 129.7 (d, C-5), 128.6 (d, C-11), 126.0 (d, C-13), 118.2 (d, C-aromat.), 117.4 (d, C-arom.), 111.3 (d, C-aromat.), 86.2 (d, C-10), 74.7 (d, C-3), 72.4 (d, C-7), 72.2 (d, C-9), 56.5 (q, C-10-OMe), 46.4 (t, C-15), 40.7 (d, C-6), 38.6 (t, C-8), 37.6 (t, C-2), 35.3 (d, Acyl), 19.6 (q, Acyl), 19.5 (q, Acyl), 18.1 (q, C-6-Me), 17.5 (q, C-14-Me), 14.7 (q, C-4-Me) ppm;

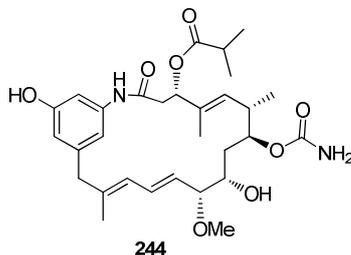
UPLC-MS $t_R = 2.23$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₂N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 581.2839, gefunden: 581.2849.

Mutasynthese von 3-*O*-Isobutyryl-proansamitocin **246**



Die Mutasynthese von 3-*O*-Isobutyryl-proansamitocin **246** erfolgt nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante HGF 073, welcher 3-*O*-Isobutyryl-proansamitocin **246** (13.0 mg, 25.2 μmol , 1 Äq.) in drei 30 mL Kulturen zugefüttert wird. Aus 90 mL Korea-Fermentationsmedium werden hierbei nach Reinigung über semipräp. HPLC (siehe unten) folgende Derivate isoliert:

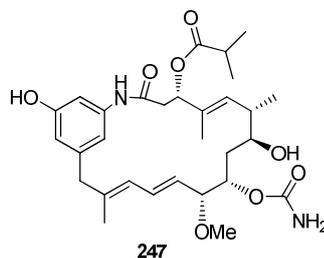
C-7-Carbamoyliertes-3-*O*-Isobutyryl-proansamitocin **244**



3.2 mg (5.7 μmol , 22 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 67.60 min); b) CN-Phase, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 60/40 in 70 min, dann 60/40 \rightarrow 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 49.17 min).

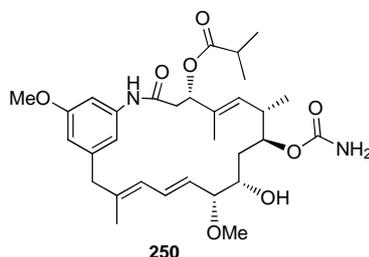
Analytik siehe vorheriger Mutasyntheseversuch.

C-9-Carbamoyliertes-3-O-isobutyryl-proansamitocin **247**

1.3 mg (2.3 μmol , 9 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 63.17 min); b) CN-Phase, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 90/10 \rightarrow 60/40 in 70 min, dann 60/40 \rightarrow 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 46.59 min).

Analytik siehe vorheriger Mutasyntheseversuch.

C-7-Carbamoyliertes Proansamitocin-Derivat **250**

2.5 mg (4.4 μmol , 18 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 75.49 min); b) CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 40/60 in 70 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 10 min, dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 47.98 min)

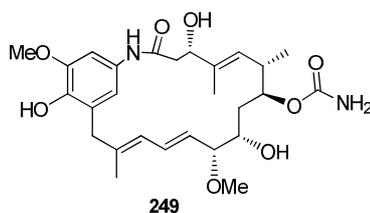
Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.47 (s, 1H, 21-H), 6.55 (dd, 1H, J = 13.8, 11.5 Hz, 12-H), 6.54 (s, 1H, 17-H), 6.49 (s, 1H, 19-H), 6.02 (d, 1H, J = 11.5 Hz, 13-H), 5.58 (dd, 1H, J = 14.5, 7.7 Hz, 11-H), 5.40-5.37 (m, 1H, 3-H), 5.40-5.37

(m, 1H, 5-H), 4.85-4.82 (m, 1H, 7-H), 3.79-3.76 (m, 1H, 9-H), 3.79 (s, 3H, 18-OMe), 3.67 (dd, 1H, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 10-H), 3.37-3.33 (m, 1H, 15-H_a), 3.33 (m, 3H, 10-OMe), 3.31-3.27 (m, 1H, 15-H_b), 2.77-2.70 (m, 2H, 2-H), 2.77-2.70 (m, 1H, 6-H), 2.60 (sep, 1H, $J = 7.0$ Hz, Acyl-H), 1.75 (s, 3H, 14-Me), 1.67 (s, 3H, 4-Me), 1.60-1.55 (m, 1H, 8-H_a), 1.51-1.48 (m, 1H, 8-H_b), 1.16 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, Acyl), 0.88 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.4 (s, C-Acyl), 169.6 (s, C-1), 161.2 (s, C-18), 160.3 (s, COONH), 143.5 (s, C-16), 140.6 (s, C-20), 138.5 (s, C-14), 134.9 (s, C-4), 131.6 (d, C-12), 128.8 (d, C-13), 128.7 (d, C-11), 127.8 (d, C-5), 113.7 (d, C-21), 111.8 (d, C-17), 103.7 (d, C-19), 87.0 (d, C-10), 76.0 (d, C-7), 75.0 (d, C-3), 71.2 (d, C-9), 57.0 (q, C-10-OMe), 55.6 (q, C-18-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.7 (t, C-2), 37.6 (d, C-6), 35.3 (d, Acyl), 34.5 (t, C-8), 19.4 (q, 2xAcyl), 17.7 (q, C-6-Me), 17.2 (q, C-14-Me), 14.6 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.73 (s, 1H, arom.-H), 6.71 (s, 1H, arom.-H), 6.54 (s, 1H, arom.-H), 6.44 (dd, 1H, $J = 14.3, 12.0$ Hz, 12-H), 5.71 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, 13-H), 5.48-5.43 (m, 1H, 11-H), 5.39-5.37 (m, 1H, 3-H), 5.11 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, 5-H), 4.66-4.62 (m, 1H, 7-H), 3.81 (s, 3H, 18-OMe), 3.80-3.79 (m, 1H, 9-H), 3.49-3.47 (m, 1H, 10-H), 3.42-3.38 (m, 1H, 15-H_a), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.26-3.22 (m, 1H, 15-H_b), 2.73-2.70 (m, 2H, 2-H), 2.60 (sep., 1H, $J = 6.8$ Hz, Acyl-H), 2.54-2.49 (m, 1H, 6-H), 1.84 (s, 3H, 14-Me), 1.48 (s, 3H, 4-Me), 1.38-1.33 (m, 1H, 8-H_a), 1.25-1.20 (m, 1H, 8-H_b), 1.16 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, Acyl), 0.88 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.4 (s, C-Acyl), 170.3 (s, C-1), 161.6 (s, C-18), 160.3 (s, COONH), 143.8 (s, C-16), 140.5 (s, C-20), 138.5 (s, C-14), 135.2 (s, C-4), 132.4 (d, C-12), 128.9 (d, C-11), 128.3 (d, C-5), 126.3 (d, C-13), 120.1 (d, C-arom.), 114.9 (d, C-arom.), 109.1 (d, C-arom.), 87.2 (d, C-10), 75.4 (d, C-7), 74.6 (d, C-3), 69.7 (d, C-9), 56.5 (q, C-10-OMe), 55.8 (q, C-18-OMe), 46.3 (t, C-15), 39.1 (t, C-2), 38.1 (d, C-8), 37.5 (t, C-6), 35.3 (d, Acyl), 19.6 (q, 2xAcyl), 17.7 (q, C-6-Me), 17.6 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 2.54$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₁H₄₄N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 595.2995, gefunden: 595.3005.

C-7-Carbamoyliertes Proansamitocin-Derivat **249**

1.1 mg (2.1 μmol , 8 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min, dann 10 min 100 CH_3OH ; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 62.85 min); b) CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 90/10 \rightarrow 40/60 in 70 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 10 min, dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 37.02 min); c) C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 90/10 \rightarrow 60/40 in 70 min, dann 60/40 \rightarrow 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_{R} = 65.17 min).

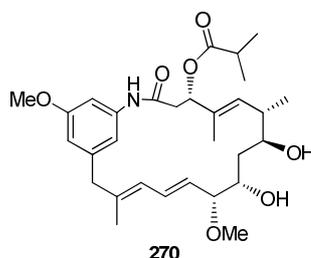
Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.08 (d, 1H, J = 2.1 Hz, 21-H), 6.64 (d, 1H, J = 2.1 Hz, 19-H), 6.55 (dd, 1H, J = 15.3, 10.9 Hz, 12-H), 6.03 (d, 1H, J = 10.9 Hz, 13-H), 5.59 (dd, 1H, J = 15.3, 8.9 Hz, 11-H), 5.47 (d, 1H, J = 8.6 Hz, 5-H), 4.83-4.79 (m, 1H, 7-H), 4.36 (dd, 1H, J = 8.3, 2.5 Hz, 3-H), 3.83 (s, 3H, 18-OMe), 3.83-3.79 (m, 1H, 9-H), 3.58 (dd, 1H, J = 8.9, 2.4 Hz, 10-H), 3.45 (d, 1H, J = 15.4 Hz, 15- H_a), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10-OMe), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 15- H_b), 2.75 (ddq, 1H, J = 8.6, 8.5, 7.0 Hz, 6-H), 2.69 (dd, 1H, J = 14.5, 8.3 Hz, 2- H_a), 2.58 (dd, 1H, J = 14.5, 2.5 Hz, 2- H_a), 1.76 (s, 3H, 14-Me), 1.61 (s, 3H, 4-Me), 1.55-1.50 (m, 1H, 8- H_a), 1.47-1.44 (m, 1H, 8- H_b), 0.89 (d, 3H, J = 7.0 Hz, 6-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.0 ppm): δ 170.3 (s, C-1), 161.6 (s, COONH), 149.0 (s, C-18), 142.1 (s, C-17), 139.5 (s, C-14), 138.6 (s, C-4), 132.8 (d, C-12), 131.1 (s, C-20), 128.2 (d, C-13), 128.2 (d, C-5), 128.1 (d, C-11), 127.6 (s, C-16), 115.0 (d, C-21), 103.72 (d, C-19), 87.4 (d, C-10), 76.0 (d, C-7), 74.8 (d, C-3), 70.9 (d, C-9), 56.6 (q, C-10-OMe), 56.3 (q, C-18-OMe), 42.0 (t, C-2), 39.0 (t, C-15), 37.5 (d, C-6), 30.8 (t, C-8), 17.7 (q, C-6-Me), 17.2 (q, C-14-Me), 14.1 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.74 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, 21-H), 6.62 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, 19-H), 6.42 (dd, 1H, *J* = 15.0, 10.9 Hz, 12-H), 5.69 (d, 1H, *J* = 10.8 Hz, 13-H), 5.39 (dd, 1H, *J* = 15.0, 9.0 Hz, 11-H), 5.27 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 4.70-4.66 (m, 1H, 7-H), 4.39 (dd, 1H, *J* = 3.9, 0.3 Hz, 3-H), 3.87 (s, 3H, 18-OMe), 3.80-3.78 (m, 1H, 9-H), 3.48 (d, 1H, *J* = 14.5 Hz, 15-H_a), 3.46-3.43 (m, 1H, 10-H), 3.26 (s, 3H, 10-OMe), 3.19 (d, 1H, *J* = 14.5 Hz, 15-H_b), 2.51 (ddq, 1H, *J* = 8.7, 6.8, 6.5 Hz, 6-H), 2.35-2.31 (m, 2H, 2-H), 1.79 (s, 3H, 14-Me), 1.52-1.50 (m, 1H, 8-H_a), 1.41 (s, 3H, 4-Me), 1.25-1.20 (m, 1H, 8-H_b), 0.95 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 170.3 (s, C-1), 161.6 (s, COONH), 150.3 (s, C-18), 144.4 (s, C-17), 140.3 (s, C-14), 138.9 (s, C-4), 132.8 (d, C-12), 129.9 (s, C-20), 128.2 (d, C-5), 128.1 (d, C-11), 127.3 (s, C-16), 125.7 (d, C-13), 122.9 (d, C-21), 108.2 (d, C-19), 87.5 (d, C-10), 75.7 (d, C-7), 73.7 (d, C-3), 70.1 (d, C-9), 56.4 (q, C-18-OMe), 56.3 (q, C-10-OMe), 39.3 (d, C-6), 39.1 (t, C-15), 38.4 (t, C-2), 37.8 (t, C-8), 17.6 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 13.0 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS *t_R* = 2.10 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₇H₃₈N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 541.2526, gefunden: 541.2515.

3-*O*-Isobuturyl Proansamitocin-Derivat **271**

0.5 mg (0.9 μmol, 4 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃OH 90/10 → 100 CH₃OH in 80 min, dann 10 min 100 CH₃OH; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 75.25 min); b) CN-Phase, Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 40/60 in 70 min, dann 40/60 → 20/80 in 10 min, dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 43.00 min).

Konformer 1:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.53 (s, 1H, 21-H), 6.55 (dd, 1H, *J* = 14.7, 11.5 Hz, 12-H), 6.54 (s, 1H, 17-H), 6.48 (s, 1H, 19-H), 6.04 (d, 1H,

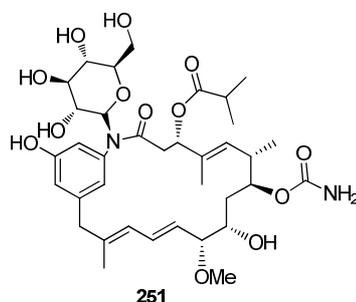
$J = 11.5$ Hz, 13-H), 5.62 (dd, 1H, $J = 14.7, 8.0$ Hz, 11-H), 5.36 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 3-H), 5.32 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 5-H), 4.10-4.08 (m, 1H, 9-H), 3.76 (s, 3H, 18-OMe), 3.65 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 10-H), 3.60-3.57 (m, 1H, 7-H), 3.41-3.36 (m, 1H, 15-H_a), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, 10-OMe), 3.25-3.20 (m, 1H, 15-H_b), 2.79 (dd, 1H, $J = 14.1, 2.4$ Hz, 2-H_a), 2.72 (dd, 1H, $J = 14.1, 8.9$ Hz, 2-H_b), 2.59 (sep, 1H, $J = 7.0$ Hz, Acyl-H), 2.54-2.47 (m, 1H, 6-H), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.68 (s, 3H, 4-Me), 1.56-1.51 (m, 1H, 8-H_a), 1.24-1.18 (m, 1H, 8-H_b), 1.15 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, Acyl), 0.92 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.73 (s, 1H, aromat.-H), 6.72 (s, 1H, aromat.-H), 6.52 (s, 1H, aromat.-H), 6.43 (dd, 1H, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 12-H), 5.72 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, 13-H), 5.46 (dd, 1H, $J = 15.1, 8.0$ Hz, 11-H), 5.40 (dd, 1H, $J = 13.5, 1.8$ Hz, 3-H), 5.11-5.06 (m, 1H, 5-H), 4.10-4.08 (m, 1H, 9-H), 3.81 (s, 3H, 18-OMe), 3.39-3.36 (m, 1H, 10-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 7-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 15-H_a), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 10-OMe), 3.26-3.22 (m, 1H, 15-H_b), 2.72-2.70 (m, 1H, 2-H_a), 2.59 (sep, 1H, $J = 7.0$ Hz, Acyl-H), 2.49-2.47 (m, 1H, 2-H_b), 2.21-2.16 (m, 1H, 6-H), 1.84 (s, 3H, 14-Me), 1.45 (s, 3H, 4-Me), 1.31-1.29 (m, 1H, 8-H_a), 1.15 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, Acyl), 0.96-0.94 (m, 1H, 8-H_b), 0.94 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

UPLC-MS $t_R = 2.55$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₀H₄₃NNaO₇ [M+Na]⁺: 552.2937, gefunden: 552.3927.

N-Glycosyliertes Proansamitocin-Derivat **251**



0.8 mg (1.1 μ mol, 4 %)

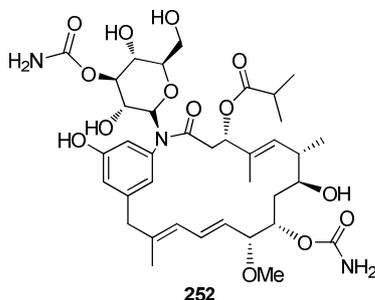
semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃OH 90/10 → 100 CH₃OH in 80 min, dann 10 min 100 CH₃OH; Fluss 2.25 mL/min; ($t_R = 56.93$ min); b) CN-Phase,

Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 22.51 min); c) C-18-Phase, Gradient H₂O/ CH₃CN = 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 61.59 min).

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.90 (dd, 1H, *J* = 2.0, 0.7 Hz, arom.-H), 6.85 (dd, 1H, *J* = 1.2, 0.7 Hz, arom.-H), 6.77 (dd, 1H, *J* = 2.0, 1.2 Hz, arom.-H), 6.40 (dd, 1H, *J* = 15.3, 10.9 Hz, 12-H), 6.05 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz, 13-H), 5.65 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, 1-H'), 5.49 (dd, 1H, *J* = 15.3, 8.2 Hz, 11-H), 5.31 (dd, 1H, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 3-H), 5.18 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 4.59 (ddd, 1H, *J* = 10.4, 10.0, 3.1 Hz, 7-H), 4.30 (dd, 1H, *J* = 9.7, 6.2 Hz, 4-H'), 3.76 (ddd, 1H, *J* = 10.6, 3.6, 1.2 Hz, 9-H), 3.66 (dd, 1H, *J* = 10.2, 1.9 Hz, CH_{2a}'), 3.59 (dd, 1H, *J* = 10.2, 5.9 Hz, CH_{2b}'), 3.57 (dd, 1H, *J* = 9.7, 6.0 Hz, 3-H'), 3.52 (dd, 1H, *J* = 6.2, 5.9, 1.9 Hz, 5-H'), 3.49 (dd, 1H, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 10-H), 3.41 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.16 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, 15-H_b), 2.91 (dd, 1H, *J* = 9.3, 6.0 Hz, 2-H'), 2.62 (sep, 1H, *J* = 7.0 Hz, Acyl-H), 2.48 (dd, 2H, *J* = 9.0, 4.0 Hz, 2-H), 2.44 (ddq, 1H, *J* = 9.9, 6.4, 3.1 Hz, 6-H), 1.82 (s, 3H, 14-Me), 1.36-1.31 (m, 1H, 8-H_a), 1.21 (s, 3H, 4-Me), 1.19 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, Acyl), 1.18 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, Acyl), 1.21-1.17 (m, 1H, 8-H_b), 0.89 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

UPLC-MS *t_R* = 1.98 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₆H₅₂N₂NaO₁₃ [M+Na]⁺: 743.3367, gefunden: 743.3381.

N-Glycosyliertes Proansamitocin-Derivat **252**



0.9 mg (1.2 μmol, 4 %)

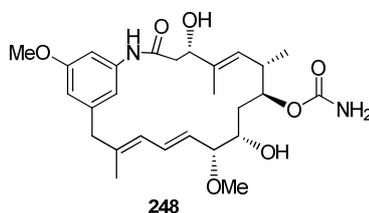
semipröp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃OH 90/10 → 100 CH₃OH in 80 min, dann 10 min 100 CH₃OH; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 59.47 min); b) CN-Phase,

Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 31.45 min); c) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 66.53 min).

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.91 (dd, 1H, *J* = 1.8, 0.8 Hz, arom.-H), 6.85 (dd, 1H, *J* = 1.5, 0.8 Hz, arom.-H), 6.77 (dd, 1H, *J* = 1.8, 1.5 Hz, arom.-H), 6.39 (dd, 1H, *J* = 15.2, 10.9 Hz, 12-H), 6.06 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz, 13-H), 5.64 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, 1-H'), 5.51 (dd, 1H, *J* = 15.2, 8.1 Hz, 11-H), 5.26 (dd, 1H, *J* = 10.5, 2.7 Hz, 3-H), 5.16 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, 5-H), 4.31 (dd, 1H, *J* = 10.1, 9.7 Hz, 4-H'), 4.08 (ddd, 1H, *J* = 10.6, 5.4, 1.9 Hz, 9-H), 3.66 (dd, 1H, *J* = 9.2, 2.0 Hz, CH'_{2a}), 3.60 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.1 Hz, CH'_{2b}), 3.57 (dd, 1H, *J* = 9.7, 9.2 Hz, 3-H'), 3.51 (ddd, 1H, *J* = 10.1, 6.1, 2.0 Hz, 5-H'), 3.45 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 10-H), 3.42 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 7-H), 3.14 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz, 15-H_b), 2.92 (dd, 1H, *J* = 9.3, 9.2 Hz, 2-H'), 2.61 (sep, 1H, *J* = 7.0 Hz, Acyl-H), 2.52 (dd, 1H, *J* = 15.0, 2.7 Hz, 2-H_a), 2.47 (dd, 1H, *J* = 15.0, 10.5 Hz, 2-H_b), 2.15 (ddq, 1H, *J* = 12.1, 6.5, 3.4 Hz, 6-H), 1.81 (s, 3H, 14-Me), 1.31-1.26 (m, 1H, 8-H_a), 1.19 (s, 3H, 4-Me), 1.17 (d, 6H, *J* = 7.0 Hz, Acyl), 0.96 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, 6-Me), 0.95-0.91 (m, 1H, 8-H_b); **¹³C-NMR** Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

UPLC-MS *t_R* = 2.01 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₇H₅₃N₃NaO₁₄ [M+Na]⁺: 786.3425, gefunden: 786.3437.

C-7-Carbamoyliertes Proansamitocin-Derivat **248**



2.6 mg (5.2 μmol, 21 %)

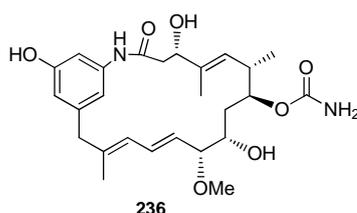
semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃OH 90/10 → 100 CH₃OH in 80 min, dann 10 min 100 CH₃OH; Fluss 2.25 mL/min; (*t_R* = 71.17 min); b) CN-Phase,

H₂O/CH₃CN 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_R = 45.73 min);

NMR-Daten siehe Dissertation K. Harmrolfs S. 154-155.¹³⁴

UPLC-MS t_r = 2.41 min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₇H₃₈N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 525.2577, gefunden: 525.2586.

C-7-Carbamoyliertes Proansamitocin-Derivat **236**



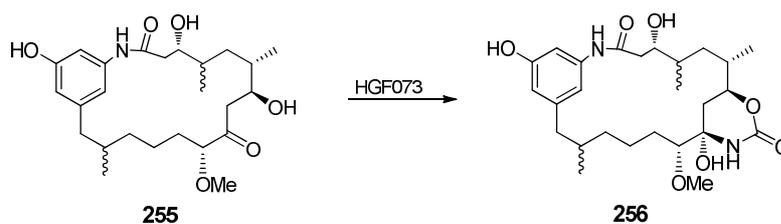
1.3 mg (2.6 μmol, 10 %)

semipräp. HPLC-Läufe: a) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃OH 90/10 → 100 CH₃OH in 80 min, dann 10 min 100 CH₃OH; Fluss 2.25 mL/min; (t_R = 62.85 min); b) CN-Phase, Gradient H₂O/CH₃CN 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_R = 35.12 min); c) C-18-Phase, Gradient H₂O/CH₃CN = 90/10 → 60/40 in 70 min, dann 60/40 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min; (t_R = 63.28 min);

NMR-Daten siehe S. 199

UPLC-MS t_R = 2.10 min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₆H₃₆N₂NaO₇[M+Na]⁺: 511.2420, gefunden: 511.2431.

Trihydriertes Proansamitocin-Derivat **256**



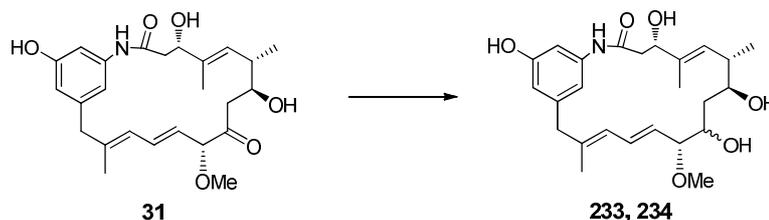
Die Mutasythese zu dem hydrierten Proansamitocin-Derivat **256** erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der Blockmutante HGF 073, welcher trihydriertes Proansamitocin-Derivat **255** (5 mg, 1.1 μmol , 1 Äq.) in einer 30 mL Kultur zugefüttert wird. Aus einer Probe des Korea-Fermentationsmediums wird hierbei über UPLC-MS-Analytik hydriertes Proansamitocin-Derivat **256** nachgewiesen.

UPLC-MS $t_r = 2.08$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{NaO}_7[\text{M}+\text{Na}]^+$: 515.2733 gefunden: 515.2737.

6.4 Semisyntheseexperimente

6.4.1 Semisynthese mit Proansamitocin-Derivaten

9-*anti*-Hydroxy-proansamitocin **234** und 9-*syn*-Hydroxy-proansamitocin **233**



Vorschrift A:

Proansamitocin **31** (5.0 mg, 11.5 μmol , 1 Äq.) wird in THF abs. (3 mL) gelöst, mit (*S*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin (9.5 mg, 34.5 μmol , 6 Äq.) gelöst in THF abs. (2 mL) versetzt und auf -78 °C abgekühlt. Es wird Boran-Dimethylsulfid-Komplex (19 μL , 0.29 mmol, 25 Äq.) zugegeben und auf -40 °C erwärmt. Nach 2 h wird die Reaktion durch Zugabe von CH_3OH (2 mL) beendet und auf RT erwärmt. Es wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 40/60 in 90 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 10 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) werden reduziertes Proansamitocin **233** und **234** ($t_R = 50.40$ min) (2.9 mg, 6.51 μmol , 57 %) als Diastereomerengemisch, sowie *seco*-Proansamitocin-Derivat **242** ($t_R = 47.25$ min) (0.8 mg, 1.77 μmol , 15 %), *seco*-Proansamitocin-Derivat **243** ($t_R = 48.37$ min) (0.3 mg, 0.67 μmol , 6 %), 1-Desoxy-

Proansamitocin-Derivat **240** ($t_R = 52.27$ min) (0.7 mg, 1.62 μmol , 14 %) und 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **241** ($t_R = 56.80$ min) (0.4 mg, 0.93 μmol , 8 %) erhalten. Nach Trennung der Diastereomere über semipräp. HPLC (CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 95/5 \rightarrow 70/30 in 80 min, dann 70/30 \rightarrow 50/50 in 5 min, dann 5 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden 9-*anti*-Hydroxyproansamitocin **234** ($t_R = 69.39$ min) (2.6 mg, 5.79 μmol , 51%) und 9-*syn*-Hydroxyproansamitocin **233** ($t_R = 63.49$ min) (0.3 mg, 0.73 μmol , 6 %) im Verhältnis 8:1 erhalten.

Vorschrift B:

Proansamitocin **31** (5.00 mg, 11.5 μmol , 1 Äq.) wird in THF abs. (3 mL) gelöst, mit (*R*)-Methyl-CBS-oxazaborolidin (9.5 mg, 34.5 μmol , 6 Äq.) gelöst in THF abs. (2 mL) versetzt und auf -78 °C abgekühlt. Es wird Boran-Dimethylsulfid-Komplex (19 μL , 0.29 mmol, 25 Äq.) zugegeben und auf -40 °C erwärmt. Nach 2 h wird die Reaktion durch Zugabe von CH_3OH (2 mL) beendet und auf RT erwärmt. Es wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 40/60 in 90 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 10 min, dann 10 min 20/80; Fluss 2.25 mL/min) werden reduziertes Proansamitocin **233** und **234** ($t_R = 50.40$ min) (4.4 mg, 9.88 μmol , 86 %) als Diastereomeregemisch, sowie *seco*-Proansamitocin-Derivat **242** ($t_R = 47.25$ min) (0.4 mg, 0.88 μmol , 7 %), *seco*-Proansamitocin-Derivat **243** ($t_R = 48.37$ min) (< 0.1 mg), 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **240** ($t_R = 52.27$ min) (0.3 mg, 0.68 μmol , 5 %) und 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **241** ($t_R = 56.80$ min) (0.1 mg, 0.23 μmol , 2 %) erhalten. Nach Trennung der Diastereomere über semipräp. HPLC (CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH} = 95/5 \rightarrow 70/30$ in 80 min, dann 70/30 \rightarrow 50/50 in 5 min, dann 5 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden 9-*anti*-Hydroxyproansamitocin **234** ($t_R = 69.39$ min) (3.7 mg, 8.23 μmol , 72 %) und 9-*syn*-Hydroxyproansamitocin **233** ($t_R = 63.49$ min) (0.7 mg, 1.65 μmol , 14 %) im Verhältnis 5:1 erhalten.

Vorschrift C:

Proansamitocin **31** (5.00 mg, 11.5 μmol , 1 Äq.) wird in THF abs. (5 mL) gelöst, auf -78 °C abgekühlt und mit LiBH_4 (0.25 mg, 11.5 μmol , 1 Äq.) versetzt. Diese Mischung wird 1.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lsg. (2 mL) beendet und auf RT erwärmt. Die Mischung wird mit dest.

Wasser verdünnt und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} = 90/10 \rightarrow 40/60$ in 90 min, dann $40/60 \rightarrow 20/80$ in 10 min, dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden die reduzierten Proansamitocine **233** und **234** ($t_{\text{R}} = 50.40$ min) (4.8 mg, 10.77 μmol , 94 %) als Diastereomergemisch erhalten. Nach Trennung der Diastereomere über semipräp. HPLC (CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH} 95/5 \rightarrow 70/30$ in 80 min, dann $70/30 \rightarrow 50/50$ in 5 min, dann 5 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden 9-*anti*-Hydroxyproansamitocin **234** ($t_{\text{R}} = 69.39$ min) (3.6 mg, 8,08 μmol , 71 %) und 9-*syn*-Hydroxyproansamitocin **233** ($t_{\text{R}} = 63.49$ min) (1.2 mg, 2.69 μmol , 23 %) im Verhältnis 3:1 erhalten.

9-*anti*-Hydroxyproansamitocin **234**

Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 285 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.18 (s, 1H, 21-H), 6.54-6.47 (m, 1H, 12-H), 6.51 (s, 1H, 19-H), 6.40 (s, 1H, 17-H), 6.06 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 13-H), 5.63 (dd, 1H, $J = 15.2, 9.0$ Hz, 11-H), 5.39 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, 5-H), 4.28 (dd, 1H, $J = 7.2, 2.4$ Hz, 3-H), 4.11 (dd, 1H, $J = 14.6, 10.5$ Hz, 9-H), 3.54-3.50 (m, 1H, 7-H), 3.52 (dd, 1H, $J = 10.5, 9.0$ Hz, 10-H), 3.34 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz, 15- H_a), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10-OMe), 3.08 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz, 15- H_b), 2.75 (dd, 1H, $J = 15.0, 7.2$ Hz, 2- H_a), 2.63 (dd, 1H, $J = 15.0, 2.4$ Hz, 2- H_b), 2.42-2.38 (m, 1H, 6-H), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.58 (s, 3H, 4-Me), 1.53-1.46 (m, 1H, 8- H_a), 1.12 (dd, 1H, $J = 14.6, 10.6$ Hz, 8- H_b), 0.98 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 285 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 172.0 (s, C-1), 159.0 (s, C-18), 143.3 (s, C-14), 140.6 (s, C-20), 139.5 (s, C-16), 137.8 (s, C-4), 132.7 (d, C-12), 129.6 (d, C-5), 128.0 (d, C-11), 127.9 (d, C-13), 113.3 (d, C-17), 112.3 (d, C-21), 105.6 (d, C-19), 87.8 (d, C-10), 74.4 (d, C-3), 73.6 (d, C-7), 71.3 (d, C-9), 56.4 (q, C-10-OMe), 46.6 (t, C-15), 41.8 (t, C-2), 40.3 (d, C-6), 39.3 (t, C-8), 18.4 (q, C-6-Me), 16.8 (q, C-14-Me), 13.9 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 285 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.67 (s, 1H, 21-H), 6.54 (s, 1H, 17-H), 6.44-6.39 (m, 1H, 12-H), 6.40 (s, 1H, 19-H), 5.80 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, 13-H), 5.46 (dd, 1H, $J = 14.9, 8.5$ Hz, 11-H), 5.23 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, 5-H), 4.35 (dd, 1H, $J = 8.7, 3.8$ Hz, 3-H), 4.11 (dd, 1H, $J = 14.4, 11.0$ Hz, 9-H), 3.44 (dd, 1H, $J = 11.0, 8.5$ Hz, 10-H), 3.38-3.34 (m, 1H, 7-H), 3.35 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz, 15- H_a), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.11 (d, 1H,

$J = 13.8$ Hz, 15- H_b), 2.42-2.35 (m, 2H, 2-H), 2.27-2.22 (m, 1H, 6-H), 1.76 (s, 3H, 14-Me), 1.53-1.46 (m, 1H, 8- H_a), 1.39 (s, 3H, 4-Me), 1.01 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz, 6-Me), 1.00-0.96 (m, 1H, 8- H_b) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 285 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 176.1 (s, C-1), 160.5 (s, C-18), 143.3 (s, C-14), 140.0 (s, C-20), 139.8 (s, C-16), 137.5 (s, C-4), 132.7 (d, C-12), 129.6 (d, C-5), 128.7 (d, C-11), 126.5 (d, C-13), 118.8 (d, C-21), 116.5 (d, C-17), 111.0 (d, C-19), 88.0 (d, C-10), 73.8 (d, C-3), 73.0 (d, C-7), 70.3 (d, C-9), 56.3 (q, C-10-OMe), 46.9 (t, C-15), 40.9 (d, C-6), 40.5 (t, C-8), 38.5 (t, C-2), 18.2 (q, C-6-Me), 16.9 (q, C-14-Me), 14.1 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 2.11$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NNaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 468.2362, gefunden: 468.2362.

9-*syn*-Hydroxyproansamitocin **233**

Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.05 (s, 1H, 21-H), 6.59-6.53 (m, 1H, 12-H), 6.43 (s, 1H, 19-H), 6.41 (s, 1H, 17-H), 6.01 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, 13-H), 5.44 (dd, 1H, $J = 14.1, 8.4$ Hz, 11-H), 5.43 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, 5-H), 4.41 (dd, 1H, $J = 7.4, 5.5$ Hz, 3-H), 3.67-3.64 (m, 1H, 9-H), 3.67-3.64 (m, 1H, 7-H), 3.52 (dd, 1H, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 10-H), 3.31 (unter CHD_2OD , 3H, 10-OMe), 3.27-3.24 (m, 2H, 15-H), 2.62-2.61 (m, 2H, 2-H), 2.49-2.45 (m, 1H, 6-H), 1.80-1.77 (m, 1H, 8- H_a) 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.66 (s, 3H, 4-Me), 1.38-1.29 (m, 1H, 8- H_b), 0.74 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, 6-Me) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 171.3 (s, C-1), 158.7 (s, C-18), 143.2 (s, C-16), 140.2 (s, C-20), 139.9 (s, C-14), 137.3 (s, C-4), 132.2 (d, C-12), 129.5 (d, C-11), 129.3 (d, C-5), 127.7 (d, C-13), 113.4 (d, C-17), 113.4 (d, C-21), 106.2 (d, C-19), 88.1 (d, C-10), 75.5 (d, C-9), 75.3 (d, C-3), 75.1 (d, C-7), 56.7 (q, C-10-OMe), 46.5 (t, C-15), 43.2 (t, C-2), 39.5 (d, C-6), 37.9 (t, C-8), 17.1 (q, C-14-Me), 16.9 (q, C-6-Me), 11.8 (q, C-4-Me) ppm;

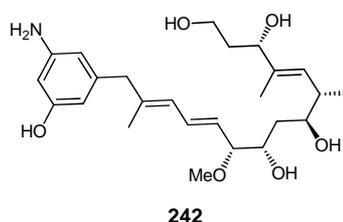
Konformer 2:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.56 (s, 1H, 21-H), 6.55 (s, 1H, 17-H), 6.49 (dd, 1H, $J = 15.4, 11.1$ Hz, 12-H), 6.43 (s, 1H, 19-H), 5.67 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, 13-H), 5.18 (dd, 1H, $J = 15.4, 8.5$ Hz, 11-H), 5.14 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, 5-H), 4.31 (dd, 1H, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 3-H), 3.67-3.64 (m, 1H, 9-H), 3.37-3.31 (m, 1H, 10-H) 3.37-3.31 (m, 1H, 7-H), 3.25 (s, 3H, 10-OMe), 3.21-3.17 (m, 2H, 15-H), 2.49-2.45 (m, 1H, 2- H_a), 2.35 (dd, 1H, $J = 14.3, 9.6$ Hz, 2- H_a), 2.30-2.25 (m, 1H, 6-H), 1.80 (s, 3H, 14-Me), 1.71-1.66 (m, 1H,

8-H_a), 1.49 (s, 3H, 4-Me), 1.14-1.06 (m, 1H, 8-H_b) 0.98 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz, 6-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 175.3 (s, C-1), 160.1 (s, C-18), 143.1 (s, C-16), 141.5 (s, C-14), 139.7 (s, C-20), 137.5 (s, C-4), 133.1 (d, C-12), 129.1 (d, C-11), 128.8 (d, C-5), 125.9 (d, C-13), 119.3 (d, C-21), 116.5 (d, C-17), 111.4 (d, C-19), 89.7 (d, C-10), 77.3 (d, C-7), 75.4 (d, C-9), 73.4 (d, C-3), 56.4 (q, C-10-OMe), 46.4 (t, C-15), 40.8 (d, C-6), 39.8 (t, C-2), 39.0 (t, C-8), 17.7 (q, C-6-Me), 17.4 (q, C-14-Me), 13.7 (q, C-4-Me) ppm;

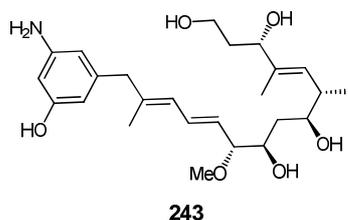
UPLC-MS t_R = 2.09 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₅H₃₅NNaO₆ [M+Na]⁺: 468.2362, gefunden: 468.2365.

seco-Proansamitocin-Derivat **242**



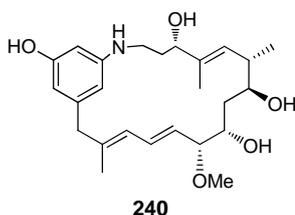
¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.53 (dd, 1H, *J* = 14.8, 11.0 Hz, 12-H), 6.12 (dd, 1H, *J* = 2.0, 1.6 Hz, 21-H), 6.09 (dd, 1H, *J* = 2.0, 2.0 Hz, 19-H), 6.03 (dd, 1H, *J* = 2.0, 1.6 Hz, 17-H), 5.97 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.50 (dd, 1H, *J* = 14.8, 8.4 Hz, 11-H), 5.26 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, 5-H), 4.14 (dd, 1H, *J* = 6.9, 2.2 Hz, 3-H), 3.90 (ddd, 1H, *J* = 10.8, 3.8, 1.7 Hz, 9-H), 3.63-3.54 (m, 2H, 1-H), 3.63-3.54 (m, 1H, 7-H), 3.63-3.54 (m, 1H, 10-H), 3.28 (s, 3H, 10-OMe), 3.17 (s, 2H, 15-H), 2.43 (ddq, 1H, *J* = 9.6, 7.1, 6.6 Hz, 6-H), 1.78-1.72 (m, 2H, 2-H), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (s, 3H, 4-Me), 1.60 (ddd, 1H, *J* = 14.2, 10.8, 1.2 Hz, 8-H_a), 1.43 (ddd, 1H, *J* = 14.2, 10.6, 1.7 Hz, 8-H_b), 1.01 (d, 3H, *J* = 6.6 Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 159.1 (s, C-18), 149.7 (s, C-20), 142.9 (s, C-16), 140.1 (s, C-14), 138.2 (s, C-4), 132.4 (d, C-12), 130.5 (d, C-5), 129.1 (d, C-11), 126.6 (d, C-13), 109.4 (d, C-21), 107.4 (d, C-17), 101.8 (d, C-19), 88.0 (d, C-10), 75.6 (d, C-3), 73.2 (d, C-7), 71.4 (d, C-9), 60.1 (t, C-1), 56.7 (q, C-10-OMe), 47.3 (t, C-15), 40.3 (d, C-6), 38.5 (t, C-2), 38.5 (t, C-8), 17.4 (q, C-6-Me), 16.5 (q, C-14-Me), 11.9 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS t_R = 1.69 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na]⁺: 472.2675, gefunden: 472.2681.

seco-Proansamitocin-Derivat **243**

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.53 (dd, 1H, $J = 15.0$, 11.0 Hz, 12-H), 6.10 (dd, 1H, $J = 2.0$, 1.4 Hz, arom.-H), 6.07 (dd, 1H, $J = 2.0$, 1.3 Hz, arom.-H), 6.02 (dd, 1H, $J = 1.4$, 1.3 Hz, arom.-H), 5.96 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, 13-H), 5.45 (dd, 1H, $J = 15.0$, 8.6 Hz, 11-H), 5.26 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, 5-H), 4.10 (dd, 1H, $J = 6.6$, 2.0 Hz, 3-H), 3.72 (ddd, 1H, $J = 8.6$, 5.2, 5.0 Hz, 9-H), 3.63-3.51 (m, 2H, 1-H), 3.63-3.51 (m, 1H, 7-H), 3.63-3.51 (m, 1H, 10-H), 3.28 (s, 3H, 10-OMe), 3.18 (s, 2H, 15-H), 2.44 (ddq, 1H, $J = 9.7$, 7.1, 6.7 Hz, 6-H), 1.80 (ddd, 1H, $J = 14.3$, 10.0, 5.0 Hz, 8-H_a), 1.73-1.69 (m, 2H, 2-H), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (ddd, 1H, $J = 14.3$, 8.6, 1.8 Hz, 8-H_b), 0.97 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

UPLC-MS $t_R = 1.72$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na]⁺: 472.2675, gefunden: 472.2671.

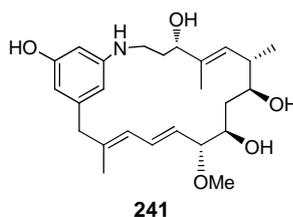
1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **240**

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.42 (dd, 1H, $J = 15.2$, 10.9 Hz, 12-H), 5.99-5.95 (m, 1H, arom.-H), 5.99-5.95 (m, 1H, arom.-H), 5.99-5.95 (m, 1H, arom.-H), 5.99-5.95 (m, 1H, 13-H), 5.55 (dd, 1H, $J = 15.2$, 9.1 Hz, 11-H), 5.24 (d, 1H, $J = 9.8$, 1.3 Hz, 5-H), 4.16 (ddd, 1H, $J = 11.2$, 2.1, 1.3 Hz, 9-H), 3.88 (dd, 1H, $J = 9.6$, 2.0 Hz, 3-H), 3.43 (dd, 1H, $J = 9.1$, 2.1 Hz, 10-H), 3.40 (ddd, 1H, $J = 11.0$, 9.6, 1.7 Hz, 7-H), 3.28 (s, 3H, 10-OMe), 3.25 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz, 15-H_a), 3.24-3.20 (m, 2H, 1-H), 3.00 (d, 1H,

$J = 13.2$ Hz, 15- H_b), 2.25 (ddq, 1H, $J = 9.8, 9.6, 6.5$ Hz, 6-H), 1.98 (dddd, 1H, $J = 14.6, 8.4, 6.4, 2.0$ Hz, 2- H_a), 1.66 (s, 3H, 14-Me), 1.51 (ddd, 1H, $J = 14.4, 11.2, 1.7$ Hz, 8- H_a), 1.40 (s, 3H, 4-Me), 1.32 (dddd, 1H, $J = 14.6, 9.6, 4.9, 4.8$ Hz, 2- H_b), 1.06 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me), 1.01 (ddd, 1H, $J = 14.4, 11.0, 1.3$ Hz, 8- H_b) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 158.6 (s, C-18), 150.6 (s, C-20), 143.3 (s, C-16), 141.2 (s, C-14), 139.9 (s, C-4), 133.0 (d, C-12), 127.9 (d, C-11), 126.3 (d, C-5), 125.9 (d, C-13), 106.9 (d, C-arom.), 104.1 (d, C-arom.), 100.6 (d, C-arom.), 88.2 (d, C-10), 73.3 (d, C-3), 73.3 (d, C-7), 70.4 (d, C-9), 56.2 (q, C-10-OMe), 47.6 (t, C-15), 41.1 (t, C-1), 41.0 (d, C-6), 40.2 (t, C-8), 35.7 (t, C-2), 18.6 (q, C-6-Me), 16.4 (q, C-14-Me), 15.8 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 1.84$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{NNaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 454.2569, gefunden: 454.2570.

1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **241**

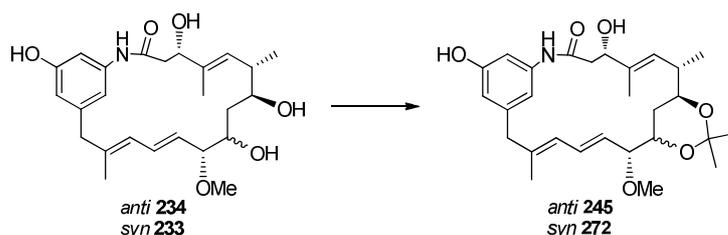


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.48 (dd, 1H, $J = 15.2, 10.9$ Hz, 12-H), 5.98 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.4$ Hz, arom.-H), 5.97-5.95 (m, 1H, arom.-H), 5.97-5.95 (m, 1H, arom.-H), 5.90 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, 13-H), 5.25-5.20 (m, 1H, 11-H), 5.25-5.20 (m, 1H, 5-H), 3.87 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 3-H), 3.65 (ddd, 1H, $J = 10.5, 8.3, 2.8$ Hz, 3-H), 3.43 (ddd, 1H, $J = 9.8, 9.4, 1.3$ Hz, 7-H), 3.35 (dd, 1H, $J = 8.4, 8.4$ Hz, 10-H), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 15- H_a), 3.31 (unter CHD_2OD , 1H, 1- H_a), 3.26 (s, 3H, 10-OMe), 3.17 (ddd, 1H, $J = 14.7, 7.5, 6.5$ Hz, 1- H_b), 2.99 (d, 1H, $J = 13.7$ Hz, 15- H_b), 2.28 (dq, 1H, $J = 6.5, 6.3, 3.0$ Hz, 6-H), 1.87 (dddd, 1H, $J = 14.3, 7.7, 6.8, 2.5$ Hz, 2- H_a), 1.72 (s, 3H, 14-Me), 1.68 (ddd, 1H, $J = 14.5, 10.4, 1.4$ Hz, 8- H_a), 1.45 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, 4-Me), 1.33 (dddd, 1H, $J = 16.7, 14.5, 6.6, 4.5$ Hz, 2- H_b), 1.12 (ddd, 1H, $J = 14.5, 10.4, 10.4$ Hz, 8- H_b), 1.00 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 158.7 (s, C-18), 150.7 (s, C-20), 143.1 (s, C-16), 142.0 (s, C-14), 140.0 (s, C-4), 133.3 (d, C-12), 128.6 (d, C-11), 126.4 (d, C-5), 125.6 (d, C-13), 107.0 (d, C-arom.), 104.5 (d, C-arom.), 100.8 (d, C-arom.), 89.2 (d, C-10), 78.0 (d, C-7), 76.1 (d, C-9), 74.0 (d, C-3), 56.5 (q, C-10-OMe), 47.4

(t, C-15), 41.7 (t, C-1), 40.5 (d, C-6), 38.1 (t, C-8), 35.8 (t, C-2), 17.7 (q, C-6-Me), 16.8 (q, C-14-Me), 15.3 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 1.95$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{25}H_{37}NNaO_5$ $[M+Na]^+$: 454.2569, gefunden: 454.2580.

9-*anti*-Hydroxy-proansamitocin-Derivat **245** und 9-*syn*-Hydroxy-proansamitocin-Derivat **272**



Ein Gemisch aus 9-*anti*-Hydroxy-proansamitocin **234** und 9-*syn*-Hydroxy-proansamitocin **233** (4.7 mg, *dr* 3:1, 10.5 μ mol, 1 \AA q.) wird unter N_2 -Atmosphäre in Dimethoxypropan (2 mL) und CH_2Cl_2 abs. (2 mL) gelöst, mit PPTS (1 mg) versetzt und für 2 h bei RT gerührt.

Nach dieser Zeit wird die Mischung mit gesätt.-Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient H_2O/CH_3CN 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden 9-*anti*-Hydroxy-proansamitocin-Derivat **245** ($t_R = 60.56$ min) (3.5 mg, 7.1 μ mol, 68 %) und 9-*syn*-Hydroxyproansamitocin-Derivat **272** ($t_R = 6157$ min) (1.1 mg, 2.3 μ mol, 22 %) als farblose Feststoffe erhalten.

9-*anti*-Hydroxy-proansamitocin-Derivat **245**

1H -NMR (500 MHz, 285 K, $THF-d_8$, $THF-d_7 = 1.73$ ppm): δ 8.79 (s, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, 18-OH), 7.44 (d, 1H, 19-H), 6.53 (dd, 1H, $J = 15.1, 10.7$ Hz, 12-H), 6.28 (s, 1H, 21-H), 6.27 (s, 1H, 17-H), 5.99 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, 13-H), 5.55 (dd, 1H, $J = 15.1, 6.1$ Hz, 11-H), 5.40 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 5-H), 4.17-4.12 (m, 1H, 3-H), 4.17-4.12 (m, 1H, 3-OH), 3.93 (ddd, 1H, $J = 9.9, 6.5, 2.1$ Hz, 9-H), 3.76 (dd, 1H, $J = 6.5, 6.1$ Hz, 10-H), 3.54-3.50 (m, 1H, 7-H), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 15-H), 2.60-2.58 (m, 2H, 2-H), 2.46-2.38 (m, 1H,

6-H), 1.86-1.76 (m, 1H, 8-H_a), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (s, 3H, 4-Me), 1.37–1.32 (m, 1H, 8-H_b), 1.29 (s, 6H, Acetonid), 0.89 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 6-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, 285 K, THF-d₈ = 25.5 ppm): δ 169.5 (s, C-1), 158.6 (s, C-18), 142.9 (s, C-16), 141.6 (s, C-20), 138.0 (s, C-4), 137.6 (s, C-14), 130.3 (d, C-13), 128.9 (d, C-11), 128.6 (d, C-13), 126.5 (d, C-5), 112.0 (d, C-17), 111.4 (d, C-21), 104.0 (d, C-19), 100.8 (s, C-Acetonid), 83.9 (d, C-10), 73.0 (d, C-3), 72.0 (d, C-7), 70.6 (d, C-9), 57.8 (q, C-10-OMe), 46.5 (t, C-15), 42.4 (t, C-2), 38.8 (d, C-6), 31.3 (t, C-8), 25.5 (q, unter THF, 2xC-Acetonid), 17.9 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 14.5 (q, C-4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.50$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₈H₄₀NO₆ [M+H]⁺: 486.2856, gefunden: 486.2852.

9-*syn*-Hydroxy-proansamitocin-Derivat **272**

Konformer 1:

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.52 (s, 1H, 19-H), 6.55 (dd, 1H, $J = 14.5, 11.1$ Hz, 12-H), 6.41 (s, 1H, 21-H), 6.35 (s, 1H, 17-H), 6.07 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, 13-H), 5.44 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, 5-H), 5.39 (dd, 1H, $J = 14.8, 9.0$ Hz, 11-H), 4.23-4.22 (m, 1H, 3-H), 3.92-3.89 (m, 1H, 9-H), 3.66-3.62 (m, 1H, 7-H), 3.53 (dd, 1H, $J = 8.4, 8.4$ Hz, 10-H), 3.37-3.35 (m, 1H, 15-H_a), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.13 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz, 15-H_b), 2.80-2.73 (m, 2H, 2-H), 2.42-2.37 (m, 1H, 6-H), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.67 (s, 3H, 4-Me), 1.59 (ddd, 1H, $J = 16.1, 12.8, 2.3$ Hz, 8-H_a), 1.40 (s, 6H, Acetonid), 0.97 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me), 0.90 (ddd, 1H, $J = 16.1, 11.3, 7.6$ Hz, 8-H_b) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 171.5 (s, C-1), 158.5 (s, C-18), 143.3 (s, C-16), 140.8 (s, C-20), 140.3 (s, C-14), 137.6 (s, C-4), 133.5 (d, C-12), 127.7 (d, C-11), 127.5 (d, C-5), 127.3 (d, C-13), 113.0 (d, C-17), 112.2 (d, C-21), 104.6 (d, C-19), 100.0 (s, C-Acetonid), 87.8 (d, C-10), 74.5 (d, C-9), 73.6 (d, C-3), 73.4 (d, C-7), 56.2 (q, C-10-OMe), 46.7 (t, C-15), 40.9 (t, C-2), 39.8 (d, C-6), 33.5 (t, C-8), 30.3 (q, C-Acetonid), 20.0 (q, C-Acetonid), 17.8 (q, C-14-Me), 17.1 (q, C-6-Me), 15.2 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

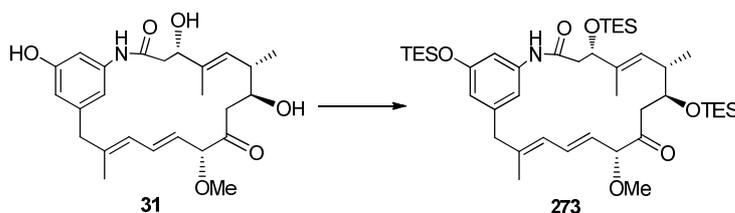
¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.50 (s, 1H, 19-H), 6.51-6.47 (m, 1H, 12-H), 6.45 (s, 1H, 21-H), 6.43 (s, 1H, 17-H), 5.73 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, 13-H), 5.26 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 5-H), 5.16 (dd, 1H, $J = 13.7, 8.9$ Hz, 11-H), 4.33 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, 3-H), 3.82-3.74 (m, 1H, 9-H), 3.44-3.39 (m, 1H, 10-H), 3.44-3.39 (m, 1H, 7-H), 3.38-3.34 (m, 1H, 15-H_a), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, 10-OMe), 3.16 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, 15-H_b), 2.61 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, 2-H_a), 2.32-2.25 (m, 1H, 6-H), 2.16-2.10 (m, 1H, 2-H_b), 1.81 (s, 3H, 14-Me),

1.47 (s, 6H, Acetonid), 1.43 (s, 3H, 4-Me), 1.34-1.31 (m, 1H, 8-H_a), 0.97 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me), 0.90 (ddd, 1H, $J = 17.0, 11.6, 5.0$ Hz, 8-H_b) ppm;

¹³C-NMR (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 175.8 (s, C-1), 159.3 (s, C-18), 143.4 (s, C-16), 141.7 (s, C-14), 139.9 (s, C-20), 137.9 (s, C-4), 133.4 (d, C-12), 128.3 (d, C-11), 126.5 (d, C-5), 125.7 (d, C-13), 118.7 (d, C-17), 115.9 (d, C-21), 110.5 (d, C-19), 100.3 (s, C-Acetonid), 88.4 (d, C-10), 73.9 (d, C-7), 73.0 (d, C-9), 72.7 (d, C-3), 56.4 (q, C-10-OMe), 46.4 (t, C-15), 39.1 (d, C-6), 39.1 (t, C-2), 34.2 (t, C-8), 30.9 (q, C-Acetonid), 20.0 (q, C-Acetonid), 17.4 (q, C-6-Me), 17.4 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS $t_R = 2.49$ min; HRMS(ESI) m/z berechnet für: C₂₈H₃₉NNaO₆ [M+Na]⁺: 508.2675, gefunden: 508.2684.

TES-geschütztes Proansamitocin 273

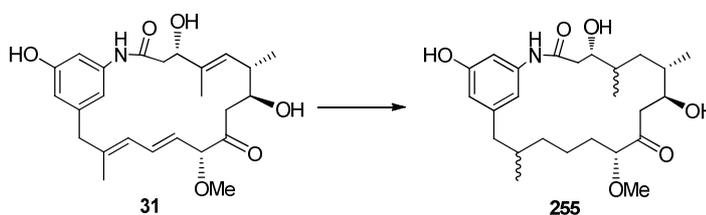


Proansamitocin **31** (10 mg, 23 μ mol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ abs. (10 mL) gelöst, 2,6-Lutidin (14 μ L, 120 μ mol, 5 Äq.) zugetropft und auf 0 °C gekühlt. Dann wird TESOTf (20 μ L, 90 μ mol, 4 Äq.) zugetropft, auf RT erwärmt und 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird die Reaktion durch die Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7) beendet und dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE/EE 5/1 → 2/1) wird TES-geschütztes Proansamitocin **273** (14.8 mg, 18.8 μ mol, 82 %) als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, 295 K, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.71 (br. s, 1H, NH), 7.18 (s, 1H, 21-H), 6.66 (dd, 1H, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 12-H), 6.43 (s, 1H, 17-H), 6.38 (s, 1H, 19-H), 5.97 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz, 13-H), 5.37 (dd, 1H, $J = 15.1, 7.6$ Hz, 11-H), 5.31 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, 5-H), 4.40 (dd, 1H, $J = 7.2, 3.0$ Hz, 3-H), 4.25 (d, 1H, $J = 7.6, 10$ -H), 4.12-4.07 (m, 1H, 7-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.26 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, 15-H_a), 3.10 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, 15-H_b), 2.66 (dd, 1H, $J = 15.9, 7.3$ Hz, 8-H_a), 2.59-2.57 (m, 2H, 2-H), 2.47 (dd, 1H, $J = 15.9, 5.5$ Hz, 8-H_b),

2.25-2.20 (m, 1H, 6-H), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.56 (s, 3H, 4-Me), 1.00-0.48 (m, 48H, TES, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, 295 K, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 205.0 (s, C-9), 168.7 (s, C-1), 156.1 (s, C-18), 141.5 (s, C-16), 141.2 (s, C-20), 139.0 (s, C-14), 135.0 (s, C-4), 132.0 (d, C-12), 130.7 (d, C-5), 125.4 (d, C-11), 125.1 (d, C-13), 116.9 (d, C-17), 112.6 (d, C-19), 110.3 (d, C-21), 88.5 (d, C-10), 75.1 (d, C-3), 71.5 (d, C-7), 57.0 (q, C-10-OMe), 46.0 (t, C-15), 44.7 (t, C-2), 44.2 (t, C-8), 36.9 (d, C-6), 17.0 (q, C-14-Me), 14.1 (q, C-6-Me), 11.9 (q, C-4-Me), 7.0 (t, TES), 6.9 (t, TES), 6.7 (t, TES), 5.1 (q, TES), 5.0 (q, TES), 4.9 (q, TES) ppm; **UPLC-MS** $t_r = 4.46$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{NO}_6\text{Si}_3[\text{M}+\text{H}]^+$: 786.4981, gefunden: 786.4965.

Tri-hydriertes Proansamitocin 255



Proansamitocin **31** (7 mg, 0.0161 mmol, 1 Äq.) wird in CH_3OH abs. (3 mL) gelöst, mit Pd/C (1.75 mg, 10 %, 1.61 μmol , 10 mol%) versetzt und 24 h bei RT unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach dieser Zeit wird das Gemisch über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min, dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) werden ein Hauptdiastereomer (2.8 mg, 6.2 μmol , 39 %) ($t_R = 79.15$ min), zwei weitere Diastereomere (je 1.4 mg, 3.1 μmol , 19 %) ($t_R = 75.41$ und 76.16 min) sowie ein viertes Diastereomer in Spuren ($t_R = 77.41$ min) als farblose Feststoffe erhalten.

Hauptdiastereomer:

Die Konformere 1 und 2 sind zusammen aufgeführt, da eine genaue Zuordnung aufgrund von Signalüberlagerung im Alkyl-Bereich nicht möglich ist.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.93-6.86 (m, 2H, arom.-H), 6.36 (s, 1H, arom.-H), 4.08 (ddd, 1H, $J = 8.2, 4.0, 4.0$ Hz, 7-H), 4.04 (ddd, 1H, $J = 8.2, 4.0, 4.0$ Hz, 7-H'), 3.81 (ddd, 1H, $J = 9.0, 8.9, 5.5$ Hz, 3-H, 3-H'), 3.76 (dd, 1H, $J = 6.8, 5.0$ Hz, 10-H), 3.64 (dd, 1H, $J = 7.2, 4.3$ Hz, 10-H'), 3.25 (s, 3H, 10-OMe), 3.22 (s,

3H, 10-OMe $\hat{}$), 2.70-2.63 (m, 1H, 8-H_a, 8-H_a $\hat{}$), 2.70-55 (m, 1H, 2-H_a, 2-H_a $\hat{}$), 2.61-2.55 (m, 1H, 15-H_a, 15-H_a $\hat{}$), 2.52 (dd, 1H, $J = 6.7, 4.3$ Hz, 8-H_b), 2.49 (dd, 1H, $J = 6.6, 4.2$ Hz, 8-H_b $\hat{}$), 2.42 (dd, 1H, $J = 8.8, 3.7$ Hz, 2-H_b), 2.39 (dd, 1H, $J = 8.7, 3.8$ Hz, 2-H_b $\hat{}$), 2.27 (dd, 1H, $J = 19.0, 9.4$ Hz, 15-H_b), 2.24 (dd, 1H, $J = 18.8, 9.4$ Hz, 8-H_b $\hat{}$), 1.85-1.74 (m, 2H, 6-H, 6-H $\hat{}$, 14-H, 14-H $\hat{}$), 1.66-1.55 (m, 3H, 11-H_a, 11-H_a $\hat{}$, 4-H, 4-H $\hat{}$, 5-H_a, 5-H_a $\hat{}$), 1.47-1.24 (m, 4H, 11-H_b, 11-H_b $\hat{}$, 12-H_a, 12-H_a $\hat{}$, 12-H_b, 12-H_b $\hat{}$, 13-H_a, 13-H_a $\hat{}$), 1.14-1.05 (m, 1H, 13-H_b, 13-H_b $\hat{}$), 1.01 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 6-Me, 6-Me $\hat{}$), 0.98 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 14-Me, 14-Me $\hat{}$), 0.96 (d, 3H, $J = 2.7$ Hz, 4-Me), 0.95 (d, 3H, $J = 2.4$ Hz, 4-Me $\hat{}$), 0.93-0.91 (m, 1H, 5-H_b, 5-H_b $\hat{}$) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 213.7 (s, C-8), 213.6 (s, C-8 $\hat{}$), 172.1 (s, C-1), 172.0 (s, C-1 $\hat{}$), 158.8 (s, C-18), 158.6 (s, C-18 $\hat{}$), 144.5 (s, C-16), 144.4 (s, C-16 $\hat{}$), 140.5 (s, C-20), 140.3 (s, C-20), 113.8 (d, C-arom._a), 113.7 (d, C-arom._a $\hat{}$), 113.1 (d, C-arom._b), 113.1 (d, C-arom._b $\hat{}$), 105.9 (d, C-arom._c), 105.8 (d, C-arom._c $\hat{}$), 87.7 (d, C-10), 87.4 (d, C-10 $\hat{}$), 73.1 (d, C-3), 73.0 (d, C-3 $\hat{}$), 72.6 (d, C-7), 72.4 (d, C-7 $\hat{}$), 58.2 (q, C-10-OMe), 58.2 (q, C-10-OMe $\hat{}$), 44.5 (t, C-2), 44.3 (t, C-2 $\hat{}$), 44.1 (t, C-15), 43.5 (t, C-15 $\hat{}$), 41.9 (t, C-8), 41.8 (t, C-8 $\hat{}$), 37.9 (t, C-4), 37.7 (t, C-4 $\hat{}$), 36.9 (t, C-6), 36.9 (t, C-6 $\hat{}$), 36.52 (t, C-5), 36.2 (t, C-5 $\hat{}$), 35.5 (t, C-14), 34.9 (t, C-14 $\hat{}$), 34.7 (t, C-13), 34.6 (t, C-13 $\hat{}$), 31.5 (t, C-11), 31.2 (t, C-11 $\hat{}$), 22.5 (t, C-12), 22.1 (t, C-12), 21.5 (q, C-14-Me), 21.2 (q, C-14-Me $\hat{}$), 16.8 (q, C-6-Me), 16.6 (q, C-6-Me $\hat{}$), 16.5 (q, C-4-Me), 16.4 (q, C-4-Me $\hat{}$) ppm; **UPLC-MS** $t_{\text{R}} = 2.31$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na] $^{+}$: 472.2675, gefunden: 472.2677.

Diastereomer 2:

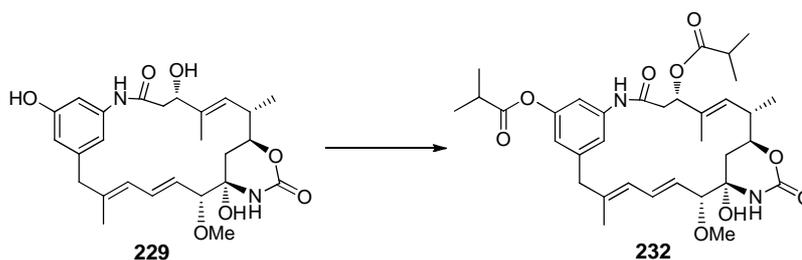
UPLC-MS $t_{\text{R}} = 2.21$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na] $^{+}$: 472.2675, gefunden: 472.2677.

Diastereomer 3:

UPLC-MS $t_{\text{R}} = 2.23$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na] $^{+}$: 472.2675, gefunden: 472.2677.

Diastereomer 4:

UPLC-MS $t_{\text{R}} = 2.27$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₅H₃₉NNaO₆ [M+Na] $^{+}$: 472.2675, gefunden: 472.2679.

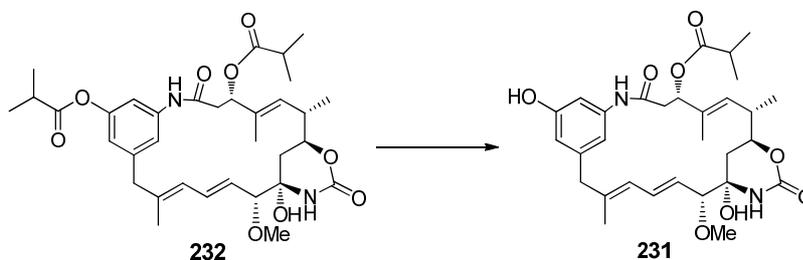
Bisacyliertes Proansamitocin-Derivat **232**

Carbamoyliertes Proansamitocin **229** (1.2 mg, 2.5 μmol , 1 \AA q.) wird in abs. CH_2Cl_2 (2 mL) gelöst, mit DMAP (0.6 mg, 0.0049 mmol, 2 \AA q.), DIC (2.5 μL , 0.0146 mmol, 6 \AA q.) und *iso*-Buttersäure (1.4 μL , 0.0146 mmol, 6 \AA q.) versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert, mit Essigsäureethylester nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Bisacyliertes Proansamitocin-Derivat **232** (1.3 mg, 2.1 μmol , 84 %) ($t_{\text{R}} = 81.39$ min) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 8.00 (s, 1H, 21-H), 6.71-6.66 (m, 1H, 12-H) 6.71-6.66 (m, 1H, 17-H), 6.57 (s, 1H, 19-H) 6.12 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, 13-H), 5.63 (dd, 1H, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 11-H), 5.32-5.28 (m, 1H, 3-H), 5.32-5.28 (m, 1H, 5-H), 4.28 (dd, 1H, $J = 11.0, 2.0$ Hz, 7-H), 3.60 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 10-H), 3.44 (d, 1H, $J = 14.3$ Hz, 15- H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.26 (d, 1H, $J = 14.3$ Hz, 15- H_b), 2.88 (dd, 1H, $J = 14.7, 2.0$ Hz, 2- H_a), 2.81 (hept, 1H, $J = 6.8$ Hz, 18-Acyl) 2.71 (dd, 1H, $J = 14.7, 7.9$ Hz, 2- H_b), 2.69-2.64 (m, 1H, 6-H), 2.61 (hept, 1H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 2.00 (s, 3H, 14-Me), 1.99 (dd, 1H, $J = 13.5, 2.0$ Hz, 8- H_a), 1.97 (s, 3H, 4-Me), 1.48 (dd, 1H, $J = 13.5, 11.0$ Hz, 8- H_b), 1.29 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, 18-Acyl), 1.17 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 1.09 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, 6-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 177.6 (s, 3-Acyl), 177.2 (s, 18-Acyl), 169.4 (s, C-1), 155.8 (s, C-Carbamat), 152.2 (s, C-18), 143.7 (s, C-16), 140.9 (s, C-20), 139.8 (s C-14), 136.0 (s, C-4), 134.5 (d, C-12), 128.9 (d, C-13), 127.1 (d, C-11), 126.3 (d, C-5), 118.6 (d, C-17), 117.7 (d, C-21), 110.9 (d, C-19), 88.8 (d, C-10), 82.4 (s, C-9), 79.3 (d, C-7), 74.3 (d, C-3), 56.5 (q, C-10-OMe), 46.0 (t, C-15), 40.4 (t, C-2), 38.7 (d, C-6), 36.1 (t, C-8), 35.3 (d, C-3-Acyl), 35.2 (d, C-18-Acyl), 19.4 (q, 2x C-3-Acyl), 19.2 (q, 2x C-18-Acyl), 18.1 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 16.0 (q, C-4-Me) ppm; **UPLC-MS**

$t_R = 2.58$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{34}H_{47}N_2O_9$ $[M+H]^+$: 627.3282, gefunden: 627.3270.

Monoacyliertes Proansamitocin-Derivat **231**



Bisacyliertes Proansamitocin-Derivat **232** (1.3 mg, 2.1 μ mol, 1 \ddot{A} q.) wird in CH_3OH (2 mL) gelöst und tropfenweise mit 1 M $NaHCO_3$ -Lsg. versetzt bis die Reaktion beendet ist. Anschließend wird die Mischung mit etwas H_2O versetzt und die wässrige Phase mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient H_2O/CH_3OH 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Monoacyliertes Proansamitocin-Derivat **231** (1.1 mg, 2.0 μ mol, 95 %) ($t_R = 68.85$ min) als farbloser Feststoff erhalten.

Konformer 1:

1H -NMR (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 7.54 (s, 1H, 21-H), 6.67 (dd, 1H, $J = 14.8, 11.0$ Hz, 12-H) 6.40 (s, 1H, 17-H), 6.32 (s, 1H, 19-H), 6.08 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz, 13-H), 5.58 (dd, 1H, $J = 14.8, 8.9$ Hz, 11-H), 5.31-5.27 (m, 1H, 3-H), 5.31-5.27 (m, 1H, 5-H), 4.27 (ddd, 1H, $J = 11.5, 10.7, 2.3$ Hz, 7-H), 3.59 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, 10-H), 3.35 (d, 1H, $J = 15.0$ Hz, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.15 (d, 1H, $J = 15.0$ Hz, 15- H_b), 2.86 (dd, 1H, $J = 13.5, 2.0$ Hz, 2- H_a), 2.68 (dd, 1H, $J = 13.5, 8.7$ Hz, 2- H_b), 2.68-2.61 (m, 1H, 6-H), 2.61 (hep, 1H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 1.98 (dd, 1H, $J = 13.6, 2.3$ Hz, 8- H_a), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.71 (s, 3H, 4-Me), 1.48 (dd, 1H, $J = 13.6, 11.5$ Hz, 8- H_b), 1.17 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 1.09 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, 6-Me); **^{13}C -NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 177.6 (s, 3-Acyl), 169.4 (s, C-1), 158.6 (s, C-18), 155.8 (s, C-Carbamat), 143.3 (s, C-16), 140.8 (s, C-20), 140.3 (s, C-14), 136.1 (s, C-4), 134.7 (d, C-12), 128.5 (d, C-13), 126.6 (d, C-11), 126.1 (d, C-5), 113.0 (d, C-17), 112.0 (d, C-21), 104.6 (d, C-19), 88.8 (d,

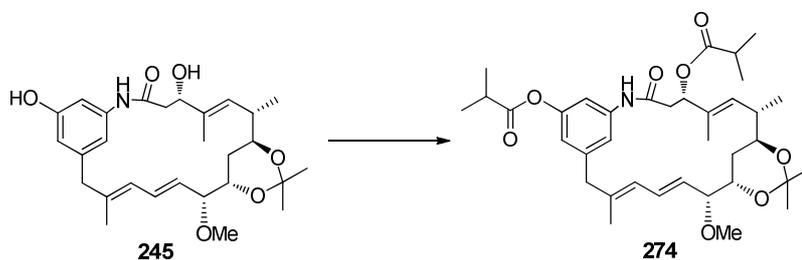
C-10), 82.4 (s, C-9), 79.2 (d, C-7), 74.3 (d, C-3), 56.5 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.4 (t, C-2), 38.7 (d, C-6), 36.1 (t, C-8), 35.2 (d, C-3-Acyl), 19.5 (q, 2x C-3-Acyl), 18.2 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 16.0 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 295 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.64 (s, 1H, arom.-H), 6.61 (s, 1H, arom.-H) 6.61-6.56 (m, 1H, 12-H), 6.43 (s, 1H, arom.-H) 5.89 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, 13-H), 5.45-5.37 (m, 1H, 11-H), 5.45-5.37 (m, 1H, 3-H), 5.13 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, 5-H), 4.09 (dd, 1H, *J* = 10.8, 2.1 Hz, 7-H), 3.58-3.55 (m, 1H, 10-H), 3.31 (unter CHD₂OD, 1H, 15-H_a), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, 10-OMe), 3.22-3.19 (m, 1H, 15-H_b), 2.68-2.65 (m, 1H, 2-H_a), 2.65-2.59 (m, 1H, 3-Acyl), 2.59-2.53 (m, 1H, 6-H), 2.53-2.47 (m, 1H, 2-H_b), 1.83 (s, 3H, 14-Me) 1.61 (dd, 1H, *J* = 12.6, 2.1 Hz, 8-H_a), 1.48 (s, 3H, 4-Me), 1.39-1.33 (m, 1H, 8-H_b), 1.17 (d, 6H, *J* = 7.0 Hz, 3-Acyl), 1.09 (d, 3H, *J* = 6.2 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 295 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 173.5 (s, 3-Acyl), 170.3 (s, C-1), 159.5 (s, C-18), 155.8 (s, C-Carbamat), 143.9 (s, C-16), 141.9 (s, C-20), 140.0 (s C-14), 136.8 (s, C-4), 134.4 (d, C-12), 128.3 (d, C-11), 127.8 (d, C-5), 125.9 (d, C-13), 118.8 (d, C-arom.), 116.2 (d, C-arom.), 111.0 (d, C-arom.), 89.1 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.6 (d, C-7), 74.6 (d, C-3), 56.8 (q, C-10-OMe), 46.6 (t, C-15), 38.5 (d, C-6), 37.3 (t, C-2), 36.4 (t, C-8), 35.3 (d, C-3-Acyl), 19.6 (q, 2x C-3-Acyl), 19.3 (q, C-6-Me), 17.3 (q, C-14-Me), 14.9 (q, C-4-Me) ppm;

UPLC-MS *t_R* = 2.19 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₀H₄₀N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 579.2682, gefunden: 579.2684.

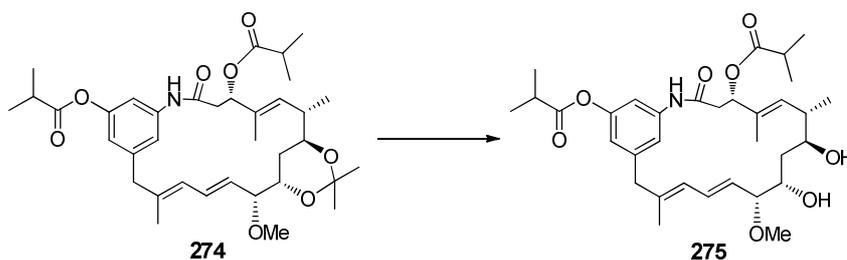
Bisacyliertes Acetonid-geschütztes Proansamitocin-Derivat 274



Acetonid-geschütztes Proansamitocin-Derivat **245** (1.0 mg, 2.1 μmol, 1 Äq.) wird in CH₂Cl₂ abs. (2 mL) gelöst, mit DMAP (0.5 mg, 4.1 μmol, 2 Äq.), DIC (2 μL, 12.3 μmol, 6 Äq.) und *iso*-Buttersäure (1.2 μL, 12.3 μmol, 6 Äq.) versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Nach dieser

Zeit wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert, mit Essigsäureethylester nachgespült und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräparative HPLC (C-18-Phase, Gradient H₂O/ CH₃CN = 90/10 → 20/80 in 80 min, dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Bisacyliertes Acetonid-geschütztes Proansamitocin-Derivat **274** (1.2 mg, 1.9 μmol, 90 %)(t_R = 94.80 min) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): δ 7.81 (s, 1H, 21-H), 6.68 (s, 1H, 17-H), 6.64 (s, 1H, 19-H), 6.62 (dd, 1H, *J* = 15.3, 10.9 Hz, 12-H), 6.10 (d, 1H, *J* = 10.9 Hz, 13-H), 5.67 (dd, 1H, *J* = 15.3, 8.1 Hz, 11-H), 5.47 (dd, 1H, *J* = 9.9, 1.8 Hz, 3-H), 5.33 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz, 5-H), 4.10 (ddd, 1H, *J* = 9.9, 6.8, 2.1 Hz, 9-H), 3.74 (dd, 1H, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 10-H), 3.54 (ddd, 1H, *J* = 10.1, 7.5, 6.3 Hz, 7-H), 3.42 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter MeOH, 1H, 15-H_b), 2.85 (dd, 1H, *J* = 15.4, 9.9 Hz, 2-H_a), 2.85 (sept, 1H, *J* = 7.0 Hz, 18-Acyl), 2.69 (dd, 1H, *J* = 15.4, 1.8 Hz, 2-H_b), 2.57 (sept, 1H, *J* = 6.9 Hz, 3-Acyl), 2.51 (ddq, 1H, *J* = 9.1, 7.5, 6.9 Hz, 6-H), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.71-1.66 (m, 1H, 8-H_a), 1.69 (s, 3H, 4-Me), 1.48 (ddd, 1H, *J* = 12.5, 9.9, 6.3 Hz, 8-H_b), 1.36 (s, 3H, Acetonid), 1.35 (s, 3H, Acetonid), 1.29 (d, 6H, *J* = 7.0 Hz, 18-Acyl), 1.16 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz, 3-Acyl), 1.15 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz, 3-Acyl), 0.91 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz, 6-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, 283 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ 177.7 (s, 3-Acyl), 177.2 (s, 18-Acyl), 169.8 (s, C-1), 152.2 (s, C-18), 143.9 (s, C-16), 140.9 (s, C-20), 138.8 (s, C-14), 133.8 (s, C-4), 133.2 (d, C-12), 129.6 (d, C-5), 129.0 (d, C-13), 127.5 (d, C-11), 118.7 (d, C-17), 117.6 (d, C-21), 111.0 (d, C-19), 101.8 (s, Acetonid), 84.8 (d, C-10), 74.7 (d, C-3), 71.5 (d, C-7), 70.0 (d, C-9), 56.8 (q, C-10-OMe), 46.0 (t, C-15), 40.1 (t, C-2), 38.9 (d, C-6), 35.3 (d, C-3-Acyl), 35.2 (d, C-18-Acyl), 32.6 (t, C-8), 24.8 (t, Acetonid), 24.6 (t, Acetonid), 19.4 (q, C-3-Acyl), 19.3 (q, C-18-Acyl), 17.2 (q, C-6-Me), 17.0 (q, C-14-Me), 15.0 (q, C-4-Me) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.96 min; **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C₃₆H₅₁NNaO₈ [M+Na]⁺: 648.3512, gefunden: 648.3511.

Bisacyliertes-Proansamitocin-Derivat 275

Bisacyliertes Proansamitocin-Derivat **274** (6.3 mg, 10.23 μmol , 1 Äq.) wird in CH_3OH abs. (4 mL) gelöst, mit PPTS (2 mg) versetzt und 5 h bei RT gerührt. Anschließend wird Phosphatpuffer zugegeben und die wässrige Phase wird viermal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Bisacyliertes-Proansamitocin-Derivat **275** (5.3 mg, 9.05 μmol , 88 %) ($t_{\text{R}} = 80.00$ min) als farbloser Feststoff erhalten.

Konformer 1:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.86 (s, 1H, 21-H), 6.68 (s, 1H, 17-H), 6.65 (s, 1H, 19-H), 6.56 (dd, 1H, $J = 15.1, 10.9$ Hz, 12-H), 6.07 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, 13-H), 5.65 (dd, 1H, $J = 15.2, 8.0$ Hz, 11-H), 5.37 (dd, 1H, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 3-H), 5.32 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz, 5-H), 4.11-4.09 (m, 1H, 9-H), 3.65 (dd, 1H, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 10-H), 3.59 (dd, 1H, $J = 9.3, 8.2$ Hz, 7-H), 3.39 (d, 1H, $J = 14.9$ Hz, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter MeOH, 1H, 15- H_b), 2.84-2.79 (m, 1H, 18-Acyl), 2.84-2.79 (m, 1H, 2- H_a), 2.75-2.71 (m, 1H, 2- H_b), 2.59 (hep, 1H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 2.54-2.49 (m, 1H, 6-H), 1.76 (s, 3H, 14-Me), 1.69 (s, 3H, 4-Me), 1.54 (dd, 1H, $J = 13.5, 10.9$ Hz, 8- H_a), 1.29 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, 18-Acyl), 1.24-1.19 (m, 1H, 8- H_b), 1.15 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, 3-Acyl), 0.92 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 6-Me); **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 177.5 (s, 3-Acyl), 177.1 (s, 18-Acyl), 170.0 (s, C-1), 152.2 (s, C-18), 143.8 (s, C-16), 140.6 (s, C-20), 138.1 (s, C-14), 134.6 (s, C-4), 131.6 (d, C-12), 129.2 (d, C-13), 128.8 (d, C-11), 128.6 (d, C-5), 118.8 (d, C-17), 118.2 (d, C-21), 111.3 (d, C-19), 87.4 (d, C-10), 74.7 (d, C-3), 73.2 (d, C-7), 71.4 (d, C-9), 56.8 (q, C-10-OMe), 45.9 (t, C-15), 40.6 (t, C-2), 40.5 (d, C-6), 37.9 (t,

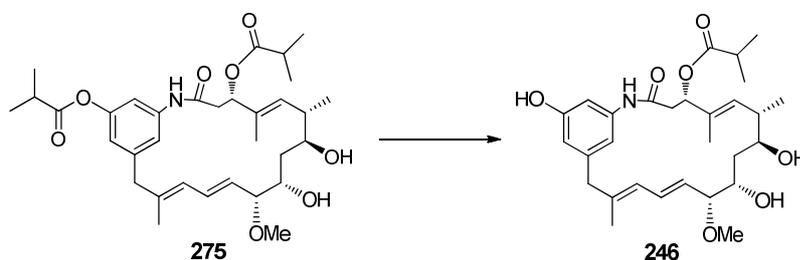
C-8), 35.3 (d, C-3-Acyl), 35.2 (d, C-18-Acyl), 19.4 (q, C-3-Acyl), 19.3 (q, C-18-Acyl), 18.5 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 15.0 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

Ein zweites Konformer ist im NMR-Spektrum erkennbar, die Signalintensität ist jedoch für eine Zuordnung zu gering.

UPLC-MS $t_R = 2.68$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{33}H_{47}NNaO_8 [M+Na]^+$: 608.3199, gefunden: 608.3193.

Monoacyliertes Proansamitocin-Derivat 246



Bisacyliertes Proansamitocin-Derivat **275** (4.5 mg, 7.68 μ mol, 1 Äq.) wird in CH_3OH (3 mL) gelöst und tropfenweise mit 1M $NaHCO_3$ -Lösung versetzt bis die Reaktion beendet ist.

Anschließend wird die Mischung mit etwas H_2O versetzt und die wässrige Phase mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient H_2O/CH_3OH 90/10 \rightarrow 100 CH_3OH in 80 min dann 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Monoacyliertes Proansamitocin-Derivat **246** (3.6 mg, 6.98 μ mol, 91 %) ($t_R = 67.31$ min) als farbloser Feststoff erhalten.

Konformer 1:

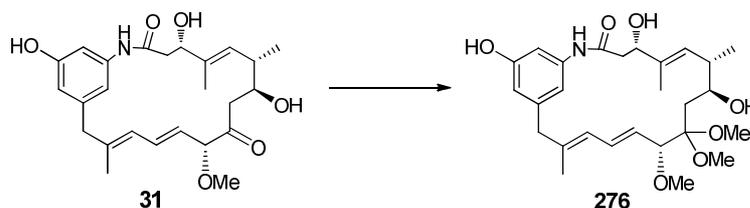
1H -NMR (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 7.40 (s, 1H, 21-H), 6.54 (dd, 1H, $J = 15.7, 11.3$ Hz, 12-H), 6.40-6.39 (m, 1H, 17-H), 6.40-6.93 (m, 1H, 19-H), 6.03 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, 13-H), 5.61 (dd, 1H, $J = 15.2, 7.8$ Hz, 11-H), 5.35 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.3$ Hz, 3-H), 5.31 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 5-H), 4.08 (dd, 1H, $J = 10.1, 1.3$ Hz, 9-H), 3.65 (dd, 1H, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 10-H), 3.58 (dd, 1H, $J = 10.0, 7.9$ Hz, 7-H), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (unter

CHD₂OD, 1H, 15-H_a), 3.21 (d, 1H, $J = 14.7$ Hz, 15-H_b), 2.78 (dd, 1H, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 2-H_a), 2.71 (dd, 1H, $J = 14.2, 8.1$ Hz, 2-H_b), 2.58 (hep, 1H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 2.54-2.46 (m, 1H, 6-H), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.68 (s, 3H, 4-Me), 1.53 (dd, 1H, $J = 13.4, 10.7$ Hz, 8-H_a), 1.22 (dd, 1H, $J = 13.3, 11.2$ Hz, 8-H_b), 1.15 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 0.91 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, 6-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.5 (s, 3-Acyl), 169.8 (s, C-1), 158.7 (s, C-18), 143.4 (s, C-16), 140.6 (s, C-20), 138.5 (s, C-14), 134.7 (s, C-4), 131.7 (d, C-12), 128.7 (d, C-13), 128.6 (d, C-5), 128.4 (d, C-11), 113.2 (d, C-17), 112.5 (d, C-21), 105.0 (d, C-19), 87.4 (d, C-10), 74.8 (d, C-3), 73.3 (d, C-7), 71.5 (d, C-9), 56.8 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 40.7 (t, C-2), 40.5 (d, C-6), 37.9 (t, C-8), 35.3 (d, C-3-Acyl), 19.5 (q, C-3-Acyl_a), 19.4 (q, C-3-Acyl_b), 18.5 (q, C-6-Me), 17.1 (q, C-14-Me), 15.0 (q, C-4-Me) ppm;

Konformer 2:

¹H-NMR (500 MHz, 283 K, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.57 (s, 1H, 21-H), 6.57 (s, 1H, 17-H), 6.43 (dd, 1H, $J = 15.5, 11.2$ Hz, 12-H), 6.40 (s, 1H, 19-H), 5.73 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, 13-H), 5.46 (dd, 1H, $J = 14.9, 8.9$ Hz, 11-H), 5.39 (ps.d, 1H, $J = 11.2$ Hz, 3-H), 5.06 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, 5-H), 4.09-4.07 (m, 1H, 9-H), 3.44 (dd, 1H, $J = 9.3, 1.7$ Hz, 10-H), 3.43-3.35 (m, 1H, 7-H), 3.31 (unter MeOH, 1H, 15-H_a), 3.28 (s, 3H, 10-OMe), 3.18 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, 15-H_b), 2.73-2.69 (m, 1H, 2-H_a), 2.58 (hep, 1H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 2.50-2.49 (m, 1H, 2-H_b), 2.24-2.19 (m, 1H, 6-H), 1.84 (s, 3H, 14-Me), 1.45 (s, 3H, 4-Me), 1.31 (dd, 1H, $J = 14.0, 10.8$ Hz, 8-H_a), 1.15 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz, 3-Acyl), 0.95 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 6-Me) 0.94-0.92 (m, 1H, 8-H_b) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, 283 K, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.0 ppm): δ 177.5 (s, 3-Acyl), 173.8 (s, C-1), 159.7 (s, C-18), 143.7 (s, C-16), 140.7 (s, C-14), 139.9 (s, C-20), 134.1 (s, C-4), 132.5 (d, C-12), 129.6 (d, C-5), 128.8 (d, C-11), 126.3 (d, C-13), 118.8 (d, C-arom.), 116.2 (d, C-arom.), 110.8 (d, C-19), 87.7 (d, C-10), 74.7 (d, C-3), 72.6 (d, C-7), 69.9 (d, C-9), 56.3 (q, C-10-OMe), 46.3 (t, C-15), 41.1 (d, C-6), 40.6 (t, C-8), 37.5 (t, C-2), 35.3 (d, C-3-Acyl), 19.6 (q, C-3-Acyl_a), 19.4 (q, C-3-Acyl_b), 18.3 (q, C-6-Me), 17.6 (q, C-14-Me), 14.8 (q, C-4-Me) ppm;

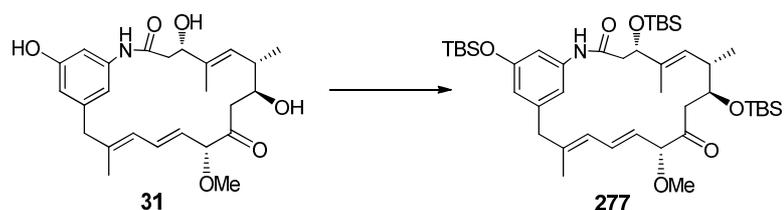
UPLC-MS $t_R = 2.32$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₉H₄₁NNaO₇ [M+Na]⁺: 538.2781, gefunden: 538.2787.

Acetal-geschütztes Proansamitocin-Derivat **276**

Proansamitocin **31** (5 mg, 11.3 μmol , 1 Äq.) wird in CH_3OH (2 mL) gelöst, mit Trimethylorthoformiat (1,2 μL , 11.3 μmol , 1 Äq.) und Camphersulfonsäure (0.17 mg, 0.7 μmol , 0.6 Äq.) versetzt und 2 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wird Phosphatpuffer (2 mL) zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 90/10 \rightarrow 20/80 in 80 min dann 20/80 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird Acetal-geschütztes-Proansamitocin-Derivat **276** (0.6 mg, 1.2 μmol , 11 %) ($t_{\text{R}} = 51.27$ min) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.96 (s, 1H, arom.-H), 6.48 (dd, 1H, $J = 15.3, 11.2$ Hz, 12-H), 6.43 (s, 1H, arom.-H), 6.39 (s, 1H, arom.-H), 6.08 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, 13-H), 5.60 (dd, 1H, $J = 15.3, 2.8$ Hz, 11-H), 5.42 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, 5-H), 4.48 (dd, 1H, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 3-H), 4.06-4.04 (m, 1H, 7-H), 4.06-4.04 (m, 1H, 10-H), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.39 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, 15- H_a), 3.33 (s, 3H, OMe), 3.25 (s, 3H, OMe), 3.13 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, 15- H_b), 2.59-2.57 (m, 2H, 2-H), 2.54-2.48 (m, 1H, 6-H), 1.93-1.89 (m, 1H, 8- H_a), 1.71 (dd, 1H, $J = 14.2, 9.4$ Hz, 8- H_b), 1.65 (s, 3H, 4-Me), 1.51 (s, 3H, 14-Me), 0.66 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ Messung aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich.

UPLC-MS $t_{\text{R}} = 2.37$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NNaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 512.2624, gefunden: 512.2618.

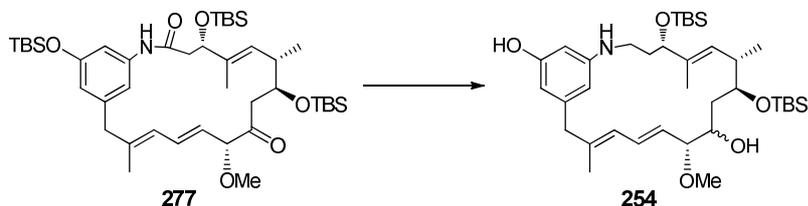
TBS-geschütztes Proansamitocin 277

Proansamitocin **231** (10 mg, 0.023 mmol, 1 Äq.) wird in CH_2Cl_2 abs. (7 mL) gelöst, mit 2,6-Lutidin (13 μL , 0.115 mmol, 5 Äq.) versetzt, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit TBSOTf (20 μL 0.092 mmol, 4 Äq.) versetzt. Anschließend wird die Mischung 2 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wird wieder auf 0 °C gekühlt und die Reaktion durch die Zugabe von Phosphatpuffer beendet. Die wässrige Phase wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel (PE/EE = 5:1) wird TBS-geschütztes Proansamitocin **277** (16.7 mg, 0.021 mmol, 92 %) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, Benzol- d_6 , Benzol- $\text{d}_5 = 7.16$ ppm): δ 7.72 (s, 1H, 21-H), 7.49 (br.s, 1H, NH), 6.61 (dd, 1H, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 12-H), 6.55 (s, 1H, 17-H), 6.55 (s, 1H, 19-H), 5.96 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 13-H), 5.54 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 5-H), 5.48 (dd, 1H, $J = 15.1, 6.8$ Hz, 11-H), 4.37-4.32 (m, 1H, 3-H), 4.37-4.32 (m, 1H, 7-H), 4.06 (d, 1H, $J = 6.8$, 10-H), 3.13 (s, 3H, 10-OMe), 3.11 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, 15- H_a), 3.00 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, 15- H_b), 2.59-2.55 (m, 2H, 8-H), 2.59-2.55 (m, 1H, 2- H_a), 2.49-2.44 (m, 1H, 6-H), 2.34 (dd, 1H, $J = 13.7, 8.2$ Hz, 2- H_b), 1.62 (s, 3H, 14-Me), 1.57 (s, 3H, 4-Me), 1.02 (s, 9H, TBS), 0.99 (s, 9H, TBS), 0.91 (s, 9H, TBS), 0.65 (d, 3H, $J = 6.1$ Hz, 6-Me), 0.25 (s, 6H, TBS), 0.11 (s, 3H, TBS), 0.06 (s, 6H, TBS), 0.03 (s, 3H, TBS) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 295 K, Benzol- d_6 , Benzol- $\text{d}_6 = 128.06$ ppm): δ 204.6 (s, C-9), 167.8 (s, C-1), 156.5 (s, C-18), 142.0 (s, C-16), 140.1 (s, C-20), 140.1 (s, C-14), 135.1 (s, C-4), 130.7 (d, C-12), 129.7 (d, C-5), 126.4 (d, C-13), 126.4 (d, C-11), 116.6 (d, C-17), 112.6 (d, C-21), 110.1 (d, C-19), 88.8 (d, C-10), 75.3 (d, C-3), 71.9 (d, C-7), 56.8 (q, C-10-OMe), 45.8 (t, C-15), 44.6 (t, C-2), 42.6 (t, C-8), 37.0 (d, C-6), 26.2 (q, TBS), 26.1 (q, TBS), 26.0 (q, TBS), 18.5 (s, TBS), 18.4 (s, TBS), 18.2 (s, TBS), 17.1 (q, C-14-Me), 14.6 (q, C-6-Me), 12.3 (q, C-4-Me), -4.2 (q, 2xTBS), -4.2 (q, TBS), -4.5 (q, TBS),

-4.7 (q, TBS), -5.0 (q, TBS) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 3.89$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $C_{43}H_{76}NO_6Si_3$ $[M+H]^+$: 786.4981, gefunden: 786.4987.

TBS-geschütztes 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **254**



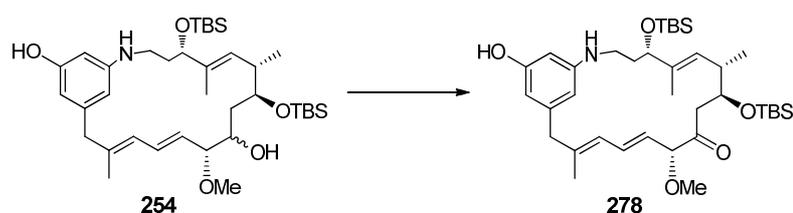
TBS-geschütztes Proansamitocin **277** (10 mg, 0.0127 mmol, 1 Äq.) gelöst in Benzol (1 mL) wird bei 0 °C zu einer Suspension aus $LiAlH_4$ (2.4 mg, 0.0636 mmol, 5 Äq.) in Diethylether (5 mL) getropft. Anschließend wird die Mischung für 20 Minuten bei 45 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dieser Zeit wird auf 0 °C gekühlt, Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (2 mL) zugegeben und für 30 min gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung über semipräp. HPLC (CN-Phase, Gradient $H_2O/CH_3CN = 70/30 \rightarrow 70/30$ in 85 min dann 100 % CH_3CN 10 min halten; Fluss 2.25 mL/min) wird TBS-geschütztes 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **254** (2.2 mg, 3.4 μ mol, 26 %) ($t_R = 61.73$ und 64.05 min) als farbloser Feststoff erhalten. (Diastereomergemisch)

Hauptdiastereomer (7,9-*anti*)

1H -NMR (500 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 6.49 (dd, 1H, $J = 15.1, 10.9$ Hz, 12-H), 6.05 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.2$ Hz, 21-H), 6.03 (dd, 1H, $J = 2.0, 1.9$ Hz, 17-H), 6.00 (dd, 1H, $J = 1.9, 1.2$ Hz, 19-H), 5.92 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, 13-H), 5.29 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, 5-H), 5.24 (dd, 1H, $J = 15.1, 9.7$ Hz, 11-H), 3.90 (dd, 1H, $J = 9.5, 0.8$ Hz, 3-H), 3.69 (ddd, 1H, $J = 9.7, 8.2, 3.2$ Hz, 9-H), 3.44 (d, 1H, $J = 10.0, 6.7, 1.5$ Hz, 7-H), 3.37 (dd, 1H, $J = 9.7, 8.2$ Hz, 10-H), 3.27 (s, 3H, 10-OMe), 3.27 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, 15- H_a), 3.24 (ddd, 1H, $J = 11.2, 4.6, 4.3$ Hz, 1- H_a), 3.07 (ddd, 1H, $J = 11.2, 8.2, 7.4$ Hz, 1- H_b), 3.00 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, 15- H_b), 2.27 (dq, 1H, $J = 9.7, 7.3, 6.7$ Hz, 6-H), 1.81 (dddd, 1H, $J = 13.6, 7.4, 4.6, 0.8$ Hz, 2- H_a), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.70-1.67 (m, 1H, 8- H_a), 1.44 (s, 3H, 4-Me), 1.36 (dddd, 1H, $J = 13.6, 9.5, 8.2, 4.3$ Hz, 2- H_b), 1.14 (ddd, 1H, $J = 14.4, 10.0, 3.2$ Hz, 8- H_b), 0.99

(d, 3H, $J = 7.3$ Hz, 6-Me), 0.99 (s, 9H, TBS), 0.98 (s, 9H, TBS), 0.18 (s, 6H, TBS), 0.10 (s, 3H, TBS), 0.06 (s, 3H, TBS) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, 283 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 157.3 (s, C-18), 150.8 (s, C-20), 143.0 (s, C-16), 141.8 (s, C-14), 139.5 (s, C-4), 133.2 (d, C-12), 128.6 (d, C-11), 126.8 (d, C-5), 125.6 (d, C-13), 111.5 (d, C-17), 105.9 (d, C-19), 105.8 (d, C-21), 89.1 (d, C-10), 77.7 (d, C-7), 75.6 (d, C-9), 75.1 (d, C-3), 56.5 (q, C-10-OMe), 47.4 (t, C-15), 42.1 (t, C-1), 40.4 (d, C-6), 38.2 (t, C-8), 37.3 (t, C-2), 26.5 (q, 2xTBS), 26.2 (q, 2xTBS), 19.1 (s, TBS), 19.1 (s, TBS), 17.9 (q, C-6-Me), 16.7 (q, C-14-Me), 15.1 (q, C-4-Me), -4.1 (q, TBS), -4.2 (q, TBS), -4.2 (q, TBS), -4.7 (q, TBS) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 3.44$ und 3.73 min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{NO}_5\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 660.4480, gefunden: 660.4484.

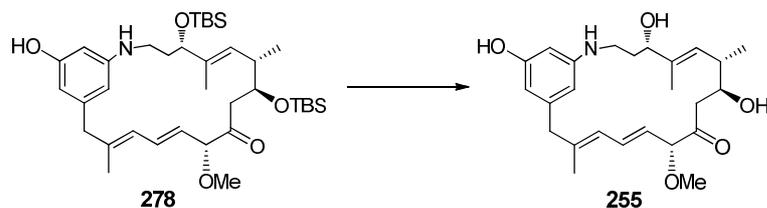
TBS-geschütztes-1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat 278



TBS-geschütztes 1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **254** (0.2 mg, 0.3 μmol , 1 Äq.) wird in CH_2Cl_2 (1 mL) gelöst, mit einer Spatelspitze DMP und Natriumhydrogencarbonat versetzt und für 60 min bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wird die Lösung mit Natriumthiosulfat-Lsg. ges. (2 mL) versetzt und für 30 min gerührt. Die Phasen werden anschließend getrennt, die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt.

UPLC-MS $t_R = 3.54$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{NO}_5\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 658.4323 gefunden: 658.4305.

1-Desoxy Proansamitocin-Derivat 255

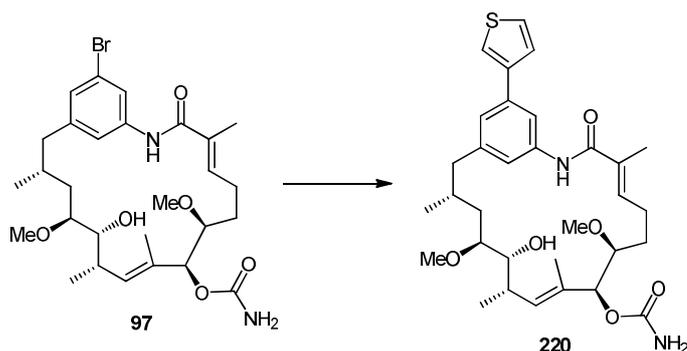


TBS-geschütztes-1-Desoxy-Proansamitocin-Derivat **278** (0.2 mg, 0.3 μmol , 1 Äq.) wird in THF (0.5 mL) gelöst, mit TBAF in THF (0.2 mg, 0.7 μmol , 2.3 Äq.) versetzt und 6 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wird die Mischung mit Phosphatpuffer versetzt und mehrmals mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

UPLC-MS $t_{\text{R}} = 1.75$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NO}_5[\text{M}+\text{H}]^+$: 430.2593 gefunden: 430.2599.

6.4.2 Semisyntheseexperimente mit Geldanamycin-Derivaten

17-Desmethoxy-18-thiophenyl-reblastatin 220



17-Desmethoxy-18-brom-reblastatin **97** (0.8 mg, 1.4 μmol , 1 Äq.) wird in entgastem DME/ H_2O -Gemisch (3:1, 1 mL) gelöst, mit K_2CO_3 (0.3 mg, 2 μmol , 1.5 Äq.), Thiophen-3-boronsäure (0.2 mg, 1.5 μmol , 1.1 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1 mg, 0.1 μmol , 5 mol%) versetzt und 24 h bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird H_2O (5 mL) und Essigsäureethylester (5 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit

Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über zwei semipräp. HPLC-Läufe (1. (C-18-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 \rightarrow 70/30 in 40 min, dann 70/30 \rightarrow 65/35 in 10 min, dann 65/35 \rightarrow 45/55 in 20 min, dann 45/55 \rightarrow 35/65 in 15 min, dann CH_3CN 10 min halten; Fluss 2.50 mL/min) 2. (CN-Phase, Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 \rightarrow 70/30 in 40 min, dann 70/30 \rightarrow 65/35 in 10 min, dann 65/35 \rightarrow 45/55 in 20 min, dann 45/55 \rightarrow 35/65 in 15 min, dann CH_3CN 10 min halten; Fluss 2.50 mL/min)) gereinigt. Es werden 17-Desmethoxy-18-thiophenyl-reblastatin **220** (0.5 mg, 0.8 μmol , 62%) und 17-Desmethoxy-18-thiophenyl-7-hydroxy-reblastatin **219** (0.2 mg, 0.4 μmol , 30%) als weiße Feststoffe erhalten.

17-Desmethoxy-18-thiophenyl-reblastatin **220**

1. semipräp. HPLC ($t_R = 84.29$ min); 2. semipräp. HPLC ($t_R = 56.77$ min)

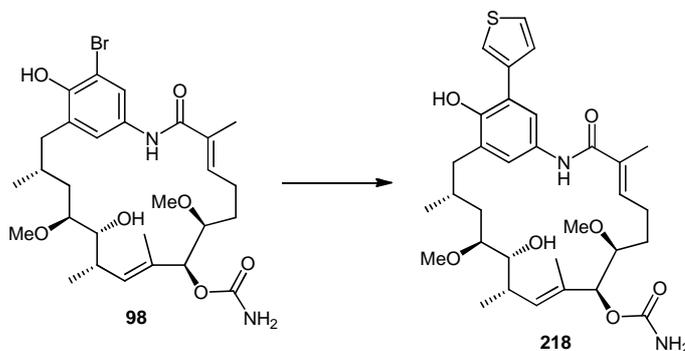
(es fehlen die Signale von C-1, C-20, C-16, C-18, C-8, C-14-Me, C-10-Me aufgrund zu geringer Substanzmengen)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.68 (dd, 1H, $J = 2.7, 1.3$ Hz, 22-H), 7.50 (dd, 1H, $J = 5.0, 2.7$ Hz, 24-H), 7.49 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.3$ Hz, 25-H), 7.35 (br. s, 1H, 19-H), 7.26 (s, 1H, 17-H), 6.70 (s, 1H, 21-H), 5.71 (br. s, 1H, 3-H), 5.16 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, 9-H), 5.84 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, 7-H), 3.61 (dd, 1H, $J = 9.8, 1.9$ Hz, 11-H), 3.41 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (s, 3H, 6-OMe), 3.26-3.21 (m, 1H, 6-H), 3.07-3.05 (m, 1H, 12-H), 2.80 (dd, 1H, $J = 12.5, 2.2$ Hz, 15- H_a), 2.62 (dd, 1H, $J = 12.5, 4.8$ Hz, 15- H_b), 2.33-2.24 (m, 1H, 10-H), 2.33-2.24 (m, 1H, 4- H_a), 2.15-2.04 (m, 1H, 4- H_b), 2.15-2.04 (m, 1H, 14-H), 1.88 (s, 3H, 2-Me), 1.72 (ddd, 1H, $J = 13.0, 10.3, 3.5$ Hz, 13- H_a), 1.29 (s, 3H, 8-Me), 1.15-1.09 (m, 1H, 5- H_a), 1.06-1.00 (m, 1H, 5- H_b), 0.99 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, 10-Me), 0.94-0.87 (m, 1H, 13- H_b), 0.77 (d, 3H, $J = 5.4$ Hz, 14-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, 295 K, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.0$ ppm): δ 159.0 (s, COONH_2), 137.6 (s, C-23), 135.9 (d, C-3), 134.1 (d, C-9), 132.2 (s, C-2), 127.4 (d, C-25), 127.1 (d, C-24), 124.9 (d, C-arom.), 124.4 (d, C-arom), 121.7 (d, C-22), 118.9 (d, C-arom.), 81.4 (d, C-7), 81.2 (d, C-12), 80.5 (d, C-6), 73.5 (d, C-11), 59.9 (q, C-12-OMe), 58.4 (q, C-6-OMe), 43.8 (t, C-15), 36.1 (d, C-10), 31.1 (t, C-13), 29.9 (d, C-5), 28.6 (t, C-14), 24.2 (t, C-4), 14.0 (q, C-2Me), 11.9 (q, C-8Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.45$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 607.2818, gefunden: 607.2808.

17-Desmethoxy-18-thiophenyl-7-hydroxy-reblastatin **219**

1. semipräp. HPLC ($t_R = 83.84$ min); 2. semipräp. HPLC ($t_R = 51.55$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, 323 K, THF- d_8 , THF- $d_7 = 1.73$ ppm): δ 8.53 (s, 1H, NH), 7.56 (br.s, 1H, arom.-H), 7.56 (dd, 1H, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 22-H), 7.42 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.8$ Hz, 24-H), 7.41 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.8$ Hz, 25-H), 7.14 (s, 1H, arom.-H), 6.78 (s, 1H, arom.-H), 5.93 (dd, 1H, $J = 6.4, 6.2$ Hz, 3-H), 5.20 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 9-H), 3.76 (dd, 1H, $J = 6.8, 4.1$ Hz, 7-H), 3.49 (ddd, 1H, $J = 11.2, 4.3, 2.6$ Hz, 11-H), 3.42 (s, 3H, 12-OMe), 3.33 (s, 3H, 6-OMe), 3.27 (d, 1H, $J = 4.3$ Hz, 7-OH), 3.15-3.10 (m, 1H, 6-H), 3.15-3.10 (m, 1H, 12-H), 2.70 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.9$ Hz, 15- H_a), 2.57 (dd, 1H, $J = 13.2, 5.3$ Hz, 15- H_b), 2.50 (dq, 1H, $J = 8.1, 6.9, 2.6$ Hz, 10-H), 2.27-2.24 (m, 1H, 4- H_a), 2.15-2.09 (m, 1H, 4- H_b), 2.07-2.02 (m, 1H, 14-H), 1.82 (s, 3H, 2-Me), 1.66-1.65 (m, 1H, 13- H_a), 1.37 (s, 3H, 8-Me), 1.35-1.32 (m, 2H, 5-H), 1.22 (ddd, 1H, $J = 13.7, 8.5, 3.6$ Hz, 13- H_b), 0.97 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz, 10-Me), 0.90 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, 14-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** $t_R = 2.50$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 564.2760, gefunden: 564.2754.

17-Des-*O*-methyl-18-thiophenyl-reblastatin **218**

17-Des-*O*-methyl-18-bromreblastatin **98** (1.2 mg, 2.0 μmol , 1 Äq.) wird in entgastem DME/ H_2O -Gemisch (3:1, 1 mL) gelöst, mit K_2CO_3 (0.4 mg, 3 μmol , 1.5 Äq.), Thiophen-3-boronsäure (0.3 mg, 2.2 μmol , 1.1 Äq.) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.1 mg, 0.1 μmol , 5 mol%) versetzt und 24 h bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird H_2O (5 mL) und Essigsäureethylester (5 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über semipräp. HPLC

(C-18-Phase, Gradient H₂O/ CH₃CN 95/5 → 75/25 in 40 min, dann 75/25 → 70/30 in 20 min, dann 70/30 → 60/40 in 10 min, dann 60/40 → 50/50 in 15 min, dann CH₃CN 10 min halten; Fluss 2.50 mL/min) gereinigt. Es werden 17-Des-O-methyl-18-thiophenyl-reblastatin **218** (0.3 mg, 0.5 μmol, 25 %), 17-Des-O-methyl-18-thiophenyl-7-hydroxy-reblastatin **217** (Spuren), 17-Des-O-methyl-18-brom-7-hydroxy-reblastatin **269** (Spuren) und reisoliertes Edukt **98** (0.5 mg, 0.8 μmol, 42 %) als farblose Feststoffe erhalten.

17-Des-O-methyl-18-thiophenyl-reblastatin **218**

semipräp. HPLC ($t_R = 56.96$ min)

¹H-NMR (500 MHz, 323 K, THF-d₈, THF-d₇ = 1.73 ppm): δ 8.16 (dd, 1H, $J = 3.0, 1.1$ Hz, 22-H), 7.51 (dd, 1H, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 25-H), 7.43 (dd, 1H, $J = 5.1, 3.0$ Hz, 24-H), 7.29 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 19-H), 6.64 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, 21-H), 6.24 (dd, 1H, $J = 7.0, 6.2$ Hz, 3-H), 5.51 (br. s, 2H, NH₂), 5.35 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, 9-H), 4.95 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, 7-H), 3.40 (s, 3H, 12-OMe), 3.35 (ddd, 1H, $J = 8.2, 4.2, 3.8$ Hz, 11-H), 3.32 (ddd, 1H, $J = 8.4, 3.7, 2.6$ Hz, 6-H), 3.29 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz, 11-OH), 3.26 (s, 3H, 6-OMe), 3.04 (ddd, 1H, $J = 8.2, 4.7, 3.5$ Hz, 12-H), 2.45-2.39 (m, 1H, 15-H_a), 2.45-2.39 (m, 1H, 10-H), 2.45-2.39 (m, 1H, 4-H_a), 2.28-2.20 (m, 1H, 15-H_b), 2.28-2.20 (m, 1H, 4-H_b), 1.90-1.88 (m, 1H, 14-H), 1.53 (ddd, 1H, $J = 14.1, 9.0, 4.7$ Hz, 13-H_a), 1.46 (s, 3H, 8-Me), 1.43-1.36 (m, 2H, 5-H), 1.30 (s, 3H, 2-Me), 1.21-1.13 (m, 1H, 13-H_b), 0.94 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, 10-Me), 0.93 (d, 3H, $J = 7.6$ Hz, 14-Me) ppm; **¹³C-NMR** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** $t_R = 2.27$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₂H₄₄N₂O₇NaS [M+Na]⁺: 623.2767, gefunden: 623.2783.

17-Des-O-methyl-18-thiophenyl-7-hydroxy-reblastatin **217**

semipräp. HPLC ($t_R = 64.15$ min);

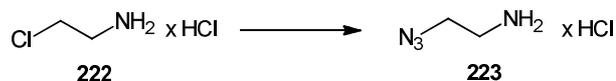
UPLC-MS $t_R = 2.31$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₃₁H₄₃NO₆NaS [M+Na]⁺: 580.2709, gefunden: 580.2725.

17-Des-O-methyl-18-brom-7-hydroxy-reblastatin **269**

semipräp. HPLC ($t_R = 53.52$ min);

UPLC-MS $t_R = 2.33$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für C₂₇H₄₀NO₆NaBr [M+Na]⁺: 576.1937, gefunden: 576.1938.

2-Azidoethylamin Hydrochlorid **223**

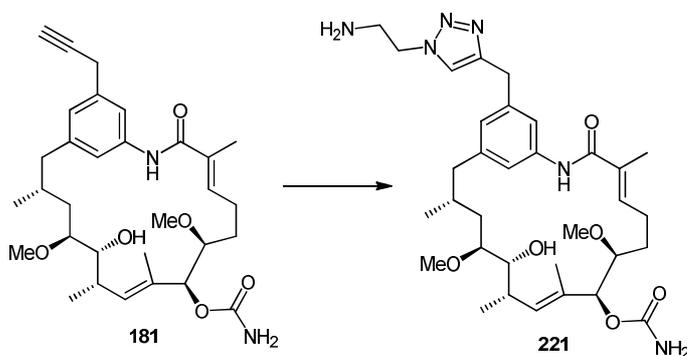


2-Chlorethylamin Hydrochlorid **222** (1 g, 8.62 mmol, 1 Äq.) wird in Wasser (20 mL) gelöst, mit NaN_3 (1.86 g, 25.86 mmol, 3 Äq.) versetzt und 2 d bei 70°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wird mit KOH auf ein basischer pH-Wert eingestellt und mehrmals mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden anschließend mit HCl (15 mL, 2 M) extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend im Vakuum eingengt. Es wird 2-Azidoethylamin Hydrochlorid **223** (0.97 g, 7.93 mmol, 92 %) als farblose Kristalle erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O , DHO = 4.79 ppm): δ 3.76 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH_2), 3.22 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz, CH_2) ppm; **HRMS (EI)** m/z berechnet für $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4$ $[\text{M}]^+$: 87.0671, gefunden: 87.0671;

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.¹⁷⁸

17-Desmethoxy-Reblastatin-Derivat **221**



17-Desmethoxy-18-propargyl-reblastatin **181** (0.7 mg, 1.295 μmol , 1 Äq.) wird in einem Gemisch aus $^t\text{BuOH/THF/H}_2\text{O}$ (1/2/3, 1 mL) gelöst, mit 2-Azido-1-ethylamin Hydrochlorid **223** (0.24 mg, 1.943 μmol , 1.5 Äq.) und $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$ (6.7 μg , 0.324 μmol , 0.25 Äq.) versetzt und für 48 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktion mit Phosphatpuffer hydrolysiert,

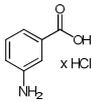
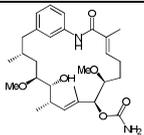
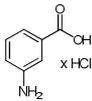
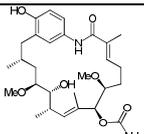
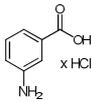
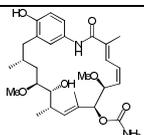
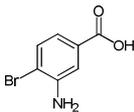
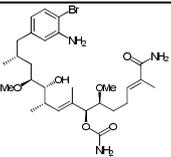
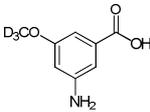
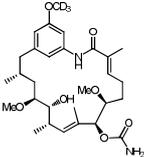
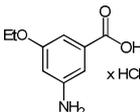
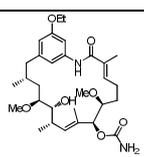
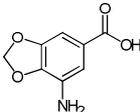
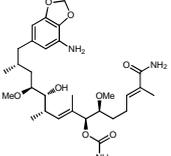
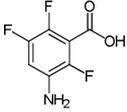
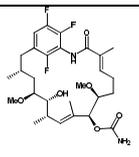
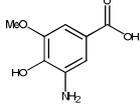
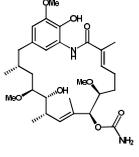
¹⁷⁸ S. Blake, R. Capone, M. Mayer, J. Yang, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1614-1624.

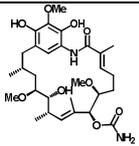
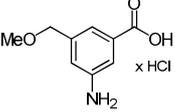
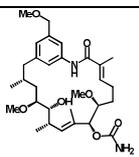
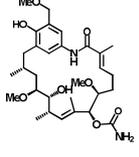
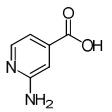
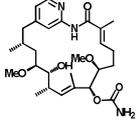
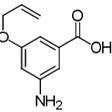
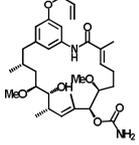
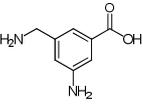
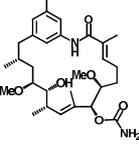
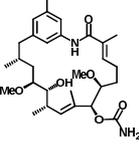
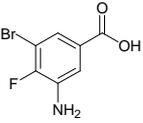
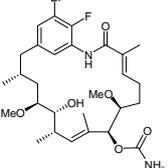
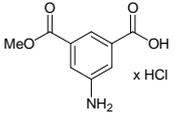
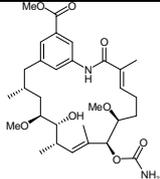
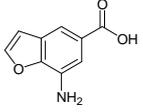
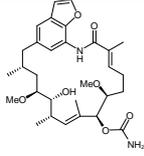
die Mischung mit Essigsäureethylester verdünnt und die wässrige Phase mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte über semipräp. HPLC (semipräp. CN-Phase; $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95/5 \rightarrow 80/20 in 40 min, dann 80/20 \rightarrow 75/25 in 20 min, dann 75/25 \rightarrow 65/35 in 10 min, dann 65/35 \rightarrow 55/45 in 15 min, dann 100 CH_3CN 10 min halten; Fluss 2.5 mL/min) ($t_{\text{R}} = 55.55$ min) 17-Desmethoxy-Reblastatin-Derivat **221** wurde nur in Spuren erhalten.

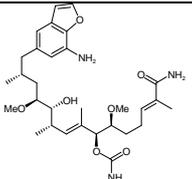
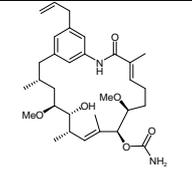
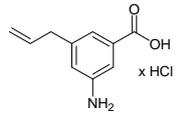
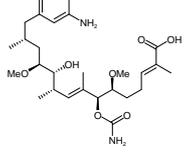
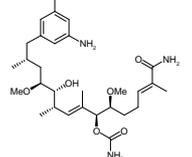
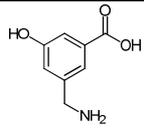
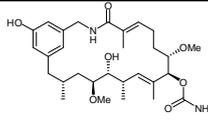
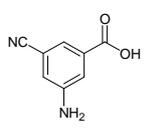
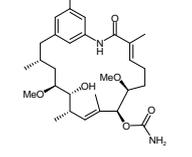
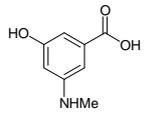
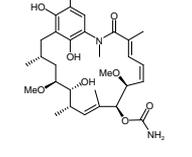
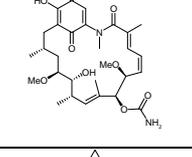
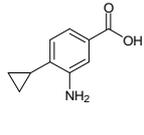
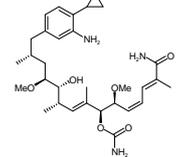
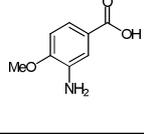
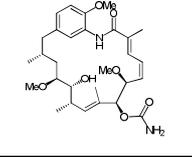
UPLC-MS $t_{\text{R}} = 1.60$ min; **HRMS (ESI)** m/z berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 627.3870, gefunden: 627.3880.

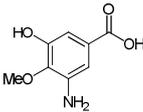
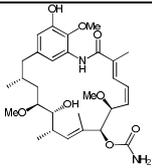
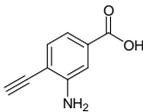
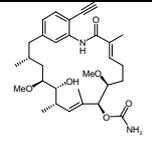
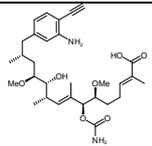
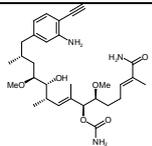
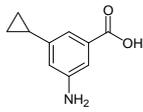
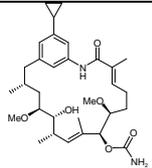
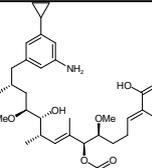
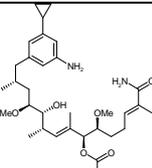
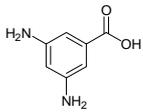
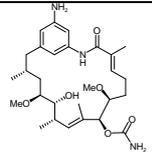
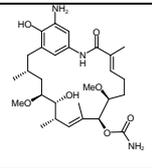
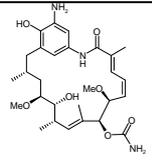
7 Anhang

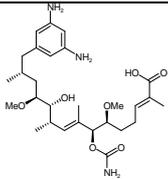
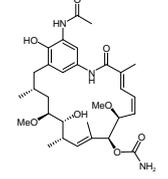
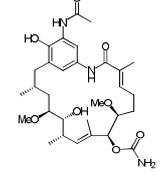
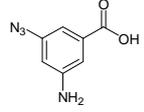
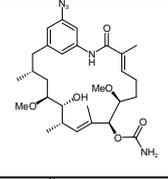
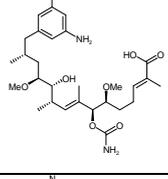
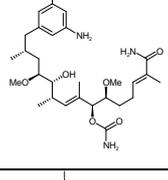
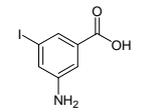
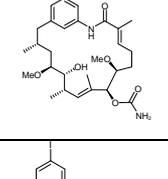
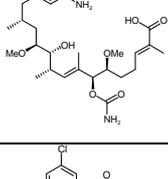
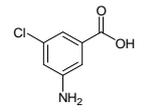
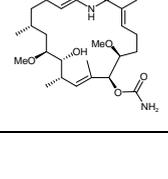
7.1 Massenspektrometrische Daten

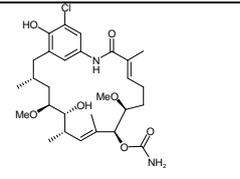
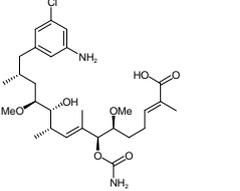
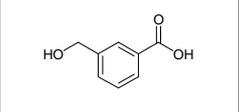
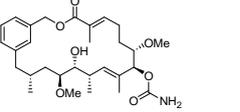
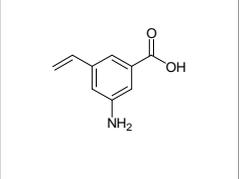
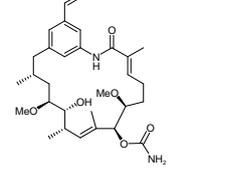
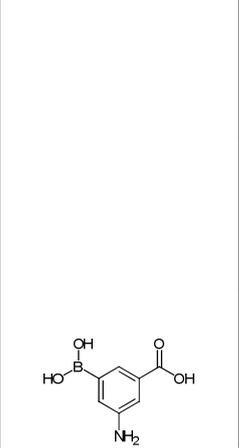
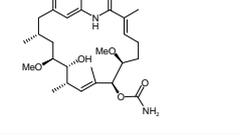
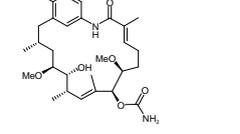
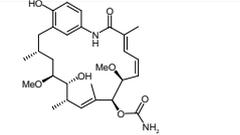
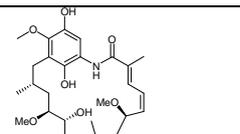
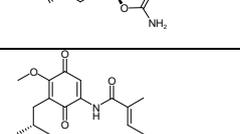
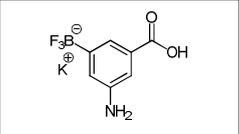
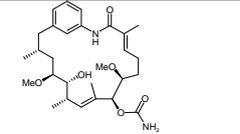
Startbaustein	Produkt	HRMS
		$C_{28}H_{42}N_2NaO_6[M+Na]^+$: ber.: 525.2941 gef.: 525.2932
		$C_{28}H_{42}N_2NaO_7[M+Na]^+$: ber.: 541.2890 gef.: 541.2894
		$C_{28}H_{40}N_2NaO_7[M+Na]^+$: ber.: 539.2733 gef.: 539.2720
		$C_{28}H_{45}N_3BrO_6[M+H]^+$: ber.: 598.2492 gef.: 598.2482
		$C_{29}H_{42}D_3N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 536.3412 gef.: 536.3417
		$C_{30}H_{46}N_2NaO_7[M+Na]^+$: ber.: 569.3203 gef.: 569.3188
		$C_{29}H_{46}N_3O_8[M+H]^+$: ber.: 564.3285 gef.: 564.3288
		$C_{28}H_{39}F_3N_2O_6Na[M+Na]^+$: ber.: 579.2658 gef.: 579.2666
		$C_{29}H_{45}N_2O_8[M+H]^+$: ber.: 549.3176 gef.: 549.3193

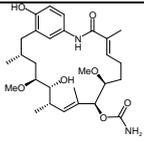
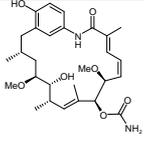
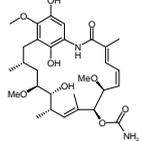
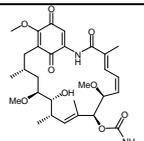
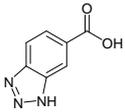
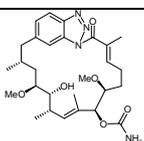
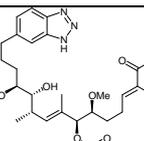
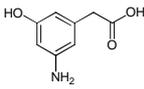
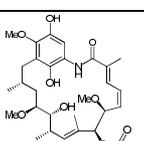
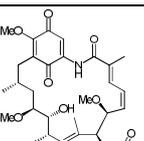
		$C_{29}H_{44}N_2NaO_9[M+Na]^+$: ber.: 587.2945 gef.: 587.293
		$C_{30}H_{47}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 547.3383 gef.: 547.3364
		$C_{30}H_{47}N_2O_8[M+H]^+$: ber.: 563.3332 gef.: 563.3336
		$C_{27}H_{42}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 504.3074 gef.: 504.307
		$C_{31}H_{47}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 559.3383 gef.: 559.3397
		$C_{29}H_{44}N_2O_6Na[M+Na]^+$: ber.: 539.3097 gef.: 539.3090
		$C_{29}H_{44}N_2O_6Na[M+Na]^+$: ber.: 555.3046 gef.: 555.3034
		$C_{28}H_{40}N_2O_6FBr[M+Na]^+$: ber.: 621.1951 gef.: 621.2000
		$C_{30}H_{44}N_2O_8[M+Na]^+$: ber.: 583.2995 gef.: 583.2999
		$C_{30}H_{42}N_2O_7[M+Na]^+$: ber.: 565.2890 gef.: 565.2884

		$C_{30}H_{46}N_3O_7[M+H]^+$: ber.: 560.3336 gef.: 560.3322
		$C_{31}H_{46}N_2O_6Na[M+Na]^+$: ber.: 565.3254 gef.: 565.3258
		$C_{31}H_{49}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 561.3540 gef.: 563.3522
		$C_{31}H_{50}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 560.3700 gef.: 563.3702
		$C_{29}H_{44}N_2O_7[M+Na]^+$: ber.: 555.3046 gef.: 555.3027
		$C_{29}H_{42}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 528.3074 gef.: 528.3070
		$C_{29}H_{42}N_2O_9[M+Na]^+$: ber.: 585.2788 gef.: 585.2784
		$C_{29}H_{41}N_2O_9[M+H]^+$: ber.: 561.2812 gef.: 561.2814
		$C_{31}H_{50}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 560.3700 gef.: 560.3701
		$C_{29}H_{45}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 533.3227 gef.: 533.3252

		$C_{29}H_{45}N_2O_8[M+H]^+$: ber.: 549.3176 gef.: 533.3165
		$C_{30}H_{43}N_2O_6[M+H]^+$: ber.: 527.3121 gef.: 527.3120
		$C_{30}H_{45}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 545.3227 gef.: 545.3227
		$C_{30}H_{46}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 544.3387 gef.: 544.3400
		$C_{31}H_{47}N_2O_6[M+H]^+$: ber.: 543.3434 gef.: 543.3430
		$C_{31}H_{49}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 561.3540 gef.: 561.3527
		$C_{31}H_{50}N_3O_6[M+H]^+$: ber.: 560.3700 gef.: 560.3710
		$C_{28}H_{43}N_3O_6[M+Na]^+$: ber.: 540.3050 gef.: 540.3057
		$C_{28}H_{43}N_3O_7[M+Na]^+$: ber.: 556.2999 gef.: 556.3007
		$C_{28}H_{41}N_3O_7Na[M+Na]^+$: ber.: 554.2842 gef.: 554.2854

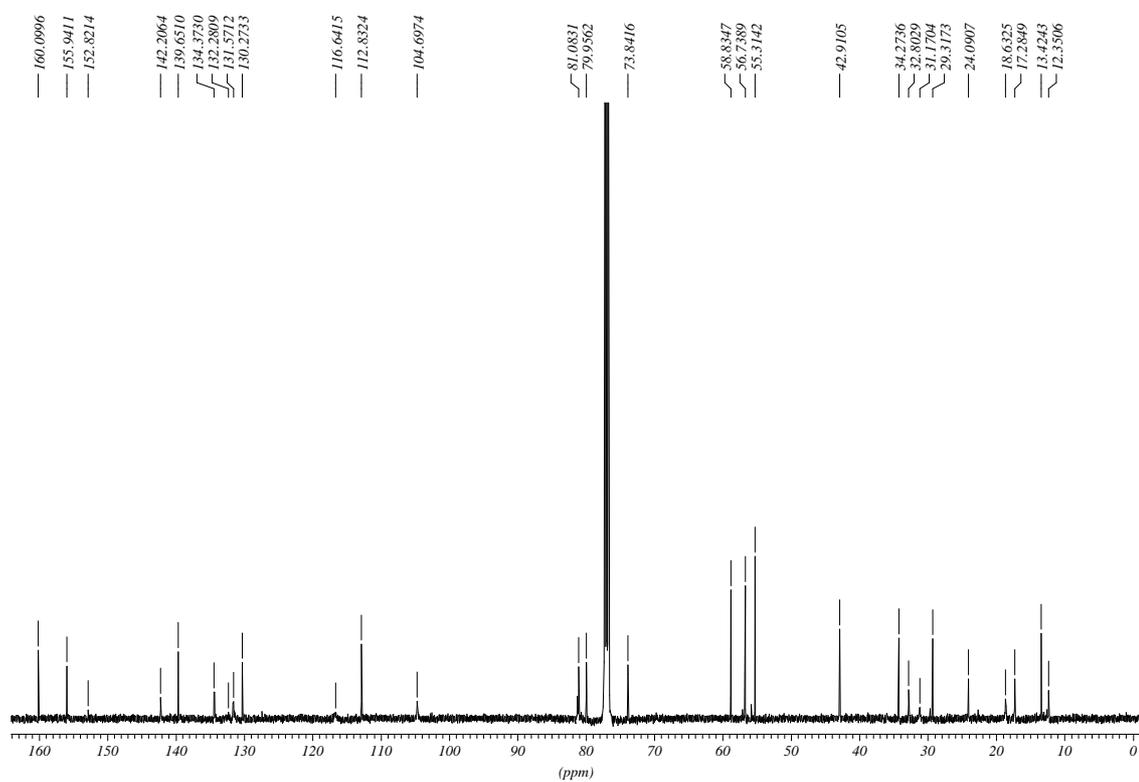
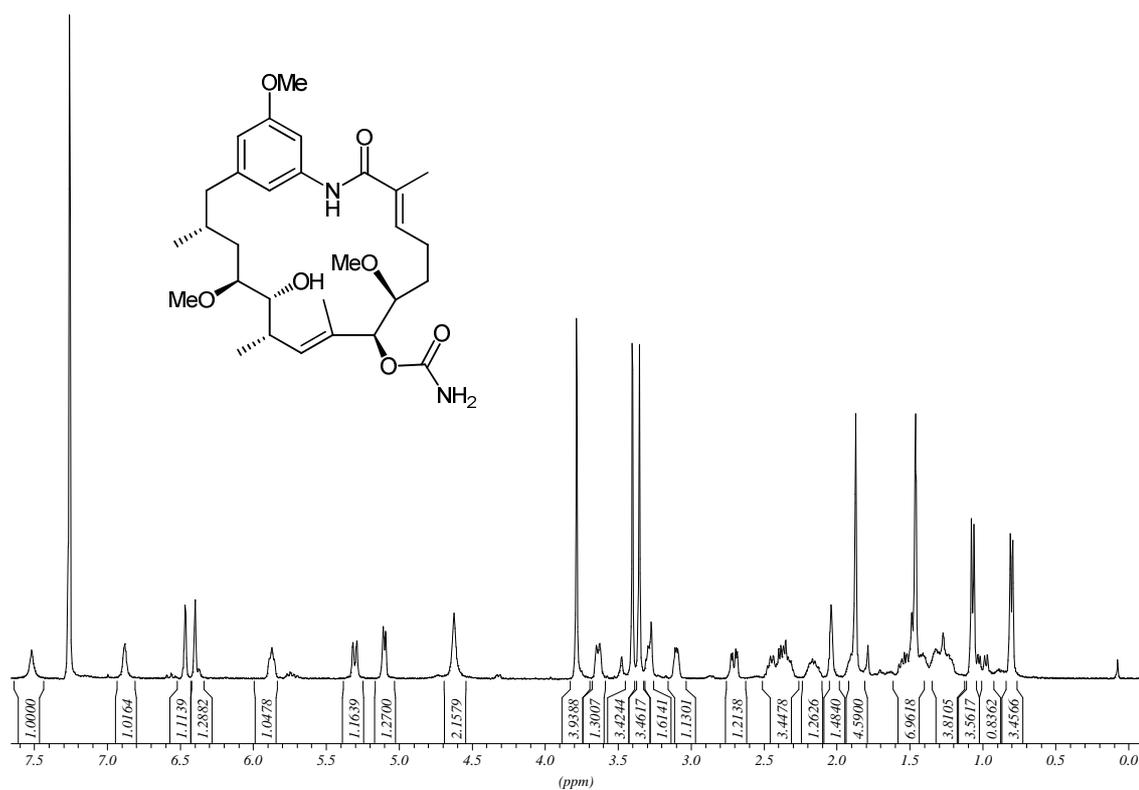
		$C_{28}H_{46}N_3O_7[M+H]^+$: ber.: 536.3336 gef.: 536.3326
		$C_{30}H_{43}N_3O_8Na[M+Na]^+$: ber.: 596.2948 gef.: 596.2941
		$C_{30}H_{45}N_3O_8Na[M+Na]^+$: ber.: 598.3104 gef.: 598.3078
		$C_{28}H_{42}N_5O_6[M+H]^+$: ber.: 544.3135 gef.: 544.3135
		$C_{28}H_{44}N_5O_7[M+H]^+$: ber.: 562.3241 gef.: 562.3241
		$C_{28}H_{45}N_6O_6[M+H]^+$: ber.: 561.3401 gef.: 561.3419
		$C_{28}H_{42}N_2O_6[M+H]^+$: ber.: 629.2088 gef.: 629.2072
		$C_{28}H_{44}N_2O_7[M+H]^+$: ber.: 647.2193 gef.: 647.2184
		$C_{28}H_{42}N_2O_6NaCl[M+H]^+$: ber.: 537.2731 gef.: 537.2748

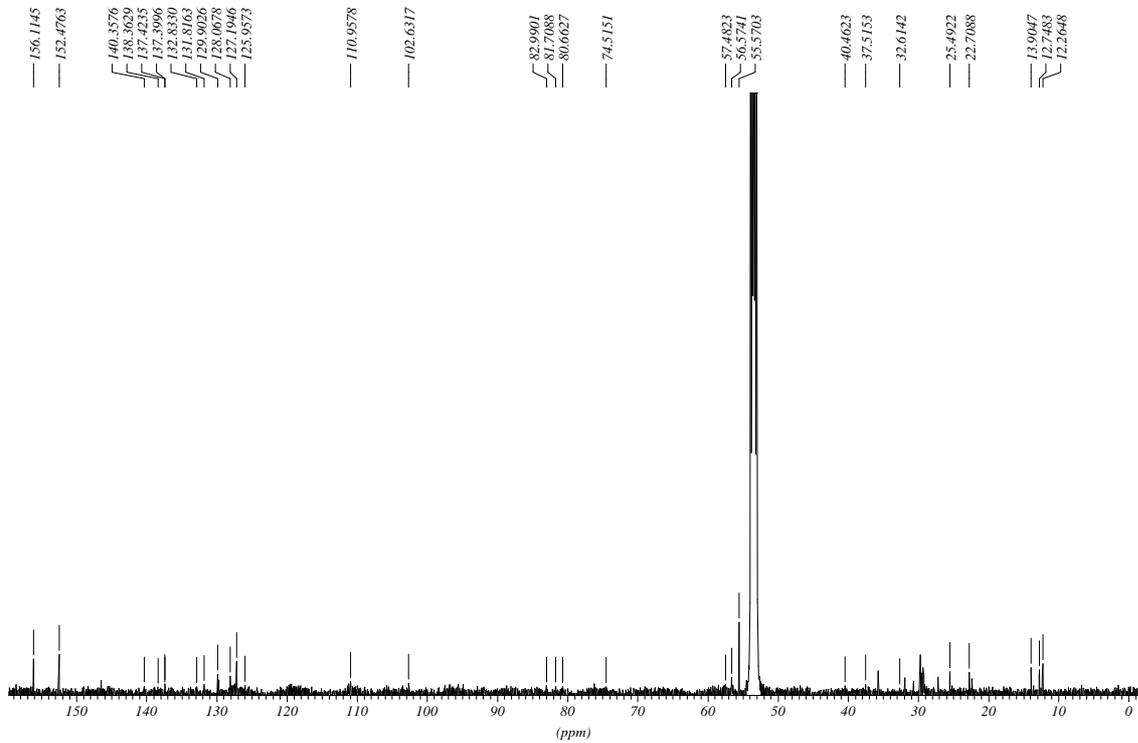
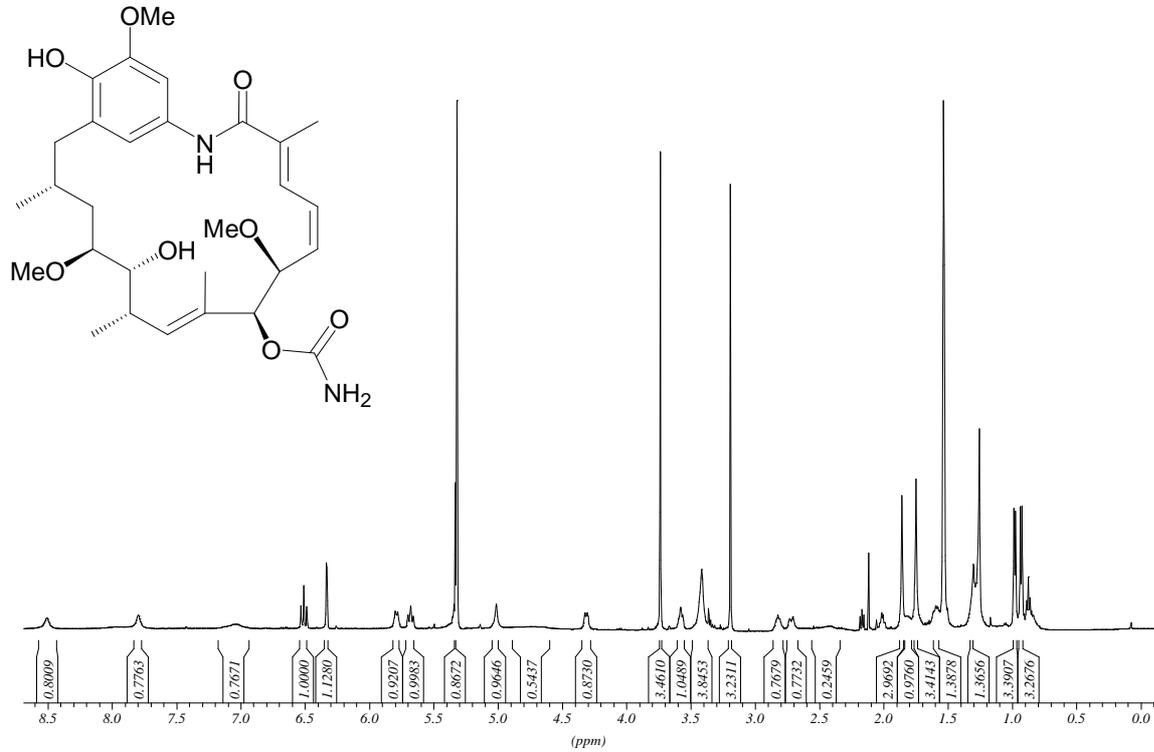
		$C_{28}H_{41}N_2O_7NaCl[M+Na]^+$: ber.: 575.2500 gef.: 575.2505
		$C_{28}H_{44}N_2O_7Cl[M+H]^+$: ber.: 555.2837 gef.: 555.2834
		$C_{29}H_{43}NNaO_7[M+Na]^+$: ber.: 540.2937 gef.: 540.2921
		$C_{30}H_{44}N_2NaO_6[M+Na]^+$: ber.: 551.3097 gef.: 551.3105
		$C_{28}H_{42}N_2O_6Na[M+Na]^+$: ber.: 525.2941 gef.: 525.2930
		$C_{28}H_{40}N_2O_7Na[M+Na]^+$: ber.: 539.2733 gef.: 539.2739
		$C_{28}H_{42}N_2O_7Na[M+Na]^+$: ber.: 541.2890 gef.: 541.2896
		$C_{29}H_{42}N_2O_9Na[M+Na]^+$: ber.: 585.2788 gef.: 585.2803
		$C_{29}H_{40}N_2O_9Na[M+Na]^+$: ber.: 583.2632 gef.: 583.2654
		

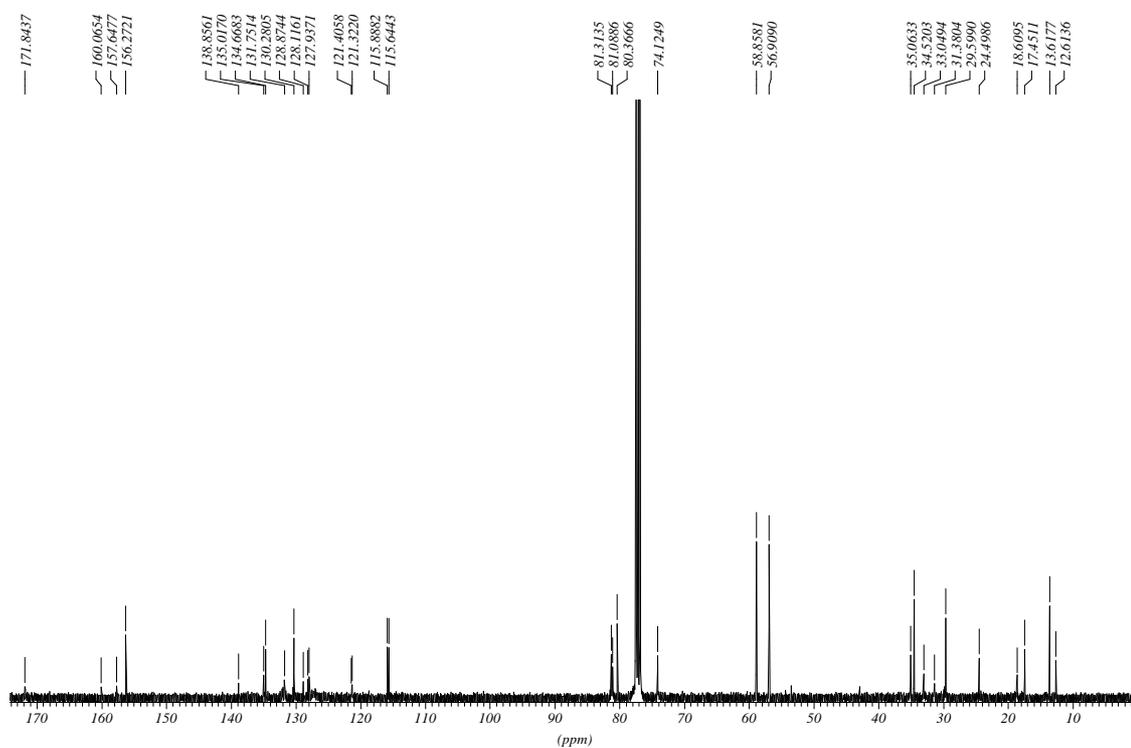
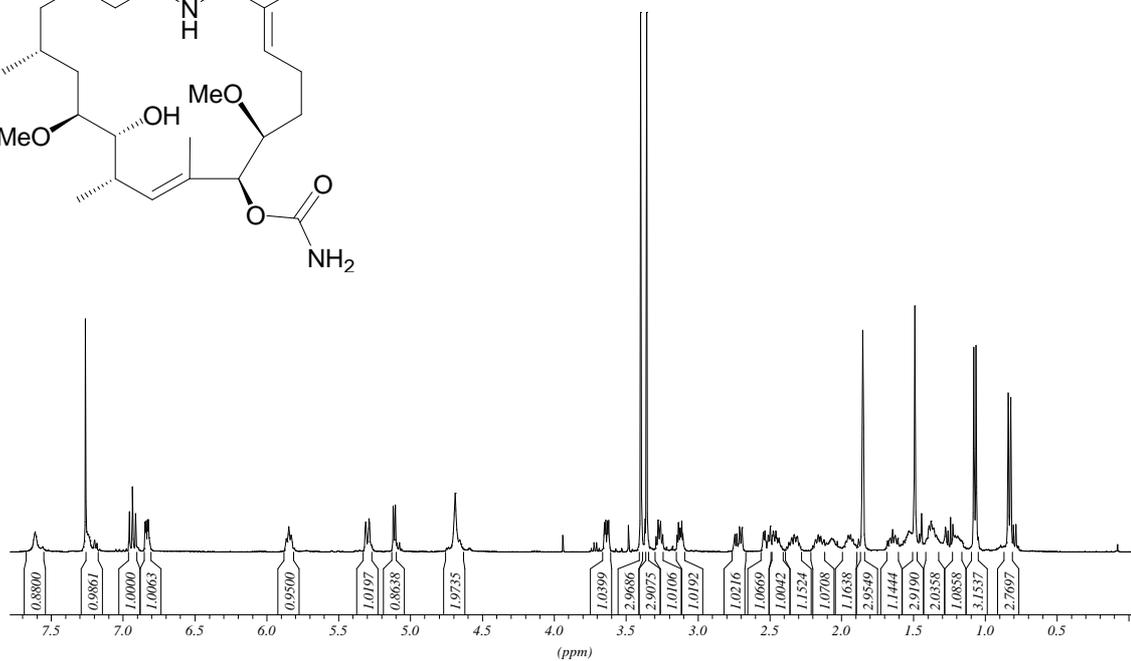
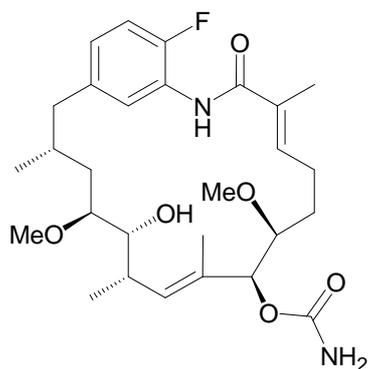
		$C_{28}H_{40}N_2O_7Na[M+Na]^+$: ber.: 539.2733 gef.: 539.2772
		$C_{28}H_{42}N_2O_7Na[M+Na]^+$: ber.: 541.2890 gef.: 541.2887
		$C_{29}H_{42}N_2O_9Na[M+Na]^+$: ber.: 585.2788 gef.: 585.2778
		$C_{29}H_{40}N_2O_9Na[M+Na]^+$: ber.: 583.2632 gef.: 583.2627
		$C_{28}H_{41}N_4O_6[M+H]^+$: ber.: 529.3026 gef.: 529.3025
		$C_{28}H_{43}N_4O_7[M+H]^+$: ber.: 547.3132 gef.: 547.3130
		$C_{29}H_{42}N_2NaO_9[M+Na]^+$: ber.: 585.2788 gef.: 585.2772
		$C_{29}H_{40}N_2NaO_9[M+Na]^+$: ber.: 583.2632 gef.: 583.2637

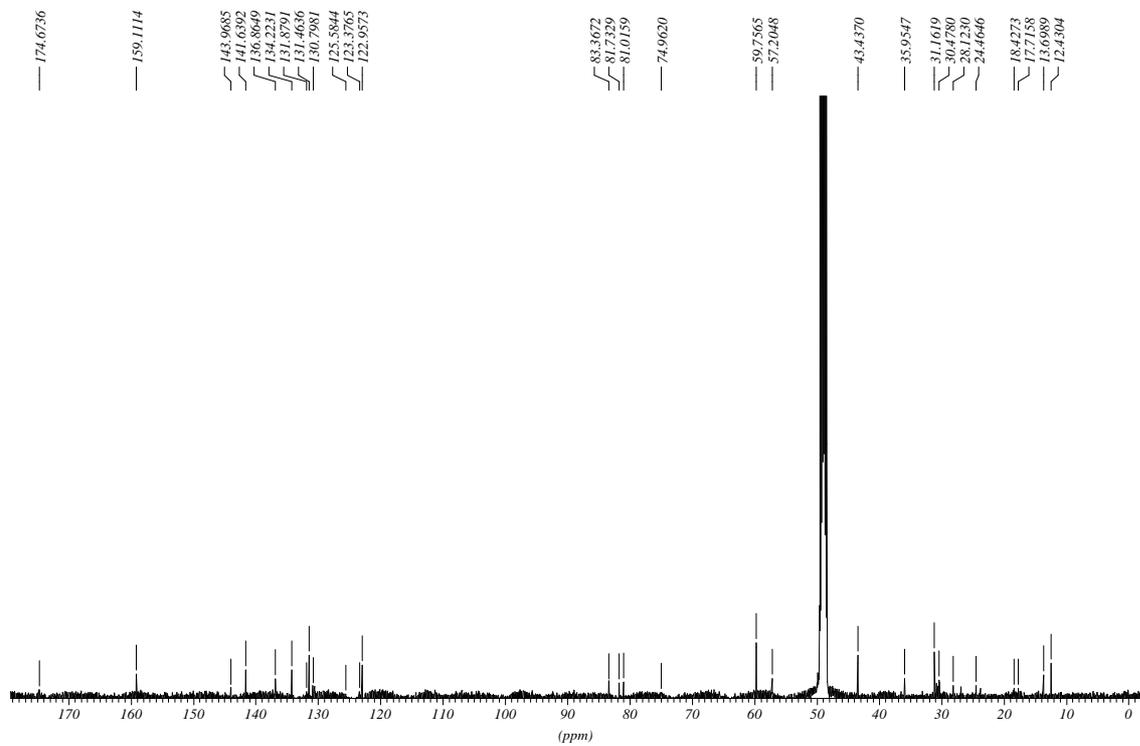
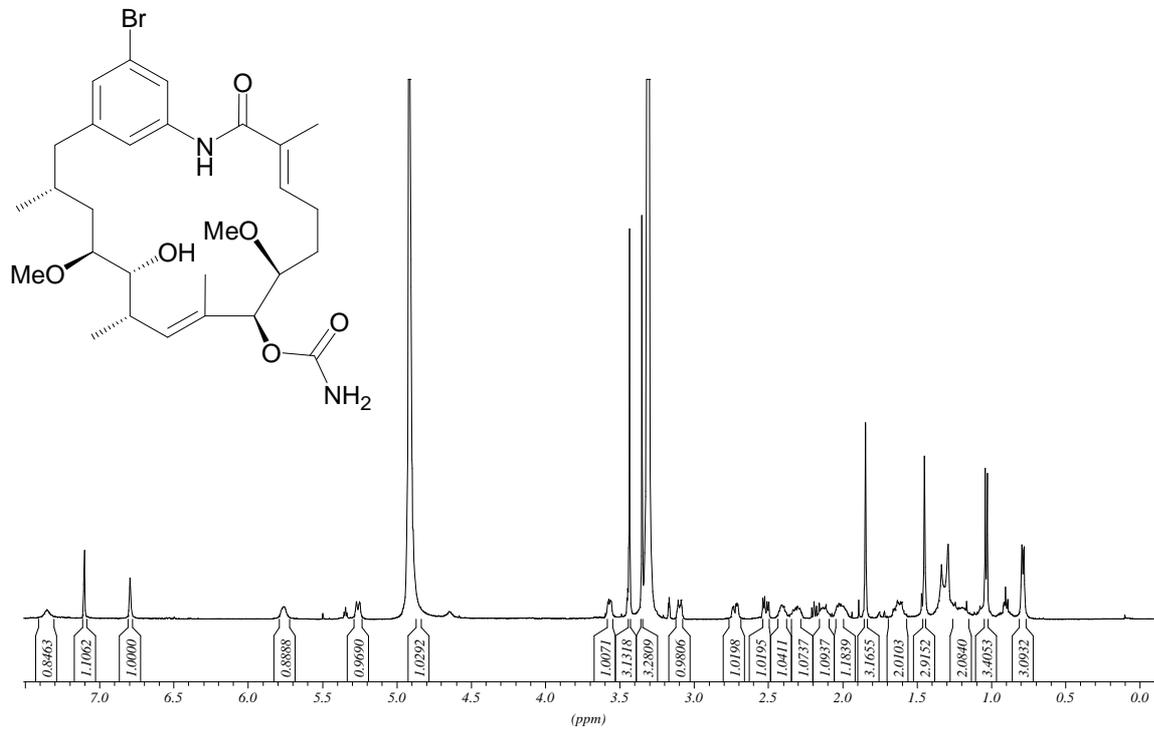
7.2 Ausgewählte NMR-Spektren

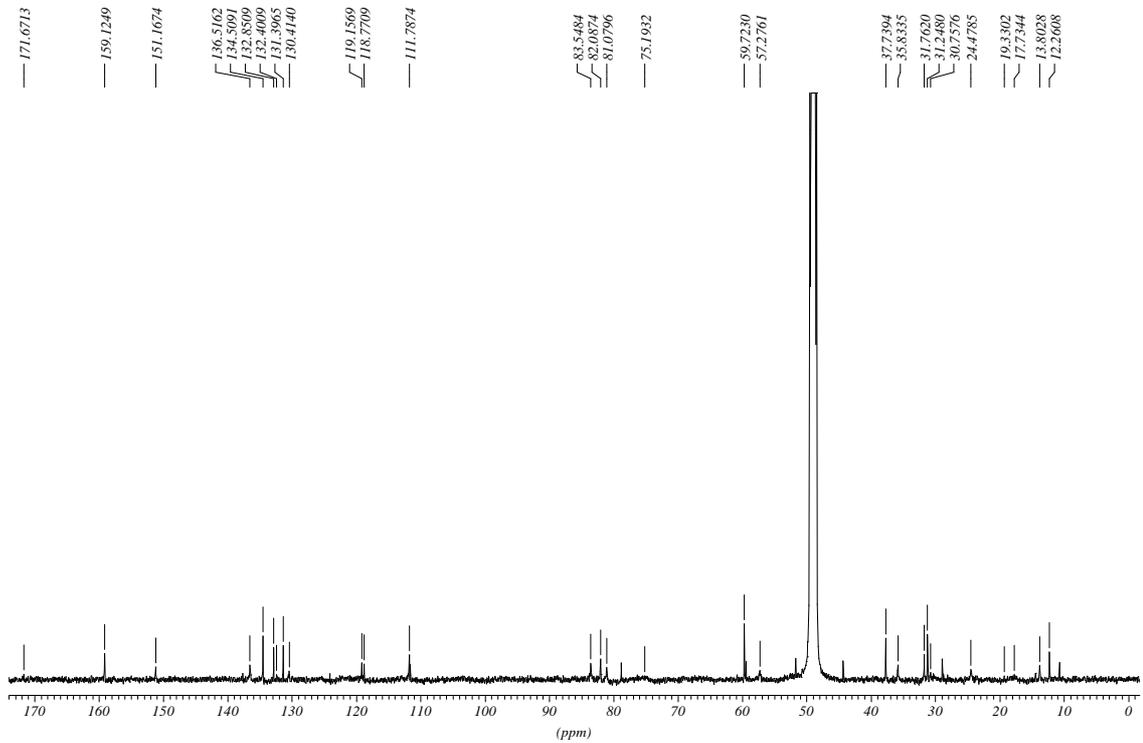
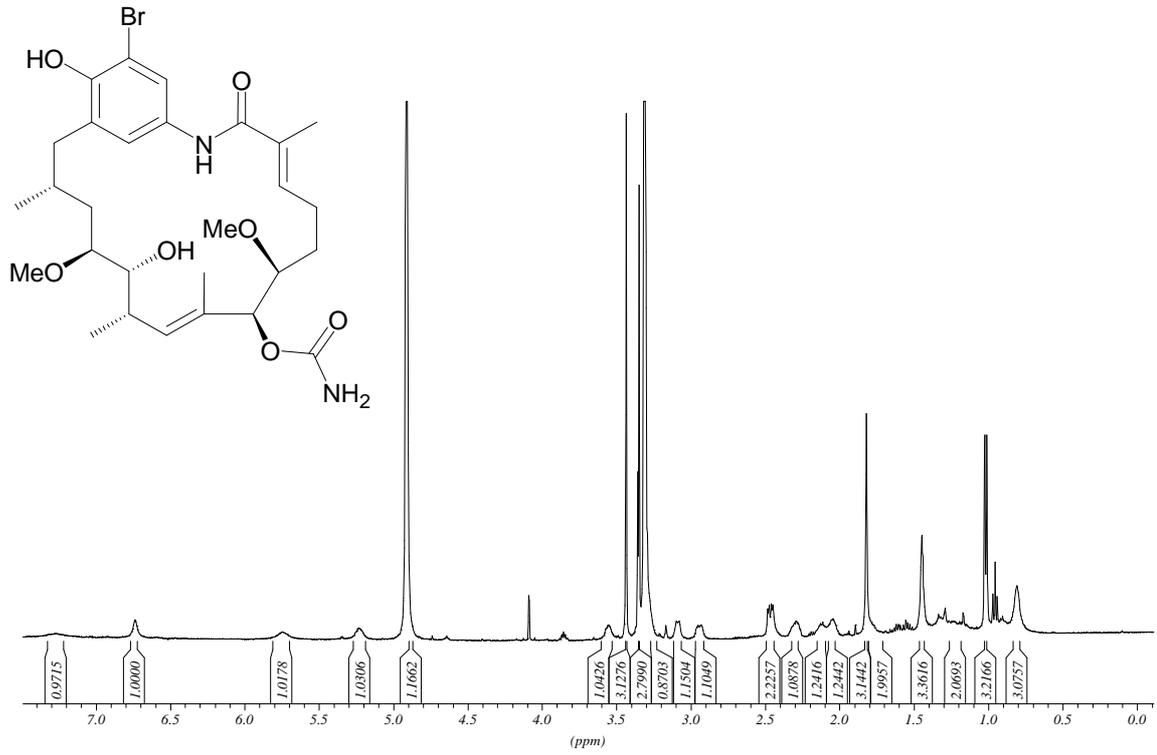
Geldanamycin-Derivate

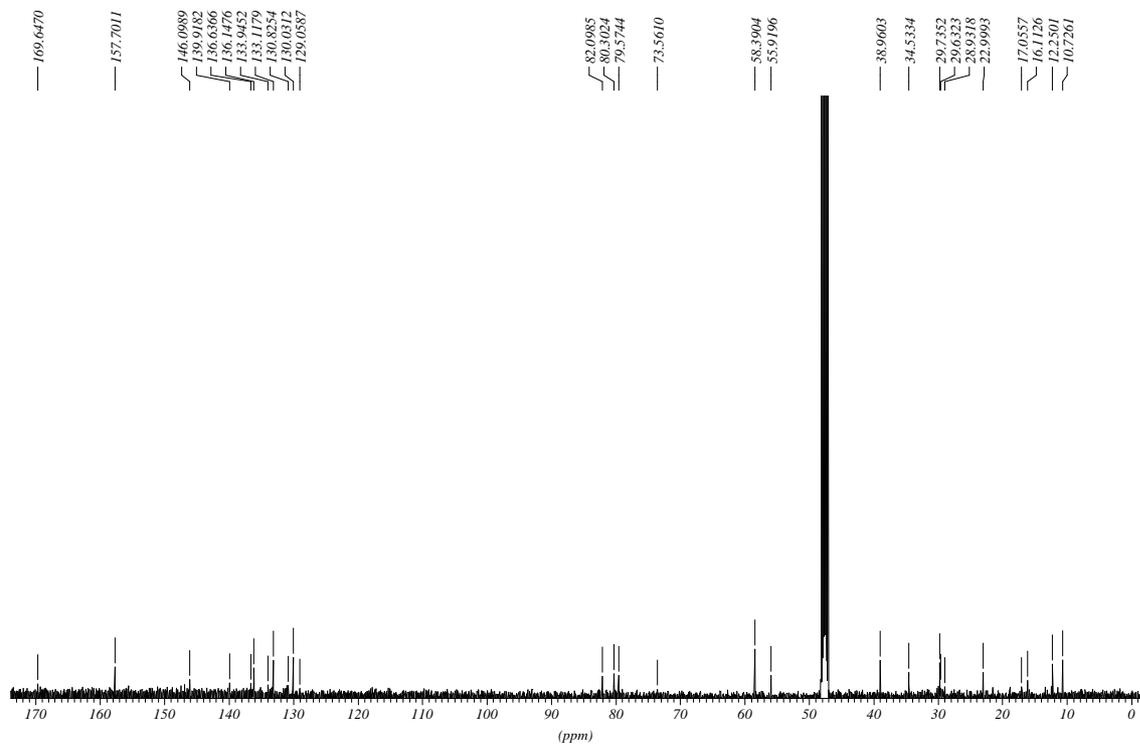
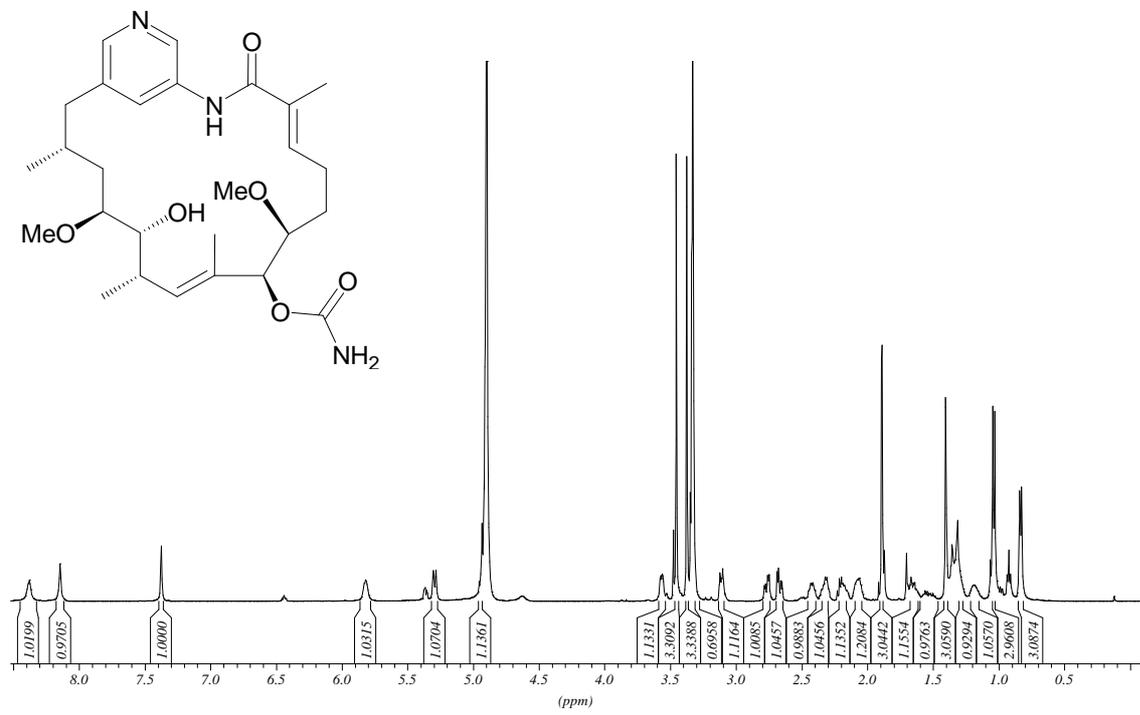


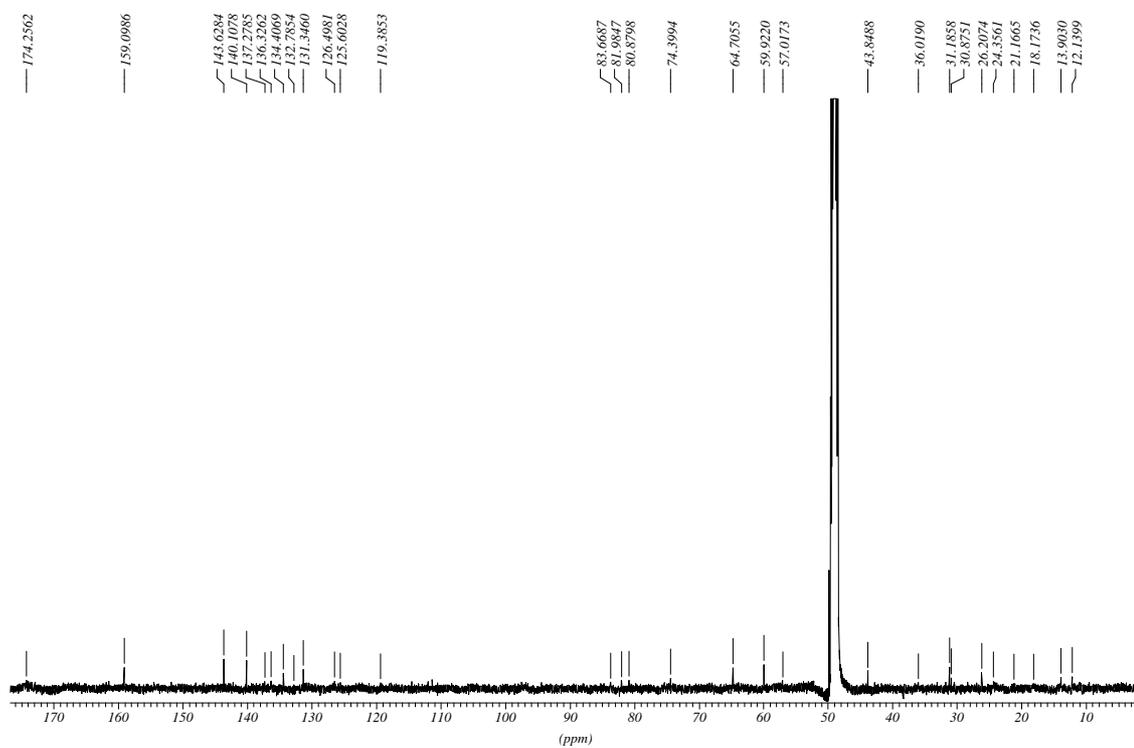
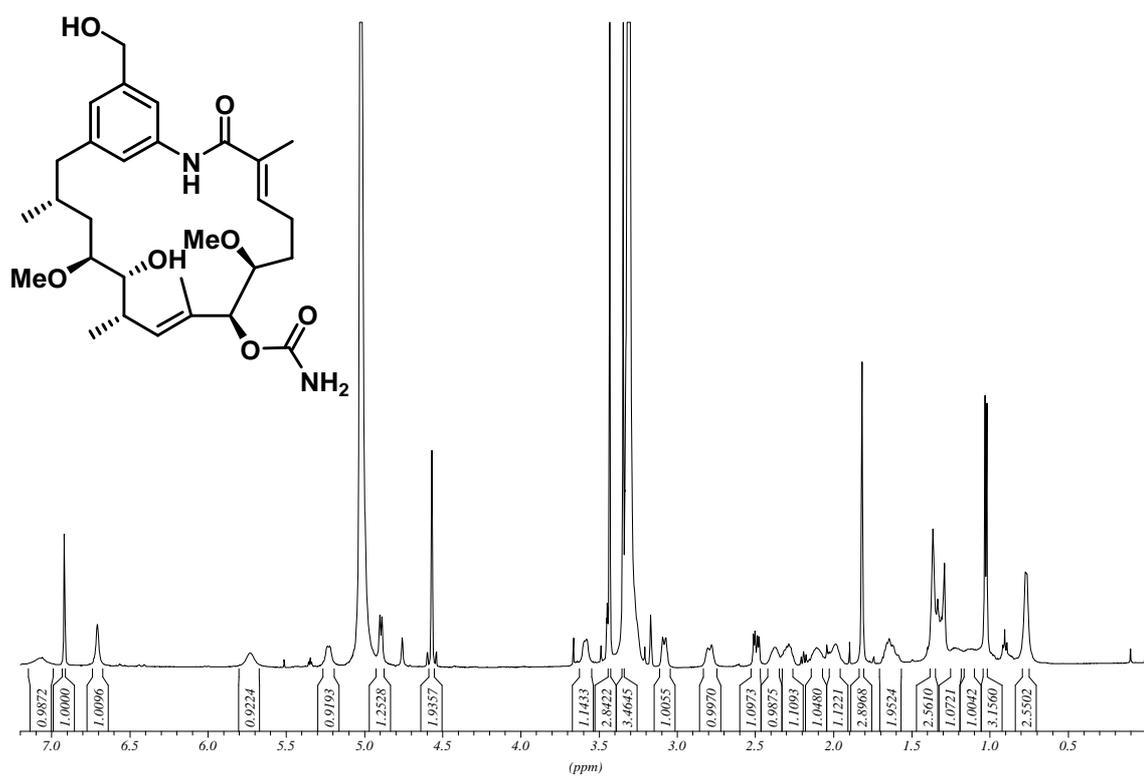


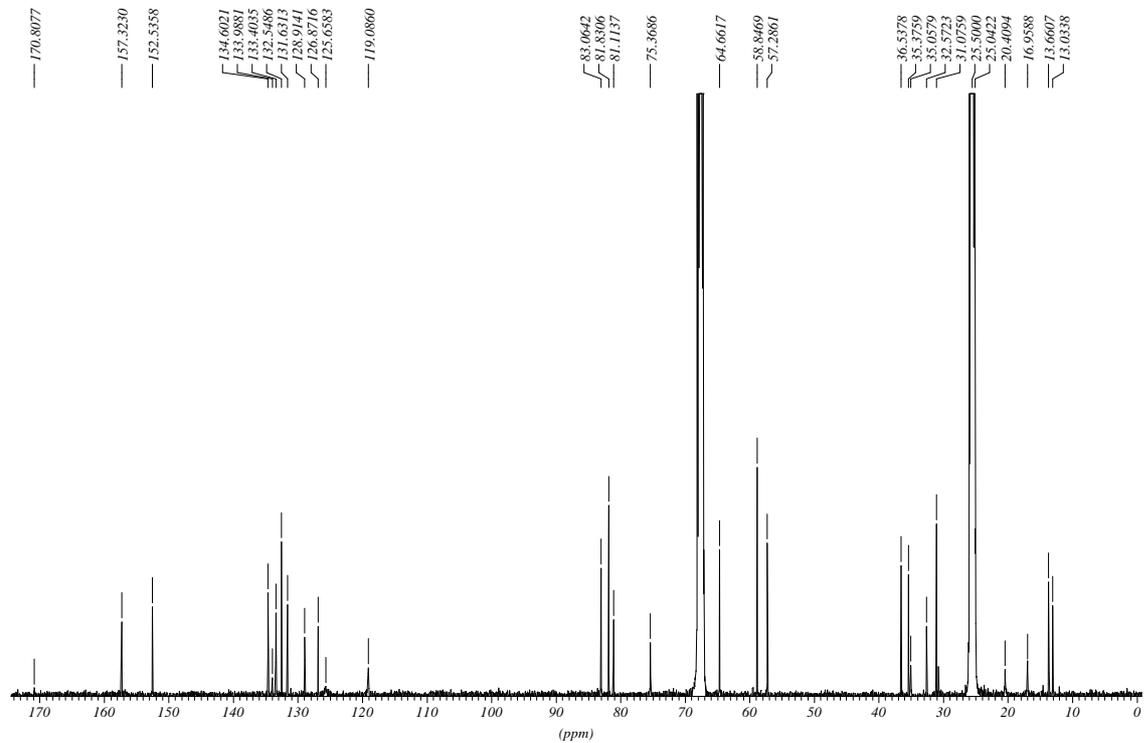
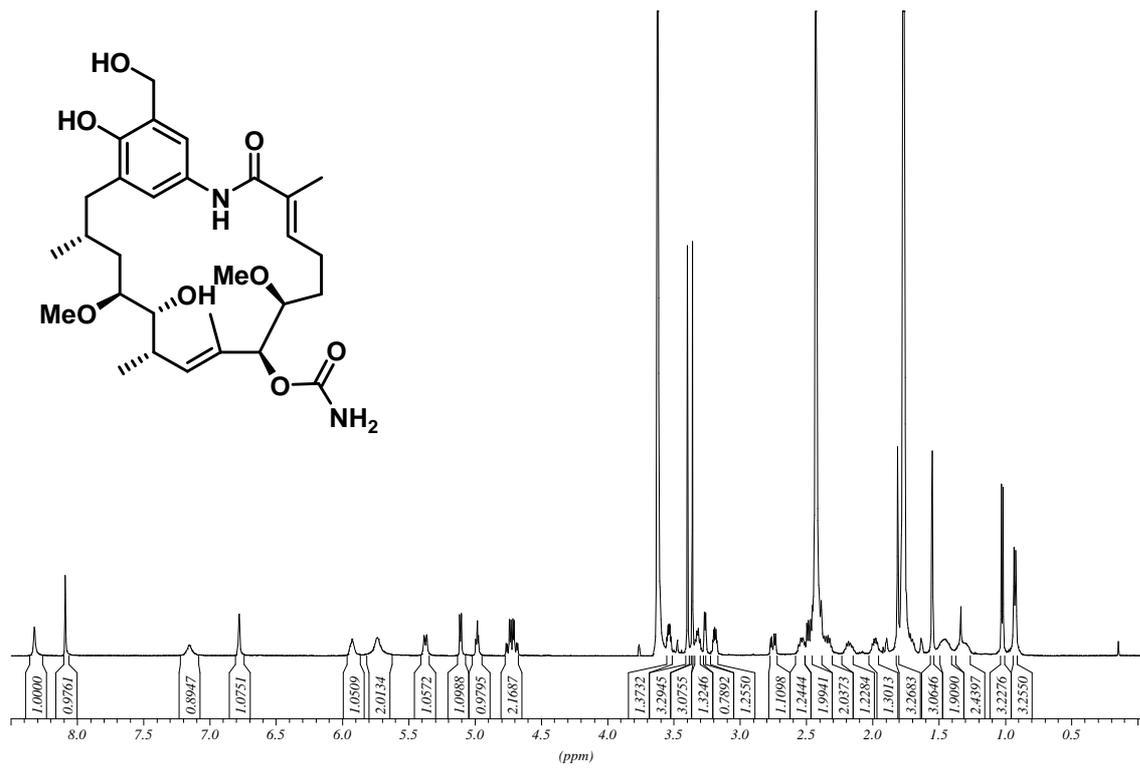


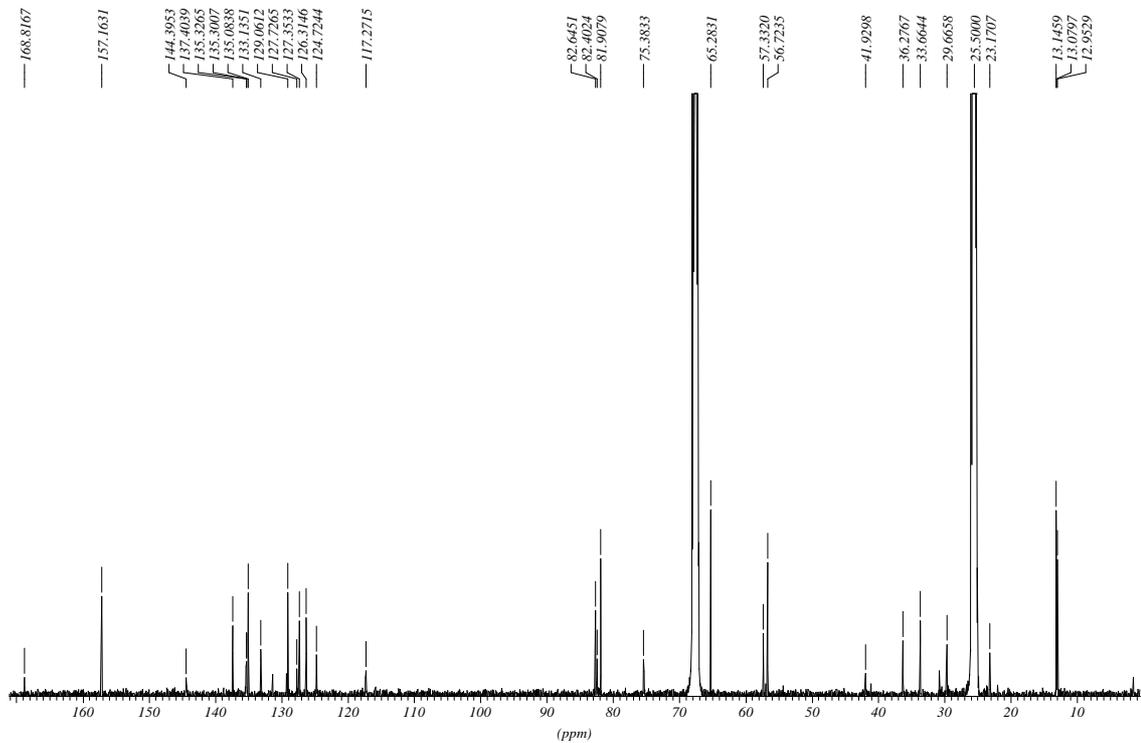
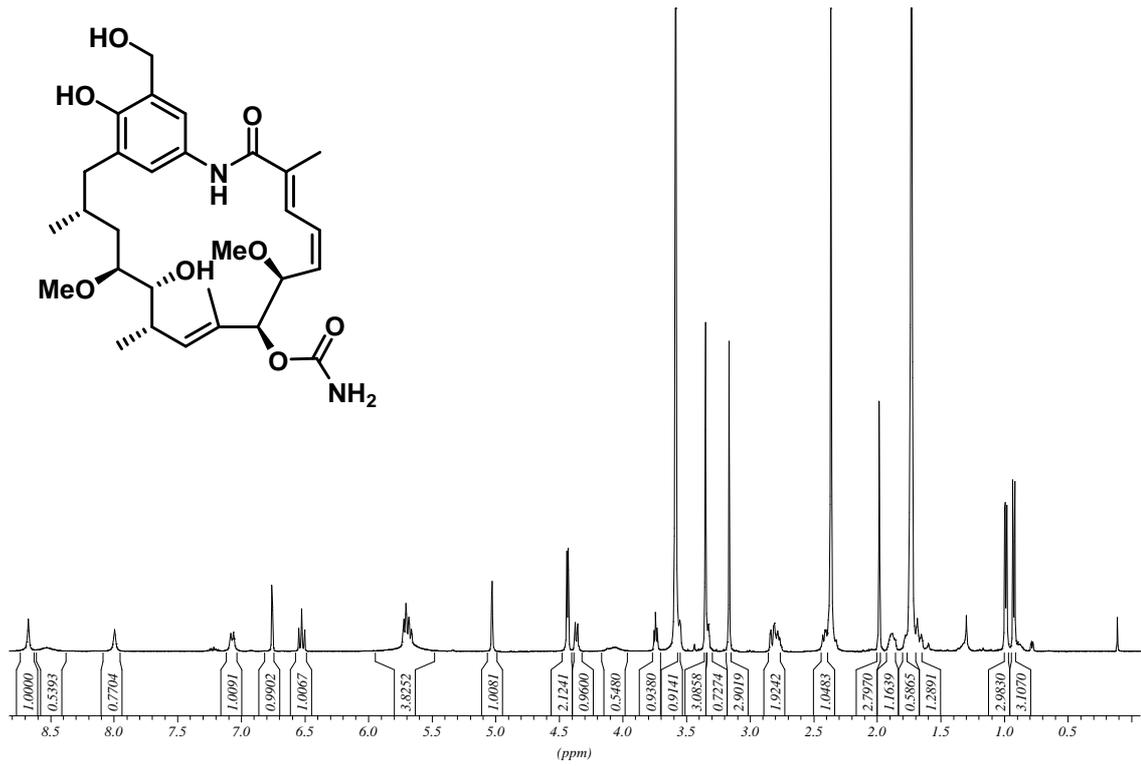


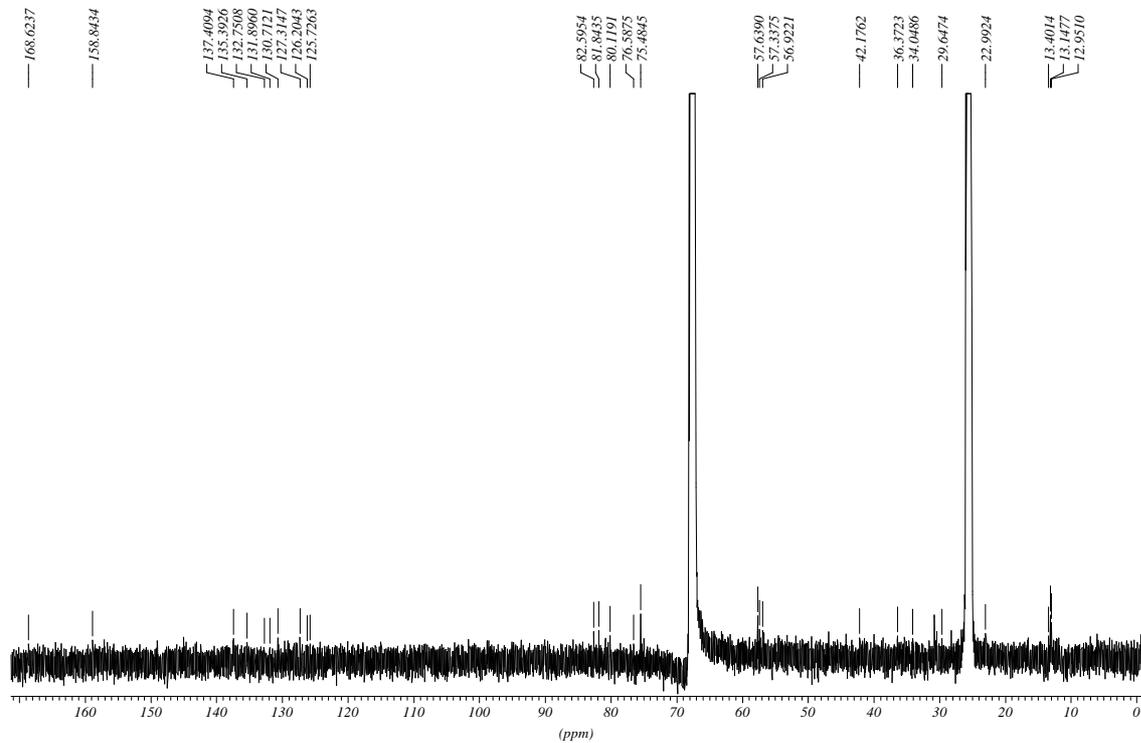
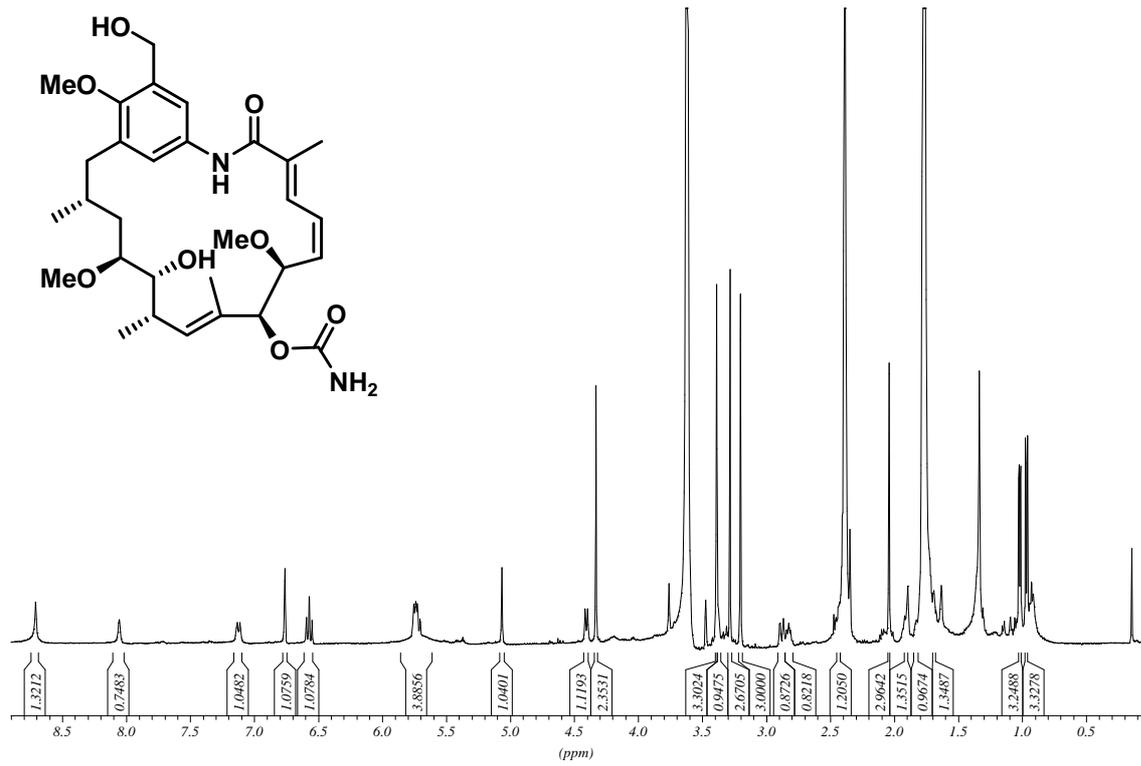


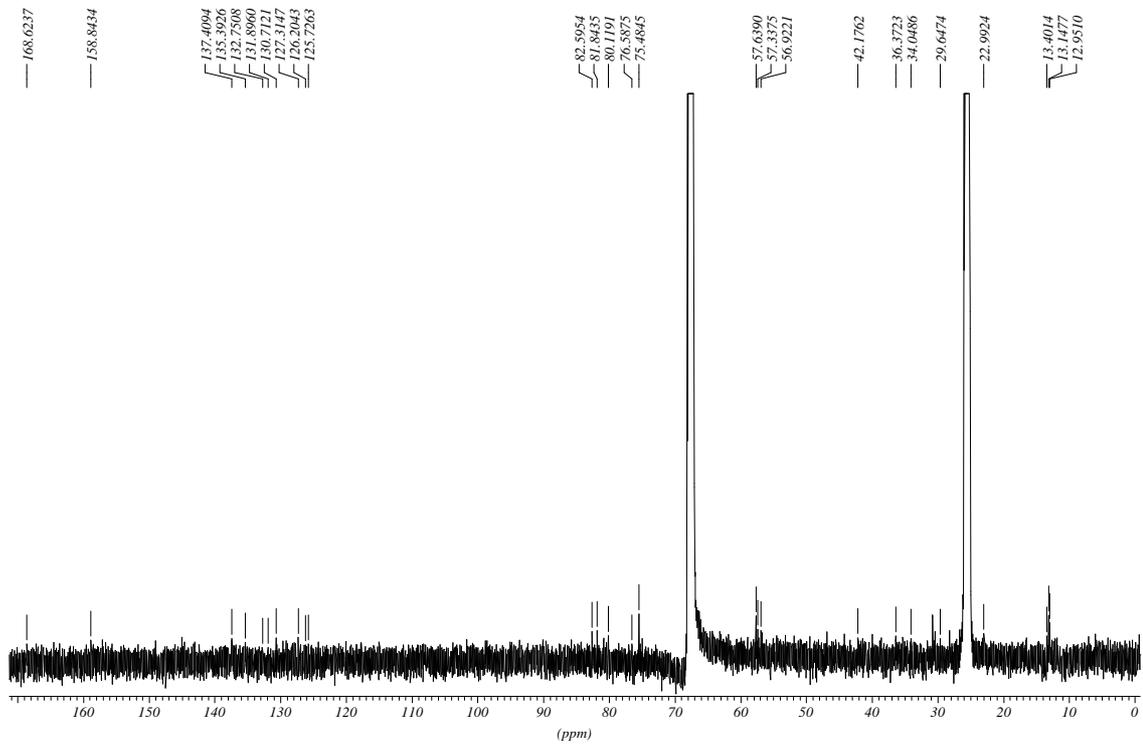
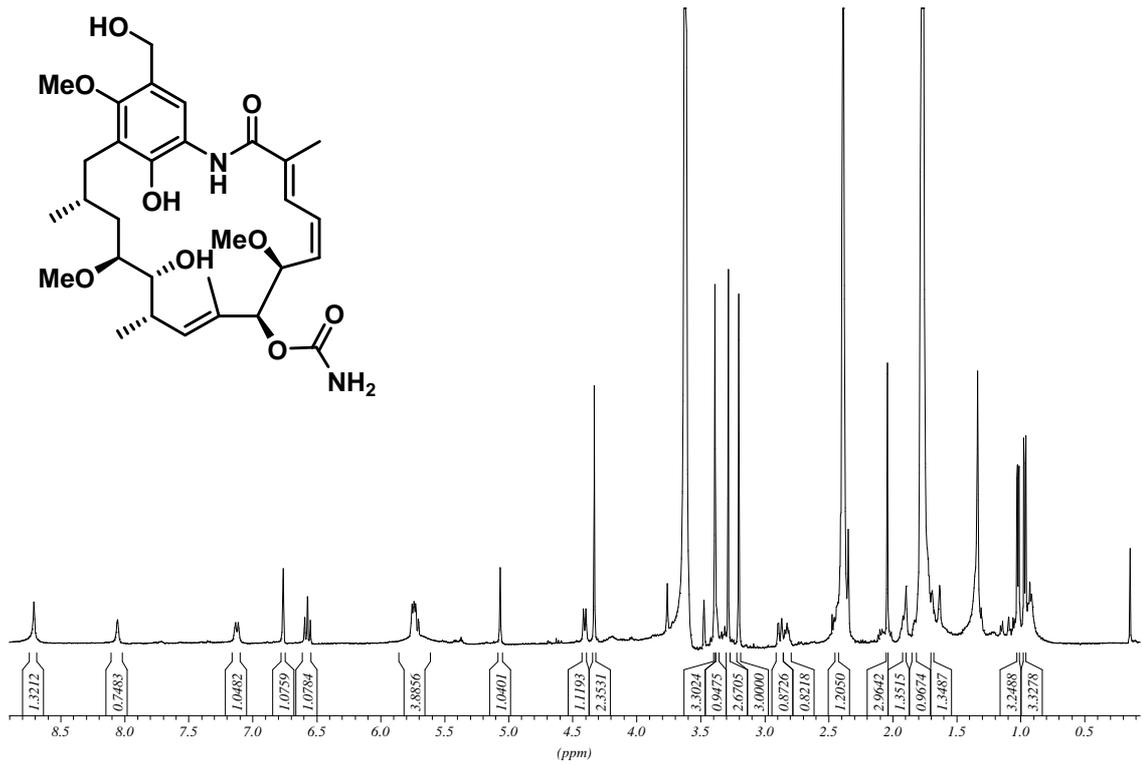


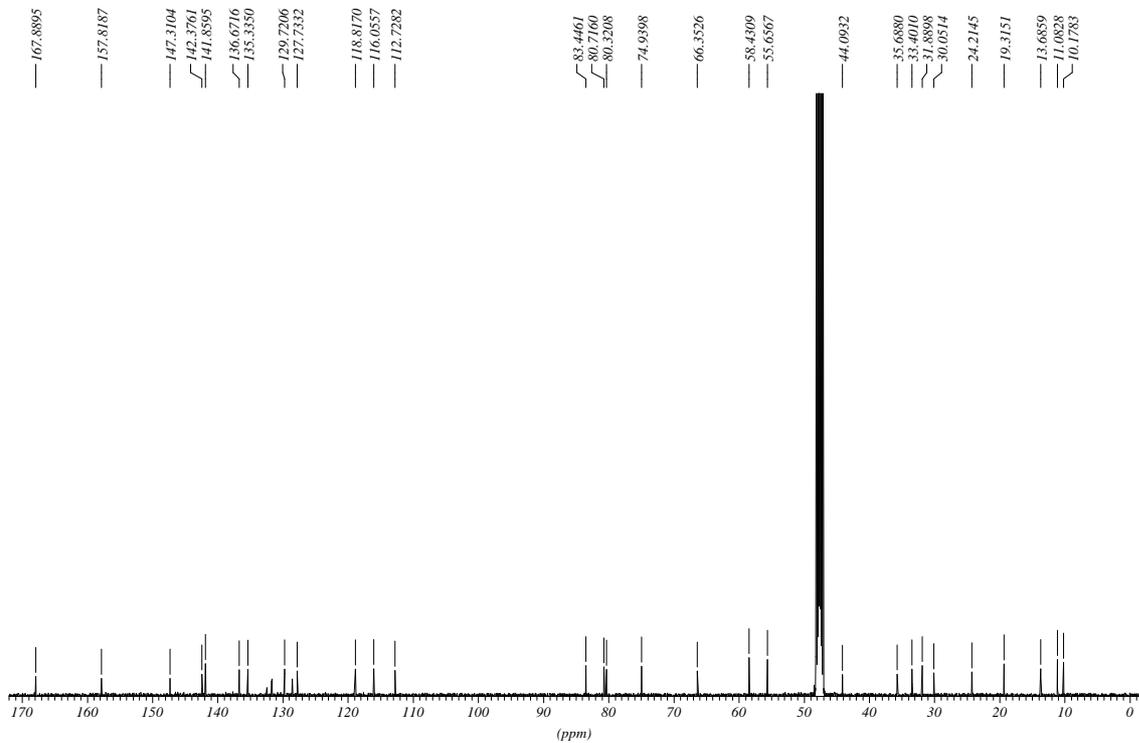
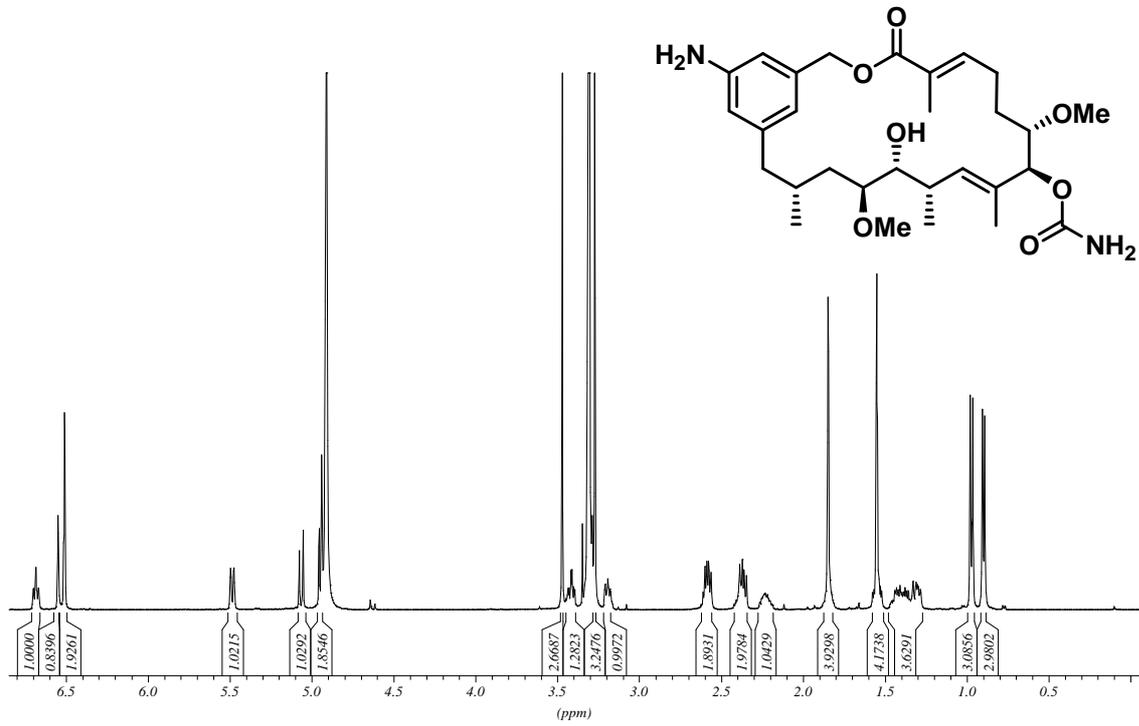


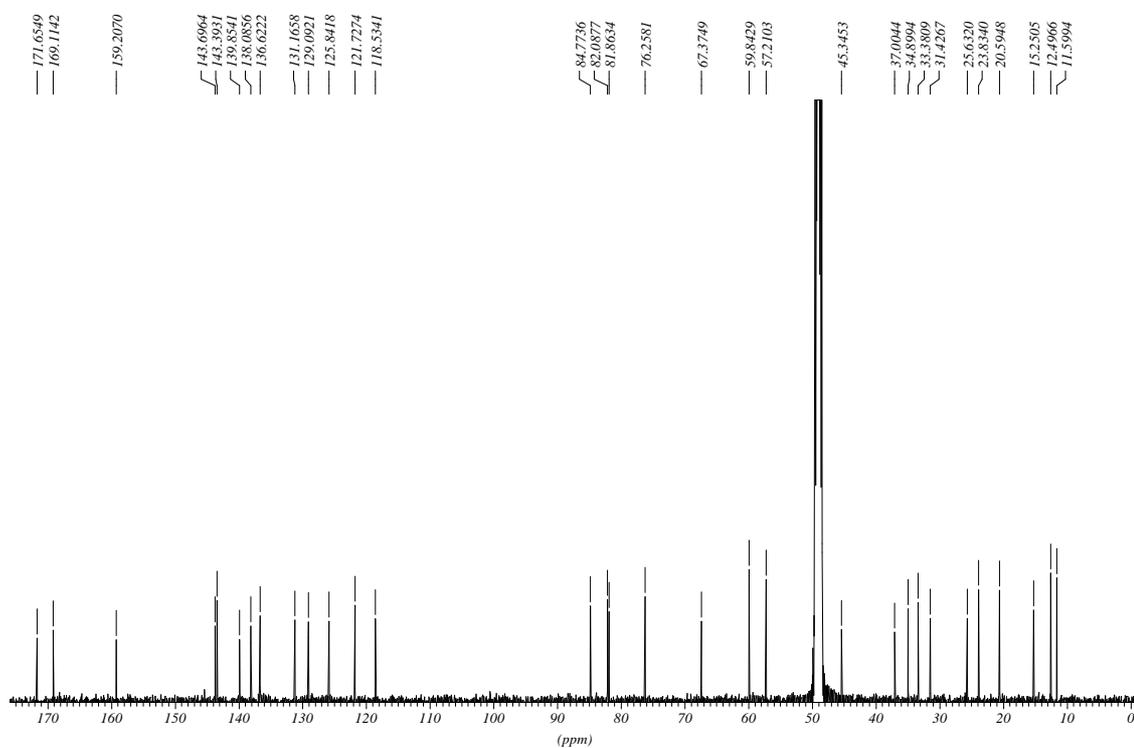
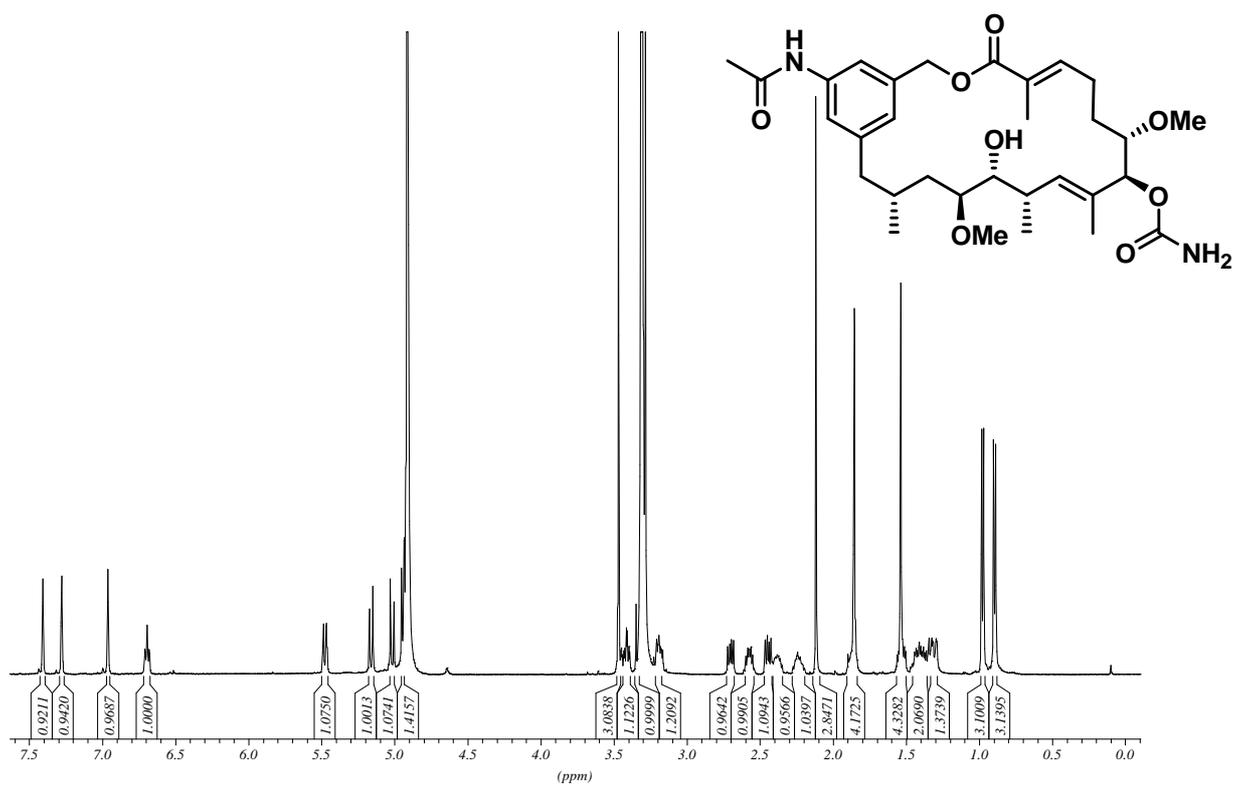


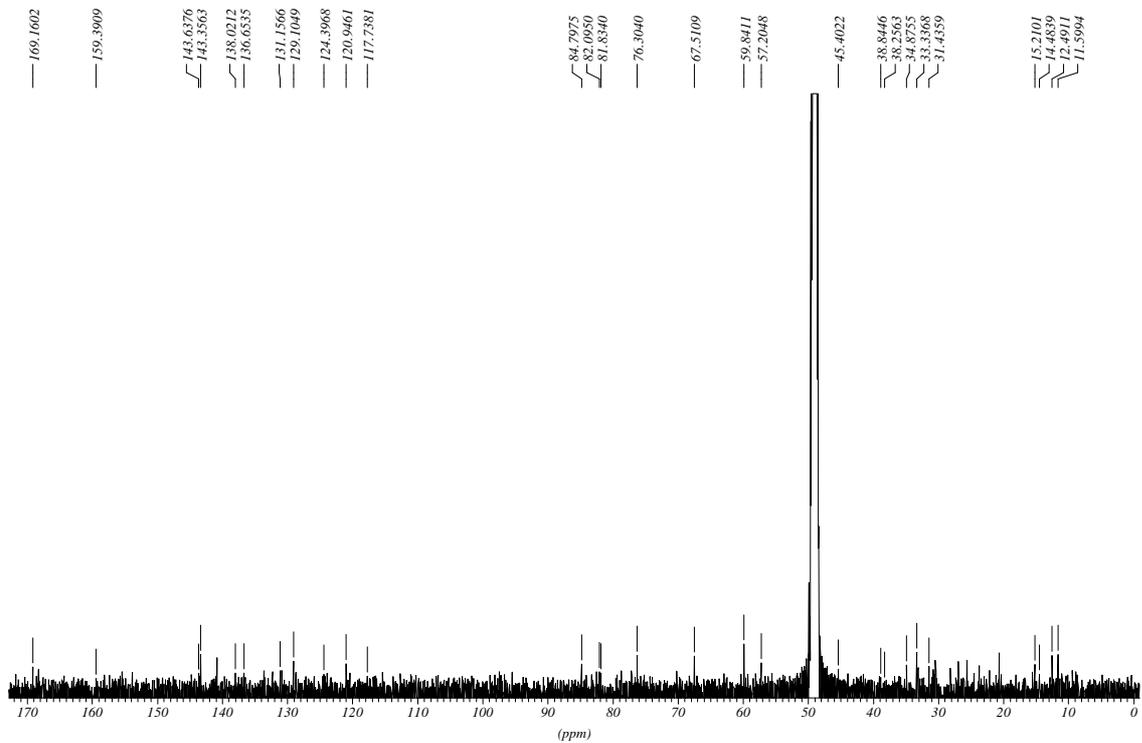
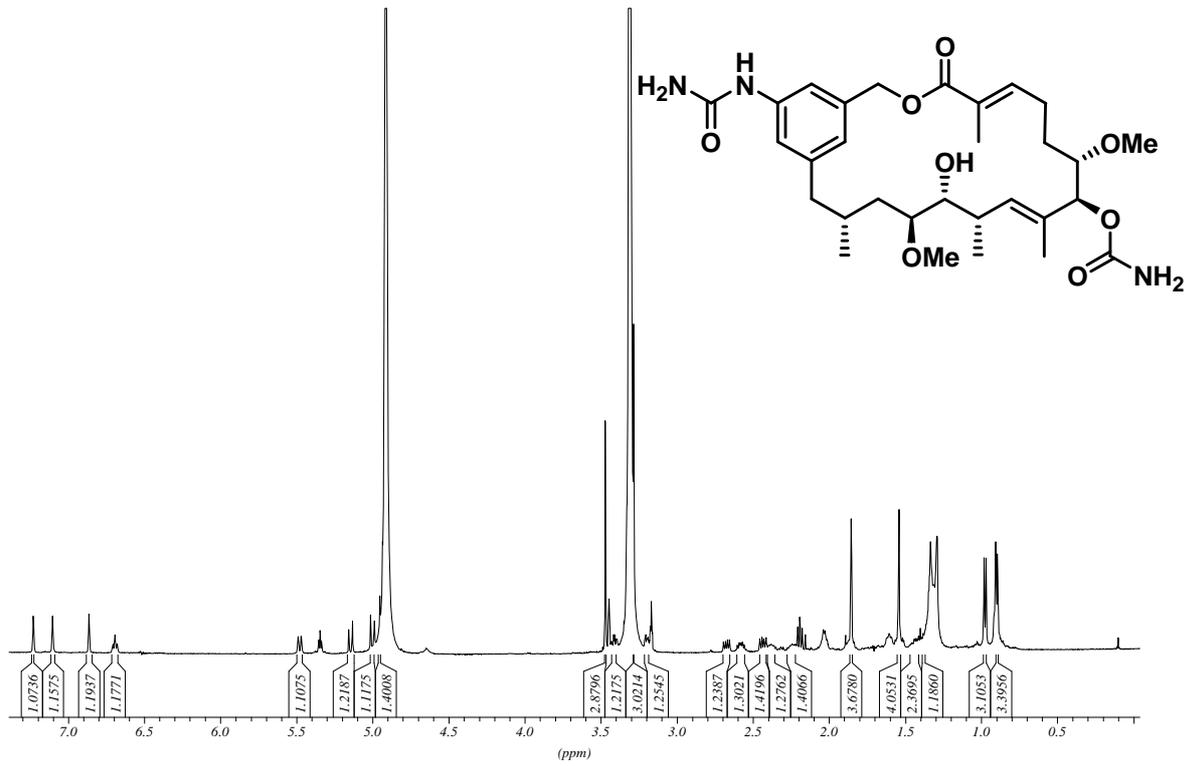


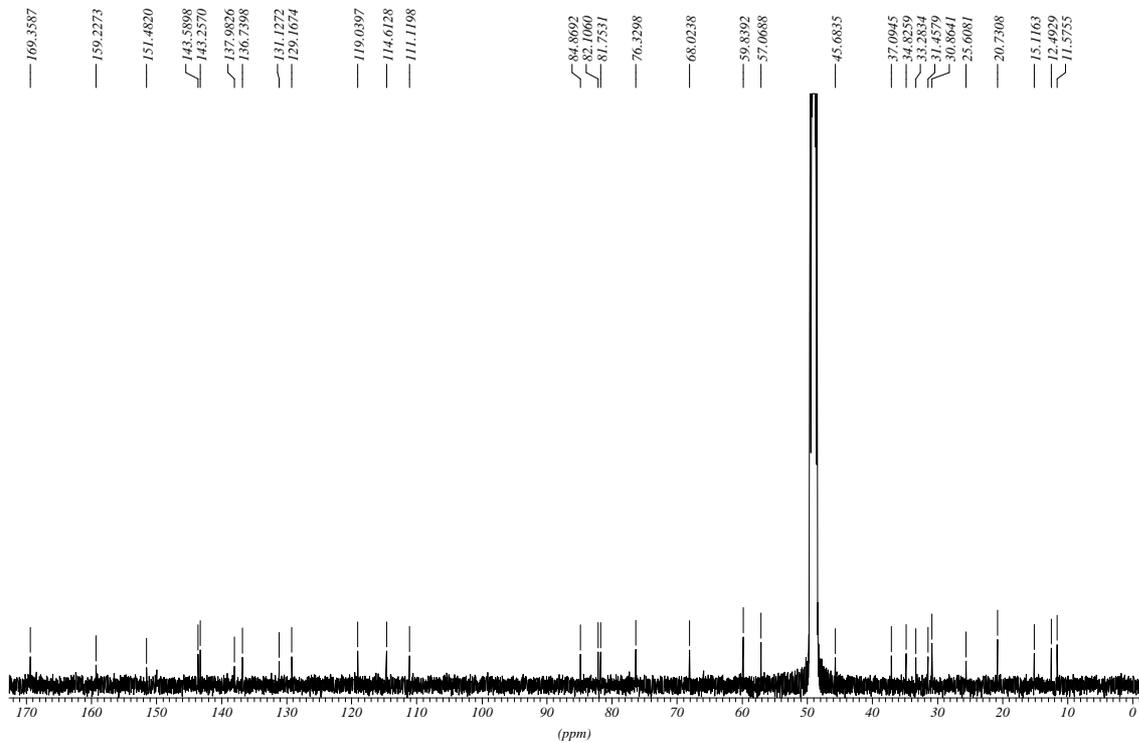
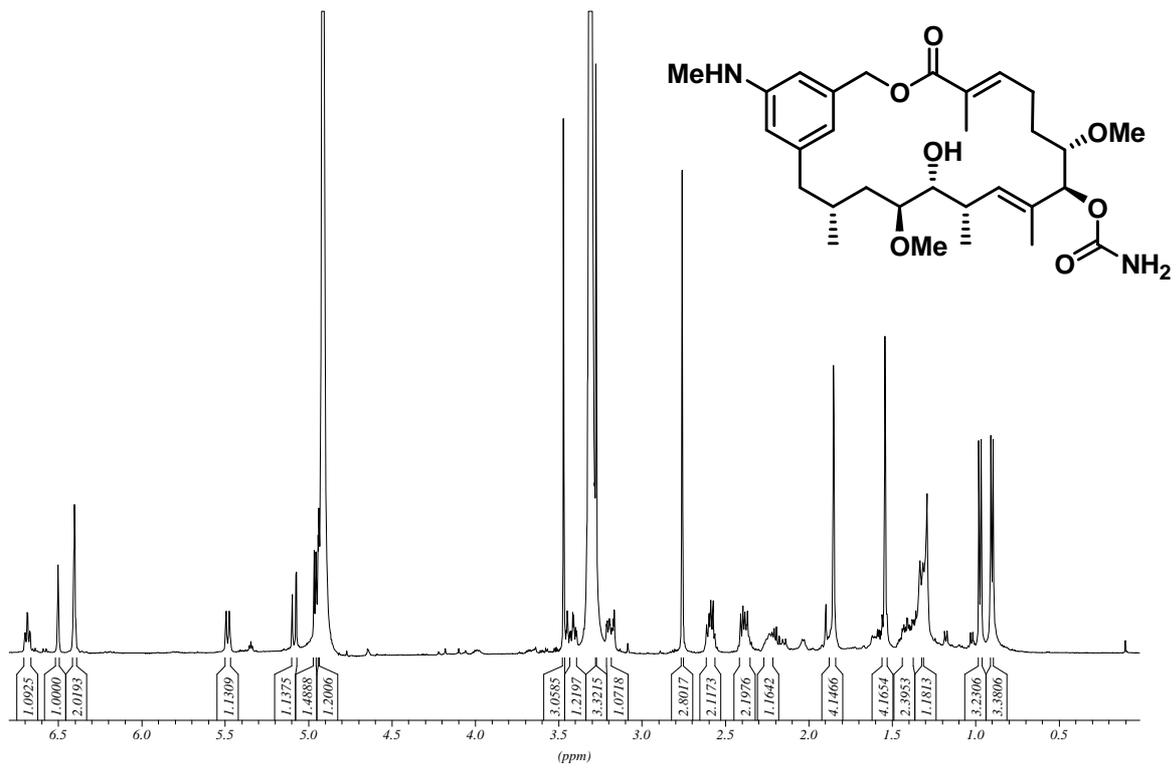


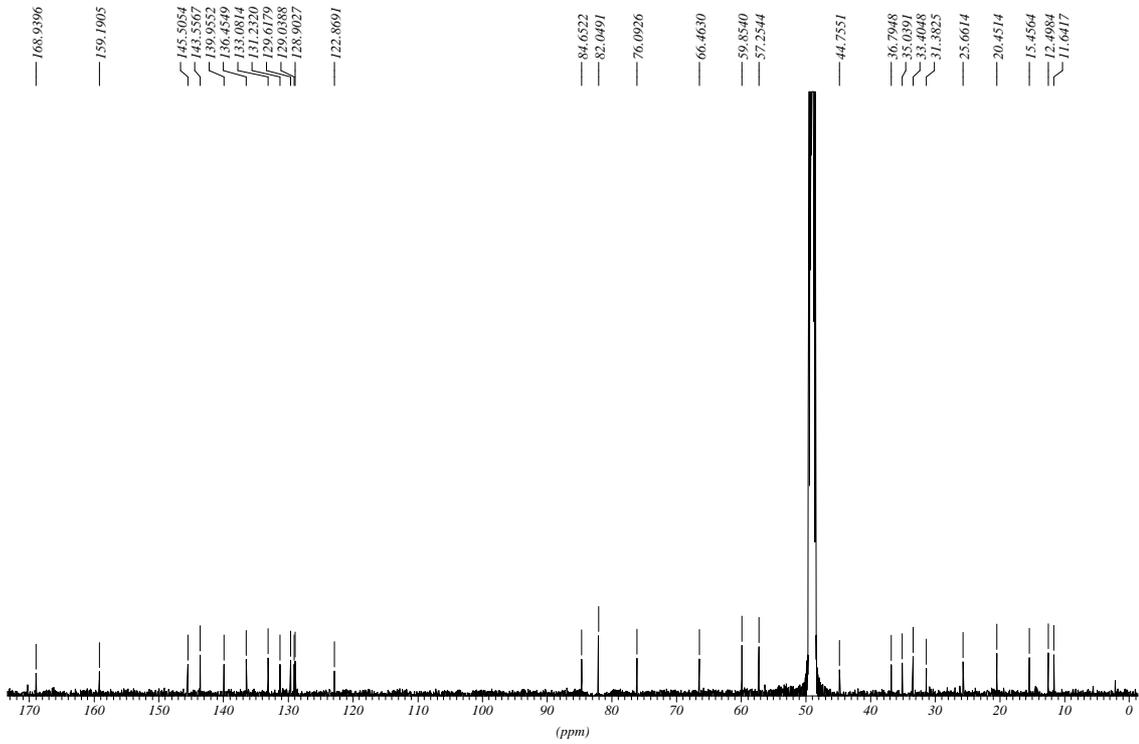
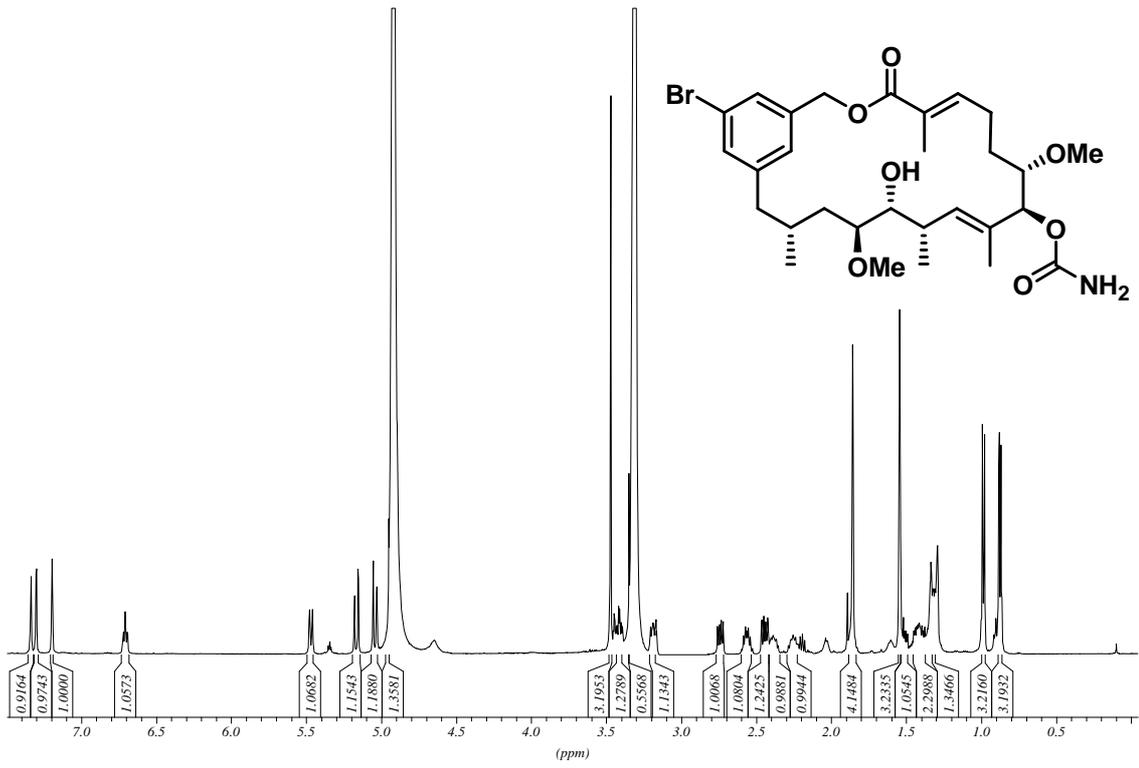


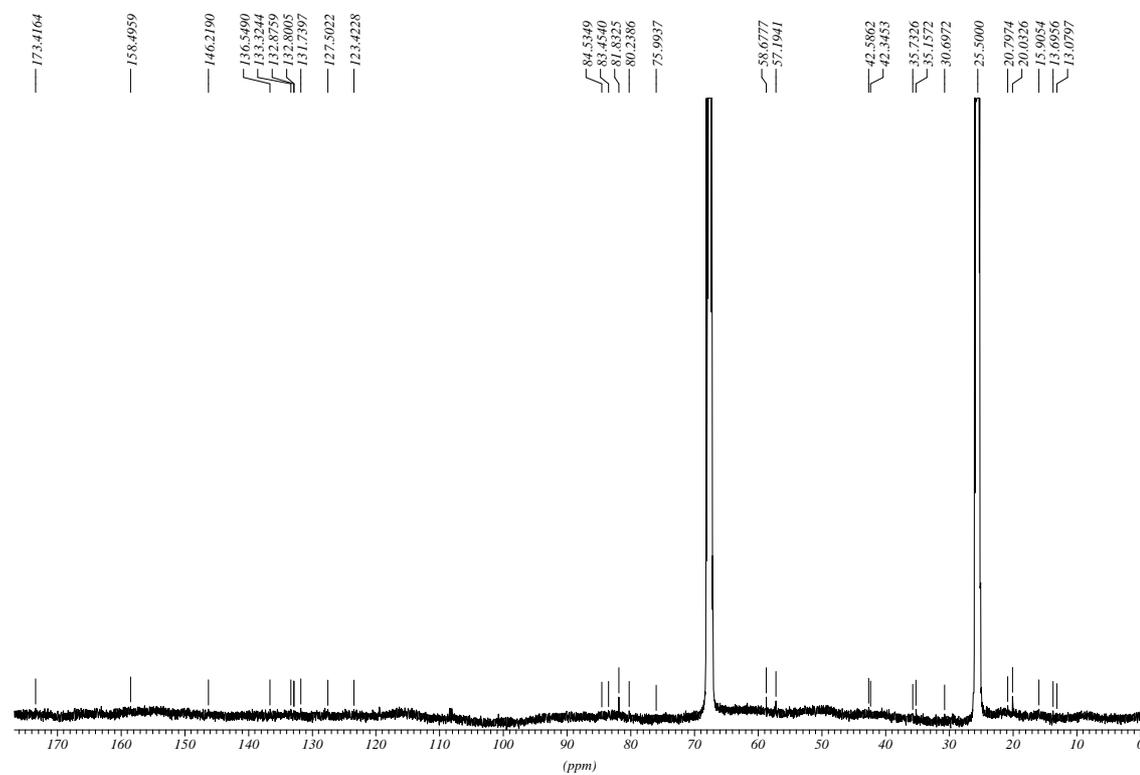
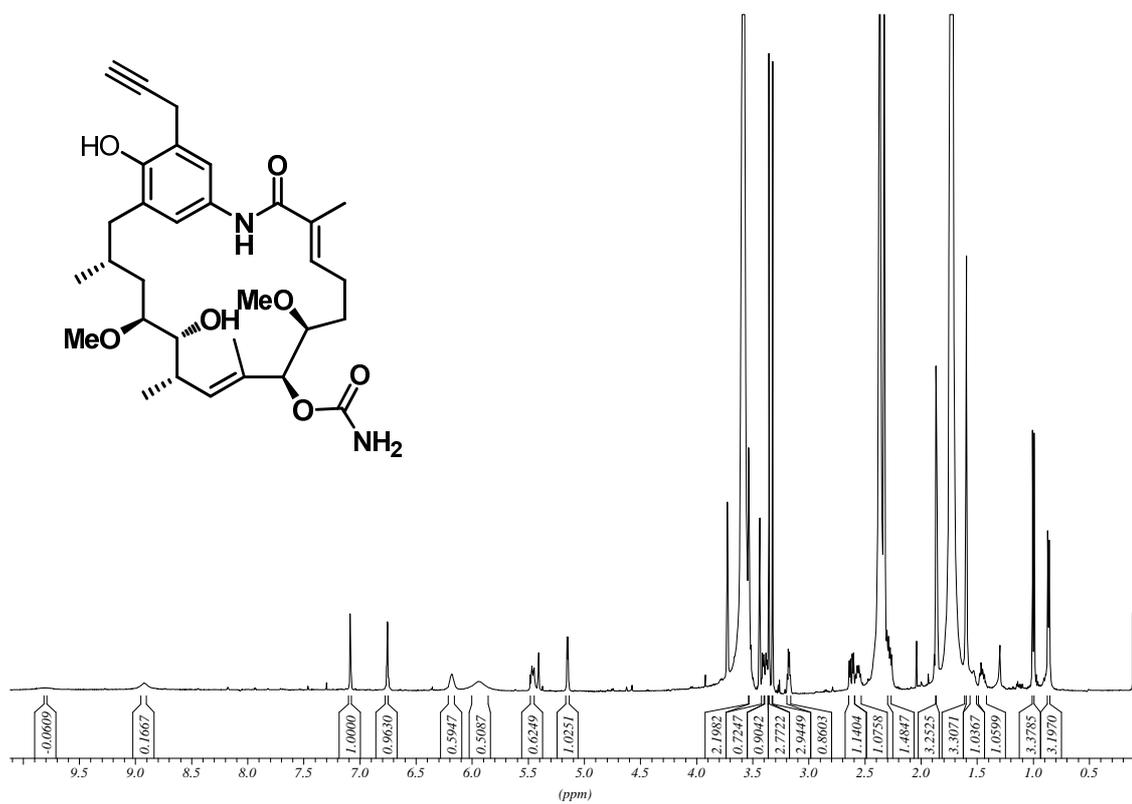


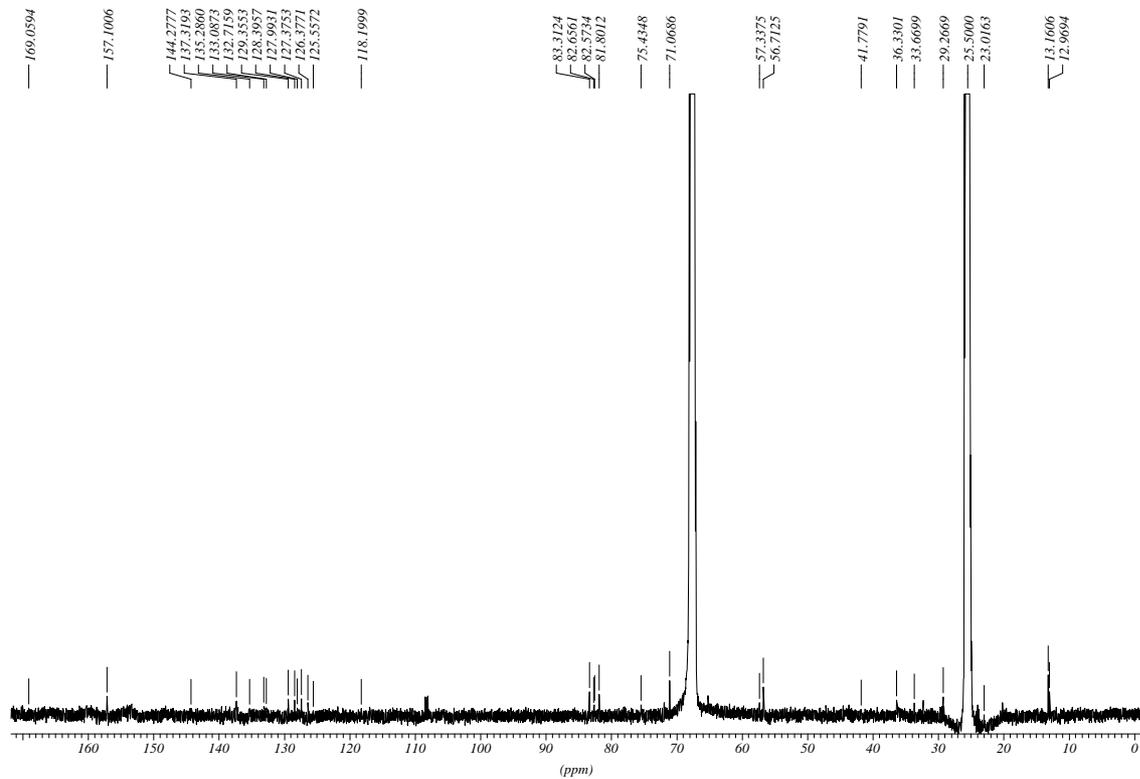
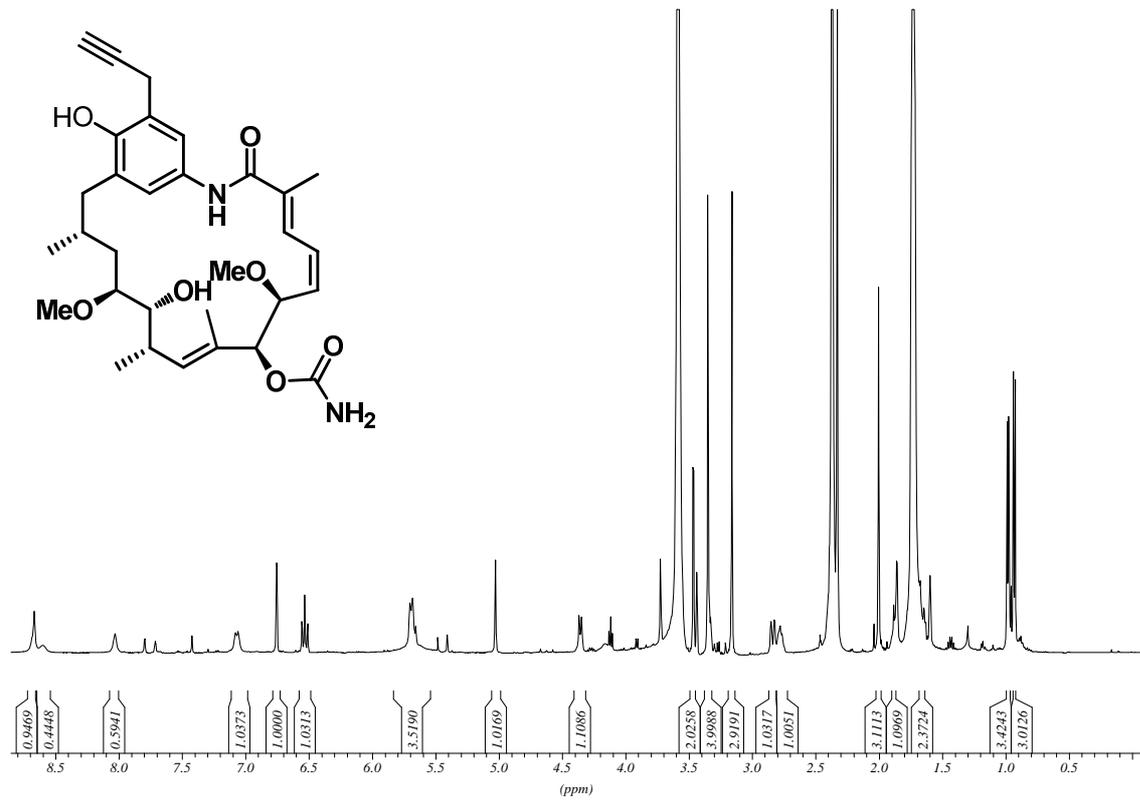


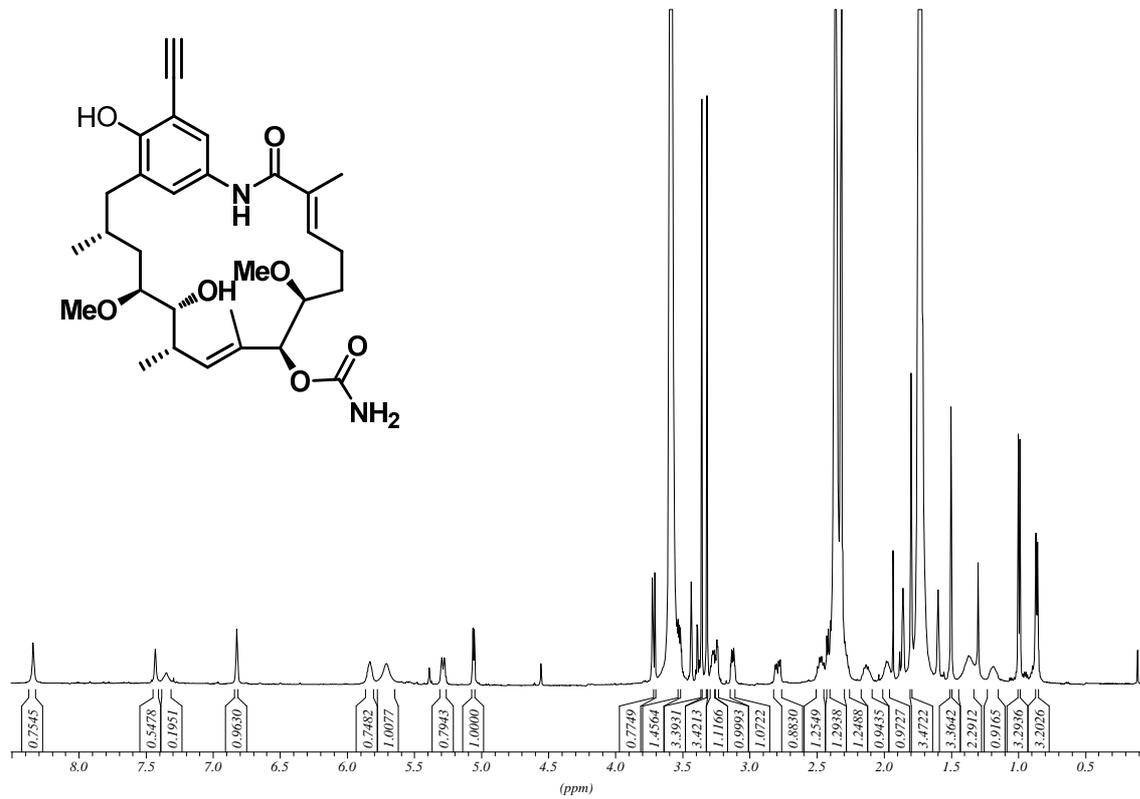




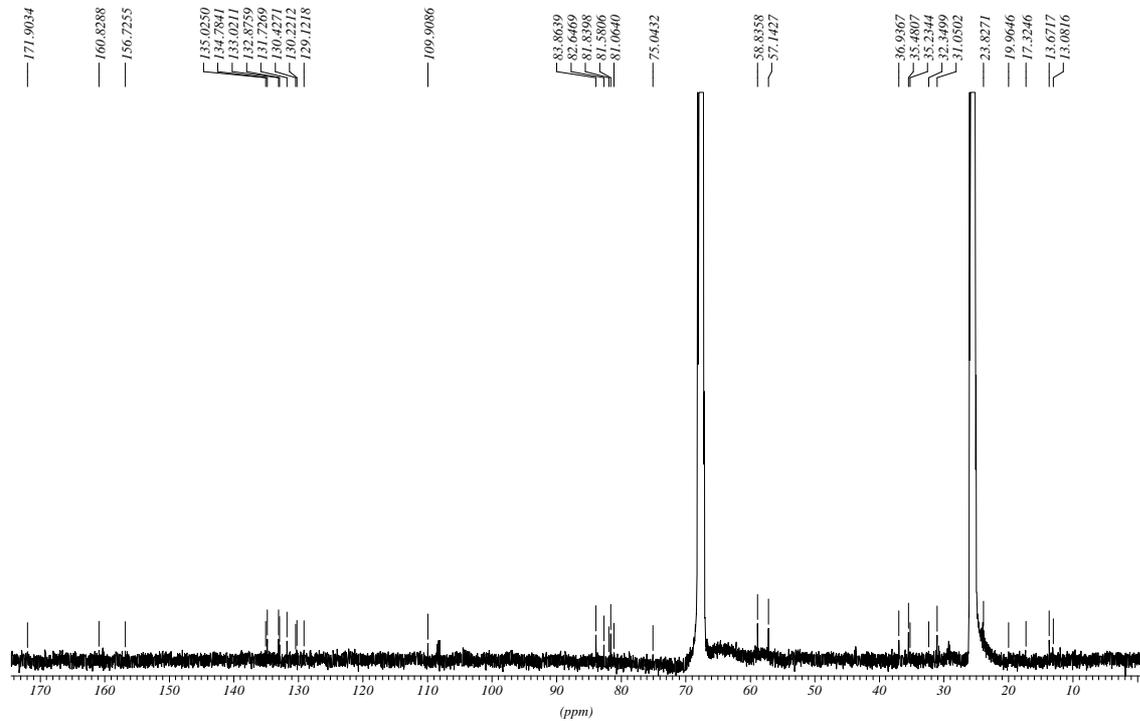


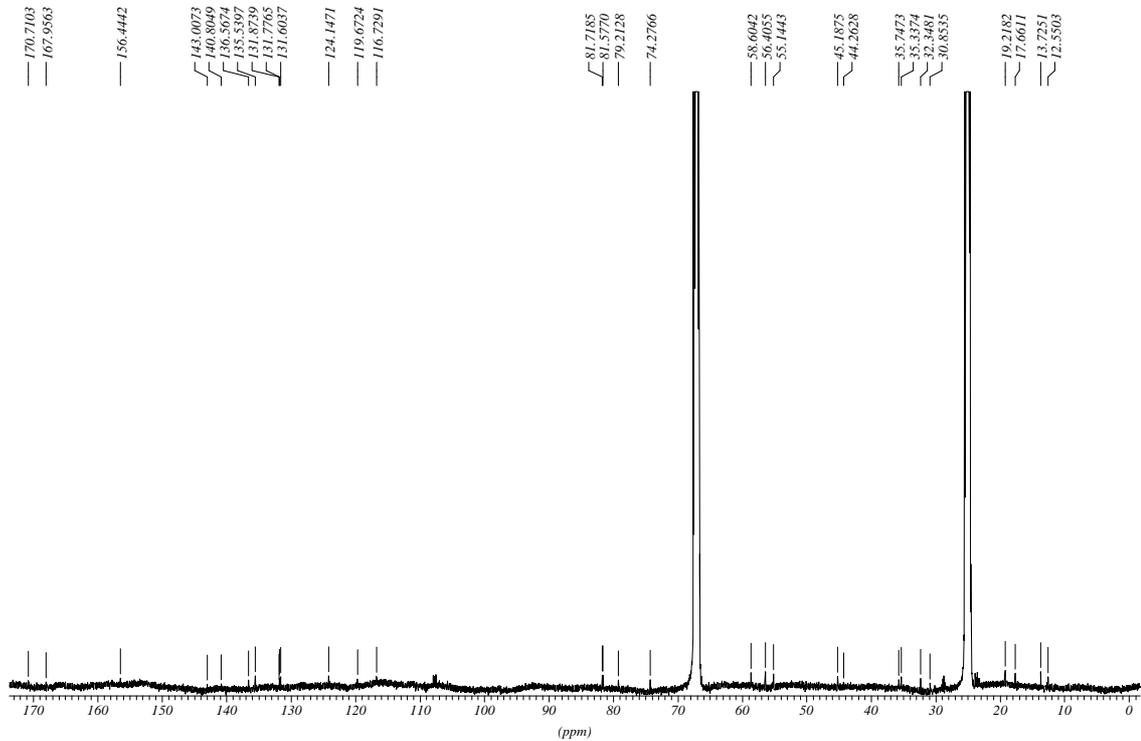


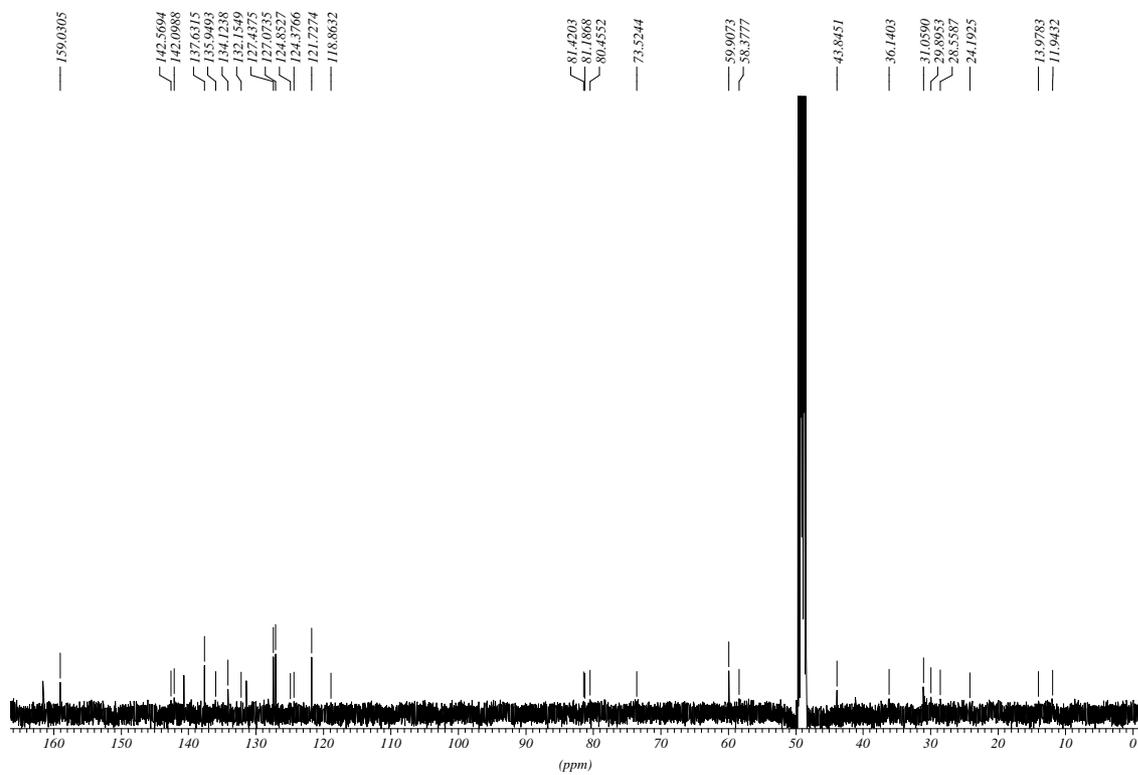
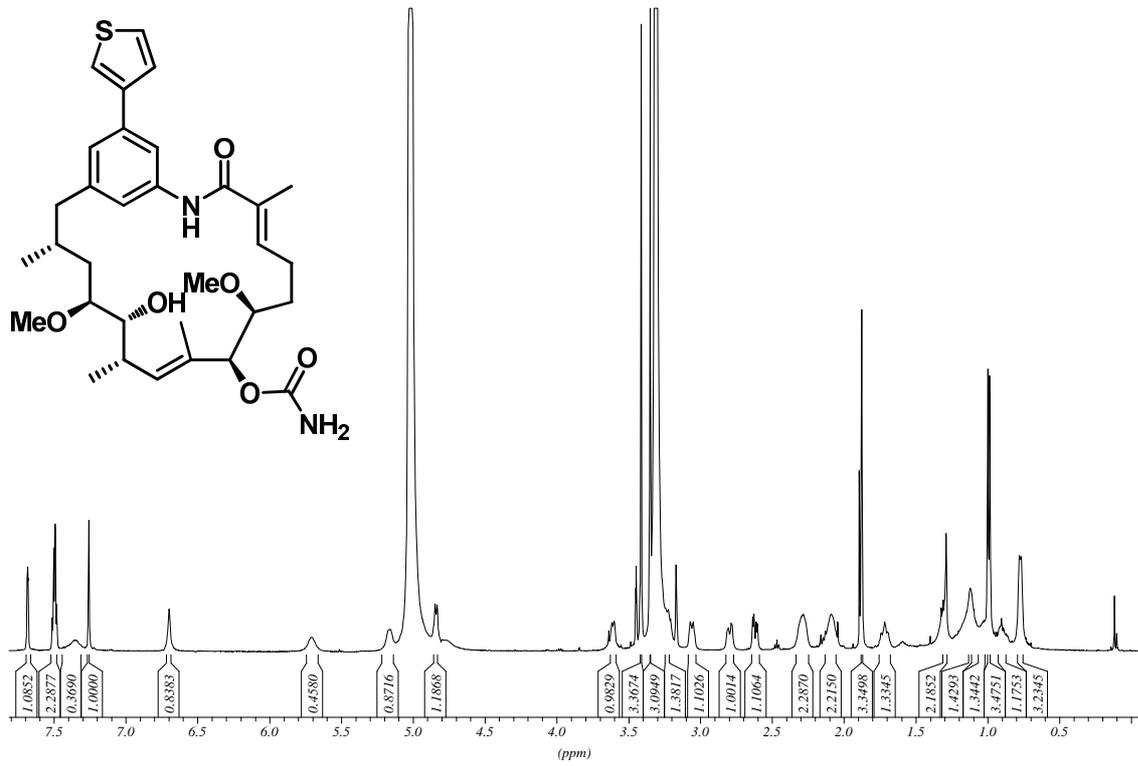


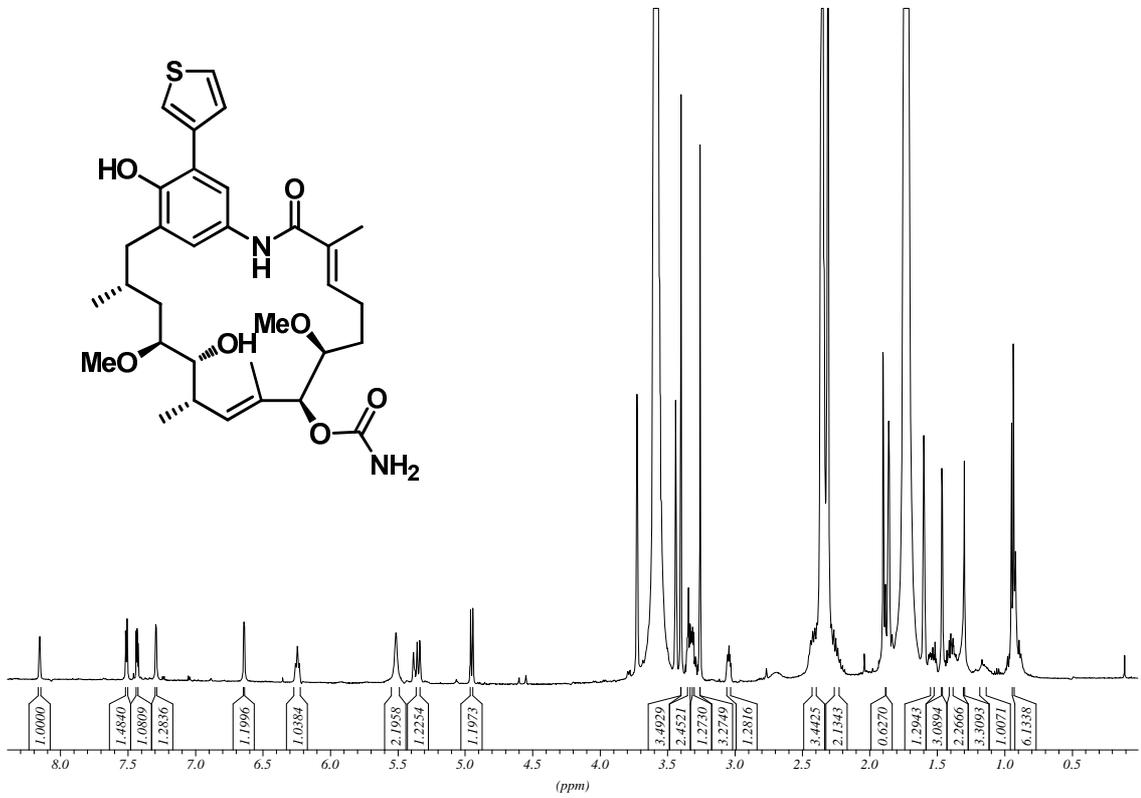
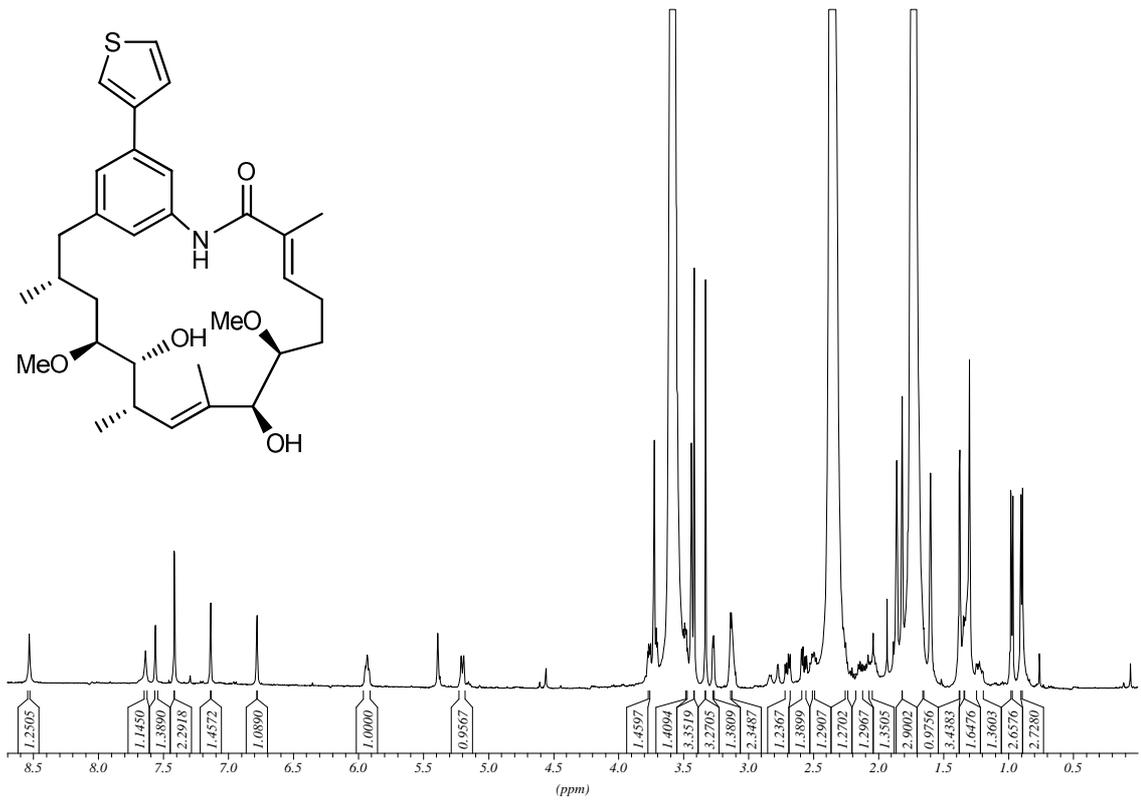


Eichner SE C42 <1.0mg in THF at 323.0K 13C-BB 29.10.10 Fohrer



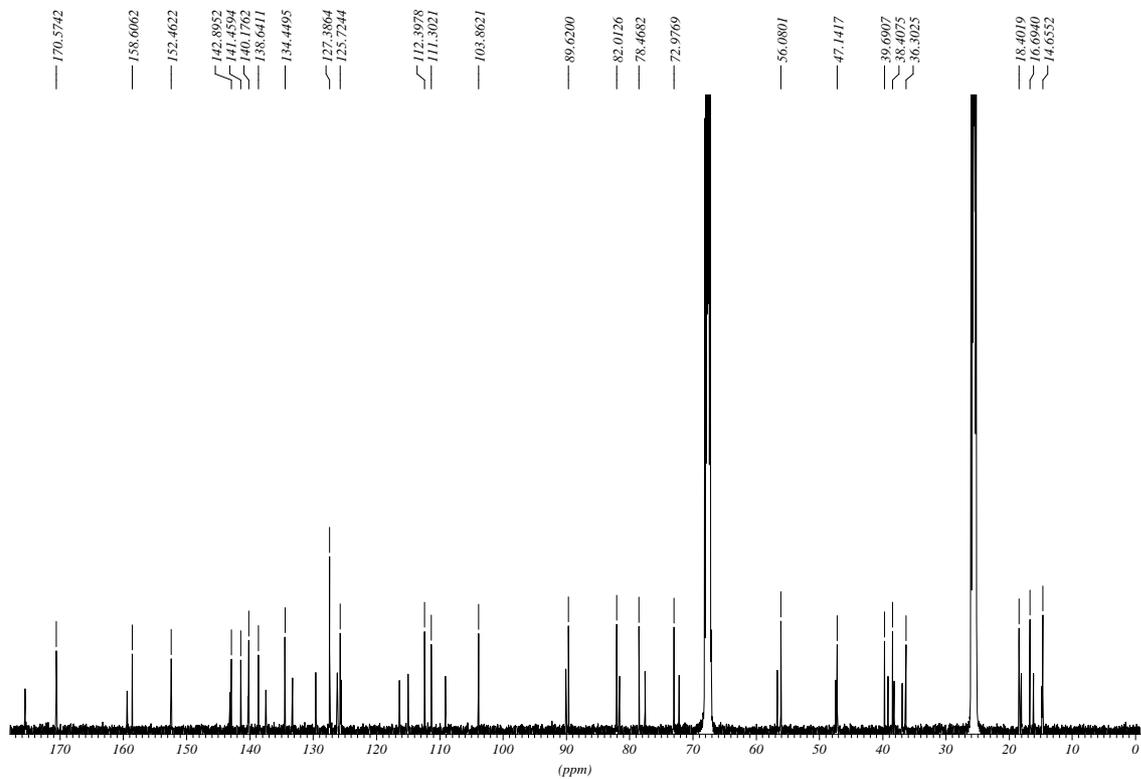
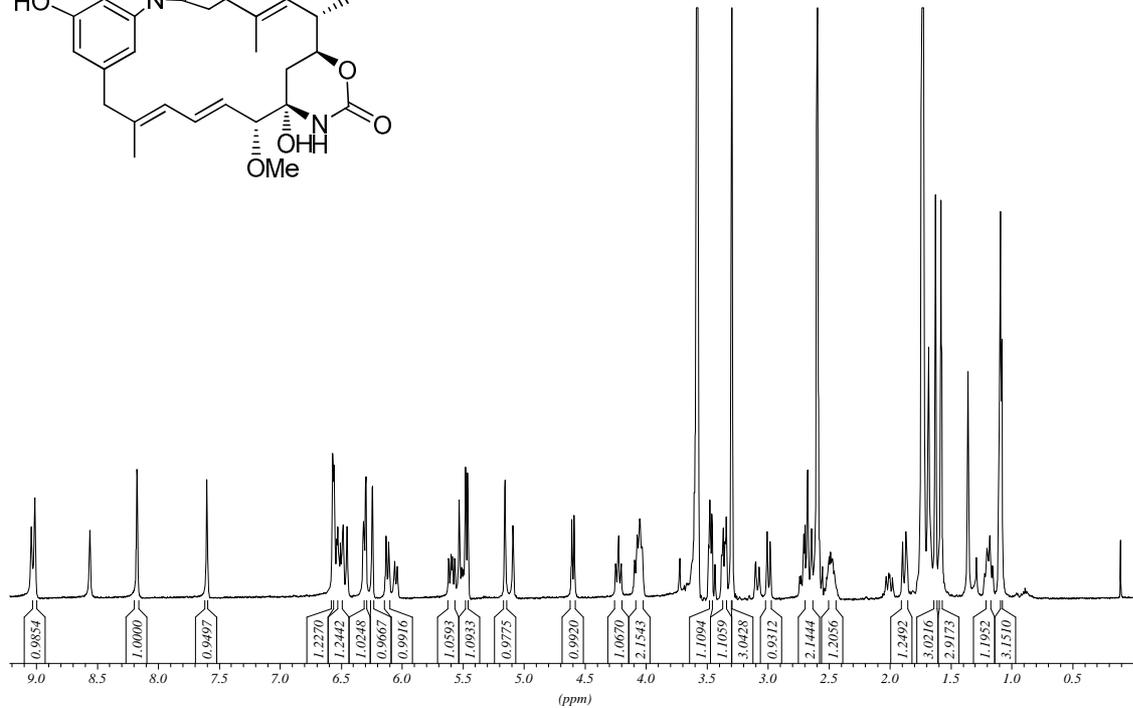
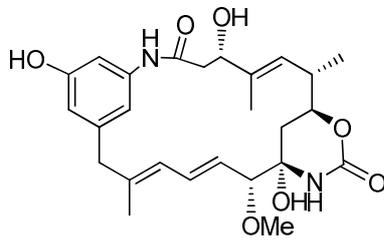




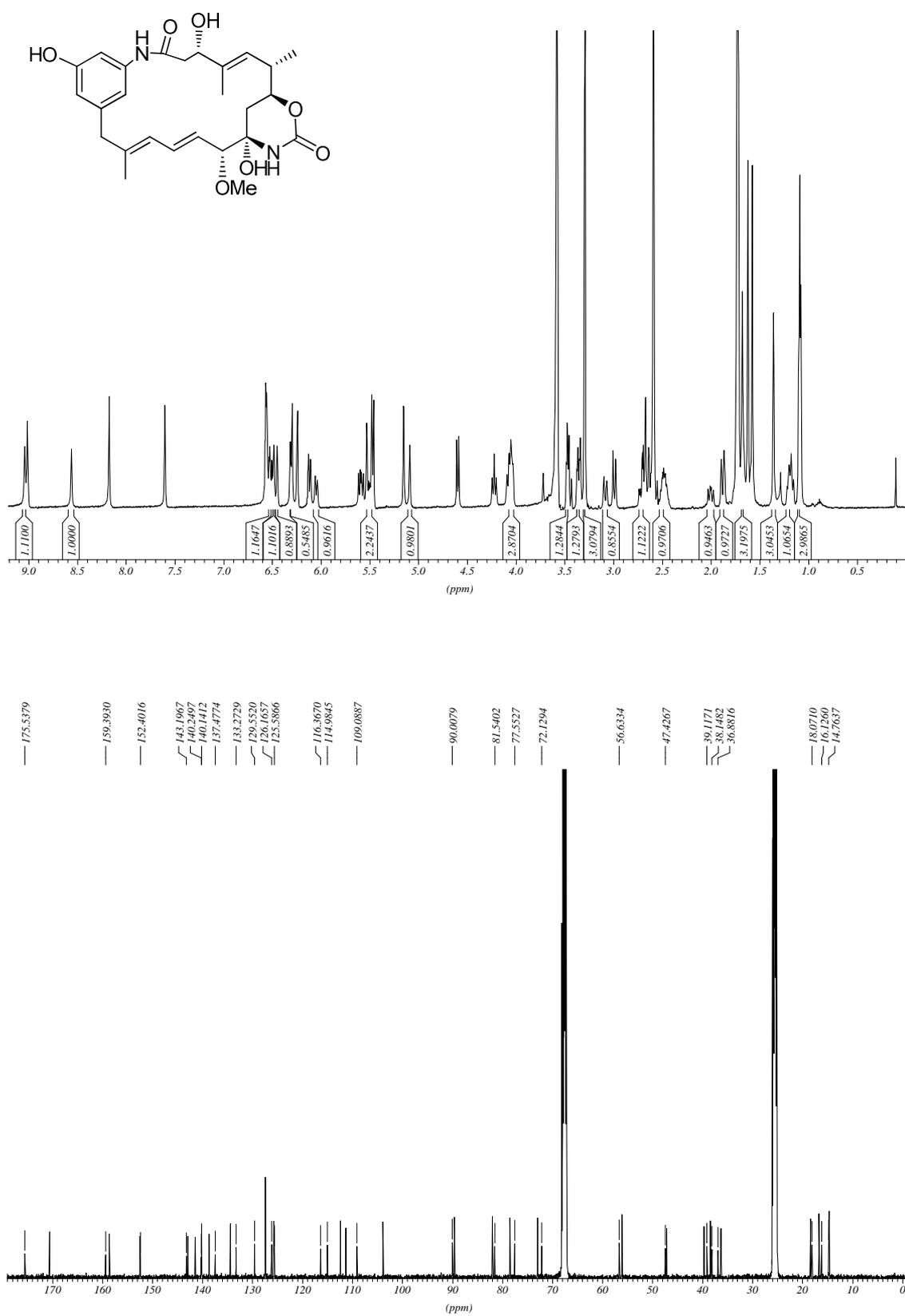


Proansamitocin-Derivate

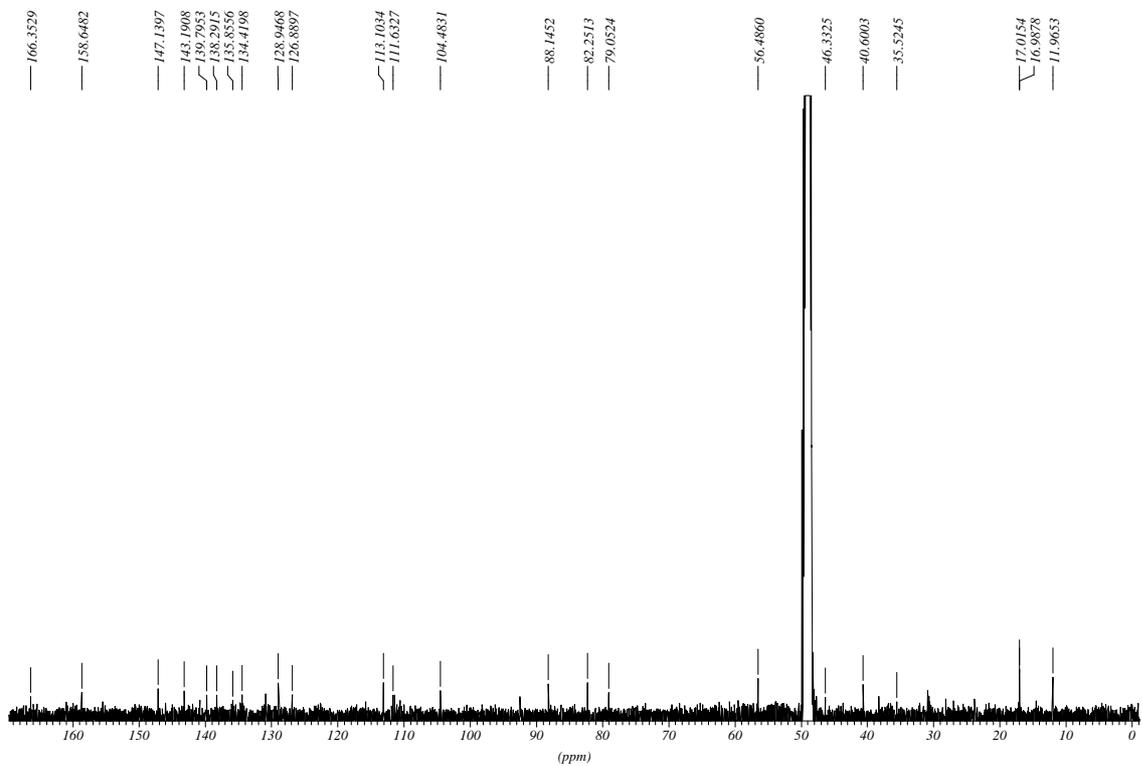
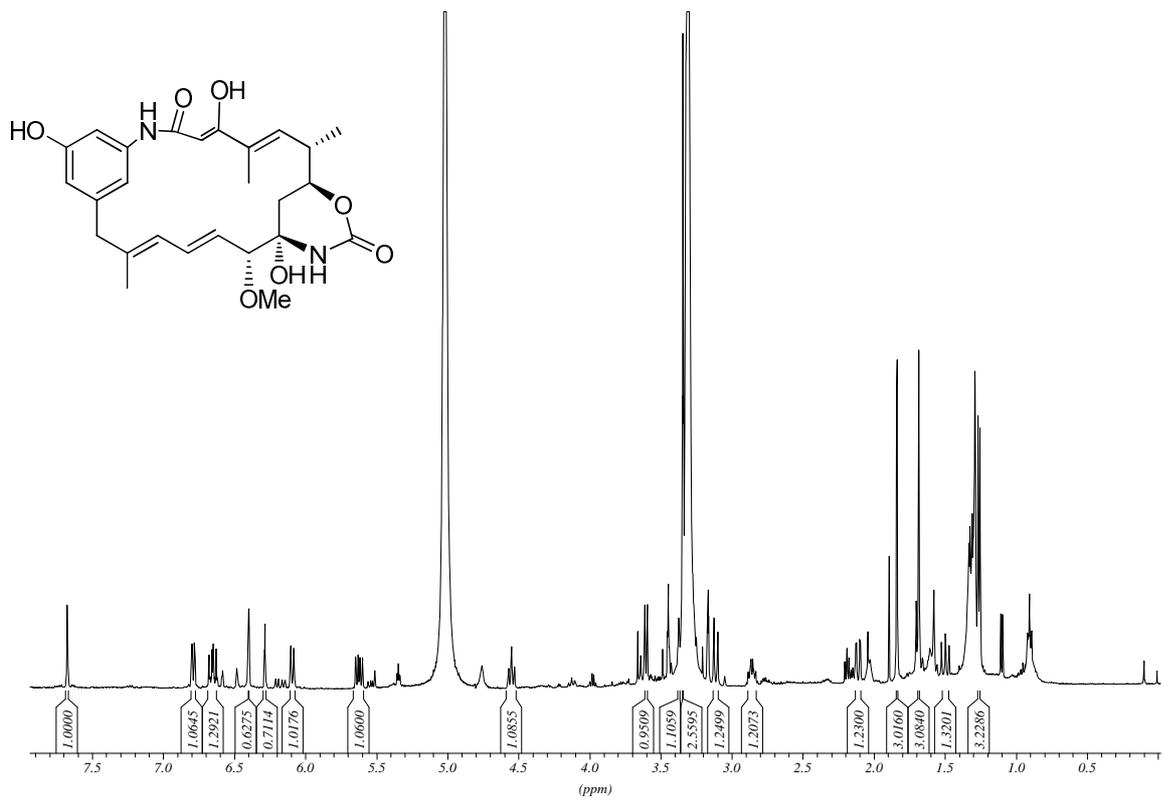
Konformer 1

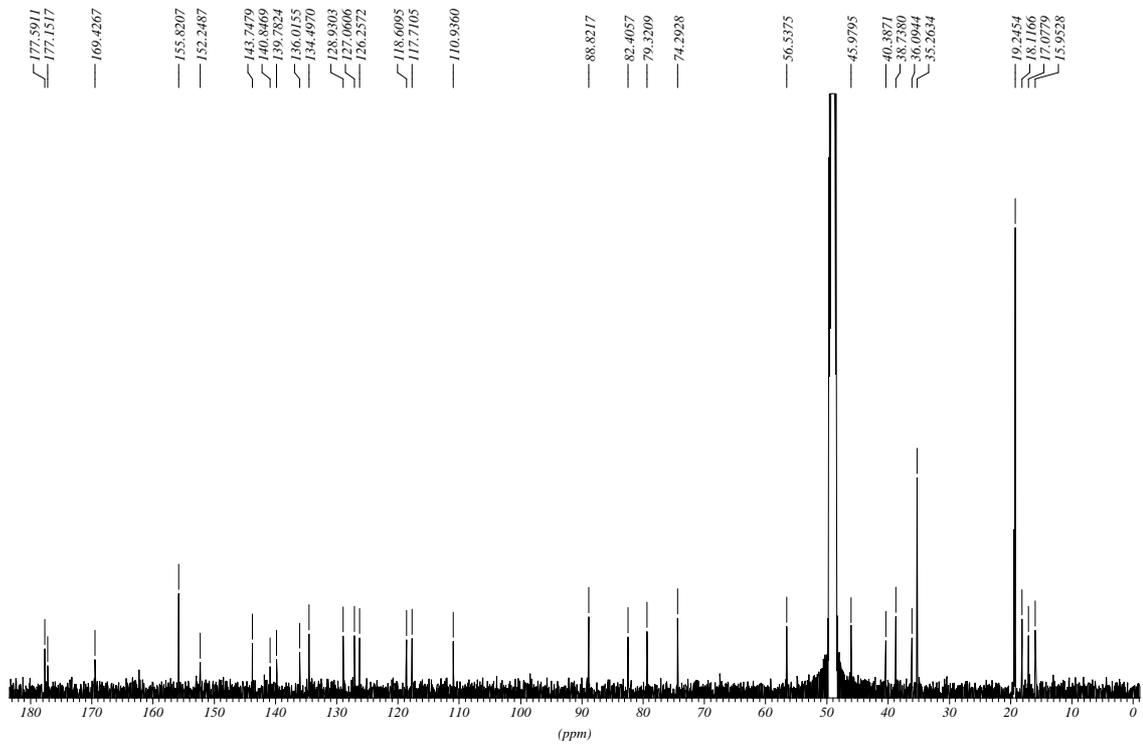
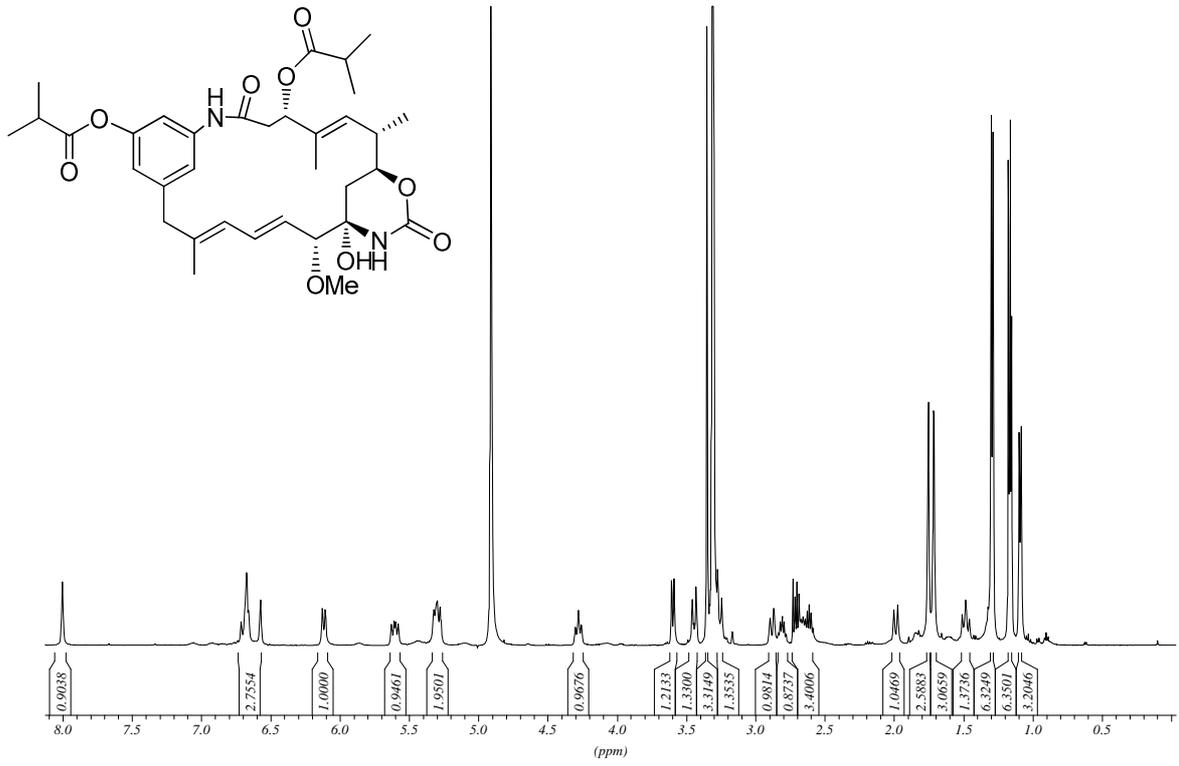


Konformer 2

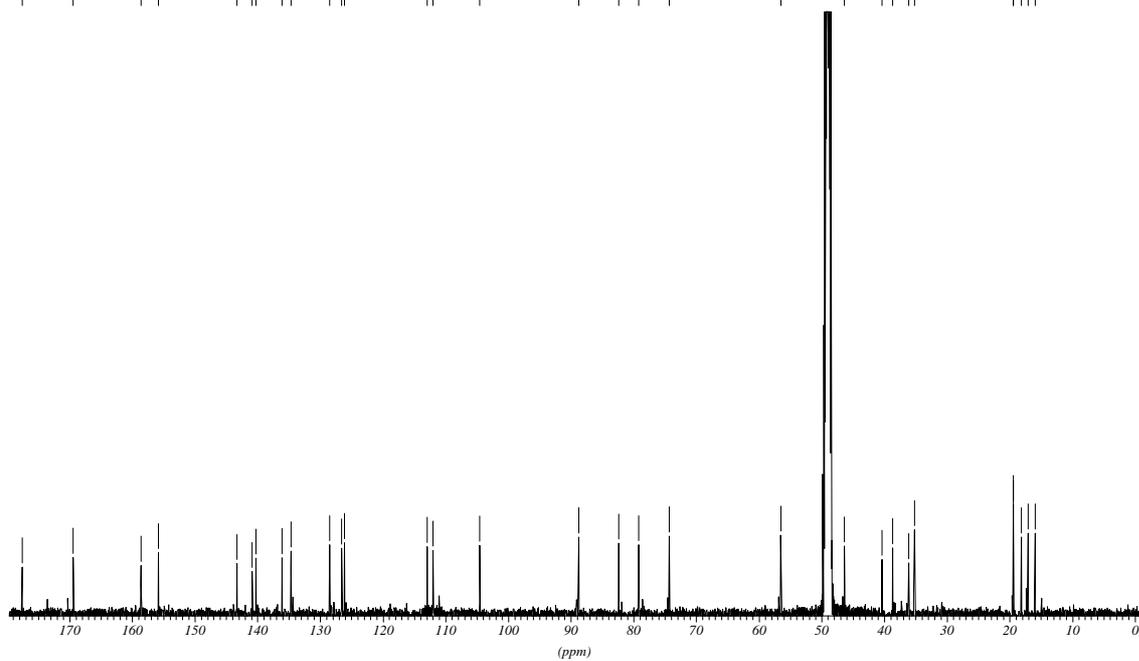
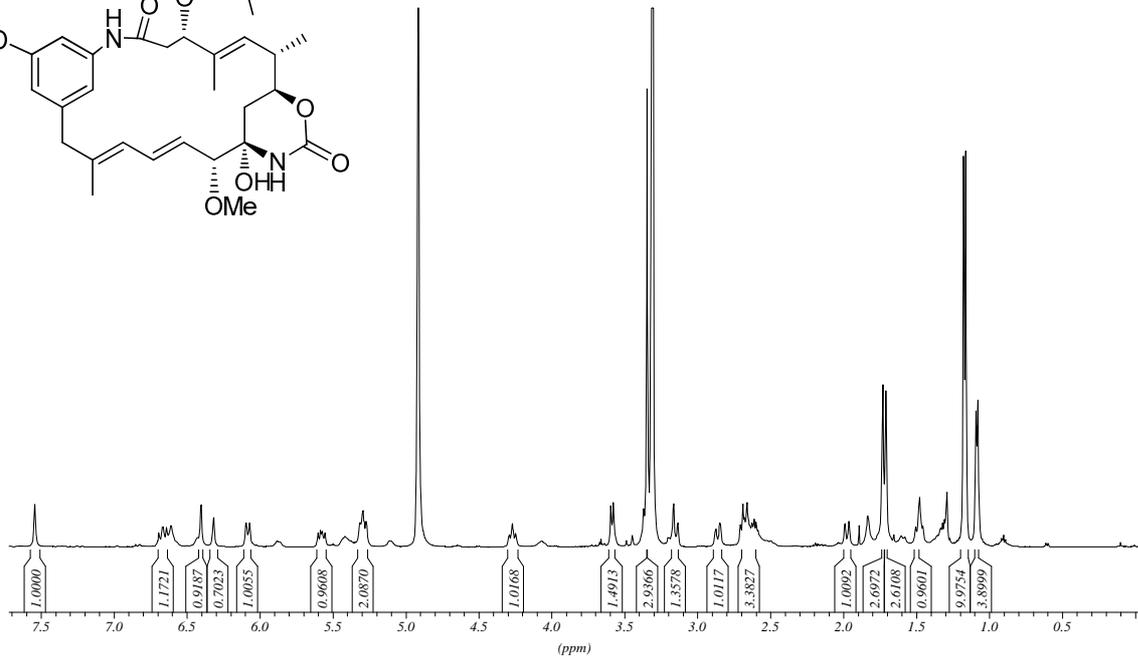
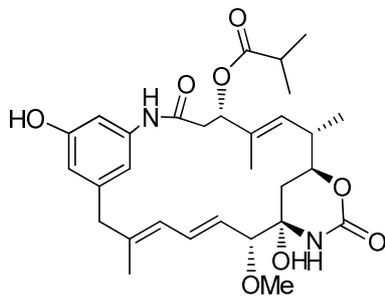


Konformer 1

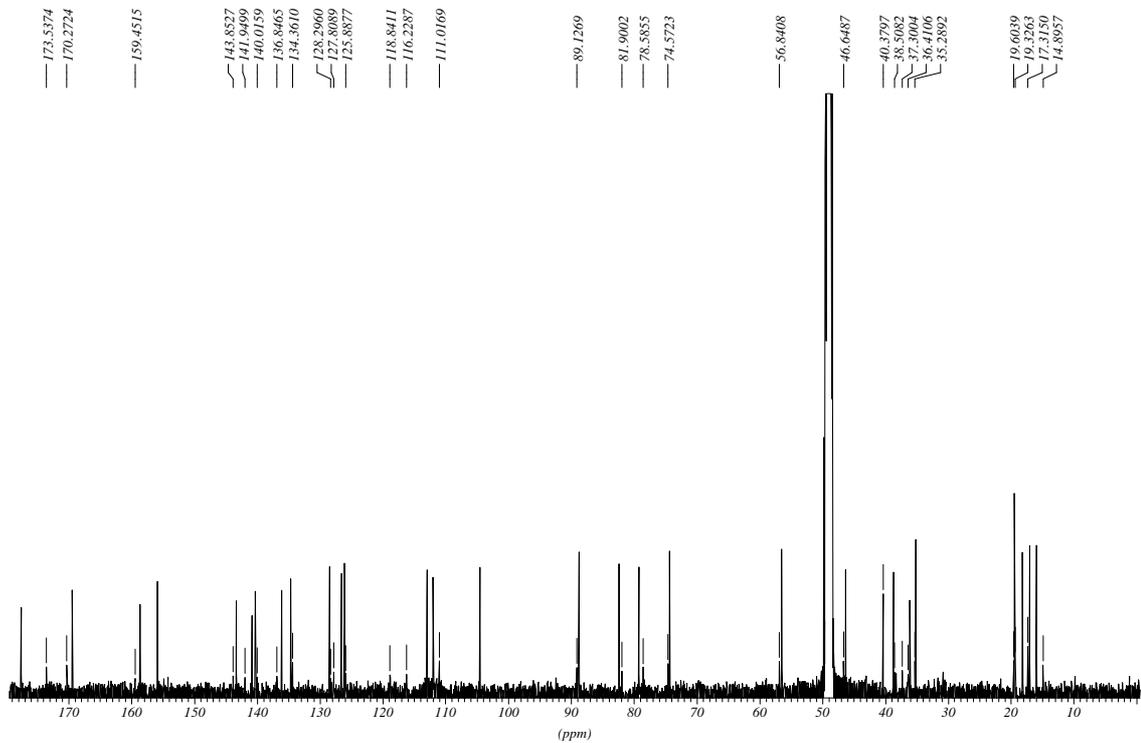
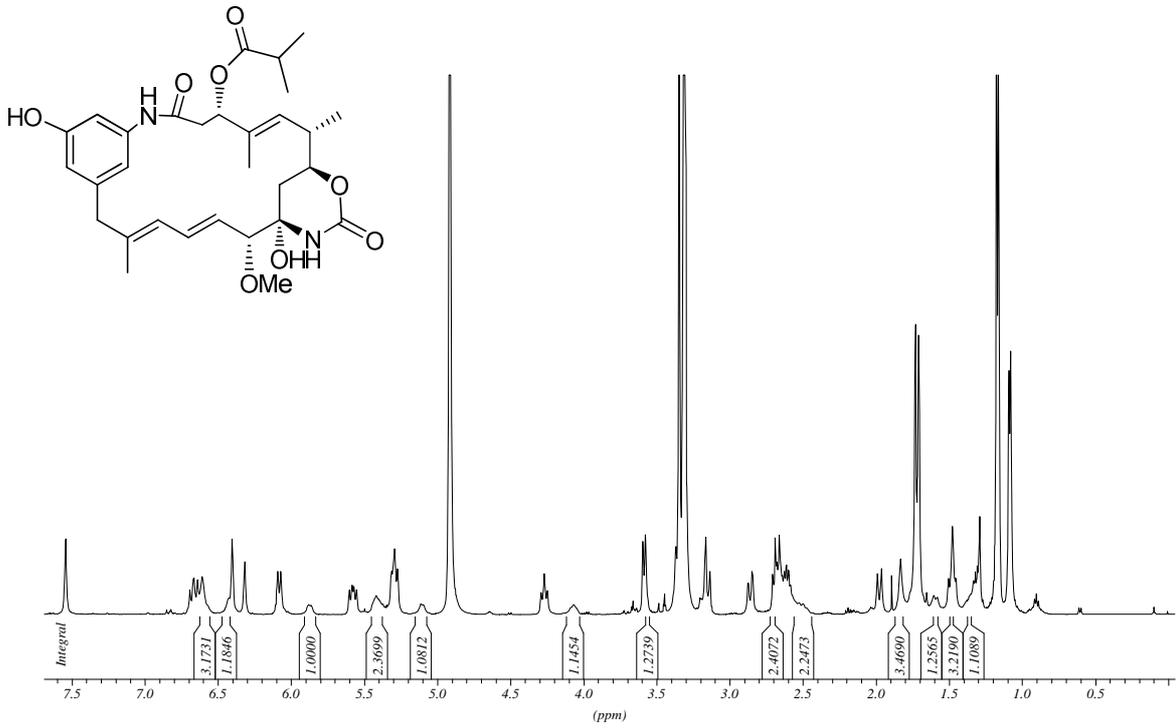




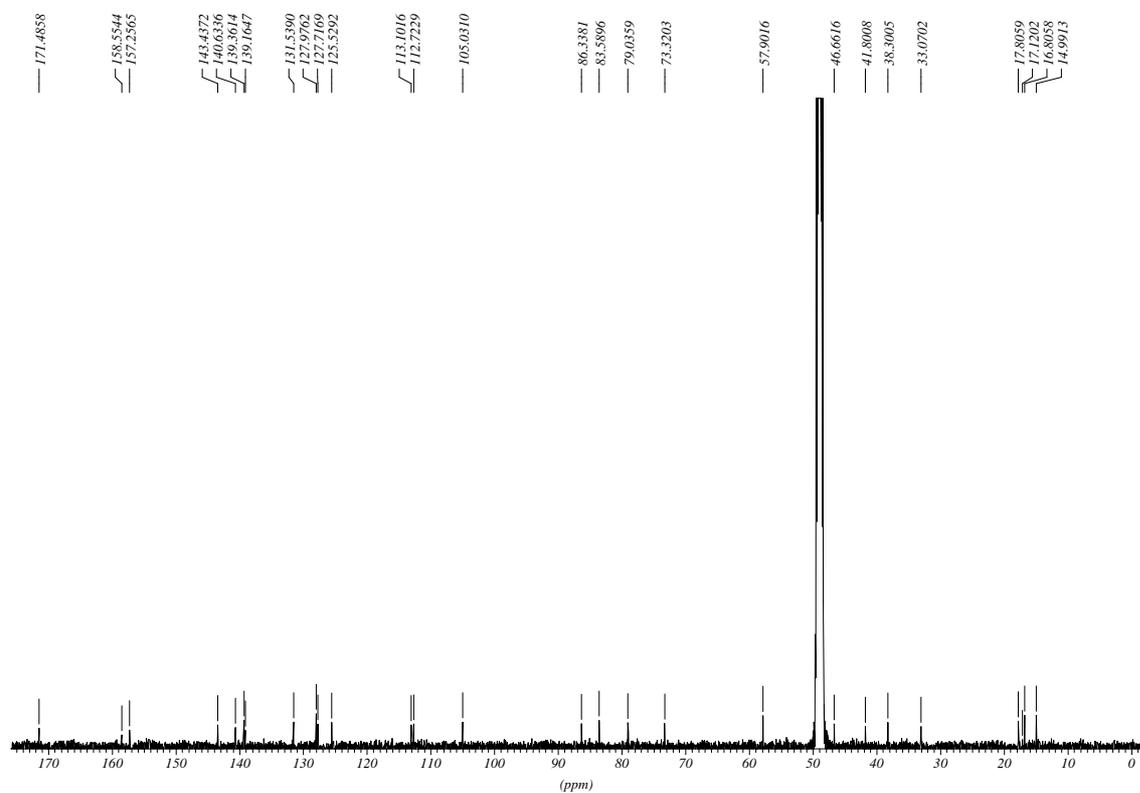
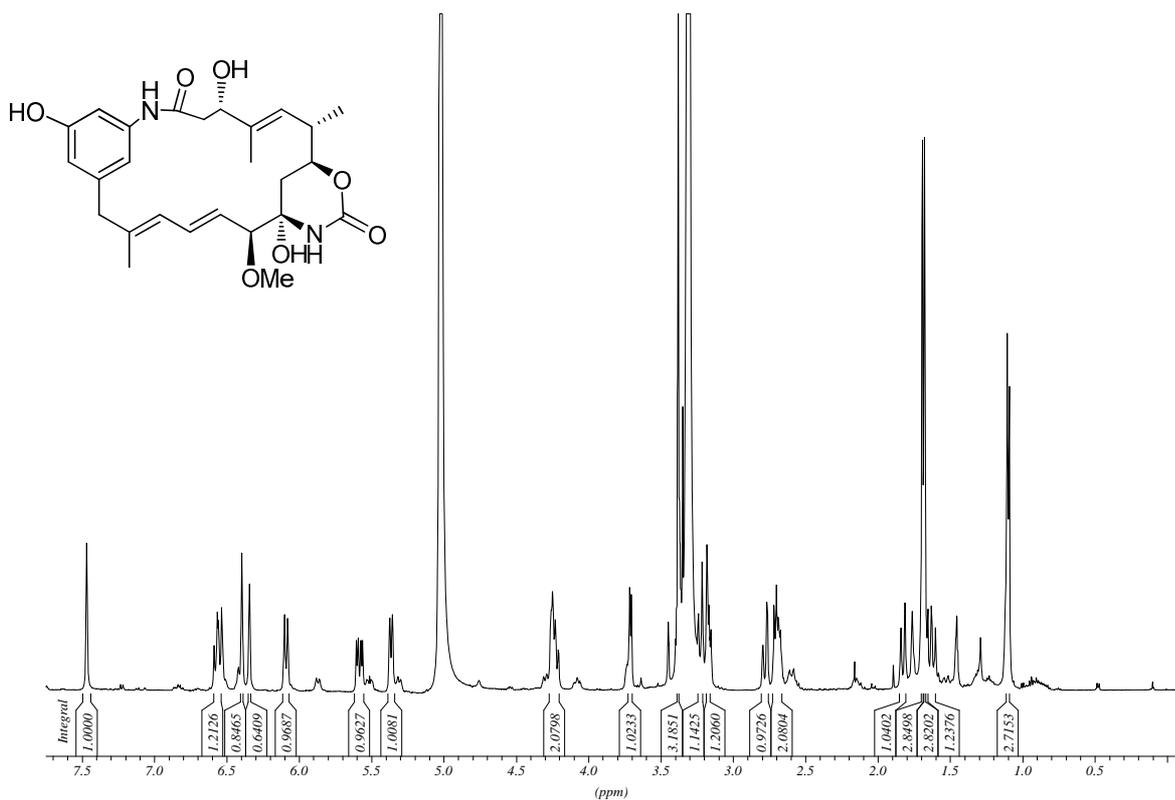
Konformer 1



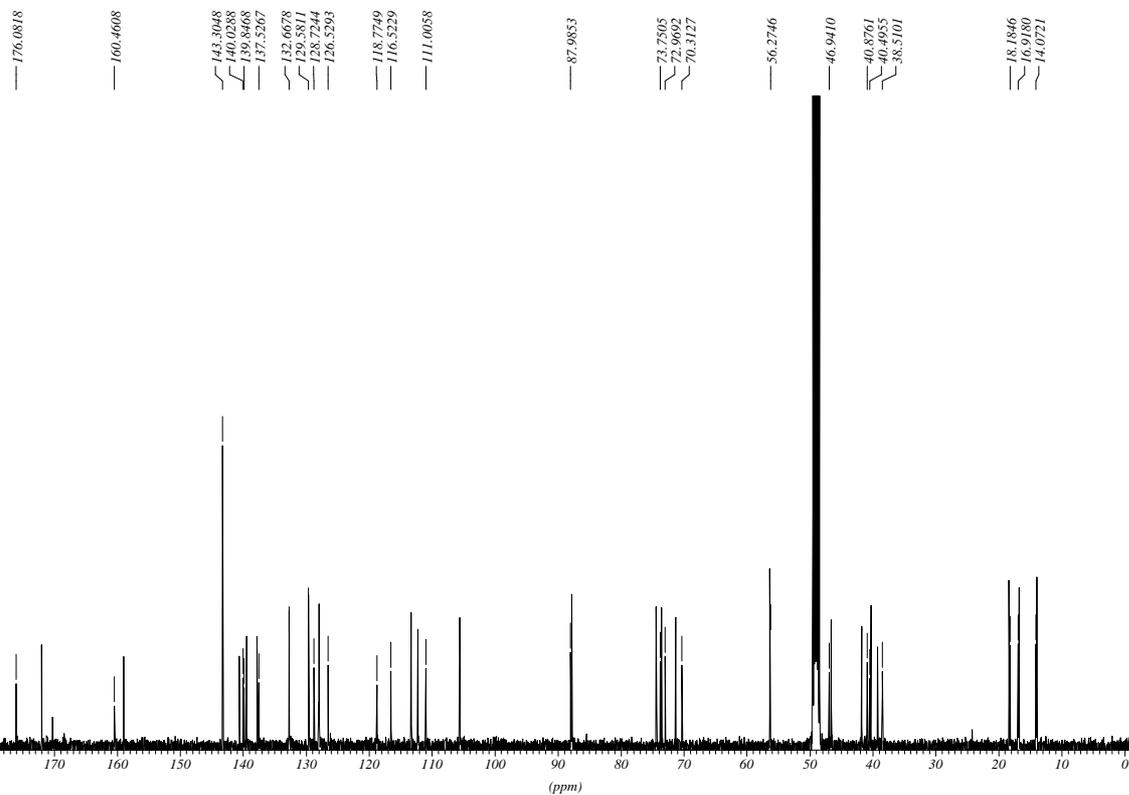
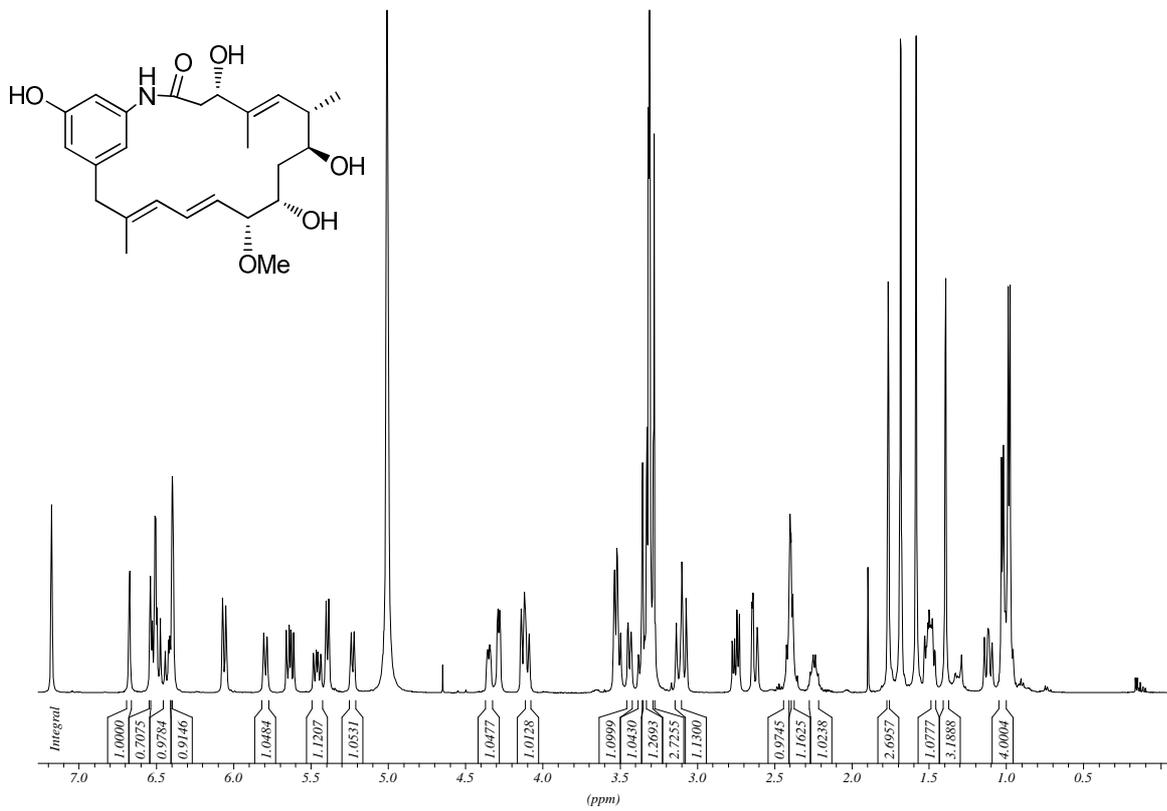
Konformer 2



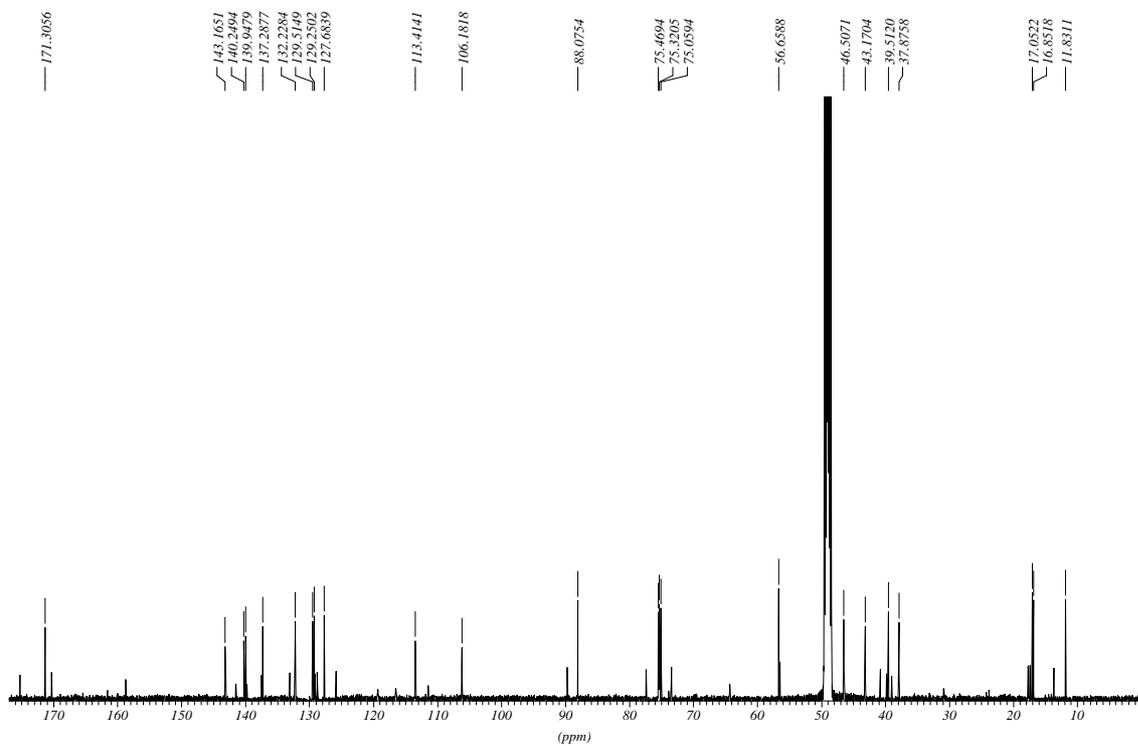
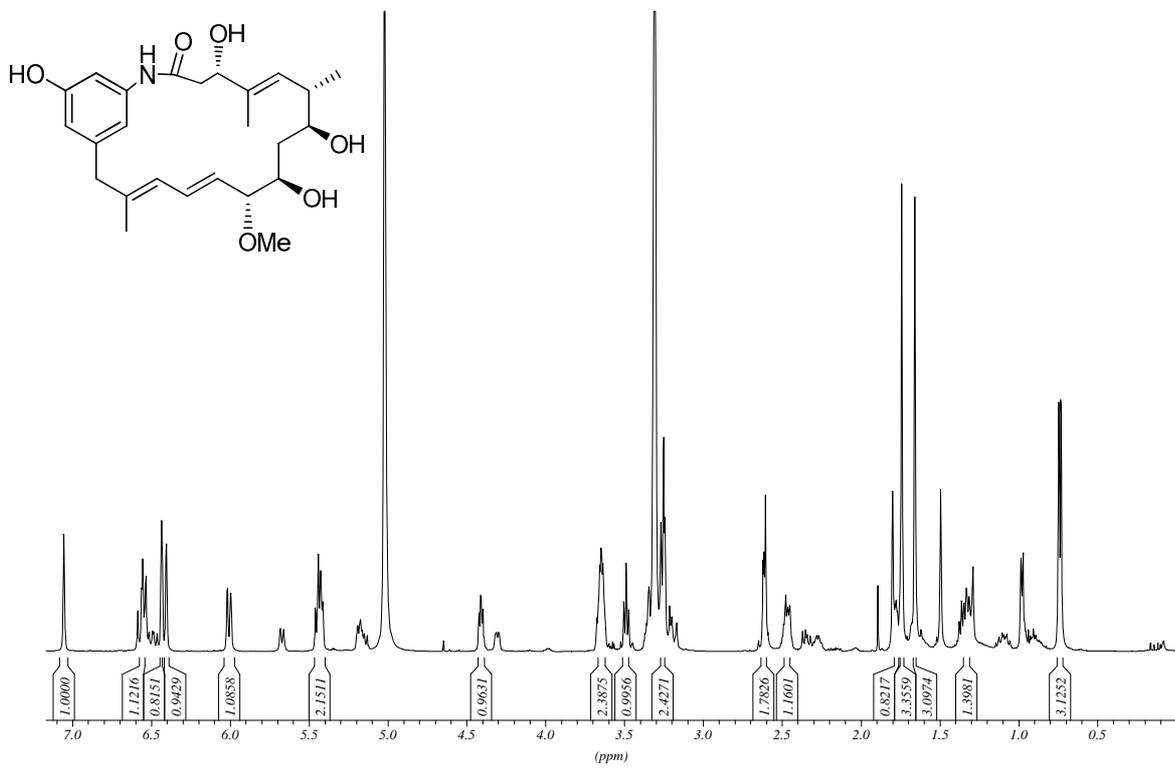
Konformer 1



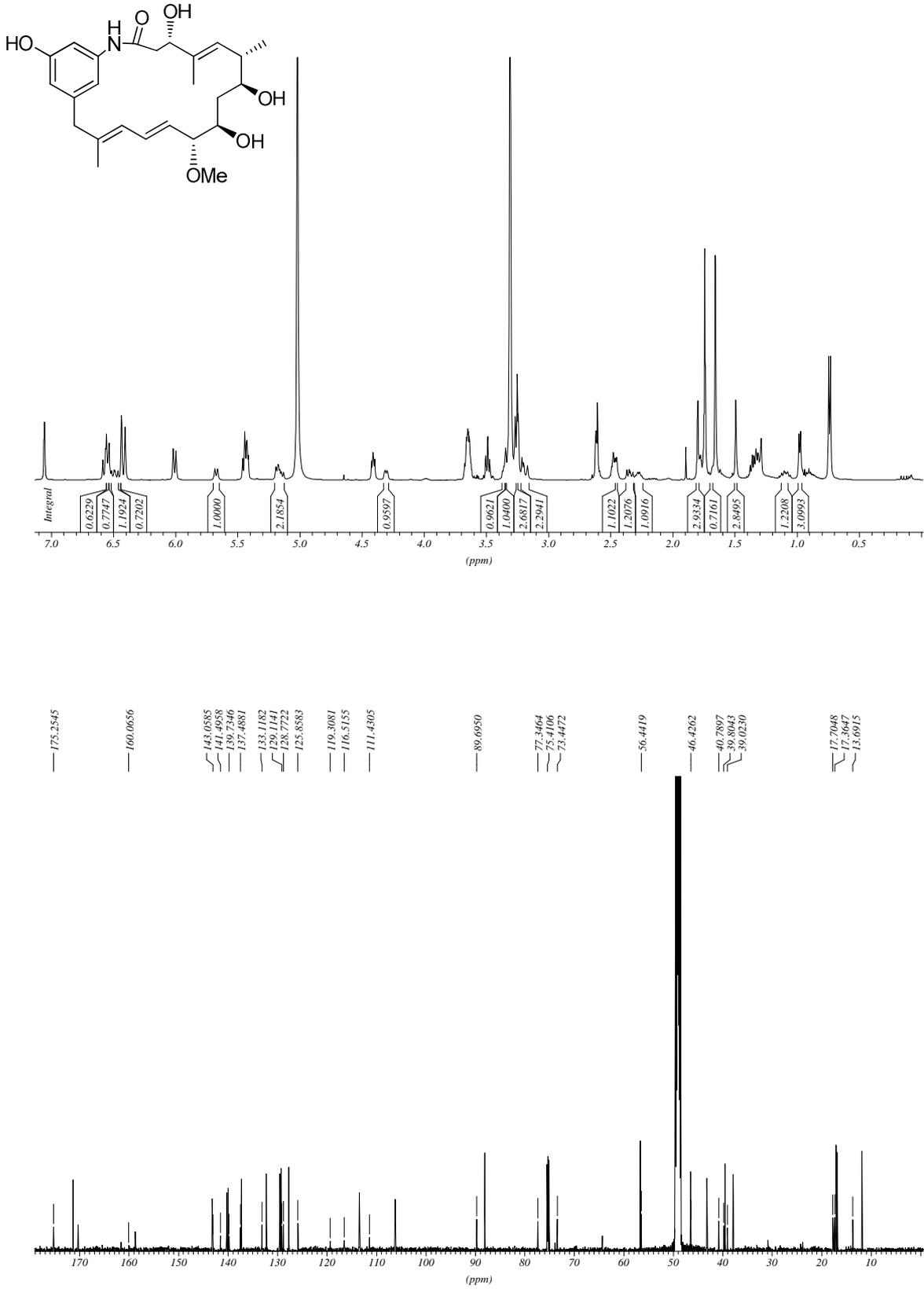
Konformer 2



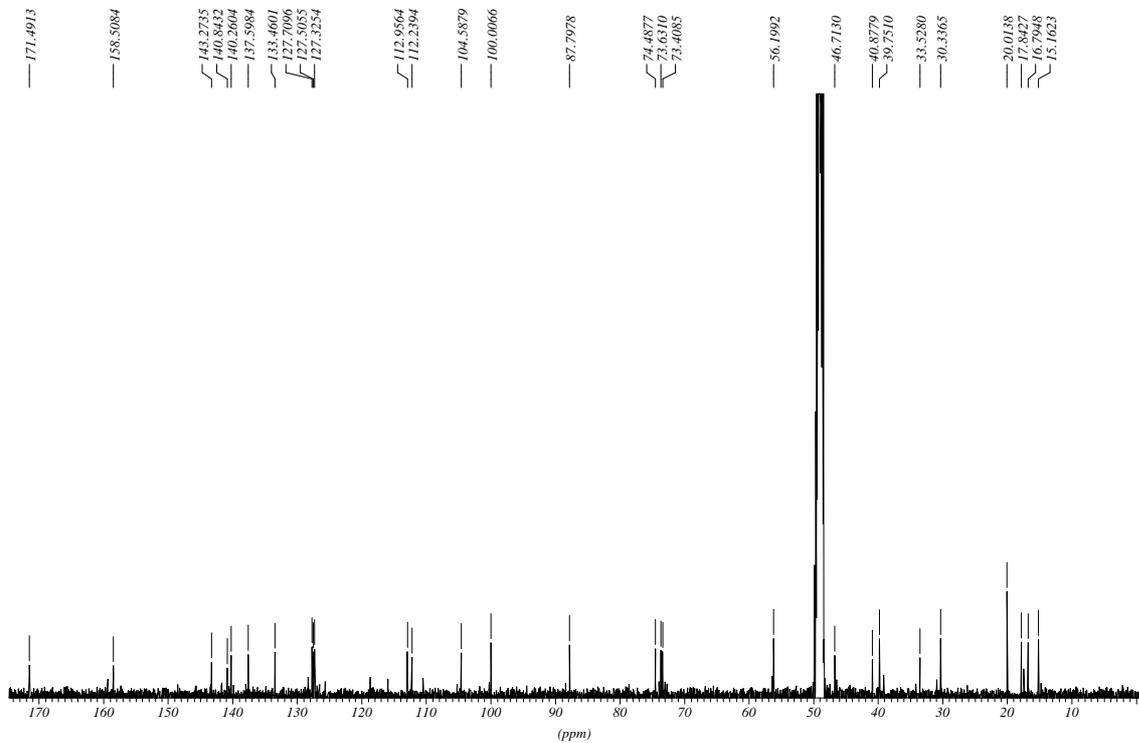
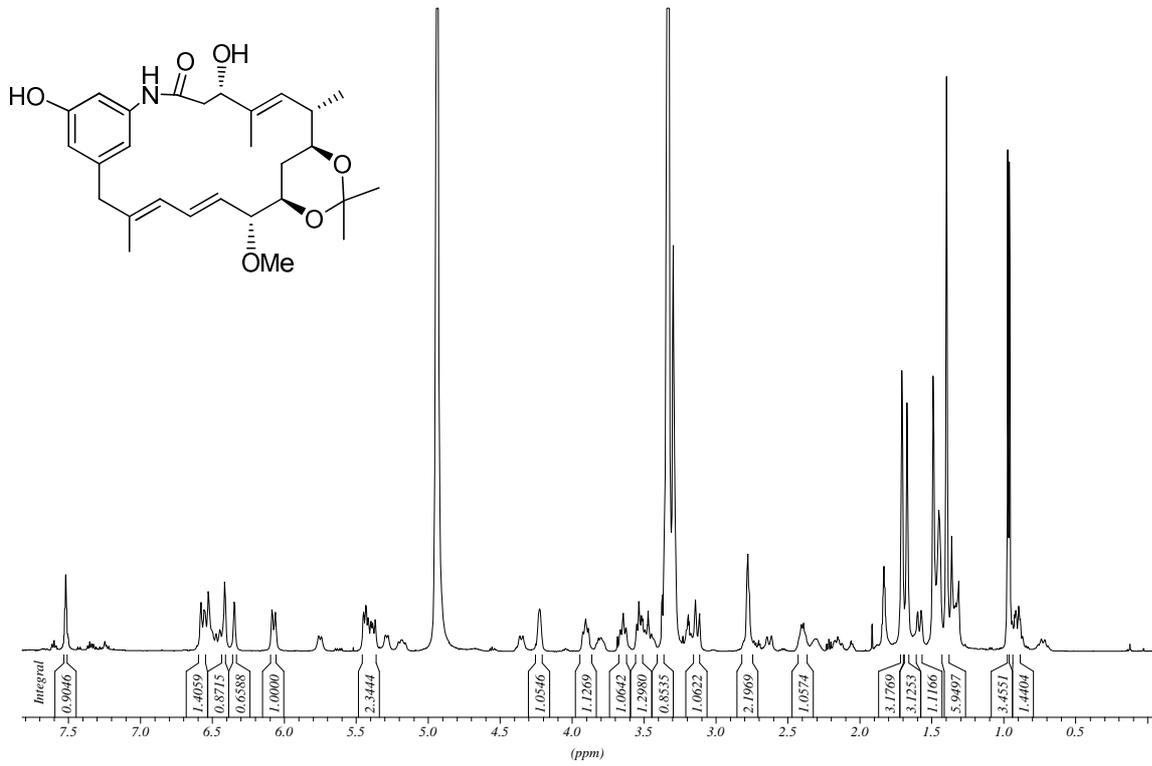
Konformer 1



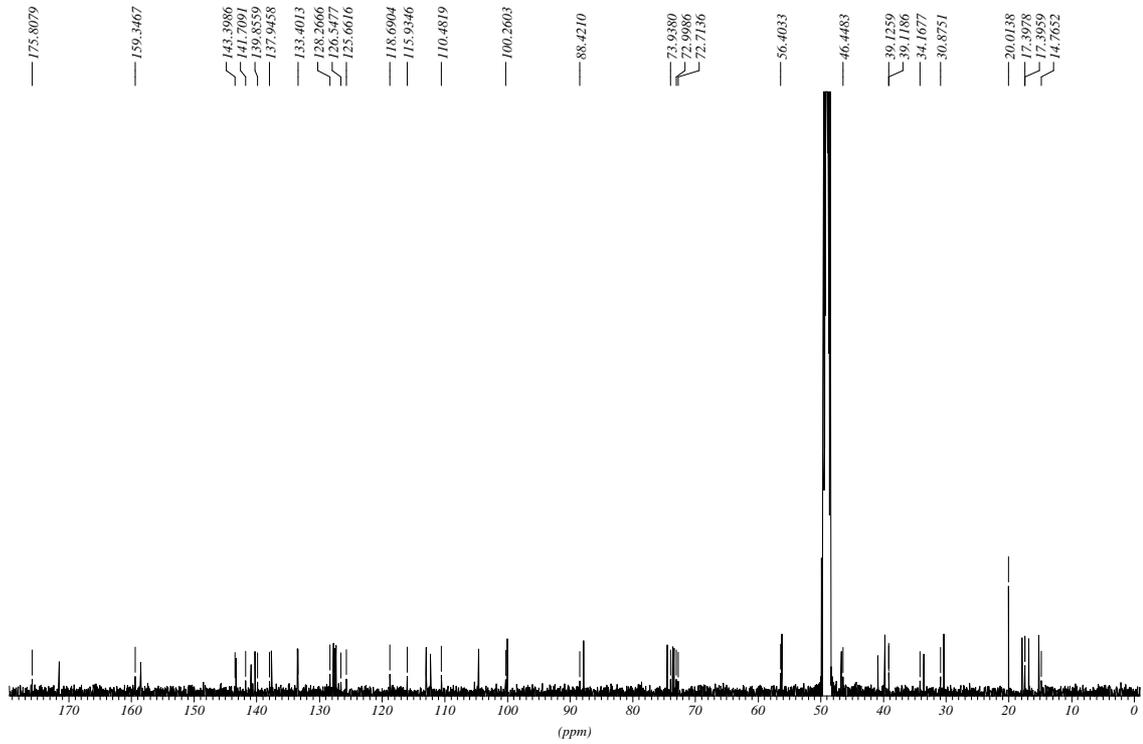
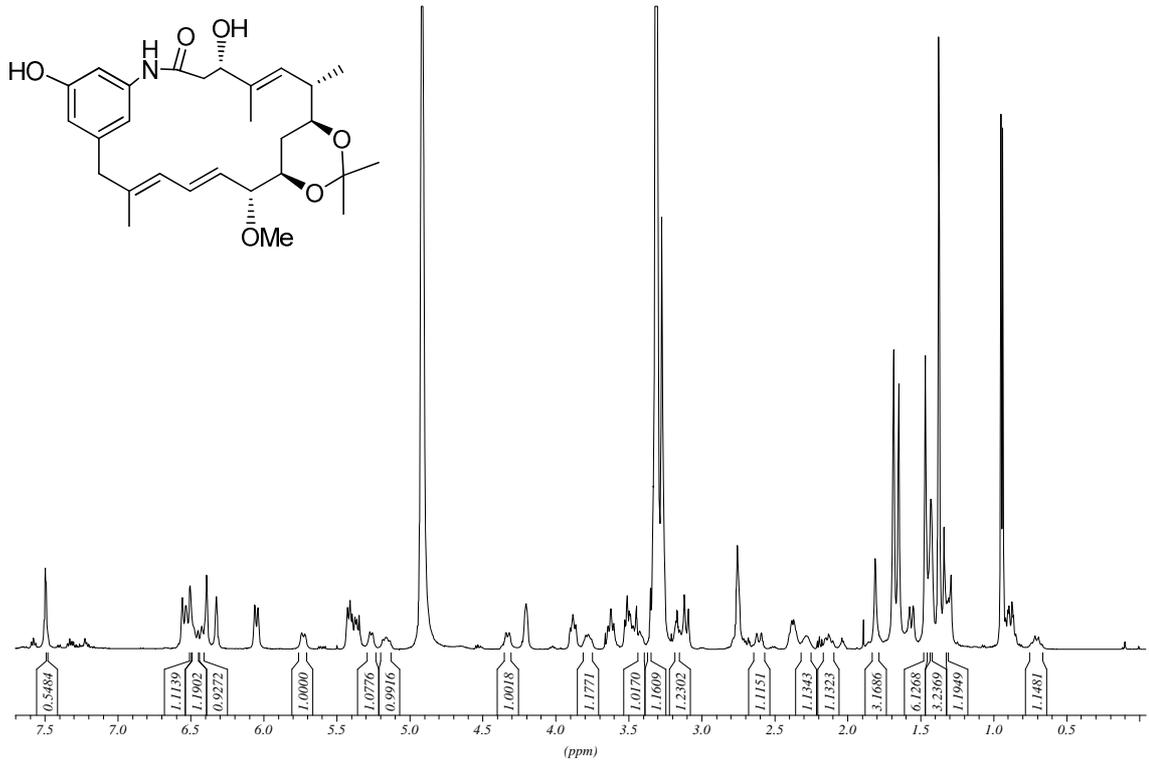
Konformer 2



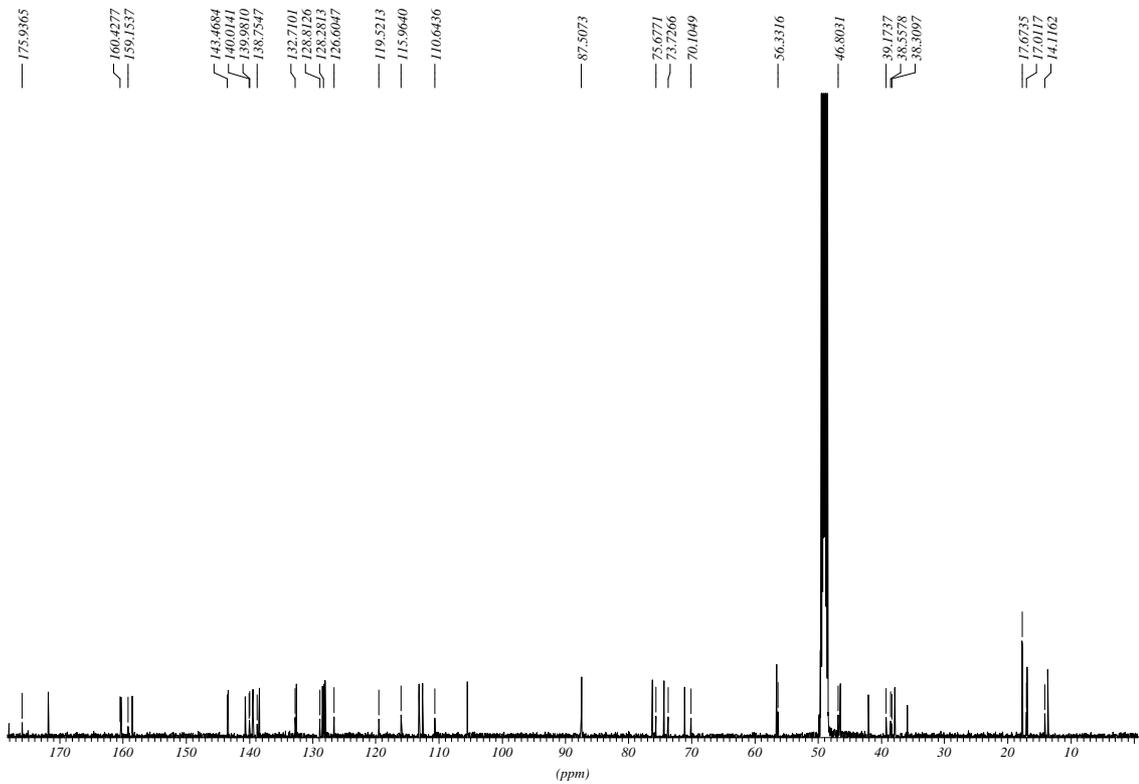
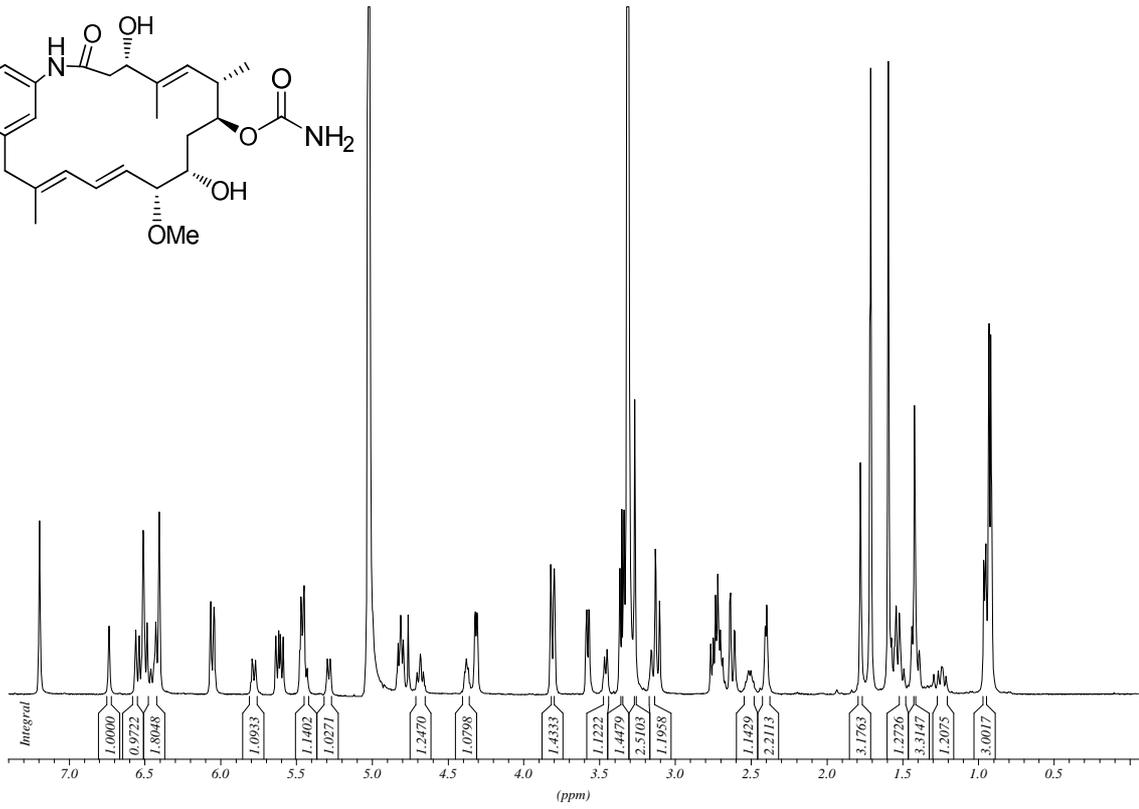
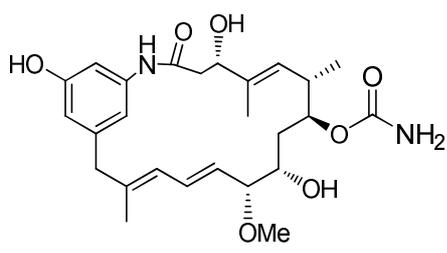
Konformer 1



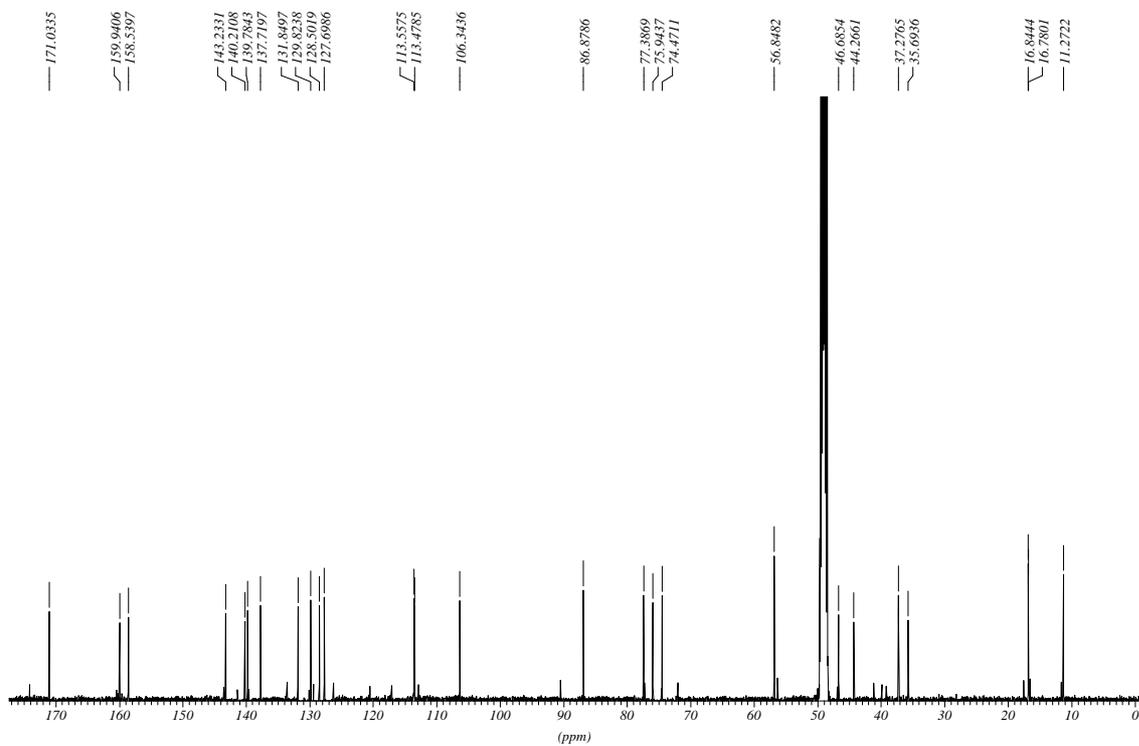
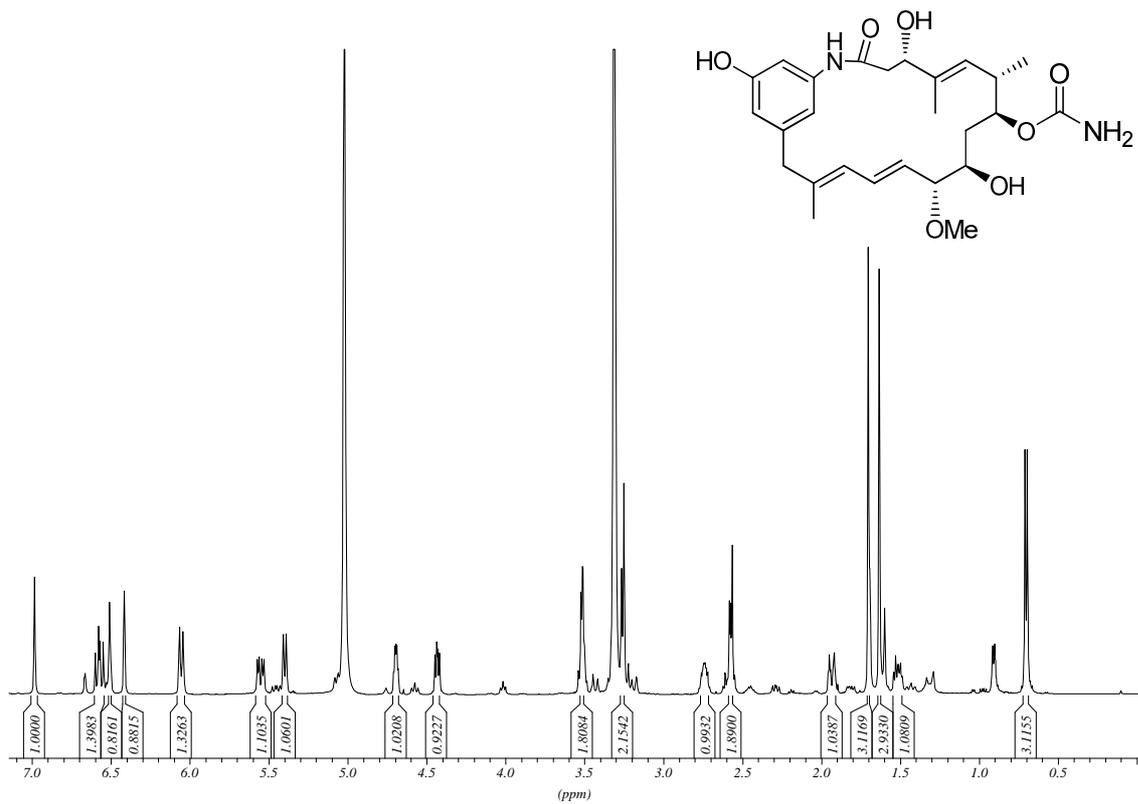
Konformer 2



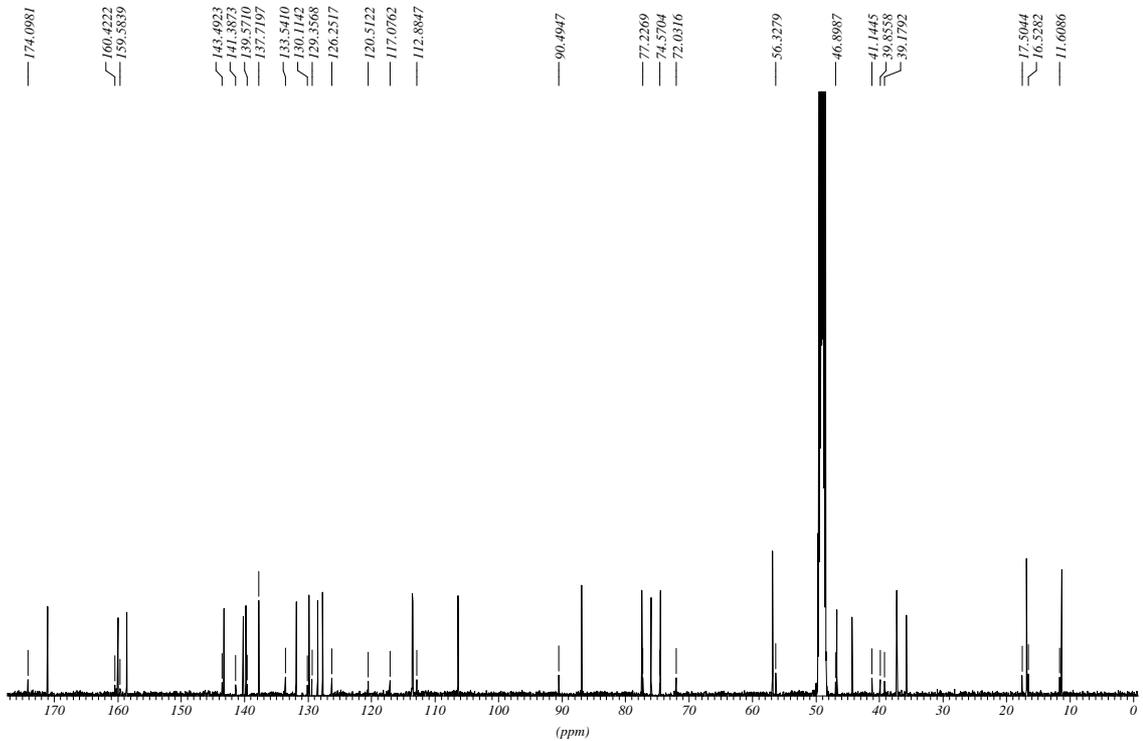
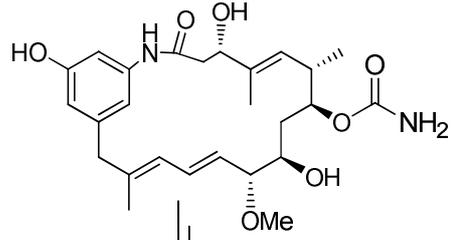
Konformer 2



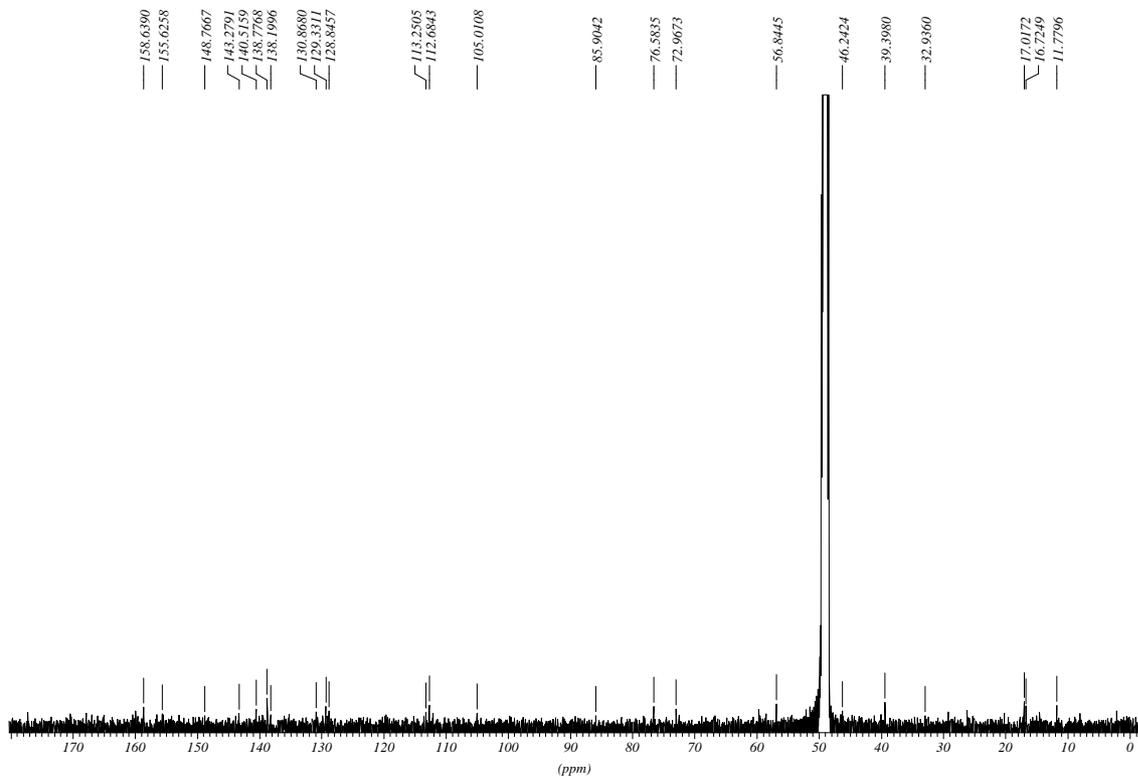
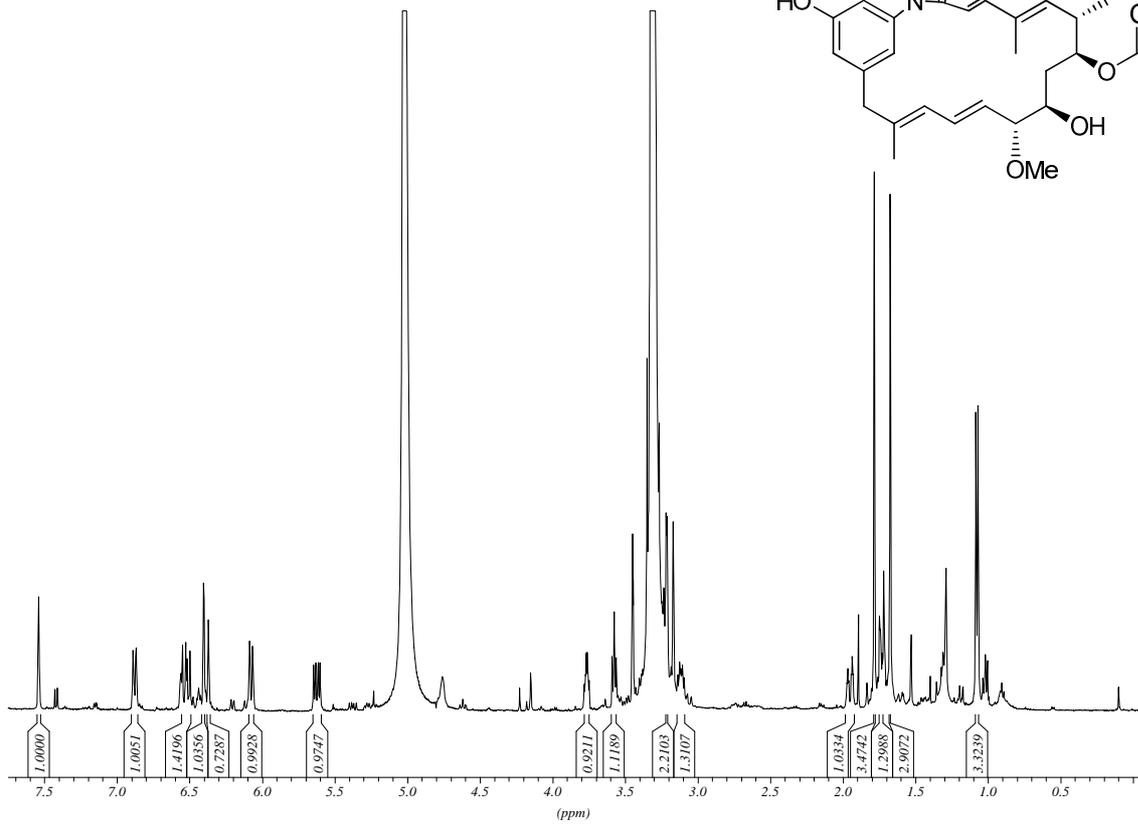
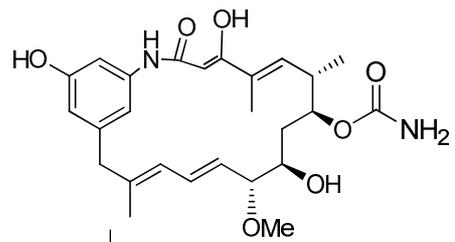
Konformer 1



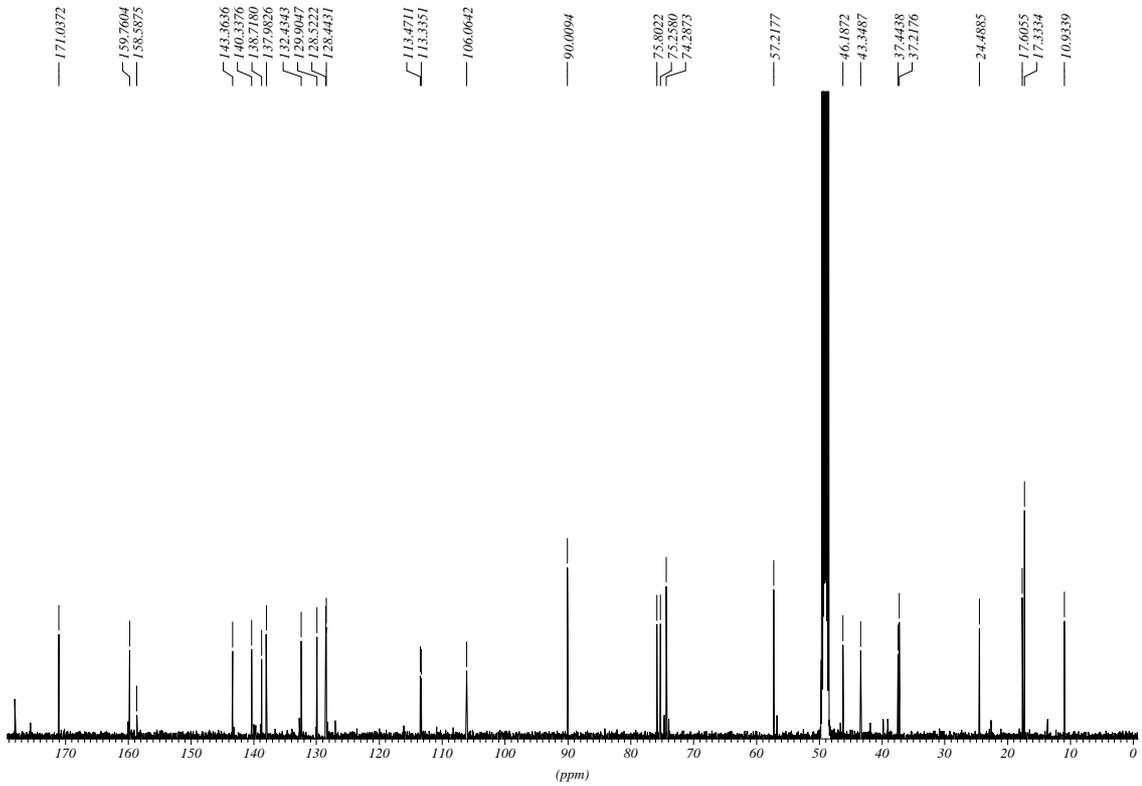
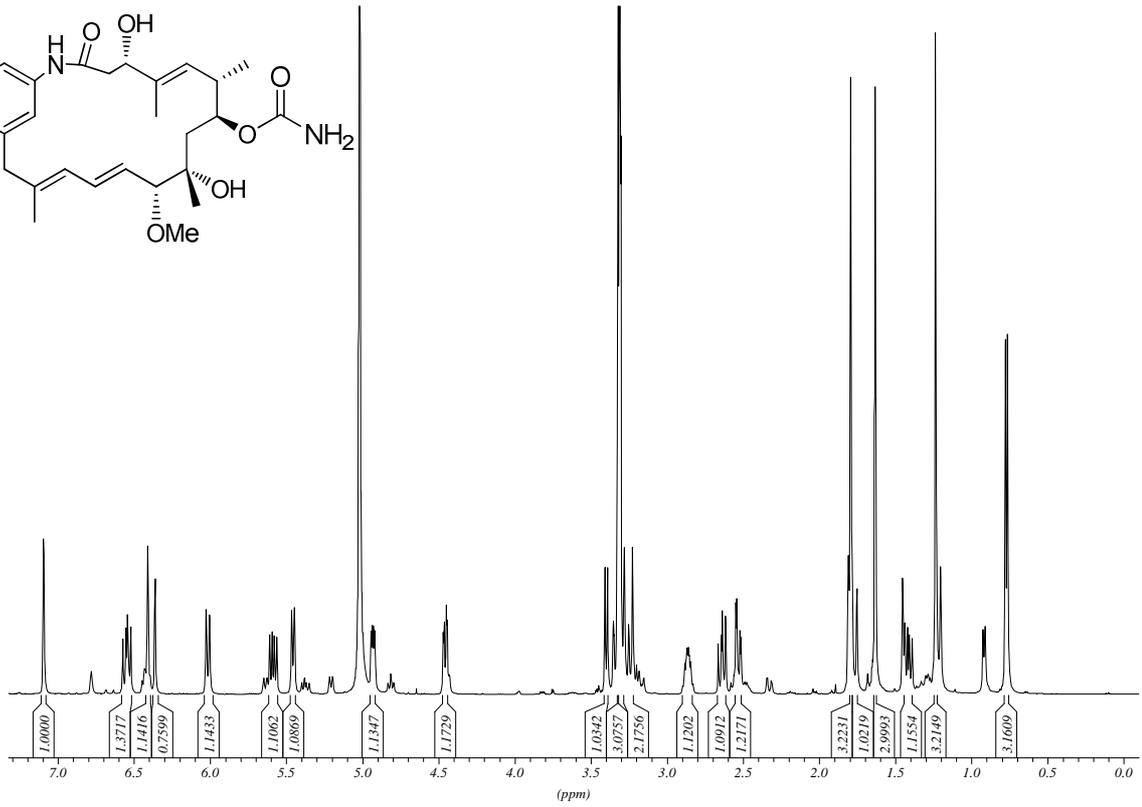
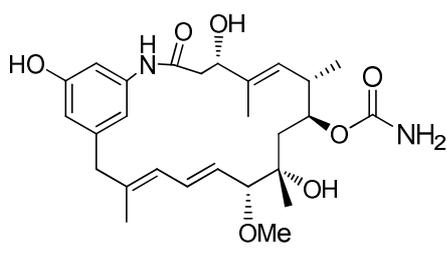
Konformer 2

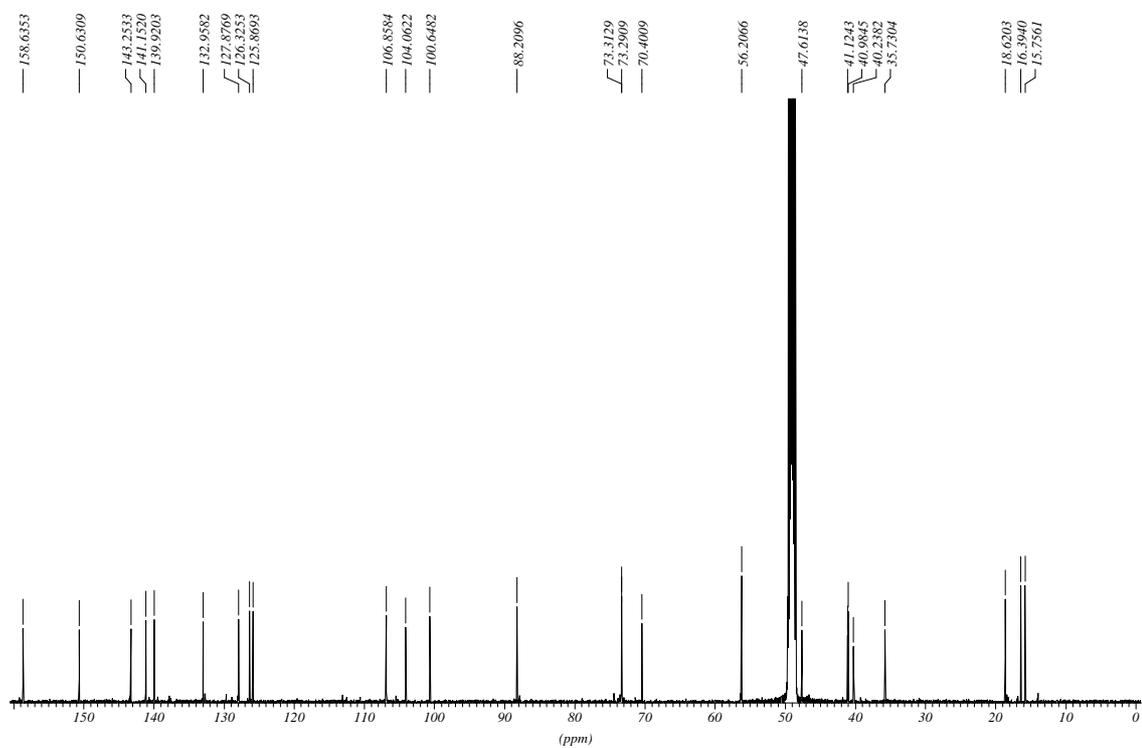


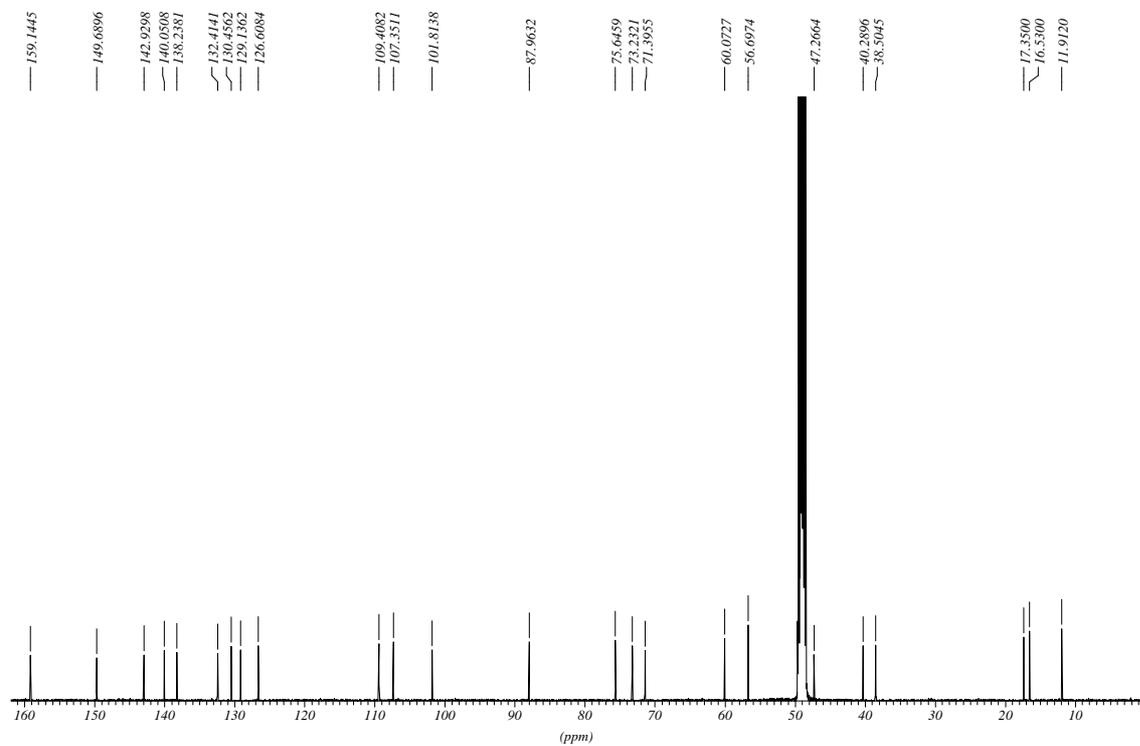
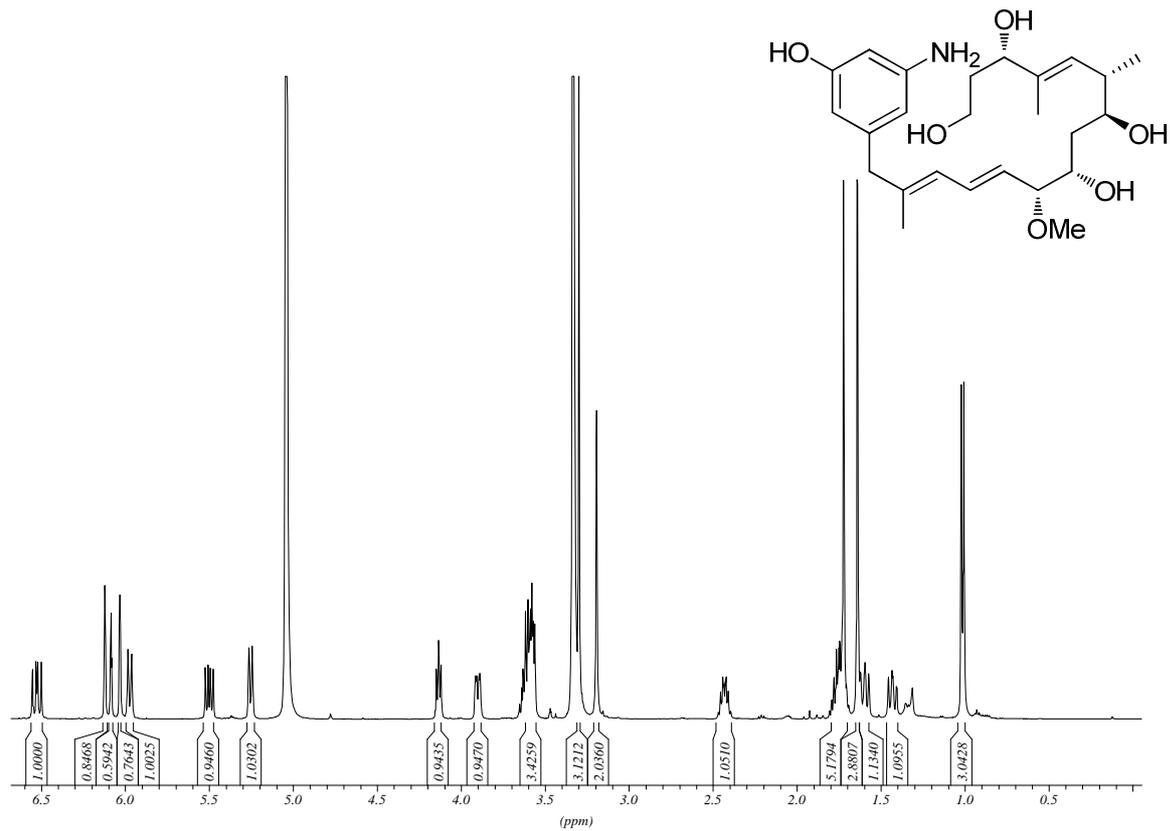
Konformer 1

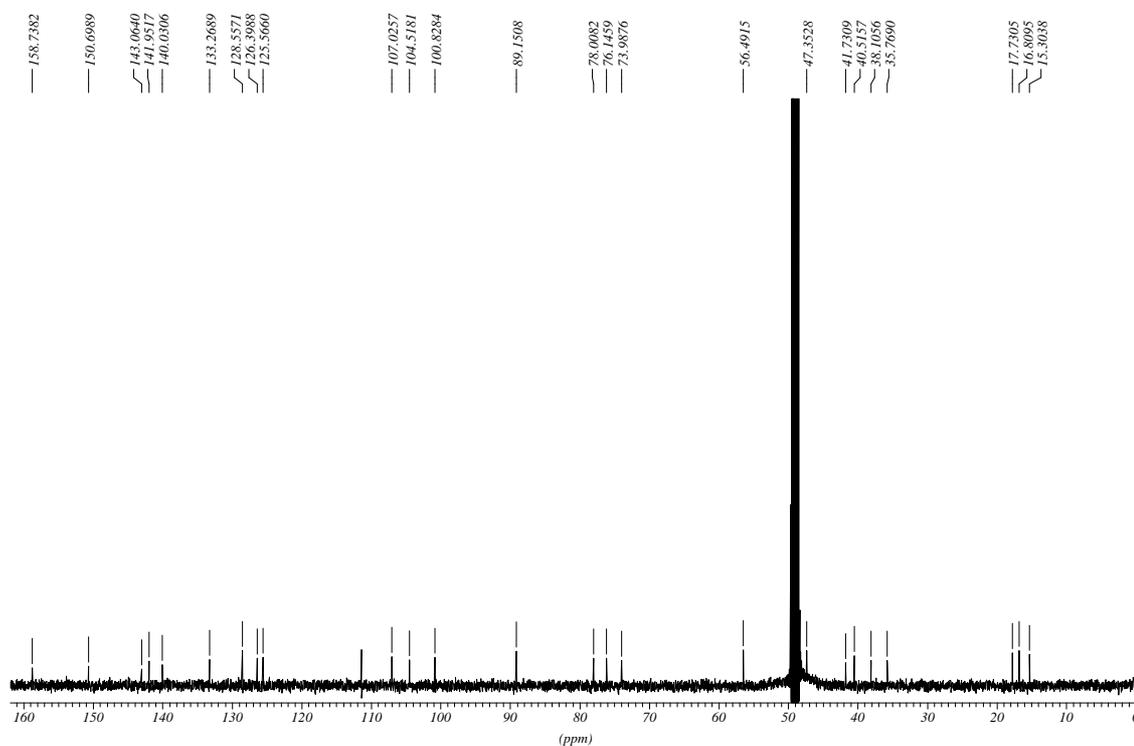
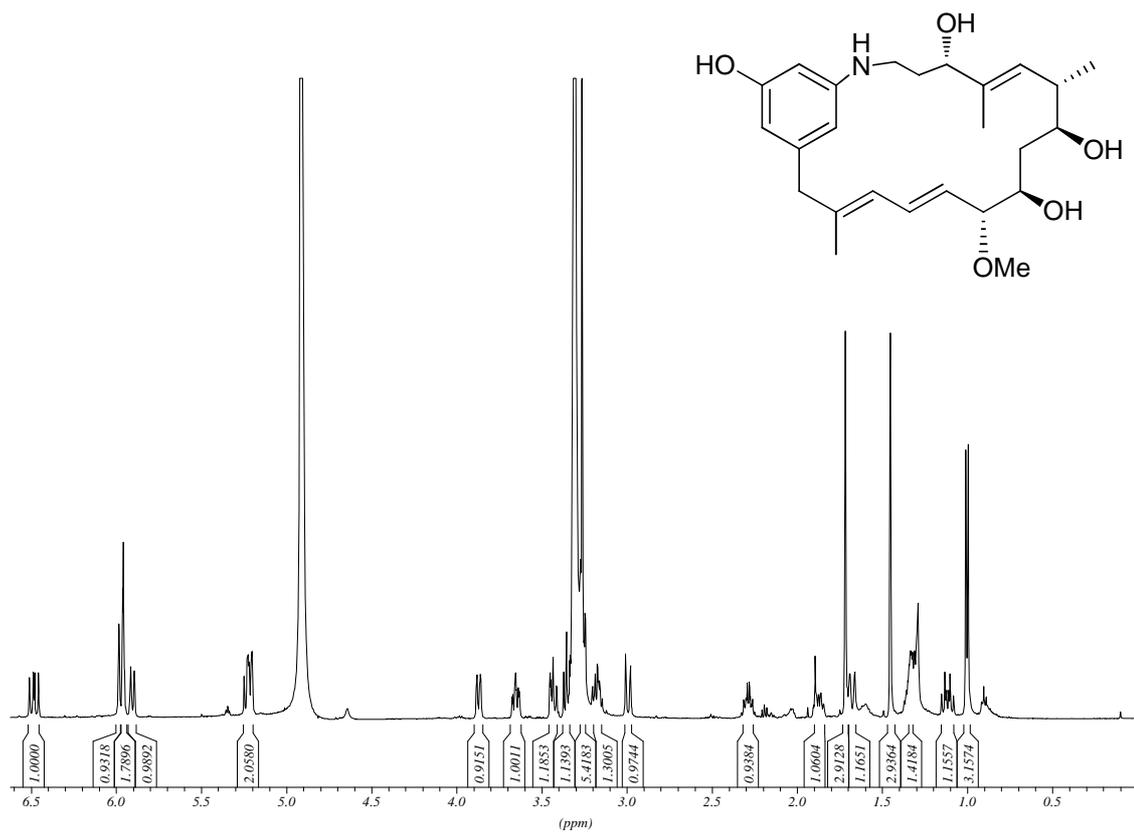


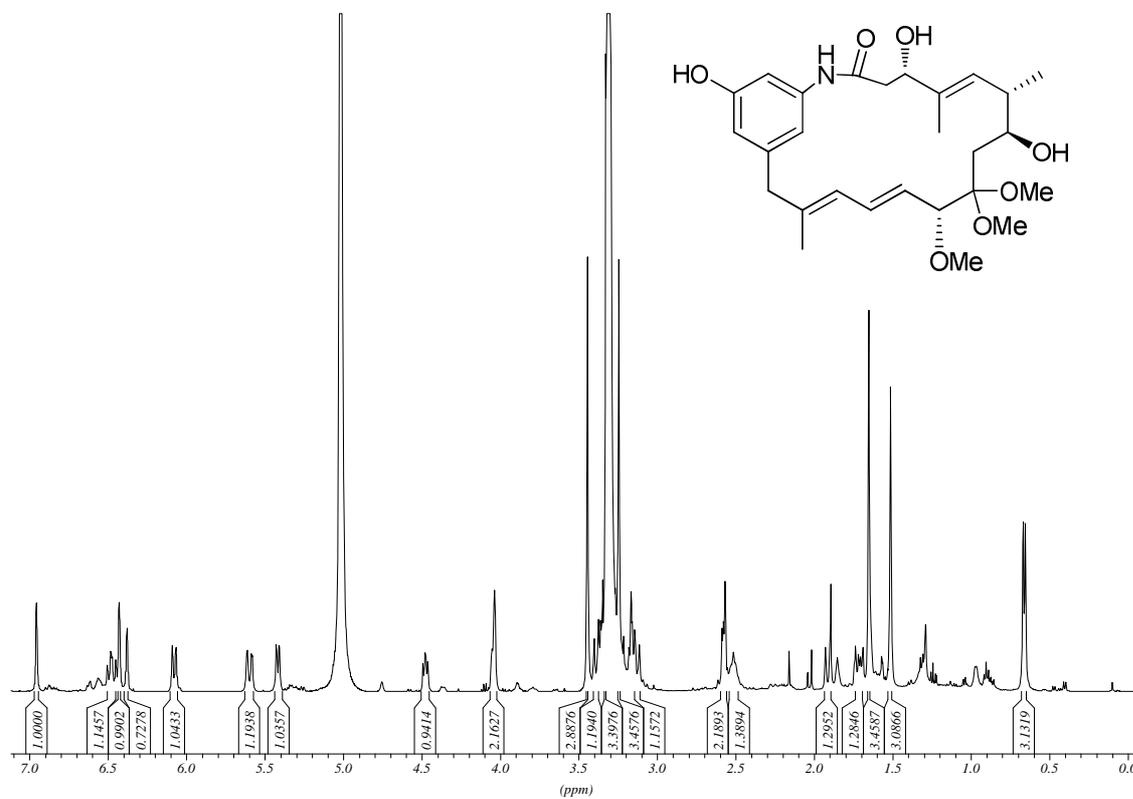
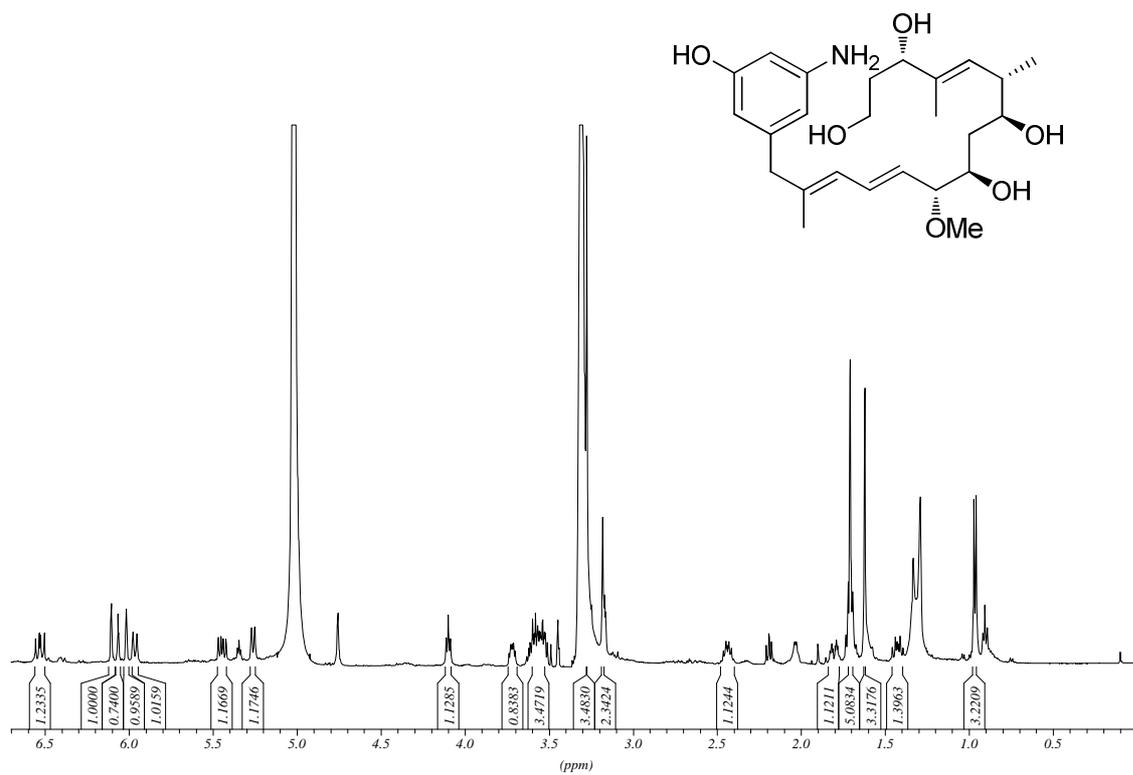
Konformer 1

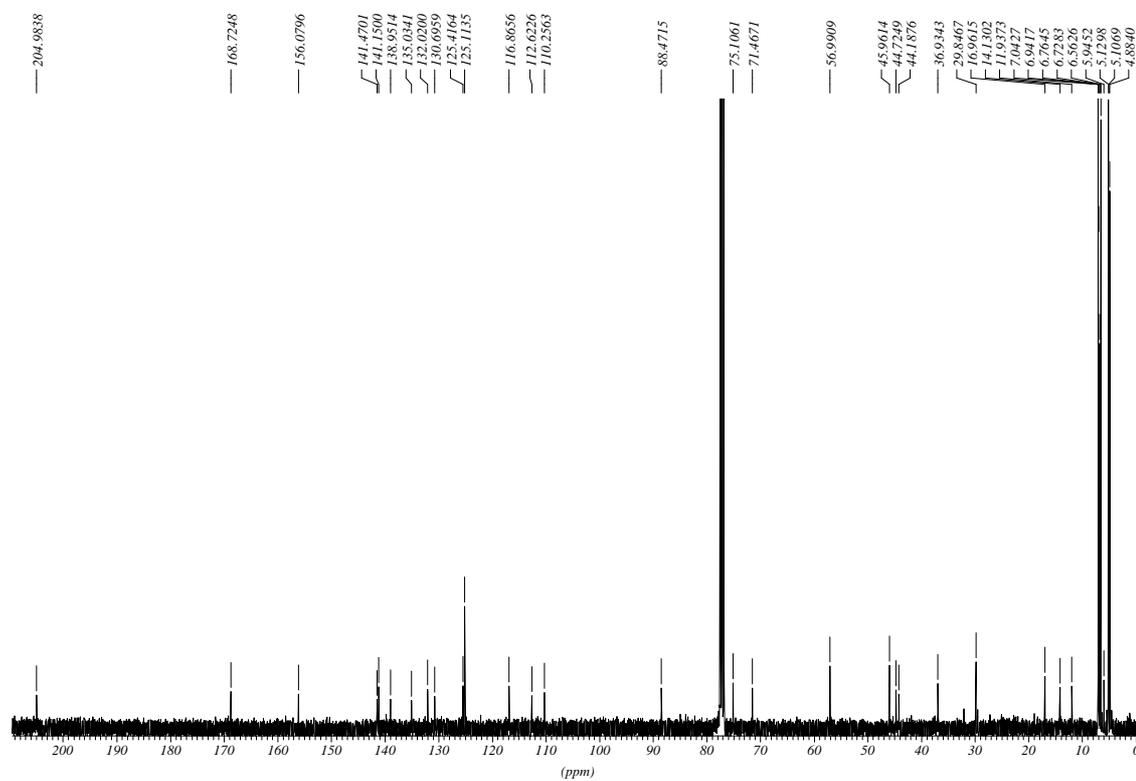
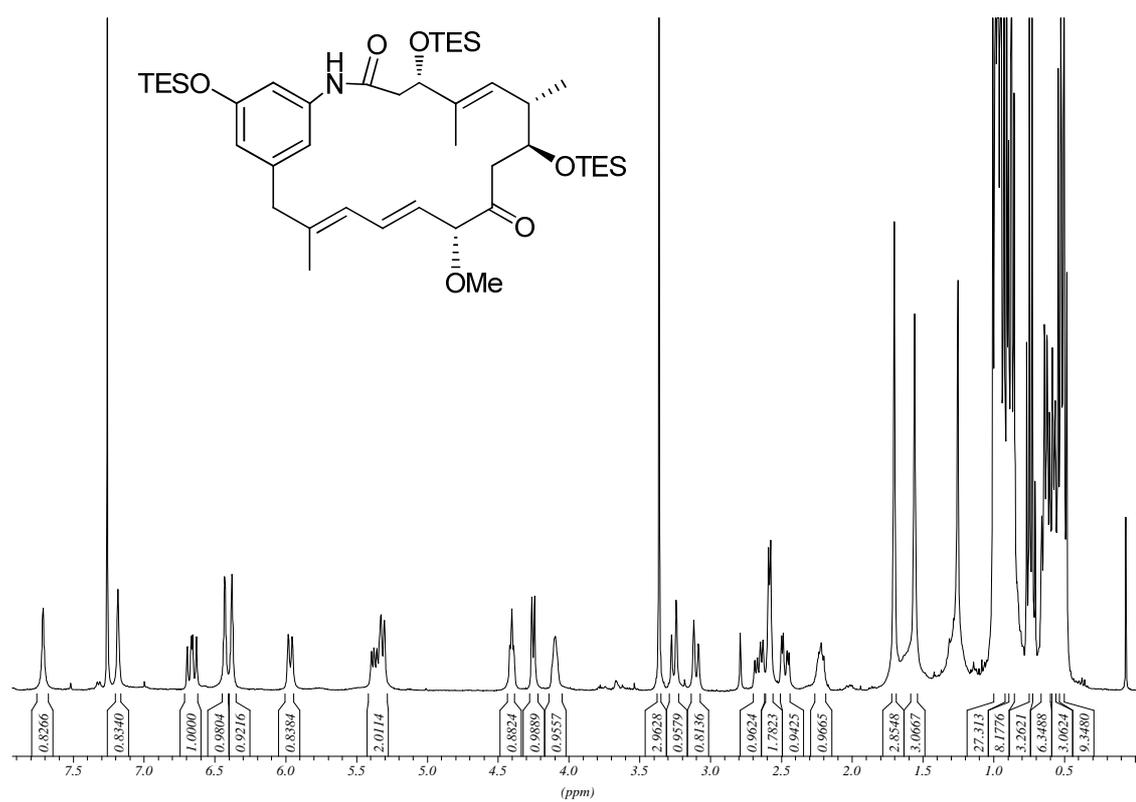


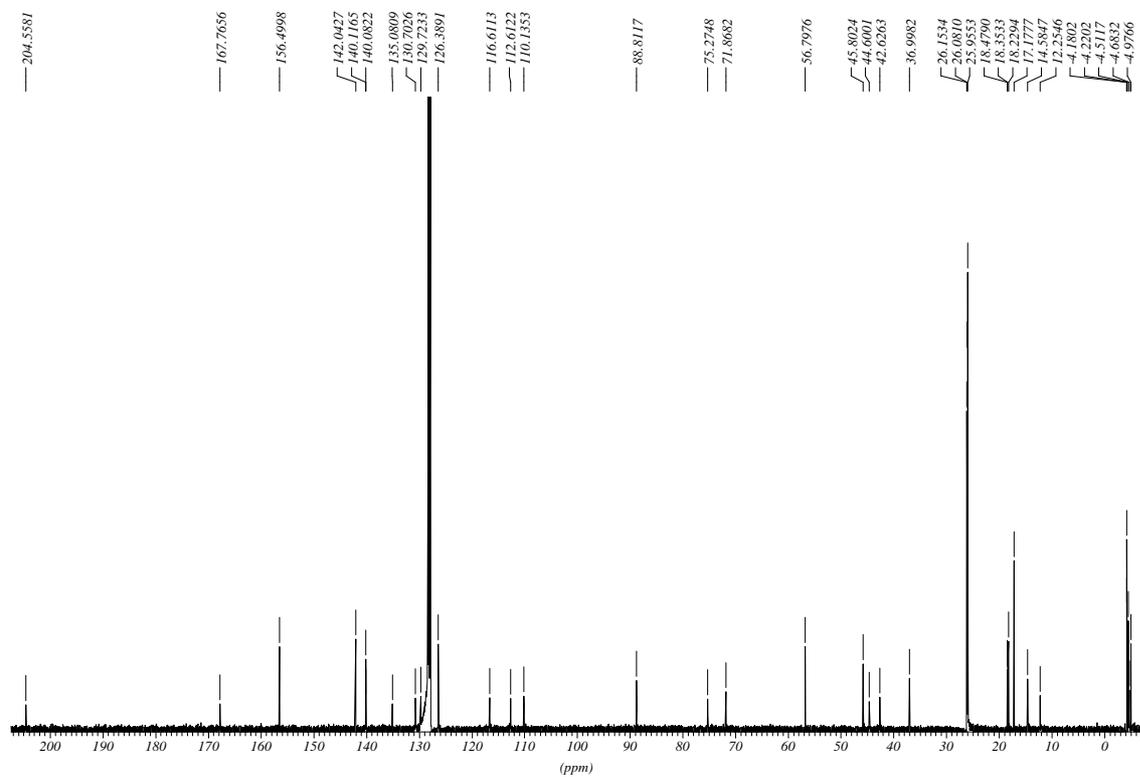
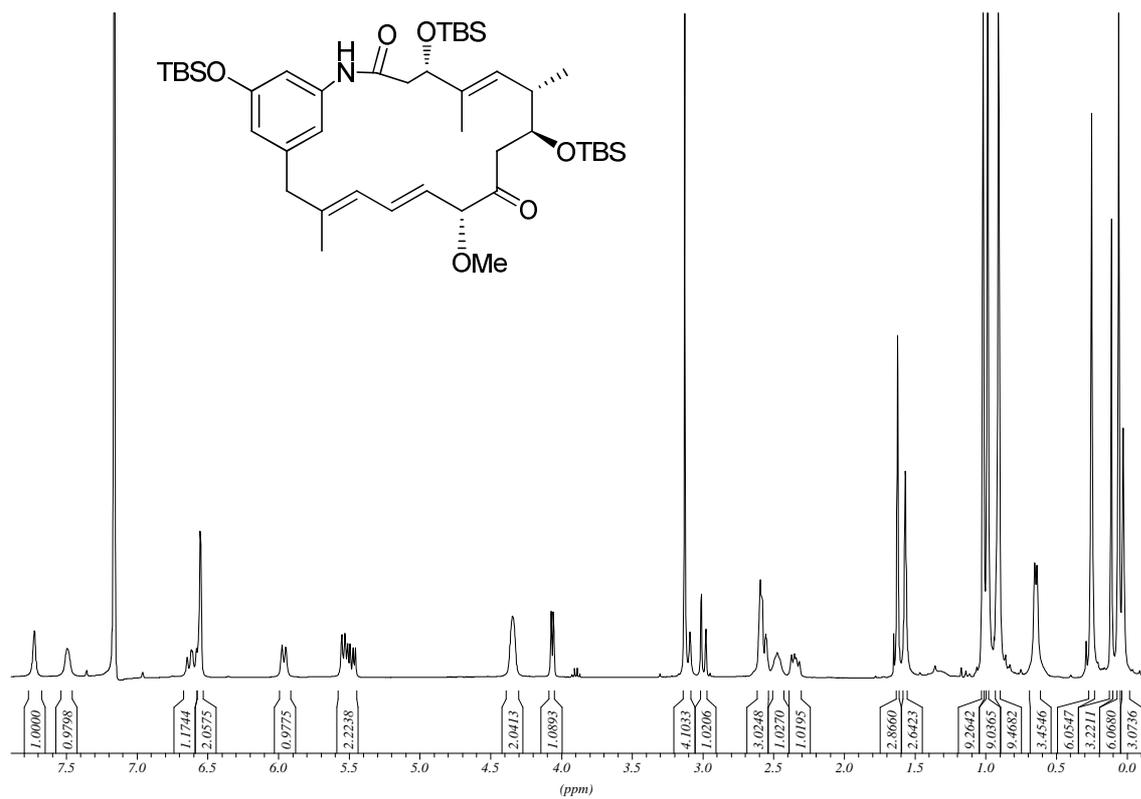


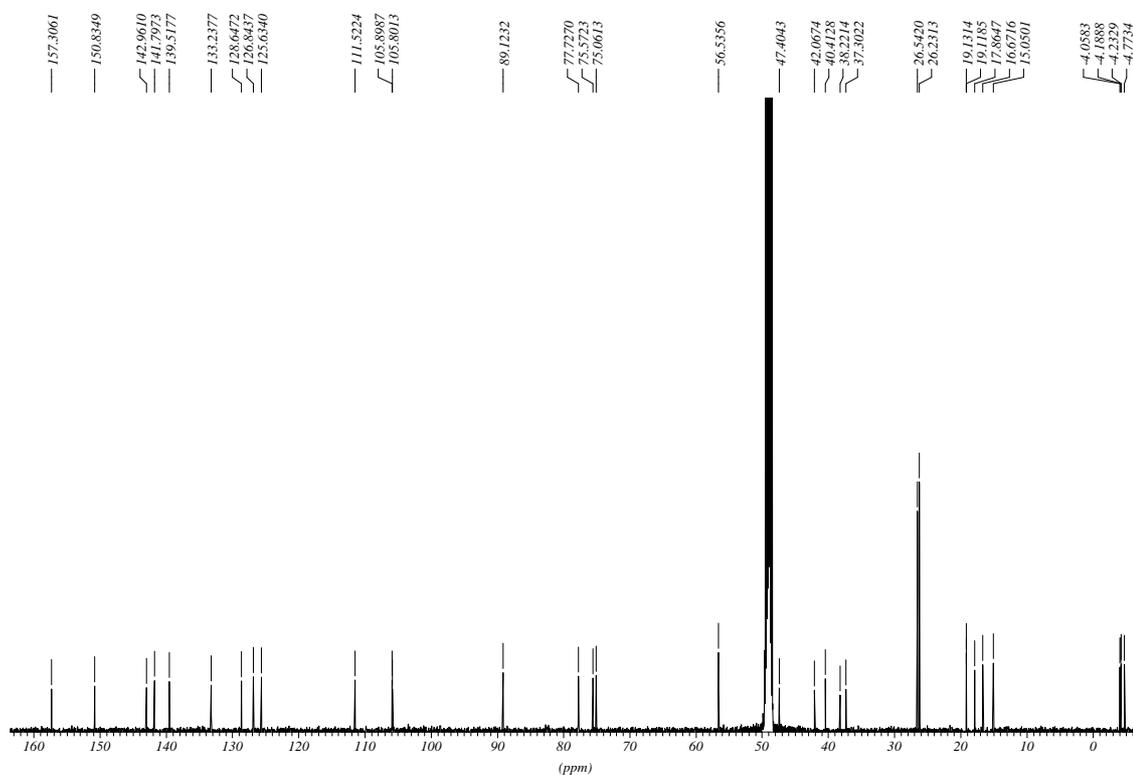
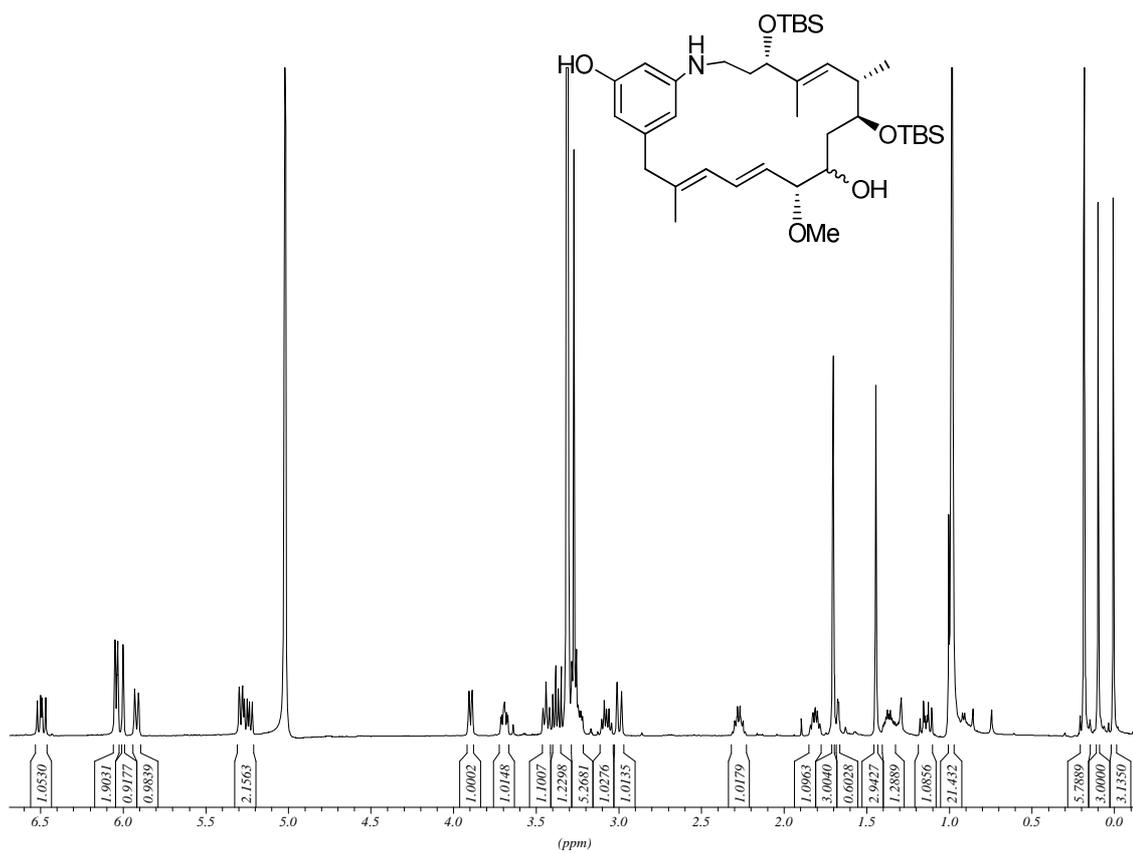


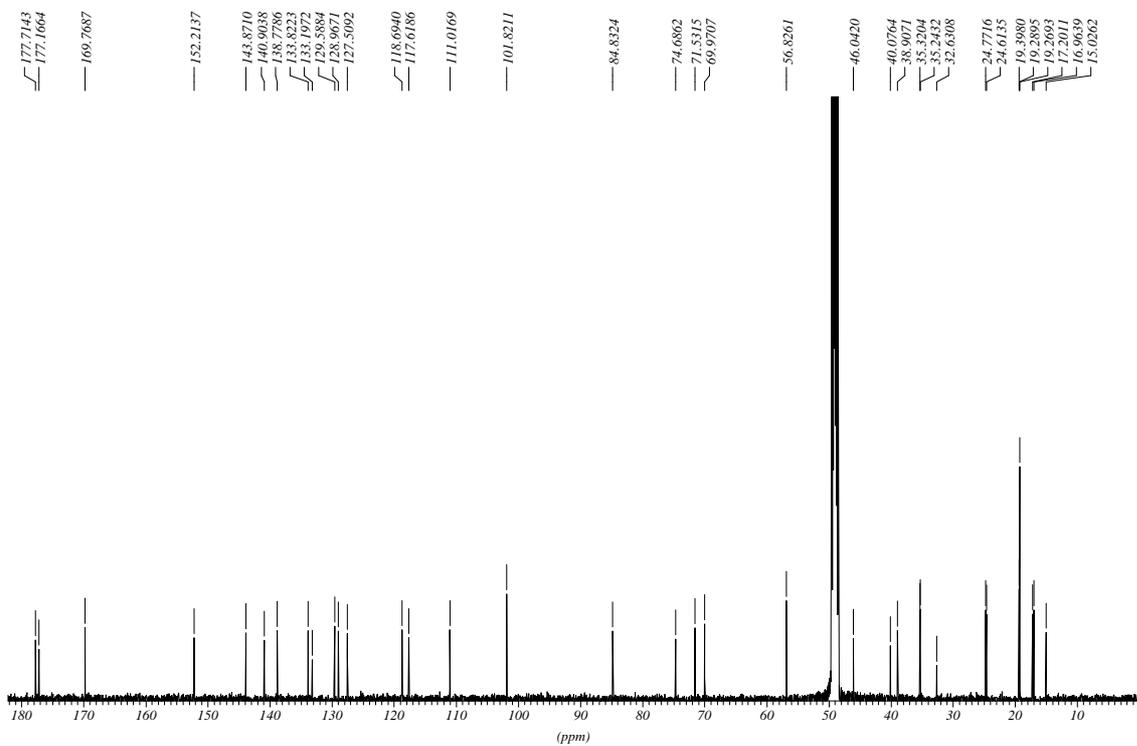
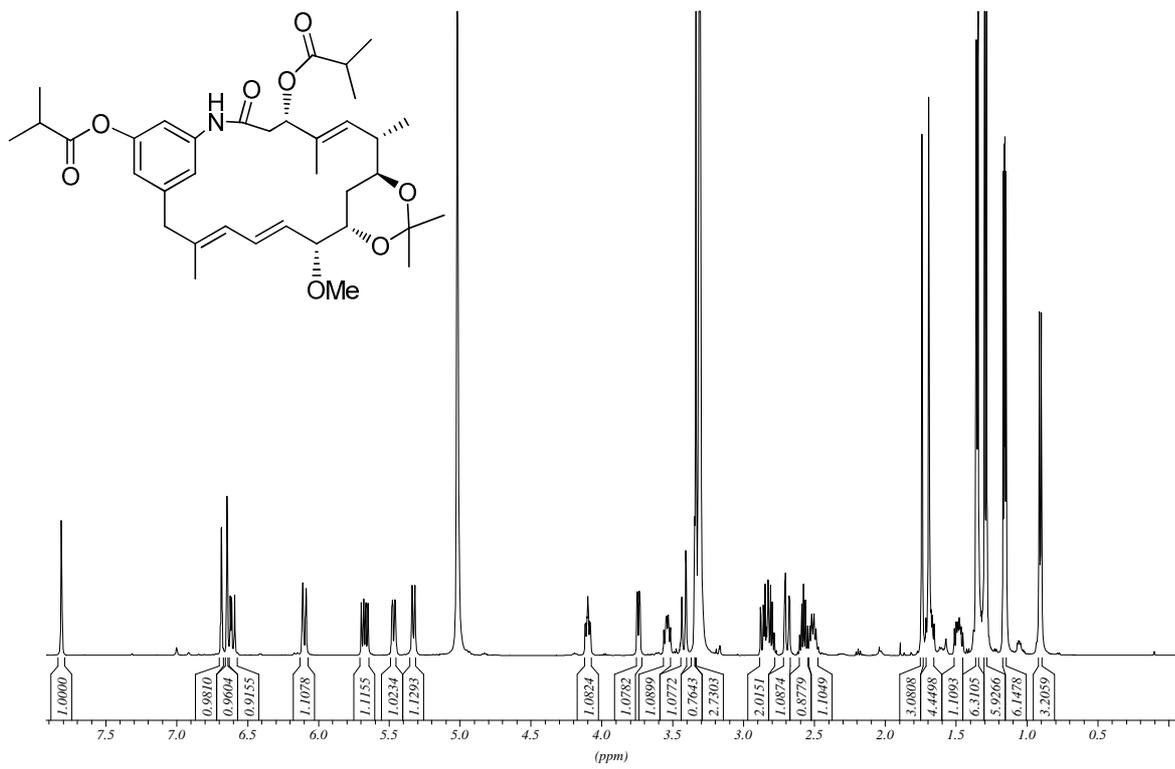




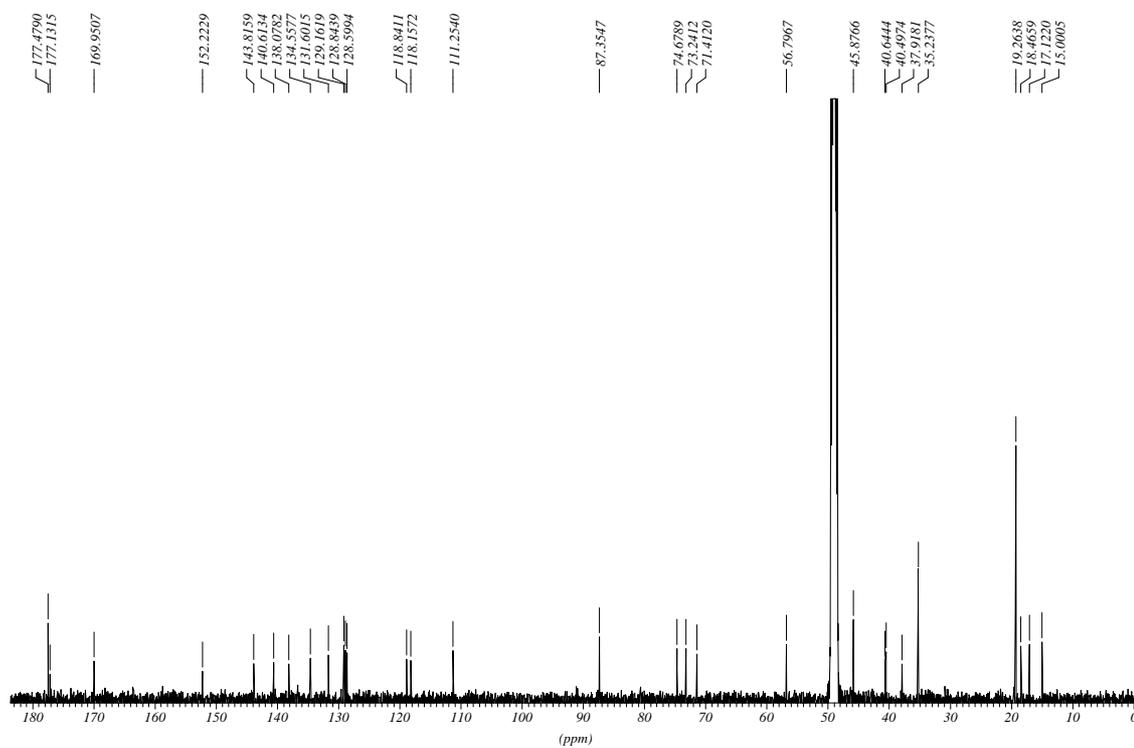
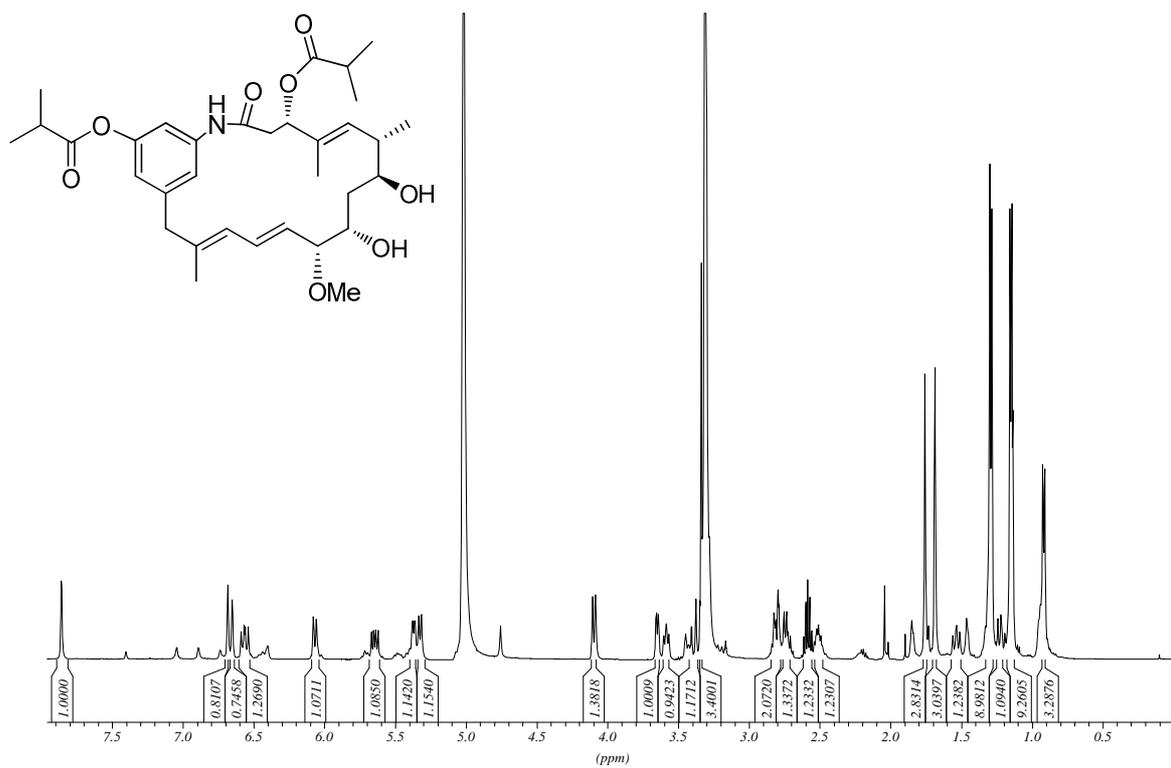




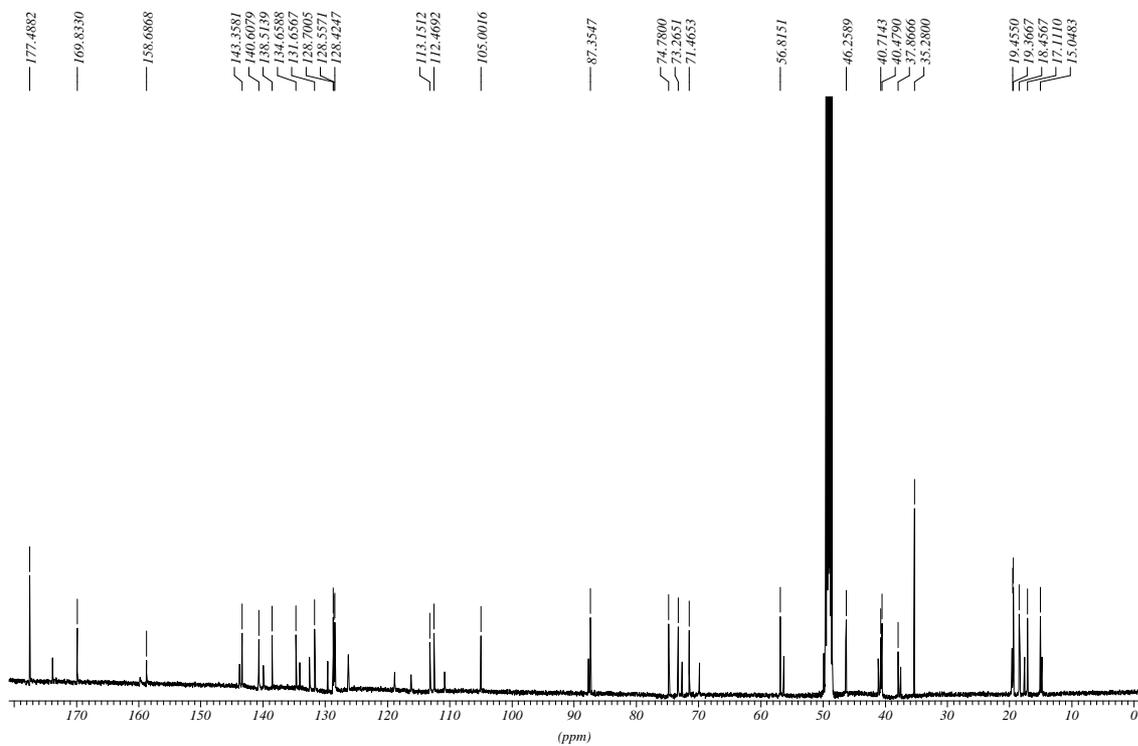
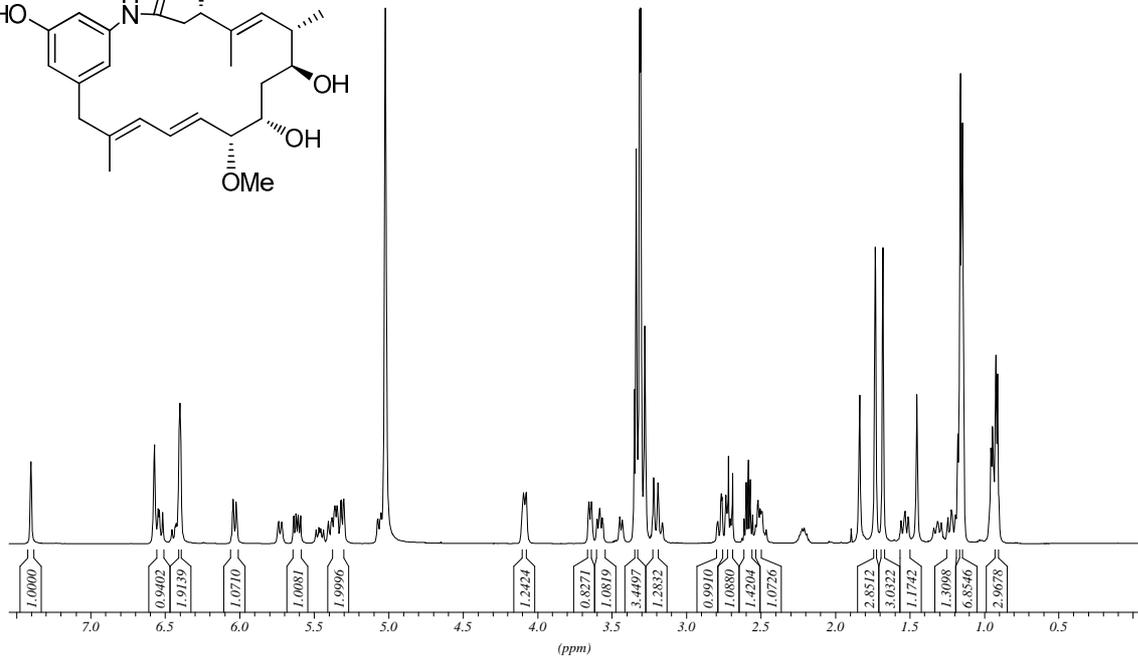
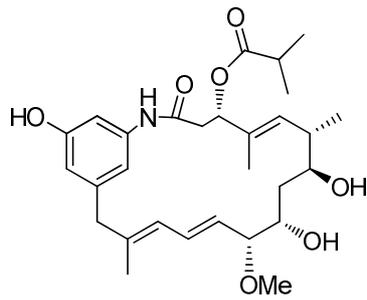




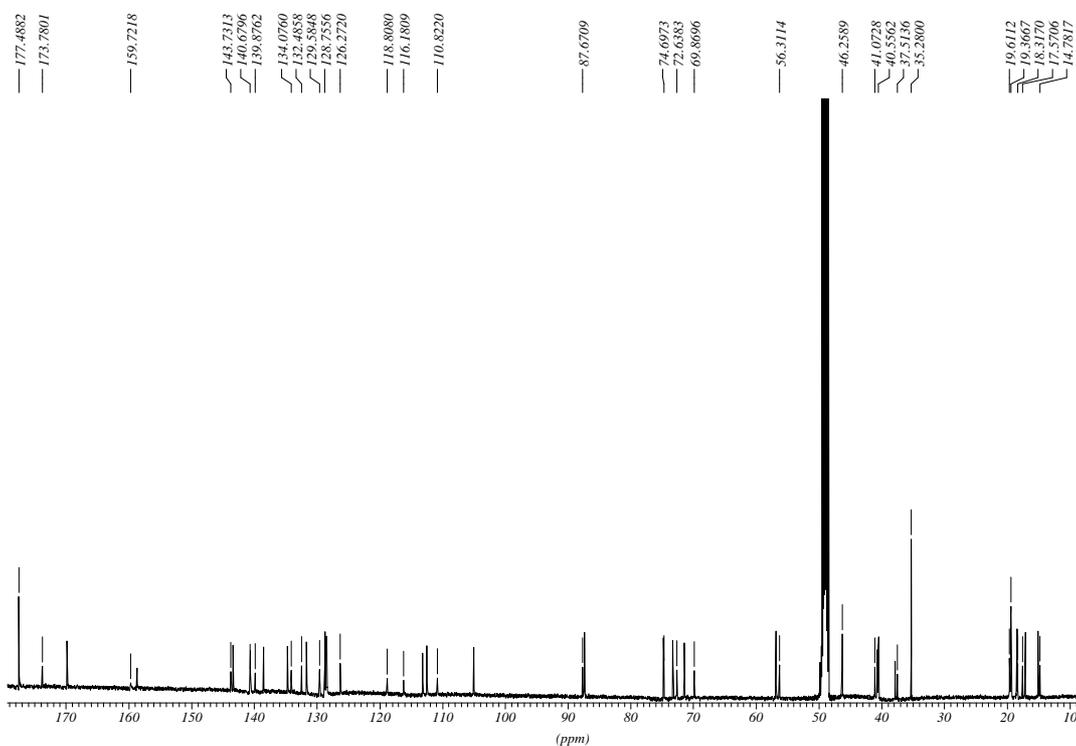
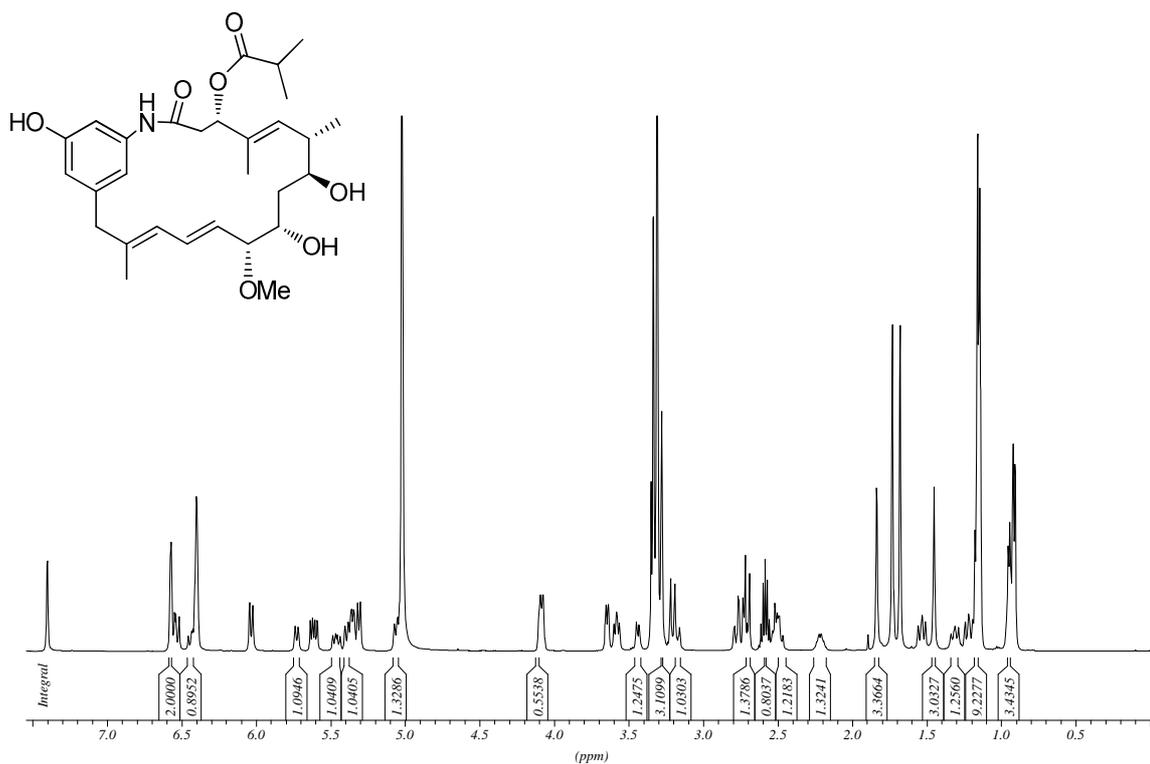
Konformer 1



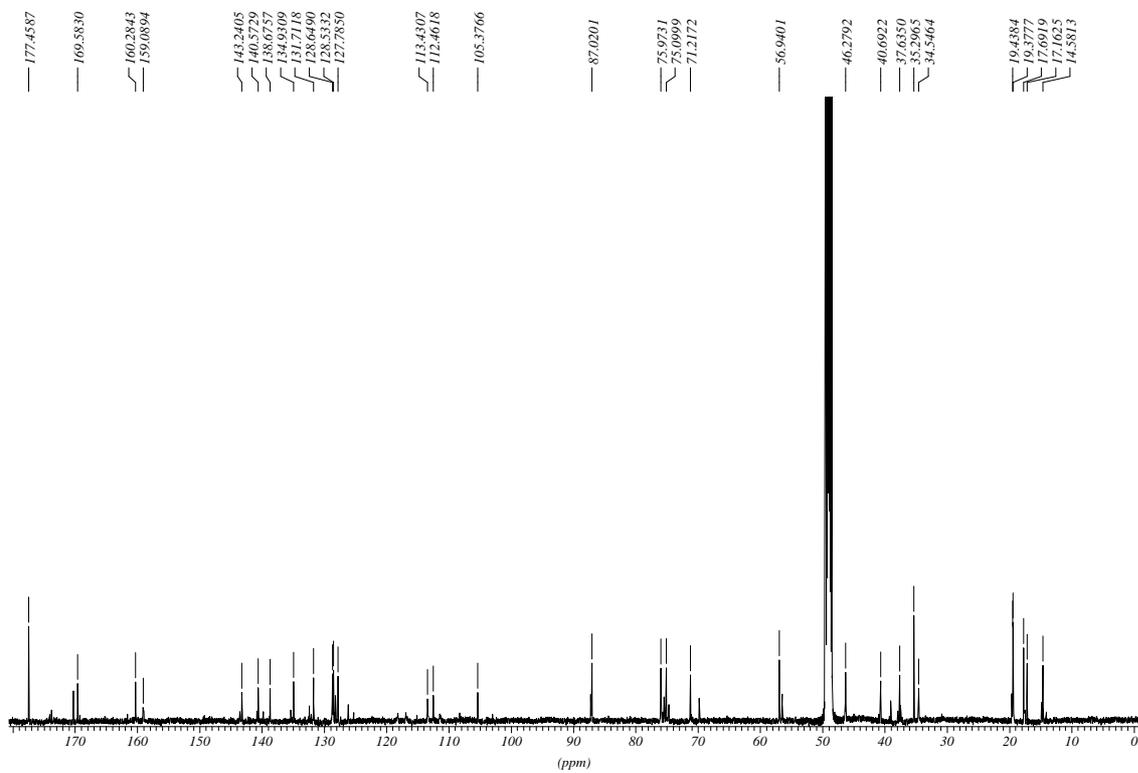
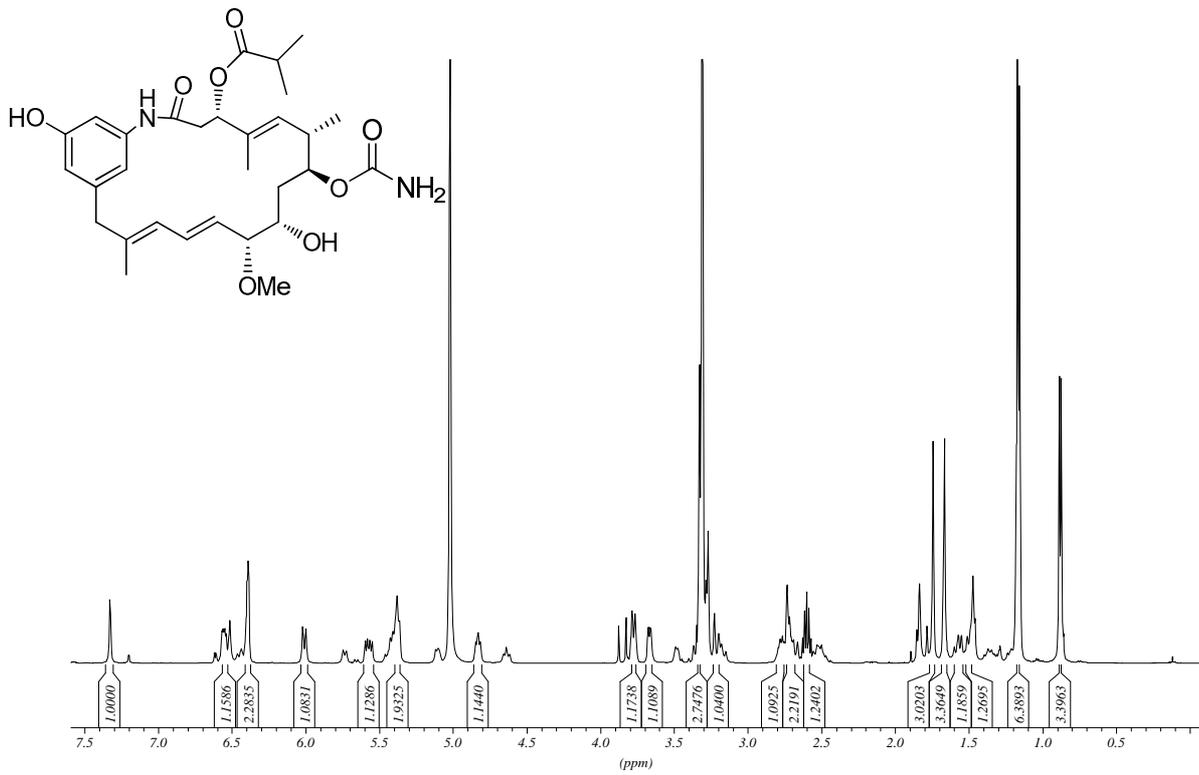
Konformer 1



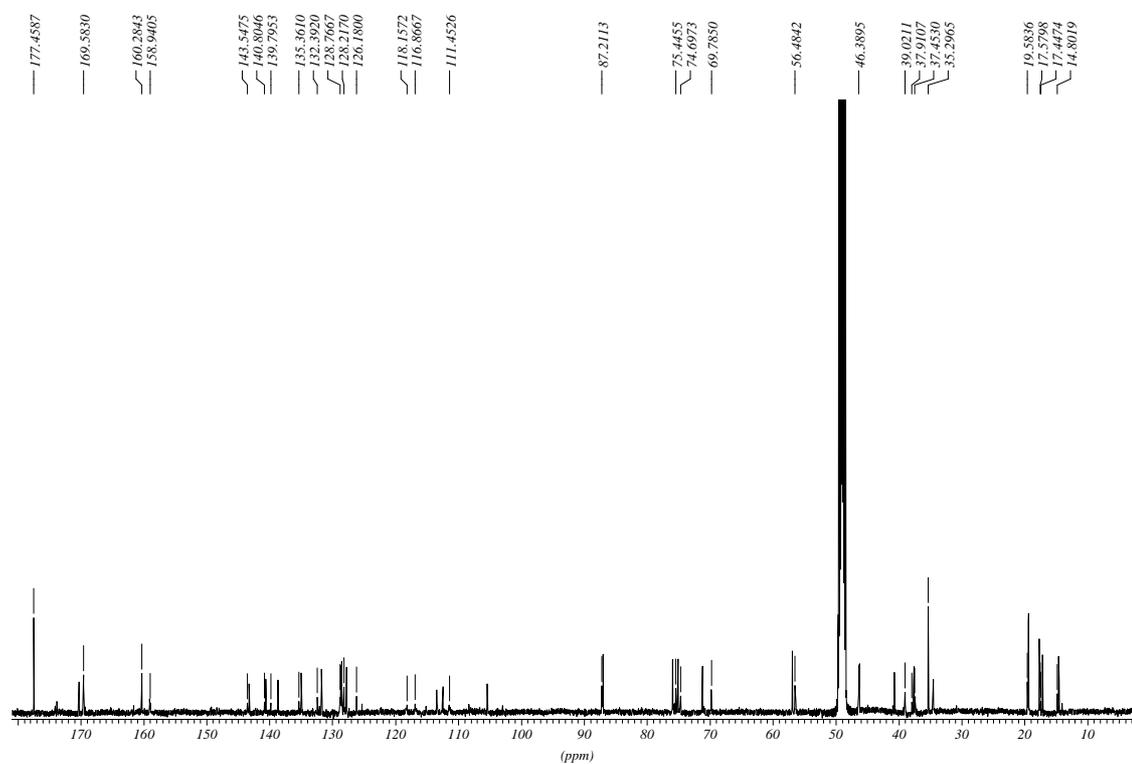
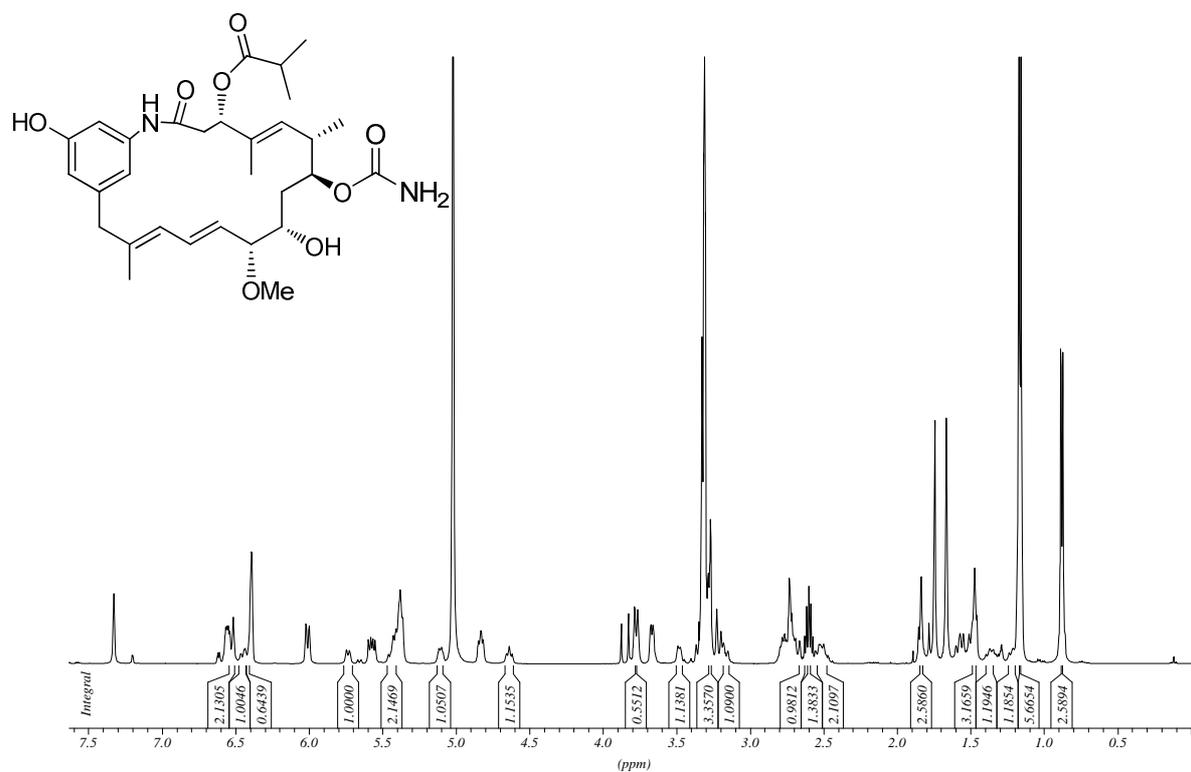
Konformer 2



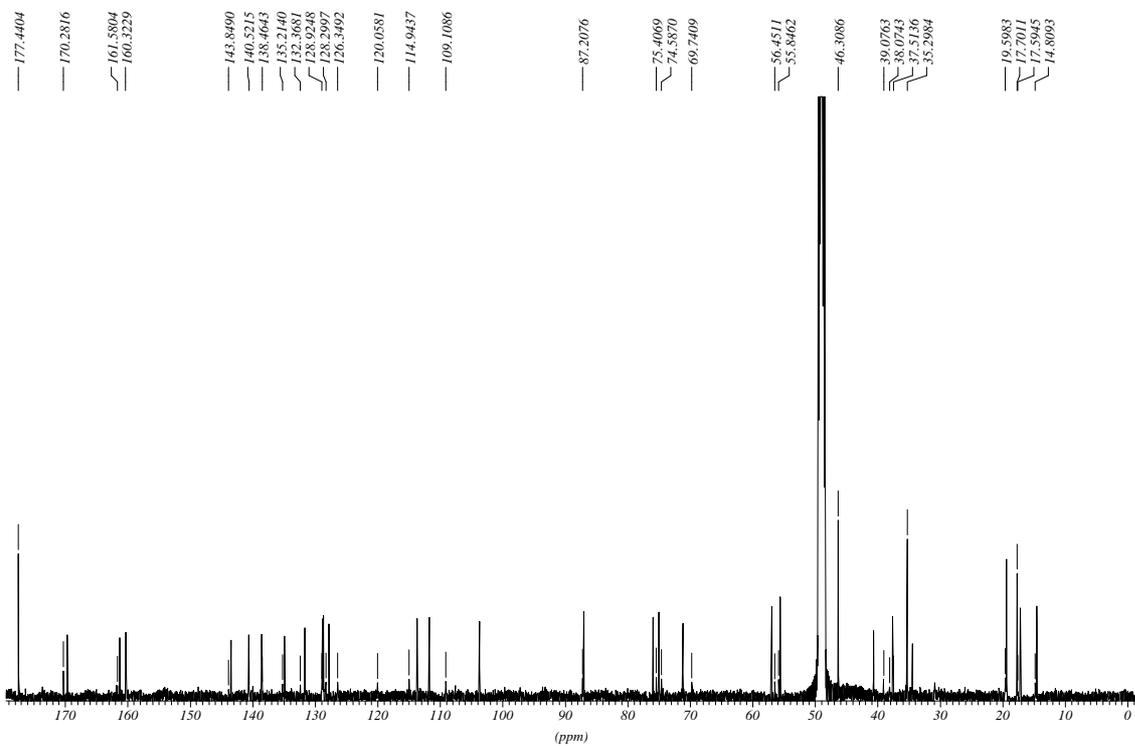
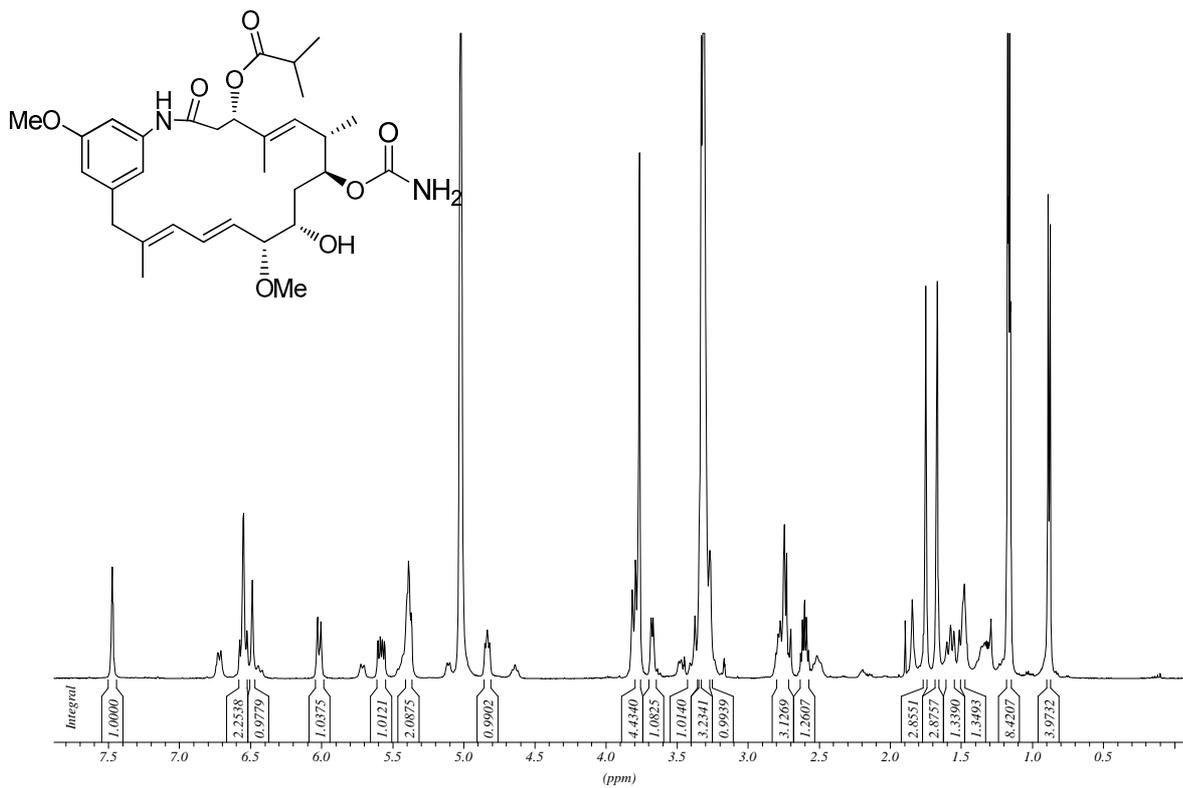
Konformer 1



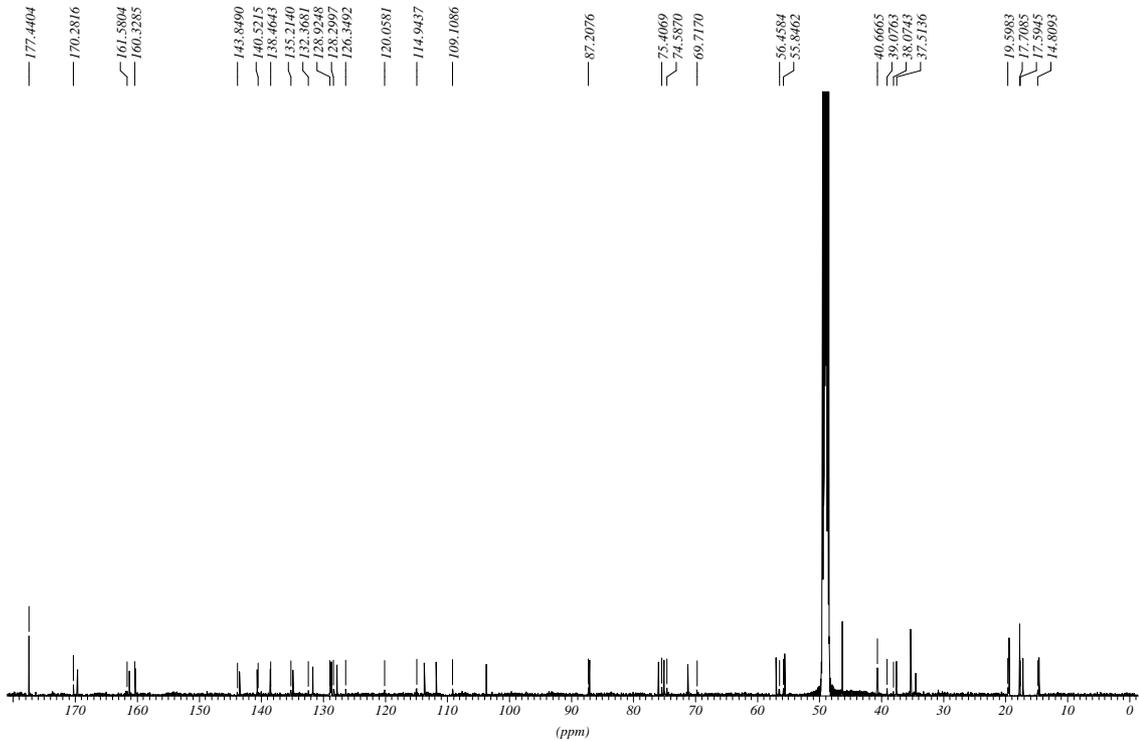
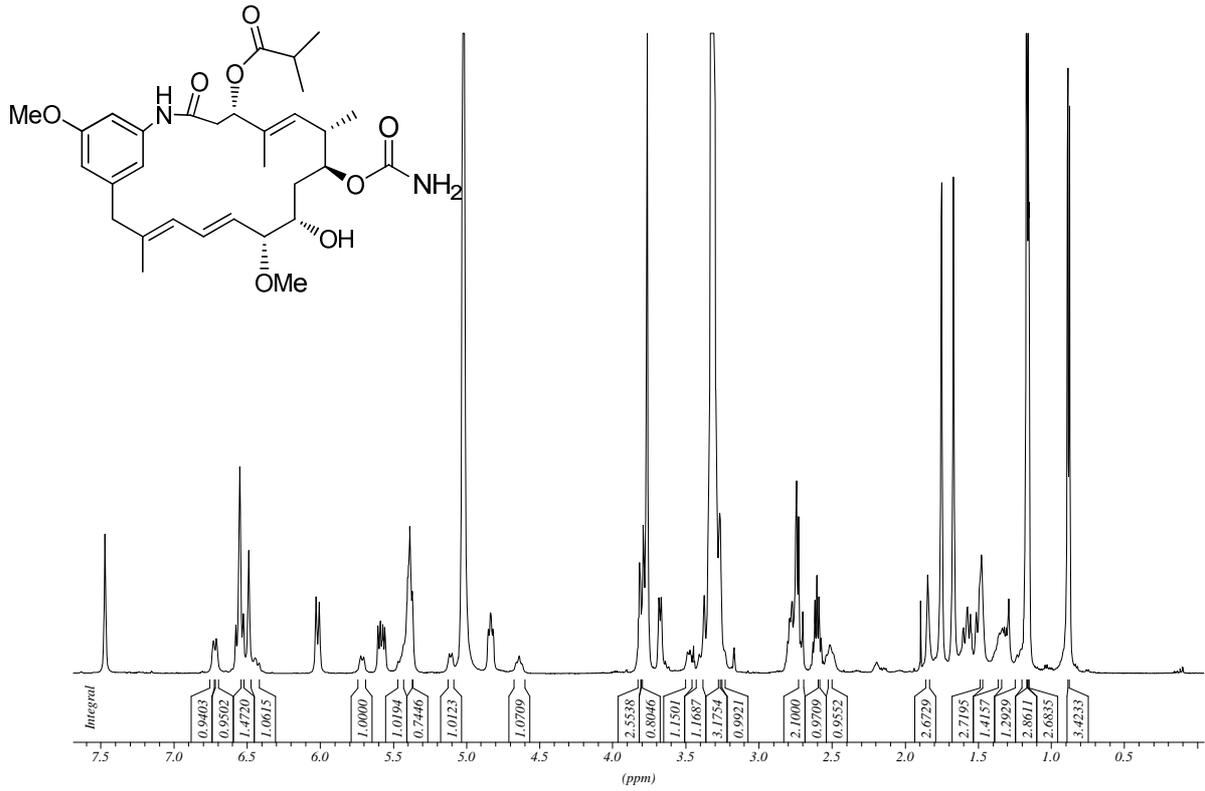
Konformer 2



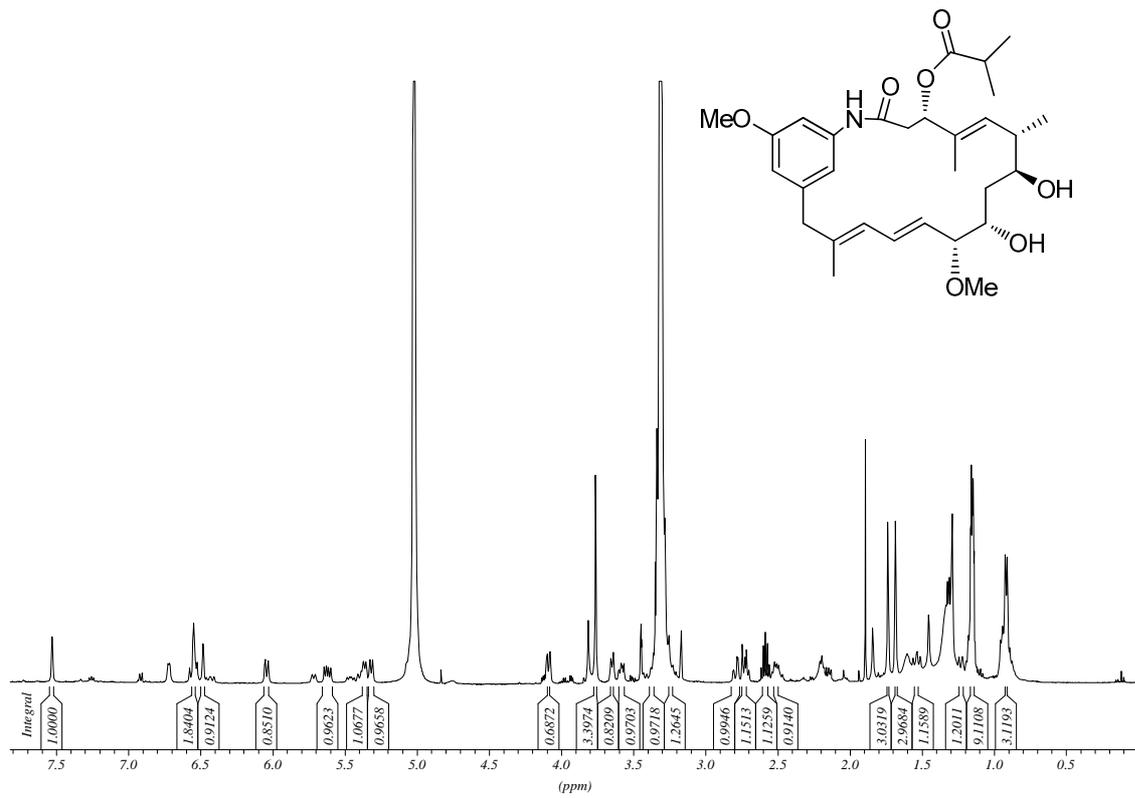
Konformer 1



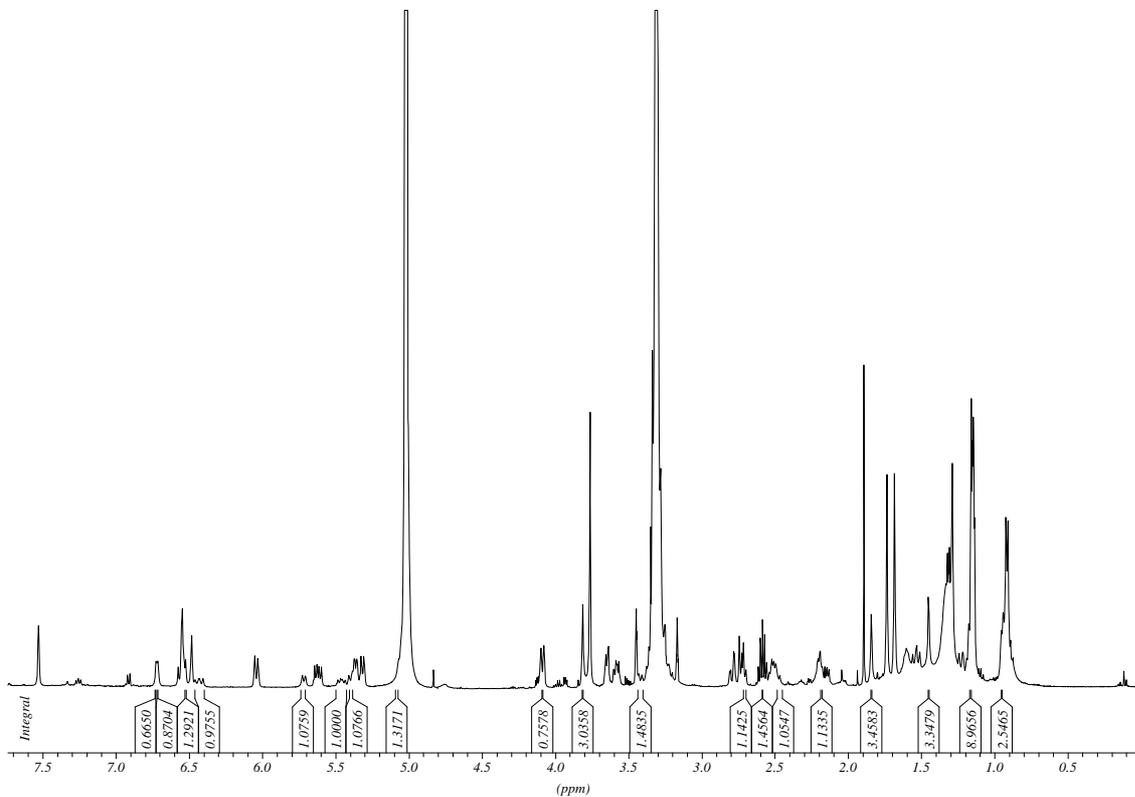
Konformer 2



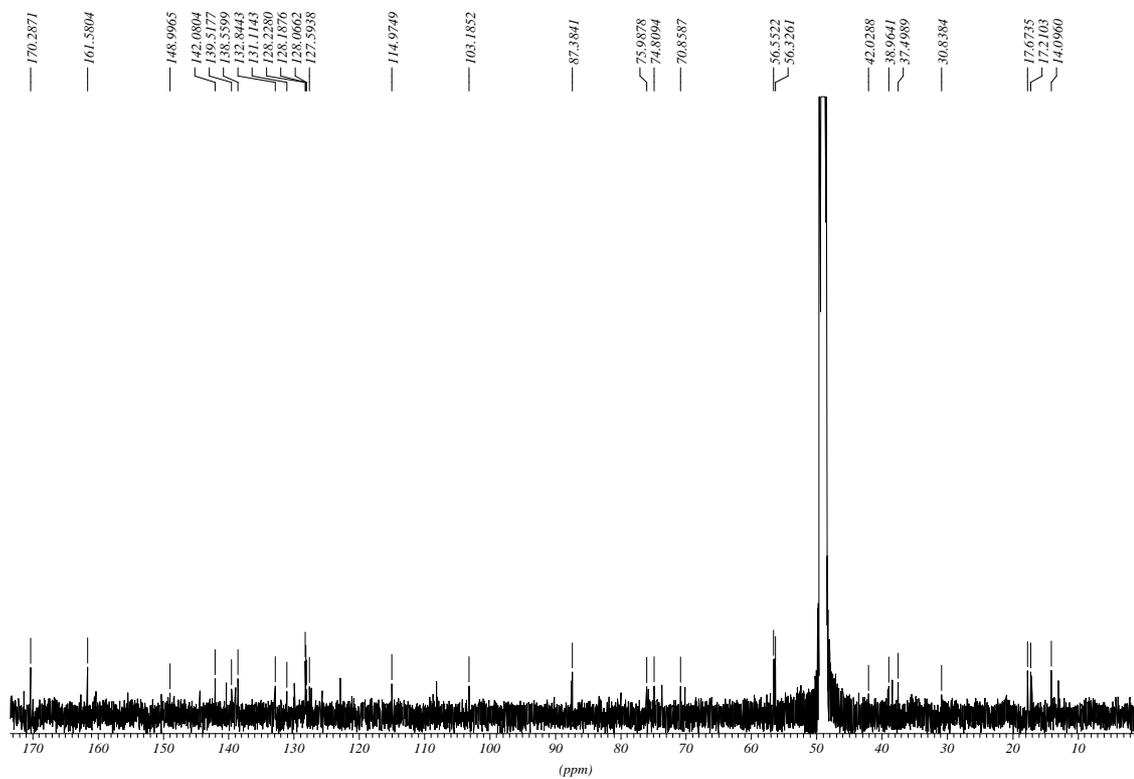
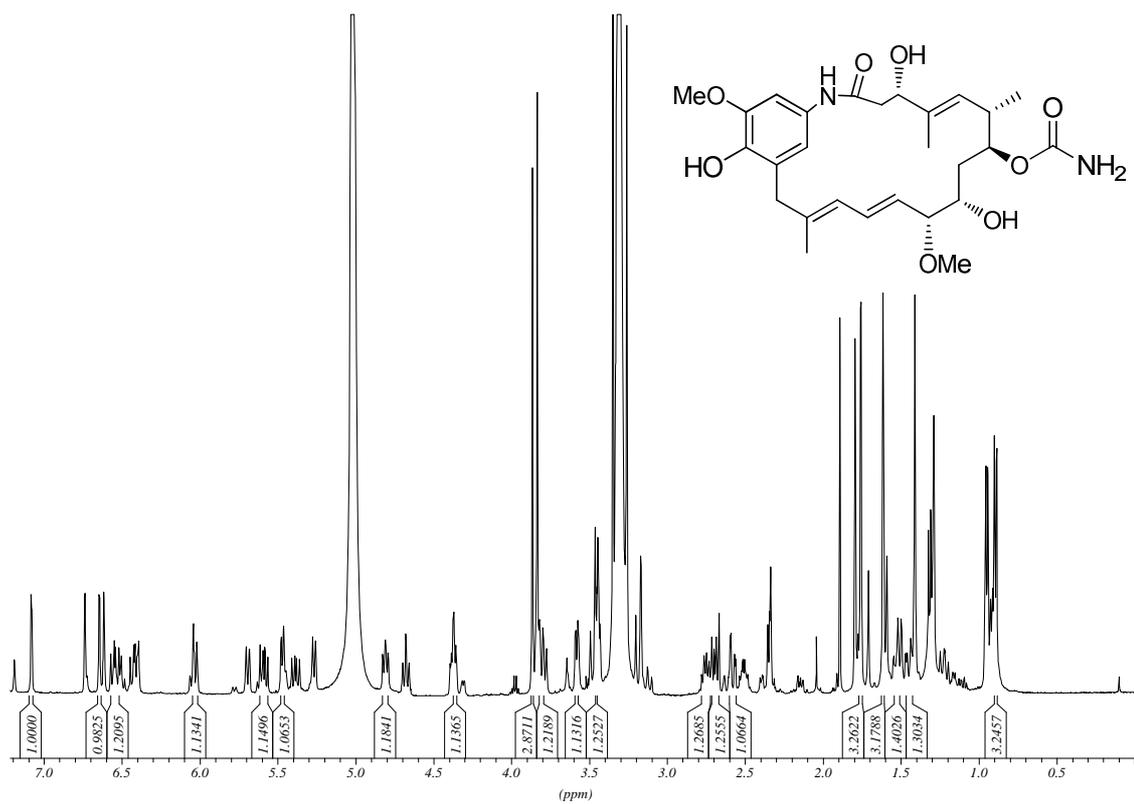
Konformer 1



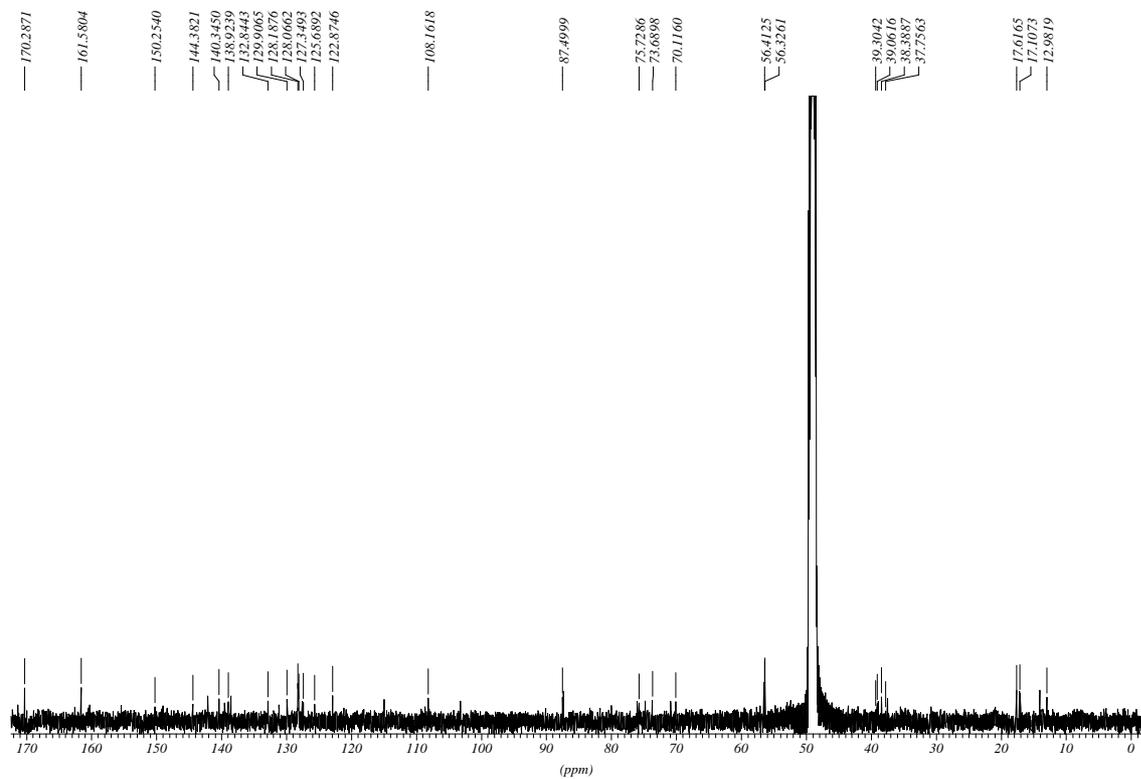
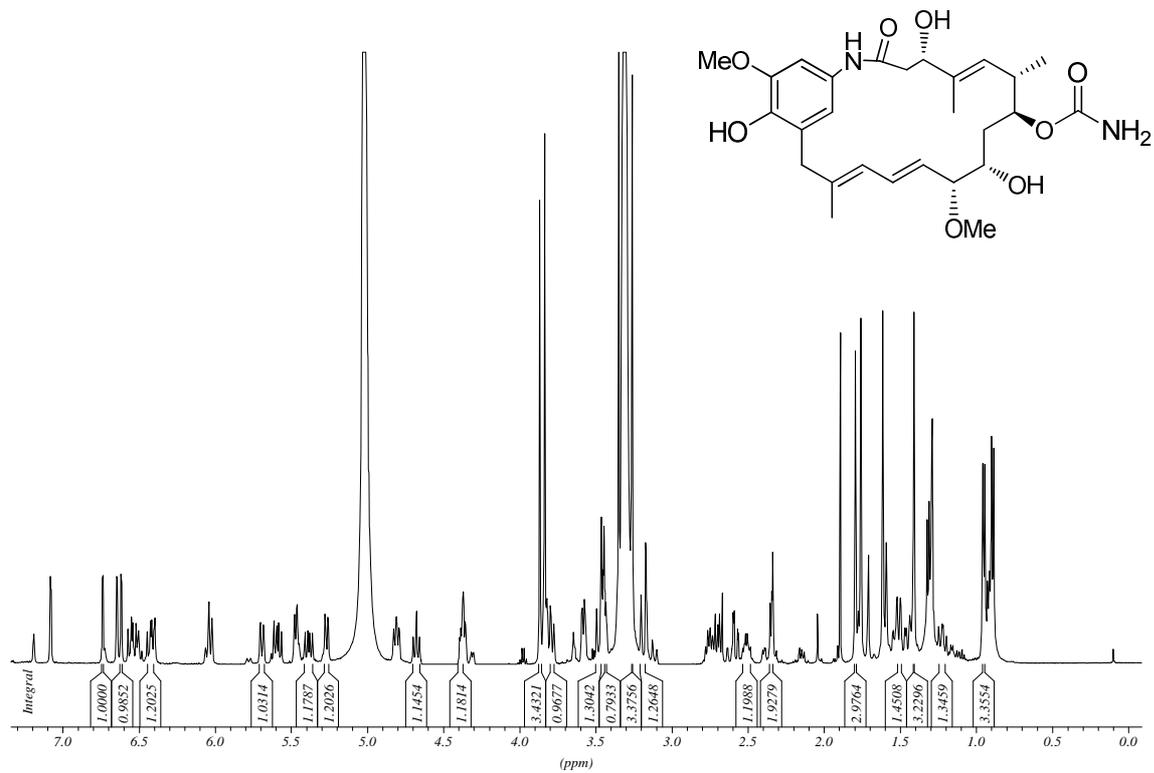
Konformer 2

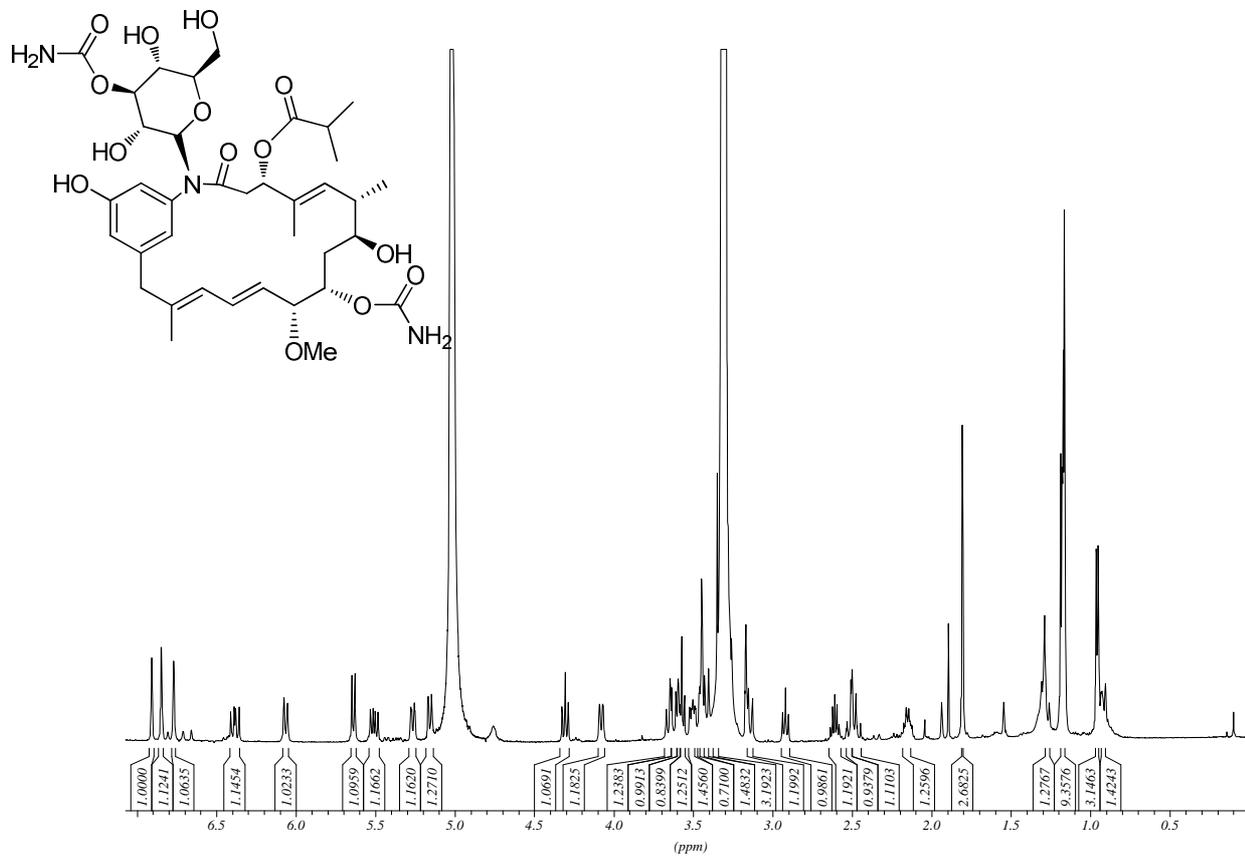
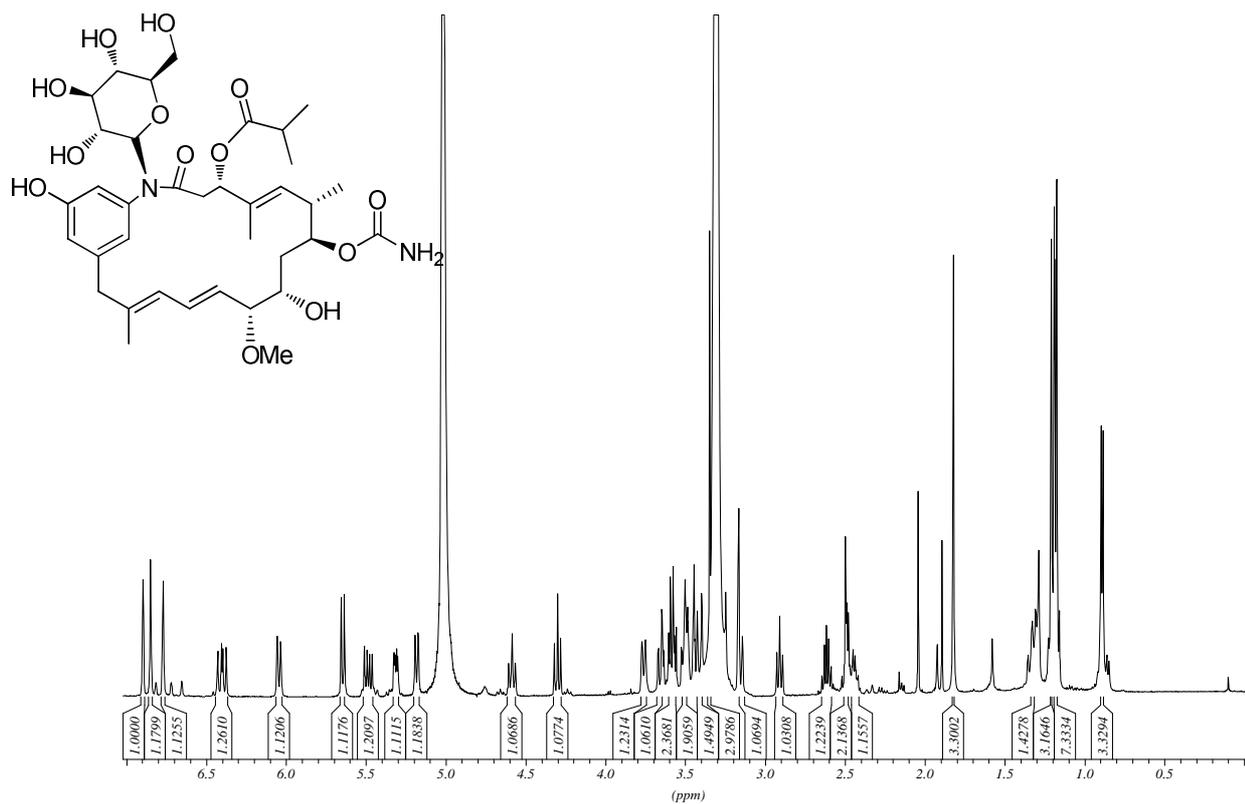


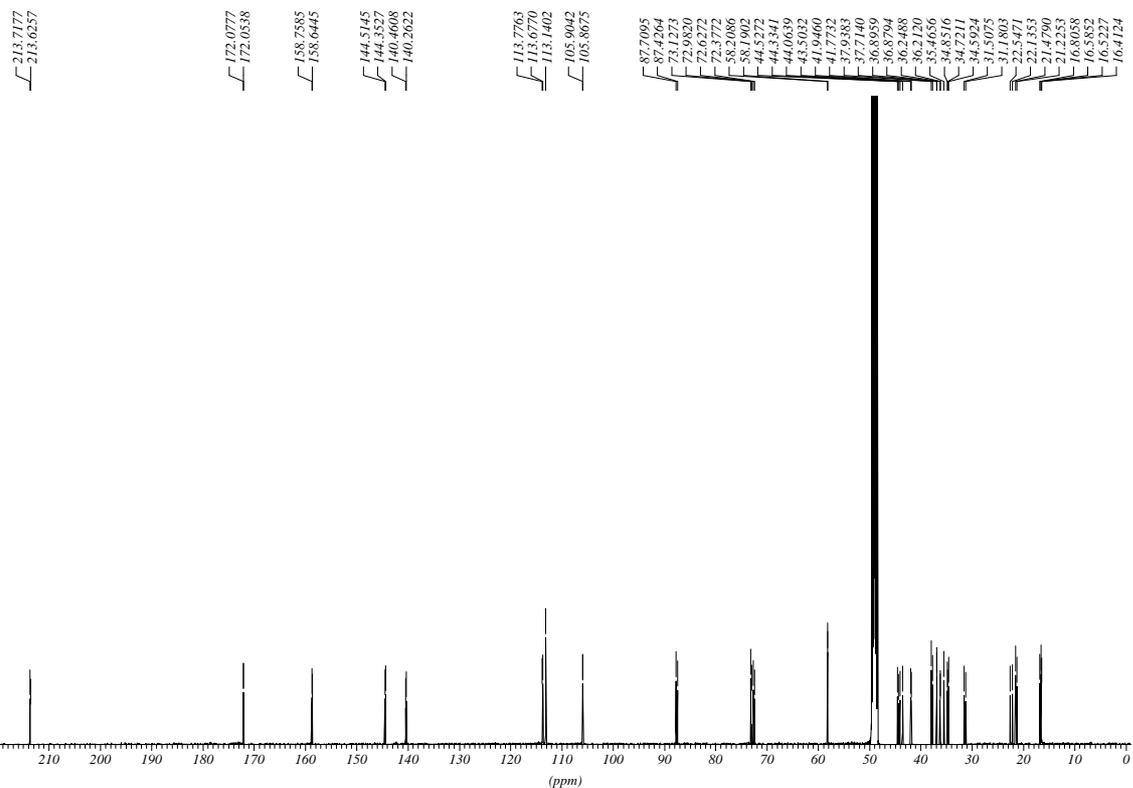
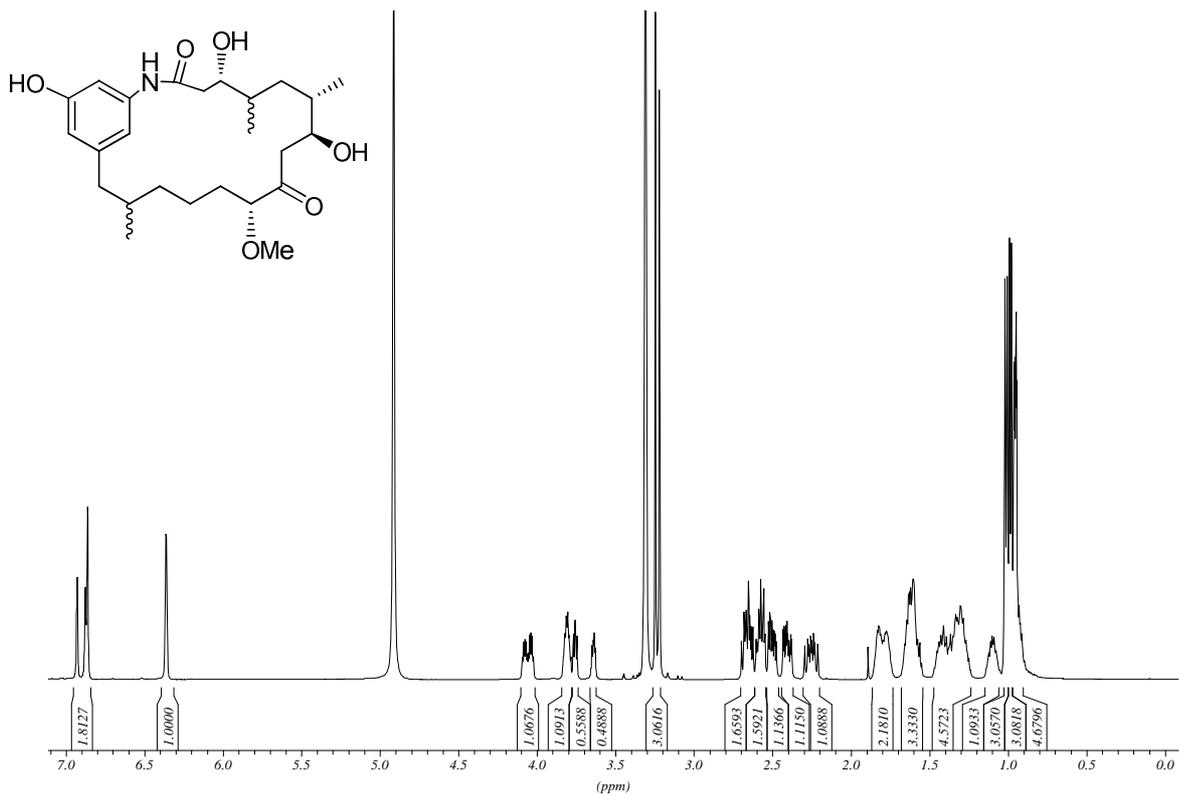
Konformer 1



Konformer 2







Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 18.01.1979 in Hannover, ledig

Schule

08/1985 - 07/1998 Schulausbildung
07/1998 Abitur Wirtschaftsgymnasium Hannover

Berufsausbildung

10/1998 - 09/2001 Ausbildung zur Krankenschwester im Klinikum Hannover

Akademischer Werdegang

10/2002 - 11/2007 **Chemiestudium** an der Universität Hannover
02/2005 **Vordiplom**
02/2006 - 05/2006 **Schwerpunktpraktikum** Solvay Pharmaceuticals
04/2007 **Diplomprüfungen**
05/2007 - 11/2007 **Diplomarbeit** „Zugänge zu Geldanamycin-Derivaten über Mutasynthese“
01/2008 - 03/2011 **Promotion** bei Prof. Dr. A. Kirschning, Universität Hannover
„Darstellung neuer Ansamycin-Derivate über Mutasynthese in Kombination mit Semisynthese“

Berufliche Tätigkeiten

10/2001 - 07/2008 **Krankenschwester** im Klinikum Hannover.
08/2006 - 09/2006 **Industriepraktikum** Solvay Pharmaceuticals
01/2008 - 03/2011 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Institut für Organische Chemie, Universität Hannover

Sonstiges

04/1995 - 06/2007 **Jugendtrainer** für Handball bei der HSG Idensen/Wunstorf

Weiterbildung

08/2002 Erwerb der C-Trainer Lizenz Handball

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

1. „Comparison of monomode and multimode microwave equipment in Suzuki Miyaura reactions – en route to high throuput parallel synthesis under microwave conditions“ U. Schön, J. Messinger, S. Eichner, A. Kirschning, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3204-3207.
2. “New, highly active nonbenzoquinone geldanamycin derivatives by using mutasynthesis”, S. Eichner, H.G.Floss, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem.* **2009**, 10, 1801-1805.

Wissenschaftliche Vorträge

1. 42nd IUPAC Congress, “New highly active non-benzoquinone geldanamycin derivatives by mutasynthesis”, Glasgow **2009** (Kurzvortrag)

Ausgewählte Posterbeiträge

1. The Chemistry and Biology of Natural Products IV, “Mutasynthesis employing AHBA derivatives yields novel, highly potent Ansamitocins”, Bristol **2008** (Posterpreis)
2. 42nd IUPAC Congress, “New highly active non-benzoquinone geldanamycin derivatives by mutasynthesis” Glasgow **2009**
3. Directing Biosynthesis 2010: Discovery, Evolution, Function, ”Reversing the substrate specificity of amide synthase in *S. hygroscopicus* by mutasynthesis – new 20-membered macrolactones derived from geldanamycin”, Durham **2010** (NPR Poster Prize)

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kirschning für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, den Freiraum bei der Bearbeitung der Themen sowie für seine Unterstützung und Hilfe während der gesamten Doktorarbeit. Herrn Prof. Dr. Markus Kalesse danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Heinz G. Floss zum einen für die Bereitstellung und die Vorarbeiten zu den beiden Blockmutanten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie für konstruktive Publikationsbeiträge.

Bei Dr. Gerald Dräger möchte ich mich für die Einarbeitung in die Bedienung der Massenspektrometer sowie für viele hilfreiche Gespräche über diverse Thematiken bedanken.

Dr. Hans Peter Fiedler danke ich für wertvolle Streptomyceten-Tips, die nie in Vergessenheit geraten werden.

Ich danke meinen ehemaligen Laborkollegen Dr. Kirsten Harmrolfs, Dr. Antonella Migliorini und Andreas Kipke für die nette Atmosphäre, die nicht selbstverständliche Hilfsbereitschaft (vor allem während meiner Krück-Zeit) und die einfach nette Gemeinschaft in diesem Labor. Kirsten danke ich außerdem für die nette Zeit auf all unseren Reisen.

Ich danke der Muta-Subgroup für die nette Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt hier Dr. Florian Taft für die Einarbeitung in die HPLCs und die Masse, Anja Heutling und Dr. Tobias Knobloch für einige hilfreiche „Bio-Tips“, Anne Schulz für die Hilfe bei diversen Fermentationen sowie dem Messen von unzähligen Massen, Gerrit Jürjens für das Teilen der HGF073-Kryos und Dr. Kirsten Harmrolfs für ihre Zeit und ihr Interesse mit mir über diverse Fermentationsprobleme zu diskutieren.

Ein ganz besonderer Dank gilt der Mutante *Streptomyces hygrosopicus* K390-61-1, die trotz häufigen „Rumzickens“ sehr viele der angebotenen Startbausteine tolerierte und in vielen Überstunden diverse Totalsynthesen durchgezogen hat.

Bei Dr. Sascha Ceylan, Anja Heutling, Andreas Kipke, Dr. Kirsten Harmrolfs und Dr. Martin Bock möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Vielen Dank an alle die mit mir durch den Park gelaufen sind und durchgehalten haben, dass hat immer viel Spaß gemacht.

Danke auch an den gesamten AK Kirschning inklusive vieler Ehemaliger für die nette Atmosphäre während der Arbeit, den Pausen und auch außerhalb der Arbeitszeit. Besonders bedanken möchte ich mich hierfür bei Dr. Sascha Ceylan, Jens Wegner, Dr. Ludovic Coutable, Dr. Florian Taft, Dr. Monika Vogt, Anja Heutling, Nadin Schläger, Jenny Barbier, Dr. Kirsten Harmrolfs, Lena Möller, Andreas Kipke, Andreas Krause, Anne Schulz, Thomas Schmidt, Yi Su und Silke Oelze, sowie Dr. Leila Bülow und Dr. Tobias Brodmann aus dem AK Kalesse.

Danke an alle Kollegen der spektroskopischen und spektrometrischen Abteilung, Monika Rettstadt, Dagmar Körtje, Dr. Edgar Hofer, Dr. Jörg Fohrer, Dr. Thomas Hackl und Rainer Nötel ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vor allem danke ich hier Dr. Edgar Hofer und Dr. Jörg Fohrer, für die angeregten Diskussionen und die Lösung diverser NMR-Probleme.

Den Damen aus dem Sekretariat Fr. Griese, Kristina Struckmeier und Fr. Bartetzko danke ich für die prompte Abwicklung bürokratischer Dinge, sowie Hilfe bei vor allem wollenden Fragen.

Ein großer Dank gilt meinem Bruder Timo Eichner, zum einen, da er die Moleküldynamik-Studien zu den Lacton-Ringschlüssen durchgeführt hat, und zu anderen für die interessanten biologischen und biochemischen Gespräche und die aufbauenden Worte, wenn's mal wieder nicht so lief, wie es sollte.

Martin danke ich ganz besonders; vor allem dafür, dass er den Preis der BahnCard100 auf sich genommen hat und Wochenende für Wochenende die Hochs und Tiefs dieser Arbeit ertragen musste.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Familie möchte ich in jeglicher Hinsicht für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums ganz herzlich danken.