

Muta- und Semisynthetische Zugänge zu Konjugaten aus Ansamitocinen und Tumor-assoziierten Liganden

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

von
Dipl.-Chem. Lena Mancuso
geboren am 22.09.1982 in Bachtschisaraj, Ukraine

2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2010 bis November 2013 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

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

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

Hannover, den 14.11.2013

Referent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. Markus Kalesse

Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bahnemann

Tag der Promotion: 07.02.2014

meinem Vater

Zusammenfassung

Lena Mancuso

Muta- und Semisynthetische Zugänge zu Konjugaten aus Ansamitocinen und Tumor-assoziierten Liganden

Schlagwörter:

Mutasynthese, Semisynthese, Ansamitocin, CuAAC, MAGSILICA[®], DIELS-ALDER-
Cycloaddition

Ansamitocin P-3 und sein pflanzliches Analogon Maytansin stellen eine Klasse von hochwirksamen zytotoxischen Naturstoffen dar, die seit ihrer Entdeckung bis heute ein außerordentliches Interesse hervorrufen. Diese Wirkstoffe zählen zu der Klasse der Ansamycin-Antibiotika und weisen eine 19-gliedrige makrozyklische Laktamstruktur auf. Heutzutage konzentriert sich die Forschung auf die Fusion der Ansamycine mit Tumor-adressierenden Antikörpern, wodurch ein selektiver Transport in die Tumorzellen möglich ist und die toxischen Nebenwirkungen verringert werden können.

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Methoden zur Darstellung von neuen Konjugaten auf Ansamitocin-Basis untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurden Azide als modifizierte Startereinheiten für die Mutasynthese erzeugt. Während der mutasynthetischen Experimente mit neuen AHBA-Analoga wurde die Fähigkeit von *A. pretiosum* HGF073 entdeckt, die organischen Azide zu reduzieren, was anschließend weitergehend untersucht wurde.

Unter Verwendung der Vorläufer-dirigierenden Biosynthese konnten erfolgreich die Azido- bzw. Alkino-*O*-Maytansinole in guten Ausbeuten erhalten und weiter mittels HUISGEN-Cycloaddition zu Ansamitocin-Derivaten umgesetzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden erfolgreich neue Konjugate auf Ansamitocin-Basis für den selektiven Transport zum Tumorgewebe synthetisiert und in DIELS-ALDER, sowie in RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion getestet. Anschließend gelang auch die reversible Ligation von Ansamitocin-Derivaten auf MAGSILICA[®]-Nanopartikel, sowie die selektive thermische Freisetzung des Wirkstoffes, die bereits bei 40 °C induktiv stattfindet.

Abstract

Lena Mancuso

Muta- and Semisynthetic Approaches to Access Target Specific Antitumor Conjugates Based on Ansamitocin P-3

Keywords:

Mutasynthesis, Semisynthesis, Ansamitocin, CuAAC, MAGSILICA[®], DIELS-ALDER-cycloaddition

Ansamitocin P-3 and its herbal analogue maytansine represent a class of highly potent cytotoxic natural substances that produce an extraordinary interest since its discovery until today. These substances belong to the class of ansamycin antibiotics and have a 19-membered macrocyclic lactam. Nowadays, research focuses on the fusion of ansamycins with tumor targeted antibodies, whereby a selective transport is possible in the tumor cells, and the toxic side effects can be reduced.

In this thesis, several new methods for the generation of conjugates based on ansamitocin were described. In the first part, azides were generated as modified starter units for mutasynthesis. During the experiments with new modified AHBA-analogs, the ability of *A. pretiosum* HGF073 was discovered to reduce the organic azides, which was analyzed.

Using precursor-directed biosynthesis new azido- and alkino-maytansinols were successfully obtained in good yields, which were transformed *via* HUISGEN cycloaddition to novel ansamitocins.

In the second part new conjugates based on ansamitocin were successfully synthesized for the selective delivery to the tumor tissue and for testing these conjugates in DIELS-ALDER- and RETRO-DIELS-ALDER-reactions. Subsequently, the reversible ligation of ansamitocin derivatives on MAGSILICA[®] nanoparticles and the selective thermal release of the active ingredient that takes place inductively already at 40 °C was successfully achieved.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2	EINLEITUNG	8
2.1	Was ist Krebs?	8
2.2	Moderne Krebstherapien.....	9
2.3	Immunokonjugate	11
2.4	Magnetische Nanopartikel und Wirkstofffreisetzung.....	14
2.5	Funktionalisierung von Makromolekülen	16
	2.5.1 Konzept der Bioorthogonalität und „CLICK“-Chemie.....	18
	2.5.2 1,3-dipolare Cycloaddition.....	18
	2.5.3 DIELS-ALDER-Cycloaddition.....	21
2.6	Maytansinoide	22
2.7	Biosynthese von Ansamitocin P-3	26
2.8	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in Ansamitocin P-3.....	27
2.9	Mutasynthese	29
3	ZIELSETZUNG	31
3.1	Muta- und Semisynthese von Ansamitocinen	31
3.2	Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel	32
4	BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	34
4.1	Mutasynthese von Ansamitocin-Derivaten.....	34
	4.1.1 Vorarbeiten	34
	4.1.2 Synthese der neuen Mutasynthone	37
	4.1.3 Mutasynthesen mit Blockmutantenstamm <i>A. pretiosum</i> HGF073.....	43
	4.1.3.1 Mutasynthesen mit modifizierten AHBA-Analoga.....	43
	4.1.3.2 Mutasynthese mit Azid-Startereinheit.....	50
	4.1.3.3 Aminoansamitocine	55
	4.1.3.4 Biologische Aktivitäten	60
4.2	Biochemische Studien der Azidreduktion.....	62
	4.2.1 Vorarbeiten	62
	4.2.3 Synthese der Diketiden	63
	4.2.4 Mutasynthese mit Diketiden	66
	4.2.5 Synthese des modifizierten AHBA-Amides	72
	4.2.6 Mutasynthese mit 3-Azido-5-hydroxybenzamid (127)	73

4.3	Muta-und semisynthetische Zugänge zu Tumor-adressierenden Konjugaten der Ansamitocine	75
4.3.1	Vorarbeiten	75
4.3.2	Mutasynthetische Zugänge zu den Ansamitocin-Derivaten	76
4.3.3	Semisynthetische Studien zu Konjugaten aus Ansamitocinen	77
4.3.4	Mutasynthesen mit gezielter Esterseitenkettendrigierung	80
	4.3.4.1 <i>Vorarbeiten</i>	81
	4.3.4.2 <i>Synthesen der Esterseitenkettenvorläufer</i>	81
4.3.5	Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf HGF073	84
4.3.6	Ergebnisse der Mutasynthesen und die semisynthetische Nutzung der neuen Ansamitocin-Derivaten	88
	4.3.6.1 <i>Linkersynthese und „CLICK“-Derivatisierungen</i>	93
	4.3.6.2 <i>„CLICK“-Synthesen mit Ansamitocin-Derivaten</i>	96
4.4	Studien zu DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion	98
4.4.1	Vorarbeiten	98
4.4.2	Untersuchungen zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion	99
4.4.3	DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion mit Ansamitocin-Derivaten.....	102
4.4.4	Reaktionen an Nanopartikel	106
4.4.5	Studien zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER mit Ansamitocinen mittels konventionellen Heizens	110
4.4.6	Studien zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER mit Ansamitocinen mittels induktiven Heizens.....	114
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	116
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	116
5.2	Ausblick	119
6	EXPERIMENTELLER TEIL	121
6.1	Allgemeine Hinweise zu den chemisch-synthetischen Arbeiten	121
6.2	Allgemeine Hinweise zu den mikrobiologischen Arbeiten.....	124
6.3	Synthese, Mutasynthese und Semisynthese der Verbindungen.....	129
7	ANHANG	221
7.1	Quantifizierung mittels Kalibrationsgeraden (LC/MS)	221
7.2	NMR-Spektren	223

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetyl
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
AP	Ansamitocin
Ar	Aryl
Äq.	Äquivalent
<i>asm</i>	Gene der Ansamitocin-Biosynthese in <i>Actinosynnema pretiosum</i>
AT	Acetyltransferase
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BnAP	<i>N</i> ⁶ -Benzyladenin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
c	Konzentration
CoA	Coenzym A
COSY	<i>engl.</i> correlation spectroscopy
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylazidophosphat
ED	Effektive Dosis
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> '-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>engl.</i> electrospray ionisation
Et	Ethyl

<i>et al.</i>	<i>lat.</i> et alii
EtOAc	Ethylacetat
g	Gramm
GA	Gibberellinsäure A ₃
gef.	gefunden
h	Stunde
HMBC	<i>engl.</i> heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	<i>engl.</i> heteronuclear multiple quantum coherence
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>engl.</i> high performance liquid chromatography
HRMS	<i>engl.</i> high resolution mass spectrometry
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IAA	Indol-3-essigsäure
IC	<i>engl.</i> inhibitory concentration
IR	<i>engl.</i> infrared spectroscopy
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LDA	Lithiumdiisopropylamid
L	Liter
λ	Wellenlänge
m	milli
M	molar
μ	mikro
Me	Methyl
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
m/z	Masse pro Ladung

n	nano
NAT	Arylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Buthyllithium
neat	<i>engl.</i> reinlich
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
NP	Nanopartikel
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
pH	negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKS	Polyketidsynthese
ppm	<i>engl.</i> parts per million
quant.	quantitative
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAR	<i>engl.</i> structure-activity relationship
Smp.	Schmelzpunkt
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteaminyl
<i>tert</i>	tertiär
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
t_R	Retentionszeit
TE	Thioesterase
Ts	Tosyl
UDP	Uridyldiphosphat
UPLC	<i>engl.</i> ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviolett
YMG	<i>engl.</i> yeast, malt, glucose
Zers.	Zersetzung
°C	Grad Celsius
%	Prozent

‰	<i>engl.</i> per mille
δ	chemische Verschiebung
®	registrierte Warenmarke

2 EINLEITUNG

2.1 Was ist Krebs?

Krebs ist eine bekannte Krankheit und ein Sammelbegriff für verschiedene Krankheiten mit gemeinsamen Merkmalen: Ursprünglich gesunde Zellen des menschlichen Körpers vermehren sich unkontrolliert, wachsen in gesundes Gewebe ein und bilden sogenannte Tumore ("Verhärtung").¹

Tumore lassen sich in gutartig (*lat.:* benigne) und bösartig (*lat.:* maligne) unterscheiden. Gutartige Tumore kopieren meist genau das Gewebe, aus dem sie entstehen. Entsprechend sind die einzelnen Zellen gut entwickelt und gesunden Zellen sogar zum Verwechseln ähnlich. Gutartige Tumore wachsen in der Regel langsam, haben klare Grenzen und sind auf das betroffene Organ beschränkt. Sie zerstören also die Umgebung nicht und verursachen lange Zeit keine oder nur wenige Beschwerden.

Bösartige Tumore (Abbildung 1) hingegen entwickeln sich aus Milliarden wuchernder Zellen, die aus einer einzigen Ursprungszelle entstehen, welche sich wieder und wieder geteilt hat. Normalerweise wird eine solche Form von biologischer Anarchie im Körper durch ein ganzes System von Kontrollmaßnahmen unterdrückt - Krebszellen zeichnen sich aber dadurch aus, dass sie sich nicht mehr den normalen Regelmechanismen unterwerfen.²



Abbildung 1: Tumorzellen unter dem Mikroskop.³

Die gefährlichste Eigenschaft von Krebszellen besteht jedoch darin, in benachbarte Gewebe einzudringen, sich im gesamten Körper auszubreiten und an entfernten Stellen sogenannte Tochtergeschwülste (*Metastasen*) zu bilden. Damit schädigen Krebszellen mit der Zeit

¹ www.krebspatienten.info, Abruf: 17.09.2013.

² <http://www.krebshilfe-wien.at>, Abruf: 17.09.2013.

³a) links: Morgenpost, <http://www.morgenpost.de/berlin-aktuell/article106385154/Impfung-gegen-Krebs.html>, Abruf: 14.10.2013; b) Mitte: Krebsinformationsdienst, <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/>, Abruf: 14.10.2013; c) rechts: Die Welt, <http://www.welt.de/gesundheit/article13777135/Zucker-treibt-Krebszellen-in-den-Selbstmord.html>, Abruf: 14.10.2013.

lebenswichtige Strukturen und Funktionen des menschlichen Organismus. Wenn die Ausbreitung nicht kontrolliert wird, kann es zum Tod führen.¹

Krebs kann sowohl von *externen Faktoren* (Tabak, infektiöse Organismen, Chemikalien und Strahlung), als auch von *internen Faktoren* (geerbte Mutationen, Hormone, Immunsystem) verursacht werden. Diese Faktoren können zusammen oder nacheinander wirken, um die Entwicklung von Krebs zu initiieren oder zu fördern.^{1,2}

Allein in Deutschland erkranken nach Angaben des Robert-Koch-Instituts jährlich etwa 480.000 Menschen neu an Krebs. Weil das Risiko, an Krebs zu erkranken, mit dem Alter zunimmt, gehen Experten vor dem Hintergrund des demographischen Wandels davon aus, dass die Zahl der Erkrankungen bis zum Jahr 2030 um 50 Prozent steigen wird.⁴

Die weltweit drei häufigsten Krebsarten bei Männern sind (Zahlen 2012) unter anderem: das Prostatakarzinom, der Darmkrebs und der Lungenkrebs. Die weltweit drei häufigsten Krebsarten bei Frauen sind (Zahlen 2012): der Brustkrebs, der Darmkrebs und Lungenkrebs. Bei Frauen wie Männern liegen Krebserkrankungen hinter den Krankheiten von Herz und Kreislauf seit vielen Jahren auf Platz zwei der Todesursachenstatistik.⁵

2.2 Moderne Krebstherapien

Zu den Standardmethoden, die heutzutage bei der Behandlung von Krebs eingesetzt werden, zählen die Operation, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Die Operation ist die älteste und die häufigste Behandlungsform bei Krebs. Die höchsten Erfolgsaussichten hat der chirurgische Eingriff, wenn der Tumor auf ein bestimmtes Organ beschränkt ist und der Krebs nicht schon weitere Organe befallen hat. Ist eine komplette Tumorbeseitigung nicht möglich, wird die betroffene Körperregion meist energiereicher ionisierender Strahlung ausgesetzt. Dabei werden die Krebszellen so geschädigt, dass sie schließlich absterben. Wie bei der Operation lässt es sich hierbei nicht vermeiden, dass auch gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden.⁴

Krebs wird auch mittels der Chemotherapie bekämpft. Dabei werden Zellgifte verwendet, die ihre Wirkung möglichst gezielt auf Krebszellen ausüben und diese abtöten oder in ihrem

⁴ <http://www.krebshilfe.de>, Abruf: 17.09.2013.

⁵ <http://www.who.int/cancer/en/>, Abruf: 17.09.2013.

Wachstum hemmen. Aber auch normale Körperzellen können von der Chemotherapie geschädigt werden.⁶

Zu den modernen Methoden der Krebsbehandlung zählt die Hyperthermie. Die Hyperthermie ist potenziell die bedeutendste der derzeit bekannten biomedizinischen Anwendungen.

Die klinische Hyperthermie wird bereits mit Erfolg als Ergänzung zur Chemotherapie verwendet.⁷

Bei der Hyperthermie-Behandlung wird das Tumorareal eine bestimmte Zeit lang auf 40 °C bis 43 °C mittels elektromagnetischen Wellen erwärmt. Es ist bekannt, dass Krebszellen hitzeempfindlicher als gesunde Zellen sind und viele von ihnen allein durch die Erwärmung absterben. Ein weiterer Effekt der Überwärmung besteht in einer besseren Durchblutung des Tumors und führt damit zu einer besseren Wirkung von Strahlen- und Chemotherapien.^{6,7}

In einer ersten Näherung werden die Hyperthermie-Behandlungen drei große Kategorien eingeteilt: *Ganzkörper-Hyperthermie*, *regionale Hyperthermie* und *lokale Hyperthermie*.⁸

Die *lokale Hyperthermie* wird bei Tumoren, die dicht unter der Haut liegen, z.B. bei wiederkehrendem Brustkrebs, bei schwarzem Hautkrebs, oberflächlich gelegenen Sarkomen und nicht operablen Lymphknoten verwendet. Bei der lokalen Hyperthermie wird nur das erkrankte Gewebe überhitzt. Dadurch wird der Körper des Patienten weniger belastet. Dieses Verfahren wird meist in Verbindung mit einer Chemotherapie angewandt. Das erkrankte Gewebe wird durch die Hitze stark erweitert, was die Wirkung der Chemotherapie verbessern soll. Die Wirkstoffe können dadurch leichter in den Tumor eindringen. Mit *regionaler Hyperthermie* werden tiefer liegende Tumore oder ausgedehnte Tumorareale im Bauch- und Beckenbereich behandelt. Bei der regionalen Hyperthermie, wie auch bei der lokalen Hyperthermie wird der erkrankte Teil des Körpers erhitzt.^{8,9}

Die *Ganzkörper-Hyperthermie* wird oft bei der Behandlung von metastasierendem Krebs, der sich im ganzen Körper ausgebreitet hat, verwendet.

Die Wirksamkeit der Hyperthermie-Behandlung ist auf die während der Behandlung erreichte Temperatur als auch auf die Dauer der Behandlung und Zell- und Gewebeeigenschaften zurückzuführen.⁷

Zu den weiteren modernen Methoden der Krebstherapie, neben der Hyperthermie, gehört die zielgerichtete Verabreichung von Kontrastmitteln und Chemotherapeutika, das sogenannte selektive *Targeting* von Tumorgewebe.^{6,10} Das selektive Targeting maligner Zellen mit

⁶ www.krebsinformationsdienst.de, Abruf: 18.09.2013.

⁷ D. Ortega, Q. A. Pankhurst *Nanoscience* **2013**, *1*, 60–88.

⁸ M.H. Falk, R.D. Issels, *Int. J. Hyperthermia* **2001**, *17*, 1-18.

⁹ J. Zee, *Annals of Oncology* **2002**, *13*, 1173–1184.

¹⁰ W. Maison, J. V. Frangioni, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4726-4728.

monoklonalen Antikörpern und niedermolekularen Liganden gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Krebsbehandlung und -diagnostik.¹⁰ Für eine effektive therapeutische Anwendung sind dabei chemische Methoden essenziell, die den Wirkstoff in seiner bioaktiven Form in der richtigen subzellulären Umgebung freisetzen. Die monoklonalen Antikörper spielen dabei eine zunehmend wichtigere Rolle.¹¹ Die Antikörper sind stabil im Blut, haben typischerweise nanomolare Affinitäten zu ihrem Target und tolerieren die Konjugation mit Kontrastmitteln und Chemotherapeutika, da bindende und nichtbindende Domänen in hinreichendem Abstand zueinander vorliegen.¹⁰

Die Aufnahme von Antikörpern in der Zelle tritt vorwiegend über die Clathrin-vermittelte Endozytose auf (Abbildung 2).¹² Nach Bindung an dem jeweiligen Antigen werden die Antikörper-Arzneistoff-Konjugate leicht endozytiert. Anschließend kommt es im Endosom zur hydrolytischen oder reduktiven Spaltung des Konjugats und der Wirkstoff wird freigesetzt.

Aus der gezielten Freisetzung des Toxins in der Krebszelle folgt, dass nur eine geringe Dosierung des cytotoxischen Wirkstoffes nötig ist, um die Krebszelle zu vernichten und die dosisabhängigen Nebenwirkungen stark zu reduzieren.

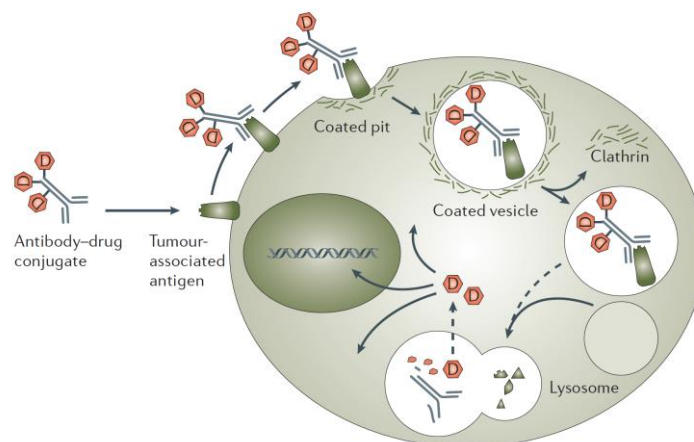


Abbildung 2: Internalisierung von mit Wirkstoff (D) beladenen Antikörpern durch die Krebszelle.^{12a}

2.3 Immunokonjugate

Wie bereits erwähnt wurde, wird das Konjugat nach der Bindung an die Zelle durch die Endozytose internalisiert. Idealerweise sollte ein Konjugat so konstruiert werden, dass es im

¹¹ S. Aggarwal, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 427-428.

¹² a) D. Schrama, R. A. Reisfeld, J. C. Becker, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 147-159; b) H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, *66*, 2873-2896.

Umlauf *in vivo* solange ungiftig bleibt, bis das biologische Ziel, also der Tumor, erreicht wird.¹² Die Freisetzung von Wirkstoff findet im inneren der Zelle statt.¹³ Ein Beispiel eines sogenannten Antikörper-Wirkstoff-Konjugats ist in Abbildung 3 dargestellt. Typischerweise, werden im Durchschnitt vier Moleküle eines zytotoxischen Wirkstoffs (orange-farbene Kugeln) mit einem Molekül des Antikörpers (blaue Y-geformte Proteinstruktur) über Lysinreste verbunden.

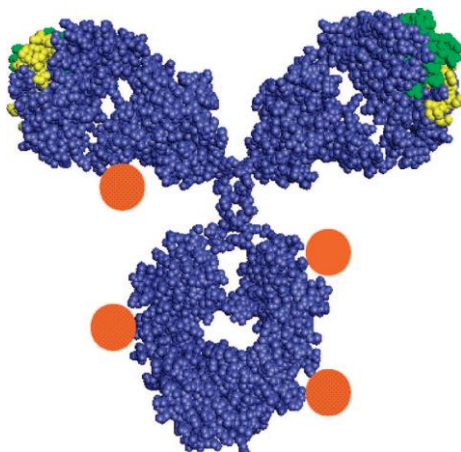


Abbildung 3: Bildliche Darstellung eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats.¹⁴

Die Verknüpfung einer größeren Anzahl von Wirkstoffmolekülen ist oft nicht möglich. In der Regel sind die Zytostatika hydrophob und in dem überwiegend wässrigen Milieu schlecht löslich. Für deren Anbindung an Antikörper darf weniger als 5 % organischen Lösungsmittels verwendet werden, sonst kann es zu einem negativen Einfluss auf die Pharmakokinetik des Antikörpers *in vivo* beitragen oder die Bindungsaffinität des Antikörpers an das Antigen auf der Zielzelle wird vermindert.^{12,14,15}

Der Erfolg der gezielten Verabreichung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten hängt von drei Komponenten ab: (1) die Selektivität des Antikörpers; (2) die Wirksamkeit des Medikaments, und (3) die Stabilität und Spaltbarkeit des Linkers, der zur Bindung des Antikörpers an das Medikament benötigt wird.¹⁴

Der Antikörper sollte sorgfältig ausgewählt werden, da er sich selektiv an Tumorgewebe binden und wenig Kreuz-Reaktivität mit gesunden Geweben hervorrufen soll.

Die zytotoxischen Wirkstoffe sollten die folgenden Eigenschaften besitzen: (1) eine hohe *in vitro* Wirksamkeit gegen spezifischen Tumor-Zelllinien, bzw. die IC₅₀-Werte sollten im niedrigen, nanomolaren Bereich liegen; (2) eine geeignete funktionelle Gruppe zur Bindung

¹³ F. Kratz, K. A. Ajaj, A. Warnecke, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *7*, 1037-1058.

¹⁴ R. V. J. Chari, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 98-107.

¹⁵ S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, I. Ojima, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5043-5054.

an einen Antikörper; (3) eine angemessene Löslichkeit in wässrigen Lösungen, um die Reaktion mit Antikörpern zu ermöglichen.^{14,15}

Der Linker zwischen dem Antikörper und der Zytostatika sollte so konstruiert sein, dass einerseits eine gewisse Stabilität während der Zirkulation im Blut und andererseits die schnelle Freisetzung des Wirkstoffs in seiner voll aktiven Form in Tumorzellen gewährleistet wird.^{12,13}

Im Februar 2013 erteilte die FDA (*engl.* Food and Drug Administration) die Zulassung für das Roche-Medikament KADCYLA, das erste Antikörper-Wirkstoff-Konjugat zur Behandlung von HER2-positivem metastasierendem Brustkrebs (Abbildung 4).¹⁶ KADCYLA besteht aus dem Antikörper TRASTUZUMAB und dem Chemotherapeutikum DM1, beide sind durch einen stabilen Linker miteinander verbunden.

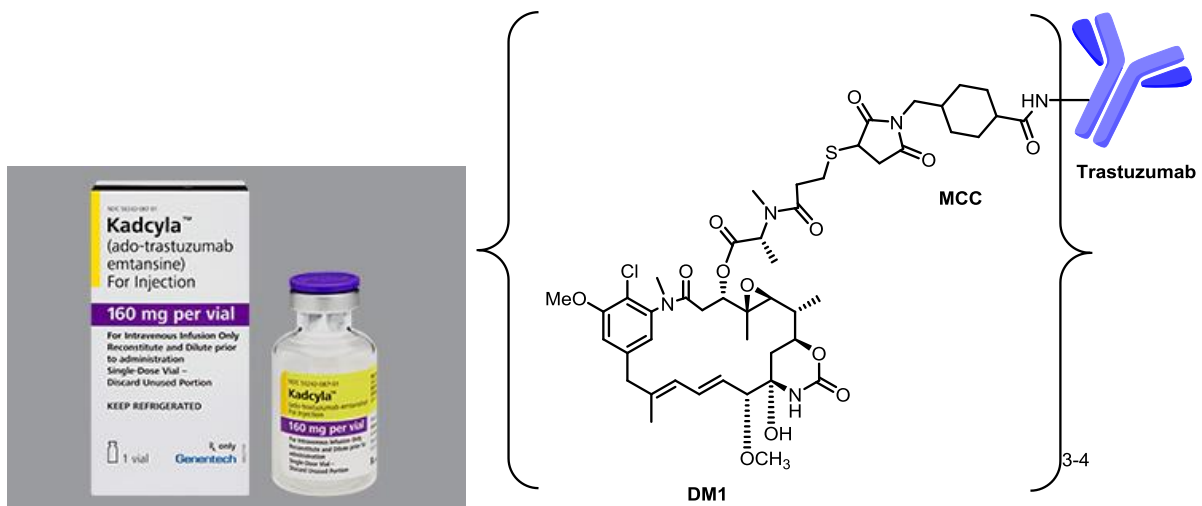


Abbildung 4: Medikament KADCYLA¹⁷ und bildliche Darstellung seiner chemischen Komponente.

Die FDA-Zulassung stütze sich auf eine internationale randomisierte, offene Phase-III-Studie mit 991 Patientinnen mit HER2-positivem lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs.¹⁸

¹⁶ Roche, http://www.roche.com/de/media/media_releases/med-cor-2013-02-22.htm, Medienmitteilung vom 22.02.2013; Abruf: 14.10.2013.

¹⁷ https://healthy.kaiserpermanente.org/health/care/consumer/health-wellness/drugs-and-natural-medicines/drug-encyclopedia/medicine-information/!ut/p/c5/fc7RboIwFAbgZ_EJemoF, Abruf: 14.10.2013.

¹⁸ S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I. E. Crop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D.-Y. Oh, V. Dieras, E. Guardino, L. Fang, M. Lu, S. Olsen, K. Blackwell, *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1783-1791.

2.4 Magnetische Nanopartikel und Wirkstofffreisetzung

In den letzten Jahren haben sich Nanopartikel zu den wichtigsten Komponenten in der Nanotechnologie entwickelt. Ihre Vielseitigkeit in Bezug auf Design und Einsatzmöglichkeiten macht sie zu einem attraktiven Werkzeug für neue biologische und biomedizinische Ansätze.^{19,20}

Obwohl Krebs eine der häufigsten Todesursachen ist, sind die Behandlung und die genauen Diagnosen in vielen Fällen immer noch schwierig. Die enormen Anstrengungen in der biomedizinischen Forschung dienen zur Verbesserung der Empfindlichkeit und Genauigkeit der Diagnose, um die Früherkennung und möglicherweise eine bessere Wirksamkeit der Behandlung zu realisieren.^{21,22}

Nanopartikel für die Krebsbehandlung werden als feste Teilchen im Größenbereich von 10 bis 100 nm definiert.²² Sie bestehen aus makromolekularen Materialien und können therapeutisch verwendet werden, z. B. als Arzneistoffträger, in denen der Wirkstoff (Arzneimittel oder biologisch aktives Material) gelöst, eingeschlossen oder eingekapselt ist, oder der Wirkstoff adsorbiert oder gebunden ist.²⁰

In modernen Forschungsansätzen zur Krebsbehandlung sollen die magnetischen Nanopartikel mit der zielgerichteten Wirkstofffreisetzung kombiniert werden. Ein Zytostatikum wird an einem magnetischen Nanopartikel-Träger fixiert und dieser, meist in Form eines biokompatiblen Ferrofluids in den Patienten injiziert. Nachdem die Partikel in den Blutkreislauf gelangen, wird ein externes Hoch-Gradienten-Magnetfeld verwendet, um den Komplex zu einer bestimmten Zielstelle innerhalb des Körpers zu führen (Abbildung 5).²³

Sobald die mit Wirkstoff beladenen Nanopartikel das Ziel erreicht haben, kann das Medikament entweder über enzymatische Aktivität oder Veränderungen in physiologischen Bedingungen, wie pH-Wert,²⁴ Osmose, oder Temperatur freigesetzt und von den Tumorzellen aufgenommen werden.²³

¹⁹ S. Krol, R. Macrez, F. Docane, G. Defer, S. Laurent, M. Rahman, M. J. Hajipour, P. G. Kehoe, M. Mahmoudi, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1877-1903.

²⁰ J. Rauch, W. Koch, S. Laurent, M. Mahmoudi, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3391-3406.

²¹ V. R. Devadasu, V. Bhardway, M. N. V. R. Kumar, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1686-135.

²² M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, *Nat. Rev.* **2008**, *7*, 771-781.

²³ Q. A. Parkhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, 167-181.

²⁴ J. Zou, G. Jafr, E. Themistou, Y. Yap, Z. Wintrop, P. Alexandridis, A. C. Ceacareanu, C. Cheng, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4493-4495.

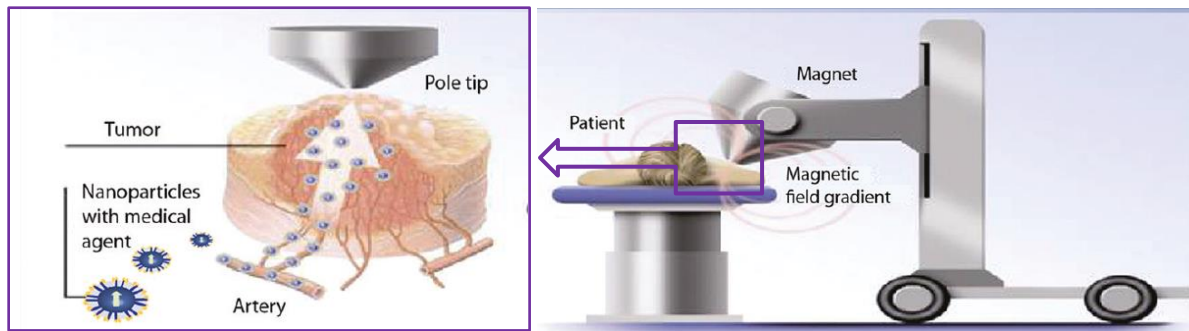


Abbildung 5: Magnetische Nanopartikel werden mit Wirkstoffen beladen und an der Tumorseite mittels externen Magnetfeldes konzentriert (Originalbild wurde geändert).²⁵

Die Wirksamkeit der Therapie hängt von verschiedenen Parametern ab, unter anderem der magnetischen Feldstärke und der Partikeleigenschaften. Da die Nanopartikel in der Regel intravenös oder intra-arteriell verabreicht werden, spielen die hydrodynamische Parameter wie Blutdurchlauf, Ferrofluid-Konzentration, Infusionsroute und Zirkulationszeit auch eine wichtige Rolle, ebenso wie physiologische Parameter wie Gewebetiefe an der Zielstelle (Abstand zu der Magnetfeldquelle), Spaltbarkeit und Zytotoxizität des Wirkstoffes, und das Tumolvolumen.²³

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Nanopartikel für die Wirkstofffreisetzung spielen Größe, Form und Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel selbst. Die Eigenschaften von idealen, mit Wirkstoff beladenen, magnetischen Nanopartikeln wurden bereits 1978 durch SENYEI *et al.* definiert.²⁶ Der Durchmesser von Nanopartikel sollte weniger als 1.4 μm betragen, damit diese Kapillargefäße passieren können. Die Partikel sollen angemessene magnetische Eigenschaften besitzen, so dass diese sogar unter physiologischen Bedingungen lokalisiert werden können. Außerdem sollen die Partikel so funktionalisiert werden, dass eine ausreichende Menge von biologisch aktiven Wirkstoffen zum Zielorgan transportiert werden kann, aber ohne übermäßig den Organismus mit magnetisierbarem Material zu belasten. Die Freisetzung vom Wirkstoff soll von dem Träger an dem gewünschten Zielort in kontrollierter Weise stattfinden. Die Partikel sollen maximale Biokompatibilität und minimale Antigenität aufweisen und biologisch ausscheidbar sein.²⁶

Mehrere Forschergruppen befassen sich mit der Wirkstofffreisetzung von magnetischen Nanopartikeln. WANG *et al.* berichtete über eine erfolgreiche Freisetzung von Cisplatin *in*

²⁵ J. V. Jokerst, S. S. Gambhir, *ACR* **2011**, 1050–1060.

²⁶ A. Senyei, K. Widder, G. Czerlinski, *J. Appl. Phys.* **1978**, 49, 3578-3583.

vitro und *in vivo*.²⁷ Viele Gruppen²⁸ haben Doxorubicin als spaltbares Konjugat bei der Behandlung von Krebs bereits getestet. Allerdings, erfolgt in allen Fällen die Wirkstoffabspaltung vom Nanoträger diffusionskontrolliert. Die Herausforderung die Nanopartikel, so zu funktionalisieren, dass eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung erfolgen kann, bleibt damit bestehen.

2.5 Funktionalisierung von Makromolekülen

Die vielen chemischen und technischen Herausforderungen, die mit der Funktionalisierung von Nanopartikel-Biokonjugaten verbunden sind, sind nicht trivial.²⁹ Nanopartikel (NP) haben eine große Variabilität in ihrer Struktur, bzw. in ihrer Zusammensetzung. Einige Nanopartikel bestehen nur aus einer Art von Material, z. B. Gold-Nanopartikel; es existieren aber auch NP, wie FePt-Nanopartikel, die aufgrund ihrer gleichmäßigen Zusammensetzung, eine binäre Legierung und eine fehlende Schale-Struktur aufweisen. In anderen Fällen sind NP so aufgebaut, dass die äußeren Schalen die inneren Schichten schützen und isolieren, was für biologische Anwendungen besonders wichtig ist.²⁹

Die meisten synthetisierten Nanopartikel sind hydrophob und werden durch chemische Derivatisierung der Oberfläche hydrophil und biokompatibel funktionalisiert. Dieses beinhaltet gewöhnlich das Anbringen oder Auswechseln der hydrophoben Liganden, die den NP stabilisieren. Die Chemie des hydrophilen Liganden ist komplex und vielfältig. Sie reicht von kleinen geladenen Molekülen bis hin zu Dendrimeren oder amphiphilen Blockcopolymeren, welche die NP vollständig umkapseln können.^{30,31}

Biomoleküle werden direkt auf der Oberfläche von einigen Nanopartikeln oder auf der Oberfläche gebundenen stabilisierenden Liganden konjugiert. Die Auswahl der Konjugationsstrategie wird zunächst durch eine Kombination von verschiedenen Faktoren bestimmt: die Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit und die Struktur von Nanopartikel selbst sind entscheidend, aber auch die Art von funktionellen Gruppen, die zur Verfügung stehen. Die

²⁷ J. Wang, X. Wang, Y. Song, J. Wang, C. Zhang, C. Chang, J. Yan, L. Qiu, M. Wu, Z. Guo, *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 2605-2612.

²⁸ a) F. H. Chen, L. M. Zhang, Q. T. Chen, Y. Zhang, Z. J. Zhang, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 8633-8635; b) S.-M. Lee, H. Park, J.-W. Choi, Y. N. Park, C.-O. Yun, K.-H. Yoo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 7581-7586; c) J. Lee, K. Chen, S. Noh, M. Garcia, H. Wang, W. Lin, H. Jeong, B. Kong, D. Stout, J. Cheong, H. Tseng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4384-4388.

²⁹ K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. Gemmill, B. Casey, E. Oh, M. Stewart, I. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904-2074.

³⁰ N. Than, L. Green, *Nano today* **2010**, *5*, 213-230.

³¹ Z. Zhu, Y. Yeh, R. Tang, B. Yan, J. Tamayo, R. Vachet, V. Rotello, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 963-968.

Art, die Größe, die chemische Zusammensetzung der biologischen Moleküle, sowie die Endanwendung für solche Konstrukte sind ebenfalls maßgeblich.

Die funktionellen Gruppen sind für Konjugationsreaktionen sehr nützlich, und die meisten derzeit verfügbaren Nanopartikel sind hinsichtlich ihrer Vielfalt eher begrenzt. In Abbildung 6 sind Beispiele von chemischen Reaktionen zur Modifizierung der Oberfläche von Nanopartikeln schematisch dargestellt.²⁹

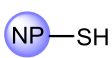
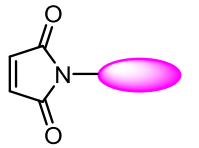
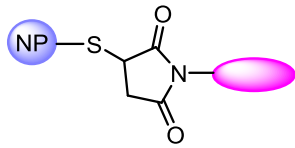
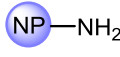
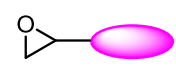
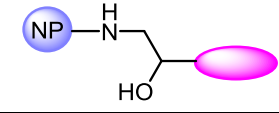
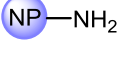
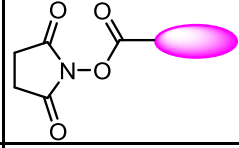
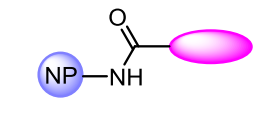
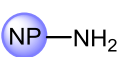
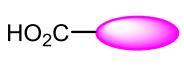
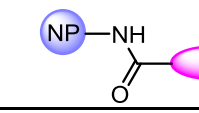
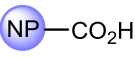
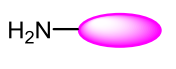
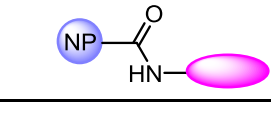
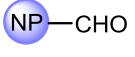
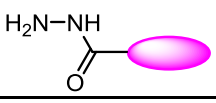
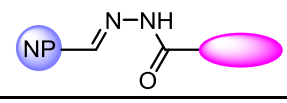
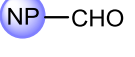
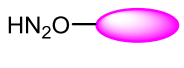
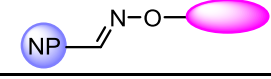
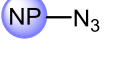

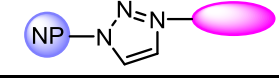
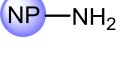
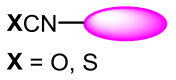
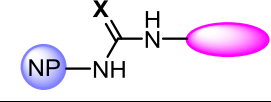


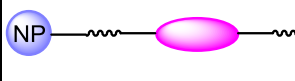
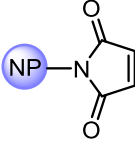
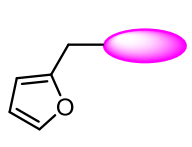
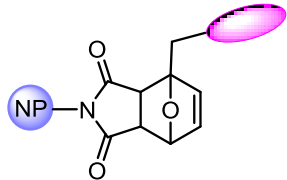
Ligand	Substrat	Ligand gebunden an das Substrat	Reaktion
			MICHAEL Addition
			Epoxid- öffnung
			Amidierung
			Amidbildung- Bindung
			Amidbildung- Bindung
			Imin-Bildung
			Imin-Bildung
			"Click"-Chemie
			Addition von Aminen an Cyanate
			Kreuzmetathese
			DIELS-ALDER CYCLOADDITION

Abbildung 6: Schematische Darstellung von Konjugationsreaktionen an Nanopartikel.

2.5.1 Konzept der Bioorthogonalität und „CLICK“-Chemie

Ein wichtiges und wachsendes Konzept in der „Biokonjugationschemie“ ist die Bioorthogonalität. Der Begriff „bioorthogonale Chemie“ bezieht sich auf jede chemische Reaktion, die im Inneren von lebenden Systemen auftreten kann, ohne sich an nativen chemischen Prozessen zu beteiligen.³² Der Begriff wurde von BERTOZZI im Jahr 2003 geprägt. Die Reaktionen werden als bioorthogonal bezeichnet, wenn zwei reaktive funktionelle Gruppen sehr chemoselektiv sind, wenn die betrachtete Reaktion in Wasser bei oder nahe neutralem pH-Wert zwischen 25 °C und 37 °C abläuft, und zytotoxische Reagenzien oder Nebenprodukte an der Reaktion nicht beteiligt sind.³³

Eine Reihe von chemischen Ligationsstrategien wurde bereits entwickelt, die den Anforderungen von Bioorthogonalität entsprechen, einschließlich der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen.

Das Konzept der "CLICK"-Chemie wurde von KOLB, FINN und SHARPLESS im Jahr 2001 definiert³⁴ und wird angewendet, wenn eine Reaktion mehrere Kriterien erfüllt: (1) Modular, d.h. die Reaktionsbedingungen sollen einfach sein, so dass die Reaktion in einem chemischen Labor durchgeführt werden könnte; (2) leicht verfügbare Ausgangsmaterialien oder Reagenzien, keine Lösungsmittel; (3) hohe Ausbeute, eine einfache Isolierung des Produktes und (4) die Entstehung von nicht toxischen Nebenprodukten.

2.5.2 1,3-dipolare Cycloaddition

Die HUISGEN 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen zu 1,2,3-Triazolen ist zu einer beliebten und häufig eingesetzten „CLICK“-Reaktion geworden. Dies bedeutet auch, dass diese besondere Cycloaddition auch manchmal versehentlich als "CLICK"-Reaktion bezeichnet wird.²⁹ Die Beliebtheit dieser Reaktion basiert auf ihrer rasanten Geschwindigkeit und ihrer Regioselektivität. Diese Chemie wird allgemein als Cu(I)-vermittelte [3+2] Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnet.³⁵ Zur *in situ* Erzeugung der aktiven Cu(I)-Spezies während der Reaktion wurden verschiedene Verfahren untersucht, einschließlich des direkten Zusatzes von Cu(I)-Salzen (wie CuI oder CuBr).^{29,35} Dieses erfordert oft die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, Zugabe von Basen oder O₂-freien, anaerobe Reaktions-

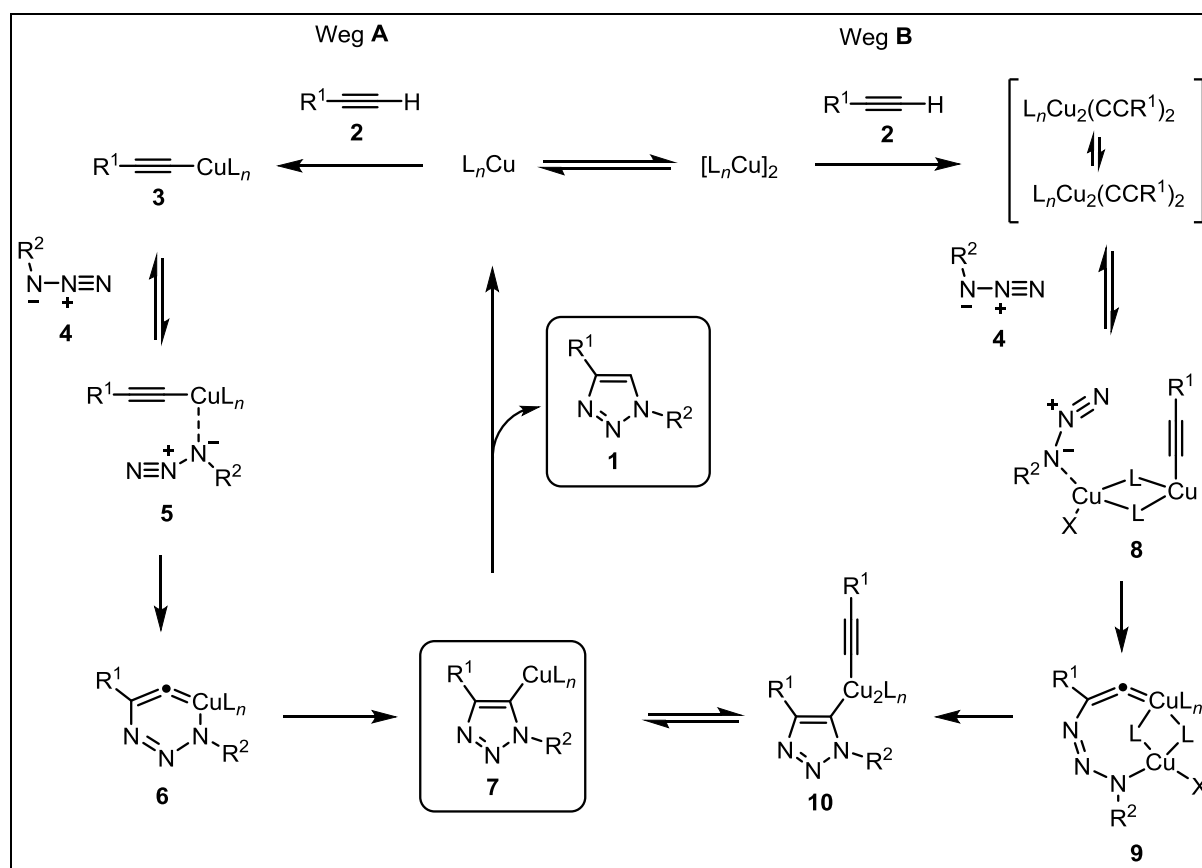
³² C. Bertozzi, J. Jewet, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1272-1279.

³³ E. Sletten, C. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974-6998.

³⁴ H. Kolb, M. Finn, K. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

³⁵ P. Wu, V. Fokin, *Aldrichimica Acta*, **2007**, 40, 7-17.

bedingungen. Allerdings, können diese extremen Bedingungen vermieden werden, z. B. durch Einsatz von Ascorbinsäure und einer Cu(II)-Spezies wie CuSO_4 und der damit verbundenen *in situ* Herstellung von Cu(I).³⁶ Triazol- und Benzimidazol-Liganden können ebenfalls verwendet werden, um Cu(I)-Spezies zu stabilisieren und somit zur Verbesserung der Reaktionskinetik beizutragen.³⁶ Der vorgeschlagene Mechanismus der CuAAC-Reaktion ist in Schema 1 dargestellt.³⁷ Die CuAAC ist eine Reaktion zweiter Ordnung in Bezug auf Kupfer, allerdings führt eine Erhöhung der Kupferkonzentration zur Bildung weniger reaktiver Spezies.³⁷ Diese Befunde lassen darauf schließen, dass in Lösung eine Gruppe von Cu(I)-Verbindungen im dynamischen Gleichgewicht vorliegen könnte. Unabhängig davon, ob Mono- oder Dicupratspezies beteiligt sind, kann die beobachtete Regioselektivität mit Hilfe eines Schlüsselkomplexes (**5** oder **8**) aus einem Cu(I)-Acetylid und dem organischen Azid **4** (Koordination an das Kupferzentrum über das α -Stickstoffatom) erklärt werden. Hieraus ergibt sich, dass die CuAAC auf terminale Alkine beschränkt ist.³⁷



Schema 1: Vorgeschlagener Mechanismus der Kupfer-katalysierten Reaktion.³⁷

³⁶ S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5188-5240.

³⁷ C. Spiteri, J. E. Moses, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 31-33.

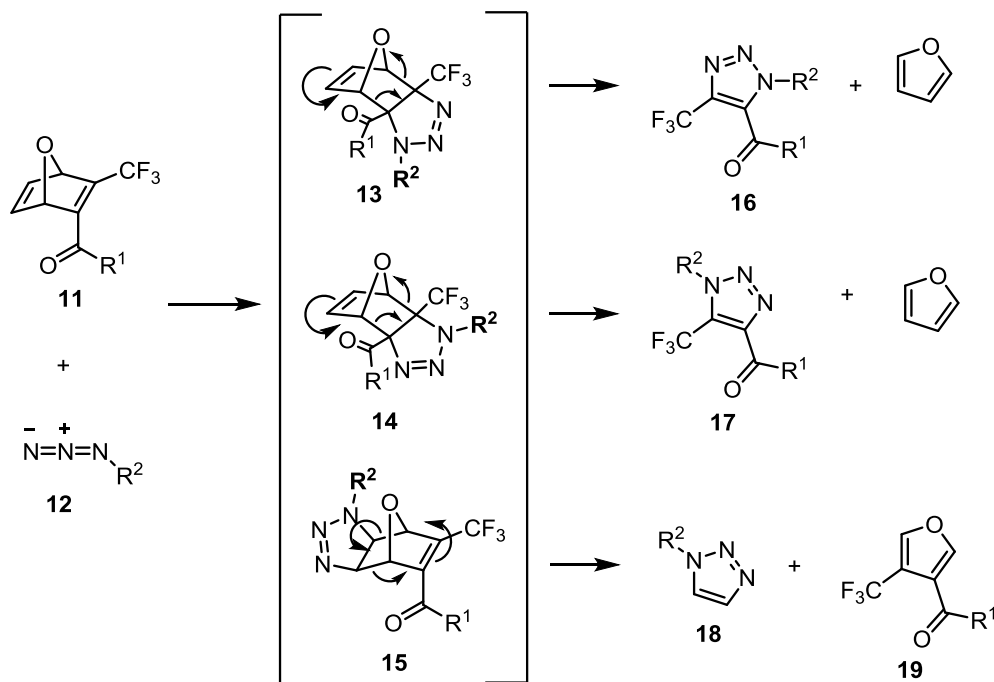
CuAAC ist hoch spezifisch (es entstehen keine Nebenprodukte). Die Reaktion ist chemisch orthogonal, kompatibel mit wässrigen Medien und biologischen Komponenten und nutzt milde Reaktionsbedingungen. Obwohl viele Bedenken vorliegen, dass die *in vivo*-Toxizität von den Cu (I/II)-Spezies erhöht werden, sind CuAAC die am umfassendsten untersuchten "CLICK"-Reaktionen zum Funktionalisieren von Nanopartikeln mit Biokonjugaten.³⁸

Eine elegante, metallfreie Strategie zum Aufbau von 1,2,3-Triazolverbindungen wurde von RUTJES *et al.* entdeckt.³⁹ In diesem Verfahren reagieren Oxanorbornadiene mit organischen Aziden über eine [3+2]-Cycloaddition-RETRO-DIELS-ALDER-Tandemreaktion. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Schema 2 dargestellt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Bildung eines relativ toxischen Nebenproduktes (eines Furans) und die Abwesenheit von Regioselektivität (beide Regioisomeren **16** und **17** werden gebildet, daher wurden zwei Zwischenprodukte **13** und **14** postuliert).⁴⁰ Die Reaktion startet durch den chemoselektiven Angriff des nukleophilen Azids **12** an die elektronenärmste Doppelbindung des Oxabornadiensystems **11**, und führt zur Bildung von beiden Triazolinderivaten **13** und **14**.^{39,40} Anschließende RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion setzt beide Trifluorderivate **16** und **17** frei. Zudem wurde eine Nebenreaktion zum Triazol **18** und dem Furan **19** beobachtet. Der Angriff des Azides erfolgte in diesem Fall auf die elektronisch ungünstigere, aber sterisch wenig anspruchsvollere Doppelbindung des Oxabornadiens.³⁹

³⁸ P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905-4997.

³⁹ a) S. van Berkel, A. Dirks, M. Debets, F. Delft, J. Cornelissen, R. Nolte, F. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504-1508; b) S. van Berkel, A. Dirks, S. Meeuwissen, D. Pinggen, O. Boerman, P. Laverman, F. Delft, J. Cornelissen, F. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1805-1815; c) B. Kuijpers, S. Groothuys, A. Soede, P. Laverman, O. Boerman, F. Delft, F. Rutjes, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1847-1854.

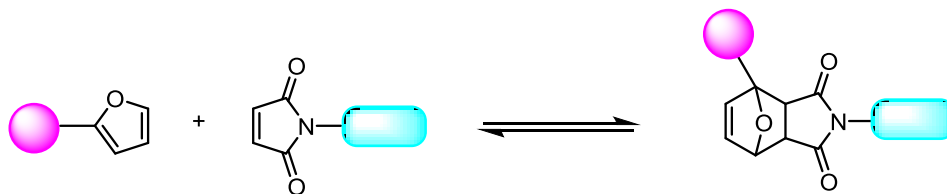
⁴⁰ J. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2182-2184.



Schema 2: Vorgeschlagener Mechanismus der kupferfreien Ligation nach RUTJES.

2.5.3 DIELS-ALDER-Cycloaddition

Für die Biokonjugation in wässrigen Puffern können auch DIELS-ALDER-Cycloaddition genutzt werden. Diese Art der Reaktionen verlaufen durch eine [4+2]-Cycloaddition zwischen einem Dien und einem typischen Dienophil.²⁹ Die Kriterien der „CLICK“-Chemie werden dabei teilweise erfüllt, da es eine sehr selektive, effiziente Art und Weise ist, neue Produkte zu erzeugen. Vom besonderen Interesse ist auch die reversible DIELS-ALDER-Cycloaddition (Schema 3), die von GANDINI *et al.* studiert und bei der Funktionalisierung von Polymeren angewendet wurde.⁴¹



Schema 3: Schematische Darstellung der reversiblen DIELS-ALDER-Cycloaddition für die Funktionalisierung von Makromolekülen.

⁴¹ a) C. Gousse, A. Gandini, *Polym. Bull.* **1998**, *40*, 389-394; b) A. Gandini, D. Coelho, M. Gomes, B. Reis, A. Silvestre, *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 8656-8664; c) A. Gandini, A. Silvestre, D. Coelho, *J. Poly. Sci.: Part A: Poly. Chem.*, **2010**, *48*, 2053-2056.

Der Einfluss der Substituenten am Furan auf die Geschwindigkeit und die Reversibilität der DIELS-ALDER-Cycloaddition wurde bereits durch NORTHROP *et al.* beschrieben.⁴² Besonders Alkyl-, oder Alkylether-substituierte Furane eignen sich für diesen Reaktionstyp.

2.6 Maytansinoide

Maytansin (**20**) und seine mikrobiellen Analoga Ansamitocin P2-P4 (**21-23**) stellen eine Klasse von hochwirksamen cytotoxischen Naturstoffen dar, die seit ihrer Entdeckung bis heute ein außerordentliches Interesse hervorrufen. Der erste Vertreter dieser Naturstofffamilie – das Maytansin (**20**) – wurde bereits im Jahr 1972 von KUPCHAN und Mitarbeitern am National Cancer Institut (NCI) aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus serrata* isoliert⁴³ und seine Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.⁴⁴

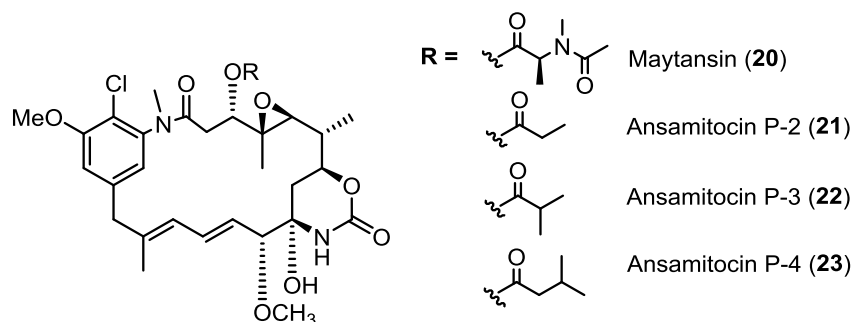


Abbildung 7: Maytansin (**20**) und Ansamitocine **21-23**.

Maytansin (**20**) zeigte eine sehr hohe *in vitro* Aktivität gegenüber humanen KB-Zellen ($ED_{50} = 10^{-4}$ - 10^{-5} $\mu\text{g/mL}$) und gegenüber mehreren tierischen Tumorzelllinien.⁴⁵ Nach ersten erfolgreichen Experimenten wurde Maytansin (**20**) als Antitumormittel in klinischen Studien bis zur Phase II getestet. Es stellte sich heraus, dass das Medikament starke Nebenwirkungen, wie z.B. Neurotoxizität, gastrointestinale Toxizität, Schwäche und Übelkeit hervorruft.⁴⁶ Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Studien der klinischen Testung von Maytansin (**20**)

⁴² R. Boutelle, B. Northrop, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 7994-8002.

⁴³ S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmor, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1354-1356.

⁴⁴ S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, A. T. Sneden, W. A. Court, G. J. Thomas, H. P. J. Hintz, R. M. Smith, A. Karim, A. K. Verma, Y. Nagao, R. G. Dailey, V. A. Zimmerly, W. C. Summer, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2349-2347.

⁴⁵ B. F. Isell, S. T. Crooke, *Cancer Treatment Revs.* **1978**, 5, 199-207.

⁴⁶ a) J. Thigpen, C. Ehrlich, W. Creasman, S. Curry, J. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 273-275; b) J. Thigpen, C. Ehrlich, J. Blessing, *Am. J. Clin. Oncol.* **1983**, 6, 427-430; c) M. J. Ravry, G. Omura, R. Birch, *Am. J. Clin. Oncol.* **1985**, 8, 148-150.

abgebrochen. 1977 gelang es HIGASHIDE und Mitarbeitern von TAKEDA CHEMICAL Industries Ansamitocin P-3 (**22**) aus dem Mikroorganismus *Actinosynnema pretiosum* zu isolieren,⁴⁷ wobei sich die in den Actinomyceten gefundenen Verbindungen von den pflanzlichen Maytansinen nur in der Natur der Esterseitenkette an C-3 unterscheiden (Abbildung 7). Erste biologische Tests von Ansamitocin P-3 (**22**) ergaben ein vergleichbares Wirkprofil zu Maytansin (**20**) im Hinblick auf die Antitumoraktivität, aber auch die Nebenwirkungen betreffend.^{47,48}

Die Maytansinoide zählen zu der Klasse der Ansamycin-Antibiotika. Es handelt sich um ein 19-gliedriges makrocyclisches Lactam, das aus einem aromatischen Grundbaustein und einer aliphatischen Kette, welche als „Henkel“ (*lat.* ansa) zwei nicht benachbarte Positionen des aromatischen Systems verbindet, besteht.⁴⁹

Die Substanzklasse der Ansamycine kann in zwei Gruppen eingeteilt werden. Diese unterscheiden sich in der strukturellen Natur des aromatischen Grundbausteins. Die erste Gruppe wird durch benzolische Ansamycine, wie z. B. Ansamitocin P-3 (**22**) oder Geldanamycin (**24**) (Abbildung 8) vertreten. Die zweite Gruppe umfasst die naphthalinische Ansamycine, zu denen Rifamycin B (**25**) und Tolypomycin Y (**26**) gehören (Abbildung 8).⁴⁹

⁴⁷ a) E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino, M. Yoneda, *Nature*, **1977**, 270, 721-722; b) M. Asai, E. Mizuta, M. Isawa, K. Haibara, T. Kishi, *Tetrahedron* **1979**, 35, 1079-1085.

⁴⁸ S. Ikeyama, M. Takeuchi, *Biochem. Pharmacol.* **1981**, 30, 2421-2425.

⁴⁹ S. Funayama, G. A. Cordell, *Ansamycin Antibiotics discovery, classification, biosynthesis and biological activities*, In *Studies in Natural Products Chemistry*, 23, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier Science B. V. **2000**, 51-106.

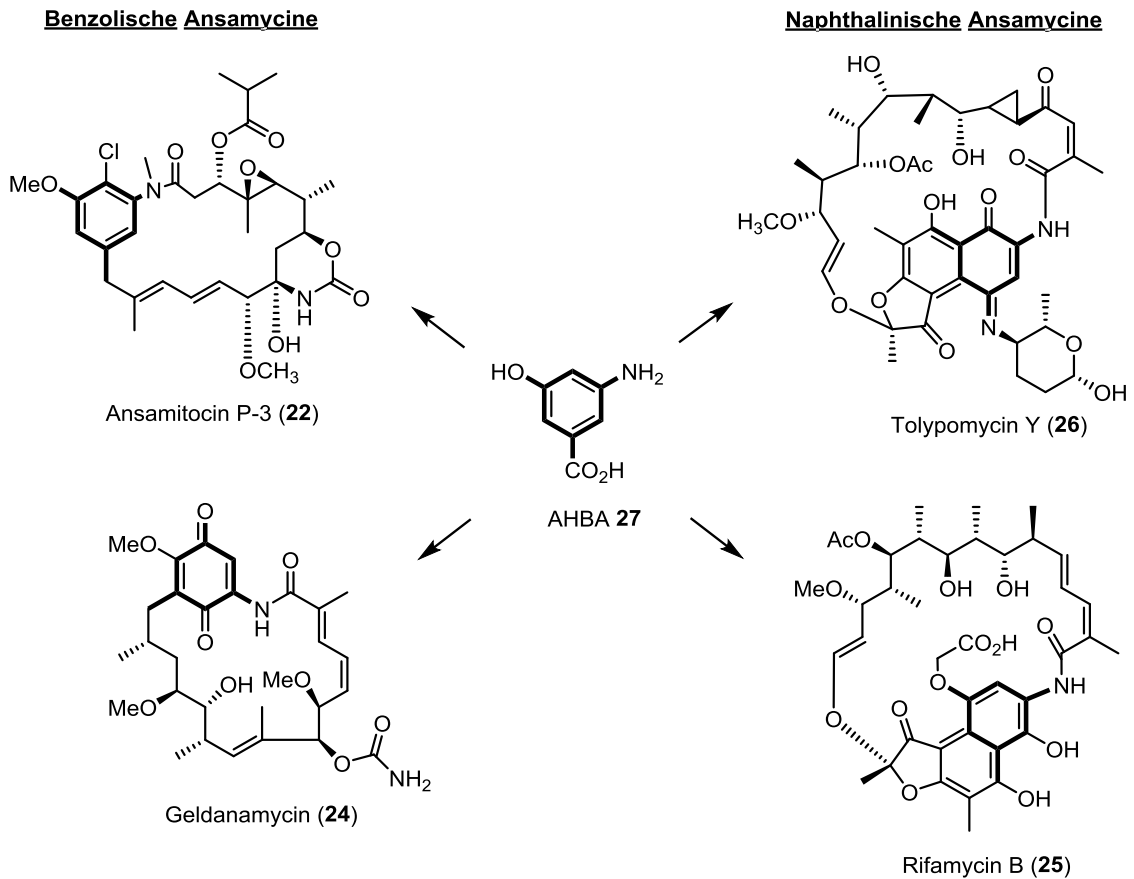
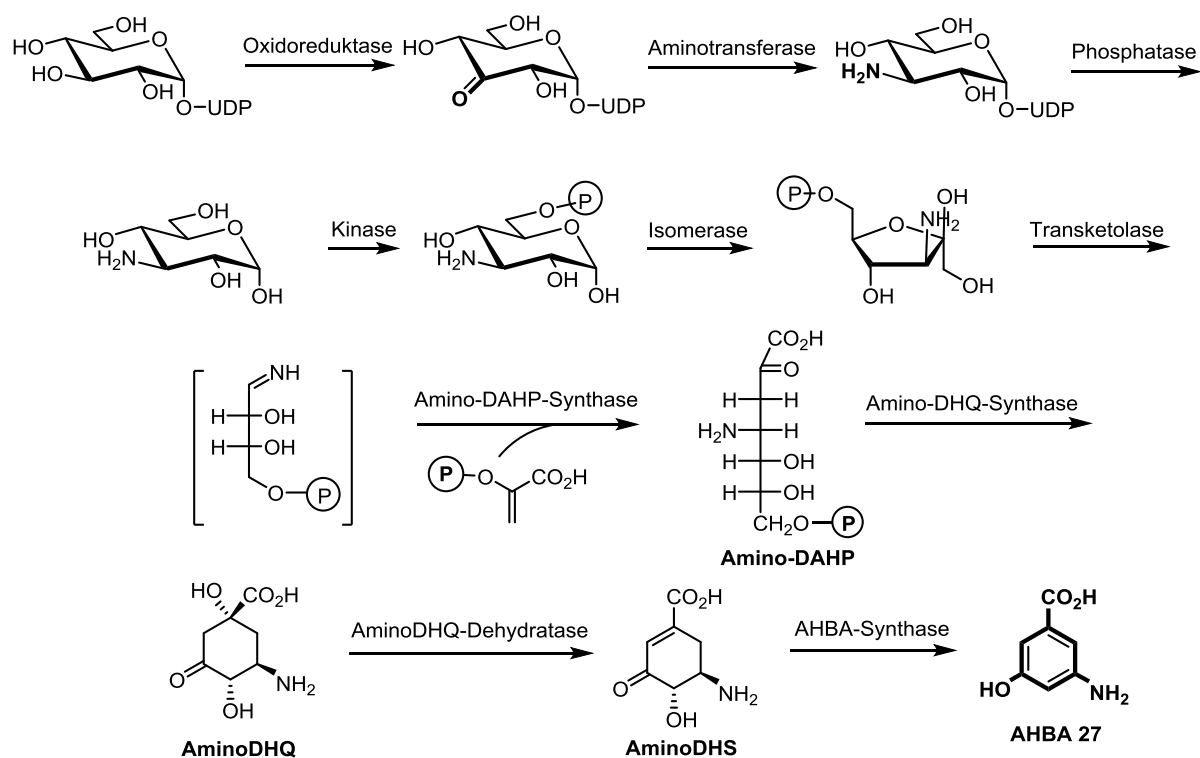


Abbildung 8: Ansamycine: Ansamitocin P-3 (**22**), Geldanamycin (**24**), Tolypomycin (**26**), Rifamycin B (**25**).

Der Grundbaustein für die Ansamycine ist eine mC_7N -Einheit - Aminohydroxybenzoesäure (AHBA) **27**, welche über einen Aminoshikimat-Biosyntheseweg aus UDP-Glukose aufgebaut wird. Die Biosynthese von AHBA **27** wurde von FLOSS *et al.* postuliert⁵⁰ und ist in Schema 4 ausführlich dargestellt.

⁵⁰ H. G. Floss, T. - W. Yu, K. Arakawa, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 35-44.



Schema 4: Postulierter Biosyntheseweg für die Bildung von AHBA 27.⁵⁰

(UDP: Uridindiphosphat, **Amino-DAHP**: 3,4-Didesoxy-4-amino-*D*-arabino-se-heptulonsäure-7-phosphat, **Amino-DHQ**: 5-Desoxy-5-amino-3-deshydrochinasäure, **Amino-DHS**: 5-Desoxy-5-amino-3-dehydro-shikimisäure).

Die Maytansinoide sind wegen ihrer hohen cytotoxischen Aktivität als potentielle medizinische Wirkstoffe von großem Interesse.^{13,51} Heutzutage konzentriert sich die Forschung auf die Fusion von Maytansinoiden mit Tumor-adressierenden Antikörpern oder anderen Tumorspezifischen Liganden,^{16,52} wodurch ein selektiver Transport in die Tumorzellen möglich ist und die toxischen Nebenwirkungen verringert werden können.^{13,51,53} Derzeit sind mehr als 120 verschiedene Ansamycine bekannt, die aus zahlreichen biologischen Quellen, wie z.B. aus Pflanzen, Samen, Moosen und Bakterien isoliert wurden.^{49,54}

⁵¹ a) W. Widdison, S. Wilhelm, E. Cavanagh, K. Whiteman, B. Leece, Y. Kovtun, V. Goldmacher, H. Xie, R. Stevens, R. Lutz, R. Zhao, L. Wang, W. Blättler, R. Chari, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392-4395.

⁵² F. Taft, K. Harmrolfs, I. Nicleleit, A. Heutling, M. Keine, N. Malek, F. Sasse, A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 880-886.

⁵³ 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.

⁵⁴ a) Y. Komoda, T. Kishi, *Anticancer Agents based on Natural Product Models* Academic Press, New York, **1980**, 353-389; b) J. M. Cassidy, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1-26; c) A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch, *C. R. Chimie* **2008**, 1523-1543.4345tz

2.7 Biosynthese von Ansamitocin P-3

Die Biosynthese von Ansamitocin P-3 (**22**) wurde von FLOSS *et al.* vollständig aufgeklärt.^{54,55}

Der Aufbau des Grundgerüsts von Ansamitocin P-3 (**22**) (Abbildung 9) erfolgt durch eine modulare Typ I Polyketidsynthase (PKS). Dabei handelt es sich um vier Multienzym-Komplexe (*asmA* – *asmD*), welche in Modulen organisiert vorliegen.⁵⁶ Jedes dieser Module ist für die Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts um zwei C-Atome verantwortlich und enthält zusätzlich bis zu drei Domänen für die Veränderung der funktionellen Gruppen durch Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) oder Enoylreduktase (ER).⁵⁷

Zu Beginn der Biosynthese von Ansamitocin P-3 (**22**) wird die Startereinheit AHBA **27** (Schema 4) mit Hilfe von sieben Genen (*asm22-24*, *asm43-45*, *asm47*) aus UDP-Glukose synthetisiert. Im nächsten Schritt wird AHBA **27** durch die Lade-Domäne an den Enzym-Komplex gebunden, aktiviert und auf das verwandte Acyl-Career-Protein (ACP) übertragen (Abbildung 9).

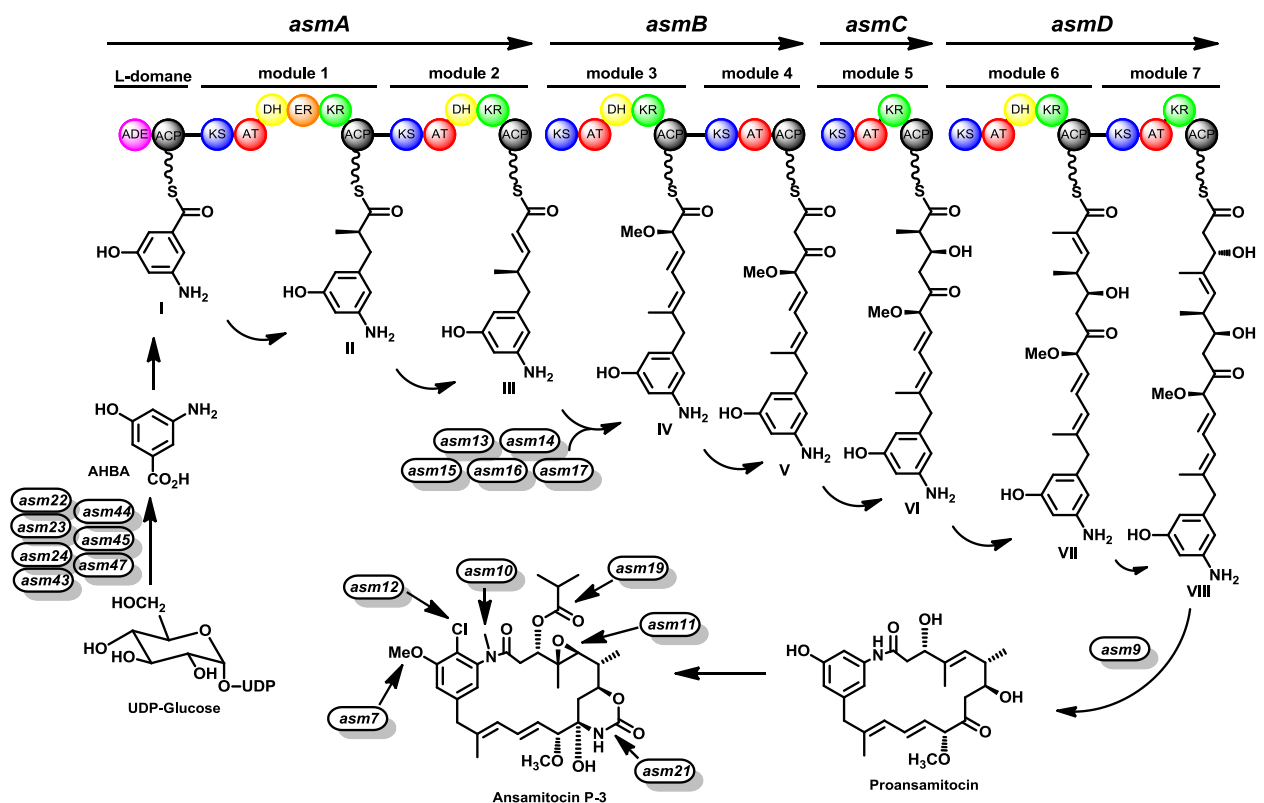


Abbildung 9: Biosynthese von Ansamitocin P-3 (**22**).

⁵⁵ T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 7968 – 7973.

⁵⁶a) C.-G. Kim, A. Kirschning, P. Bergon, P. Zhou, E. Su, B. Sauerbrei, S. Ning, Y. Ahn, M. Breuer, E. Leistner, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7486-7491; b) Y. A. Chana, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 90-114.

⁵⁷ Y. A. Chan, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 90-114.

Es folgen sieben Verlängerungsschritte, wobei drei Acetat-, drei Propionat-, sowie eine „Glucolat“-Einheit (Thioester aktiviertes Methoxy-Malonyl) verwendet werden, um das Oktaketid **VIII** (Abbildung 9) aufzubauen.⁵⁵ Dieses wird durch die Amidsynthase *asm9* vom Multienzym-Komplex abgespalten und zyklisiert. Als Zwischenprodukt wird Proansamitocin gebildet, welches nach sechs post-PKS-Transformationen, zu denen Chlorierung (*asm12*), Carbamoylierung (*asm21*), 20-*O*-Methylierung (*asm7*), Acylierung (*asm19*), Epoxidierung (*asm11*) und *N*-Methylierung (*asm10*) zählen, in das biologisch aktive Ansamitocin P-3 (**22**) umgewandelt wird.^{54,55} Die Reihenfolge der post-PKS-Modifizierungen wurde von FLOSS *et al.* durch Generierung zahlreicher Deletionsmutanten und deren Fütterungsstudien bestimmt.⁵⁸

Die Biosynthese von Ansamitocin P-3 (**22**) beinhaltet zwei interessante Besonderheiten. Zum einen findet auf der PKS (beim Übergang von Modul 2 zu Modul 3) die Doppelbindungswanderung durch eine vinyloge *syn*-Dehydratisierung statt, die durch KIRSCHNING *et al.* belegt wurde.⁵⁹ Zum anderen wird in Modul 3 eine ungewöhnliche „Glucolat“-Einheit in die wachsende Asamitocin-Kette eingebaut. Durch Fütterungsexperimente mit ¹³C- bzw. ¹⁴C-markierten Intermediaten wurde von FLOSS *et al.* der Ursprung der „Glucolat“-Verlängerungseinheit in Methoxymalonyl-ACP-Vorläufern belegt.⁶⁰

2.8 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in Ansamitocin P-3

Die Maytansinoide sind zytotoxisch. Diese Eigenschaft ist auf die Hemmung der Tubulin-Polymerisation zurückzuführen.⁶¹ Sie binden dabei an die β -Tubulinuntereinheit, was zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli und einer daraus resultierenden Hemmung der Mitose in der Metaphase führt.⁶² Die zytotoxische Wirkung der Maytansinoide basiert auf bestimmten charakteristischen Strukturmerkmalen, welche die biologische Aktivität der Ansamycine beeinflussen können. Die durchgeführten Studien⁵³ zu den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

⁵⁸ P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carrol, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236-14237.

⁵⁹ a) T. Kubota, M. Brünjes, T. Frenzel, J. Xu, A. Kirschning, H.G. Floss, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1221-1225;

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

⁶⁰ a) B. J. Carroll, J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T. -W. Yu, H. G. Floss *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177; b) Y. Kato, L. Bai, Q. Xue, W. P. Revill, T. -W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5268-5269; c) S. Wenzel, R. Williamson, C. Grünanger, J. Xu, K. Gerth, R. Martinez, S. Moss, B. Carroll, S. Grond, C. Unkefer, R. Müller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14325-14336.

⁶¹ a) S. Remillard, L. Rebhun, G. Howie, S. Kupchan, *Science*, **1975**, *189*, 1002-1005; b) E. Hamel, *Pharmacol. Therap.* **1992**, *55*, 31-51.

⁶² A. Kawai, H. Akimoto, Y. Kozai, K. Ootsu, S. Tanida, N. Hashimoto, H. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3441-3451.

(SAR, *engl.* structure-activity-relationship) haben gezeigt, dass die Anwesenheit von gewissen funktionellen Gruppen für die Antitumor-Aktivität der Maytansinoide entscheidend ist (Abbildung 10).

Es wurde festgestellt, dass nur zwei Gruppen einen ausschlaggebenden Einfluss auf die biologische Aktivität haben. Dabei handelt es sich um die Ester-Seitenkette an C-3 und das Carbinol-Amid. So weisen z.B. die Maytansinoide mit einer Hydroxyfunktion an C-3 gegenüber vergleichbaren Ester-Derivaten eine wesentlich geringere zytotoxische Aktivität auf.⁶³ Ebenso führt ein Wechsel der Stereokonfiguration an C-3 zu einem Verlust der Aktivität.⁶⁴

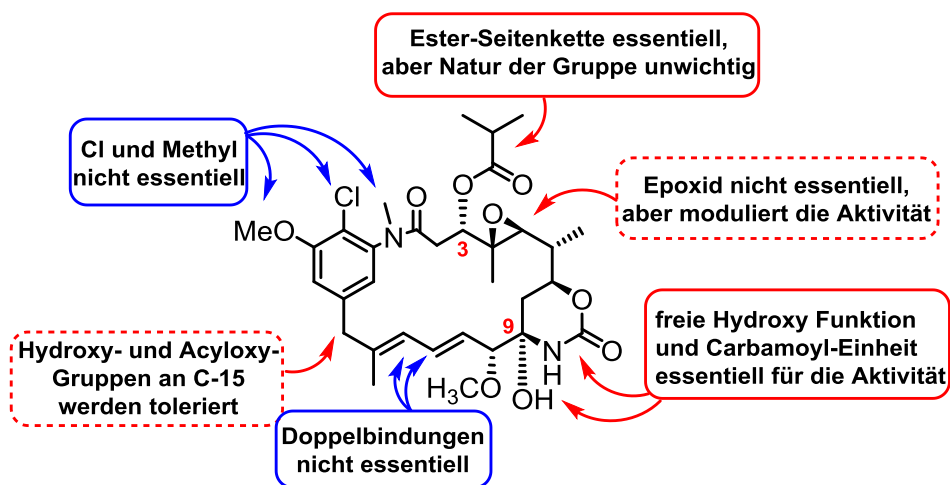


Abbildung 10: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Ansamitocin P-3 (22).

Das Carbinol-Amid ist für die Antitumor-Aktivität essentiell, aber nur als cyclische Einheit an C-9. Durch semisynthetische Studien von KIRSCHNING *et al.* wurden die Carba-Analoga synthetisiert und auf mehrere Krebszelllinien getestet. Es stellte sich heraus, dass der Austausch von *N*- zu *C*- an der Knüpfstelle C-9 nicht zum Aktivitätsverlust der Ansamitocin-Derivate führt.⁶⁵

Das Epoxid an C-4,5 ist nicht erforderlich, wirkt aber modulierend auf die Aktivität. Dagegen sind sowohl die Substituenten am Aromaten und die Methylgruppe am Lactam-Stickstoff, als auch die Stereokonfiguration an C-10 und die Doppelbindungen für die Cytotoxizität nicht relevant. Hydroxy- und Acyloxy-Gruppen an C-15 werden toleriert, haben aber keinen Einfluss auf die biologische Aktivität.

⁶³ S. Kupchan, Y. Komoda, A. Branfman, R. Daily, V. Zimmerly, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1578-1579.

⁶⁴ H. Akimoto, A. Kawai, N. Hashimoto, H. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 2565.

⁶⁵ a) S. Eichner, T. Knobloch, H. G. Floss, J. Fohrer, K. Harmrolfs, J. Hermane, A. Schulz, F. Sasse, P. Spittler, F. Taft, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 752-757; b) F. Taft, S. Eichner, T. Knobloch, K. Harmrolfs, J. Hermane, A. Kirschning, *Synlett* **2012**, 23, 1416-1426.

Allerdings konnten die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgrund der Komplexität der Struktur bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

2.9 Mutasyntese

Seit langem zählen Naturstoffe zu den wichtigsten Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Häufig handelt es sich um sehr komplexe Substanzen, die auf synthetischen Wegen nur unter großem Aufwand oder gar nicht herzustellen sind. Die Modifizierung von natürlichen Substraten zur Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften gewinnt zunehmend an Bedeutung, wobei besonders die Größe der Naturstoffe und die Anordnung von einzelnen Molekülgruppen für die Synthesechemiker im Labor eine Herausforderung darstellt.⁶⁶ Um solche Verbindungen als Wirkstoffe einsetzen zu können, werden sie oft aus bakteriellen Produzenten gewonnen (Schema 5, Fall I). Für die gezielte Modifizierung von Sekundärmetaboliten eignet sich die Vorläufer-dirigierte Biosynthese (*engl. precursor-directed biosynthesis*, PDB). Bei dieser Methode wird durch die Supplementierung von modifizierten Biosynthese-Vorläufern die Bildung von Derivaten des natürlichen Metaboliten erreicht. Allerdings führt die Anwesenheit des natürlichen Substrates neben der zugeführten Startereinheit zu einer Konkurrenzreaktion, die als Folge aufwendige Trennverfahren und zu geringe Ausbeuten des gewünschten Naturstoffderivates hat (Schema 5, Fall II).⁶⁷

Als eine gute Alternative zur PDB erweist sich die Mutasyntese (Schema 5, Fall III). Dabei wird ein genetisch manipulierter Mikroorganismus verwendet, bei dem gezielt einer der wichtigen Schritte der Biosynthese blockiert ist (Im Schema 5, Fall III, der erste Schritt der Biosynthese ist blockiert dargestellt). Da die modifizierten Vorläufer, die sogenannten Mutasyntone, bei den Komplementierungsexperimenten nicht mit dem natürlichen Substrat konkurrieren müssen, wird im Falle der Akzeptanz ausschließlich das gewünschte Derivat des Naturstoffes produziert.^{68, 69}

⁶⁶ a) J. Clardy, C. Walsh, *Nature* **2004**, *432*, 829-837; b) K. J. Weismann, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 139-142.

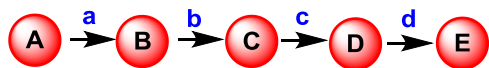
⁶⁷ R. Thiericke, R. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265-289.

⁶⁸ a) S. Weist, R. D. Süßmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141-150.

⁶⁹ A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3259.

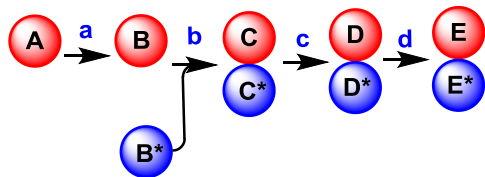
I. Biosynthese von Naturstoffen

Wildtyp-Organismus



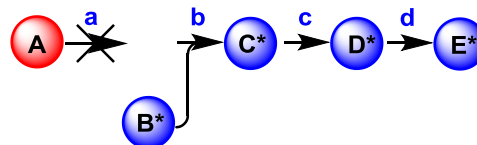
II. Vorläufer-dirigierte Biosynthese (PDB)

Wildtyp-Organismus



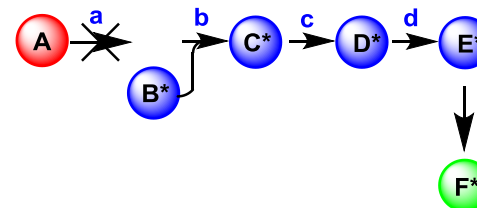
III. Mutasynthese

genetisch manipulierter Organismus



IV. Kombination aus Semisynthese und Mutasynthese

genetisch manipulierter Organismus



Schema 5: Methodische Konzepte zur Darstellung von Naturstoffen und deren Derivaten (a-d = Enzyme, A = Initiationsbaustein, B-D = Biosynthese-Intermediate, B*-D* = modifizierte Biosynthese-Intermediate, E = Naturstoff, E*-F* = Naturstoffderivate).

Somit erlaubt die Mutasynthese mit wenig Aufwand nicht nur die Verbesserung der Produktausbeute, sondern auch einen Zugang zu pharmakologisch interessanten Verbindungen, deren Herstellung auf dem Weg der chemischen Synthese als unmöglich erscheint.

Bekannte Beispiele der erfolgreichen Darstellung von Naturstoffderivaten *via* Mutasynthese sind die Rapamycin- und Ansamitocin-Analoga.^{70,71}

Als eine methodische Erweiterung der Mutasynthese zur Darstellung von modifizierten Naturstoffen kann die Semisynthese in Betracht gezogen werden (Schema 5, Fall IV). Die durch Mutasynthese eingeführten, interessanten funktionellen Gruppen werden durch chemische Synthese so eingesetzt, dass neue Naturstoffanaloga entstehen, die später Einsatz in der Anwendung finden.⁵²

⁷⁰ a) T. Knobloch, G. Dräger, W. Collisi, F. Sasse, A. Kirschning, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 861–869;

c) T. Knobloch, K. Harmrolfs, F. Taft, B. Thomaszewski, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 540-547.

⁷¹ a) M. A. Gregory, H. Petkovic, R. E. Lill, S. J. Moss, B. Wilkinson, S. Gaisser, P. F. Leadlay, R. M. Sheridan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4835-4838; b) R. J. M. Goss, S. Lanceron, A. D. Roy, S. Sprague, M. Nur-e-Alam, D. L. Hughes, B. Wilkinson, S. J. Moss, *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 698-702.

3 ZIELSETZUNG

Mit der Entwicklung der zielgerichteten Krebstherapie fokussiert sich das Interesse der Forschung erneut auf Klassen hochzytotoxischer Wirkstoffe, zu denen auch die Ansamitocine gehören. Es ist das Ziel, durch Anbindung z. B. an monoklonale Antikörper oder magnetische Nanopartikel, die Selektivität der Naturstoffe zu steigern und deren Nebenwirkungen zu reduzieren.

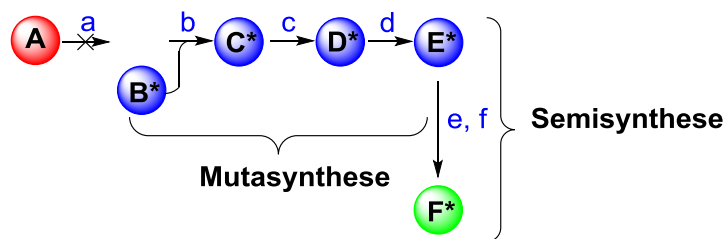
Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Darstellung von neuen Konjugaten auf Ansamitocin-Basis. Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die neuen Ansamitocin-Derivate mittels Muta- und Semisynthese generiert werden. Diese sollen durch Fermentation mit dem genetisch manipulierten Ansamitocin-Produzent *Actinosynnema pretiosum* HGF073 realisiert werden. Bei diesem Bakterienstamm handelt es sich um eine Blockmutante, bei der gezielt der Schlüsselschritt – die Bildung des Startbausteins AHBA **27** deaktiviert wurde, so dass es möglich ist, Komplementierungsexperimente durchzuführen, ohne die konkurrierende Biosynthese des natürlichen Substrates zu beobachten. Anschließend sollen die Ansamitocine durch chemische Derivatisierungen modifiziert werden, um einen gezielten Transport zum Tumorgewebe zu ermöglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen die bereits erzeugten Konjugate an magnetische Nanopartikel gebunden werden, um einen selektiven Wirkstofftransport zu entwickeln.

3.1 Muta- und Semisynthese von Ansamitocinen

Zunächst soll das Konzept der Mutasynthese zur Darstellung von Ansamitocin-Derivaten verwendet werden. Es ist eine der modernen Möglichkeiten, zu neuartigen Naturstoffen zu gelangen. Das Verfahren umfasst die Darstellung von geeigneten modifizierten Biosynthesevorläufern (**B***) und anschließender Fermentation mit genetisch manipulierten Mikroorganismen, bei denen einer der wichtigen Schritte der Biosynthese blockiert ist (Schema 6). Durch die externe Zufuhr von modifizierten Startereinheiten wird der Zugang zu neuen Naturstoffderivaten (**E***) ermöglicht.

Die durch Mutasynthese erzeugten Ansamitocine (**E***) sollen mittels gezielter chemischer Veränderungen in neue Konjugate (**F***) überführt werden, um diese anschließend für den selektiven Transport zum Tumorgewebe nutzen zu können (Schema 6).



Schema 6: Schematische Darstellung vom Konzept der kombinierten Muta- und Semisynthese mit der AHBA-(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen unterschiedliche Verknüpfungsstellen zur Erzeugung von neuen Konjugaten untersucht werden (Abbildung 11).

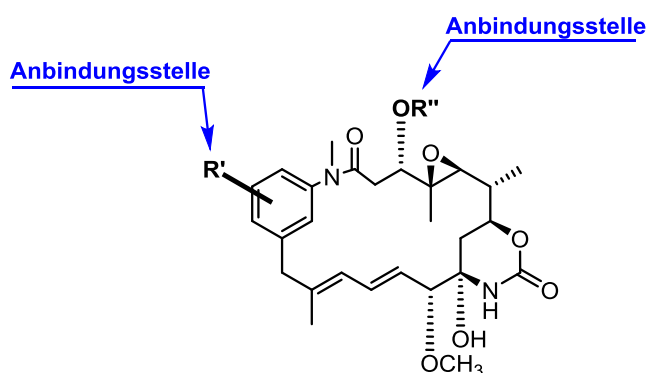
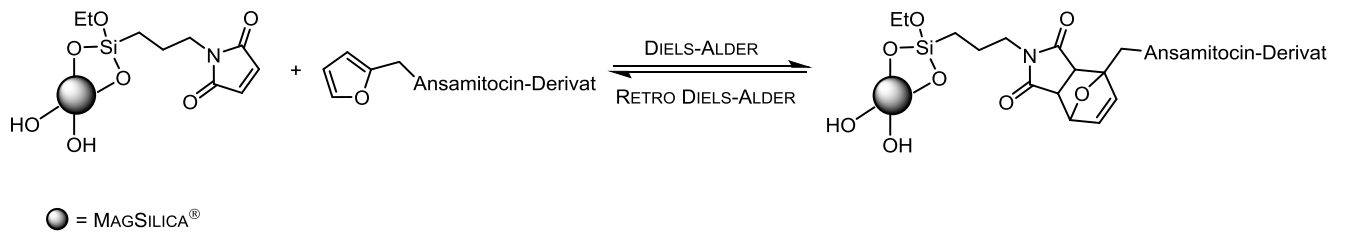


Abbildung 11: Mögliche Verknüpfungsstellen zur Erzeugung neuer Konjugaten.

Die ungewöhnlichen durch Muta- und Semisynthese erzeugten Ansamitocin-Derivate sollen auch zur Vertiefung der bereits vorhandenen Kenntnisse in den Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, sowie zu den Studien der PKS-Maschinerie beitragen.

3.2 Wirkstofftransport über magnetische Nanopartikel

In diesem Teil der Arbeit soll das Konzept für den Wirkstofftransport mittels MAGSILICA[®]-Nanopartikel und die selektive Abspaltung am Wirkort erarbeitet werden. Die dafür benötigten Ansamitocin-Derivate sollen mit einer Furfurylgruppe ausgestattet werden, damit die thermisch induzierte DIELS-ALDER- beziehungsweise RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen stattfinden können (Schema 7).



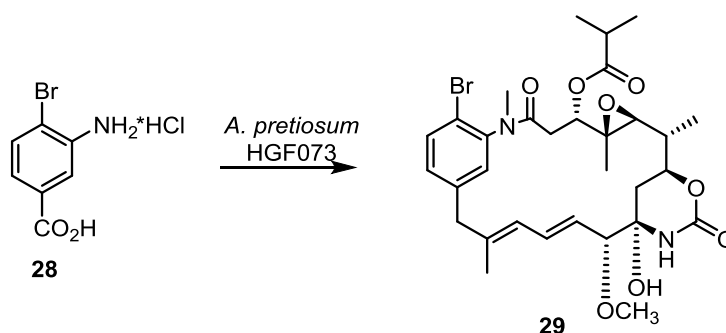
Schema 7: Darstellung vom möglichen *magnetic-drug-release-System*.

4 BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1 Mutasynthese von Ansamitocin-Derivaten

4.1.1 Vorarbeiten

Zahlreiche mutasynthetische Studien zur Erzeugung von neuen Ansamitocin-Derivaten mit Hilfe von *A. pretiosum* HGF073 wurden bereits in mehreren Arbeiten der Gruppe KIRSCHNING durchgeführt.^{72,73,74} Eine der erfolgreichsten Mutasynthesen wurde von FLORIAN TAFT etabliert und ist in Schema 8 dargestellt.



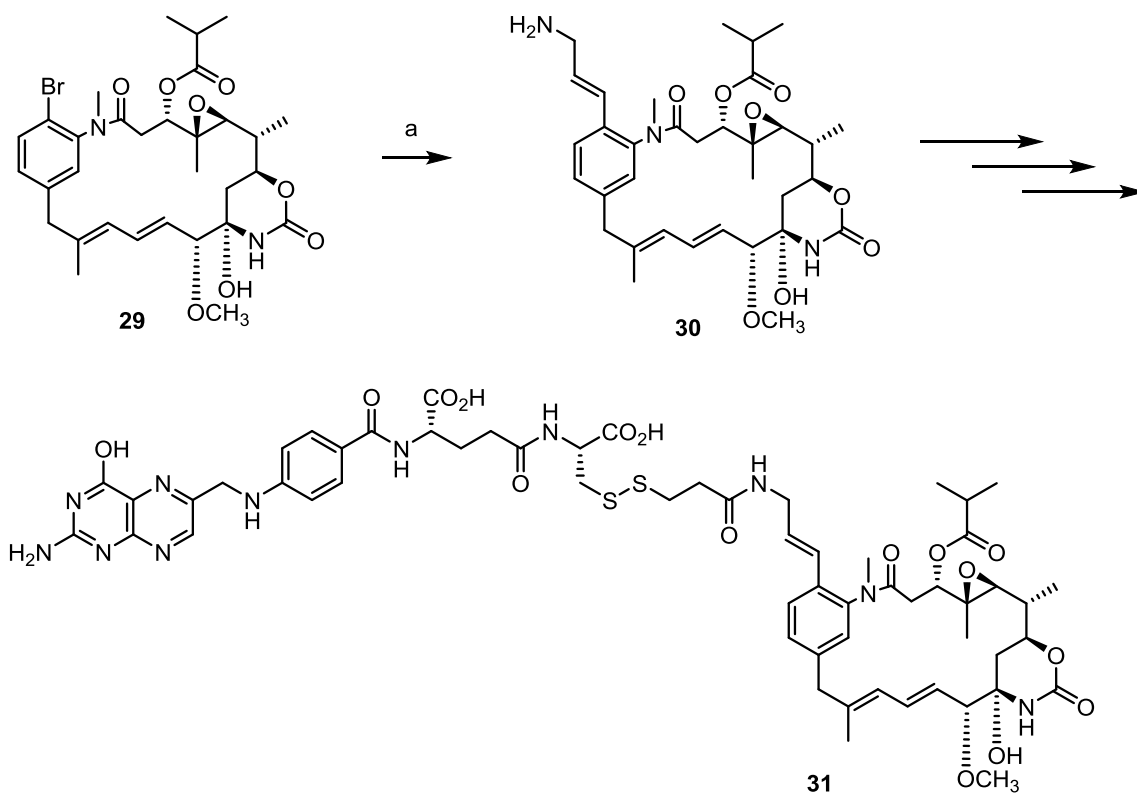
Schema 8: Mutasynthese mit 3-Amino-4-brombenzoesäurehydrochlorid (**28**).

Die bromierten Naturstoffderivate eignen sich insbesondere für die semisynthetische Derivatisierung unter milden Bedingungen, wie z. B. in der Palladium-katalysierten STILLE-Kreuzkupplung in der Synthese von Folatkonjugaten aus Ansamitocinen (Schema 9).⁵³

⁷² F. Taft, Dissertation, *Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum / Synthese Tumorgerichteter Ansamitocin-Derivate*, Universität Hannover, Hannover **2009**.

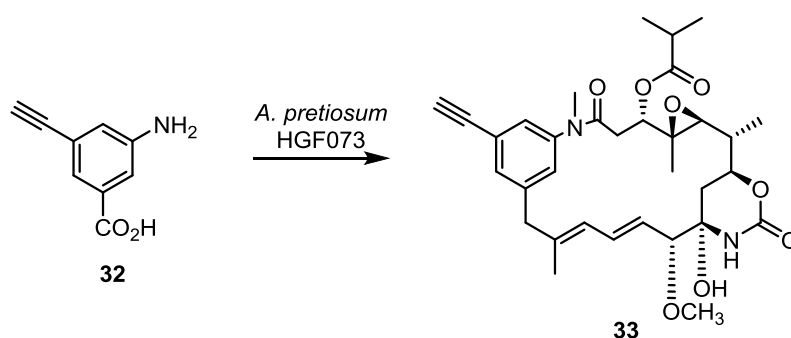
⁷³ T. Knobloch, Dissertation, *Studien zur Flexibilität der Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2010**.

⁷⁴ K. R. Harmrolfs, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Synthesewege zu neuen Ansamitocin-Derivaten*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2010**.



Schema 9: Semisynthetische Darstellung des Folatkonjugates **31**. Bedingungen: a) i. $(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{SnBu}_3$, $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Toluol, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 20 h; ii. KF_{aq} , 95 %.

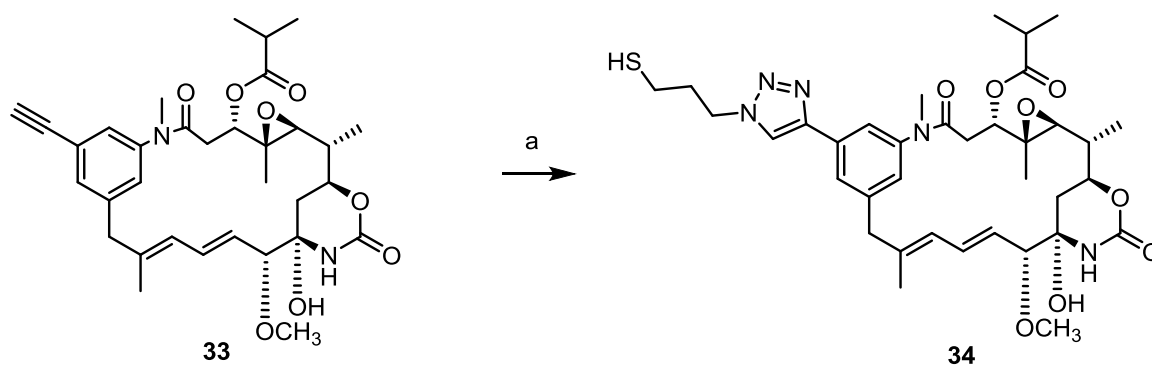
Die zweite erfolgreiche Variante der Mutasythese für die semisynthetischen Modifizierungen an Ansamitocin-Derivaten wurde von KIRSTEN HARMROLFS entwickelt (Schema 10).⁷⁴



Schema 10: Mutasynthetische Darstellung des Alkinansamitocins **33**.

Die Alkin-modifizierten Ansamitocine können anschließend in Semisynthesen, wie z. B. kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC) eingesetzt werden, um weitere modifizierte Derivate zu erzielen (Schema 11). CuAAC eignet sich insbesondere für die semisynthetische Derivatisierung, da die Reaktion unter milden Bedingungen und mit hohen

Selektivitäten verläuft. Außerdem zeigte die ausgewählte Methode viele Vorteile,⁷⁵ unter anderem die Toleranz von reaktiven Gruppen, sodass Schutzgruppen an den Resten der beteiligten Azid- und Alkin Komponenten oft nicht notwendig waren. Des Weiteren sollten die neugebildeten 1,2,3-Triazole wasserlöslicher werden, da ihr Polaritätsprofil und die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, einer nativen Amidbindung ähnlich ist.^{36,76}



Schema 11: HUISGEN Cycloaddition von Alkinansamitocin-Derivat **33**. Bedingungen: a) $\text{SH}(\text{CH}_2)_3\text{N}_3\text{CuBr}\cdot\text{SMe}$, *t*-BuOH/THF/ H_2O , RT, 40 h, 53 %.

Die Verknüpfung des Thiolinkers mittels CuAAC unter sehr milden Bedingungen wurde als eine elegante und effektive Methode zu neuen Konjugaten aus Ansamitocinen betrachtet.

Auf Grund dieser positiven Ergebnisse wurden auch die Mutasyntone **35-38** in der Mutasyntese mit *A. pretiosum* HGF073 eingesetzt (Abbildung 12). Allerdings erwiesen sich die AHBA-Analoga **35** und **36** für die semisynthetische Nutzung als nicht geeignet. Obwohl diese Startereinheiten von der *A. pretiosum* HGF073 akzeptiert wurden, konnten die erhaltenen Ansamitocin-Derivate nur unter großem Aufwand chromatographisch gereinigt werden. Des Weiteren war die Ausbeute zu niedrig, um die isolierten Naturstoffderivate für weitere semisynthetische Derivatisierungen einsetzen zu können.

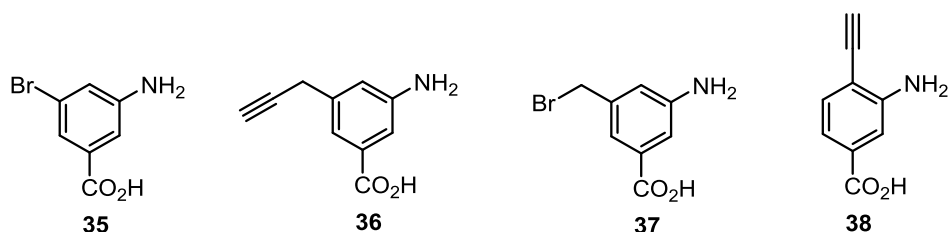


Abbildung 12: Bereits getestete 3-Aminobenzoensäuren.

⁷⁵ J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem.Soc.Rev.* **2010**, 39, 1302-1315.

⁷⁶ a) W. Stadlbauer, W. Fiala, M. Fischer, G. Hojas *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, 37, 1253-1256; c) S. Darvesh, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 4586-4599.

Die beiden modifizierten AHBA-Analoga **37** und **38**⁷⁷ wurden nicht zu neuen Ansamitocin-Derivaten prozessiert.

4.1.2 Synthese der neuen Mutasythone

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Synthesen der modifizierten 3-Aminobenzoessäuren zur Nutzung als Biosynthese-Vorläufer ausführlich beschrieben. Die neuen Mutasythone sollen weiterhin für Fermentationsexperimente mit *A. pretiosum* für die mutasythetische Darstellung neuer Ansamitocin-Derivate verwendet werden. Neben den 3-Aminobenzoessäuren wurden auch Bisazidobenzoessäuren synthetisiert. Auf die Besonderheiten von diesen Mutasythonen wird in Kapitel 4.1.3 näher eingegangen.

Basierend auf den ersten Supplementierungsexperimenten mit Bromid- und Alkinhaltigen Startereinheiten, wurden Azido-AHBA-Analoga für die mutasythetische Darstellung von Ansamitocin-Derivaten entwickelt (Abbildung 13). Es wurden nur 3,4- und 3,5-disubstituierte Aminobenzoessäuren synthetisiert, da die Mutasythone mit der AHBA(-)-Blockmutane *A. pretiosum* HGF073 in der Akzeptanz der zugefütterten Startereinheiten begrenzt ist.

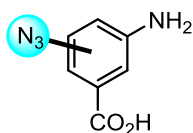


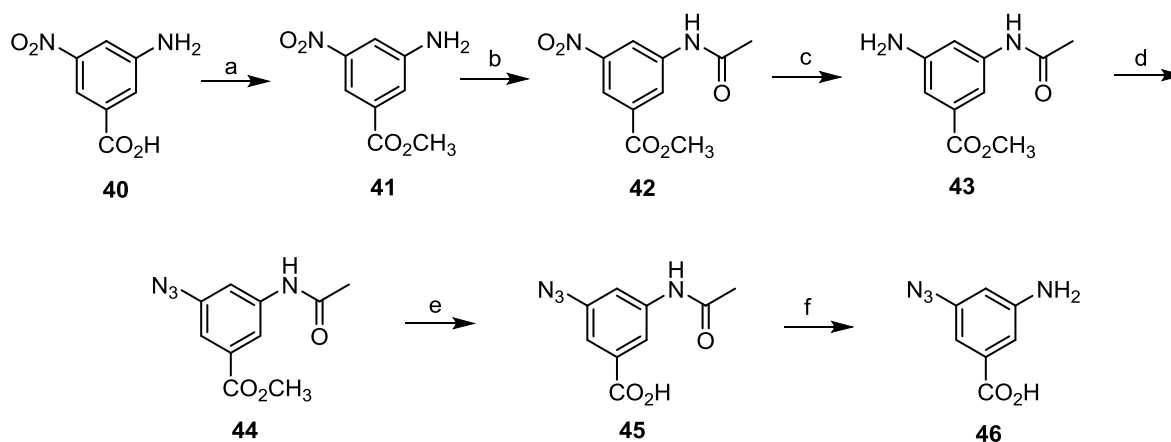
Abbildung 13: Azidobenzoessäuren für die Mutasythone.

Die Synthese von 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**) wurde bereits in einer früheren Arbeit untersucht.⁷⁷ Hierbei konnten die Verbindungen der letzten Stufen **44-46** in geringen Ausbeuten erhalten werden (Schema 12). In dieser Arbeit wurde die Syntheseroute modifiziert und optimiert. Die Darstellung von 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**) startete mit der kommerziell erhältlichen Aminobenzoessäure **40**. Zunächst wurde Aminosäure **40** verestert und dann in Acetamid **42** überführt. Anschließend erfolgte die Reduktion der Nitrogruppe, wobei Arylamin **43** in einer Ausbeute von 88 % erhalten wurde. Die nachfolgende Diazotierung⁷⁸ lieferte Azid **44**, welches durch die Hydrolyse bei 50 °C unter basischen Bedingungen in 5-Azidobenzoessäure **45** überführt werden konnte. Letztlich wurde die

⁷⁷ L. Mancuso, Diplomarbeit, *Mutasythone von Tumor-adressierenden Ansamitocinen*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, **2010**.

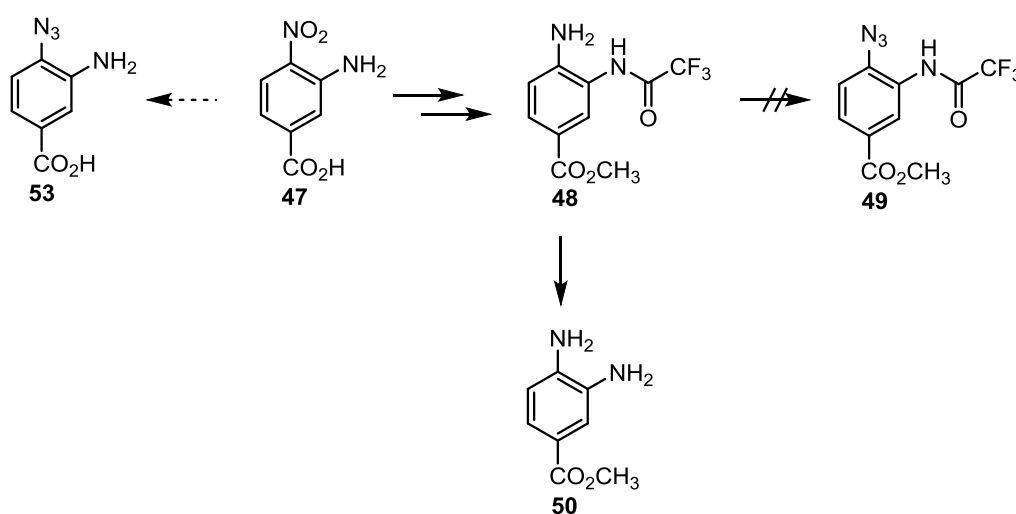
⁷⁸ H. Lamotte, F. Degeilh, P. Neau, P. Ripoché, B. Rousseau, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1994**, *3*, 289-295.

Acetylschutzgruppe mit Hilfe von konzentrierter Salzsäure abgespalten, wodurch das Mutasynton **46** in einer Ausbeute von 85 % gebildet wurde.



Schema 12: Synthese von 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**). Bedingungen: a) AcCl, MeOH, Δ , 48 h, quant.; b) Ac₂O, Pyridin, 1,4-Dioxan, RT, 12 h, quant.; c) SnCl₂·2H₂O, EtOH, 70 °C, 6 h, 88 %; d) HCl (2 M), NaNO₂, NaN₃, H₂O, -3 bis -7 °C, 12 h, 71 %; e) LiOH (1M), MeOH, 50 °C, 12 h, 97 %; f) HCl_(konz.), H₂O, 120 °C, 12 h, 85 %.

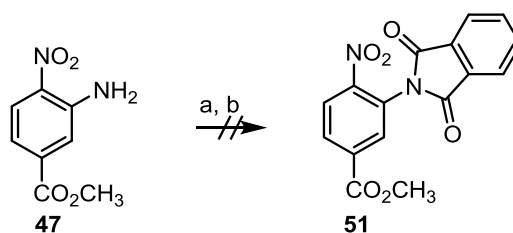
Des Weiteren sollte 4-Amino-3-azidobenzoessäure (**53**) dargestellt werden. Die ersten Syntheseschritte wurden bereits in früheren Arbeiten⁷⁷ getestet (Schema 13). Diese umfassten die Veresterung von Benzoessäure **47**, Anilinschutzung mit Trifluoroacetat zum Methylester **48**, Reduktion der Nitrogruppe und anschließende Diazotierung zum Azid **49**. Die Azidbildung unter saueren Bedingungen scheiterte und führte nur zu dem 3,4-Diamin **50**.



Schema 13: Versuchte Synthese des Arylazides **53**.

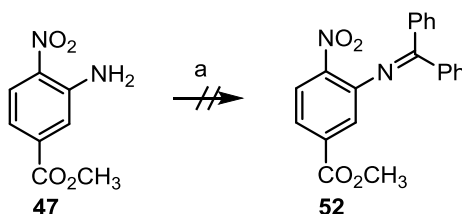
In dieser Arbeit sollten neue Schutzgruppen der Anilinfunktion in Betracht gezogen werden, um das Zielazid erfolgreich herzustellen. Die neue Schutzgruppe sollte eine gewisse Größe aufweisen, das Anilin binden, aber gleichzeitig einfach zum Entfernen sein.

Zuerst wurde Phthalsäureanhydrid als Schutzgruppe getestet (Schema 14). Diese Umsetzung führte allerdings nicht zum Methylester **51**, sondern führte bei hohen Temperaturen teilweise zur Zersetzung des Anilins **47**.



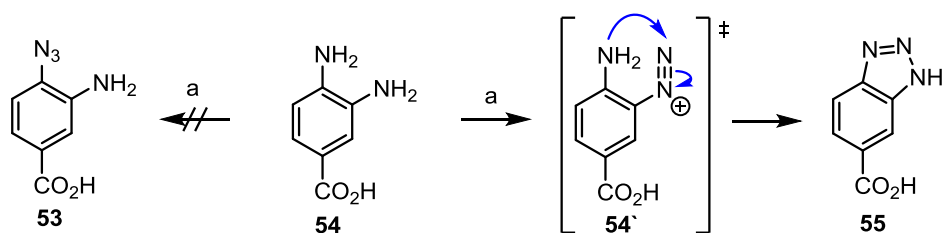
Schema 14: Versuchte Schützung des Anilins **47**. Bedingungen: a) Phthalsäureanhydrid, Essigsäure, Δ , 10 h; b) Phthalsäureanhydrid, 235 °C.

Eine andere Strategie basierte auf der Schützung des Anilins **47** als Schiff'sche Base **52** (Schema 15). Diese Umsetzung lieferte ebenfalls nicht das gewünschte Substrat **52**. Wahrscheinlich ist die Aminogruppe in **47** nicht nukleophil genug wegen Elektronenarmuts des Aromaten (anwesende Nitrogruppe und Methylester), so dass die Bildung des Imins nicht stattfindet.



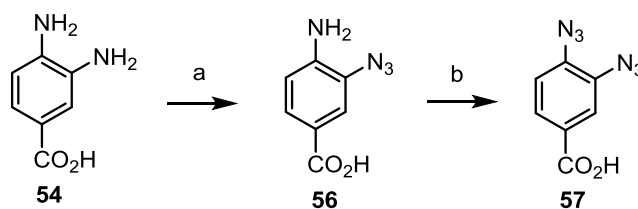
Schema 15: Versuchte Schützung des Anilins **47**. Bedingungen: a) Benzophenonimin, CH_2Cl_2 , 48 h, 30 °C.

Daraufhin wurde neue Syntheseroute ausgehend von einem anderen Edukt geplant (Schema 16). Als Ausgangsverbindung diente kommerziell erhältliche 3,4-Diaminobenzoesäure (**54**), die direkt diazotiert werden sollte. Obwohl vollständiger Umsatz beobachtet wurde, konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden. Mit Hilfe der analytischen Daten konnte das erhaltene Produkt als Triazol **55** (Schema 16) identifiziert werden. Es wurde postuliert, dass Triazolbildung eine unerwünschte Nebenreaktion bei der Diazotierung von *ortho*-Diaminen ist. Dabei wird zunächst ein Diazoniumkation **54**⁺ erzeugt, welches anschließend intramolekular mit der Aminogruppe zum Triazol zyklisiert (Schema 16).



Schema 16: Versuchte Darstellung von Mutasynton **53**. Bedingungen: a) $\text{HCl}_{(\text{aq.})}$ (2M), NaNO_2 , NaN_3 , H_2O , -3 bis -7 °C, 12 h.

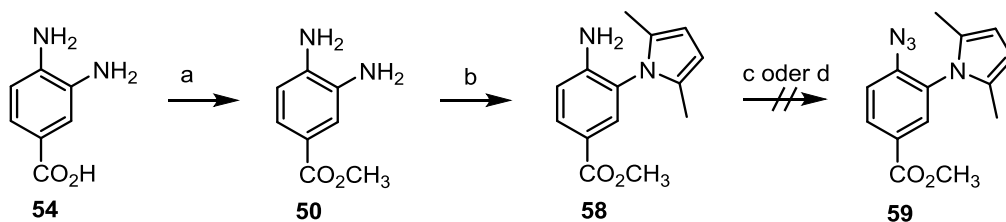
Des Weiteren wurden mildere Reaktionsbedingungen⁷⁹ für den Diazotransfer getestet. Dafür wurde zunächst 3,4-Diamin **54** mit frisch hergestelltem Triflylazid umgesetzt (Schema 17). Es stellte sich heraus, dass nur die Aminogruppe in *meta*-Position zur Säure bei der Reaktion involviert war und somit zur Bildung von aromatischem Azid **56** beitrug. Der zweite Diazotransfer unter gleichen Bedingungen scheiterte. Allerdings konnte unter Verwendung von härteren Reaktionsbedingungen Anilin **56** in das Bisazid **57** in guter Ausbeute überführt werden.



Schema 17: Synthese der Arylaziden **56** und **57**. Bedingungen: a) Triflylazid, CuSO_4 , Et_3N , MeOH , CH_2Cl_2 , RT, 2 h, 56 %; b) $\text{HCl}_{(\text{aq.})}$ (2M), NaNO_2 , NaN_3 , H_2O , -3 bis -7 °C, 12 h, 79 %.

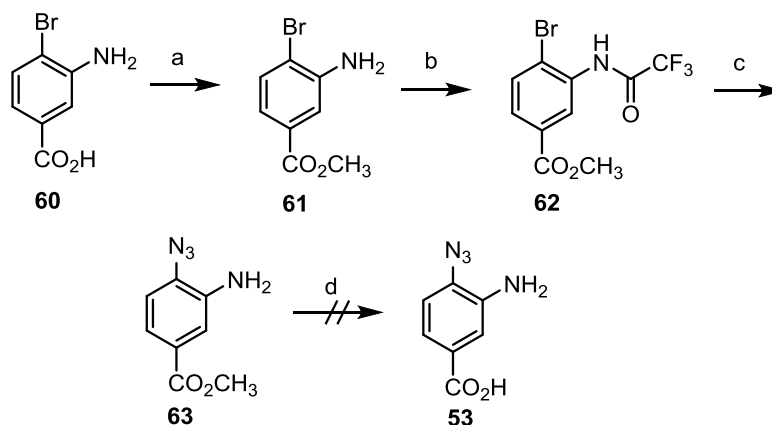
Nachdem die in Schema 17 dargestellten Syntheseschritte zu Anilin **53** ebenfalls nicht erfolgreich waren, wurde eine neue Syntheseroute ausgehend von der kommerziell erhältlichen Diaminobenzoessäure **54** aufgestellt (Schema 18). Da die Aminogruppe in *meta*-Position zur Säure aktiviert ist, wurde versucht, diese als Dimethylpyrrol zu schützen, um anschließend die Diazotierung in der Position C-4 durchzuführen. Nach der erfolgreichen Schützung, scheiterten alle unternommenen Versuche zur Diazotierung von **58**, so dass eine alternative Strategie zur Synthese von 3-Amino-4-Azidobenzoessäure (**53**) entwickelt wurde.

⁷⁹ Q. Liu, Y. Tor, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2571-2572.



Schema 18: Synthese von Azid **59**. Bedingungen: a) H_2SO_4 , CH_3OH , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 79 %; b) AcOH , 2,5-Hexandion, Toluol, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h, 45 %; c) NaNO_2 , NaN_3 , $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (2M), $-5\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 24 h; d) Triflylazid, CuSO_4 , Et_3N , CH_3OH , CH_2Cl_2 , RT.

Der neue Ansatz startete mit 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**), welche nach der erfolgreichen Veresterung und Schützung der Aminofunktion in **61** mit Trifluoacetat Methylester **62** lieferte (Schema 19). Der Bromaromat **62** wurde anschließend in der Kupferkatalysierten ULLMANN-Kupplung mit NaN_3 unter Einfluss von Mikrowellenstrahlung zu Azid **63** umgesetzt.⁸⁰ Bei der Durchführung dieser Kupplung wurde die Schutzgruppe des Amins entfernt, so dass als einziger Schritt die Verseifung der Verbindung **63** bevorstand. Alle durchgeführten Reaktionen führten zur Zersetzung des Produktes, obwohl bei der Verseifung eine milde Methode mit LiOH (1M) verwendet wurde. Daher wurde eine Acetat-Schutzgruppe für das Amin gewählt, die bei den basischen Bedingungen der Kupplung erhalten bleiben und außerdem leicht entfernbar sein sollte.



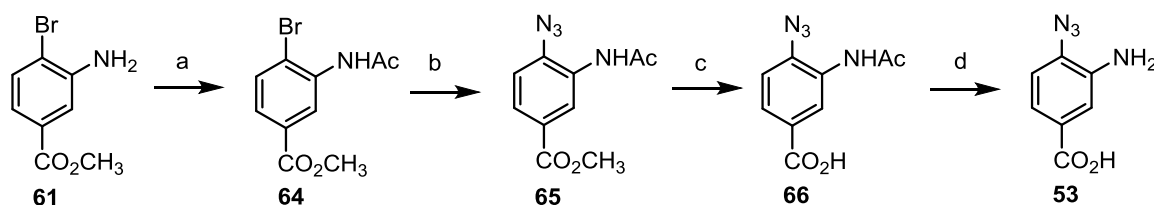
Schema 19: Synthese von der 3-Amino-4-azidobenzoensäure (**53**). Bedingungen: a) CH_3COCl , MeOH , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 18 h, quant.; b) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, Et_3N , CH_2Cl_2 , RT, 19 h, 85 %; c) NaN_3 , CuI , Na-Ascorbat, TMEDA, $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O} = 7:1$, MW, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 30 Min, 60 %; d) LiOH (1M), MeOH , RT $\rightarrow 30\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h.

Der neue Ansatz startete mit der Schützung von Anilin **61** mit Acetanhydrid zu Methylester **64** (Schema 20), welcher in quantitativer Ausbeute erhalten wurde. Das Bromid

⁸⁰ a) W. Zhu, D. Ma, *Chem. Commun.* **2004**, 888-889; b) J. Andersen, U. Madsen, F. Björkling, X. Liang, *Synlett* **2005**, 2209-2213.

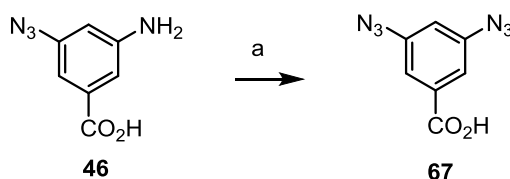
wurde anschließend im Mikrowellenfeld zu Kupplung geführt und in geringer Ausbeute von 29 % wurde Azid **65** erhalten. Da diese Reaktion in nur sehr geringer Ausbeute gelang, wurden die Bedingungen optimiert. Hierfür wurden unterschiedliche Bedingungen erprobt. Das Variieren der Zeit, der Zusätze, des Lösungsmittels und der Temperatur lieferten Ausbeuten allesamt in einem Bereich von 10–30 %. Die beste Ausbeute wurde in einem Ethanol-Wasser-Gemisch mit Natriumascorbat als Zusatz erreicht. Dabei wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 100 °C in der Mikrowelle erhitzt. Die Synthese von Azid **53** im *batch*-Verfahren scheiterte, so dass keine weiteren Versuche zur Optimierung dieser Reaktion unternommen wurden.

Die Verseifung von Methylester **65** mit LiOH (1M) gelang in quantitativer Ausbeute. Die darauffolgende Entschützung der Aminogruppe mit konzentrierter Salzsäure lieferte 3-Amino-4-azidobenzoessäure **53** in einer mäßigen Ausbeute von 10 %.



Schema 20: Synthese von Anilin **53**. Bedingungen: a) $(\text{AcO})_2\text{O}$, 1,4-Dioxan, Pyridin, RT, 20 h, quant.; b) NaN_3 , CuI, Na-Ascorbat, TMEDA, EtOH:H₂O = 7:1, MW, 100 °C, 30 Min, 29 %; c) LiOH (1M), MeOH, RT, 24 h, quant.; d) $\text{HCl}_{(\text{konz.})}$, H₂O, Δ , 20 h, 10 %.

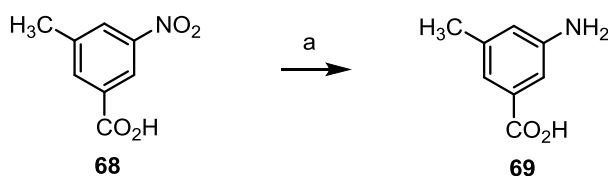
Parallel sollte das Bisazid **67** ausgehend von 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**) hergestellt werden. Die Diazotierung unter Standardbedingungen lieferte Bisazid **67** in guter Ausbeute von 89 % (Schema 21).



Schema 21: Synthese von 3,5-Bisazidobenzoessäure (**67**). Bedingungen: a) $\text{HCl}_{(\text{aq.})}$ (2M), NaNO_2 , NaN_3 , H₂O, -3 bis -7 °C, 12 h, 89 %.

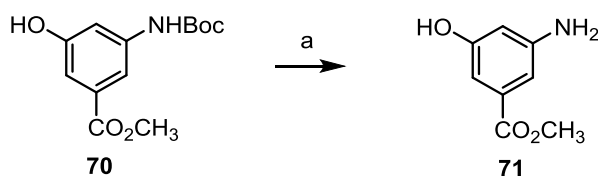
Für die Erweiterung der bis dato ermittelten Erkenntnisse zur Substratflexibilität der Adenylierungsdomäne (PKS-Aufladedomäne) sollten 3-Amino-5-hydroxybenzoessäuremethylester (**71**) und der 3-Amino-5-methylbenzoessäure (**69**) synthetisiert werden. Die Ausgangsverbindung für die Synthese von **69** war die kommerziell erhältliche 3-Methyl-5-nitrobenzoessäure (**68**), welche in einem Schritt zu dem gewünschten AHBA-Derivat in

quantitaver Ausbeute gelang. Triethylsilan und eine katalytische Menge Pd/C dienten als Reduktionsmittel (Schema 22).



Schema 22: Synthese von 3-Amino-5-methylbenzoesäure **69**. Bedingungen: a) Pd/C, Et₃SiH, EtOAc, 20 h, quant.

Die Synthese von Methylester **71** startete ausgehend von dem bereits im Arbeitskreis KIRSCHNING vorhandenem Phenol **70**. Durch die Boc-Entschützung mittels TFA stand Anilin **71** in quantitativer Ausbeute zur Verfügung (Schema 23).



Schema 23: Synthese von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäuremethylester (**71**). Bedingungen: a) CH₂Cl₂, TFA, 20 h, RT, quant.

4.1.3 Mutasyntesen mit dem Blockmutantenstamm *A. pretiosum* HGF073

In Folgenden werden die Ergebnisse der Fermentationen mit *A. pretiosum* HGF073 vorgestellt. Die durchgeführten Fütterungsstudien werden in zwei Teilen präsentiert. Im ersten Teil sind die Ergebnisse zur Erweiterung von Flexibilitätsstudien der PKS-Aufladedomäne von AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 zusammengefasst. Im zweiten Teil werden die Supplementierungsexperimente mit Azid-Startereinheiten beschrieben.

4.1.3.1 Mutasyntesen mit modifizierten AHBA-Analoga

Bereits in früheren Arbeiten wurde ein breites Spektrum von modifizierten AHBA-Derivaten mit unterschiedlichen elektronischen und sterischen Eigenschaften synthetisiert und erfolgreich an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert.⁷²⁻⁷⁴ Diese Fermentationsexperimente dienten einerseits zur Erzeugung neuer Ansamitocin-Derivate für nachfolgende semisynthetische

Derivatisierungen, aber auch zum Erforschen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von neuen Ansamitocin-Derivaten. Andererseits stand die Substratflexibilität der gesamten Biosyntheseenzymen in der AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 im Vordergrund.

Zur Erweiterung von Flexibilitätsstudien der PKS-Aufladedomäne der AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 standen insgesamt neun Mutasyntone zur Verfügung (Abbildung 15). Mit jedem AHBA-Derivat wurden jeweils zwei Testverfütterungen (Kulturgröße: 50 mL KOREA-Medium) durchgeführt, um festzustellen, ob die jeweilige 3-Aminobenzoesäure von dem Bakterienstamm *A. pretiosum* HGF073 akzeptiert wird. Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgte parallel zu einer Referenz mit AHBA-Zugabe zur Sicherstellung der Aktivität des Stammes. Um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen, wurde auch eine Negativkontrolle - eine Probe ohne jegliche Supplementierung - eingesetzt. Die durchgeführten Fermentationen dauerten bis zu sieben Tage und nach anschließender Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht.

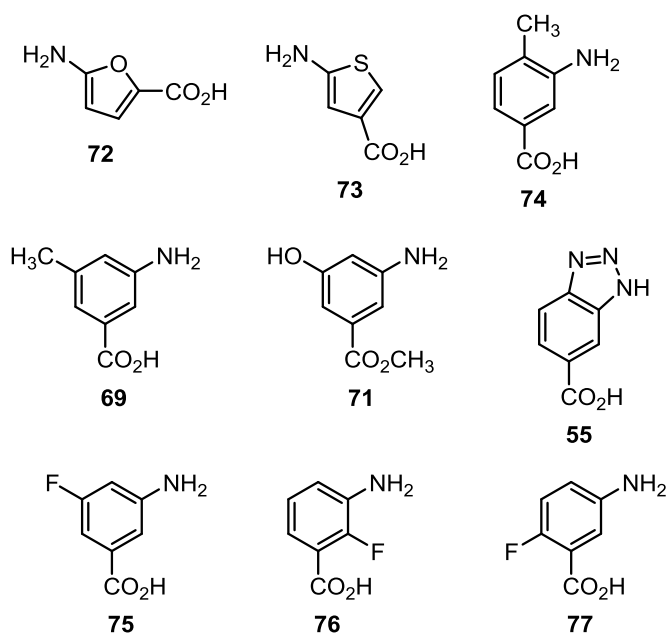


Abbildung 15: Zur Verfügung stehende Aminobenzoesäuren.

Zunächst sollte die AHBA(-)-Blockmutante auf die Akzeptanz von fünfgliedrigen heteroaromatischen Aminosäuren **72** und **73** untersucht werden. Hierzu stellte HENDRIK GEISE die beiden AHBA-Analoga **72** und **73** im Rahmen seiner Bachelorarbeit her.⁸¹ Die

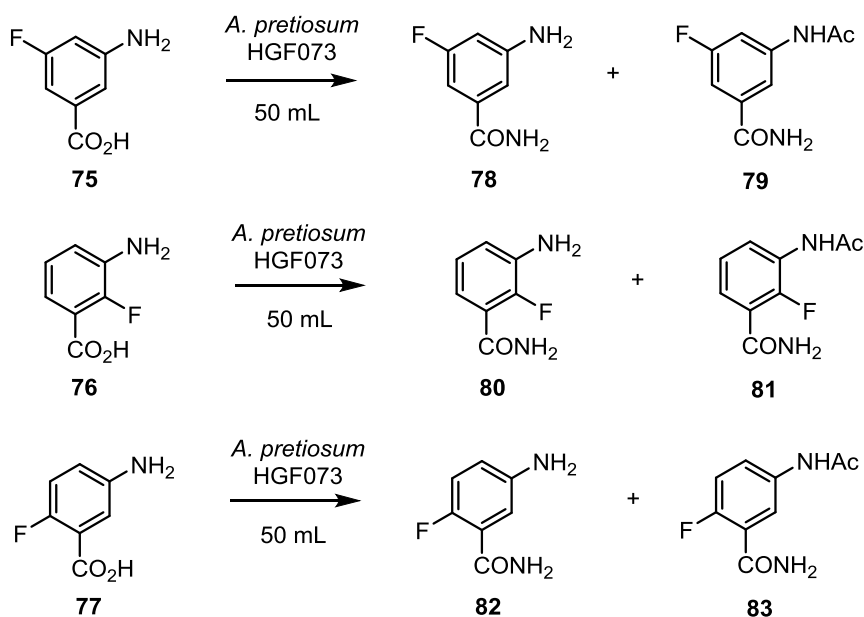
⁸¹ H. Geise, Bachelorarbeit, *Mutasyntetische Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2012**.

Substrate **72** und **73** waren Mutasyntone mit bisher nicht untersuchter Struktur und weisen die wichtigste Voraussetzung, den 1,3-Abstand zwischen Amino- und Säurefunktion, auf (Abbildung 15). Nach den erfolgten Komplementierungsexperimenten mit Mutasyntonen **72** und **73** wurde anhand massenspektrometrischen Analyse festgestellt, dass die beiden AHBA-Analoga von *A. pretiosum* HGF073 nicht akzeptiert und somit nicht zu neuen Naturstoffen prozessiert wurden.

Zur weiteren Untersuchung der Akzeptanz von Mutasyntonen durch die AHBA-(-)-Blockmutante sollten die Fluorderivate verwendet werden. Die in Abbildung 15 aufgeführte Mutasyntone **75-77** wurden von ILONA BULYSZKO synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Frühere Studien belegen, dass die Positionen 2 und 6 am Aromaten unsubstituiert bleiben sollten, um von der AHBA-(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 akzeptiert und prozessiert zu werden. Trotzdem wurden die fluorierten Derivate **76** und **77** an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert. Dieses hat mehrere Gründe. Einerseits hat das Fluorid einen kleinen Ionenradius von 1.33 Å, und ist somit mit dem H-Atom vergleichbar. Zum anderen bildet es starke Wasserstoffbrücken aus. Im Allgemeinen erhöht die Einführung von Fluoriden in Naturstoffen die Bioverfügbarkeit, Lipophilie und metabolische Stabilität. Außerdem erhöht die Anwesenheit eines Fluoratoms die Wechselwirkung zwischen dem Metaboliten und seinem Zielprotein.⁸²

Bei der Verfütterung der Fluoraminobenzoesäuren **75-77** wurde festgestellt, dass alle drei Mutasyntone nicht zu Ansamitocin-Derivaten umgesetzt werden. Interessanterweise wurden nur die Detoxifizierungsprodukte massenspektrometrisch detektiert (Schema 24).

⁸² K. Müller, C. Fach, F. Diederich, *Science* **2007**, 1881-1886.

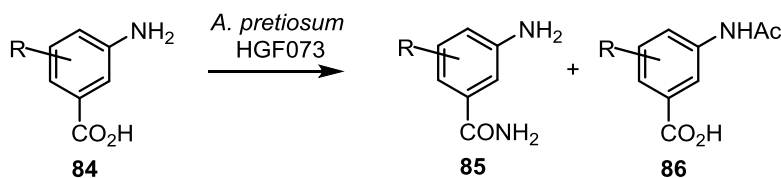


Schema 24: Fütterungsstudien mit Aminobenzoesäuren 75-77.

Die Detoxifizierung der Mutasyntnone durch *A. pretiosum* HGF073 wurde bereits in früheren Arbeiten⁷²⁻⁷⁴ beobachtet und umfasst die Acylierung von Anilin und die Amidierung der Säure. Dieser Transfer ist in Schema 25 zusammengefasst.

Die Acylierung der Aminogruppe ist auf das Enzym Arylamin-*N*-Acetyltransferase (NAT) zurückzuführen. NAT's sind bekannt dafür, dass sie in der Lage sind, Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf das terminale Stickstoffatom eines Arylamins zu transferieren, um dieses Xenobiotikum zu deaktivieren.⁸³

Die mikrobielle Amidierung von aromatischen Carbonsäuren zum Amid **85**, wurde bereits bei BRUNATI *et al.* als „seltene metabolische Umwandlung“ („*infrequent metabolic conversion*“) beschrieben.⁸⁴ Diese Biotransformation ist als eine Detoxifizierungsstrategie des Organismus *A. pretiosum* HGF073 zu betrachten.

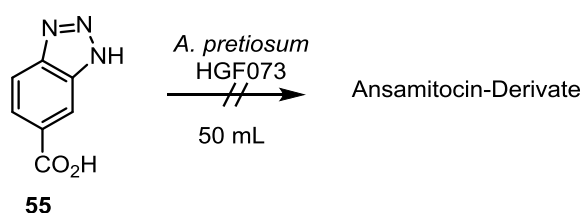


Schema 25: Bildung von Detoxifizierungsprodukten bei der Verfütterung von AHBA-Derivaten an *A. pretiosum* HGF073.

⁸³ M. Payton, A. Mushtag, T.-W. Yu, L.-J. Wu, J. Sinclair, E. Sim, *Microbiology* **2001**, *147*, 1137-114.

⁸⁴ a) M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandolfi, D. Daffonchio, F. Molinari, *Enzyme Microb. Tech.* **2004**, *34*, 3-9; b) R. Maruyama, S. Ono, M. Inoue, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5229-5232.

Ein weiteres Mutasynton war das Triazolderivat **55**, das allerdings von *A. pretiosum* HGF073 ebenfalls nicht prozessiert wurde (Schema 26), obwohl eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Prozessierung, die Anilinfunktion in *meta*-Position zur Säure, vorhanden ist. Die Verfütterungsexperimente mit Triazol **55** sollten weitere Hinweise auf die Substratflexibilität der in der Biosynthese der PKS-Startereinheit AHBA blockierten Mutante HGF073 geben. Die Untersuchung des Rohextraktes mit UPLC/MS ergab weder die Bildung von Ansamitocin-Derivaten, noch die Bildung von Abbau-Produkten. Es wird vermutet, dass das Mutasynton **55** von *A. pretiosum* HGF073 als mögliche Startereinheit nicht akzeptiert wurde.



Schema 26: Versuchte Mutasyntese mit Triazolbenzoesäure **55**.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde das Triazol **55** als Startereinheit der Biosynthese des Geldanamycin-Produzenten *S. hygroscopicus* K390-61-1 erkannt. Die Testverfütterungen mit dem Stamm der AHBA(-)-Mutante von *S. hygroscopicus* K390-61-1 lieferte ein positives Ergebnis.^{85,86} Die Fermentation mit dem Triazol ergab Hinweise auf die Bildung von dem Triazolgeldanamycin-Derivat **87** und dem offenkettigen *seco*-Derivat **88** (Abbildung 16). Die beiden Verbindungen wurden von JEKATERINA HERMANE isoliert und charakterisiert.⁸⁶

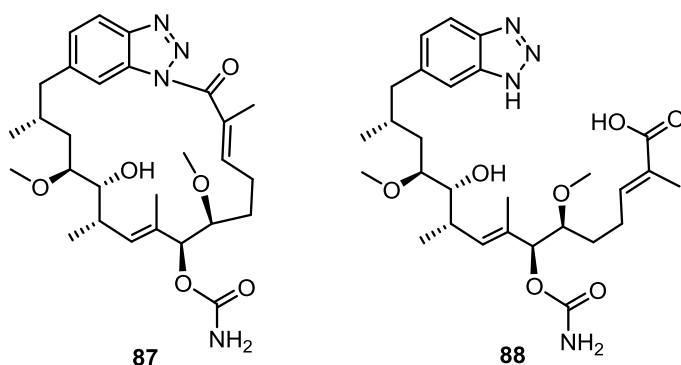


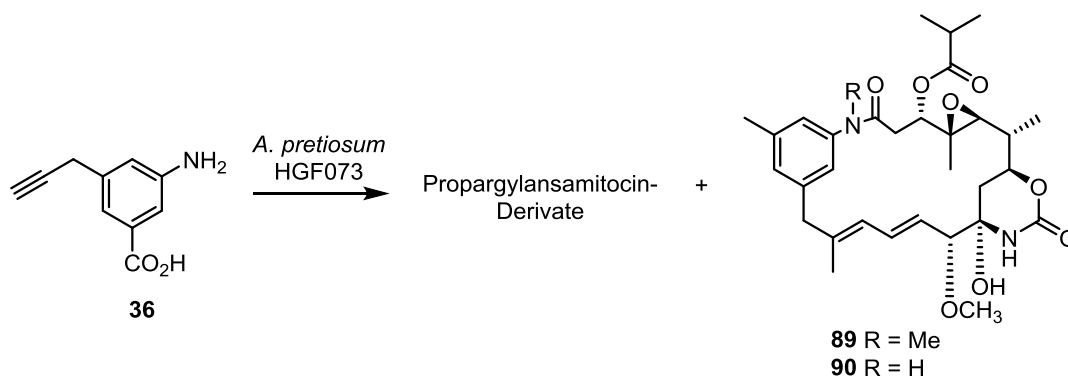
Abbildung 16: Produkte aus der Fermentation der Geldanamycin-Produzenten, *S. hygroscopicus* K390-61-1.

⁸⁵ S. Eichner, Dissertation, *Darstellung neuer Ansamycin-Derivate über Mutasyntese in Kombination mit Semisynthese*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2011**.

⁸⁶ J. Hermene, Dissertation, *Synthetische und mutasyntetische Zugänge zu neuen HSP90 Inhibitoren*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2013**.

Weitere Hinweise auf Akzeptanz der AHBA-Analoga von *A. pretiosum* HGF073 sollte die Fermentation mit Methylbenzoesäure **69** liefern (Abbildung 15).

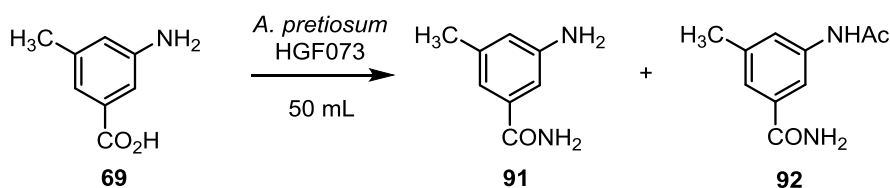
Aus den mutasynthetischen Arbeiten⁷⁴ von KIRSTEN HARMROLFS geht hervor, dass *A. pretiosum* HGF073 bei den Komplementierungsstudien mit Propargylbenzoesäure **36** neben zahlreichen Propargylansamitocin-Derivaten auch reduzierte Methyl-Ansamitocine als Nebenprodukte in ausreichenden Mengen produziert hatte (Schema 27).



Schema 27: Fermentation mit Propargylaminobenzoensäure **36**.

Als Ursache für die Bildung dieser Naturstoffe galten zunächst Verunreinigungen, die bei der Darstellung der AHBA-Analoga **36** entstanden waren. Daher sollten diese Behauptungen überprüft werden, in dem Mutasynthon **69** erneut synthetisiert und in Testverfütterung eingesetzt werden sollte.

Diese Experimente wurden mit 3-Amino-5-methylbenzoesäure (**69**) durchgeführt und lieferten kein positives Ergebnis. Nach der Fermentation (Schema 28) konnten ausschließlich die Detoxifizierungsprodukte **91** und **92** massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

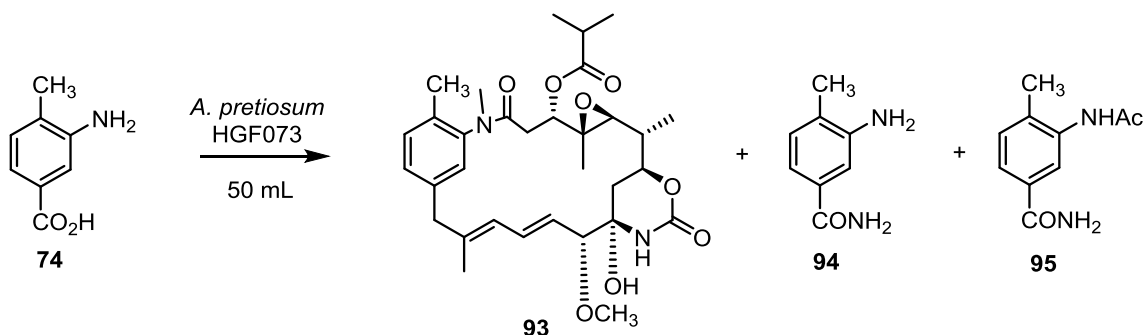


Schema 28: Fütterungsstudien mit 5-Amino-3-methylbenzoesäure (**69**).

Im Fall der Propargylbenzoesäure **36** kann nur schwer eine Erklärung gefunden werden.

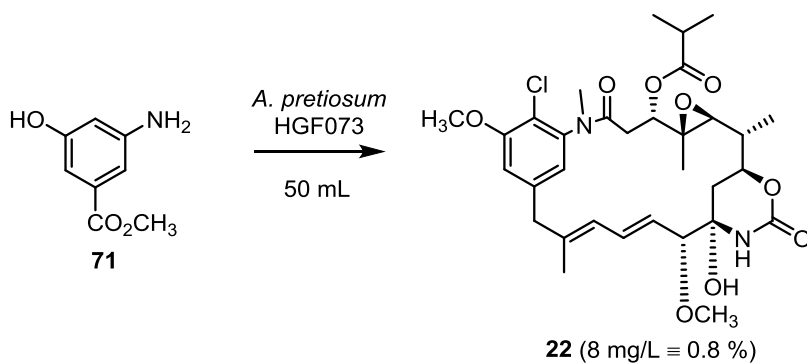
Bei der Verfütterung der käuflich erhältlichen 3-Amino-4-methylbenzoesäure (**74**) konnte Ansamitocinderivat **93** in sehr geringen Produktionsmengen nachgewiesen werden (Schema 29). Es wurde entschieden, dass eine „upscaling“ der Fermentation auf mehrere Liter

nicht zu ausreichenden Mengen der Mutaprodukte führt, die für die vollständige Charakterisierung ausreicht.



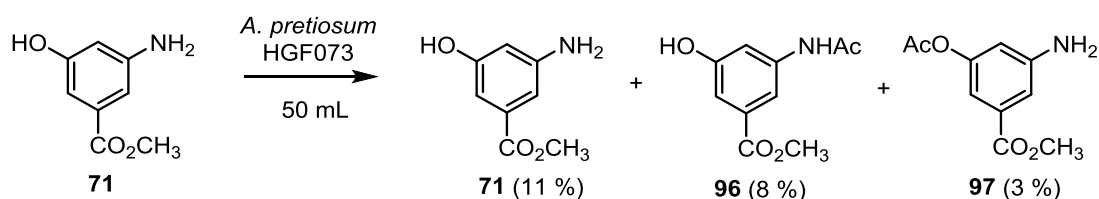
Schema 29: Ergebnis der Fermentation mit 3-Amino-4-methylbenzoesäure (**74**).

Für die Erweiterung der zuvor ermittelten Kenntnisse der Substratflexibilität der Adenylierungsdomäne (PKS-Aufladedomäne) wurde 3-Amino-5-hydroxybenzoesäuremethylester (**71**) an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert. Im Rahmen dieser Fermentation wurde Ansamitocin P-3 (**22**) in einer Ausbeute von 8 mg/L, bzw. 0.8 %, bezogen auf die eingesetzte Menge von Methylester **71**, (Schema 30) isoliert. Im Vergleich dazu liefert eine Fermentation mit der natürlichen AHBA-Startereinheit **27** Ansamitocin P-3 (**22**) in einer Ausbeute von 60-70 mg/L (6 % - 7 %, bezogen auf die Menge von AHBA).



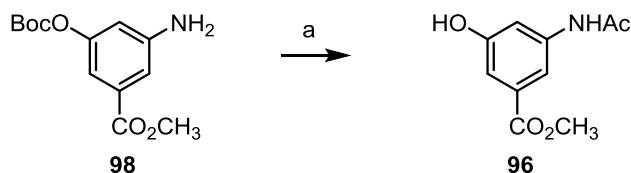
Schema 30: Ergebnis der Fermentation mit AHBA-Methylester **71**.

Interessanterweise, wurden auch drei Detoxifizierungsprodukte (Schema 31) isoliert und vollständig charakterisiert.



Schema 31: Isolierte Detoxifizierungsprodukte der Fermentation mit AHBA-Methylester (**71**).

Die vorliegende Bildung von Acetat **97** als Detoxifizierungsprodukt ist ungewöhnlich, da die Acyltransferase üblicherweise die Acylierung von aromatischen Anilinen bevorzugt. Mittels UPLC/MS wurden die beiden Acetate durch unterschiedliche Retentionszeiten detektiert. Mittels semipräparativer HPLC konnten alle Produkte isoliert werden. Allerdings, konnten die beiden Acetate nicht eindeutig zugeordnet werden, da sie in zu geringer Menge vorlagen, um eine vollständige Strukturanalytik durchzuführen. Deshalb wurde das Acetat **96** separat synthetisiert, um verlässliche Vergleichsdaten zu erhalten (Schema 32). Durch den Vergleich der Retentionszeiten des synthetisch erzeugten Acetats **96** und der mutasynthetisch dargestellten Verbindungen **96** und **97** konnten die beiden Detoxifizierungsprodukte zugeordnet, identifiziert und die Ausbeute bestimmt werden (Schema 31-32).

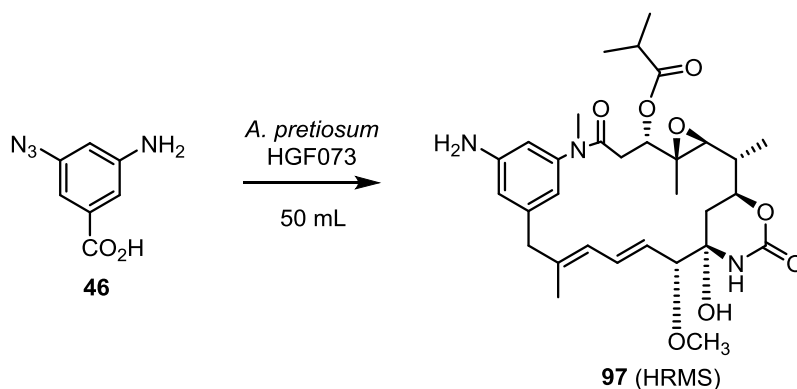


Schema 32: Synthese von 3-Acetamino-5-hydroxybenzoesäuremethylester (**96**). Bedingungen: a) i. Ac₂O, 1,4-Dioxan, Pyridin, RT, quant.; ii. TFA, CH₂Cl₂, RT, 24 h, 52 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PKS-Aufladedomäne in der Biosynthese von *A. pretiosum* HGF073 eine eingeschränkte Substratflexibilität des aromatischen Teils aufweist. Strukturell stark veränderte Startereinheiten werden nicht akzeptiert und zu Ansamitocin-Derivaten prozessiert. Beim PKS-Aufladen kann das AHBA-Analogon als Methylester vorliegen, es wird durch die Ladedomäne erkannt und zum Naturstoff umgesetzt. Diese Tatsache ist interessant für solche Mutasynthone, die als Säure nur schwer zu synthetisieren sind.

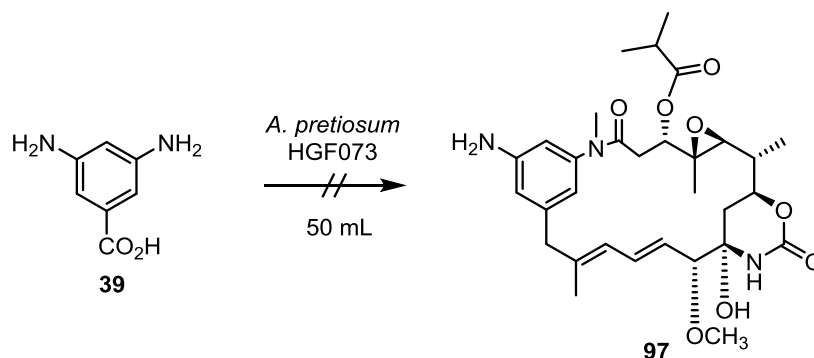
4.1.3.2 Mutasynthesen mit Azid-Startereinheiten

Bereits in früheren Arbeiten⁷⁷ wurden erste Hinweise auf die Möglichkeit der Bioreduktion von organischen Arylazide gefunden, in dem Azidbenzoesäure **46** an die AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 verfüttert und die Bildung des Aminoansamitocin-Derivates **97** beobachtet wurde (Schema 33).



Schema 33: Komplementierungsexperiment mit 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**).

Bemerkenswert war, dass nach der Fermentation von 3,5-Diaminobenzoessäure **39** mit dem AHBA-(-)-Mutantenstamm *A. pretiosum* HGF073 kein Anilinsamitocin-Derivat **97** mittels UPLC-MS detektiert wurde (Schema 34).



Schema 34: Fermentation mit 3,5-Diaminobenzoessäure (**39**).

Durch diese Ergebnisse wurde ein interessanter Einblick in die Biosynthesemaschinerie gewonnen. In Anlehnung an diese Hinweise wurden Azide, Acetate und Bisazide als Startereinheiten synthetisiert, um Rückschlüsse auf die Substratspezifität und -flexibilität in der Bioreduktion der organischen Azide ziehen zu können.

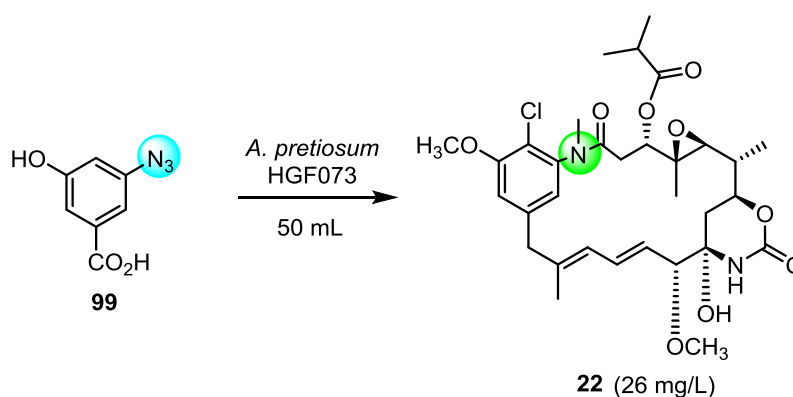
Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Reduktionen von Arylaziden zu Anilinen durch Bakterien nach bisherigem Wissensstand beispiellos ist. Es ist bekannt, dass in ausgewählten Klassen von Bakterien das Enzym Nitrogenase vorhanden ist, welches in der Lage ist, bei der Stickstofffixierung die anorganischen Azide zu N_2 und Ammoniak umzusetzen.⁸⁷ Andererseits konnte bisher nicht aufgeklärt werden, wie die Reduktion von Aziden im biologischen System stattfindet. Die in der Literatur erwähnten Hinweise deuten darauf hin, dass die *in vivo* Umwandlung von Azid zum Amin durch Bäckerhefe *Saccharomyces*

⁸⁷ a) K. Fisher, M. J. Dilworth, W. E. Newton, *Biochemistry* **2006**, *45*, 4190-4198; b) J. M. Rivera-Ortiz, R. Burris, *J. Bacteriol.* **1975**, *123*, 537-545.

cerevisiae möglich sei.⁸⁸

Es wird vermutet, dass die Reduktion des Azides zum primären Amin entweder durch NADPH-Oxidoreduktase oder durch eine Variante der STAUDINGER-Reaktion erfolgt. Es ist bekannt, dass die Azide chemisch mit NaBH₄ zu Aminen reduziert werden können.⁸⁹ Die Natur verwendet für solche chemischen Prozesse ihre eigene Hydridquelle. Dabei fungiert NADPH als Reduktionsmittel, das als Lieferant von Hydrid und Protonen dient, und dabei zu NADP⁺ oxidiert wird.⁹⁰

Für die Bestätigung der ersten Hinweise dieser ungewöhnlichen Reduktion von Azidobenzoensäuren durch HGF073 wurde von GERRIT JÜRJENS⁹¹ 3-Azido-5-hydroxybenzoensäure (**99**) synthetisiert und an den Blockmutantenstamm *A. pretiosum* HGF073 verfüttert (Schema 35). Ansamitocin P-3 (**22**) wurde in guter Ausbeute erhalten. Das erfolgreiche Aufladen des AHBA-Derivates auf die PKS und die komplette Prozessierung bis zum Naturstoff lieferte einen der wichtigsten Hinweise, dass *A. pretiosum* HGF073 in der Lage ist, organische Azide zu reduzieren.



Schema 35: Mutasyntheseexperiment mit Azidohydroxybenzoensäure **99**.

Für die Fütterungsexperimente mit der AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073, bei der gezielt der Schlüsselschritt, die Bildung des Startbausteins AHBA, deaktiviert wurde, standen eine Reihe von Azidobenzoensäuren zur Verfügung (Abbildung 17). Benzylazid **100** wurde bereits von KIRSTEN HARMROLFS hergestellt⁷⁴ und in Fütterungsstudien getestet.

⁸⁸ a) V. K. Sharma, H. D. Kumar, *J. Bas. Microbiol.* **1973**, *13*, 517-522; b) M. Baruah, A. Boruah, D. Prajapati, J. S. Sandhu, *Synlett*, **1996**, 1193-1194; c) A. Kamal, B. Laxminarayana, N. L. Gayatri, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6871-6874.

⁸⁹ a) D. M. Krein, P. J. Sullivan, K. Turnbull, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7213-7216; b) F. Rolla, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4327-4329.

⁹⁰ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**, 1381-1412.

⁹¹ L. Mancuso, G. Jürjens, J. Hermane, K. Harmrolfs, S. Eichner, J. Fohrer, W. Collisi, F. Sasse, A. Kirschning, *Org.Lett.* **2013**, *15*, 4442-4445.

Mit jedem AHBA-Derivat wurden jeweils zwei Testverfütterungen (Kulturgröße: 50 mL KOREA-Medium) durchgeführt, um festzustellen, ob die jeweilige 3-Aminobenzoessäure von dem Bakterienstamm *A. pretiosum* HGF073 akzeptiert wird. Die durchgeführten Fermentationen dauerten bis zu sieben Tage und nach anschließender Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht.

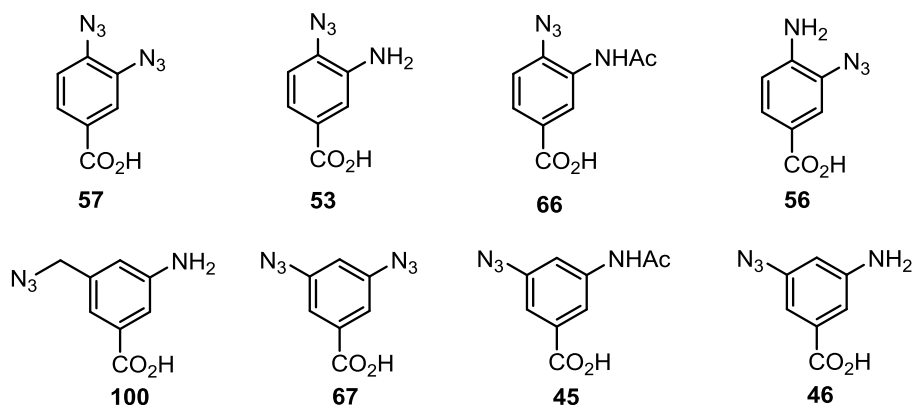
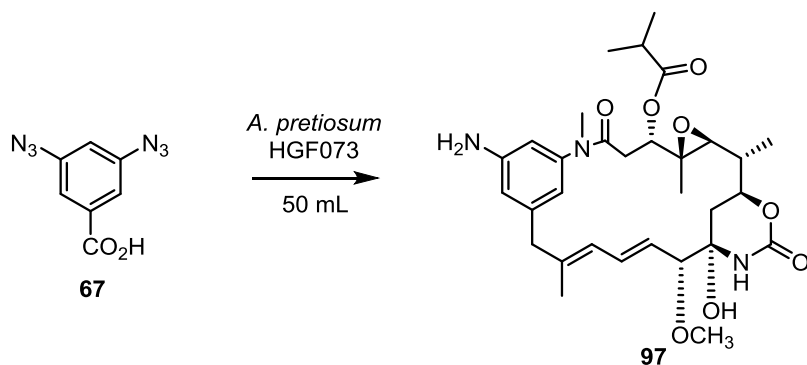


Abbildung 17: Mutagenese zur Verfütterung an *A. pretiosum* HGF073.

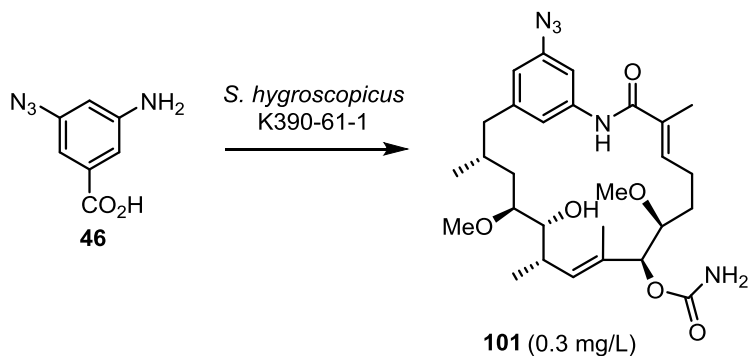
Die Mutagenese mit Benzoessäuren **57**, **53**, **66** und **56** lieferten kein positives Ergebnis. Die *ortho*-funktionalisierten AHBA-Derivate wurden nicht reduziert und nicht zu neuen Ansamitocin-Derivaten prozessiert. Allerdings konnten die Abbau-Produkte isoliert und identifiziert werden. Allgemeine Hinweise auf die Bildung von Detoxifizierungsprodukten wurden bereits im Kapitel 4.1.3.1 beschrieben. Es lässt sich aus dieser ersten Reihe von Experimenten schließen, dass für die Bioreduktion das Substitutionsmuster des aromatischen Teils essentiell ist.

Im Fall der Fütterung von Benzylazid **100** und dem *N*-Acetat **45** findet weder die Bioreduktion noch die Prozessierung zu Ansamitocin-Derivaten statt. Die Fermentationsexperimente mit Diazidobenzoessäure **67** offenbarten nach den ersten massenspektrometrischen Untersuchungen das reduzierte Aminoansamitocin-Derivat **97**, allerdings in sehr geringen Mengen (Schema 36).



Schema 36: Mutageneseexperiment mit Diazidobenzoessäure **67**.

Die Fähigkeit von *A. pretiosum* HGF073, organische Azide zu reduzieren, ist einzigartig. Sowohl die Fermentation mit der Aminoazidobenzoesäure **46**, wie auch mit dem AHBA-Derivat **100** mit *S. hygroscopicus* K-390-61-1 ergaben weder Aminogeldanamycine, noch nachweisbar reduzierte Aromaten. Die Verfütterung von Aminoazidobenzoesäure **46** an den Geldanamycin-Produzenten *S. hygroscopicus* K390-61-1 resultierte in einem Derivat, welches zunächst mittels UPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden konnte und anschließend isoliert und komplett charakterisiert wurde (Schema 37).⁸⁵



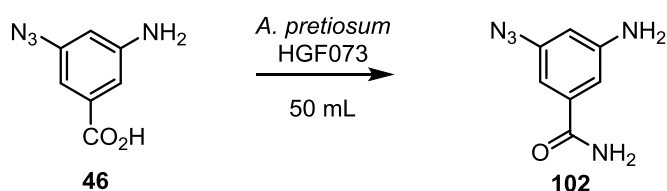
Schema 37: Mutasyntheseexperiment mit Azidobenzoesäure **46**.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 in der Lage ist, organische 3,5-disubstituierte Arylazidobenzoesäuren zu den entsprechenden Anilinen zu reduzieren. Der Zeitpunkt der Bioreduktion ist unbekannt und soll im Folgenden weitergehend untersucht werden. Die Ergebnisse der biochemischen Studien werden im Kapitel 4.2 diskutiert.

4.1.3.3 Aminoansamitocine

Die mehrmals durchgeführten Testfermentationen mit Aminoazidobenzoessäure **46** lieferten erste Hinweise auf gute Ausbeuten, sodass entschieden wurde, diese Bioreduktion in einem Fermentationsansatz von sechs Liter nachzustellen, um neue Derivate in ausreichenden Mengen für die Strukturaufklärung isolierbaren Metaboliten zu erhalten. Die Verfütterung von Aminoazidobenzoessäure **46** erfolgte kontinuierlich über vier Tage in 50 mL Schüttelkulturen. Die ausführliche Beschreibung der Mutasynteseexperimente, sowie das Protokoll zur Verfütterung sind in Kapitel 6.2 beschrieben.

Insgesamt wurden dreizehn neue Ansamitocin-Derivate isoliert. Weiterhin wurde 3-Amino-5-azidobenzamid (**102**) als Detoxifizierungsprodukt der Startereinheit **46** isoliert (Schema 38).



Schema 38: Bildung von Detoxifizierungsprodukt **102** nach der Mutasyntese mit Aminobenzoessäure **46** an *A. pretiosum* HGF073.

Erstaunlicherweise fand sich im Fermentationsansatz nach Verfütterung mit Azidobenzoessäure **46** kein einziger Metabolit, der noch eine Azidogruppe enthält. In allen Fällen wurden Aniline gebildet, die sogar weiter durch Acetylierung, Methylierung oder durch Amidierung zu den entsprechenden Derivaten durch den Mikroorganismus modifiziert wurden (Abbildung 18).

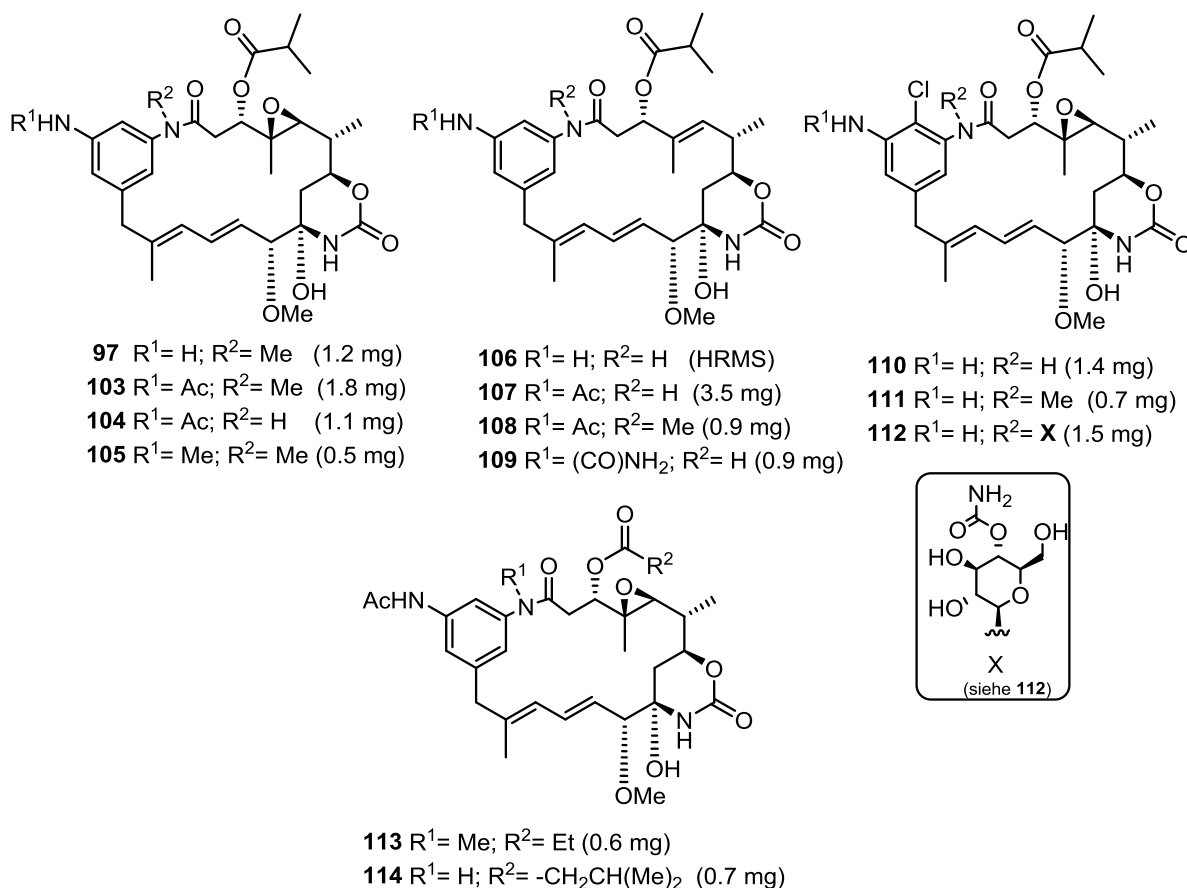


Abbildung 18: Produkte der Fermentation mit Azidobenzoesäure **46**.

Alle isolierten Mutasynthese-Produkte enthalten die Carbamoylgruppe, welche, wie es bereits beschrieben⁹² wurde, eine essentielle strukturelle Voraussetzung für die nachfolgende C-3-Acylierung ist. In den meisten Metaboliten dominierte die Isobuttersäureseitenkette (P-3-Typ), welche auf die Zugabe von L-Valin zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden Ansamitocine mit Ethyl- (P-2-Typ) **113** und Isovaleriansäureseitenkette (P-4-Typ) **114** isoliert.

Erstaunlicherweise entstanden auch Intermediate, bei denen die post-PKS-Modifizierungen nicht komplett erfolgt waren. Dazu gehören die 4,5-Desoxy-Derivate **106 - 109**, als auch die nicht *N*-methylierten Derivate (**104**, **106**, **107**, **109**, **110** und **114**). Es wurden ebenfalls Derivate isoliert, die am anilinischem Stickstoffatom acyliert (**103**, **104**, **107**, **108**, **113**, **114**) bzw. methyliert (**105**) oder sogar amidiniert (**109**) sind. Diese enzymatischen Transformationen sind wahrscheinlich mit den Detoxifizierungswegen im Organismus verbunden.

⁹² P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carrol, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236-14237.

Das Auftreten des *N*-methylierten und 4,5-Desoxy-Metabolits **108** bestätigt die von TOBIAS KNOBLOCH getroffene Aussage, dass die *N*-Methylierung durch *Asm10* ohne vorherige Epoxidierung möglich sei.⁷³

Erste Hinweise auf die mutasynthetische Bildung von Aminoansamitocine **110**, **111** lieferte die massenspektrometrische Analyse. Zunächst konnten H^+ bzw. Na^+ -Addukte, und doppelt ionisierte Addukte (Abbildung 19), sowie die charakteristischen Molekülpeaks gefunden werden, welche auf das typische Ansamitocin-Fragmentierungsmuster deuten. So wurde für Ansamitocin-Derivat **111** das folgende Massenspektrum angefertigt (Abbildung 19). Deutlich zu sehen ist, das doppelt ionisierte H^+ -Addukt (m/z 1241) $[2M+H^+]$, das doppelt ionisierte Na^+ -Addukt (m/z 1261) $[2M+Na]$, sowie die H^+ - (m/z 620), bzw. Na^+ -Addukte (m/z 642), und das Tochterion nach der Spaltung der Esterseitenkette an C-3, was ein weiteres Indiz für die Existenz der Ansamitocine ist.

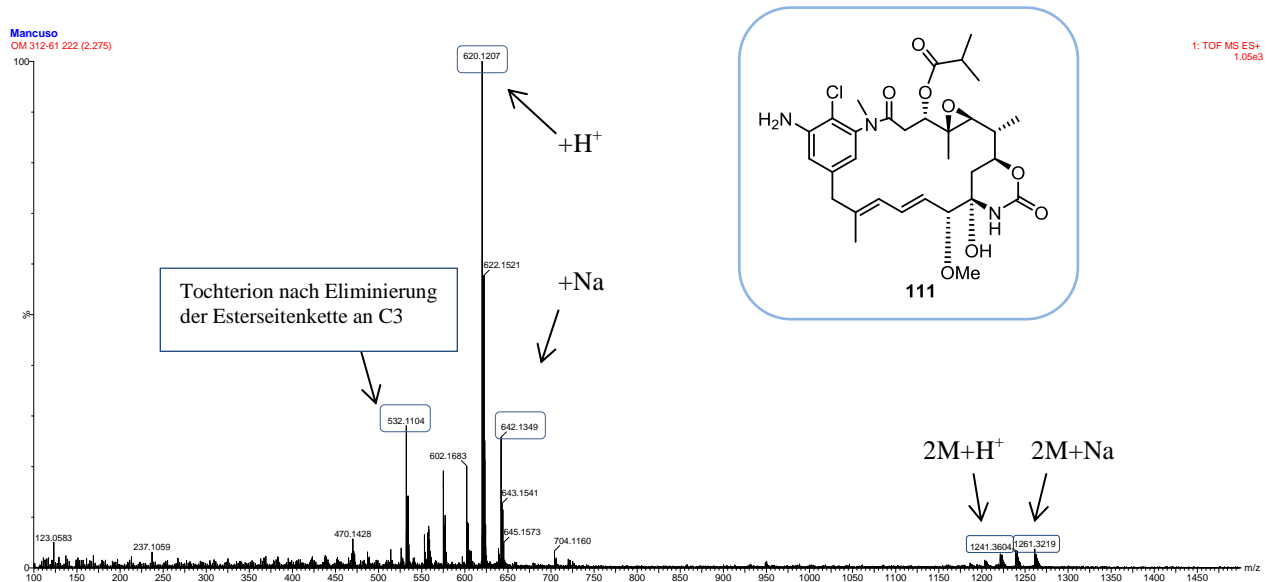


Abbildung 19: Massenspektrum für Ansamitocin-Derivat **111**.

Ebenfalls wurde das typisch Isotopenmuster für monochlororganische Verbindungen in den gemessenen Massenspektren gefunden (Abbildung 20), da Chlor aus den beiden Isotopen ^{35}Cl und ^{37}Cl in einem Verhältnis von ca. 3:1 besteht. So ist allgemein die Anwesenheit eines oder mehrerer Chloratome leicht zu erkennen, ebenso auch der Verlust eines oder mehrerer Chloratome in einem Fragment-Ion.

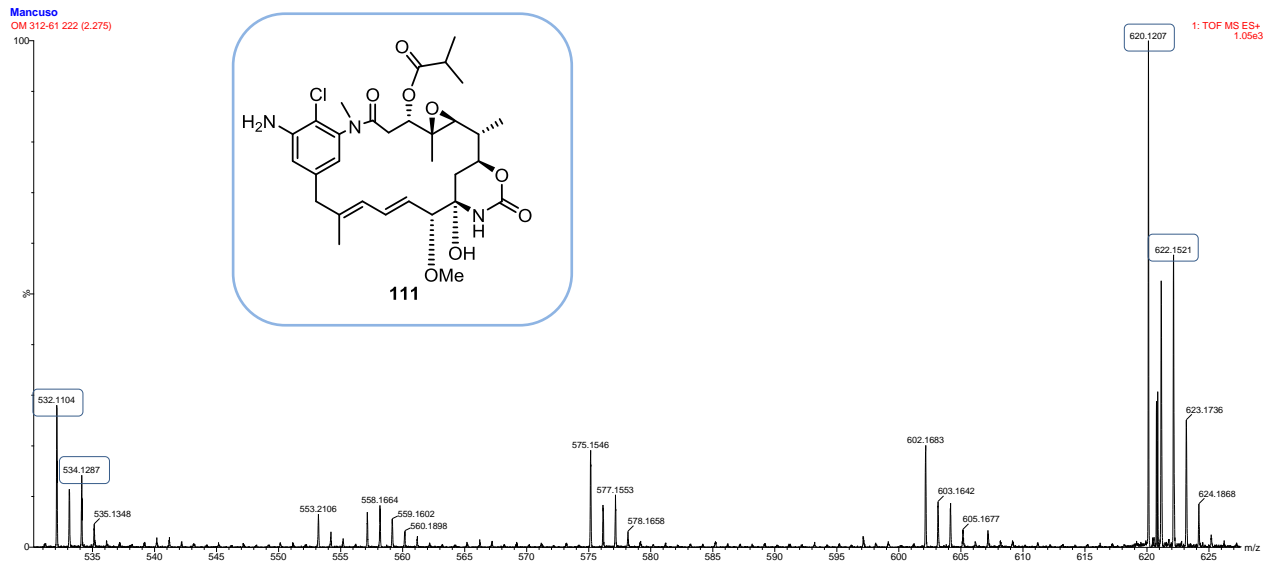


Abbildung 20: Chlorionenmuster für das Ansamitocinderivat **111**.

Für jeden Metabolit wurde auch eine MSMS-Analyse durchgeführt, die weitere Hinweise strukturanalytisch lieferten. Das MSMS-Spektrum von Aminoansamitocin **110** (Abbildung 21) zeigte das für Ansamitocine typische Fragmentierungsmuster.

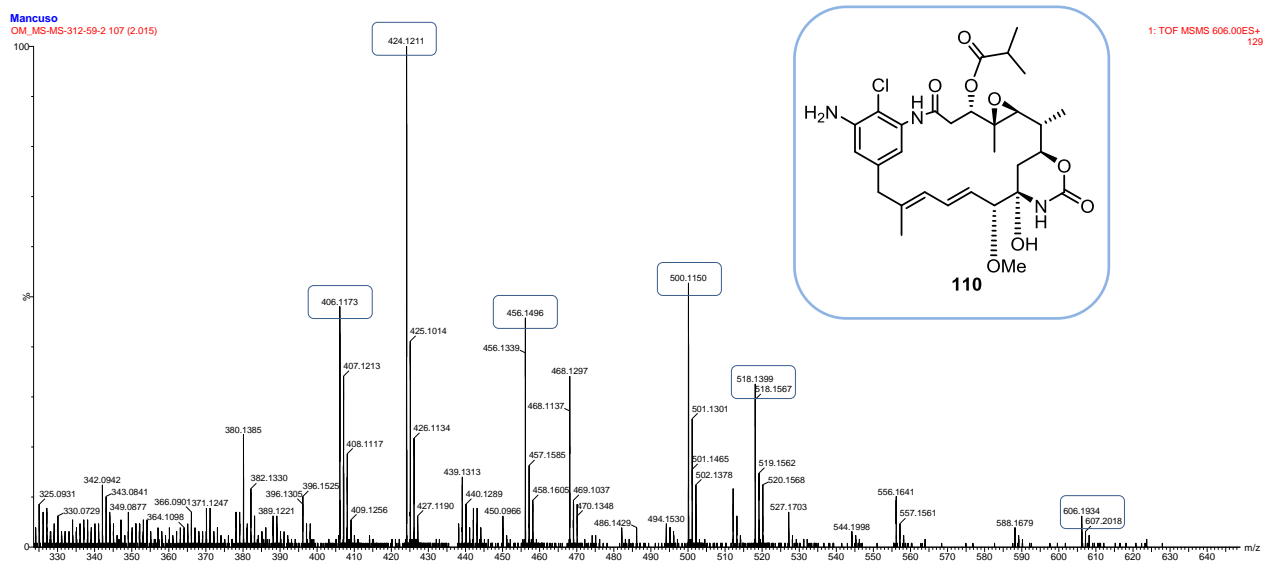
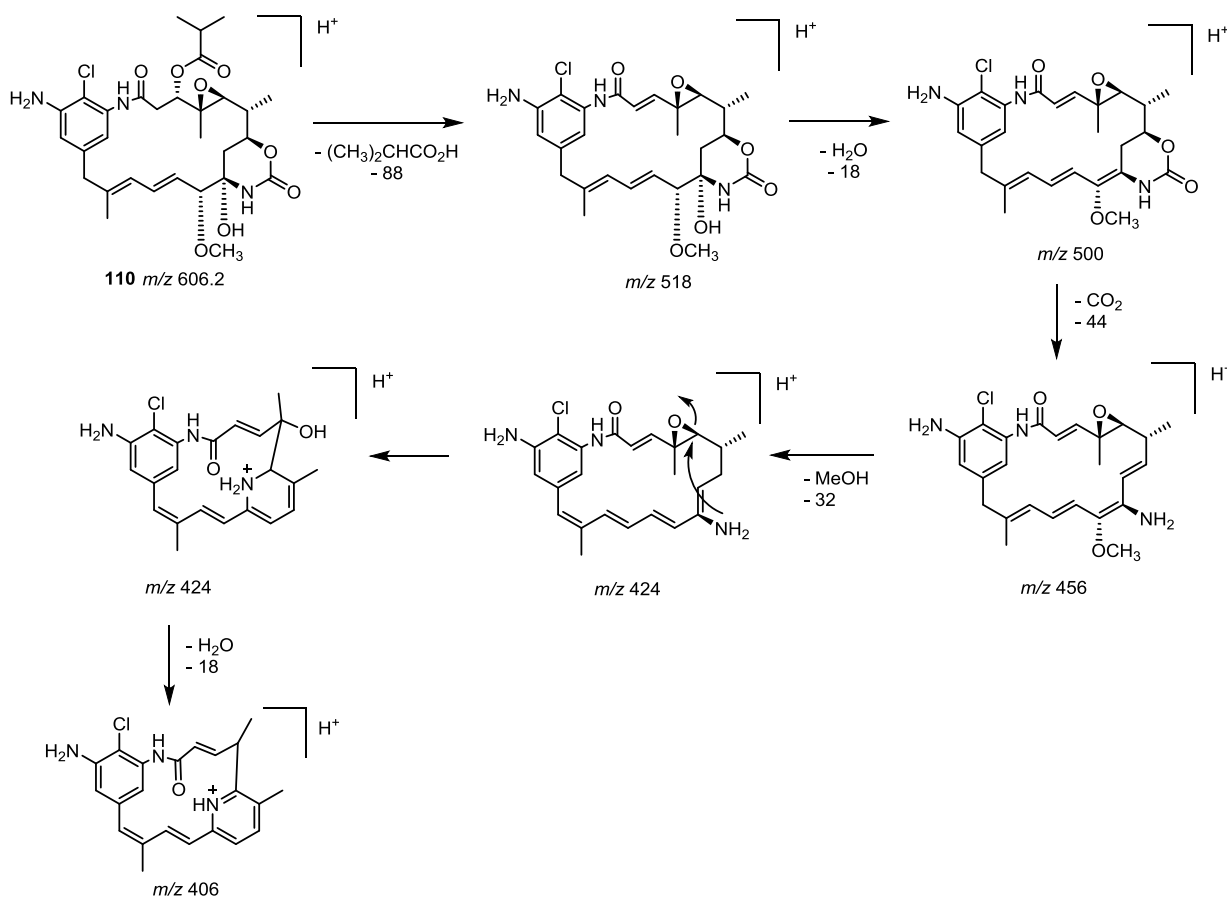


Abbildung 21: MSMS-Spektrum von dem Aminoansamitocin **110**.

Die Ionen ließen sich dann in eine Reihenfolge entsprechend der Fragmentierung zuordnen (Schema 39).



Schema 39: Fragmentierungsmuster des 20-Amino-19-chloro-*N*-demethylansamitocins **110**.

Die Verbindungen wurden anschließend NMR-spektroskopisch untersucht. Die ^1H -NMR-Signale bei 6.83 und 6.62 ppm im Derivat **110** wurden den beiden aromatischen Protonen zugeordnet. Die ^1H - ^{13}C -HMBC- sowie ^1H - ^1H -COSY-Experimente zeigten keine zusätzlichen Korrelationen im aromatischen Bereich, was auf das fehlende Proton an C-19 hinwies. In der Regel erfordert die Halogenase eine phenolische Gruppe an C-20, so dass sogar eine *O*-Methylierung an C-20 die Chlorierung vollständig unterdrückt. Offensichtlich kann auch die freie Aminogruppe an C-20 als dirigierende Gruppe handeln, wahrscheinlich durch Wasserstoffbrückenbindung in der aktiven Stelle der Halogenase.

Das Auftreten von *N*- β -*D*-Glykosylierung des Makrolactamamids in Ansamitocin-Derivaten wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben.⁷³ Bemerkenswert ist, dass die *N*-Glykosyltransferase in der Lage ist, die UDP-Glukose als Glykosyldonor zu nutzen. Die NMR-Daten für die Glukoseeinheit im Derivat **112** stimmen mit den literaturbekannten Daten

für analoge glukosylierte Metabolite überein.⁹³ Mittels ^1H - ^{13}C -NMR-HMBC sowie ^1H - ^{13}C -NMR-HSQC konnte belegt werden, dass die *N*- β -D-Glykosylierung am Makrolaktam-Amid und nicht am aromatischen Anilin stattfindet.

4.1.3.4 Biologische Aktivitäten

Die durch Mutasythese erzeugten Aminoansamitocine wurden von FLORENZ SASSE am HZI in Braunschweig auf ihre antiproliferierende Wirkung auf verschiedene Krebszelllinien untersucht. Die Ergebnisse der MTT-Tests⁹⁴ sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

N-Glucosylierung in Derivat **112** führte zum Verlust der biologischen Aktivität im Vergleich zu Ansamitocin P-3 (**22**). In den meisten Fällen führte der Austausch der Hydroxylgruppe des Phenols durch die Aminogruppe nur zu gering verringerten antiproliferierenden Eigenschaften (siehe **97-105**), und zwar unabhängig davon, ob die Aminogruppe weiter methyliert (**105**) oder acyliert (**103,104**) ist.

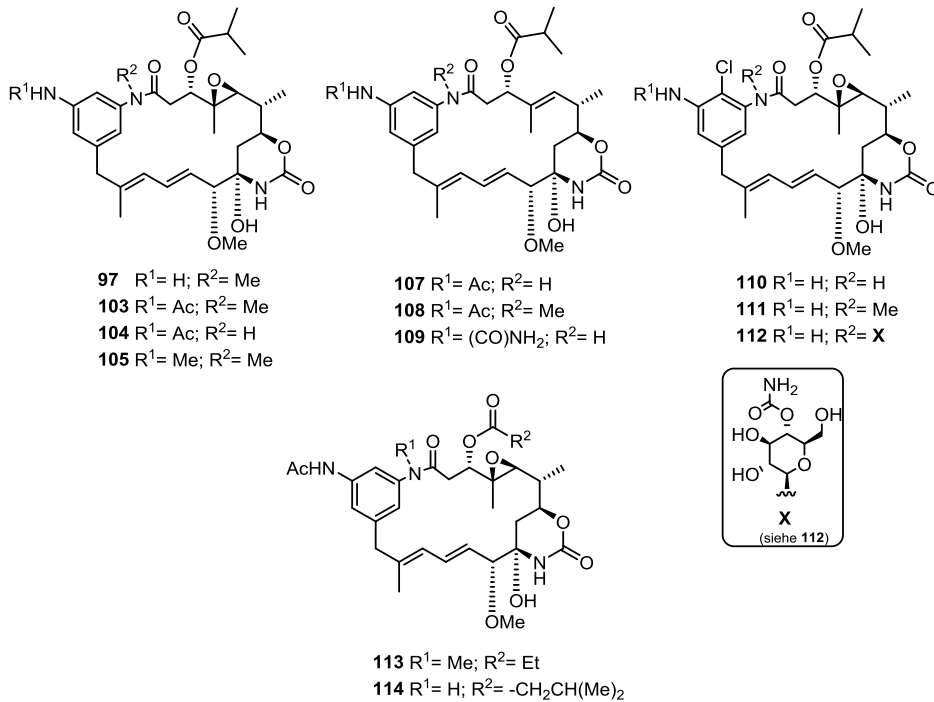
Die vollständig prozessierten Amino-Derivate **110** und **111** besitzen eine ähnliche antiproliferierende Wirkung auf Tumor-Zelllinien, wie Ansamitocin P-3 (**22**). Die 4,5-Desepoxy-Metaboliten (**107-109**) zeigten keine oder nur moderate Aktivität im Vergleich zu Ansamitocin P-3 (**22**).

⁹³ a) 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. Graupner, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1578-1581; b) P. Zhao, L. Bai, J. Ma, Y. Zeng, L. Li, Y. Zhang, C. Lu, H. Dai, Z. Wu, Y. Li, X. Wu, G. Chen, X. Hao, Y. Shen, Z. Deng, H. G. Floss, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 863-874.

⁹⁴ 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).

Tabelle 1: IC₅₀-Werte [ng/mL] der Aminoansamitocin-Derivaten im Vergleich zum natürlichen Ansamitocin P-3 (**22**).

getestete Ansamitocin-Derivate:



Zelllinien:

KB-3-1 = Gebärmutterhalskarzinom, PC-3 = Prostataadenokarzinom, A-431 = Hautkarzinom, SK-OV-3 = Eierstockadenokarzinom.

Zelllinie	AP-3	97	103	104	105	107	108	109	110	111	112	113	114
KB-3-1	0.11	1.4	2.0	5.0	0.7	6000	350	10	0.28	0.35	2600	20	58
PC-3	0.035	9.0	19	55	1.8	>10000	n.d.	70	1.5	1.4	7500	220	320
A-431	0.05	2.0	7.5	21	0.8	>10000	350	26	0.28	0.4	7000	120	260
SK-OV-3	0.03	2.8	2.5	13	1.4	>10000	650	20	0.45	0.35	2800	54	210

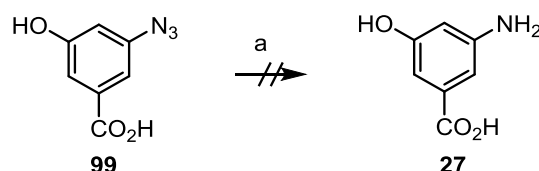
4.2 Biochemische Studien der Azidreduktion

In diesem Kapitel werden die biochemischen Studien vorgestellt, die aufgrund der ungewöhnlichen Bioreduktion von 3-Amino-5-azidbenzoesäure (**46**) durch *A. pretiosum* weitere Hinweise auf die Azidoreduktase liefern.

4.2.1 Vorarbeiten

Obwohl der Zeitpunkt der Bioreduktion unbekannt war und die Azidoreduktase nicht isoliert vorlag, wurde entschieden, die in biologischen Systemen vorkommenden Reduktionshelfer zu testen. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der Azidogruppe durch natürliche Thiole stattfindet. GERRIT JÜRJENS behandelte das Azid **99** mit Ethanthiol, Thiophenol und Glutathion in entgastem Puffer (pH = 7) für 3 Tage (Schema 40).⁹¹

Die ersten Ergebnisse der MS-Analyse zeigten keinen Umsatz von **99** durch Thiophenol und nur Spuren (weniger als 0.5 %) des Produktes **27** wurde in Gegenwart von Glutathion und Ethanthiol gefunden. Natürliche Thiole sind an einer chemischen Bioreduktion von 3,5-Arylaziden nicht beteiligt.

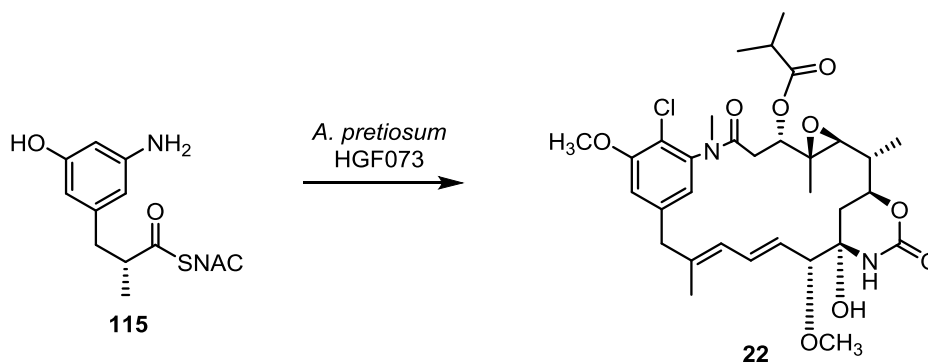


Schema 40: Versuchte Reduktion von Azid **99**. Bedingungen: a) i. Ethanthiol, pH = 7 Puffer, 3 d; ii. Thiophenol, pH = 7 Puffer, 3 d; iii. Glutathion, pH = 7 Puffer, 3 d.

Weitere Hinweise auf den Zeitpunkt der Bioreduktion sollten biochemische Studien mit *A. pretiosum* HGF073 liefern.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass die Verfütterungen von Diketiden (Schema 41),⁹⁵ Triketiden,⁹⁵ Tetraketiden,⁷² sowie *seco*-Proansamitocin⁷⁴ an AHBA-(-)-Blockmutante *Actinosynnema pretiosum* HGF073 zu Ansamitocin P-3 (**22**) führt.

⁹⁵ M. Brünjes, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese und Biosynthese von Maytansinoid-Analoga*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2006**.



Schema 41: Fütterungsstudien mit Diketid **115**.

Das bedeutet, dass die Biosynthesemaschinerie in der Lage ist, die fortgeschrittenen Intermediate zu erkennen, auf die PKS zu transferieren und anschließend vollständig zum Naturstoff **22** zu prozessieren. Für die biochemischen Studien zur Bestimmung des Zeitpunktes der Bioreduktion von Aziden wurden deshalb Diketide als Biosynthesevorläufer gewählt.

Zu einem umfasst die Synthese der Diketide weniger als 10 Stufen und diese Verbindungen sind einfacher handzuhaben, als z. B. *seco*-Proansamitocin. Andererseits ist die Akzeptanz der früheren Biosyntheseintermediaten durch *A. pretiosum* HGF073 deutlich besser als der späteren Biosynthesevorläufer.

4.2.2 Synthese der Diketide

Für die biochemischen Studien der Azidreduktion wurden Diketide **116** und **117** hergestellt (Abbildung 22).

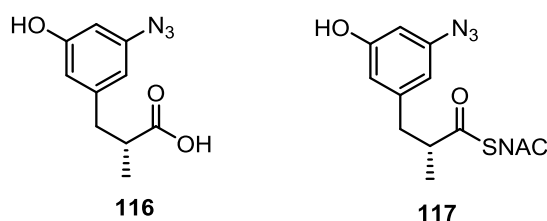
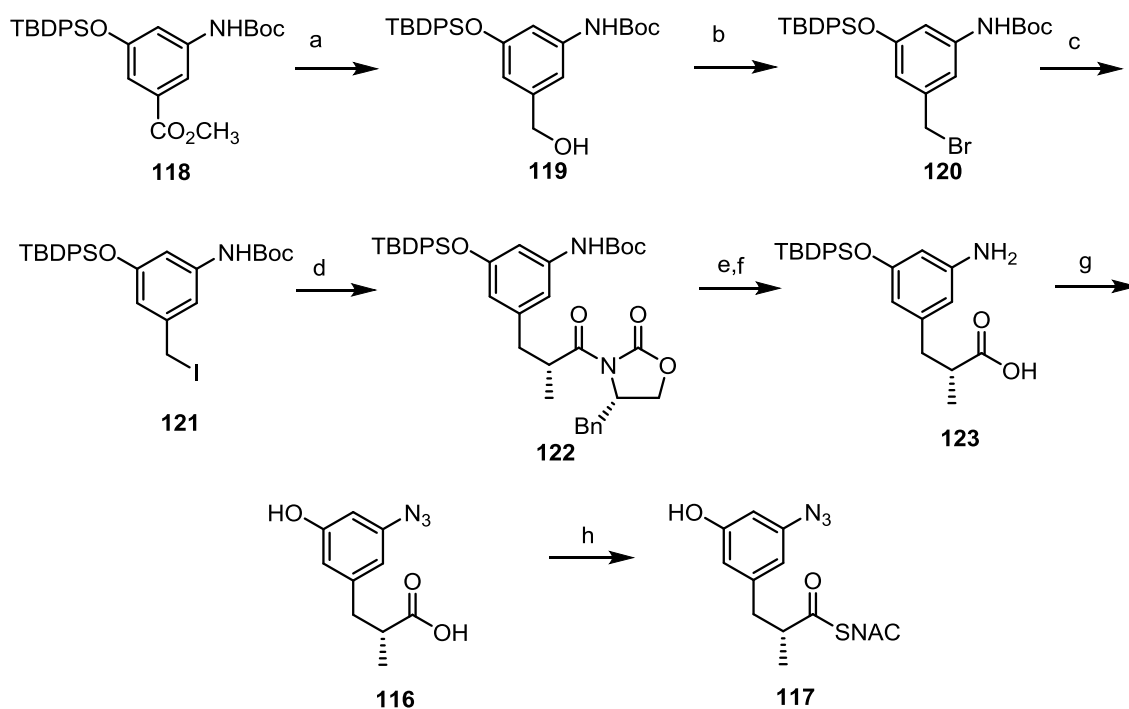


Abbildung 22: Diketide für die Verfütterung an *A. pretiosum* HGF073.

Die Synthese von 3-Azidodiketid **117** erfolgte nach der in Schema 42 gezeigten Sequenz. Zunächst wurde die Reduktion des Esterrestes von **118** mit DIBAL zum Benzylalkohol **119** durchgeführt und anschließend erfolgte eine APPEL-Reaktion zum Benzylbromid **120**, welches durch eine FINKELSTEIN-Reaktion in Benzyljodid **121** überführt wurde (Schema 42).

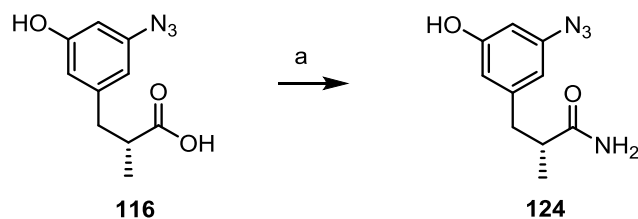
Letzlich wurde die EVANS-Alkylierung zum Aufbau des stereogenen Zentrums durchgeführt. Das Abspalten des EVANS-Auxiliars und die Entschützung der Boc-Gruppe lieferte Anilin **123**, welches durch Diazotierung in Azid **116** überführt wurde. Durch stark saure Bedingungen wurde die TBDPS-Schutzgruppe abgespalten. Durch Kupplung mit Acetylcysteinin wurde AHBA-Derivat **117** in einer guten Ausbeute erhalten.



Schema 42: Synthese von Azid **117**. Bedingungen: a) DIBAL, THF, $-78 \rightarrow 0$ °C, 98 %; b) PPh_3 , CBr_4 , CH_2Cl_2 , RT, 30 Min, 88 %; c) NaI, Aceton, RT, 30 Min, 98 %; d) (*S*)-Oxalidinon, LDA, THF, -78 °C \rightarrow -40 °C, 3h, 77 %; e) H_2O_2 , LiOH, 0 °C \rightarrow RT, THF:H₂O = 4:1, 97 %; f) TFA, CH_2Cl_2 , RT, 92 %; g) HCl (2N), NaNO_2 , H₂O, MeOH, NaN_3 , -3 °C, 52 %; h) DCC, DMAP, *N*-Acetylcysteinin, Acetonitril, RT, 60 %.

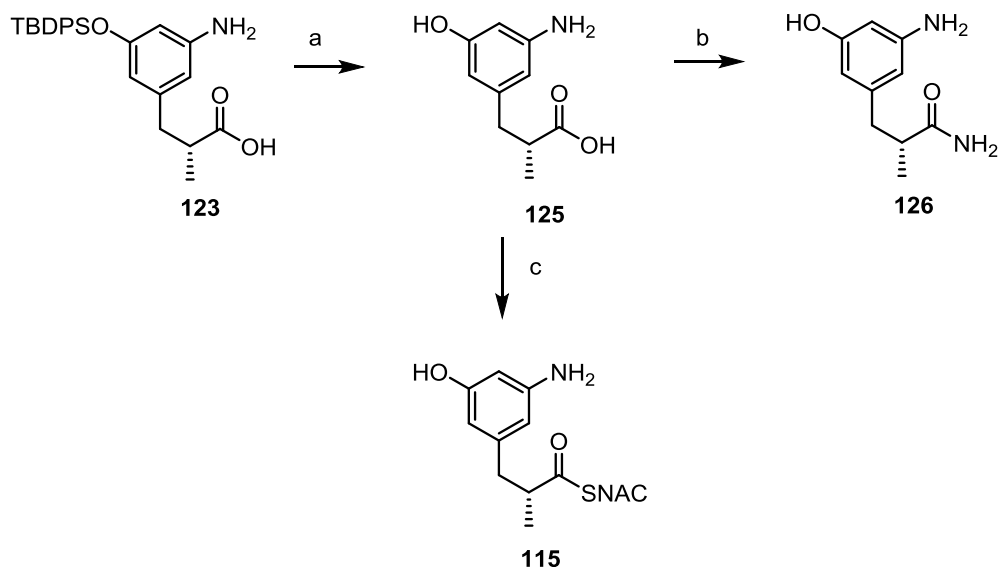
Es ist bekannt, dass die Biosynthesevorläufer als Säure oder als Thioester vorliegen sollten, um von der Biosynthesemaschinerie akzeptiert, auf die PKS geladen und zum Naturstoff prozessiert zu werden. Die amidischen Intermediate werden als mögliche PKS-Vorläufer nicht erkannt und können somit als eine negative Kontrolle in Studien der Biosynthese verwendet werden, um z. B. ein falsch positives Ergebnis auszuschließen.

Die Synthese des Amid-Diketids **124** (Schema 43) erfolgte durch Umsetzung von Säure **116** zum Amid **124** in quantitativer Ausbeute. Diketid **124** sollte nach den Fütterungsstudien weitere Hinweise über den Zeitpunkt der Azidreduktion geben.



Schema 43: Synthese des Amides **124**. Bedingungen: a) Et₃N, Ethylchloroformiat, NH₃, THF, -10 °C → RT, 48 h, quant.

Obwohl biochemische Studien mit AHBA-Diketiden bereits im Arbeitskreis erfolgreich durchgeführt wurden, sollten diese Verbindungen erneut synthetisiert und an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert werden (Schema 44). Die Fermentation mit AHBA-Diketiden wurde als positive Kontrolle für den Nachweis der Stammaktivität betrachtet.



Schema 44: Synthese von den AHBA-Diketiden **115** und **126**. Bedingungen: a) TBAF, THF, RT, 24 h, 75 %; b) Et₃N, Ethylchloroformiat, NH₃, THF, -10 °C → RT, 48 h, 38 %; c) DCC, DMAP, *N*-Acetylcysteamin, Acetonitril, RT, 30 %.

Für die biochemischen Studien der Azidreduktion wurden alle synthetisierten Diketide an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert.

4.2.3 Mutasynthese mit Diketiden

Für die mutasynthetischen Experimente standen sechs durch Synthese erhaltenen Diketide, dargestellt in Abbildung 23, zur Verfügung. Die Fütterungsexperimente wurden in 37.5 mL-Maßstab durchgeführt. Bei der Fermentation mit Diketiden wurden zusätzlich eine AHBA- und eine Blindprobe zur Kontrolle der Aktivität des Stammes parallel verfüttert. Die Diketide wurden in 2 mL DMSO:Wasser-Gemisch (1:1) gelöst und portionsweise nach 48, 72 und 96 Stunden den Kulturen zugeführt. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Kulturen in der Zentrifuge je dreimal mit Ethylacetat extrahiert.

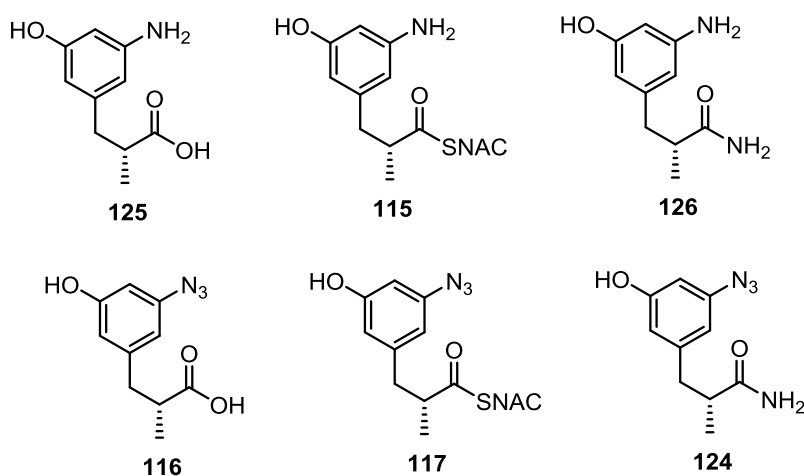
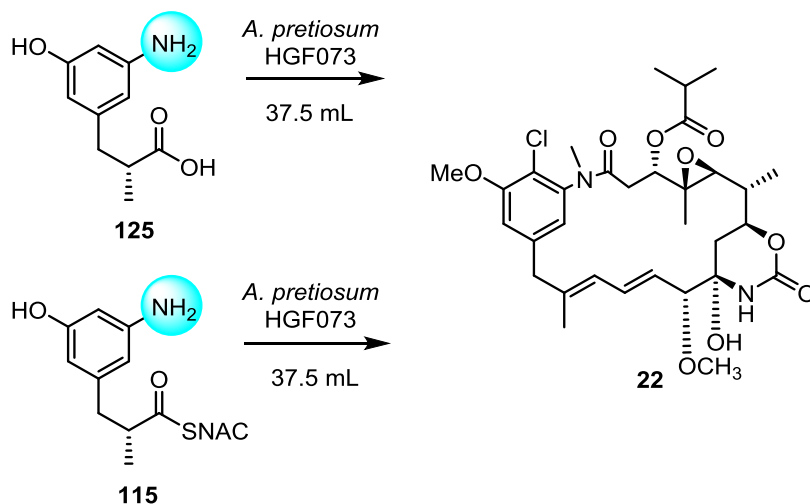


Abbildung 23: Synthetisierte Diketide für die Komplementierungsexperimente mit *A. pretiosum* HGF073.

Alle Fermentationen wurden aus dem Rohextrakt massenspektrometrisch auf die Bildung von Ansamitocin P-3 (**22**) untersucht. Die Verfütterungsexperimente mit AHBA-Diketiden **115** und **125** wurden bereits von MARCO BRÜNJES in seiner Doktorarbeit⁹⁵ durchgeführt. Das Wiederholen von diesem Experiment im Rahmen dieser Arbeit wurde als positive Kontrolle betrachtet.

Das Ergebnis der Fermentation mit den natürlichen AHBA-Diketiden **115** und **125** ist in Schema 45 gezeigt. Die massenspektrometrische Untersuchung der Rohextrakte gab erste Hinweise auf die Bildung von Ansamitocin P-3 (**22**).



Schema 45: Fermentationsexperimente mit AHBA-Diketiden **115** und **125**.

Durch Vergleich der Retentionszeiten (Abbildung 24) und der Massenspuren für Ansamitocin P-3 (**22**) ($t_R = 2.48$, m/z für $[M+H]^+ = 635.2735$) der AHBA-Kultur (positive Kontrolle) und der Diketid-Säure **125** konnte eindeutig die Bildung von AP-3 **22** nachgewiesen werden. Das SNAC-Diketid **115** wurde in geringem Maß akzeptiert, allerdings die durchgeführte MS/MS-Untersuchung bestätigte die Bildung von Ansamitocin P-3 (**22**) in sehr geringer Ausbeute. Das Amiddiketid **126**, wie zu erwarten war, wurde zu nicht AP-3 **22** prozessiert.

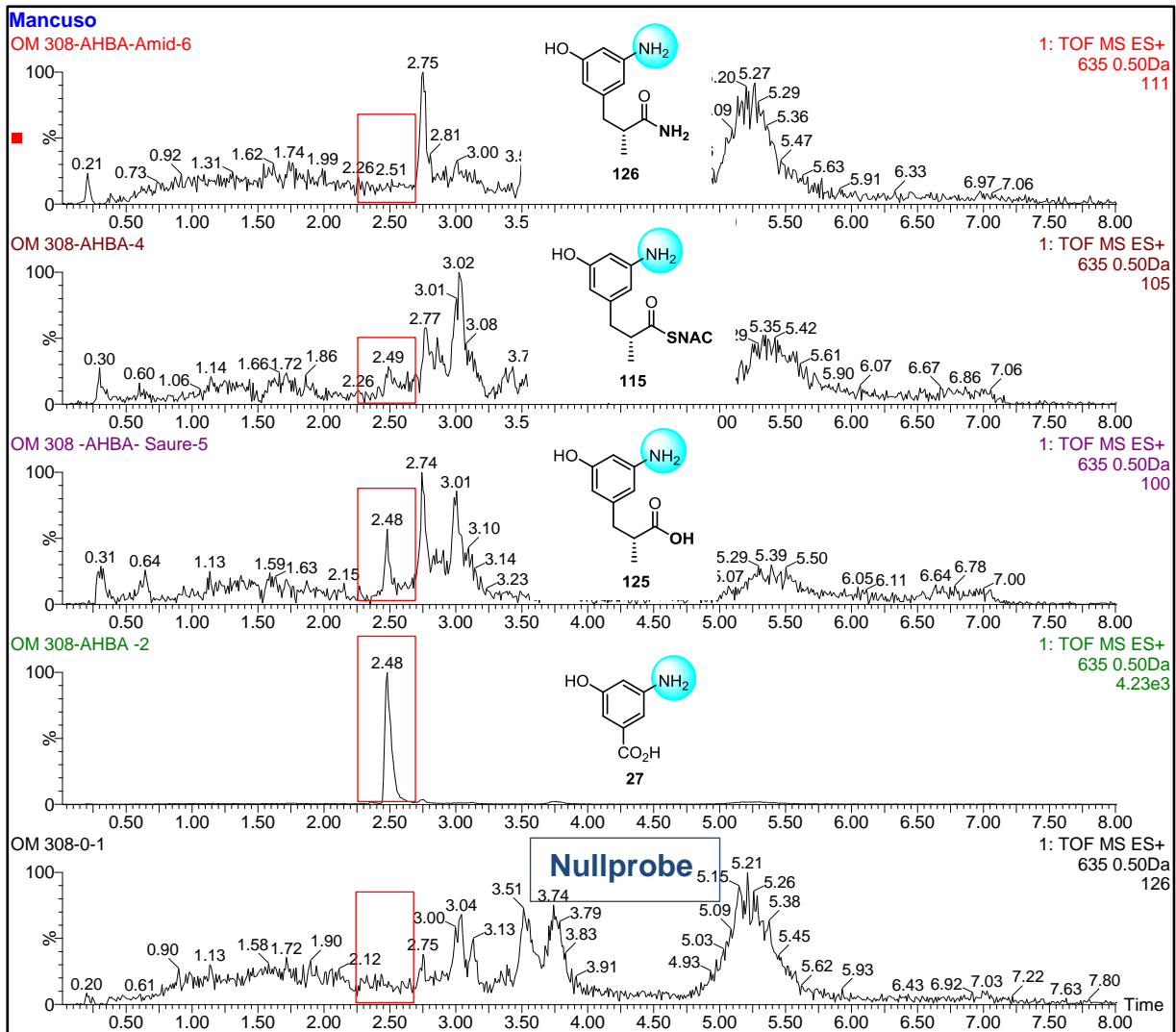
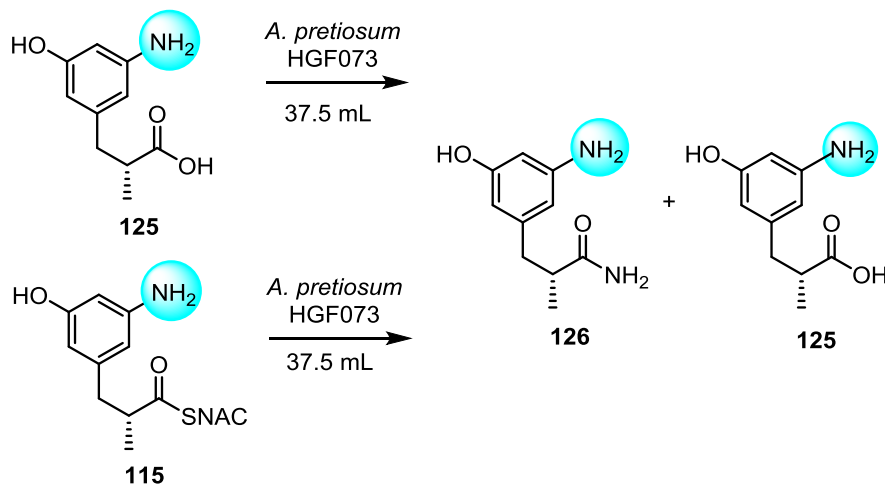


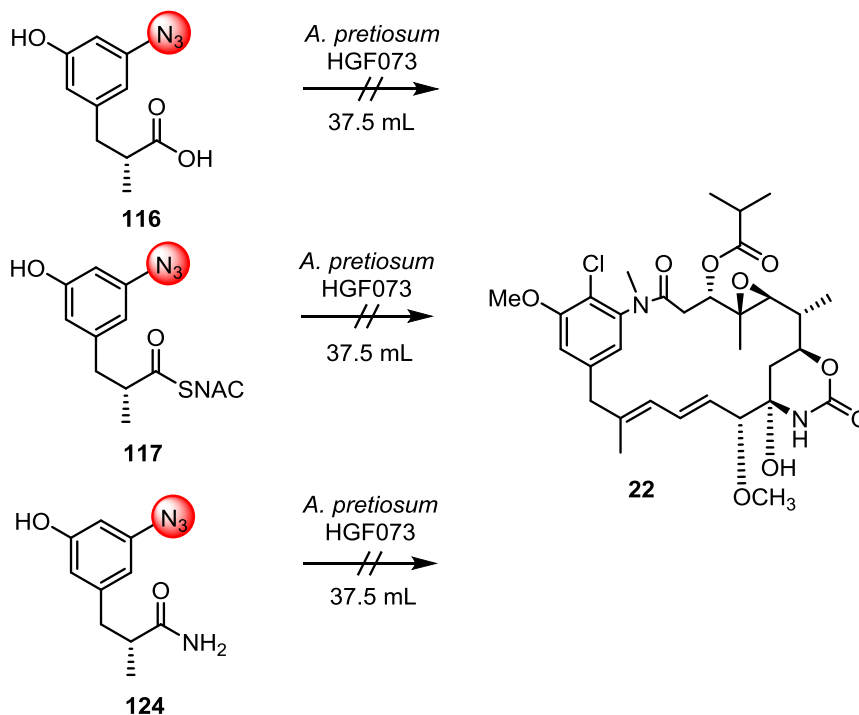
Abbildung 24: UPLC/MS-Diagramm für die Fermentationsexperimente mit AHBA-Diketiden.

Des Weiteren wurden die Rohextrakte von **125** und **115** nach Detoxifizierungsprodukten untersucht (Schema 46). Die massenspektrometrische Analyse gab in beiden Fällen Hinweise auf die Bildung von Diketiden **125** und **126** als Detoxifizierungsprodukte.



Schema 46: Fermentation mit AHBA-Diketiden **125** und **115**.

Die Verfütterungsexperimente mit Azido-Diketiden **116**, **117** und **124** sind in Schema 47 zusammengefasst.



Schema 47: Fermentation mit AHBA-Diketiden **116**, **117** und **124**.

Laut UPLC-MS-Analytik (Abbildung 25) der Rohextrakte wurde keine Produktion des Naturstoffes **22** beobachtet.

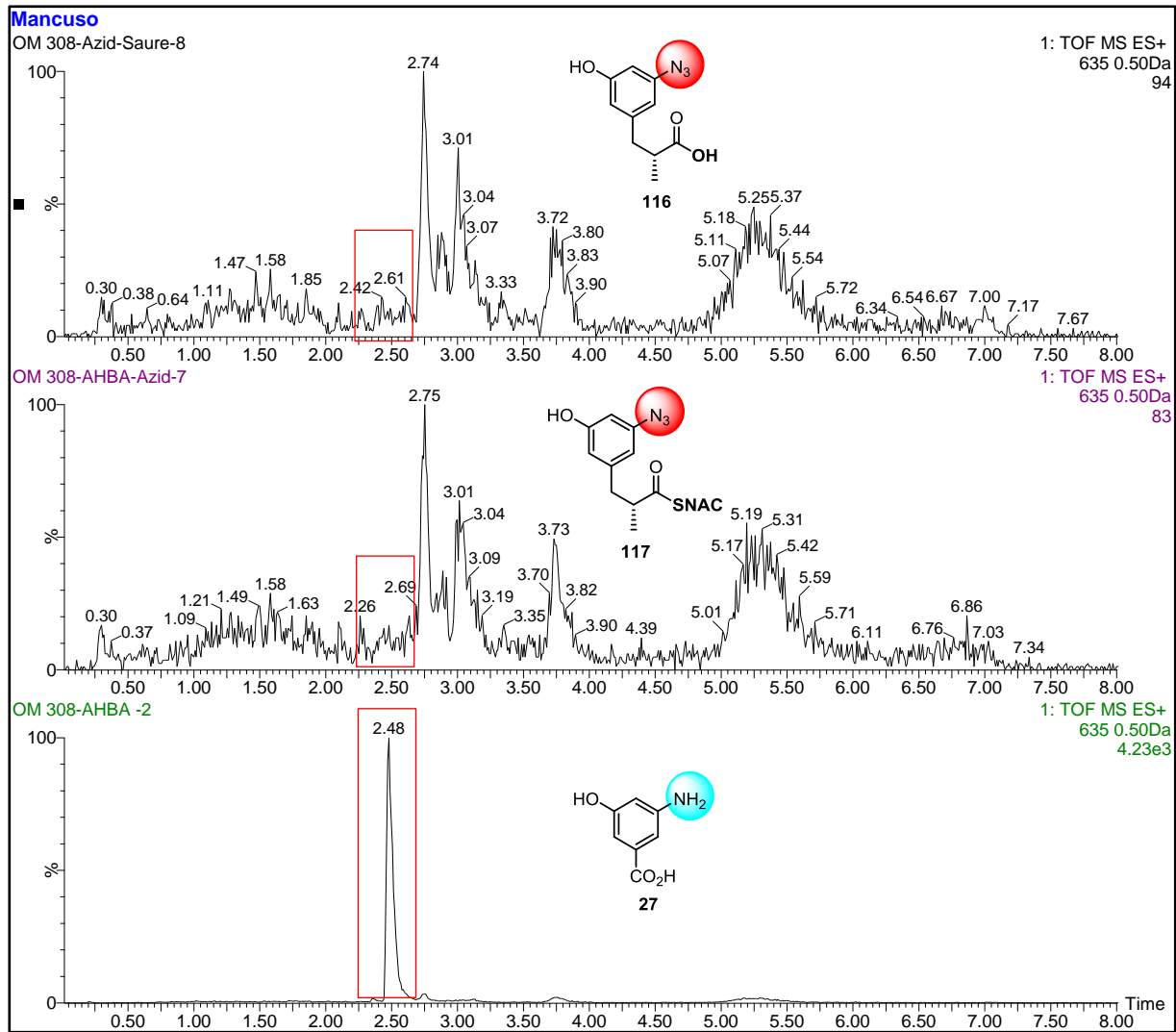
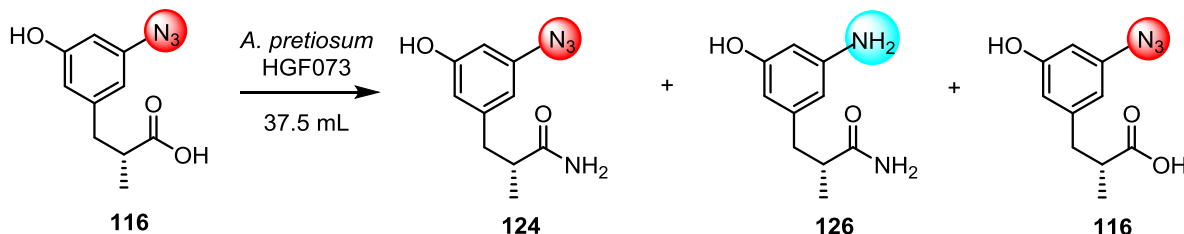


Abbildung 25: UPLC/MS-Diagramm für die Fermentationsexperimente mit AHBA-Azido-Diketiden.

Mit diesem Experiment wurden weitere Hinweise gesammelt, dass die Azidreduktion nicht auf der PKS stattfindet. Außerdem deutet das Nicht-beladen von Azid-Diketiden auf die Polyketidsynthase darauf hin, dass die Acyltransferase der modularen PKS Typ I hochspezifisch ist, eine mit Azid maskierte Aminogruppe nicht erkennt und deswegen das Azid-Diketid als potentielle Startereinheit nicht registriert. Daraus folgt, dass die Aminogruppe von den späteren Biosynthesevorläufern als Erkennungsmuster für das Enzym Acyltransferase essentiell ist, um in die Biosynthese aufgenommen zu werden.

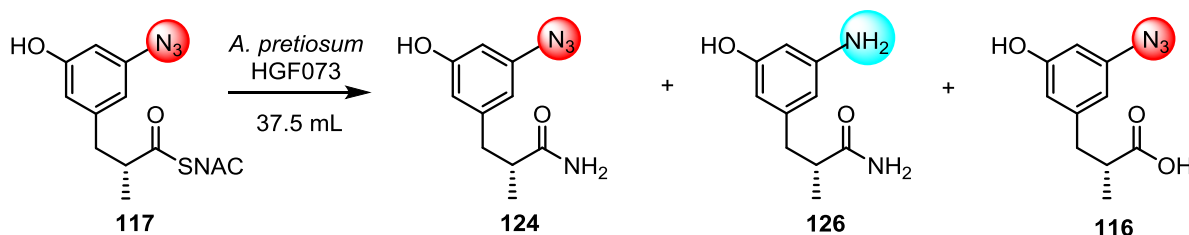
Die weitere massenspektrometrische Untersuchung von Rohextrakten ergab Hinweise auf die Bildung von unterschiedlichen Detoxifizierungsprodukten, in denen die Azidogruppe teilweise reduziert war. Zum Nachweis der Azidreduktion in den Detoxifizierungsprodukten wurde entschieden, diese zu isolieren.

Die Mutasyntese mit Aziddiketid **116** lieferte 0.8 mg Methylpropanamid **126** (4 μmol , 9 %). Außerdem wurden 0.7 mg Methylpropionsäure **116** (3 μmol , 6 %) reisoliert und in Spuren die Bildung von Amid **124** massenspektrometrisch nachgewiesen (Schema 48).



Schema 48: Mutasynthese mit Azidodiketid **116**.

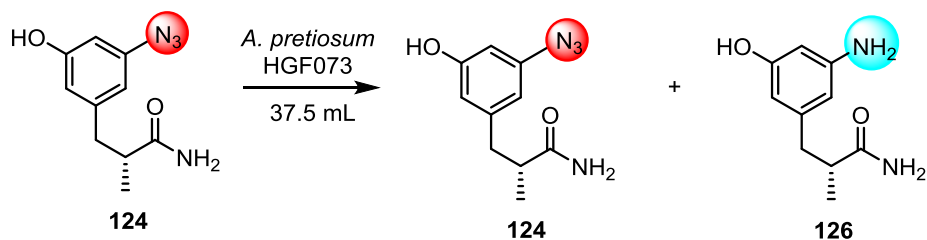
Bei der Fermentation des Azid-Diketid-SNAC-Esters **117** wurden per UPLC-MS die gleichen Abbauprodukte wie bei der Verfütterung der Säure **116** detektiert (Schema 49). Das bekräftigt die Tatsache, dass es keinen Unterschied in der Aufnahme der Mutasyntese als Säure oder als SNAC-Ester durch den Organismus gibt.



Schema 49: Verfütterung von Aziddiketid **117** an *A. pretiosum* HGF073.

Aus diesem Experiment folgte, dass die Geschwindigkeit der Detoxifizierung von Startereinheiten schneller als die Reduktion zum Amin ist.

Die Supplementierung von Azidamid **124** sollte weitere Hinweise über den Zeitpunkt der Azidreduktion geben, denn die synthetisierte Startereinheit wird als Amid nicht auf die PKS geladen und somit kann es das Resultat der stattfindenden Reduktion nicht verfälschen. Das Fazit dieser Fermentation ist in Schema 50 zusammengefasst. Mittels präparativer HPLC konnten 1.3 mg Azidoamid **124** (6 μmol , 19 %) reisoliert und 2.0 mg Aminoamid **126** (10 μmol , 32 %) isoliert werden.

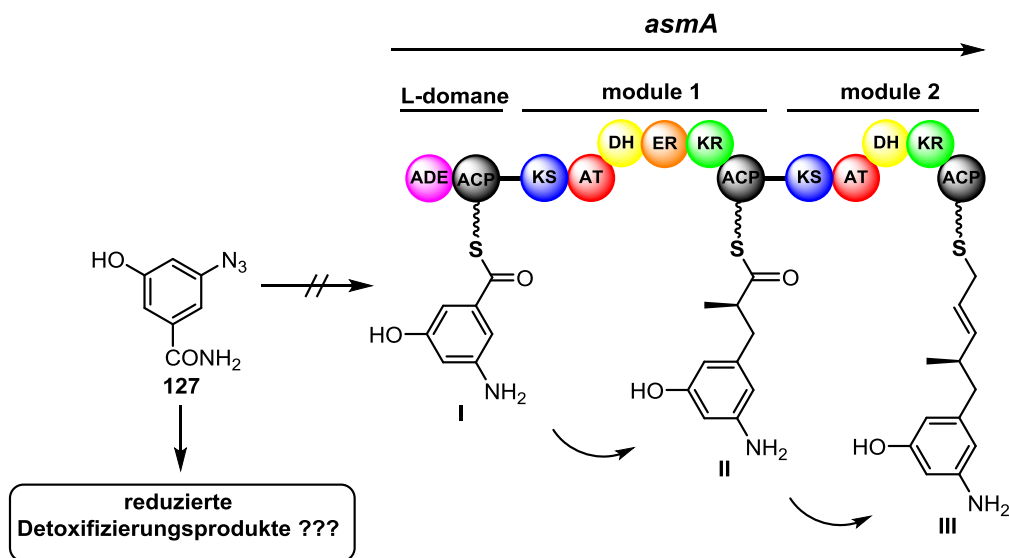


Schema 50: Fermentation von Azidamid **124** an *A. pretiosum* HGF073.

Die biochemischen Studien mit Diketiden und die isolierten Detoxifizierungsprodukte bekräftigen die Aussage, dass die Azidreduktion nicht auf der PKS stattfindet. In den nachfolgenden Studien sollten die frühen Schritte der Biosynthese in Bezug auf die Azidreduktion untersucht werden.

4.2.4 Synthese des modifizierten AHBA-Amides

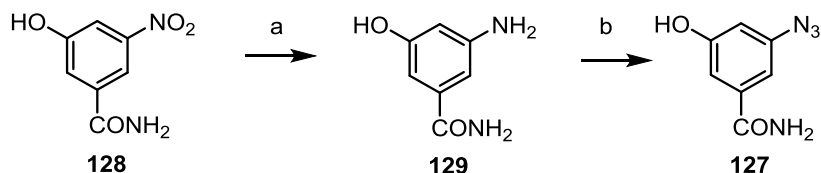
Für die Bestätigung der Aussage, dass die Azidreduktion vor dem Aufladen auf die PKS stattfindet, wurde das Amid **127** hergestellt und an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert. Da das Benzamid **127** nicht auf die PKS aufgeladen werden kann, sollte besonders auf die Reduktion der Azidogruppe und die entstehenden Abbauprodukte geachtet werden (Schema 51).



Schema 51: Komplementierungsexperimente mit Azidbenzamid **127**.

Die Synthese des Amids **127** erfolgte ausgehend von dem im Arbeitskreis KIRSCHNING bereits vorhandenen Nitroamid **128** nach der in der Schema 52 dargestellten Methode. Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit Zinn(II)chlorid verlief leider nur in einer geringen

Ausbeute von 15 %. Da aber die Ausgangsverbindung **128** für die Optimierungsreaktionen nicht in ausreichender Menge vorlag, wurde auf eine Wiederholung dieses Schrittes verzichtet. Die nachfolgende Diazotierung lieferte das Azid **127** in einer Ausbeute von 68 % (Schema 52).



Schema 52: Synthese von 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**). Bedingungen: a) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EtOH, 70 °C, 6 h, 15 %; b) HCl (2M), NaNO_2 , NaN_3 , H_2O , -3 bis -7°C, 12 h, 68 %.

4.2.5 Mutasynthese mit 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**)

Die Mutasynthese mit Benzamid **127** sollte weitere Hinweise über den Zeitpunkt der Azidreduktion liefern. Das Verfütterungsexperiment wurde in 37.5 mL-Maßstab durchgeführt. Bei der Fermentation mit Benzamid **127** wurde parallel eine AHBA- und eine Blindprobe zur Kontrolle der Aktivität des Stammes verfüttert. 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**) wurde in 2 mL DMSO:Wasser-Gemisch (1:1) gelöst und portionsweise nach 48, 72 und 96 Stunden den Kulturen zugeführt. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Kulturen in der Zentrifuge je dreimal mit Ethylacetat extrahiert.

Die massenspektrometrische Untersuchung des Rohextraktes ergab Hinweise auf die Bildung von unterschiedlichen Detoxifizierungsprodukten (Abbildung 26), in denen die Azidogruppe teilweise reduziert worden war.

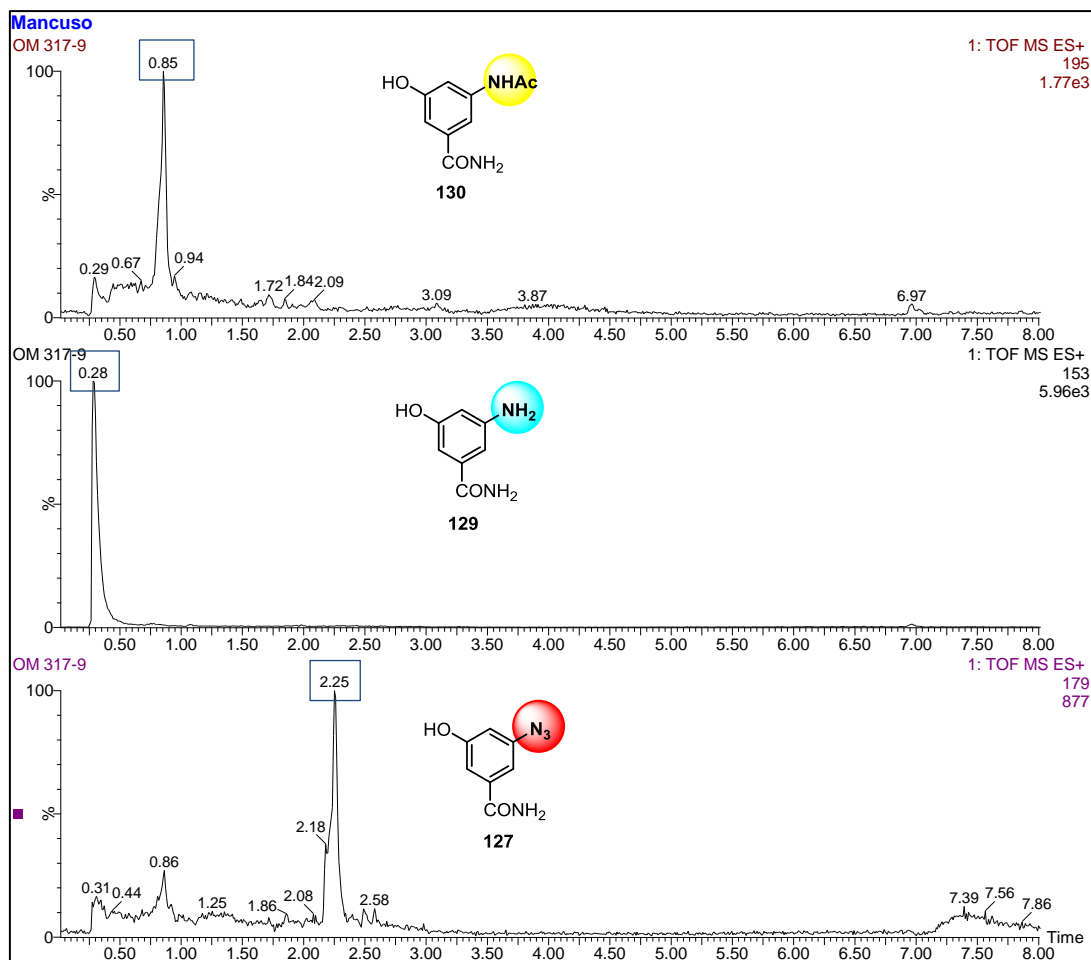
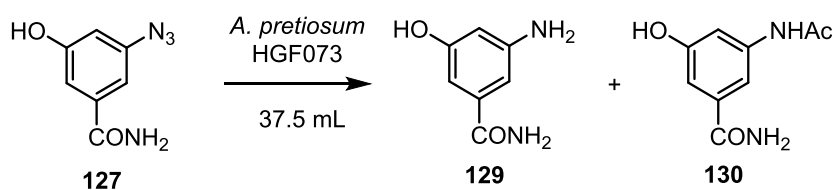


Abbildung 26: UPLC-Diagramme der Fermentation mit 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**).

Zum Nachweis der Azidreduktion in den Detoxifizierungsprodukten wurde entschieden, alle Verbindungen zu isolieren. Das Fazit von diesem Fermentationsexperiment ist im Schema 53 zusammengefasst.



Schema 53: Fermentation mit 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**).

Mit Hilfe einer semipräparativer HPLC-Trennung konnten Acetat **130** (1.0 mg, 5.15 μmol , 8 %) und Aminoamid **129** (8.5 mg, 56 μmol , 83 %) isoliert werden. Das Edukt **127** war nur in Spuren vorhanden.

Zusammenfassend konnte durch die Komplementierungsexperimente mit Diketiden **116**, **117**, **124** und dem Benzamid **127** die Bioreduktion der Azidogruppe bestätigt werden. Derzeit beschäftigt sich GERRIT JÜRJENS mit Studien zur Identifizierung und Isolierung des Enzyms mit Azidreduktase-Aktivität.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aminogruppe von den späteren Biosynthesevorläufern als Erkennungsmuster für die Acyltransferase essentiell ist, um auf die PKS aufgeladen zu werden.

4.3 Muta- und semisynthetische Zugänge zu Tumor-adressierenden Konjugaten der Ansamitocine

In den einleitenden Kapiteln wurde die mutasynthetische Darstellung neuer Ansamitocin-Konjugate vorgestellt. Da das Umstellen der Strategie bei der Fermentation der Azide nicht zu den gewünschten Derivaten geführt hat, sollten die bereits bekannten Wege genutzt werden, Bromansamitocine fermentativ darzustellen und weiter zu den Furfuryl-Konjugaten umzusetzen. Die somit erhaltenen Konjugate sollten anschließend für das Konzept des Wirkstofftransportes mittels Nanopartikel getestet werden.

In diesem Kapitel sind die ersten Ergebnisse für die muta- und anschließend semisynthetischen Darstellungen solcher Konjugate aus Ansamitocinen zusammengefasst.

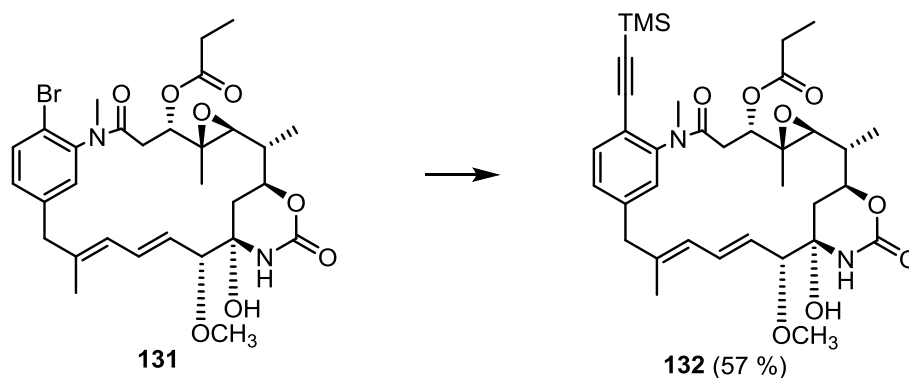
4.3.1 Vorarbeiten

Die bromierten Ansamitocin-Derivate eignen sich insbesondere für die semisynthetische Derivatisierung unter milden Bedingungen. Die erste Palladium-katalysierte STILLE-Kreuzkupplung in der Synthese von Folatkonjugaten aus Ansamitocinen wurde von FLORIAN TAFT erfolgreich durchgeführt.⁷² Bei der STILLE-Reaktion werden unterschiedliche funktionelle Gruppen in hohem Maße toleriert. Der Nachteil dieser Kreuzkupplung ist die höhere Toxizität von Organozinnverbindungen gegenüber Metallen in anderen Kreuzkupplungsreaktionen. Obwohl die Reinigung von Konjugaten und die Abtrennung von Zinnresten mittels HPLC realisiert werden kann, sollte eine andere Methode zur Herstellung von neuen Konjugaten aus Ansamitocinen entwickelt werden.

Die SONOGASHIRA-Kupplung hat sich als elegante Synthesemethode zur Bildung von sp^2 - sp -Bindungen erwiesen. Terminale Alkine reagieren mit Arylhalogeniden unter Knüpfung einer

neuen Bindung in Gegenwart einer katalytischen Menge von Pd- und Cu-Quelle und einer Base.

Die grundlegenden Arbeiten von SONIA MAYER⁹⁶ lieferten bereits ein Beispiel für eine erfolgreiche Konjugation des durch Mutasythese erzeugten Bromansamitocins **131** mit einem Alkin unter SONOGASHIRA-Reaktionsbedingungen (Schema 54).



Schema 54: SONOGASHIRA-Kreuzkupplung mit Ansamitocin-Derivat **131**.

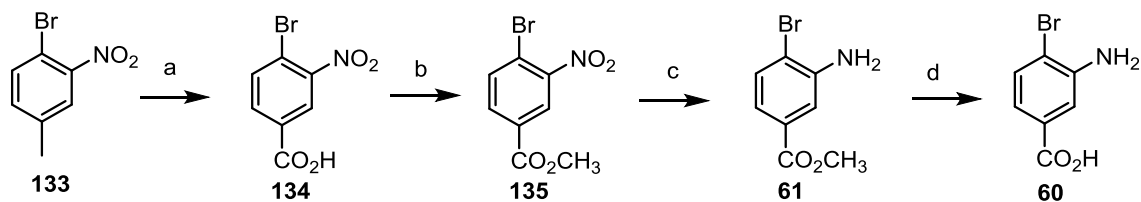
Obwohl die Kreuzkupplung unter milden Bedingungen gut funktioniert hat, scheiterten alle Versuche bei der Entschützung des Alkins.

4.3.2 Mutasythetische Zugänge zu den Ansamitocin-Derivaten

Für die erfolgreiche Realisierung der SONOGASHIRA-Kupplung wurde mit der Synthese der 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**) begonnen, welche an den genetisch manipulierten Stamm HGF073 verfüttert werden sollte. 3-Aminobenzoesäure **60** wurde nach der von FLORIAN TAFT entwickelten Methode⁷² aus 4-Brom-3-nitrotoluol (**133**) dargestellt (Schema 55).

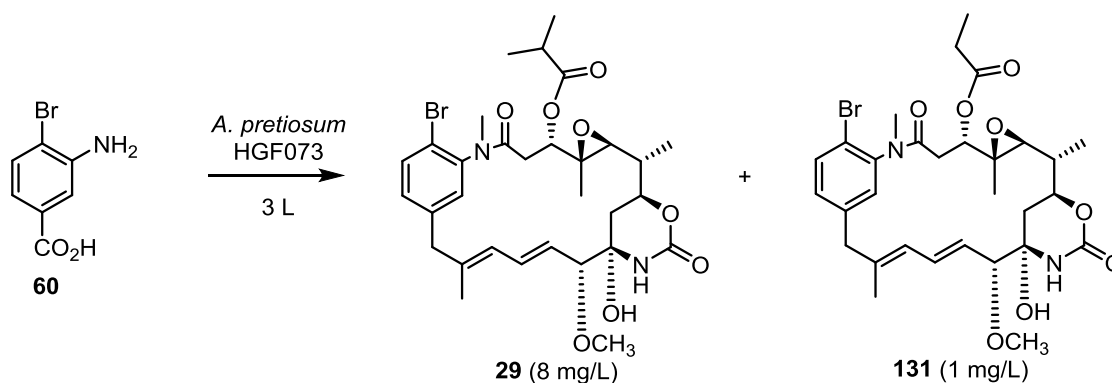
Die Ausgangsverbindung für das Mutasytheton **60** ist kommerziell erhältliches Bromnitrotoluol **133**, welches durch benzyliche Oxidation mit Kaliumpermanganat unter leicht basischen Bedingungen zur Nitrobenzoesäure **134** umgesetzt wurde. Die Ausbeute betrug 19 %, jedoch konnten 50 % des Eduktes **133** reisoliert werden. Die Veresterung und anschließende Reduktion der Nitrogruppe mit Zinnchlorid lieferte Methylester **61** in guter Ausbeute von 89 %. Der hergestellte Methylester **61** wurde mit LiOH (1M) hydrolysiert und stand anschließend als Mutasytheton **60** zur Verfügung.

⁹⁶ S. Mayer, Diplomarbeit, *Synthesen spezifisch Tumor-adressierender Ansamitocin-Konjugate*, Leibniz Universität Hannover, Hannover **2009**.



Schema 55: Synthese der Aminobenzoesäure **60**. Bedingungen: a) KMnO_4 , Na_2CO_3 , H_2O , Δ , 24 h, 19 %; b) AcCl , MeOH , Δ , 24 h, 98 %; c) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EtOAc , Δ , 3 h, 89 %; d) LiOH (1M), MeOH , 25°C , 24 h, 97 %.

Die Verfütterung von 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**) geschah kontinuierlich mittels Spritzenpumpe und lieferte hauptsächlich das gewünschte AP-3 Derivat **29** (25 mg, 8 mg/L), welches nach Reinigung mittels präparativer HPLC für die folgende Pd-Kreuzkupplung zur Verfügung stand (Schema 56). Außerdem wurde das AP-2 Derivat **131** (3 mg, 1 mg/L) für die Nutzung in Testreaktionen isoliert und charakterisiert.

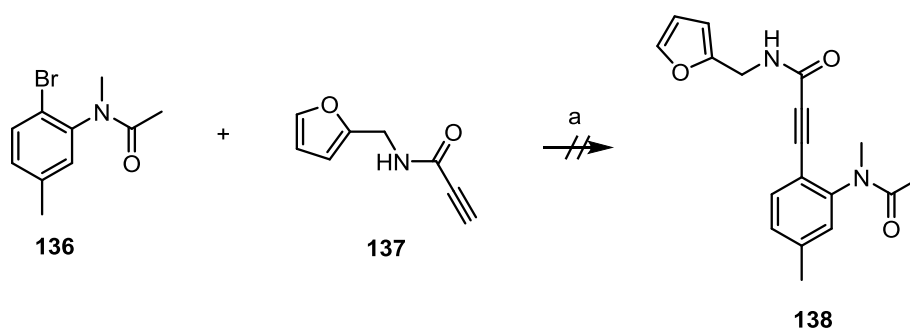


Schema 56: Mutasynthese mit 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**).

4.3.3 Semisynthetische Studien zu Konjugaten aus Ansamitocinen

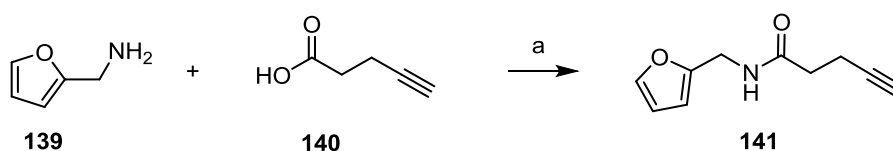
Bevor die SONOGASHIRA-Kupplung am Brom-Derivat durchgeführt wurde, wurde die Pd-katalysierte Kreuzkupplung an einem Testsystem **136** erprobt (Schema 57). Der von LENA MÖLLER⁹⁷ entwickelte Amidlinker **137** erwies sich allerdings als instabil und die ersten Testreaktionen lieferten kein positives Ergebnis.

⁹⁷ L. Möller, Dissertation, *Funktionalisierung von Oberflächen und Hyaluronsäure-basierte Hydrogele für die Anwendung in der Regenerativen Medizin*, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2012.



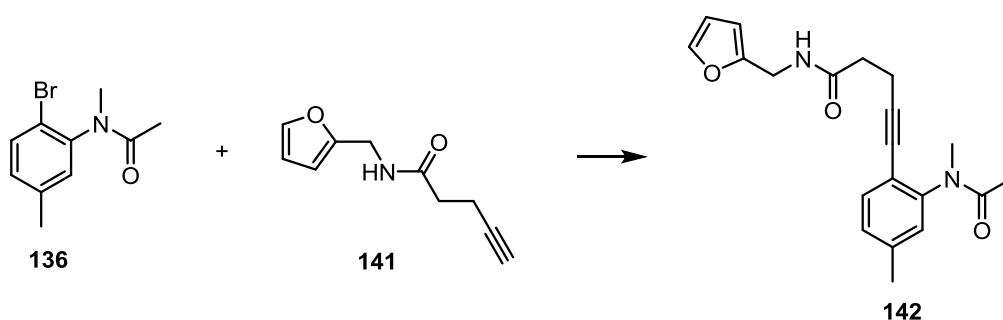
Schema 57: Testreaktion für die SONOGASHIRA-Kreuzkupplung. Bedingungen: a) Pd(PPh₃)₄, TEA, CuI, 100 °C, 24 h.

Die Erweiterung der Propionsäure um zwei Kohlenstoffatome sollte für die Stabilität des Linkers **141** sorgen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Synthese des für die SONOGASHIRA-Kupplung benötigten Bausteins **141** in einer guten Ausbeute von 92 % durchgeführt werden (Schema 58).



Schema 58: Synthese des Linkers **141**. Bedingungen: a) EDCI·HCl, HOBT, TEA, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 20 h, 92 %.

Der synthetisierte Baustein **141** wurde mit dem Bromaromaten **136** für die Pd-Kreuzkupplung getestet (Schema 59).



Schema 59: Testreaktion für die SONOGASHIRA-Kupplung.

Die erprobten Bedingungen sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. In allen durchgeführten Reaktionen konnte das Edukt reisoliert werden. Die Versuche zur Synthese des Aromaten **142** unter den angegebenen Bedingungen (Tabelle 2, Eintrag 1, 4, 5) schlugen allerdings fehl.⁹⁸

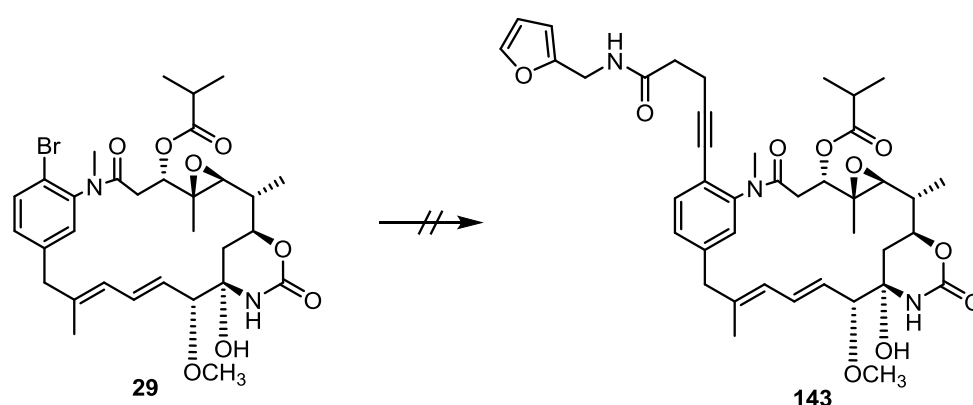
⁹⁸ a) P. N. Wyrembak, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4566-4567; b) J. Panteleev, K. Geyer, A. Aguilar-Aguilar, L. Wang, M. Lautens, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5092-5095; c) K. Kinoshita, K. Asoh, N. Furuichi,

Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnte die Produktbildung in Spuren nachgewiesen werden (Tabelle 2, Eintrag 2, 6). Erst durch Erniedrigung der Reaktionstemperaturen konnte das Kreuzkupplungsprodukt **142** isoliert werden (Tabelle 2, Eintrag 7-9). Obwohl bei keinem der erprobten Beispiele ein kompletter Umsatz beobachtet wurde, wurde entschieden, die Bedingungen (Tabelle 2, Eintrag 9) direkt am Naturstoff durchzuführen.

Tabelle 2: Getestete Bedingungen für die SONOGASHIRA-Kreuzkupplung mit 2-Brom-5-methylphenyl-*N*-methylacetamid (**136**).

Eintrag	Reagenzien	Bedingungen	Ausbeute	Anmerkung
1	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂ , CuI	TEA, 80 °C, 24 h	-	95 % Edukt reisoliert
2	Pd(PPh ₃) ₄ , CuI	TEA, 80 °C, 24 h	Spuren	82 % Edukt reisoliert
3	Pd(<i>Pt</i> -Bu ₃) ₂ , CuI	TEA, 80 °C, 24 h	9 %	82 % Edukt reisoliert
4	Pd(<i>Pt</i> -Bu ₃) ₂ , CuI	TEA, 100 °C, 24 h	-	90 % Edukt reisoliert
5	Pd(PPh ₃) ₄ , CuI	TEA, 100 °C, 24 h	-	90 % Edukt reisoliert
6	Pd(PPh ₃) ₄ , CuI	<i>i</i> -Pr ₂ NH, 65 °C, 24 h	Spuren	10 % Edukt reisoliert
7	Pd(<i>Pt</i> -Bu ₃) ₂ , CuI	<i>i</i> -Pr ₂ NH, 65 °C, 24 h	11 %	89 % Edukt reisoliert
8	Pd(PPh ₃) ₄ , CuI	Et ₂ NH, RT, 24 h	22 %	80 % Edukt reisoliert
9	Pd(<i>Pt</i>-Bu₃)₂, CuI	Et₂NH, RT, 24 h	25 %	75 % Edukt reisoliert

Es stellte sich heraus, dass die Reaktion unter Verwendung von Pd(*Pt*-Bu₃)₂, Cu(I)I und Et₂NH bei Raumtemperatur zur Zersetzung des Naturstoffes führte (Schema 60).



Schema 60: Versuchte semisynthetische Derivatisierung des Bromids **29** durch die SONOGASHIRA-Kupplung.

Der Wechsel des Katalysators, die Veränderung der Temperatur, der Reaktionszeit, des Lösungsmittels und der Base führten in weiteren Optimierungsstudien nicht zum gewünschten

Derivat **143** (Tabelle 3). Unter Verwendung von $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ als Katalysator, CuI als Zusatz, Et_3N als Base in THF bei 24 h und 65 °C konnte das Edukt vollständig reisoliert werden (Tabelle 3, Eintrag 6). In allen anderen Fällen wurde die Eduktzersetzung detektiert (Tabelle 3, Eintrag 1-5, 7-10).

Tabelle 3: Getestete Bedingungen⁹⁸ für die SONOGASHIRA-Kreuzkupplung mit Bromansamitocin-Derivat **29**.

Eintrag	Katalysator	Zusätze	Lösungs- mittel	Zeit	Temperatur	Anmerkung
1	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$	CuI , TEA	Toluol	22 h	110 °C	Zersetzung
2	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	CuI , TEA	Toluol	22 h	100 °C	Zersetzung
3	$\text{Pd}(\text{P}t\text{-Bu}_3)_2$	CuI , DEA	THF	24 h	65 °C	Zersetzung
4	$\text{Pd}(\text{P}t\text{-Bu}_3)_2$	CuI , TEA	Toluol	22 h	100 °C	Zersetzung
5	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	CuI , DIPA	THF	24 h	65 °C	Zersetzung
6	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	CuI , TEA	THF	24 h	65 °C	Edukt reisoliert
7	$\text{Pd}(\text{P}t\text{-Bu}_3)_2$	CuI , TEA	THF	24 h	65 °C	Zersetzung
8	$\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$	CuI , TEA	MeCN	24 h	85 °C	Zersetzung
9	$\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$	CuI , TEA	Toluol	24 h	100 °C	Zersetzung
10	$\text{Pd}(\text{P}t\text{-Bu}_3)_2$	CuI , TEA	Toluol	24 h	100 °C	Zersetzung

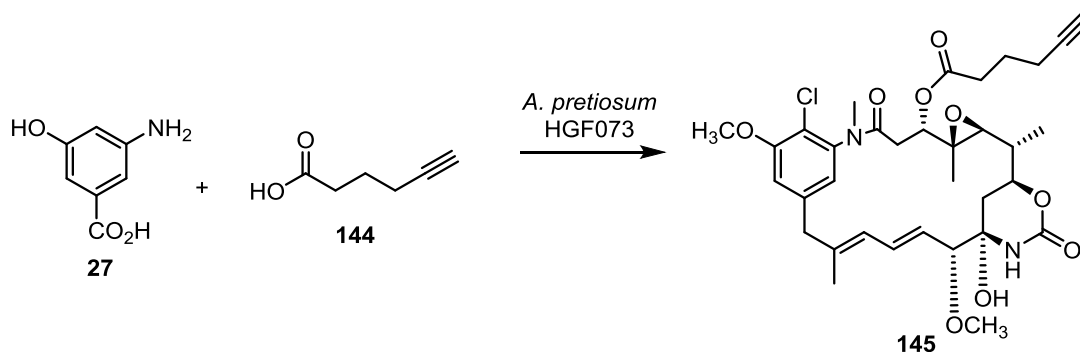
Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der SONOGASHIRA-Ansatz nicht weiter verfolgt und die Strategie zur Erzeugung von Konjugaten auf Ansamitocin-Basis erneuert.

4.3.4 Mutasyntesen mit gezielter Esterseitenkettendirektion

Nach den gescheiterten Versuchen das Furan an dem aromatischen Teil von Ansamitocin-Derivat mittels SONOGASHIRA-Kupplung anzubringen, wurde entschieden eine andere Strategie für die Zugänge zu den Konjugaten aus Ansamitocinen in Betracht zu ziehen. Eine interessante Verknüpfungsstelle zu den Liganden stellte die Esterseitenkette des Naturstoffes dar.

4.3.4.1 Vorarbeiten

Erste Vorarbeiten für die Nutzung der AHBA-(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 für den Einbau der unnatürlichen Esterseitenkette gelang TOBIAS KNOBLOCH (Schema 61).⁷³ Durch zahlreiche Optimierungsstudien mit Zusätzen und Wachstumstimulantien wurde frisches Kokosnusswasser aus jungen Kokosnüssen als effektivstes Additiv für die erfolgreiche Vorläufer-dirigierte Biosynthese der Seitenkette gefunden.



Schema 61: Erstes Mutasyntheseexperiment zur Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten.

Insgesamt stellte sich die Biosynthese unter Esterseitenketteneinbau als äußerst komplex dar. Die Skalierungsstudien für den Fermentationsmaßstab ergaben, dass die bevorzugte Kulturgröße von 50 mL Fermentationsvolumen in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Stahlfeder für die gute Produktion entscheidend ist. Da unter diesen Bedingungen gute Ausbeuten erreicht werden konnten, wurde auf weitere Optimierungen des Fermentationvolumens verzichtet.

4.3.4.2 Synthesen der Esterseitenkettenvorläufer

Furane als funktionelle Gruppen kommen in Naturstoffen sehr häufig vor. Dieser Heterozyklus ist in einer Vielzahl von Naturstoffen von Polyketiden (**148**, Proximicin A)^{99b} bis zu komplexen Terpenen (**146**, (-)-Wistarin)^{99a} und Alkaloiden (**147**, (-)-Securinin)^{99c} enthalten (Abbildung 27). Viele dieser Wirkstoffe besitzen eine hohe biologische Aktivität und wurden bereits in klinischen Studien getestet.⁹⁹

⁹⁹ a) R. P. Gregson, D. Ouvrier, *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 412–414; b) H. P. Fiedler, C. Bruntner, J. Riedlinger, A.T. Bull, G. Knutsen, M. Goodfellow, A. Jones, L. Maldonado, W. Pathomaree, W. Beil, K. Schneider, S. Keller, R. D. Süsmuth, *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 158-163; c) K. C. Majumdar, S. K. Chattopadhyay, *Heterocycles in Natural Product Synthesis* **2011**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 1-637; d) R. E. Minto, B. J. Blacklock, *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 233-306.

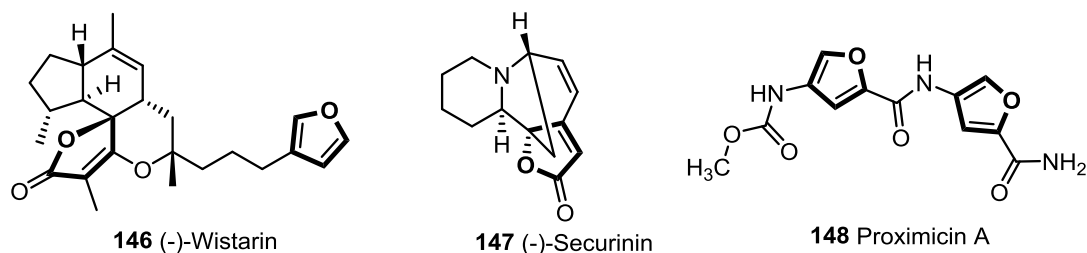
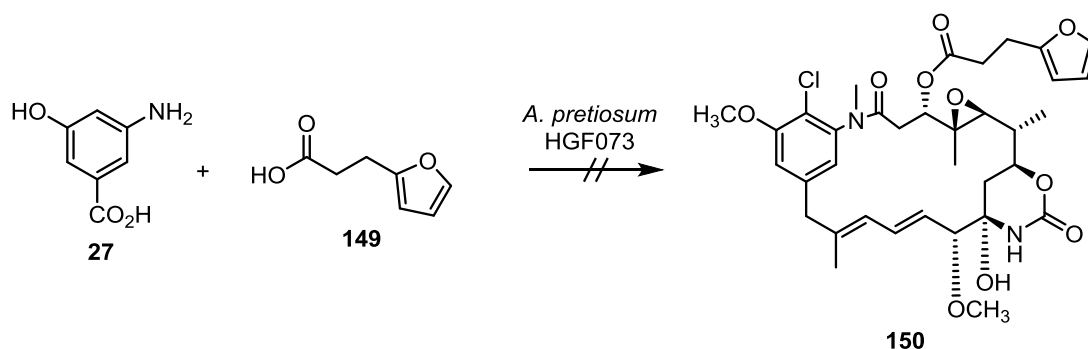


Abbildung 27: Naturstoffe mit Furanring.

Die Einführung einer Furfuryl esterseitenkette in Ansamitocin-Derivaten eröffnet neue Möglichkeiten des hochselektiven Aufbaus von zahlreichen Konjugaten für die weitere semisynthetische Derivatisierung mittels DIELS-ALDER-Reaktion. In Anlehnung an bereits bekannte Fermentationsbedingungen wurde käuflich erworbene Furfurylpropionsäure **149** als geeigneter Seitenketten-Vorläufer für die Mutasyntese ausgewählt. Die Testfermentationen wurden mehrmals wiederholt, allerdings, konnte kein Einbau der Furanseitenkette detektiert werden (Schema 62), obwohl Ansamitocin P-3 (**22**) in guter Ausbeute produziert wurde. Vermutlich wurde die Furfurylpropionsäure als möglicher Seitenketten-Vorläufer von der Acyltransferase *Asm19* der Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum* nicht erkannt.



Schema 62: Erstes Mutasyntheseexperiment zur Darstellung von neuen Furfurylansamitocin-Derivaten.

Eine geänderte Strategie basierte auf der fermentativen Darstellung von Alkynyl- und Azido-Ansamitocin-Derivaten, die nachfolgend mittels 1,3-dipolarer Cycloaddition in entsprechende Furfurylderivate umgesetzt werden könnten.

Alkine als funktionelle Gruppen kommen in Naturstoffen häufig vor. Neben stabilen internen Alkinen, die in Neocarzinostatin (**151**), oder in den Callipeltosiden A-C (**152-154**) eingebaut sind (Abbildung 28), sind auch terminale Alkine in Sekundärmetaboliten keine Seltenheit, wie z. B. in Histrionicotoxin (**156**), Gephyrotoxin (**157**) und Spongidepsin (**155**).^{99d}

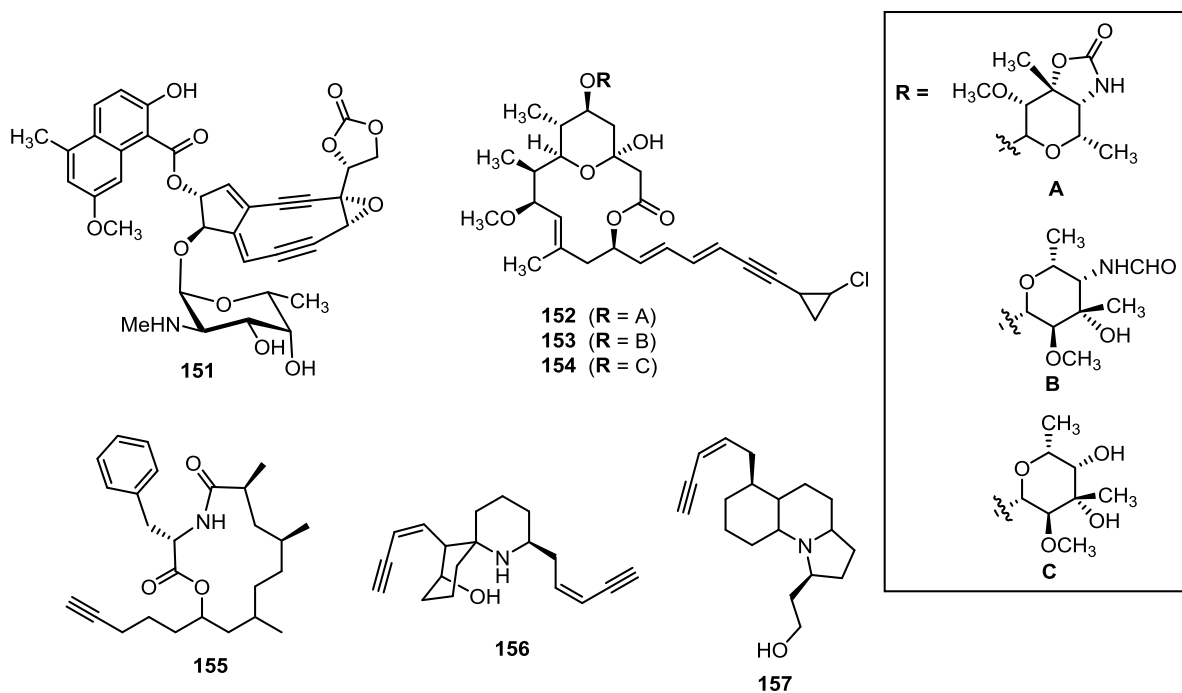
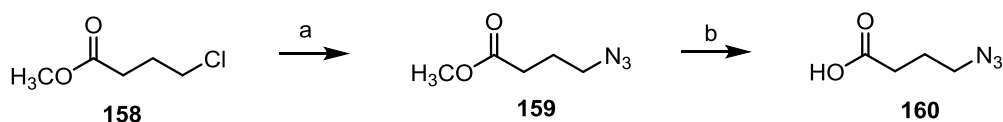


Abbildung 28: Strukturen von Neocarzinostatin (**151**), Callipeltosiden A-C (**152-154**), Histriocotoxin (**156**), Gephyrotoxin (**157**) und Spongidepsin (**155**).

Für die mutasynthetische Darstellung der Ansamitocin-Derivate wurde die Alkynylsubstituierte Carbonsäure (Hexinsäure, **144**) ausgewählt, da die Alkynylcarbonsäuren mit einer ungeraden Zahl an Kohlenstoffen (z. B. 4-Pentinsäure) als Inhibitoren der β -Oxidation des Fettsäurestoffwechsels beschrieben wurden.¹⁰⁰

Im Gegensatz dazu, kommen die Azide in der Natur nicht vor, obwohl diese funktionelle Gruppe in der Wirkstoffforschung ein breites Anwendungsspektrum findet.³⁶

In Anlehnung an frühere Mutasynthesestudien wurde entschieden, Hexinsäure **144** und Azidobuttersäure **160** an *A. pretiosum* HGF073 zu verfüttern, um die Derivate mit Alkino- bzw. Azidofunktionalitäten zu erhalten. 5-Hexinsäure (**144**) ist kommerziell erhältlich und die 4-Azidobuttersäure (**160**) wurde aus Chlorbuttersäuremethylester (**158**) mittels S_N2 -Reaktion und anschließender Esterhydrolyse in guter Ausbeute dargestellt (Schema 63).



Schema 63: Synthese der 4-Azidobuttersäure (**160**). Bedingungen: a) NaN_3 , DMF, 60 °C, 24 h, 87 %; b) LiOH (1M), MeOH, RT, 87 %.

¹⁰⁰ C. Thorpe, *Trends Biochem Sci.* **1989**, *14*, 148-151.

4.3.5 Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf *A. pretiosum* HGF073

Kokosnusswasser aus jungen Kokosnüssen (Abbildung 29) ist eine der wichtigsten Additive bei der Mutasyntese mit gezielter Esterseitenkettendirektion.



Abbildung 29: Junger Kokosnusskegel aus dem Lebensmittelhandel.

Hochkomplexe Bestandteile des Kokosnusswassers sind unter anderem Phytohormone. Erste Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf die Produktion von Ansamitocin P-3 (**22**) bei *A. pretiosum* HGF073 wurden bereits im 900 μ L-Fermentation-Maßstab von TOBIAS KNOBLOCH durchgeführt.⁷³ Tatsächlich wurde der fördernde Einfluss der Phytohormone auf Wachstums-, Produktions- und Entwicklungsprozesse bereits für viele Pflanzen und Mikroorganismen beschrieben.¹⁰¹

Die Phytohormone, wie Indol-3-Essigsäure (**161**, IAA), Gibberellinsäure A₃ (**163**, GA), N⁶-Benzyladenin (**164**, BnAP) und Abscisinsäure (**162**, ABA), die in Abbildung 30 dargestellt sind, zeigten in diesem Zusammenhang schon stimulierende Wirkung.

¹⁰¹ a) B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Wiley & Sons, New York, **2002**, 1367; b) E. A. Tsavkelova, S. Y. Klimova, T. A. Cherdyntseva, A. I. Netrusov, *Appl. Biochem. Micro.* **2006**, *42*, 117-126; c) A. Karadenitz, S. F. Topcuoglu, S. Inan, *World J. Microb. Biot.*, **2006**, *22*, 1061-1064; d) S. Manulis, H. Shafrir, E. Epstein, A. Lichter, I. Barash, *Microbiology* **1994**, *140*, 1045-1050; e) T. Tuomi, J. Ilvesoksa, S. Laakso, H. Rosenqvist, *J. Plant Growth Regul.* **1993**, *12*, 149-156; f) G. Assante, L. Merlini, G. Nasini, *Cell. Mol. Life Sci.* **1977**, *33*, 1556-1557.

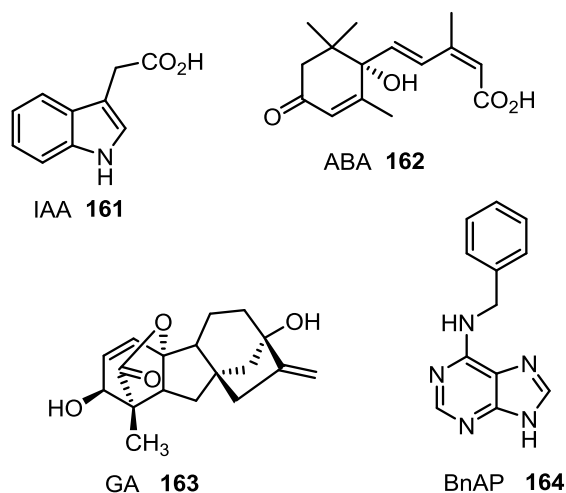
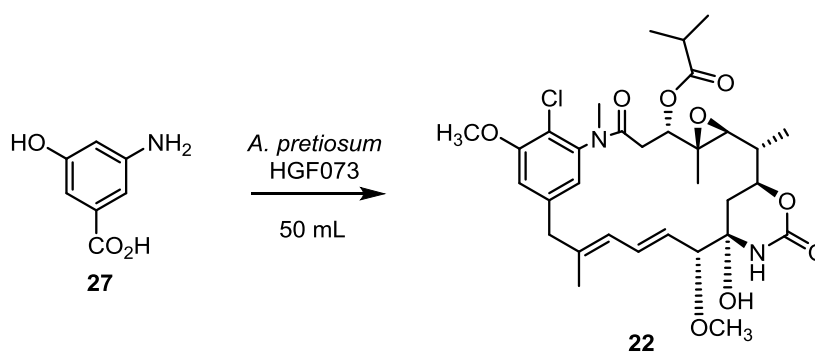


Abbildung 30: Als Additive untersuchte Phytohormone.

Zur Untersuchung der stimulierenden Effekte von ausgewählten Phytohormonen wurden die Fermentationen im Erlenmeyerkolbenmaßstab durchgeführt. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte nach dem in Kapitel 6.2 beschriebenem Protokoll. Die Zugabe der Phytohormone zum Hauptkulturmedium geschah in Konzentrationen von 10 nM (IAA, BnAP, ABA) und 10 μ M (GA), zwei Tage später erfolgte die Fütterung mit AHBA **27** kontinuierlich über 4 Tage zu 50 mL Schüttelkulturen (Schema 64). Die Verfütterung erfolgte parallel zu einer Referenz mit AHBA-Zugabe ohne weitere Zusätze, um die Aktivität des Stammes sicherzustellen. Des Weiteren wurden Produktionsvergleiche mit AHBA und Kokosnusswasser als Additiv durchgeführt. Um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen, wurde auch eine Negativkontrolle - eine Probe ohne jegliche Supplementierung - eingesetzt.



Schema 64: Mutasynthesestudien mit ausgewählten Phytohormonen zur Darstellung von Ansamitocin P-3 (**22**).

Die durchgeführten Fermentationen dauerten bis zu sieben Tage. Nach anschließender Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung wurden die Proben massenspektrometrisch untersucht. Die Bestimmung der Ausbeute von Ansamitocin P-3 (**22**)

erfolgte mittels HPLC-LC/MS UV-Spektroskopisch bei $\lambda = 248$ nm nach vorheriger Kalibration.¹⁰²

Die Kulturen mit Kokosnusswasser (KW) und Gibberellinsäure (GA) - Zusatz zeigten die größten Produktionssteigerungen von Ansamitocin P-3 (**22**) im Vergleich zu der Probe ohne Zusätze (Positivkontrolle, Abbildung 31). Diese Daten bekräftigen die Fermentationsergebnisse von TOBIAS KNOBLOCH, die bereits in 900 μ L-Maßstab durchgeführt wurden.

IAA, sowie BnAP zeigen eher eine hemmende Wirkung auf die Produktion von Ansamitocin P-3 (**22**). Bei der Verwendung von ABA als Additiv wurde im Vergleich zu Positivkontrolle eine ähnliche Produktion des Naturstoffes beobachtet. Die von OVERBEEK¹⁰³ beschriebene fördernde Wirkung des GA-IAA-Gemisches wurde bei *A. pretiosum* HGF073 nicht detektiert.

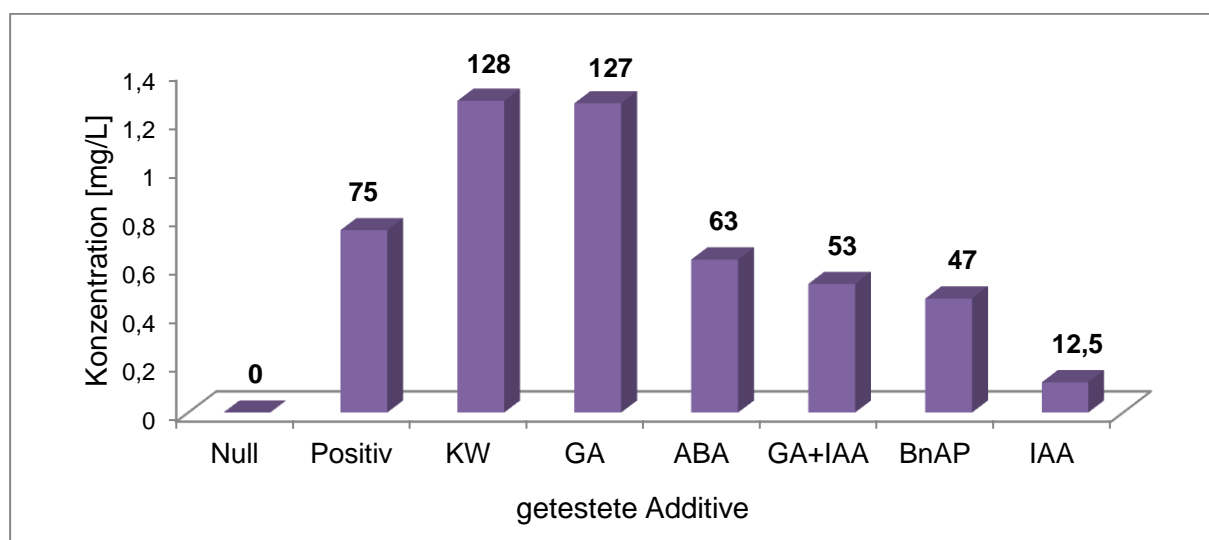


Abbildung 31: Graphische Darstellung der relativen Ansamitocin P-3 (**22**) Produktion (Mittelwerte aus zwei Fermentationsansätzen) in Abhängigkeit von den Additiven mit Phytohormon-Aktivität.

Abkürzungen: KW = Kokosnusswasser, GA = Gibberellinsäure A₃, ABA = Abscisinsäure, BnAP = N⁶-Benzyladenin, IAA = Indol-3-essigsäure (siehe auch Schema 64).

Obwohl die Zusammensetzung des Kokosnusswassers ziemlich kompliziert erscheint, wurden das frische Kokosnusswasser und die getesteten Phytohormone massenspektrometrisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass nur die Gibberellinsäure (**163**) ein Bestandteil von Kokosnusswasser ist ($t_R = 3.37$ min, Abbildung 32). Die Phytohormone, wie Abscisinsäure, Benzyladenin oder Indol-3-essigsäure wurden in den UPLC/MS-Spektren nicht detektiert.

¹⁰² im Anhang sind die Daten und die Kalibrationsgeraden dargestellt.

¹⁰³ J. Overbeek, *Science* **1966**, 152, 721-731.

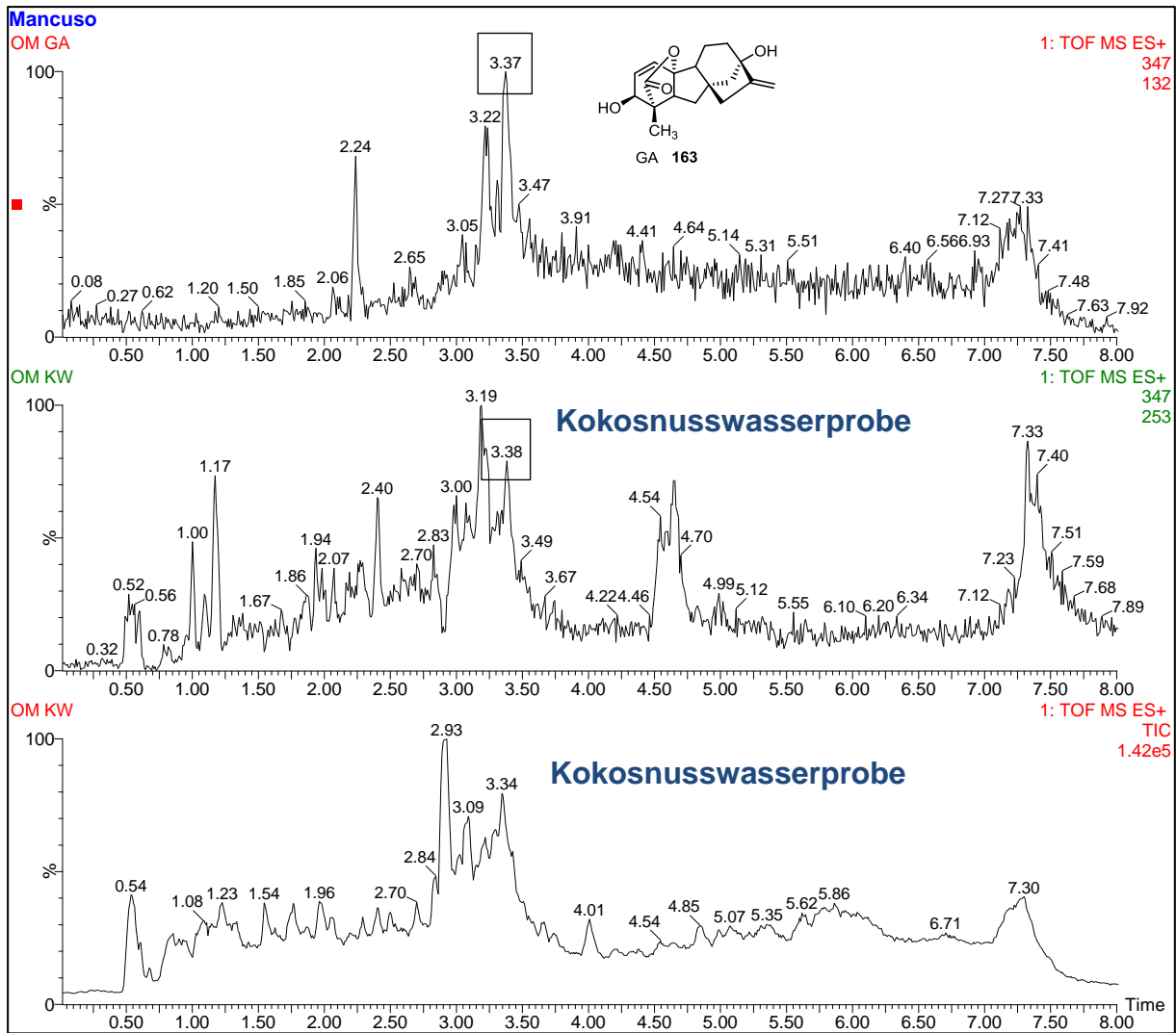


Abbildung 32: UPLC-Diagramme von Kokosnusswasser und Gibberellinsäure (GA, **163**); (unten - BPI-Signal von Kokosnusswasser, in der Mitte - m/z 347 in der Kokosnusswasserprobe, oben - m/z 347 bei reinem GA)

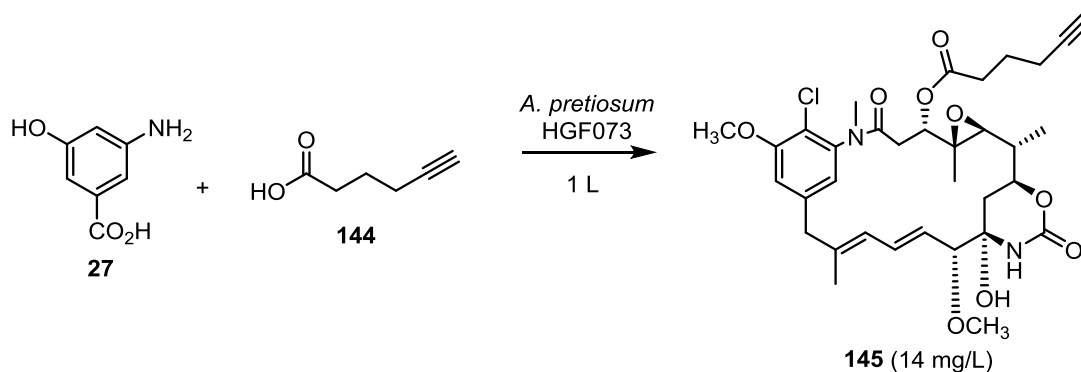
In Anlehnung an die UPLC-MS-Daten von Kokosnusswasser kann die steigende Produktion von Ansamitocin P-3 (**22**) beim Zusatz von Gibberellinsäure A₃ **163** zu den Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 erklärt werden.

Die Übertragung dieser Studien auf die Mutasyntese mit *A. pretiosum* HGF073 und anderen AHBA-Analoga konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

4.3.6 Ergebnisse der Mutasyntesen und die semisynthetische Nutzung der neuen Ansamitocin-Derivate

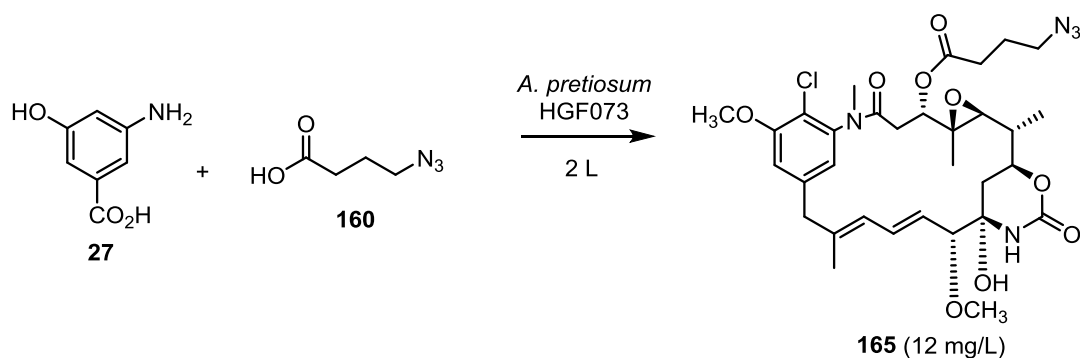
Die Mutasynthese mit 5-Hexinsäure (**144**) erwies sich als eine vielversprechende Variante zur Darstellung neuer Ansamitocin-Derivate für weitergehend semisynthetische Derivatisierungen (Schema 65). Die Verfütterung von AHBA **27** und Carbonsäure **144** erfolgte kontinuierlich über 4 Tage zu 50 mL Schüttelkulturen. Die ausführliche Beschreibung der Mutasyntheseexperimente, sowie das Protokoll zur Verfütterung sind in Kapitel 6.2 beschrieben. Nach Reinigung mittels *reversed phase* HPLC wurden 14 mg 3-*O*-(Hex-5-in-oyl)maytansinol (**145**) in einer guten Ausbeute von 14 mg/L isoliert.

Da für weitere semisynthetische Studien nur die vollständig prozessierten Ansamitocin-Derivate verwendet werden sollen, wurde auf die Isolierung von nicht vollständig prozessierten Ansamitocin-Derivaten verzichtet.



Schema 65: Mutasynthese mit Hexinsäure **144** zur Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten. Bedingungen: AHBA **27** (1.25 mmol/L), Carbonsäure **144** (12.5 mmol/L); Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, Kokosnusswasser.

Anschließend erfolgte die Fermentation mit AHBA **27** und 4-Azidobuttersäure (**160**) über 4 Tage (2 L Fermentationsvolumen, Schema 66). Nach Reinigung mittels *reversed phase* HPLC wurden 24 mg 3-*O*-(Azidobutyryl)maytansinol (**165**) in einer Ausbeute von 12 mg/L isoliert. Auch hier wurde auf die Isolierung von nicht vollständig prozessierten Ansamitocin-Derivaten verzichtet.



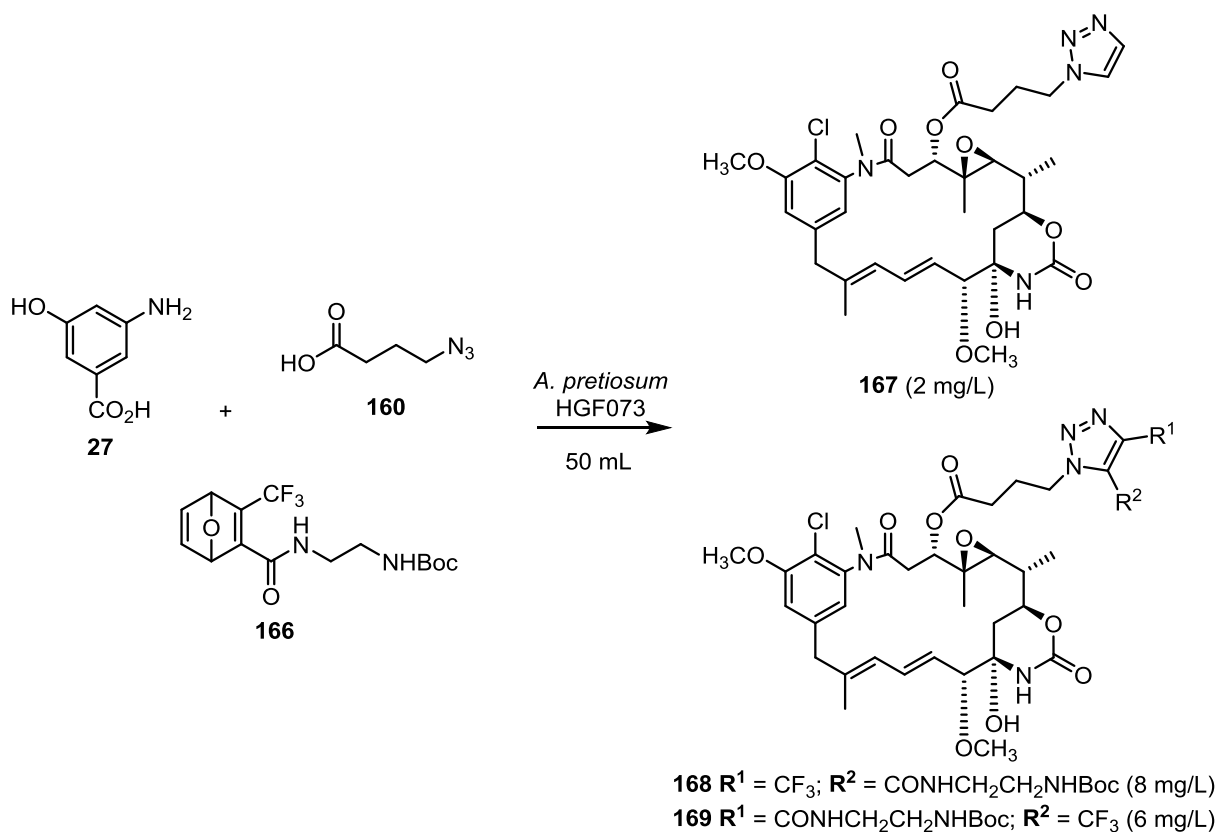
Schema 66: Mutasynthese mit Azidobuttersäure **160** zur Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten. Bedingungen: AHBA **27** (1.25 mmol/L), Carbonsäure **160** (12.5 mmol/L); Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, Kokosnusswasser.

In Kapitel 2.5 wurden bereits unterschiedliche Konjugationsmethoden detailliert vorgestellt, so auch 1,3-dipolare Cycloadditionen. Eine Variante der Metall-freien Cycloaddition ist die Reaktion zwischen einem elektronenarmen Oxanorbornadien und einem Azid.³⁹

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Umsetzung der fermentativ dargestellten Azido-Ansamitocine unter kupferfreien Bedingungen mit synthetisch erzeugtem Oxanorbornadien **166** direkt im Fermentationsansatz erprobt werden. Falls die neu aufeinander folgend eingeführten Strukturelemente für die semisynthetischen Derivatisierungen benutzt werden könnten, würden die beschriebenen Mutasynthesen ein neuer Zugang zu den Konjugaten aus Ansamitocinen eröffnen. Außerdem würden mehrere Schritte der aufwendigen Reinigungsverfahren entfallen.

Die Fermentation mit AHBA **27**, 4-Azidobuttersäure (**160**) und Oxanorbornadien **166** erfolgte kontinuierlich über 4 Tage zu einer 50 mL Schüttelkultur, dargestellt in Schema 67 und wurde zweimal wiederholt. Die ausführliche Beschreibung des Mutasyntheseexperimentes ist dem Kapitel 6.2 zu entnehmen.

Die Zugabe von bereits im Arbeitskreis KIRSCHNING vorhandenen Oxanorbornadien **166** erfolgte zwei Tage vor dem Beenden der Fermentation, da die Gefahr der Vergiftung für Mikroorganismen durch die Mengen an Linker (dreifacher Überschuss in Bezug auf die zugefütterte Azidobuttersäure **160**) vorhanden war.



Schema 67: Mutasyntese mit Azidobuttersäure **160** und Oxabornadien **166** zur Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten. Bedingungen: AHBA **27** (1.25 mmol/L), Carbonsäure **160** (12.5 mmol/L); Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, Kokosnusswasser; 2 Tage vor dem Beenden der Fermentation erfolgte die Zugabe von Oxanorbornadien **166** (37.5 mmol/L).

Nach der massenspektrometrischen Untersuchung konnte die Bildung von Metaboliten mit Trifluorotriazolgruppe detektiert werden. Allerdings wurden zwei unterschiedliche Retentionszeiten für die gewünschte Verbindung gefunden (Abbildung 33). Das entstandene Nebenprodukt wurde zunächst massenspektrometrisch als Triazol **167** identifiziert. Bereits RUTJES *et al.* beschrieben die Bildung von zwei Regioisomeren als Hauptprodukte – *cis*-Triazol und *trans*-Triazol- und dem Triazol **167** als Nebenprodukt.³⁹ Da die Testfermentationen mit Azidobuttersäure **160** und Oxabornadien **166** Hinweise auf gute Ausbeuten lieferte, wurde entschieden, alle gebildeten Triazole zu isolieren. Nach *reversed phase* HPLC wurden *cis*-Triazol **169** (0.3 mg, 6 mg/L), *trans*-Triazol **168** (0.4 mg, 8 mg/L) und Triazol **167** (0.1 mg, 2 mg/L) isoliert. Mit den aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren konnten allerdings beide Derivate nicht eindeutig identifiziert und zugeordnet werden. Deshalb wurden diese Produkte zusätzlich auf chemischem Wege, ausgehend von Ansamitocin-Derivat **165** hergestellt (Schema 68).

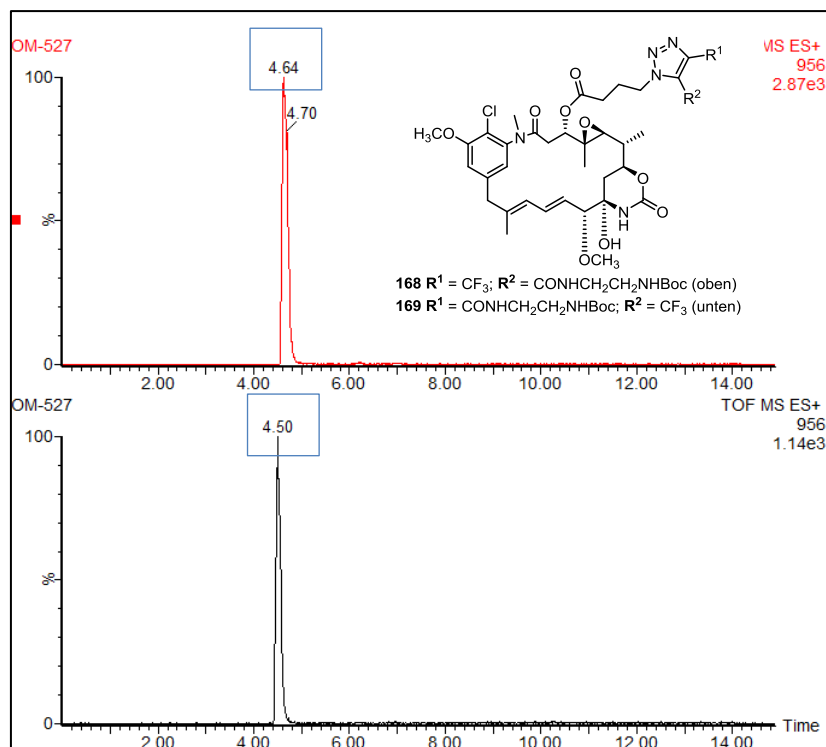
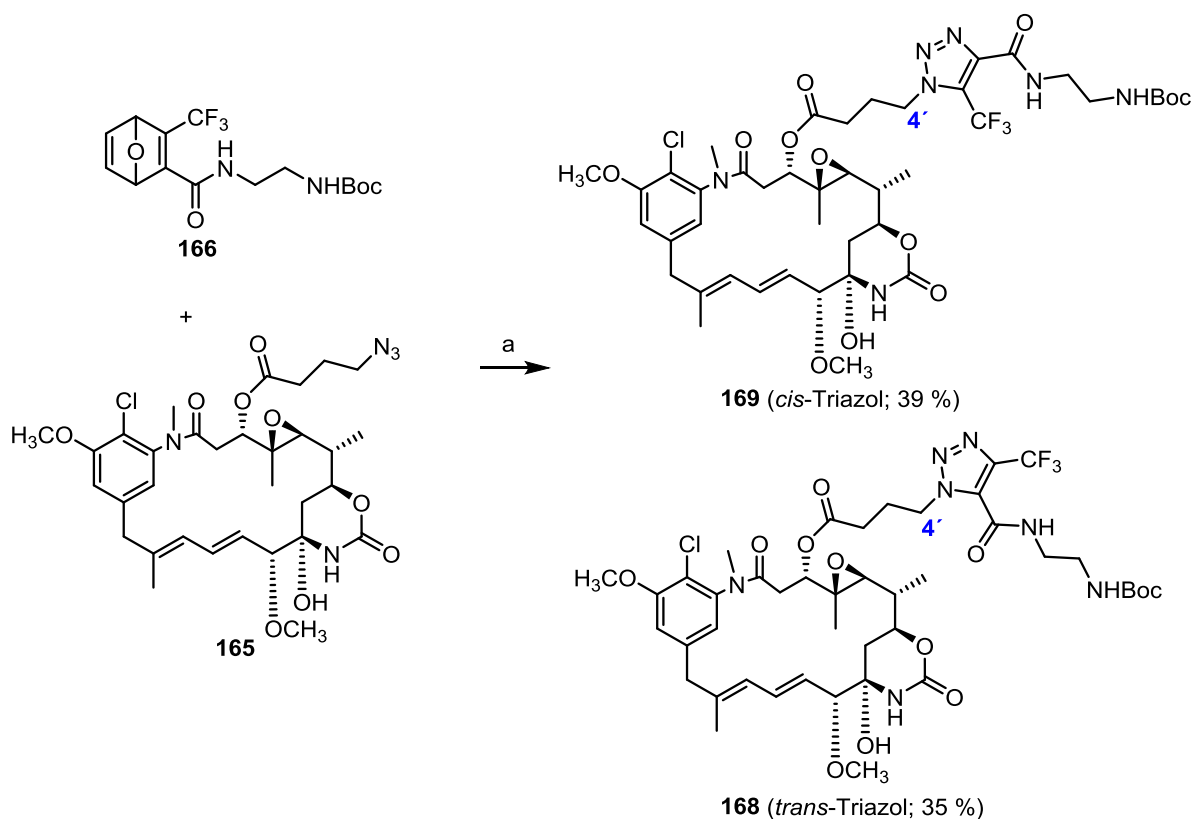


Abbildung 33: Retentionszeiten für die gebildeten Triazole **168** und **169**.

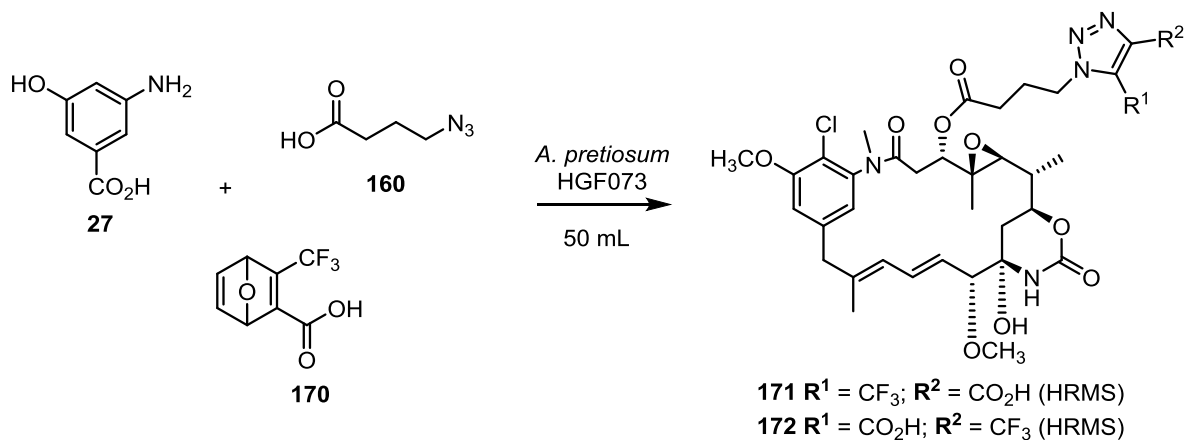
Die kupferfreie Cycloaddition wurde unter den gleichen Bedingungen, wie im Falle der fermentativ dargestellten Triazol-Ansamitocine durchgeführt. Für eine bessere Löslichkeit der Ansamitocine mussten ein paar Tropfen MeOH zur Reaktionsmischung zugegeben werden. Nach zwei Tagen wurde die Mischung mittels semipräparativer HPLC gereinigt und die Fraktionen anschließend NMR-spektroskopisch untersucht. Das Nebenprodukt **167** wurde mittels HRMS-, MS/MS-Spektrometrie und ¹H-, ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie dazugehörigen Korrelationsspektren, wie COSY, HSQC und HMBC, identifiziert.

Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten, sowie die ¹H-¹³C-Korrelationsspektren (HMBC und HSQC) erlauben es, das *trans*-Triazol **168** und das *cis*-Triazol **169** zuzuordnen. Der Unterschied von beiden Regioisomeren ist nur in einer Position (4) signifikant (Schema 68). Für das *cis*-Triazol **169** besteht im HMBC-Spektrum zusätzlich die Korrelation zu der CF₃-Gruppe, beim *trans*-Regioisomer **168** fehlt diese Korrelation.



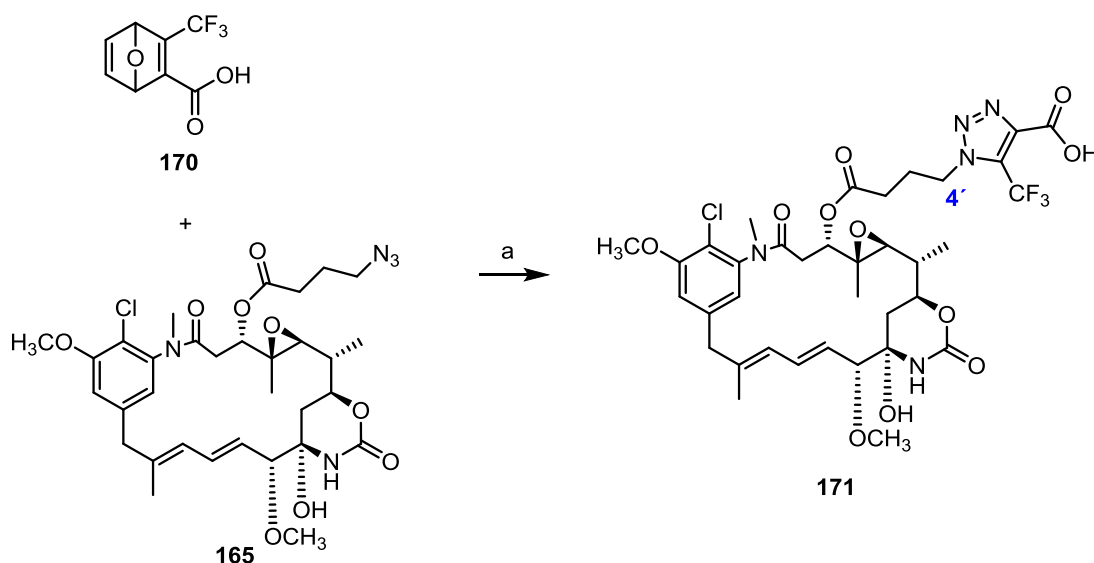
Schema 68: Synthese von *cis*-Triazol **169** und *trans*-Triazol **168**. Bedingungen: a) H₂O, MeOH, RT, 48 h, *cis*-Triazol 39 %; *trans*-Triazol 35 %.

Eine weitere Fermentation mit dem zweiten Oxanorbornadien **170** erfolgte ebenfalls nach dem in Kapitel 6.2 beschriebenen Protokoll. Nach ersten massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Hinweise auf die Bildung der regioisomeren Triazolen **171/172** in mäßiger Ausbeute beobachtet (Schema 69). Außerdem wurde das Nebenprodukt **167** in sehr geringen Mengen detektiert.



Schema 69: Mutasynthese mit Azidobuttersäure **160** und Oxanorbornadien **170** zur Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten. Bedingungen: AHBA **27** (1.25 mmol/L), Carbonsäure **160** (12.5 mmol/L); Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, Kokosnusswasser; 2 Tage vor dem Beenden der Fermentation erfolgte die Zugabe von Oxanorbornadien **170** (37.5 mmol/L).

Folglich wurde entschieden, die Triazolderivate **171** und **172** auf chemischem Wege, ganz analog zu den bereits oben beschriebenen Triazolen, herzustellen. Nach zwei Tagen wurde das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC gereinigt und die Fraktionen anschließend NMR spektroskopisch untersucht. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten, sowie die ^1H - ^{13}C -Korrelationspektren (HMBC und HSQC) identifizierten die Struktur des Triazols **171** (Schema 70). Bei dieser Reaktion wurde das *cis*-Regioisomer als Hauptprodukt gebildet. Das *trans*-Regioisomer wurde nur in Spuren massenspektrometrisch detektiert, sodass die finale Charakterisierung per ^1H -NMR Spektroskopie nicht möglich war.



Schema 70: Synthese von Triazol **171**. Bedingungen: a) H_2O , MeOH , RT, 48 h, *cis*-Triazol 35 %.

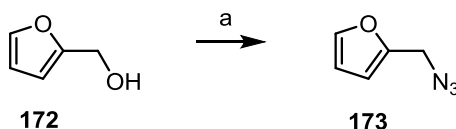
Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Fermentation im großen Maßstab für alle Oxanorbornadien-Derivate nicht durchgeführt werden.

4.3.6.1 Linkersynthese und „CLICK“-Derivatisierungen

In diesem Kapitel wird die Linkersynthese und die anschließende Kupfer-katalysierte Cycloaddition für die spätere Nutzung in der Synthese neuer Ansamitocin-Konjugate vorgestellt.

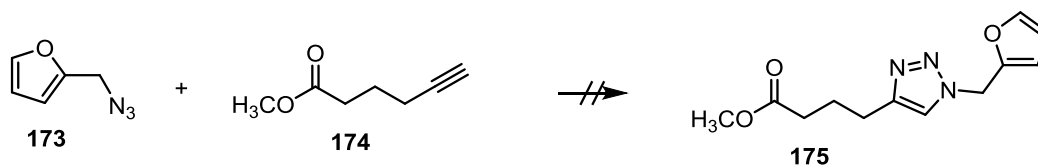
Mit verschiedenen Testreaktionen sollen die Reaktionsbedingungen erforscht und optimiert werden, damit diese später auf die Semisynthese neuer Ansamitocin-Konjugate übertragen werden können. Die ersten Versuche, Furfurylazid **173** mittels $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion zu synthetisieren, scheiterten (Schema 71, Eintrag i). Die Synthese von Azid **173** aus Furfurylalkohol **172** (Schema 71, Eintrag ii) verlief in sehr schlechter Ausbeute. Trotzdem

wurden die ersten Testversuche zur 1,3-dipolaren Cycloaddition mit **173** durchgeführt (Schema 72).



Schema 71: Versuchte Synthesen von Furfurylazid **173**. Bedingungen: a) i) PPh₃, CBr₄, Imidazol, CH₂Cl₂, 0 °C → RT; ii) DPPA, DBU, Toluol, 0 °C → RT, 24 h, 25 %.

Die „CLICK“-Derivatisierung nach MELANDER *et al.* unter Einsatz von CuSO₄ und Natriumascorbat als Zusatz (Tabelle 4, Eintrag 1)¹⁰⁴ führte nicht zum gewünschten Triazol **175** (Schema 72; Tabelle 4, Eintrag 1). Weitere Versuche mit Variationen des Cu-Katalysators wurden massenspektrometrisch verfolgt (Tabelle 4, Eintrag 2-4) und lieferten keine weitere Hinweise auf Bildung des Methylesters **175**, obwohl das Azid **173** eindeutig mittels IR-Spektroskopie identifiziert wurde. Auch mit dem Wechsel des Lösungsmittels konnte die Bildung des Triazols **175** nicht detektiert werden.



Schema 72: Versuchte Synthesen von Triazol **175**. Bedingungen sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Getesteten Bedingungen in der Synthese von Triazol **175**.

Eintrag	Katalysator	Lösungsmittel	Zusätze	Temperatur	Anmerkung
1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	<i>t</i> -BuOH:H ₂ O:CH ₂ Cl ₂ (1:1:1)	Na-Ascorbat DIPEA	RT	keine Reaktion
2	Cu(I)Br	MeOH	DIPEA	RT	keine Reaktion
3	Cu(I)I	CH ₂ Cl ₂	DIPEA	RT	keine Reaktion
4	Cu(I)I	THF	DIPEA	RT	keine Reaktion

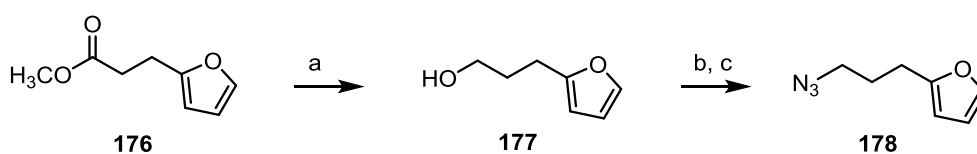
Parallel wurde die Synthese des um zwei C-Atome verlängerten Linkers **178** verfolgt. Die Synthese begann mit Methylester **176** und folgte einer Methode nach FALL *et al.* (Schema 73).^{105,106b} Zunächst wurde Methylester **176** mit DIBAL zum Alkohol **177** reduziert,

¹⁰⁴ S. A. Rogers, C. Melander, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5229-5231.

¹⁰⁵ F. Carroll, M. S. Melvin, M. C. Nuckols, S. W. Mascarella, H. A. Navarro, J. B. Thomas, *J. Med. Chem.* **2006**, 1781-1791.

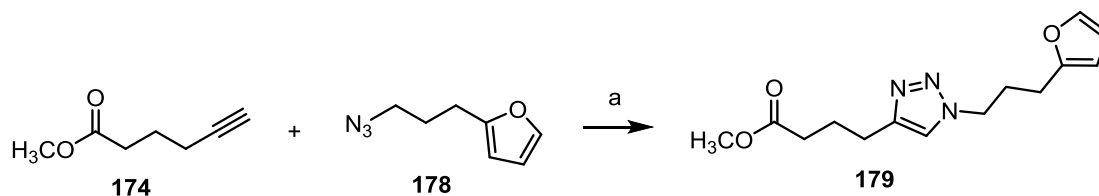
¹⁰⁶ a) R. M. Schelkun, P. Yuen, D. J. Wustrow, J. Kinsora, T. Su, M. G. Vartanian *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 2329-2332; b) I. Garcia, M. Perez, Z. Gandara, G. Gomez, Y. Fall *Tetrahedron Letters*, **2008**, 3609-3612.

in das entsprechende Tosylat¹⁰⁶ überführt, welches anschließend in einer S_N2 Reaktion in sehr guter Ausbeute das Azid **178** lieferte.



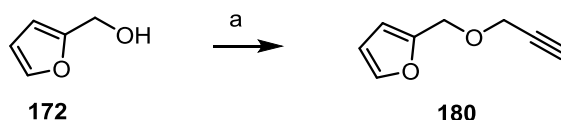
Schema 73: Synthese von Furfurylazid **178**. Bedingungen: a) DIBAL, Et₂O, -78 → 0 °C, quant; b) TsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C RT, 20 h, 96 %; c) NaN₃, DMF, H₂O, RT, 86 %.

Die 1,3-dipolare HUISGEN-Cycloaddition wurde unter Verwendung von CuSO₄ und Na-Ascorbat massenspektrometrisch verfolgt.¹⁰⁴ Trotz der nicht vollständigen Umsetzung und der niedrigen Ausbeute von unter 40 % konnte Triazol **179** isoliert und spektroskopisch untersucht werden (Schema 74). Erst durch den Wechsel von Cu(II)- zu Cu(I)-Katalysator konnte die Ausbeute der Reaktion auf 68 % erhöht werden. Auf weitere Optimierungsstudien mit Modellsubstraten wurde verzichtet, da es wichtig war, zunächst die getesteten Bedingungen auf die Ansamitocin-Derivate zu übertragen.



Schema 74: Synthese von Triazol **179**. Bedingungen: a) i) CuSO₄, Na-Ascorbat, t-BuOH/H₂O/CH₂Cl₂, RT, 24 h, 35 %; ii) DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 68 %.

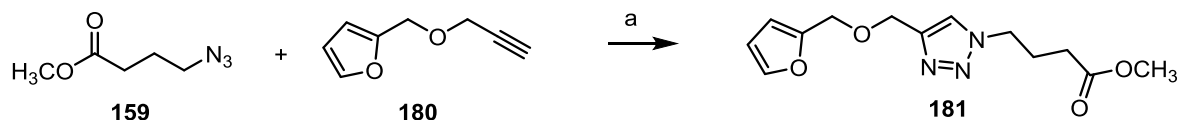
Für die folgenden Studien der Linkerverknüpfung an Ansamitocin-Derivate sollten aber auch zwei weiteren Linker in der 1,3-dipolaren Cycloaddition getestet werden. Die Synthese des Ethers **180** wurde analog der Synthese¹⁰⁷ von Echavarren *et al.* durchgeführt und ist in Schema 75 gezeigt.



Schema 75: Synthese des Ethers **180**. Bedingungen: a) NaH, CHCCH₂Br, DMF, 0 °C → RT, 20 h, 73 %.

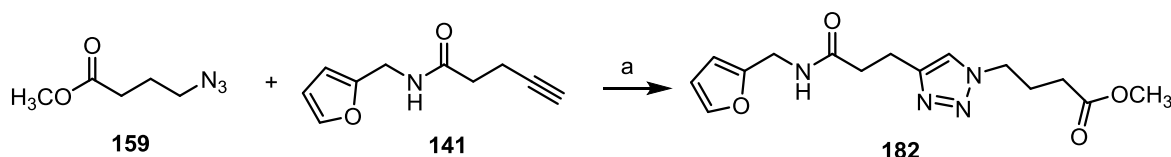
¹⁰⁷ B. Martin-Matute, C. Nevado, D. J. Cardenas, A. M. Echavarren, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5757-5766.

Die 1,3-dipolare Cycloaddition wurde unter den bereits beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt und das Triazol **181** konnte in einer Ausbeute von 51 % isoliert werden (Schema 76).



Schema 76: Synthese des Triazols **181**. Bedingungen: a) DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 51 %.

Ferner wurde das Amid **141** in einer CuAAC-Reaktion eingesetzt und Furfurylamid **182** wurde in einer sehr guten Ausbeute von 81 % dargestellt (Schema 77).



Schema 77: Synthese des Furfurylamides **182**. Bedingungen: a) DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 81 %.

Auf die Synthese von Estern als Linker wurde verzichtet, da bekannt ist, dass diese Verbindungsklasse im biologischen Milieu leicht hydrolytisch durch Esterasen bzw. Lipasen gespalten werden.

4.3.6.2 „CLICK“-Synthesen mit Ansamitocin-Derivaten

In Anlehnung an die Testreaktionen wurden 1,3-dipolare Cycloadditionen mit Ansamitocin-Derivaten durchgeführt. Zur Anbindung des Linkers an Ansamitocin-Derivaten standen drei verschiedene Furane **178**, **180** und **141** zur Verfügung (Abbildung 35). Parallel sollte der Einfluss der unterschiedlichen Verbindungselemente auf den Reaktionsverlauf, sowie für die späteren toxikologischen Studien untersucht werden.

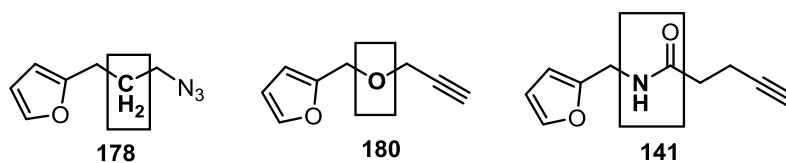
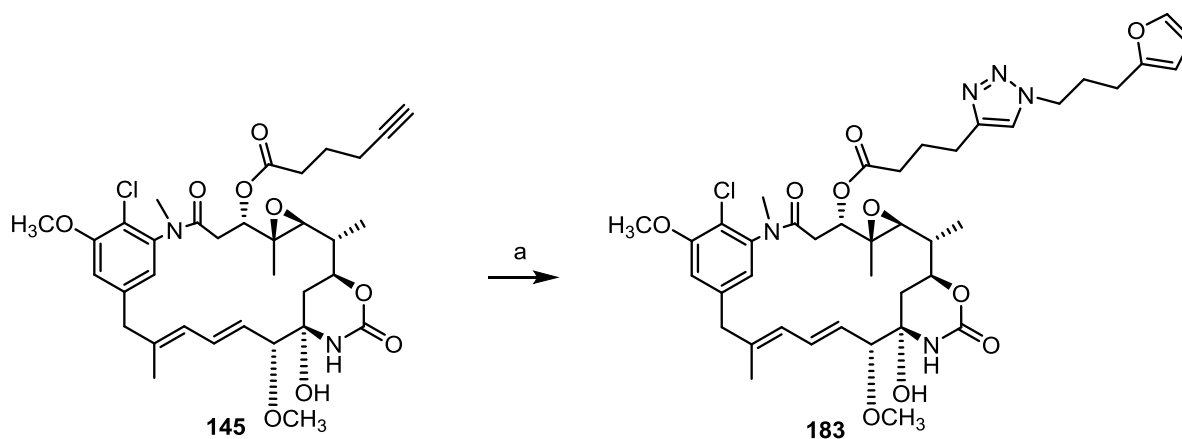


Abbildung 35: Synthetisierte Linker für die 1,3-dipolare Cycloaddition mit Ansamitocinen.

Unter Anwendung der an den Testsystemen etablierten Bedingungen wurden neue Ansamitocin-Konjugate generiert.

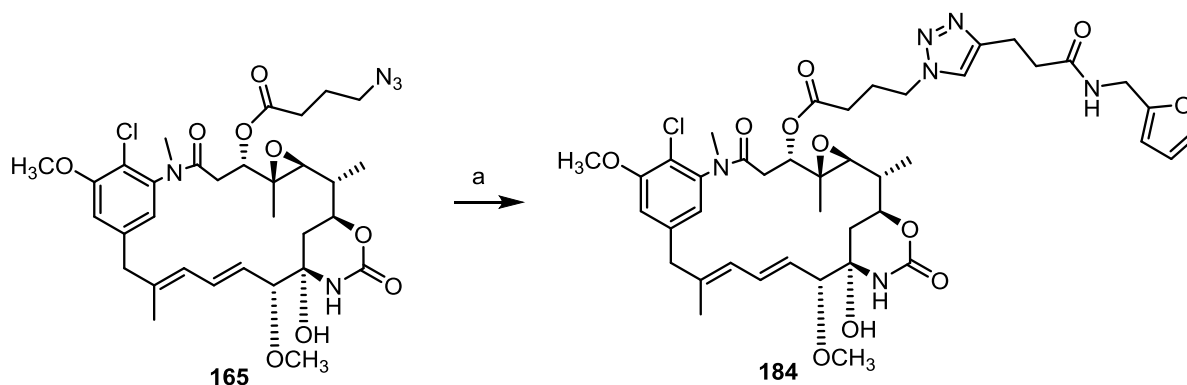
Generell, wurden alle CuAAC Reaktionen mit Ansamitocin-Derivaten unter Argonatmosphäre und Lichtausschluß durchgeführt. Für alle Kupplungen wurde die frisch hergestellte Suspension aus Cu(I)Br und DIPEA in MeOH 30 Minuten durch Einleiten von Argon und unter Lichtausschluß entgast. Nach dem Beenden der Reaktion wurde EDTA (1M) im Überschuss zugegeben und 3-5 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Lösung mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Die Reaktion mit Methylen-Linker **178** und die Bildung des Furfurylansamitocins **183** verlief in sehr guter Ausbeute von 87 % (Schema 78). Da das Edukt **145** vollständig umgesetzt wurde und die Ausbeute zum Triazol **183** exzellent war, wurde auf weiterführende Optimierungsstudien verzichtet.



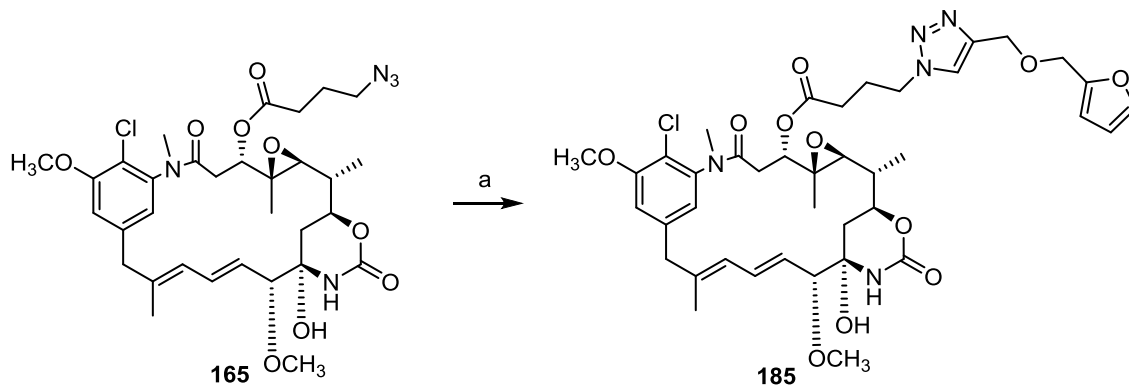
Schema 78: Synthese von Furfurylamid **183**. Bedingungen: a) Methylen-Linker **178**, DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 87 %.

Für „CLICK“-Derivatisierung von Azid **165** mit Amid-Linker **141** wurden bereits etablierte Bedingungen verwendet. Die Cycloaddition zum Furfurylansamitocin **184** gelang in einer Ausbeute von 62 % (Schema 79).



Schema 79: Synthese von Furfurylamid **184**. Bedingungen: a) Amidlinker **141**, DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 62 %.

Bei der Reaktion mit Ether-Linker **180** wurde das gewünschte Derivat **185** in einer moderaten Ausbeute von 20 % gewonnen (Schema 80). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Bildung von Nebenprodukten. Da die Trennung der instabilen Nebenprodukte misslang, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.



Schema 80: Synthese von Furfurylsansamitocin **185**. Bedingungen: a) Ether-Linker **180**, DIPEA, Cu(I)Br, MeOH, RT, 20 h, 20 %.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die etablierten 1,3-dipolaren Cycloadditionen zur Darstellung von Furfurylsansamitocin-Derivaten in guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden können.

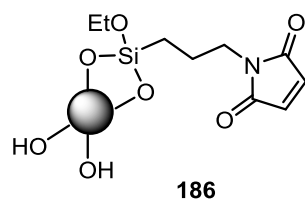
4.4 Studien zu DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion

In diesem Abschnitt wurden zahlreiche Studien zu DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen, sowie zum Aufbringen von Ansamitocinen an Nanopartikel zusammengefasst. Für die selektive Wirkstofffreisetzung werden unterschiedliche Heizmethoden vorgestellt.

4.4.1 Vorarbeiten

Bereits in der früheren Kapiteln 2.2 und 2.4 wurde das Konzept der magnetisch gesteuerten Verabreichung von Wirkstoffen (*magnetic-drug-targeting*) vorgestellt. Die ersten Studien zur Funktionalisierung von MAGSILICA[®] (Abbildung 36) und DIELS-ALDER-Cycloadditionen an Modellsystemen sowie die Freisetzung unter thermischen Bedingungen zeigten bereits LENA MÖLLER und JENS WEGNER.^{97,108}

¹⁰⁸ J. Wegner, Dissertation, "Enabling Technologien" in der organischen Synthese: Induktives Heizen und Durchflussreaktionen/ Totalsynthese von Millingtonine A, Leibniz Universität Hannover, Hannover 2012.

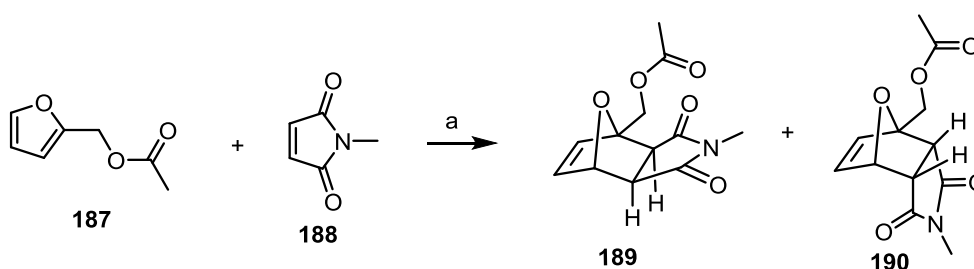


186

● = MAGSILICA®

Abbildung 36: Funktionalisierte MAGSILICA®-Nanopartikel.

Die ersten Testreaktionen des stark vereinfachten Liganden **187** mit Maleimid **188** (Schema 81) lieferten das thermodynamisch begünstigte *exo*-Produkt **189** als Hauptprodukt (im Verhältnis von 6:1).⁹⁷



Schema 81: Synthese der DIELS-ALDER-Produkte **189** und **190**. Bedingungen: a) Tetrachlorethan, 65 °C, 3 d, *exo*-Derivat **189** 50 %, *endo*-Derivat **190** 8 %.

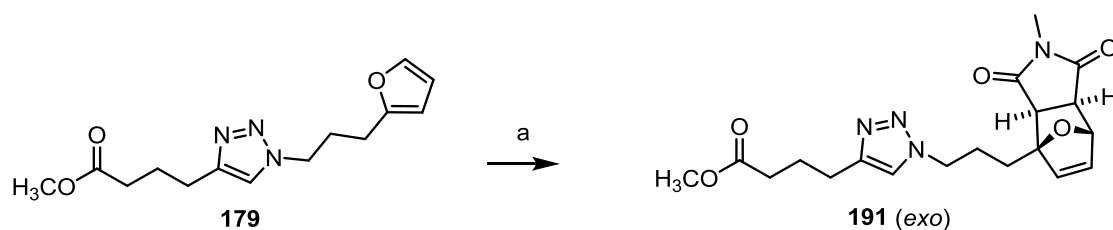
4.4.2 Untersuchungen zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion

Die DIELS-ALDER-Cycloaddition zwischen Furanen und Maleimiden wurde sowohl für Monomere^{42,109} als auch für Polymere^{41,110} beschrieben. Dabei waren vor allem unterschiedliche Lösungsmittelsysteme, der Einfluss von Substituenten am Furan auf die Reaktionsgeschwindigkeit, der Einsatz von LEWIS Säuren und die Reversibilität der Reaktion von Interesse.

Für die nachfolgenden Untersuchungen zur DIELS-ALDER-Cycloaddition wurde Acetonitril als Lösungsmittel der Wahl zunächst an einem Modellsystem erprobt (Schema 82). Nach drei Tagen wurde die Reaktion gestoppt, obwohl die Umsetzung nicht komplett war. Da diese Reaktion reversibel ablaufen kann, wurde entschieden die Produkte und Edukte zu isolieren. Methylester **191** wurde in einer Ausbeute von 72 % gebildet.

¹⁰⁹ a) Y. W. Goh, B. R. Pool, J. M. White, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 151-156; c) S. N. Pieniazek, K. N. Houk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1442-1445; d) D. Tobia, R. Harrison, B. Phillips, T. L. White, M. DiMare, B. Rickborn, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 6701-6706; e) H. Kwart, I. Burchuk, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 3094-3097.

¹¹⁰ a) C. M. Nimmo, S. C. Owen, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 824-830; b) A. Sanyal, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, 1417-1425.



Schema 82: Synthese von DIELS-ALDER-Produkt **191** Bedingungen: a) *N*-Methylmaleimid, MeCN, 65 °C, 3 d, 72 %.

In Anlehnung an die bereits bekannten Studien von LENA MÖLLER⁹⁷ zur Identifizierung von *exo*- und *endo*-Produkten an Modellsubstraten, wurde das erhaltene Triazol **191** mittels ¹H- und ¹³C-NMR-, sowie HSQC und HMBC-Korrelationsspektroskopie als *exo*-Produkt identifiziert. Das *endo*-Produkt wurde bei dieser Reaktion im Verhältnis zu *exo*-Produkt 13:1 erhalten, allerdings war die Menge für die detaillierte spektroskopische Untersuchung zu gering.

Für die nachfolgenden Studien zum Reaktionsablauf zwischen Furan **179** und *N*-Methylmaleimid wurde THF als Lösungsmittel, Einfluss von Wasser und Reaktionsdauer untersucht (Tabelle 5). Es stellte sich heraus, dass die längere Reaktionszeit (Tabelle 5, Eintrag 6,7) die Bildung von *exo*-Produkt minimiert, was auf die Reversibilität der Reaktion zurückzuführen ist. Der Einfluss von Wasser wurde als eher negativ als positiv eingestuft, da es zu herabgesetzte Ausbeute führte (Tabelle 5, Eintrag 3,4).

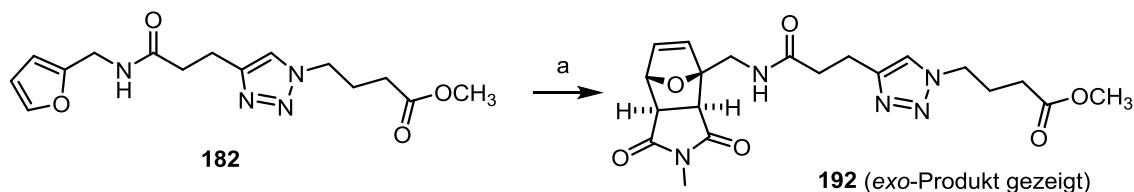
Tabelle 5: Die getesteten Bedingungen für die DIELS-ALDER-Cyclisierung.

Eintrag	Lösungsmittel	Zusätze	Zeit [d]	Ausbeute
1	Acetonitril	-	3	<i>exo</i> - 191 (72 %) + 179 (7 %)
2	THF	-	3	<i>exo</i> - 191 (68 %) + 179 (10 %)
3	THF	20 % H ₂ O	3	<i>exo</i> - 191 (65 %) + 179 (20 %)
4	Acetonitril	20 % H ₂ O	3	<i>exo</i> - 191 (63 %) + 179 (15 %)
5	Acetonitril	-	5	191 (<i>exo+endo</i> ; 75 %) + 179 (23 %)
6	Acetonitril	-	7	<i>exo</i> - 191 (18 %) + 179 (Spuren)
7	THF	20 % H ₂ O	7	<i>exo</i> - 191 (15 %) + 179 (30 %)

Abschließend wurde Acetonitril und nicht THF als Lösungsmittel für die nachfolgenden Reaktionen gewählt, obwohl die Ausbeuten in beiden Lösungsmittelsystemen relativ ähnlich

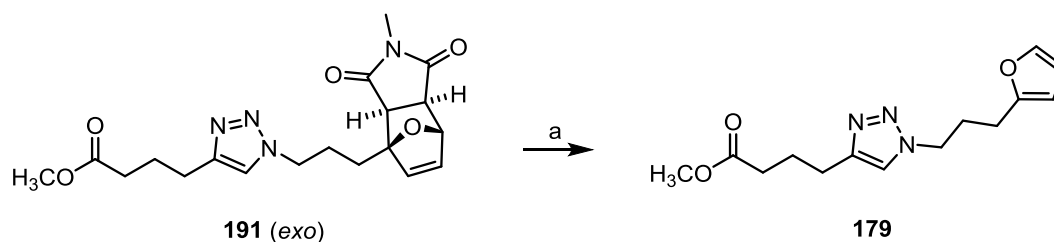
sind. Der Grund dafür ist die spätere Reinigung der Ansamitocin-Derivate mittels HPLC, die in Acetonitril durchgeführt wird.

Unter Anwendung der bereits für Methylene-Linker **178** beschriebenen Bedingungen wurde Methylester **182**, als eine nicht trennbare Mischung aus *exo*- und *endo*-Produkten in quantitativer Ausbeute generiert (Schema 83). Da für den weiteren Reaktionsverlauf dieser Befund keine Rolle spielte, wurde entschieden, auf das aufwendige Reinigungsverfahren zu verzichten.



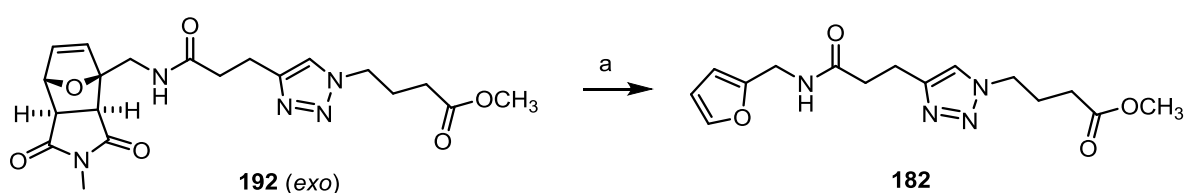
Schema 83: Synthese von DIELS-ALDER-Produkt **192**. Bedingungen: a) *N*-Methylmaleimid, MeCN, 65 °C, 3 d, quant.

Nachdem die passenden Bedingungen der DIELS-ALDER-Cycloaddition für beide Linker gefunden wurden, wurde die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion untersucht. Die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion wurde zunächst in Acetonitril bei 110 °C getestet. Für den Triazol-Linker **191** stellte sich heraus (Schema 84), dass die Reaktion zur Bildung von Methylester **179** in quantitativer Ausbeute verläuft.



Schema 84: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h, quant.

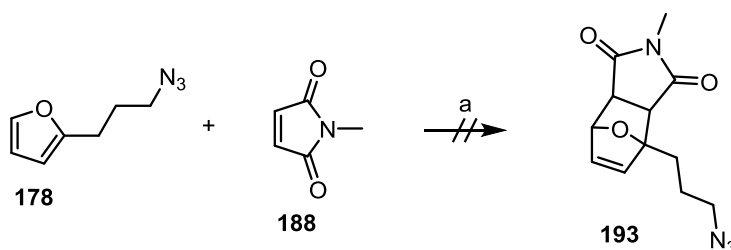
Im Gegensatz dazu wurde bei der RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion mit dem Amid-Linker **192** die Bildung von Triazol **182** in eher mäßiger Ausbeute verzeichnet (Schema 85), wobei das Edukt reisoliert werden konnte.



Schema 85: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion zu Methylester **182**. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h, 57 %.

Die Ergebnisse der durchgeführten DIELS-ALDER- sowie RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen lassen sich bezüglich des Einflusses der Linkerverbindungselemente auf die Richtung der Gleichgewichtsreaktion wie folgt zusammenfassen. Der Amid-Linker **182** begünstigt die Bildung von DIELS-ALDER-Produkt **192** und weiterhin ist das verwendete Triazol **191** für die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion geeignet.

Parallel wurde die Reihenfolge der Kupplungsreaktionen geändert und untersucht. Zunächst sollte eine DIELS-ALDER-Cycloaddition erfolgen und anschließend die „CLICK“-Derivatisierungen. Nach drei Tagen stellte sich heraus, dass eine nicht definierbare Produktmischung vorliegt (Schema 86). Mittels IR-Spektroskopie konnte aber auch keine Bande für die Azido-Gruppe bei **193** detektiert werden. Es wurde versucht, die Produkte zu isolieren und zu identifizieren. Allerdings wurde nach mehreren misslungenen HPLC-Läufen entschieden, die Route zu verwerfen.



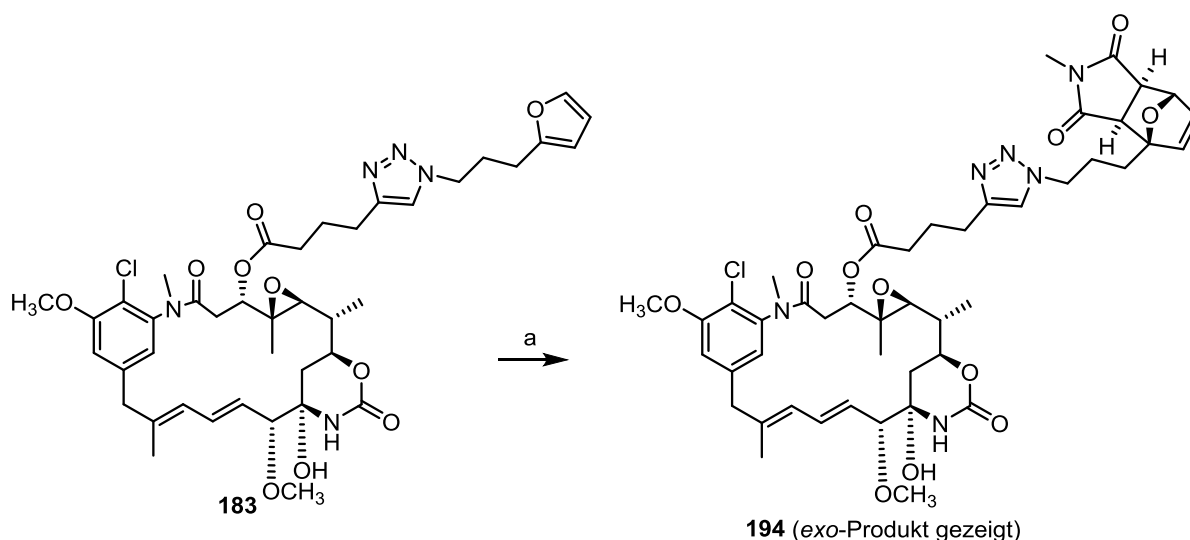
Schema 86: Synthese von DIELS-ALDER-Produkt **193**. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 3 d.

Aufgrund dieser Erkenntnisse über den Verlauf der DIELS-ALDER- und RETRO- DIELS-ALDER-Reaktionen, wurden die optimierten Reaktionsbedingungen auf Ansamitocin-Derivate übertragen.

4.4.3 DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen mit Ansamitocin-Derivaten

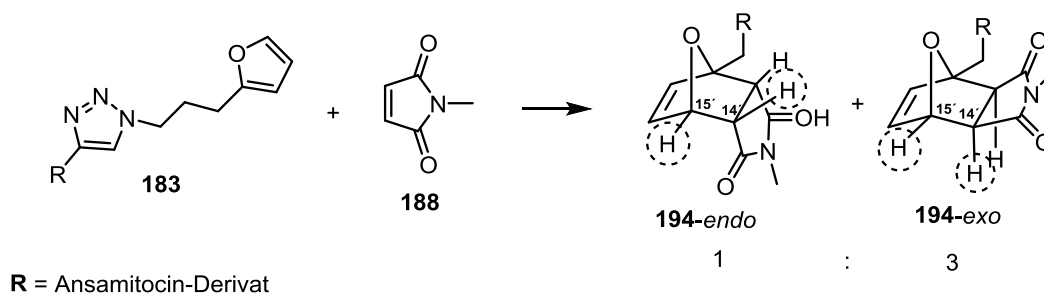
Im Folgenden sollte die DIELS-ALDER-Cycloaddition, welche bereits an Modellsubstanzen untersucht wurde, auf die Naturstoffe übertragen werden. Die Reaktionen wurden zunächst mit *N*-Maleimid getestet und nicht direkt mit funktionalisiertem MAGSILICA[®], da es *bis dato* noch keine Studien zu diesem Reaktionstyp mit Ansamitocinen gab. Außerdem sollte die Reversibilität anhand der zurückgewonnenen DIELS-ALDER-Produkte studiert werden.

Die dreitägige Reaktion von *N*-Maleimid mit Triazol-Ansamitocin **183** (Schema 87) wurde nach dem Beenden direkt mittels HPLC gereinigt. Sie verlief unter Bildung von cyclischen Produkten **194** (*exo:endo* = 3:1) in einer Gesamtausbeute von 77 %.



Schema 87: Synthese von DIELS-ALDER-Produkt **194**. Bedingungen: a) *N*-Methylmaleimid, MeCN, 65 °C, 3 d, 77 %.

Das Identifizieren von *endo*- bzw. *exo*-Triazolen geschah anhand der bereits bekannten Daten von Modellsubstraten und über die $^3J_{\text{H-H}}$ -Kopplungskonstanten der Protonen H-14' und H-15' (Schema 88). Im Falle einer *endo*-Anordnung stehen diese Protonen *trans* zueinander und zeigen eine Kopplung von etwa 2.1 Hz. Sofern jedoch das *exo*-Produkt vorliegt, stehen diese beiden Protonen *gauche* zueinander, sodass keine Kopplung beobachtet werden kann.



Schema 88: DIELS-ALDER-Cycloaddition zwischen *N*-Methylmaleimid **188** und Furan **183**.

Das *exo:endo*-Verhältnis in DIELS-ALDER-Produkt **194** wurde anhand der Integration beider H-15'-Signale in $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestimmt (Abbildung 37).

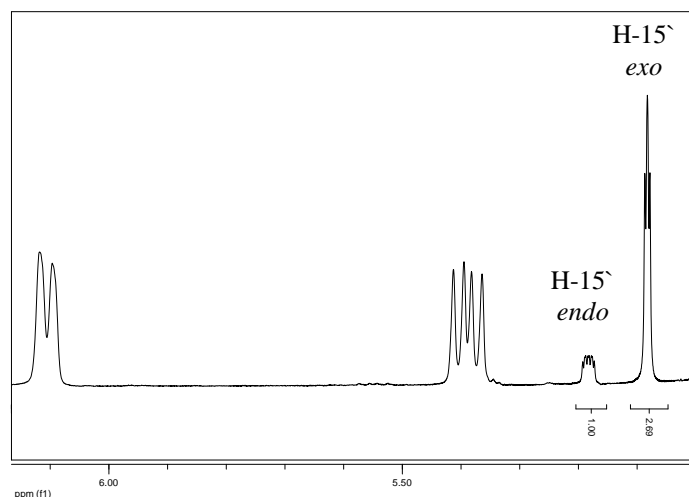
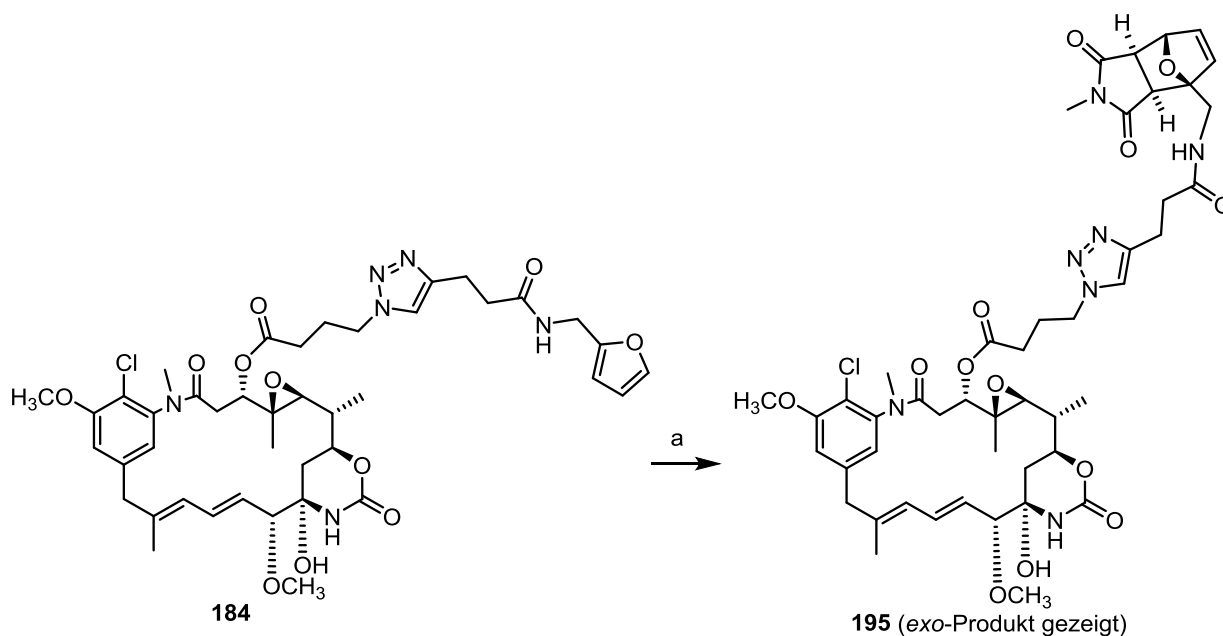


Abbildung 37: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Produktes **194** zur Bestimmung von *exo:endo*-Verhältnis.

Da für den weiteren Reaktionsverlauf die Entstehung der *exo:endo*-Mischung keine Rolle spielte, wurde entschieden, auf die aufwendige Isomerentrennung zu verzichten.

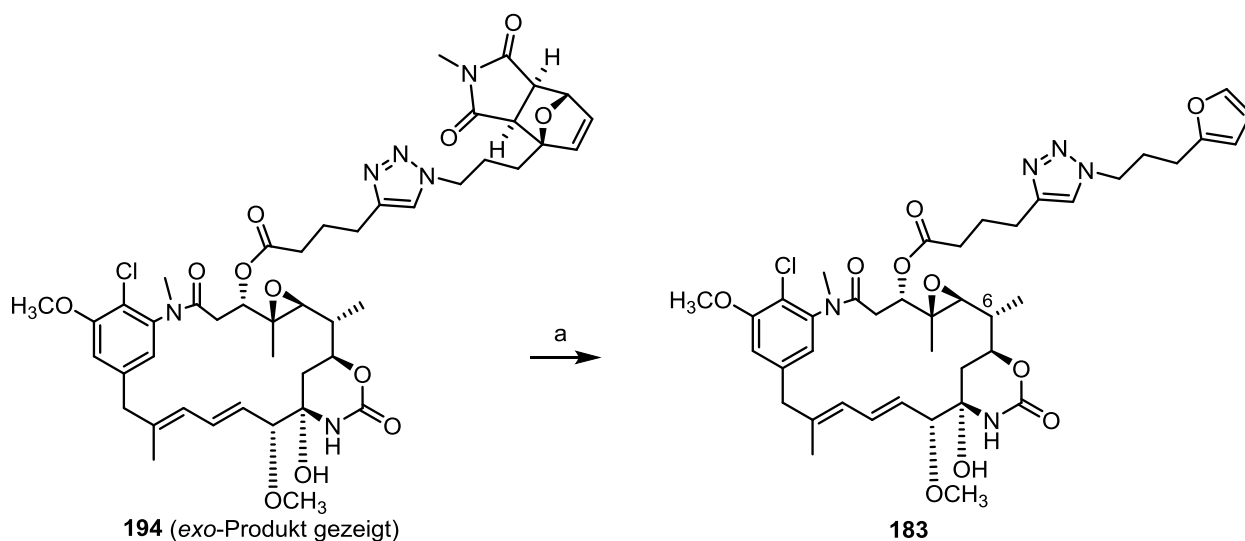
Unter den bereits beschriebenen Bedingungen wurde schließlich das Amid **184** mit *N*-Methylmaleimid zum Triazol **195** umgesetzt. Nach Reinigung mittels HPLC konnte ein Gemisch aus *exo:endo*-Cyclisierungsprodukten **195** (*exo:endo* = 5:1) in quantitativer Ausbeute isoliert werden (Schema 89). Die Bestimmung des *exo:endo*-Verhältnisses gelang analog zum Produkt **194**.



Schema 89: Synthese des DIELS-ALDER-Produktes **195**. Bedingungen: a) *N*-Methylmaleimid, MeCN, 65 °C, 3 d, quant.

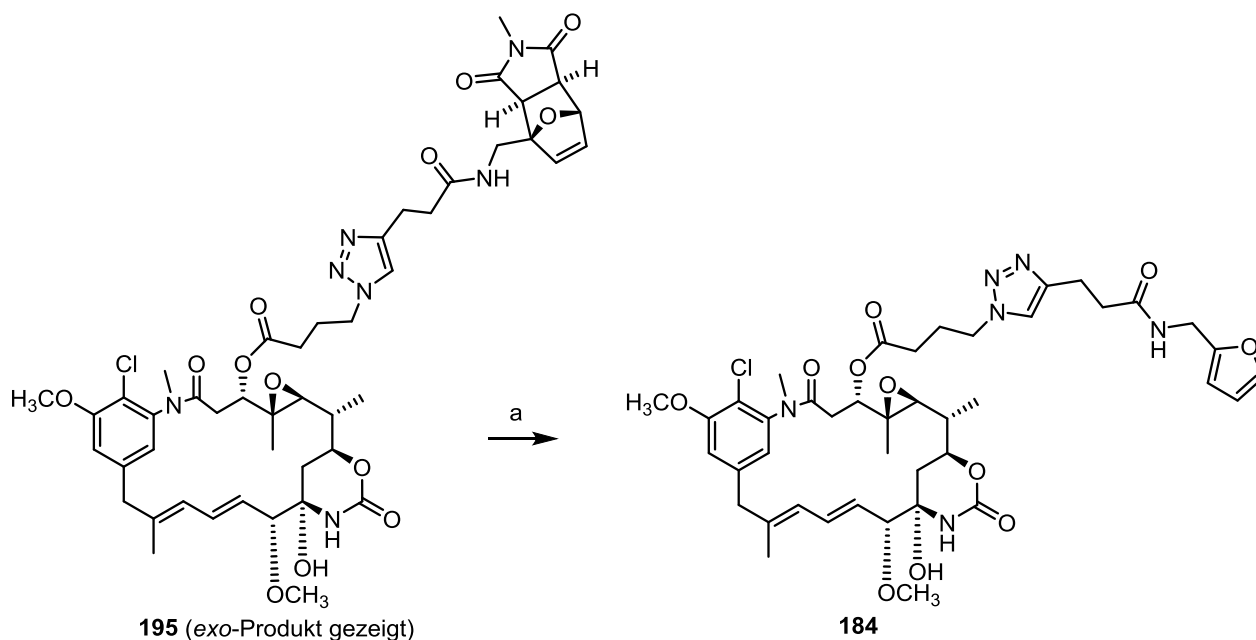
Die dazugehörigen RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen wurden als erfolgreich bewertet. Die quantitative Umsetzung zum Furan **183** gelang in einer Ausbeute von 85 % (Schema 90). Das

isolierte Produkt wurde per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie identifiziert und mit bereits gewonnenen Daten verglichen. Es stellte sich heraus, dass es sich um das bereits isolierte Furfurylansamitocin-Derivat **183** handelt.



Schema 90: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h, 85 %.

Die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion mit Amid-Ansamitocin-Derivat **195** wurde in Acetonitril bei 110 °C durchgeführt und das Furfurylansamitocin **184** in einer mäßigen Ausbeute von 40 % erhalten (Schema 91), obwohl der Reaktionsumsatz massenspektrometrisch verfolgt und zunächst als quantitativ eingestuft wurde. Als möglicher Grund wurde das Einengen des Lösungsmittels des Rohproduktes vermutet, dass die DIELS-ALDER-Cycloaddition einleitete, denn das Edukt wurde ebenso isoliert.



Schema 91: Synthese von Furfurylamid **184**. Bedingungen: a) *N*-Methylmaleimid, MeCN, 65 °C, 3 d, 40 %.

Analog zu den Modellsubstraten konnte auch bei den vorliegenden Ansamitocin-Derivaten der Einfluss der Linkerverbindungselemente auf die Reaktionsrichtung beobachtet werden. Durch die Verwendung von Amid in **184** wurde die Bildung von DIELS-ALDER-Produkt **195** in quantitativer Ausbeute gefunden. Die Begünstigung der RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion konnte mit dem Methylen-Linker in **183** erreicht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Bedingungen und Materialien für das Verknüpfen von Ansamitocin-Derivaten auf funktionalisiertes MAGSILICA[®] geeignet sind und in guten Ausbeuten zu neuen Konjugaten auf Ansamitocin-Basis führen könnten.

4.4.4 Reaktionen an Nanopartikeln

Ein Schlüsselschritt zum erfolgreichen Einsatz der DIELS-ALDER-Cycloaddition in *magnetic drug targeting* stellte die Übertragung der bereits an Testmodellen erprobten Bedingungen auf MAGSILICA[®]-Nanopartikel dar. Über die Möglichkeiten der Funktionalisierung der Oberfläche von MAGSILICA[®]-Nanopartikel wurde bereits in Arbeiten von JENS WEGNER und LENA MÖLLER diskutiert.^{108,97}

MAGSILICA[®]-Nanopartikel bestehen aus einem ferritischen Kern, der sich zu einem Großteil aus Maghemit (γ -Fe₂O₃) und Magnetit (Fe₃O₄) zusammensetzt. Dieser ferritische Kern ist von einer Kieselgelhülle umgeben (Abbildung 38). Die Hülle verhindert das Agglomerieren der einzelnen Partikel und schützt den magnetischen Kern vor Zersetzungen. MAGSILICA[®]-Nanopartikel sind ein Entwicklungsprodukt der EVONIK-Industries.¹¹¹

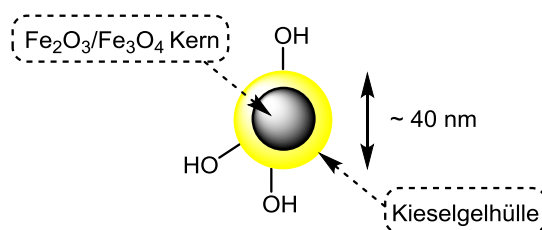
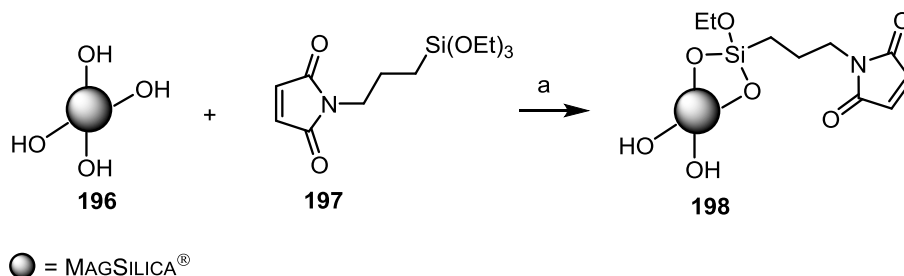


Abbildung 38: Schematische Darstellung von MAGSILICA-Nanopartikel[®].

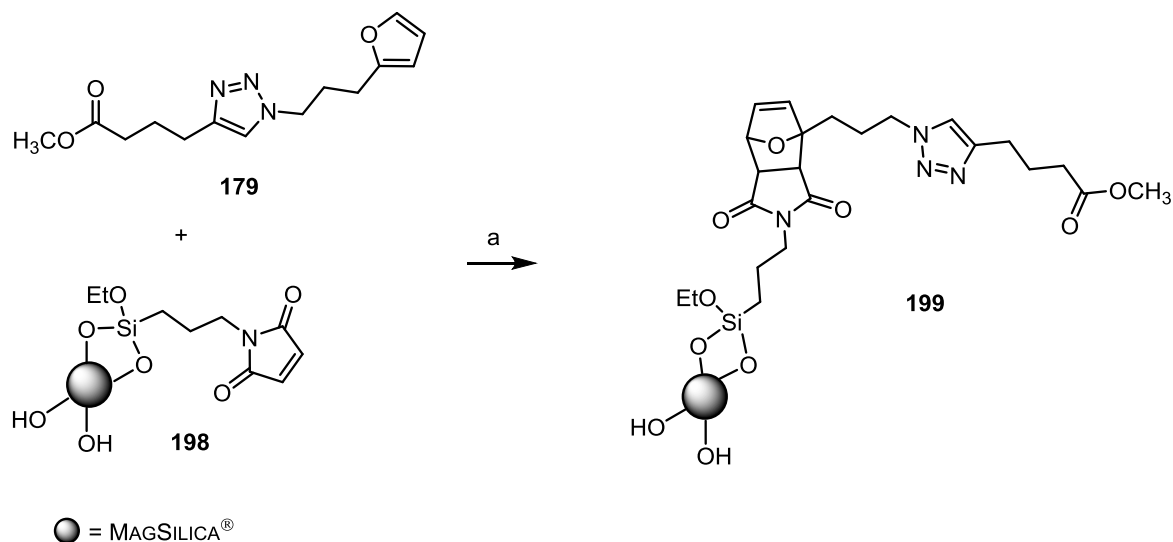
¹¹¹ S. Ceylan, Dissertation, *Entwicklung eines Induktionsheizkonzepts für Durchflussreaktoren und Untersuchungen zur Palladium-katalysierten Umpolungsallylierung*, Leibniz Universität Hannover, Hannover, 2011.

Der erste Schritt der Funktionalisierung von MAGSILICA[®] wurde durch LENA MÖLLER durchgeführt und optimiert.⁹⁷ Die Anbindung von Maleinsäureamid **197** an MAGSILICA[®] erfolgte innerhalb von 66 Stunden bei 65 °C (Schema 92).



Schema 92: Konjugation von Maleinsäureamid **197** an MAGSILICA-Nanopartikel[®]. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 66 h.

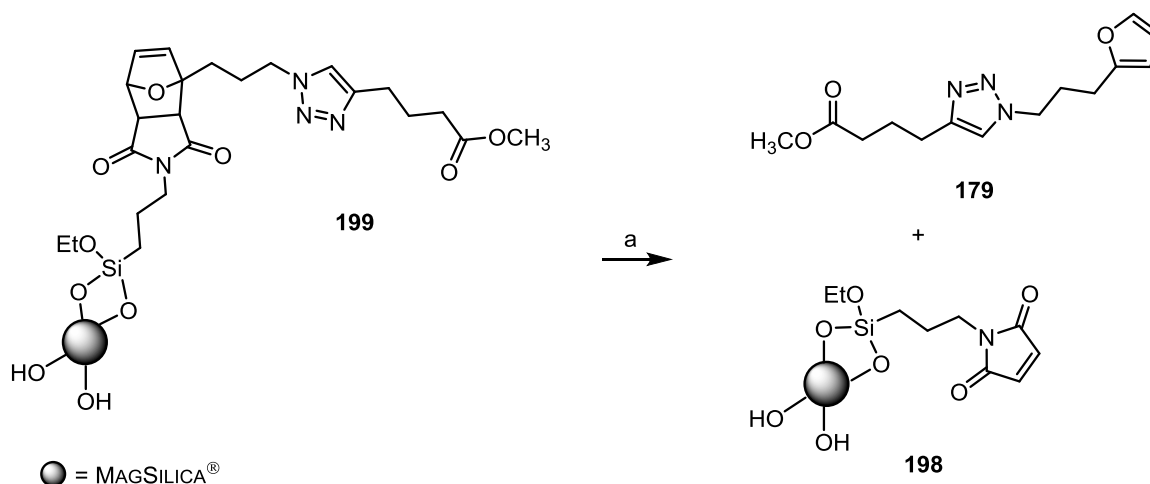
Der nächste Schritt der Funktionalisierung beinhaltete die Konjugation von Furan **179** mittels DIELS-ALDER-Cycloaddition. Unter Anwendung der bereits für das Testsystem beschriebenen Bedingungen wurde hochfunktionalisiertes MAGSILICA[®] **199** generiert (Schema 93). Allerdings war die Untersuchung der beschichteten Partikel mittels IR-, UV-, LC/MS- oder NMR-Analysemethoden unmöglich, so dass entschieden wurde, das nicht aufgeladene Furan zu reisolieren, um daraus den Grad der Umsetzung bestimmen zu können.



Schema 93: Konjugation von Methyl ester **179** an MAGSILICA-Nanopartikel[®]. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 3 d.

Nach dreitägiger Reaktion wurden die Nanopartikel magnetisch fixiert und mit Methanol solange gespült bis mittels LC/MS kein Furan **179** mehr nachzuweisen war. Der Rückstand wurde anschließend eingengt und chromatographiert. Furan **179** konnte in einer Ausbeute von 52 % reisolieren werden. Es wurde angenommen, dass die restlichen 48 % des Furans **179**

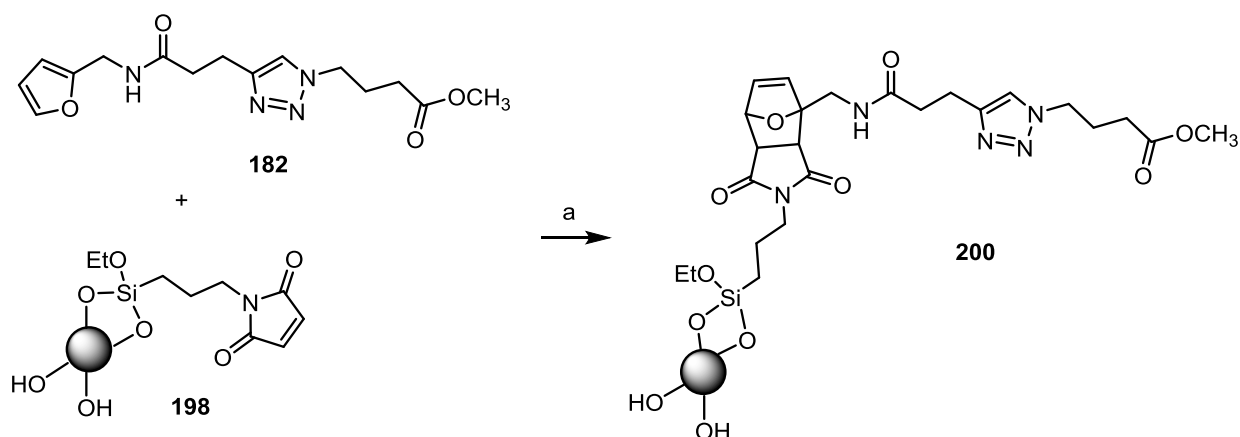
als DIELS-ALDER-Produkt **199** auf der Oberfläche der Nanopartikel gebunden wurden. Zum Überprüfen, ob Furan tatsächlich auf der Oberfläche angeknüpft wurde, wurde eine RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion durchgeführt. Für diese Reaktion wurden die bereits etablierten Bedingungen übernommen (Schema 94). Nach vier Stunden bei 110 °C wurden die Partikel magnetisch fixiert und der Rückstand abpipettiert. Die Partikel wurden solange mit Methanol gewaschen bis kein Furan mittels LC/MS detektiert werden konnte.



Schema 94: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h.

Nach chromatographischer Reinigung wurde Triazol **179** in einer Ausbeute von 25 %, in Bezug auf das vorher aufgeladene Furan **179** (Schema 93-94) erhalten. Anschließend wurden MAGSILICA[®]-Nanopartikel in Acetonitril suspendiert und weitere 24 Stunden bei 110 °C erhitzt. Es gab keine Hinweise auf die Freisetzung von weiterem Furan **179**. Dadurch wurde gezeigt, dass die Spaltung des aufgeladenen Methylesters **179** bereits nach vier Stunden Reaktion vollständig war. Der prinzipielle Erfolg der in Schema 94 gezeigten Reaktion konnte somit nachgewiesen werden.

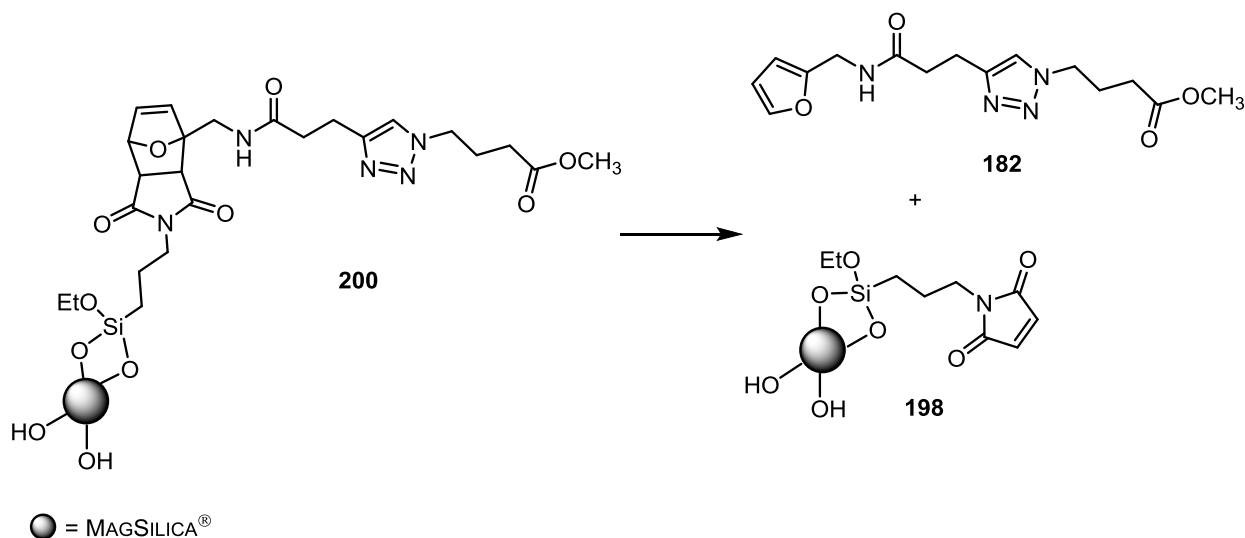
Parallel wurde Furfurylamid **182** in einer DIELS-ALDER-Cycloaddition mit MAGSILICA[®] getestet (Schema 95). Die Umsetzung geschah nach der bereits etablierten Methode anhand der Kalibrationsgerade (siehe Anhang). Es wurde 58 % des Triazols **182** reisoliert, somit sollten die anderen 42 % auf der Oberfläche gebunden vorliegen.



● = MAGSILICA[®]

Schema 95: Konjugation von Methyl ester **182** an MAGSILICA-Nanopartikel[®]. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 3 d.

Zum Testen der RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion wurden die beladenen Partikel bei 110 °C zuerst vier Stunden und anschließend 24 Stunden erhitzt (Schema 96). Nach 4 Stunden Reaktionszeit wurden 52 % des Furfurylamids **182** nach 24 Stunden weitere 10 %, bezogen auf die tatsächliche Beladung, isoliert. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die aufgeladene Menge an Triazol **182** größtenteils nach 4 Stunden wieder abgespalten werden können.



● = MAGSILICA[®]

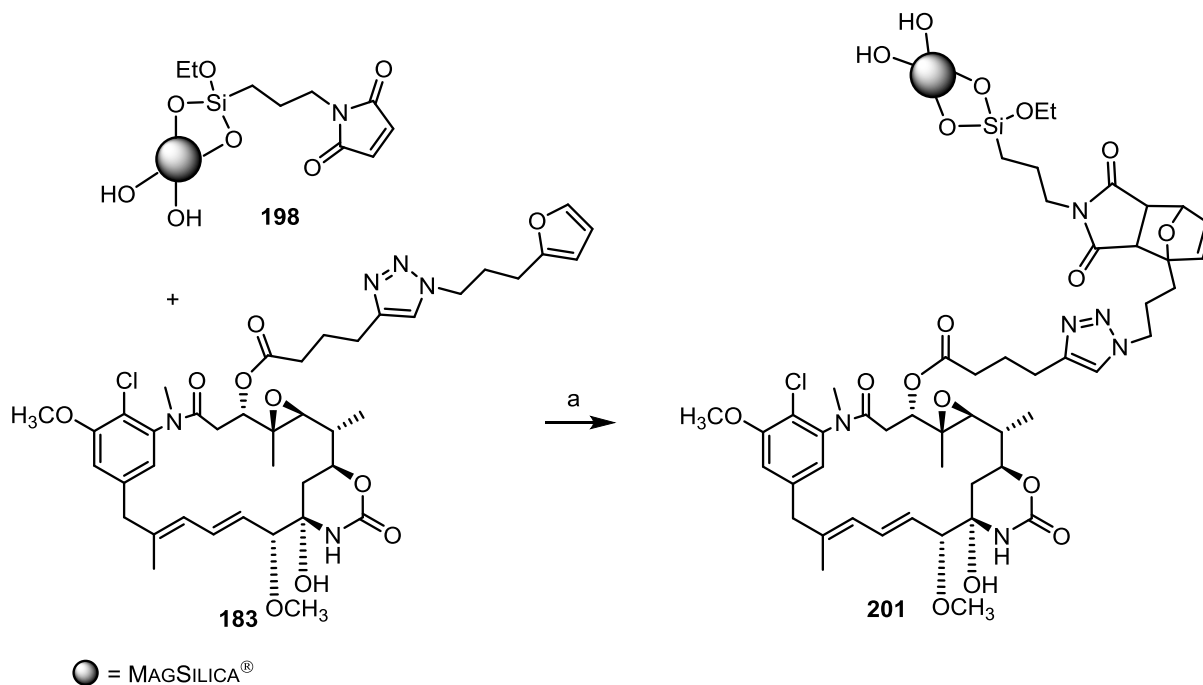
Schema 96: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h → 24 h.

Auf weitere Optimierungsstudien wurde verzichtet, da es von großem Interesse war, die getesteten Bedingungen auf die Ansamitocin-gebundenen Furane zu übertragen.

4.4.5 Studien zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen mit Ansamitocinen mittels konventionellen Heizens

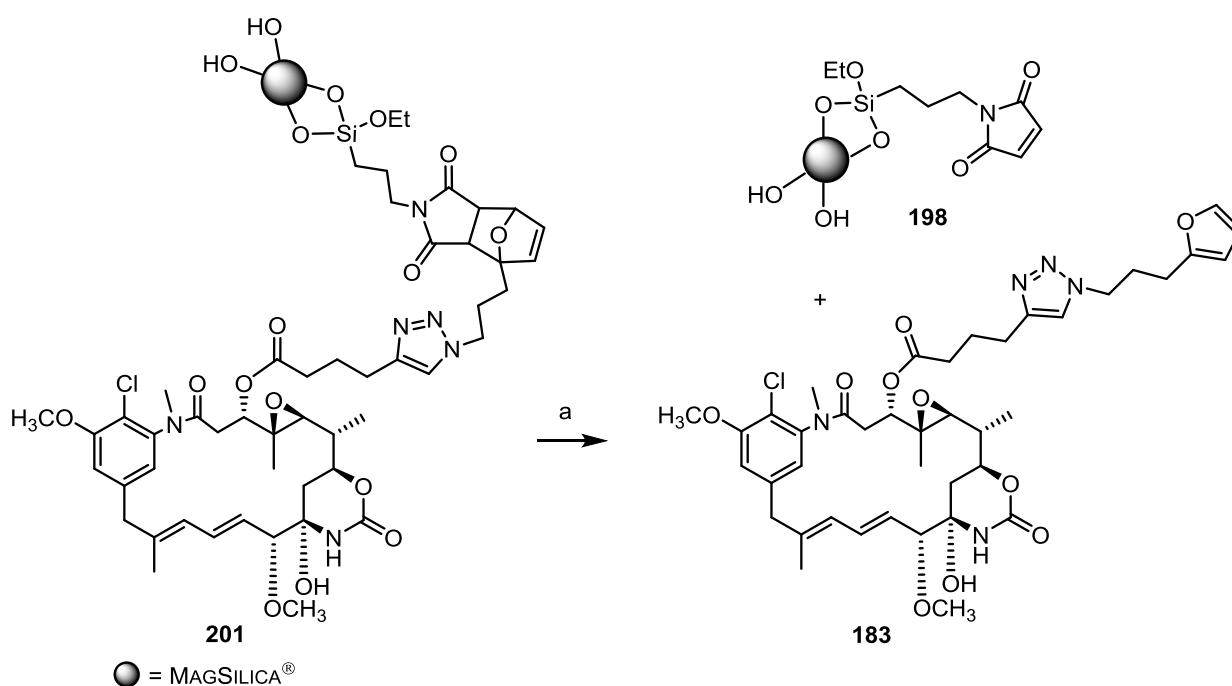
In diesem Kapitel werden die Experimente zwischen den funktionalisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikeln und hochtoxischen Ansamitocin-Derivaten ausführlich beschrieben. Diese Studien eröffnen den Zugang zu den neuen Konjugaten auf Ansamitocinbasis, die zu den Tumorzellen magnetisch geführt und anschließend selektiv gespaltet werden können.

Zunächst wurde die DIELS-ALDER-Cycloaddition mit Triazol **183** unter den bereits an einem Modellsystem getesteten Bedingungen durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in Acetonitril bei 65 °C innerhalb von drei Tagen (Schema 97). Das Edukt **183** wurde aus dem Rückstand reisoliert und die Beladung auf den Nanopartikeln bestimmt. Es wurden 40 % von nicht aufgeladenem Ansamitocin zurückgewonnen, sodass von 60 % Beladung auf der Oberfläche von Nanopartikel ausgegangen werden kann. Für die bessere Reproduzierbarkeit wurde das Experiment mehrmals wiederholt und es stellte sich heraus, dass die tatsächliche Beladung von Nanopartikel mit Ansamitocin-Derivat **183** in einem Bereich zwischen 40 % und 60 % liegt.



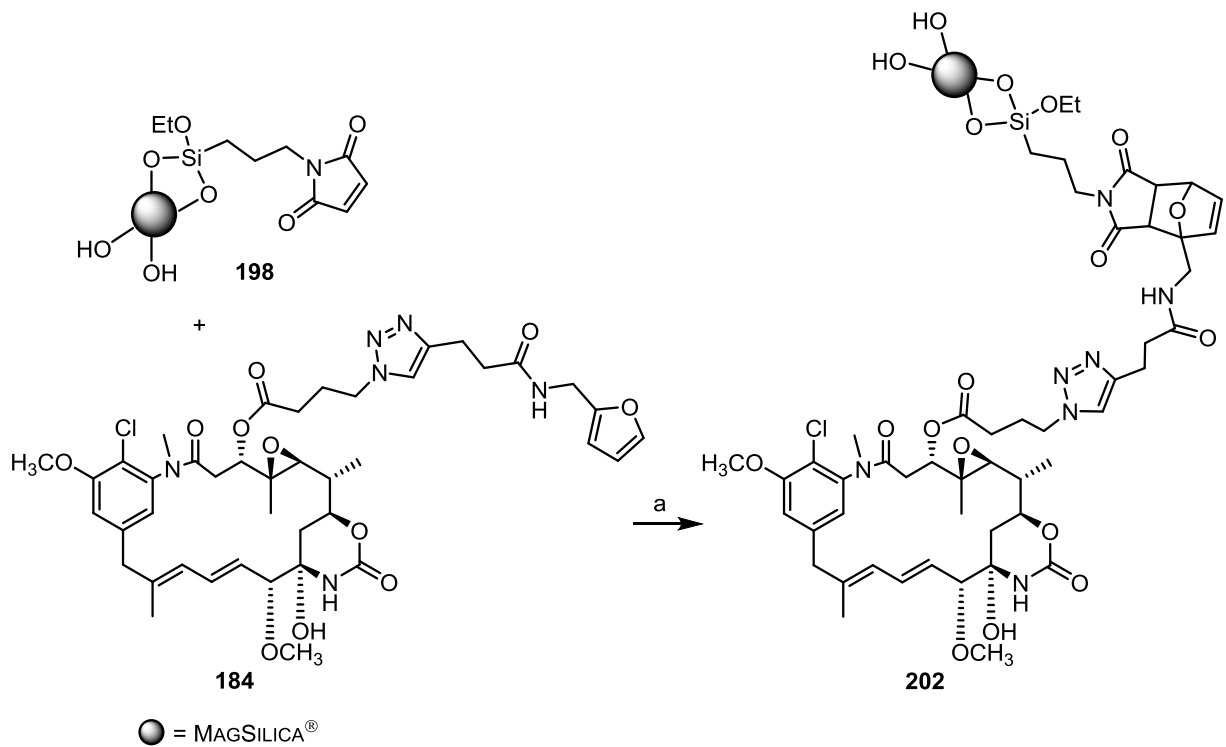
Schema 97: Konjugation von Furfurylansamitocin **183** an MAGSILICA-Nanopartikel[®]. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 3 d.

Die ersten Versuche zur RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion wurden zunächst in Acetonitril bei 110 °C mittels konventionellen Heizens durchgeführt. Nach vierstündiger Reaktionszeit wurden die Partikel magnetisch fixiert und der abpipettierte Rückstand mittels HPLC gereinigt. Die thermische Spaltung des auf Nanopartikel immobilisierten Ansamitocin-Derivats **183** geschah in quantitativer Ausbeute (Schema 98). Das isolierte Derivat **183** wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und mit den bereits vorhandenen Daten erfolgreich identifiziert.

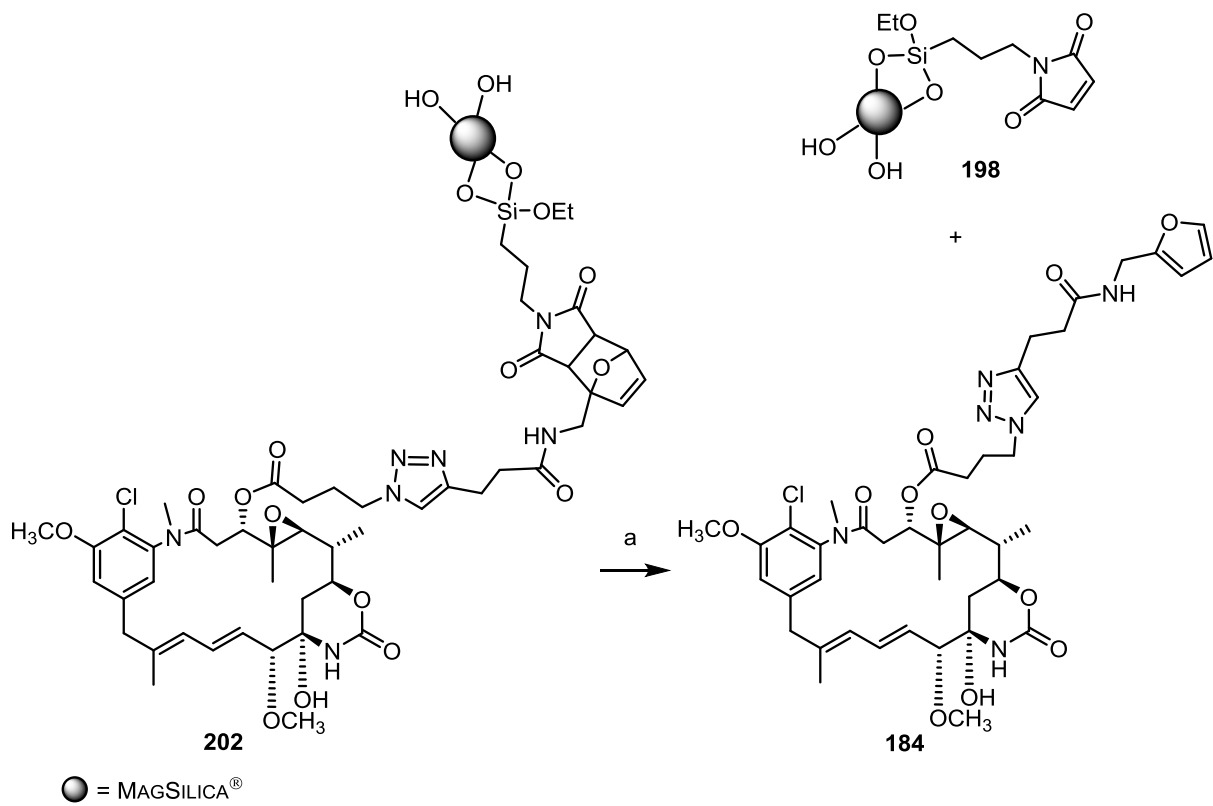


Schema 98: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h.

Des Weiteren wurde die DIELS-ALDER-Cycloaddition mit Amidofurfurylansamitocin **184** erprobt (Schema 99). Nach dem Reisolieren von 45 % des nicht aufgeladenen Ansamitocins **184**, wurde die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion in Acetonitril bei 110 °C mittels konventionellen Heizens getestet (Schema 100). Nach Reinigung des Rückstandes mittels semipräparativer HPLC konnte Ansamitocin-Derivat **184** in einer quantitativen Ausbeute in Bezug auf die tatsächliche Beladung isoliert werden. Das Derivat **184** wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und durch Vergleich mit den bereits vorhandenen Daten erfolgreich identifiziert.



Schema 99: Konjugation von Furfurylsamitocin **184** an MAGSILICA-Nanopartikel[®]. Bedingungen: a) MeCN, 65 °C, 3 d.



Schema 100: RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion. Bedingungen: a) MeCN, 110 °C, 4 h.

Der Einsatz von Acetonitril in DIELS-ALDER-Cycloaddition spielte eine untergeordnete Rolle. Allerdings ist es für den Erfolg der ausgewählten Wirkstoffabspaltung essentiell, denn die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion sollte schließlich unter physiologischen Bedingungen ablaufen. Die ersten Untersuchungen zur Abspaltung des Amid-Ansamitocin-Konjugates von MAGSILICA[®]-Nanopartikeln wurde deshalb auch unter Verwendung von Wasser als Lösungsmittel getestet. Nach 24 Stunden bei 110 °C konnten Spuren des Amid-Ansamitocins **189** massenspektrometrisch detektiert werden. Allerdings benötigen diese Experimente weitere Optimierungsstudien, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

Zusammenfassend wurde die Konjugation von Ansamitocin-Derivaten an funktionalisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikel erfolgreich durchgeführt. Die an Modellsubstraten etablierten Reaktionsbedingungen konnten auf die Nanopartikel übertragen werden. Die ersten Versuche zur selektiven thermischen Konjugat-Abspaltung von der Nanopartikeloberfläche konnten ebenso erfolgreich durchgeführt werden. Durch das Wiederholen der Experimente sollte sich die Reproduzierbarkeit der Reaktionen nachweisen. Für die Verbesserung der tatsächlichen Beladung von MAGSILICA[®]-Nanopartikel sind ebenfalls weitere Optimierungsstudien notwendig, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. Die Bestimmung der biologischen Aktivitäten der neuen Konjugate ist noch nicht abgeschlossen und wird derzeit am HELMHOLTZ Zentrum für Infektionsforschung (HZI) durchgeführt.

4.4.6 Studien zur DIELS-ALDER- und RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion mit Ansamitocinen mittels induktiven Heizens

Für die Anwendung in biologischen Systemen ist es von besonderer Bedeutung eine alternative Methode zur selektiven Abspaltung der Ansamitocin-Derivate zu finden, da ein externes Erhitzen der Nanopartikel innerhalb des menschlichen Körpers unmöglich ist.

Somit wurde entschieden, die RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen mit beladenen Nanopartikeln mittels induktiven Heizens zu testen. Der Effekt des gezielten Erhitzens (Hyperthermie) wurde bereits in Kapitel 2 beschrieben. Der Erfolg dieser Methode eröffnet den Zugang für gezielte Anwendungen von Ansamitocin-Konjugaten als Antikrebsmedikamente.



Abbildung 39: Wassergekühlter Generator EW 5 (links), Induktor (rechts).

Die RETRO-DIELS-ALDER-Studien wurden nur mit MAGSILICA[®]-Nanopartikeln, die mit Ansamitocin-Derivaten beladen sind, durchgeführt. Für die Bestimmung der Ausbeute wurden Kalibrationsgeraden¹⁰² für das jeweilige Konjugat unter Anwendung eines internen Standards erstellt. Die technischen Details zu dem Generator und Induktor (Abbildung 39) und die näheren Informationen zu Versuchsdurchführung sind dem EXPERIMENTELLEN TEIL dieser Arbeit, sowie den Arbeiten von JENS WEGNER und SASCHA V. CEYLAN zu entnehmen.^{108,111}

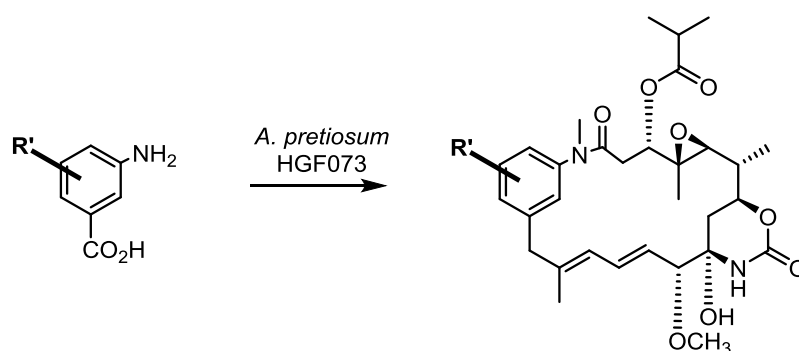
Zunächst wurden die Versuche in Acetonitril mit dem Methylen-Linker basierten Konjugat **183** durchgeführt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Pulsweitenmodulationen (500 % und 600 %) am Generator eingestellt. Es konnte erst bei einem eingestellten Energieeintrag von 600 % die Abspaltung des Ansamitocin-Derivates massenspektrometrisch beobachtet werden. Für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb nur eine Pulsweitenmodulation von 600 % verwendet. Die während des Versuches mit einem IR-Thermometer gemessene Temperatur des Lösungsmittels betrug 40 °C. Die Abspaltung des Konjugates **183** geschah bei dieser Temperatur in einer Ausbeute von 2 %.

Ein besseres Ergebnis wurde mit Amid-Ansamitocin-Konjugat **184** erzielt. Die Abspaltung von MAGSILICA[®]-Nanopartikeln geschah bei 40 °C in einer Ausbeute von 22 %. Zum Überprüfen, ob beim Aufladen der Partikel ein Fehler aufgetreten war oder die tiefe Temperatur die Ursache für die schlechte Ausbeute für die Abspaltung war, wurden die Nanopartikel in Acetonitril aufgeschlämmt und 24 Stunden bei 110 °C im Ölbad erhitzt. Der Rückstand wurde anschließend eingeeengt und massenspektrometrisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Abspaltung des Amid-Konjugates in einer Ausbeute von 78 % geschah. Daraus folgt, dass die Reaktion stark temperaturabhängig ist. Für weitere Optimierungen an dieser Stelle sind umfassende Studien nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden konnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte das Konzept der Mutasyntese für die Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten erfolgreich realisiert werden (Schema 101).



Schema 101: Mutasyntese für die Darstellung von neuen Ansamitocin-Derivaten.

Dabei wurden zahlreiche modifizierte Startereinheiten synthetisiert (Abbildung 40) und an die AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 verfüttert. Drei AHBA-Analoga **46**, **67** und **71** wurden auf die PKS geladen und zu neuen Ansamitocin-Derivaten prozessiert.

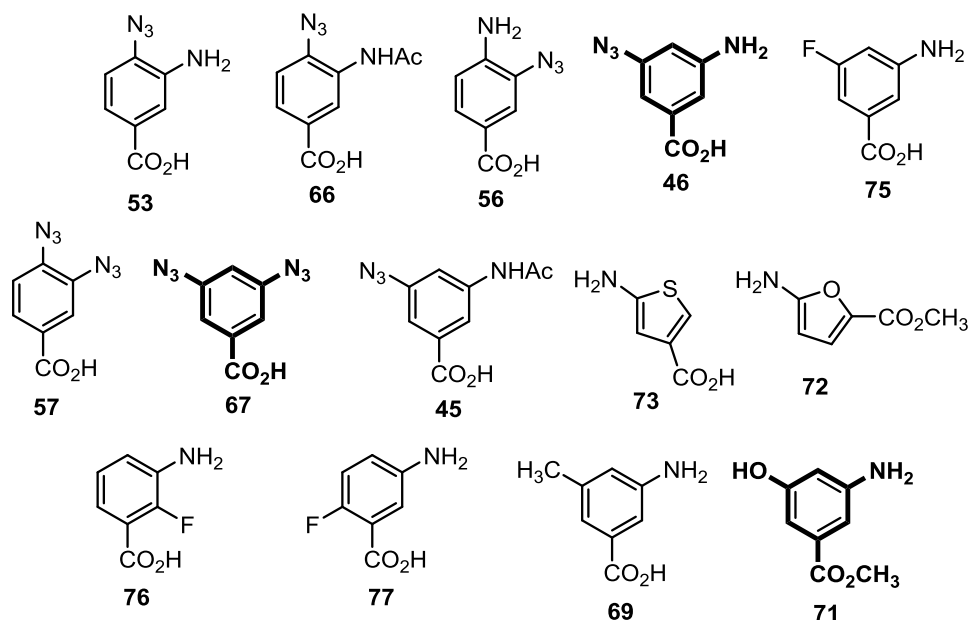
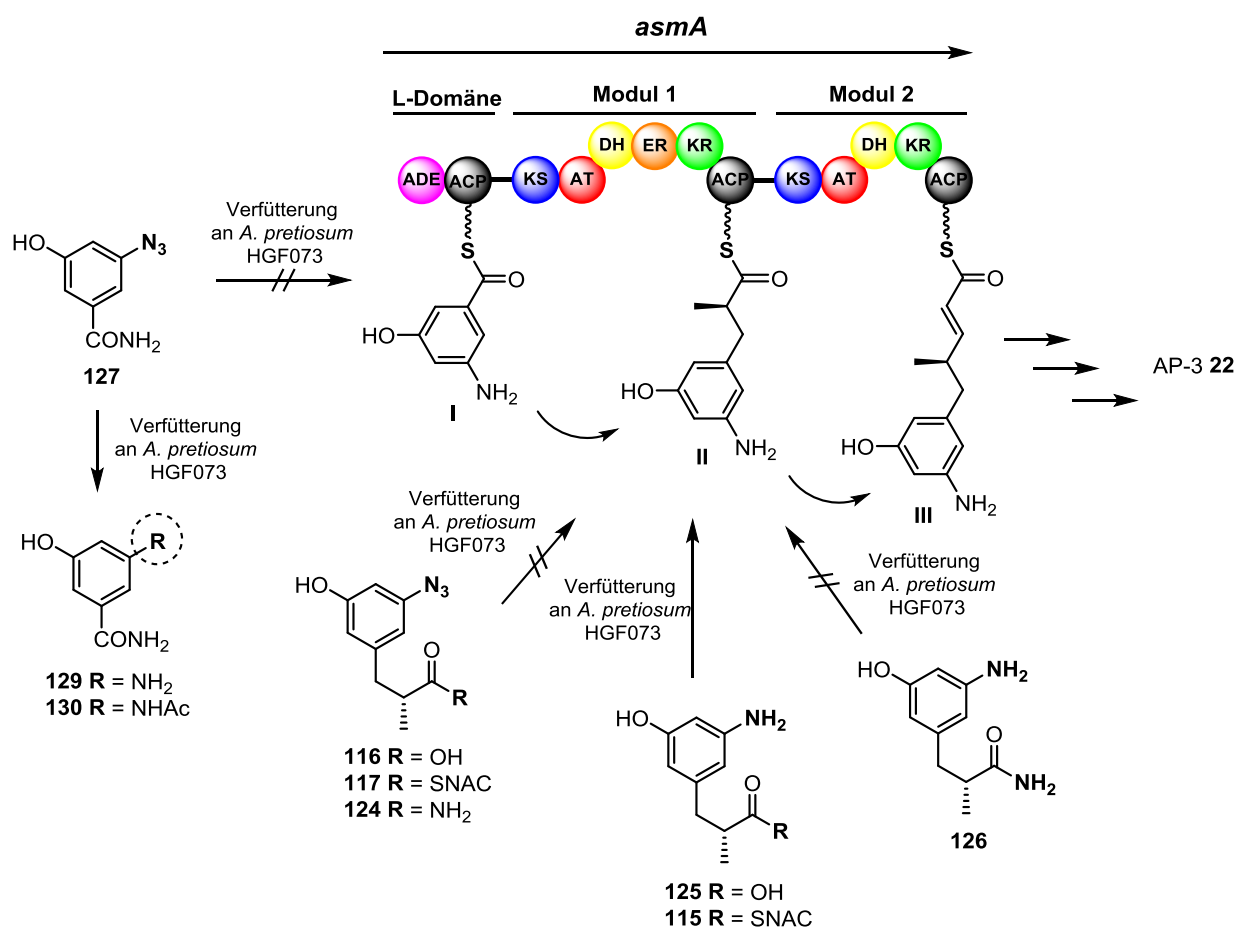


Abbildung 40: Die an *A. pretiosum* HGF073 verfütterten Mutasyntehone.

Während der mutasyntetischen Experimente mit Azido-AHBA-Analoga **46** und **67** wurde die Fähigkeit von *A. pretiosum* HGF073 festgestellt, die 3,5-substituierten organischen Azide

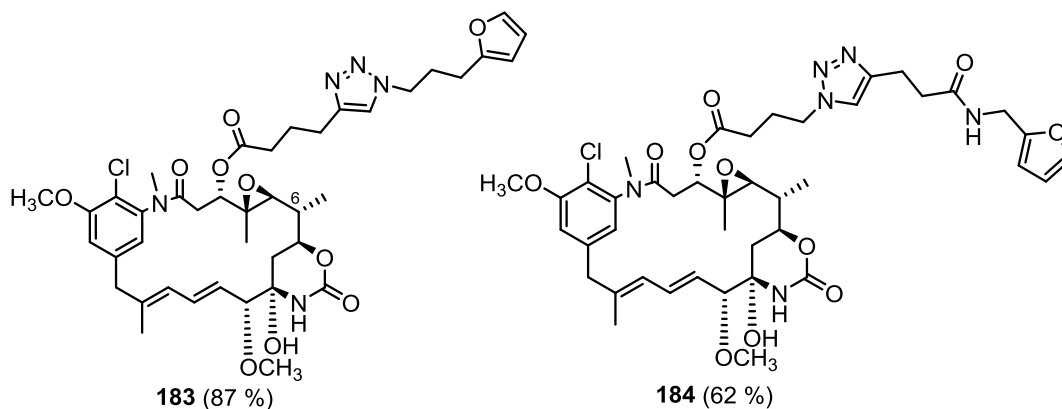
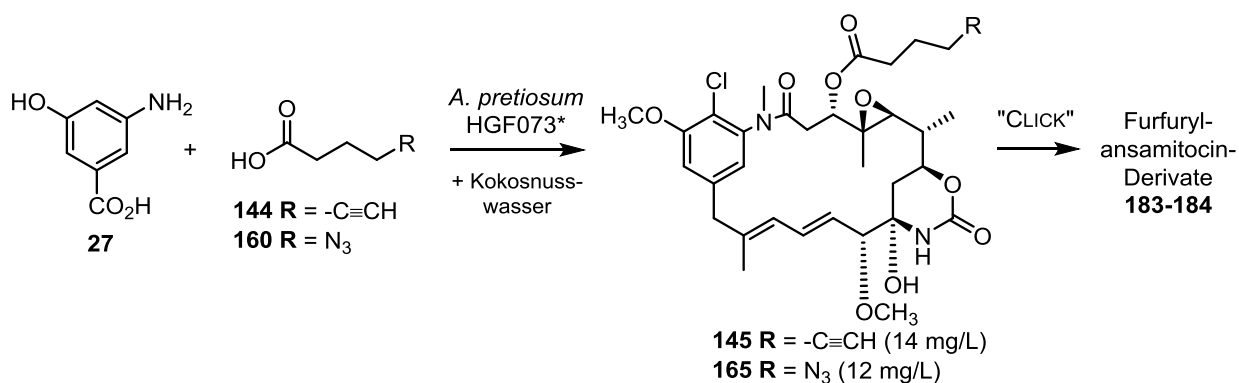
zu reduzieren und zu Ansamitocin-Derivaten zu prozessieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 12 neuartige Aminoansamitocine durch die Fermentation mit Azidobenzoessäure **46** isoliert und auf die biologische Aktivität getestet.

Weiterhin wurde der Zeitpunkt der Bioreduktion von organischen Arylaziden in biochemischen Studien untersucht. Darüber hinaus wurden sechs Diketide **115-117**, **124-126** und das Azidobenzamid **127** synthetisiert und an die AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 verfüttert (Schema 102). Die durchgeführten Komplementierungsexperimente zeigten, dass die Bioreduktion vor dem Aufladen auf die Polyketidsynthese stattfindet.



Schema 102: Ergebnisse der biochemischen Studien mit Diketiden **115-117**, **124-126** und Benzamid **127** über den Zeitpunkt der Bioreduktion; **AP-3:** Ansamitocin P-3 (**22**).

Zur Erzeugung von neuen Konjugaten auf Ansamitocin-Basis wurde erfolgreich Vorläufer-dirigierte Biosynthese der Esterseitenkette durchgeführt. Die Azido- bzw. Alkino-*O*-Maytansinole wurden in guten Ausbeuten erhalten und weiter mittels semisynthetischen „CLICK“-Derivatisierungen zu Furfuryl-Derivaten umgesetzt (Schema 103).



Schema 103: Kombinierte Muta- und Semisynthetische Darstellung von Konjugaten aus Ansamitocinen.

Der Einfluss von Kokosnusswasser auf die Mutasyntese zur Darstellung von Ansamitocin-Derivaten mit unnatürlichen Esterseitenketten erwies sich als essentiell. Es konnte auch ein Bestandteil des hochkomplexen Kokosnusswassers als Phytohormon Gibberellinsäure A₃ identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich neuartige Trifluoroansamitocin-Derivate sowohl fermentativ, als auch auf dem chemischen Wege generiert (Abbildung 41). Die Komplementierungsexperimente mit RUTJES-Linker ermöglichen in der Zukunft die Darstellung von Konjugaten aus Ansamitocinen ohne mehrere Reinigungs- und Syntheseschritte.

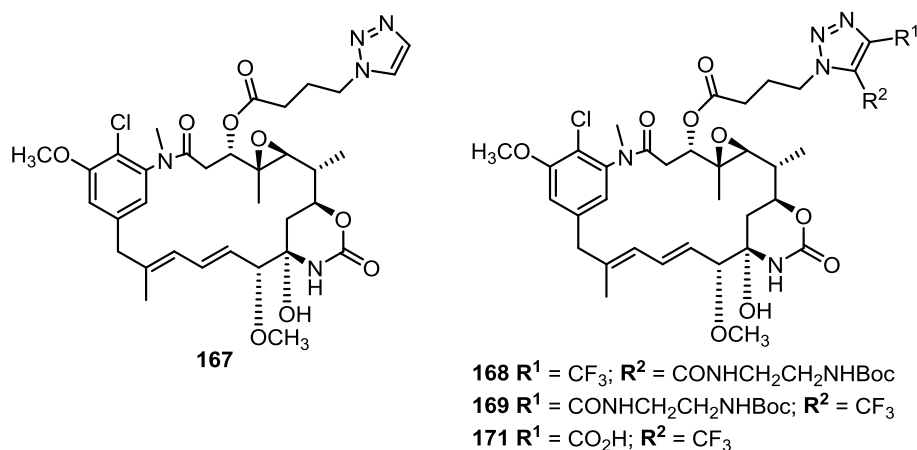
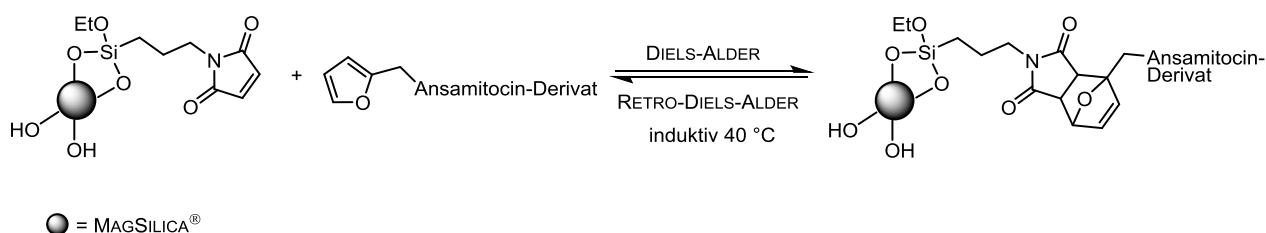


Abbildung 41: Neuartige Ansamitocin-Derivate.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Konjugate auf Ansamitocin-Basis für den selektiven Transport zum Tumorgewebe mit Erfolg entwickelt und in DIELS-ALDER-, sowie in RETRO-DIELS-ALDER-Reaktionen erprobt. Anschließend gelang auch die reversible Ligation von Ansamitocin-Derivaten auf MAGSILICA[®]-Nanopartikeln, sowie die selektive thermische Freisetzung vom Wirkstoff, die bereits bei 40 °C induktiv stattfindet (Schema 104).

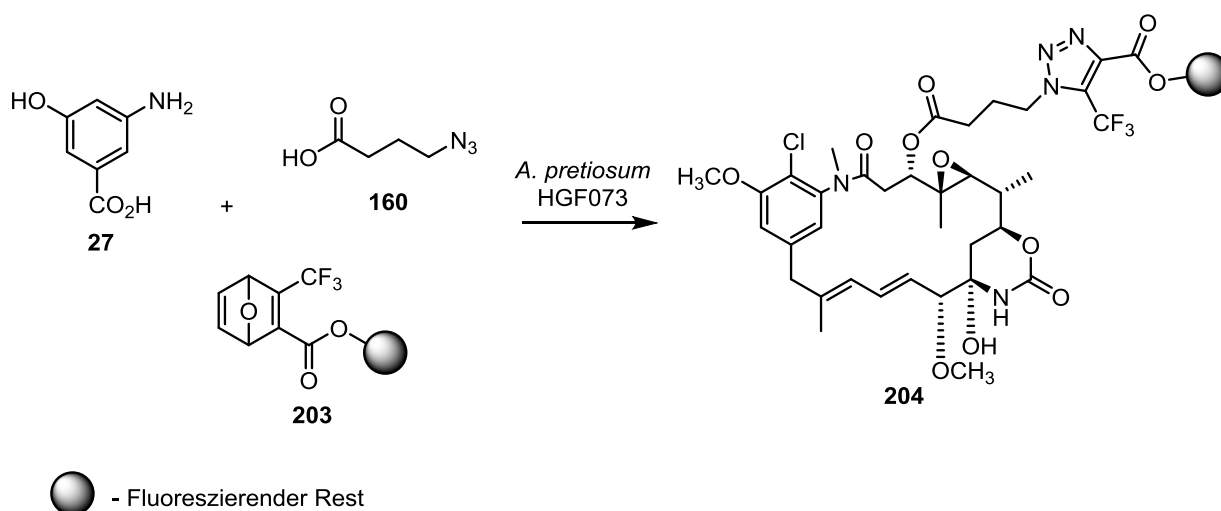


Schema 104: Das getestete *magnetic-drug-release*-System.

5.2 Ausblick

Die AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073 ist in der Lage die 3,5-substituierten organischen Azide zu reduzieren. Obwohl die Isolierung der Azidoreduktase einen hohen Aufwand erfordert, könnte dies zur Strukturaufklärung des einzigartigen noch nie in der Literatur beschriebenen Enzyms beitragen.

Durch die Fermentationen mit modifizierten bzw. fluoreszierenden RUTJES-Linkern könnten neue Ansamitocine dargestellt werden, die zur Aufklärung der Wirkungsweise *in vivo* dieser Naturstoffklasse dienen werden (Schema 105).



Schema 105: Mögliche Mutasynthese zur Darstellung von fluoreszierenden Ansamitocinen.

Des Weiteren könnten semisynthetische Modifizierungen mittels STILLE-Kupplung an Bromansamitocinen entwickelt werden, damit diese Konjugate anschließend in magnetischen Wirkstofftransport-Systemen eingesetzt werden können (Abbildung 42).

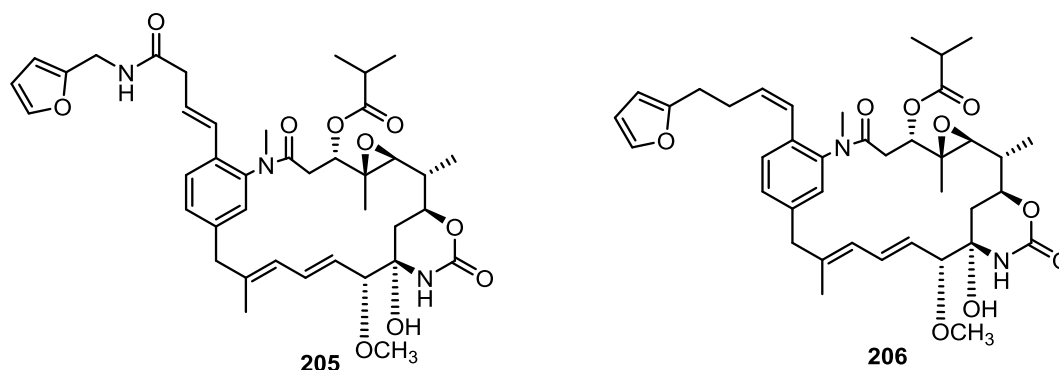


Abbildung 42: Mögliche Konjugate aus Ansamitocinen für den selektiven Wirkstofftransport und-freisetzung.

Außerdem soll der Einfluss von Kokosnusswasser auf die Ausbeute von Bromansamitocinen bei der Mutasynthese untersucht werden.

Für die bereits entwickelten Systeme der Wirkstofffreisetzung sollen neue Linker synthetisiert und unter physiologischen Bedingungen getestet werden. Außerdem sollen die Optimierungen in RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion mittels induktiven Heizens durchgeführt werden. Es sollte die Pulsweitenmodulation von 800 % für die Wirkstofffreisetzung untersucht werden.

In naher Zukunft sollen *in vivo* Experimente in selektiver, induktiver Wirkstofffreisetzung verwirklicht werden, die den weiteren Verlauf der entwickelten Strategie mitbestimmen können.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeine Hinweise zu den chemisch-synthetischen Arbeiten

Gerätschaften

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Die entsprechenden Glasgeräte wurden vor der Verwendung im Vakuum ausgeheizt; Spritzen und Kanülen wurden bei 80 °C getrocknet und mit Inertgas gespült.

Lösungsmittel und Reagenzien

Absolute Lösungsmittel wurden für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen zuvor nach Standardverfahren¹¹² getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt. Toluol und DIPEA wurden wasserfrei von der Firma ACROS erworben. Alle Reagenzien, deren Herstellung nicht angegeben ist, stammen von den Firmen ACROS, ALDRICH, ABCR, FLUKA und MERCK.

Bei sauerstoffempfindlichen Reaktionen wurde das Lösungsmittel durch Spülen mit Inertgas oder nach Ausfrieren im Vakuum (*freeze-pump-thaw degassing*) entgast. Bei wässrigen Lösungen handelt es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL 60M mit der Korngröße 40-63 µm (230-400 mesh) unter leichtem Überdruck durchgeführt. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden zuvor destilliert; das Eluentenverhältnis ist in den Versuchsvorschriften angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien vom ALUGRAM[®] XTRA SIL G/UV₂₅₄ der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Der Nachweis der Verbindungen erfolgte durch Fluoreszenzdetektion mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm und mittels Eintauchen in unterschiedliche Färbereagenzien¹¹³

¹¹² W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed., Butterworth and Heinemann, Oxford 1996.

¹¹³ J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis in der organischen Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1996.

(Anisaldehyd-, Bromkresolgrün-, Kaliumpermanganat- oder Ninhydrin-Tauchreagenz) mit anschließender Wärmebehandlung.

HPLC

Semipräparative HPLC wurde an einer MERCK HITACHI LaCrome HPLC-Anlage (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450 [$\lambda = 220-400$ nm]) durchgeführt. Es wurden folgende stationäre Phasen angewendet: **C-18** (TRENTEC AQ 5 μm 120 C18, 250 mm · \varnothing 8 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche 40 mm · \varnothing 8 mm), **C-18-ISIS** (NUCLEODUR C18 ISIS 5 μm von MACHEREY NAGEL, 250 mm · \varnothing 8 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche 40 mm · \varnothing 8 mm), **CN** (NUCLEODUR 100-5 CN-RP 5 μm von MACHEREY NAGEL, 250 mm · \varnothing 8 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche 40 mm · \varnothing 8 mm).

Die verwendeten organischen Lösungsmittel in HPLC-Qualität wurden von den Firmen ACROS und ALDRICH bezogen und vor dem Gebrauch im Ultraschallbad entgast. Wasser wurde über eine Filterkartusche gereinigt und anschließend doppelt destilliert.

Alternativ wurde präparative HPLC an einer VARIANT HPLC-Anlage (Pumpen Prestar Model 218, Variabler Wellenlängendetektor Prostar [$\lambda = 248$ nm]) mit paralleler Massendetektion (MICROMASS Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phasen **C-18** (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μm , 250 mm · \varnothing 25 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche 10 μm 30 mm · \varnothing 20 mm), **CN** (NUCLEODUR 100-5 CN-RP, MACHEREY NAGEL 250 mm · \varnothing 25 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche 10 μm 30 mm · \varnothing 20 mm) durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden mit Ameisensäure (FA) in einem Verhältnis 1:1000 gemischt. Die verwendeten stationären Phasen, sowie Betriebsbedingungen und Retentionszeiten (t_R) sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben.

Mikrowelle

Die Reaktionen im Mikrowellenfeld wurden mit einer Discover S-Class Mikrowelle der Firma CEM GmbH mit einer maximalen Leistung von 300 Watt durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR Spektren wurden mit den Geräten DPX-200 (200 MHz), AVS-400, DPX-400 (400 MHz) und DPX-500 (500 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur durchgeführt. Das verwendete Lösungsmittel ist jeweils angegeben und die Kalibrierung erfolgte auf das

durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachten Signals.¹¹⁴ Die chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qu = Quintett, se = Sextett, sep = Septett, m = Multiplett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Abkürzungen geben an: d = doppelt, b = breites Signal.

Die ¹³C-NMR Spektren wurden mit den Geräten AVS-400, DPX-400 (100 MHz) und DRX-500 (125 MHz) der Firma BRUKER aufgenommen. Das verwendete Lösungsmittel ist jeweils angegeben und die Kalibrierung erfolgte auf das durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachten Signals.¹¹⁴ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgte in ppm. Die in ¹³C-NMR Spektren angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren: p = primär, s = sekundär, t = tertiär, q = quartär. Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen α -ständigen Wasserstoffatome wurde aus dem HSQC-Spektrum entnommen. Sofern nötig, wurden für eine vollständige Interpretation ¹H-¹H-Korrelationsspektren (COSY) und ¹H-¹³C-Korrelationsspektren (HMBC, HSQC) durchgeführt.

IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit einem ATR-FT-IR Spektrometer (VECTOR 22) der Firma BRUKER gemessen. Die Verschiebung der Schwingungsbanden wurde in cm^{-1} angegeben.

Massenspektrometrie

Die hochaufgelösten Massenspektren (HRMS) wurden an einer Acquity-UPLC (WATERS) Anlage gekoppelt und mit einem Q-ToF Premier Massenspektrometer (WATERS) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI). Alternativ wurden die Messungen mit einem MICROMASS LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695). Angegeben sind die berechnete und die gefundene Masse. MS/MS-Fragmentierungsexperimente wurden mit Argon als Kollisionsgas bei einer Kollisionsenergie von 15 bis 35 eV durchgeführt. Die Massenspektren von solchen Verbindungen, die nicht über eine ESI-Analytik vermessen werden konnten, wurden mit einem Gerät des Typs FINNIGAN MAT 312 (EI) bei einem Ionisierungspotential von 70 eV aufgenommen.

¹¹⁴ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

Drehwerte

Die spezifische optische Rotation $[\alpha]$ wurde mit dem Polarimeter der Firma PERKIN-ELMER des Typs 341 in einer Quarzglasküvette (Länge 10 cm) bei $\lambda = 589$ nm (Natrium D-Linie) gemessen. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in $[\text{°}\cdot\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}]$. Dabei ist die Konzentration $c = 1$ definitionsgemäß in $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lösung angegeben. Das jeweilige Lösungsmittel ist angegeben.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte an dem Gerät des Typs OptiMelt MPA100 der Firma STANFORD RESEARCH SYSTEMS. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Induktoren/Generatoren

Als Generator wurde das Gerät EW5 mit einer Maximalleistung von 10.0 kW verwendet (IFF GmbH). Das Gerät wurde wassergekühlt und ist bei der verwendeten Frequenz stufenlos von 8 bis 25 kHz einstellbar. Die verwendete Pulsweitenmodulation ist stufenlos von 100 bis 1000 % einstellbar, wobei Werte von 750 % nicht überschritten werden sollten.

Temperaturmessung bei Induktionsversuchen

Die Temperaturmessung im induktiven Magnetfeld erfolgte mit einem Infrarot-Digitalthermometer des Typs GIM 3590 optris LaserSight der Firma GREISINGER ELECTRONIC GmbH.

6.2 Allgemeine Hinweise zu den mikrobiologischen Arbeiten

Allgemeine Hinweise

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden in einem S1-Labor unter keimfreien Bedingungen durchgeführt. Die Gerätschaften und Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Geräte wurden mit Hilfe von Isopropanol oder Ethanol (70 %) sterilisiert. Alle nicht autoklavierbaren Reagenzzusätze wie zum Beispiel Substanzen zur Verfütterung wurden vor der Verwendung steril filtriert.

Für die Supplementierungsexperimente wurde ein genetisch manipulierter Stamm des Ansamitocin-Produzenten *Actinosynnema pretiosum* (HGF073) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Block-Mutante, bei der die Enzyme zur Erzeugung von AHBA als Biosynthese-Startereinheit deaktiviert vorliegen. *A. pretiosum* HGF073 ist ein Replikat des Stammes

HGF056⁵⁵ und wurde von H. G. FLOSS zur Verfügung gestellt und als Sporensuspension (40 % Glycerin in Wasser) bei -80 °C gelagert.

Nährmedien

Die verwendeten Medien wurden ausschließlich mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Zusammensetzung der verwendeten Medien ist wie folgt (absolute Angabe pro Liter):

YMG-Agar-Platten:

- 22.0 g Agar (BACTO)
- 4.0 g Hefeextrakt (SIGMA ALDRICH)
- 10.0 g Malzextrakt (SIGMA ALDRICH)
- 4.0 g *D*(+)-Glucose Monohydrat (FLUKA)

YMG-Medium:

- 4.0 g Hefeextrakt (SIGMA ALDRICH)
- 10.0 g Malzextrakt (SIGMA ALDRICH)
- 4.0 g *D*-Glucose Monohydrat (FLUKA)

KOREA-Medium:

- 60.0 g Dextrin (SIGMA ALDRICH)
- 30.0 g *D*(+)-Maltose Monohydrat (SIGMA ALDRICH)
- 5.25 g Cottonseed flour (PROFLO)
- 5.0 g CaCO₃ (SIGMA ALDRICH)
- 4.5 g Hefeextrakt (BACTO)
- 0.3 g K₂HPO₄ (FLUKA)
- 2 mg FeSO₄·7H₂O

KRYO-Medium:

- 10.0 g Glycerin (100 %)
- 5.0 g Saccharose (SIGMA ALDRICH)
- 35 mL Wasser

Inkubator

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte auf Agar-Platten bei 28 °C im Inkubator der Firma HERAEUS (VT5042 EK). Die Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelschrank des Typs

Inova 4900 der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 28 °C mit einer Schüttelfrequenz von 190 rpm kultiviert. Die Fermentationen erfolgten in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Stahlfedereinsatz (bis 50 mL Medium) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (bis 125 mL Medium) mit zusätzlichem Stahlfedereinsatz.

Spritzenpumpe

Die Substratzugabe erfolgte kontinuierlich über eine BS-9000-8 Spritzenpumpe mit 8 bzw. 12 Spritzenplätzen (2 bis 10 mL) der Firma BRAINTREE SCIENTIFIC. Die Zuleitung über Tefzel[®]-Kapillaren mit LUER-LOCK-Anschluss, welche vor dem Gebrauch zusammen mit den Schüttelkolben autoklaviert wurden.

Allgemeine Hinweise zum Anlegen der KRYO-Kulturen

Zum Anlegen der KRYO-Kulturen wurde ein Screening in 24-well-Platten durchgeführt, um eine reproduzierbare Produktion von Ansamitocin **22** und den entsprechenden Derivaten zu erhalten.

Dafür wurde die Sporenprobe, die bei -80 °C gelagert wurde, auf mehreren YMG-Agar-Platten dünn verstrichen und bei 28 °C 4-5 Tage inkubiert. Anschließend wurden 24 gut sporulierte Einzelkolonien (1/4 von jeweiligen Kolonie) selektiert, und zur Inokulation der YMG-Vorkultur (800 µL) in 24-well-Platten verwendet, welche 2 Tage bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt wurden. Anschließend wurden 24 Hauptkulturen in 24-well-Platten, die jeweils mit einer sterilen Glaskugel versehen waren, angeimpft. Dafür wurde für jede Hauptkultur KOREA-Medium (800 µL), L-Valin-Lösung (3 % in Wasser; 100 µL) und Vorkultur (50 µL) verwendet. Nach 24 Stunden wurde AHBA **27** zwei Tage lang portionsweise zugefüttert und nach weiteren 48 Stunden wurden die Proben für den Produktionsnachweis entnommen. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede in Produktion der ausgewählten Kolonien. Von besonders gut produzierenden Kolonien (3/4) wurden Vorkulturen (50 mL YMG-Medium in 250 mL Fermentationskolben mit Stahlfedereinsatz) angeimpft und zwei Tage im Schüttelschrank bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Diese Vorkulturen wurden anschließend zum Anlegen der KRYO-Kulturen verwendet. Dafür wurden 300 µL Vorkulturmedium mit 300 µL KRYO-Medium gemischt und diese anschließend bei -80 °C gelagert.

Allgemeines Fermentationsprotokoll

Die Sporenprobe, die bei -80 °C gelagert wurde, wurde auf einer YMG-Agar-Platte dünn verstrichen und bei 28 °C 4-5 Tage inkubiert. Anschließend wurden mehrere gut sporulierte Einzelkolonien selektiert, in einem mit Wasser (1 mL) und sterilen Glasperlen gefüllten 1.5 mL Eppendorf Tube[®] suspendiert, durchmischt und zur Inokulation der YMG-Vorkultur (50 mL) verwendet, welche 48 h geschüttelt wurde. Daraufhin wurden 4 mL der Kultur in je 50 mL KOREA-Medium überführt und mit L-Valin-Lösung (3 % in Wasser; 3 mL je 25 mL KOREA-Medium) versetzt. Je Fermentationskolben wurde ein Tropfen Antischaummittel (GE BAYER Silicones, SAG 471 - SGS) zugegeben und für zwei Tage geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe der sterilen Substratlösung (gelöst in DMSO:H₂O = 1:1) entweder mittels Spritzenpumpe über 72 - 96 h oder in drei Portionen nach 48, 72 und 96 h. Die Hauptkulturen wurden insgesamt 168 - 216 h bei 28 °C fermentiert. Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgte parallel zu einer Referenz mit AHBA-Zugabe und zu einer Null-Referenz (HGF073-Kultur ohne AHBA-Zugabe) zur Sicherstellung der Aktivität des Stammes.

Alternativ wurden die KRYO-Kulturen zum Animpfen einer Vorkultur für die Fermentationen benutzt. Dafür wurde die KRYO-Kultur aufgetaut und 100 µL KRYO-Medium eine 50 mL YMG-Vorkultur angeimpft. Diese wurden für zwei Tage in einem INNOVA 4900 Multiebenen-Schüttelschrank der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Daraufhin wurden 4 mL Vorkultur in 50 mL KOREA-Medium überführt und mit 6 mL L-Valin-Lösung (3 % in Wasser) versetzt. Je Fermentationskolben wurde ein Tropfen Antischaummittel (GE BAYER Silicones, SAG 471 - SGS) zugegeben. Nach 48 h erfolgte die Zugabe der sterilen Substratlösung (gelöst in DMSO:H₂O = 1:1) entweder mittels Spritzenpumpe über 72 - 96 h oder in drei Portionen nach 48, 72 und 96 h. Die Hauptkulturen wurden insgesamt 168 - 216 h bei 28 °C fermentiert. Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgte parallel zu einer Referenz mit AHBA-Zugabe und zu einer Null-Referenz (HGF073-Kultur ohne AHBA-Zugabe) zur Sicherstellung der Aktivität des Stammes.

Erste analytische Untersuchung und Aufarbeitung

Nach 10 Tagen (nach dem Animpfen der Hauptkultur) wurde die Probe für die analytische Untersuchung (200 µL) entnommen, mit Methanol (200 µL) gut vermischt und bei 10500*g, 3 min 4°C zentrifugiert. Die klare, methanolische Lösung (150 µL) wurde anschließend einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Retentionszeiten (t_R) sind jeweils in den Versuchsvorschriften angegeben.

Zur Isolierung von Ansamitocin-Derivaten wurden die Kulturen in der Zentrifuge dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Konzentrat wurde über eine kurze Kieselgelsäule mit Ethylacetat gereinigt. Die erhaltenen Extrakte wurden im Vakuum eingeengt, über eine Sephadex-LH20-Säule und anschließend über eine präparative, sowie eine semipräparative HPLC gereinigt. Die Analyse der Fermentationsprodukte erfolgte über HRMS (ESI).

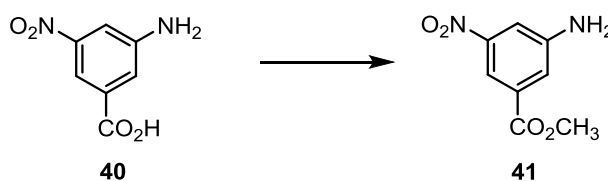
Allgemeine Hinweise für die Fermentationen mit den Carbonsäuren

Dafür wurde die KRYO-Kultur aufgetaut und mit 100 µL KRYO-Medium eine 50 mL YMG-Vorkultur angeimpft. Diese wurden für zwei Tage in einem INNOVA 4900 Multiebenen-Schüttelschrank der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Daraufhin wurden 4 mL Vorkultur in 50 mL KOREA-Medium überführt, sowie mit 1.3 mL L-Valin-Lösung (1 % in Wasser), 2.7 mL L-Threonin (3 % in Wasser), 2 mL frisch geöffneten Kokosnusswasser versetzt. Je Fermentationskolben wurde ein Tropfen Antischaummittel (GE BAYER Silicones, SAG 471 - SGS) zugegeben. Nach 48 h erfolgte die Zugabe des sterilen Substratlösung - AHBA (1.25 mmol/L) und Carbonsäure (12.5 mmol/L), gelöst in DMSO:H₂O = 1:1, entweder mittels Spritzenpumpe über 72 - 96 h oder in drei Portionen nach 48, 72 und 96 h. Die Hauptkulturen wurden insgesamt 168 - 216 h bei 28 °C fermentiert. Die Verfütterung neuer Substanzen erfolgte parallel zu einer Referenz mit AHBA-Zugabe und zu einer Null-Referenz (HGF073-Kultur ohne AHBA-Zugabe) zur Sicherstellung der Aktivität des Stammes.

6.3 Synthese, Mutasynthese und Semisynthese der Verbindungen aus Kapitel 4

6.3.1 DARSTELLUNG DER VERBINDUNGEN

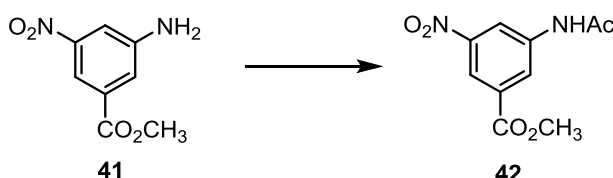
3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**41**)



3-Amino-5-nitrobenzoesäure (**40**) (5.0 g, 27.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (80 mL) gelöst und anschließend mit Acetylchlorid (2.6 mL, 35.7 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 48 Stunden bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt **41** (5.4 g, 27.5 mmol, quant.) wurde direkt weiter eingesetzt.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 7.94 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.73 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.68 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 5.65 (bs, 2H, NH₂), 3.91 (s, 3H, CO₂Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 206.26 ppm): δ 166.0 (p, ArCO₂CH₃), 151.1 (p, C-Ar), 150.3 (p, C-Ar), 133.1 (p, C-Ar), 120.9 (s, C-Ar), 112.2 (s, C-Ar), 111.9 (s, C-Ar), 52.8 (q, ArCO₂Me) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* berechnet für C₈H₈N₂O₄ [M+H]⁺: 196.0484, gefunden 196.0483.

3-Acetylamino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**42**)

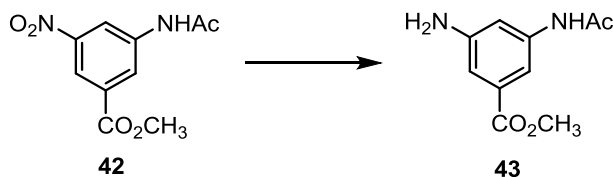


3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**41**) (4.0 g, 20.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (60 mL) gelöst und mit Pyridin (3.3 mL, 40.8 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Anschließend wurde Acetanhydrid (5.3 mL, 61.2 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die

Reaktionsmischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EtOAc = 2:1). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit CH_2Cl_2 aufgenommen und mit H_2SO_4 (1 M) dreimal gewaschen. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1) lieferte 3-Acetylamino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**42**) (4.8 g, 20.4 mmol, quant.) als gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 10.60 (s, 1H, N-H), 8.77 (m, 1H, H-Ar), 8.47 (m, 1H, H-Ar), 8.25 (m, 1H, H-Ar), 3.91 (s, 3H, CO_2Me), 2.11 (s, 3H, ArNHCO_2Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 169.3 (p, ArNHCO_2Me), 164.4 (p, ArCOMe), 148.1 (p, C-Ar), 140.8 (s, C-Ar), 131.3 (p, C-Ar), 124.5 (s, C-Ar), 117.4 (s, C-Ar), 116.7 (p, C-Ar), 52.9 (q, CO_2Me), 24.0 (q, ArNHCO_2Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 239.0668, gefunden 239.0661; **Smp.**: 172 °C.

3-Acetylamino-5-aminobenzoesäuremethylester (**43**)

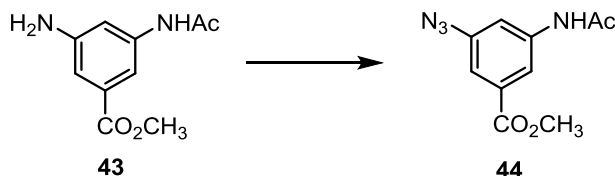


Methylester **42** (5.9 g, 25.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Essigsäureethylester (200 mL) gelöst und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (28.3 g, 225.4 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 19 Stunden unter Reflux erhitzt. Nach Zugabe von einer NaHCO_3 -Lösung wurde die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1) lieferte 3-Acetylamino-5-aminobenzoesäuremethylester (**43**) (4.6 g, 22.1 mmol, 88 %) als gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 9.82 (s, 1H, N-H), 7.31 (m, 1H, H-Ar), 7.17 (m, 1H, H-Ar), 6.87 (m, 1H, H-Ar), 5.39 (s, 2H, NH_2), 3.78 (s, 3H, CO_2Me), 2.00 (s, 3H, ArNHCO_2Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 168.3 (p, ArNHCO_2Me), 166.7 (p, ArCOMe), 149.4 (s, C-Ar), 140.2 (s, C-Ar), 130.3 (s,

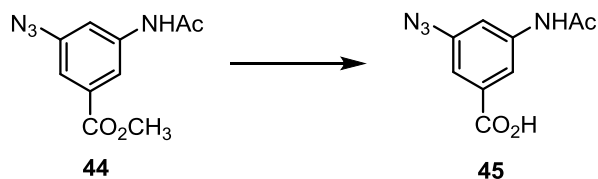
C-Ar), 109.4 (p, C-Ar), 108.5 (p, C-Ar), 107.6 (p, C-Ar), 51.9 (q, CO₂Me), 24.1 (q, ArNHCO₂Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₃N₂O₃ [M+H]⁺: 209.0926, gefunden 209.0922; **Smp.**: 177.6 °C.

3-Acetylamino-5-azidobenzoessäuremethylester (**44**)



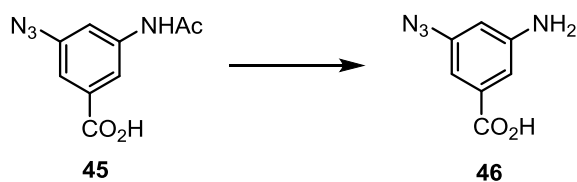
Methylester **43** (2.2 g, 10.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in HCl (2M) (30 mL) gelöst, auf -5 °C gekühlt und mit in H₂O (10 mL) gelöstem NaNO₂ (2.07 g, 30.0 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach 6 Stunden wurde zur Lösung in H₂O (5 mL) gelöstes NaN₃ (0.9 g, 20.0 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 12 Stunden bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und mit Ethylacetat dreimal extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 2:1) lieferte 3-Acetylamino-5-azidobenzoessäuremethylester (**44**) (1.73 g, 7.38 mmol, 71 %) als hell brauner Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 10.30 (s, 1H, N-H), 7.96 (m, 1H, H-Ar), 7.71 (m, 1H, H-Ar), 7.23 (m, 1H, H-Ar), 3.86 (s, 3H, CO₂Me), 2.06 (s, 3H, ArNHCO₂Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 168.9 (p, ArNHCO₂Me), 165.3 (p, ArCOMe), 141.1 (s, C-Ar), 140.5 (s, C-Ar), 131.6 (s, C-Ar), 115.9 (p, C-Ar), 113.6 (p, C-Ar), 113.1 (p, C-Ar), 52.5 (q, CO₂Me), 24.1 (q, ArNHCO₂Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺: 235.0831, gefunden 235.0834; **Smp.**: 150 °C.

3-Acetylamino-5-azidobenzoessäure (45)

3-Acetylamino-5-azidobenzoessäuremethylester (**44**) (1.4 g, 5.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (50 mL) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (1M) (59.8 mL, 59.8 mmol, 5.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung 24 Stunden bei 50 °C gerührt. Die Mischung wurde auf Eis hydrolysiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit HCl (1M) auf pH = 1 eingestellt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es wurde 3-Acetylamino-5-azidobenzoessäure (**45**) (1.3 g, 5.8 mmol, 97 %) als farbloser Feststoff erhalten.

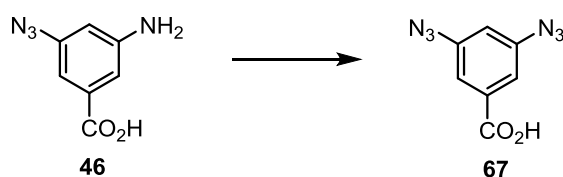
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 10.26 (s, 1H, N-H), 7.93 (m, 1H, H-Ar), 7.69 (m, 1H, H-Ar), 7.23 (m, 1H, H-Ar), 2.06 (s, 3H, ArNHCO₂Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 168.9 (p, ArNHCO₂Me), 166.3 (p, ArCOH), 140.9 (s, C-Ar), 140.2 (s, C-Ar), 132.9 (s, C-Ar), 116.2 (p, C-Ar), 113.8 (p, C-Ar), 112.8 (p, C-Ar), 24.1 (q, ArNHCO₂Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₁N₄O₃ [M+H]⁺: 221.0674, gefunden 221.0675; **Smp.**: 192 °C (Zers).

3-Amino-5-azidobenzoessäure (46)

3-Acetylamino-5-azidobenzoessäure (**45**) (1.3 g, 5.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in H₂O (200 mL) gelöst und mit HCl_{konz.} (1.9 mL, 61.5 mmol, 1.18 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei 120 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**) (0.9 g, 4.9 mmol, 85 %) als brauner Feststoff erhalten.

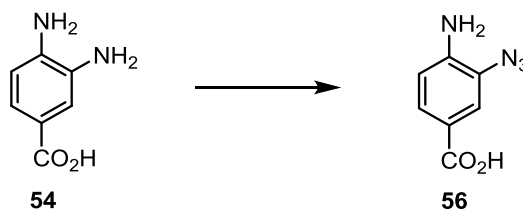
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.13 (m, 1H, H-Ar), 6.94 (m, 1H, H-Ar), 6.55 (m, 1H, H-Ar), 4.90 (s, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 169.5 (p, ArCO₂H), 151.2 (p, C-Ar), 142.5 (p, C-Ar), 134.2 (p, C-Ar), 113.9 (s, C-Ar), 109.7 (s, C-Ar), 109.5 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3381, 3300, 2966, 2356, 2103, 1704, 1591, 1232 cm⁻¹; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₇H₇N₄O₂ [M-H]⁻: 179.0569, gefunden 179.0566; **Smp.**: 172 °C (Zers).

3,5-Diazidobenzoesäure (67)



Aminobenzoesäure **46** (100 mg, 0.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde in HCl (2M) (2 mL) gelöst, auf -5 °C gekühlt und mit in H₂O (0.5 mL) gelöstem NaNO₂ (115.9 mg, 1.7 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach 2 Stunden wurde zur Lösung in H₂O (0.5 mL) gelöstem NaN₃ (54.6 g, 0.8 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 Stunden gerührt. Der erhaltene Feststoff wurde mit Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser dreimal extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde 3,5-Diazidobenzoesäure (**67**) (102 mg, 0.5 mmol, 89 %) als hell brauner Feststoff erhalten.

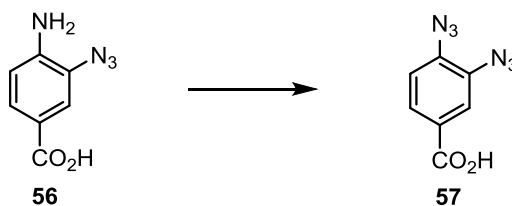
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 7.36 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, H-Ar), 7.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-Ar) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 165.7 (p, ArCO₂H), 141.7 (p, 2C, C-Ar), 133.9 (s, C-Ar), 116.0 (p, C-Ar), 114.1 (s, 2C, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 2837, 2356, 2118, 1696, 1588, 1253 cm⁻¹; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₇H₃N₆O₂ [M-H]⁻: 203.0317, gefunden 203.0312; **Smp.**: 182.9 °C (Zers).

4-Amino-3-azidobenzoessäure (56)

Natriumazid (8.2 g, 126.8 mmol, 6.0 Äq.) wurde unter Stickstoff in Wasser (20 mL) gelöst. Nach Zugabe von Methylenchlorid (20 mL) wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und anschließend mit Trifluormethansulfonsäure (3.5 mL, 21.1 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit Methylenchlorid dreimal extrahiert, die organische Phase mit dem Tosylazid wurde sofort weiter eingesetzt.

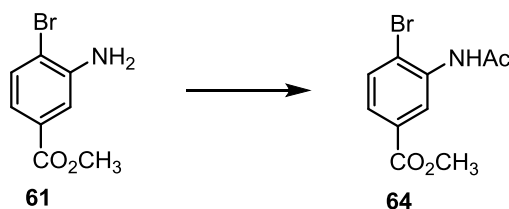
Diamin **54** (0.8 g, 5.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (20 mL) gelöst und mit dem frisch hergestellten Tosylazid versetzt. Nach der Zugabe von Triethylamin (2.2 mL, 15.8 mmol, 3.0 Äq.) und CuSO₄ (65.9 mg, 0.3 mmol, 0.05 Äq.) wurde die Reaktionslösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Kieselgur filtriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel in Vakuum entfernt. Das erhaltene Öl wurde mit Wasser versetzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 3 gebracht. Die Mischung wurde mit Ethylacetat dreimal extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischen Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 → 2:1 → 100 % EtOAc) wurde Azidobenzoessäure **56** (523.7 mg, 2.9 mmol, 56 %) als brauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 7.75 (dd, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.49 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-Ar), 6.68 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-Ar), 5.81 (s, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.9 (p, ArCO₂H), 144.3 (p, C-Ar), 127.9 (s, C-Ar), 122.4 (p, C-Ar), 119.8 (s, C-Ar), 118.4 (p, C-Ar), 113.7 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3500, 3395, 2939, 2126, 1606 cm⁻¹; **HRMS** [EI] *m/z* berechnet für C₇H₆N₄O₂ [M+H]⁺: 178.0490, gefunden 178.0491; **Smp.**: 156.7 °C.

3,4-Diazidobenzoesäure (57)

Azidobenzoesäure **56** (20 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in HCl (2M) (2 mL) gelöst, auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit in H_2O (1 mL) gelöstem NaNO_2 (23.2 mg, 0.4 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach 6 Stunden wurde zur Lösung in H_2O (1 mL) gelöstes NaN_3 (10.8 mg, 0.2 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 12 Stunden bei 0 ° gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und mit dreimal Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 2:1) lieferte Bisazidobenzoesäure **57** (17.7 mg, 0.09 mmol, 79 %) als hell brauner Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50\text{ ppm}$): δ 7.75 (dd, $J = 8.5, 1.8\text{ Hz}$, 1H, H-Ar), 7.66 (d, $J = 1.8\text{ Hz}$, 1H, H-Ar), 7.37 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, H-Ar) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52\text{ ppm}$): δ 165.9 (p, ArCO_2H), 134.8 (p, C-Ar), 130.4 (p, C-Ar), 128.2 (s, C-Ar), 127.0 (s, C-Ar), 121.2 (p, C-Ar), 120.8 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 2853, 2644, 2102, 1683, 1596, 1500, 1409, 1264 cm^{-1} ; **HRMS** [EI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_2$ [M-H]: 204.0395, gefunden 204.0397; **Smp.**: $182.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zers).

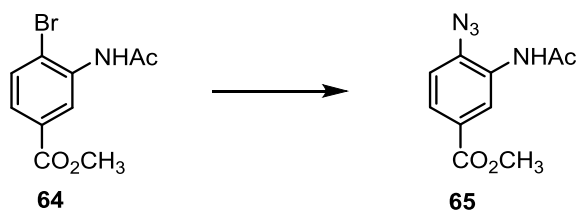
3-Acetamido-4-brombenzoesäuremethylester (64)

Methylester **61** (305 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und mit Acetanhydrid (0.3 mL, 2.7 mmol, 2.0 Äq.) und Pyridin (0.3 mL, 3.9 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit H_2SO_4 (1M) versetzt und anschließend

dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Bromaromat **64** (358.1 mg, 1.3 mmol, quant.) wurde ohne weitere Reinigung in dem nächsten Schritt eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 9.62 (s, 1H, N-H), 8.20 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-Ar), 7.65 (dd, $J = 1.9, 8.4$ Hz, 1H, H-Ar), 3.85 (s, 3H, CO_2Me), 2.11 (s, 3H, ArNHCO_2Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 168.8 (p, ArNHCO_2Me), 165.4 (p, ArCO_2Me), 136.9 (s, C-Ar), 133.3 (s, C-Ar), 129.3 (s, C-Ar), 127.0 (p, C-Ar), 126.8 (p, C-Ar), 122.8 (p, C-Ar), 52.4 (q, CO_2Me), 23.3 (q, ArNHCO_2Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_1\text{O}_3\text{Br}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 271.9922, gefunden 271.9920; **Smp.**: 132 °C.

3-Acetamido-4-azidobenzoensäuremethylester (**65**)

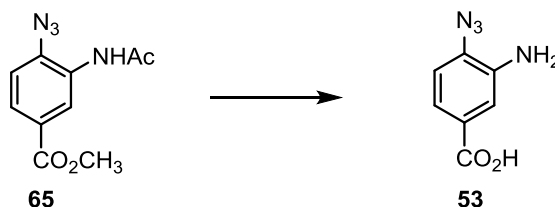


Benzoensäuremethylester **64** (80 mg, 0.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in ein Mikrowellenglas mit NaN_3 (39 mg, 0.6 mmol, 2.0 Äq.), Na-Ascorbat (19.8 mg, 0.1 mmol, 0.2 Äq.), CuI (19.1 mg, 0.1 mmol, 0.2 Äq.), und TMEDA (0.02 mL, 0.1 mmol, 0.3 Äq.) gegeben, mit $\text{EtOH:H}_2\text{O} = 7:1$ - Gemisch (5 mL) versetzt und 30 min in der Mikrowelle auf 100 °C erhitzt. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung ($\text{PE:EtOAc} = 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow \text{EtOAc} = 100\%$) lieferte 3-Acetamido-4-azidobenzoensäuremethylester (**65**) (20 mg, 0.1 mmol, 30 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 8.24 (s, 1H, N-H), 7.82 (d, $J = 8.02$ Hz, 1H, H-Ar), 7.62 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-Ar), 7.44 (dd, $J = 7.7, 8.02$ Hz, 1H, H-Ar), 3.85 (s, 3H, CO_2Me), 2.06 (s, 3H, ArNHCO_2Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 178.1 (p, ArNHCO_2Me), 175.1 (p, ArCO_2Me), 149.16 (p, C-Ar), 139.5 (p, C-Ar), 138.7 (s, C-Ar), 133.1 (p, C-Ar), 132.9 (s, C-Ar), 128.9 (s, C-Ar), 61.7 (q,

CO_2Me), 33.5 (q, ArNHCO_2Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 235.0831, gefunden 235.0820.

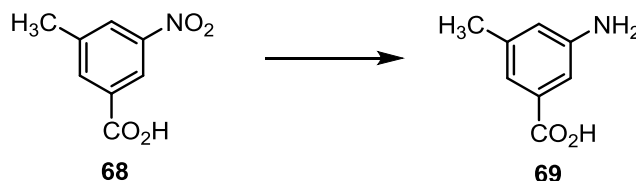
3-Amino-4-azidobenzoensäure (**53**)



Methylester **65** (30 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (1M) (6.3 mL, 6.3 mmol, 5.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis hydrolysiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit HCl (1M) auf pH = 2 eingestellt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Azidobenzoensäure **66** (28.2 mg, 0.1 mmol, quant.) wurde als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in dem nächsten Schritt eingesetzt.

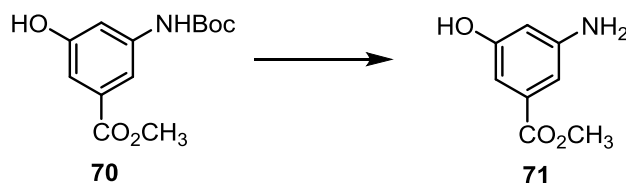
4-Azidobenzoensäure **66** (40 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in H_2O (8 mL) gelöst und mit $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ (0.1 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC (Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 90/10 \rightarrow 0/100 in 90 min, dann 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) über eine C18-Phase ($t_R = 45$ min) gereinigt. Es wurde 3-Amino-4-azidobenzoensäure (**53**) (4.1 mg, 0.02 mmol, 10 %) als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-Ar), 7.38 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 6.99 (dd, $J = 1.9, 8.3$ Hz, 1H, H-Ar), 5.49 (s, 1H, N-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 177.0 (p, ArCO_2H), 155.3 (p, C-Ar), 141.8 (p, C-Ar), 141.6 (s, C-Ar), 127.4 (s, C-Ar), 125.5 (s, C-Ar), 120.9 (p, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3418, 3333, 2830, 2358, 1676 cm^{-1} ; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 179.0569, gefunden 179.0573; **Smp.** 150.7 °C (Zers.).

3-Amino-5-methylbenzoesäure (69)

3-Methyl-5-nitrobenzoesäuremethylester (**68**) (200 mg, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethylacetat (10 mL) gelöst und mit Triethylsilan (2.6 mL, 16.5 mmol, 15.0 Äq.) und Palladium [10 % auf Kohle] (23.4 mg, 0.2 mmol, 20 mol%) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und säulenchromatographische Abtrennung von Triethylsilan (PE:EtOAc = 2:1) lieferte 5-Amino-3-methylbenzoesäure (**69**) (166.2 mg, 1.1 mmol, quant.) als gelbliches Öl.

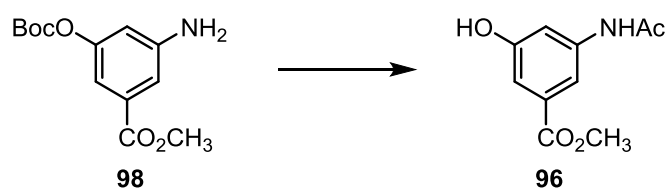
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₆ = 2.50 ppm): δ 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-Ar), 7.17 (dd, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-Ar), 6.62 (d, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1H, H-Ar), 2.24 (s, 3H, CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₆ = 39.52 ppm): δ 173.6 (p, CO₂H), 149.3 (p, C-Ar), 136.4 (s, C-Ar), 131.6 (s, C-Ar), 125.8 (p, C-Ar), 117.1 (s, C-Ar), 109.8 (p, C-Ar), 20.4 (q, CH₃) ppm; **HRMS [ESI]** *m/z* berechnet für C₈H₈NO₂ [M-H]⁻: 150.0555, gefunden 150.0557.

3-Amino-5-hydroxybenzoesäuremethylester (71)

Methylester **70** (100 mg, 0.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (5 mL) gelöst und langsam mit TFA (1.2 mL, 14.9 mmol, 40.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und mit Ethylacetat dreimal extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung PE:EtOAc = 1:1 → 100 % EtOAc lieferte Anilin **71** (61.8 mg, 0.4 mmol, quant.) als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 6.89 (m, 1H, H-Ar), 6.80 (m, 1H, H-Ar), 6.49 (m, 1H, H-Ar), 3.79 (s, 3H, CO₂Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.3 (p, ArCOMe), 158.4 (s, 2*C, C-Ar), 131.2 (s, C-Ar), 108.8 (p, C-Ar), 108.3 (p, C-Ar), 107.7 (p, C-Ar), 51.9 (q, CO₂Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₈H₁₀NO₃ [M+H]⁺: 168.0661, gefunden 168.0655; **Smp.**: 152.8 °C.

3-Acetamido-5-hydroxybenzoesäuremethylester (96)



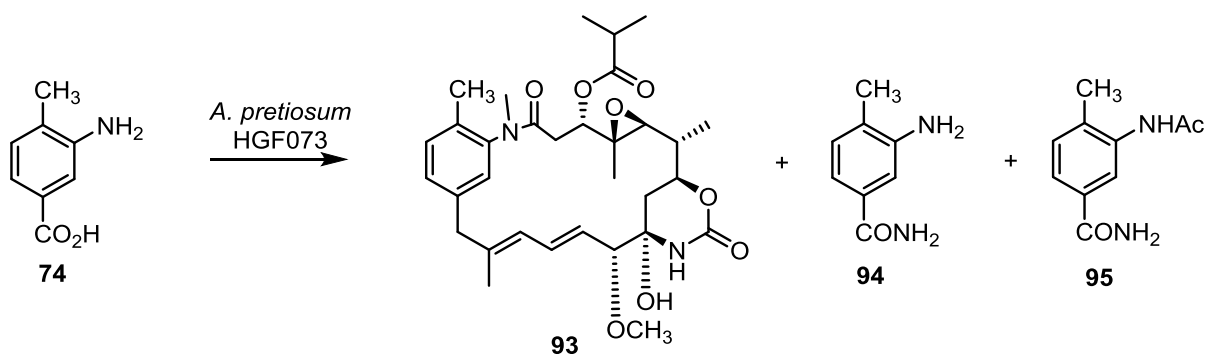
Methylester **98** (100 mg, 0.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (5 mL) gelöst und mit Acetanhydrid (0.06 mL, 0.7 mmol, 2.0 Äq.) und Pyridin (0.08 mL, 1.1 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mit H₂SO₄ (1M) versetzt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Acetat (114.4 mg, 0.4 mmol, quant.) wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

Anilin (114.4 mg, 0.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (5 mL) gelöst und langsam mit TFA (1.2 mL, 14.8 mmol, 40.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung PE:EtOAc = 5:1 → 100 % EtOAc lieferte Phenol **96** (39.4 mg, 0.2 mmol, 52 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.61 (m, 1H, H-Ar), 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.14 (m, 1H, H-Ar), 3.87 (s, 3H, CO₂Me), 2.12 (s, 3H, NHAc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 171.8 (p, ArCOMe), 168.3 (p, NHCO₂CH₃), 159.2 (p, C-Ar), 141.2 (p, C-Ar), 132.7 (p, C-Ar), 113.1 (s, C-Ar), 112.7 (s, C-Ar), 112.6 (s, C-Ar), 52.6 (q, CO₂CH₃), 23.8 (q, NHCO₂CH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₂NO₄ [M+H]⁺: 210.0766, gefunden 210.0763; **Smp.**: 215.7 °C.

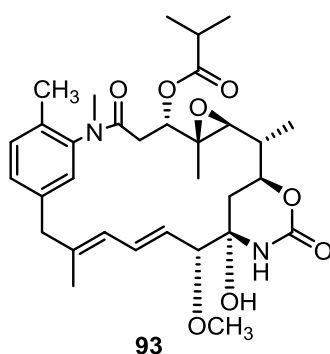
6.3.2 MUTASYNTHETISCHE DARSTELLUNG VON ANSAMITOCIN-DERIVATEN AUS KAPITEL 4.1

Verfütterung von 3-Amino-4-methylbenzoesäure (74)

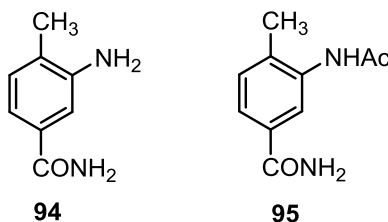


Die Mutasyntese mit Aminobenzoesäure **74** (11.4 mg, 75 μmol , gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Aufgrund der zu geringen Substanzmenge konnten die erhaltenen Produkte nicht vollständig charakterisiert werden.

20-Deschloro-19-methyl-Ansamitocin P-3 (93)



UPLC-MS $t_{\text{R}} = 2.55$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₅N₂O₈ [M+H]⁺: 585.3176, gefunden 585.3161.

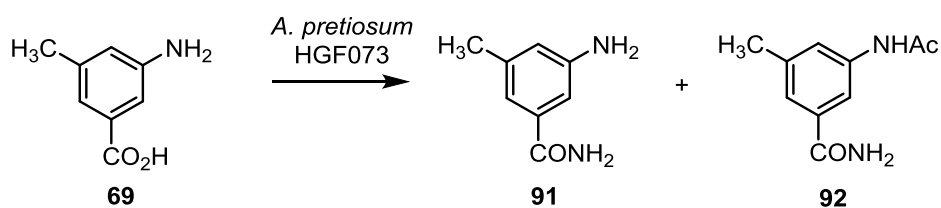
3-Amino-4-methylbenzamid (94) und 3-Acetamido-4-methylbenzamid (95)

Für Amid **94**:

UPLC-MS $t_R = 1.04$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_8H_{11}N_2O_1$ $[M+H]^+$: 151.0871, gefunden 151.0866.

Für Acetat **95**:

UPLC-MS $t_R = 1.06$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{13}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 193.0977, gefunden 193.0981.

Verfütterung von 3-Amino-5-methylbenzoesäure (69)

Die Mutasynthese mit Aminobenzoesäure **69** (11.4 mg, 75 μ mol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Aufgrund der zu geringen Substanzmenge konnte keine vollständige Charakterisierung vorgenommen werden.

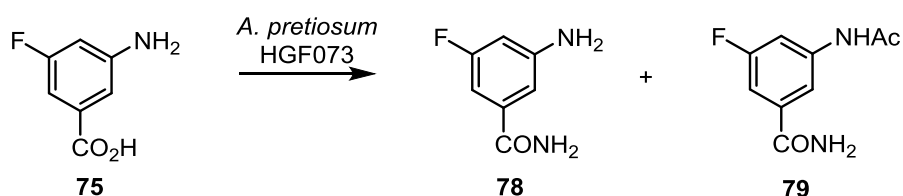
Für Amid **91**:

UPLC-MS $t_R = 1.45$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_8H_{11}N_2O_1$ $[M+H]^+$: 151.0871, gefunden 151.0870.

Für Acetat **92**:

UPLC-MS $t_R = 1.33$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{12}N_1O_3$ $[M+H]^+$: 194.0817, gefunden 194.0810.

Verfütterung von 3-Amino-5-fluorbenzoesäure (**75**)



Die Mutasynthese mit 3-Amino-5-fluorbenzoesäure (**75**) (11.4 mg, 74 μ mol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

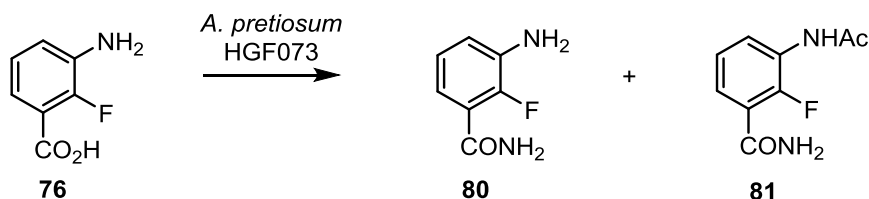
Aufgrund der zu geringen Substanzmenge konnte keine vollständige Charakterisierung vorgenommen werden.

Für Amid **78**:

UPLC-MS $t_R = 0.86$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_7H_8N_2O_1F$ $[M+H]^+$: 155.0621, gefunden 155.0619.

Für Acetat **79**:

UPLC-MS $t_R = 1.31$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_9H_{10}N_2O_2F$ $[M+H]^+$: 197.0726, gefunden 197.0734.

Verfütterung von 3-Amino-2-fluorbenzoesäure (76)

Die Mutasynthese mit 3-Amino-2-fluorbenzoesäure (**76**) (11.6 mg, 75 μ mol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

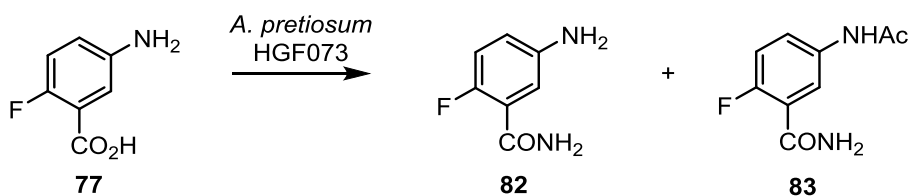
Aufgrund der zu geringen Substanzmenge konnten die erhaltenen Produkte nicht vollständig charakterisiert werden.

Für Amid **80**:

UPLC-MS t_R = 0.84 min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₇H₈N₂O₁F [M+H]⁺: 155.0621, gefunden 155.0619.

Für Acetat **81**:

UPLC-MS t_R = 1.31 min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₉H₁₀N₂O₂F [M+H]⁺: 197.0720, gefunden 197.0726.

Verfütterung von 3-Amino-6-fluorbenzoesäure (77)

Die Mutasynthese mit 3-Amino-6-fluorbenzoesäure (**77**) (11.6 mg, 75 μ mol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Aufgrund der zu geringen Substanzmenge konnte keine vollständige Charakterisierung vorgenommen werden.

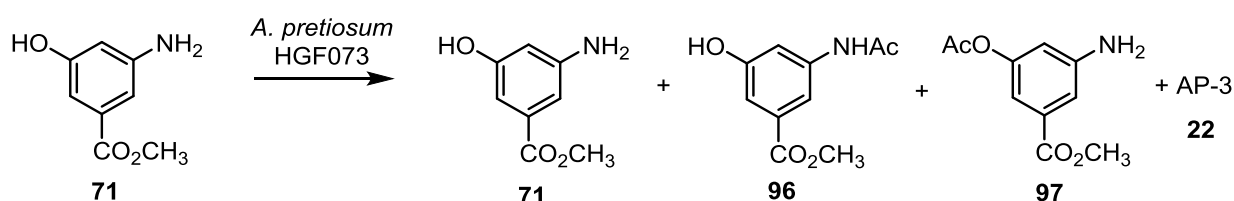
Für Amid **82**:

UPLC-MS $t_R = 0.82$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_7H_8N_2O_1F$ $[M+H]^+$: 155.0621, gefunden 155.0625.

Für Acetat **83**:

UPLC-MS $t_R = 1.00$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_9H_{10}N_2O_2F$ $[M+H]^+$: 197.0726, gefunden 197.0735.

Verfütterung von AHBA-Methylester **71**



Die Mutasynthese mit AHBA-Methylester (**71**) (11 mg, 75 μ mol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 50 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc) filtriert.

Nach der Reinigung mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-RP-Säule; Gradient H₂O/MeCN 95/5 \rightarrow 65/35 in 60 min, 35/65 \rightarrow 60/40 in 20 min, dann 60/40 \rightarrow 30/70 in 10 min, 30/70 \rightarrow 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 \rightarrow 3.0 mL/min in 90 min) wurden Ansamitocin P-3 (**22**) (0.4 mg, 8 mg/L), AHBA-Methylester **71** (1.2 mg, 7.2 μ mol, 11 %), Amin **97** (0.4 mg, 8 mg/L) und Acetat **96** (1.1 mg, 22 mg/L) isoliert.

Für Ansamitocin P-3 (**22**):

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.88 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 21-H), 6.84 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.44 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.22 (s, 1H, 9-NH), 6.16 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.46 (dd, $J = 15.4, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.82 (dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.27 (ddd, $J = 12.0, 10.6, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 3.99 (s, 3H, 20-OMe), 3.52 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, NMe), 3.06 (bs, 1H, OH), 2.95 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, 5-H), 2.60 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.57 (dd, $J = 13.8, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.20 (dd, $J = 13.8, 3.0$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.64 (m, 1H, 8-H_a), 1.46 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.26 (m, 1H, 6-H), 1.21 (d,

$J = 6.9$ Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.86 (s, 3H, 4-Me) ppm. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.⁶⁹

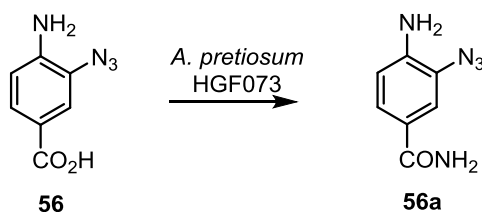
Für Amin **97**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.85 (m, 1H, H-Ar), 7.66 (m, 1H, H-Ar), 7.44 (m, 1H, H-Ar), 3.89 (s, 3H, CO₂Me), 2.13 (s, 3H, NHAc) ppm; UPLC-MS t_R = 1.49 min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₁₀H₁₂N₁O₄ [M+H]⁺: 210.0766, gefunden 210.0761.

Für Acetat **96**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.61 (m, 1H, H-Ar), 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.14 (m, 1H, H-Ar), 3.87 (s, 3H, CO₂Me), 2.12 (s, 3H, NHAc) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 171.8 (p, ArCOMe), 168.3 (p, NHCO₂CH₃), 159.2 (p, C-Ar), 141.2 (p, C-Ar), 132.7 (p, C-Ar), 113.1 (s, C-Ar), 112.7 (s, C-Ar), 112.6 (s, C-Ar), 52.6 (q, CO₂CH₃), 23.8 (q, NHCO₂CH₃) ppm; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₁₀H₁₂NO₄ [M+H]⁺: 210.0766, gefunden 210.0763.

Verfütterung von 4-Amino-3-azidobenzoessäure (**56**)

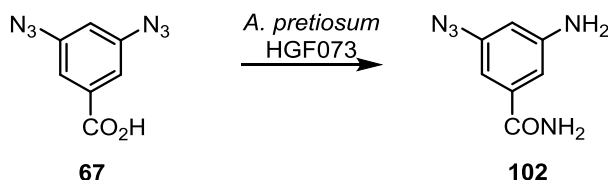


Die Zufütterung von Aminoazidobenzoessäure **56** (13.4 mg, 75 μmol, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen zu 37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselsäure (EtOAc) filtriert. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 → 2:1) lieferte 4-Amino-3-azido-benzamid (**56a**) als Detoxifikationsprodukt (5.9 mg, 0.03 mmol) in einer Ausbeute von 40 %.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 7.72 (s, 1H, ArCONH₂), 7.59 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.47 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.02 (s, 1H, ArCONH₂), 6.64 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-Ar), 5.56 (s, 2H, NH₂) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.1 (p, ArCONH₂), 142.9 (p, C-Ar), 125.8 (s, C-Ar), 122.4 (p,

C-Ar), 122.1 (p, C-Ar), 118.5 (s, C-Ar), 113.6 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3363, 3168, 2116, 1597, 1436, 1380, 1288 cm^{-1} ; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 178.0729, gefunden 178.0732.

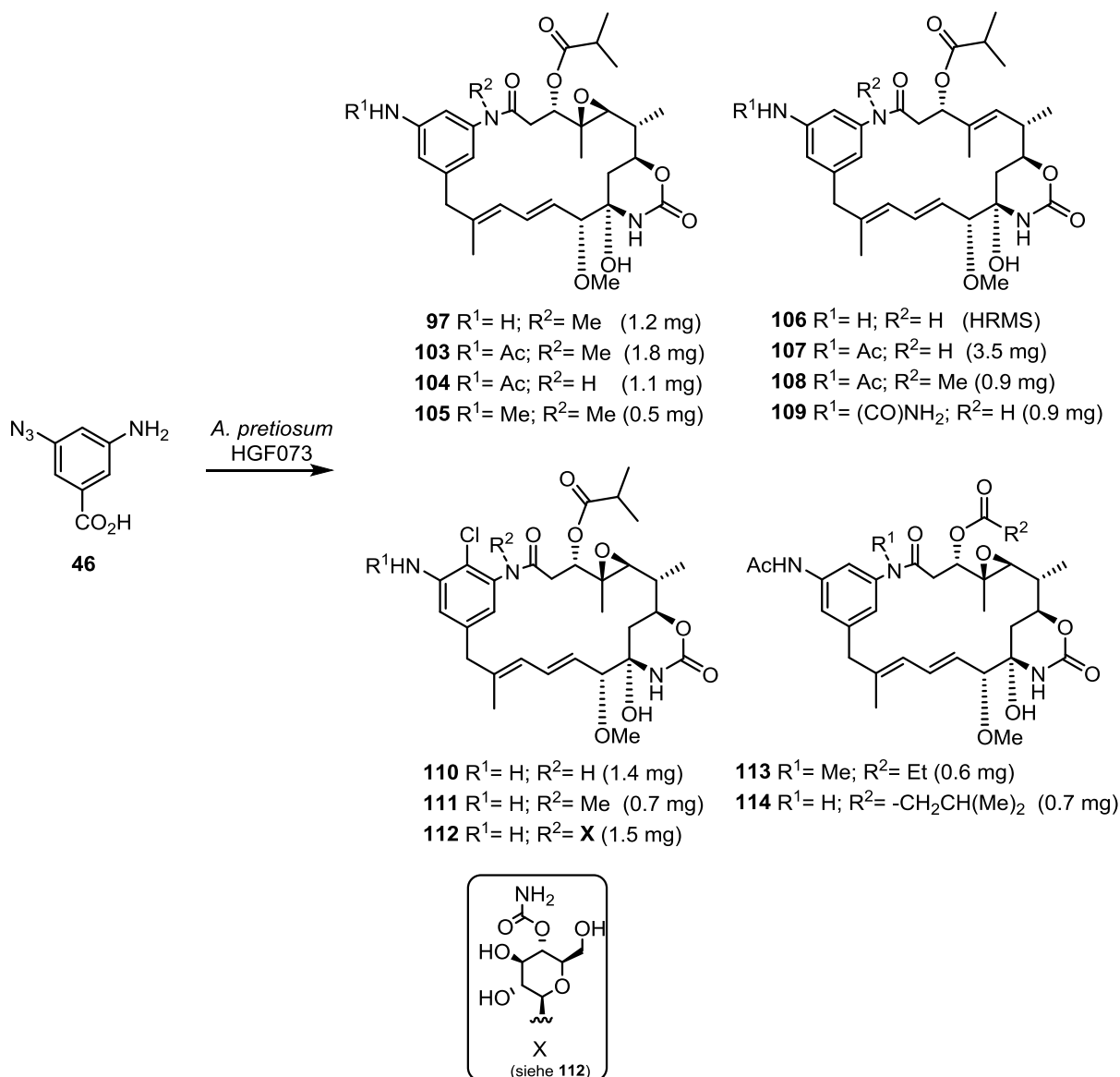
Verfütterung von 3,5-Diazidobenzoesäure (**67**)



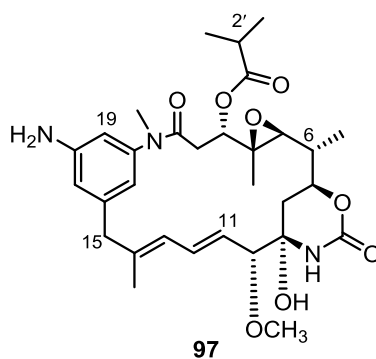
Die Zufütterung von Azidobenzoesäure **67** (2*11.0 mg, 2*56.3 μmol , gelöst in 2*2 mL $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O} = 1:1$) erfolgte in drei Portionen zu 2*37.5 mL Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselsäure (EtOAc) filtriert. Säulenchromatographische Reinigung ($\text{PE}:\text{EtOAc} = 5:1 \rightarrow 2:1$) lieferte 3-Amino-5-azido-benzamid (**102**) als Detoxifikationsprodukt (4.2 mg, 0.02 mmol) in einer Ausbeute von 18 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 7.83 (s, 1H, ArCONH_2), 7.24 (s, 1H, ArCONH_2), 6.87 (s, 1H, H-Ar), 6.70 (s, 1H, H-Ar), 6.40 (s, 1H, H-Ar), 5.51 (s, 2H, NH_2) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 167.7 (p, ArCONH_2), 150.2 (p, C-Ar), 139.9 (p, C-Ar), 136.8 (p, C-Ar), 110.5 (s, C-Ar), 105.8 (s, C-Ar), 105.1 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3463, 3361, 3189, 2110, 1635, 1581, 1399 cm^{-1} ; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 178.0729, gefunden 178.0729.

6.3.3 MUTASYNTHESE MIT 3-AMINO-5-AZIDOBENZOESÄURE (46)



Die mutasynthetische Darstellung der 20-Aminoansamitocin-Derivate erfolgte nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit der AHBA(-)-Blockmutante *A. pretiosum* HGF073. Unter kontinuierlicher Mutasynthon-Zugabe durch Spritzenpumpensysteme wurden insgesamt 1.6 g der 3-Amino-5-azidobenzoessäure (**46**) zu 6 L KOREA-Kulturen supplementiert. Nach Reinigung durch mehrere HPLC-Läufe wurden die folgenden Ansamitocin-Derivate erhalten.

20-Amino-19-deschloroansamitocin P-3 (97)

1.2 mg (0.2 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 69 min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 64 min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 60 min, dann 80/20 → 65/35 in 15 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 64 min;

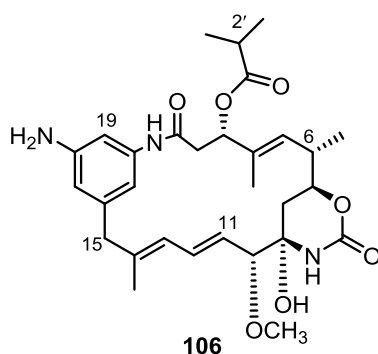
4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 81.5 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.65 (m, 1H, 21-H), 6.63 (dd, *J* = 11.0, 15.3 Hz, 1H, 12-H), 6.53 (m, 1H, 17-H), 6.46 (m, 1H, 19-H), 6.20 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.50 (dd, *J* = 15.3, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, *J* = 12.2, 2.6 Hz, 1H, 3-H), 4.21 (td, *J* = 11.1, 2.03 Hz, 1H, 7-H), 3.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.44 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.16 (s, 3H, N-CH₃), 3.12 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, 15-H_b), 2.91 (td, *J* = 13.9, 12.2 Hz, 1H, 2-H_a), 2.83 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.71 (sep, *J* = 6.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.15 (dd, *J* = 13.9, 2.6 Hz, 1H, 2-H_b), 1.71 (s, 3H, 14-CH₃), 1.60-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.25 (s, 6H, 2'-CH_{3a}, 6-CH₃), 1.19 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 0.93 (s, 3H, 4-CH₃) ppm;

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (p, C-1'), 171.3 (p, C-1), 155.3 (p, OCONH), 151.1 (p, C-20), 146.0 (p, C-18), 143.9 (p, C-16), 141.6 (p, C-14), 134.4 (s, C-12), 129.0 (s, C-11), 125.7 (s, C-13), 117.6 (s, C-17), 117.1 (s, C-21), 111.6 (s,

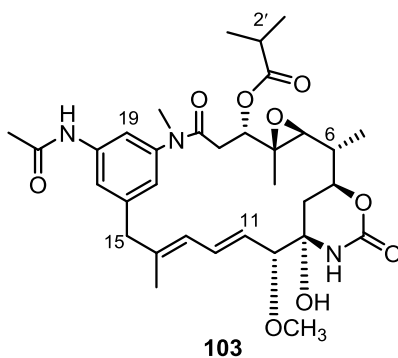
C-19), 89.9 (s, C-10), 81.7 (p, C-9), 77.8 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.7 (s, C-5), 62.1 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OCH₃), 47.9 (t, C-15), 39.6 (s, C-6), 37.7 (q, N-CH₃), 37.6 (t, C-8), 35.0 (s, C-2'), 34.2 (t, C-2), 20.6 (q, 2'-CH_{3a}), 18.4 (q, 2'-CH_{3b}), 15.9 (q, 14-CH₃), 14.8 (q, 6-CH₃), 12.9 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.11$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₁H₄₄N₃O₈ [M+H]⁺: 586.3128, gefunden 586.3126; **MSMS** {586.26 [M+H]⁺}: 498.2, 480.2, 436.2, 404.2, 387.2.

20-Amino-19-deschloro-4,5-deseoxy-*N*-desmethylansamitocin P-3 (106)



UPLC-MS $t_R = 1.99$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₀H₄₁N₃O₇ [M+Na]: 578.2842, gefunden 578.2880; **MSMS** {578.31 [M+Na]}: 556.3, 468.2, 450.2, 406.2, 374.2, 356.2.

20-Acetamido-19-deschloroansamitocin P-3 (103)



1.8 mg (0.3 mg/L); farbloser Schaum

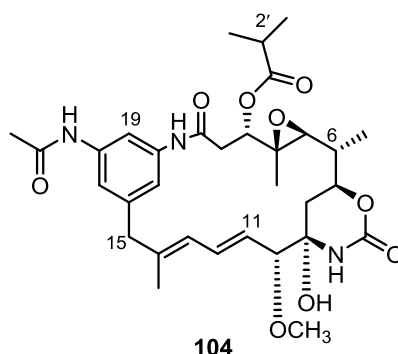
1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 73$ min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 60/40 in 45 min, dann 60/40 → 30/70 in 35 min, danach 30/70 → 100 % MeOH in 20 min, dann 100 % MeOH 20 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 82 min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 60 min, dann 80/20 → 65/35 in 15 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min]; t_R = 78 min;

4. HPLC: [(semipräp.) C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 65/35 in 60 min, dann 65/35 → 40/60 in 20 min, dann 40/60 → 30/70 in 10 min und 30/70 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 mL/min → 2.5 mL/min in 60 min, dann 2.5 mL/min → 3.0 mL/min in 20 min]; t_R = 63.5 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.52 (m, 2H, 21-H, 17-H), 7.03 (m, 1H, 19-H), 6.64 (dd, *J* = 15.3, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.26 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 13-H), 5.53 (dd, *J* = 15.3, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, *J* = 11.7, 2.6 Hz, 1H, 3-H), 4.21 (td, *J* = 11.1, 2.2 Hz, 1H, 7-H), 3.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.57 (m, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.25 (m, 1H, 15-H_b), 3.20 (s, 3H, N-CH₃), 2.84 (td, *J* = 13.9, 12.2 Hz, 1H, 2-H_a), 2.81 (d, *J* = 12 Hz, 1H, 5-H), 2.72 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.21-2.20 (m, 1H, 2-H_b), 2.11 (s, 3H, NHAc), 1.71 (s, 3H, 14-CH₃), 1.61-1.53 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.25 (m, 9H, 2'-CH_{3a}, 6-CH₃), 1.20 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 0.91 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (p, C-1'), 171.8 (p, C-1), 171.2 (p, COAc), 155.3 (p, OCONH), 145.6 (p, C-16), 144.0 (p, C-20), 141.6 (p, C-4), 141.1 (p, C-14), 134.2 (s, C-12), 129.6 (s, C-11), 126.3 (s, C-13), 124.5 (s, C-21), 121.6 (s, C-17), 117.4 (s, C-19), 111.39 (p, C-18), 89.8 (s, C-10), 81.7 (p, C-9), 77.9 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.7 (s, C-5), 61.9 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OCH₃), 47.7 (t, C-15), 39.6 (s, C-6), 37.8 (q, N-CH₃), 37.6 (t, C-8), 35.1 (s, C-2'), 34.3 (t, C-2), 23.8 (q, NHAc), 20.6 (q, 6-CH₃), 18.5 (q, 2'-CH_{3a}), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.8 (q, 2'-CH_{3b}), 12.8 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.12 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₃₃H₄₅N₃O₉ [M+Na]: 650.3054, gefunden 650.3064; **MSMS** {628.2 [M+H]⁺}: 628.2, 540.2, 522.19, 478.2.

20-Acetamido-19-deschloro-*N*-desmethylansamitocin P-3 (104)

1.1 mg (0.18 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 69$ min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 61.5$ min;

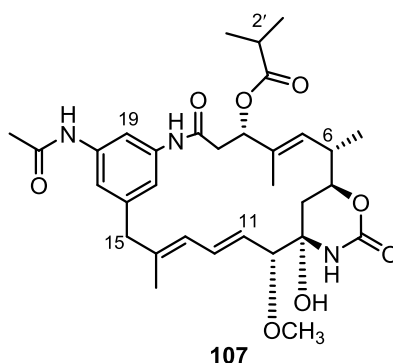
3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; $t_R = 75.5$ min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; $t_R = 75$ min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.39 (m, 1H, 17-H), 7.36 (m, 1H, 19-H), 7.06 (m, 1H, 21-H), 6.68 (dd, $J = 10.9, 15.3$ Hz, 1H, 12-H), 5.56 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.56 (dd, $J = 15.3, 8.8$ Hz, 1H, 11-H), 4.80 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, 3-H), 4.24 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H, 7-H), 3.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 10-H), 3.41 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.12 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.01 (t, $J = 13.4$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.86 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, 5-H), 2.75 (m, 1H, 2'-H), 2.21 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.13 (s, 3H, NHAc), 1.73 (s, 3H, 14-CH₃), 1.67 (m, 1H, 6-H), 1.59 (m, 2H, 8-H_a, 8-H_b), 1.26 (s, 6H, 2'-CH_{3a}, 6-CH₃), 1.19 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 1.06 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (p, C-1'), 173.1 (p, C-1), 171.8 (p, NHCOAc), 155.3 (p, OCONH), 143.3 (p, C-16), 141.1 (p, C-20), 140.5 (p, C-4), 139.7 (p,

C-18, C-14), 133.9 (s, C-12), 129.8 (s, C-11), 127.0 (s, C-13), 123.6 (s, C-21), 120.6 (s, C-17), 116.8 (s, C-19), 89.7 (s, C-10), 81.7 (p, C-9), 77.8 (s, C-3), 76.0 (s, C-7), 67.6 (s, C-5), 62.2 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OCH₃), 47.8 (t, C-15), 39.7 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 35.1 (s, C-2'), 33.4 (t, C-2), 23.8 (q, NHAc), 20.6 (q, 6-CH₃), 18.5 (q, 2'-CH_{3a}), 16.0 (q, 14-CH₃), 14.8 (q, 2'-CH_{3b}), 13.2 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.03 min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₃N₃O₉ [M+Na]: 636.2897 gefunden 636.2900; **MSMS** {636.28 [M+Na]}: 636.28, 614.3, 526.3, 508.3, 464.3.

20-Acetamido-19-deschloro-4,5-deseoxy-*N*-desmethylansamitocin P-3 (107)



3.5 mg (0.7 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 73 min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 30/70 in 30 min, danach 30/70 → 100 % MeOH in 10 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 85 min;

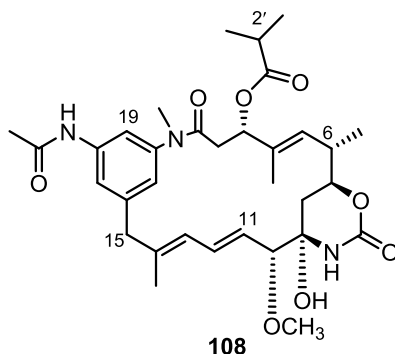
3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 84 min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 60/40 in 20 min, dann 60/40 → 45/55 in 20 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 76 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.85 (m, 1H, 17-H), 7.29 (m, 1H, 19-H), 6.97 (m, 1H; 21-H), 6.67 (dd, J = 14.7, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.09 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.59 (dd, J = 14.7, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 5.31-5.27 (m, 2H, 3-H, 5-H), 4.27 (t,

$J = 10.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.40 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.21 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, 15-H_b), 2.88 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.72-2.58 (m, 2'-H, 2-H_b, 6-H), 2.11 (s, 3H, NHAc), 1.98 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.73 (s, 3H, 14-CH₃), 1.70 (s, 3H, 4-CH₃), 1.47 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.17 (s, 3H, 2'-CH_{3a}), 1.16 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 1.08 (s, 3H, 6-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.6 (p, C-1'), 171.6 (p, COAc), 155.8 (p, OCONH), 142.6 (p, C-16), 140.3 (p, C-20), 140.00 (p, C-14), 136.1 (p, C-4), 134.5 (s, C-12), 128.7 (s, C-13), 126.8 (s, C-11), 126.3 (s, C-5), 117.2 (s, C-21), 116.4 (s, C-17), 115.8 (p, C-18), 109.7 (s, C-19), 88.8 (s, C-10), 82.4 (p, C-9), 79.3 (s, C-3), 77.4 (s, C-7), 56.5 (q, 10-OCH₃), 46.3 (t, C-15), 40.4 (t, C-2), 38.7 (s, C-6), 36.1 (t, C-8), 35.2 (s, C-2'), 23.8 (q, NHAc), 19.4 (q, 2'-CH_{3a}), 19.3 (q, 2'-CH_{3b}), 18.1 (q, 6-CH₃), 17.1 (q, 14-CH₃), 15.9 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.25$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₄N₃O₈ [M+H]⁺: 598.3128, gefunden 598.1111; **MSMS** {598.3 [M+H]⁺: 598.3, 510.3, 492.3, 448.3, 416.29.

20-Acetamido-19-deschloro-4,5-deseoxyansamitocin P-3 (108)



0.9 mg (0.15 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 73$ min;

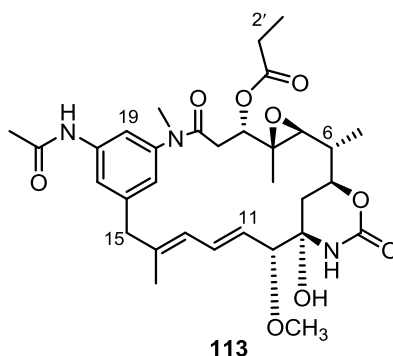
2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 60/40 in 45 min, dann 60/40 → 30/70 in 35 min, danach 30/70 → 100 % MeOH in 20 min, dann 100 % MeOH 20 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 85$ min;

3. HPLC: [(semipräp.) C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 65/35 in 60 min, dann 65/35 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 → 30/70 in 20 min und 30/70 → 100 % MeCN in

10 min; Fluss 2.25 mL/min → 2.5 mL/min in 60 min, dann 2.5 mL/min → 3.0 mL/min in 20 min]; $t_R = 75$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 7.81 (m, 1H, H-Ar), 7.28 (m, 1H, H-Ar), 6.98 (m, 1H, H-Ar), 6.65 (dd, $J = 14.1, 10.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.10 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.58 (dd, $J = 14.1, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 5.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 5-H), 5.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.21 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.43 (m, 1H, 15- H_a), 3.33 (s, 3H, N-CH_3), 3.32 (s, 3H, 10- OCH_3), 3.20 (m, 1H, 15- H_b), 2.85-2.83 (m, 1H, 2- H_a), 2.75-2.71 (m, 1H, 2- H_b), 2.65 (m, 1H, 6-H), 2.60 (sep, $J = 6.8$ Hz, 1H, 2'-H), 2.11 (s, 3H, NHAc), 2.03-2.01 (m, 1H, 8- H_a), 1.72 (m, 3H, 14- CH_3), 1.53 (m, 1H, 8- H_b), 1.29 (s, 3H, 4- CH_3), 1.17 (m, 6H, 2'- CH_{3a} , 6- CH_3), 1.07 (s, 3H, 2'- CH_{3b}); **$^{13}\text{C-NMR}$** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** $t_R = 2.43$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_8$ [M+Na]: 612.3285, gefunden 612.3279.

20-Acetamido-19-deschloroansamitocin P-2 (113)



0.6 mg (0.1 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 69$ min;

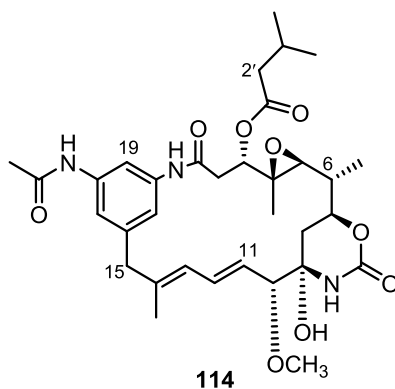
2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 65$ min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 95/5 → 80/20 in 60 min, dann 80/20 → 65/35 in 15 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min]; $t_R = 84$ min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 60/40 in 20 min, dann 60/40 → 45/55 in 20 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; $t_R = 78$ min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.52 (m, 2H, 17-H, 21-H), 7.03 (m, 1H, 19-H), 6.64 (dd, $J = 15.3, 10.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.26 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, 13-H), 5.53 (dd, $J = 15.3, 9.04$ Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, $J = 11.8, 2.6$ Hz, 1H, 3-H), 4.21 (dd, $J = 11.1, 2.2$ Hz, 1H, 7-H), 3.58 (m, 1H, 10-H), 3.57 (m, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.25 (m, 1H, 15-H_b), 3.20 (s, 3H, N-CH₃), 2.84-2.81 (m, 2H, 2-H_a, 5-H), 2.73 (m, 2H, 2'-CH₂), 2.21-2.20 (m, 1H, 2-H_b), 2.11 (s, 3H, ArNHAc), 1.71 (s, 3H, 14-CH₃), 1.62-1.53 (m, 2H, 6-H, 8-H_a), 1.25 (m, 3H, 6-CH₃), 1.20 (s, 4H, 2'-CH_{3a}, 8-H_b), 0.91 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (p, C-1'), 173.5 (p, C-1), 171.3 (p, COAc), 155.3 (p, OCONH), 144.3 (p, C-16), 141.1 (p, C-20), 140.6 (p, C-4), 139.5 (p, C-14), 134.2 (s, C-12), 129.6 (s, C-11), 126.3 (s, C-13), 123.5 (s, C-21), 121.6 (s, C-17), 117.4 (p, C-18), 107.6 (s, C-19), 89.9 (s, C-10), 81.8 (p, C-9), 77.9 (s, C-3), 76.0 (s, C-7), 67.7 (s, C-5), 62.1 (p, C-4), 57.0 (q, 10-OCH₃), 47.1 (t, C-15), 39.7 (s, C-6), 37.8 (t, C-8), 36.6 (s, C-2'), 35.2 (t, C-2), 23.8 (q, NHAc), 20.6 (q, 6-CH₃), 18.5 (q, 2'-CH_{3a}), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.9 (q, 2'-CH_{3b}), 12.9 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.12$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₃N₃O₉ [M+Na]: 636.2897, gefunden 636.2902.

20-Acetamido-19-deschloro-*N*-desmethylansamitocin P-4 (114)



0.7 mg (0.11 mg/L); farbloser Schaum

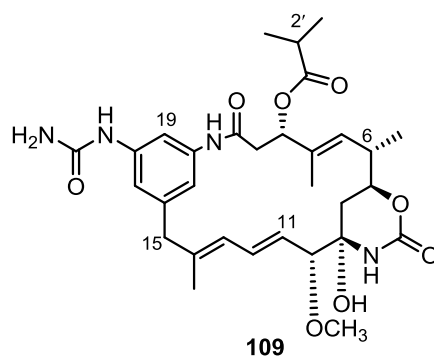
1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 69$ min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 61.5 min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 83 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.39 (m, 1H, 17-H), 7.36 (m, 1H, 19-H), 7.06 (m, 1H, 21-H), 6.67 (dd, *J* = 14.2, 11.4 Hz, 1H, 12-H), 6.26 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, 13-H), 5.56 (dd, *J* = 14.2, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.81 (m, 1H, 3-H), 4.16-4.10 (m, 1H, 7-H), 3.58 (m, 1H, 10-H), 3.56 (m, 2H, 15-H), 3.41 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.05-2.99 (m, 1H, 2-H_a), 2.85 (m, 2H, 5-H), 2.77-2.71 (m, 1H, 3'-H), 1.89 (s, 3H, ArNHAc), 1.73 (s, 3H, 14-CH₃), 1.22-1.21 (m, 3H, 6-H, 8-H_a, 8-H_b), 1.70-1.67 (m, 11H, 6-CH₃, 3'-CH_{3a}, 3'-CH_{3b}, 2'-CH₂), 0.90 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** t_R = 2.27 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₃₃H₄₆N₃O₉ [M+H]⁺: 628.3234, gefunden 628.3251.

19-Deschloro-4,5-deseoxy-*N*-desmethyl-20-*N*-ureidoansamitocin P-3 (109)



0.9 mg (0.15 mg/L); farbloser Schaum

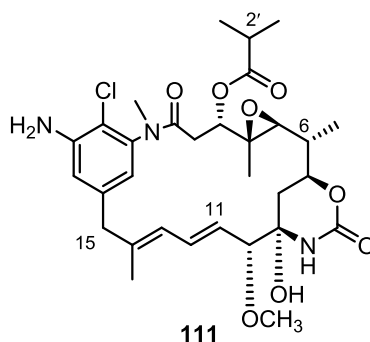
1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 73 min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 30/70 in 30 min, danach 30/70 → 100 % MeOH in 10 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 79 min;

3. HPLC: [(semipräp.) C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 65/35 in 60 min, dann 65/35 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 → 30/70 in 20 min und 30/70 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 mL/min → 2.5 mL/min in 60 min, dann 2.5 mL/min → 3.0 mL/min in 20 min]; t_R = 64 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.75 (m, 1H, H-Ar), 7.05 (m, 1H, H-Ar), 6.84 (m, 1H, H-Ar), 6.67 (dd, *J* = 15.1, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.09 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.59 (dd, *J* = 15.1, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 5.35-5.27 (m, 2H, 3-H, 5-H), 4.27 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H, 7-H), 3.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.38 (m, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.19 (m, 1H, 15-H_b), 2.88 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, 2-H_a), 2.72-2.61 (m, 2'-H, 2-H_b, 6-H), 1.98 (m, 1H, 8-H_a), 1.73 (s, 3H, 14-CH₃), 1.71 (s, 3H, 4-CH₃), 1.50-1.45 (m, 1H, 8-H_b), 1.18 (s, 3H, 2'-CH_{3a}), 1.16 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 1.09 (s, 3H, 6-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** t_R = 2.11 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₃₁H₄₃N₄O₈ [M+H]⁺: 599.3081, gefunden 599.3091; **MSMS** {599.4 [M+H]⁺: 599.4, 511.3, 493.3, 449.3.

20-Aminoansamitocin P-3 (111)



0.7 mg (0.11 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 73 min;

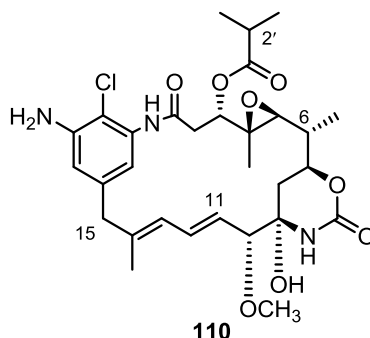
2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 30/70 in 30 min, danach 30/70 → 100 % MeOH in 10 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 85 min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min in 90 min]; t_R = 87 min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min in 90 min]; $t_R = 85$ min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.83 (m, 1H, 21-H), 6.62 (m, 1H, 17-H), 6.61 (dd, $J = 11.1, 15.5$ Hz, 1H, 12-H), 6.20 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.49 (dd, $J = 15.5, 9$ Hz, 1H, 11-H), 4.70 (dd, $J = 12.2, 2.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.20 (td, $J = 10.4, 1.08$ Hz, 1H, 7-H), 3.56 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.42 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.20 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.12 (s, 3H, N-CH₃), 2.82 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.74 (td, $J = 13$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.71 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.13 (dd, $J = 13, 2.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.71 (s, 3H, 14-CH₃), 1.55-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.26 (s, 3H, 6-CH₃), 1.23 (s, 6H, 2'-CH_{3a}), 1.20 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 0.89 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); **UPLC-MS** $t_R = 2.27$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für C₃₁H₄₃N₃O₈Cl [M+H]⁺: 620.2739, gefunden 620.2739; **MSMS** {620.1 [M+H]⁺: 620.1, 532.1, 514.1, 470.1, 438.1.

20-Amino-*N*-desmethylansamitocin P-3 (110)



1.4 mg (0.23 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 69$ min;

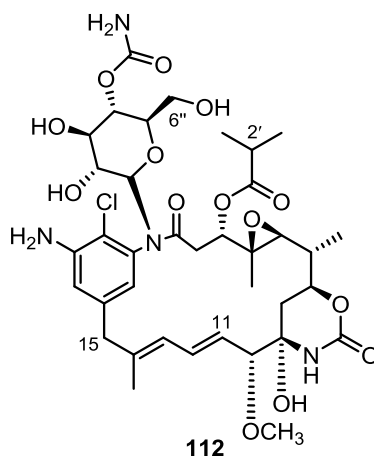
2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 61$ min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 60 min, dann 80/20 → 65/35 in 15 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min]; $t_R = 81$ min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min]; $t_R = 70$ min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.75 (m, 1H, 21-H), 6.68 (m, 1H, 17-H), 6.66 (dd, $J = 11.5, 15.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.20 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, 13-H), 5.52 (dd, $J = 15.9, 9.0$ Hz, 1H, 11-H), 4.77 (dd, $J = 11.6, 2.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.23 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H, 7-H), 3.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.42 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.13 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, 15-H_b), 2.89 (t, $J = 12.8$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.85 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.73 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.19 (dd, $J = 12.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.72 (s, 3H, 14-CH₃), 1.66-1.54 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.28 (s, 6H, 2'-CH_{3a}, 6-CH₃), 1.20 (s, 3H, 2'-CH_{3b}), 1.03 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.8 (p, C-1'), 173.1 (p, C-1), 163.3 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 141.0 (p, C-18), 136.8 (p, C-16), 134.1 (s, C-12), 130.8 (p, C-14), 129.4 (s, C-11), 126.4 (s, C-13), 118.8 (s, C-21), 116.9 (s, C-17), 112.6 (s, C-19), 89.7 (s, C-10), 81.7 (p, C-9), 77.6 (s, C-3), 76.0 (s, C-7), 67.7 (s, C-5), 62.1 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OCH₃), 47.5 (t, C-15), 39.6 (s, C-6), 36.5 (t, C-8), 35.1 (s, C-2'), 33.1 (t, C-2), 18.5 (q, 2'-CH_{3a}), 15.9 (q, 2'-CH_{3b}), 14.8 (q, 14-CH₃), 14.4 (q, 6-CH₃), 13.0 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.03$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₀H₄₁N₃O₈Cl [M+H]⁺: 606.2582, gefunden 606.2579; **MSMS** {606.1 [M+H]⁺: 606.1, 518.1, 500.1, 456.1, 424.1.

20-Amino-N-(4-O-carbamoyl-β-D-glucopyranosyl)-ansamitocin P-3 (112)



1.5 mg (0.25 mg/L); farbloser Schaum

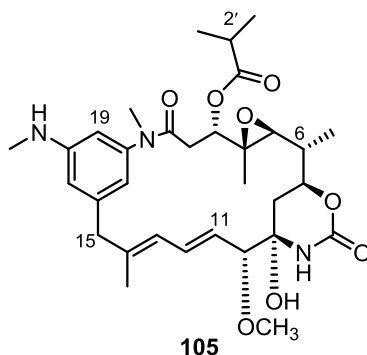
1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; $t_R = 65.5$ min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 100 % MeOH in 35 min, dann 100 % MeOH 25 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 68 min;

3. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 60 min, dann 80/20 → 65/35 in 15 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 → 3.0 mL/min]; t_R = 75 min;

4. HPLC: [(semipräp.) CN-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 80/20 in 50 min, dann 80/20 → 65/35 in 25 min, dann 65/35 → 45/55 in 15 min und 45/55 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.5 → 3.0 mL/min]; t_R = 74 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.89 (m, 1H, 17-H), 6.88 (m, 1H, 21-H), 6.59 (dd, *J* = 11.0, 15.3 Hz, 1H, 12-H), 6.16 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.51 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, 1^{''}-H), 5.47 (dd, *J* = 15.3, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, *J* = 11.9, 3.2 Hz, 1H, 3-H), 4.18 (td, *J* = 12.3, 2.1 Hz, 1H, 7-H), 4.13 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, 4^{''}-H), 3.53 (dd, *J* = 9.4, 5.9 Hz, 1H, 6^{''}-H_a), 3.49 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, 6^{''}-H_b), 3.46-3.45 (m, 2H, 3^{''}-H, 10-H), 3.43 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.19 (s, 1H, 2^{''}-H), 3.17-3.16 (m, 1H, 5^{''}-H), 3.15 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, 15-H_b), 2.76 (sep, *J* = 5.6 Hz, 1H, 2[`]-H), 2.76 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.63 (dd, *J* = 14.4, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.15 (dd, *J* = 14.4, 3.2 Hz, 1H, 2-H_b), 1.76 (s, 3H, 14-CH₃), 1.59 (m, 1H, 6-H), 1.54-1.45 (m, 2H, 8-H_a, 8-H_b), 1.25 (s, 3H, 2[`]-CH_{3a}), 1.22 (s, 3H, 6-CH₃), 1.19 (s, 3H, 2[`]-CH_{3b}), 1.14 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 178.3 (p, C-1[`]), 172.7 (p, C-1), 159.3 (p, 4^{''}-OCONH₂), 155.1 (p, OCONH), 146.8 (p, C-20), 141.8 (p, C-14), 140.9 (p, C-18), 137.4 (p, C-16), 134.5 (s, C-12), 128.8 (s, C-11), 125.2 (s, C-13), 122.9 (s, C-17), 118.7 (s, C-19), 117.9 (s, C-21), 89.9 (s, C-10), 82.1 (s, C-5^{''}), 81.9 (p, C-9), 81.8 (s, C-1^{''}), 79.8 (s, C-7), 77.2 (s, C-3^{''}), 77.1 (s, C-3), 75.8 (s, C-4^{''}), 73.6 (s, C-6^{''}), 71.9 (s, C-2^{''}), 67.2 (s, C-5), 62.3 (s, C-4), 56.8 (q, 10-OCH₃), 47.3 (t, C-15), 39.6 (s, C-6), 37.6 (t, C-8), 34.8 (s, C-2[`]), 34.7 (t, C-2), 20.3 (q, 2[`]-CH_{3a}), 19.1 (q, 2[`]-CH_{3b}), 17.9 (q, 4-CH₃), 15.9 (q, 6-CH₃), 14.9 (q, 14-CH₃) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.74 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₃₇H₅₂N₄O₁₄Cl [M+H]⁺: 811.3169, gefunden 811.3138.

20-Aminomethyl-19-dechloroansamitocin P-3 (105)

0.5 mg (0.12 mg/L); farbloser Schaum

1. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 79.5 min;

2. HPLC: [(präp.) C-18-Phase; Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 50/50 in 50 min, dann 50/50 → 100 % MeOH in 40 min, dann 100 % MeOH 10 min halten; Fluss 15 mL/min]; t_R = 75 min;

3. HPLC: [(semipräp.) C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 65/35 in 60 min, dann 65/35 → 40/60 in 10 min, dann 40/60 → 30/70 in 20 min und 30/70 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 mL/min → 2.5 mL/min in 60 min, dann 2.5 mL/min → 3.0 mL/min in 20 min]; t_R = 73 min;

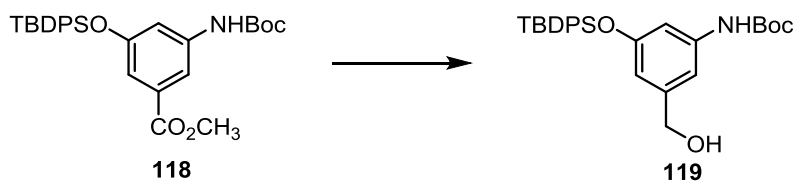
4. HPLC: [(semipräp.) C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeCN 95/5 → 65/35 in 60 min, dann 65/35 → 50/50 in 20 min, dann 50/50 → 30/70 in 10 min und 30/70 → 100 % MeCN in 10 min; Fluss 2.25 mL/min → 2.5 mL/min in 80 min, dann 2.5 mL/min → 3.0 mL/min in 10 min]; t_R = 73.5 min.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.63 (dd, *J* = 11, 15.3 Hz, 1H, 12-H), 6.55 (m, 1H, Ar-H), 6.49 (m, 1H, Ar-H), 6.34 (m, 1H, Ar-H), 6.20 (d, *J* = 11 Hz, 1H, 13-H), 5.49 (dd, *J* = 15.3, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, *J* = 12.1, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 4.21 (td, *J* = 11.1, 2.1 Hz, 1H, 7-H), 3.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.33 (s, 3H, N-CH₃), 3.31 (unter CHD₂OD, 3H, N-CH₃), 3.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 15-H_b), 2.91 (td, *J* = 14.1, 12.1 Hz, 1H, 2-H_a), 2.83 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.72 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.16 (dd, *J* = 14.1, 2.7 Hz, 1H, 2-H_b), 1.72 (s, 3H, 14-CH₃), 1.62 (dd, *J* = 13.6, 2.1 Hz, 2H, 8-H_a, 8-H_b), 1.55-1.52 (m, 1H, 6-H), 1.25 (s, 3H, 2'-CH_{3a}),

1.19 (s, 3H, 2`-CH_{3b}), 1.15-1.11 (m, 6H, 4-CH₃, 6-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (aufgrund zu geringer Substanzmenge nicht möglich); UPLC-MS t_R = 2.47 min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₅N₃O₈Na [M+Na]: 622.3104, gefunden 622.3074; MSMS {600.2 [M+H]⁺}: 600.2, 512.2, 494.2, 450.2, 418.2.

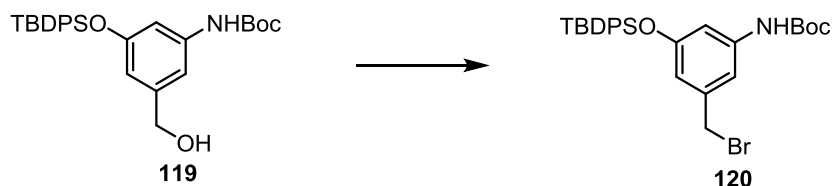
6.3.4 SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.2

3-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-5-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-benzylalkohol (**119**)



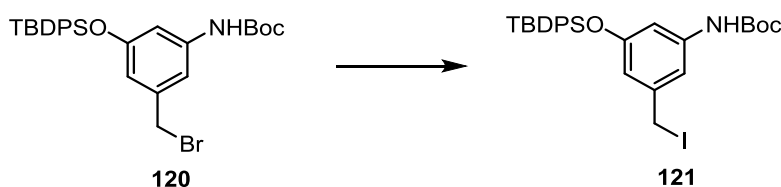
Methylester **118** (2.8 g, 5.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in THF (100 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt und mit DIBAL (*c* = 1.2 mol/L in Toluol, 14 mL, 16.8 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 20 Stunden gerührt. Durch Zugabe von Ethylacetat wurde die Reaktion beendet, mit Na-K-Tartrat-Lösung versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 → 3:1) lieferte Benzylalkohol **119** (2.6 g, 5.5 mmol, 98 %) als farbloses Öl.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 9.19 (s, 1H, NHBoc), 7.67 (m, 4H, TBDPS), 7.50 – 7.42 (m, 6H, TBDPS), 7.04 (m, 1H, H-Ar), 6.87 (m, 1H, H-Ar), 6.34 (m, 1H, H-Ar), 5.02 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.23 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂OH), 1.41 (s, 9H, Boc), 1.03 (s, 9H, TBDPS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 154.9 (p, C-Ar), 152.5 (p, Boc), 144.1 (p, C-Ar), 140.3 (p, C-Ar), 135.0 (s, 2C, TBDPS), 132.3 (p, TBDPS), 130.1 (s, TBDPS), 127.9 (s, 2C, TBDPS), 111.0 (s, C-Ar), 109.3 (s, C-Ar), 107.8 (s, C-Ar), 78.9.8 (p, Boc), 62.7 (t, CH₂OH), 28.1 (q, Boc), 26.4 (q, TBDPS), 18.9 (p, TBDPS) ppm; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₂₈H₃₄NO₃SiBr [M+H]⁺: 538.1413, gefunden 538.1397.

3-(tert-Butyloxycarbonylamino)-5-(tert-butyldiphenylsilyloxy)-benzylbromid (120)

Benzylalkohol **119** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in Dichlormethan (5 mL) gelöst und nacheinander mit PPh_3 (68.2 mg, 0.3 mmol, 1.2 Äq.) und CBr_4 (86.2 mg, 0.3 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde das Dichlormethan in Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 20:1 \rightarrow 10:1) lieferte Benzylbromid **120** (99.5 mg, 0.2 mmol, 88 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.73 - 7.69 (m, 4H, TBDPS), 7.46 - 7.35 (m, 6H, TBDPS), 7.16 (m, 1H, H-Ar), 6.56 (m, 1H, H-Ar), 6.43 (m, 1H, H-Ar), 6.26 (s, 1H, NH), 4.22 (s, 2H, CH_2Br), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.08 (s, 9H, TBDPS) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 156.3 (p, C-Ar), 152.5 (p, Boc), 139.6 (p, C-Ar), 139.5 (p, C-Ar), 135.6 (s, TBDPS), 132.7 (p, TBDPS), 130.2 (s, TBDPS), 128.0 (d, TBDPS), 115.4 (d, C-Ar), 111.9 (d, C-Ar), 109.9 (d, C-Ar), 80.8 (s, Boc), 33.4 (t, CH_2Br), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 19.6 (p, TBDPS) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{BrNO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 540.1570, gefunden 540.1566.

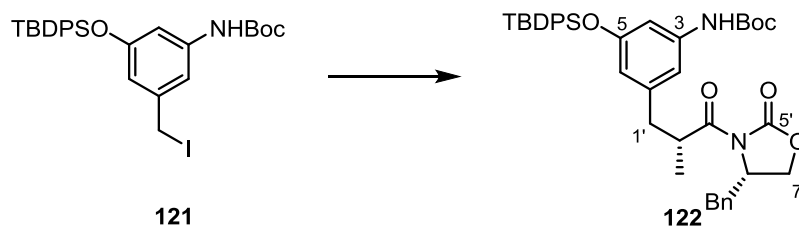
3-(tert-Butyloxycarbonylamino)-5-(tert-butyldiphenylsilyloxy)-benzyljodid (121)

Benzylbromid **120** (100 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Aceton (5 mL) gelöst und bei Raumtemperatur mit NaI (42.9 mg, 0.3 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde trübe unter Bildung eines weißen Niederschlages. Die Reaktionsmischung wurde bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per LC/MS) gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser (5 mL) und mit Diethylether (10 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit

CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Benzylidiodid **121** (115.4 mg, 0.19 mmol, 98 %) wurde direkt weiter eingesetzt.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.69 (m, 4H, TBDPS), 7.45 – 7.35 (m, 6H, TBDPS), 7.12 (m, 1H, H-Ar), 6.54 (m, 1H, H-Ar), 6.40 (m, 1H, H-Ar), 6.25 (m, 1H, NH), 4.18 (s, 2H, CH₂I), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.08 (s, 9H, TBDPS) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 156.2 (p, C-Ar), 152.5 (p, Boc), 140.9 (p, C-Ar), 139.5 (p, C-Ar), 135.6 (s, TBDPS), 132.7 (p, TBDPS), 130.1 (s, TBDPS), 128.0 (s, TBDPS), 115.1 (s, C-Ar), 111.6 (s, C-Ar), 109.5 (s, C-Ar), 80.8 (s, Boc), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 19.6 (p, TBDPS), 5.6 (t, CH₂I) ppm; HRMS [ESI] *m/z* berechnet für C₂₈H₃₅NO₃SiI [M+H]⁺: 588.1431, gefunden 588.1432.

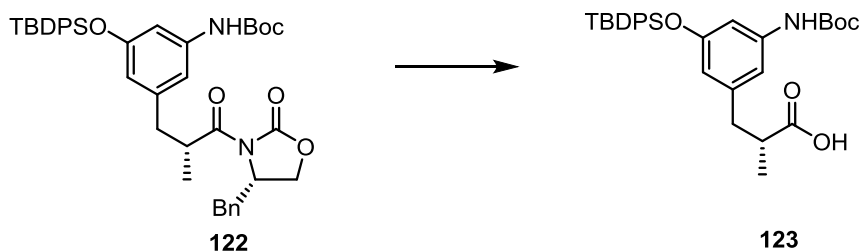
Bezyloxalidinon **122**



Frisch destillierte Diisopropylamin (1.6 mL, 11.2 mmol, 1.7 Äq.) wurde in THF (80 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zur Reaktionslösung wurde langsam *n*-BuLi (4.5 mL, 11.2 mmol, 1.7 Äq.) zugetropft und 10 Minuten bei -78 °C gerührt. Das propionierte (*S*)-EVANS-Auxiliar (2.5 g, 10.7 mmol, 1.6 Äq.) wurde in THF (10 mL) gelöst und zur Reaktionslösung hinzugefügt. Die Lösung wurde für 5 Minuten auf -40 °C erwärmt und danach wieder auf -78 °C gekühlt. Benzylidiodid **121** (3.9 g, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (20 mL) gelöst und langsam zur Reaktionsmischung zugetropft. Die Lösung wurde dann über Zeitraum von 2 Stunden auf -35 °C und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und 20 Stunden gerührt. Durch die Zugabe von Phosphatpuffer pH = 7 (20 mL) und Ethylacetat (20 mL) wurde die Reaktion beendet, auf Raumtemperatur erwärmt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde per Flash-Chromatographie (PE:EtOAc = 10:1 → 7:1) gereinigt. Bezyloxalidinon **122** (3.5 g, 5.1 mmol, 77 %) wurde als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.71 - 7.68 (m, 4H, TBDPS), 7.41 - 7.24 (m, 4H, TBDPS, 5H, Bn), 7.11 - 7.09 (m, 2H, TBDPS), 6.86 (m, 1H, H-Ar), 6.72 (m, 1H, H-Ar), 6.29 (m, 1H, H-Ar), 6.25 (m, 1H, NH), 4.64 (m, 1H, H-8`), 4.18 (m, 2H, H-7`), 4.12 (m, 1H, H-2`), 3.16 (dd, *J* = 13.3, 3.1 Hz, 1H, H-1a`), 2.93 (dd, *J* = 12.9, 6.7 Hz, 1H, H-1a`), 2.60 (dd, *J* = 13.3, 9.6 Hz, 1H, H-1b`), 2.33 (dd, *J* = 12.9, 8.5 Hz, 1H, H-1b`), 1.59 (s, 9H, TBDPS), 1.26 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-2`), 1.07 (s, 9H, Boc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.5 (p, NCOCH), 156.0 (p, C-Ar), 153.0 (p, NCOO), 152.5 (p, Boc), 140.9 (p, C-Ar), 139.3 (p, C-Ar), 135.6 (s, TBDPS), 135.4 (s, C-Ar), 132.9 (s, C-Ar), 132.8 (p, TBDPS), 129.9 (s, TBDPS), 129.5 (s, C-Ar), 129.0 (s, C-Ar), 127.9 (s, TBDPS), 127.5 (s, C-Ar), 127.3 (s, C-Ar), 115.8 (s, C-Ar), 112.1 (s, C-Ar), 108.3 (s, C-Ar), 83.1 (p, Boc), 66.1 (t, CH₂O), 55.3 (s, CHN), 39.6 (t, CH₂Ph), 39.5 (s, CHCH₃), 38.0 (t, CH₂CH), 28.4 (q, Boc), 26.6 (q, TBDPS), 19.6 (p, TBDPS), 16.2 (q, CH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₄₁H₄₈N₂O₆SiNa [M+Na]: 715.3179, gefunden 715.3158.

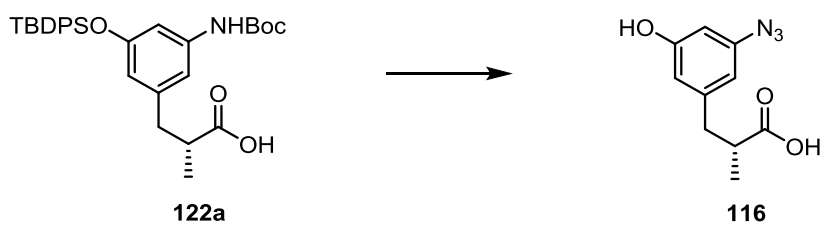
(2R)-3-[3-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-5-(*tert*-butyloxycarbonylamino)]-2-methylpropionsäure (123**)**



Benzylloxalidion **122** (690 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF:H₂O-Gemisch = 4:1 (20 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde zur Reaktionsmischung 30%ige H₂O₂aq.-Lösung (0.2 mL, 5.9 mmol, 6.0 Äq.) und LiOH·H₂O (83.7 mg, 2.0 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Nach 2 Stunden wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 Stunden gerührt. Nach Zugabe von Na₂SO₃aq.-Lösung wurde die Reaktionsmischung weitere 30 Minuten gerührt und anschließend mit H₂O und mit Dichlormethan versetzt. Nach Extraktion wurden die vereinigten, organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es wurde Rohprodukt **123** (514.5 mg, 0.9 mmol, 97 %) als farbloses Öl erhalten, und ohne weitere Reinigung in nächster Stufe eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 3.31 ppm): δ 7.71 (m, 4H, TBDPS), 7.44 - 7.36 (m, 6H, TBDPS), 6.92 (m, 1H, H-Ar), 6.74 (m, 1H, H-Ar), 6.11 (m, 1H, H-Ar), 2.73 (dd, J = 12.8, 6.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 2.35 (td, J = 13.0, 8.2 Hz, 1H, CH), 1.99 (dd, J = 12.8, 8.2 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.08 (s, 9H, TBDPS), 0.84 (d, J = 6.3 Hz, 3H, Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 179.8 (p, ArCO_2H), 157.2 (p, C-Ar), 155.1 (p, Boc), 142.1 (p, C-Ar), 141.5 (p, C-Ar), 136.7 (p, 2C, TBDPS), 134.1 (s, 4C, TBDPS), 131.1 (p, TBDPS), 128.9 (s, TBDPS), 115.9 (s, C-Ar), 113.5 (s, C-Ar), 109.6 (s, C-Ar), 80.8 (p, Boc), 42.2 (s, CH), 40.5 (t, CH_2), 28.7 (q, TBDPS), 27.1 (q, Boc), 20.2 (p, TBDPS), 5.6 (q, Me) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{NO}_5\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 534.2676, gefunden 534.2680.

Methylpropionsäure 116



(R)-3-[3-Amino-5-(*t*-Butyldiphenylsilyl)-oxophenyl]-2-methylpropionsäure

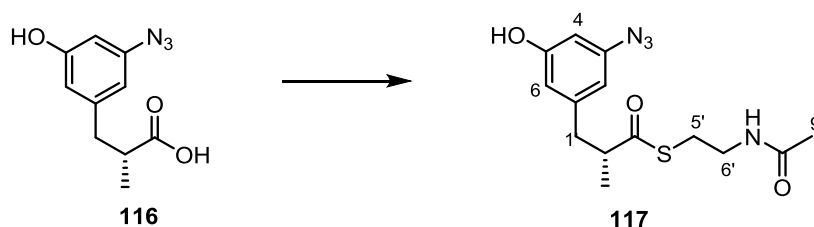
Propionsäure **122a** (514.5 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst und langsam mit TFA (2.9 mL, 38.6 mmol, 40.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung PE:EtOAc = 1:1 \rightarrow 100 % EtOAc lieferte Anilin **123** (448.7 mg, 0.9 mmol, quant.) als farbloses Öl.

(R)-3-(3-azido-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropionsäure

Das Anilin **123** (25 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst, mit HCl_{aq} (2M) (5 mL) versetzt und auf $-5\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Zur Reaktionsmischung wurde langsam in H_2O (2 mL) gelöstes NaNO_2 (8.0 mg, 0.1 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und 6 Stunden bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde zur Lösung in H_2O (1 mL) gelöstes NaN_3 (5.6 mg, 0.1 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und 12 Stunden bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 2:1) lieferte Methylpropionsäure **116** (13.8 mg, 0.03 mmol, 52 %) als braunes Öl.

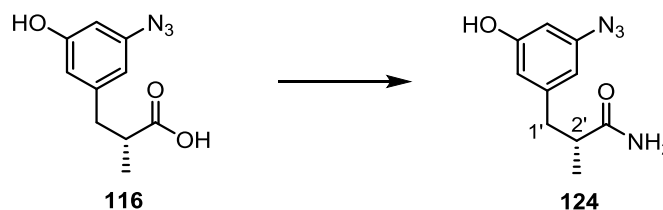
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 9.68 (s, 1H, OH), 6.43 (m, 1H, H-Ar), 6.38 (m, 1H, H-Ar), 6.31 (m, 1H, H-Ar), 2.79 (dd, *J* = 12.6, 6.8 Hz, 1H, CH₂-H_a), 2.59 (dd, *J* = 13.8, 7.0 Hz, 1H, CH), 2.57 (m, 1H, CH₂-H_b), 1.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 176.7 (p, ArCO₂H), 158.5 (p, C-Ar), 142.9 (p, C-Ar), 139.9 (p, C-Ar), 113.1 (s, C-Ar), 110.2 (s, C-Ar), 103.7 (s, C-Ar), 40.3 (t, CH₂), 38.7 (s, CH), 16.8 (q, Me) ppm; **IR** (neat) 3372, 2952, 2105, 1707, 1593, 1453, 1330, 1214 cm⁻¹; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₀N₃O₃ [M-H]⁻: 220.0722, gefunden 220.0719; **[α]_D²¹**: -7.69 (*c* = 1.3, MeOH).

SNAC-Ester **117**



Propionsäure **116** (35 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurden in Acetonitril (5 mL) gelöst und mit *N*-Acetylcystein (24.5 mg, 0.21 mmol, 1.3 Äq.), DCC (43.3 mg, 0.21 mmol, 1.3 Äq.) und 4-DMAP (19.6 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Stickstoff 24 Stunden bei 40 °C erhitzt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst chromatographisch (PE:EtOAc = 2:1 → 1:1 → 100 % EtOAc) und anschließend über semipräp.-HPLC (Gradient H₂O:MeOH = 90:10 → 100 % MeOH in 90 min, dann 10 min 100 % MeOH, *t_R* = 95 min) über eine C18-Phase gereinigt. Der SNAC-Ester **117** (30.7 mg, 0.09 mmol, 60 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

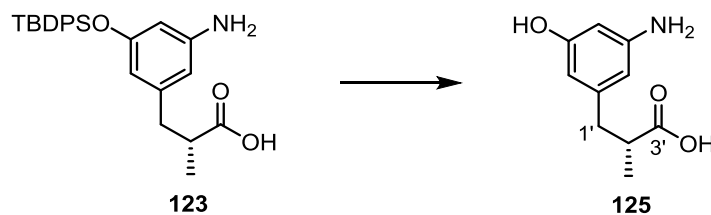
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.43 (m, 1H, 6-H), 6.36 (m, 1H, 2-H), 6.33 (m, 1H, 4-H), 3.29 (td, *J* = 6.7, 1.6 Hz, 2H, 6'-H), 2.97 (m, 2H, 2'-H, 1'-H), 2.94-2.91 (m, 2H, 5'-H), 2.65-2.59 (m, 1H, 1'-H), 1.92 (s, 3H, 9'-CH₃), 1.18 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 2'-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 204.1 (p, 3'-C), 173.4 (p, 8'-C), 159.9 (p, 5-C), 143.5 (p, 1-C), 142.3 (p, 3-C), 114.1 (s, 6-C), 111.8 (s, 2-C), 105.1 (s, 4-C), 51.3 (s, 2'-C), 40.8 (t, 1'-C), 40.1 (t, 6'-C), 29.0 (t, 5'-C), 22.5 (q, 9'-CH₃), 17.9 (q, 2'-CH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₄H₁₈N₄O₃S [M+Na]: 345.0997, gefunden 345.0997; **[α]_D²²**: -51.0 (*c* = 1.0, MeOH).

(R)-3-(3-Azido-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropanamid (124)

Diketid **116** (12 mg, 50 μ mol, 1.0 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in THF (5 mL) gelöst und auf -10 °C gekühlt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Et₃N (10 μ L, 50 μ mol, 1.0 Äq.) und Ethylchloroformiat (10 μ L, 50 μ mol, 1.0 Äq.) langsam versetzt, für 30 Minuten bei -10 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur gebracht. Das erhaltene Anhydrid wurde sofort weiter eingesetzt.

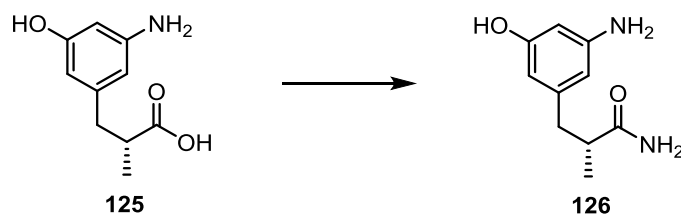
NH₃-Lösung (1 mL) wurde in THF (2 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde das frisch hergestellte Anhydrid in THF (5 mL) langsam zur Reaktionsmischung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C für 2 Stunden gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 48 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethylacetat beendet und dreimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC mit Gradienten (H₂O/MeCN 95/5 \rightarrow 90/10 in 5 min, 90/10 \rightarrow 80/20 in 30 min, dann 80/20 \rightarrow 75/25 in 50 min und dann 75/25 \rightarrow 45/55 in 75 min, 45/55 \rightarrow 30/70 in 80 min, 30/70 \rightarrow 100 % MeCN in 85 min und danach 100 % MeCN 15 min; Fluss 2.5 mL/min) über eine CN-Phase ($t_R = 32$ min) gereinigt. Amid **124** (11.8 mg, 50 μ mol, quant.) wurde als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.45 (m, 1H, H-Ar), 6.40 (m, 1H, H-Ar), 6.30 (m, 1H, H-Ar), 2.82 (dd, $J = 13.1, 8.1$ Hz, 1H, 1_a'-H), 2.62 (td, $J = 14.2, 6.7$ Hz, 1H, 2'-H), 2.54 (dd, $J = 13.1, 6.7$ Hz, 1H, 1_b'-H), 1.12 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 2'-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 181.5 (p, 3'-C), 159.9 (p, 5-C), 144.3 (p, 1-C), 142.2 (p, 3-C), 114.1 (s, 6-C), 111.6 (s, 2-C), 104.8 (s, 4-C), 43.4 (s, 2'-C), 40.9 (t, 1'-C), 18.2 (q, 2'-CH₃) ppm; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₁₀H₁₂N₄O₂Na [M+Na]: 243.0858, gefunden 243.0861; $[\alpha]_D^{22} = -4.17$ ($c = 1.2$, MeOH).

(R)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropansäure (125)

Methylpropansäure **123** (50 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (5 mL) gelöst, mit Eiswasser auf 0 °C gekühlt und anschließend mit einer Lösung aus TBAF (72.8 mg, 0.2 mmol, 2.0 Äq.) in THF (1 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur gebracht und 19 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NH₄Cl-Lösung beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC (Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 75/25 in 45 min, dann 75/25 → 45/55 in 45 min und dann 45/55 → 100 MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) über eine C18-Phase (t_R = 30 min.) gereinigt. AHBA-Diketid **125** (17.5 mg, 0.09 mmol, 75 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.29 (m, 1H, H-Ar), 6.27 (m, 1H, H-Ar), 6.26 (m, 1H, H-Ar), 2.87 (dd, *J* = 13.1, 6.9 Hz, 1H, 1_a'-H), 2.67 (td, *J* = 14.1, 7.1 Hz, 1H, 2'-H), 2.50 (dd, *J* = 13.1, 7.1 Hz, 1H, 1_b'-H), 1.13 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 2'-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm) δ 177.0 (p, 3'-C), 157.9 (p, 5-C), 149.5 (p, 1-C), 140.9 (p, 3-C), 106.1 (s, 6-C), 104.0 (s, 2-C), 99.0 (s, 4-C), 59.8 (s, 2'-C), 40.5 (t, 1'-C), 16.8 (q, 2'-CH₃) ppm; HRMS [ESI] *m/z* berechnet für C₁₀H₁₄N₁O₃ [M+H]⁺: 196.0974, gefunden 196.0987; [α]_D²⁴ = -8.0 (*c* = 0.5, MeOH).

(R)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropanamid (126)

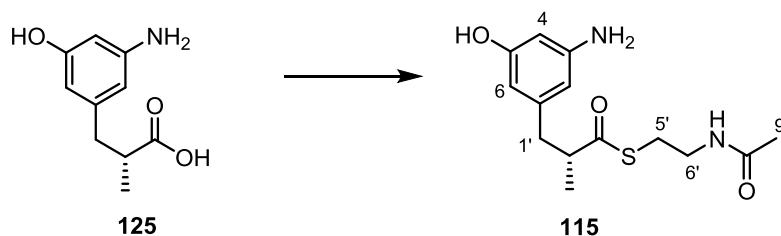
AHBA-Diketid **125** (32.7 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in THF (5 mL) gelöst und auf -10 °C gekühlt. Zur Lösung wurde anschließend Et₃N (30 µL, 0.2 mmol, 1.1 Äq.) und Ethylchloroformiat (20 µL, 20 µmol, 1.1 Äq.) langsam zugegeben,

30 Minuten bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann auf Raumtemperatur gebracht. Das erhaltene Anhydrid wurde sofort weiter eingesetzt.

NH_3 konz. (1 mL) wurde in THF (2 mL) gelöst und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurde das frisch hergestellte Anhydrid in THF (5 mL) langsam zur Reaktionsmischung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 48 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethylacetat beendet und dreimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC mit einem Gradienten ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 95/5 \rightarrow 90/10 in 5 min, 90/10 \rightarrow 80/20 in 30 min, dann 80/20 \rightarrow 75/25 in 50 min und dann 75/25 \rightarrow 45/55 in 75 min, 45/55 \rightarrow 30/70 in 80 min, 30/70 \rightarrow 100 % MeCN in 85 min und danach 100 % MeCN 15 min; Fluss 2.5 mL/min) über eine CN-Phase ($t_R = 13$ min) gereinigt. Amid **126** (12.3 mg, 640 μmol , 38 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.10 (m, 1H, H-Ar), 6.05 (m, 1H, H-Ar), 6.03 (m, 1H, H-Ar), 2.74 (dd, $J = 13.2, 7.6$ Hz, 1H, 1_a-H), 2.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, 2-H), 2.41 (dd, $J = 13.2, 7.1$ Hz, 1H, 1_b-H), 1.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 2-CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 182.1 (p, 3-C), 159.1 (p, 5-C), 149.7 (p, 3-C), 143.1 (p, 1-C), 109.3 (s, 6-C), 107.4 (s, 2-C), 101.9 (s, 4-C), 43.5 (s, 2-C), 41.2 (t, 1-C), 18.0 (q, 2-CH_3) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195.1134, gefunden 195.1138; $[\alpha]_D^{23}$: -2.5 ($c = 1.8$, MeOH).

(R)-(2-Acetamidoethyl)-3-(3-amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropanthiol (115)

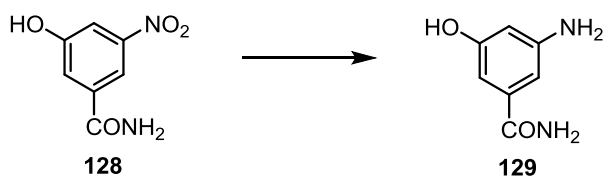


AHBA-Diketid **125** (37.4 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (5 mL) gelöst und mit *N*-Acetylcystein (52.5 mg, 0.44 mmol, 2.3 Äq.), DCC (90.8 mg, 0.44 mmol, 2.3 Äq.) und 4-DMAP (46.9 mg, 0.4 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Stickstoff 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC (Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95/5 \rightarrow 75/25 in 45 min, dann 75/25 \rightarrow 45/55 in 45 min und dann

45/55 → 100 MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) über eine C18-Phase ($t_R = 65$ min) gereinigt. SNAC-Diketid **115** (16.2 mg, 0.05 mmol, 30 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.06 - 6.05 (m, 2H, H-Ar), 5.98 (m, 1H, H-Ar), 3.25 (td, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 2H, 6'-H), 2.96 (td, $J = 13.2, 6.8$ Hz, 2H, 5'-H), 2.89 (dd, $J = 13.6, 7.2$ Hz, 1H, 1a'-H), 2.82 (dd, $J = 12.9, 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.47 (dd, $J = 13.6, 7.2$ Hz, 1H, 1b'-H), 1.90 (s, 3H, 9'-CH₃), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'-CH₃) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 204.4 (p, 3'-C), 173.45 (p, 8'-C), 159.2 (p, 5-C), 149.9 (p, 1-C), 142.2 (p, 3-C), 109.3 (s, 6-C), 107.3 (s, 2-C), 101.9 (s, 4-C), 51.5 (s, 2'-C), 41.2 (t, 1'-C), 40.1 (t, 6'-C), 28.9 (t, 5'-C), 22.5 (q, 9'-CH₃), 17.8 (q, 2'-CH₃) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₁₄H₂₁N₂O₃S [M+H]⁺: 297.1273, gefunden 297.1274; $[\alpha]_D^{21}$: -61.0 ($c = 1.0$, MeOH).

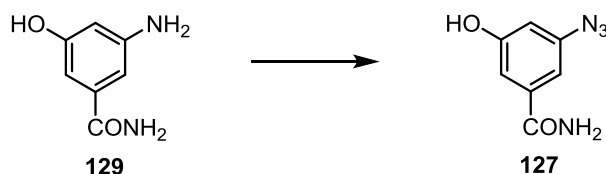
3-Amino-5-hydroxybenzamid (**129**)



Amid **128** (175 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethylacetat (15 mL) gelöst und mit SnCl₂·2H₂O (1.8 g, 4.5 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden unter Reflux erhitzt. Nach Zugabe von NaHCO_{3(aq.)}-Lösung wurde die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc = 100 %) und anschließend mittels semipräp.-HPLC (Gradient H₂O/MeOH 90/10 → 0/100 in 90 min, dann 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) über eine C18-Phase ($t_R = 10$ min) gereinigt. 3-Amino-5-hydroxybenzamid (**129**) (18.8 mg, 0.13 mmol, 15 %) wurde als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.66 (m, 1H, H-Ar), 6.59 (m, 1H, H-Ar), 6.34 (m, 1H, H-Ar) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm) δ 173.3 (p, ArCONH₂), 159.5 (p, C-Ar), 150.4 (p, C-Ar), 136.8 (p, C-Ar), 107.1 (s, C-Ar), 106.4 (s, C-Ar), 105.4 (s, C-Ar) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₇H₉N₂O₂ [M+H]⁺: 153.0664, gefunden 153.0663.

3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**)

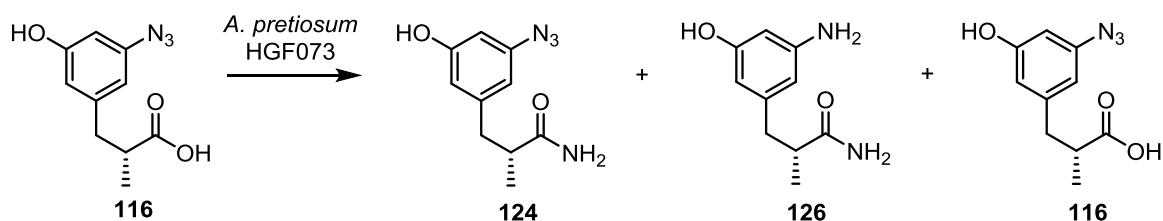


Amin **129** (17 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in HCl_{aq} (2M) (5 mL) gelöst, auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit in H_2O (1 mL) gelöstem NaNO_2 (22.77 mg, 0.33 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach 6 Stunden wurde eine wässrige Lösung von NaN_3 (14.5 mg, 0.2 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und 12 Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 2:1 \rightarrow EtOAc 100 %) lieferte 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**) (13.4 mg, 750 μmol , 68 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 7.97 (s, 1H, CONH_2), 7.39 (s, 1H, CONH_2), 7.08 (m, 1H, H-Ar), 7.04 (m, 1H, H-Ar), 6.59 (m, 1H, H-Ar) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 166.9 (p, ArCONH_2), 158.6 (p, C-Ar), 140.5 (p, C-Ar), 137.2 (p, C-Ar), 111.8 (s, C-Ar), 108.8 (s, C-Ar), 108.3 (s, C-Ar) ppm; **IR** (neat) 3407, 3204, 2106, 1650, 1578 cm^{-1} ; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 179.0569, gefunden 179.0573.

6.3.5 MUTASYNTHESEN MIT DEN VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.2

Verfütterung von Methylpropionsäure **116**



Die Zufütterung von Methylpropionsäure **116** (11.4 mg, 520 μmol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Nach der Reinigung durch semipräp.-HPLC (C-18-RP-Säule; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95/5 \rightarrow 40/60 in 80 min, 40/60 \rightarrow 0/100 in 10 min und dann 100 %

MeOH 10 min; Fluss 2.25 mL/min) wurde Aminomethylpropanamid **126** (0.8 mg, 0.4 μmol , 9 %) und Azidomethylpropionsäure **116** (0.7 mg, 0.3 μmol , 6 %) isoliert.

Amino-methylpropanamid **126**:

semipräp.-HPLC ($t_R = 27$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.10 (m, 1H, H-Ar), 6.05 (m, 1H, H-Ar), 6.03 (m, 1H, H-Ar), 2.74 (dd, $J = 13.2, 7.6$ Hz, 1H, 1_a-H), 2.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, 2-H), 2.41 (dd, $J = 13.2, 7.1$ Hz, 1H, 1_b-H), 1.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 2-CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 182.1 (p, 3-C), 159.1 (p, 5-C), 149.7 (p, 3-C), 143.1 (p, 1-C), 109.3 (s, 6-C), 107.4 (s, 2-C), 101.9 (s, 4-C), 43.5 (s, 2-C), 41.2 (t, 1-C), 18.0 (q, 2-CH_3) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 0.84$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195.1134, gefunden 195.1138.

Azido-methylpropionsäure **116**:

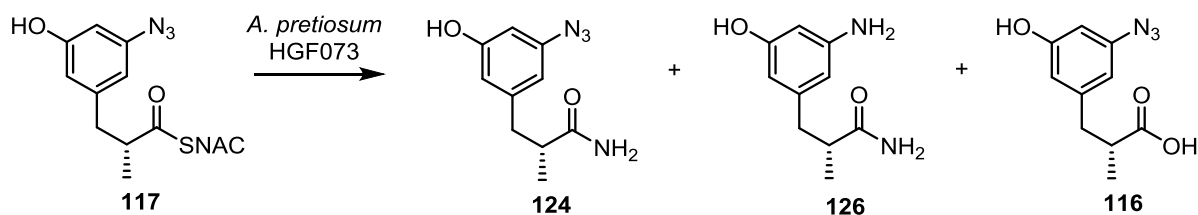
semipräp.-HPLC ($t_R = 48$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , DMSO- $d_6 = 2.50$ ppm): δ 9.68 (s, 1H, OH), 6.43 (m, 1H, H-Ar), 6.38 (m, 1H, H-Ar), 6.31 (m, 1H, H-Ar), 2.79 (dd, $J = 12.6, 6.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 2.59 (dd, $J = 13.8, 7.0$ Hz, 1H, CH), 2.57 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 1.03 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO- d_6 , DMSO- $d_6 = 39.52$ ppm): δ 176.7 (p, ArCO_2H), 158.5 (p, C-Ar), 142.9 (p, C-Ar), 139.9 (p, C-Ar), 113.1 (s, C-Ar), 110.2 (s, C-Ar), 103.7 (s, C-Ar), 40.3 (t, CH_2), 38.7 (s, CH), 16.8 (q, Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.14$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 220.0722, gefunden 220.0719.

Azido-methylpropanamid **124**:

UPLC-MS $t_R = 1.53$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 221.1039, gefunden 221.1029.

Verfütterung von SNAC-Ester **117**



Die Zufütterung von SNAC-Ester **117** (6.8 mg, 190 μmol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die massenspektrometrischen Daten stimmten mit den oben genannten überein.

Amino-methylpropanamid **126**:

UPLC-MS $t_R = 0.84$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195.1134, gefunden 195.1138.

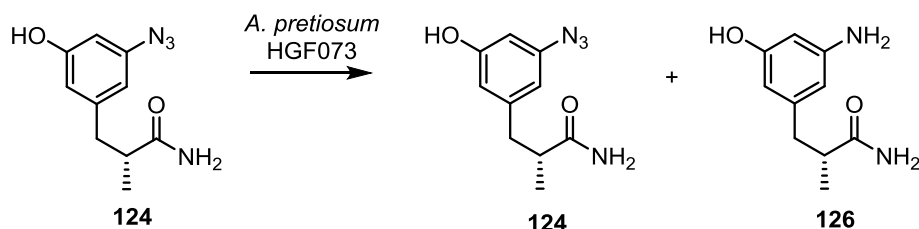
Azido-methylpropionsäure **116**:

UPLC-MS $t_R = 1.14$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 220.0722, gefunden 220.0719.

Azido-methylpropanamid **124**:

UPLC-MS $t_R = 1.53$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 221.1039, gefunden 221.1029.

Verfütterung von (*R*)-3-(3-Azido-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropanamid (**124**)



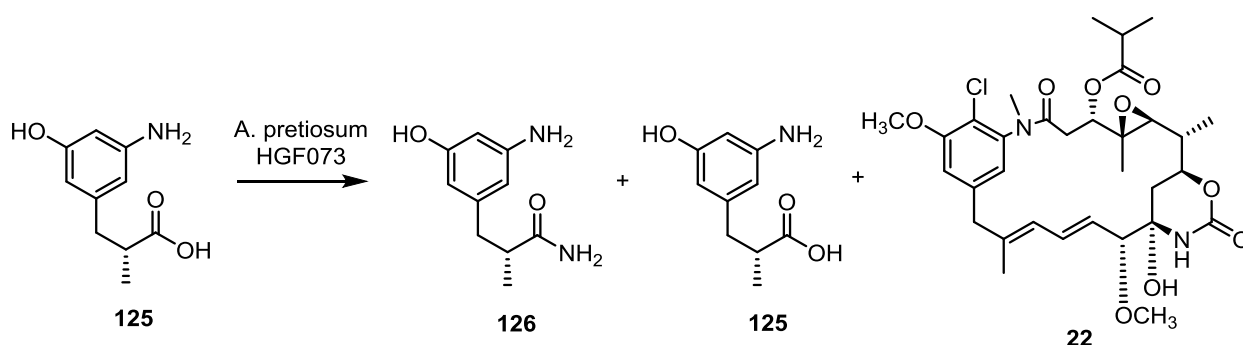
Die Zufütterung von Azido-methylpropanamid **124** (7.2 mg, 32 μmol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Nach der Reinigung durch semipräp.-HPLC (C-18-RP-Säule; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95/5 \rightarrow 40/60 in 80 min, 40/60 \rightarrow 0/100 in 10 min und dann 100 % MeOH 10 min; Fluss 2.25 mL/min) konnten Aminomethylpropanamid **126** (2 mg, 10 μmol , 32 %) und Azidomethylpropanamid **124** (1.3 mg, 6 μmol , 19 %) isoliert werden.

Aminomethylpropanamid 126:semipräp.-HPLC ($t_R = 10$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.10 (m, 1H, H-Ar), 6.05 (m, 1H, H-Ar), 6.03 (m, 1H, H-Ar), 2.74 (dd, $J = 13.2, 7.6$ Hz, 1H, 1_a'-H), 2.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H, 2'-H), 2.41 (dd, $J = 13.2, 7.1$ Hz, 1H, 1_b'-H), 1.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 2'-CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 182.1 (p, 3'-C), 159.1 (p, 5-C), 149.7 (p, 3-C), 143.1 (p, 1-C), 109.3 (s, 6-C), 107.4 (s, 2-C), 101.9 (s, 4-C), 43.5 (s, 2'-C), 41.2 (t, 1'-C), 18.0 (q, 2'-CH_3) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 0.84$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 195.1134, gefunden 195.1129.

Azidomethylpropanamid 124:semipräp.-HPLC ($t_R = 63$ min)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 6.45 (m, 1H, H-Ar), 6.40 (m, 1H, H-Ar), 6.30 (m, 1H, H-Ar), 2.82 (dd, $J = 13.1, 8.1$ Hz, 1H, 1_a'-H), 2.62 (td, $J = 14.2, 6.7$ Hz, 1H, 2'-H), 2.54 (dd, $J = 13.1, 6.7$ Hz, 1H, 1_b'-H), 1.12 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 2'-CH_3) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 181.5 (p, 3'-C), 159.9 (p, 5-C), 144.3 (p, 1-C), 142.2 (p, 3-C), 114.1 (s, 6-C), 111.6 (s, 2-C), 104.8 (s, 4-C), 43.4 (s, 2'-C), 40.9 (t, 1'-C), 18.2 (q, 2'-CH_3) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.21$ min; **HRMS [ESI]** m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 221.1039, gefunden 221.1030.

Verfütterung von (*R*)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropansäure (125)

Die Zufütterung von AHBA-methylpropionsäure **125** (9 mg, 46 μmol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Der Rohextrakt wurde nur massenspektrometrisch untersucht, da alle Verbindungen bekannt waren und bereits oben beschrieben wurden.

Aminomethylpropanamid **126**:

UPLC-MS $t_R = 0.85$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{15}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 195.1134, gefunden 195.1140.

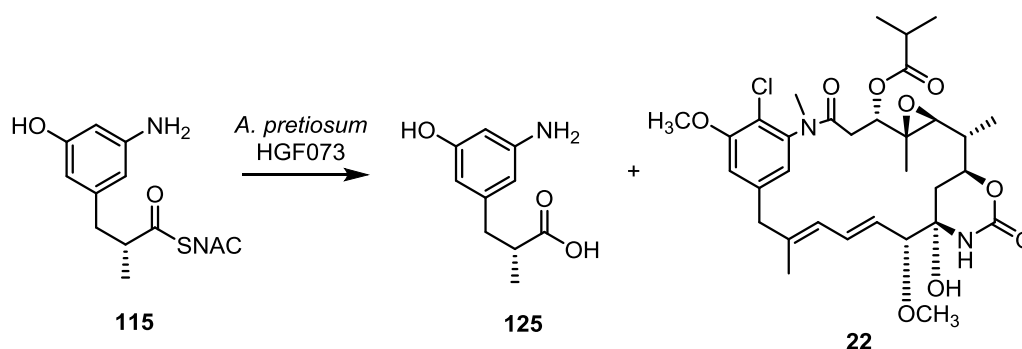
AHBA-methylpropionsäure **125**:

UPLC-MS $t_R = 1.16$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{14}N_1O_3$ $[M+H]^+$: 196.0974, gefunden 196.0974.

Ansamitocin P-3 (**22**):

UPLC-MS $t_R = 2.48$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{32}H_{44}N_2O_9Cl$ $[M+H]^+$: 635.2735, gefunden 635.2695.

Verfütterung von (R)-S-(2-Acetamidoethyl)-3-(3-amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropanthiol (115**)**



Die Zufütterung von AHBA-SNAC-Ester **115** (5.8 mg, 20 μ mol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die massenspektrometrische Daten stimmten mit den oben benannten Verbindungen überein.

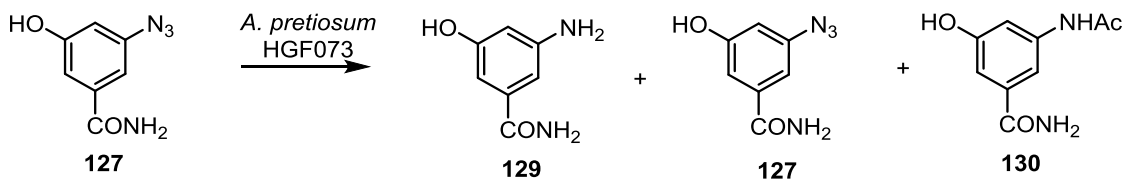
AHBA-methylpropionsäure **125**:

UPLC-MS $t_R = 1.16$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{14}N_1O_3$ $[M+H]^+$: 196.0974, gefunden 196.0974.

Ansamitocin P-3 (**22**):

UPLC-MS $t_R = 2.48$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{32}H_{44}N_2O_9Cl$ $[M+H]^+$: 635.2735, gefunden 635.2695.

Verfütterung von 3-Azido-5-hydroxybenzamid (**127**)



Die Zufütterung von Methylpropionsäure **127** (11.4 mg, 52 μ mol) erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Nach der Reinigung mittels semipräp.-HPLC (CN-RP-Säule; Gradient H₂O/MeCN 95/5 \rightarrow 90/10 in 20 min, 70/30 \rightarrow 50/50 in 15 min und dann 50/50 \rightarrow 100 % MeCN 10 min und 100 % MeCN 20 min halten; Fluss 2.5 mL/min) wurde Acetat **130** (1.0 mg, 5.2 μ mol, 8 %) und Aminoamid **129** (8.5 mg, 56 μ mol, 83 %) isoliert, das Edukt war in Spuren vorhanden.

Aminoamid **129**:

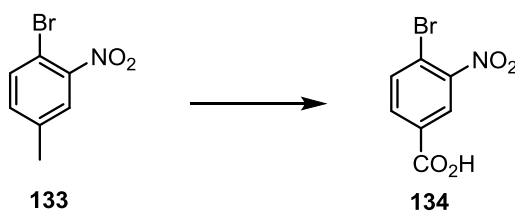
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 6.66 (m, 1H, H-Ar), 6.59 (m, 1H, H-Ar), 6.34 (m, 1H, H-Ar) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm) δ 173.3 (p, ArCONH₂), 159.5 (p, C-Ar), 150.4 (p, C-Ar), 136.8 (p, C-Ar), 107.1 (s, C-Ar), 106.4 (s, C-Ar), 105.4 (s, C-Ar) ppm; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₇H₉N₂O₂ [M+H]⁺: 153.0664, gefunden 153.0663.

Acetat **130**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.40 (m, 1H, H-Ar), 7.32 (m, 1H, H-Ar), 6.99 (m, 1H, H-Ar), 2.12 (s, 3H, NHAc) ppm; UPLC-MS t_R = 0.85 min; HRMS [ESI] m/z für C₉H₁₁N₂O₃ [M+H]⁺: ber. 195.0770 gef. 195.0761.

6.3.6 SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.3

4-Brom-3-nitrobenzoesäure (**134**)

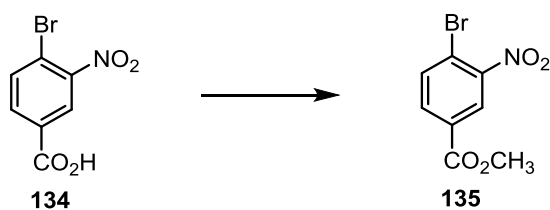


4-Brom-3-nitrotoluol (**133**) (10.0 g, 46.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde zu einer siedenden Lösung aus Na₂CO₃ (2.5 g, 23.1 mmol, 0.5 Äq.) in H₂O (250 mL) gegeben. Anschließend wurde diese

portionsweise mit KMnO_4 (21.9 g, 138.9 mmol, 3.0 Äq.) versetzt und 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf $\text{pH} = 5$ eingestellt und weitere 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde der entstandene Braunstein über Kieselgur abfiltriert, das Filtrat mit NaHCO_3 -Lösung leicht basisch eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. 4-Brom-3-nitrotoluol (**133**) (4.91 g, 22.7 mmol, 50 % reisoliert) wurde als gelben Feststoff reisoliert. Die wässrige Phase wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert ($\text{pH} = 2$) und dreimal mit Ethylacetat extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. 4-Brom-3-nitrobenzoesäure (**134**) (2.2 g, 8.8 mmol, 19 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 13.80 (s, 1H, COOH), 8.43 (s, 1H, H-Ar), 8.05 (s, 2H, H-Ar) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 165.0 (p, COOH), 149.7 (p, C-Ar), 135.4 (s, C-Ar), 133.8 (s, C-Ar), 131.7 (p, C-Ar), 125.9 (s, C-Ar), 118.1 (p, C-Ar) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_7\text{H}_3\text{BrNO}_4$ [M-H]: 243.9253, gefunden 243.9245; **Smp.**: 199 °C.

4-Brom-3-nitrobenzoesäuremethylester (**135**)

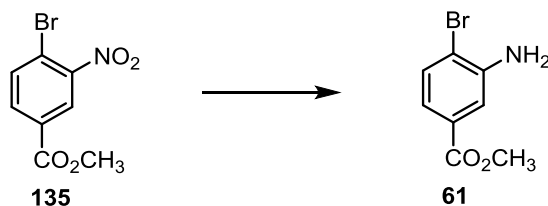


4-Brom-3-nitrobenzoesäure (**134**) (1.8 g, 7.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (50 mL) gelöst und mit Acetylchlorid (0.7 mL, 9.5 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden unter Reflux erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf Eis hydrolysiert und mit $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ -Lösung auf $\text{pH} = 8$ eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige viermal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. 4-Brom-3-nitrobenzoesäuremethylester (**135**) (1.9 g, 7.3 mmol, 98 %) wurde als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 8.46 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-Ar), 8.07 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, H-Ar), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-Ar), 3.97 (s, 3H, CO_2Me) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 164.5 (p, ArCOMe), 150.0 (p, C-Ar), 135.6 (s, C-Ar), 133.6 (s, C-Ar), 130.9 (p, C-Ar), 126.6 (s, C-Ar), 119.7 (p, C-Ar), 53.1 (q, CO_2Me) ppm; **HRMS** [EI] m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 258.9480, gefunden 258.9478; **Smp.**: 105 °C.

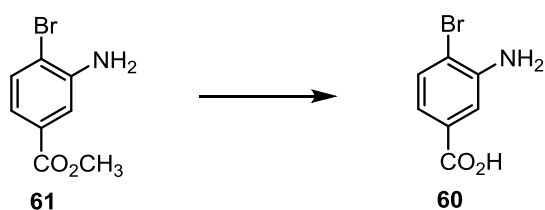
4-Brom-3-aminobenzoensäuremethylester (61)



Bromid **135** (4.5 g, 17.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethylacetat (150 mL) gelöst und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (19.4 g, 86.2 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden refluxiert. Nach Zugabe von $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ -Lösung wurde die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1) lieferte 3-Amino-4-brombenzoensäuremethylester (**61**) (3.49 g, 15.3 mmol, 89 %) als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 7.47 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-Ar), 7.41 (d, $J = 2.04$ Hz, 1H, H-Ar), 7.01 (dd, $J = 2.04, 8.3$ Hz, 1H, H-Ar), 5.63 (s, 2H, NH_2), 3.80 (s, 3H, CO_2CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 166.1 (p, CO_2CH_3), 146.2 (p, C-Ar), 132.6 (s, C-Ar), 129.6 (p, C-Ar), 117.4 (s, C-Ar), 115.5 (s, C-Ar), 112.3 (p, C-Ar), 52.1 (q, CO_2CH_3) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_9\text{BrNO}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^+$: 229.9817, gefunden 229.9818; **Smp.**: 119 °C.

4-Brom-3-aminobenzoensäure (60)

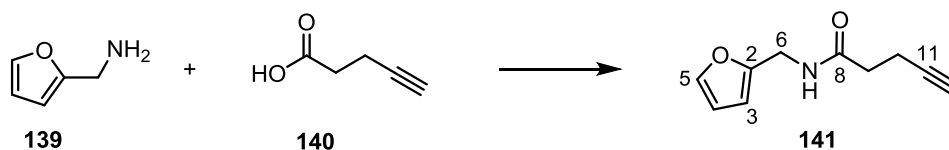


Methylester **61** (3.4 g, 14.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (150 mL) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (1M) (75 mL, 74.6 mmol, 5.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung 24 Stunden unter

Reflux erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis hydrolysiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit HCl (1M) auf pH = 2 eingestellt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Brombenzoesäure **60** (3.2 g, 14.5 mmol, 97 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 2.50 ppm): δ 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-Ar), 7.39 (d, *J* = 2.04 Hz, 1H, H-Ar), 7.00 (dd, *J* = 2.04, 8.3 Hz, 1H, H-Ar), 5.56 (bs, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 167.2 (p, CO₂CH₃), 145.9 (p, C-Ar), 132.3 (s, C-Ar), 130.8 (p, C-Ar), 117.7 (s, C-Ar), 115.8 (s, C-Ar), 111.9 (p, C-Ar) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₇H₅BrNO₂ [M-H]⁻: 213.9504, gefunden 213.9510; **Smp.**: 202 °C.

***N*-(Furan-2-ylmethyl)pent-4-ynamid (141)**

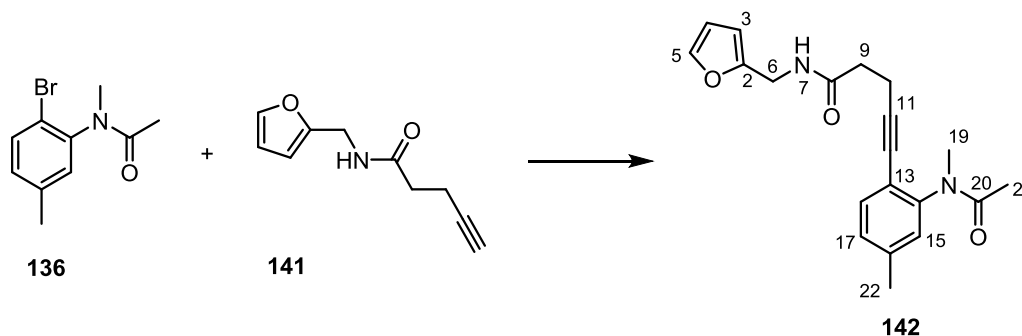


Zu einer Lösung von Pentynsäure **140** (1.0 g, 10.2 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (100 mL) wurden unter Stickstoffatmosphäre EDC·HCl (2.9 g, 15.3 mmol, 1.5 Äq.) und HOBT (2.1 g, 15.3 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Nach der Zugabe von Furfurylamin **139** (1.4 mL, 15.3 mmol, 1.5 Äq.) wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und langsam frisch destilliertes Triethylamin (2.1 mL, 15.3 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und 20 Stunden gerührt. Nach der Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1) lieferte Amid **141** (1.8 g, 9.4 mmol, 92 %) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.35 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 5-H), 6.32 (dd, *J* = 1.5, 3.2 Hz, 1H, 4-H), 6.23 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, 3-H), 5.99 (s, 1H, NH), 4.45 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, 6-H), 2.54 (td, *J* = 2.2, 7.1 Hz, 2H, 10-H), 2.42 (dd, *J* = 7.1 Hz, 2H, 9-H), 1.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, 12-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 170.8 (p,

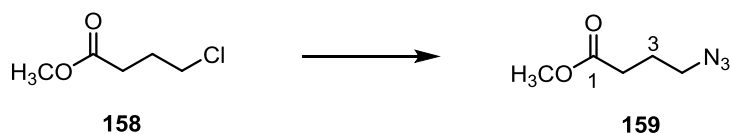
8-C), 151.3 (s, 5-C), 142.3 (p, 2-C), 110.6 (s, 3-C), 107.6 (s, 4-C), 82.9 (p, 11-C), 69.5 (s, 12-C), 36.7 (t, 6-C), 35.4 (t, 9-C), 14.9 (t, 10-C) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{10}H_{11}N_1O_2Na$ [M+Na]: 200.0687, gefunden 200.0684.

***N*-(Furan-2-ylmethyl)-5-[4-methyl-2-(*N*-methylacetamido)-phenyl]- 4-pentylamid (142)**



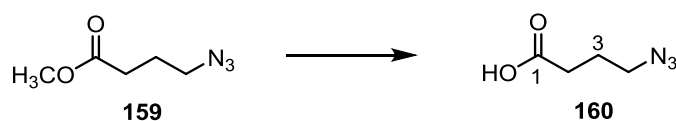
Alkin **141** (16.2 mg, 91 μ mol, 1.1 Äq.) wurde in Diethylamin (1.5 mL) gelöst, mit einer Mikrospatelspitze CuI versetzt und 5 Minuten unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde Acetamid **136** (20 mg, 83 μ mol, 1 Äq.) und eine Spatelspitze von Pd(Pt-Bu₃)₂ zur Reaktionsmischung zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Wasser wurde die Reaktion gestoppt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 \rightarrow 2:1) lieferte das Kupplungsprodukt **142** (7 mg, 0.02 mmol, 25 %) als farbloses Öl und das Bromacetamid **136** (15 mg, 0.06 mmol, 75 %) wurde zurückgewonnen.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.32 (m, 1H, 5-H), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 18-H), 7.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 17-H), 6.99 (s, 1H, 15-H), 6.57 (bs, 1H, NH), 6.29 (dd, J = 2.0, 3.0 Hz, 1H, 4-H), 6.25 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 3-H), 4.46 (dd, J = 2.0, 5.5 Hz, 2H, 6-H), 3.13 (s, 3H, 19-H), 2.76 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 9-H), 2.44 (td, J = 2.2, 6.8 Hz, 2H, 10-H), 2.36 (s, 3H, 22-H), 1.80 (s, 3H, 21-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 171.8 (p, 20-C), 171.2 (p, 8-C), 151.5 (p, 2-C), 145.7 (p, 13-C), 142.2 (p, 14-C), 139.9 (p, 5-C), 132.7 (s, 18-C), 129.0 (s, 17-C), 128.2 (s, 15-C), 119.9 (p, 16-C), 110.6 (s, 4-C), 107.6 (s, 3-C), 93.5 (p, 11-C), 82.7 (p, 12-C), 36.7 (t, 6-C), 36.2 (q, 19-C), 35.7 (t, 10-C), 22.2 (q, 21-C), 21.4 (q, 22-C), 16.1 (t, 9-C) ppm; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₂₀H₂₃N₂O₃ [M+H]⁺: 339.1709, gefunden 339.1711.

4-Azido-*n*-buttersäuremethylester (159)

Chlorbuttersäuremethylester **158** (4.5 mL, 36.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (3 mL) gelöst und mit NaN_3 (3.1 g, 47.6 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Methylester **159** (4.53 g, 31.7 mmol, 87 %) wurde weiter eingesetzt. *Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.*¹¹⁵

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 3.61 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.53 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 2-H), 2.39 (m, 2H, 2-H), 1.92 (m, 2H, 4-H) ppm.

4-Azido-*n*-buttersäure (160)

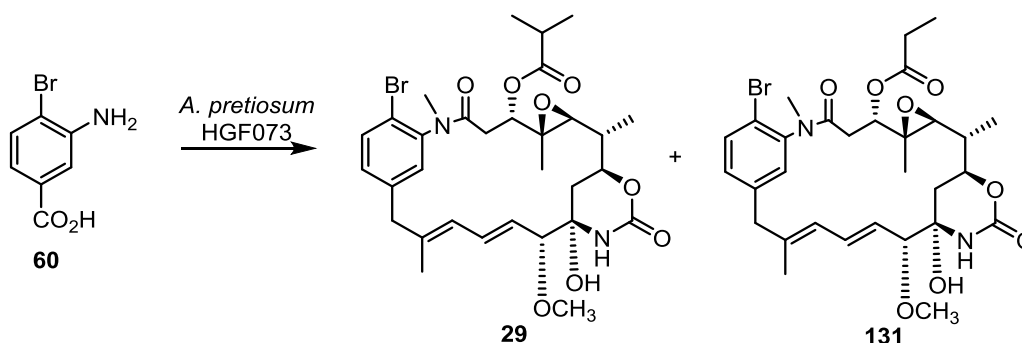
Methylester **159** (5.4 g, 38.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (1M) (60 mL, 60 mmol, 1.6 Äq.) wurde die Reaktionslösung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit HCl (1M) auf $\text{pH} = 3$ eingestellt und anschließend dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Azidobuttersäure **160** (3.4 g, 26.4 mmol, 87 %) wurde anschließend weiter eingesetzt. *Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.*¹¹⁵

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 4.22 (m, 1H, 2- H_a), 4.03 (m, 1H, 2- H_b), 2.44 (td, $J = 2.2, 7.2$ Hz, 2H, 3-H), 1.87 (m, 2H, 4-H) ppm.

¹¹⁵ B. Carboni, M. Vaultier, R. Carrie, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1799-1810.

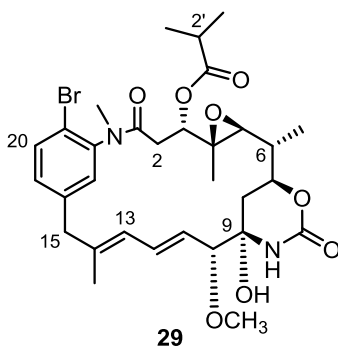
6.3.7 MUTASYNTHETISCHE DARSTELLUNG VON ANSAMITOCIN-DERIVATEN AUS KAPITEL 4.3

Verfütterung von 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**)



Die mutasynthetische Darstellung von 19-Bromansamitocin-Derivaten **29** und **131** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll mit *A. pretiosum* HGF073 (Kapitel 6.2). Die Zufütterung von 3-Amino-4-brombenzoesäure (**60**) (1. 324.1 mg, 1.5 mmol, gelöst in 2*12 mL DMSO:H₂O = 1:1; 2. 648.2 mg, 3.0 mmol, gelöst in 4*12 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu (1. 1000 mL; 2. 2000 mL) Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (PE:EtOAc = 2:1 → 100 % EtOAc) filtriert und über Sephadex (LH20) mit Methanol chromatographiert. Nach Reinigung durch semipräp.-HPLC (TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, Säule: 250 mm*8 mm, Vorsäule 40 mm*8 mm; Gradient H₂O:MeOH = 80:20 → 100 % MeOH in 90 min, dann 10 min 100 % MeOH, Flussrate 2.25 mL/min) konnten zwei Ansamitocin-Derivate **29** (25 mg, 39 µmol, 0.85 %) und **131** (3 mg, 3.2 µmol, 0.07 %) isoliert werden.

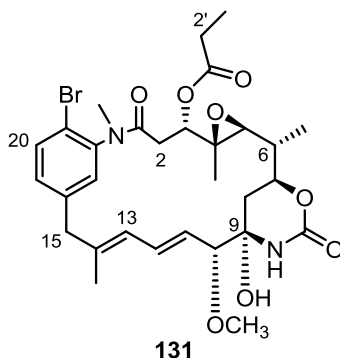
19-Brom-20-desmethoxyansamitocin P-3 (**29**)



¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 20-H), 7.35 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 17-H), 7.32 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, 21-H), 6.62 (dd, *J* = 15.3, 10.7 Hz, 1H, 12-H), 6.27 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, 13-H), 5.52 (dd, *J* = 15.3, 8.7 Hz, 1H, 11-H),

4.70 (dd, $J = 12.0, 3.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.20 (ddd, $J = 11.9, 10.5, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 3.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, 10-H), 3.54 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.29 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, NMe), 2.82 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.73 (sep, $J = 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 2.57 (dd, $J = 13.7, 12.3$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.16 (dd, $J = 13.7, 3.2$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.57 (m, 2H, 8-H), 1.49 (m, 1H, 6-H), 1.29 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, 6-Me), 1.23 (t, $J = 5.5$ Hz, 6H, 2'-Me), 0.83 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.6 (p, C-1'), 171.3 (p, C-1), 153.8 (p, NHCOO), 143.7 (p, C-16), 143.6 (p, C-18), 141.2 (p, C-14), 134.7 (s, C-12), 134.2 (p, C-19), 132.6 (s, C-21), 131.9 (s, C-17), 129.5 (s, C-11), 125.9 (s, C-20), 121.6 (s, C-13), 89.9 (s, C-10), 81.8 (p, C-9), 77.9 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OMe), 46.9 (t, C-15), 39.6 (s, C-6), 37.6 (t, C-8), 36.3 (q, NMe), 35.0 (s, C-2'), 33.8 (t, C-2), 20.8 (q, 2'-Me_a), 18.4 (q, 2'-Me_b), 15.7 (q, 14-Me), 14.8 (q, 6-Me), 12.5 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.58$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₃₁H₄₂BrN₂O₈ [M+H]⁺: 649.212, gefunden 649.2126.

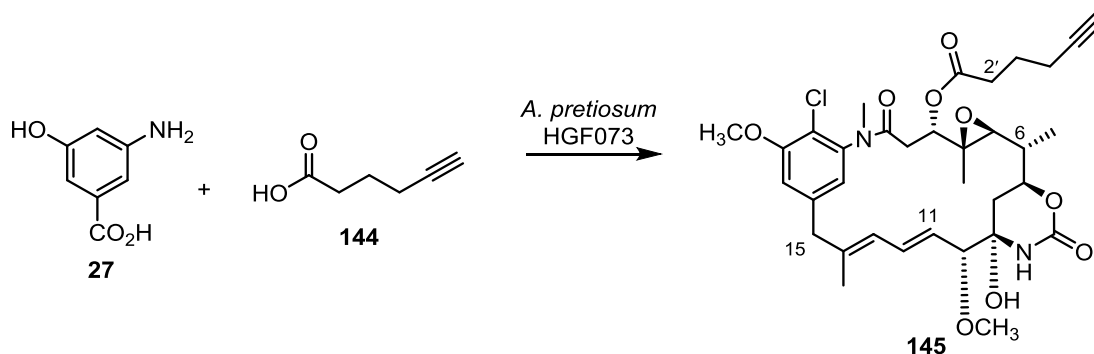
19-Brom-20-desmethoxyansamitocin P-2 (131)



¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 20-H), 7.31 (m, 2H, 17-H, 21-H), 6.61 (dd, $J = 15.3, 10.7$ Hz, 1H, 12-H), 6.29 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, 13-H), 5.55 (dd, $J = 15.3, 8.7$ Hz, 1H, 11-H), 4.75 (dd, $J = 12.0, 3.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.19 (td, $J = 10.5, 3.7$ Hz, 1H, 7-H), 3.58 (m, 1H, 10-H), 3.55 (m, 1H, 15-H_a), 3.48 (m, 1H, 15-H_b), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.16 (s, 3H, NMe), 2.77 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.61-2.48 (m, 2H, 2'-H, 2-H_a), 2.15 (dd, $J = 13.9, 2.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-Me), 1.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, 2'-CH₂), 1.13 (m, 3H, 6-Me), 0.83 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (p, C-1'), 171.5 (p, C-1), 155.4 (p, NHCOO), 143.7 (p, C-16), 143.5 (p, C-18), 141.0 (p, C-14), 134.6 (s, C-12), 133.9 (s, C-20), 132.6 (s, C-21), 132.1 (s, C-17), 129.9 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 121.6 (p, C-19), 89.7 (s, C-10), 81.8 (p,

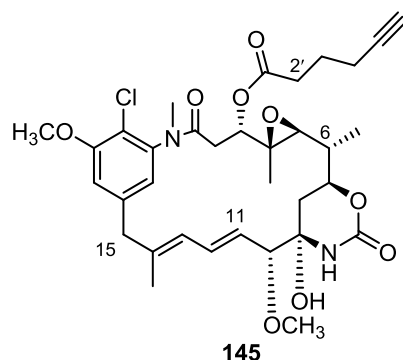
C-9), 77.9 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 68.1 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 56.9 (q, 10-OMe), 46.9 (t, C-15), 39.2 (s, C-6), 37.6 (t, C-8), 36.3 (q, NMe), 33.8 (t, C-2), 28.2 (t, C-2'), 15.7 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.2 (q, 4-Me), 9.1 (q, C-3'), ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.29$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{30}H_{40}BrN_2O_8$ $[M+H]^+$: 635.1968, gefunden 635.1958.

Verfütterung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**27**) und Hexensäure **144**



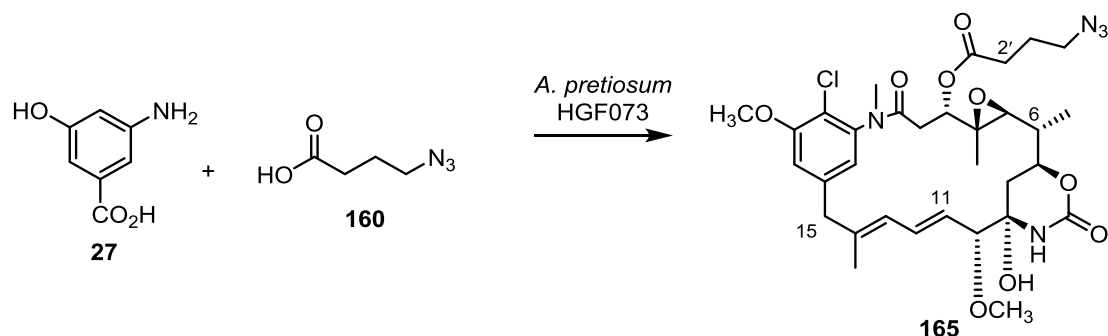
Die mutasynthetische Darstellung von 3-*O*-(Hex-5-in-oyl)maytansinol (**145**) erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung der Mischung aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**27**) und 5-Hexynsäure (**144**) (**AHBA**: 193 mg, 1.25 mmol/L; **Säure**: 1.4 g, 12.5 mmol/L, gelöst in 20*2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu 1 L Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc = 100 %) filtriert und über Sephadex (LH20) mit Methanol chromatographiert.

Nach Reinigung mittels präp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O:MeOH = 95/5 → 90/10 in 5 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min und 10 min halten; Fluss: 15 mL/min; $t_R = 67$ min) wurde 3-*O*-(Hex-5-in-oyl)maytansinol (**145**) (14 mg, 20.6 μ mol, 14 mg/L) als farbloser Schaum isoliert.

3-O-(Hex-5-in-oyl)maytansinol (145)

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.15 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 21-H), 6.96 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 17-H), 6.63 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.32 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.61 (dd, *J* = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.80 (dd, *J* = 11.9, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.19 (td, *J* = 2.6, 10.9 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.55 (m, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.23 (m, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, N-CH₃), 2.76 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.69 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.59 (dd, *J* = 12.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.39 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, 6'-H), 2.36-2.23 (m, 2H, 4'-H), 2.14 (dd, *J* = 12.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.87 (m, 2H, 3'-H), 1.72 (s, 3H, 14-CH₃), 1.58-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.88 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.4 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 143.0 (p, C-18), 142.7 (p, C-16), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.9 (s, C-11), 126.0 (s, C-13), 123.3 (s, C-17), 119.8 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 89.7 (s, C-10), 84.7 (p, C-5'), 81.9 (p, C-9), 78.1 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 70.9 (s, C-6'), 67.9 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 56.9 (q, 10-OCH₃), 47.5 (t, C-15), 39.2 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 33.8 (s, C-2'; t, C-2), 24.9 (t, C-3'), 18.4 (t, C-4'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** *t*_R = 2.50 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₃₄H₄₃N₂O₉ClNa [M+Na]: 681.2555, gefunden 681.2539.

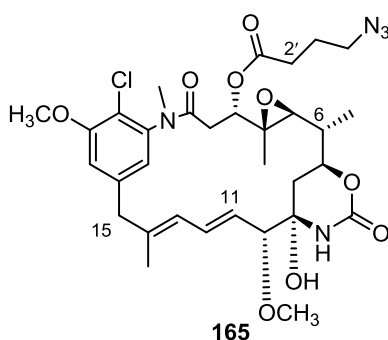
Verfütterung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (27) und Azidobuttersäure 160



Die mutasynthetische Darstellung von 3-*O*-(Azidobutyryl)maytansinol (**165**) erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung der Mischung aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**27**) und 4-Azidobuttersäure (**160**) (AHBA: 2*195 mg, 1.25 mmol/L; Säure: 2*1.61 g, 12.5 mmol/L, gelöst in 40*2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe zu 2 L Fermentationsmedium. Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc = 100 %) filtriert und über Sephadex (LH20) mit Methanol chromatographiert.

Nach Reinigung durch präp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O:MeOH = 95/5 → 90/10 in 5 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % CH₃OH in 10 min und 10 min halten; Fluss: 15 mL/min; t_R = 65.5 min) wurde 3-*O*-(Azidobutyryl)maytansinol (**165**) (24 mg, 35.5 μmol, 12 mg/L) als farbloser Schaum isoliert.

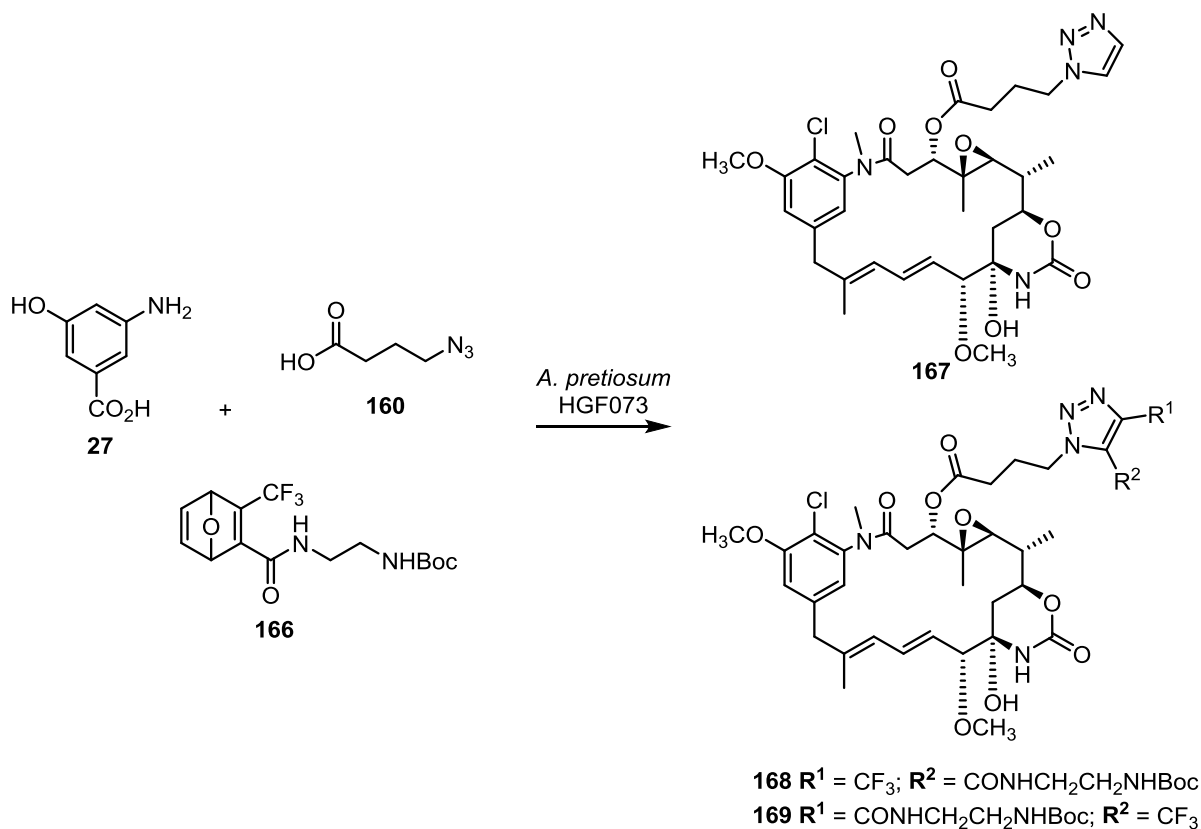
3-*O*-(Azidobutyryl)maytansinol (165)



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.15 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 21-H), 6.91 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 17-H), 6.63 (dd, J = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.29 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.60 (dd, J = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.19 (td, J = 2.6, 10.9 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.59 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.55 (m, 1H, 15-H_a), 3.44 (p, J = 6.6 Hz, 2H, 4'-H), 3.43 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.37 (m, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, N-CH₃), 2.76 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.68 (dd, J = 12.9 Hz, 1H,

2-H_a), 2.63-2.56 (m, 2H, 2'-H), 2.14 (dd, $J = 2.6, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.93 (m, 2H, 3'-H), 1.73 (s, 3H, 14-CH₃), 1.59-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.88 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.1 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 143.0 (p, C-18), 142.7 (p, C-16), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.9 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.1 (s, C-17), 119.8 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 89.6 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 78.2 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 56.9 (q, 10-OCH₃), 51.7 (t, C-4'), 47.6 (t, C-15), 39.2 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 33.8 (t, C-2), 32.1 (t, C-2'), 25.2 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS $t_R = 2.56$ min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₃₂H₄₃N₅O₉Cl [M+H]⁺: 676.2749, gefunden 676.2740.

Verfütterung von AHBA 27, Azidobuttersäure 160 und Oxanorbornadien 166



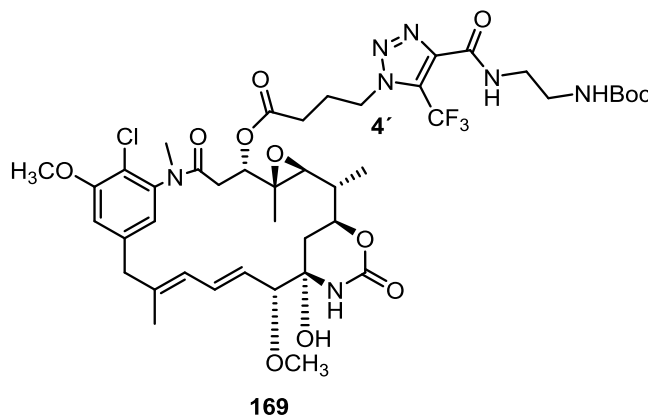
Die mutasynthetische Darstellung von Triazol **168** und seinem Regioisomer **169** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung der Mischung aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**27**) und Azidobuttersäure (**160**) (AHBA: 10 mg, 1.25 mmol/L; Säure: 81 mg, 0.63 mmol, 12.5 mmol/L, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen nach 48, 72 und 96 Stunden zu 50 mL

Fermentationsmedium. Die Zugabe von Oxanorbornadien **166** (661.4 mg, 1.9 mmol, 3.0 Äq.) erfolgte in einer Portion nach 120 Stunden zu 50 mL Fermentationsmedium.

Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc = 100 %) filtriert. Nach Reinigung mittels präp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O:MeOH = 95/5 → 90/10 in 5 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min und 10 min halten; Fluss: 15 mL/min; t_R = 70 min) und anschließende Reinigung durch semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 54 min und t_R = 55.5 min) wurde Triazol **169** (0.3 mg, 0.31 μmol, 6 mg/L) und Triazol **168** (0.4 mg, 0.42 μmol, 8 mg/L) als farbloser Schaum isoliert.

Die Substanzmenge war zu gering um ¹³C-NMR-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die Verbindungen parallel synthetisiert. Die analytischen Daten der isolierten Derivate stimmten mit den synthetisierten Triazolderivaten überein. Für das Triazol **167** wurden die Kohlenstoffsignale aus 2D-Korrelationspektren indirekt bestimmt.

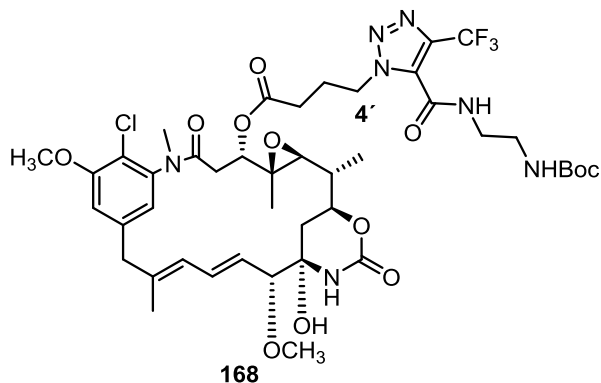
cis-Triazol **169**



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.14 (d, *J* = 1.65 Hz, 1H, 21-H), 6.80 (d, *J* = 1.65 Hz, 1H, 17-H), 6.60 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.19 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.49 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 4.88 (*unter dem H₂O-Signal*, m, 1H, 4'-H_a), 4.79-4.61 (m, 2H, 3-H, 4'-H_b), 4.20-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.57 (m, 1H, 10-H), 3.56 (m, 1H, 15-H_a), 3.47-3.44 (m, 1H, 9'-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.33 (*unter dem MeOD-Signal*, m, 1H, 9'-H_b), 3.32 (m, 1H, 15-H_b), 3.24 (m, 2H, 10''-H), 3.19 (s, 3H, N-CH₃), 2.79-2.75 (m, 2H, 2'-H), 2.73 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.56 (dd, *J* = 12.1, 13.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.53-2.46 (m, 1H, 2'-H_b), 2.29-2.20 (m, 2H, 3'-H), 2.13 (dd,

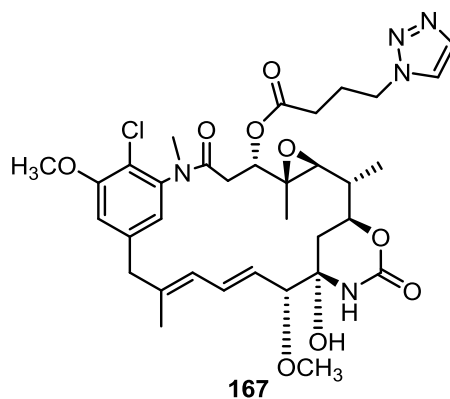
$J = 12.1, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.41 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.87 (s, 3H, 4-CH₃) ppm.

trans-Triazol 168



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.14 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 21-H), 6.86 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.56 (dd, $J = 11.1, 15.4$ Hz, 1H, 12-H), 6.11 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.22 (dd, $J = 8.9, 15.4$ Hz, 1H, 11-H), 4.76 (dd, $J = 2.8, 11.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.65-4.57 (m, 2H, 4'-H), 4.20-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.58 (m, 1H, 15-H_a), 3.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.28 (m, 1H, 15-H_b), 3.25 (unter dem MeOD-Signal, m, 2H, 9'-H), 3.16 (s, 3H, N-CH₃), 2.77 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.58 (m, 2H, 2'-H), 2.56 (dd, $J = 12.1, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.32-2.23 (m, 2H, 3'-H), 2.13 (dd, $J = 2.8, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.44 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.65$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₄₃H₅₈N₇O₁₂F₃Cl [M+H]⁺: 956.3784, gefunden 956.3780.

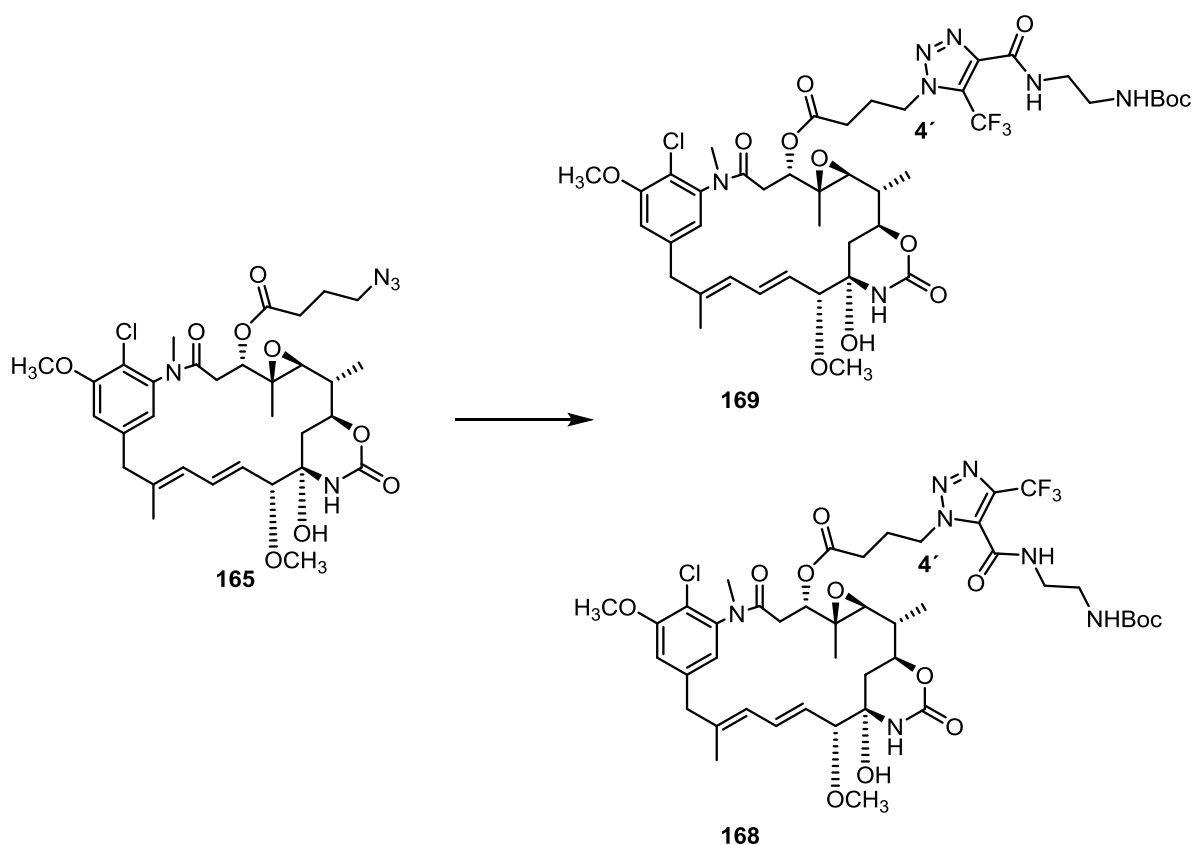
Triazol 167



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 8.07 (d, $J = 0.85$ Hz, 6'-H), 7.78 (d, $J = 0.85$ Hz, 7'-H), 7.14 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 21-H), 6.76 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 17-H),

6.57 (dd, $J = 11.0, 15.3$ Hz, 1H, 12-H), 6.09 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.36 (dd, $J = 8.9, 15.3$ Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, $J = 2.8, 11.9$ Hz, 1H, 3-H), 4.57 (m, 2H, 4'-H), 4.20-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (m, 1H, 15-H_a), 3.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.37 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.31 (*unter dem MeOD-Signal*, m, 1H, 15-H_b), 3.14 (s, 3H, N-CH₃), 2.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.64 (dt, $J = 7.7, 16.7$ Hz, 1H, 2'-H_a), 2.56 (dd, $J = 12.1, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.43 (dt, $J = 7.7, 16.7$ Hz, 1H, 2'-H_b), 2.24 (qu, $J = 7.15$ Hz, 2H, 3'-H), 2.13 (dd, $J = 2.8, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.23 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 171.3 (p, C-1'), 170.3 (p, C-1), 158.6 (p, C-7'), 157.5 (p, C-20), 155.4 (p, OCONH), 143.1 (p, C-16), 142.8 (p, C-18), 141.1 (p, C-14), 132.3 (s, C-12), 128.4 (s, C-11), 124.5 (s, C-13), 121.8 (s, C-17), 123.9 (s, C-6'), 119.7 (p, C-19), 113.7 (s, C-21), 89.5 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 78.5 (s, C-3), 75.8 (s, C-7), 67.8 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 48.9 (t, C-4'), 45.7 (t, C-15), 37.6 (s, C-6), 35.9 (t, C-8), 34.9 (q, N-CH₃), 32.0 (t, C-2), 30.8 (t, C-2'), 25.8 (t, C-3'), 14.4 (q, 14-CH₃), 13.9 (q, 6-CH₃), 11.3 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS $t_R = 2.90$ min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₃₄H₄₅N₅O₉Cl [M+H]⁺: 702.2906, gefunden 702.2877.

Trifluormethyltriazole



Azidoansamitocin **165** (3 mg, 4.44 μmol, 1 Äq.) wurde in Methanol (1 mL) gelöst und mit

einer kleine Spatelspitze Oxanorbornadien **166** versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min) gereinigt. Triazolderivat **169** (1.6 mg, 1.73 μmol, 39 %) wurde als farbloser Schaum und Triazolderivat **168** (1.5 mg, 1.55 μmol, 35 %) als farbloser Schaum isoliert.

cis-Triazol **169**:

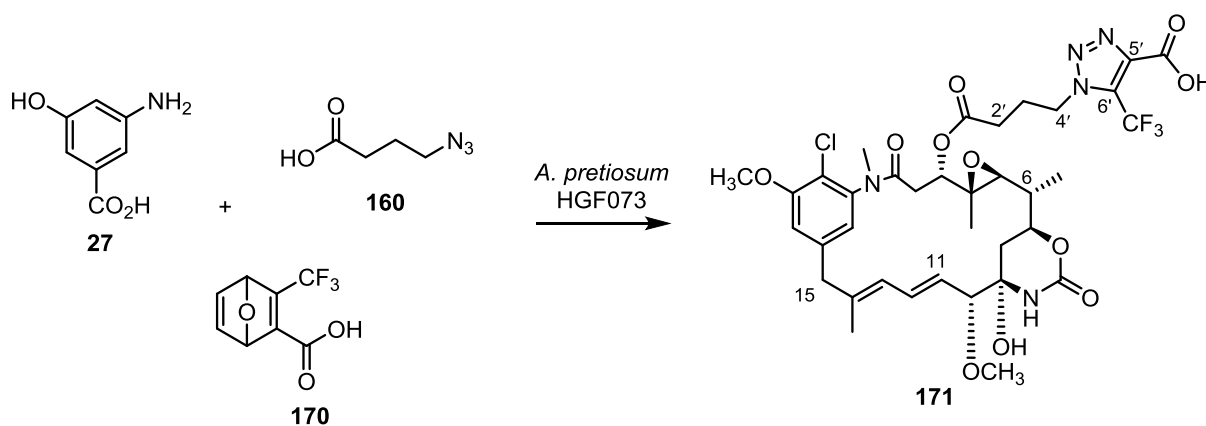
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.14 (d, *J* = 1.65 Hz, 1H, 21-H), 6.80 (d, *J* = 1.65 Hz, 1H, 17-H), 6.60 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.19 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.49 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 4.88 (*unter dem H₂O-Signal*, m, 1H, 4⁻-H_a), 4.79-4.61 (m, 2H, 3-H, 4⁻-H_b), 4.20-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.57 (m, 1H, 10-H), 3.56 (m, 1H, 15-H_a), 3.47-3.44 (m, 1H, 9⁻-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.33 (*unter dem MeOD-Signal*, m, 1H, 9⁻-H_b), 3.32 (m, 1H, 15-H_b), 3.24 (m, 2H, 10⁻-H), 3.19 (s, 3H, N-CH₃), 2.79-2.75 (m, 2H, 2⁻-H), 2.73 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.56 (dd, *J* = 12.1, 13.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.53-2.46 (m, 1H, 2⁻-H_b), 2.29-2.20 (m, 2H, 3⁻-H), 2.13 (dd, *J* = 12.1, 13.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.41 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.22 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.87 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.6 (p, C-12[^]), 171.3 (p, C-1[^]), 170.3 (p, C-1), 163.1 (p, C-5[^]), 160.9 (p, C-7[^]), 158.6 (p, C-6[^]), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 143.1 (p, C-16), 142.7 (p, C-18), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.9 (s, C-11), 127.3 (p, CF₃), 125.9 (s, C-13), 123.2 (s, C-17), 119.7 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 89.5 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 80.2 (p, C-Boc), 78.3 (s, C-3), 75.8 (s, C-7), 67.8 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 52.9 (t, C-4[^]), 47.5 (t, C-15), 40.7 (t, C-10[^]), 40.6 (t, C-9[^]), 39.1 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.3 (q, N-CH₃), 33.8 (t, C-2), 31.5 (t, C-2[^]), 28.7 (q, 3*CH₃-Boc), 25.8 (t, C-3[^]), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** *t_R* = 3.11 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₄₃H₅₈N₇O₁₂F₃Cl [M+H]⁺: 956.3784, gefunden 956.3793.

trans-Triazol **168**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.14 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 21-H), 6.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 17-H), 6.56 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.11 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.22 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 4.76 (dd, *J* = 2.8, 11.9 Hz, 1H, 3-H), 4.65-4.57 (m, 2H, 4⁻-H), 4.20-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.58 (m, 1H, 15-H_a), 3.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.28 (m, 1H, 15-H_b), 3.25

(unter dem MeOD-Signal, m, 2H, 9'-H), 3.16 (s, 3H, N-CH₃), 2.77 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.58 (m, 2H, 2'-H), 2.56 (dd, $J = 12.1, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.32-2.23 (m, 2H, 3'-H), 2.13 (dd, $J = 2.8, 13.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.44 (s, 9H, CH₃-Boc), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.8 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 159.2 (p, C-12'), 158.6 (p, C-7'), 157.7 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 150.6 (p, C-6'), 142.9 (p, C-18), 142.8 (p, C-16), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.6 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.3 (s, C-17), 122.8 (p, CF₃), 120.1 (p, C-5'), 119.6 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 89.6 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 80.4 (p, C-Boc), 78.5 (s, C-3), 75.8 (s, C-7), 68.1 (s, C-5), 61.7 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 50.3 (t, C-4'), 47.3 (t, C-15), 41.1 (t, C-10'), 40.5 (t, C-9'), 39.1 (s, C-6), 37.6 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 33.7 (t, C-2), 31.7 (t, C-2'), 28.8 (q, 3*CH₃-Boc), 25.9 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.3 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS $t_R = 2.65$ min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₄₃H₅₈N₇O₁₂F₃Cl [M+H]⁺: 956.3784, gefunden 956.3780.

Verfütterung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (27), Azidobuttersäure 160 und Oxanorbornadien 170



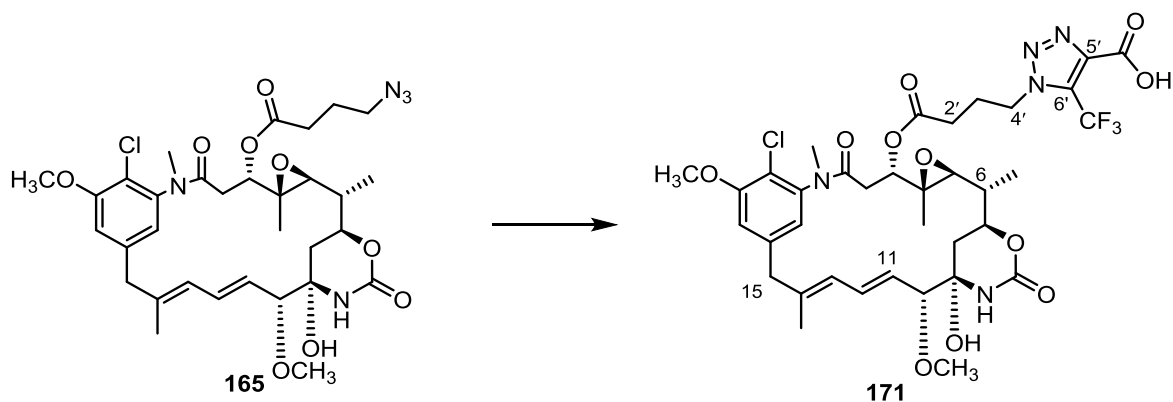
Die mutasynthetische Darstellung von Triazol **171** erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Fermentationsprotokoll mit *A. pretiosum* HGF073. Die Zufütterung der Mischung aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**27**) und 4-Azidobuttersäure (**160**) (AHBA: 10 mg, 1.25 mmol/L; Säure: 81 mg, 0.63 mmol, 12.5 mmol/L, gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) erfolgte in drei Portionen nach 48, 72 und 96 Stunden zu 50 mL Fermentationsmedium. Die Zugabe von Oxanorbornadien **170** (387.9 mg, 1.9 mmol, 3.0 Äq.) erfolgte in einer Portion nach 120 Stunden zu 50 mL Fermentationsmedium.

Der Rohextrakt wurde über eine kurze Kieselgelsäule (EtOAc = 100 %) filtriert. Nach Reinigung durch präp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O:MeOH = 95/5 → 90/10 in 5 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % CH₃OH in 10 min und 10 min halten; Fluss: 15 mL/min; t_R = 92 min) und anschließende Reinigung durch semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 50 min) wurde Triazol **171** (0.1 mg, 0.12 μmol, 2 mg/L) als farbloser Schaum isoliert.

Die Substanzmenge war zu gering um ¹³C-NMR-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die Verbindungen parallel synthetisiert. Die analytischen Daten der isolierten Derivate stimmten mit denen der synthetisierten Triazolenderivate überein.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.13 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 21-H), 6.86 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 17-H), 6.59 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.22 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.52 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 4.82 (dd, *J* = 2.6, 11.9 Hz, 1H, 3-H), 4.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 4'-H_a), 4.59 (m, 1H, 4'-H_b), 4.18 (dd, *J* = 3.2, 10.6 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.61 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 15-H_a), 3.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.26 (m, 1H, 15-H_b), 3.15 (s, 3H, N-CH₃), 2.75 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, 5-H), 2.73-2.69 (m, 1H, 2'-H_a), 2.57 (dd, *J* = 12.1, 13.8 Hz, 1H, 2-H_a), 2.53-2.46 (m, 1H, 2'-H_b), 2.31-2.17 (m, 2H, 3'-H), 2.12 (dd, *J* = 2.6, 13.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.87 (s, 3H, 4-CH₃) ppm.

Triazol **171**



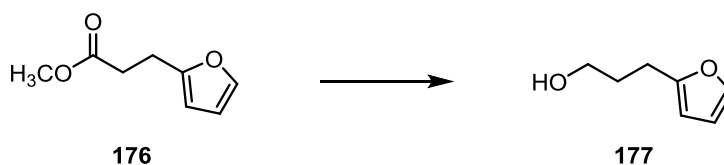
Azidoansamitocin **165** (3 mg, 4.4 μmol, 1 Äq.) wurde in Methanol (1 mL) gelöst und mit einer kleinen Spatelspitze Oxanorbornadien **170** versetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase;

Gradient H₂O mit 0.01 % NH₄OAc /MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 50 min) gereinigt. Triazolderivat **171** (1.9 mg, 1.55 μmol, 35 %) wurde als farbloser Schaum isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.13 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 21-H), 6.86 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 17-H), 6.59 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.22 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.52 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 4.82 (dd, *J* = 2.6, 11.9 Hz, 1H, 3-H), 4.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 4'-H_a), 4.59 (m, 1H, 4'-H_b), 4.18 (dd, *J* = 3.2, 10.6 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.61 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 15-H_a), 3.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.26 (m, 1H, 15-H_b), 3.15 (s, 3H, N-CH₃), 2.75 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, 5-H), 2.73-2.69 (m, 1H, 2'-H_a), 2.57 (dd, *J* = 12.1, 13.8 Hz, 1H, 2-H_a), 2.53-2.46 (m, 1H, 2'-H_b), 2.31-2.17 (m, 2H, 3'-H), 2.12 (dd, *J* = 2.6, 13.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.87 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 179.3 (p, C-7'), 172.7 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 157.4 (p, C-20), 155.4 (p, OCONH), 142.95 (p, C-16), 142.96 (p, C-18), 141.0 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.9 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.8 (p, CF₃), 123.4 (s, C-17), 119.6 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 89.6 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 78.3 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.8 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.1 (q, 20-OCH₃), 56.9 (q, 10-OCH₃), 51.1 (t, C-4'), 47.4 (t, C-15), 39.1 (s, C-6), 37.4 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 33.8 (t, C-2), 31.6 (t, C-2'), 26.0 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS t_R = 2.62 min; HRMS [ESI] *m/z* berechnet für C₃₆H₄₄N₅O₁₁F₃Cl [M+H]⁺: 814.2678, gefunden 814.2675.

6.3.8 SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.3

3-(Furan-2-yl)-propan-1-ol (**177**)

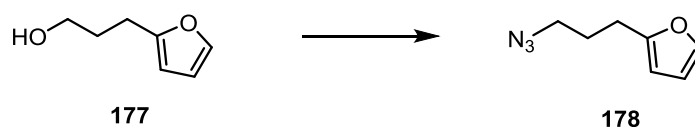


Methylester **176** (200 mg, 1.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in Diethylether (10 mL) gelöst, auf -78 °C gekühlt und DIBAL (*c* = 1.0 mol/L in Toluol, 3.2 mL, 4.1 mmol, 2.5 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei -78°C gerührt und anschließend langsam auf Raumtemperatur gebracht und 20 Stunden bei Raumtemperatur

gerührt. Durch Zugabe von Diethylether (5 mL) wurde die Reaktion beendet, mit Na-K-Tartrat-Lösung versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 \rightarrow 2:1) lieferte Alkohol **177** (168 mg, 1.3 mmol, quant.) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.30 (dd, $J = 1.7, 0.68$ Hz, 1H, Ar-H), 6.28 (dd, $J = 3.1, 1.7$ Hz, 1H, Ar-H), 6.00 (dd, $J = 3.1, 0.68$ Hz, 1H, Ar-H), 3.68 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.73 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.91 (m, 2H, CH_2), 1.52 (s, 1H, OH) ppm. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.¹⁰⁶

2-(3-Azidopropyl)-furan (178)

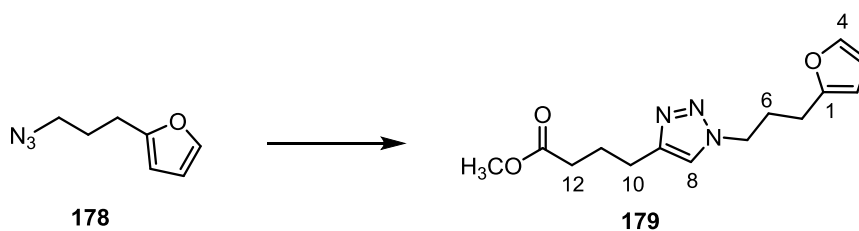


Alkohol **177** (600 mg, 4.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (10 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und Et_3N (1.9 mL, 14.3 mmol, 3.0 Äq.) langsam zugetropft. Anschließend wurde TsCl (1.4 g, 7.1 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von NH_4Cl (10 mL) wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 10:1 \rightarrow 5:1) lieferte Tosylat **177a** (1.3 g, 4.5 mmol, 96 %) als farbloses Öl.

Tosylat **177a** (1.3 g, 4.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (2 mL) gelöst und mit NaN_3 (1.2 g, 18.2 mmol, 4.0 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (20 mL) versetzt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 50:1) lieferte Azid **178** (591.4 mg, 3.9 mmol, 86 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.31 (dd, $J = 1.8, 0.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.29 (dd, $J = 3.1, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.02 (m, 1H, Ar-H), 3.31 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 2.73 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.93 (m, 2H, CH_2) ppm; **IR** (neat) 2929, 2092, 1597, 1508, 1257, 729 cm^{-1} . Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.¹⁰⁶

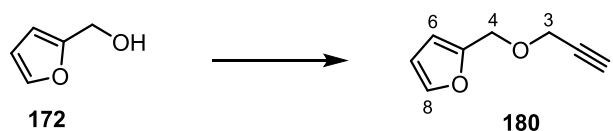
Methyl-4-(1-(3-(furan-2-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-butanoat (179)



Azid **178** (240 mg, 0.8 mmol, 4.0 Äq.) wurde in dem zuvor mit Argon entgastem Methanol (1 mL) gelöst und anschließend wurden Hexynsäuremethylester (50 mg, 0.4 mmol, 1.0 Äq.), Cu(I)Br (74 mg, 0.52 mmol, 1.3 Äq.) und DIPEA (0.35 mL, 2 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Durch Zugabe von NH_4Cl -Lösung wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 \rightarrow 2:1) lieferte Triazol **179** (75 mg, 0.27 mmol, 68 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.31 (m, 1H, 4-H), 7.29 (m, 1H, 8-H), 6.27 (m, 1H, 3-H), 6.02 (m, 1H, 2-H), 4.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 7-H), 3.65 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.75 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 10-H), 2.65 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 5-H), 2.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 12-H), 2.23 (m, 2H, 6-H), 2.00 (m, 2H, 11-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 173.9 (p, C-13), 153.9 (p, C-1), 147.2 (p, C-9), 141.5 (s, C-4), 121.1 (s, C-8), 110.4 (s, C-3), 106.0 (s, C-2), 51.7 (q, OCH_3), 49.3 (t, C-7), 33.4 (t, C-12), 28.8 (t, C-6), 25.0 (t, C-11), 24.9 (t, C-10), 24.7 (t, C-5) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.1$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 278.1505, gefunden 278.1503.

Propargyloxymethylfuran 180

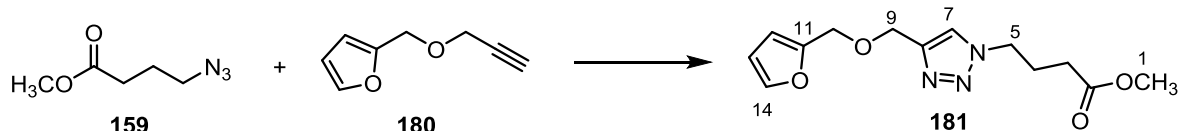


Furfurylalkohol **172** (5 mL, 57.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde langsam zu einer Suspension aus NaH (1.5 g, 63.7 mmol, 1.1 Äq.) und absolutem DMF (15 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und mit Propargylbromid (11.4 mL, 150.3 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde unter Argon 20 Stunden gerührt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 50:1) lieferte Furan **180** (5.8 g,

42.4 mmol, 73 %) als gelbes Öl. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.¹⁰⁷

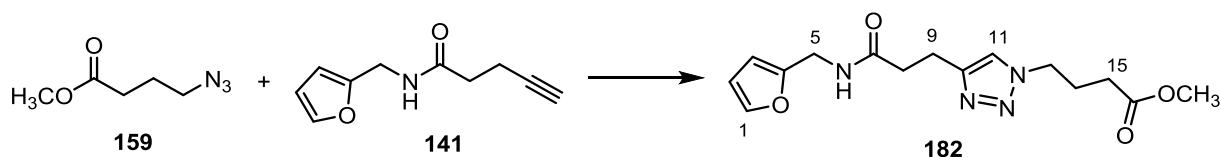
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.45 (dd, *J* = 1.7, 0.9 Hz, 1H, 8-H), 6.41-6.36 (m, 2H, 6-H, 7-H), 4.59 (s, 2H, 4-H), 4.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 3-H), 2.51 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, 1-H) ppm.

Methylester 181



Alkin **180** (300 mg, 2.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in dem zuvor mit Argon entgastem Methanol (5 mL) gelöst und anschließend wurden Azidobuttersäuremethylester **159** (946.4 mg, 6.6 mmol, 3.0 Äq.), Cu(I)Br (412 mg, 2.9 mmol, 1.3 Äq.) und DIPEA (1.9 mL, 11.1 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Durch Zugabe von NH₄Cl-Lösung wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 5:1 → 2:1) lieferte Triazol **181** (314.5 mg, 1.1 mmol, 51 %) als gelbes Öl.

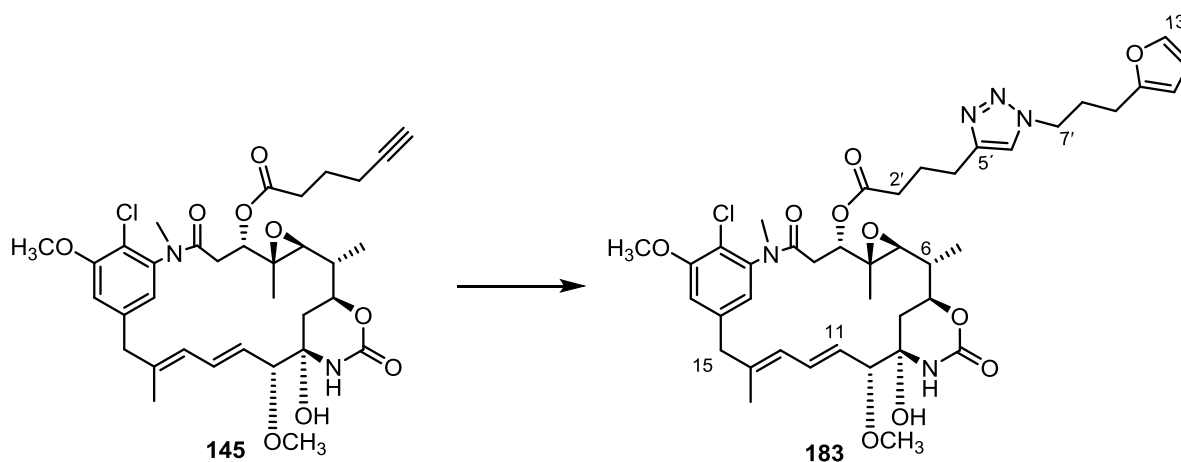
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.53 (s, 1H, 7-H), 7.39 (dd, *J* = 1.02, 1.7 Hz, 1H, aryl-H), 6.32 (m, 2H, aryl-H), 4.65 (s, 2H, 10-H), 4.52 (s, 2H, 9-H), 4.40 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 5-H), 3.65 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 3-H), 2.20 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 4-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 172.8 (p, C-2), 151.4 (p, C-11), 145.2 (p, C-8), 143.0 (s, C-14), 122.8 (s, C-7), 110.4 (s, C-aryl.), 109.9 (s, C-aryl.), 64.3 (t, C-10), 63.5 (t, C-9), 51.9 (q, OCH₃), 49.3 (t, C-5), 30.5 (t, C-3), 25.5 (t, C-4) ppm; **UPLC-MS** t_R = 1.79 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₃H₁₈N₃O₄ [M+H]⁺: 280.1297, gefunden 280.1292.

Furfurylamid **182**

Alkin **141** (318 mg, 1.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in dem zuvor mit Argon entgastem Methanol (5 mL) gelöst und anschließend wurden Azidobuttersäuremethylester (1.03 g, 7.2 mmol, 4.0 Äq.), Cu(I)Br (336 mg, 2.3 mmol, 1.3 Äq.) und DIPEA (1.53 mL, 8.9 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Durch Zugabe von NH_4Cl -Lösung wurde die Reaktion beendet und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 1:1 \rightarrow EtOAc:MeOH = 20:1) lieferte Furfurylamid **182** (463.7 mg, 1.5 mmol, 81 %) als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 2.50$ ppm): δ 8.34 (m, 1H, 6-H), 7.80 (m, 1H, 11-H), 7.55 (m, 1H, Ar-H), 6.37 (m, 1H, Ar-H), 6.17 (m, 1H, Ar-H), 4.32 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 13-H), 4.24 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, 5-H), 3.58 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.84 (m, 2H, 9-H), 2.46 (m, 2H, 8-H), 2.29 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 15-H), 2.02 (q, $J = 7$ Hz, 2H, 14-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 172.4 (p, C-16), 170.9 (p, C-7), 152.3 (p, C-aryl.), 141.9 (s, C-aryl.), 122.4 (s, C-11), 110.3 (s, C-aryl.), 106.6 (p, C-10), 51.3 (q, OCH_3), 48.3 (t, C-13), 35.3 (t, C-5), 34.6 (t, C-8), 30.0 (t, C-15), 25.1 (t, C-14), 21.2 (t, C-9) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.66$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 321.1563, gefunden 321.1564.

Furan 183

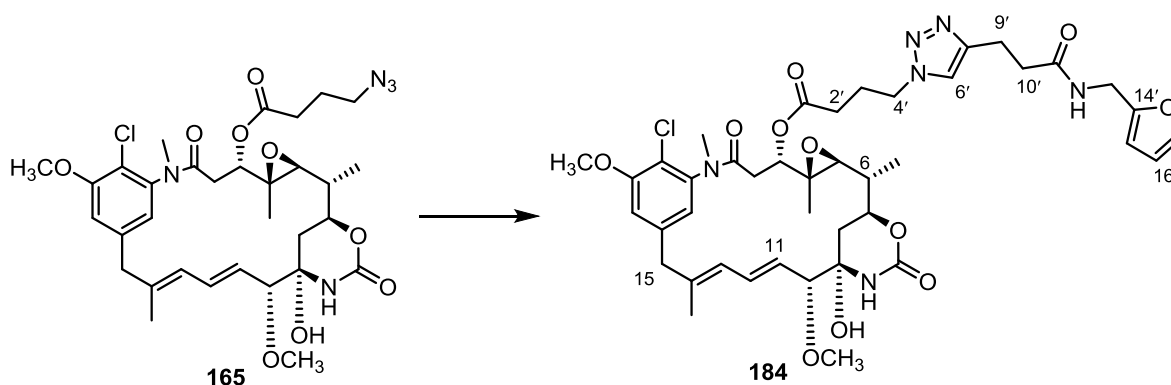


Unter Argon wurde Cu(I)Br (8.5 mg, 59 μmol , 26.0 Äq.) in dem zuvor mit Argon entgasten Methanol (3 mL) gelöst und DIPEA (30 μL , 0.16 mmol, 76.0 Äq.) zugegeben. Die entstandene gelbliche Suspension wurde 30 Minuten durch eine Argoneinleitung über eine Kanüle und unter Lichtausschluß entgast. Unter Argon wurde Alkinansamitocin-Derivat **145** (1.5 mg, 2.3 μmol , 1.0 Äq.) in dem mit Argon entgasten Methanol (0.5 mL) gelöst und mit 240 μL einer erstellten Cu(I)Br-DIPEA-Suspension und Azid **178** (0.8 mg, 5.3 μmol , 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EDTA-Lösung [pH = 8.0, (0.5M); 0.5 mL] versetzt und nach 5 Minuten direkt mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; $t_{\text{R}} = 76.5$ min) gereinigt. Furanansamitocin-Derivat **183** (1.6 mg, 1.97 μmol , 87 %) wurde als farbloser Schaum isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.83 (s, 1H, 6'-H), 7.34 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 13'-H), 7.12 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 21-H), 6.80 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, $J = 11.1, 15.4$ Hz, 1H, 12-H), 6.32 (dd, $J = 1.6, 3.1$ Hz, 1H, 12'-H), 6.08 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 6.04 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, 11'-H), 5.37 (dd, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 1H, 11-H), 4.76 (dd, $J = 11.9, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.39 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 7'-H), 4.18 (td, $J = 2.6, 10.9$ Hz, 1H, 7-H), 3.97 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.54 (m, 1H, 15-H_a), 3.35 (d, $J = 2.2$ Hz, 3H, 10-OCH₃), 3.26 (m, 1H, 15-H_b), 3.11 (s, 3H, N-CH₃), 2.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 4'-H), 2.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 9'-H), 2.57 (m, 3H, 3'-H, 2-H_a), 2.20 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, 8'-H), 2.12 (dd, $J = 12.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.03 (m, 2H, 2'-H), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.47 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s,

3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.5 (p, C-1), 171.4 (p, C-1'), 157.4 (p, C-20), 155.5 (p, OCONH), 155.3 (p, C-10'), 148.4 (p, C-5'), 142.9 (p, C-18), 142.7 (p, C-16), 142.5 (p, C-10'), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.7 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.6 (s, C-6'), 123.2 (s, C-17), 119.7 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 111.2 (s, C-12'), 106.6 (s, C-11'), 89.7 (s, C-10), 81.8 (p, C-9), 78.1 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 50.6 (t, C-7'), 47.4 (t, C-15), 39.2 (t, C-8), 37.5 (d, C-6), 36.2 (q, N-CH₃), 34.3 (t, C-3'), 33.8 (t, C-2), 29.9 (t, C-8'), 25.8 (t, C-2'), 25.7 (t, C-4'), 25.5 (t, C-9'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS t_R = 2.03 min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₄₁H₅₃N₅O₁₀Cl [M+H]⁺: 810.3481, gefunden 810.3450.

Ansamitocin-Derivat 184

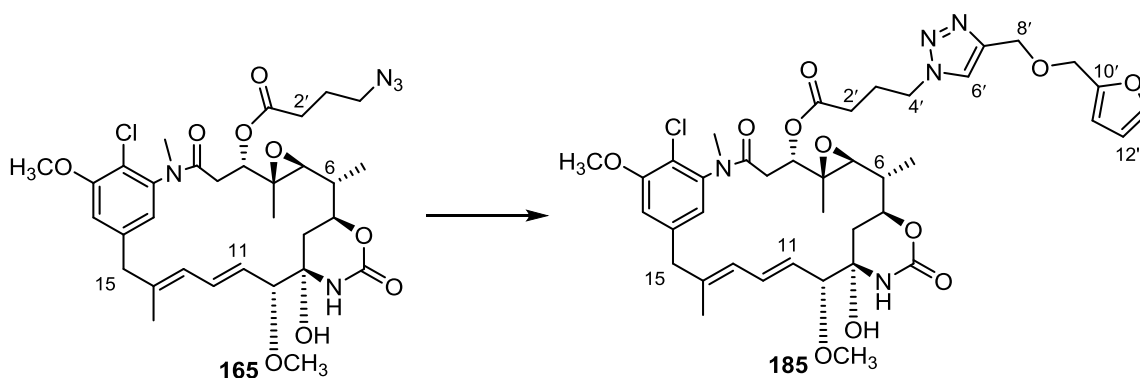


Unter Argon wurde Cu(I)Br (13 mg, 90 μmol, 21.0 Äq.) in dem zuvor mit Argon entgasten Methanol (3 mL) gelöst und DIPEA (30 μL, 0.25 mmol, 58.0 Äq.) zugegeben. Die entstandene gelbliche Suspension wurde 30 Minuten durch Argoneinleitung über eine Kanüle und unter Lichtausschluß entgast. Unter Argon wurde Azidansamitocin-Derivat **165** (2.9 mg, 4.3 μmol, 1.0 Äq.) in dem mit Argon entgasten Methanol (0.5 mL) gelöst, mit 240 μL einer erstellten Cu(I)Br-DIPEA-Suspension und Alkin **141** (1.8 mg, 9.9 μmol, 2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EDTA-Lösung [pH = 8.0, (0.5 M), 0.5 mL] versetzt und nach 5 Minuten direkt mittels semipräp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 68.5 min) gereinigt. Furanansamitocin-Derivat **184** (2.2 mg, 2.63 μmol, 62 %) wurde als farbloser Schaum isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.74 (s, 1H, 6'-H), 7.42 (dd, J = 0.6, 1.8 Hz, 1H, 17'-H), 7.14 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 21-H), 6.77 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 17-H),

6.57 (dd, $J = 11.1, 15.4$ Hz, 1H, 12-H), 6.35 (dd, $J = 1.8, 3.2$ Hz, 1H, 16'-H), 6.19 (dd, $J = 0.6, 3.2$ Hz, 1H, 15'-H), 6.08 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.35 (dd, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, $J = 11.9, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 4'-H), 4.32 (s, 2H, 13'-H), 4.19-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (m, 1H, 15-H_a), 3.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.29 (m, 1H, 15-H_b), 3.14 (s, 3H, N-CH₃), 3.00 (td, $J = 2.9, 7.3$ Hz, 2H, 9'-H), 2.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 10'-H), 2.52 (q, $J = 8.16$ Hz, 2H, 2'-H), 2.68 (dd, $J = 12.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.63-2.56 (m, 2H, 2'-H), 2.19 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, 3'-H), 2.13 (dd, $J = 2.6, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 174.2 (p, C-11'), 172.8 (p, C-1), 171.4 (p, C-1'), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 153.1 (p, C-14'), 148.0 (p, C-7'), 143.4 (p, C-18), 142.9 (p, C-16), 142.8 (s, C-17'), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.8 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.7 (s, C-6'), 123.2 (s, C-17), 119.7 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 111.4 (s, C-16'), 108.1 (s, C-15'), 89.6 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 78.4 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.7 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 50.5 (t, C-4'), 47.4 (t, C-15), 39.2 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 37.1 (t, C-13'), 36.2 (t, C-10'), 36.1 (q, N-CH₃), 33.8 (t, C-2), 31.8 (t, C-2'), 26.5 (t, C-3'), 22.5 (t, C-9'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS $t_R = 2.37$ min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₄₂H₅₄N₆O₁₁Cl [M+H]⁺: 853.3539, gefunden 853.3503.

Triazolderivat 185

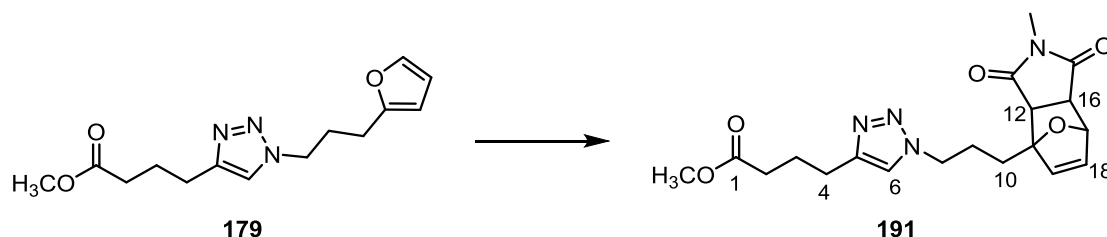


Unter Argon wurde Cu(I)Br (50 mg, 0.35 mmol, 23.0 Äq.) in dem zuvor mit Argon entgasten Methanol (3 mL) gelöst und DIPEA (0.2 mL, 1.1 mmol, 100.0 Äq.) zugegeben. Die entstandene gelbliche Suspension wurde 30 Minuten durch Argoneinleitung über eine Kanüle und unter Lichtausschluß entgast. Unter Argon wurde Azidansamitocin-Derivat **165** (10 mg, 15 µmol, 1.0 Äq.) in dem zuvor mit Argon entgasten Methanol (0.5 mL) gelöst, mit 240 µL einer zuvor erstellten Cu(I)Br-DIPEA-Suspension und Alkin **180** (4.7 mg, 34.5 µmol,

2.3 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluß gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit EDTA-Lösung [pH = 8.0, (0.5M), 0.5 mL] versetzt und nach 5 Minuten direkt mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 76.5 min) gereinigt. Furanansamitocin-Derivat **185** (2.4 mg, 3 μmol, 20 %) wurde als farbloses Schaum isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 8.03 (s, 1H, 6'-H), 7.45 (d, J = 1.3 Hz, 1H, 13'-H), 7.12 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 21-H), 6.71 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 17-H), 6.56 (dd, J = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.36 (m, 2H, 12'-H, 14'-H), 6.08 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.37 (dd, J = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.87 (*unter dem H₂O-Signal*, s, 1H, 10'-H_a), 4.78 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.60 (dd, J = 12.1, 15.9 Hz, 1H, 8'-H), 4.54 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 4'-H), 4.49 (d, J = 1.1 Hz, 1H, 10'-H_b), 4.19-4.14 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.55 (m, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.26 (m, 1H, 15-H_b), 3.11 (s, 3H, N-CH₃), 2.75 (d, J = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.65-2.59 (m, 2H, 2'-H_a), 2.54 (dd, J = 12.9, 13.8 Hz, 1H, 2-H_a), 2.42-2.36 (m, 2H, 2'-H_b), 2.23 (qui, J = 6.9 Hz, 2H, 3'-H), 2.12 (dd, J = 2.8, 13.8 Hz, 1H, 2-H_b), 1.68 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.8 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 157.4 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 152.8 (p, C-11'), 146.3 (p, C-7'), 144.2 (p, C-18), 142.9 (s, C-13'), 142.8 (p, C-16), 141.1 (p, C-14), 133.8 (s, C-12), 129.8 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 125.2 (s, C-6'), 123.2 (s, C-17), 119.4 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 111.4 (p, C-14'), 110.8 (s, C-12'), 89.6 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 78.3 (s, C-3), 75.8 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 65.1 (t, C-10'), 63.8 (t, C-8'), 61.7 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 50.5 (t, C-4'), 47.4 (t, C-15), 39.1 (s, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 33.7 (t, C-2), 31.7 (t, C-2'), 26.4 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS t_R = 2.45 min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₄₀H₅₁N₅O₁₁Cl [M+H]⁺: 812.3274, gefunden 812.3274. *Durch partiellen Methanol-Austausch erscheinen die Protonen des Furans mit geringer Intensität (Integral ~0.6-0.7 statt 1.0).*

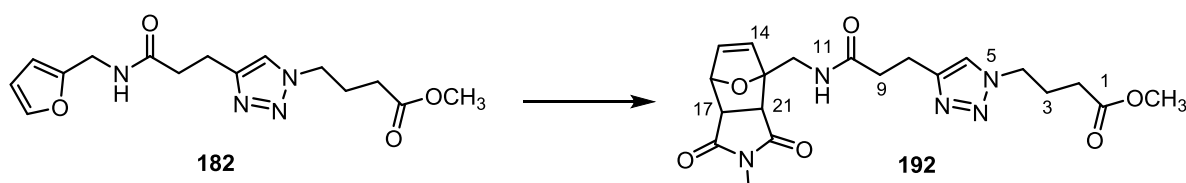
Triazol 191



Zu einer Lösung von Methyl ester **179** (18.6 mg, 60 μmol , 1.0 $\text{\AA}q.$) in Acetonitril (2 mL) wurde *N*-Methylmaleimid (15.9 mg, 140 μmol , 2.0 $\text{\AA}q.$) gegeben und für drei Tage bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (PE:EtOAc = 1:1 \rightarrow 100 % EtOAc) gereinigt. Triazol **191** (18.8 mg, 48 μmol , 72 %) wurde als farbloses Öl erhalten. Es wurde ein Gemisch aus *exo:endo*-Triazol = 13:1 isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.32 (s, 1H, 6-H), 6.52 (dd, $J = 5.7$, 1.6 Hz, 1H, 18-H), 6.33 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, 19-H), 5.20 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 17-H), 4.44 - 4.31 (m, 2H, 8- H_a , 8- H_b), 3.66 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.96 (s, 3H, N-CH_3), 2.95 (s, 1H, 12-H), 2.77 (dd, $J = 15.3$, 10.6 Hz, 2H, 3- H_a , 3- H_b), 2.75 (m, 1H, 16-H), 2.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2-H), 2.23 (m, 1H, 4- H_a), 2.09 – 2.00 (m, 5H, 4- H_b , 9-H, 10-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 176.1 (p, C-13), 174.9 (p, C-14), 173.9 (p, C-1), 147.2 (p, C-5), 138.3 (s, C-19), 137.7 (s, C-18), 121.2 (s, C-6), 91.1 (p, C-11), 80.7 (s, C-17), 51.7 (q, OCH_3), 50.5 (s, C-12), 50.1 (t, C-8), 49.2 (s, C-16), 33.4 (t, C-2), 26.6 (t, C-9), 26.3 (t, C-10), 25.1 (t, C-3), 25.0 (q, N-CH_3), 24.8 (t, C-4) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 1.72$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 389.1825, gefunden 389.1816.

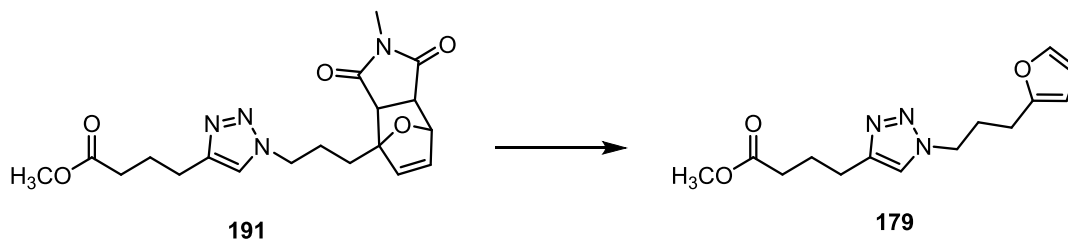
Methylester 192



Furan **182** (156.8 mg, 0.49 mmol, 1.0 $\text{\AA}q.$) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst, mit *N*-Methylmaleimid (160 mg, 1.4 mmol, 2.0 $\text{\AA}q.$) versetzt und vier Tage bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc = 1:1 \rightarrow EtOAc:MeOH = 20:1) lieferte Methylester **192** (211.1 mg, 0.49 mmol, quant.) als farbloses Öl.

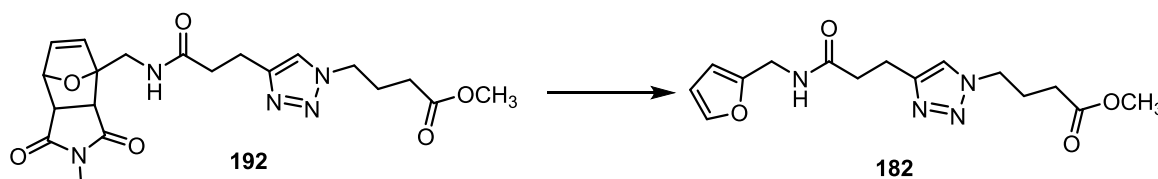
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.37 (s, 1H, 6-H), 6.53-6.48 (m, 1H, 11-H), 6.39 (dd, *J* = 5.5 Hz, 1H, 15-H), 6.28 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 14-H), 5.21 (m, 1H, 16-H_{exo}), 5.15 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 16-H_{endo}), 4.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, 4-H), 3.91 (m, 1H, 12-H_a), 3.74 (m, 1H, 12-H_b), 3.64 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.03 (s, 2H, 8-H), 2.93 (s, 3H, N-CH₃), 2.90 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1H, 21-H), 2.78 (m, 1H, 17-H), 2.65 (s, 2H, 9-H), 2.30 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, 2-H), 2.16 (qui., *J* = 6.9 Hz, 2H, 3-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.0 (p, C-18), 175.6 (p, C-20), 172.8 (p, CO₂CH₃), 172.3 (p, C-10), 138.8 (s, C-14), 136.9 (s, C-15), 135.6 (p, C-7), 135.2 (s, C-6), 90.7 (p, C-13_{endo}), 90.4 (p, C-13_{exo}), 80.8 (s, C-16_{endo}), 79.4 (s, C-16_{exo}), 51.9 (q, CO₂CH₃), 50.4 (s, C-17), 48.4 (t, C-4), 38.6 (s, C-21), 35.7 (t, C-9), 30.6 (t, C-2), 25.6 (t, C-8), 25.1 (q, NCH₃), 21.6 (t, C-3) ppm; **UPLC-MS** *t*_R = 1.43 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₂₀H₂₆N₅O₆ [M+H]⁺: 432.1883, gefunden 432.1877.

Methylester **179**



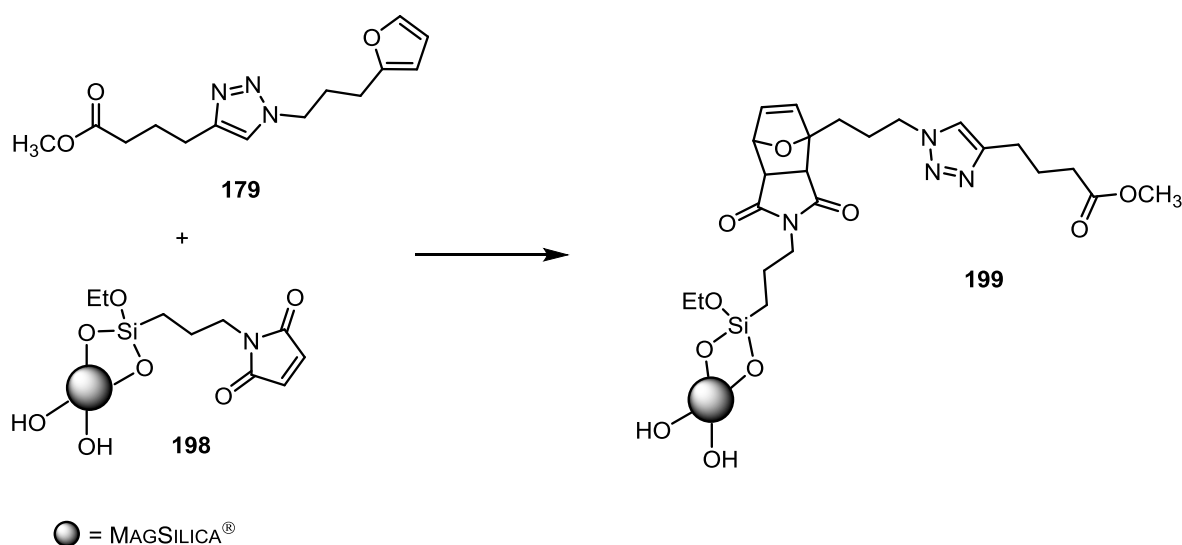
Diels-Alder-Produkt **191** (34 mg, 87 μmol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (2 mL) gelöst und 20 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Eiswasser auf Raumtemperatur gebracht und anschließend (ohne Einengen im Vakuum) mittels Säulenchromatographie (PE:EtOAc = 5:1 → 2:1) gereinigt. Triazol **179** (24.1 mg, 87 μmol, quant.) wurde als gelbes Öl erhalten. Es wurde ein Gemisch aus *exo:endo*-Triazol = 3:1 isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.31 (m, 1H, 4-H), 7.29 (m, 1H, 8-H), 6.27 (m, 1H, 3-H), 6.02 (m, 1H, 2-H), 4.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, 7-H), 3.65 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 10-H), 2.65 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, 5-H), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 12-H), 2.23 (m, 2H, 6-H), 2.00 (m, 2H, 11-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 173.9 (p, C-13), 153.9 (p, C-1), 147.2 (p, C-9), 141.5 (s, C-4), 121.1 (s, C-8), 110.4 (s, C-3), 106.0 (s, C-2), 51.7 (q, OCH₃), 49.3 (t, C-7), 33.4 (t, C-12), 28.8 (t, C-6), 25.0 (t, C-11), 24.9 (t, C-10), 24.7 (t, C-5) ppm; **UPLC-MS** *t*_R = 2.1 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₄H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺: 278.1505, gefunden 278.1503.

Triazolderivat **182**

Diels-Alder-Produkt **192** (100 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst und 20 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Kühlen mit Eiswasser auf Raumtemperatur gebracht und anschließend (ohne vorheriges Einengen im Vakuum) mittels Säulenchromatographie (PE:EtOAc = 1:1 → EtOAc:MeOH = 20:1) gereinigt. Triazolderivat **182** (42 mg, 0.13 mmol, 57 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

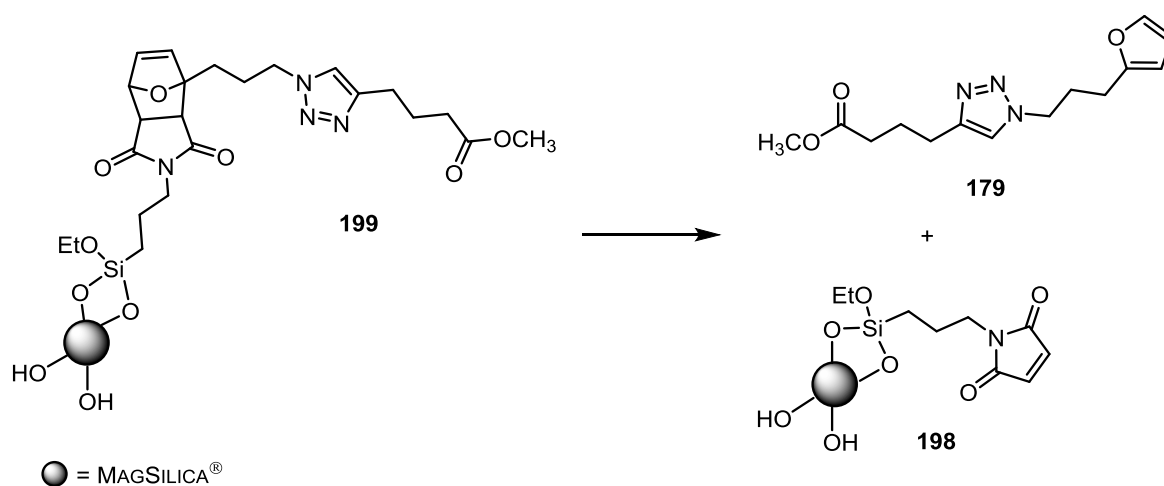
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₆ = 2.50 ppm): δ 8.34 (m, 1H, 6-H), 7.80 (m, 1H, 11-H), 7.55 (m, 1H, Ar-H), 6.37 (m, 1H, Ar-H), 6.17 (m, 1H, Ar-H), 4.32 (t, *J* = 7 Hz, 2H, 13-H), 4.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, 5-H), 3.58 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.84 (m, 2H, 9-H), 2.46 (m, 2H, 8-H), 2.29 (t, *J* = 7 Hz, 2H, 15-H), 2.02 (q, *J* = 7 Hz, 2H, 14-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆, DMSO-*d*₆ = 39.52 ppm): δ 172.4 (p, C-16), 170.9 (p, C-7), 152.3 (p, C-aryl.), 141.9 (s, C-aryl.), 122.4 (s, C-11), 110.3 (s, C-aryl.), 106.6 (p, C-10), 51.3 (q, OCH₃), 48.3 (t, C-13), 35.3 (t, C-5), 34.6 (t, C-8), 30.0 (t, C-15), 25.1 (t, C-14), 21.2 (t, C-9) ppm; **UPLC-MS** *t*_R = 1.66 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₁₅H₂₁N₄O₄ [M+H]⁺: 321.1563, gefunden 321.1564.

DIELS-ALDER Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikeln **198**

Methylester **179** (3 mg, 11 μmol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (0.5 mL) gelöst, mit silanisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikel (1 g) versetzt und 4 Tage bei 65 °C gerührt. Nach

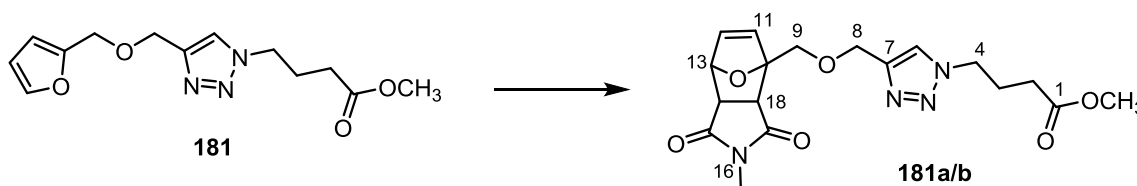
Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Furan entfernt, wobei die MAGSILICA[®]-Nanopartikel mit einem Magneten fixiert und die Lösung abpipettiert wurde. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis das Furan (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde im Vakuum eingengt und mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 48 min) gereinigt. Das Edukt **179** wurde als farbloses Öl (1.5 mg, 1.5 μmol, 50 %) reisoliert. Das beschichtete MAGSILICA[®] **199** (mit 1.5 mg, 50 % aufgeladenem Furan) wurde im Vakuum getrocknet.

Retro-DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel



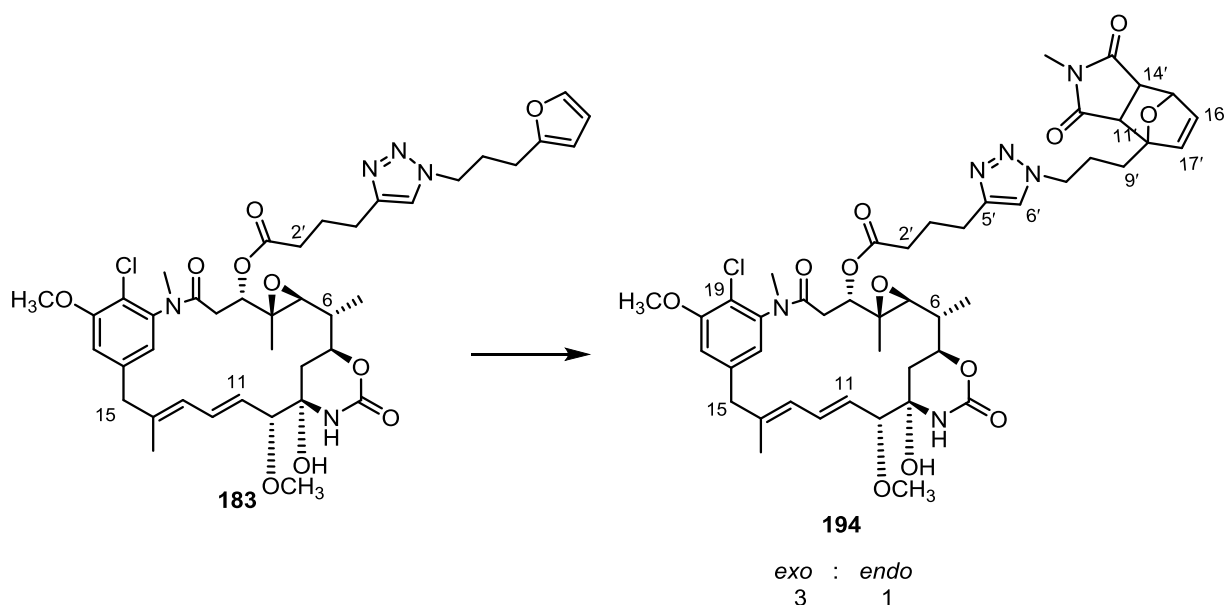
Durchführung mittels konventionellem Heizens:

Die beschichteten MAGSILICA[®]-Nanopartikel **199** (mit 1.5 mg aufgeladenem Furan) wurden in Acetonitril (5 mL) gegeben und im Ölbad für 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde schnell auf Raumtemperatur gebracht, die Nanopartikel wurden magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis Methylester **179** (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde im Vakuum eingengt und mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 48 min) gereinigt. Methylester **179** (0.7 mg, 1.87 μmol, 47 % bezogen auf 1.5 mg des aufgeladenen Furans) wurde als farbloses Öl isoliert.

Triazol **181a**

Zu einer Lösung von Methylester **181** (96.8 mg, 37 μmol , 1.0 Äq.) in Acetonitril (3 mL) wurde *N*-Methylmaleimid (130 mg, 1.2 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und 3 Tage bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (PE:EtOAc = 1:1 \rightarrow 100 % EtOAc) gereinigt. Die Produkte *exo*-Triazol **181a** und *endo*-Triazol **181b** wurden als eine nicht trennbare Mischung (137.7 mg, 0.35 mmol, 95 %) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 7.57 (d, $J = 6.52$ Hz, 1H, 6-H), 6.48 (s, 1H, 12-H), 6.30 (dd, $J = 5.3$ Hz, 1H, 11-H), 5.22 (m, 1H, 13-H), 4.72 (m, 2H, 8-H), 4.38 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 4-H), 4.20 (t, $J = 11.3$ Hz, 1H, 9-H_a), 3.98 (dd, $J = 11.3$ Hz, 1H, 9-H_b), 3.63 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.51 (dd, $J = 7.1$ Hz, 1H, 14-H), 2.91 (s, 3H, N-CH_3), 2.88 (dd, $J = 7.1$ Hz, 1H, 18-H), 2.32 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 2-H), 2.18 (p, $J = 6.1$ Hz, 2H, 3-H) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 176.1 (p, C-17), 174.7 (p, C-15), 172.8 (p, CO_2CH_3), 145.01 (p, C-7), 138.1 (s, C-12), 136.8 (s, C-11), 122.9 (s, C-6), 91.2 (p, C-10_{exo}), 90.5 (p, C-10_{endo}), 81.1 (s, C-13_{endo}), 79.7 (s, C-13_{exo}), 67.8 (t, C-9), 65.4 (s, C-8), 51.9 (q, CO_2CH_3), 50.1 (t, C-4), 49.4 (q, NCH_3), 48.4 (s, C-18), 46.2 (s, C-14), 30.6 (t, C-2), 25.7 (t, C-3) ppm; **UPLC-MS** $t_{\text{R}} = 2.41$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 391.1618, gefunden 391.1622.

Ansamitocin-Derivat **194**

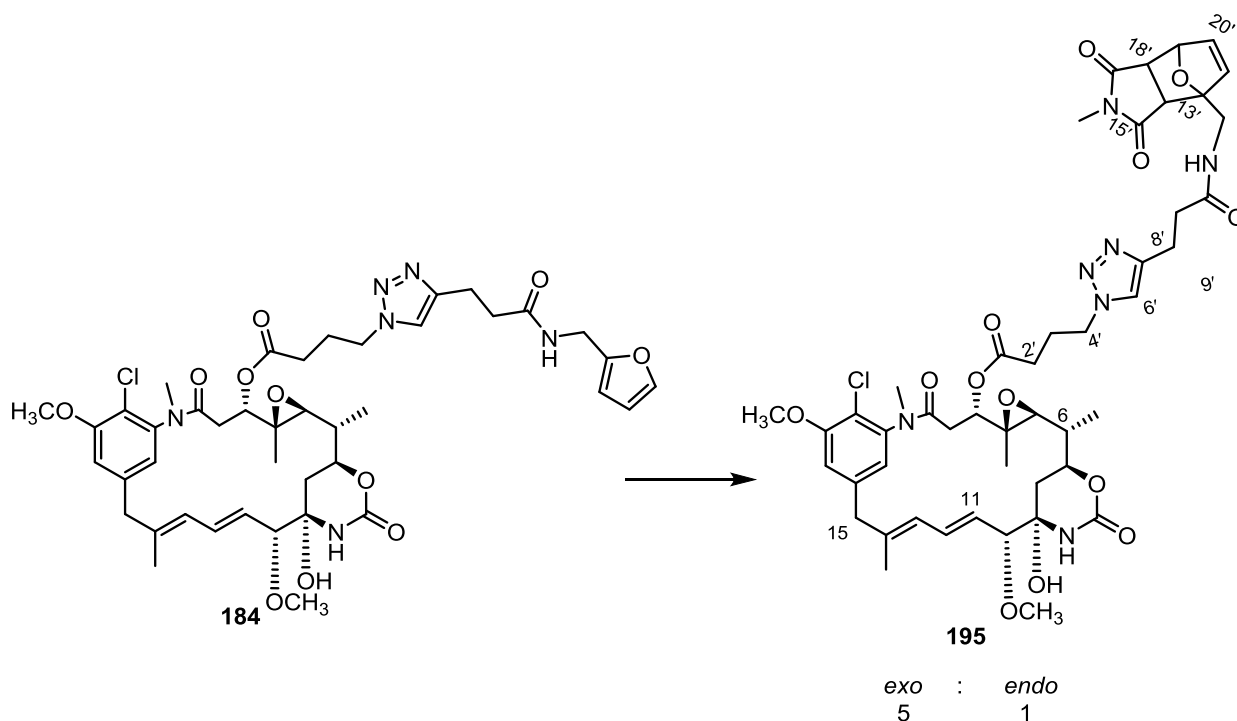
Zu einer Lösung von Furfurylansamitocin **183** (1.6 mg, 1.97 μmol , 1.0 Äq.) in Acetonitril (1 mL) wurde eine kleine Spatelspitze von *N*-Methylmaleimid gegeben und 3 Tage bei 65 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels semipräp.-HPLC (CN-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_{R} = 63 min) gereinigt. Die Mischung aus *exo*- und *endo*- Triazololderivaten **194** (1.4 mg, 1.52 μmol , 77 %) wurde als farbloser Schaum isoliert.

Triazolansamitocin-Derivat **194**:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 3.31 ppm): δ 7.84 (s, 1H, 6'-H), 7.13 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.79 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.59 (dd, J = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.58-6.54 (m, 1H, 16'-H), 6.39 (dd, J = 5.63, 9.8 Hz, 1H, 17'-H), 6.11 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.39 (dd, J = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 5.08 (t, J = 2.1 Hz, 1H, 15'-H), 4.76 (dd, J = 11.5, 2.2 Hz, 1H, 3-H), 4.44 (m, 2H, 7'-H), 4.18 (td, J = 2.6, 10.9 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.55 (m, 2H, 10-H; 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.23 (m, 1H, 15-H_b), 3.11 (s, 3H, N-CH₃), 3.02 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 11'-H), 2.89 (d, J = 1.7 Hz, 3H, N-CH₃ maleimid), 2.84-2.80 (m, 3H, 14'-H; 4'-H), 2.76 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.60-2.52 (m, 3H, 2'-H; 2-H_a), 2.20-2.15 (m, 1H, 9'-H_a), 2.11 (dd, J = 2.2, 12.9 Hz, 1H, 2-H_b), 2.08-1.98 (m, 4H, 8'-H, 3'-H), 1.93-1.87 (m, 1H, 9'-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.55-1.47 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 178.4 (p, C-12'), 176.9 (p, C-13'), 173.5 (p, C-1'), 171.4 (p,

C-1), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 148.4 (p, C-5^ˆ), 142.9 (p, C-16), 142.8 (p, C-18), 141.1 (p, C-14), 139.3 (s, C-17^ˆ), 138.5 (s, C-16^ˆ), 133.8 (s, C-12), 129.8 (s, C-11), 126.0 (s, C-13), 123.7 (s, C-6^ˆ), 123.2 (s, C-17), 119.7 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 92.2 (p, C-10^ˆ), 89.7 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 80.2 (s, C-15^ˆ), 78.1 (s, C-3), 75.9 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.8 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 51.8 (t, C-7^ˆ), 51.3 (s, C-11^ˆ), 50.4 (s, C-14^ˆ), 47.4 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.6 (t, C-8), 36.2 (q, N-CH₃), 34.3 (t, C-2), 27.7 (t, C-8^ˆ), 27.3 (t, C-9^ˆ), 25.8 (t, C-2^ˆ), 25.7 (t, C-3^ˆ), 25.5 (q, N⁻-CH₃), 24.9 (t, C-4^ˆ), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** $t_R = 2.53$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für C₄₆H₅₈N₆O₁₂Cl [M+H]⁺: 921.3801, gefunden 921.3807.

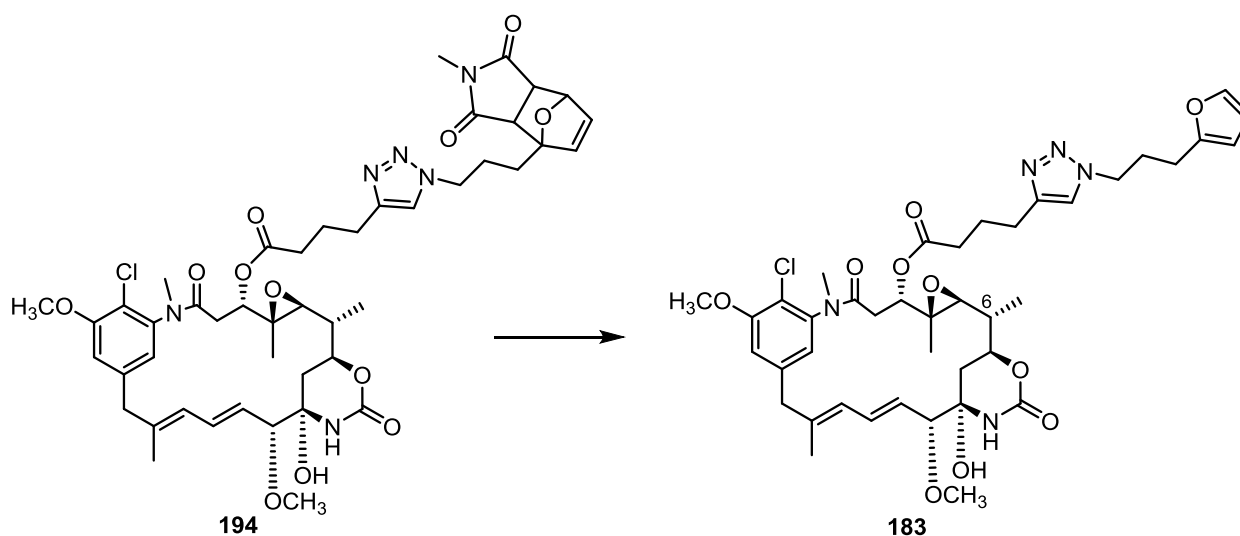
Ansamitocin-Derivat 195



Zu einer Lösung von Furfurylamidansamitocin **184** (1.0 mg, 1.17 μ mol, 1.0 \AA q.) in Acetonitril (1 mL) wurde eine kleine Spatelspitze von *N*-Methylmaleimid gegeben und 3 Tage bei 65 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels semipräp.-HPLC (CN-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; $t_R = 63.5$ min) gereinigt. Das Gemisch (*exo:endo* = 5:1) der beiden Triazolderivaten **195** (1.12 mg, 1.17 μ mol, quant.) wurde als farbloser Schaum isoliert.

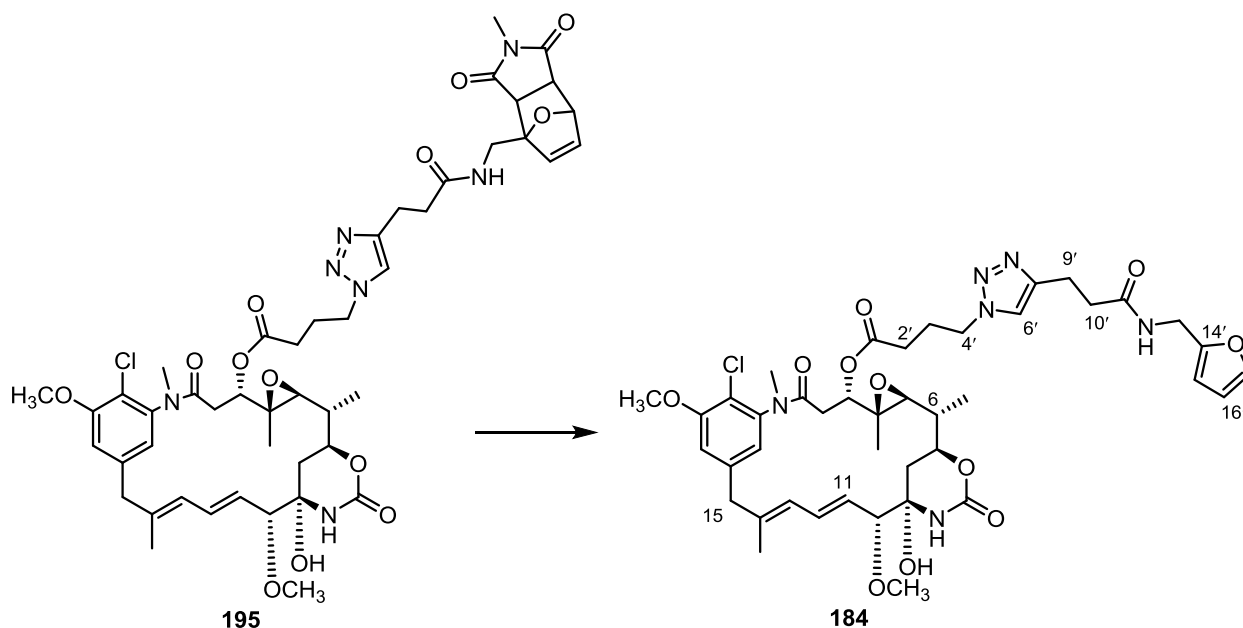
Triazolderivat **195**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.78 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, 6'-H), 7.14 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 21-H), 6.78 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, *J* = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.56-6.54 (m, 1H, 21'-H), 6.31 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, 20'-H), 6.09 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.36 (dd, *J* = 8.9, 15.4 Hz, 1H, 11-H), 5.13 (dd, *J* = 1.8, 3.2 Hz, 1H, 19'-H), 4.77 (dd, *J* = 2.5, 11.5 Hz, 1H, 3-H), 4.47 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, 4'-H), 4.18 (m, 1H, 7-H), 4.05 (dd, *J* = 10.9, 14.8 Hz, 1H, 12'-H_a), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.59 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, 10-H), 3.57-3.54 (m, 2H, 12'-H_b; 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.28 (m, 1H, 15-H_b), 3.15 (s, 3H, N-CH₃), 3.06 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, 14'-H), 3.01-2.98 (m, 2H, 8'-H), 2.93 (m, 1H, 18'-H), 2.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H, N-CH₃ maleimid), 2.77-2.75 (m, 1H, 5-H), 2.64-2.53 (m, 4H, 9'-H; 2'-H_a; 2-H_a), 2.48-2.42 (m, 1H, 2'-H_b), 2.19 (qui, *J* = 6.8 Hz, 2H, 3'-H), 2.19 (dd, *J* = 2.5, 13.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.51 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 178.2 (p, C-15'), 176.9 (p, C-17'), 174.8 (p, C-10'), 172.9 (p, C-1'), 171.4 (p, C-1), 157.5 (p, C-20), 155.3 (p, OCONH), 148.0 (p, C-7'), 142.9 (p, C-18), 142.8 (p, C-16), 141.1 (p, C-14), 138.9 (s, C-21'), 138.7 (s, C-20'), 133.8 (s, C-12), 129.8 (s, C-11), 125.9 (s, C-13), 123.7 (s, C-6'), 123.2 (s, C-17), 119.7 (p, C-19), 114.9 (s, C-21), 91.9 (p, C-13'), 89.7 (s, C-10), 81.9 (p, C-9), 80.3 (s, C-19'), 78.4 (s, C-3), 75.8 (s, C-7), 67.9 (s, C-5), 61.7 (p, C-4), 57.2 (q, 20-OCH₃), 57.1 (q, 10-OCH₃), 51.9 (s, C-14'), 50.4 (s, C-18'), 49.8 (t, C-4'), 47.4 (t, C-15), 39.5 (t, C-12'), 39.2 (q, N-CH₃), 37.6 (s, C-6), 36.2 (t, C-9'), 36.1 (t, C-8), 33.8 (t, C-2), 31.8 (t, C-2'), 26.5 (q, N'-CH₃), 24.9 (t, C-3'), 22.5 (t, C-8'), 15.8 (q, 14-CH₃), 14.7 (q, 6-CH₃), 12.4 (q, 4-CH₃) ppm; **UPLC-MS** *t*_R = 2.21 min; **HRMS** [ESI] *m/z* berechnet für C₄₇H₅₉N₇O₁₃Cl [M+H]⁺: 964.3859, gefunden 964.3856.

Furfurylansamitocin-Derivat **183**

Diels-Alder-Produkt **194** (0.4 mg, 0.43 μmol , 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst und 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde schnell auf Raumtemperatur gebracht und anschließend (ohne Einengen im Vakuum) direkt mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_{R} = 71 min) gereinigt. Triazolderivat **183** (0.3 mg, 0.37 μmol , 85 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 3.31 ppm): δ 7.83 (s, 1H, 6'-H), 7.34 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 13'-H), 7.12 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 21-H), 6.80 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, J = 11.1, 15.4 Hz, 1H, 12-H), 6.32 (dd, J = 1.6, 3.1 Hz, 1H, 12'-H), 6.08 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 6.04 (d, J = 3.1 Hz, 1H, 11'-H), 5.37 (dd, J = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.76 (dd, J = 11.9, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 7'-H), 4.18 (td, J = 2.6, 10.9 Hz, 1H, 7-H), 3.97 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (d, J = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.54 (m, 1H, 15-H_a), 3.35 (d, J = 2.2 Hz, 3H, 10-OCH₃), 3.26 (m, 1H, 15-H_b), 3.11 (s, 3H, N-CH₃), 2.82 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 4'-H), 2.76 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.63 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 9'-H), 2.57 (m, 3H, 3'-H, 2-H_a), 2.20 (q, J = 7.2 Hz, 2H, 8'-H), 2.12 (dd, J = 12.9 Hz, 1H, 2-H_b), 2.03 (m, 2H, 2'-H), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.47 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃) ppm; UPLC-MS t_{R} = 2.03 min; HRMS [ESI] m/z berechnet für C₄₁H₅₃N₅O₁₀Cl [M+H]⁺: 810.3481, gefunden 810.3450.

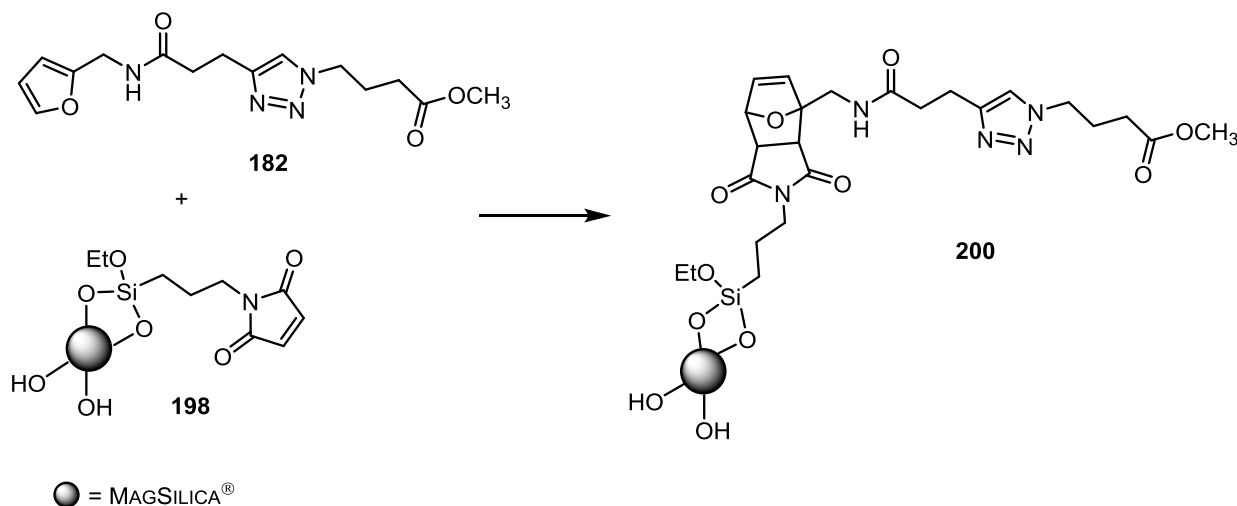
Furfurylansamitocin-Derivat **184**

Diels-Alder-Produkt **195** (0.9 mg, 0.93 μmol , 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst und 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Kühlen mit Eiswasser auf Raumtemperatur gebracht und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; $t_{\text{R}} = 65.5$ min) gereinigt. Triazolderivat **184** (0.32 mg, 0.37 μmol , 40 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 3.31$ ppm): δ 7.74 (s, 1H, 6'-H), 7.42 (dd, $J = 0.6, 1.8$ Hz, 1H, 17'-H), 7.14 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 21-H), 6.77 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, $J = 11.1, 15.4$ Hz, 1H, 12-H), 6.35 (dd, $J = 1.8, 3.2$ Hz, 1H, 16'-H), 6.19 (dd, $J = 0.6, 3.2$ Hz, 1H, 15'-H), 6.08 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.35 (dd, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, $J = 11.9, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 4'-H), 4.32 (s, 2H, 13'-H), 4.19-4.15 (m, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OCH₃), 3.56 (m, 1H, 15-H_a), 3.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (s, 3H, 10-OCH₃), 3.29 (m, 1H, 15-H_b), 3.14 (s, 3H, N-CH₃), 3.00 (td, $J = 2.9, 7.3$ Hz, 2H, 9'-H), 2.76 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, 5-H), 2.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 10'-H), 2.52 (q, $J = 8.16$ Hz, 2H, 2'-H), 2.68 (dd, $J = 12.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.63-2.56 (m, 2H, 2'-H), 2.19 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, 3'-H), 2.13 (dd, $J = 2.6, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-CH₃), 1.56-1.50 (m, 3H, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃), 0.85 (s, 3H, 4-CH₃)

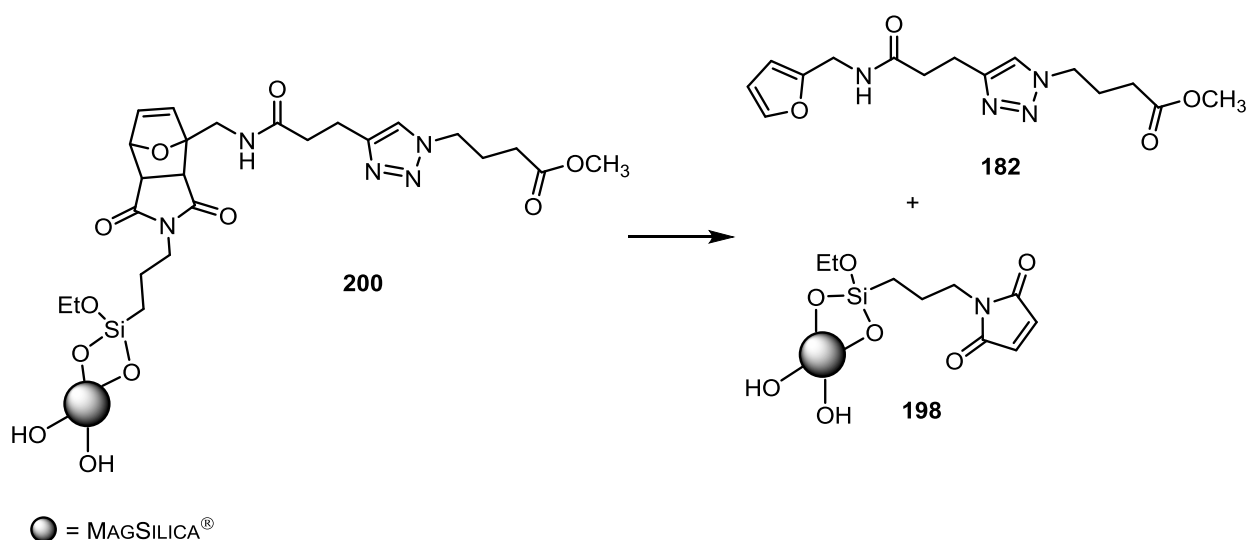
ppm; UPLC-MS $t_R = 2.37$ min; HRMS [ESI] m/z berechnet für $C_{42}H_{54}N_6O_{11}Cl$ $[M+H]^+$: 853.3539, gefunden 853.3503.

DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel 198



Furan **182** (1.5 mg, 4.68 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (0.5 mL) gelöst, mit silanisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikel (430 mg) versetzt und 4 Tage bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Furan entfernt, wobei die MAGSILICA[®]-Nanopartikel mit einem Magneten fixiert und die Lösung abpipettiert wurde. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis Furan (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient $H_2O/MeOH$ 95/5 \rightarrow 90/10 in 10 min, dann 90/10 \rightarrow 40/60 in 50 min, dann 40/60 \rightarrow 20/80 in 20 min und 20/80 \rightarrow 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; $t_R = 36.6$ min) gereinigt. Das Edukt **182** (0.7 mg, 2.19 μ mol, 47 %) wurde als farbloses Öl reisoliert. Das beschichtete MAGSILICA[®] **200** (mit 0.8 mg, 53 % aufgeladenem Furan) wurde im Vakuum getrocknet.

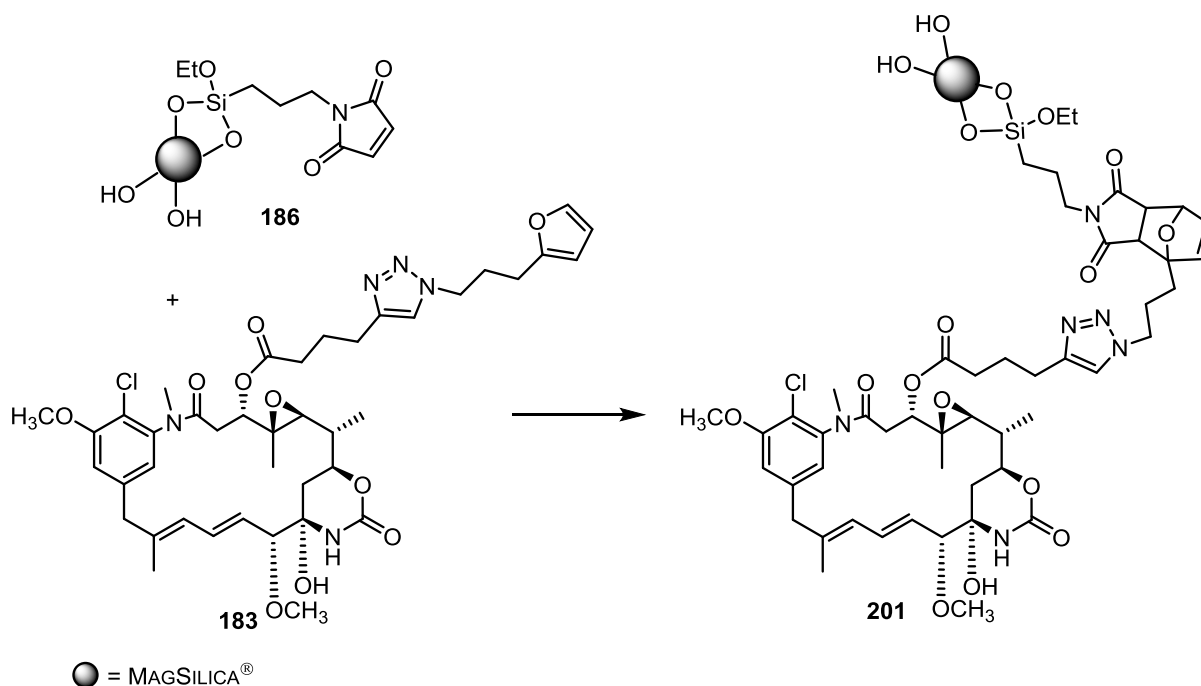
RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel **200**



Durchführung mittels konventionellem Heizens:

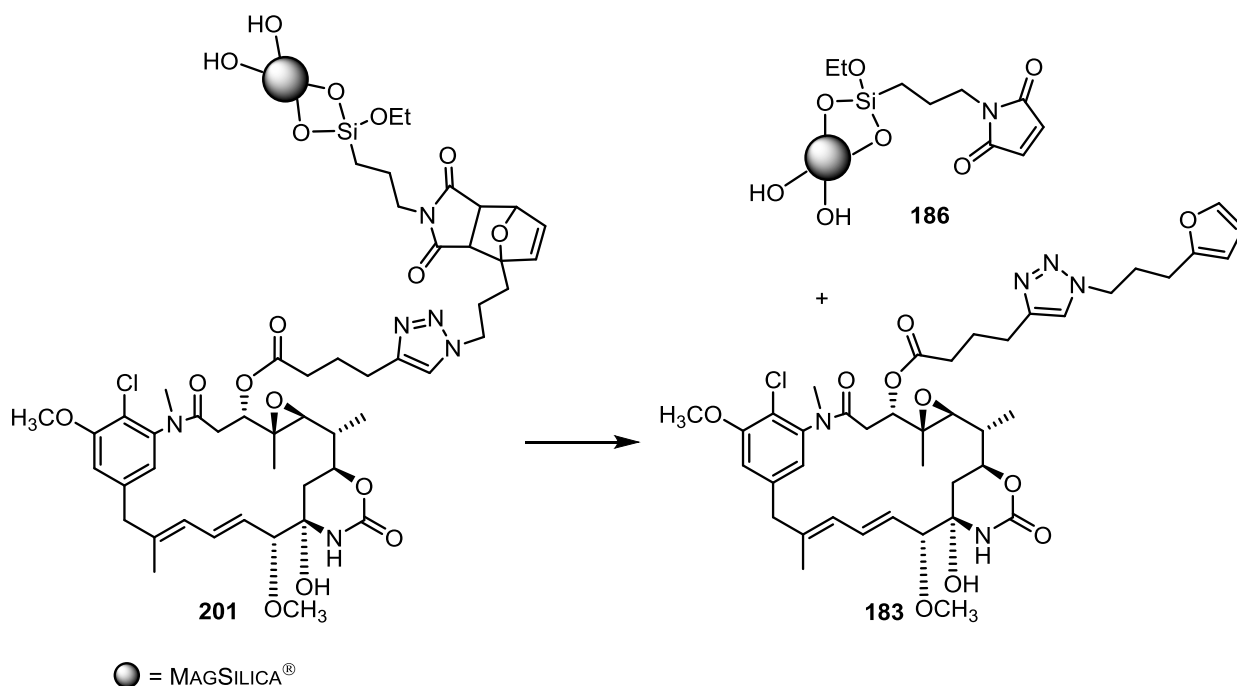
Die beschichteten MAGSILICA[®]-Nanopartikel **200** (mit 0.8 mg aufgeladenem Furan) wurden in Acetonitril (5 mL) gegeben und im Ölbad für 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Kühlung mit Eiswasser auf Raumtemperatur gebracht, die Nanopartikel wurden magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis Furan **182** (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde entfernt und der Rückstand mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 36.6 min) gereinigt. Methyl ester **182** (0.6 mg, 1.87 μmol, 86 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel



Furfurylansamitocin-Derivat **183** (1 mg, 1.24 μmol , 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst, mit silanisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikel (100 mg) versetzt und 4 Tage bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Furan entfernt, wobei die MAGSILICA[®]-Nanopartikel mit einem Magneten fixiert und die Lösung abpipettiert wurde. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis das Furan (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde entfernt und der Rückstand mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 68.5 min) gereinigt. Das Edukt **183** (0.4 mg, 0.49 μmol , 40 %) wurde als farbloser Schaum reisoliert. Das beschichtete MAGSILICA[®] **201** (mit 0.6 mg, 60 % aufgeladenem Furan) wurde im Vakuum getrocknet.

RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel **201**



Durchführung mittels konventionellem Heizens:

Die beschichteten MAGSILICA[®]-Nanopartikel **201** (mit 0.6 mg aufgeladenem Furan) wurden in Acetonitril (5 mL) gegeben und im Ölbad 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Kühlung mit Eiswasser auf Raumtemperatur gebracht, die Nanopartikel wurden magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt, bis das Furan **183** (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde entfernt und der Rückstand mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 68.5 min) gereinigt. Furfurylansamitocin-Derivat **183** (0.6 mg, 0.74 μmol, quant.) wurde als farbloser Schaum isoliert.

Durchführung mittels induktivem Heizens:

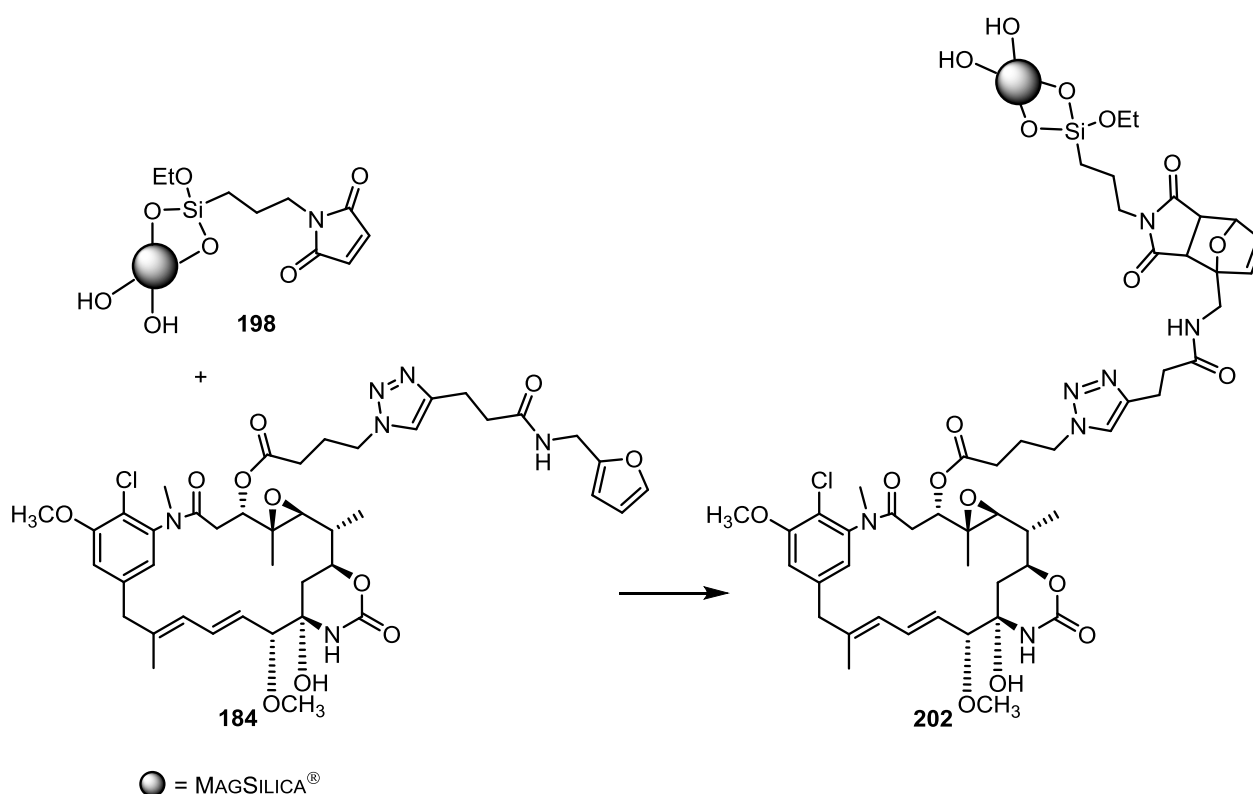
Die beschichteten MAGSILICA[®]-Nanopartikel **201** (mit 0.73 mg aufgeladenem Furan) wurden in einem Mikrowellengefäß in Acetonitril (2 mL) gegeben. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde in den Induktor eingespannt und für 5 Stunden bei einer Pulsweitenmodulation von 600 % erhitzt. Es wurde eine Temperatur von 40 °C gemessen.

Anschließend wurde das MAGSILICA[®]-Nanopartikel magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden fünfmal mit Methanol aufgeschwemmt und die methanolische Lösung entfernt. Der Rückstand wurde mittels LC/MS analysiert. Die Ausbeute wurde über UV-Absorption bei $\lambda = 248$ nm bestimmt. Die Kalibration erfolgte vorab mit dem internen Standard (3-Amino-5-brombenzoesäure) und Furfurylansamitocin **183**. Das Furfurylansamitocin-Derivat **183** (4 μ g, 5 nmol, 2 %) wurde detektiert.

Die erstellte Kalibrationsgerade, die Chromatogramme und die Massenspektren sind dem Anhang zu entnehmen.

UPLC-MS $t_R = 2.03$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{41}H_{53}N_5O_{10}Cl$ $[M+H]^+$: 810.3481, gefunden 810.3450.

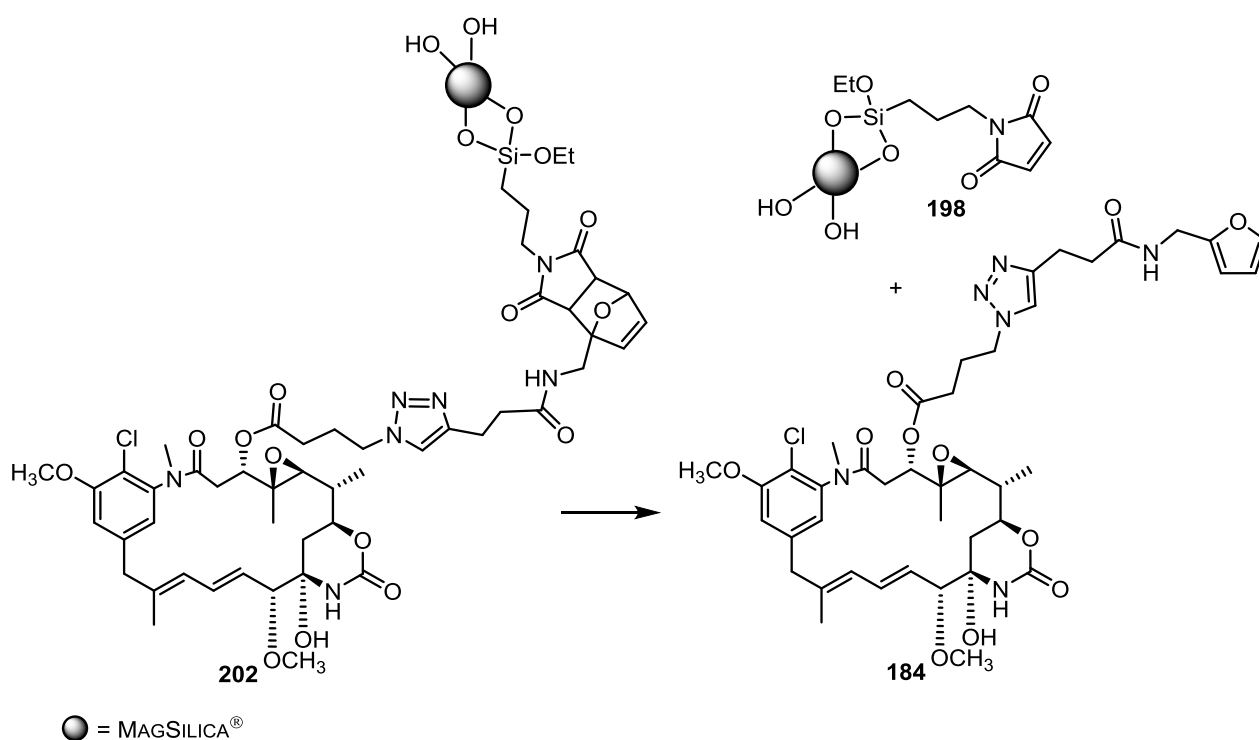
DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA[®]-Nanopartikel **202**



Furfurylansamitocin-Derivat **184** (1.1 mg, 1.2 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (1 mL) gelöst, mit silanisierten MAGSILICA[®]-Nanopartikel (120 mg) versetzt und 4 Tage bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Furan entfernt, wobei die MAGSILICA[®]-Nanopartikel mit dem Magneten fixiert und die Lösung abpipettiert wurde. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt bis das Furan (Kontrolle per

LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde entfernt und der Rückstand mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 60 min) gereinigt. Das Edukt **184** (0.5 mg, 0.59 μmol, 45 %) wurde als farbloser Schaum reisoliert. Das beschichtete MAGSILICA® **202** (mit 0.6 mg, 55 % aufgeladenem Furan) wurde im Vakuum getrocknet.

RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion an MAGSILICA®-Nanopartikel



Durchführung mittels konventionellem Heizens:

Die beschichteten MAGSILICA®-Nanopartikel **202** (mit 0.6 mg aufgeladenem Furan) wurden in Acetonitril (5 mL) gegeben und 4 Stunden bei 110 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde schnell auf Raumtemperatur gebracht, die Nanopartikel wurden magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden solange mit Methanol aufgeschwemmt, bis das Furan **184** (Kontrolle per LC/MS) nicht mehr nachweisbar war. Die methanolische Lösung wurde entfernt und der Rückstand mittels semipräp.-HPLC (C-18-ISIS-Phase; Gradient H₂O/MeOH 95/5 → 90/10 in 10 min, dann 90/10 → 40/60 in 50 min, dann 40/60 → 20/80 in 20 min und 20/80 → 100 % MeOH in 10 min; Fluss 2.25 mL/min; t_R = 60 min) gereinigt. Furfurylansamitocin-Derivat **184** (0.6 mg, 0.7 μmol, quant.) wurde als farbloser Schaum isoliert.

Durchführung mittels induktiven Heizens:

Die beschichteten MAGSILICA[®]-Nanopartikel **202** (mit 0.5 mg aufgeladenem Furan) wurden in einem Mikrowellengefäß in Acetonitril (2 mL) gegeben. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde in den Induktor eingespannt und 5 Stunden bei einer Pulsweitenmodulation von 600 % erhitzt. Es wurde eine Temperatur von 40 °C gemessen.

Anschließend wurde das MAGSILICA[®]-Nanopartikel magnetisch fixiert und die Lösung abpipettiert. Die Partikel wurden fünfmal mit Methanol aufgeschwemmt und die methanolische Lösung wurde entfernt. Der Rückstand wurde mittels LC/MS analysiert. Die Ausbeute wurde über UV-Absorption bei $\lambda = 248$ nm bestimmt. Die Kalibration erfolgte vorab mit dem internen Standard (3-Amino-5-brombenzoesäure) und Furfurylansamitocin **184**. Das Furfurylamidoansamitocin-Derivat **184** (124 µg, 0.15 µmol, 25 %) wurde detektiert.

Die erstellte Kalibrationsgerade, die Chromatogramme und die Massenspektren sind dem Anhang zu entnehmen.

UPLC-MS $t_R = 2.37$ min; **HRMS** [ESI] m/z berechnet für $C_{42}H_{54}N_6O_{11}Cl$ $[M+H]^+$: 853.3539, gefunden 853.3503.

7 ANHANG

7.1 Quantifizierung mittels Kalibrationsgeraden (LC/MS)

Alle durchgeführten Quantifizierungen mittels Kalibrationsgeraden wurden unter Verwendung der C18-RP-Säule, bei $\lambda = 248$ nm durchgeführt. Zu den Kalibrierstandardlösungen sowie der Probelösung wurde die gleiche Menge eines internen Standards zugefügt. Als Interner Standard wurde 3-Amino-5-brombenzoesäure verwendet. Es wurden 10 μL der erstellten Maßlösungen, sowie der untersuchten Proben injiziert. Die Integration von mittels LC/MS erhaltenen UV-Signalen wurde mit dem Programm MassLynx V4.1 durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Fermentationsendvolumen zur Quantifizierung bestimmt und in die Berechnung einbezogen. Die Konzentrationsangaben basieren nicht auf die tatsächliche Konzentration nach der Fermentation, sondern auf den standardisierten Ansamitocin-Titer.

7.1.1 Quantifizierung von Ansamitocin P-3 (22) Produktion in Phytohormonenstudien

Die in Kapitel 4.3 beschriebenen Quantifizierungen in den Phytohormonenstudien basieren auf der abgebildeten Kalibriergerade (Abbildung 43).

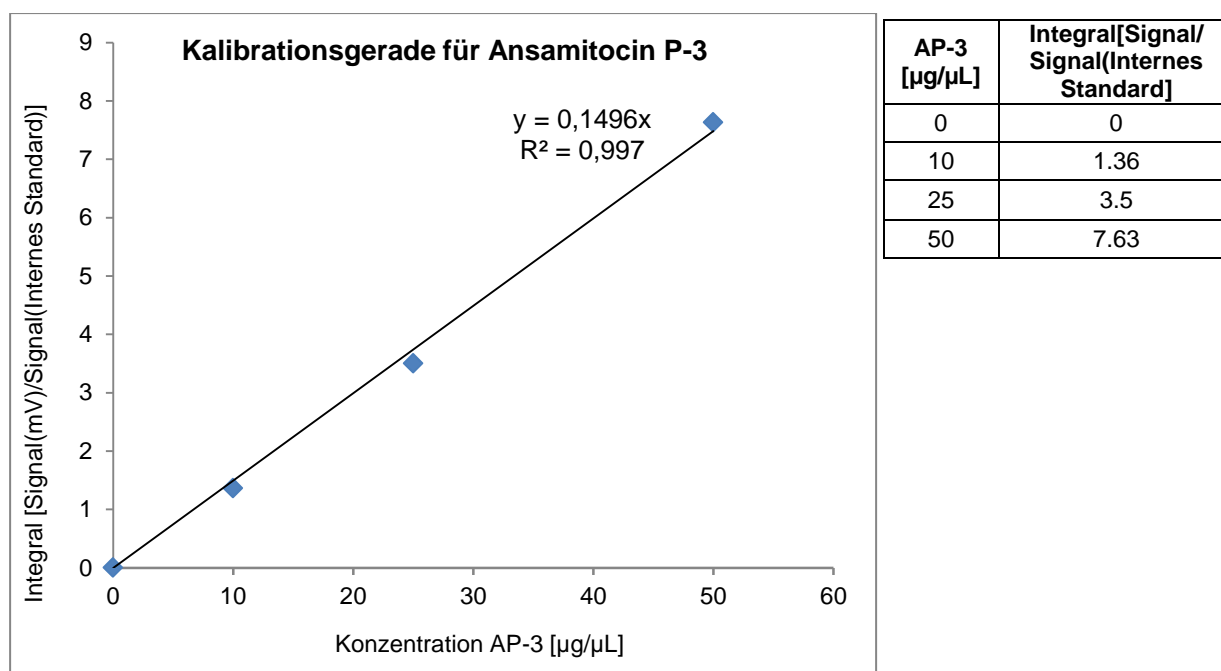
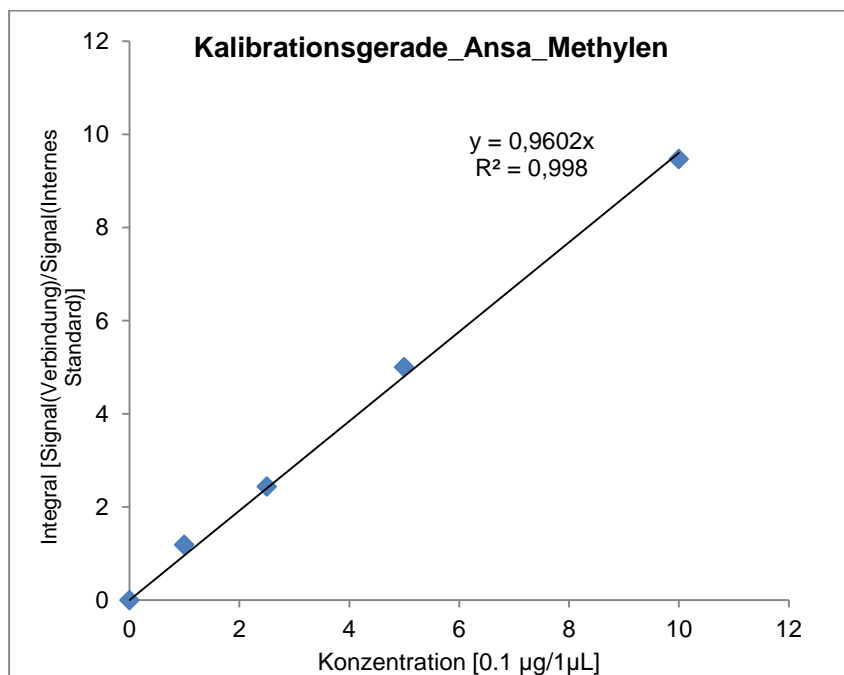


Abbildung 43: Kalibriergerade für die quantitative Bestimmung der Ansamitocin P-3 (22) Produktion.

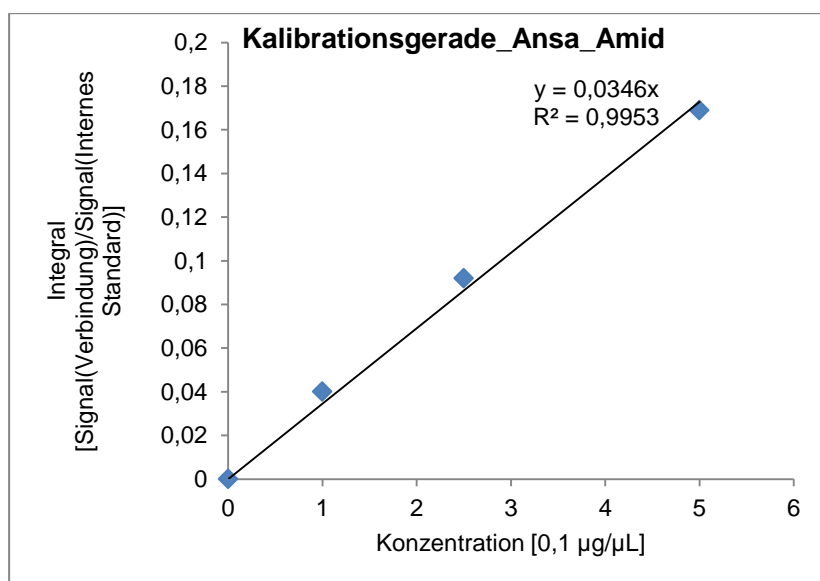
7.1.2 Quantifizierung von den auf die Nanopartikel aufgeladenen Ansamitocin-Derivaten 188 und 189

Die in Kapitel 4.3 beschriebenen Quantifizierungen von Ansamitocin-Derivaten **183** und **184** mit dem Methylene- bzw. Amid-Linker in RETRO-DIELS-ALDER-Reaktion basieren auf den abgebildeten Kalibriergeraden (Abbildung 44 und Abbildung 45).



Ansa-CH ₂ 183 [µg/µL]	Integral[Signal/ Signal(Internes Standard)]
0	0
1	1.19
2.5	2.44
5	5
10	9.47

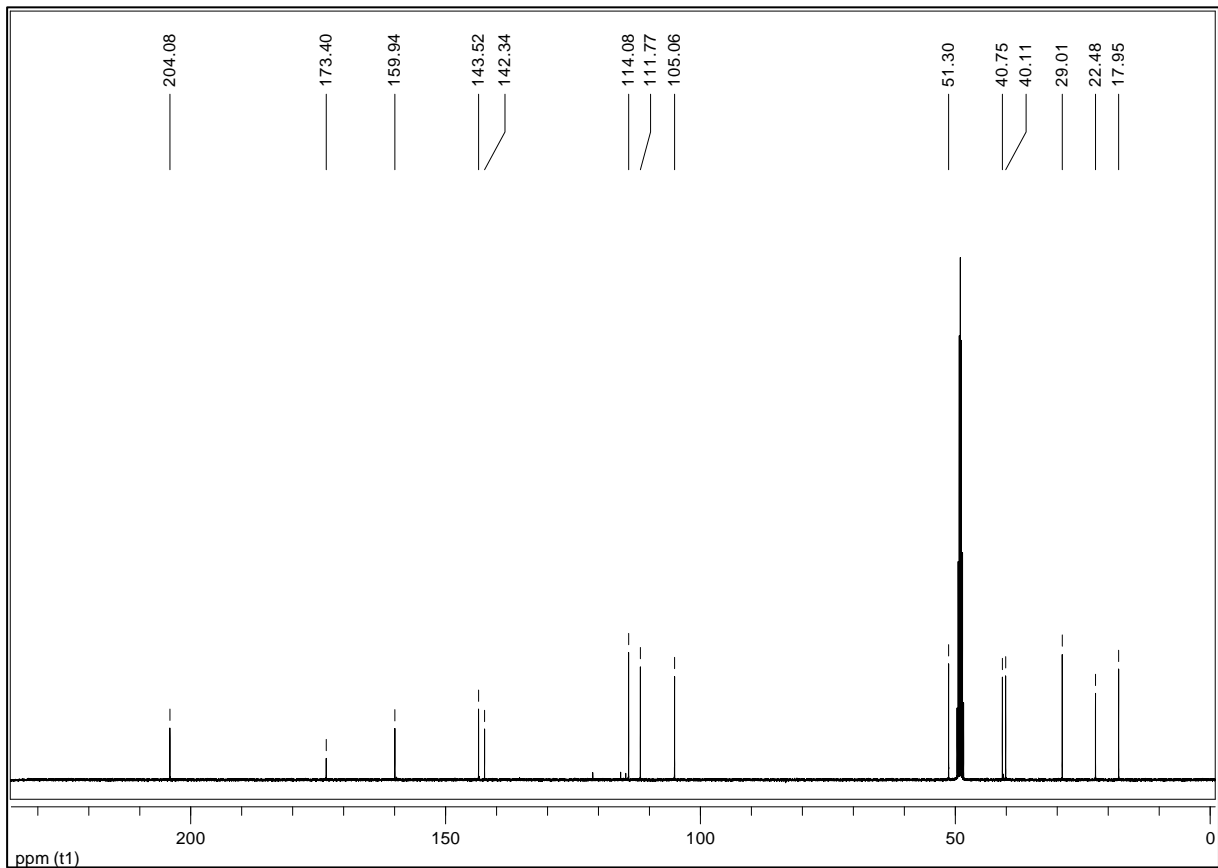
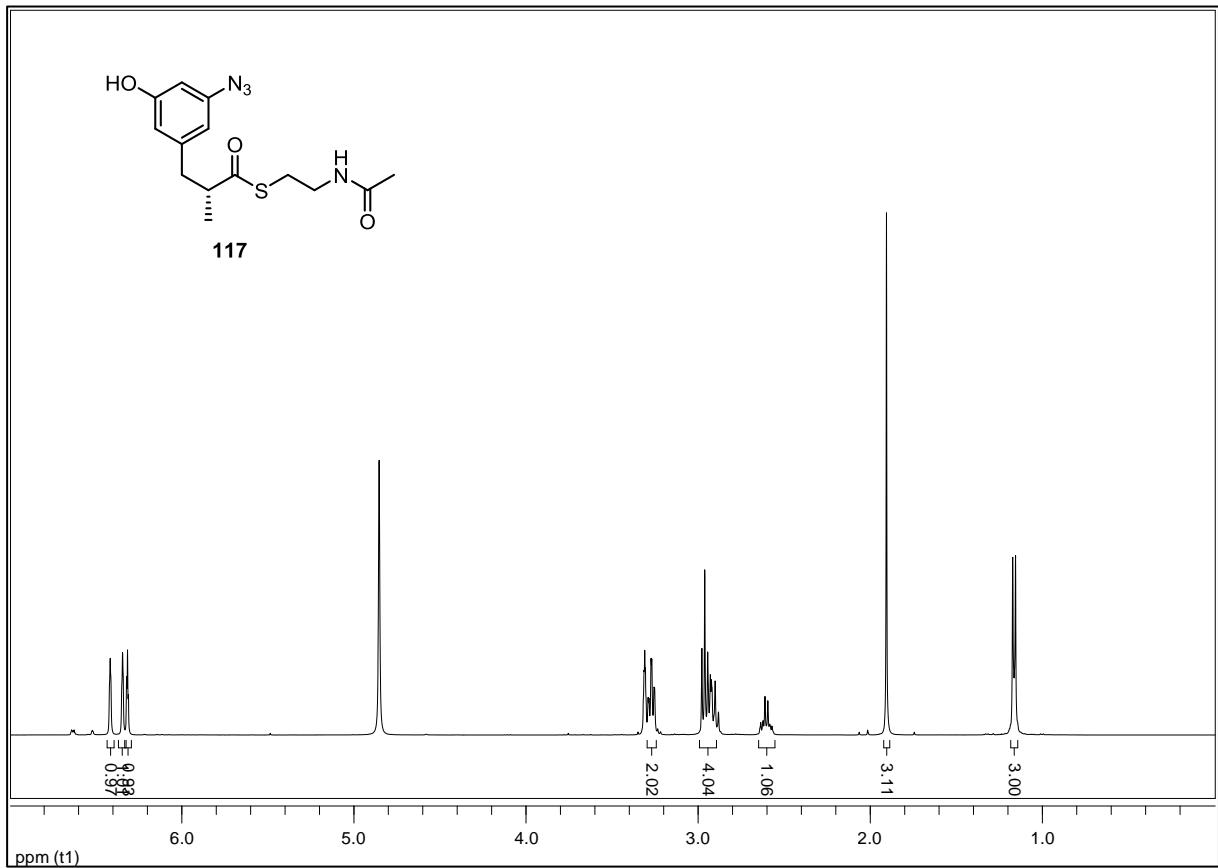
Abbildung 44: Kalibriergerade für quantitative Bestimmung der Abspaltung von dem auf Nanopartikel aufgeladenen Ansamitocin-Derivat **183**.

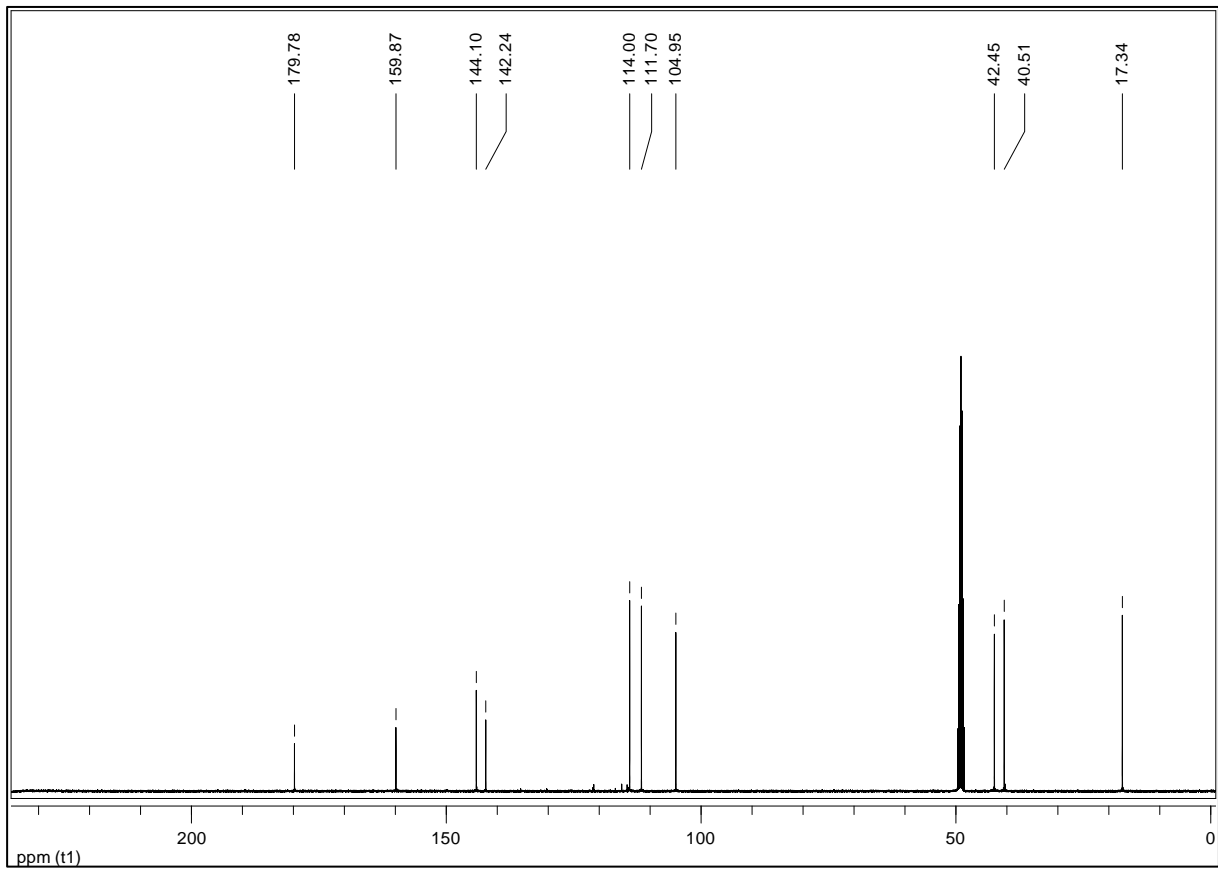
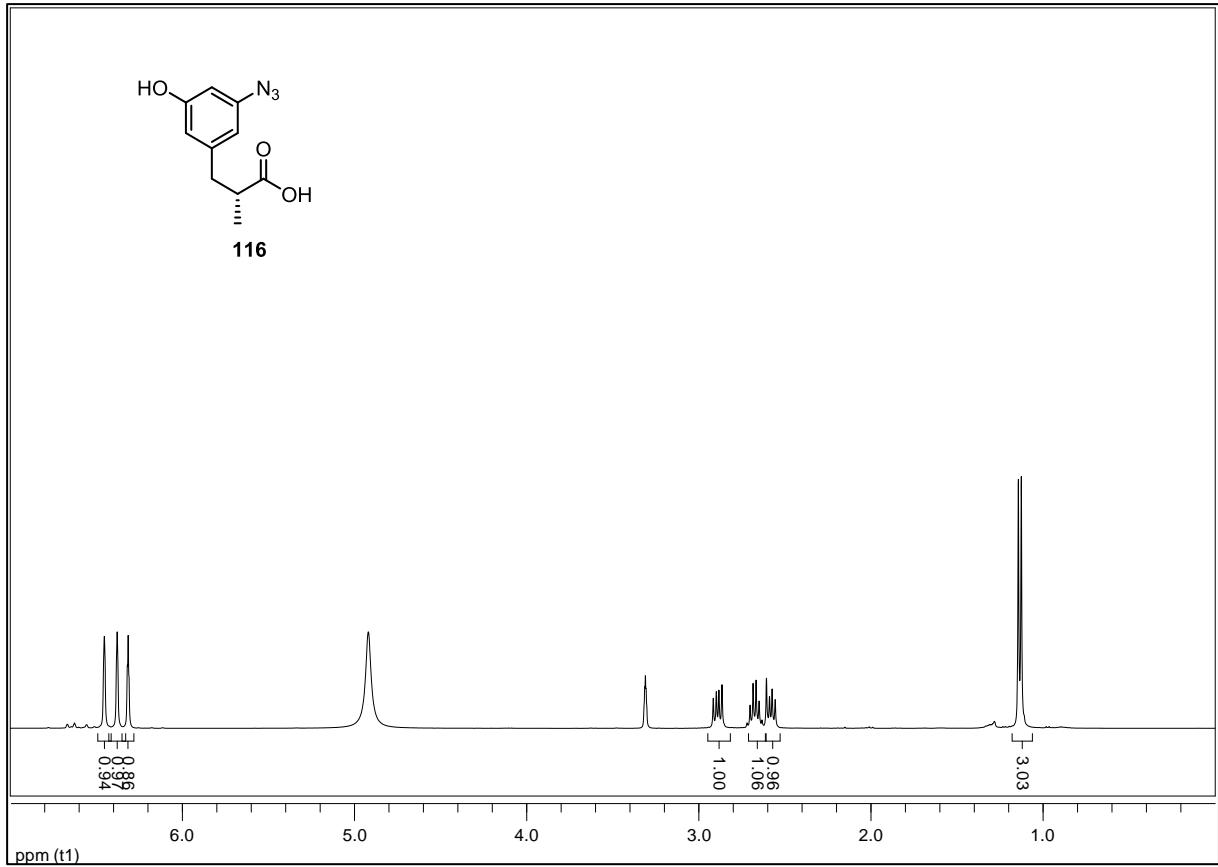


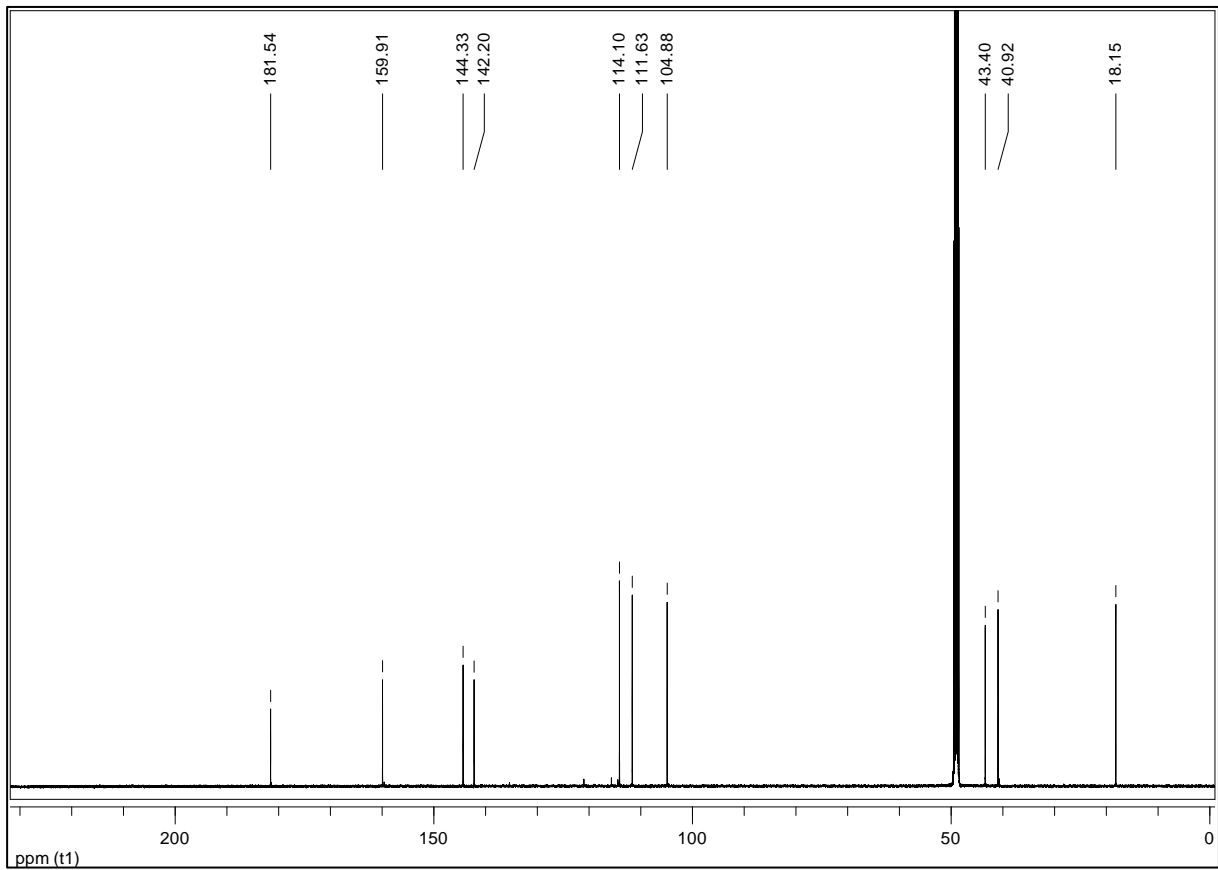
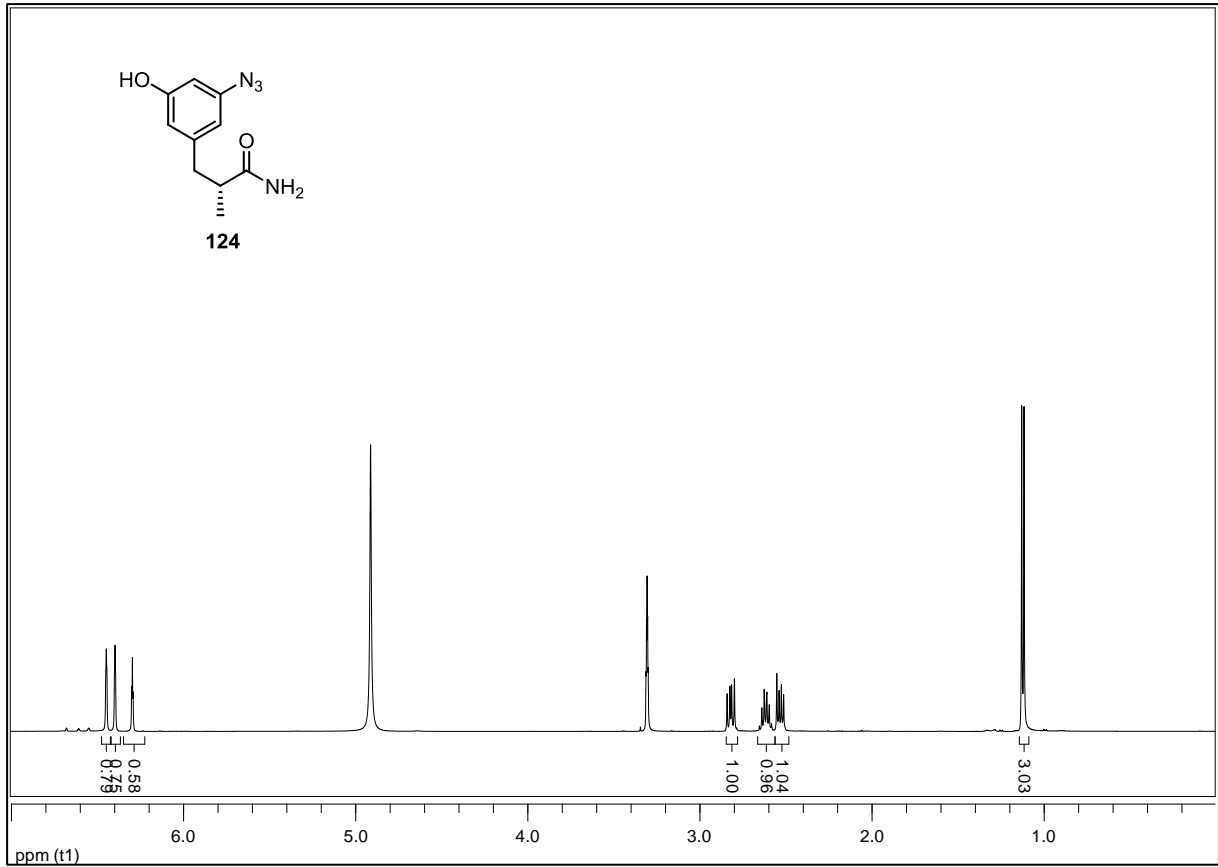
Ansa-Amid 184 [µg/µL]	Integral[Signal/ Signal(Internes Standard)]
0	0
1	0.04
2.5	0.092
5	0.169

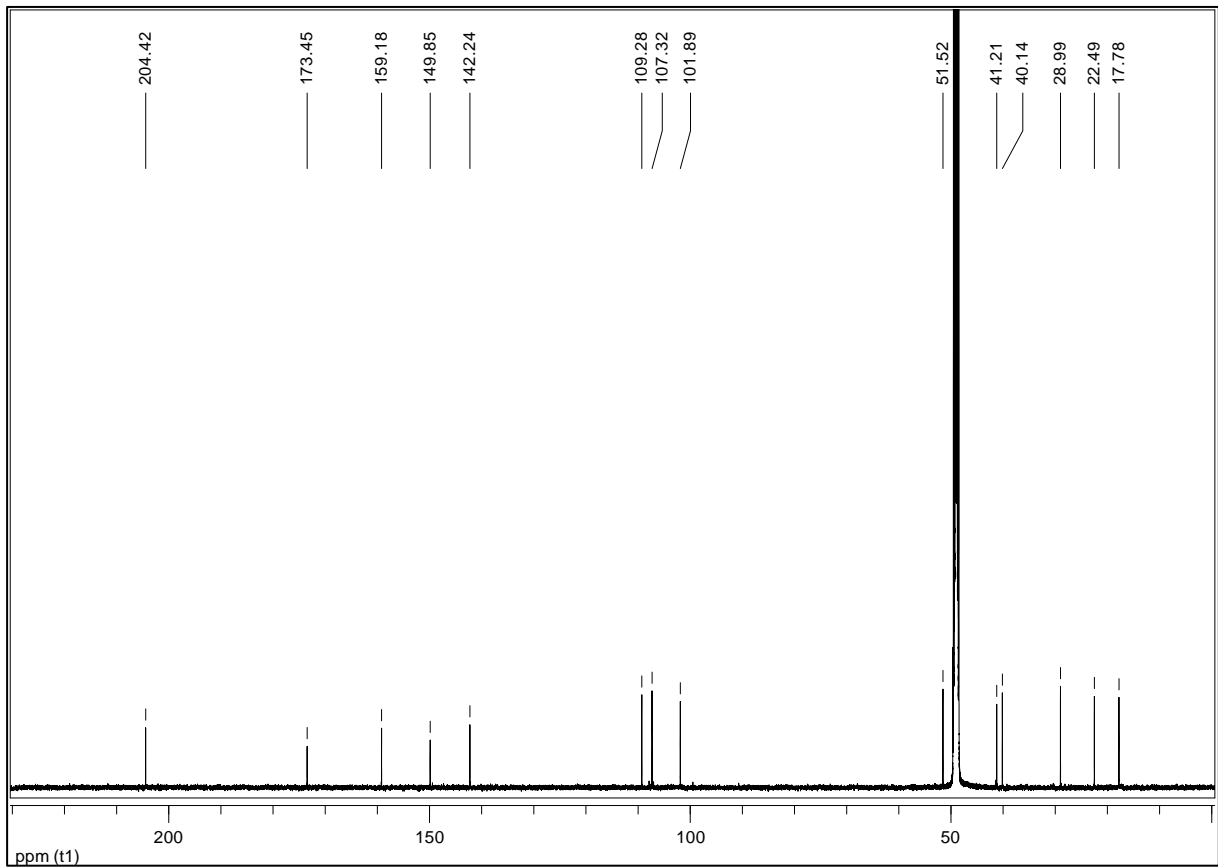
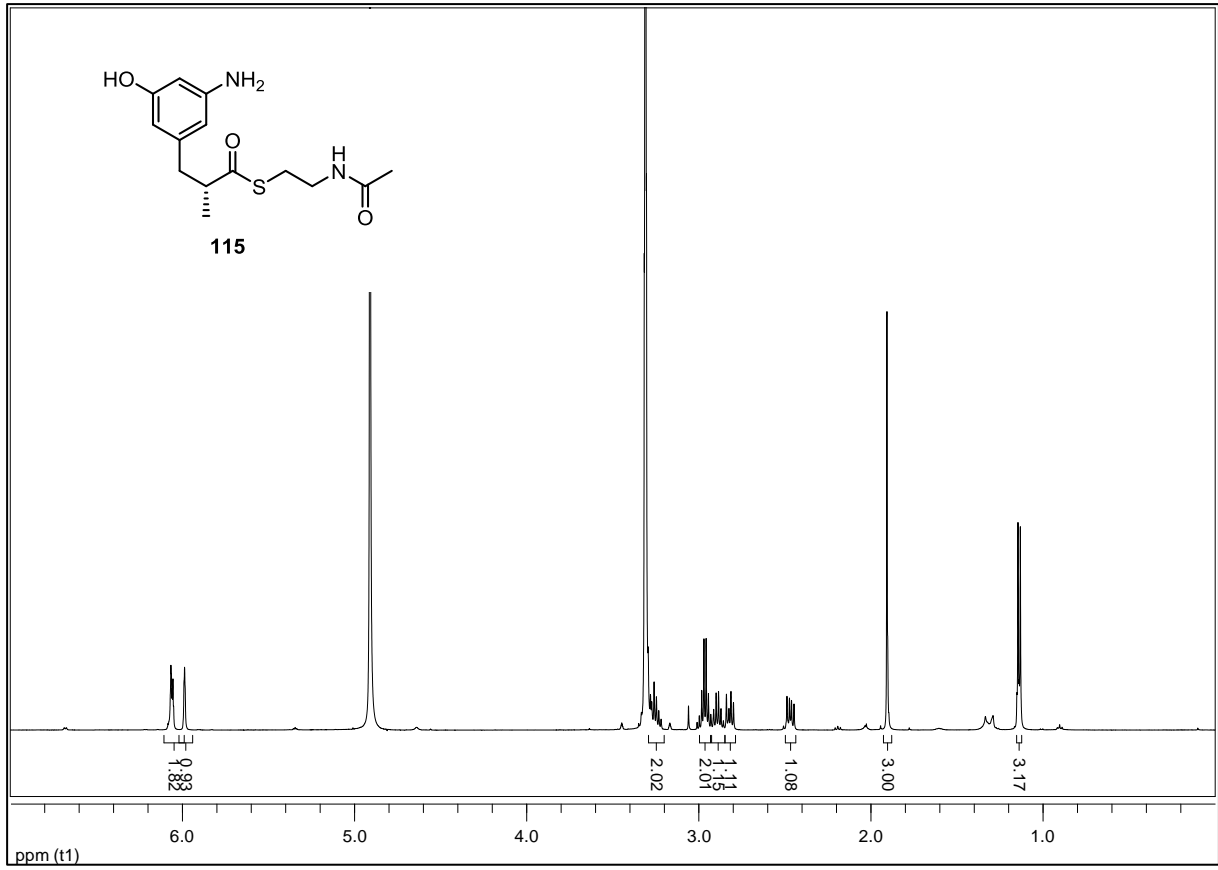
Abbildung 45: Kalibriergerade für quantitative Bestimmung der Abspaltung von dem auf Nanopartikel aufgeladenen Ansamitocin-Derivat **184**.

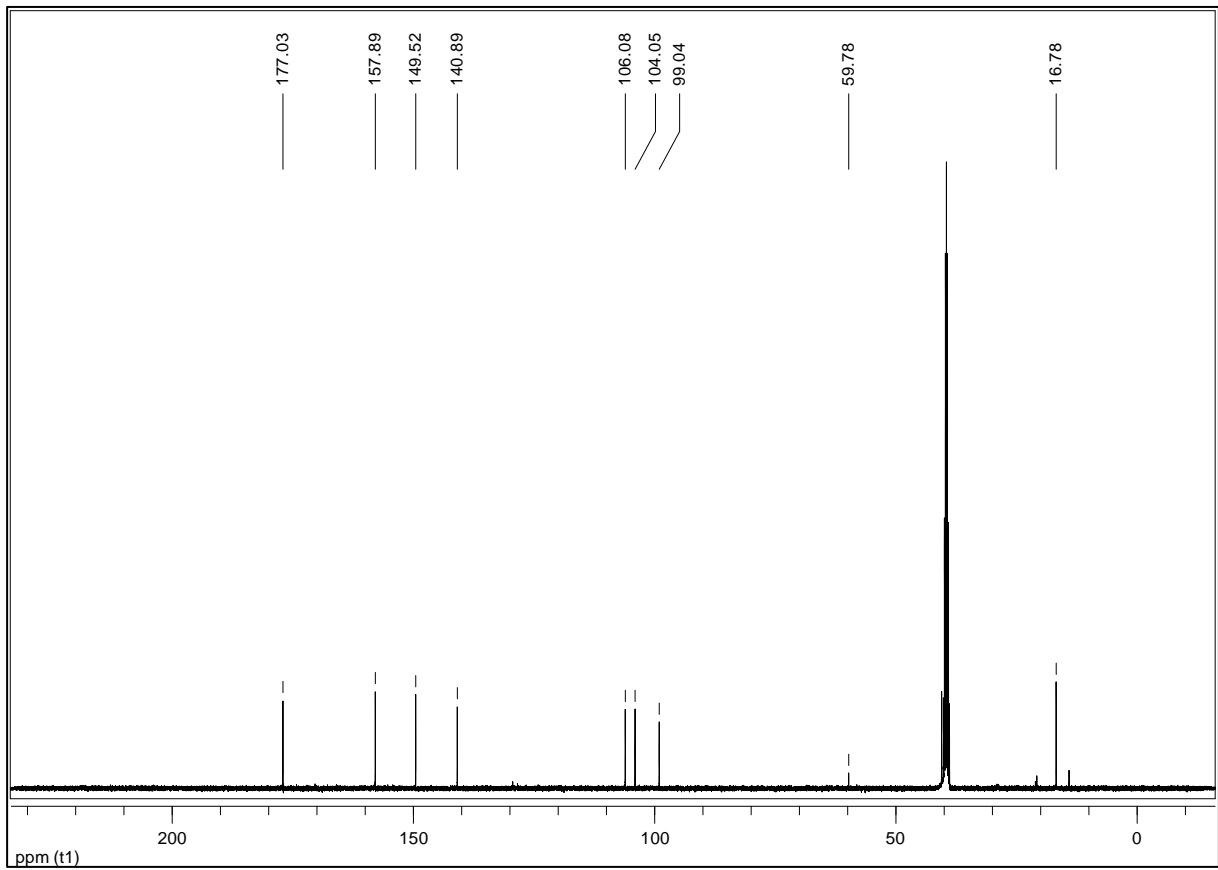
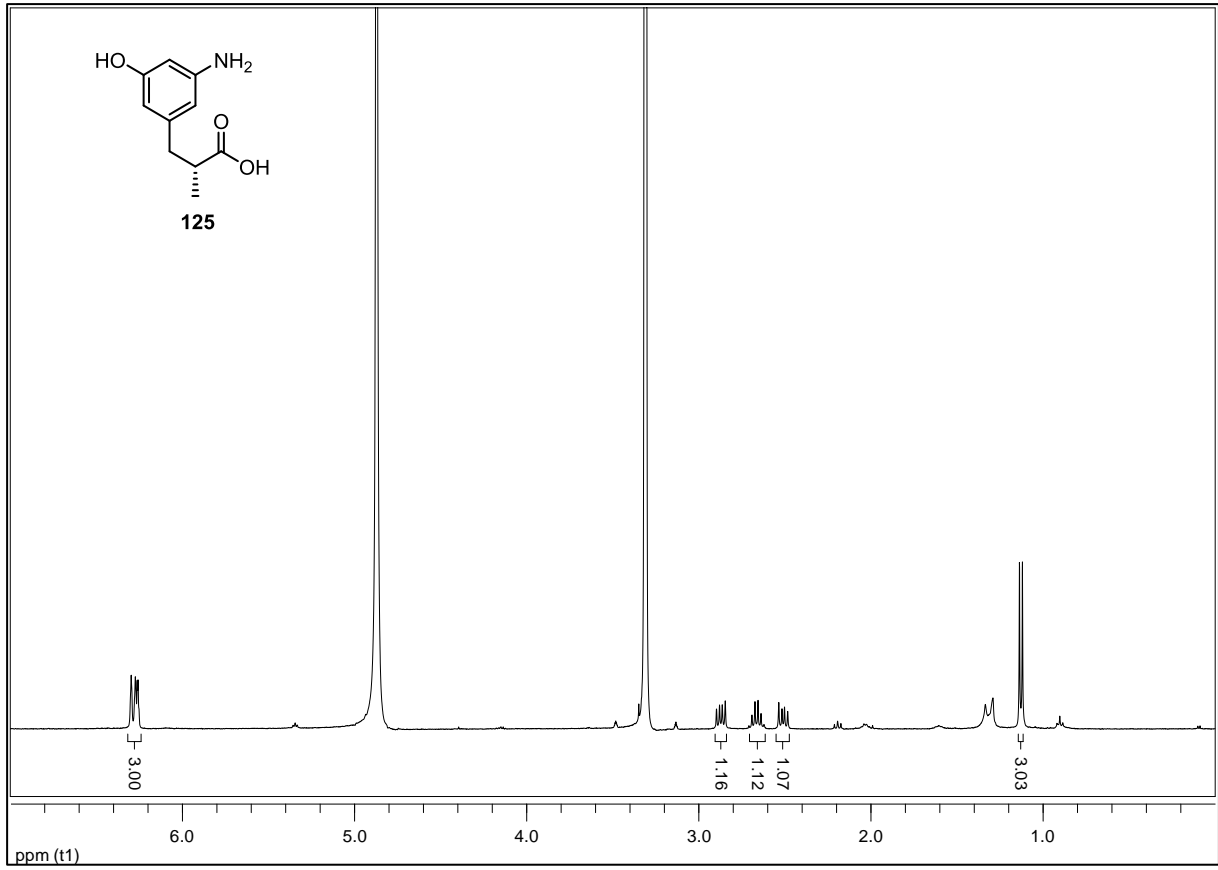
7.2 NMR-Spektren

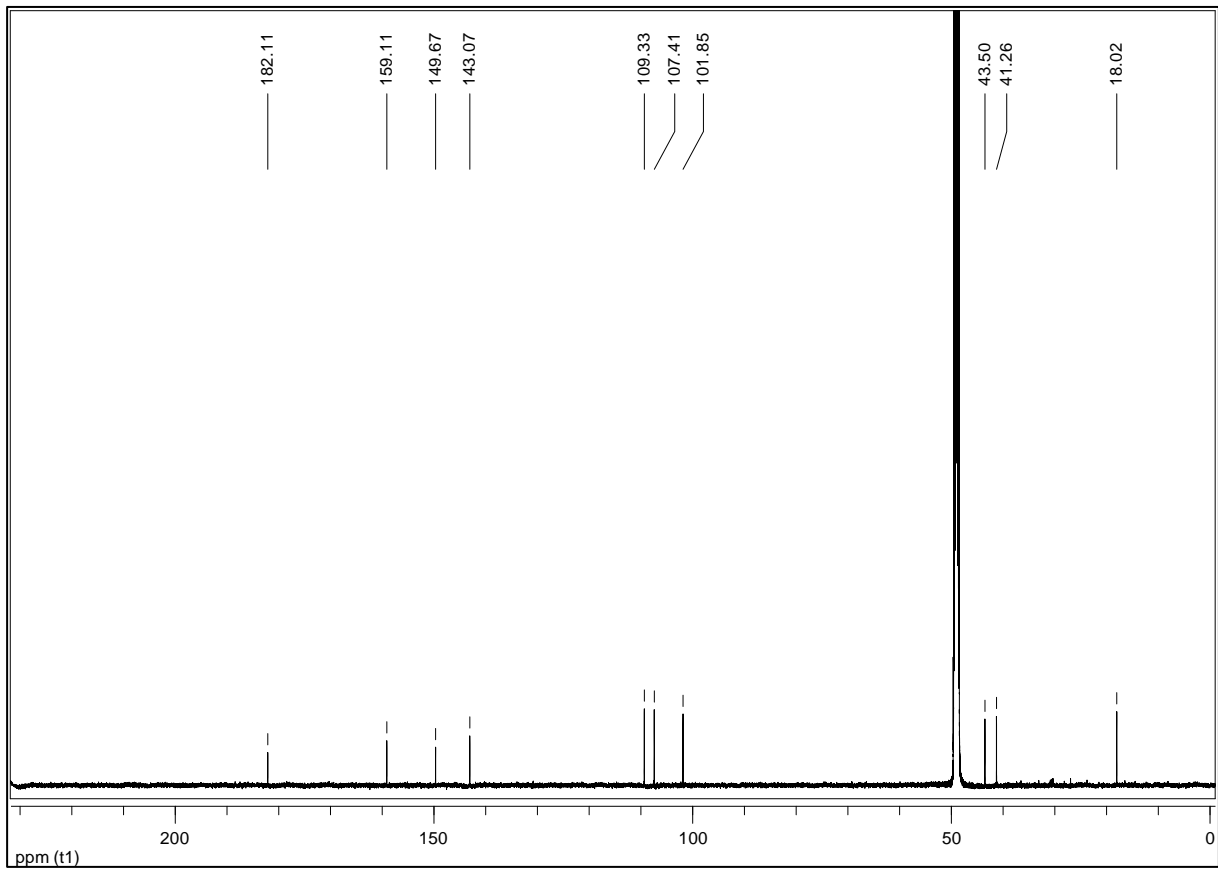
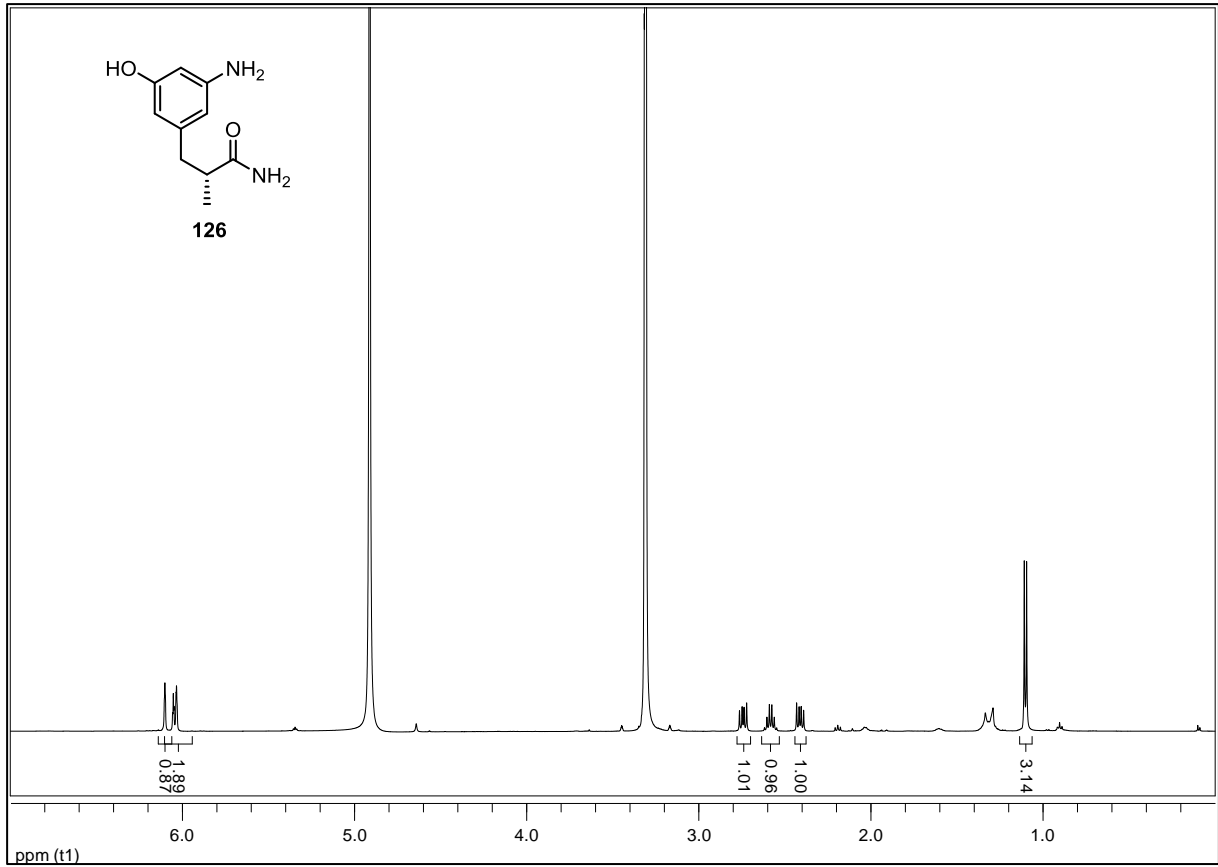


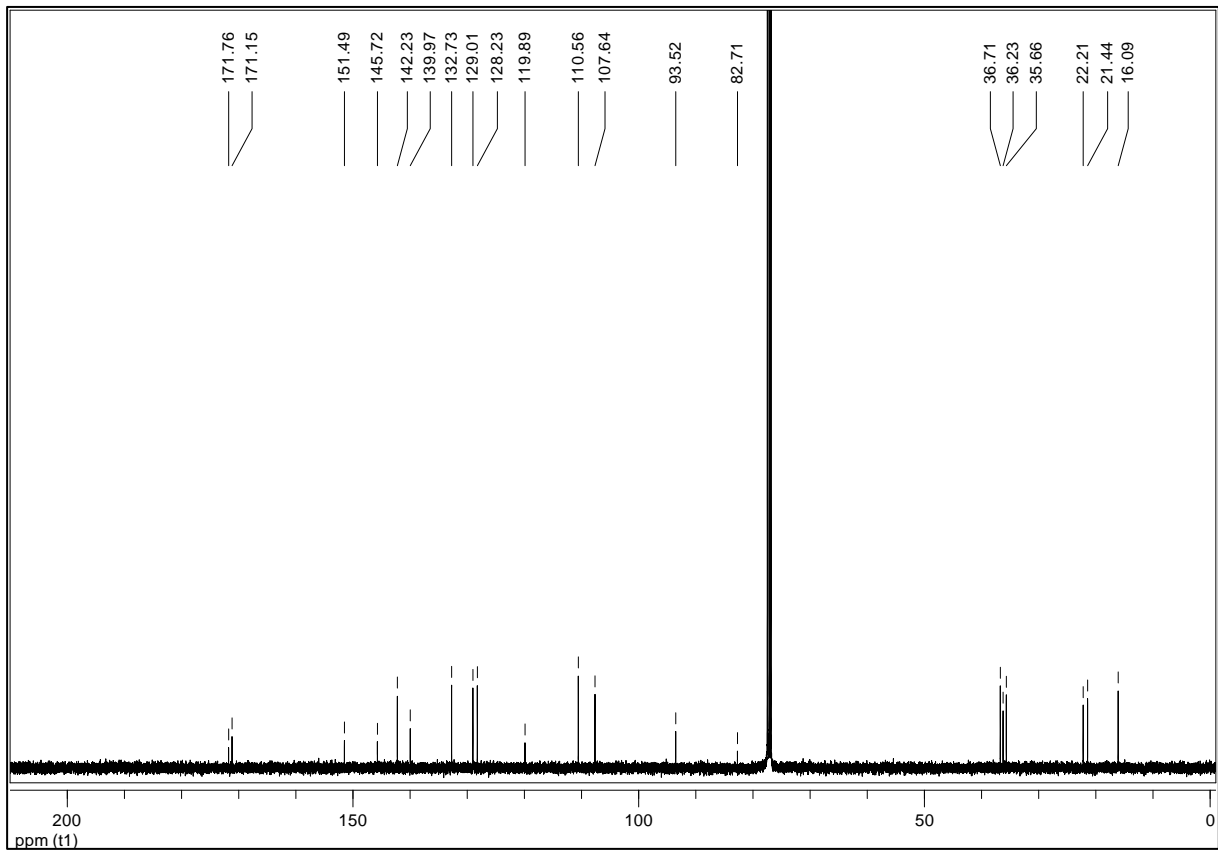
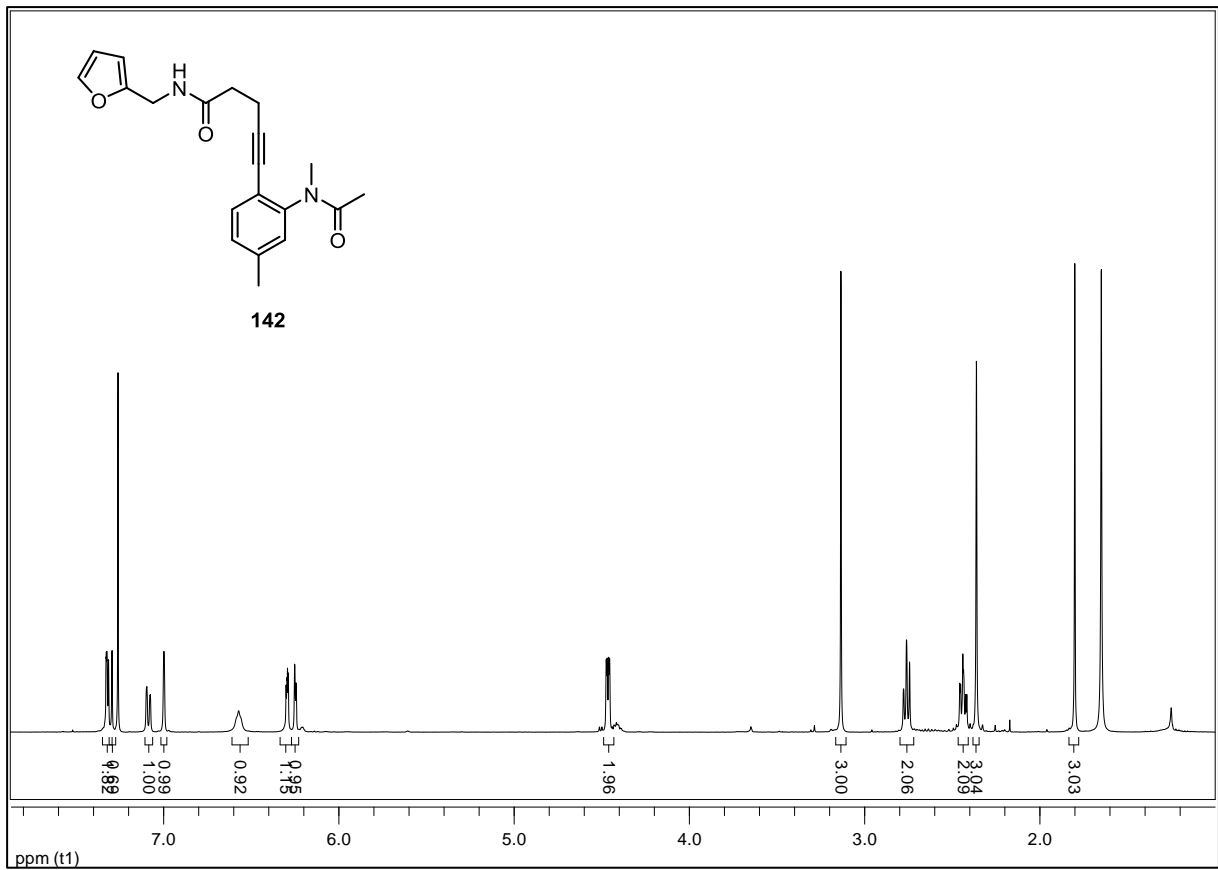


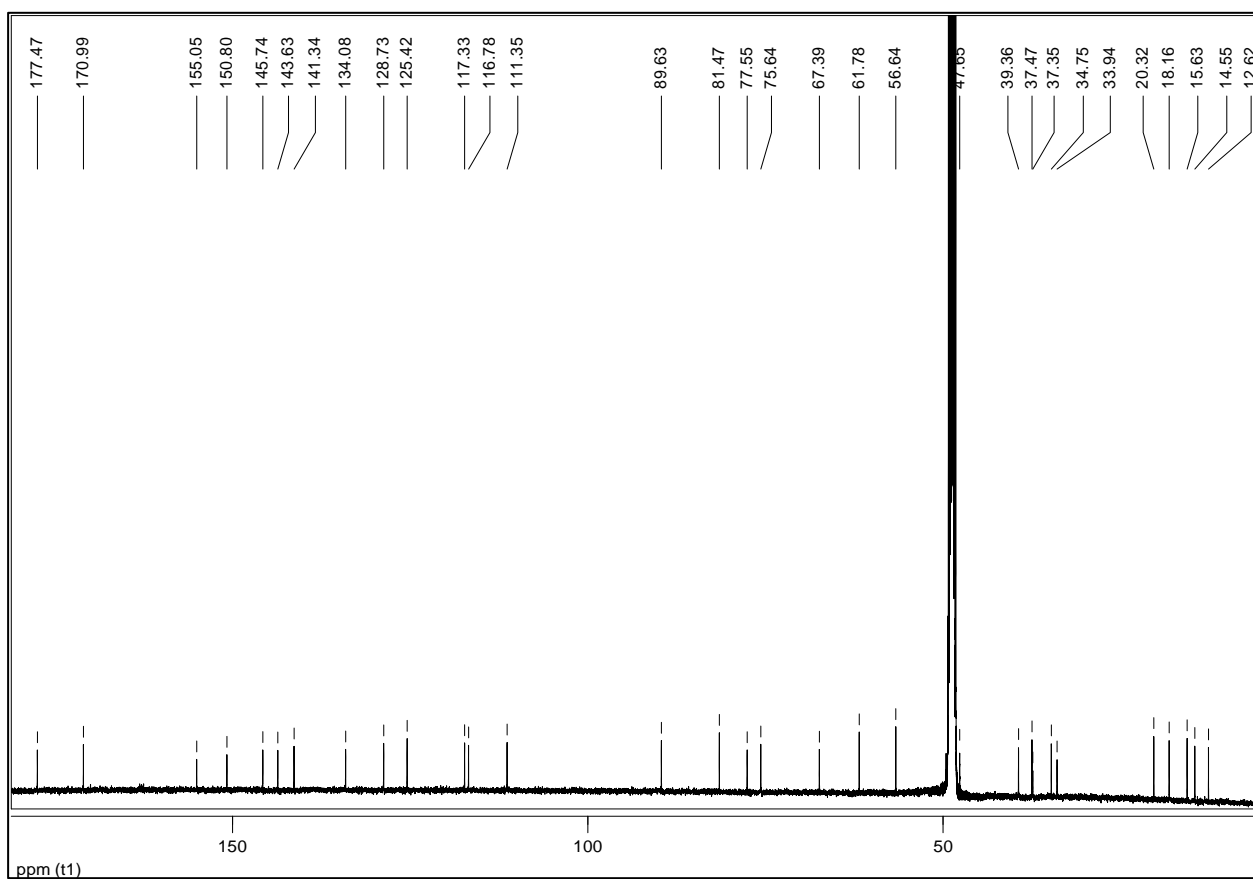
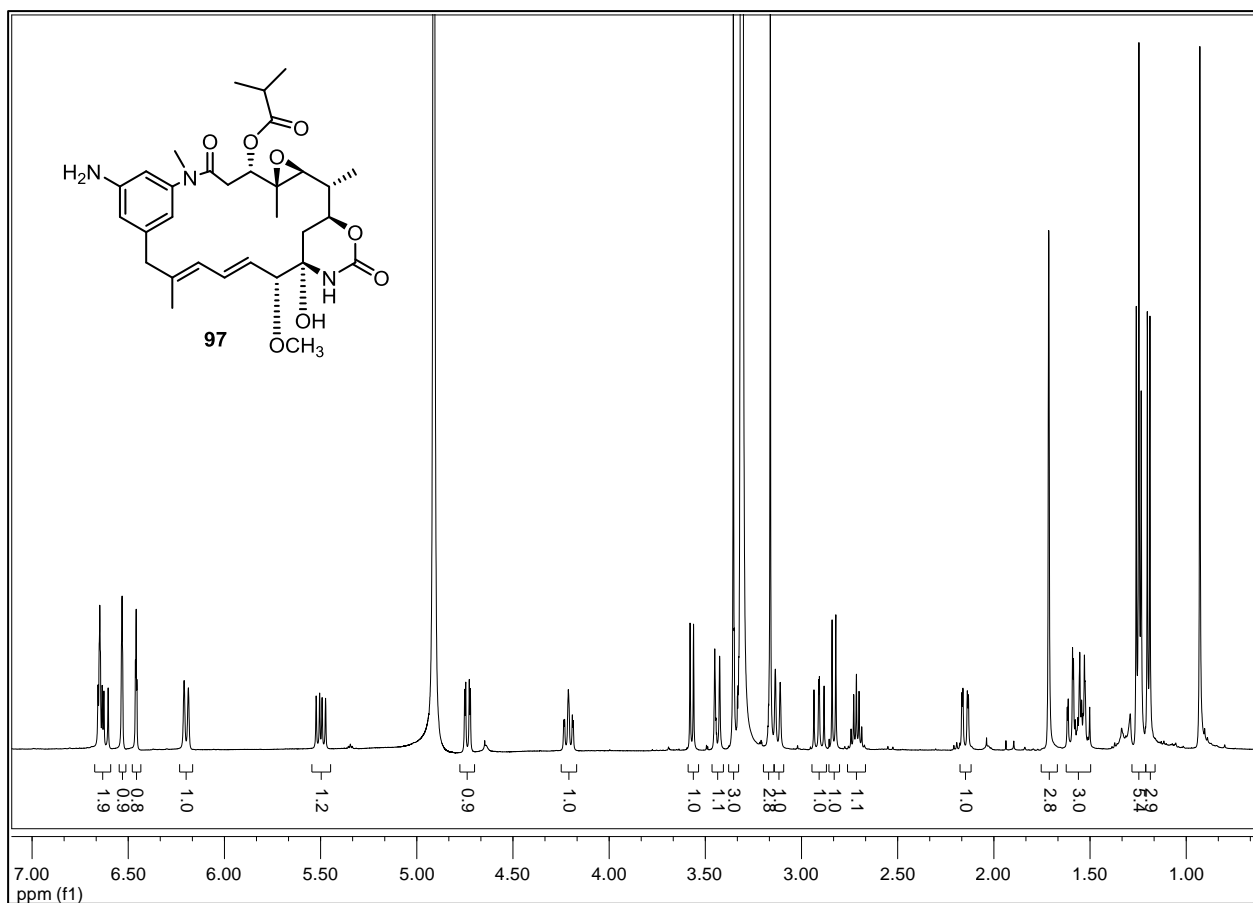


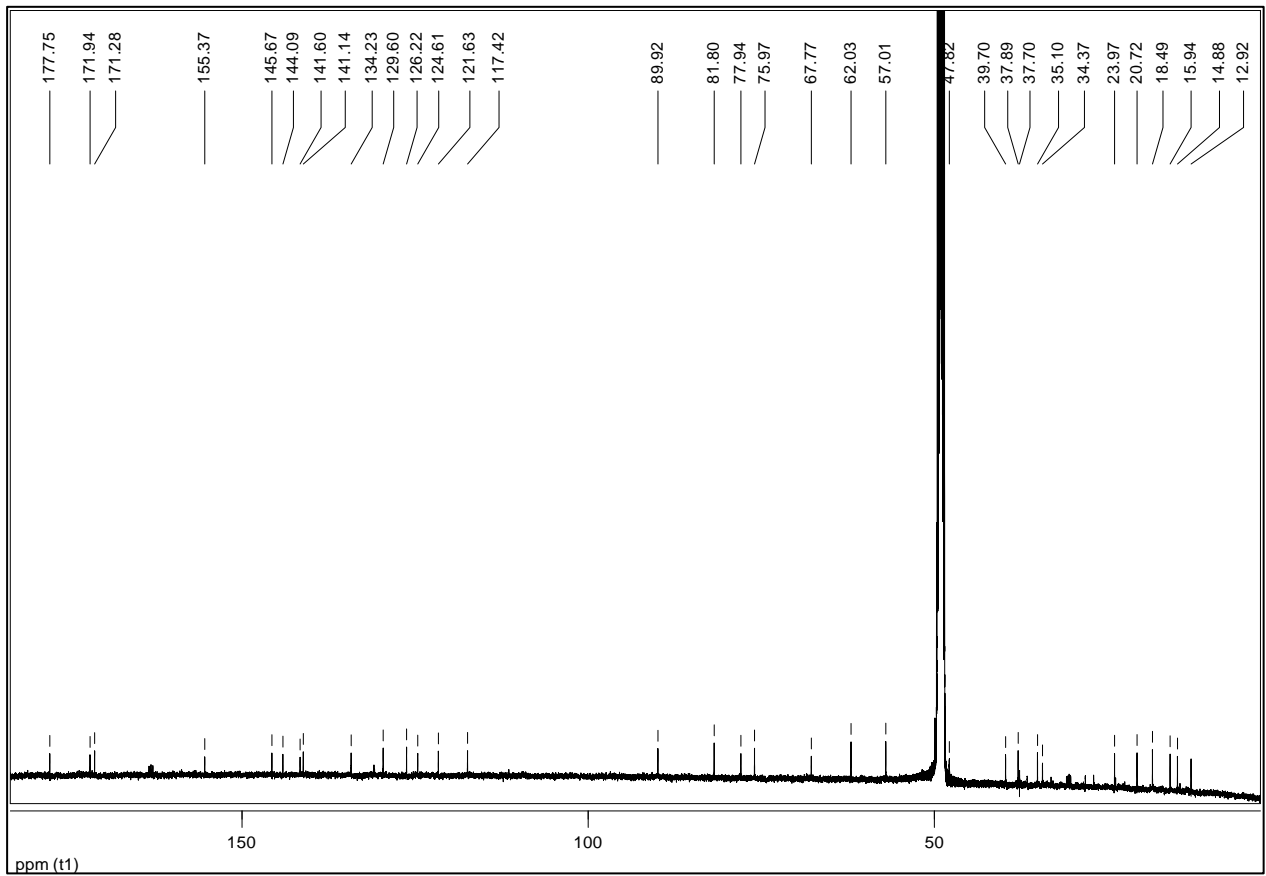
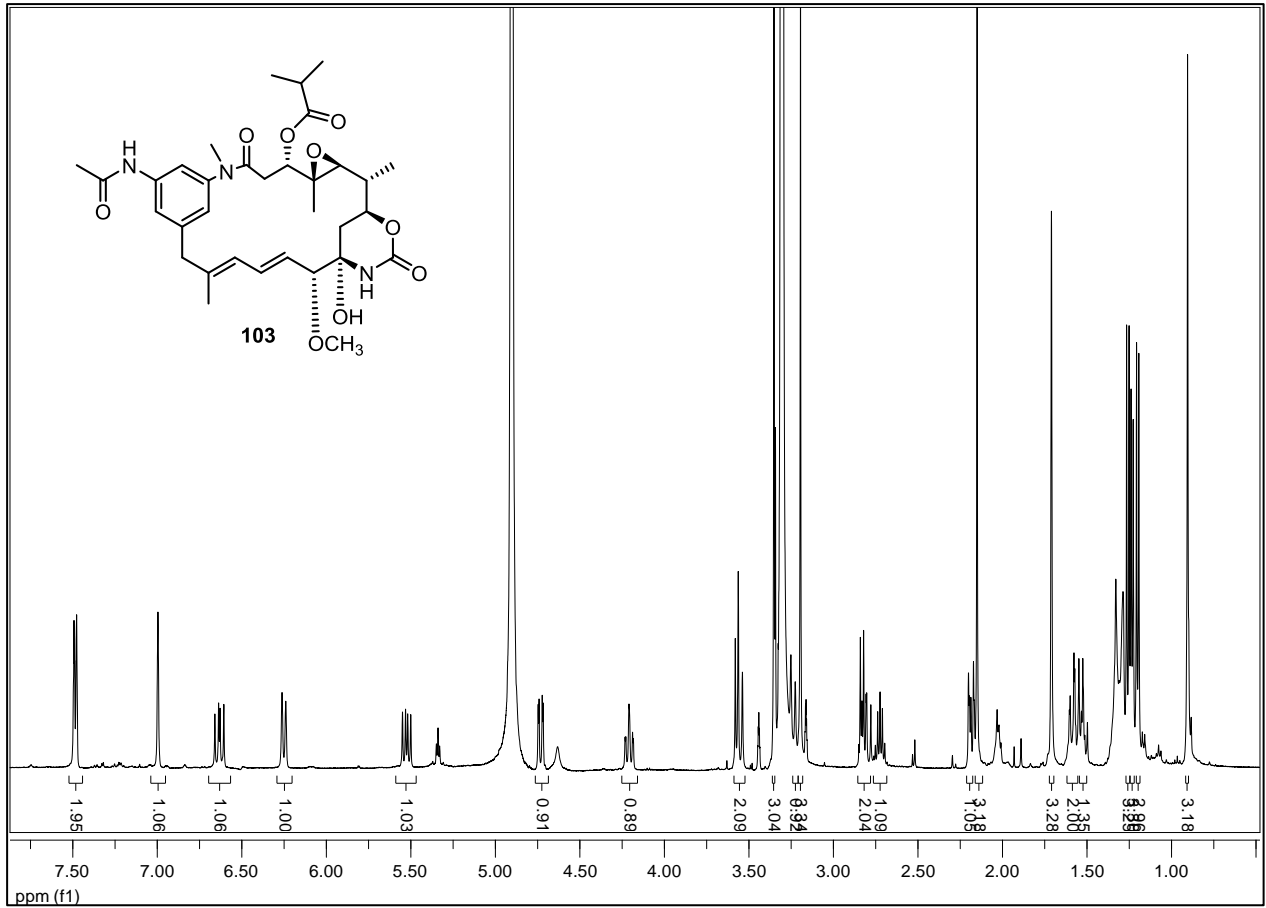


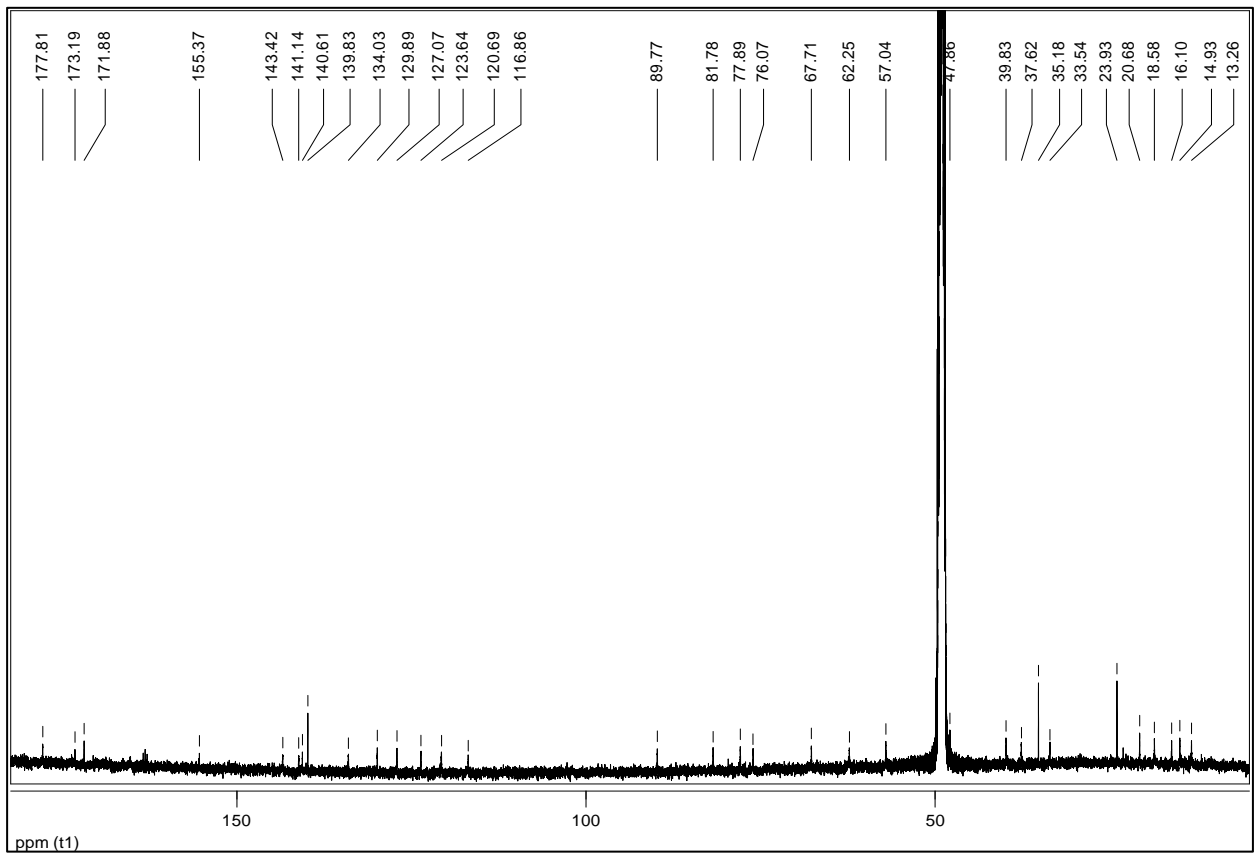
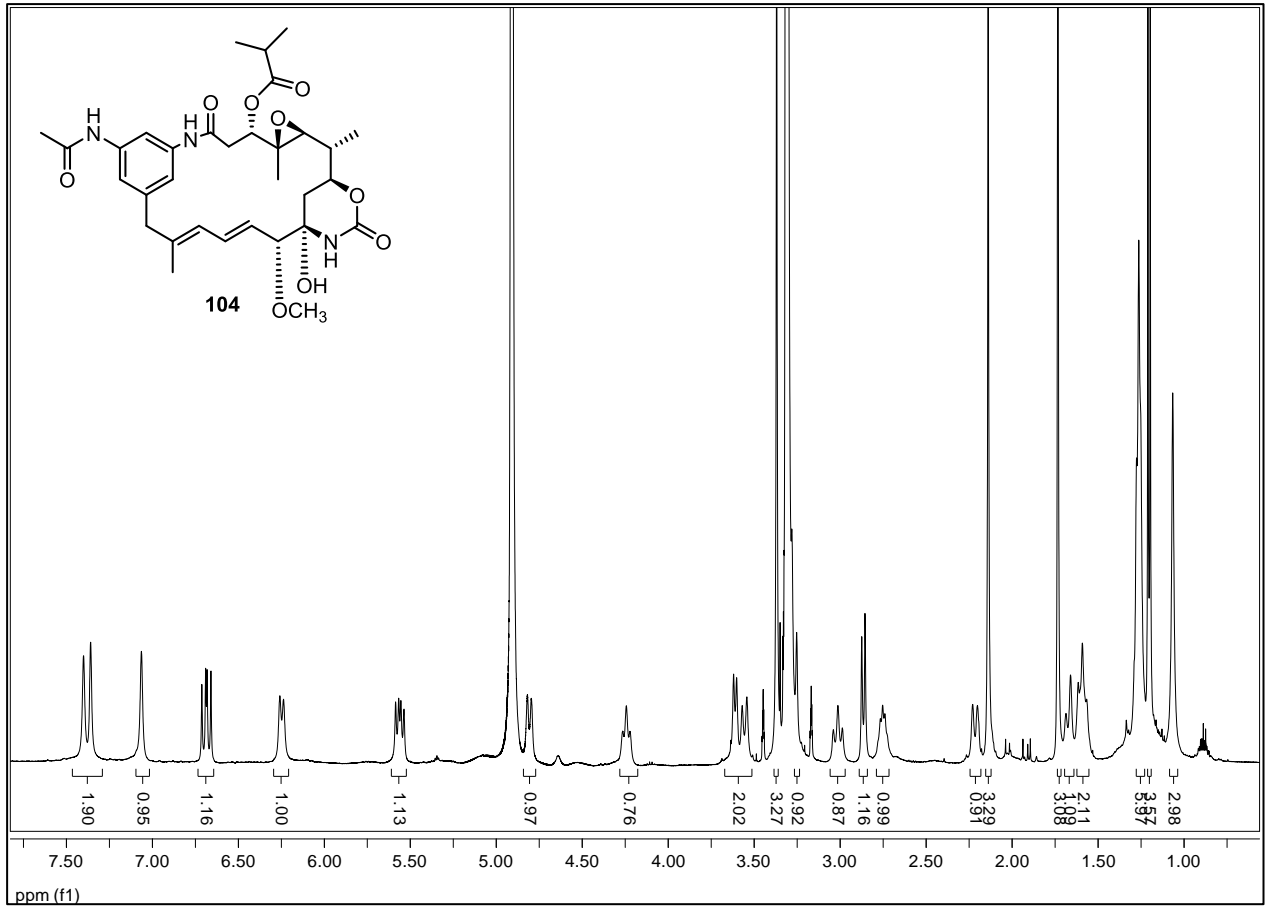


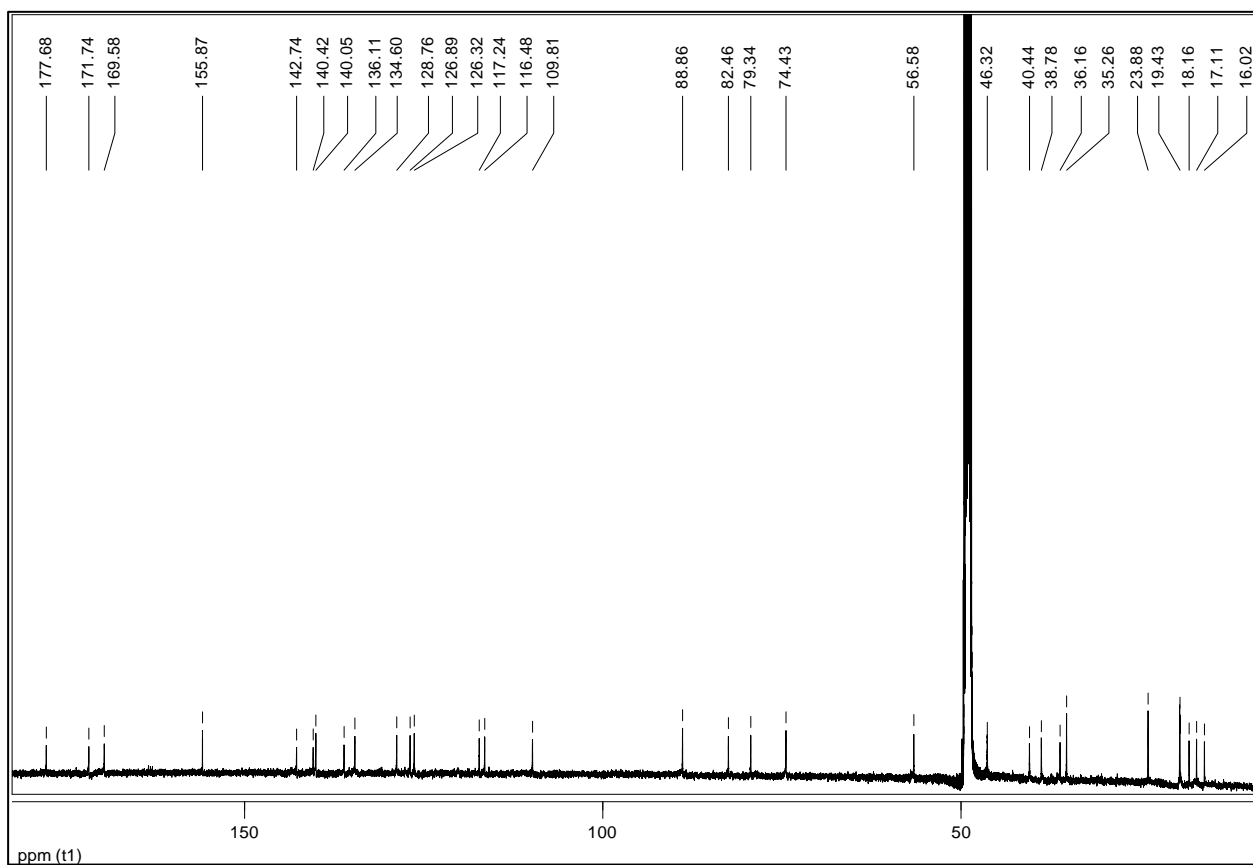
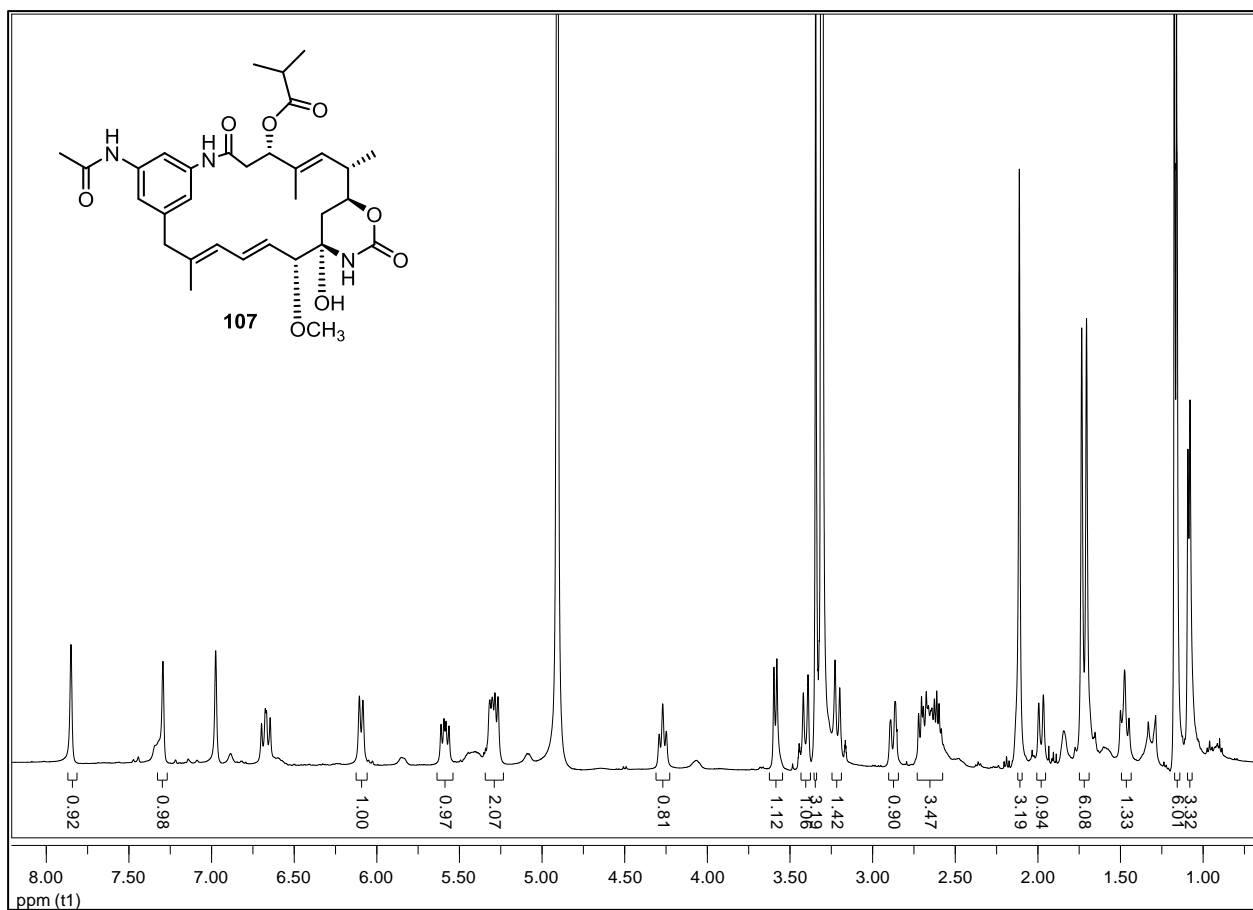


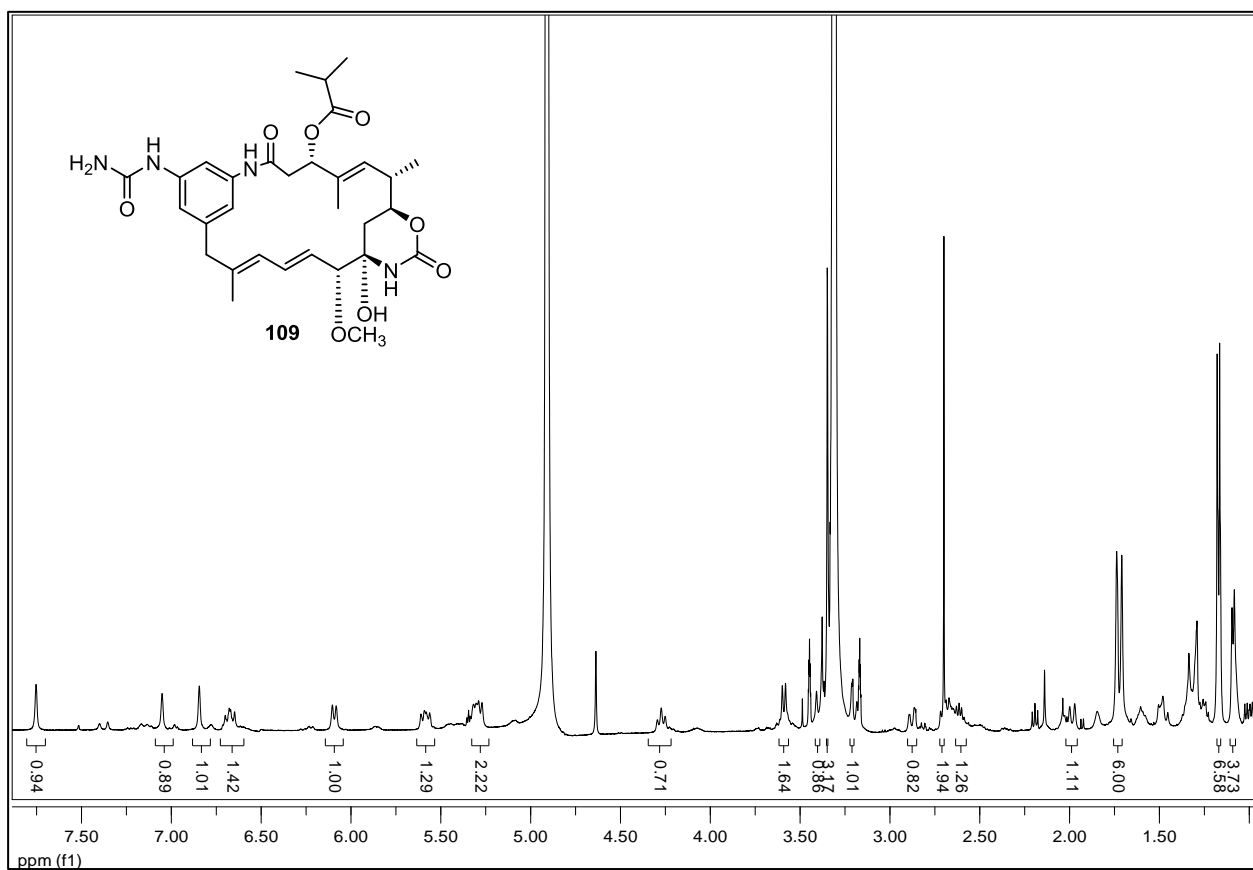
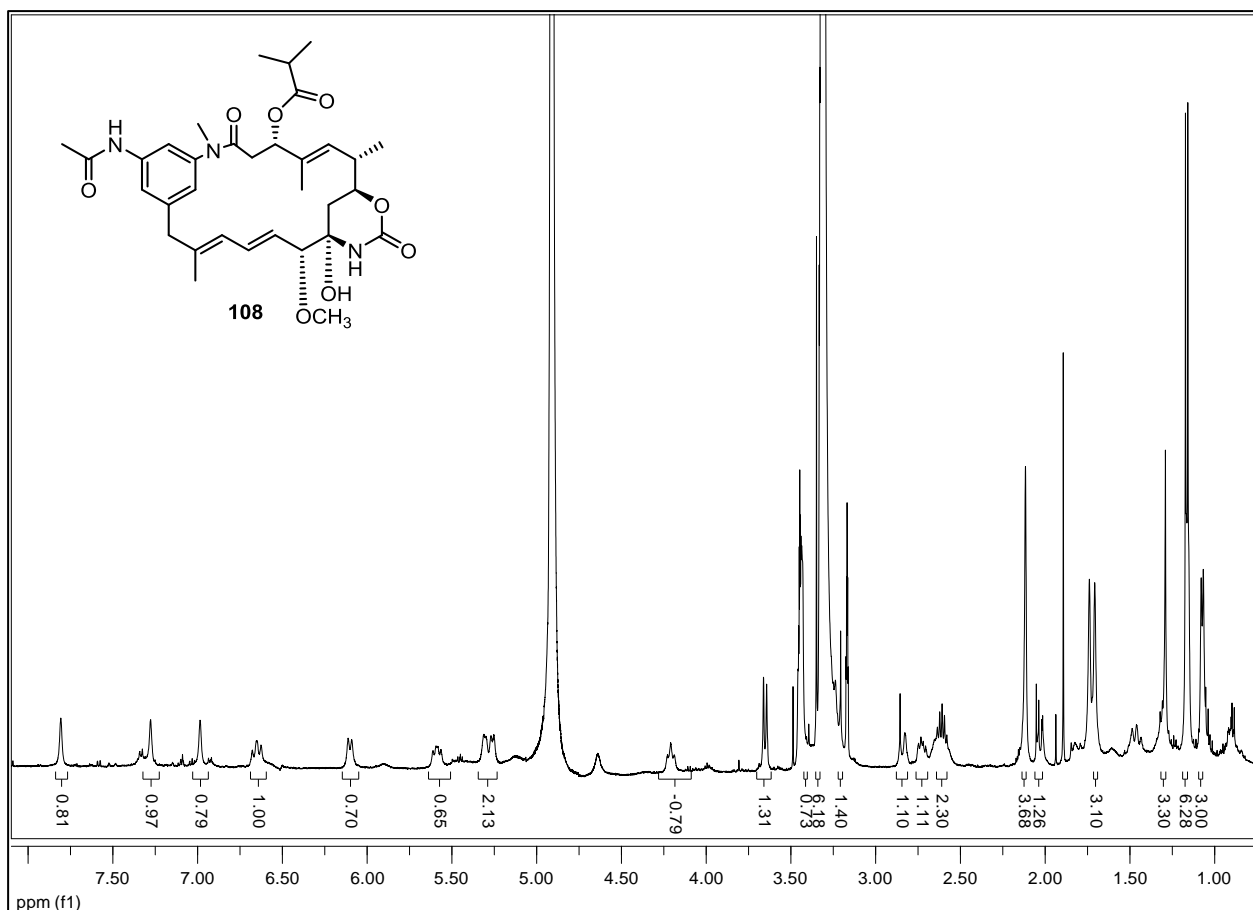


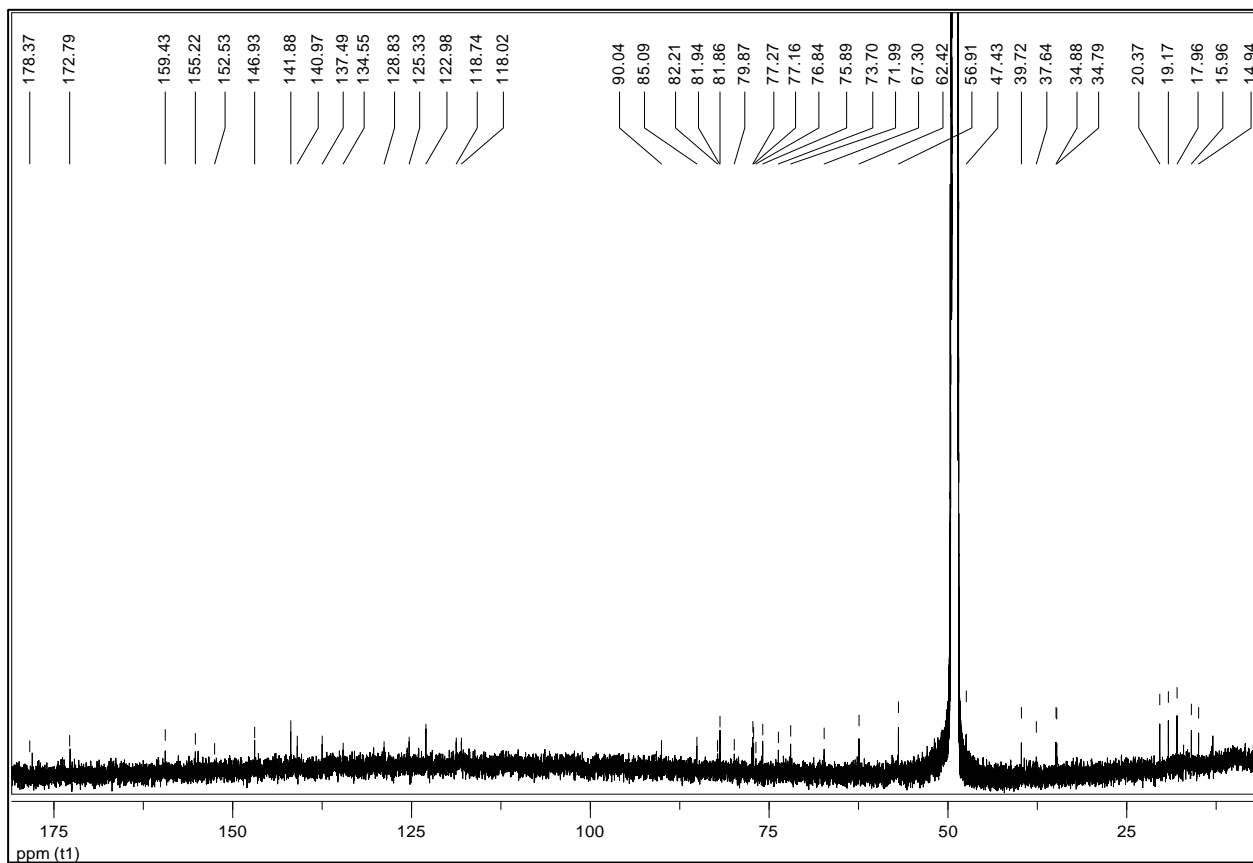
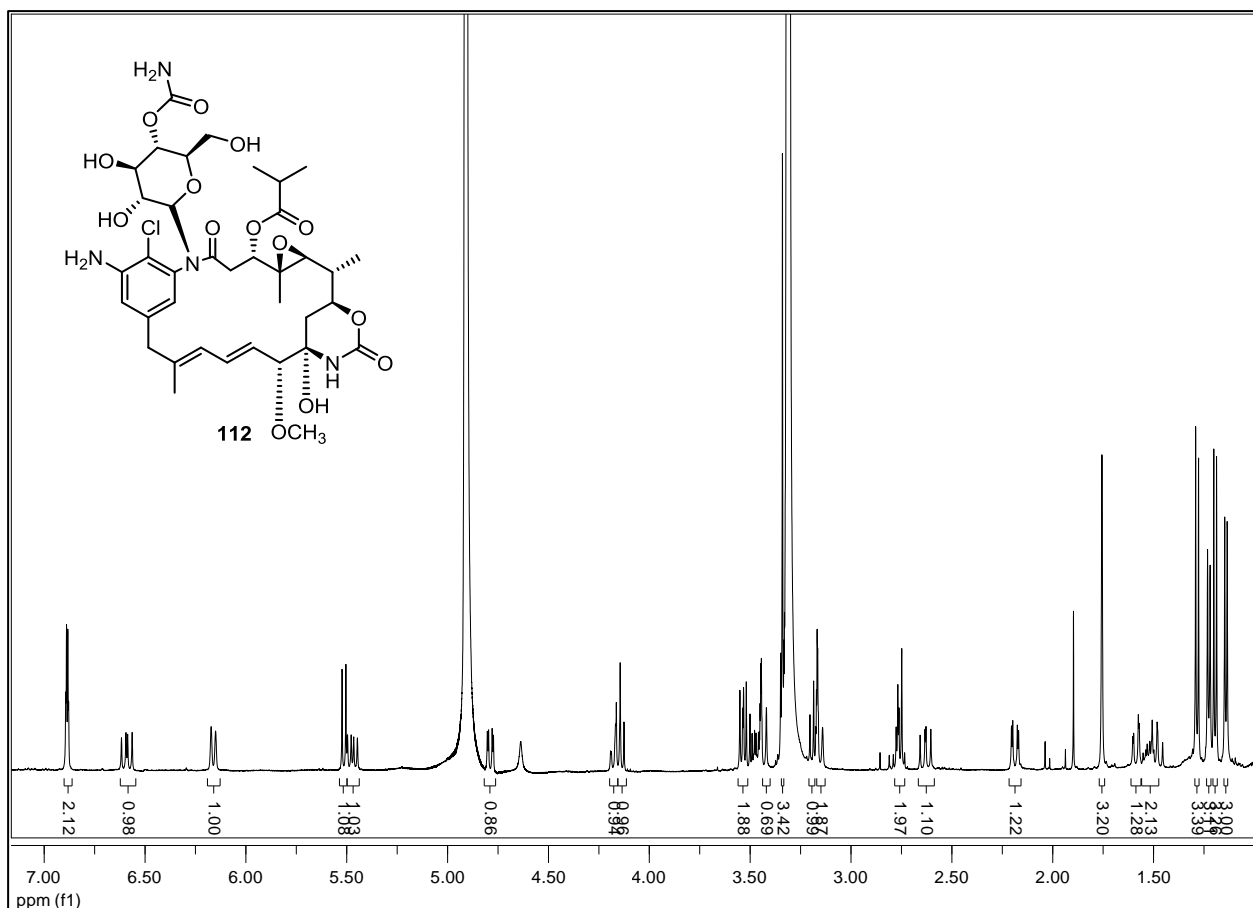


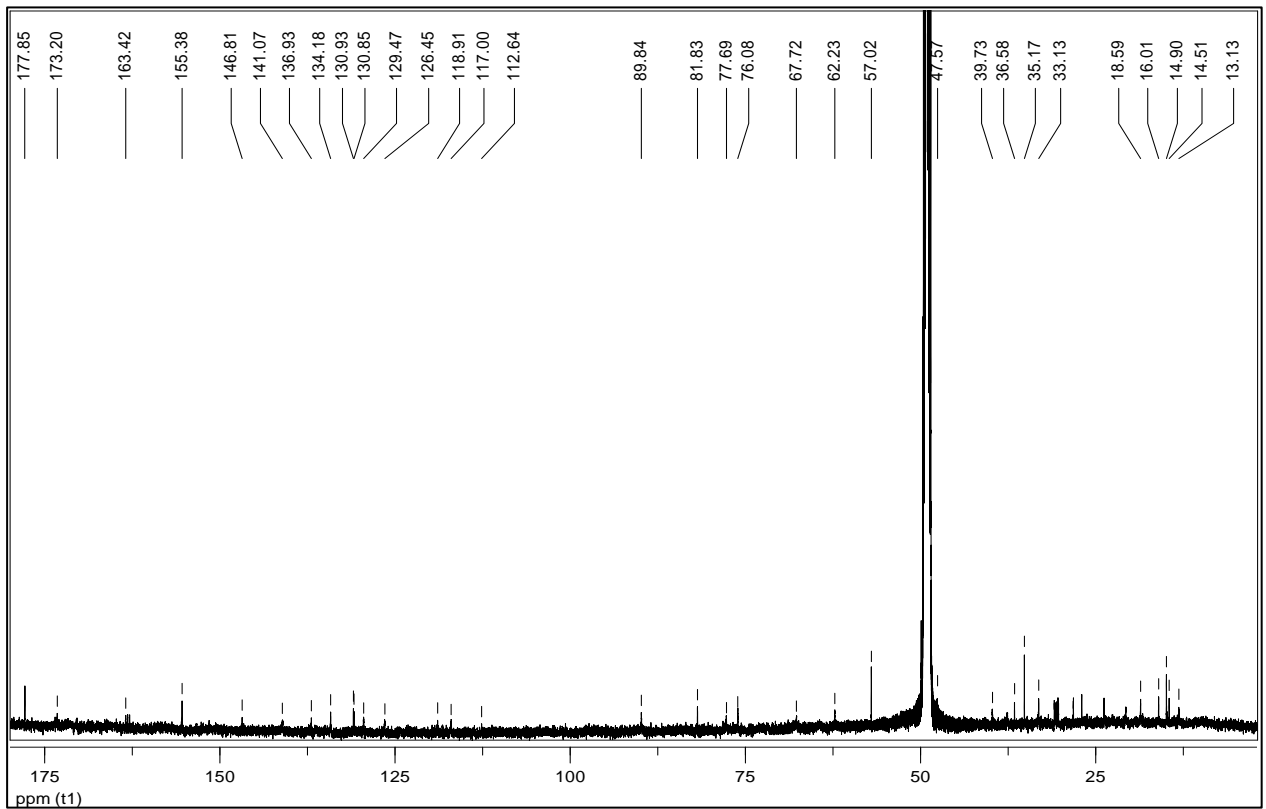
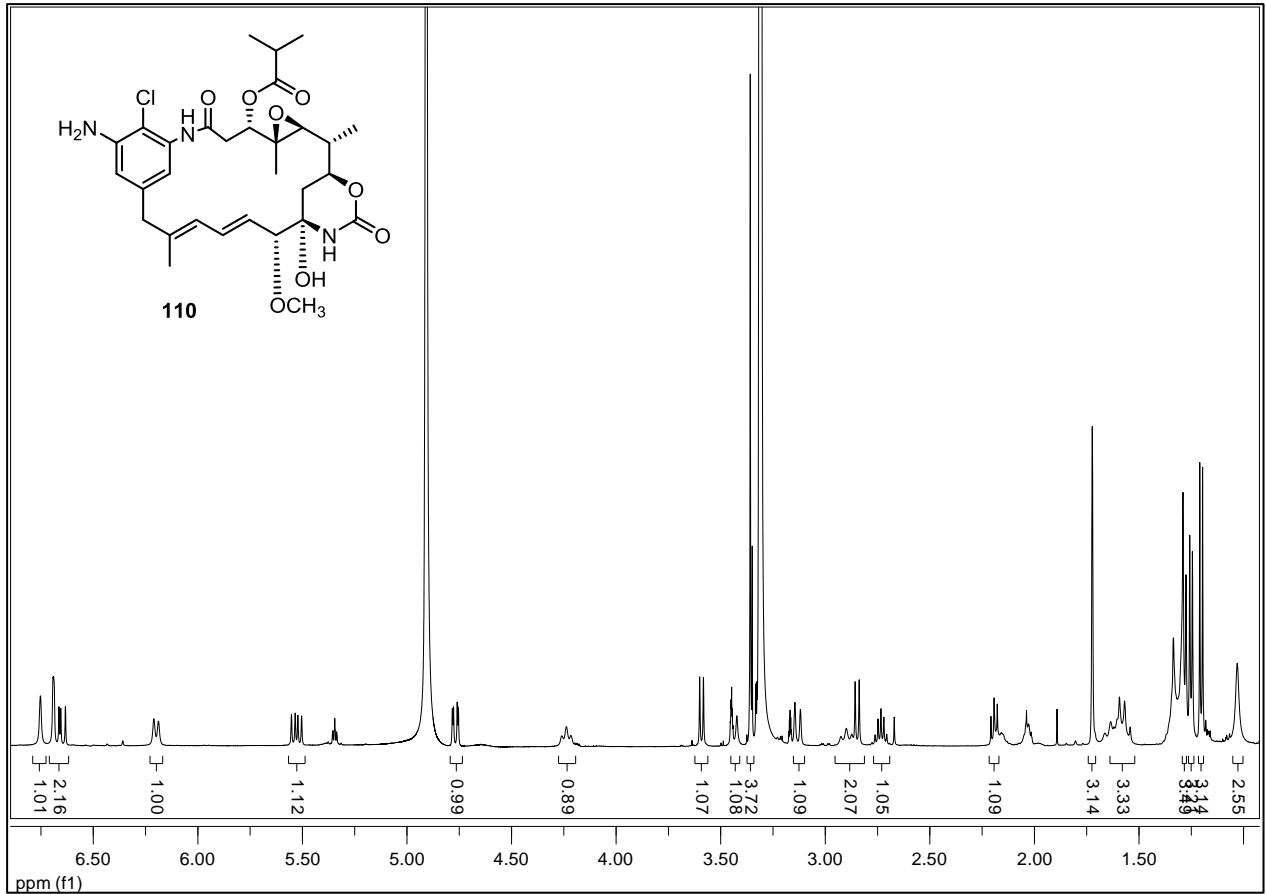


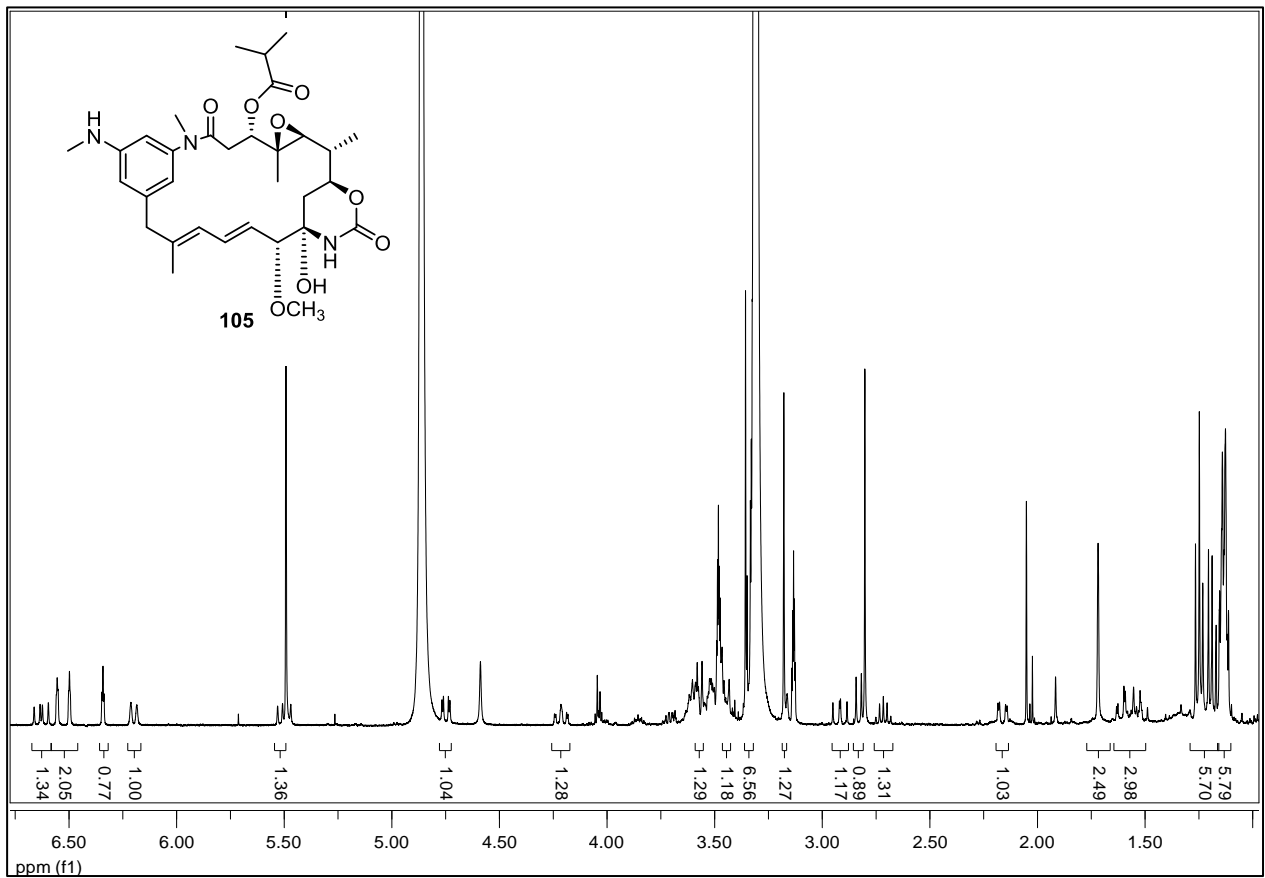
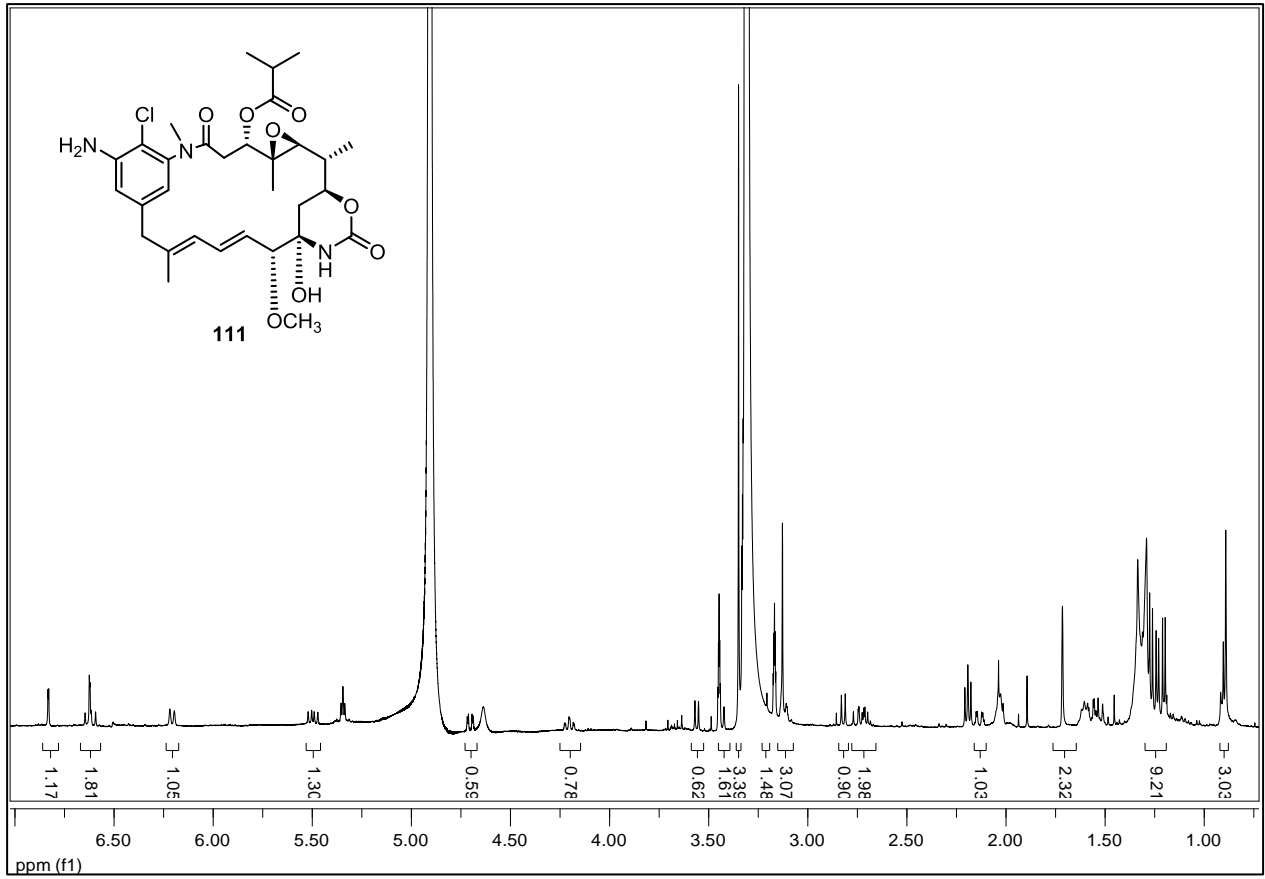


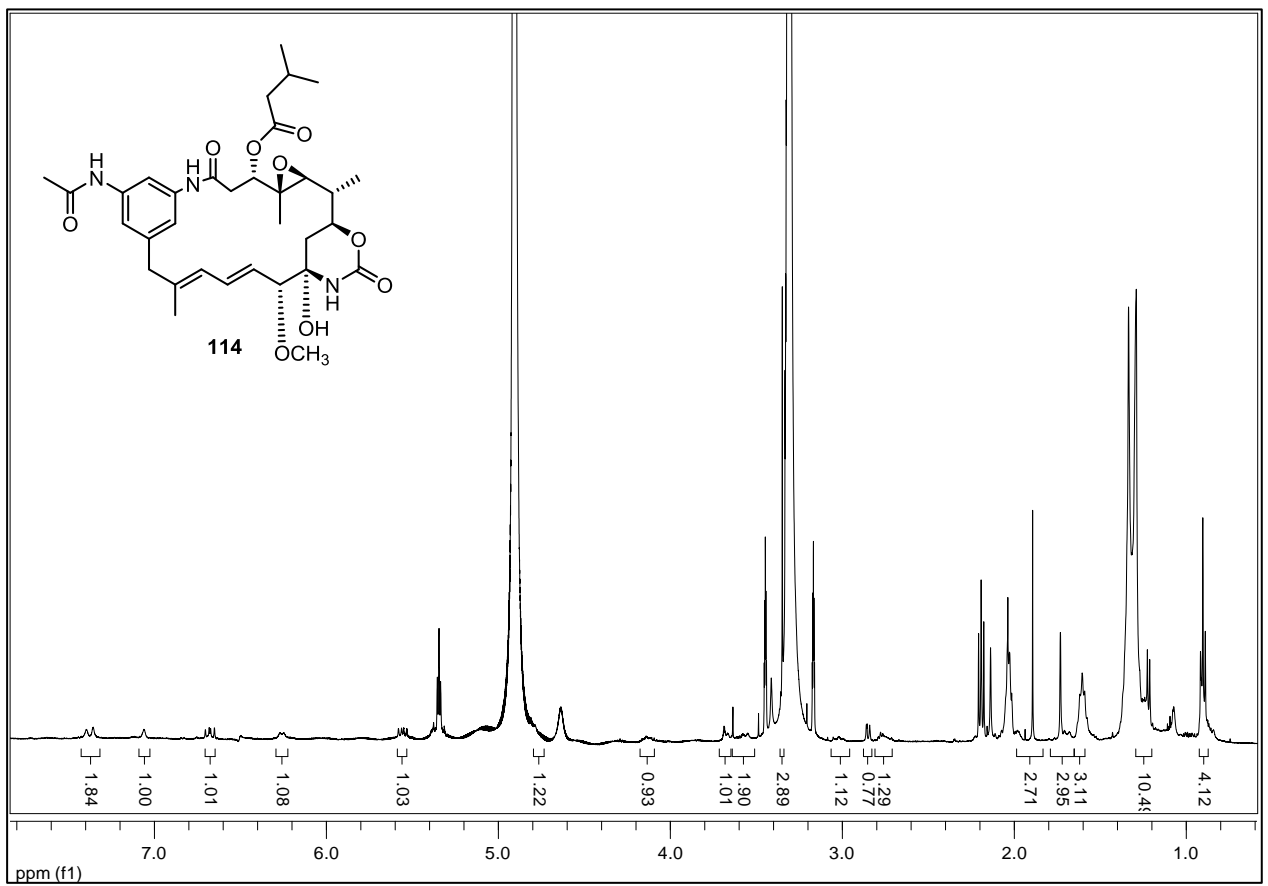
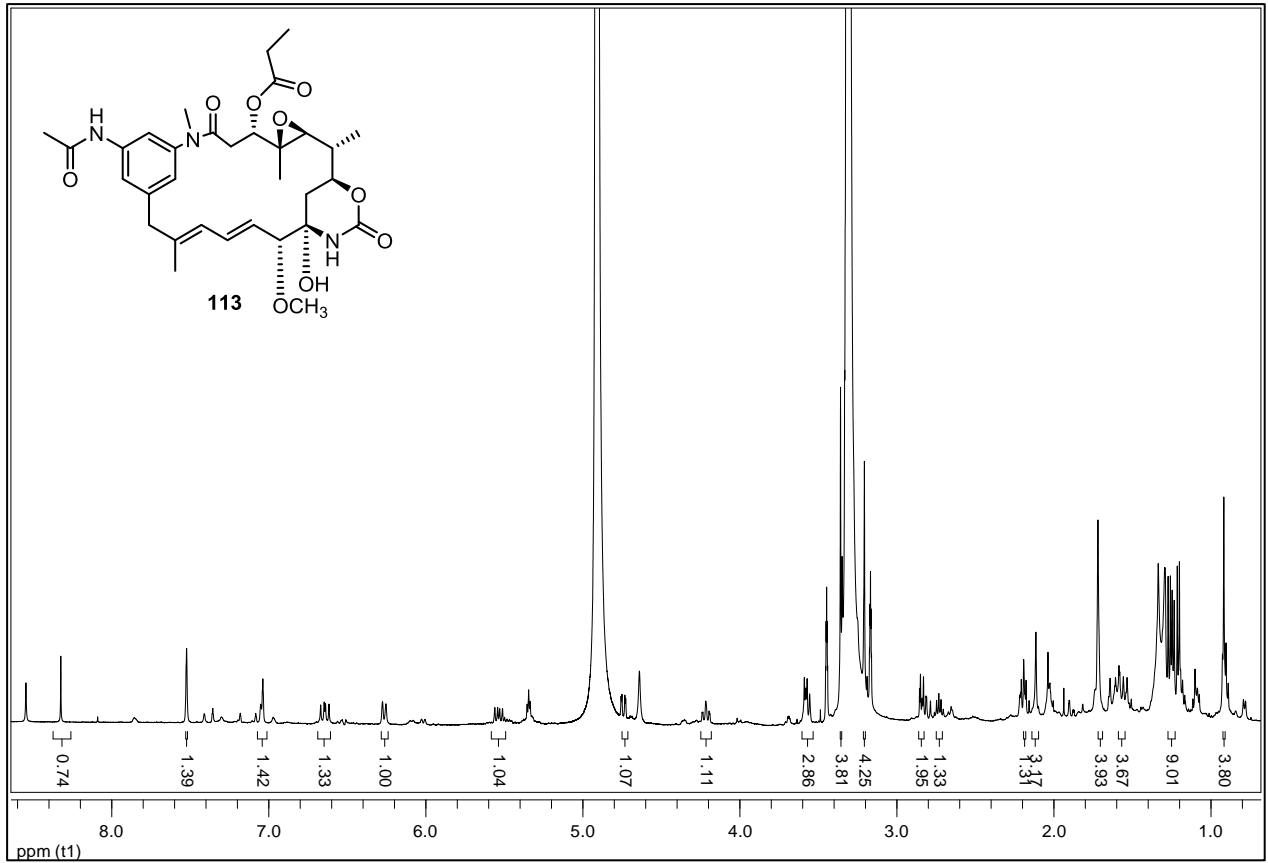


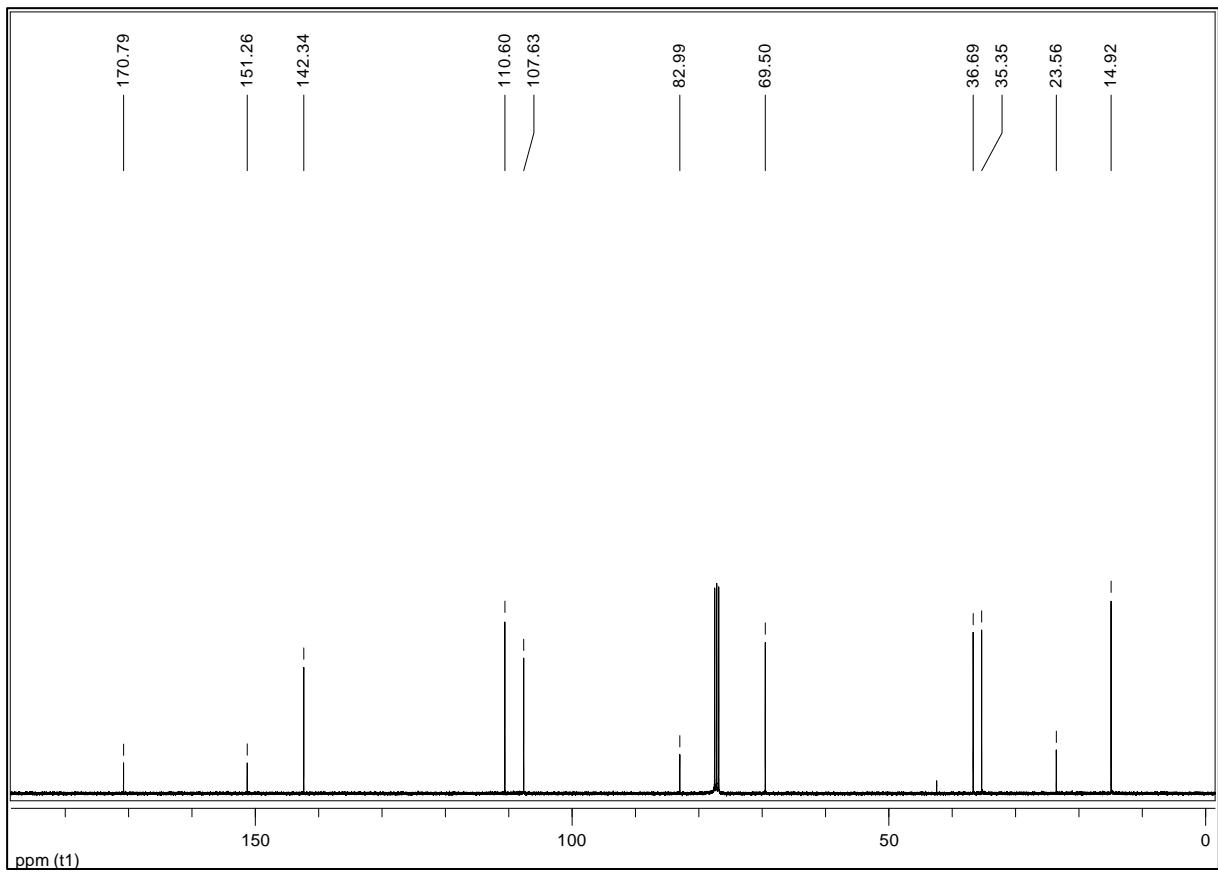
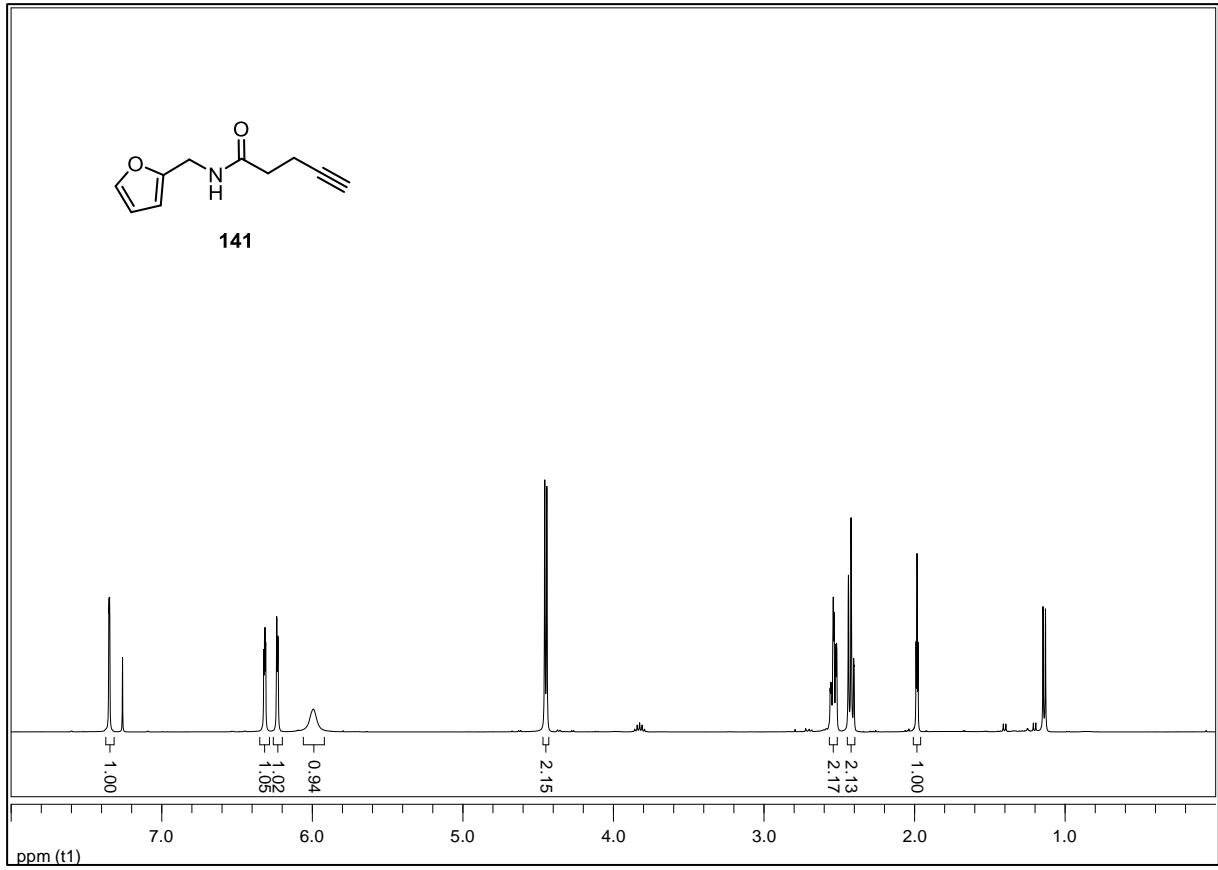


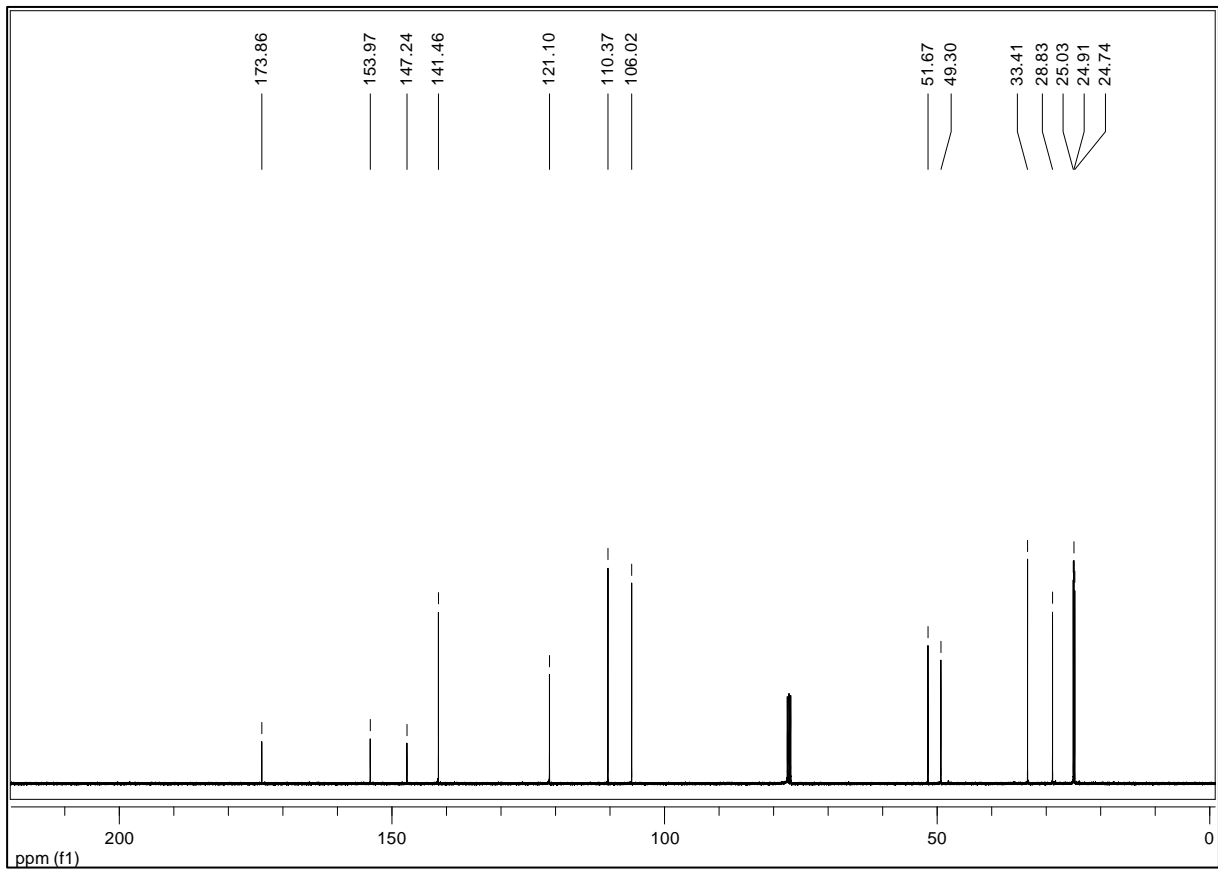
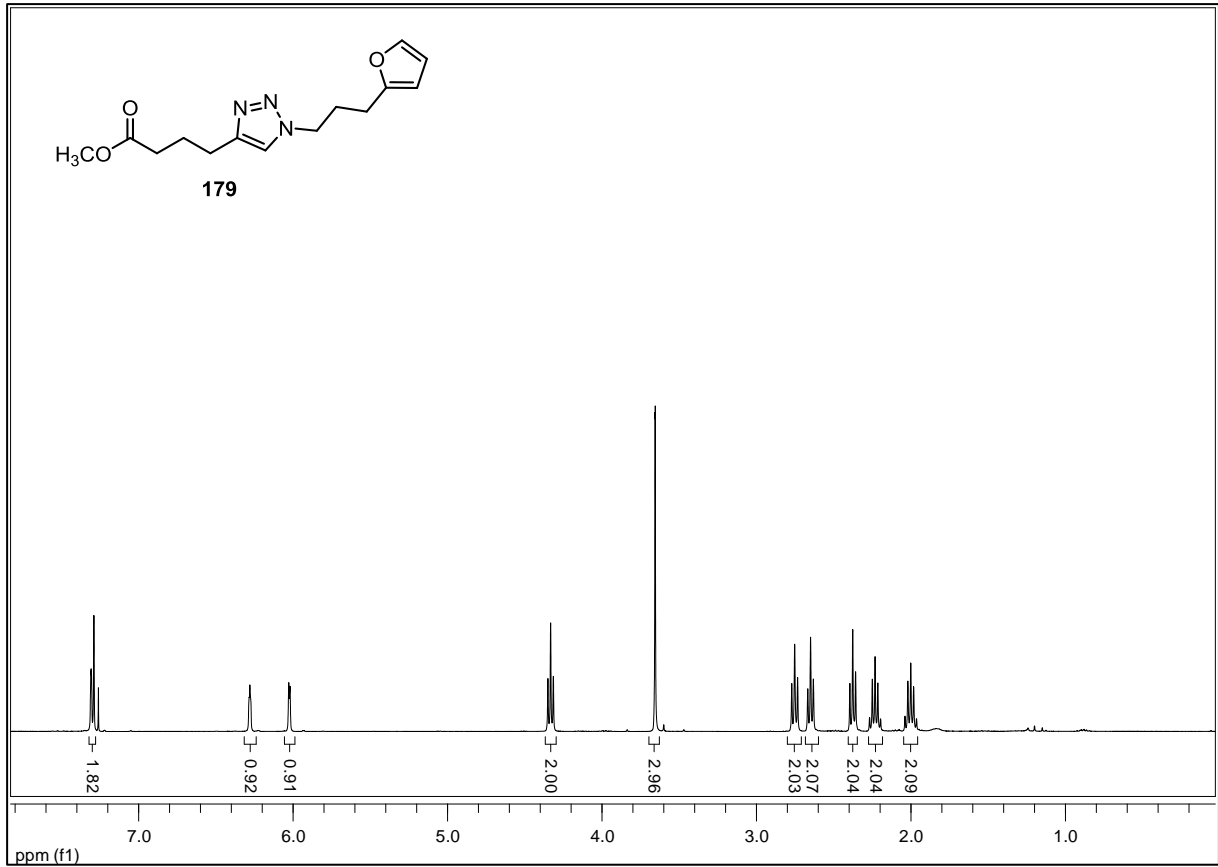


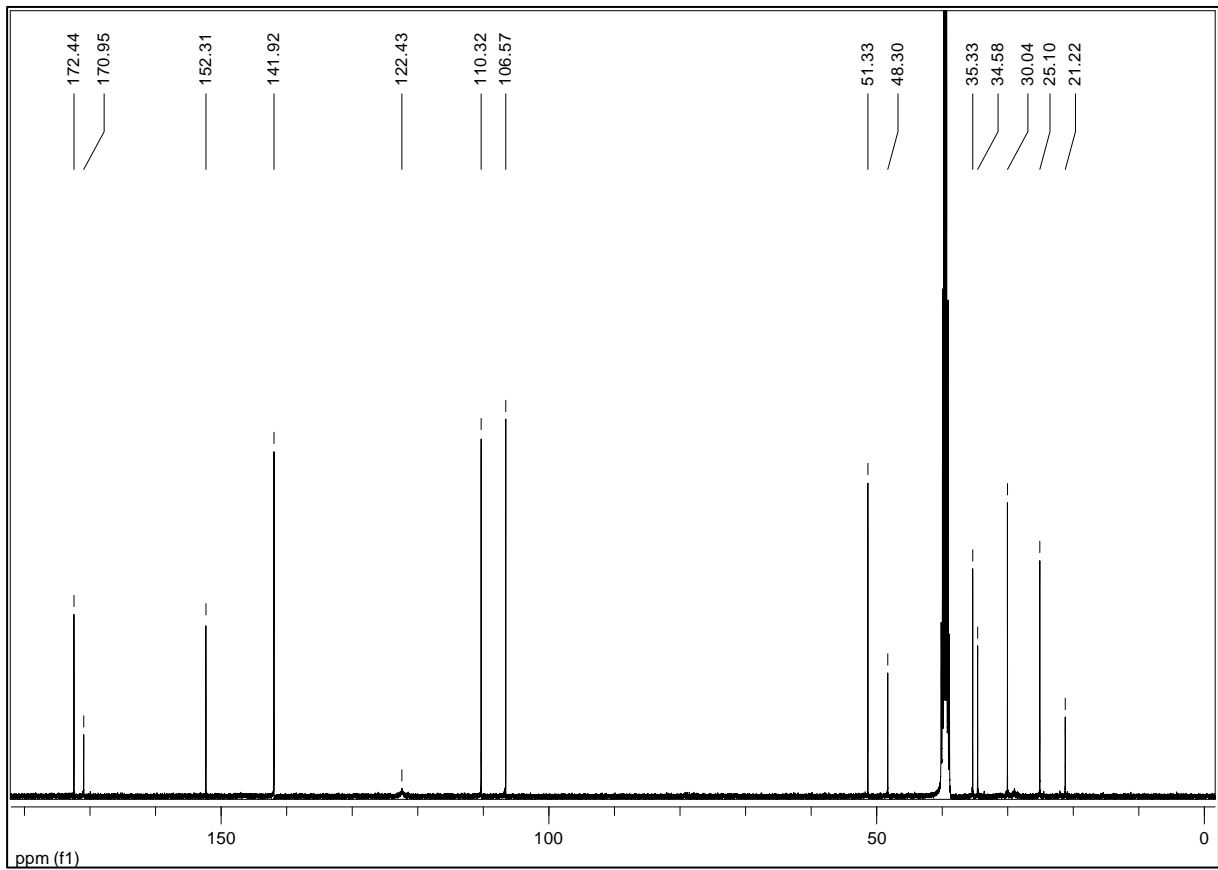
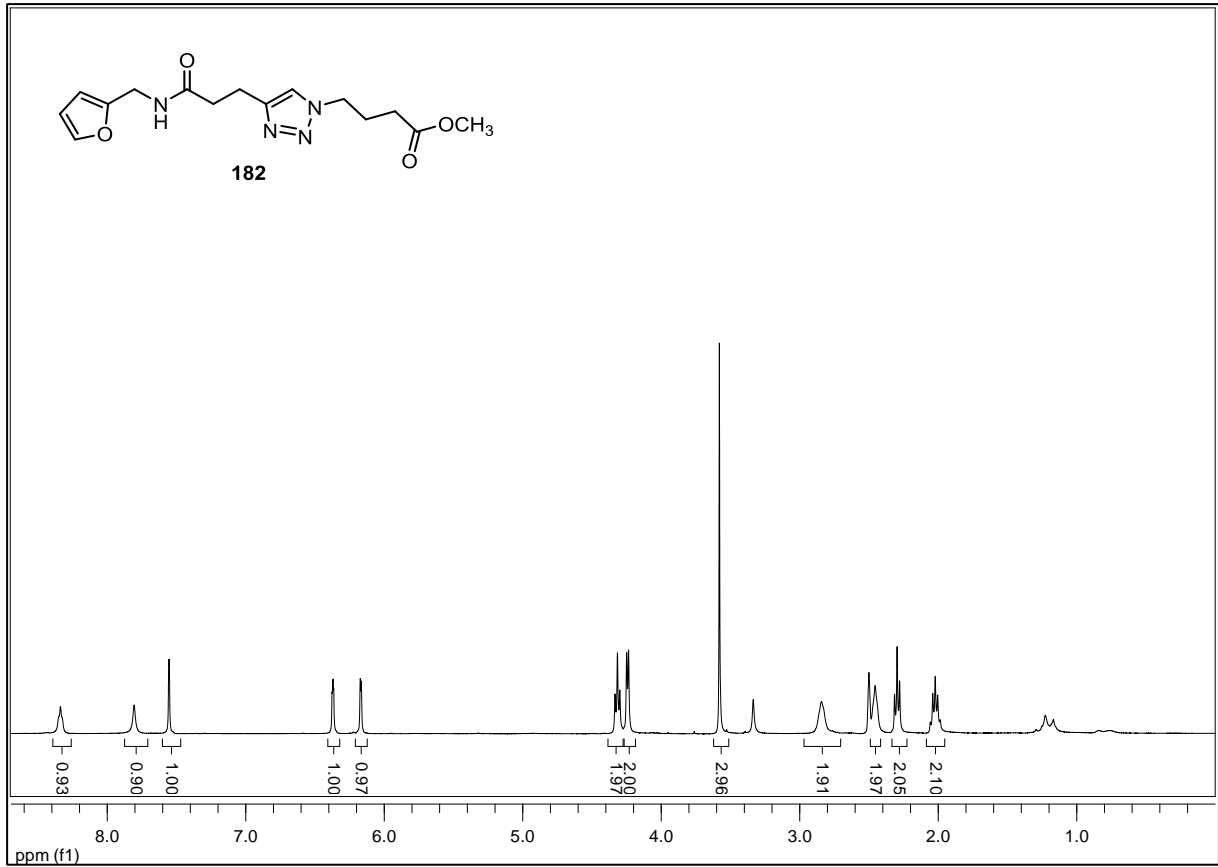


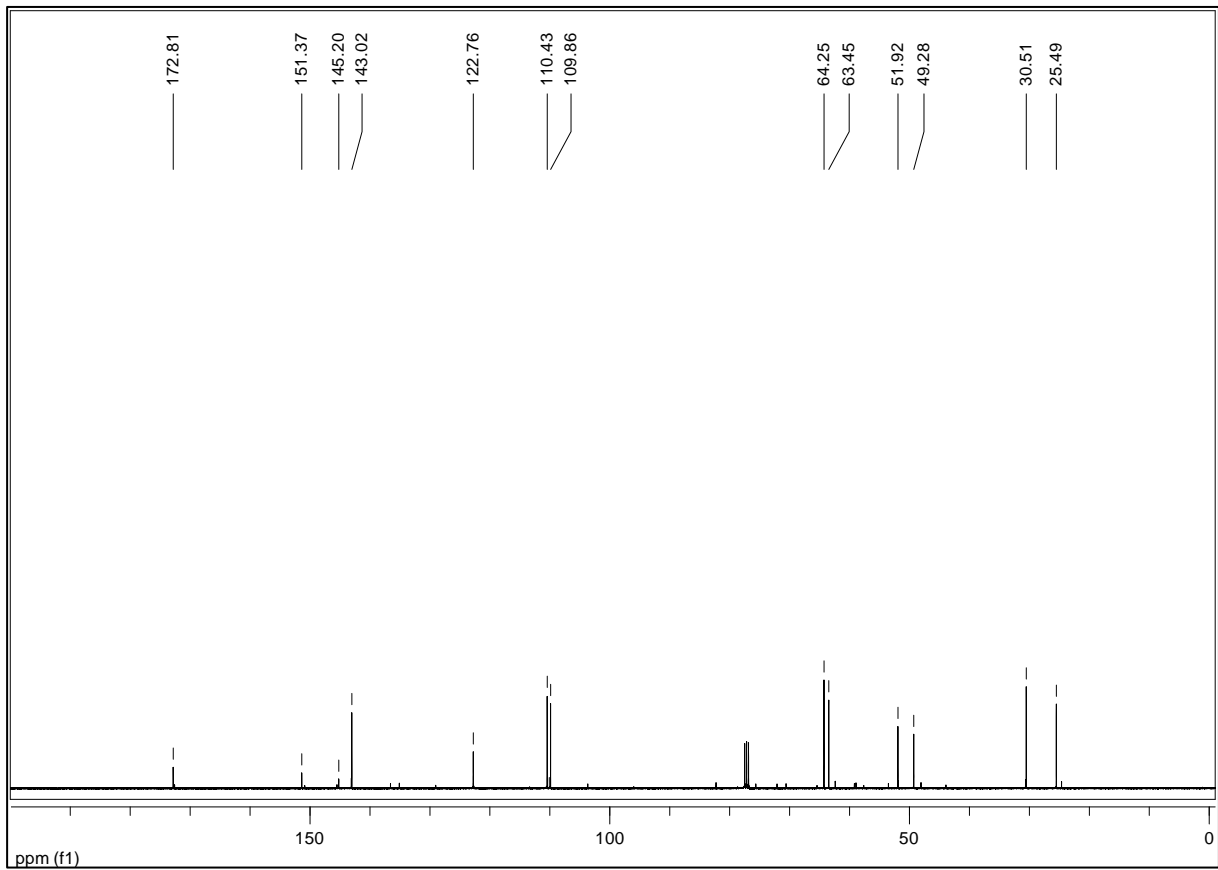
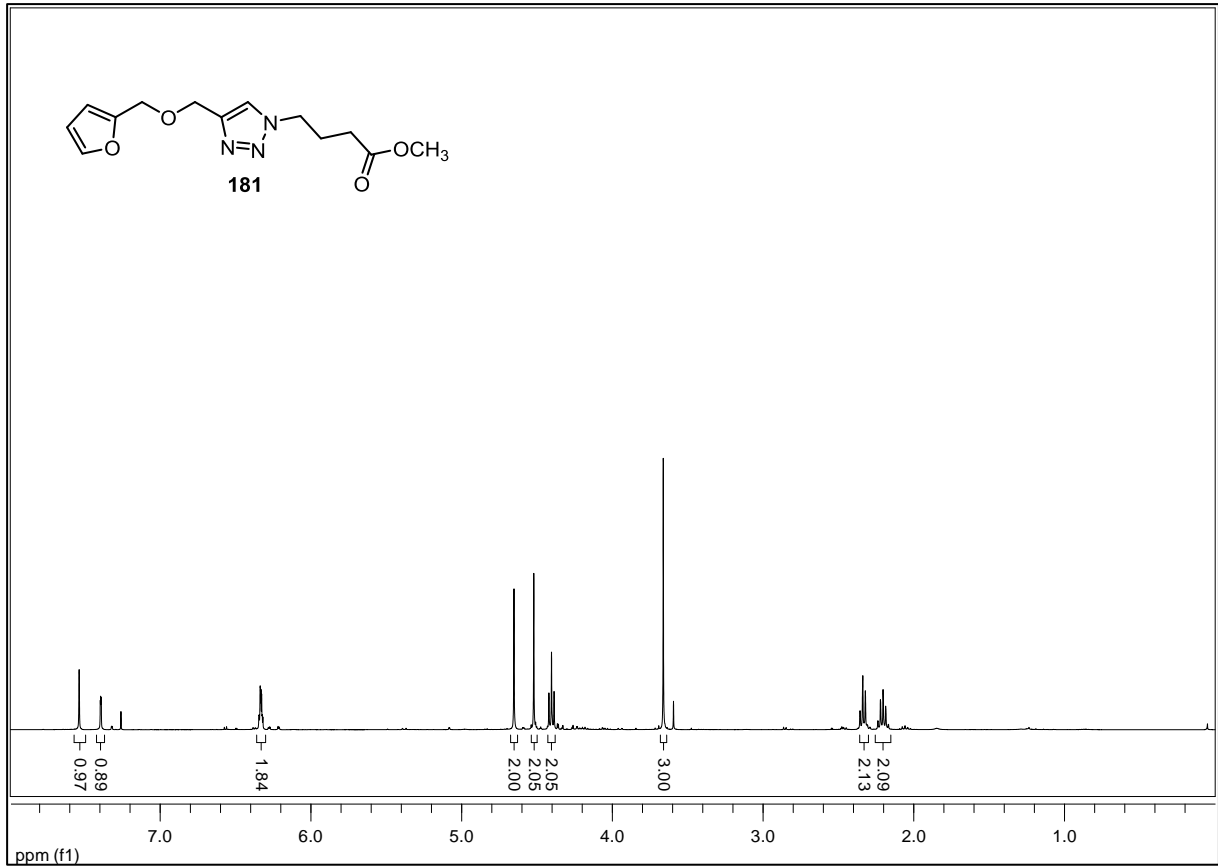


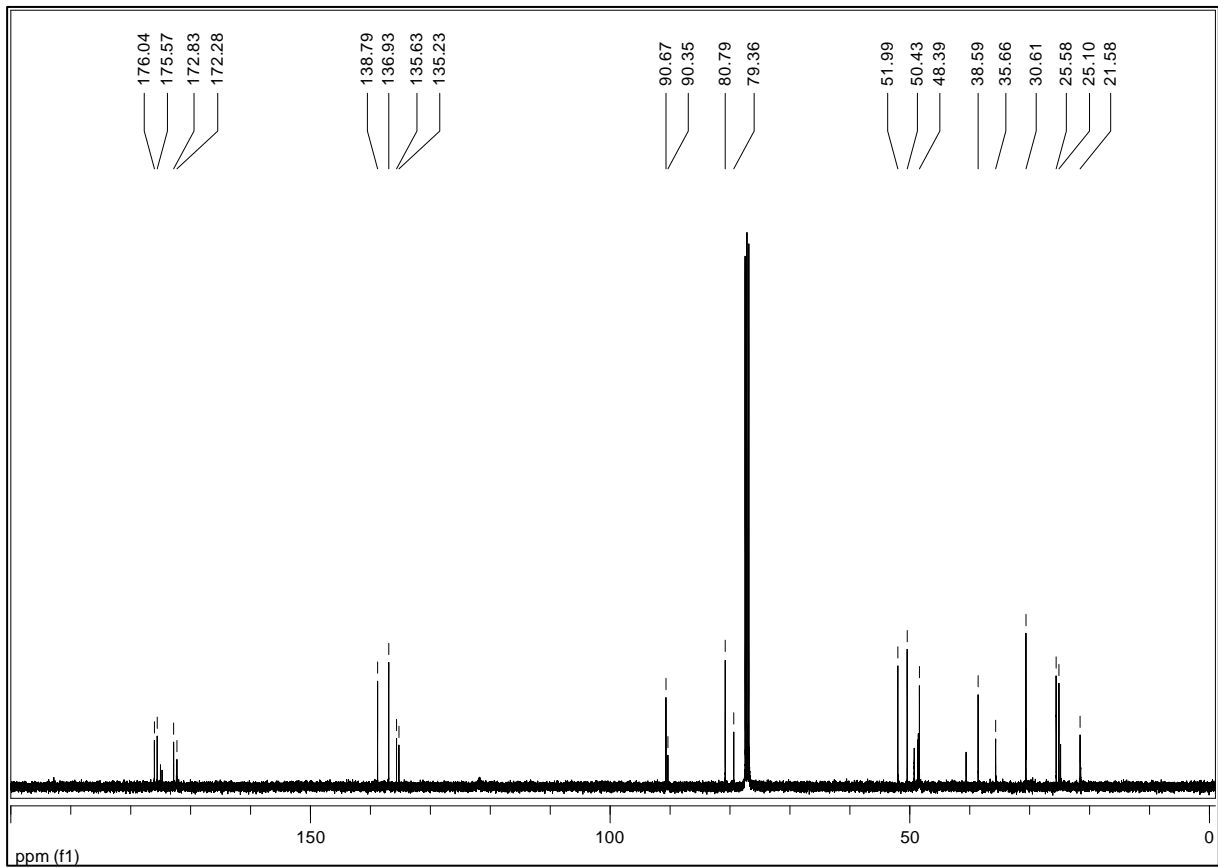
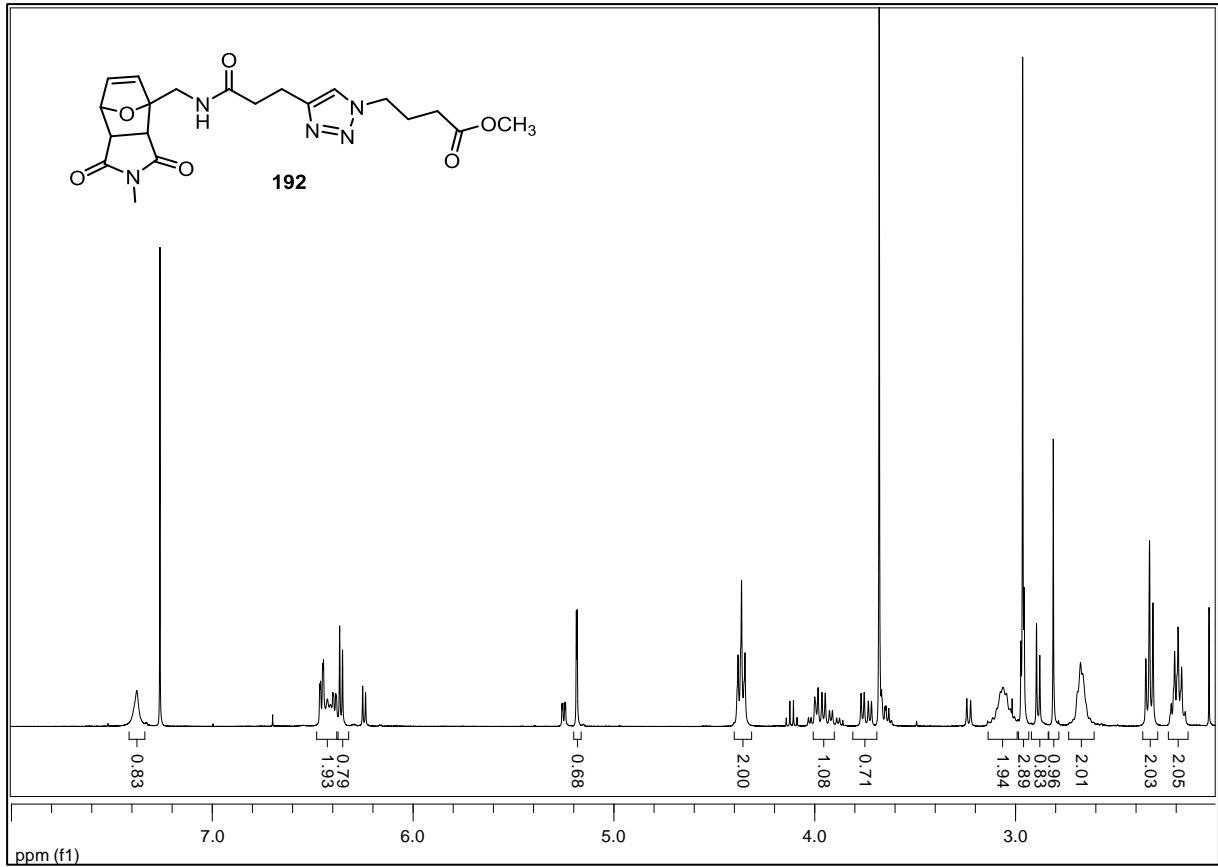


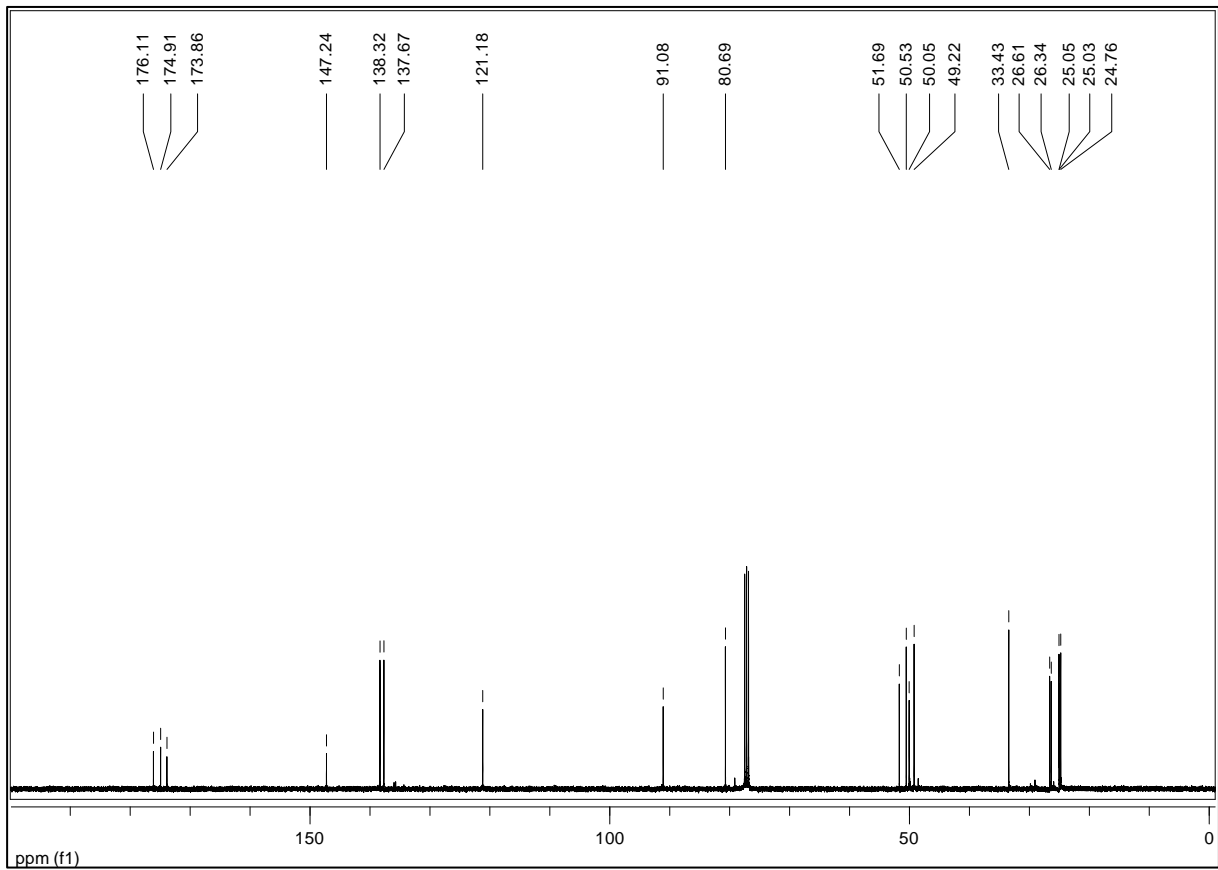
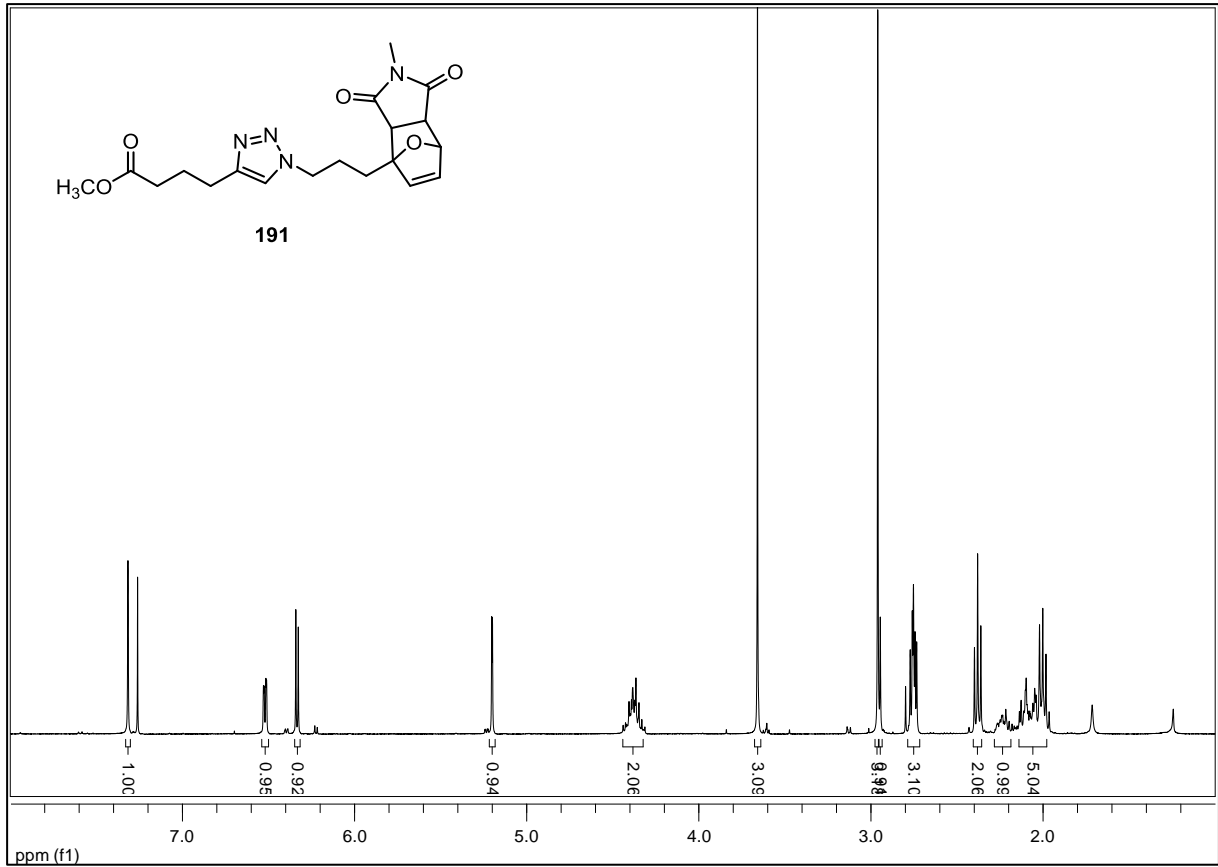


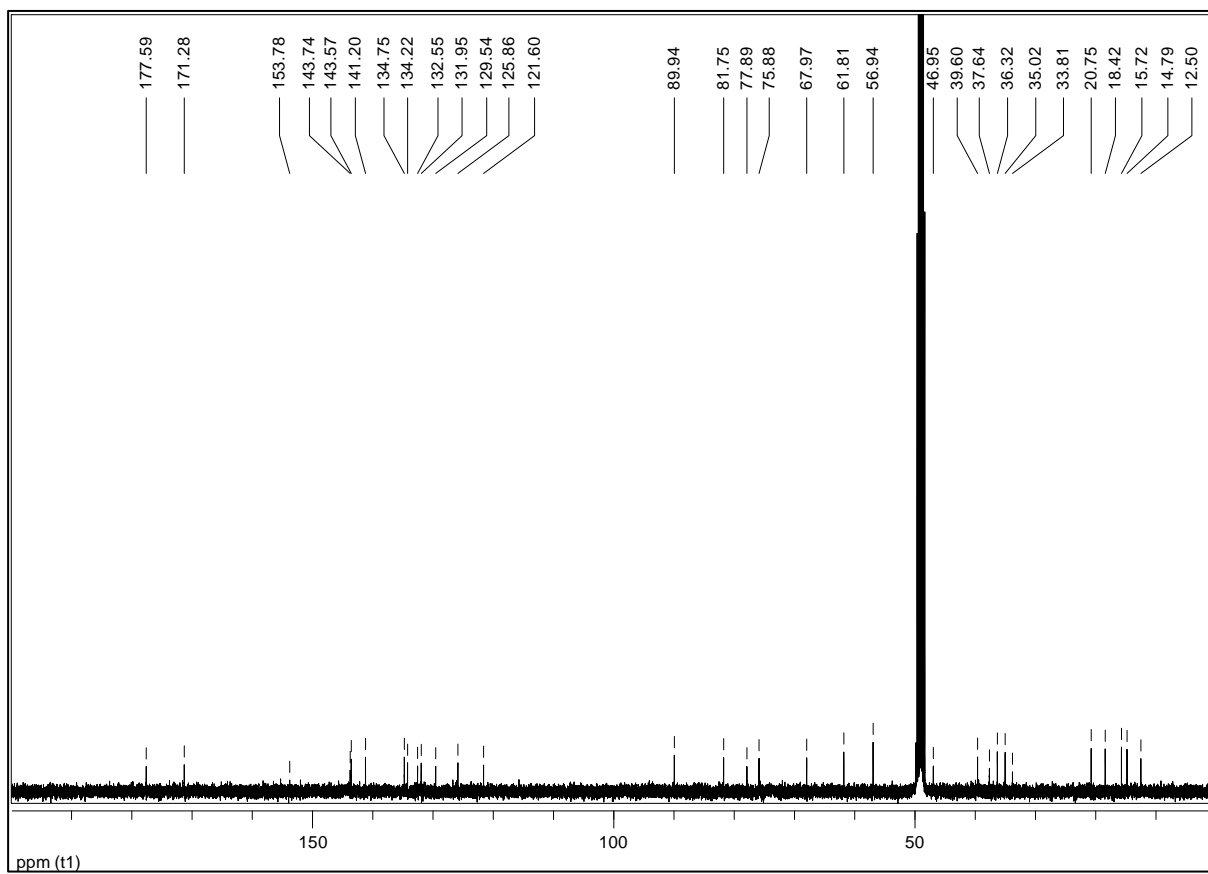
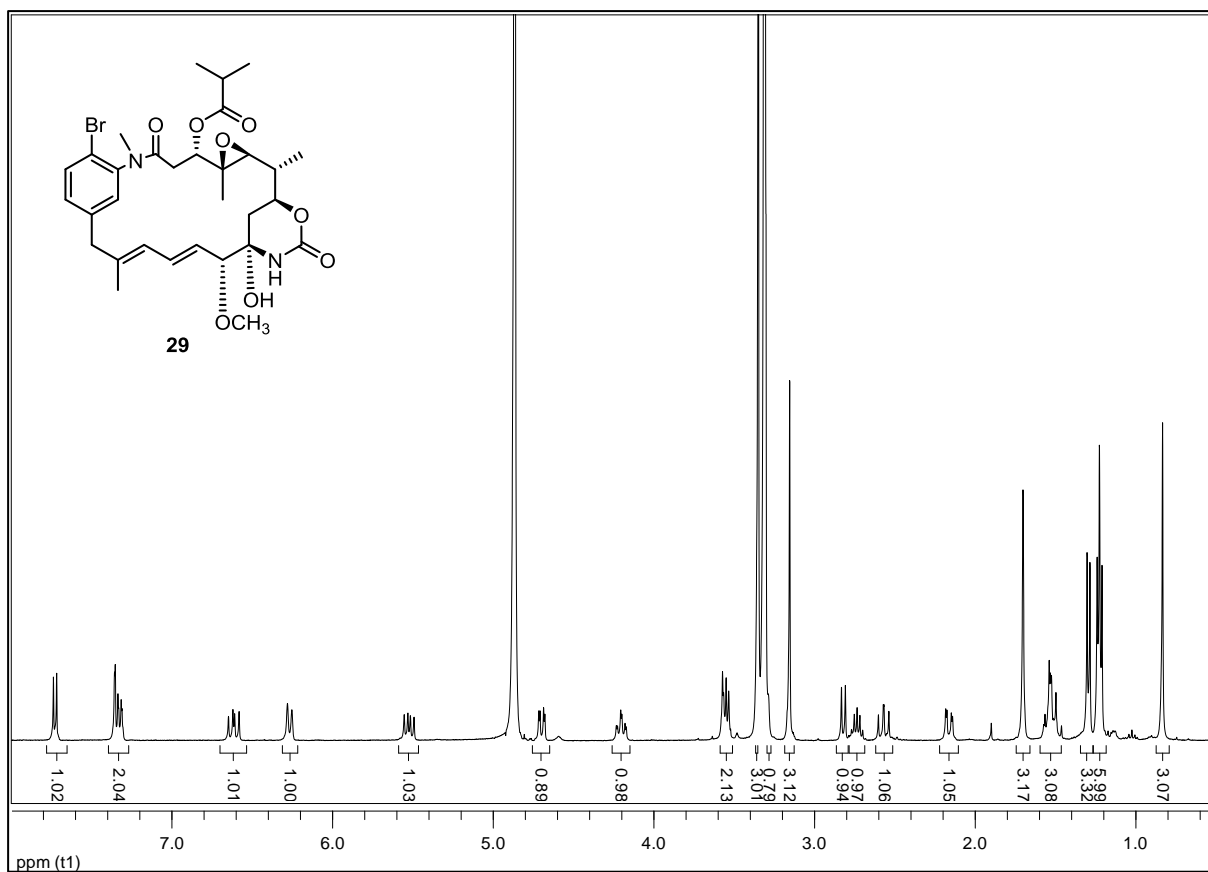


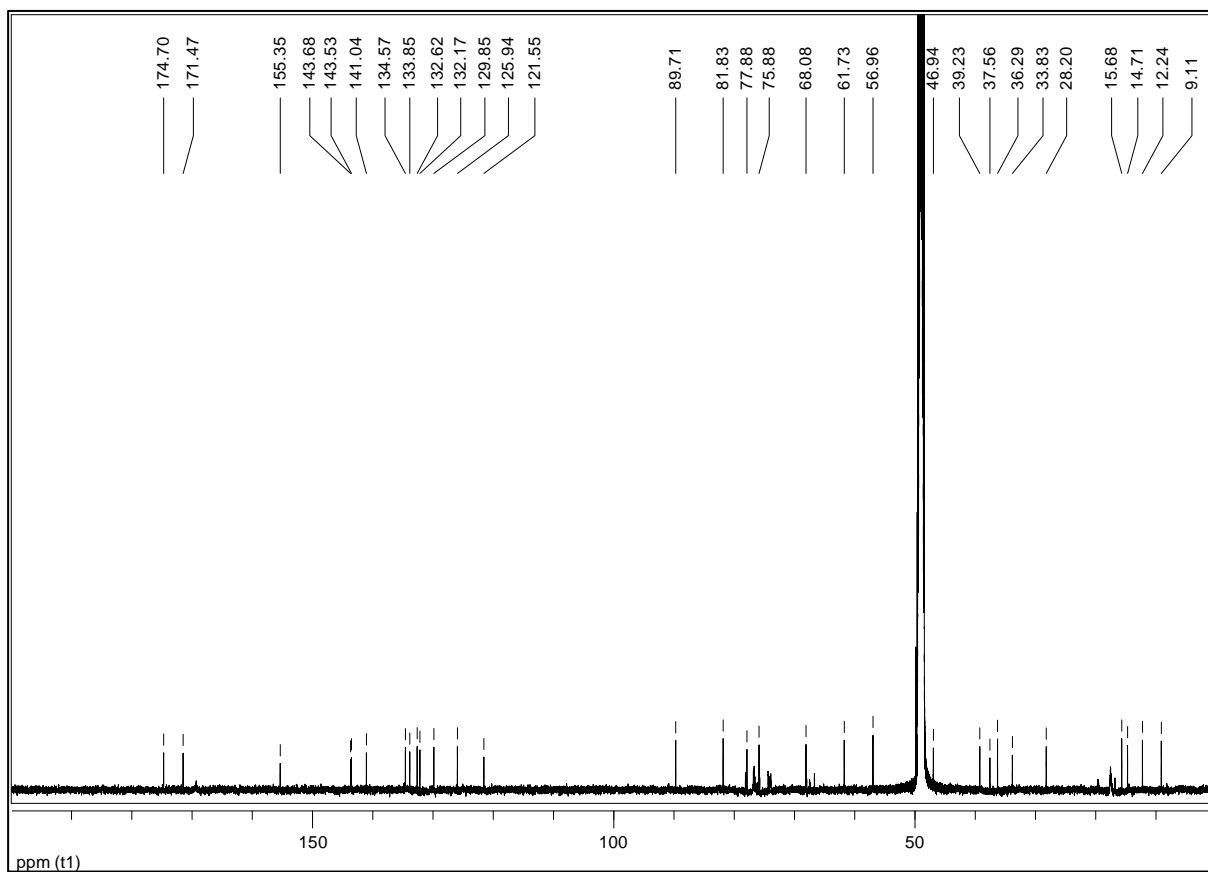
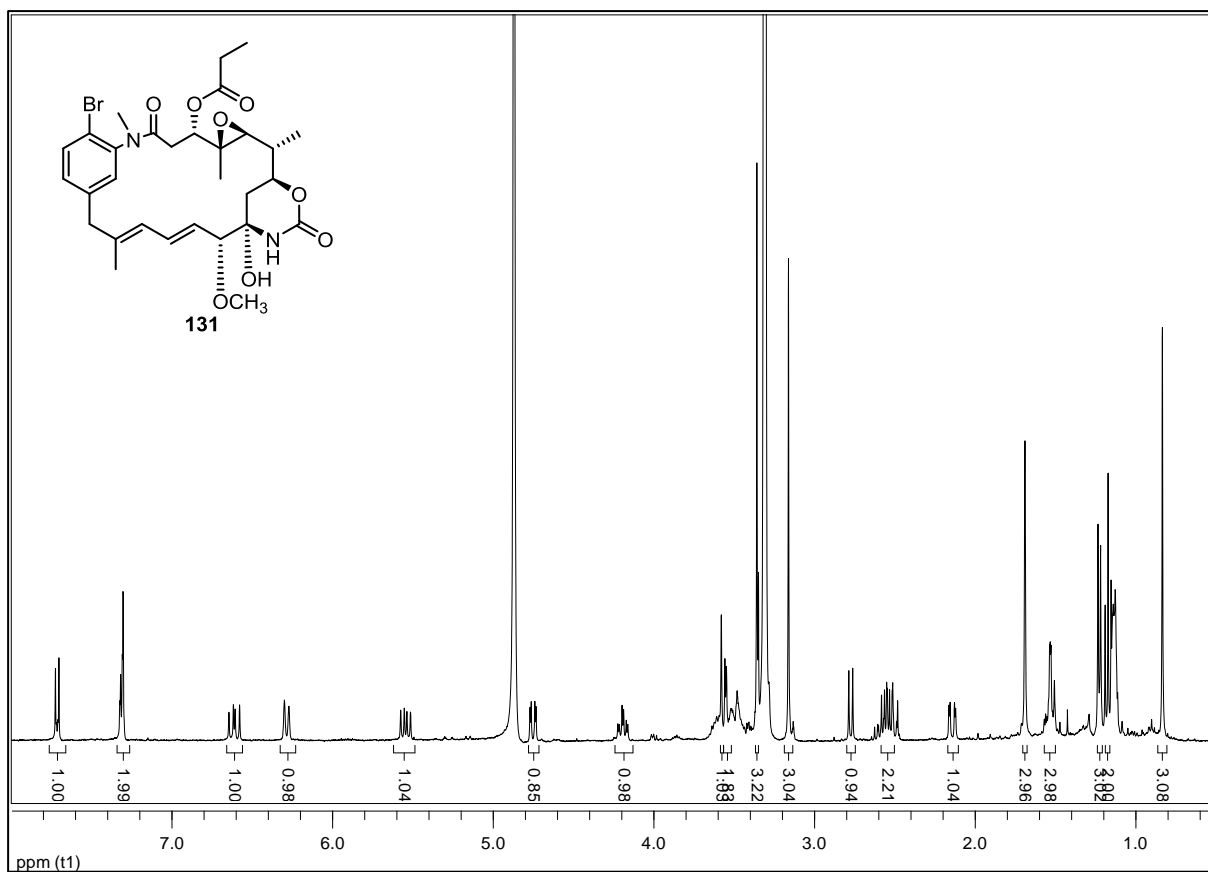


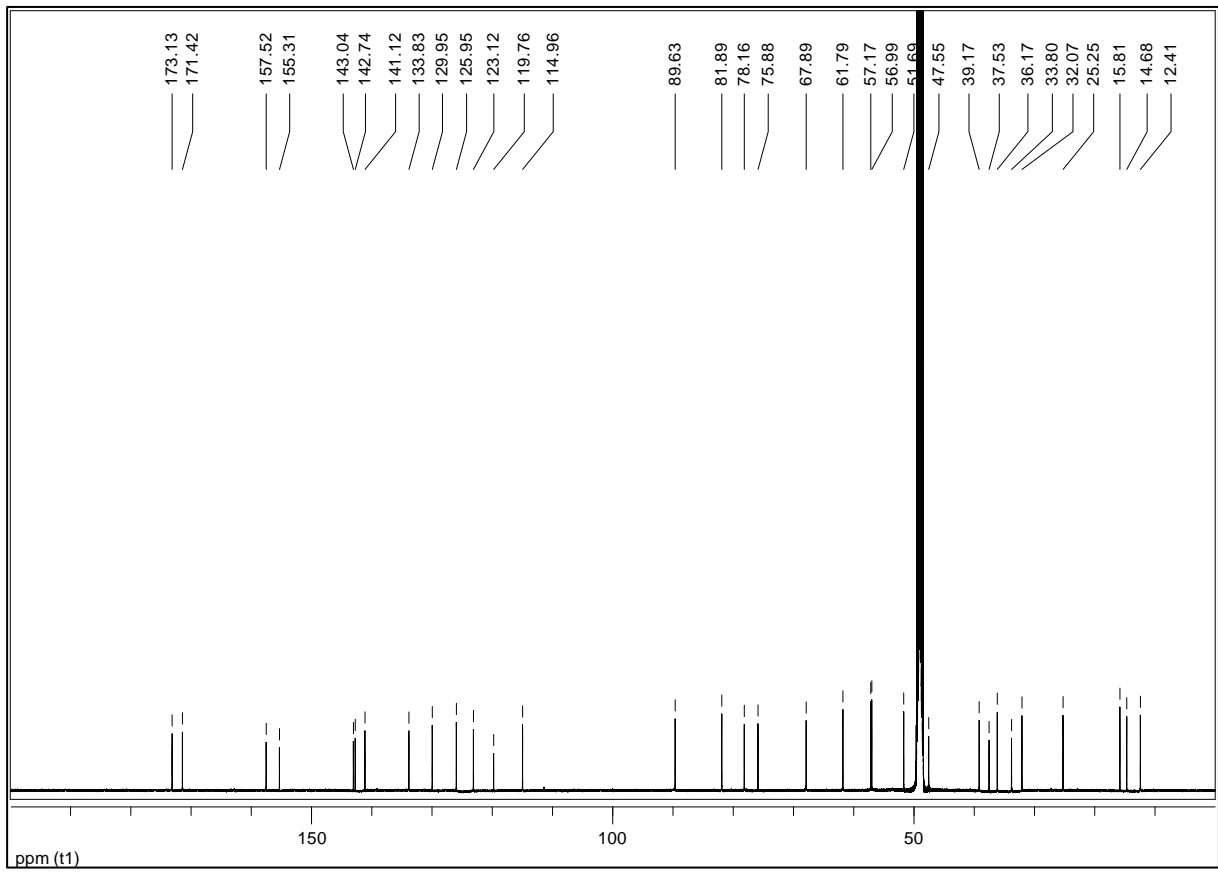
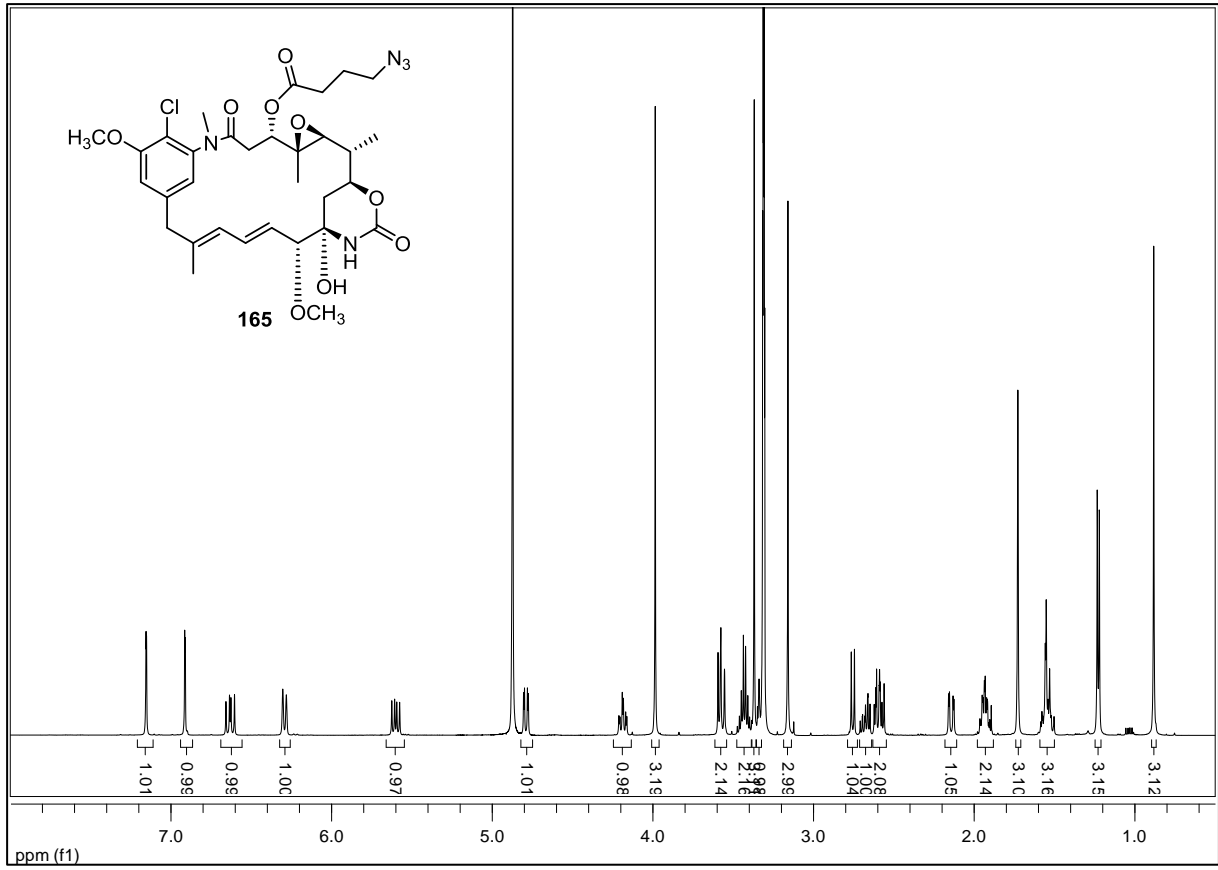


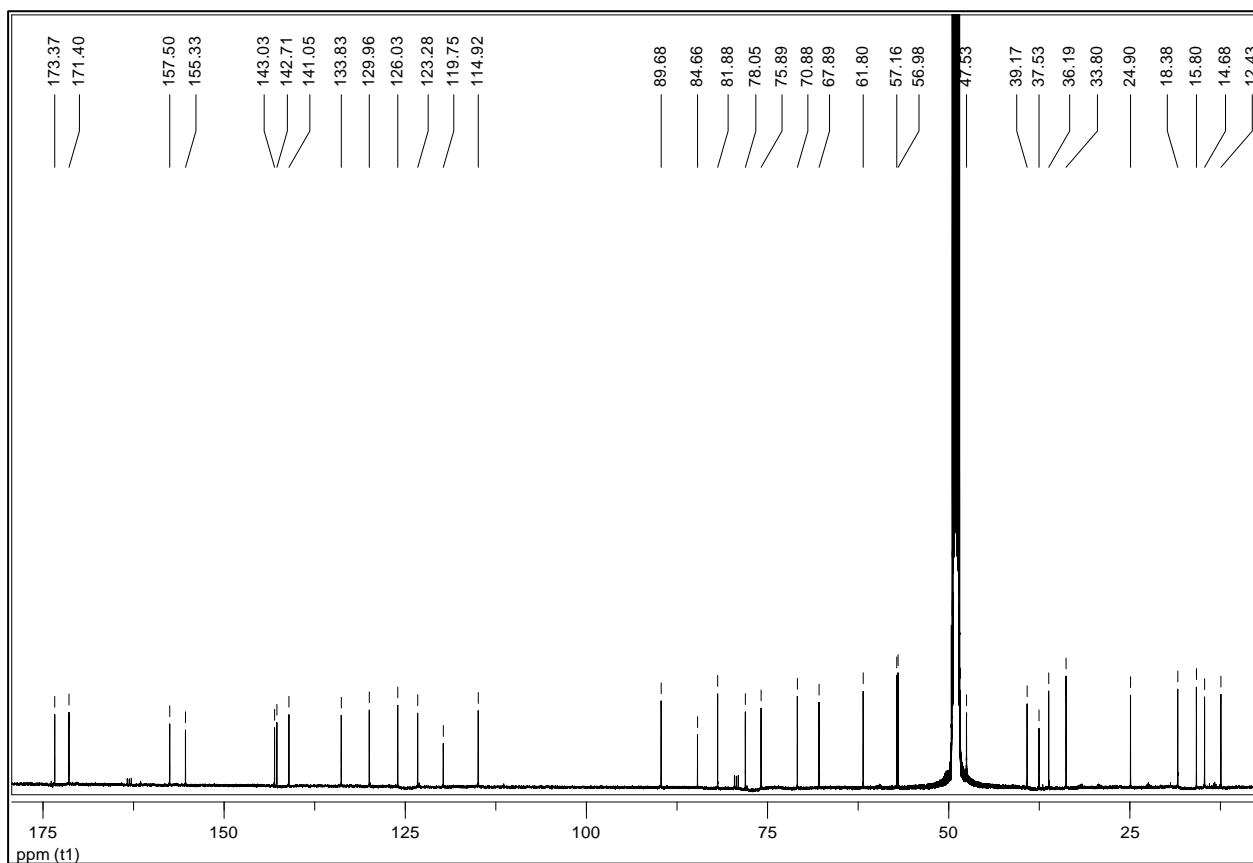
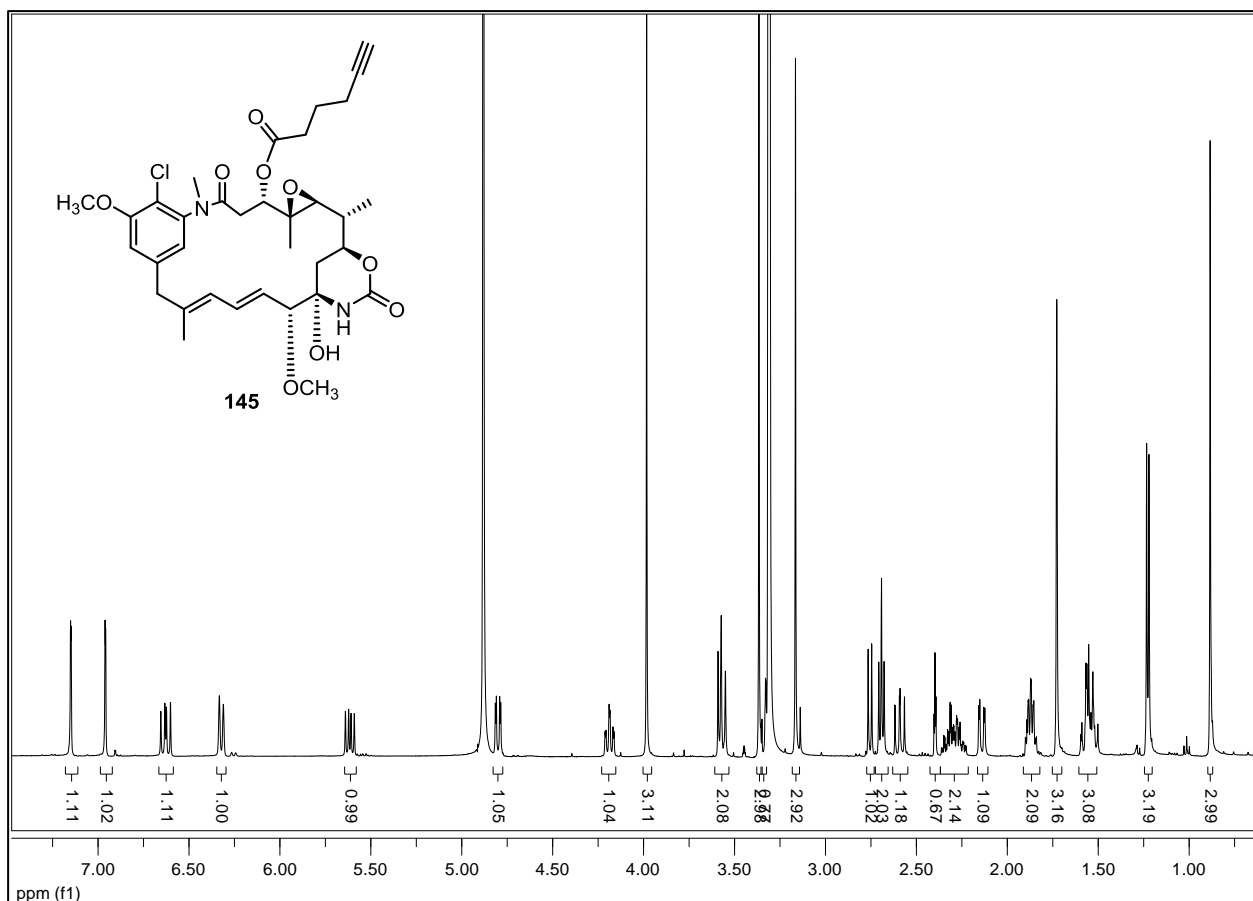


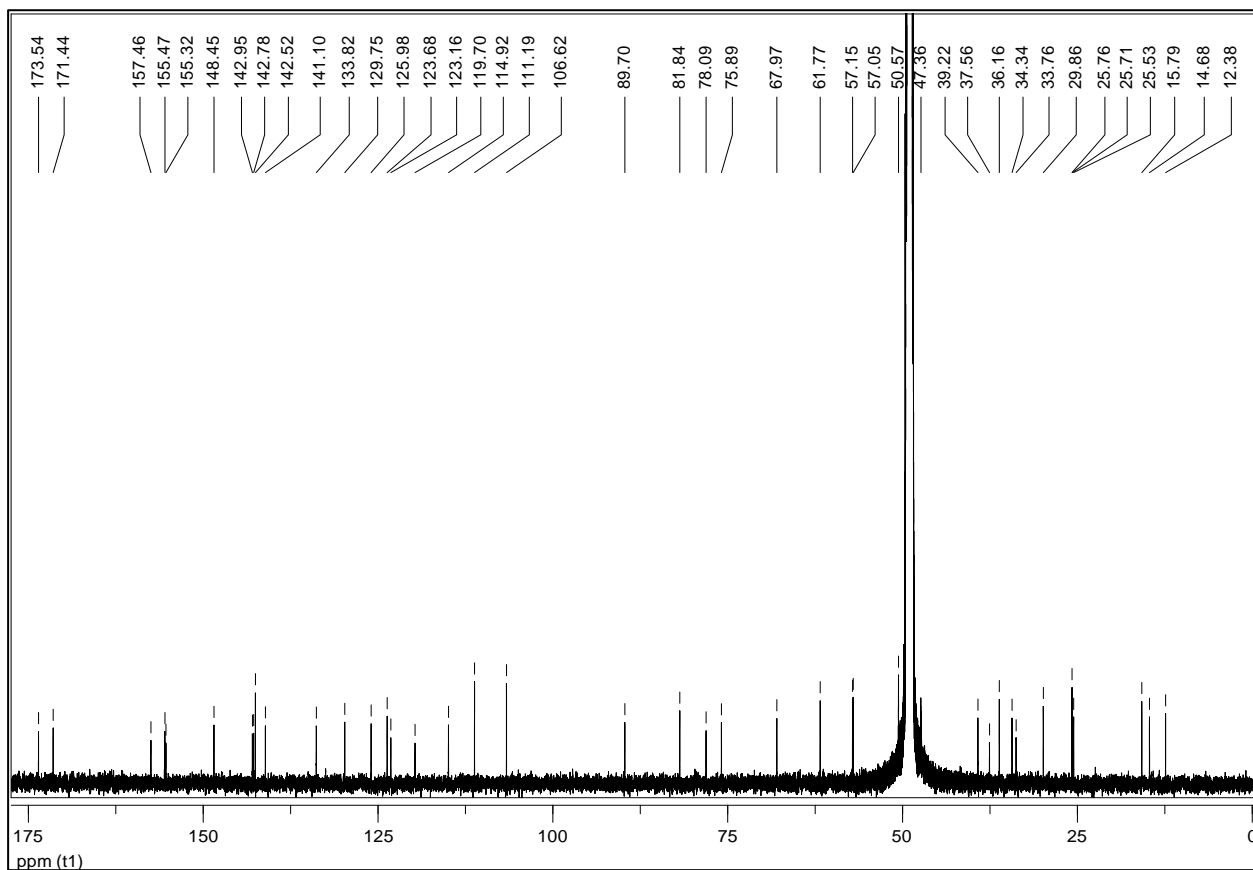
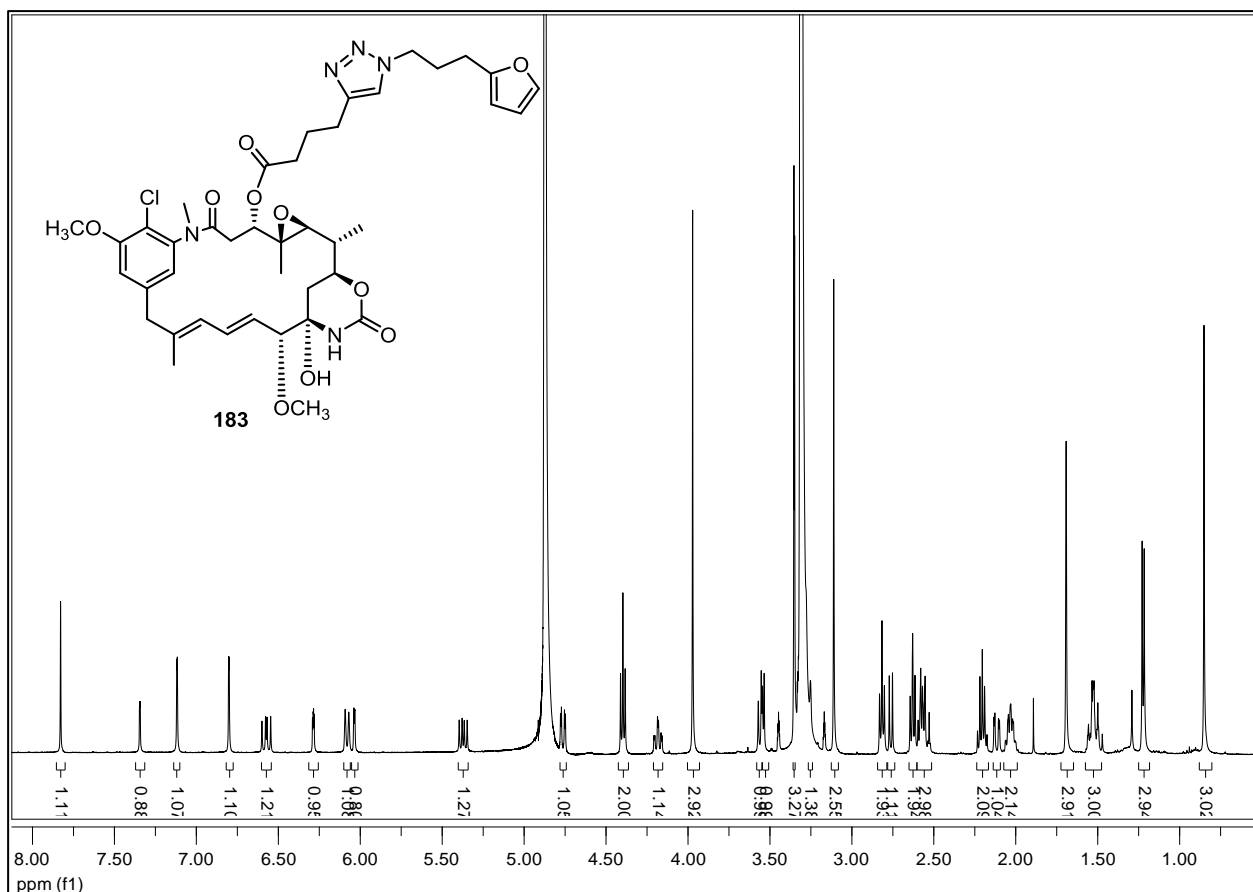


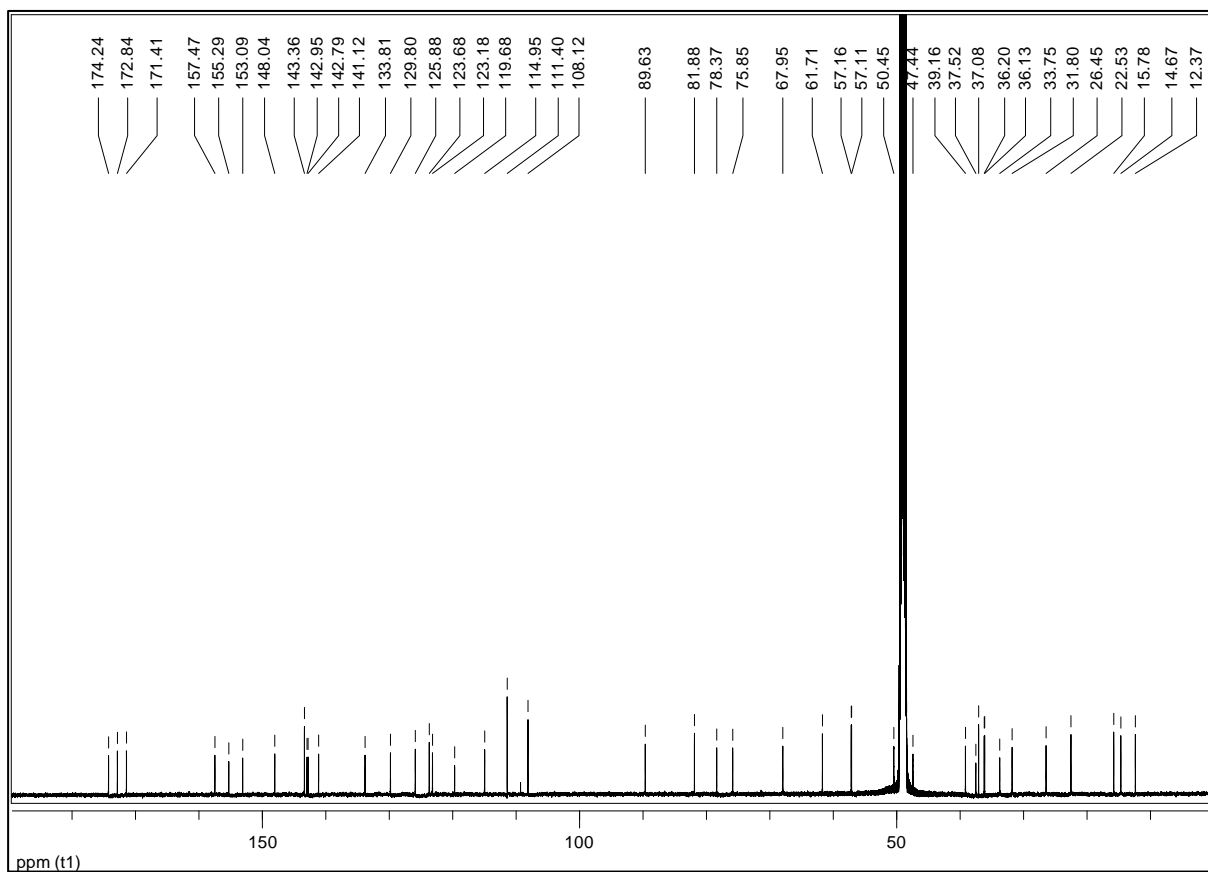
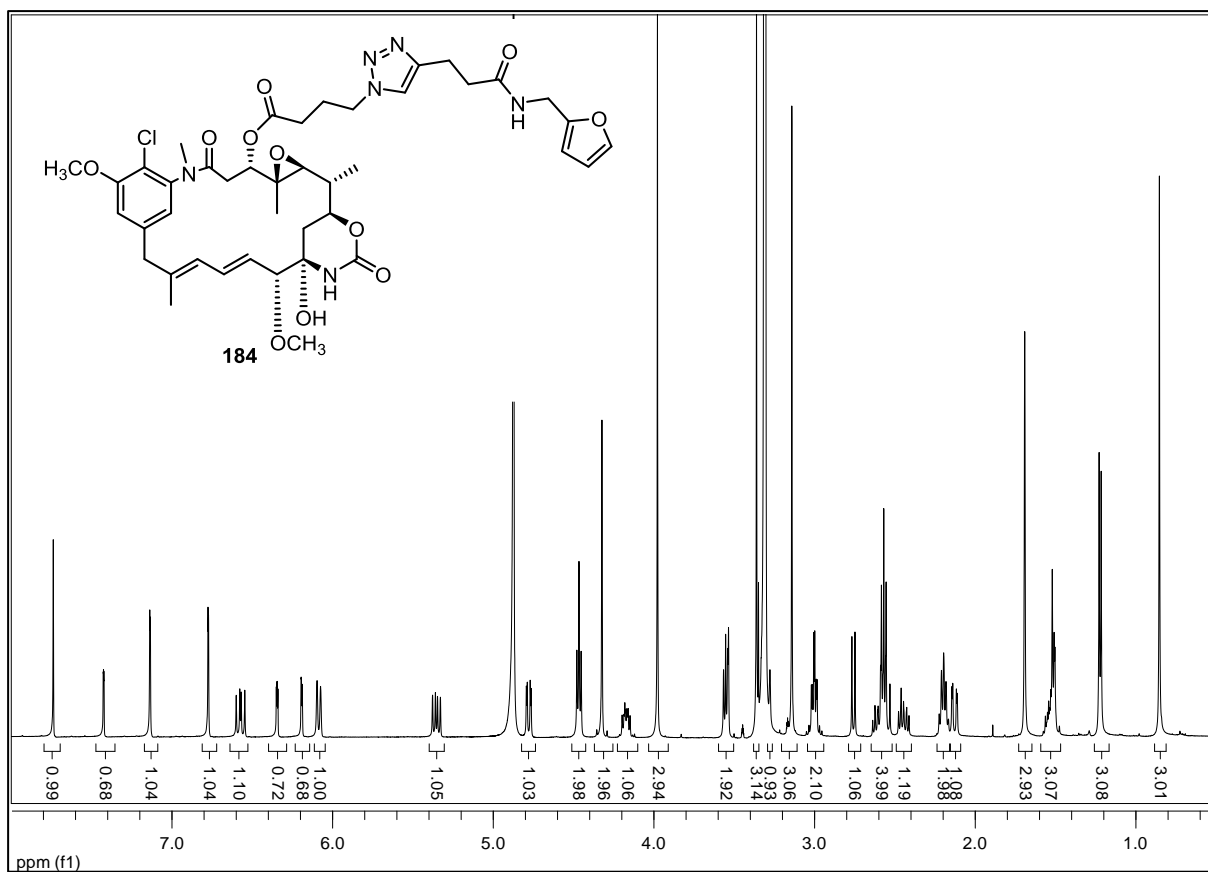


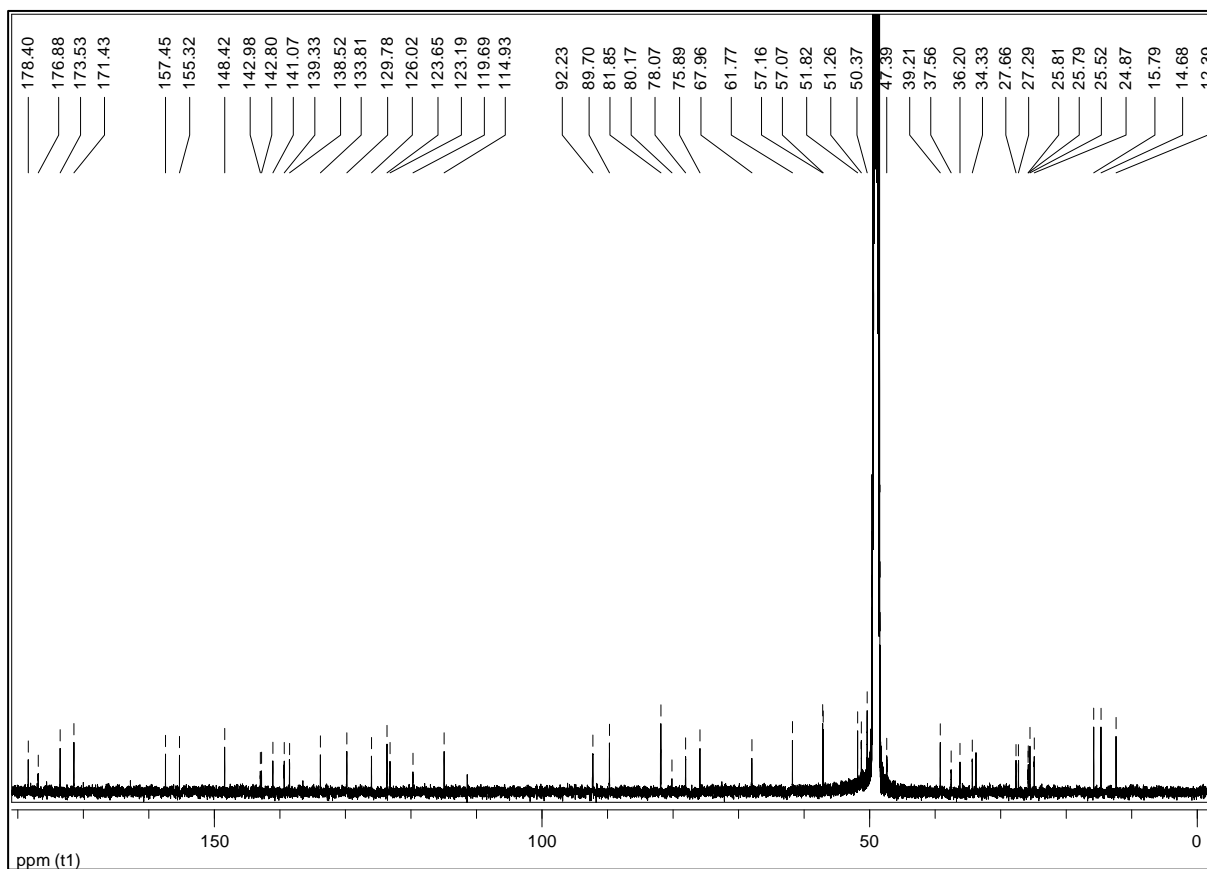
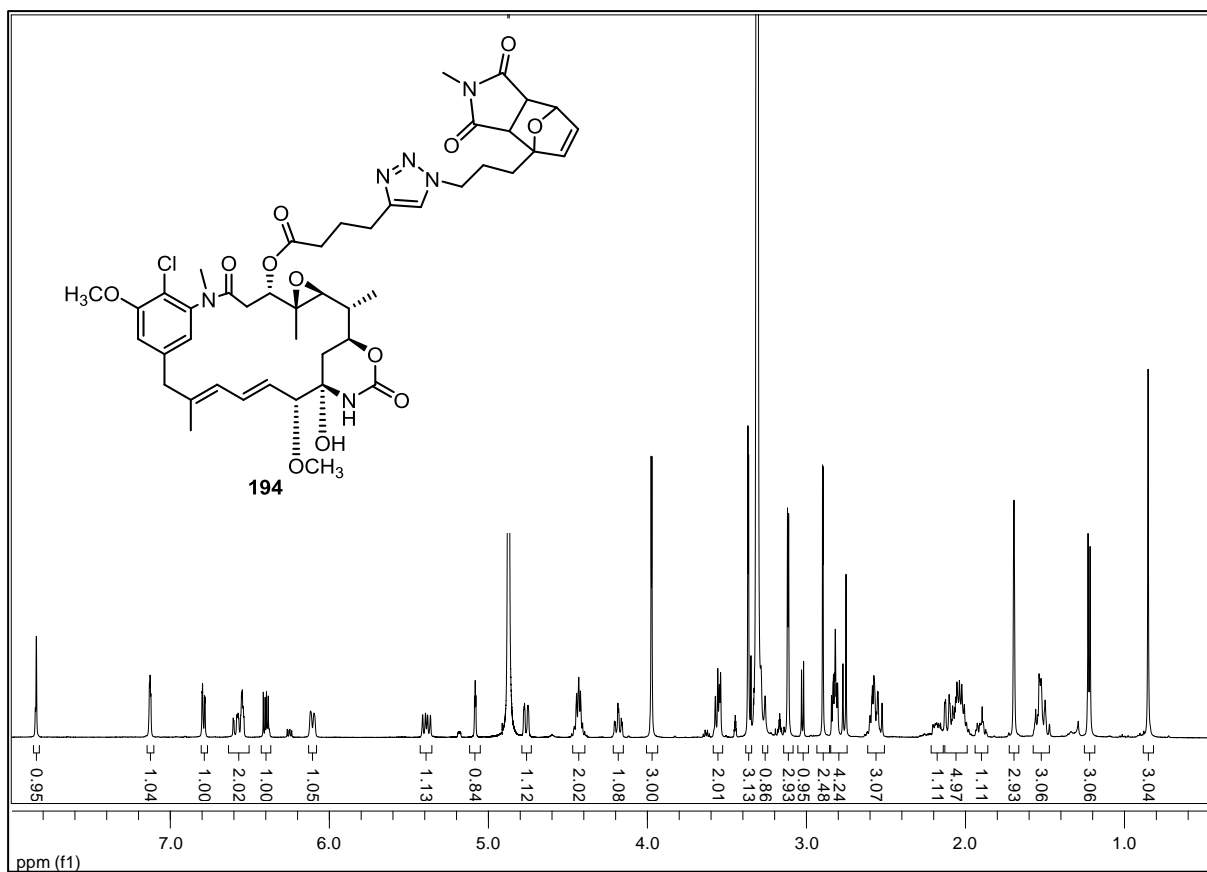


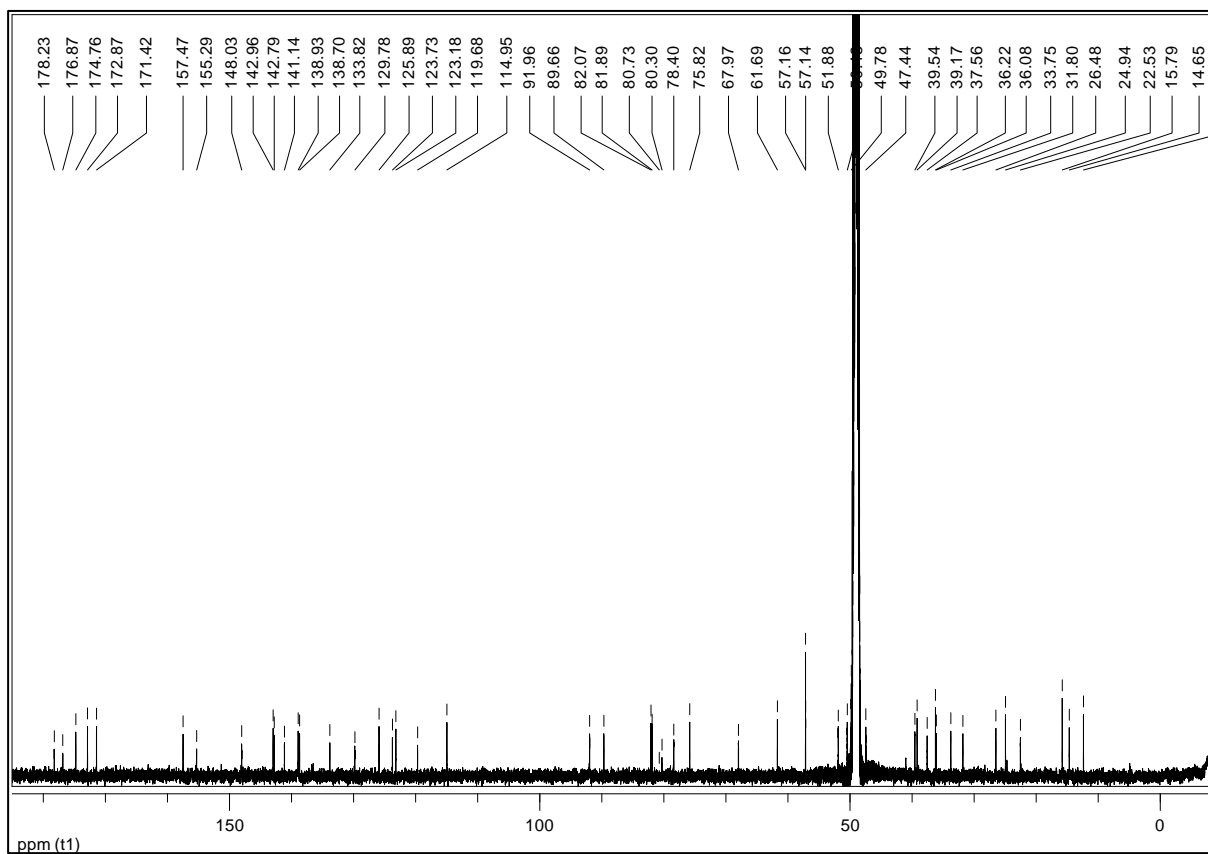
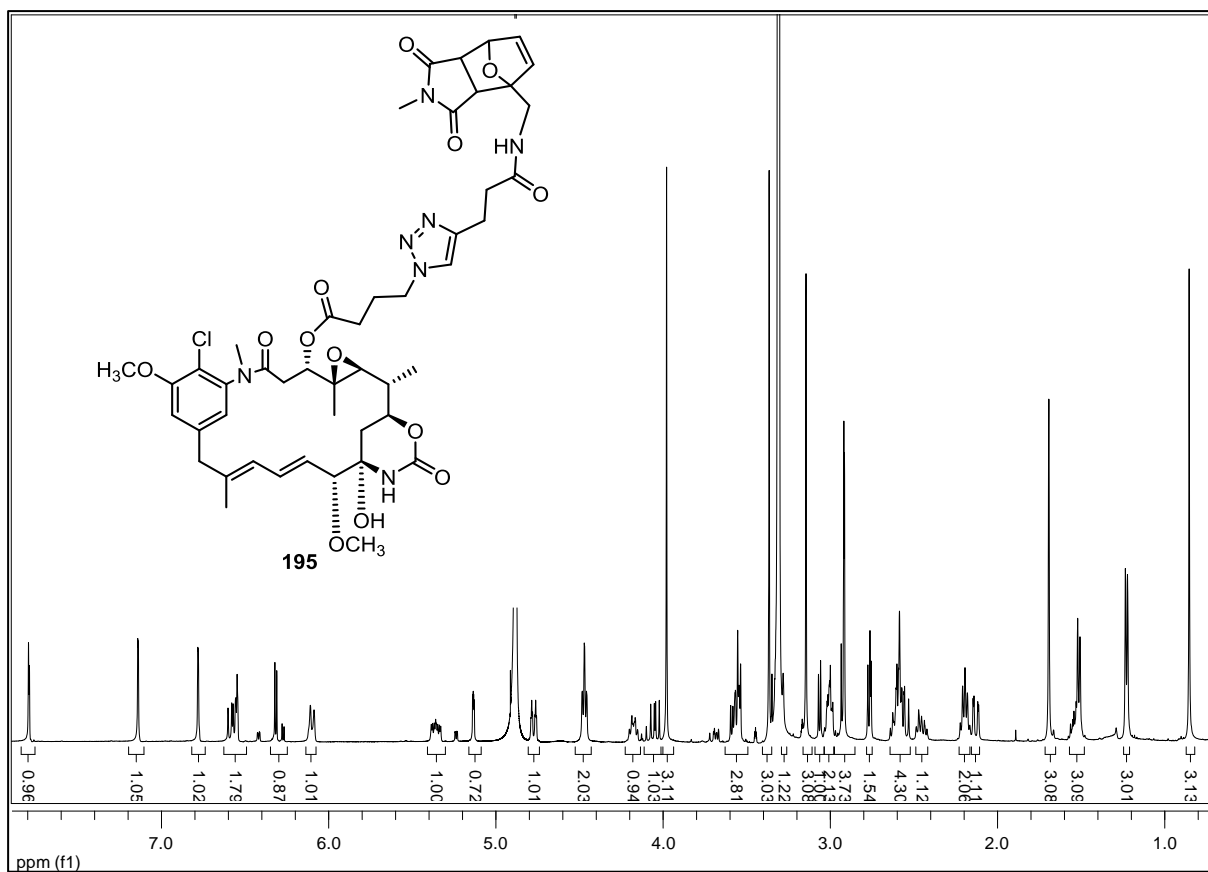


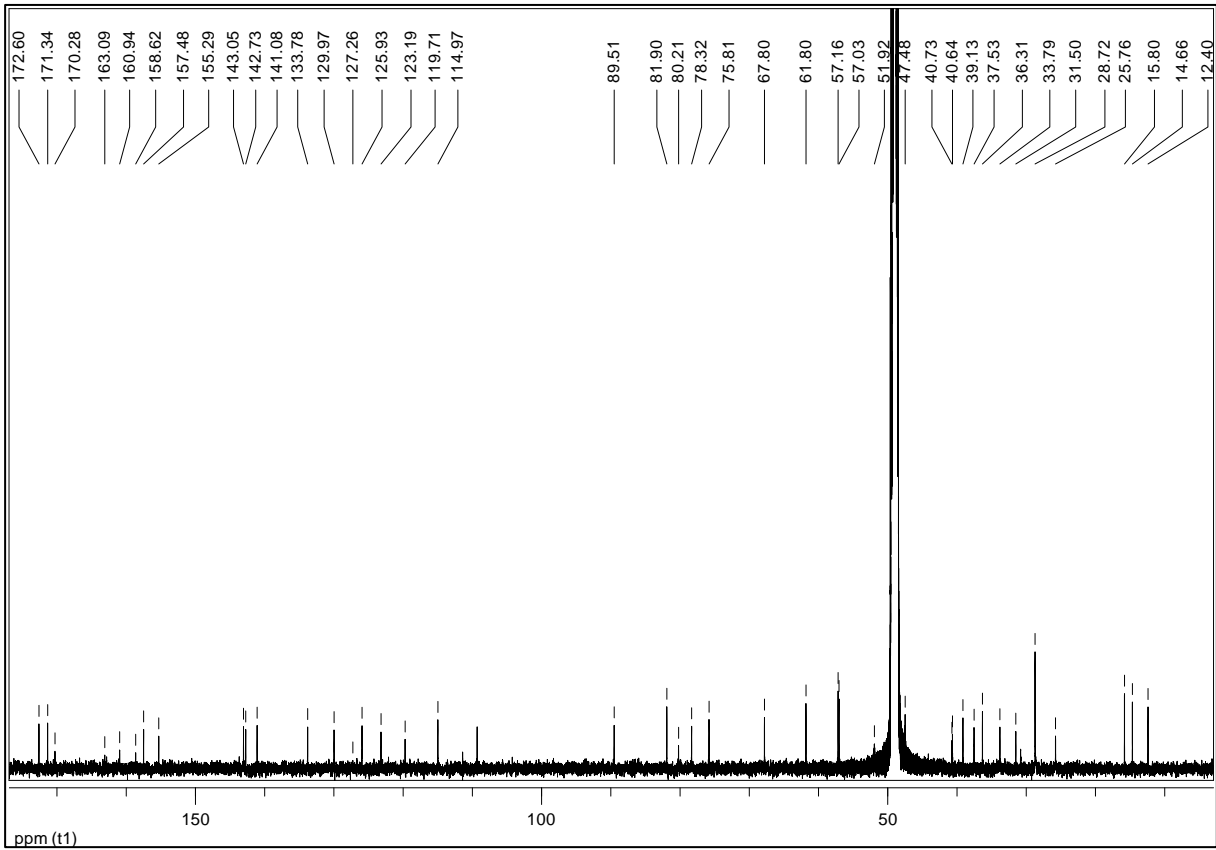
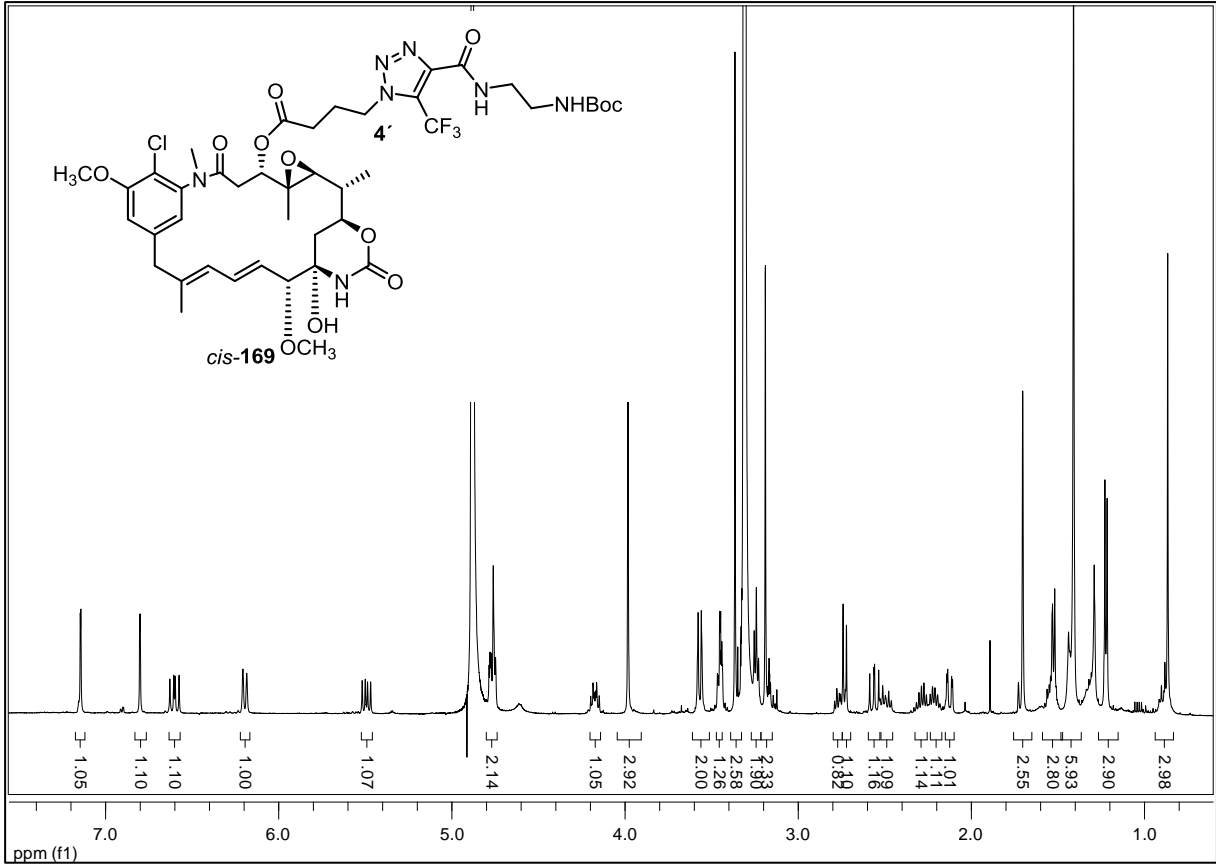


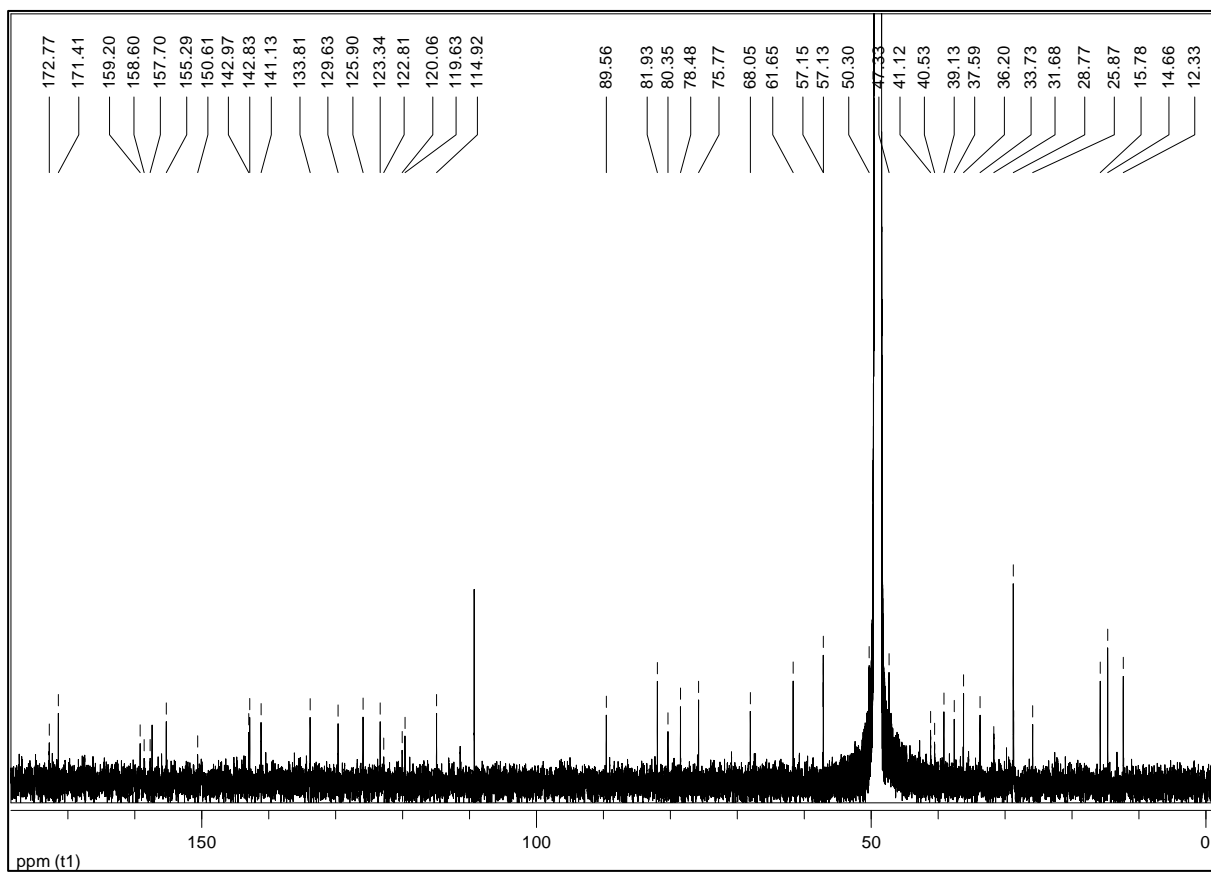
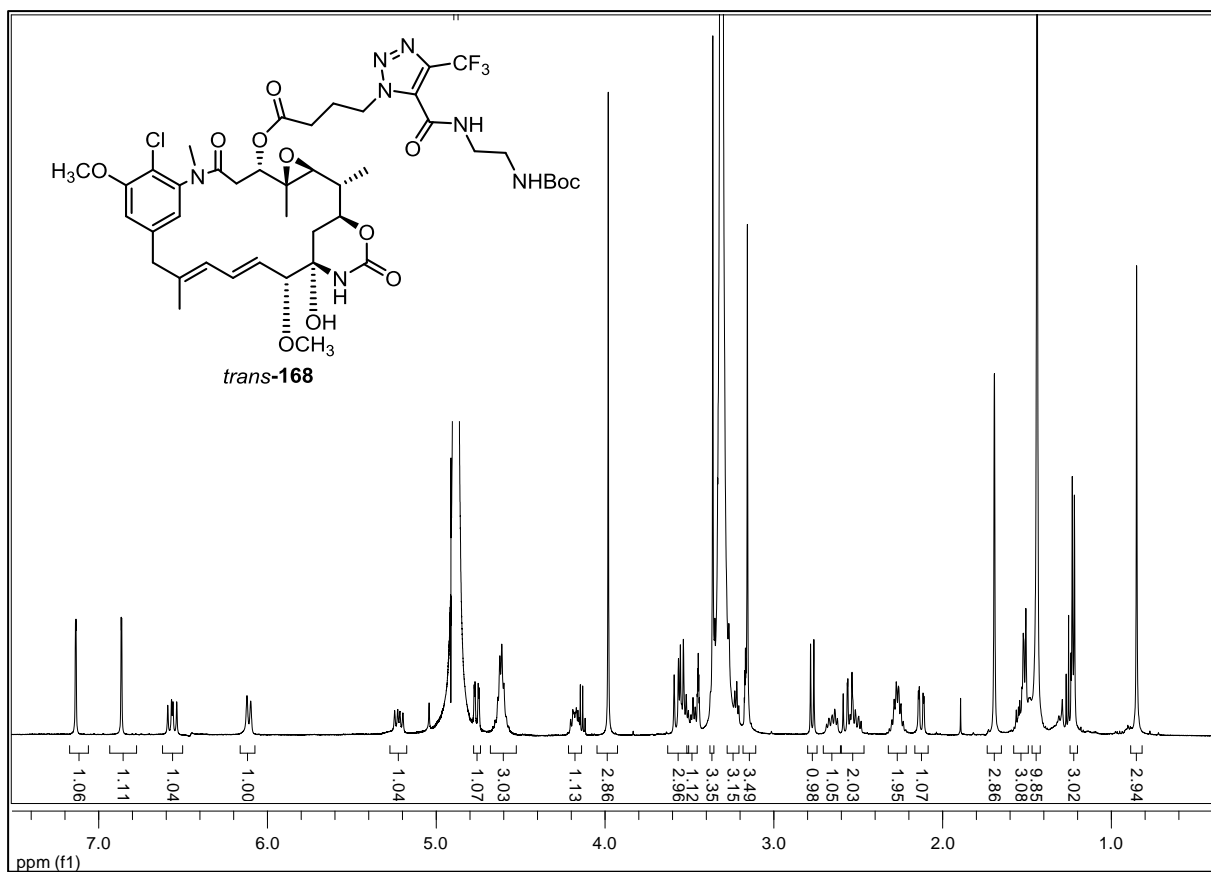


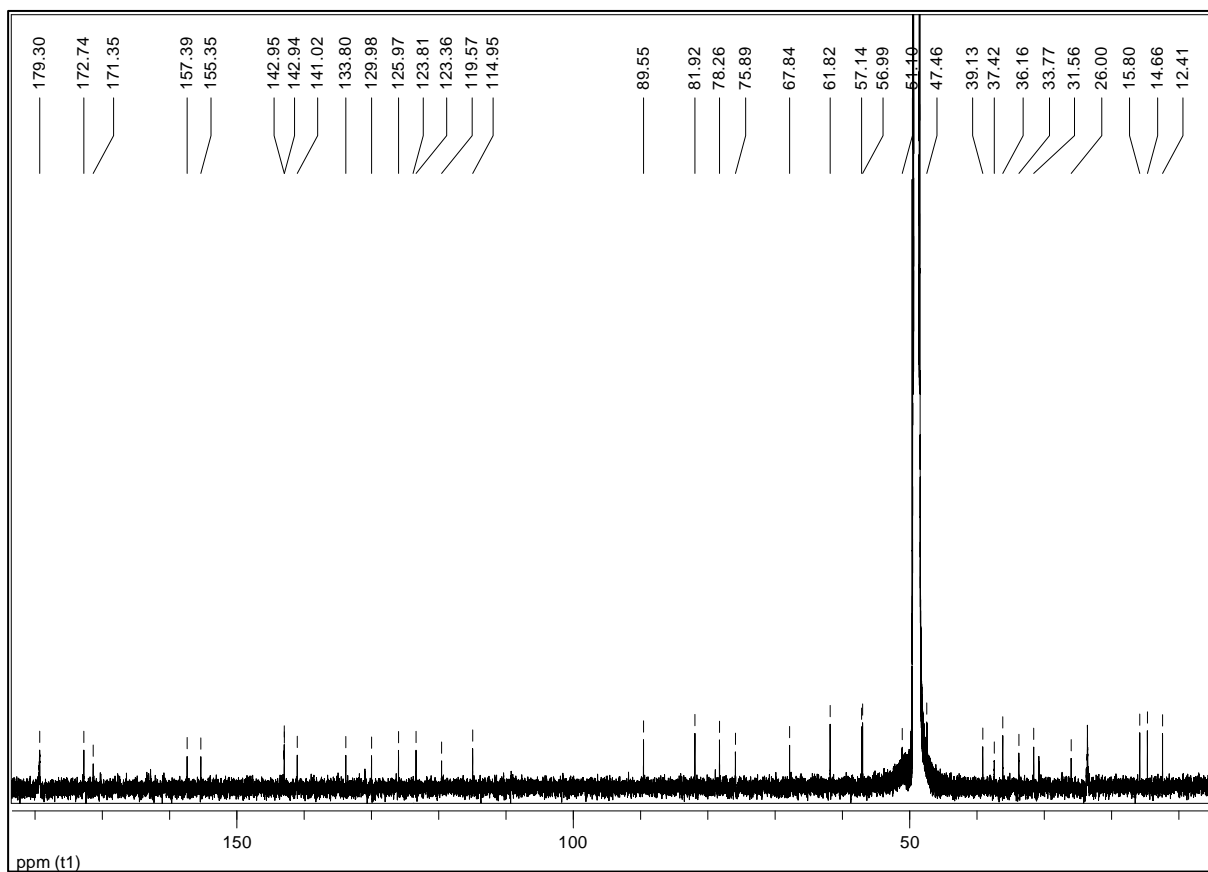
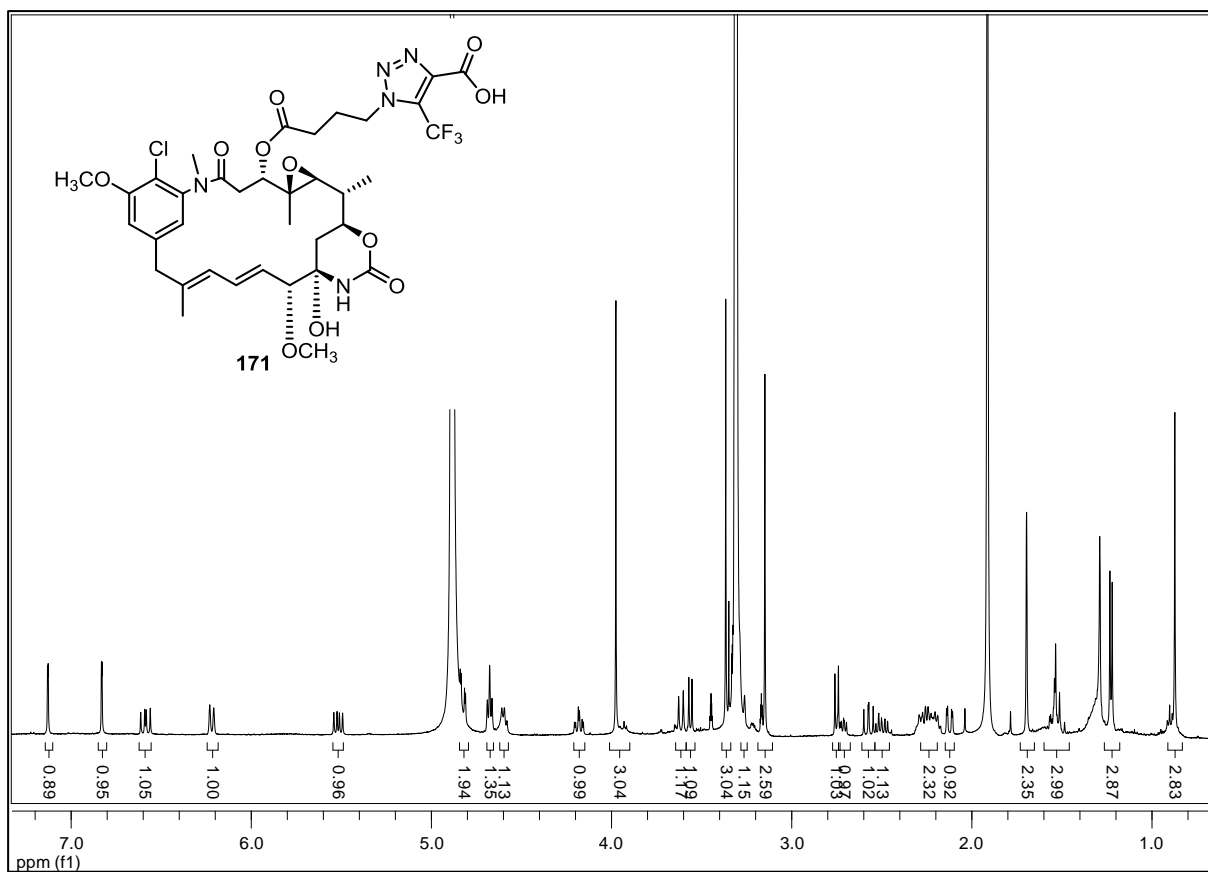


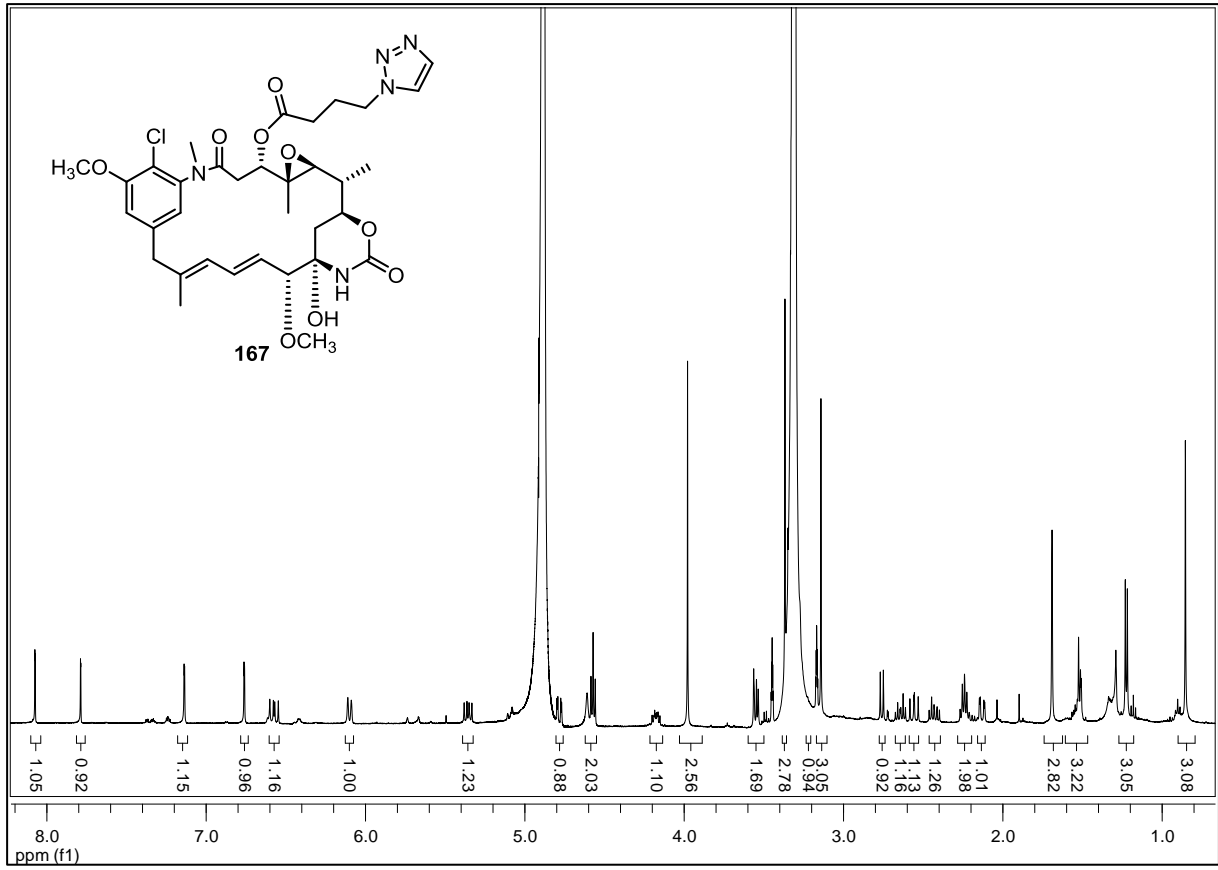












DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kirschning für sehr interessante und spannende Themenstellung, für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für Ideenunterstützung und sachkundige, wertvolle Betreuung im Verlauf der gesamten Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Kalesse danke ich für die Übernahme des Korreferats. Vielen Dank an Prof. Dr. Detlef Bahnemann für die freundliche Bereitschaft die Dritprüferschaft, zu übernehmen.

Bei Dr. Gerald Dräger bedanke ich mich für die Einweisungen in Gerätschaften, sei es Massenspektrometer, HPLC`s oder die Fütterungspumpen, die zahlreiche Tipps und Tricks waren immer eine großartige Hilfe.

Drei Damen in Sekretariat und Mitglieder der Analytik-Abteilung danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft.

Für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes danke ich ganz besonders Nadine Kandziora, Jessica Buchholz, Gerrit Jürjens, Franziska Gille, Gesche Berkhan, Arne Weber und Dr. Andreas Kipke.

Meinen ehemaligen Laborkollegen Dr. Jenny Barbier, Dr. Nadin Schläger, Sabrina Schläger, Arne Weber und jetzigen Laborkollegen Egor Geist und Jonas Ammermann danke ich vielmals für die tolle Zusammenarbeit und gute Laboratmosphäre. Die Mamma Mia-Stunden von Jenny und EinsLive-Musik von Arne werde ich nie vergessen.

Vielen Dank natürlich an meine Mädels - Katja Hermene, Nadine Kandziora, Jessica Buchholz, Franziska Gille und Claudia Holec - für die super spannenden Mittagspausen, kreative Ideen, sowie die Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeit. Diese Zeit mit euch war unbeschreiblich und hat mir viel Spaß gemacht. Ein lieber Dank geht persönlich an Katja Hermene für die schöne Zeit auf unseren Reisen, kritische Kommetare und tolle Ideenanstößeungen, die ich immer gerne zur Kenntnis genommen habe.

Dr. Kirsten Harmrolfs, Dr. Tobias Knobloch, Gerrit Jürjens, Dr. Simone Eichner und Anja Heutling bedanke ich mich für die Vermittlung der Grundlagen des mikrobiologischen Arbeitens und theoretischen Hintergründe. Ein großes Dankeschön gilt Gerrit Jürjens für die ständige Hilfsbereitschaft in vielen chemischen, technischen und mikrobiologischen Fragen. Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern in AK Kirschning (ehemalige inklusive), für die tolle Zeit und angenehme Zusammenarbeit. Praktikanten und Bacheloranten danke ich für die Zusammenarbeit in Mutasyntheseprojekt.

Meiner Freundin Helena Damsen danke ich für die tolle Zeit während des Studiums.

Ein lieber und herzlicher Dank geht an meine beste Freundin Irina Sajtseva. Du warst immer für mich da und hast immer das offene Ohr für mich gehabt, viieeeeeelen viieeeelen Dank dafür vom ganzen Herzen!

Моим родителям, моей сестре Вике и конечно же всей моей семье огромное спасибо за поддержку и советы, за понимание и терпение во время моей учебы и диссертации.

Ein besonders lieber Dank geht an meinen Ehemann Toni Mancuso, der durch sein Verständnis, seine Geduld und Unterstützung – gerade während der letzten Monate – entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne dich hätte ich nie geschafft!

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Lena Mancuso
Geburtsdatum/-ort: 22.09.1982 in Bachtschisaraj, Ukraine
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Hochschulstudium

09/2010 – 11/2013 **Promotionsstudium** bei Prof. Dr. A. Kirschning, Leibniz Universität Hannover, *“Muta- und Semisynthetische Zugänge zu Konjugaten aus Ansamitocinen und tumor-assoziierten Liganden“*.

11/2009 Diplomprüfung in Organischer, Anorganischer, Technischer und Physikalischer Chemie.

01/2010 – 08/2010 **Diplomarbeit** bei Prof Dr. A. Kirschning, Leibniz Universität Hannover, „Mutasyntesen von Tumor-adressierenden Ansamitocinen“.

02/2009 - 05/2009 **Schwerpunktpraktikum** bei SOLVAY Pharmaceuticals, Hannover

10/2005 - 08/2010 **Diplomstudium**, Chemie, Leibniz Universität Hannover

09/1999 - 06/2004 **Diplomstudium**, Germanistik, Tawrijs'ky Nationaluniversität „W. I. Wernads'ky“, Simferopol, *„Lexikalische, semantische und wortbildende Eigentümlichkeiten von Substantiven der modernen Nationalvariante der deutschen Sprache in Österreich“*.

Schulbildung

09/1988 - 06/1999 **Abitur**, Schule der I-III Stufen Nr. 4, Bachtschisaraj, Ukraine

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen:

L. Mancuso, G. Jürjens, J. Hermane, K. Harmrolfs, S. Eichner, J. Fohrer, W. Collisi, F. Sasse, A. Kirschning, Bioreduction of Aryl Azides during Mutasyntesis of New Ansamitocins, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4442-4445.

Posterbeiträge:

[1] „*Unprecedented bioreduction of aryl azides by mutasyntesis*“, ESOC, Marseille, Frankreich, Juli **2013**.

[2] „*Unnatural azides as starter unit in ansamitocin mutabiosynthesis*“, ISACS7, Edinburgh, UK, Juni **2012**.

[3] „*Azides as starter unit in mutasyntesis*“, Natural Products and Chemical Biology Symposium, Bristol, UK, **Posterpreis**, Juni **2011**.