Chemische und chemoenzymatische Synthesezugänge zu neuen Ansamitocinderivaten

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. Kirsten Rebekka Harmrolfs
geboren am 26.05.1979 in Berlin

2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2006 bis April 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

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

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

Hannover, den 14.04.10

Referent:	Prof. Dr. A. Kirschning
Korreferent:	Prof. Dr. M. Kalesse
Tag der Promotion:	10.06.2010

„Ausdauer wird früher oder später belohnt –
meistens aber später„

(Wilhelm Busch, 1832-1908)

Zusammenfassung

Kirsten Rebekka Harmrolfs

Chemische und chemoenzymatische Synthesezugänge zu neuen Ansamitocinderivaten

Schlagworte: Ansamitocine, Mutasynthese, HUISGEN-Cycloaddition, NEGISHI-Kupplung

Die vom Actinomyceten *Actinosynnema pretiosum* im Sekundärmetabolismus produzierten Ansamitocine sind hoch antitumoral wirksame Verbindungen mit IC_{50}-Werten im nanomolaren Bereich. Aufgrund von geringen Selektivitäten und daraus resultierendem Auftreten von starken Nebenwirkungen mussten klinische Studien in Phase II eingestellt werden. Mit dem Ziel eine Verbesserung der Wirkstoffeigenschaften bezüglich der Selektivität von mutierten gegenüber gesunden Zellen zu erreichen, wird die Forschung an modifizierten Ansamitocinen fortgesetzt.

In der vorliegenden Dissertation wurden unterschiedliche Methoden zur Erzeugung von Ansamitocinderivaten untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene unnatürliche neue Ansamitocine mittels Mutasynthese mit einer *knock-out* Mutante von *Actinosynnema pretiosum* (HGF073) durch Zufütterung von *AHBA*-Derivaten erzeugt. Durch den mutasynthetischen Einbau einer Ethinylgruppe in die Ansamitocinstruktur, konnte eine nachträgliche semisynthetische Derivatisierung mittels HUISGEN-Cycloaddition vorgenommen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von zwei *seco*-Proansamitocinen und Untersuchungen zur Aufnahmebereitschaft und biosynthetischen Umsetzung der komplexen Substrate durch *A. pretiosum* Stamm HGF073. Die Synthese der beiden Substrate konnte in acht bzw. neun Stufen realisiert werden. Mit den erfolgten Verfütterungs-experimenten konnte gezeigt werden, dass hochkomplexe Biosyntheseintermediate vom PKS-Modul erkannt und zum vollständigen Naturstoff prozessiert werden.

Im dritten Abschnitt wird die Synthese eines neuen Proansamitocinderivats beschrieben. Der vorgesehene retrosynthetische Ansatz konnte nach einigen Veränderungen der Fragmente größtenteils realisiert werden. Dafür wurden methodische Untersuchungen bezüglich einer regioselektiven NEGISHI-Kupplung durchgeführt, über die die Anbindung des Diensystems an ein benzylisches Bromid gegenüber einem phenylischen möglich war. Weiterhin wurden Bedingungen für eine HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zur Anbindung eines primären Amids an das aromatische System ausgearbeitet.

Abstract

Kirsten Rebekka Harmrolfs

Chemical and chemoenzymatical approaches towards new ansamitocin derivatives

Keywords: ansamitocins, mutasynthesis, HUISGEN-cycloaddition, NEGISHI-coupling

The ansamitocins, secondary metabolites produced by the actinomycete *Actinosynnema pretiosum,* show high anti-tumor activity on a nanomolar scale. Due to low selectivity and resulting side effects, clinical trials had to be stopped in phase II. Research on ansamitocin derivatives is continued aiming at improved pharmacological properties especially regarding the selectivity for mutated cells.

This thesis covers different approaches to new ansamitocin derivatives. In the first part the generation of new ansamitocins by mutasynthesis is described. Amino-hydroxy-benzoic acid (AHBA) derivatives fed to a *knock-out* mutant of *Actinosynnema pretiosum* (HGF073) were processed to unnatural ansamitocins. Incorporation of an acetylene-unit in the ansamitocin-stucture offered the possibility for subsequent semisynthetic transformations via HUISGEN-cycloaddition.

The second part describes the synthesis of two *seco*-proansamitocins. These complex substrates were studied in biosynthetic transformations by *Actinosynnema pretiosum* strain HGF073. The syntheses of the two compounds were accomplished in eight or nine steps respectively. The feeding experiments proved that highly complex biosynthetic intermediates can be loaded on the pks-module for further processing to complete natural products.

In the third part the synthesis of a new proansamitcin derivative is described. The synthesis strategy based on the retrosynthetic analysis was successfully employed with only minor changes regarding the structure of the main fragments. Key transformations were a regioselective NEGISHI-coupling and a HARTWIG-BUCHWALD-coupling. By systematic investigation of reactions conditions the selective coupling of a diene-unit to a benzyl bromide presence of a phenyl bromide was achieved. Furthermore conditions for a HARTWIG-BUCHWALD-amination were elaborated to convert the remaining phenyl bromide into a primary amine.

1. **EINLEITUNG** **4**
1.1 Naturstoffe - Wirkstoffe **4**
1.2 Synthese von Naturstoffderivaten **6**
1.2.1 Totalsynthese, Semisythese 6
1.2.2 Mutasynthese 7
1.3 Ansamitocine **10**
1.3.1 Allgemeines 10
1.3.2 Biosynthese von Ansamitocin 12
1.3.3 Biologische Aktivität und Struktur-Aktivitätsbeziehungen 14
1.3.4 Notwendigkeit von Immunokonjugaten 15
1.3.5 Die Blockmutante HGF073 16
2. **ZIELSETZUNG** **17**
3. **BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE** **20**
3.1 Mutasynthetische Nutzung von AHBA-Derivaten **20**
3.1.1 Allgemeines 20
3.1.2 Biosynthesestudien an HGF073 mit 4-Halogen-AHBA-Derivaten 22
3.1.3 Mutasynthese für die semisynthetische Nutzung in C-C-Kupplungen 26
3.1.4 Mutasynthese für die semisynthetische Nutzung in HUISGEN-Cycloadditionen. 30
3.1.5 Biosynthesestudien an HGF073 mit homologisierten AHBA-Derivaten 34
3.2 Semisynthetische Derivatisierung **37**
3.2.1 Linkersynthese 37
3.2.2 Anbindung der Linker 38
3.3 Biologische Aktivitäten **40**
3.4 seco-Proansamitocin –Chemobiosynthese **41**
3.4.1 Vorarbeiten 41
3.4.2 Chemische Synthese 44
3.4.3 Verfütterungsexperimente mit *seco*-Proansamitocinen 52
3.5 Proansamitocin-Derivate **54**
3.5.1 Mutasynthese mit synthetisch modifizierten Proansamitocinen 54
3.5.2 Synthese des aromatischen Teils 57
3.5.3 NEGISHI-Kupplung zur Knüpfung des Diensystems B an den Aromaten A 58
3.5.4 Versuche zur Heck-Kupplung mit Diiodid 94 62
3.5.5 Versuche zur Synthese des Diensystems 111 66
3.5.6 HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zum Aufbau des Lactams 76

4. **ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK** **83**
4.1 Zusammenfassung **83**
4.2 Ausblick **86**
5. **EXPERIMENTELLER TEIL** **88**
5.1 Allgemeine Hinweise zu den chemisch-synthetischen Arbeiten **88**
5.2 Allgemeine Hinweise zu den mikrobiologischen Arbeiten **91**
5.3 Verbindungen aus Kapitel 3.1: Mutasynthone **93**
5.4 Verbindungen aus Kapitel 3.1: Ansamitocin-Derivate **110**
5.5 Linkersynthese und -Anbdindung **129**
5.6 Verbindungen aus Kapitel 3.2 ..... **136**
5.7 Verbindungen aus Kapitel 3.3 ..... **153**
6. **ANHANG** **202**
6.1 Verfütterungsexperimente mit seco-Proansamitocinen 66 und 67 ..... **202**
6.2 NMR-Spektren **204**

Abkürzungsverzeichnis

AAC	Azid-Alkin-Cycloaddition
Ac	Acetyl
ACP	Acyl Carrier Protein
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
Äq	Äquivalent
Ar	Aryl
asm	Gene der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*
AT	Acyltransferase
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid
bzw.	beziehungsweise
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy
Cp	Cyclopentadienyl
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMP	DESS-MARTIN-PERIODINAN
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen
E/Z	entgegen/zusammen (Doppelbindungskonfiguration)
ED	Effektive Dosis
EE	Ethylacetat
ER	Enoylreduktase
ESI	electrospray ionisation
Et	Ethyl
et al.	et alii

Glu	Glutaminsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC	inhibitory concentration
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
K_i	Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LDA	Lithiumdiisopropylamid
M	molar
Me	Methyl
MOM	Methoxymethyl
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NBS	N-Bromsuccinimid
n-BuLi	*n*-Buthyllithium
NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
NMP	*N*-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate buffered saline
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDC	Pyidiniumdichromat
PE	Petrolether
PEPPSI	pyridine-enhanced precatalyst preparation stabilization and initiation
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase

ppm	parts per million
Pr	Propyl
quant.	quantitativ
rel.	relativ
Rf	Rückfluss
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAR	structure-activity relationship
Smp.	Schmelzpunkt
SNAC	*N*-Acetylcysteaminyl
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	^{t}Butyldiphenylsilyl
TBS	^{t}Butyldimethylsilyl
Teoc	2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
Tf	Triflat (Trifluomethansulfonat)
Tfa	Trifluoracetyl
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl oder Tetramethylsilan
TPAP	Tetrapropylammoniumperruthenat
t_R	Retentionszeit
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolett
Xphos	2-Dicyclohexylphosphino-2′,4′,6′-triisopropylbiphenyl
YMG	yeast, malt, glucose
z.B.	zum Beispiel
Zers.	Zersetzung
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

1. EINLEITUNG

1.1 NATURSTOFFE - WIRKSTOFFE

***Naturstoff**: „natürlich vorkommender Stoff als solcher, unverarbeitet oder lediglich manuell, mechanisch oder durch Gravitationskraft, durch Auflösung in Wasser, durch Flotation, durch Extraktion mit Wasser, durch Dampfdestillation oder durch Erhitzung zum Wasserentzug verarbeitet oder durch beliebige Mittel aus der Luft entnommen" und „nicht chemisch veränderter Stoff [...], dessen chemische Struktur unverändert bleibt, auch wenn er einem chemischen Verfahren oder einer chemischen Behandlung oder einer physikalischen mineralogischen Umwandlung, zum Beispiel zur Beseitigung von Verunreinigungen, unterzogen wurde“* [1]

Naturstoffe wurden schon seit der menschlichen Frühzeit als Wirkstoffe eingesetzt und spielten für die Entwicklung der Medizin eine entscheidende Rolle. Ob in Form von Tee, Tinktur oder Salbe: das Wissen über die heilende Wirkung von Pflanzen besteht in jedem Kulturkreis und schon seit Menschengedenken. Ende des 18. Jahrhunderts wurden durch CARL WILHELM SCHEELE erste Naturstoffe in Reinform isoliert, wie z.B. Harnsäure, Milchsäure, Weinsäure und Zitronensäure. Jedoch wurde erst im 19. Jahrhundert das Kapitel der Naturstoffchemie von FRIEDRICH WÖHLER durch seine Synthese von Oxalsäure und Harnstoff eröffnet. Die Synthese von „organischem“ Harnstoff aus „anorganischem“ Ammoniumcyanat (1828) wird als Meilenstein in der Geschichte der Organischen Chemie und WÖHLER damit als Widerleger des Vitalismus betrachtet[2].

Von dieser Zeit an nahm die naturstoffchemische Forschung eine rasante Entwicklung. Weitere Meilensteine setzten EMIL FISCHER mit der Strukturaufklärung und Synthese von Glucose (1891), ALEXANDER FLEMING mit der Entdeckung von Penicillin (1929) und ROBERT BURNS WOODWARD mit den ersten Totalsynthesen verschiedener komplexer Naturstoffe[3] in den 1950er Jahren.

---

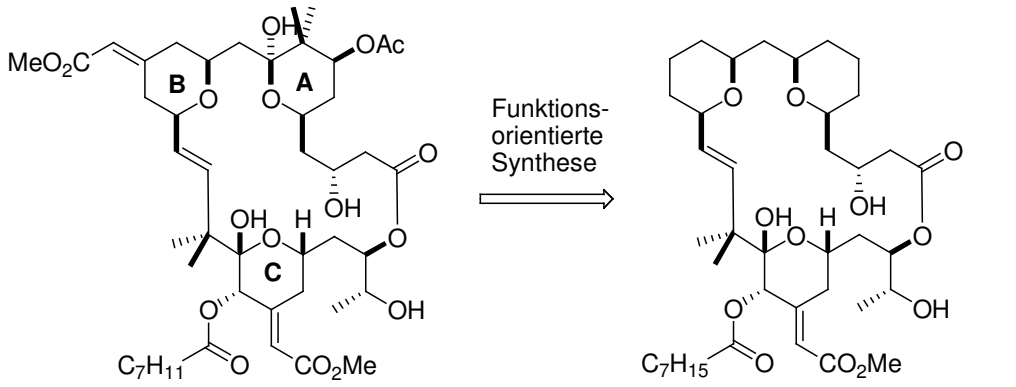
[1] Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

[2] K.C.Nicolaou, D.Vourloumis, N.Winssinger, P.S.Baran, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2000**, *39*, 44-122.

[3] unter Anderem: Cholesterin, Cortison, Strychnin, Lysergsäure, Chlorophyll, und Vitamin B12.

In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde vor allen Dingen an der Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika gearbeitet, aber auch erste Naturstoffe mit zytostatischer Wirkung wie z.B. Taxol, das Anfang der 1970er Jahre von MONROE E. WALL und M. C. WANI entdeckt wurde, kamen ins Blickfeld der Wirkstoffforschung.[4]

Nachdem Naturstoffe als Leitverbindungen durch kombinatorische Synthesetechniken in den Hintergrund gedrängt wurden, spielen sie heute wieder eine entscheidende Rolle[5] als Therapeutika oder als Leitstrukturen für diese. 77 % der derzeitigen antibakteriellen Wirkstoffe und 73 % der verwendeten Zytostatika sind Naturstoffe oder Abkömmlinge.[6] Der große Vorteil liegt in der im Molekül natürlich eingebauten Chiralität, die genau für die Anbindung an komplexe Proteine und andere dreidimensionale biologische Rezeptoren geeignet ist[7]. Deshalb besteht eine große Chance bei kleinen Veränderungen am Naturstoff dieses „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ und damit die Wirksamkeit zu erhalten. Bei Kenntnis des Wirkmechanismus können die Substanzen auf essentielle Strukturmerkmale reduziert werden, wie es im Fall der Bryostatin-Analoga von WENDER *et al.* gezeigt werden konnte (Schema 1).[8]



Bryostatin (**1**)
K_i = 1.4 nM
> 70 Stufen

Bryostatin-Analogon (**2**)
K_i = 0.3 nM
29 Stufen; längste lineare Sequenz: 19 Stufen

Schema 1. Funktionsorientierte Synthese von Bryostatin-Analogon **2**.[8]

---

[4] M.C.Wani, H.L.Taylor, MonroeE.Wall, P.Coggon, A.T.McPhail**,** *J. Am. Chem. Soc.,* **1971**, *93*, 2325–2327.

[5] H.B.Bode, R.Müller, *Angew.Chem.*, **2005**, *117*, 6988-7007.

[6] D.J.Newman, G.M.Cragg, *J. Nat. Prod.,* **2007**, *70,* 461-477.

[7] D.G.I.Kingston, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72,* 507–515.

[8] P.A.Wender, V.A.Verma, R.J.Paxton, T.H.Pillow, *Acc.Chem.Research*, **2008**, *41*, 40-49.

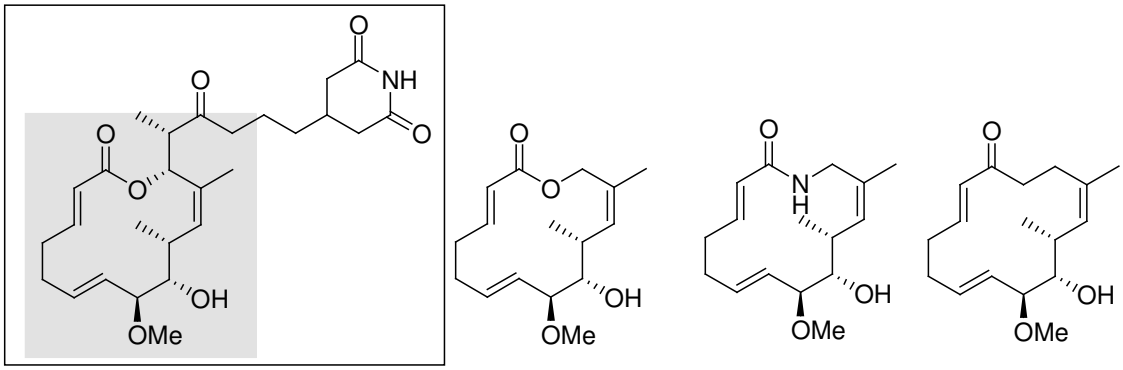
Der Vergleich der Bryostatinsynthese, die über 70 Stufen beinhaltet, mit der 19-stufigen Synthese des vereinfachten Analogons **2** zeigt eindrucksvoll die Vorteile der Kombination von strukturbiologischen und chemischen Verfahren.

1.2 SYNTHESE VON NATURSTOFFDERIVATEN

Trotz des hohen Wirkstoffpotentials von Naturstoffen besteht die Notwendigkeit diese zu derivatisieren. Ein Grund dafür ist die am Beispiel von Bryostatin gezeigte Abkürzung der Synthesesequenz, die elementar für eine mögliche industrielle Nutzung ist. Aber auch fehlende Löslichkeit, Biokompatibilität, Freisetzung oder Stabilität können Gründe für die Derivaterzeugung sein[9]. Für die Darstellung von Naturstoffderivaten stehen einige etablierte Methoden zur Verfügung, die im Folgenden kurz erläutert werden.

1.2.1 Totalsynthese, Semisynthese

Totalsynthetisch dargestellte Naturstoffe können durch kleine Veränderungen der Syntheseroute zu Derivaten führen. Ein Beispiel dafür ist die *Migrastatin*-Synthese von DANISHEFSKY *et al.*, bei der verschiedene Formen des Grundgerüsts synthetisiert wurden, die eine höhere biologische Aktivität als der Naturstoff aufwiesen (Abbildung 1).[10]



	Migrastatin **3**	Migrastatin Gerüst **4**	Lactam **5**	Keton **6**
IC_{50}= (4T1 tumor cells)	29 µM	22 nM	255 nM	100 nM

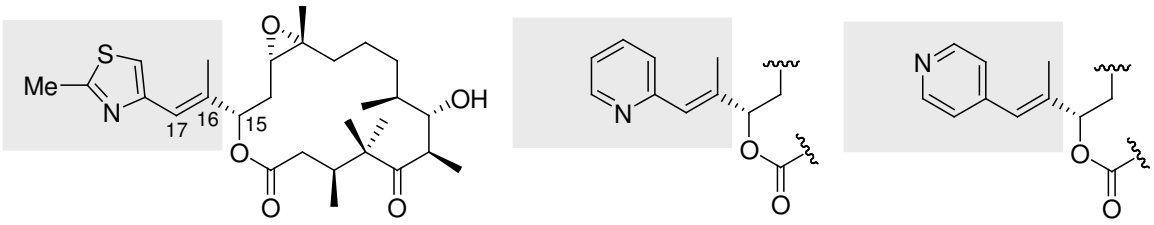
Abbildung 1. Von DANISHEFSKY *et al.* totalsynthetisch erzeugte *Migrastatin*-Derivate.[10]

[9] J.Kennedy, *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*, 25–34.

[10] R.M.Wilson, S.J.Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8329-8351.

Die Erzeugung von Derivaten über Semisynthese ist in diesem Fall offensichtlich eindeutig aufwendiger als der totalsynthetische Zugang.

Derivatisierungen mittels Semisynthese bieten sich für Naturstoffe an, die in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Ein Beispiel dafür ist die semisynthetische Derivatisierung von Epothilon B **8**, das fermentativ im großen Maßstab gewonnen werden kann.[11] Durch Ozonolyse kann die Seitenkette an C16/C17 gespalten werden. Bei Austausch der Seitenkette muss berücksichtigt werden, dass der Stickstoff im Heterozyklus essentiell für die biologische Aktivität ist (Abbildung 2).[12]



	Epothilon B **8**	**8a**	**8b**
rel. Aktivität:	1.0	0.5	0.03

Abbildung 2. Von HÖFLE *et al.* semisynthetisch erzeugte *Epothilon*-Derivate.[11,12]

In diesem Fall wäre der totalsynthetische Zugang zu Derivaten mit modifizierten Seitenketten erheblich zeit- und kostenintensiver.

Für totalsynthetische und semisynthetische Zugänge gilt gleichermaßen, dass bei Kenntnis des Struktur-Wirkstoff-Komplexes gezielter und damit effizienter Derivatisierungen vorgenommen werden können.

1.2.2 Mutasynthese[13]

Ein weiterer Zugang zu Naturstoffderivaten, der mikrobielle Biosynthese und klassische chemische Synthese kombiniert nutzt, ist die Mutasynthese. Dafür werden bakterielle

---

[11] I.H.Hardt, H.Steinmetz, K.Gerth, F.Sasse, H.Reichenbach, G.Höfle, *J.Nat.Prod.*, **2001**, *64*, 847-856.

[12] G.Höfle, N.Glaser, T.Leibold, U.Karama, F.Sasse, H.Steinmetz, *PureAppl.Chem.*, **2003**, *75*, 167-178.

[13] Der Begriff wurde von Rinehart geprägt: K.L.Rinehart, Mutasynthesis of new antibiotics. *PureAppl.Chem*, **1977**, *49*, 1361-1384. Die Methode wurde zuerst von Birch beschrieben: A.J.Birch, *PureAppl.Chem.*, **1963**, *7*, 527-537.

Produzenten von Sekundärmetaboliten genetisch derart manipuliert, dass ihnen die Starteinheit für die Biosynthese des entsprechenden Sekundärmetaboliten fehlt. Somit können den erzeugten Mutanten unnatürliche, den Startbausteinen ähnliche Substrate, zugefüttert werden. Diese als Mutasynthone bezeichneten Verbindungen, werden, falls akzeptiert, in die entsprechenden Naturstoffderivate umgesetzt (Abbildung 3).[14]

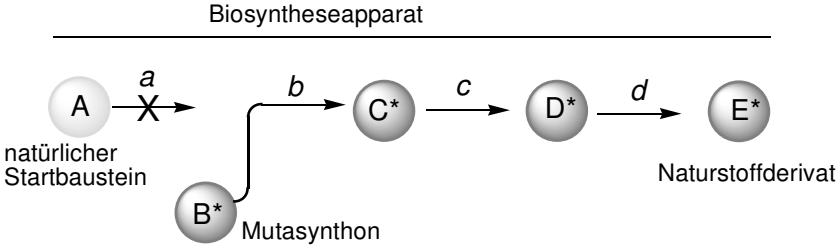


Abbildung 3. Mutasynthese zur Darstellung von Naturstoffderivaten.

Anders als bei der vorläuferdirigierten Biosynthese wird das Mutasynthon bei der Mutasynthese konkurrenzlos eingebaut und führt deshalb zu höheren Ausbeuten und auch zu Derivaten, die mittels vorläuferdirigierter Biosynthese nicht zugänglich wären.[9,15]
Beispiele sind die mutasynthetische Darstellung von Neomycinderivaten,[13] Aureothinderivaten[16] und Ansamitocinderivaten.[17] Mutasynthone sind in diesen Fällen immer den Startbausteinen ähnliche Kohlenhydrate bzw. Aminosäuren.

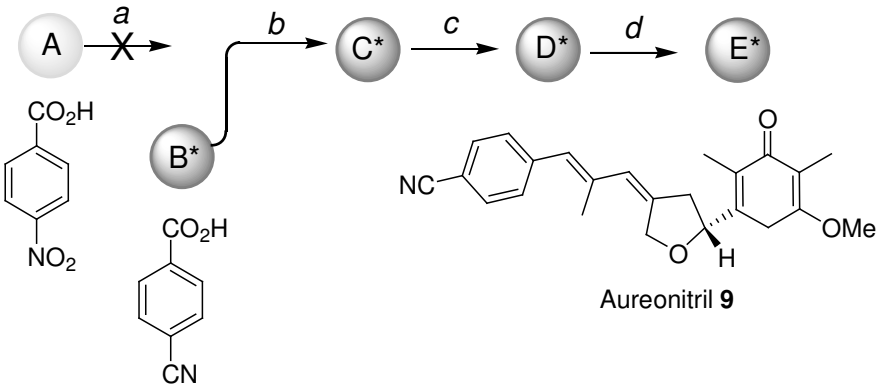


Abbildung 4. Mutasynthese für die Darstellung von *Aureonitril* (**9**).[16]

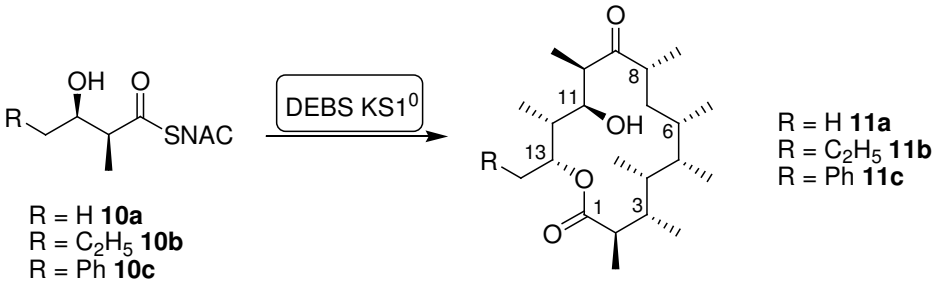
[14] A.Kirschning, F.Taft, T.Knobloch, *Org.Biomol.Chem.*, **2007**, *5*, 3245-3259.

[15] S.Weist, R.Süssmuth, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2005**, *68*: 141-150.

[16] M.Ziehl, J.He, H.Dahse, C.Hertweck, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2005**, *44*, 1202 –1205.

[17] F.Taft, M.Brünjes, H.G.Floss, N.Czempinski, S.Grond, F.Sasse, A.Kirschning, *Chem.Bio.Chem.*, **2008**, *9*, 1057-1060.

Eine erweiterte Variante der Mutasynthese stellt die Chemobiosynthese dar. Hier kommen chemisch synthetisierte fortgeschrittene Biosyntheseintermediate (**10a** – **10c**) für die Verfütterung zum Einsatz, so dass Derivatisierungen des Naturstoffs in vielfältigen Positionen möglich sind. KHOSLA *et al.* konnten am Beispiel von Erythromycinen zeigen, dass die Einführung verschiedener Seitenketten an C13 über diese Methode möglich ist (Schema 2).[18]



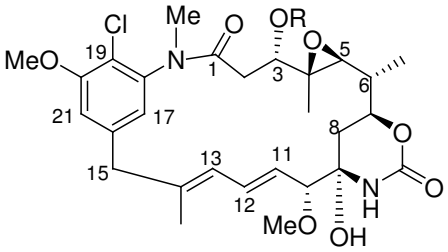
Schema 2. Chemobiosynthese für die Darstellung von Erythromycinderivaten.[18]

Durch diese Kombination von genetischer Manipulation eines Naturstoffproduzenten und synthetischer Produktion von modifizierten Biosyntheseintermediaten ist eine große Diversität an Naturstoffderivaten möglich. Fortschritte in der molekularbiologischen Forschung und daraus resultierende Kenntnis über Genomsequenzen eröffnen Wege zur gezielten Produktion von neuen „Mutasynthesereaktoren“.

[18] J.R.Jacobsen, C.R.Hutchinson, D.E.Cane, K.Khosla, *Science*, **1997**, *277*, 367-369.

1.3 ANSAMITOCINE

Ansamitocine gehören zu einer Gruppe 19-gliedriger Makrolactame, die aus einem aromatischen Ring aufgebaut sind, welcher von einer polyketidischen Ringstruktur umgeben ist. Dieser „Henkel“ [lateinisch: ansa] hat zur Namensgebung geführt (Abbildung 5).



R = $COCH(CH_3)_2$ Ansamitocin P3 **12**
R = $COCH_2CH_3$ Ansamitocin P2 **13**
R = $COCH_2CH(CH_3)_2$ Ansamitocin P4 **14**

Abbildung 5. Ansamitocine **12**-**14**.

Ansamitocine besitzen ein cyclisches Carbamat an C7/C9 und eine Esterseitenkette an C3, von deren Natur die namentliche Bezeichnung abhängt. *Ansamitocin P3* (*AP3*) **12** trägt eine Isobutyryl-Seitenkette, *Ansamitocin P2* (*AP2*) **13** eine Propionyl-Seitenkette und *Ansamitocin P4* (*AP4*) **14** eine Isovaleroyl-Seitenkette. *AP2*, *AP3* und *AP4* stellen die Hauptvertreter der Ansamitocine dar, es sind jedoch noch eine Vielzahl weiterer Derivate bekannt.[19]

1.3.1 Allgemeines

1972 wurde von KUPCHAN *et al.* aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus serrata* ein im nanomolaren Bereich zytotoxisches Polyketid isoliert, das *Maytansin* **15,** dessen Struktur wenig später durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte.[20,21,22]
Es unterscheidet sich von den Ansamitocinen nur in der Natur der Seitenkette an C3 (Abbildung 6).

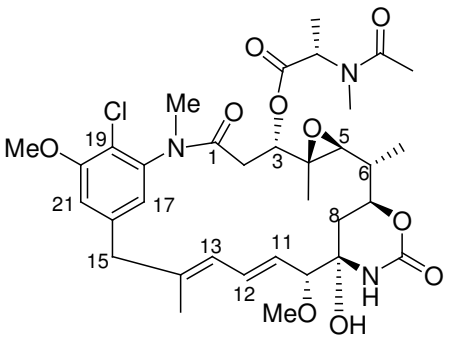
---

[19] J.M.Cassady, K.K.Chan, H.G.Floss, E.Leistner, *Chem.Pharm.Bull*., **2004***, 52*, 1-26.

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

[21] R.F.Bryan, C.J.Gilmore, R.C.Haltiwanger *J.Chem.Soc.,* **1973**, *Perkin Trans. II,* 897-901.

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



Maytansin **15**

Abbildung 6. *Maytansin* (**15**).

In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Vertreter dieser Gruppe aus unterschiedlichen Pflanzen und Moosen isoliert.[19] 1977 wurde erstmals ein Vertreter aus mikrobieller Produktion beschrieben.[23] Ansamitocine konnten aus Kulturen des Actinomyceten *Actinosynnema pretiosum* isoliert werden. Damit konnte genügend Material für die weitere Erforschung des Naturstoffs bereitgestellt werden. Da die pflanzliche Produktion von *Maytansin* sehr gering ist ($w = 2.5 \cdot 10^{-5}$ % der Trockenmasse), wurde der Naturstoff in Aktivitäts-screenings nur aufgrund seiner beachtlich hohen Zytoxizität entdeckt ($ED_{50} = 0.1$-0.01 ng/mL in in vitro Tests an humanen KB-Zellen).[22]

In den 1980er Jahren beschäftigten sich viele Gruppen mit totalsynthetischen Zugängen zu Ansamitocinen.[24,25,26,27] Aufgrund der Komplexität des Naturstoffs und den daraus resultierenden langen Syntheserouten, ist dieser Zugang nicht für die Erzeugung von Derivaten geeignet.

Es sind einige semisynthetische Ansätze zur Generierung von Ansamitocinderivaten beschrieben, die sich hauptsächlich mit der Deacylierung an C3 und anschließender Veresterung beschäftigen, um neue Seitenketten einzuführen.[28,29,30]

---

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

[24] A.I.Meyers, P.J.Reider, A.L.Campell, *J.Am.Chem.Soc.*, **1980**, *102*, 6597-6598.

[25] E.J.Corey, L.O.Weigel, A.R.Chamberlin, H.Cho, D.H.Hua, *J.Am.Chem.Soc*., **1980**, *102*, 6613-6615.

[26] M.Isobe, M.Kitamura, T.Goto, *J.Am.Chem.Soc*., **1982**, *104*, 4997-4999.

[27]M.Benechie, F.Khuong-Huu, *J.Org.Chem.*, **1996**, *61*, 7133-7138.

[28] M. Asai, E. Mizuta, M. Izawa, K. Haibara, T. Kishi, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 1079-1085.

[29] A.Kawai, H.Akimoto, Y.Kozai, K.Ootsu, S.Tanida, N.Hashimoto, H.Nomura, *Chem.Pharm.Bull*., **1984**, *32*, 3441-3951.

[30] U.S. Pat. No. 20,070,112,188.

Ansamitocinderivate konnten mutasynthetisch mittels Zufütterung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäurederivaten zu einer Mutante von *Actinosynnema pretiosum* erzeugt werden.[17] Dieser Zugang ist, verglichen mit dem total- und semisynthetischen, aufgrund der relativ einfachen Synthesen der benötigten aromatischen Aminosäuren am besten geeignet, um eine große Diversität an neuen Derivaten zu erhalten. Für die Anwendung von mutasynthetischen Ansätzen ist die Kenntnis der entsprechenden Biosynthese elementar.

1.3.2 Biosynthese von Ansamitocin

Der Mechanismus der Ansamitocinbiosynthese wurde 2002 von FLOSS *et al.* aufgeklärt und läuft an einer modularen Typ I-PKS ab (Abbildung 7).[31]

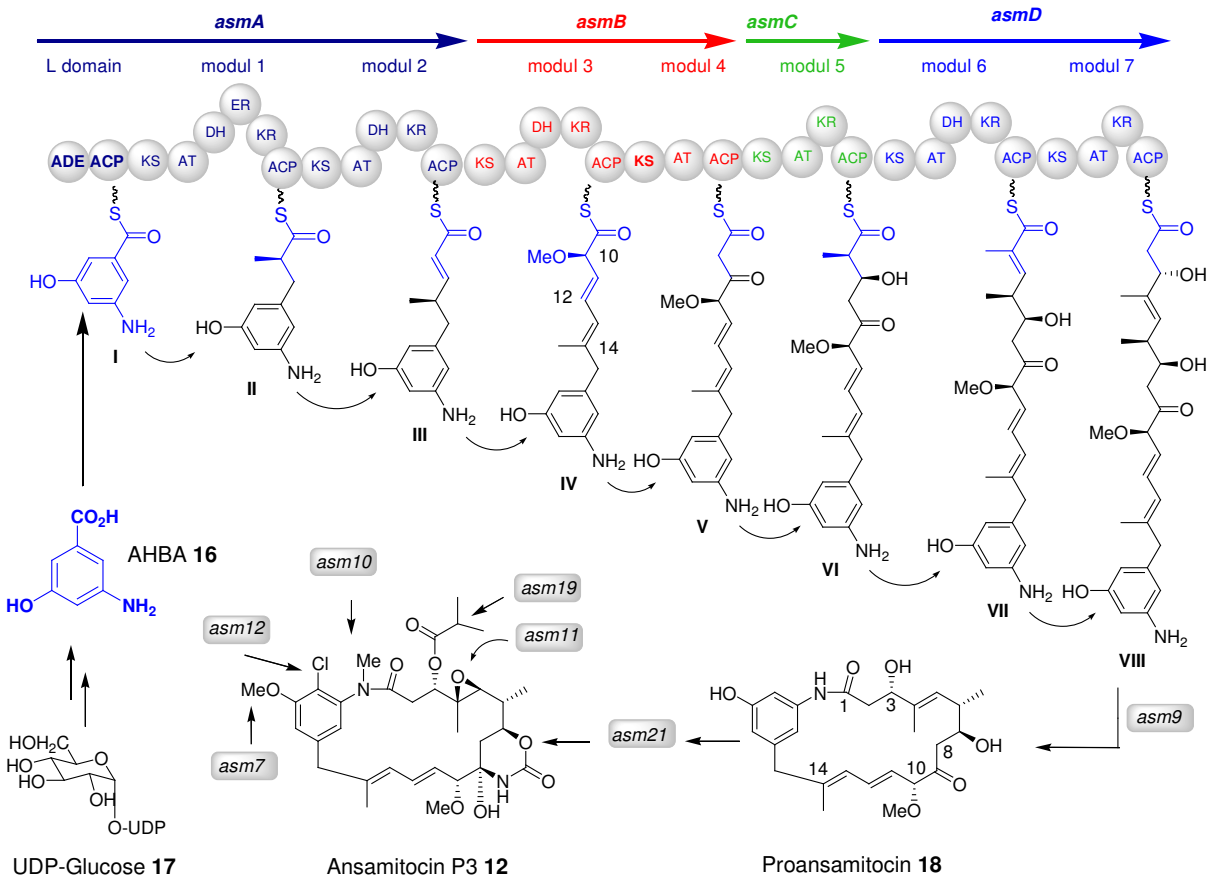
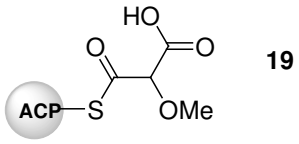


Abbildung 7. Biosynthese von *Ansamitocin P3*.[32]

[31] 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.

[32] UDP= Uridindiphosphat; mit asm sind die an der Ansamitocinsynthese beteiligten Gene bezeichnet.

Die asmPKS besteht aus der Ladedomaine und sieben Kettenverlängerungseinheiten (Modul 1-7), die in vier einzelnen Proteinkomplexen (asmA-D) organisiert sind. Jedes dieser sieben Module enthält null bis drei Domänen für die Veränderung von funktionellen Gruppen, namentlich Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER). Die Ansamitocinbiosynthese beginnt mit der Thioveresterung des Startbausteins *3-Amino-5-hydroxybenzoesäure* **16**, die mittels 3 Propionat-, 3 Acetat- und einer Glykolat-Verlängerungseinhheiten in *seco-Proansamitocin* (VIII) überführt wird. Auf Modul 7 folgt eine Amidsynthase (*asm9*), welche für die Ablösung vom PKS-Modul und Zyclisierung des fertigen Proansamitocingerüsts verantwortlich sein muss. Dieser Mechanismus konnte anhand der homologe Amidsynthase (*rifF*) in der Rifamycin-Biosynthese gezeigt werden.[33,34]
Nachdem *Proansamitocin* **18** gelöst vom Modul vorliegt, folgen sechs post-PKS Transformationen (*asm21, 12, 7, 19, 10* und *11*) zum *Ansamitocin P3* **12**.
Die Ansmitocin-Struktur zeigt zwei ungewöhnliche Attribute. Das erste stellt die ungewöhnliche Glykolat-Verlängerungseinheit in Modul 3 dar, die mittels eines Methoxymalonyl-ACP Vorläufers in die Biosynthese eingebracht wird (Abbildung 8).[35],[36]



19

Abbildung 8. Methoxymalonyl-ACP Vorläufer in der Ansamitocinbiosynthese.

Die zweite Besonderheit im Ansamitocingerüst ist die Position des Diensystems an C11/C12 und C13/C14. Bei Betrachtung der Mechanismen von Polyketidbiosynthesen[37], müsste dieses System an C10/C11 und C12/C13 liegen. Deshalb muss es während der Biosynthese an der PKS zu einer Doppelbindungsmigration kommen, deren Zeitpunkt durch chemobiosynthetische Studien aufgeklärt werden konnte.[38,39]

---

[33] T.W.Yu, Y.Shen, Y.Doi-Katayama, L.Tang, C.Park, B.S.Moore, C.R.Hutchinson, H.G.Floss, *Proc.Nat.Acad .Sci USA*, **1999**, *96*, 9051-9056.

[34] A.Stratmann, C.Toupet, W.Schilling, R.Traber, L.Oberer, T.Schupp, *Microbiology*, **1999**, *145*, 3365-3375.

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

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

[37] J.Staunton, K.J.Weissman, *Nat.Prod.Rep*., **2001**, *18*, 380-416.

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

1.3.3 Biologische Aktivität und Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Die zytotoxische Wirkung von Ansamitocinen liegt in der Bindung an Tubulin und der daraus resultierenden Inhibierung der Polymerisation der Mikrotubuli begründet.[40] Die Bindungsstelle konnte durch Konkurrenztests ermittelt werden und überlappt mit der der Vinca Alkaloide, also in der ß-Tubulin-Untereinheit.[41,42]

Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit der biologischen Aktivität von Strukturabwandlungen bei Ansamitocinen, ergaben die in Abbildung 9 dargestellte Übersicht.[43,44]

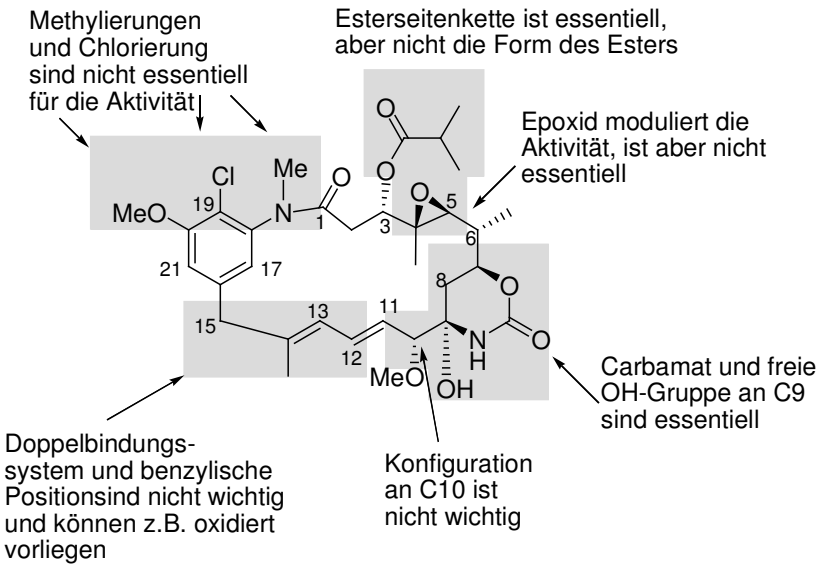


Abbildung 9. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Ansamitocinen.[19]

Das zyklische Carbamat an C7/C9 ist, genauso wie die halbaminalische freie OH-Gruppe an C9, essentiell für die biologische Aktivität. Gleiches gilt für die Esterseitenkette an C3, wobei hier die Aktivitäten aller getesteten Ester im Bereich gleicher Größenordnung liegen.

---

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

[40] S.Remilleard, L.I.Rebhun, F.A.Howie, S.M.Kupchan, *Science*, **1975**, *189*, 1002-1005.

[41] F.Mandelbaum-Shavit, M.K.Wolpert-DeFillippes, D.G.Johns, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **1976**, *72*, 47-54.

[42] S.S.Rai, J.Wolff, *J.Biol.Chem.*, **1996**, *271*, 14707-14711.

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

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

Lediglich die Verbindungen, die an C3 eine freie OH-Gruppe besaßen, zeigten stark verringerte Aktivitäten. Die Epoxidierung an C4/C5 zeigt keinen gravierenden Einfluss auf die Aktivität und die Orientierung der Methoxygruppe an C10 bewirkt keine Veränderung.
Abwandlungen im C11-C15-Teil der Struktur haben keinen bedeutenden Einfluss auf die biologische Aktivität, ebenso das Substitutionsmuster am aromatischen Ring an C19 und C20. Insgesamt hat der ösliche Teil der Ansamitocine hohe Relevanz für die Aktivität, der westliche Teil, sowie die Esterseitenkette an C3 sind potentielle Positionen für Veränderungen.

1.3.4 Notwendigkeit von Immunokonjugaten

Klinische Studien mit Maytansin, die in den 1980er Jahren bis zur Phase II fortgeschritten waren, mussten aufgrund von geringen Selektivitäten, und daraus resultierenden starken Nebenwirkungen, eingestellt werden.[45,46,47,48]
Die Forschung an den hochzytotoxischen Ansamitocinen wurde fortgesetzt, mit dem Ziel durch die Bindung an monoklonale Antikörper, Selektivitätssteigerungen zu erhalten. Mehrere Gruppen beschäftigen sich mit der Anbindung von Antikörpern an in C3-Esterseitenkette modifizierten Ansamitocinen (Abbildung 10).[49,50,51]

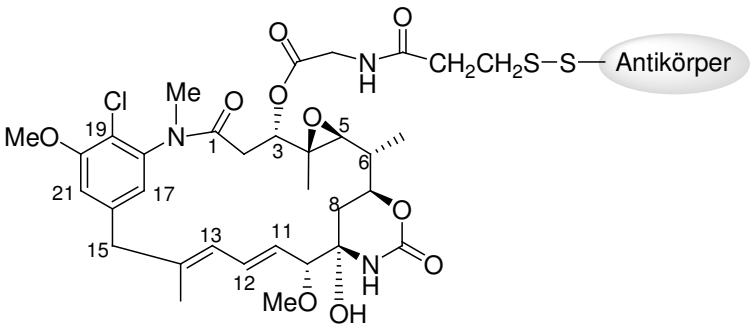


Abbildung 10. Über die Esterseitenkette antikörpergebundenes Ansamitocin.

---

[45] J.T.Thigpen, C.E.Ehrlich, W.T.Creasman, S.Curry, J.A.Blessing, *Am.J.Clin.Oncol.,* **1985**, *6*, 273-275.

[46] J.T.Thigpen, C.E.Ehrlich, J.Conroy, J.A.Blessing, *Am.J Clin.Oncol.,* **1985**, *6*,427-30.

[47] M.H.Kalser, *CancerTreatment Rep,* **1985**, *69*, 417-20.

[48] M.J.Ravry, G.A.Omura, R.Birch, *Am.J.Clin.Oncol.,* **1985**, *8*, 148-50.

[49] C.A.Ladino, R.V.J.Chari, L.A.Bourret, N.L.Kedersha, V.S.Goldmacher, *Int.J.Cancer*, **1997**, *73*, 859-864.

[50] R.Johnson, *Pharm.J*., **2000**, *365*, 490.

[51] R.V.J. Chari, *Acc.Chem.Res.*, **2008**, *41*, 98-107.

Die Konjugate befinden sich in klinischen Studien und sind somit ein vielversprechender Ansatzpunkt, um die hoch antitumoral wirksamen Ansamitocine gezielt zu nutzen.
Eine weitere mögliche Bindungsstelle für Antikörper stellt, aufgrund der Kenntnis über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, der Westteil der Ansamitocine dar. Derivate in aromatischer Position sind, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, leicht über Mutasynthese zugänglich.

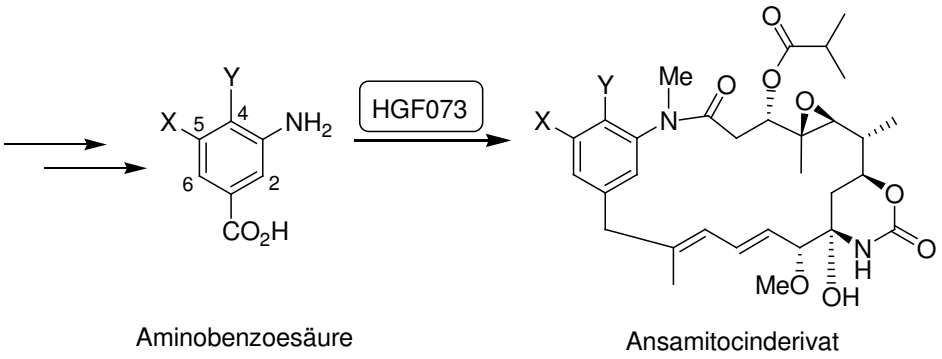
1.3.5 Die Blockmutante HGF073

Im Arbeitskreis FLOSS konnte eine Mutante von *Actinosynnema pretiosum* generiert werden (HGF073), die in der biosynthetischen Produktion des Startbausteins *3-Amino-5-hydroxybenzoesäure* (*AHBA* **16**) blockiert ist.[31] Folglich werden keine Ansamitocine ohne die Zufütterung von *AHBA* produziert, weshalb AHBA-Derivate mutasynthetisch in die entsprechenden Ansamitocinderivate überführt werden können. Durch den gezielten *knock-out* entsprechender Gene kann der Organismus als einfach handhabbarer Biosynthesereaktor instrumentalisiert werden.

2. ZIELSETZUNG

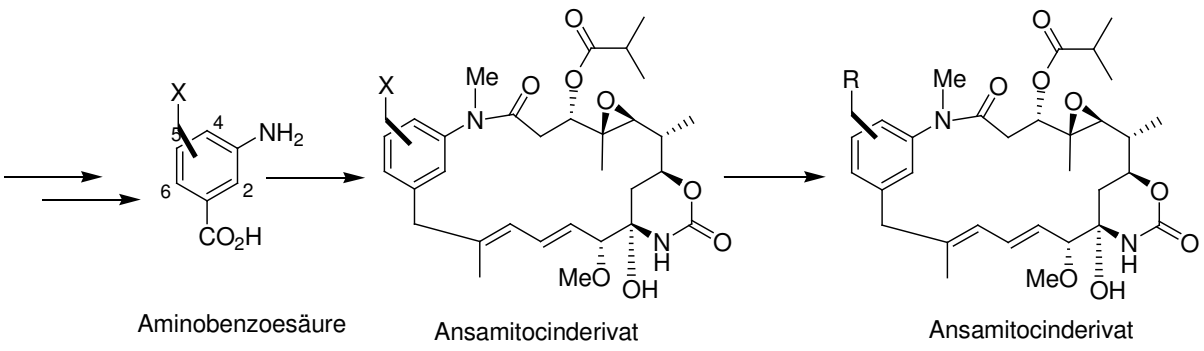
Die Synthese neuer Ansamitocinderivate sollte mittels Kombination chemisch synthetischer und chemoenzymatischer, respektive mutasynthetischer und chemobiosynthetischer, Methoden realisiert werden.

Für Biosynthesestudien bezüglich des Akzeptanz-Spektrums von *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 sollten verschieden substituierte 3-Aminobenzoesäuren synthetisiert und in Verfütterungsexperimenten angewandt werden (Schema 3).



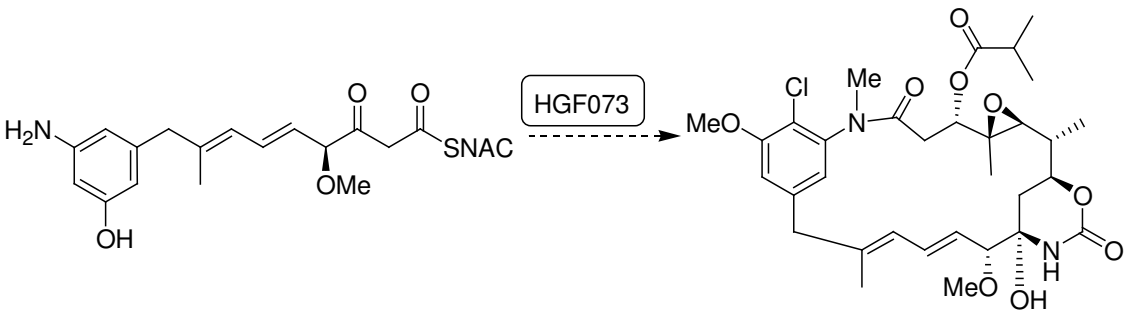
Schema 3. Geplante Biosynthesestudien an HGF073.

Weiterhin sollten gezielt Mutasynthone dargestellt werden, die nach enzymatischer Transformation in die entsprechenden Ansamitocinderivate, geeignete Funktionalitäten für eine semisynthetische Veränderung bieten (Schema 4).



Schema 4. Geplante Biosynthesestudien an *Actinosynnema pretiosum* (Stamm HGF073) mit nachfolgender semisynthetischer Derivatisierung.

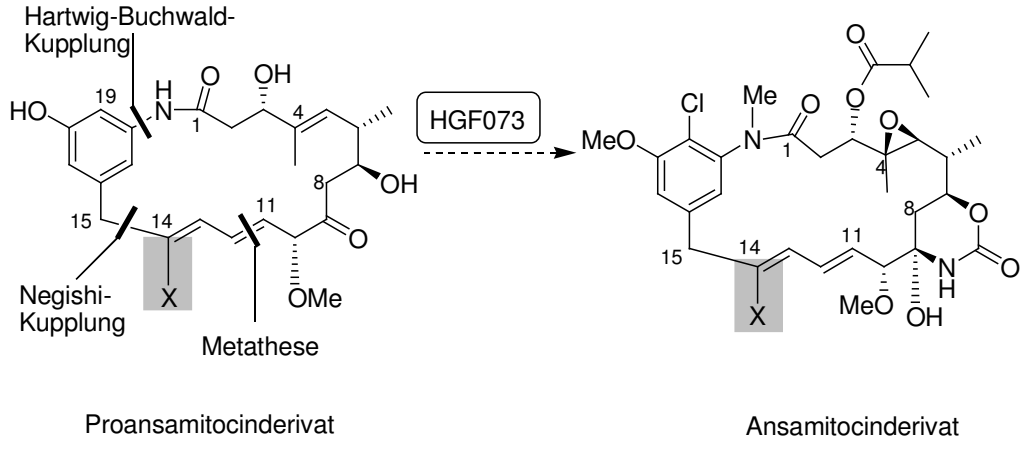
Der zweite Teil der Arbeit sollte sich mit Studien an der Blockmutante HGF073 bezüglich der Aufnahmebereitschaft von stark fortgeschrittenen Biosyntheseintermediaten, also der Chemobiosynthese, befassen. Intermediate der Ansamitocinbiosynthese sollten synthetisiert und anschließend in mutasynthetische Experimente mit *Actinosynnema pretiosum* (Stamm HGF073) eingesetzt werden.



Schema 5. Geplante chemobiosynthetische Studien mit Polyketidbiosyntheseintermediaten.

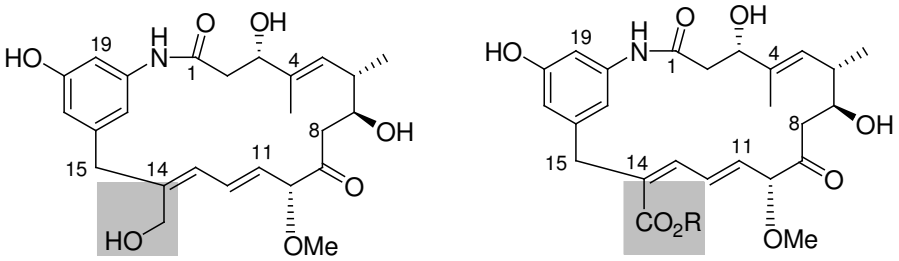
Beispiele für die Akzeptanz von Diketid, Triketid und Tetraketid sind beschrieben, weshalb mit der Synthese und Verfütterung von höheren Polyketiden die Grenzen dieser Methode untersucht werden sollten.[38,39]

Im dritten Teil der Arbeit sollte ein modifiziertes Derivat des natürlichen Vorläufers *Proansamitocin* **18** synthetisiert und überprüft werden ob an veränderten Vorläufern post-PKS-Transformationen stattfinden. Die geplante Retrosynthese sah Schnitte zwischen C14 und C15, C12 und C11 und an der Lactamgruppe vor.



Schema 6. Geplante Synthese des Proansamitocinderivats mit darauffolgender chemobiosynthetischer Nutzung.

Die zu synthetisierende Variante des Proansamitocins sollte ebenfalls eine Funktionalität für potentielle semisynthetische Derivatisierung besitzen. Dafür geplant waren eine Alkohol- oder Ester-Gruppe (Schema 7).



Schema 7. Geplante an C14-funktionalisierte Proansamitocine.

Als letzter Teil dieser Arbeit war vorgesehen, an die mutasynthetisch und chemobiosynthetisch erzeugten Ansamitocinderivate Linker für die Anbindung von Antikörpern anzubringen (Abbildung 11).

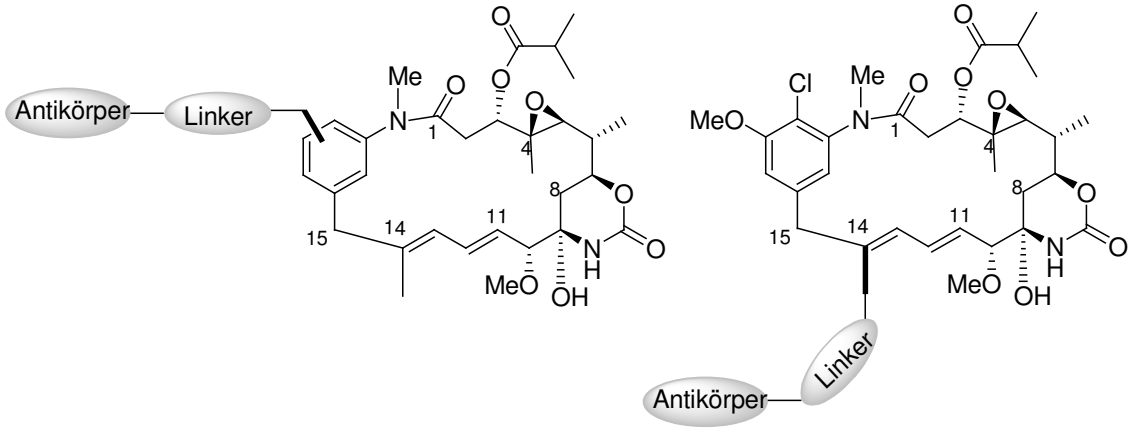


Abbildung 11. Geplante Anbindungsstellen für Linker an Ansamitocinderivaten.

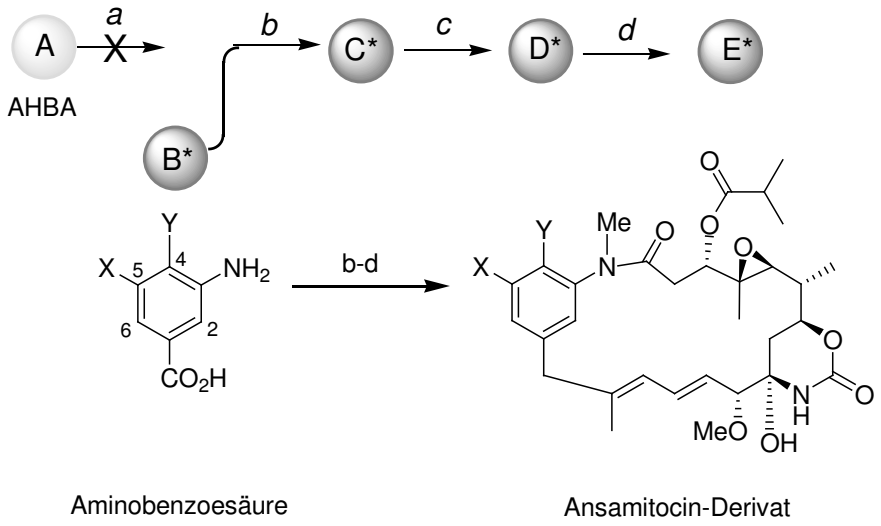
3. BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

3.1 MUTASYNTHETISCHE NUTZUNG VON AHBA-DERIVATEN

3.1.1 Allgemeines

Ansamitocin P3 **12** weist eine sehr hohe Zytotoxizität im nanomolaren Bereich gegenüber verschiedenen Krebszelllinien auf.[52] Aufgrund der geringen Differenzierung von mutierten gegenüber gesunden Zellen besteht eine dringende Notwendigkeit, den Naturstoff zur Selektivitätssteigerung zu modifizieren.

Das Konzept der Mutasynthese[53] eröffnet im Fall der Ansamitocinbiosynthese einen sehr einfachen Zugang zu diversen am aromatischen Teil modifizierten Derivaten, wofür die in 4,5-Position variierten 3-Aminobenzoesäuren einzusetzen sind (Schema 8). Substituenten an Position 2 und 6 werden erfahrungsgemäß[17] nicht akzeptiert.



Schema 8. Mutasynthetische Nutzung von 3-Aminobenzoesäuren für die Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten.

Der zeitliche Aufwand einer Mutasynthese, einschließlich der Synthese des Mutasynthons, steht in keinem Verhältnis zu den beschriebenen Totalsynthesen von Maytansin oder Ansamitocin, welche Sequenzen von 30 linearen Stufen beinhalten.[54] Somit stand mit der

[52] Siehe Kapitel 1.3.

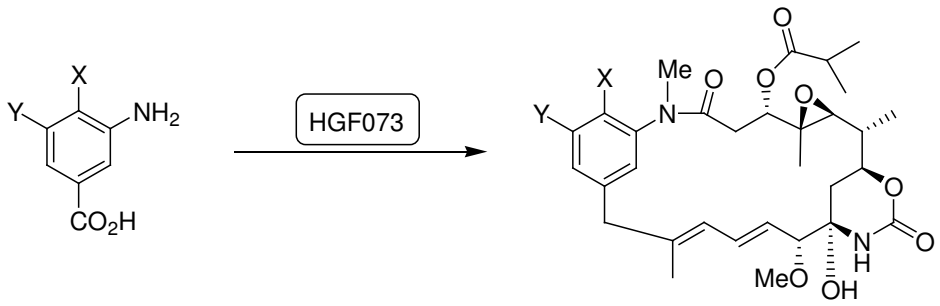
[53] Siehe Kapitel 1.2.2.

[54] A.Kirschning, K.Harmrolfs, T.Knobloch, *C.R.Chimie*, **2008**, *11*, 1523-1543.

Blockmutante HGF073[55] von *Actinosynnema pretiosum* aus dem Arbeitskreis von Prof. H.G. FLOSS ein sehr wertvolles Werkzeug zur Verfügung, um vielfältige Derivatisierungen am natürlichen *Ansamitocin P3* **12** (*AP3*) vorzunehmen.

Für die Mutasynthesen wurden verschiedene 3-Aminobenzoesäuren, welche Derivate der natürlichen Startereinheit *AHBA* sind, eingesetzt. Diese Experimente waren zum Einen von ausserordentlichem Interesse für die Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten für die Erforschung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Außerdem konnten spezielle Derivate für nachfolgende, semisynthetische Derivatisierungen genutzt werden. Zum Anderen konnte die Substrattoleranz der Ladedomäne des Polyketidsynthase-Moduls untersucht werden.

Aus früheren Arbeiten zu Biosynthesestudien war bekannt, dass 4-Halogen-3-aminobenzoesäuren **20a – 20c,** sowie auch die phenolischen Derivate **20d –20e** von *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073 akzepiert und zu den modifizierten Naturstoffen **21a**-**21e** prozessiert werden (Schema 9).[56,57]



20a : X=F, Y=H
20b : X=Cl, Y=H
20c : X=Br, Y=H
20d: X=OMe, Y=H
20e: X=OH, Y=OMe

21a : X=F, Y=H
21b : X=Cl, Y=H
21c : X=Br, Y=H
21d : X=OMe, Y=H
21e : X=OH, Y=OMe

Schema 9. Verfütterungsexperimente mit AHBA-Derivaten an *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073.[56,57]

Insbesondere bromierte Ansamitocine eröffnen neue Möglichkeiten für semisynthetische Veränderungen, z.B. in Form von Palladium-katalysierten Kupplungen, die als milde Reaktion für multifunktionelle Moleküle, teilweise ohne Schutzgruppenstrategie, möglich sind.[58]

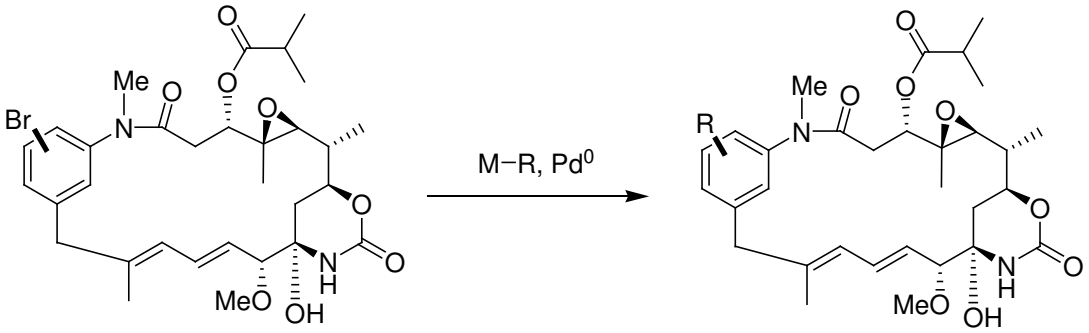
---

[55] Siehe Kapitel 1.3.5.

[56] M.Brünjes, Dissertation, **2006**.

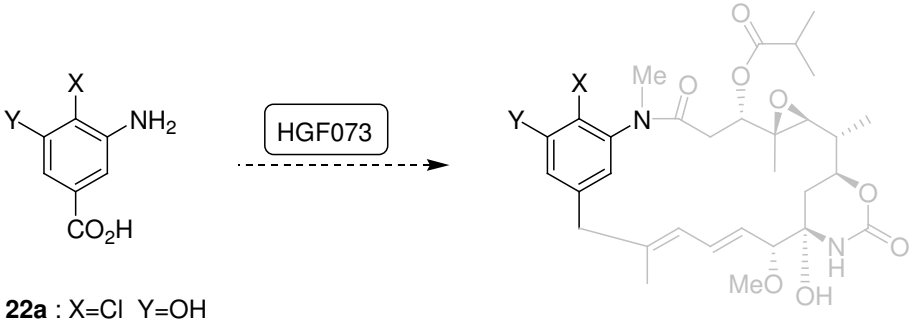
[57] F.Taft, Dissertation, **2009**.

[58] L.F.Tietze, L.Kinzel, *PureAppl.Chem*., **2007**, *79*, 629-650.



Schema 10. Mögliche semisynthetische Nutzung von bromierten Ansamitocinen.

Um die Studien zur Bildung von halogenierten Ansamitocin-Derivaten auszubauen, wurde untersucht, ob die bereits halogenierten AHBA-Derivate **22a** und **23a** bzw. auch die bereits halogenierten und *O*-methylierten Aminosäuren **22b** und **23b** von Mutante HGF073 in die Prozessierung aufgenommen werden (Schema 11).

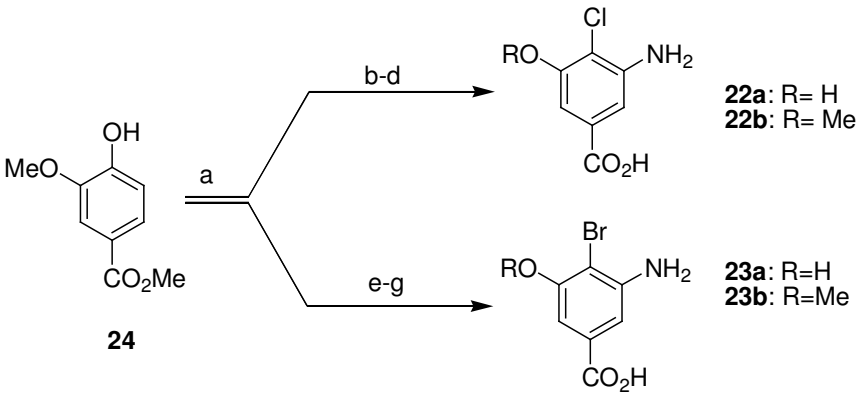


22a : X=Cl Y=OH
22b : X=Cl, Y=OMe
23a : X=Br, Y=OH
23b : X=Br, Y=OMe

Schema 11. Verfütterungsexperimente mit AHBA-Derivaten an *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073 zur Biosynthesestudienzwecken (die gewünschten chemoenzymatisch aufzubauenden Molekülteile sind in grau eingezeichnet).

3.1.2 Biosynthesestudien an HGF073 mit 4-Halogen-AHBA-Derivaten

Für die Verfütterungsexperimente wurden die Mutasynthone **22a** – **23b** ausgehend von *Methylvanillat* synthetisiert. Käufliches *Methylvanillat* **24** wurde nitriert, mit *Oxalylchlorid* bzw. *Oxalylbromid* entsprechend halogeniert, anschließend entschützt und reduziert um die vier aromatischen Aminosäuren **22a** –**23b** zu erhalten, die bereits das Substitutionsmuster der Ansamitocine bzw. Bromansamitocine besitzen.



Schema 12. Darstellung der *AHBA*-Derivate **22a**-**23b**. a) HNO_3, AcOH, 0°C, **78%**; b) $(COCl)_2$, DMF, -20°C → 80°C, 3h; c) BBr_3, CH_2Cl_2, -78°C → RT für **22a**; c) LiOH, MeOH, 18h, RT; $SnCl_2x2H_2O$, AcOH, EtOAc, 5 h, Rf, **79%** über 3 Stufen für **22a**, **73%** über 3 Stufen für **22b**; e) $(COBr)_2$, DMF, -20°C → 80 °C, 21h, **36%** für **23b**; **5.4 %** für **23a**; f) LiOH, MeOH, 18h, RT; g) $SnCl_2x2H_2O$, AcOH, EtOAc, 5 h, Rf, **72%** über 2 Stufen für **23b**, **95%** über 2 Stufen für **23a**.

Die Verfütterung erfolgte kontinuierlich mittels Spritzenpumpe über 5 Tage in 50 mL Schüttelkulturen.[59] Die Ausbeuten an *Ansamitocin P3* **12** wurden mittels HPLC-Analytik UV-spektroskopisch bei λ = 248 nm nach vorheriger Kalibration bestimmt.

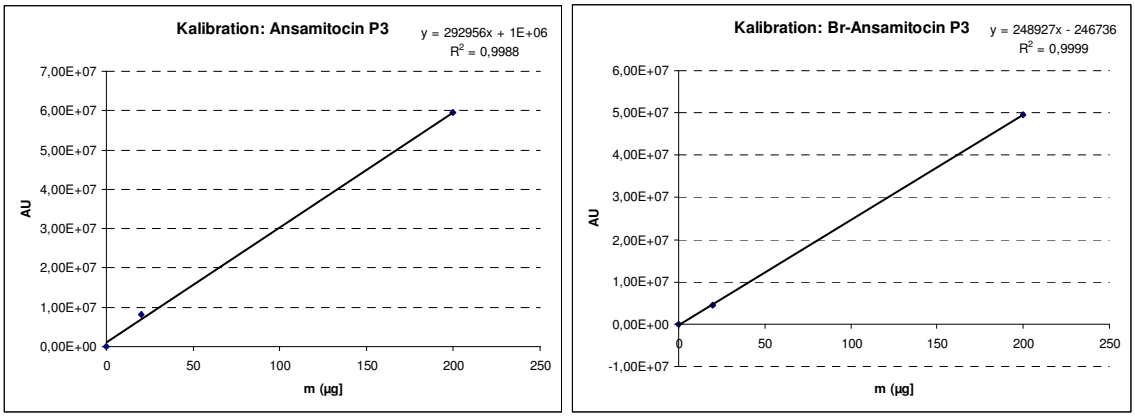


Abbildung 12. Kalibrationsgeraden bei λ =248 nm für die Bestimmung der Fermentationsausbeuten mit den Mutasynthonen **22a** – **22b**.

[59] Siehe Experimenteller Teil.

Dafür wurde eine Kalibrationsreihe mit 20 µg und 200 µg *Ansamitocin P3* **12** bzw. *Bromansamitocin P3* **25** erstellt und anschließend der Rohextrakt der Fermentation vermessen (Abbildungen 13 - 14).

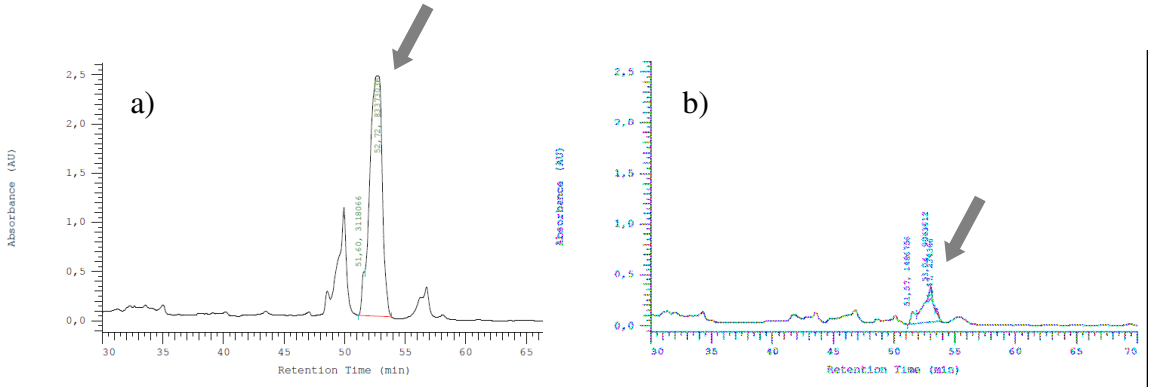


Abbildung 13. HPL-Chromatogramme bei λ = 248 nm der Roh-Fermentationsextrakte nach Verfütterung von a) **22a** und b) **22b**. Die Pfeile zeigen den *Ansamitocin P3* Peak an.

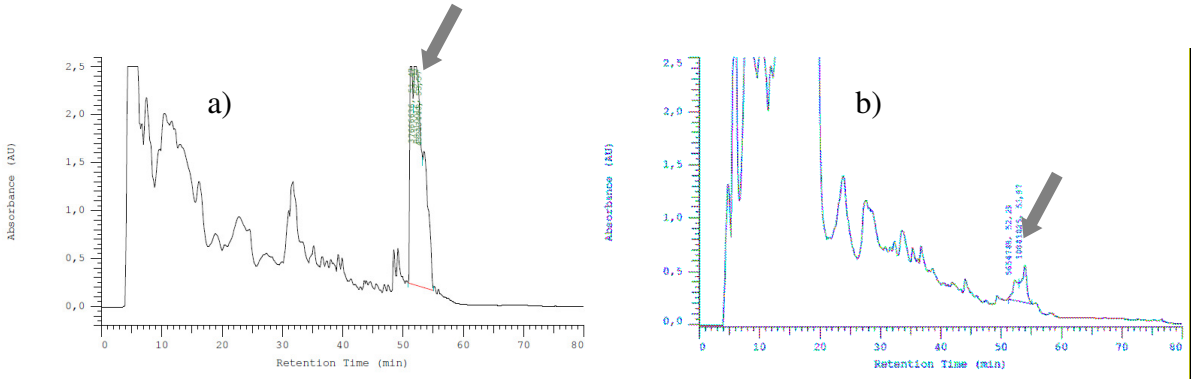


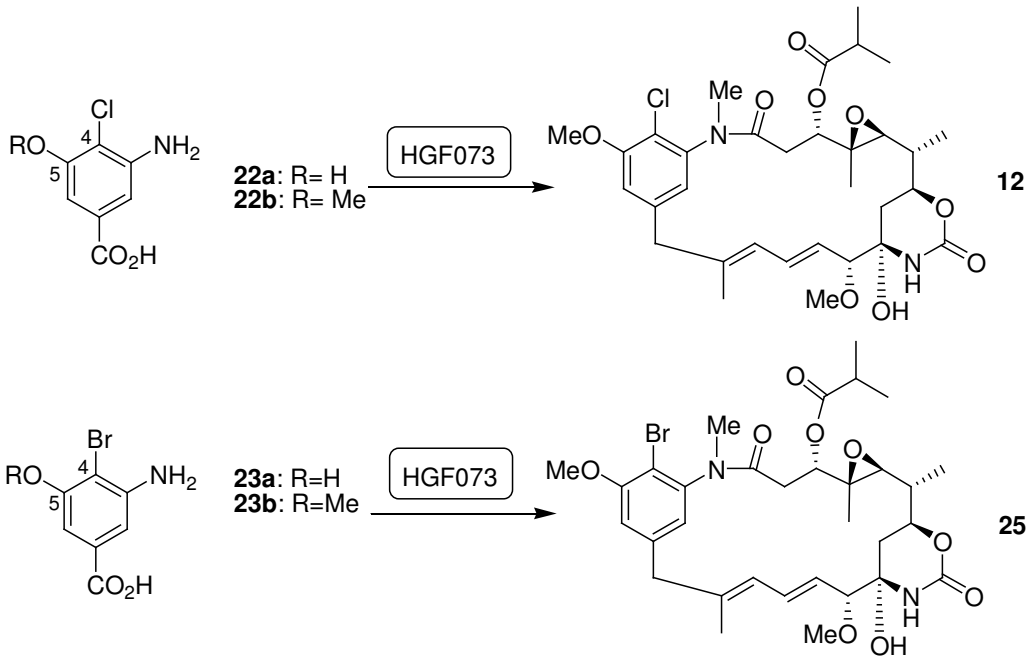
Abbildung 14. HPL-Chromatogramme bei λ = 248 nm der Roh-Fermentationsextrakte nach Verfütterung von a) **23a** und b) **23b**. Die Pfeile zeigen den *Bromansamitocin P3* Peak an.

Die in den Chromatogrammen sichtbaren Peaks neben dem *AP3*-Peak und neben dem *Br-AP3*-Peak sind die *AP2* bzw. *Br-AP2* Derivate (zeitlich davor) und *AP4* bzw. *Br-AP4* Derivate (zeitlich danach).[60] Diese werden im gleichen Verhältnis gebildet wie bei der Verfütterung des natürlichen Startbausteins *AHBA* **16**.

Die Ausbeuten für die entsprechenden Ansamitocine waren erwartungsgemäß mit den nicht *O*-methylierten AHBA-Derivaten **22a** und **23a** um einen Faktor von 10 höher als die

[60] Siehe Kapitel 1.3.

Mutasynthesen mit den *O*-methylierten AHBA-Derivaten **22b** und **23b** (Schema 13 und Tabelle 1).



Schema 13. Verfütterung der AHBA-Derivate **22a**-**23b** an HGF073.

Tabelle 1. Ausbeuten der Ansamitocine nach Mutasynthesen mit **22a** – **23b**.

Exp.	Mutasynthon	Ausbeute [mg/L]	Ausbeute (relativ[61])	Ausbeute
1	**22b**	0.7	0.9 %	0.08 %
2	**22a**	9.8	12 %	1.0 %
3	**23b**	0.5	0.6 %	0.05 %
4	**23a**	7.1	9 %	0.7 %

Die Mutasynthesen mit 3-Amino-4-halogen-5-hydroxybenzoesäuren **22a** und **23a** führten zu sehr hohen Fermentationsausbeuten von 7 – 10 mg/L. Ausbeuten in diesem Maßstab sind gut geeignet, um ausreichende Mengen der Naturstoffe für semisynthetische Derivatisierungen herzustellen. Die freie Hydroxygruppe an der aromatischen C5-Position hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Annahme durch den Biosyntheseapparat, da die *O*-methylierten Äquivalente dieser AHBA-Derivate um den Faktor 10 schlechter angenommen wurden. Dieses ist wahrscheinlich auf sterische Effekte während der Einlagerung in den

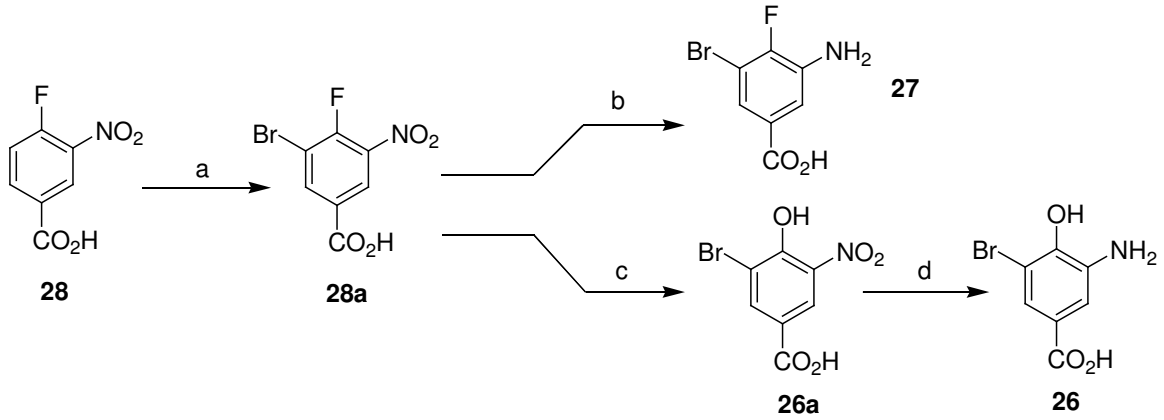
[61] Ausbeute relativ zu der erreichten Ausbeute nach Verfütterung von *AHBA* **16** (80 mg/L).

Multienzymkomplex zurückzuführen, da keine fundamentalen elektronischen Unterschiede zwischen den beiden Startereinheiten bestehen.

Aufgrund der hohen Ausbeuten bei der Verfütterung der 3-Amino-4-halogen-5-hydroxybenzoesäuren **22a** und **23a** sollten im Folgenden Halogen-hydroxyaminosäuren mit anderem Substitutionsmuster oder ausschließlich an 4-Position halogenierte Aminobenzoesäuren mutasynthetisch genutzt werden, um geeignete Derivate für semisynthetische Funktionalisierungen zu erhalten.

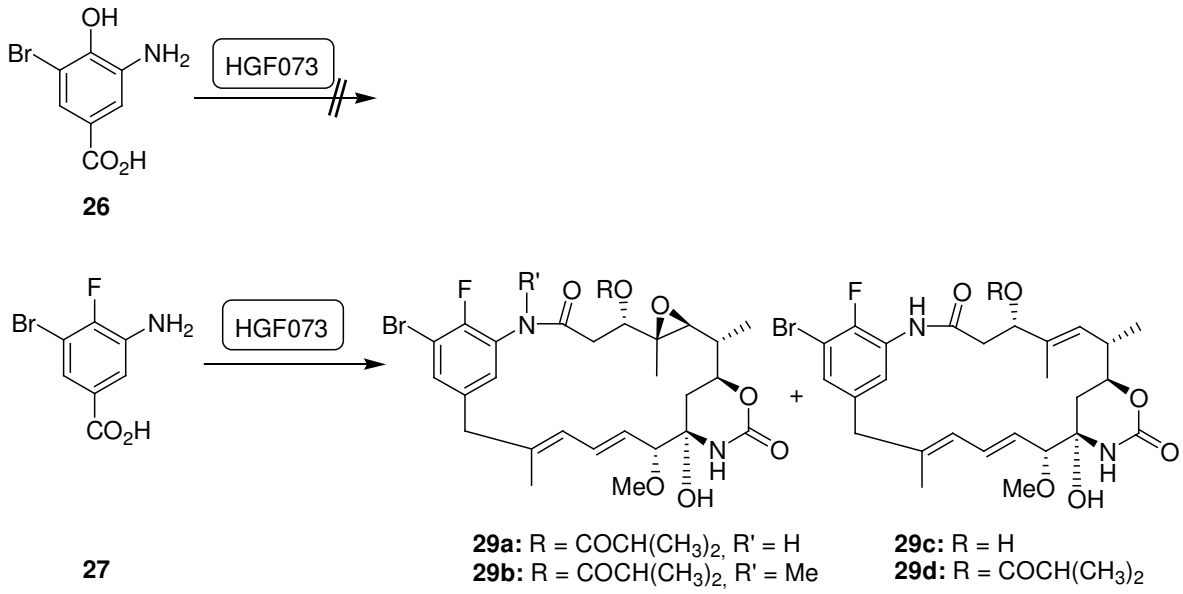
3.1.3 Mutasynthese für die semisynthetische Nutzung in C-C-Kupplungen

Die erste Wahl fiel dabei auf *3-Amino-5-brom-4-hydroxybenzoesäure* **26**, da durch die umgekehrte Funktionalisierung, im Gegensatz zu **23a**, ein freierer Zugang zum Bromid für mögliche Palladium-katalysierte C-C-Kupplungen am entstehenden Naturstoff gewährleistet wäre. Zusätzlich wurde *3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoesäure* **27** als Mutasynthon gewählt, da das räumlich kleine Fluoratom an dieser Position bekanntermaßen vom Organismus akzeptiert wird und die Möglichkeit zur Funktionalisierung des entstehenden Naturstoffs hierbei ebenfalls gegeben ist.[17] Die Synthese der Mutasynthone erfolgte über die Bromierung von käuflicher *4-Fluor-3-nitrobenzoesäure* **28**. Für AHBA-Derivat **26** wurde der Fluorsubstituent anschließend Palladium-katalysiert durch eine Hydroxyfunktion ausgetauscht (Schema 14).



Schema 14. Darstellung der *AHBA*-Derivate **27** und **26**. a) $AgSO_4$, Br_2, H_2SO_4, 4h, Rf; b) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, AcOH, EtOAc, 3h, Rf, **56%** in 2 Stufen; c) KOH, Pd_2dba_3, ^tBu-Xphos, Dioxan/H_2O, 16h, 60°C; d) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, AcOH, EtOAc, 3h, Rf, **92%** in 2 Stufen.

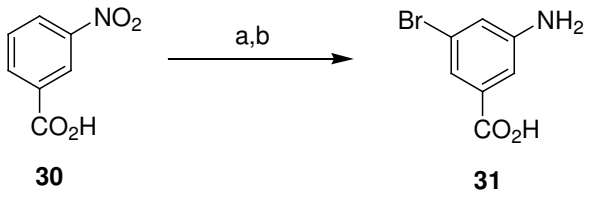
Die so erhaltenen Mutasynthone **26** und **27** wurden kontinuierlich mittels Spritzenpumpe über 5 Tage Schüttelkulturen von *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 zugeführt (Schema 15).



Schema 15. Verfütterung der AHBA-Derivate **26** und **27** an den Stamm HGF073.

Die Verfütterung von **26** resultierte nicht in den gewünschten Ansamitocin-Derivaten, während die von **27,** trotz Supplemation der vierfachen Standard-Menge der Mutasynthone.[62], nur sehr geringe Produktmengen ergab. Die Derivate konnten mittels Massenspektrometrie und MS/MS-Experimenten nachgewiesen werden, es hätte allerdings einer Fermentation in sehr großem Maßstab bedurft, um genügend Material für eine semisynthetische Nutzung bereitzustellen.

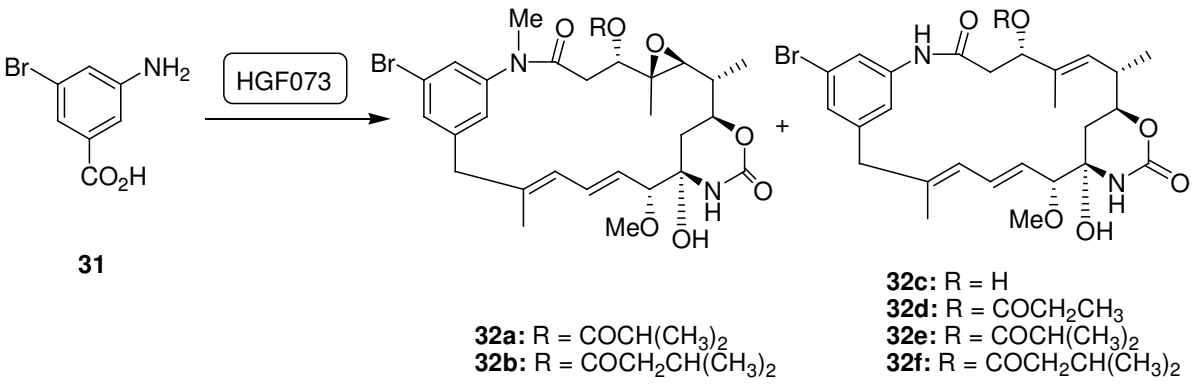
Deshalb wurden die Verfütterungsexperimente mit *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** fortgesetzt, die durch Bromierung und anschließender Nitroreduktion aus käuflicher *3-Nitrobenzoesäure* **30** dargestellt wurde (Schema 16).



Schema 16. Darstellung des *AHBA*-Derivats **31**. a) $AgSO_4$, Br_2, H_2SO_4, 4h, Rf, **87%** b) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOAc, 30 min, Rf, **83%**.

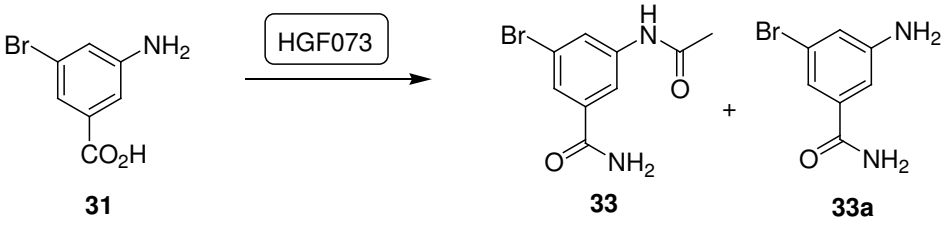
[62] 1.5 µmol/mL Fermentationsmedium; siehe Experimenteller Teil.

Das bromierte Mutasynthon schien, nach der Zufütterung der vierfachen Standard-Menge, gut akzeptiert zu werden, so dass im Folgenden die Fermentation im 3-Liter-Maßstab durchgeführt wurde.[52]



Schema 17. Verfütterung von *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** an HGF073.

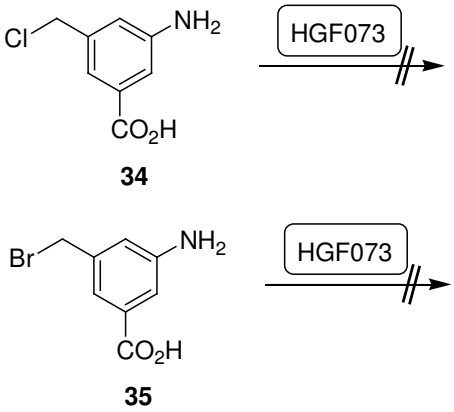
Nach der Reinigung mittels präperativer HPLC konnten 6 Ansamitocin-Derivate isoliert werden. Da sich die produzierten Ansamitocin-Analoga nur geringfügig in ihrer Polarität unterscheiden, war es bei dieser Mischung erforderlich, mehrere aufeinanderfolgende chromatographische Reinigungen mit 2 unterschiedlichen Phasen[63] vorzunehmen, um die verschiedenen Derivate zu isolieren. Die Verbindungen **32a**, **32c** und **32e** konnten in ausreichender Menge für die NMR-Analytik erhalten werden. Zusätzlich konnten *3-Acylamin-5-brombenzamid* **33** und *3-Amino-5-brombenzamid* **33a** als Detoxifizierungsprodukte des Organismus isoliert werden (Schema 18).



Schema 18. Bildung von Detoxifizierungsprodukten bei der Verfütterung von *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** an HGF073.

[63] C18 und CN-Phase; siehe Experimenteller Teil.

Das Verhältnis der produzierten Derivate unterschied sich signifikant von dem im natürlichen Produzenten, der nur ein Hauptprodukt (*Ansamitocin P3* **12**) und einige wenige Nebenprodukte[64] synthetisiert, die sich allerdings nur in der Natur der Esterseitenkette an 3-OH unterscheiden. Den nach der Mutasynthese mit *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** auftretenden Derivaten fehlten zum Teil die post-PKS-Transformationen zum Epoxid und zum methylierten Amid, außerdem entstanden teilweise das nicht acylierte Produkt **32c**. Die 19-Deschloro-20-bromansamitocine P2 und P4 waren im Gegensatz zur *AHBA*-Verfütterung in verhältnismäßig großen Mengen von etwa der Hälfte der produzierten P3-Derivate entstanden. Durch die Vielzahl der entstandenen Derivate war nur eine Ausbeute von ca. 0.3 mg/L des *19-Deschloro-20-bromansamitocin P3* **32a** gegeben, was für eine nachfolgende semisynthetische Nutzung einen beträchtlichen Aufwand bedeutet hätte. Deshalb wurde nach Mutasynthonen gesucht, die von dem Stamm HGF073 besser akzeptiert werden. Als nächstes wurden die Benzylhalogenide[65] **34** und **35** getestet (Schema 19), da aus Arbeiten von KNOBLOCH[66] bekannt war, dass der Benzylalkohol in dieser Position sehr gut von dem Stamm HGF073 akzeptiert und in hohen Ausbeuten zu Ansamitocinderivaten umgesetzt wird.



Schema 19. Verfütterung von *3-Amino-5-chlormethylbenzoesäure* **34** und *3-Amino-5-brommethyl-benzoesäure* **35** an HGF073.

Die Mutasynthone **34** und **35** wurden nicht von HGF073 in den Biosyntheseweg von *Ansamitocin* aufgenommen, so dass nun nach einer alternativen Strategie für die semisynthetische Funktionalisierung gesucht werden musste.

---

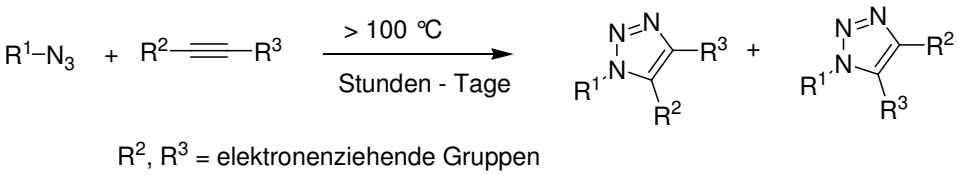
[64] größtenteils handelt es sich dabei um *AP2* und *AP4*.

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

[66] T.Knobloch, Dissertation, **2010**.

3.1.4 Mutasynthese für die semisynthetische Nutzung in HUISGEN-Cycloadditionen

Azid-Alkin-Cycloadditionen sind erstmals Ende des 19. Jahrhunderts für die Synthese von 1,2,3-Triazolen beschrieben und wurden in den 1950er bis 1970er Jahren von HUISGEN *et al.* eingehend untersucht.[67] Deshalb wird diese Art von 1,3-dipolaren Cycloadditionen auch als HUISGEN-Cycloaddition bezeichnet. Für die Überwindung der Aktivierungsenergie der insgesamt exothermen Reaktion müssen die Alkine elektronenziehende Gruppen tragen. Zusätzlich sind hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten notwendig, um die Cycloadditon zu verwirklichen, die in einer Regioisomeren-Mischung resultiert (Schema 20).[68]



Schema 20. Die klassische Variante der HUISGEN-Cycloaddition.[58]

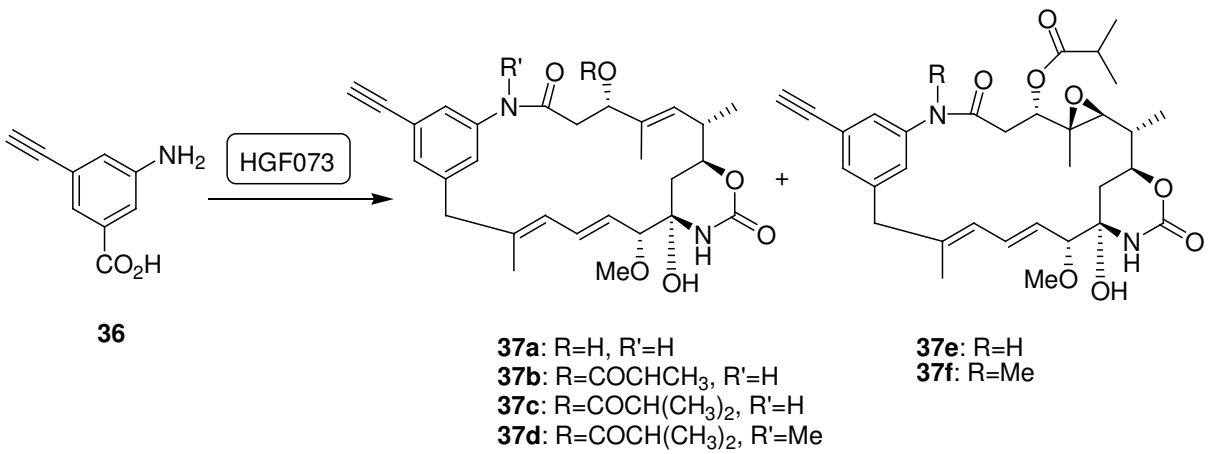
Erst in letzter Zeit sind diese Reaktionen wieder in das Blickfeld der Forschung gerückt, da kupferkatalysierte Varianten (kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen = CuAAC) zu wesentlich milderen Bedingungen und hohen Selektivitäten führten.[69] Um geeignete Naturstoffderivate für die semisynthetische Nutzung in HUISGEN-Cycloadditionen zu erhalten wurde *3-Amino-5-ethinylbenzoesäure* **36** an HGF073 verfüttert (Schema 21).

---

[67] R.Huisgen, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, **1963**, *2*, 565–598.

[68] J.E.Hein, V.V.Fokin, *Chem.Soc.Rev.*, **2010**, *39*, 1302–1315.

[69] a) C.W.Tornøe, C.Christensen, M.Meldal, *J.Org.Chem.*, **2002**,*67*, 3057–3062. b) V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V.Fokin and K.B.Sharpless, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2002**, *41*, 2596–2599.



36

37a: R=H, R'=H
37b: R=$COCHCH_3$, R'=H
37c: R=$COCH(CH_3)_2$, R'=H
37d: R=$COCH(CH_3)_2$, R'=Me

37e: R=H
37f: R=Me

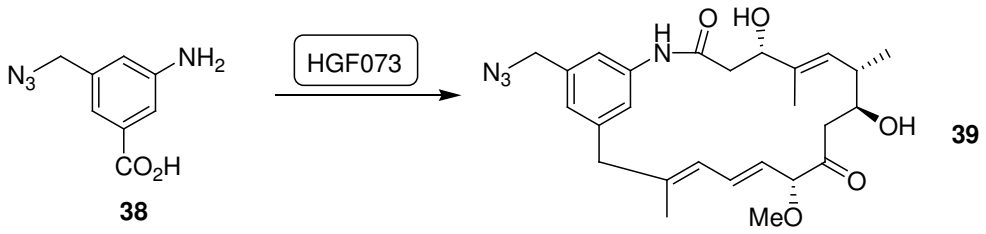
Schema 21. Verfütterung von *3-Amino-5-ethinylbenzoesäure* **36** an HGF073.

Im Fermentationsüberstand konnte schon am dritten Tag der Zufütterung massenspektrometrisch eine deutlich zu detektierende Menge an Ansamitocinen festgestellt werden, so dass dieser Versuch im Liter-Maßstab wiederholt wurde. Die Ausbeute des Hauptprodukts *19-Deschloro-20-ethinylansamitocin P3* **37f** betrug 0.34 % (3 mg/L; 4 % der Produktion nach *AHBA*-Supplemation). Diese Produktionsmenge erschien ausreichend groß, um genügend Material für anschließende Cycloadditionen bereitzustellen. Die Mutasynthese wurde im 5 L-Maßstab durchgeführt, so dass 15 mg *19-Deschloro-20-ethinylansamitocin P3* **37f** für semisynthetische Zwecke zur Verfügung standen. Zusätzlich konnte nicht epoxidiertes, nicht *N*-methyliertes *19-Deschloro-20-ethinylansamitocin P3* **37c** in einer Ausbeute von 0.06 % (0.5 mg/L; 0.7 % der Produktion nach *AHBA*-Supplemation) isoliert werden. Zusätzlich zu den Derivaten **37c** und **37f** gab es Hinweise auf die Bildung weiterer Ansamitocin-Derivate. Diese wiesen gleiche UV-Spektren wie *Ansamitocin P3* bei $\lambda = 248$ nm auf und zeigten massenspektrometrisch die für Ansamitocine charakteristischen Fragmentierungs-muster.[70] Durch die Analyse der Fragmentierungen konnten Hinweise auf die Bildung der Ethinylansamitocine **37a**, **37b**, **37d** und **37e** erhalten werden. Die Mutasynthese mit *3-Amino-5-ethinylbenzoesäure* **36** ist gut für die Bereitstellung von Edukt für die semisynthetischen Derivatisierungen geeignet, da das P3-Derivat **37f** als Hauptprodukt entsteht.

Um eine möglichst große Substratbreite für die semisynthetische Nutzung in HUISGEN-Cycloaddition zu erhalten wurden auch die Mutasynthone **38** und **40** an HGF073 verfüttert (Schema 22 -24).

---

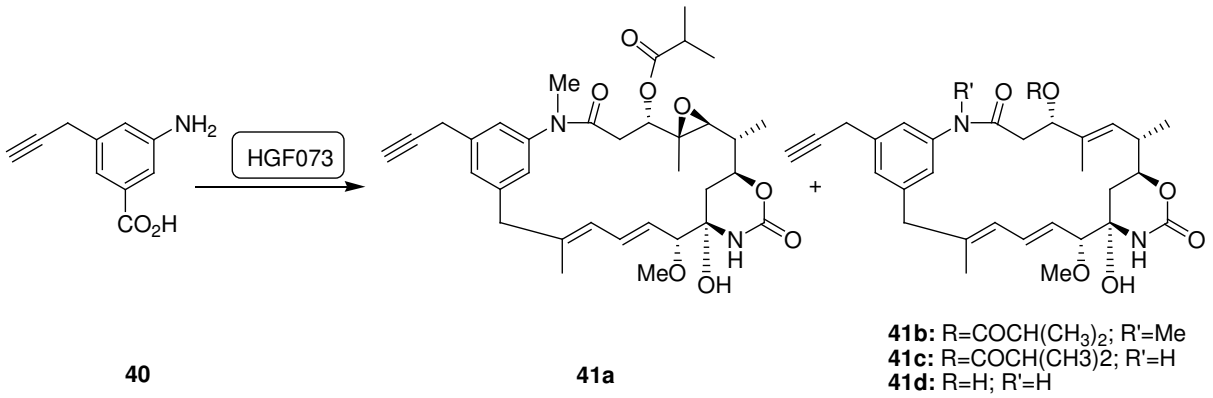
[70] Z.Liu, H.G.Floss, J.M.Cassady, K.K.Chan, *J.MassSpectrom.,* **2005**, *40,* 389–399.



Schema 22. Verfütterung von *3-Amino-5-Azidomethylbenzoesäure* **38** an HGF073.

3-Amino-5-Azidomethylbenzoesäure **38** wurde nicht gut akzeptiert. Es gab massenspektrometrisch lediglich Hinweise auf die Bildung von *20-Azidomethyl-proansamitocin* **39**.

3-Amino-5-propargyl-benzoesäure **40** wurde nach Zufütterung der doppelten Standardmenge[71] in die Ansamitocinbiosynthese aufgenommen, allerdings resultierte diese in einer ungewöhnlich hohen Anzahl von Propargyl-Ansamitocin- und Propargyl-Proansamitocin-Derivaten, die nur unter großem chromatographischen Aufwand getrennt werden konnten[72] (Schemata 23 und 24).



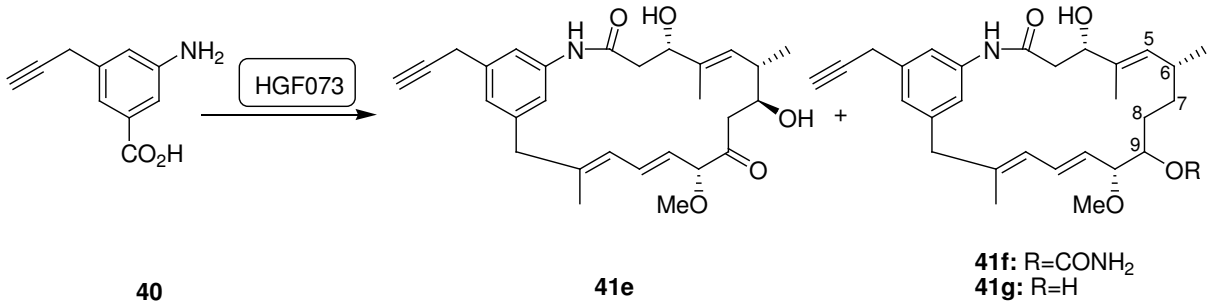
Schema 23. Verfütterung von *3-Amino-5-propargylbenzoesäure* **40** an HGF073.

Aus dieser Fermentation konnten nur Derivate mit der P3-Seitenkette isoliert werden. Zusätzlich entstanden Zwischenstufen, bei denen die post-PKS enzymatischen Transformationen nicht vollständig abgelaufen waren. Dazu gehörten das nicht epoxidierte P3-Derivat **41b**, das nicht epoxidierte und *N*-methylierte Derivat **41c** und das ausschließlich

[71] 1.5 µmol/mL Fermentationsmedium; siehe Experimenteller Teil.

[72] siehe Experimenteller Teil.

carbamoylierte Derivat **41d**. Die entstandenen Proansamitocine wiesen teilweise eine Besonderheit auf, die mittels der Ansamitocinbiosynthese nicht zu erklären war (Schema 24).



Schema 24. Verfütterung von *3-Amino-5-propargylbenzoesäure* **40** an HGF073 resultierte in *20-Propargylproansamitocin* **41e** und zwei ungewöhnlichen Proansamitocinderivaten **41f** und **41g**.

Die NMR spektroskopische Analyse der Derivate **41f** und **41g** zeigte Signale einer zusätzlichen CH_2-Gruppe, die H-H-COSY-Kontakte zur 8-CH_2-Guppe hatte. Außerdem fehlte die charakteristische 7-CH-Guppe. Der 7-CH_2-Gruppe konnten zusätzlich eindeutige H-H-COSY-Kontakte zur 6-CH-Gruppe und HMBC-Kontakte zu C9 und C5 zugeordnet werden.

Die fehlende Hydroxygruppe an C7 bei den Derivaten **41f** und **41g** kann nur durch eine post-PKS auftretende Eliminierung und anschließende Reduktion durch eine Enoylreduktase (ER) erklärt werden, die anschließende Reduktion der Ketogruppe an C9 durch eine Ketoreduktase (KR). Die Eliminierung geht wahrscheinlich vom carbamoylierten Derivat an C-OH-7 aus (Abbildung 15).

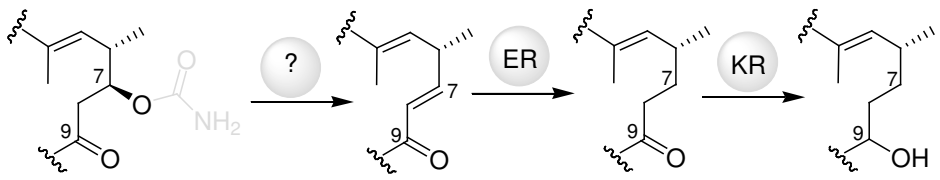
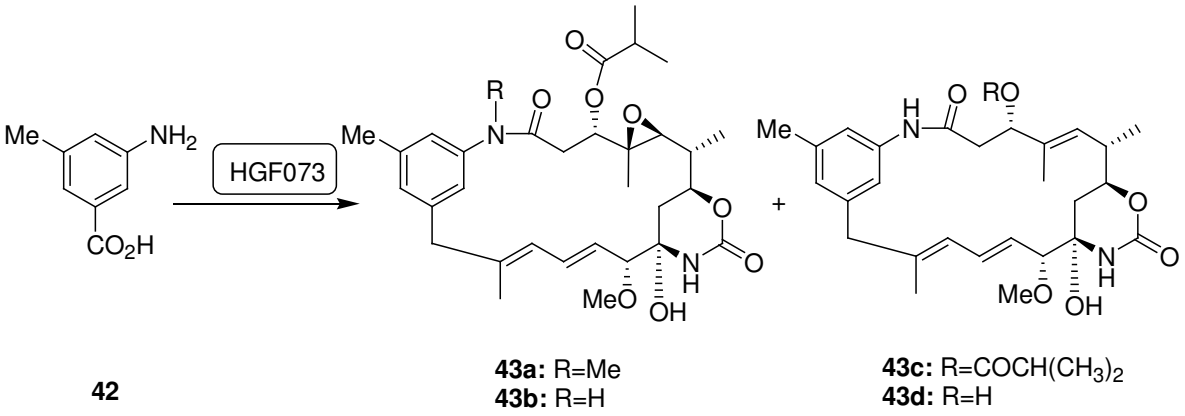


Abbildung 15. Biosynthetische Transformation zu Proansamitocinderivaten **41f** und **41g**. Die Eliminierung ausgehend vom carbamoylierten Derivat ist wahrscheinlich.

Diese enzymatischen Transformationen könnten auch aus anderen Biosynthesewegen des Organismus stammen, wie z.B. aus der Fettsäurebiosynthese, bei der gleiche Reaktionsmechanismen auftreten wie bei der Polyketidbiosynthese. Eventuell deutet das

Auftreten dieser Produkte auf eine verringerte Geschwindigkeit der Reaktionen hin, die von post-PKS Enzymen katalysiert werden, da anscheinend andere Mechanismen schneller eingreifen. Die Carbamoyltransferase scheint unspezifisch zu funktionieren, da auch das carbamoylierte Derivat **41f** isoliert werden konnte.

Zusätzlich zu den Propargyl-Ansamitocinen konnten überraschenderweise auch drei 19-Methyl-20-deschloroansamitocine **43a**-**43c** isoliert werden (Schema 25).



42

43a: R=Me
43b: R=H

43c: R=COCH(CH$_3$)$_2$
43d: R=H

Schema 25. Verfütterung von *3-Amino-5-methylbenzoesäure* **42**.

Die Entstehung dieser Derivate kann nur über eine Verunreinigung des Mutasynthons erklärt werden, die im NMR-Spektrum nicht zu erkennen war. Anscheinend wurde *3-Amino-5-methylaminobenzoesäure* **42** bevorzugt in die Biosynthese aufgenommen und resultierte deshalb in etwa gleichen Mengen Ansamitocinderivaten wie die wesentlich schlechter aufgenommene Propargylaminobenzoesäure **40**.

Aufgrund der immensen Anzahl gebildeter Derivate, die alle im etwa gleichen Maßstab entstanden waren, und die daraus resultierende sehr aufwendige Trennung, ist diese Mutasynthese ungeeignet für die Materialbereitstellung für semisynthetische Zwecke.

3.1.5 Biosynthesestudien an HGF073 mit homologisierten AHBA-Derivaten

Ein Zugang zu im Ansa-Ring veränderten Ansamitocinen sollte die Mutasynthese mit um eine CH_2-Gruppe verlängerten Aminobenzoesäuren liefern. Als AHBA-Varianten kamen *3-Amino-5-hydroxyhomobenzoesäure* **44** und *3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäure* **45** für die Verfütterung in Frage. Im Falle einer Akzeptanz durch den Stamm HGF073 sollten diese zu 20-gliedrigen Makrolactamen führen (Abbildung 16).

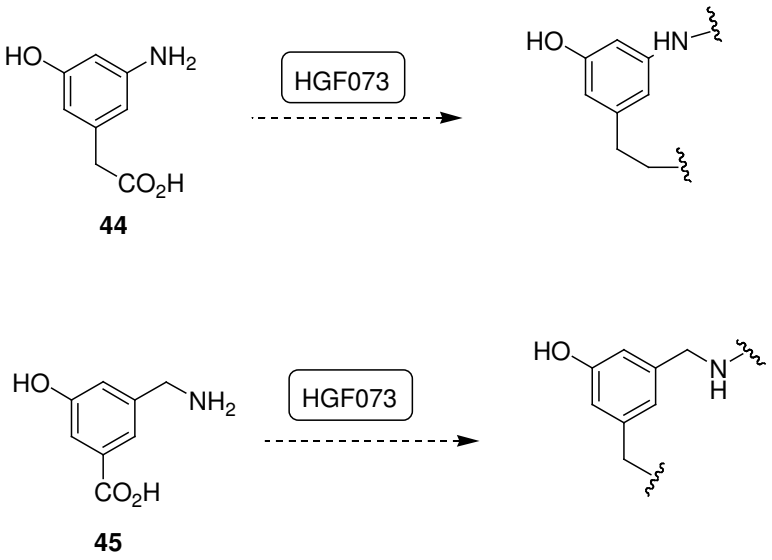
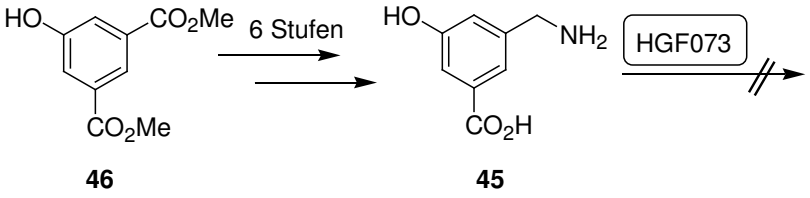


Abbildung 16. Verfütterungsexperimente mit Homo-AHBA-Derivaten an *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073 zur Darstellung von CH_2-verlängerten Makrozyklen.

Die Arbeiten zur Synthese und Verfütterung der Methylen-verlängerten Säure **44** wurden von BINIA TOMASZEWSKI während ihrer Diplomarbeit durchgeführt.[73] Erstaunlicherweise konnte nach der Verfütterung ausschließlich natürliches *Ansamitocin P3* **12** isoliert werden, was auf einen oxidativen Abbau der homologisierten Benzoesäure durch den Organismus hindeutet.
3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäure **45** wurde ausgehend von *3-Hydroxyisophthalsäure-dimethylester* **46** synthetisiert und in Verfütterungsexperimente mit *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 eingesetzt (Schema 26).



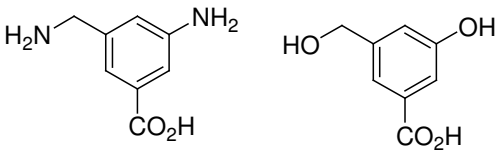
Schema 26. Verfütterungsexperimente mit *3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäure* **46** an HGF073.

Nach der Fermentation gab es keine Hinweise auf die Bildung von Ansamitocinderivaten. Das Mutasynthon konnte unverändert im Rohextrakt massenspektrometrisch detektiert werden. Detoxifizierungsprodukte des Organismus wurden nicht gefunden, was darauf

[73] B.Tomaszewski, Diplomarbeit, Januar **2010**.

hindeutet, dass das Mutasynthon weder als potentielle Startereinheit, noch als Toxin registriert wird.

Ein weiterer Ansatz zur Ringerweiterung zu einem 20-Ring-Lactam war die mutasynthetische Nutzung von **47**. Ausserdem sollte Diol **48** eingesetzt werden, da aus Mutasynthesen mit der in der AHBA-Biosynthese blockierten Mutante des *Geldanamycin*-Produzenten K390-61-1 bekannt war, dass über den Benzylalkohol makrolactonisiert wird.[55,74]

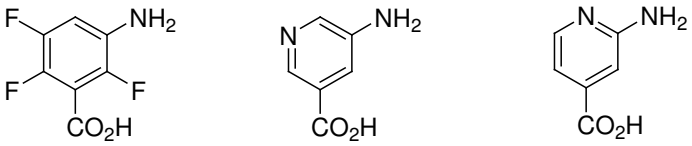


47 **48**

Abbildung 17. Nicht von *Actinosynnema pretiosum* Stamm HGF073 akzeptierte Mutasynthone.

Die Versuche waren erfolglos. Es konnten keine Ansamitocin-Derivate gefunden werden, weshalb diese Strategie zur Ansamitocin-Derivatisierung an dieser Stelle abgebrochen wurde.

Weitere mutasynthetische Versuche wurden mit den Aminosäuren **49** – **51** durchgeführt, da hier die Hoffnung bestand, die pharmakologische Wirkung durch diese starken strukturellen Änderungen zu modifizieren (Abbildung 18).



49 **50** **51**

Abbildung 18. Nicht von *Actinosynnema pretiosum* Stamm HGF073 akzeptierte Mutasynthone.

Die Mutasynthone **49** – **51** wurden nicht von HGF073 angenommen. Deshalb wurde auch diese Strategie vorerst nicht weiter verfolgt, und ausschließlich am wesentlich vielversprechenderen Weg über 19-Ethinylansamitocine gearbeitet.[75]

---

[74] Simone Eichner, unveröffentlichte Ergebnisse.

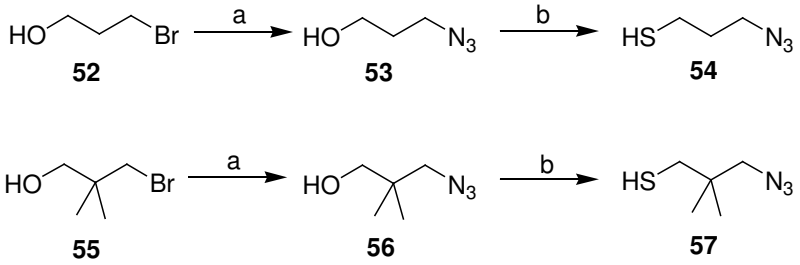
[75] siehe Kapitel 3.1.4.

3.2 SEMISYNTHETISCHE DERIVATISIERUNG

Das mutasynthetisch dargestellte *19-Ethinyl-20-deschloroansamitocin P3* **37f** sollte über HUISGEN-Cycloaddition mit einem Linker für die Anbindung an tumorassoziierte Antikörper versehen werden. Deshalb sollten die Linker auf der einen Seite ein Azid tragen, auf der anderen Seite ein freies Thiol für geplante Anbindung von Proteinen oder Vitaminen.

3.2.1 Linkersynthese

Es wurden zwei verschiedene Linker **54** und **57** synthetisiert, die eine C3-Kette als Abstand zwischen Wirkstoff und Antikörper einbringen (Schema 27).



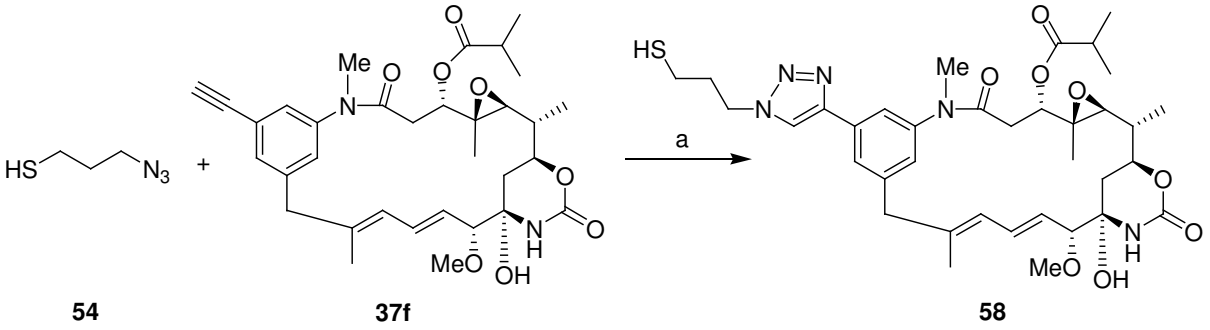
Schema 27. Synthese der Linker zur Anbindung von Proteinen an Ansamitocine. a) NaN_3, DMF, 20h, RT, **89%** für **53**, **86%** für **56**; b) i. $(F_3CCO)_2O$, THF, 30 min, RT, → LiBr, HMPA, 5h, 70°C; ii. $SC(NH_2)_2$, EtOH, 20h, 80°C, **61%** für **54**, **68%** für **57**.

Der methylverzweigte Linker **57** sollte aufgrund des sterischen Anspruchs eine höhere Stabilität gegenüber reduktiver Spaltung während des Transportweges durch den Blutkreislauf garantieren.[51]

Die Synthese erfolgte ausgehend von den 3-Bromalkoholen **52** und **55** durch Substitution der Bromide mit *Natriumazid*, anschließender Überführung der freien Alkohole in die Trifluoracetate, welche wiederum mittels *Thioharnstoff* in die gewünschten freien Thiole **54** und **57** umgesetzt wurden.

3.2.2 Anbindung der Linker

Die Anbindung der Linker erfolgte über kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Erste Versuche wurden mit dem nicht verzweigten Linker **54** durchgeführt (Schema 28).

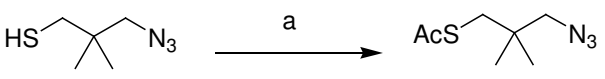


54 **37f** **58**

Schema 28. Anbindung von Linker **54** an *19-Ethinyl-20-deschloroansamitocin* **37f**. a) CuBr · SMe_2, ^{t}BuOH/THF/H_2O, **53%**.

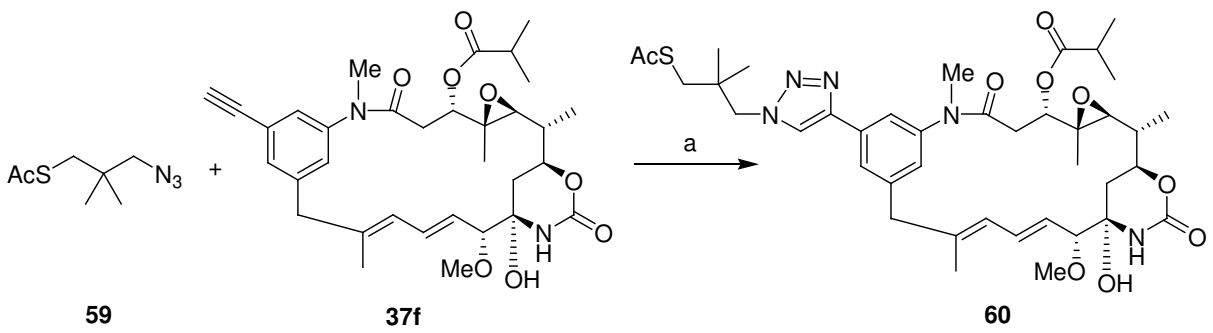
Nach erfolgter Reaktion konnte als Produkt ausschließlich das Disulfid aus **58** gefunden werden. Deshalb wurde der Rohextrakt in einer reduktiven Spaltung mit Dithiothreitol eingesetzt. Nach Reinigung mittels präperativer HPLC konnten 53% des linkergebundenen Derivats **58** isoliert und das Edukt reisoliert werden. Das zeigt, dass die Reaktion sehr sauber verläuft, da keine Zersetzungsprodukte gefunden wurden. Hinsichtlich der Ausbeute sind an dieser Stelle Optimierungsarbeiten erforderlich.

Für die Reaktion mit Linker **57** wurde dieser Acetat-geschützt, um die Disulfid-Bildung zu verhindern. Die Acetat-Gruppe stellt für die Tests auf biologische Aktivität keinen Nachteil dar, da die Acetylierung, neben der Methylierung, eine mögliche zelluläre Reaktion auf freie Thiole ist. Deshalb sollten für vollständige biologische Aktivitätstests sowohl die freien Thiole als auch die acetylierten und methylierten Derivate eingesetzt werden.



57 **59**

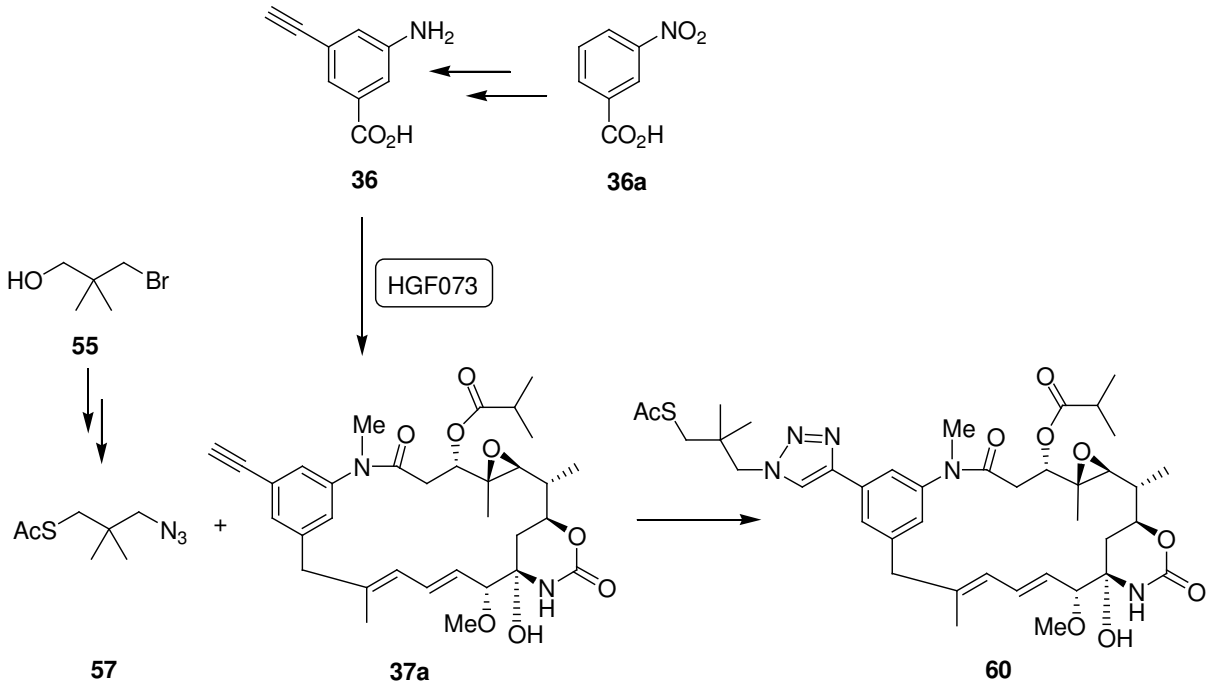
Schema 29. Acetylierung von Linker **57**. a) AcCl, NEt_3, THF, 20 h, RT, **61 %**.



Schema 30. Anbindung von Linker **59** an *19-Ethinyl-20-deschloroansamitocin* **37f**. a) CuBr · SMe_2, ^{t}BuOH/THF/H_2O, **59%**.

Die Anbindung von **59** verlief in einer Ausbeute von 59 %. Der Ablauf der Reaktion war wieder sehr sauber, sodass das Edukt reisoliert werden konnte. Auch hier sind Optimierungen hinsichtlich der Ausbeute notwendig.

Mit diesen Reaktionen konnte gezeigt werden, dass die Anbindung von Thiol-Linkern über CuAAC unter sehr milden Bedingungen möglich ist und zu potentiellen Kanditaten für die Konjugat-Synthese mit Antikörpern führt. Insgesamt konnte ein einfacher, gut praktikabler Weg zur Ansamitocin-Derivatisierung in aromatischer Position erarbeitet werden (Schema 31).



Schema 31. Zugang zu linkergebundenen Ansamitocinen für die Konjugatsynthese: Kombination von chemischen und chemoenzymatischen Techniken.

3.3 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN

Die dargestellten Ansamitocinderivate wurden von SASSE *et al.* am HZI in Braunschweig auf ihre biologische Aktivität mittels MTT-Tests an verschiedenen humanen Krebszelllinien untersucht. Die zum Ende dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.[76]

Tabelle 2. IC_{50} –Werte [nM] verschiedener Krebszelllinien auf getestete Ansamitocinderivate.

	Krebszelllinie	**12**	**32a**	**32e**	**37f**	**37c**
KB-3-1	cervix carcinoma	0,17	3,24	12	0,64	3,9
U-937	histiocytic lymphoma	0,0055	0,2	0,52	0,072	0,23
A-431	epidermoid carcinoma	0,079	0,48	8,25	0,12	1,4
A-498	kidney carcinoma	1,7	14,2	28	7,9	>8
A-549	lung carcinoma		1,85	11	0,52	1,9
SK-OV-3	ovary adenocarcinoma	0,047	0,52	2,9	0,17	0,81
PC-3	prostate adenocarcinoma	0,055	0,4	1,3	0,14	0,5
MCF7	breast adenocarcinoma		0,34	3,2	0,11	0,58

Die Aktivitäten der 19-Brom-20-deschloransamitocine sind um den Faktor 10 (**32a**) bis 100 (**32e**) geringer als die von *Ansamitocin P3* **12**, befinden sich aber dennoch im nanomolaren bis unterem mikromolaren Bereich. Erfreulicherweise wiesen die Ethinylansamitocine, insbesondere das *19-Ethinyl-20-deschloroansamitocin P3* **37f**, keine Aktivitätseinbußen gegenüber *Ansamitocin P3* **12** auf.

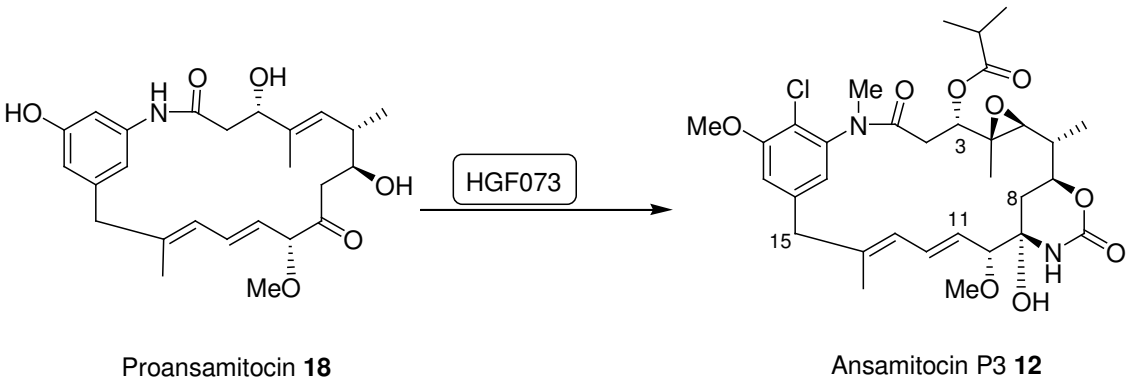
Die Tests für die linkergebundenen Ansamitocine **58** und **60**, sowie für alle Propargylansmitocine **41a** – **g** und Methylansamitocine **43a** – **c** stehen noch aus.

[76] 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.

3.4 SECO-PROANSAMITOCIN –CHEMOBIOSYNTHESE

3.4.1 Vorarbeiten

Aus früheren Arbeiten[77] war bekannt, dass die Verfütterung von *Proansamitocin* **18** an *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 zu *Ansamitocin P3* **61** führt (Schema 32). Das bedeutet, dass alle post-PKS Enzyme von unnatürlichen, also nicht vom eigenen Multienzymkomplex stammenden, synthetisch oder mutasynthetisch produzierten Biosyntheseintermediaten angesprochen werden können.

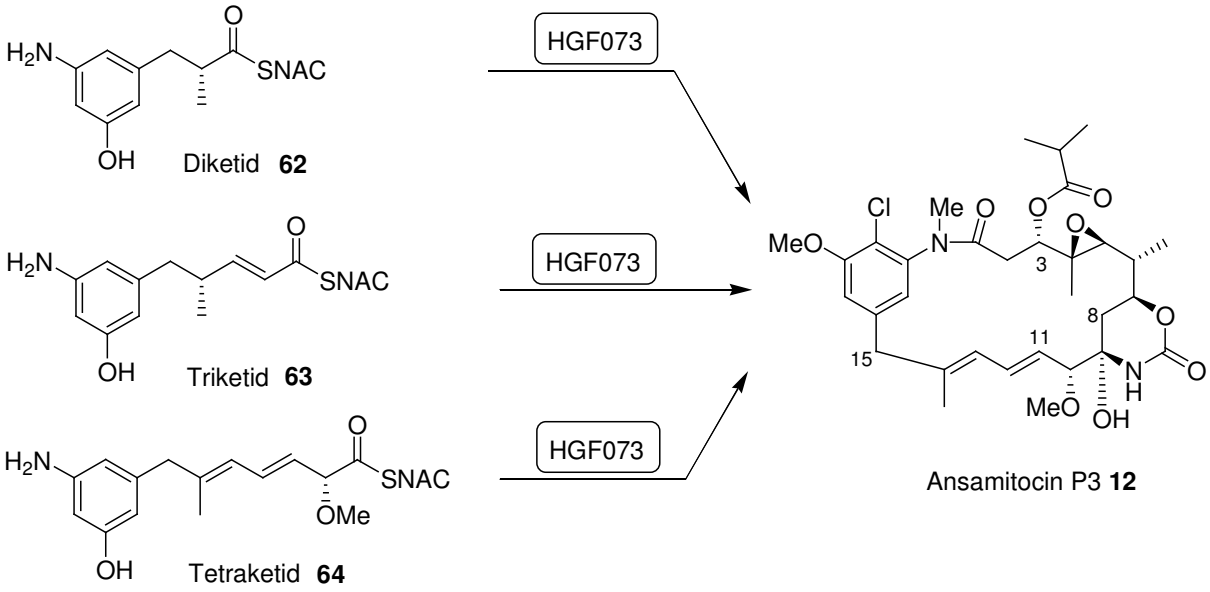


Proansamitocin **18** Ansamitocin P3 **12**

Schema 32. Verfütterung von Proansamitocin an *Actinosynnemma pretiosum* Mutante ***HGF073***.

Die post-PKS Enzyme arbeiten isoliert vom Polyketidsynthase-Modul und setzen somit keinen Transfer auf den Komplex voraus. Die Übertragung auf das Modul ist die Grundvoraussetzung für die Akzeptanz von weniger fortgeschritteneren Intermediaten der Ansamitocin-Biosynthese. Dazu gehören Diketid **62**, Triketid **63** und Tetraketid **64.** Es konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten ketidischen Zwischenstufen auf den Polyketidsynthase-Komplex von *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 transferiert und vollständig zu *Ansamitocin P3* prozessiert werden (Schema 33).[38,39]

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



Schema 33. Verfütterungsexperimente mit Biosynthesintermediaten an *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073.[38,39]

Diese Ergebnisse stellen einen vielversprechenden Zugang zu einer Vielzahl von Ansamitocin-Derivaten in großer Diversität in Aussicht. Deshalb war es von außerordentlicher Bedeutung für die weiteren Untersuchungen, die Grenzen dieser Strategie bezüglich der Substratkomplexizität aufzuklären. Dafür wurde das komplexeste am Modul gebundene Biosyntheseintermediat, das *seco-Proansamitocin* **65** für Verfütterungsexperimente synthetisiert (Abbildung 19).

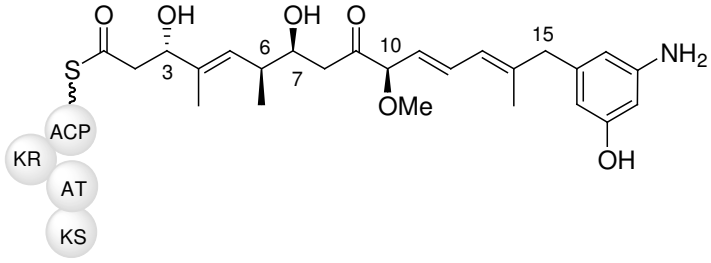
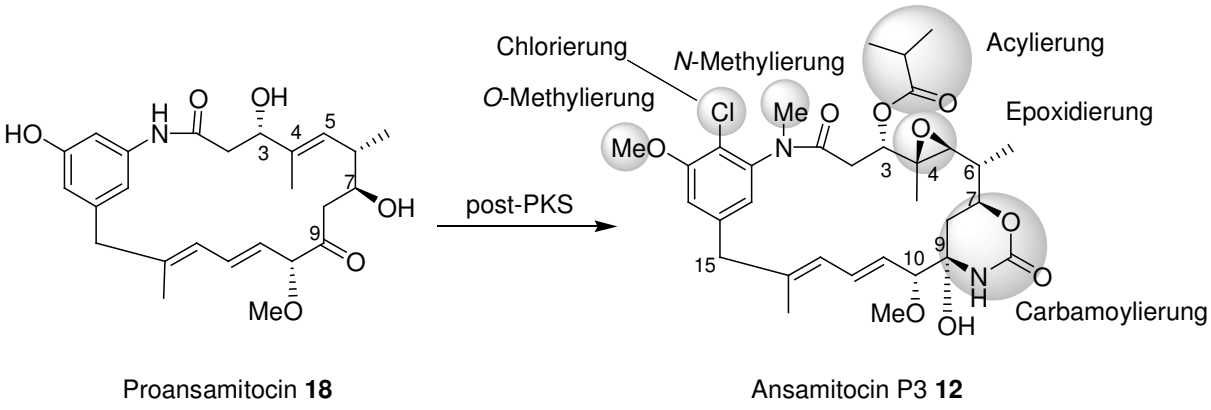


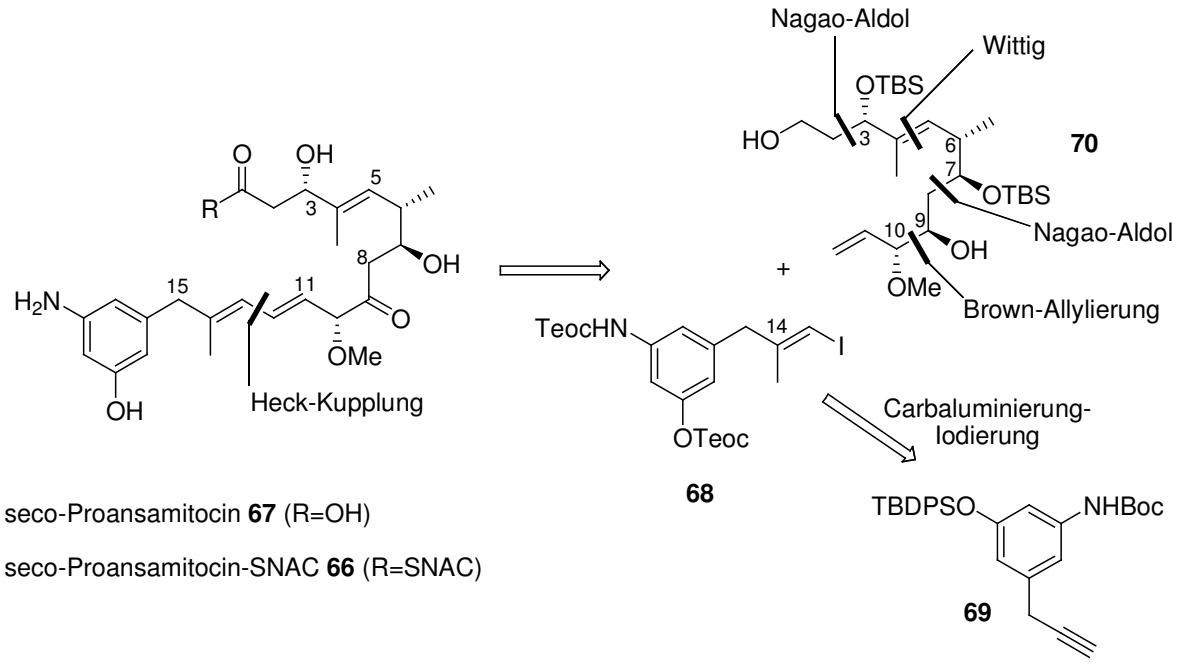
Abbildung 19. *Seco-Proansamitocin* – das komplexeste am Modul gebundene Intermediat während der Ansamitocin-Biosynthese.

Seco-Proansamitocin enthält bereits 4 der 6 im *Ansamitocin* zu findenden Stereozentren an C3, C6, C7 und C10 (Schema 34). Die Stereozentren der Ansamitocinstruktur an C4/C5 und C9 werden erst während der postketidischen Transformationen durch Carbamoylierung an C-OH-7 und anschließende Halbaminalbildung an C9 und Epoxidierung an C4/C5 aufgebaut.



Schema 34. Postketidische Transformationen an *Proansamitocin* **18** führen zu *Ansamitocin P3* **12**.

Die Synthese von *seco-Proansamitocin-N-Acetylcysteaminthioester* **66** wurde wie von FRENZEL und BRÜNJES beschrieben durchgeführt. Für die geplanten Verfütterungs-experimente wurde zusätzlich *seco-Proansamitocin* **67** analog zur Synthese des SNAC-Esters **66** hergestellt (Schema 35).[78]



Schema 35. S*eco-Proansamitocin*-Synthese nach FRENZEL und BRÜNJES.[78]

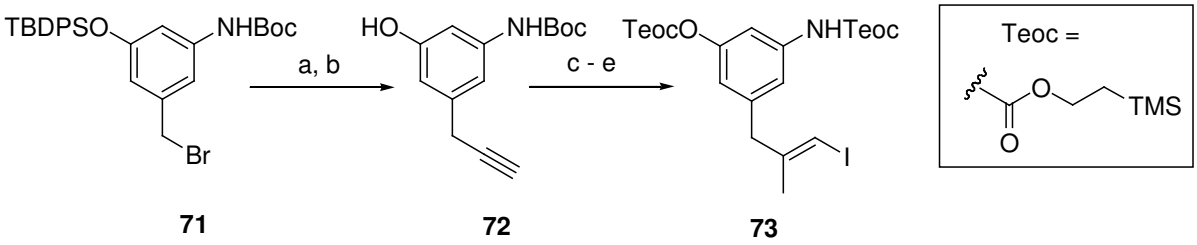
Die Synthese beinhaltet als Schlüsselschritte eine Carboaluminierungs-Iodierungs-Sequenz nach NEGISHI um die methylierte Doppelbindung an C14 einzuführen und eine HECK-Kupplung zum Aufbau des Diensystems an C11-C14-Position. Die Stereozentren werden

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

über Auxiliar gesteuerte Aldolvarianten (C3 und C7) und über eine BROWN-Allylierung (C9 und C10) aufgebaut. Die Methylgruppe an C6 wird über den Startbaustein ROCHE-Ester eingeführt.

3.4.2 Chemische Synthese

Die Synthese wurde mit der *Palladium*-katalysierten C-C-Knüpfung von Benzylbromid **71** begonnen, um das propargyl-aromatische System in Verbindung **72** als Vorstufe für das isolierte Doppelbindungssystem in Verbindung **73** einzuführen.[78] Im ersten Schritt wurde mittels einer Indium-Acetylen-Spezies, die durch Transmetallierung aus dem Lithiumäquivalent erhalten wurde, alkinyliert. Anschließend folgte die Spaltung der Silylgruppen an propargylischer und phenolischer Position mittels TBAF unter Bildung von Propargylaren **72**. Die anschließende Carboaluminierungs-Iodierungs-Sequenz nach NEGISHI[79] und darauffolgende Schützung des Phenols als „Silyl-Carbonat" und des Anilins als „Silyl-Carbamat" führten zu Vinyliodid **73** in einer Ausbeute von 30 % über 4 Stufen (Schema 36).



71 **72** **73**

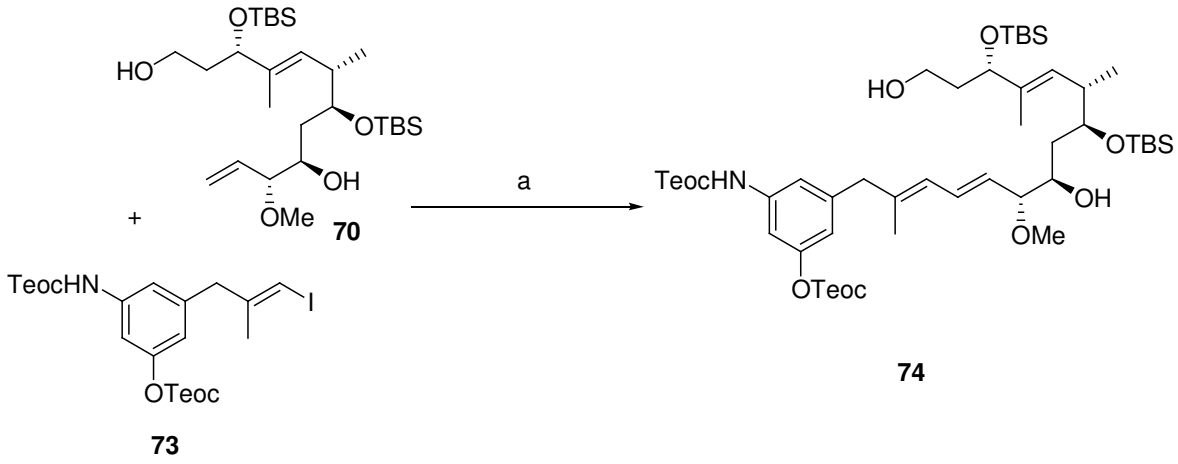
Schema 36. Darstellung des aromatischen Teils von *seco-Proansamitocin*. a) In(III)-tri-(TMS-acetylen), $Pd(dppf)Cl_2$, THF, 65 °C, **75 %**; b) TBAF, THF, 0 °C, **92 %;** c) $AlMe_3$, Cp_2ZrCl_2, DCE; d) I_2; e) TeocCl, Pyridin, RT, DCM, **43 %** .

Auch die nachfolgende *Palladium*-katalysierte HECK-Reaktion unter JEFFERY-Bedingungen[80] zur Knüpfung des armoatischen Teils **73** mit Pentaol **70** verlief in einer reproduzierbaren Ausbeute von 82 % (Schema 37). Dafür musste in hochkonzentrierter Reaktionslösung

[79] E.-I.Negishi, D.E.VanHorn, T.Yoshida, *J.Am.Chem.Soc*., **1985**, *107*, 6639-6647; E.-I.Negishi, D.Y.Kondakov, D.Choueiry, K.Kasai, T.Takahashi, *J.Am.Chem.Soc*., **1996**, *118*, 9577-9588.

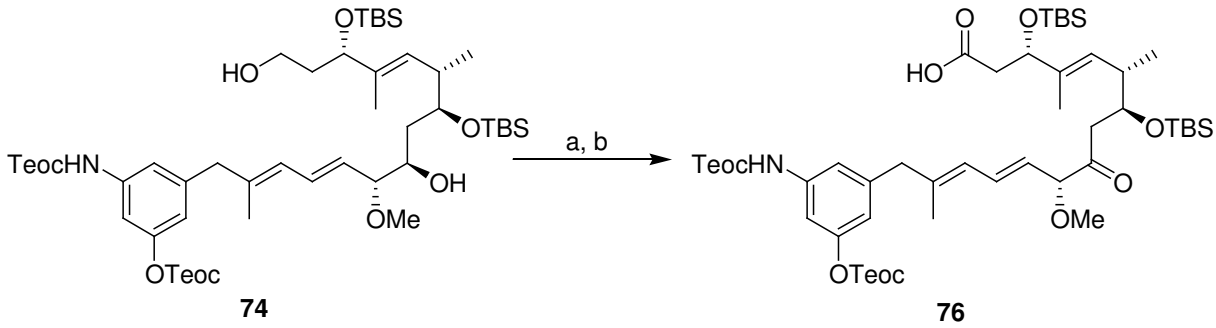
[80] T.Jeffery, *Tet.Lett*., **1985**, *26*, 2667-2670; T.Jeffery, *Tetrahedron*., **1996**, *52*, 10113-10130.

gearbeitet werden. Längere Reaktionszeiten oder höhere Temperaturen führten zu kompletter Zersetzung.



Schema 37. HECK-Reaktion zur Knüpfung der „*Ansa-Kette*“ **70** an den aromatischen Teil **73**. a) Cs_2CO_3, $Pd(OAc)_2$, TBAB, NEt_3, DMF, RT, 5h, **82 %**.

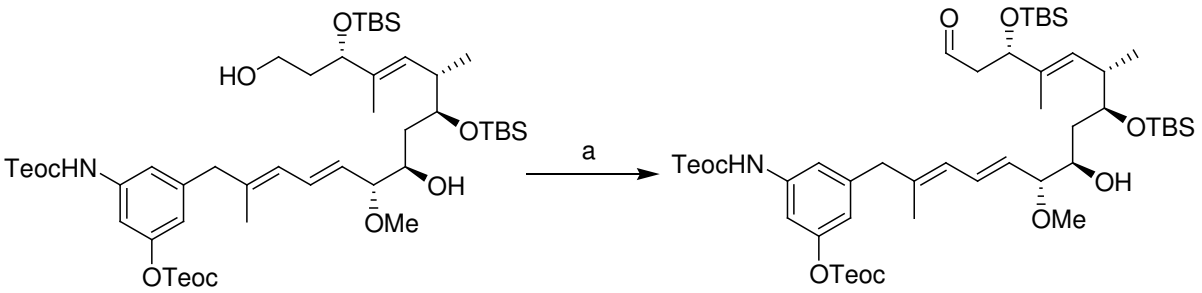
In den nachfolgenden Oxidationsschritten traten erhebliche Schwierigkeiten bei der Reaktionsführung auf. Die beschriebenen Ausbeuten der SWERN- und PINNICK-Oxidation konnten nicht stabil reproduziert werden (Schema 38).[78]



Schema 38. SWERN- und PINNICK-Oxidation zur Oxidation des Diols **74** zur Ketosäure **76**. a) DMSO, $(COCl)_2$, NEt_3, CH_2Cl_2, -60 °C → -40 °C, **0-75 %**; b) $NaClO_2$, $NaH_2PO_4xH_2O$, 2-Methyl-2-buten, ^tBuOH, 0 °C → RT, **0-86 %**.

Häufige Fehlerquellen wie Chemikalienalter, -verunreinigungen oder Lieferantenwechsel wurden systematisch ausgeschlossen. Trotz genauester Reproduktion aller Bedingungen brach oft bei großen Ansätzen die Ausbeute ohne ersichtlichen Grund komplett ein. Dieses äußerte sich in der vollständigen Zersetzung des Edukts. Da ein „up-scaling“ der

Oxidationsschritte zwingend erforderlich war, um die Synthese der seco-Proansamitocine **66** und **67** zu verwirklichen, wurde aufgrund der ständigen Rückschläge eine alternative Route in Erwägung gezogen, wofür verschiedene Oxidationsmethoden untersucht wurden.
Oxidationen mit TPAP/NMO sind als milde Reaktionen in einem breiten Anwendungsspektrum beschrieben[81]. Deshalb wurde diese Methode als erstes gewählt (Schema 39).



74 **75a**

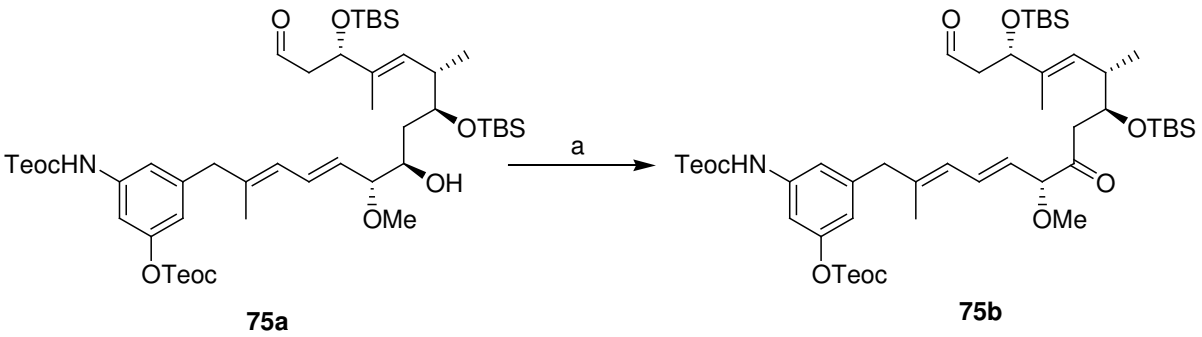
Schema 39. LEY-GRIFFITH-Oxidation des Diols **74** zu Aldehyd **75a**. a) TPAP, NMO, CH_2Cl_2, RT, 1h, **83%**.

Tabelle 3. Optimierungsversuche zur LEY-GRIFFITH-Oxidation.

Eintrag	Lösemittel	Katalysator	Bedingungen	Ausbeute	Bemerkung
1	CH_2Cl_2	TPAP/NMO	RT, 1h	83 %	Monoox. Produkt
2	CH_2Cl_2	TPAP	0 °C; 2h;	76 %	Monoox. Produkt
3	CH_2Cl_2/ MeCN	TPAP/NMO	RT, 1h	13 %	Zersetzung
4	MeCN	TPAP/NMO	RT, 1h	0%	Zersetzung

Es konnte allerdings nur eine Monooxidation zu Aldehyd **75a** erreicht werden. Das Erhöhen der Reagenzienmengen oder das Verwenden anderer Lösemittel, die zu besseren Umsätzen führen sollten, wie z.B. Acetonitril, führte nicht zum gewünschten Ketoaldehyd, sondern ebenfalls nur zur Monooxidation (Eintrag 2) oder zur langsamen Zersetzung des Produkts (Eintrag 3 und 4). Deshalb wurde nach komplettem Umsatz zu Aldehyd **75a** aufgearbeitet. Das Monooxidationsprodukt wurde nach einer kurzen Filtersäule erneut unter gleichen Bedingungen in der Reaktion eingesetzt. Auf diese Weise konnte eine Oxidation des sekundären Alkohols zum Keton in einer Ausbeute von 70 % erreicht werden (Schema 40).

[81] S.V.Ley, J.Normann, W.P.Griffith, S.P.Mardsen, *Synthesis*, **1994**, 639-666.



Schema 40. LEY-GRIFFITH-Oxidation des Aldehyds **75a** zu Ketoaldehyd **75b**. a) TPAP, NMO, CH_2Cl_2, RT, 1h, **70%**.

Dieser Weg beinhaltet zwei Stufen um zum gewünschten Ketoaldehyd **75b** in 58 % Ausbeute zu gelangen, verläuft jedoch mit einer besseren Ausbeute und Reproduzierbarkeit als die SWERN-Methode mit diesem Substrat. Zudem bedeutet es einen zeitlichen Vorteil aufgrund der einfachen Handhabung der LEY-GRIFFITH-Oxidation[82].

Da die nachfolgende PINNICK-Oxidation (Schema 38) ebenfalls nicht reproduzierbare Ausbeuten lieferte, wurde auch nach Alternativen für die Oxidation des Ketoaldehyds **75b** zur Carbonsäure **76** gesucht (Tabelle 4).

Tabelle 4. Verschiedene getestete Oxidationsmethoden zur Synthese der Carbonsäure **76**.

Oxidationsmethode	Edukt	Bedingungen	Ausbeute	Bemerkung
PINNICK	Ketoaldehyd **75b**	0 °C, 30 min	0 – 86 %	Nicht reproduzierbar
PDC	Diol **74**	DMF,RT→40°C	0 %	Keine Reaktion
PCC	Diol **74**	CH_2Cl_2, RT	0 %	Zersetzung
JONES	Diol **74**	0 °C, 20 min	40 – 60 %	--

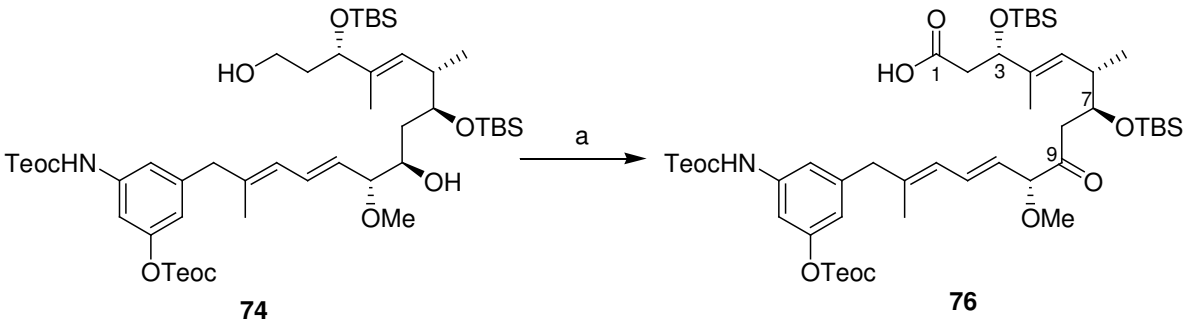
In der Literatur[83] finden sich eine Reihe von Chromatreagenzien für die Oxidation primärer und sekundärer Alkohole zur Carbonylverbindung, sowie auch einige, die direkt zur Carbonsäure führen. So ist Pyridiniumdichromat (PDC) in DMF für die milde Oxidation von primären, nicht allylischen Alkoholen direkt zur Carbonäure geeignet[84]. Die Reaktion mit diesem Reagenz führte allerdings nicht zur Umsetzung des des Diols **74**, während die Versuche mit dem reaktiveren Chromatreagenz Pyridiniumchlorochromat (PCC) die

[82] siehe Experimenteller Teil.

[83] W.J.Mijs, C.R.H I.DeJonge, Organic Syntheses by oxidation with metal compounds, *Plenum Press London*, **1986**, 41-108.

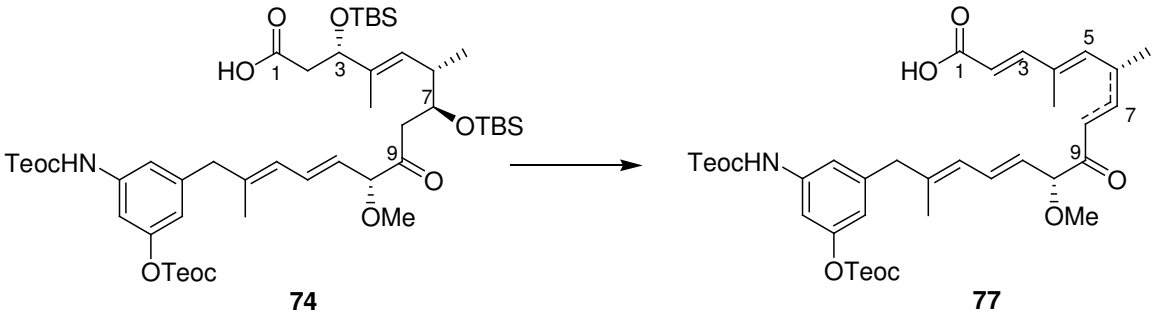
[84] E.J.Corey, G.Schmidt, *Tet.Lett*., **1979**, *5*, 399-402.

Zersetzung des Substrats herbeiführten. Mit der Anwendung des JONES-Reagenzes[85] wurde schließlich die Oxidation erfolgreich realisiert (Schema 41).



Schema 41. JONES-Oxidation des Diols **74** zur Ketosäure **76**. a) JONES-Reagenz, Aceton, 0°C → RT, 10 – 30 min, **40 – 60%**.

Es konnten Ausbeuten zwischen 40 und 60 % erreicht werden. Die langsame Zugabe des Reagenzes war hierbei wichtig. Der Reaktionsverlauf musste akribisch kontrolliert und nach erfolgtem Umsatz sofort abgebrochen werden, da ansonsten schnelle Zersetzung eintrat. Durch massenspektrometrische Reaktionkontrolle konnte die Eliminierung der Silylether an C3 und/oder C7 als erste Zersetzungsreaktion ermittelt werden (Schema 42).



Schema 42. JONES-Oxidation des Diols **74** führt zur teilweisen Zersetzung des Produkts, die mit der Elimnierung der Silylether an C3 und C7 zu **77** beginnt.

Diese Eliminierungen sind sichtlich stark begünstigt, da die Produkte über 8-14 C-Atome konjugierte π-Systeme besitzen. Die Eliminierungsprodukte waren praktisch, mehr oder weniger, in jeder durchgeführten Oxidation mit HECK-Kupplungsprodukt **74** zu finden, insbesondere bei sauren oder basischen Reaktionsbedingungen. Dieses Phänomen

[85] K.Bowden, I.M.Heilbron, E.R.H.Jones, B.C.L.Weedon, *J.Chem.*Soc., **1946**, 39.

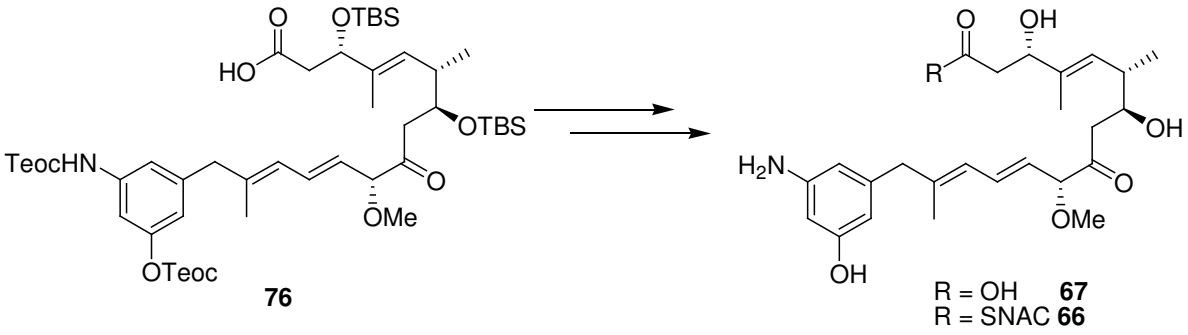
demonstriert nachweislich die Labilität der offenkettigen Proansamitocinderivate und die angesichts dessen sehr schwierige Handhabung der Substrate.

Die Ausbeuten der JONES-Oxidation waren zwar nur mäßig, dafür war Ketosäure **76** in einer Stufe zugänglich. Somit bedeutete die Nutzung dieser Methode einen zeitlichen Vorteil gegenüber der Sequenz LEY-GRIFFITH-Oxidation bzw. SWERN-Oxidation mit anschließender PINNICK-Oxidation, der insgesamt zur selben Ausbeute führte (Tabelle 5).

Tabelle 5. Vergleich der unterschiedlichen genutzten Oxidationsmethoden bezüglich Ausbeute und zeitlichem Aufwand.

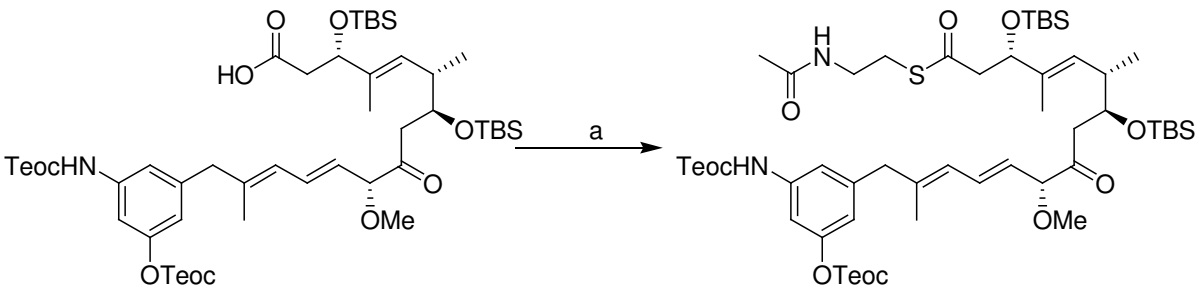
Oxidationsmethode	Produkt	Bedingungen	Ausbeute	Bemerkung
SWERN	Ketoaldehyd **75b**	-60 °C, 6 h	0 – 75 %	Nicht reproduzierbar
LEY-GRIFFITH	Ketoaldehyd **75b**	RT, 2 h	58 %	2 Stufen
PINNICK	Carbonsäure **76**	0 °C, 30 min	0 – 86 %	Nicht reproduzierbar
JONES	Carbonsäure **76**	0 °C, 20 min	40 – 60 %	--

Nach zahlreichen erfolgten Optimierungsarbeiten konnte Carbonsäure **76** in ausreichender Menge für die folgenden Stufen bereitgestellt werden, die auf der einen Seite die Veresterung zum *N-Acetylcysteamin-Thioester* mit anschließenden Entschützungen und auf der anderen Seite die Entschützungen zum *seco-Proansamitocin* beinhalteten (Schema 43).



Schema 43. Endspiel zu *seco-Proansamitocin* als freie Carbonsäure **67** und als SNAC-Ester **66**.

Die Veresterung mit *N-Acetylcysteamin* zum Thioester **78** erfolgte mit der Reagenzkombination DIC/DMAP in Dichlormethan bei Raumtemperatur in moderaten Ausbeuten von 48 % (Schema 44). Die in der Literatur verwendete Reagenzkombination DCC/DMAP führte dabei zu einer Verschlechterung der Ausbeuten.[78]

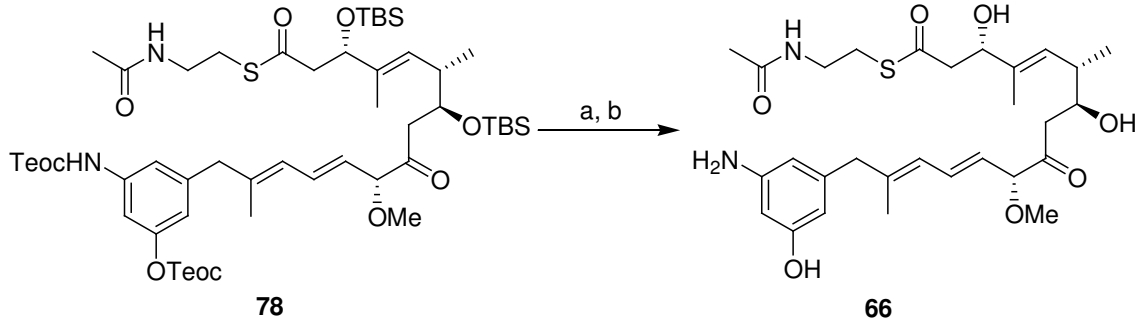


76 **78**

Schema 44. Veresterung von Carbonsäure **76** zum SNAC-Ester **78**. a) HSNAC, DIC, DMAP, CH_2Cl_2, 0°C → RT, **48 %**.

Unter diesen Reaktionsbedingungen erfolgte die Zersetzung des Produkts bevor vollständiger Umsatz erreicht war. Deshalb wurden die Reagenzien bei einer Temperatur von 0 °C zugegeben, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion nach 1.5 Stunden abgebrochen. Das verbleibende Edukt (10 – 30 %) konnte reisoliert werden. Das Phänomen der Produktzerstörung durch oben beschriebene Eliminierungen konnte auch bei den nachfolgenden Entschützungen beobachtet werden.

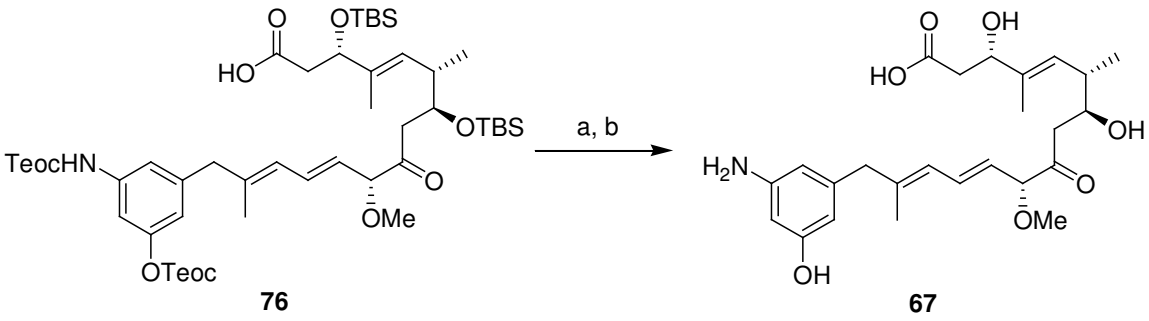
Der erste Schritt auf dem Weg zu „freiem“ *seco-Proansamitocin-N-acetylcysteaminthioester* **66** war die Silylletherspaltung mittels HF in Pyridin (Schema 45). Diese verlief innerhalb von 9 Stunden bei Raumtemperatur und zeigte bereits nach dieser Zeit starke Zersetzungserscheinungen. Trotzdem konnte das gewünschte Produkt **79** nach Reinigung mittels HPLC in 49 % Ausbeute isoliert werden. Als Nebenprodukte wurden beide Varianten der einfach „Teoc-geschützten“ Substanz isoliert: 1.) mit der Teoc-Gruppe am Anilin-Stickstoff, 2.) mit der Teoc-Gruppe an der phenolischen OH-Gruppe. Diese wurden ebenfalls in der nächsten Entschützung eingesetzt.



78 **66**

Schema 45. Entschützung der Hydroxy- und Aminogruppen von *seco-Proansamitocin-N-acetylcysteaminthioester* **66**. a) HF/Pyridin, THF, 0°C → RT, 9h, **49% 79**; b) $ZnCl_2$, CH_3NO_2, Ultraschall, RT, **47%**.

Die finale Spaltung des Carbonats bzw. des Carbamats gelang wie beschrieben,[78] so dass anschließend an der Entschützung von Carbonsäure **76** zum „freien“ *seco-Proansamitocin* **67** gearbeitet wurde. Bei dieser Reaktion musste akribisch auf die Reaktionsführung geachtet werden, da bereits bei geringfügigen Abweichungen von Temperatur (Schwankungen der Raumtemperatur) oder Konzentration starke Zersetzung auftrat. Die erste Entschützung zum Diol musste nach spätestens 6 Stunden bei Raumtemperatur abgebrochen werden. Obwohl noch deutliche Mengen Edukt vorhanden waren, traten erste Zersetzungserscheinungen auf, was sich in einer Verfärbung der Lösung von farblos über gelb zu braun äußerte, und dünnschichtchromatographisch verfolgt werden konnte. Deshalb wurde das Reaktionsgemisch nach wässriger Aufarbeitung direkt mittels HPLC getrennt, das entstandene Produkt isoliert und reisoliertes Edukt sowie auch monosilylgeschütztes Diol wieder in einer weiteren Reaktion eingesetzt. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur konnte Carbonsäure **80** in einer Gesamtausbeute von 48 % erhalten werden (Schema 46).



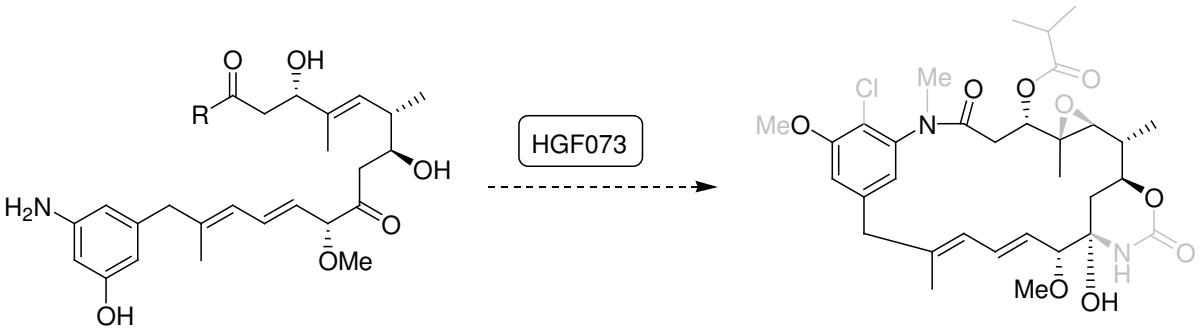
76 **67**

Schema 46. Entschützung der Hydroxy- und Aminogruppen von *seco-Proansamitocin* **67**. a) HF/Pyridin, THF, 0°C → RT, **48% 80**; b) $ZnCl_2$, CH_3NO_2, Ultraschall, RT, **47%**.

Auch bei der Lewis-sauren Entschützung der Teoc-Gruppen musste der Reaktionsverslauf sehr genau kontrolliert werden, da hier ebenfalls die Gefahr der Eliminierung des Alkohols an C3- und/oder an C7-Position bestand. Schließlich konnte aber auch diese Reaktion in einer Ausbeute von 47 % realisiert werden.

Insgesamt sind alle Stufen nach den Oxidationsreaktionen sehr schwierig zu handhaben, da die oben beschriebenen Eliminierungsreaktionen eintreten können, die letztendlich zur kompletten Zersetzung der Substrate führen. Die Stabilität des Moleküls stieg nach der Veresterung zum SNAC-Ester **78**, die freie Carbonsäure **76** war hingegen auf jeder Stufe extrem labil.

Nach zahllosen Optimierungsreaktionen und einem erheblichen Arbeitsaufwand um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu garantieren, war es möglich, von beiden Substraten ausreichende Mengen für die Verfütterungsexperimente an die *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073 bereitzustellen (Schema 47).



Schema 47. Mutasynthetische Nutzung von *seco-Proansamitocin-N-acetylcysteaminthioester* **66** und *seco-Proansamitocin* **67** (die gewünschten chemoenzymatisch aufzubauenden Molekülteile sind in grau eingezeichnet).

3.4.3 Verfütterungsexperimente mit *seco*-Proansamitocinen

Die Verfütterungsexperimente mit den *seco*-Proansamitocinen **66** und **67** wurden im 50 mL-Maßstab durchgeführt. Eine Blind-Kultur[86] und eine *AHBA*-Zufütterung wurden zur Kontrolle des Stamms parallel durchgeführt. Die beiden *seco-Proansamitocine* **66** und **67** wurden jeweils in 1 mL sterilisiertem DMSO gelöst und sequentiell nach 48, 72 und 96 Stunden den Kulturen zugeführt. Diese Zufütterung erfolgte protionsweise, da ein hohes Risiko bestand, dass sich die Substrate in der warmen DMSO-Lösung bereits nach kurzer Zeit zersetzen. Nach einer Fermentationszeit von weiteren 5 Tagen wurden die Kulturen mit Essigsäureethylester extrahiert.

Die Rohextrakte wurden direkt über die mit *Ansamitocin-P3* **12** kalibrierte HPLC-Anlage getrennt (Abbildung 20).[87]

[86] mit HGF073 inokuliert; keine Supplemation von *AHBA* oder –Derivat.

[87] im Anhang sind die Chromatogramme für die Kalibration mit Ansamitocin P3 dargestellt.

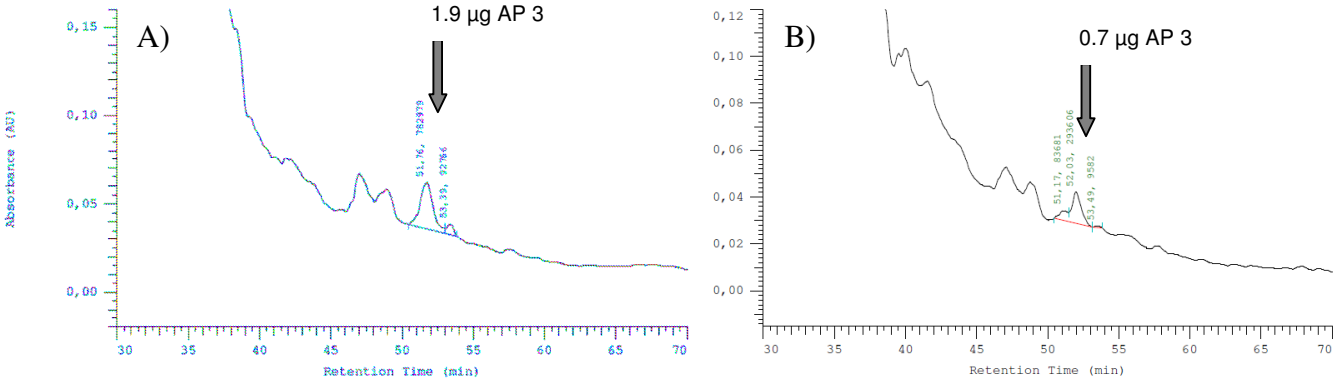


Abbildung 20. HPLC der Verfütterungsexperimente mit A) *seco-Proansamitocin-N-acetyl-cysteaminthioester* **66** und B) *seco-Proansamitocin* **67.**

Dadurch wurden erste Hinweise auf die *Ansamitocin-P3* Produktion erhalten, da zur bekannten Retentionszeit (52 min) ein Peak mit übereinstimmendem UV-Spektrum in beiden Extrakten der Verfütterungsexperimente detektiert wurde (Abbildungen 19 und 20), welcher in der Blindprobe nicht nachgewiesen werden konnte. Die UV-Absorptionen wurden zur Quantifizierung genutzt, nachdem in den entsprechenden Fraktionen mittels HRMS-ESI- und MS/MS-Experimenten eindeutig *Ansamitocin-P3* **12** nachgewiesen[88] wurde.

Damit wurde eine *Ansamitocin-P3*-Produktion von 38 µg/L in einer Ausbeute von 0.2 % für die Verfütterung von *seco-Proansamitocin-N-acetylcysteaminthioester* **66** und von 14 µg/L in einer Ausbeute von 0.13 % für die Verfütterung von *seco-Proansamitocin* **67** bestimmt.

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahmen, dass kein Unterschied in der Aufnahme durch den Organismus zwischen der Supplemation der freien Säuren und der Thioester besteht, da eine Aktivierung als Adenylat, wie für die Aufnahme von *AHBA* für Rifamycin beschrieben, stattfindet.[89] Ob das Adenylat vor der Aufnahme durch die Acyltransferase noch mittels CoA thioverestert wird oder direkt auf das Modul aufgeladen wird, bleibt damit aber unbeantwortet.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Acyltransferasen der modularen TypI PKS auch höchst komplexe Substrate erkennt und in den Biosyntheseweg einbaut. Weitere Arbeiten sollten sich mit der Modifizierung von Biosyntheseintermediaten beschäftigen, um herauszufinden welche Erkennungsmuster essentiell sind, um in die Biosynthese aufgenommen zu werden.

---

[88] im Anhang sind die MS/MS-Spektren der beiden Proansamitocin-Verfütterungen dargestellt.

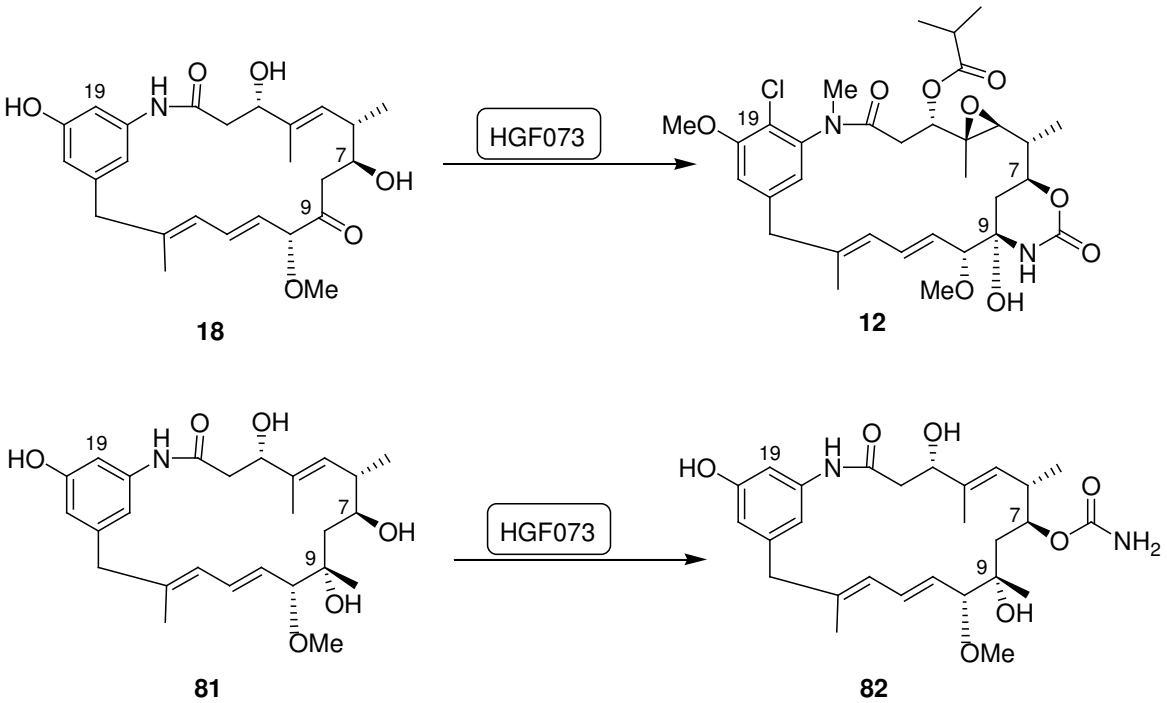
[89] S.J.Admiraal, C.T.Walsh, C.Khosla, *Biochem.*, **2001**, *40*, 6116-6123.

3.5 PROANSAMITOCIN-DERIVATE

3.5.1 Mutasynthese mit synthetisch modifizierten Proansamitocinen

Nach der erfolgreichen Annahme natürlicher weit fortgeschrittener Biosyntheseintermediate stellte sich nun die Frage nach der möglichen Akzeptanz hochentwickelter, bereits modifizierter Derivate. Für erste Versuche bot sich eine Variation des natürlichen Proansamitocins an, da dieses mutasynthetisch im großen Maßstab gewonnen werden konnte.[90]

FLORIAN TAFT konnte zeigen, dass in C9-Position methyliertes *Proansamitocin* **81** bei Zufütterung zu *A. pretiosum* Stamm HGF073 selektiv in C-OH-7-Position carbamoyliert wird.[91] Diese einzige durchgeführte post-PKS- Transformation steht in deutlichem Gegensatz zu den diversen Ablaufenden bei Zufütterung des natürlichen Vorläufers *Proansamitocin* **18** (Schema 48).



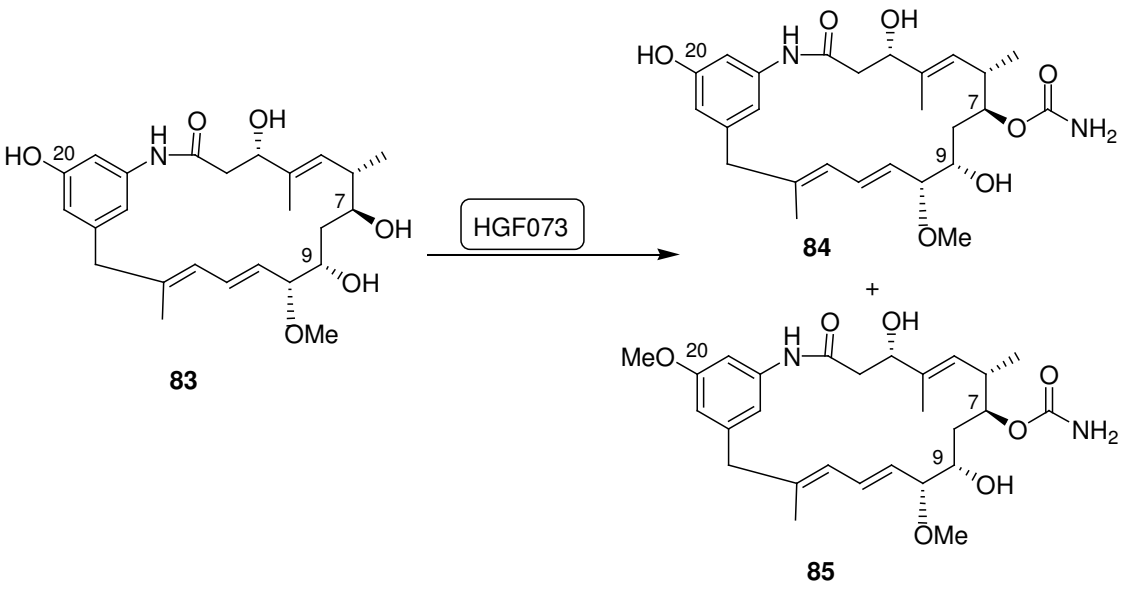
Schema 48. Bekannte Mutasynthesen mit natürlichem (**18**) und an C9-Position methyliertem *Proansamitocin* (**81**)**.**

[90] *Knockout*-Mutante, blockiert in der Carbamoyltransferase und in der Halogenase, P.Spiteller, L.Bai, G.Shang, B.J.Carrol, T.W.Yu, H.G.Floss, *J.Am.Chem.Soc*., **2003**, *125*, 14236-14237.

[91] Florian Taft, **2009**, unveröffentlichte Ergebnisse.

Ein weiteres interessantes Derivat für die Mutasynthese stellt das in C9-Position reduzierte *Proansamitocin* **83** dar. Dieses konnte von SIMONE EICHNER durch Reduktion mittels $LiBH_4$ dargestellt werden.[92]

Die Zufütterung an HGF073 erfolgte kontinuierlich über 4 Tage und resultierte in einer 1:1-Mischung aus carbamoyliertem Proansamitocin **84** und carbamoyliertem und 20-*O*-methyliertem *Proansamitocin* **85** (Schema 49).



Schema 49. Mutasynthese mit *9-Hydroxy-Proansamitocin* **83.**

Diese Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist unnatürliche Derivate der Biosynthesemaschinerie zuzuführen, die Existenz des zyklischen Carbamats aber essentiell für die weiteren post-PKS-Transformationen zu sein scheint. Um *Proansamitocin*-Varianten in die biologisch aktiven *Ansamitocin*-Analoga zu überführen, sollten dementsprechend unnatürliche Derivate die Keto-Gruppe in C9-Position aufweisen.

Damit war jetzt der Weg für die Verfütterung synthetisch produzierter *Proansamitocin*-Derivate geebnet. Diese Kombination aus klassischer Synthese und Mutasynthese öffnet vielversprechende neue Wege zur Funktionalisierung in nichtaromatischen Positionen, die semisynthetisch an *Ansamitocin P3* **12** nicht, oder nur mit sehr großem Aufwand, zugänglich wären.

[92] Simone Eichner, **2009**, unveröffentlichte Ergebnisse.

Aus dieser Motivation heraus wurden retrosynthetische Überlegungen bezüglich in Position C14 modifizierter Proansamitocinderivate angestellt (Abbildung 21).

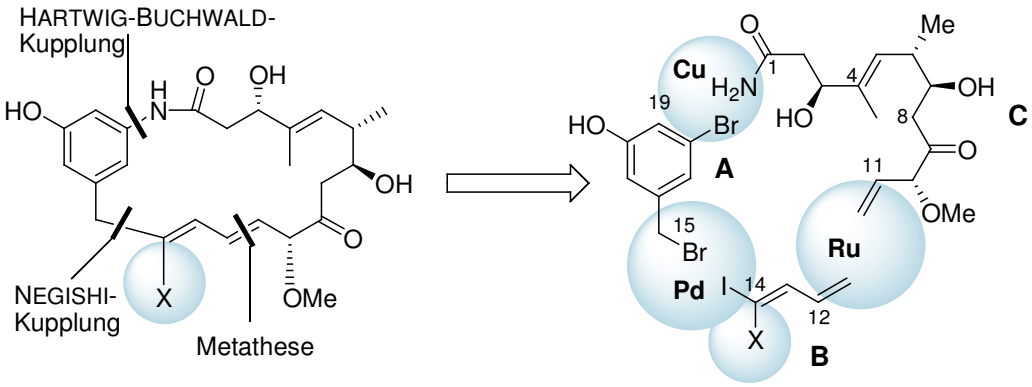


Abbildung 21. Retrosynthetische Schnitte für die Synthese von modifizierten Proansamitocinen.

Die Position am Diensystem wurde für die Veränderungen gewählt, da dieser Teil des Moleküls keine Rolle für die biologische Aktivität spielt[93].

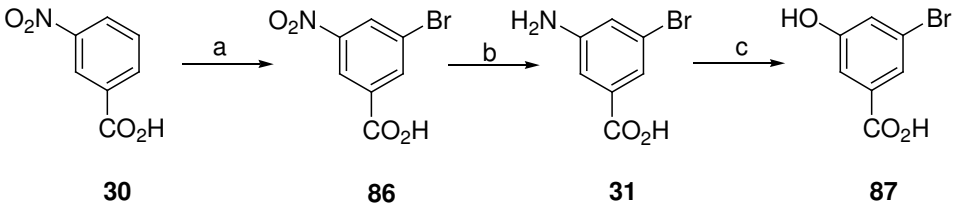
Der Schnitt zwischen C14 und C15 sollte mittels einer regioselektiven NEGISHI-Kupplung[94] realisiert werden. Die Kupplung zwischen C11 und C12 sollte mittels Ringschluss- bzw. Kreuzmetathese bewerkstelligt werden. Für die Knüpfung an den aromatischen Teil war eine HARTWIG-BUCHWALD-Reaktion zwischen einem Alkyl-Amid und einem Bromid in phenylischer Position entweder in gekreuzter oder Ringschlussform vorgesehen. Es wurde mit der Synthese des aromatischen Systems **A** begonnen.

[93] Siehe Abschnitt 1.3.3.

[94] E.-I.Negishi, *Acc. Chem. Res.,* **1982**, *15*, 340-348; J.Zhou, G.C.Fu, *J.Am.Chem.Soc*., **2003**, *125*, 12527-12530.

3.5.2 Synthese des aromatischen Teils

3-Brom-5-hydroxybenzoesäure **87** wurde in 3 Stufen und einer Ausbeute von 52 % aus käuflicher *3-Nitrobenzoesäure* **30** synthetisiert (Schema 50).

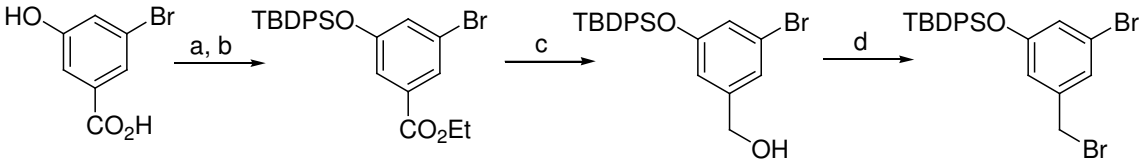


30 **86** **31** **87**

Schema 50 Darstellung von *3-Brom-5-hydroxybenzoesäure* **87**. a) H_2SO_4, Br_2, $AgSO_4$, 110°C, 4h, **87%**; b) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOAc, Rf, 30 min, **83%**; c) $NaNO_2$, H_2SO_4, 110°C, 20 min, **72%**.

Dafür wurde ausgehend von *3-Nitrobenzoesäure* **30** in *meta*-Position bromiert, nach Reduktion der Nitrogruppe das entstandene Anilinderivat **31** diazotiert und durch Hydrolyse in *3-Brom-5-hydroxybenzoesäure* **87** überführt.[95]

Nach Veresterung der freien Säure **87** erfolgte die Schützung der phenolischen OH-Gruppe als Silylether und Reduktion des Esters **88** zum Benzylalkohol **89**. Dieser wurde mittels APPEL-Reaktion in Benzylbromid **90** überführt.[96]



87 **88** **89** **90**

Schema 51. Darstellung von Benzylbromid **90**. a) EtOH, H_2SO_4, Rf, 4h, **96 %**; b) TBDPSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2, RT, **95%**; c) $LiAlH_4$, Et_2O, Rf, 1h, **93%**; d) Br_2, PPh_3, Imidazol, 0 °C, 1h, **95 %**.

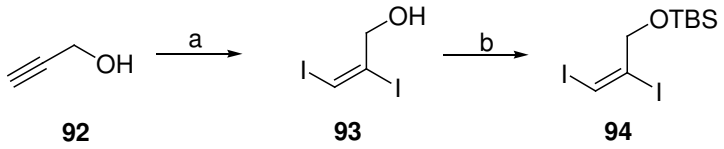
[95] F.G.Baddar, J.A.Fahim, M.A.Galaby, *J.Chem.Soc.* Part.2;; **1955,** 465-471.

[96] R.Appel, *Angew.Chem.*, **1975**, *87*, 863-874.

3-Brom-5-^{t}butyldiphenylsilyloxybenzylbromid **90** konnte über 7 Stufen in einer Gesamtausbeute von 42 % synthetisiert werden. Damit stand das aromatische System **A** bereit und die Tests für NEGISHI- und HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung konnten beginnen.

3.5.3 NEGISHI-Kupplung zur Knüpfung des Diensystems B an den Aromaten A

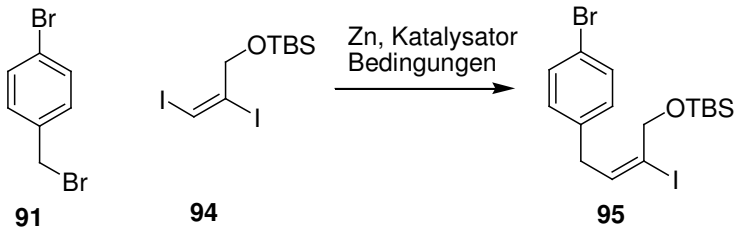
Für die NEGISHI-Kupplung des Diensystems an die benzylische Position bestand die Herausforderung dieses in Gegenwart eines phenylischen Bromids zu bewerkstelligen. Da eine ähnliche selektive Kupplung von Shair *et al.*[97] beschrieben war, sollten diese Bedingungen auf das vorliegende System übertragen werden.
Um die Durchführung der NEGISHI-Kupplung eines Benzylbromids in Gegenwart eines Bromids in Phenylstellung zu überprüfen, wurden Testreaktionen mit kommerziell erhältlichem *4-Brombenzylbromid* **91** und in zwei Stufen aus *Propargylalkohol* **92** zugänglichem Diodid **94** durchgeführt (Schema 52).



92 **93** **94**

Schema 52. Darstellung von Vinyldiiodid **94**. a) Al_2O_3, I_2, Petrolether, Rf, 4h, **quant**.; b) TBSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2, RT, 8h, **98%**.

Die ersten Tests wurden mit für NEGISHI-Kupplungen beschriebenen[98] Standardbedingungen und verschiedenen Katalysatoren durchgeführt (Schema 53 und Tabelle 6).



91 **94** **95**

Schema 53. Testreaktion für die NEGISHI-Kupplung.

---

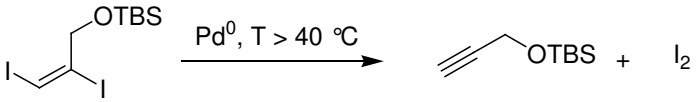
[97] M.E.Layton, C.A.Morales, M.D.Shair, *J.Am.Chem.Soc.*, **2002**, *124*, 773-775.

[98] J.Zhou, G.C.Fu, *J.Am.Chem.Soc.*, **2003**, *125*, 12527-12530.

Tabelle 6. Getestete Bedingungen für die NEGISHI-Kupplung von **91** mit **94**.

Eintrag	Lösemittel	Katalysator	Bedingungen	Ausbeute
1	THF	$Pd(PPh_3)_4$	0 °C, 20 h	0 %
2	THF	$Pd(PPh_3)_4$	0 - 40 °C, 9 h	0 %
3	THF	Pd_2dba_3	0 - 40 °C, 9 h	13 %
4	THF	Pd_2dba_3	60 °C, 2 h	0%
5	THF	PEPPSI-IPr	0 °C → RT, 2 h	62 %
6	THF/NMP (2:1)	PEPPSI-IPr	0 °C → RT, 2 h	94 %

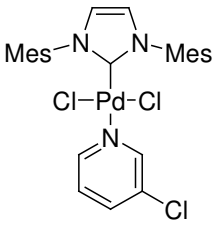
Die Reaktionen mit $Pd(PPh_3)_4$ (Eintrag 1 und 2) führten nicht zur Bildung des Produkts. Das Vinyliodid **94** lag unverändert in der Reaktionslösung vor. Bei Versuchen mit Pd_2dba_3 (Eintrag 3) konnte geringfügige Produktbildung beobachtet werden, die Erhöhung der Temperatur auf über 40°C (Eintrag 4) führten nicht zur Erhöhung der Ausbeute, sondern waren für diese Reaktionen ungeeignet, da dieses die Eliminierung von Iod aus Diiodid **94** zur Folge hatte. Dabei konnte die Bildung von TBS-geschütztem Propargylalkohol **96** beobachtet werden (Schema 54).



94 **96**

Schema 54. Eliminierung von Iod aus Diiodid **94.**

Die besten Ergebnisse für die NEGISHI-Kupplung wurden mit dem PEPPSI-IPr-Katalysator[99] **97** (Abbildung 22) in THF/NMP (2:1) bei Raumtemperatur erzielt (Eintrag 6, Tabelle 6).



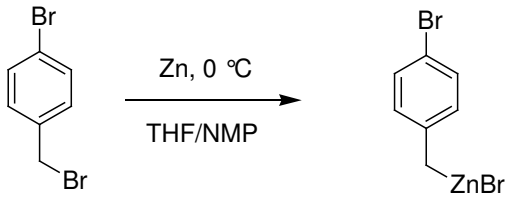
97

Abbildung 22. PEPPSI®.[99]

[99] PEPPSI=pyridine-enhanced precatalyst preparation, stabilization and initiation; Ipr=Diisopropylphenylimidazolium

Der PEPPSI-IPr-Katalysator ist sehr einfach zu synthetisieren[100] und mittlerweile kommerziell erhältlich. Er ist hochaktiv und katalysiert Reaktionen deshalb oft bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als andere Systeme[101]. Ein weiterer Vorteil des Katalysators ist die hohe Stabilität gegenüber Luft und Feuchtigkeit. Zudem ist eine Zugabe von Liganden zur Reaktion nicht notwendig.

Die Erzeugung der Benzyl-Zinkspezies musste bei erniedrigten Temperaturen (0°C) erfolgen, um die Insertion des Zinks in die phenylische C-Br-Bindung zu verhindern (Schema 55). Die Insertion konnte per gaschromatographischer Reaktionsanalyse verfolgt werden.



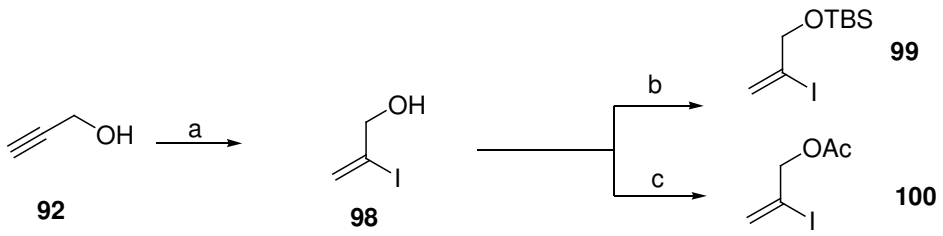
91 **91a**

Schema 55. Regioselektive Insertion des Zinks in benzylischer Position.

Die Kupplung von Diiodid **94** erfolgte erwartungsgemäß regioselektiv an der sterisch freieren Position. Unter den optimierten Bedingungen (Eintrag 6, Tabelle 6) konnte die Ausbeute von Diiodid **95** auf 94 % gesteigert werden, was hinsichtlich der möglichen vier Regioisomere beachtlich ist.
Um die NEGISHI-Kupplung nun mit einem sterisch gehinderten Vinyliodid, das dem später zu verwendenen System **B** strukturell ähnlicher ist zu testen, wurden die Testsubstrate **99** und **100** aus *Propargylalkohol* **92** synthetisiert (Schema 56).

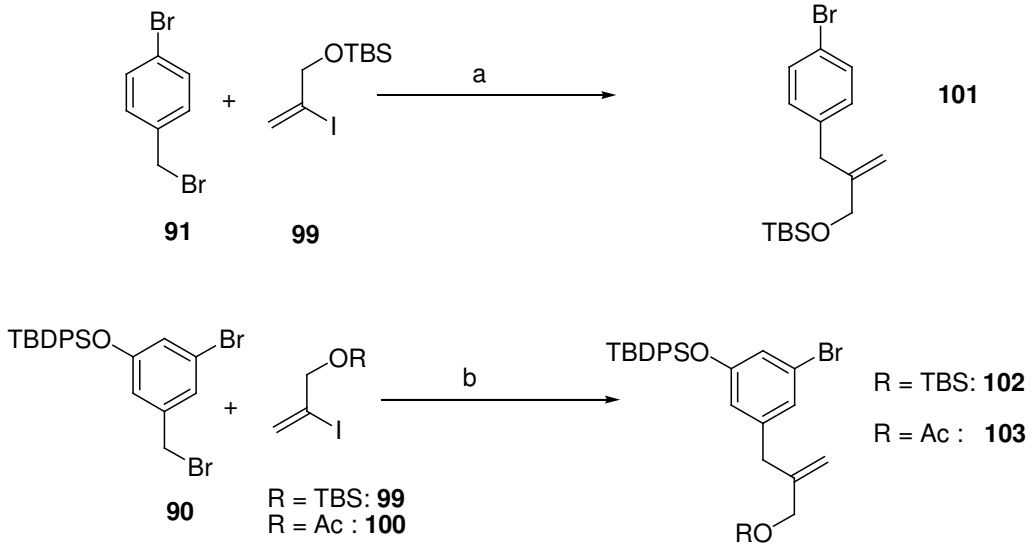
[100] E.A.B.Kantchev, C.J.O'Brien, M.G.Organ, *Angew.Chem.*, **2007**, *119*, 2824-2870.

[101] M.G.Organ, S.Avola, I.Dubovyk, N.Hadei, E.A.B.Kantchev, C.J.O'Brien, G.Valente, *Chem.Eur.J.*, **2006**, *12*, 4749–4755.



Schema 56. Darstellung von Vinyldiiodiden **99** und **100**. a) TMSCl, NaI, H_2O, CH_3CN, RT, 1h, **58%**; b) TBSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2, RT, 12h, **82%**; c) Ac_2O, Pyridin, RT, 5h, **98%**.

Diese Reaktionen wurden nach erfolgreicher Kupplung von *2-Iod-2-propenol-^{t}butyldimethyl-silylether* **99** an *4-Brombenzylbromid* **91** in 62%iger Ausbeute mit dem aromatischen Baustein **90** durchgeführt (Schema 57).



Schema 57. Negishi-Kupplungen mit Vinyliodiden **99** und **100.** a) i. Zn, NMP/THF (2:1), $(CH_2)Br_2$, **91**, 0°C, 45 min; ii. **99**, PEPPSI-Ipr **97**, THF/NMP (2:1), Zinkorganyl aus i, RT, 2 h, **62%**; b) i. Zn, NMP, I_2, **90**, 60°C, 60 min; ii. Vinyliodid, PEPPSI-Ipr **97**, THF/NMP (2:1), 60°C, 2h, **78%** für **99** und **83 %** für **100**.

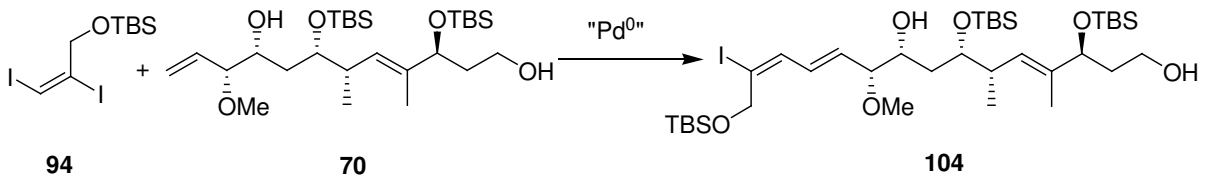
Nach einigen Experimenten zur Optimierung konnten Ausbeuten von 83 % erreicht werden. Dafür waren höhere Reaktionstemperaturen notwendig. Die Insertion des Zinks erfolgte mit Benzylbromid **90**, aufgrund der geringeren Elektronendichte des aromatischen Systems, erst nach einer Stunde bei 60 °C, da die Benzylstellung nicht so stark aktiviert ist wie im *para-Brombenzylbromid* **91**. In diesem Fall wurde die Aktivierung des Zinks mit Iod in reinem

NMP durchgeführt. Entscheidend war auch die Zugabe von Vinyliodid und Katalysator, gelöst in einer THF/NMP-Mischung, zur Zinkorganyllösung. Das Vorliegen von elementarem Zink schien für die Reaktion von wesentlicher Bedeutung zu sein, denn bei umgekehrter Zugabe, so wie in den vorangegangenen Versuchen beschrieben, wurden wesentlich geringere Ausbeuten erreicht (< 30 %).

Da die *Palladium*-katalysierte Kupplung der sterisch gehinderten Vinyliodide **99** und **100** an den Aromaten **90** mit guten Ausbeuten verlief, sollte die Ansa-Kette **70** entsprechend verlängert und anschließend an den Aromaten geknüpft werden. Dafür sollte eine HECK-Kupplung[102] genutzt werden, da aus der *seco-Proansamitocin*-Synthese[103] bekannt war, dass HECK-Kupplungen mit Ansa-Kette **70** grundsätzlich möglich sind.

3.5.4 Versuche zur Heck-Kupplung mit Diiodid 94

Die Tests zur NEGISHI-Reaktion mit Diiodid **94** und *p-Brombenzylbromid* **91** verliefen chemoselektiv unter Kupplung des sterisch freien Iodids (Schema 53). Deshalb bestand die Hoffnung, diese Selektivität auch in einer HECK-Kupplung mit der *Proansamitocin*-Seitenkette **70** zu erhalten (Schema 58).



94 **70** **104**

Schema 58. Geplante HECK-Kupplung von Diiodid **94** und Proansamitocin-Seitenkette **70**.

Als Imitat für die *Proansamitocin*-Seitenkette **70** wurde Testsystem **108** aus Alkohol **105**[104] durch Oxidation und anschließende BROWN-Allylierung[105] dargestellt, die auch für die Synthese von Ansa-Kette **70** beschrieben ist[78] (Schema 59).

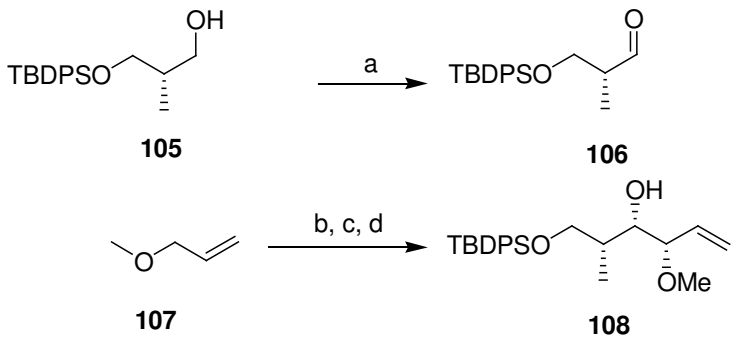
---

[102] C.Amatore, A.Jutland, *Acc.Chem.Res.*, **2000**, *33*, 314-321.

[103] siehe Abschnitt 3.4.2.

[104] erhalten aus (*R*)-Roche-Ester = (R)-3-Hydroxy-2-methylpropansäuremethylester wie in Ref. 78 beschrieben.

[105] H.C.Brown, P.K.Jadhav, K.S.Bhat, *J.Am.Chem.Soc.*, **1988**, *110*, 1535-1538; U.S.Racherla, H.C.Brown, *J.Org.Chem.*, **1991**, *56*, 401-404.



Schema 59. Darstellung von Testbaustein **108**. a) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, 0 °C, 1h, **quant**.; b) ^{s}BuLi, THF, -78°C, 10 min, (-)-$(ipc)_2$BOMe, THF, -78°C, 1h, BF_3xOEt_2, **106**, -78°C, 3h, **64%**.

Die Diastereoselektivität wird durch die Verwendung von (-)-$(ipc)_2$BOMe als chiralem Auxiliar eingebracht. Der Übergangszustand sollte nach BROWN[106] und dem CRAM-Modell wie in Abbildung 23 gezeigt aussehen, und das FELKIN-ANH-Produkt ergeben.[107]

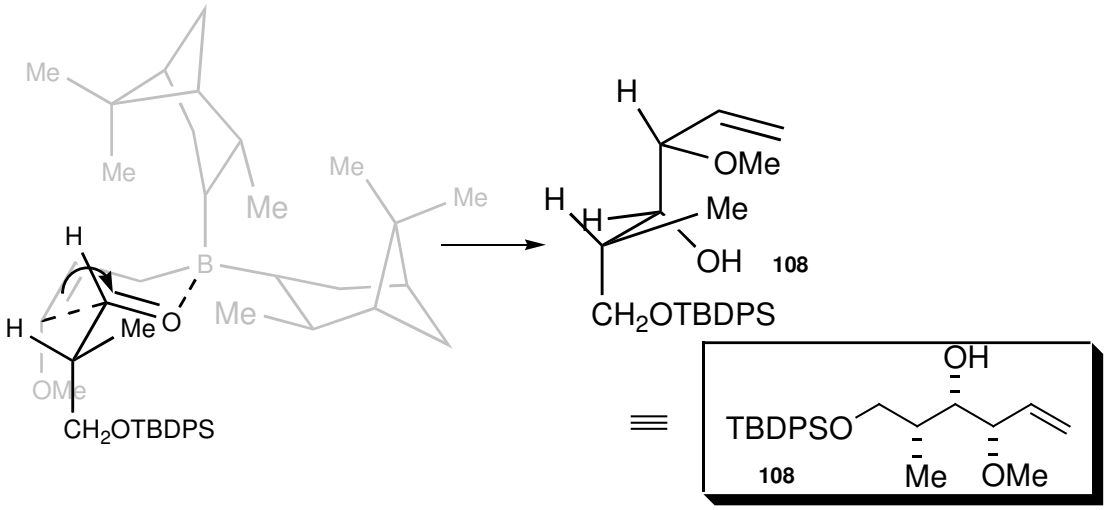


Abbildung 23. Wahrscheinlicher Übergangszustand für die BROWN-Allylierung von Aldehyd **106**.

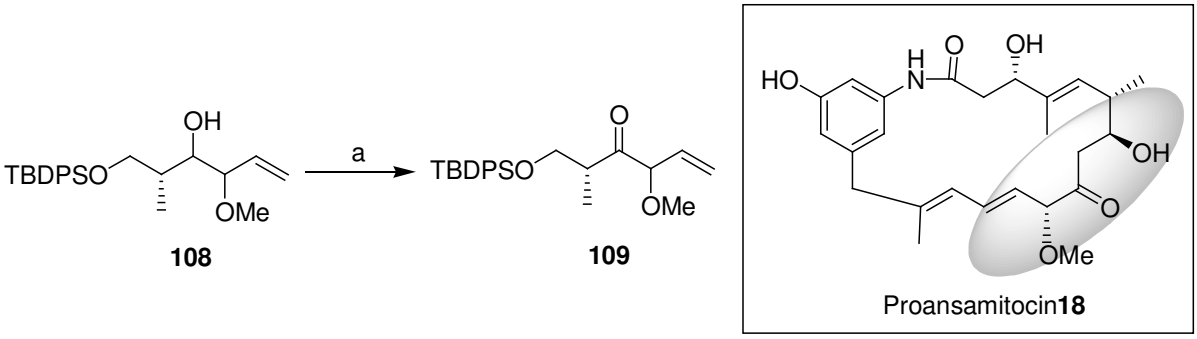
Die Stereochemie von Homoallylalkohol **108** wurde nicht bestimmt, da sie für die Tests der HECK-Reaktion nicht von Bedeutung war. Deshalb sind die Stereozentren im Folgenden nicht mehr angegeben.

---

[106] H.C.Brown, P.K.Jadhav, *J.Org.Chem.*, **1984**, *49*, 4091-4092.

[107] A.Mengel, O.Reiser, *Chem.Rev.,* **1999,** *99,* 1191-1223.

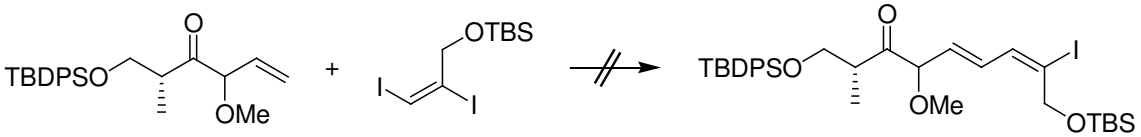
In die anschließende HECK-Kupplung wurde Triol **108** eingesetzt und der zum Keton oxidierte Testbaustein **109**, da dieser das Substitutionsmuster im *Proansamitocin* **18** widerspiegelt (Schema 60).



108 **109**

Schema 60. Oxidation von Alkohol **108** zu Keton **109**. a) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, 0°C, 1h, **69%**.

Die HECK-Kupplungen mit Diiodid **94** führten nicht zum gewünschten Erfolg. In allen getesteten Systemen konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Die erprobten Bedingungen sind in Tabelle 7 und 8 zusammengefasst.



109 **94**

Tabelle 7. HECK-Kupplungs-Tests mit Keton **109**.

Eintrag	Reagenzien	Bedingungen	Lösemittel	Ergebnis
1	0.1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3, Cs_2CO_3	RT, 40 °C	THF/NMP (2:1)	keine Reaktion
2	1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3, Cs_2CO_3	RT	DMF	keine Reaktion
3	1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3, Cs_2CO_3	40 - 60 °C	DMF	Zersetzung
4	0.1 Äq. PEPPSI-IPr, Cs_2CO_3	RT, 40 °C	THF	DB-Isomerisierung

Keton **109** konnte unter den getesteten Bedingungen nicht mit Diiodid **94** gekuppelt werden. Die bekannten HECK-Bedingungen aus der *seco-Proansamitocin*-Synthese[108] (Eintrag 2) waren nicht geeignet, um die oxidative Addition an Diiodid **94** zu realisieren. Höhere Temperaturen (Eintrag 3) führten zur Zersetzung von Keton **109**. Bei Verwendung des

[108] siehe Kapitel 3.4.2.

PEPPSI-IPr-Katalysators **97** und Heizen auf 40 °C (Eintrag 4) trat eine Isomerisierung der Doppelbindung in Edukt **109** auf, die zum α,β-ungesättigten Keton **110** führte (Abbildung 24).

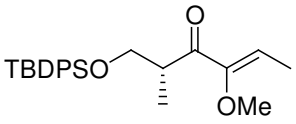
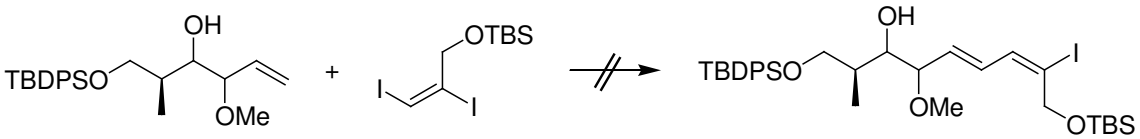


Abbildung 24. Aus Eintrag **4** (Tabelle 7) isoliertes umgelagertes Edukt **110**.

Die Bildung des α,β-ungesättigten Systems konnte unschwer NMR-spektroskopisch erkannt werden, da die Signale der Protonen der terminalen Doppelbindung im ^{1}H-Spektrum verschwunden waren und sich ein neues Quartett im olefinischen Bereich befand. Die Methylgruppe tauchte als neues Dublett bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 1.8$ ppm auf.

Die Isomerisierung der terminalen Doppelbindung mittels Palladium-Katalyse ist aufgrund der Möglichkeit zur Ausbildung eines Allyl-Palladiumkomplexes und des entstehenden begünstigten α,β-ungesättigten Systems nicht überraschend, so dass alle weiteren Versuche mit Fragment **108** durchgeführt wurden.



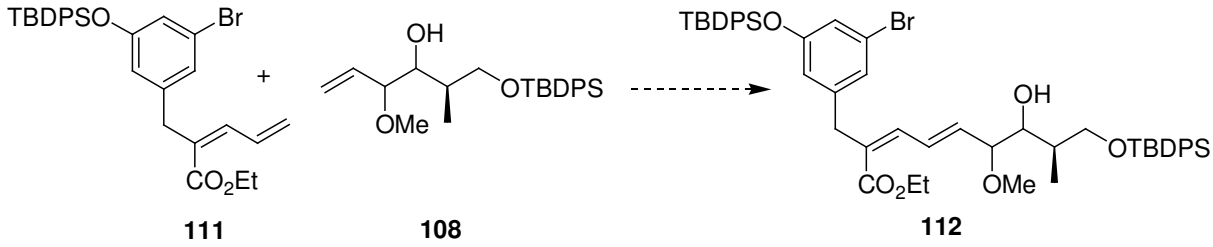
108 **94**

Tabelle 8. Testkupplungen mit Triol **108**.

Eintrag	Reagenzien	Bedingungen	Lösemittel	Ergebnis
1	0.1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3, Cs_2CO_3	RT, 40 °C	THF/NMP (2:1)	keine Reaktion
2	1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3,TBAB, Cs_2CO_3	RT, 40 °C	DMF	keine Reaktion
3	0.1 Äq. PEPPSI, Cs_2CO_3	RT, 40 °C	THF	keine Reaktion
4	0.1 Äq. PEPPSI, KO^tBu	RT, 40 - 60 °C	Toluol	keine Reaktion
5	0.1 Äq. $Pd(OAc)_2$, $NaHCO_3$	RT, 40 °C	DMF	keine Reaktion
6	0.1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3, PPh_3	RT, 40 °C	THF	keine Reaktion
7	0.1 Äq. Pd_2dba_3, K_2CO_3	RT, 40 °C	THF/DMF (1:1)	keine Reaktion
8	0.1 Äq. $Pd(OAc)_2$, PPh_3, K_2CO_3, NEt_3	MW, 60 - 100 °C	Toluol	keine Reaktion
9	1 Äq. $Pd(OAc)_2$, NEt_3,TBAB, Cs_2CO_3	MW, 60 - 100 °C	Toluol	keine Reaktion

Trotz umfangreicher Optimierungsarbeiten unter vielfältigen Bedingungen konnte mit dem Alken **108** kein Umsatz erzielt werden. Sowohl Änderungen am Katalysatorsystem, Lösemittel, Basenzugabe als auch Erhöhungen der Temperatur und Bestrahlung mit Mikrowellen führten nicht zu einem signifikanten Umsatz, so dass diese Synthesestrategie verworfen wurde.

Die Anknüpfung von Diensystem **B** an das aromatische System **A** (Abbildung 21) musste somit auf anderem Weg realisiert werden. Deshalb wurden im Anschluss Versuche zum Aufbau von Dien **111** unternommen. Dieses sollte mittels gekreuzter Olefinmetathese an Baustein **108** gebunden werden, um in diesem speziellen Fall die Möglichkeit einer Metathese als Ringschlussreaktion zu erproben (Schema 61).

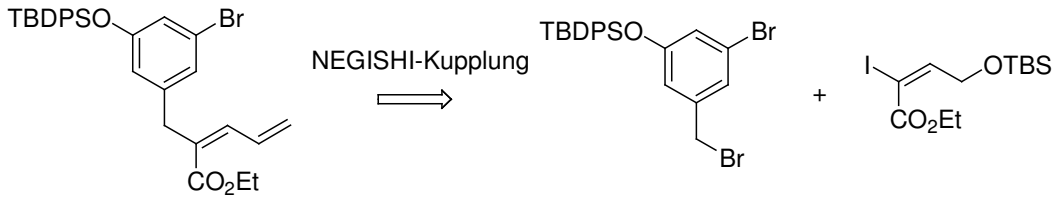


111 **108** **112**

Schema 61. Geplante Versuche zur Knüpfung der Ansa-Kette über gekreuzte Olefinmetathese.

Sollte sich die Kreuzmetathese als erfolgreich herausstellen, gäbe es auch die alternative Möglichkeit die Ansa-Kette **70** über diese anzuknüpfen und den Ringschluss über die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zwischen Amid und Phenylbromid zu realisieren (Abbildung 21). Es standen also mehrere vielversprechende Wege offen, für die zunächst Dien **111** synthetisiert werden sollte.

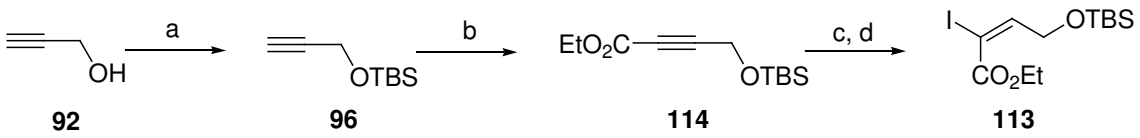
3.5.5 Versuche zur Synthese des Diensystems 111



111 **90** **113**

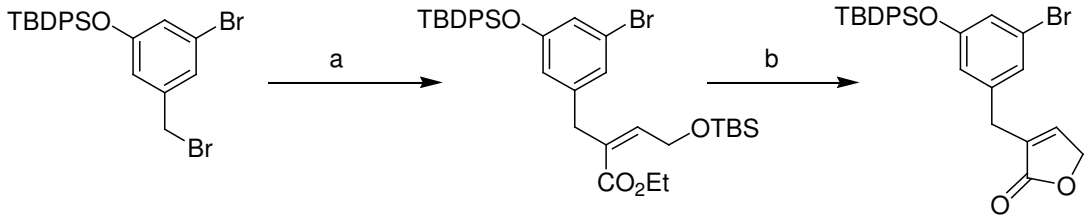
Abbildung 25. Geplante Synthese von Diensystem **111**.

Für die Kupplung an das aromatische System **90** wurde Vinyliodid **113** (Abbildung 25) gewählt, da nach erfolgter C-C-Knüpfung lediglich eine Entschützungs-Oxidations-WITTIG-Sequenz nötig wäre, um das gewünschte Diensystem **111** für die Metathesetests zu erhalten. Vinyliodid **113** wurde ausgehend von Silylether-geschütztem *Propargylalkohol* **96** per Carboxylierung mit *Chlorameisensäureethylester* in einer Ausbeute von 77 % dargestellt (Schema 62).



Schema 62. Darstellung von Vinyliodid **113.** a) TBSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2, RT, 14h, **98%**; b) i. MeLi, THF, -78°C ; ii. -20°C, $ClCO_2Et$, → RT, **77%**; c) Bu_3SnH, $Pd(PPh_3)_4$, THF, RT, **75%**; d) I_2, CH_2Cl_2, RT, **91%**.

Die *Palladium*-katalysierte *syn*-Addition von *Tributylzinnhydrid* mit gefolgter Transmetallierung durch *Iod* ergab das gewünschte Vinyliodid **113**. Dieses wurde in einer NEGISHI-Kupplung mit Aromat **90** umgesetzt (Schema 63). Die Kupplung verlief unter den bekannten Bedingungen (Eintrag 6, Tabelle 6) in mäßigen Ausbeuten von 20-30 %. Deshalb wurden verschiedene Additive getestet. Durch den Zusatz von *Zinkbromid* konnte die Ausbeute auf 63 % gesteigert werden.



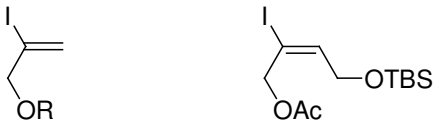
Schema 63. Darstellung von Lacton **117.** a) i. Zn, NMP, I_2, **90**, 60°C, 60 min; ii. $ZnBr_2$, **113**, PEPPSI-Ipr, THF/NMP (2:1), 60°C, 1h, **63%**; b) Bedingungen: siehe Tabelle 9.

Bei der Entschützung des primären Silylethers an Kupplungsprodukt **116** stellte es sich als problematisch heraus, dass der freigesetzte primäre Alkohol direkt nucleophil den Ethylester angriff, um das stark begünstigte Fünfringlacton **117** zu bilden (Schema 63). Keine der getesteten Bedingungen führten zum gewünschten Erfolg (Tabelle 9).

Tabelle 9. Getestete Entschützungsbedingungen für Silylether **116**.

Eintrag	Lösemittel	Reagenz	Bedingungen	Ausbeute
1	MeOH	HCl	RT, 1min	quant. **117**
2	MeOH	HCl	0 °C, 1 min	quant. **117**
3	THF	TBAF	0 °C, 10 min	quant. **117**
4	THF	TBAF	-10 °C, 30 min	quant. **117**

Deshalb wurde nachfolgend an einer methodischen Untersuchung der NEGISHI-Kupplung mit verschiedenen Vinyliodiden gearbeitet. Da aus den anfänglichen Versuchen bekannt war, dass Vinyliodide der Form **99** und **100** in derartigen NEGISHI-Kupplungen gute Ausbeuten lieferten, wurden zunächst solche vom Typ **118** synthetisiert. Bei diesen bestand keine Gefahr der Zyklisierung während der Entschützung (Abbildung 26).

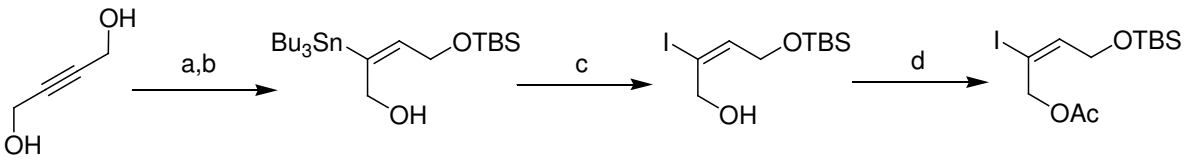


100 R= Ac
99 R= TBS

118

Abbildung 26. Vinyliodide zum Einsatz in NEGISHI-Kupplungen mit Aromat **90**.

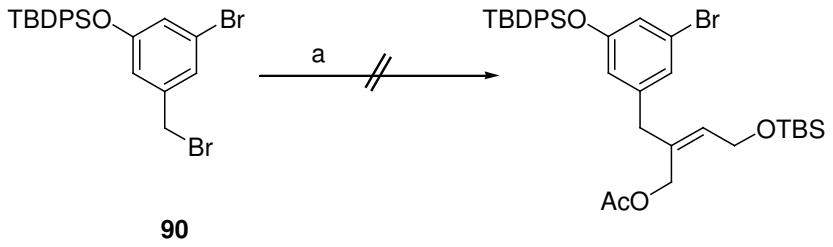
Die Synthese von Vinyliodid **118** nutzte, genauso wie die Synthese von Vinyliodid **113**, eine Hydrostannylierung gefolgt von einer Transmetallierung mit Iod zum freien Allylalkohol **121**, der anschließend als Acetat geschützt wurde (Schema 64).



119 **120** **121** **118**

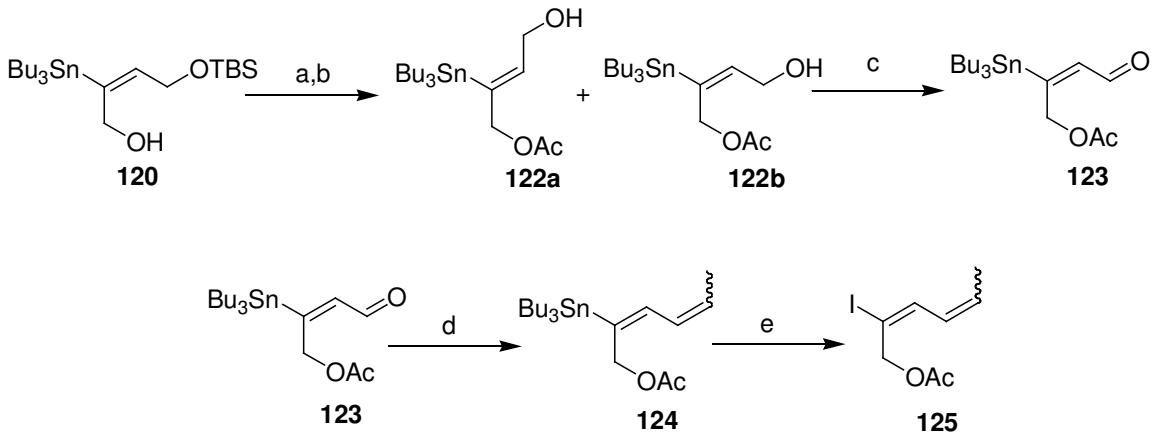
Schema 64. Darstellung von Vinyliodid **118**. a) Bu_3SnH, $Pd(PPh_3)_4$, THF, RT, 20 min, **88 %**; b) TBSCl, Imidazol, THF, 0°C → RT, 20 h, **89%**; c) I_2, CH_2Cl_2, -78°C → RT, **96%**; d) Ac_2O, Pyridin, RT, 5h, **quant**.

Die NEGISHI-Kupplungsversuche mit dieser Verbindung stellten sich als erfolglos heraus (Schema 65). Unter den zuvor genutzten Bedingungen (Tabelle 6, Eintrag 6) konnte keine Produktbildung beobachtet werden.



Schema 65. Fehlgeschlagene NEGISHI-Kupplung zu Verbindung **118**. a) i. Zn, NMP, I_2, **90**, 60°C, 60 min; ii. $ZnBr_2$, **118**, PEPPSI-Ipr, THF/NMP (2:1), 60°C, 20h.

Vinyliodid **118** konnte nach der Reaktion reisoliert werden. Da die Kupplungen mit den Vinyliodiden **99** und **100**, die ebenfalls eine CH_2OR-Substitution in C1-Position besitzen, sehr gut verliefen, wurde der Mißerfolg auf die elektronischen Verhältnisse im Vinyliodiddiol **118** zurückgeführt. Die Doppelbindung ist im disubstituierten Substrat **118**, durch das vorhandene zweite Sauerstoffatom in Allylposition, elektronenreicher als das einfach substituierte Vinyliodid **99**. Sterische Gründe wurden ausgeschlossen, da die Substrate **99** und **113** gleiche Merkmale aufweisen und gekuppelt werden konnten.
Um das Vinyliodid elektronisch zu modifizieren, wurde im nächsten Ansatz erst das Diensystem durch Silyletherspaltung, Oxidation zum Aldehyd und anschließende WITTIG-Olefinierung dargestellt, um dieses in die NEGISHI-Kupplung einzusetzen (Schema 66).

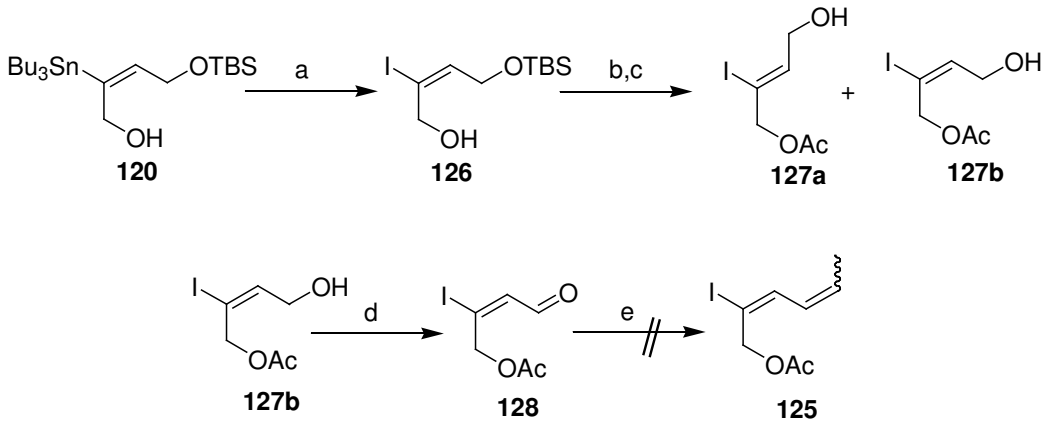


Schema 66. Darstellung von Dienyliodid **125.** a) Ac_2O, Pyridin, RT, **89%**; b) TBAF, THF, 0°C, 2h, **64% 122b** und **31% 122a**; c) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, 0°C, 1h,**73%**; d) NaH, $EtPPh_3Br$, THF, 0°C, **Spuren**; e) I_2, CH_2Cl_2, 0°C, **Spuren**.

Die TBAF induzierte Entschützung des als Silylether geschützten Alkohols **120a** resultierte zu 64 % im gewünschten *E*-Allylalkohol **122b** und zu 31 % im isomerisierten *Z*-Allylalkohol

122a. Die *E*-/*Z*-Isomere waren jedoch chromatographisch gut zu trennen. Die Oxidation zu **123** konnte in einer Ausbeute von 73 % mittels DESS-MARTIN-Periodinan erzielt werden. Bei nachfolgender WITTIG-Reaktion trat Zersetzung von Vinylstannan **123** auf. Es konnten Spuren von Dienylstannan **124** isoliert werden, die eine starke, nicht abtrennbare Verunreinigung mit Organozinn-Resten enthielten. Auch nach der Transmetallierung mit Iod zu Dienyliodid **125** konnten diese zinnorganischen Reste nicht entfernt werden. Durch die geringe Polarität sowohl der Zinnorganyle als auch des Produkts konnte keine der Standardmethoden zur Extraktion[109] genutzt werden. Auch nach Komplexierungsversuchen mit verschiedenen Fluoridreagenzien[110] befanden sich noch erhebliche Mengen des Zinnorganyls im Produkt. Deshalb wurde das noch stark verunreinigte Produkt in einen NEGISHI-Kupplungsversuch eingesetzt, der jedoch keine Anzeichen von Produktbildung lieferte.

Die Abtrennung der zinnorganischen Reste sollte zu einem früheren Zeitpunkt der Sequenz erfolgen, und zwar wenn das gewünschte Substrat eine höhere Polarität aufweist. Dafür wurde Vinylstannan **120** direkt mit *Iod* transmetalliert, acetyliert, der Silylether gespalten und anschließend oxidiert (Schema 67).



120 126 127a 127b 127b 128 125

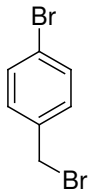
Schema 67. Alternative Darstellung von Dienyliodid **125.** a) I_2, CH_2Cl_2, -78°C → RT, **96%**; b) Ac_2O, Pyridin, RT, **quant**.; c) TBAF, THF, 0°C, 2h, **69% 127b** und **26% 127a**; d) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, 0°C, 1h, **84%**; e) NaH, $EtPPh_3Br$, THF, 0°C, **Zersetzung**.

[109] Durch eine Hexan-Methanol-Extraktion können Stannane in die unpolare Phase extrahiert werden, Produkte mit mittlerer bis hoher Polarität verbleiben in der Methanol-Phase.

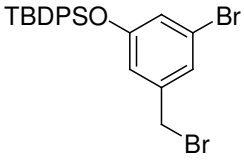
[110] KF, TBAF.

Bis hierhin verlief die Sequenz hervorragend, leider trat bei der WITTIG-Reaktion jedoch komplette Zersetzung auf. Deshalb wurde diese Strategie, auch aufgrund des Misserfolgs der ersten NEGISHI-Kupplungsversuche, ebenfalls verworfen.

Bei Betrachtung der zu kuppelnden und der nicht in der NEGISHI-Kupplung zur Reaktion zu bringenden Vinyliodide wird offensichtlich, dass das einzige reagierende Vinyliodid mit Substitution in C2-Position eine elektronenziehende Gruppe in C1-Position trägt (Eintrag 5, Tabelle 10).

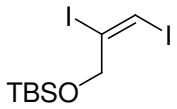
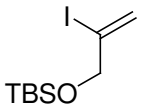
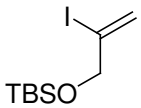
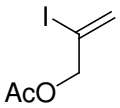
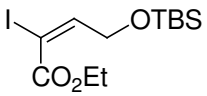
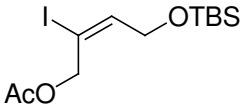
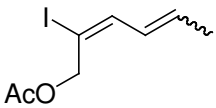


91

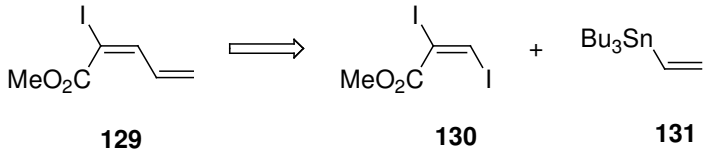


90

Tabelle 10. Vergleich der getesteten Vinyliodide für die NEGISHI-Kupplung mit **91** und **90**.

Rkt.	Benzylbromid	Vinyliodid	Bedingungen	Ausbeute
1	**91**		0 °C → RT, 2 h	**94 %**
2	**91**		0 °C → RT, 2 h	**62 %**
3	**90**		60 °C, 3 h	**78 %**
4	**90**		60 °C, 3 h	**83 %**
5	**90**		60 °C, 2 h	**63 %**
6	**90**		60 °C, 20 h	**keine Reaktion**
7	**90**		60 °C, 20 h	**keine Reaktion**

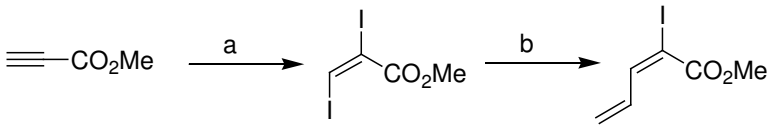
Aufgrund der oben beschriebenen Überlegungen zu den elektronischen Verhältnissen der Vinyliodide, ergab sich die logische Konsequenz, die Darstellung von Dienyliodid **129** anzugehen. Dieses Iodid weist die elektronenziehende Gruppe in C1-Position auf und besitzt bereits das benötigte Diensystem, sodass keine weiteren Veränderungen nach der NEGISHI-Kupplung nötig sind (Abbildung 27).



129 **130** **131**

Abbildung 27. Retrosynthetische Überlegungen zu Dienyliodid **129**.

Dafür wurden erste Versuche mittels STILLE-Kupplung von Vinylstannan **131** unternommen (Schema 68).



132 **133** **129**

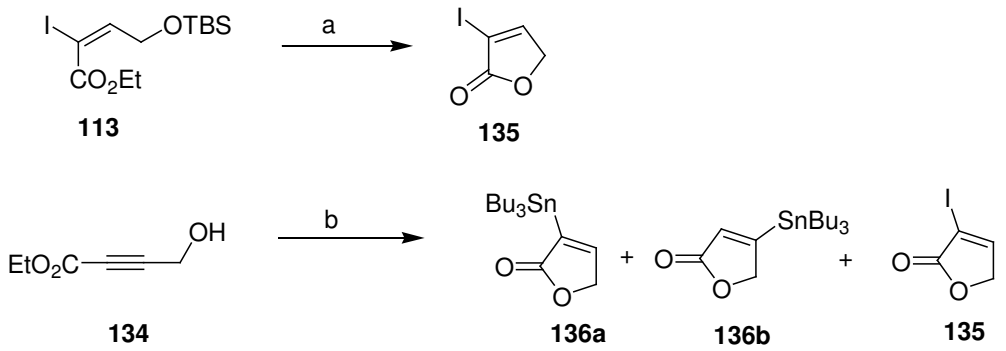
Schema 68. Darstellung von Dienyliodid **129**. a) ICl, NaI, CH_2Cl_2, 0°C → RT, 5h, **85%**; b) *Tributylvinylstannan*, diverse Bedingungen: siehe Tabelle 11.

Tabelle 11. Getestete Bedingungen für die STILLE-Kupplung von **133** mit *Tributylvinylstannan* **131**.

Rkt.	Lösemittel	Reagenz	Zusätze	Bedingungen	Ergebnis
1	THF	$Pd(PPh_3)_4$	LiCl	70 °C, 20 h	In Spuren isoliert
2	DMF	$PdCl_2(MeCN)_2$	-	RT, 20 h	Kein Produkt
3	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	CsF, CuI	40 °C, 20 h	In Spuren isoliert
4	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	CsF, CuI	45 °C, 20 h	Kein Produkt
5	Toluol	$Pd(PPh_3)_4$	CsF, LiCl	120 °C, 20 h	Kein Produkt
6	THF	$Pd(PPh_3)_4$	CsF, LiCl	65 °C	In Spuren isoliert

Diese Versuche resultierten nicht in der Isolierung des gewünschten Produkts. Der Einsatz unterschiedlicher Lösemittel und der Zusatz verschiedener Additive konnte keine Produktbildung forcieren. Die Ausbeuten waren sehr gering und die Isolierung, aufgrund bereits oben beschriebener Trennprobleme von Organostannan-Resten, problematisch.

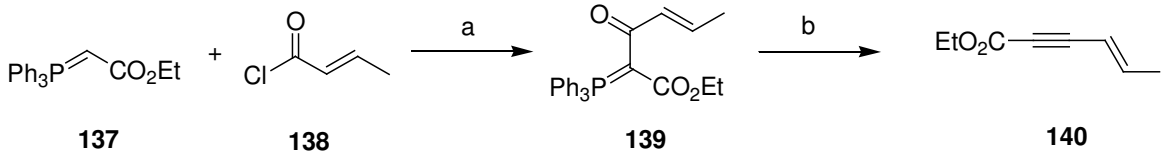
Deshalb wurden Experimente zur Entschützung des bereits vorhandenen Vinyliodids **113** durchgeführt, um dieses anschließend per Oxidation-WITTIG-Sequenz in das gewünschte Dien zu überführen. Diese Versuche endeten wie die Hydrostannylierung/Iodierung von *4-Hydroxybutinsäureethylester* **134** in der Bildung der entsprechenden Lactone (Schema 69).



113 **135** **134** **136a** **136b** **135**

Schema 69. Versuche zur Darstellung eines Dienyliodids aus **113** und **134.** a) TBAF, THF, 0°C, 30 min, **quant**.; b) i. Bu_3SnH, $Pd(PPh_3)_4$, THF, RT, 10 min; ii. I_2, RT, 1h.

Einen neuen Ansatz zum Zugang von Diensystemen für die NEGISHI-Kupplung sollte die Pyrolyse von Phosphoryliden darstellen[111]. Dafür wurde ausgehend von *2-(Triphenyl-phosphoranyliden)essigsäureethylester* **137** Phosphorylid **139** synthetisiert, das mittels Pyrolyse in der Kugelrohrdestille bei 260 °C zu Enin **140** umgesetzt werden konnte (Schema 70).



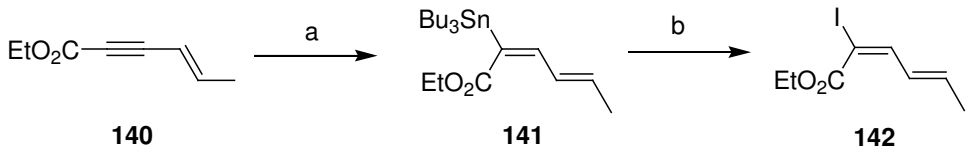
137 **138** **139** **140**

Schema 70. Darstellung von Enin **140**. a) BSA, C_6H_6, -10°C → RT, 2.5 h; b) 260°C, Kugelrohr, **64%** über 2 Stufen.

Mechanistisch ist dies über eine intramolekulare WITTIG-Reaktion zu erklären. Unter Abspaltung von Triphenylphosphinoxid bildet sich die Acetylencarbonsäure **140** aus. Diese konnte nun der bereits etablierten Prozedur zur Hydrostannylierung und anschließender

[111] H.J.Bestmann, C.Geismann, R.Zimmermann, *Chem.Ber.*, **1994**, *127*, 1501-1509; H.J.Bestmann, C.Geismann, *LiebigsAnn.*, **1977**, 282-287; G.Märkl, *Chem.Ber.*, **1961**, 3005-3010.

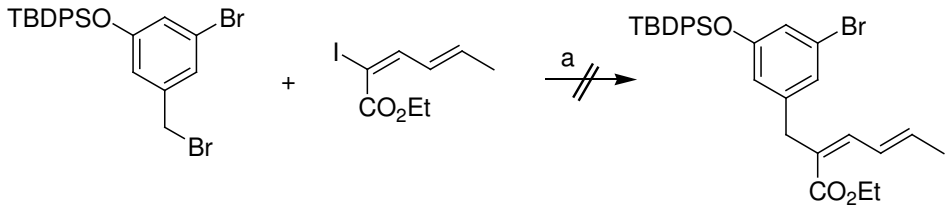
Transmetallierung mit *Iod* unterzogen werden, die in einer Ausbeute von 85 % verlief (Schema 71).



140 **141** **142**

Schema 71. Darstellung von Dienyliodid **142.** a) Bu_3SnH, $Pd(PPh_3)_4$, THF, RT, 2h, **85%**; b) I_2, CH_2Cl_2, 0°C, 5 min, **quant**.

Somit konnten nun schließlich erste Tests für die NEGISHI-Kupplung mit **90** durchgeführt werden (Schema 72).



90 **142**

Schema 72. Tests für Negishi-Kupplung mit Dienyliodid **142**. a) i. Zn, NMP, I_2, **90**, 60°C, 60 min; ii. $ZnBr_2$, **142**, PEPPSI-IPr, THF/NMP (2:1), 60°C, 20h.

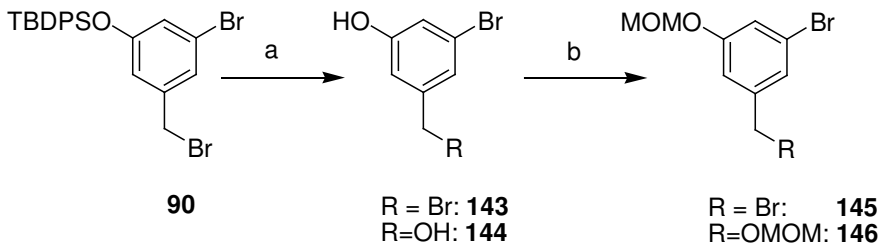
Diese wurden unter den zuvor optimierten Bedingungen[112] durchgeführt. Produktbildung konnte nur in Spuren beobachtet werden, das Dienyliodid aber nicht reisoliert werden. Das deutete darauf hin, dass die *Palladium*-Insertion an Dienyliodid **142** möglich ist. Deshalb sollte nun der Aromat **90** modifiziert werden.

Die NEGISHI-Kupplungen mit dem elektronenreichen Testsystem *para*-Brombenzylbromid **91** verliefen wesentlich leichter und mit besseren Ausbeuten als die mit Benzylbromid **90.** Daher wurde die Schutzgruppe auf dem phenolischen Alkohol an **90** ausgetauscht. Um eine erhöhte Elektronendichte im aromatischen Ring zu erreichen, sollten Kohlenstoffether aufgrund ihrer höheren Donorwirkung besser geeignet sein als Silylether.[113] Es wurde der

[112] T=60 °C, Zusatz von $ZnBr_2$.

[113] M.G.Woronko, A.J.Deitsch, *J.Prakt.Chem.*, **1963**, 214-224.

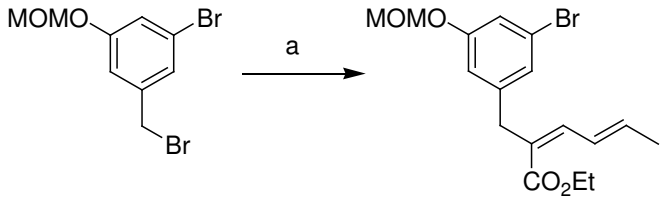
Methoxymethylether gewählt, um die spätere Entschützung - gegenüber einem Methylether - leichter zu gestalten.



90 R = Br: **143** R=OH: **144** R = Br: **145** R=OMOM: **146**

Schema 73. Umschützung des Phenylbenzyldibromids **90**. a) TBAF, THF, -10 °C, 10 min, **69% 143** und **26 % 144**; b) MOMCl, NaH, THF, 0 °C → RT, 3h, **quant**.

Die Entschützung des ^{t}Butyldiphenylsilylethers verlief bei –10 °C in guten Ausbeuten, allerdings bildete sich im wässrigen Lösemittel zu einem Anteil von 26 % Benzylalkohol **144**, der chromatographisch nicht abzutrennen war. Deshalb wurde das Gemisch aus **143** und **144** in die nächste Stufe eingesetzt, nach der das oben beschriebene Trennproblem fortbestand. Da Benzylether **146** jedoch weder mit Zink noch mit der entstehenden Zinkspezies reagieren sollte, wurde die Mischung in die folgende NEGISHI-Kupplung mit **142** eingesetzt (Schema 74).



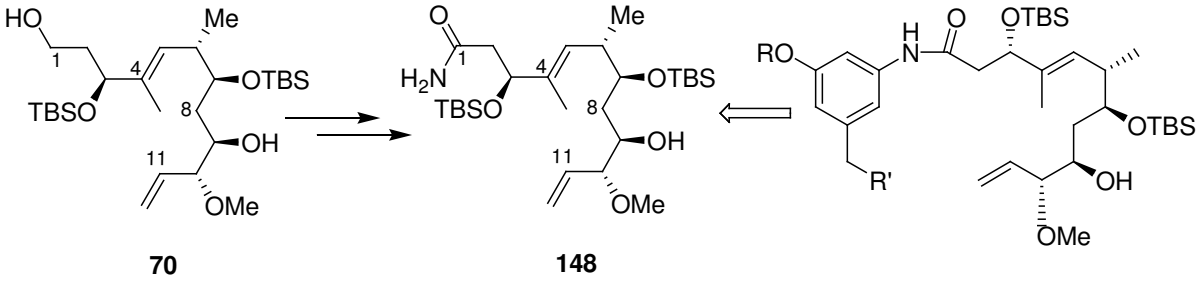
145 **147**

Schema 74. Kupplung des Dienyliodids **142** an Aromat **145**. a) i. Zn, NMP, I_2, **145**, 60°C, 90 min; ii. $ZnBr_2$, **142**, PEPPSI-IPr, THF/NMP (2:1), 60°C, 3h, **28%**.

Diese Strategie führte nun endlich zum lang ersehnten Erfolg. Das Dienyliodid **142** konnte in einer Ausbeute von 28 % an das aromatische System gekuppelt werden. Das zeigte, dass die Bedingungen optimierungsbedürftig waren, die Reaktion aber prinzipiell möglich ist. Somit konnten die Arbeiten zur HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung mit dem phenylischen Bromid beginnen.

3.5.6 HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zum Aufbau des Lactams

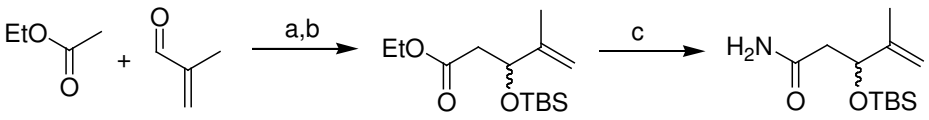
Palladium- und *Kupfer*-katalysierte Reaktionen zur Kupplung von Aminen an sp^2-Zentren sind seit Jahren in einer Vielzahl von Publikationen zu finden.[114] Neuere Arbeiten beschäftigen sich häufig auch mit der Möglichkeit zur Kupplung von Amiden an solche Zentren.[115] Deshalb sollte die Ansa-Kette **70** in das entsprechende Amid **148** überführt und mittels einer HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung an das aromatische System installiert werden (Schema 75).



70 **148**

Schema 75. Geplante HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung für die Anbindung von Ansa-Kette **148** an das aromatische System.

Für erste Experimente hinsichtlich dieser Kupplungen an das aromatische System wurde das in drei Stufen aus *Essigsäureethylester* und *Methacrolein* zugängliche Amid **152** als Analogon für Ansa-Kette **148** eingesetzt (Schema 76).



149 **150** **151** **152**

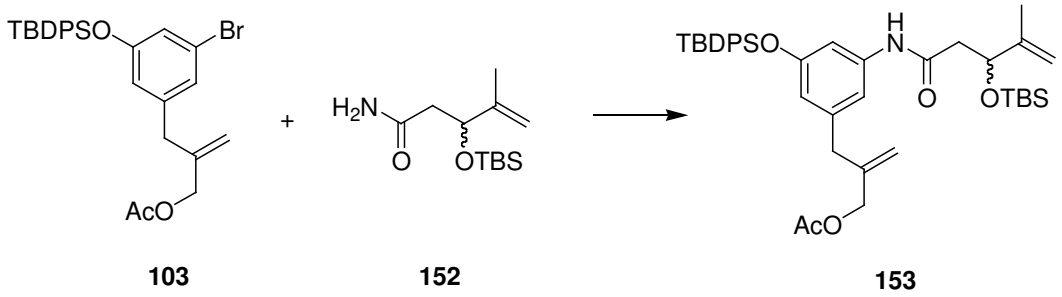
Schema 76. Darstellung von Testsystems **152** für die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung. a) LDA, THF, -60°C → -20°C, **86%**; b) TBSOTf, Lutidin, CH_2Cl_2, -78°C, **quant**.; c) NH_4Cl, $AlMe_3$, 0°C → 50°C, 16h, **quant**.

---

[114] A.S.Guram, R.A.Rennels, S.L.Buchwald, *Angew.Chem.*, **1995**, *107*, 1456-1459; N.Kataoka, Q.Shelby, J.P.Stambuli, J.F.Hartwig, *J.Org.Chem.*, **2002**, *67*, 5553-5566.

[115] J.Yin, S.L.Buchwald, *Org.Lett.*, **2000**, *2*, 1101-1104; A.Klapars, X.Huang, S.L.Buchwald, *J.Am.Chem.Soc.*, **2002**, 124, 7421-7428.

Als Kupplungspartner wurde für erste Tests das aus den NEGISHI-Testkupplungen gewonnene Substrat **103** eingesetzt (Schema 77).



103 **152** **153**

Schema 77. Testreaktion für die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung. Bedingungen: Tabelle 12.

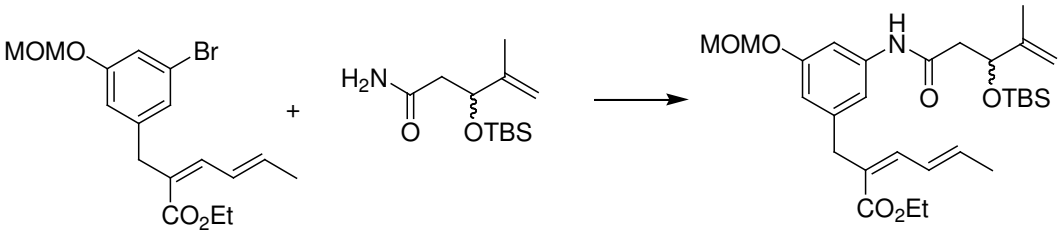
Es wurden verschiedene Bedingungen und Katalysatoren getestet, die mit diesen Substraten jedoch alle nicht zum gewünschten Erfolg führten (Tabelle 12).

Tabelle 12. Getestete Bedingungen für den Aufbau des Amid-Systems.

Eintrag	Kat	Lösemittel	Bedingungen	Ergebnis
1	$Pd(OAc)_2$	THF	Cs_2CO_3, Xantphos, 45 °C	Keine Reaktion
2	$Pd(OAc)_2$	^{t}BuOH	Cs_2CO_3, Xantphos, 90 °C	Zersetzung
3	Pd_2dba_3	Dioxan	Cs_2CO_3, Xantphos, 50 °C	In Spuren isoliert
4	CuI	Toluol	Dimethylethandiamin, 80 - 100 °C	Keine Reaktion
5	CuI	Toluol	K_2CO_3, Dimethylethandiamin, 100 °C	In Spuren isoliert

Die Produktbildung konnte lediglich mit den Bedingungen aus Eintrag 3 und 5 in Spuren beobachtet werden. Da ähnliche Kupplungen von PANEK *et al*[116] unter Nutzung von Bedingung 5 beschrieben sind, wurde der Misserfolg - wie bei den NEGISHI-Kupplungen - auf die elektronischen Bedingungen im aromatischen Ring zurückgeführt. Für weitere Kupplungsversuche wurde deshalb das elektronenreichere MOM-geschützte Aren **145** verwendet (Schema 78).

[116] G.Evano, J.V.Schaus, J.S.Panek, *Org.Lett.*, **2004**, *6*, 525-528.



Schema 78. Testreaktion für die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung.

In diesen Kupplungen konnte Produktbildung erzielt werden, die Ausbeuten lagen jedoch bei < 10%. Deshalb wurde entschieden, den aromatischen Ring so zu ändern, dass er dem in den von PANEK *et al.* beschriebenen Kupplungen möglichst ähnlich ist (Abbildung 28).[116]

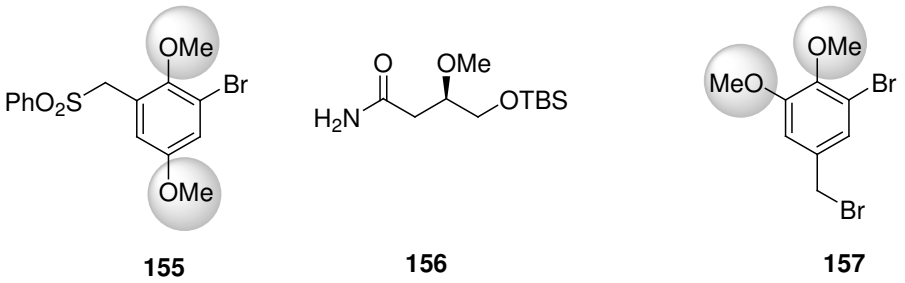
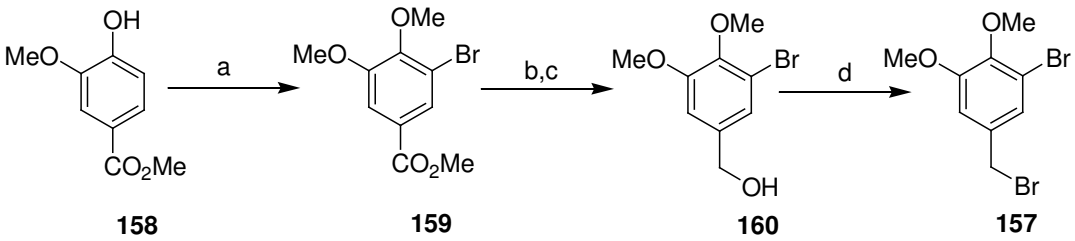


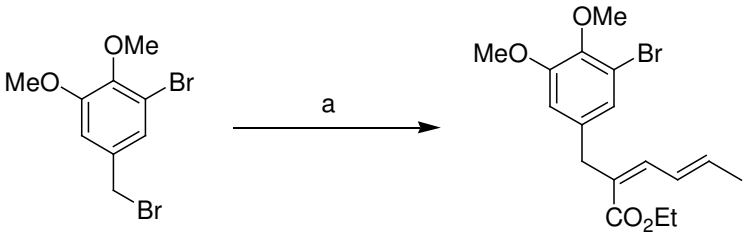
Abbildung 28. Die von PANEK *et al.* in einer HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung genutzten Bausteine **155** und **156** und das angepasste aromatische System **157**.[116]

Der Zielbaustein **157** trägt, wie das System von PANEK, Methoxygruppen in *ortho*- und *meta*-Stellung zum zu kuppelnden Bromid. Durch diese Konstitution sollte der Elektronendruck im aromatischen Ring stark erhöht sein. Die Darstellung erfolgte ausgehend von *Methylvanillat* **158** über 4 Stufen (Schema 79).



Schema 79. Darstellung von *3-Brom-4,5-dimethoxybenzylbromid* **157**. a) NBS, DMF, RT, 20h; b) K_2CO_3, Me_2SO_4, Rf, 5h, **83%** über 2 Stufen; c) $LiAlH_4$, Et_2O, RT, 1h, **80%**; d) Br_2, PPh_3, Imidazol, 0°C, 1h, **91%**.

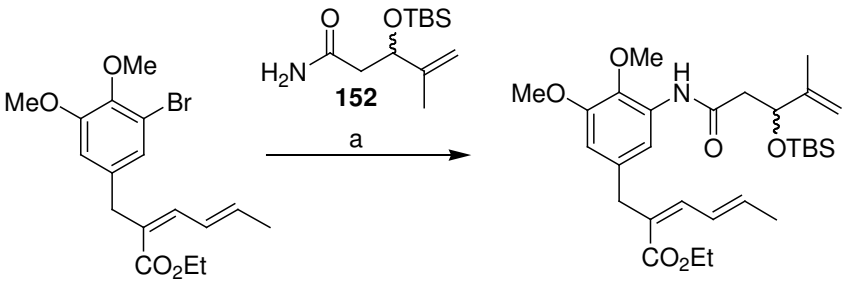
Kommerziell erhältliches *Methylvanillat* **158** wurde bromiert, methyliert, in Esterposition reduziert und in der aus Derivat **90** bekannten APPEL-Variante zum Benzylbromid **157** umgesetzt. Die Ausbeute betrug 60 % über alle Stufen. Mit dem aromatischen Baustein in den Händen konnten die Experimente zur NEGISHI- und HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung wiederholt werden. Erfreulicherweise konnte nun die NEGISHI-Kupplung unter kleinen Anpassungen der bekannten Bedingungen mit Dienyliodid **142** in einer Ausbeute von 79 % bewerkstelligt werden (Schema 80).



157 **161**

Schema 80. Kupplung des Dienyliodids **142** an das aromatische System **157.** a) i. Zn, NMP, I_2, **157**, RT, 60 min; ii. $ZnBr_2$, **142**, PEPPSI-IPr, THF/NMP (2:1), 60 C, 2h, **79%**.

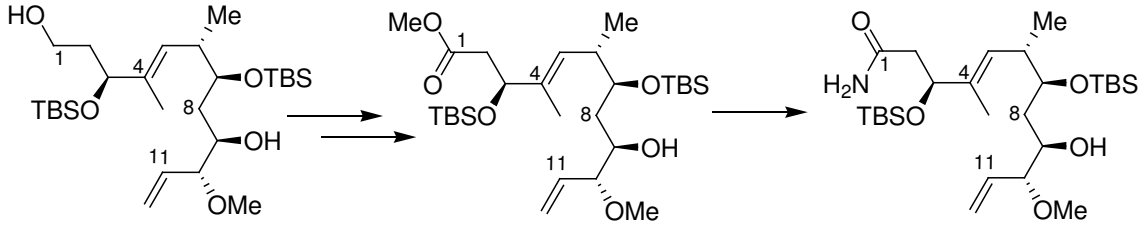
Auch die nachfolgende HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung mit Amid-Testbaustein **152** konnte mit diesem System in einer Ausbeute von 55 % realisiert werden (Schema 81).



161 **162**

Schema 81. Amidkupplung von **152** an das aromatische System **161.** a) CuI, K_2CO_3, *N,N*-Dimethyl-aminoethandiamin, Toluol, 110 °C, 40 h, **55** %.

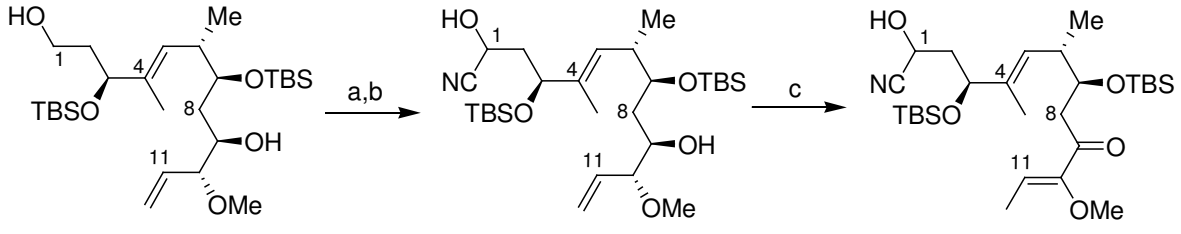
Diese Ergebnisse zeigten, dass die Anbindung des Diensystems und der Ansakette über die geplanten Kupplungen möglich ist. Somit konnte mit der Überführung der Ansakette **70** in das benötigte Amid **148** begonnen werden (Schema 82).



70 **165** **148**

Schema 82. Geplante Syntheseroute zu Amid **148**.

Dafür war geplant den primären Alkohol in das Cyanhydrin zu überführen, welches direkt oxidativ zum Methylester **165** umgesetzt werden sollte.[117] Dieser sollte in der aus Testbaustein **152** bekannten Methode in das primäre Amid **148** transformiert werden.[118]
Die selektive Oxidation des primären Alkohols **70** und Überführung des gebildeten Aldehyds **163** in Cyanhydrin **164** verliefen problemlos in guten Ausbeuten (Schema 83). Die nachfolgende SWERN-Oxidation resultierte allerdings in der selektiven Oxidation des sekundären Alkohols anstelle des gewünschten Cyanhydrins. Die allylische Doppelbindung an C11/C12 isomerisierte zusätzlich in Richtung des α,β-ungesättigten Systems, so dass diese Route in einer Sackgasse endete (Schema 83). Die Isomerisierung war nach der NMR-spetroskopischen Analyse offensichtlich, da das Signal des 1-H noch vorhanden war und die beiden 12-H Signale der terminalen Doppelbindung verschwunden waren. Außerdem gab es ein neues Signal im olefinischen Bereich, das eine Quartett-Aufspaltung aufwies. Dieses ist 11-H zuzuordnen, mit der Kopplung zur neu entstandenen Methylgruppe (12-H).



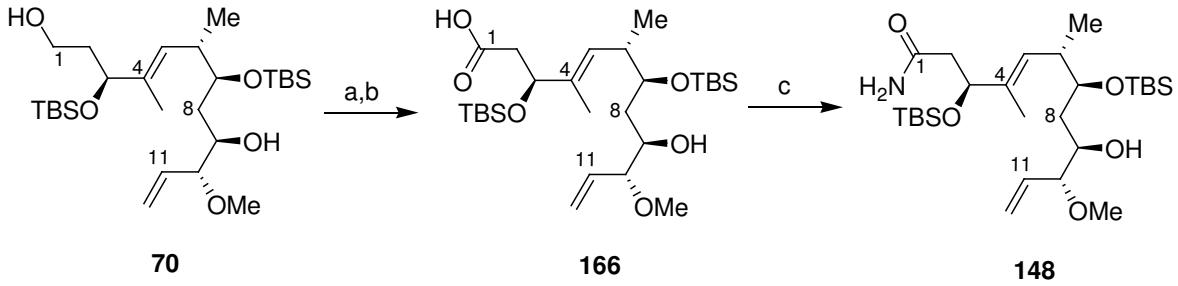
70 **164** **164a**

Schema 83. Synthese von isomerisierter Ansakette **164a**. a) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, RT, 1.5h; b) Aceton-Cyanhydrin, NEt_3, CH_2Cl_2, RT, 20h, **86%** über 2 Stufen; c) $(COCl)_2$, DMSO, -78°C → -40°C → -78°C, NEt_3, → -30°C, MeOH, **78 %**.

[117] R.P.Polniakszek, R.V.Stevens, *J.Org.Chem.*, **1986**, *51*, 3023-3027.

[118] L.C.Dias, C.C.S.Goncalves, *Adv.Synth.Catal.*, **2008**, *350*, 1017-1021.

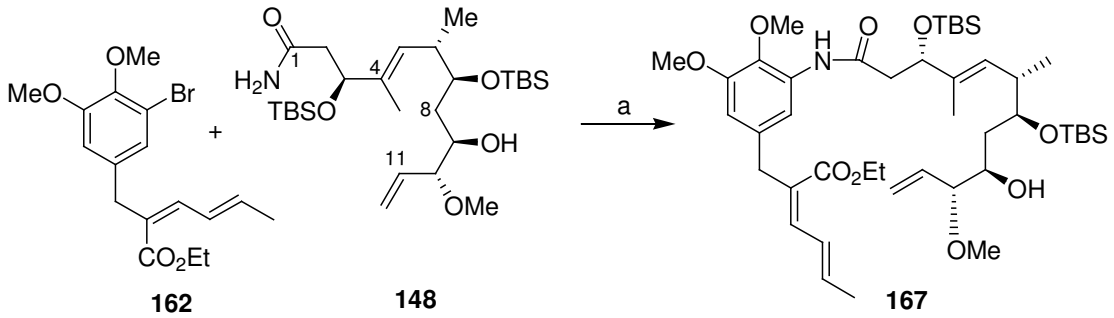
Der nächste Ansatz sah die Amidbildung mittels Ammoniak aus der freien Säure vor.[116] Die Carbonsäure **166** wurde mittels PINNICK-Oxidation aus Aldehyd **163** gewonnen (Schema 84).



70 **166** **148**

Schema 84. Synthese von Ansakette **148**. a) DMP, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2, RT, 1.5h; b) $NaClO_2$, $NaH_2PO_4xH_2O$, 2-Methyl-2-buten, $^tBuOH/H_2O$, RT, 1h, **76%** über 2 Stufen; c) NEt_3, EtOCOCl, CH_2Cl_2, -20°C, 45 min → NH_3, **77%**.

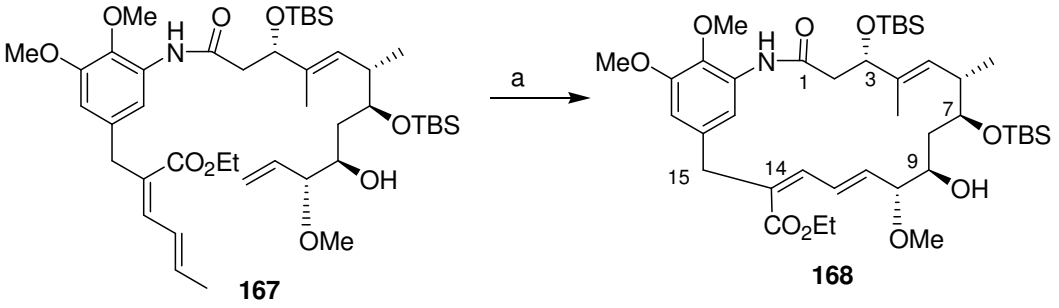
Das primäre Amid **148** konnte in einer Ausbeute von 59 % über drei Stufen aus dem primären Alkohol **70** hergestellt werden. Mit dem so erhaltenen Amid **148** konnten nun erste Kupplungsversuche mit dem aromatischen Baustein **162** durchgeführt werden (Schema 85). Diese konnten massenspektrometrisch verfolgt werden und verliefen erfolgreich, allerdings in einer nicht praktikablen Ausbeute von < 5 %. Deshalb konnte zum Ende dieser Arbeit nicht genügend Substanz für die NMR-spektroskopische Analyse bereitgestellt werden.



162 **148** **167**

Schema 85. Amidkupplung von **148** an das aromatische System **162**. a) CuI, K_2CO_3, *N,N*-Dimethyl-aminoethandiamin, Toluol, 110°C, 40 h, **~5%**.

Die minimalen Produktmengen aus der HARTWIG-BUCHWALD-KUPPLUNG zum Amid **167** wurden in einer massenspetrometrisch verfolgbaren Ringschlussmetathese mit dem GRUBBS-HOVEYDA-Katalysator bei 80 °C in Toluol zur Reaktion gebracht.



Schema 85. Die Ringschlussmetathese zu **168** ist prinzipiell möglich. a) GRUBBS-HOVEYDA-Katalysator II, Toluol, 80 °C, 20h.

Für die letzten beiden Stufen sind noch Optimierungsarbeiten erforderlich. Prinzipiell konnte aber gezeigt werden, dass die geplante Route über NEGISHI- und HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung zum gewünschten Produkt führt. Somit konnte ein Zugang zum Aufbau von an C14-Position veränderten Proansamitocinen erarbeitet werden. Die an dieser Stelle eingeführte Esterfunktion kann in vielfältiger Weise umfunktionalisiert werden, und stellt eine potentielle Likeranbindungsstelle für geplante Konjugatsynthesen dar.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

4.1 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnten unterschiedliche mutasynthetische Ansätze für die Erzeugung von Ansamitocinderivaten realisiert werden.

Für die Darstellung von im aromatischen Teil modifizierten Ansamitocinen wurden 19 aromatische Mutasynthone der *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073 verfüttert. Die *AHBA*-Analoga **22**, **23**, **27**, **31**, **36**, **40** und **42** wurden in die entsprechenden Ansamitocinderivate biotransformiert.

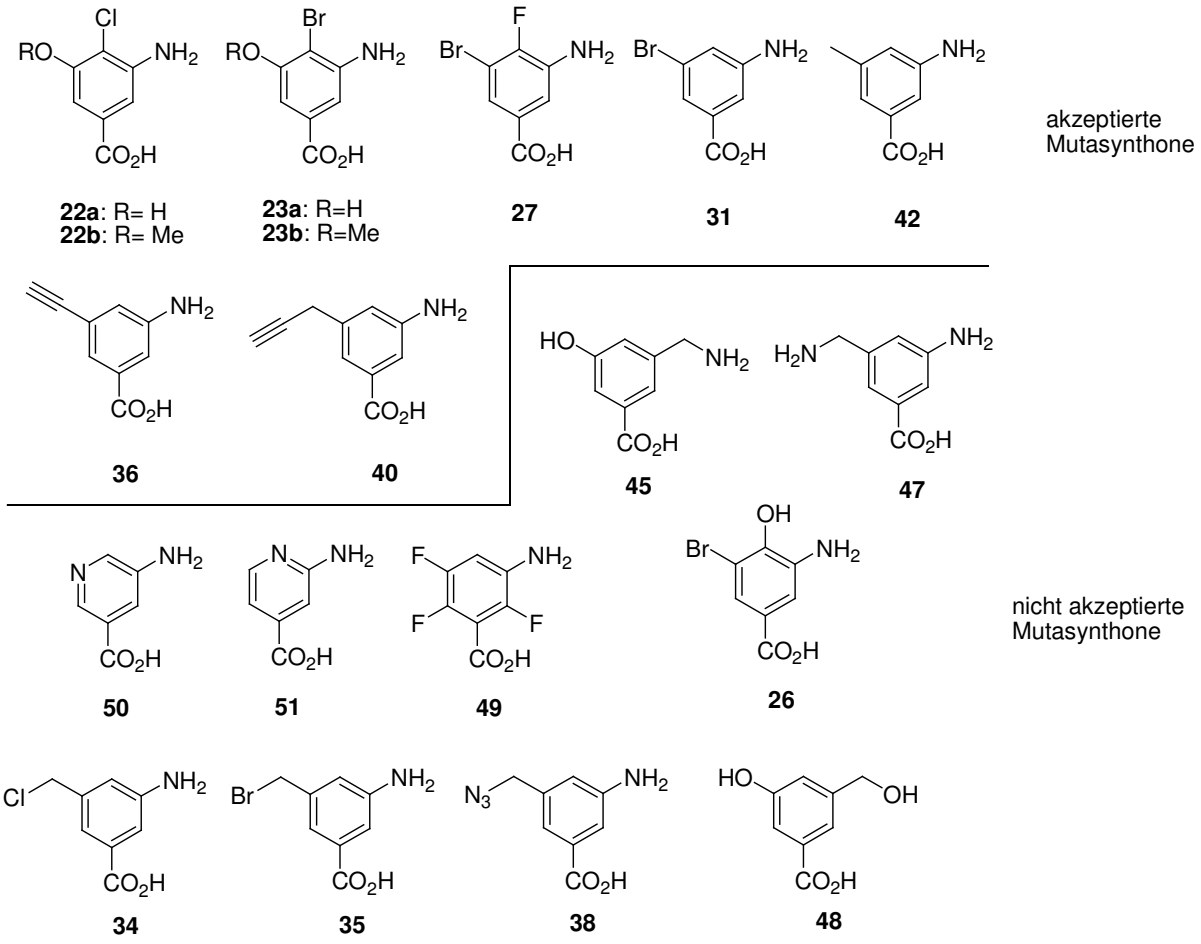
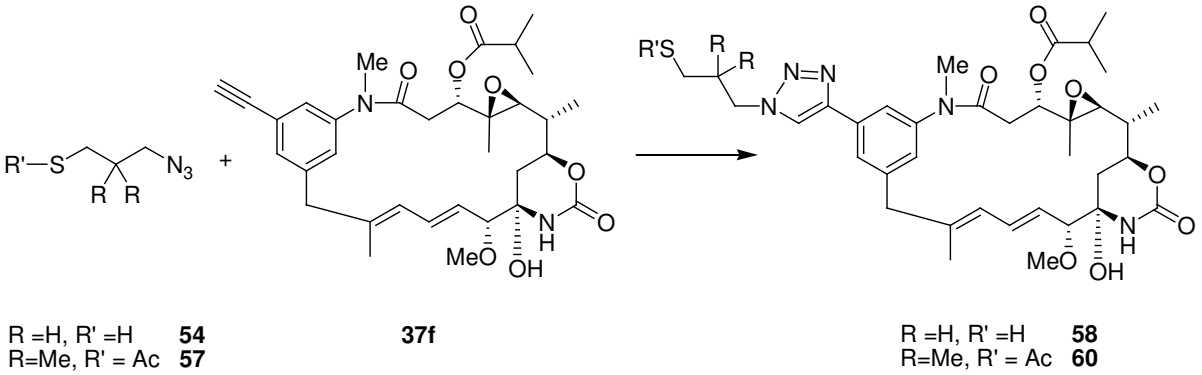


Abbildung 29. Für Verfütterungsexperimente an *Actinosynnema pretiosum* (Stamm HGF073) genutzte Mutasynthone.

Besonders herauszustellen ist dabei die Synthese von *20-Acetylen-19-deschloro-ansamitocin P3* aus Mutasynthon **36**, das in guter Fermentationsausbeute von 3 mg/L

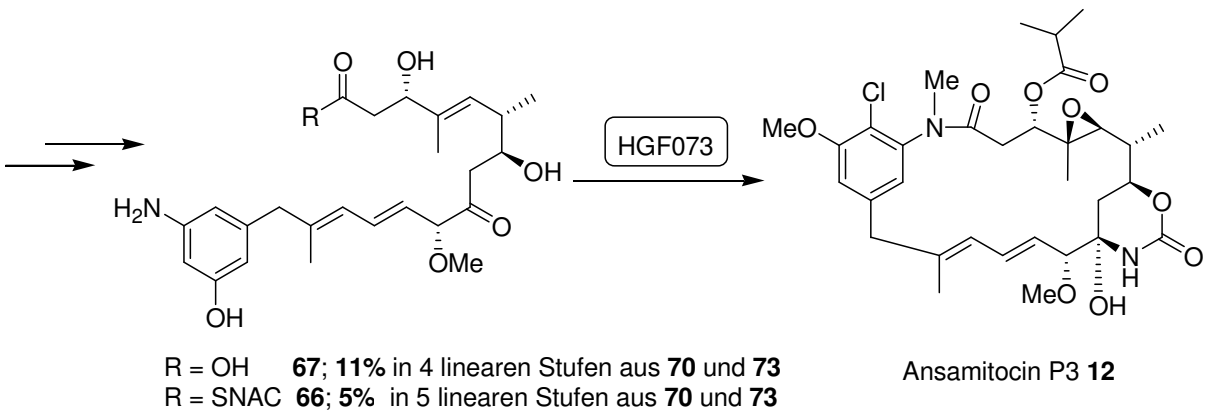
produziert wurde und einen idealen Anbindungspunkt für Linker über HUISGEN-Cycloadditionen darstellt. Diese Anbindung konnte anhand von zwei Beispielen gezeigt werden.



Schema 86. Anbindung der Thiollinker **54** und **57** an Ansamitocinderivat **37f**.

Die freien Thiole können über Disulfidbildung an Proteine gebunden werden, um Wirkstoff-Antikörper-Komplexe zu erzeugen. Damit konnte ein einfacher Zugang zu möglichen Konjugaten erarbeitet werden.

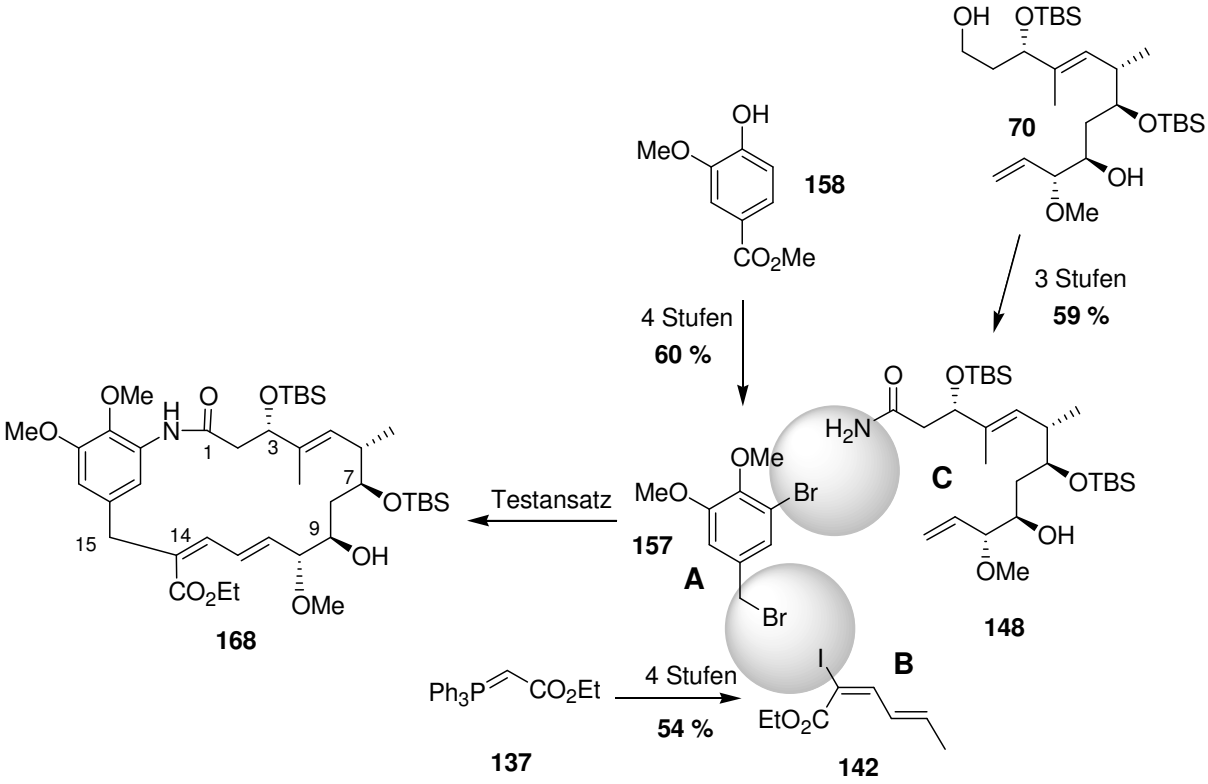
Um die Möglichkeit zur Modifizierung in nicht aromatischen Positionen über mutasynthetische Zugänge zu testen, wurde das natürliche und komplexeste PKS-gebundene Biosyntheseintermediat, *seco-Proansamitocin* **65**, in Form von SNAC-Ester **66** und als freie Carbonsäure **67** synthetisiert. Die Synthese umfasste insgesamt 8 Stufen für **67** und 9 Stufen für **66**.



Schema 87. Chemobiosynthese der seco-Proansamitocine **66** und **67**.

Mit den nachfolgenden Verfütterungsexperimenten an *Actinosynnema pretiosum* Blockmutante HGF073 konnte gezeigt werden, das weit fortgeschrittene Biosyntheseintermediate akzeptiert und zum Naturstoff transformiert werden. Diese Ergebnisse bereiteten den Weg zur Synthese und mutasynthetischen Nutzung von modifiziertem Proansamitocin.

Die dafür geplanten retrosynthetischen Schritte konnten nach einigen Veränderungen der Fragmente **A** und **B** größtenteils realisiert werden. Die Synthese der Fragmente **157**, **142** und **148** gelang in wenigen Stufen und guten Ausbeuten (Schema 88).

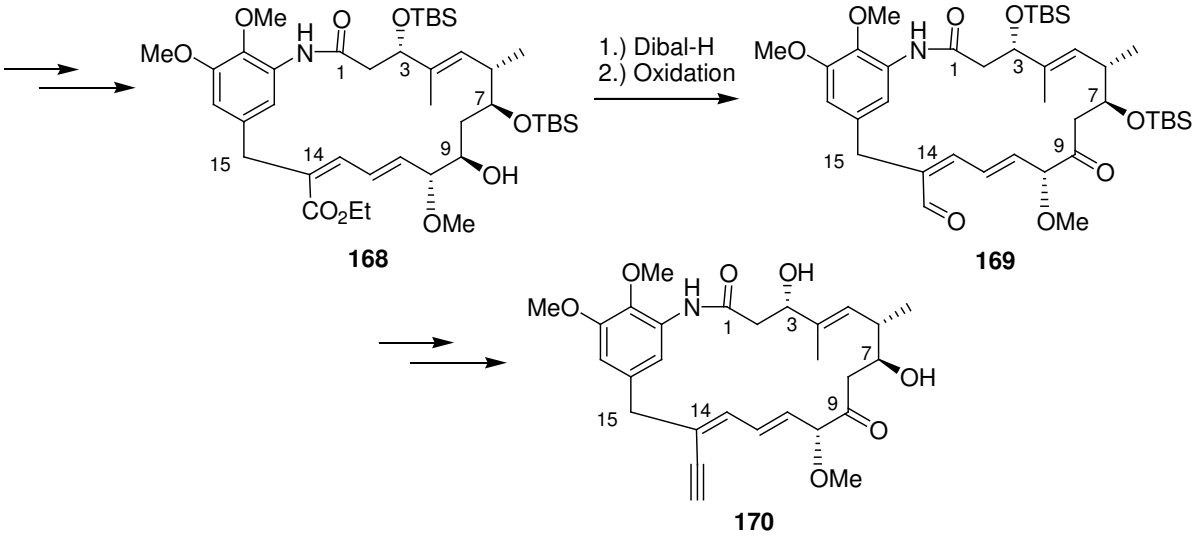


Schema 88. Fragmentsynthesen für den Aufbau von *14-Ethoxycarbonyl-19,20-dimethoxy-proansamitocin*.

Die geplante NEGISHI-Kupplung konnte in guten Ausbeuten verwirklicht werden. Die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung konnte an einem Testbaustein gezeigt werden. Die Anknüpfung des benötigten Bausteins **C** und die anschließende Ringschlussmetathese ist prinzipiell möglich, erfordert jedoch noch Optimierungsarbeiten.

4.2 AUSBLICK

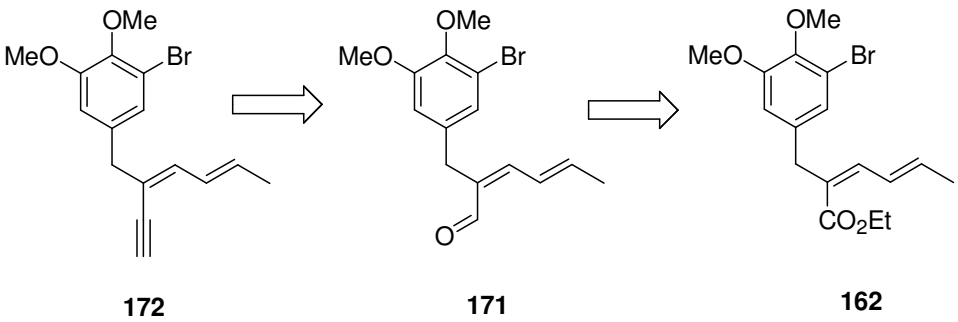
Nach erfolgter Optimierung der HARTWIG-BUCHWALD-KUPPLUNG und der Ringschlussmetathese zu 168 sollte das Lactam in wenigen Stufen in *14-Ethinyl-19,20-dimethoxyproansamitocin* **170** zu überführen sein (Schema 89).



Schema 89. Mögliche Syntheseroute zu *14-Ethinyl-19,20-dimethoxy-proansamitocin* **170**.

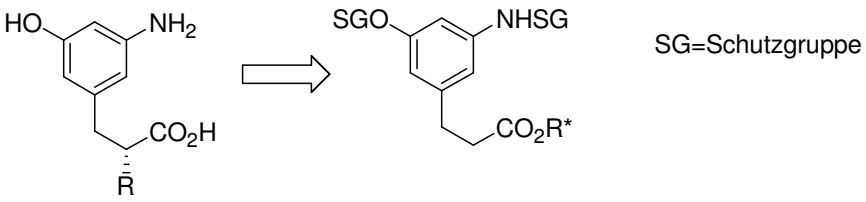
Proansamitocinderivat **170** kann wiederum chemoenzymatisch, durch Verfütterung an *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073, in das entsprechende Ansamitocinderivat überführt werden und anschließend für die Anbindung von Linkern, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, genutzt werden.

Einen zweiten Ansatz um zu Derivat 170 zu gelangen wäre die direkte Überführung des Diens **162** in das entsprechende Dienin **172**. Eventuell sollte dieses bei der Metathese geschützt vorliegen um eine mögliche Enin-Metathese zu verhindern.



Schema 89. Mögliche frühe Einführung des Alkins in C14 Position.

Ein weiterer Ansatz um zu in C14-Position modifizierten Ansamitocinderivaten zu gelangen, wäre die wesentlich weniger aufwendige Synthese des entsprechend modifizierten Diketids **173**. Die Nutzung einer stereoselektiven Alkylierung mit einem Esterenolat stellt eine aussichtsreiche Route zu diesem Baustein dar. Dafür könnte ein Menthol-Ester als dirigierende Gruppe eingesetzt werden (Abbildung 30).



173

Abbildung 30. Möglicher Baustein für weitere chemobiosynthetische Studien.

Bei Annahme durch *Actinosynnema pretiosum* Stamm HGF073 wäre dies ein sehr einfacher Zugang zu semisynthetisch schwer zugänglichen Derivaten von Ansamitocin.

Weiterhin können alle linkergebundenen Derivate in verschiedene Konjugate mit Proteinen oder Vitaminen überführt werden. Eine Möglichkeit ist die Anbindung von Folsäure, da verschieden Krebszellen den Folsäurerezeptor überexprimieren. Die dadurch hervorgerufene Selektivitätssteigerung von Ansamitocin-Folsäurekonjugaten ist beschrieben,[51] die Synthese eines Folsäurederivats mit freier Thiolfunktion und entsprechender Anbindung über Disulfidbindung konnte von TAFT[57] gezeigt werden.
Die Nutzung der Chemobiosynthese zur Erzeugung von Ansamitocinderivaten bietet somit noch eine Vielzahl aussichtsreicher Möglichkeiten, um Ansamitocine mit verbesserten Eigenschaften zu generieren.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 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.

Lösemittel und Reagenzien

Lösemittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren[119] getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt: Tetrahydrofuran wurde mit Benzophenon als Indikator über Natriumdraht refluxiert. Diethylether, Dichlormethan, Acetonitril und Toluol wurden mittels eines MB-SPS (Solvent purification system) von BRAUN zuvor getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt. Alle weiteren absoluten Lösungsmittel wurden käuflich erworben (FLUKA, ACROS). Bei sauerstoffsensiblen Reaktionen wurde das Lösungsmittel vor Gebrauch durch Spülen mit Inertgas oder nach Ausfrieren im Vakuum (*freeze-pump-thaw degassing*) entgast. Alle Reagenzien, deren Herstellung nicht angegeben ist, stammen von den Firmen ACROS, ALDRICH, FLUKA und ABCR. Bei wässrigen Lösungen handelt es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

Säulenchromatographie

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

---

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

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien vom Typ 60 F_{254} der Firma MERCK verwendet. Die Indikation erfolgte durch Fluoreszenzdetektion (λ = 254 nm) und durch unterschiedliche Färbereagenzien[120] (Anisaldehyd-, 2,4-Dinitrophenylhydrazin-, Bromkresolgrün Kaliumpermanganat- oder Ninhydrin-Tauchreagenz) mit anschließender Wärmebehandlung.

HPLC

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

Präparative HPLC wurde an einer MERCK HITACHI LaChrom HPLC-Anlage (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450) durchgeführt. Die verwendeten organischen Lösemittel wurden von der Firma ACROS bezogen und vor Gebrauch im Ultraschallbad entgast. Wasser wurde zunächst über eine Filterkartusche gereinigt und anschließend doppelt destilliert. Die verwendeten Betriebsbedingungen und Retentionszeiten (t_R) sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben. Es wurde entweder eine TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, 250 mm x 8 mm, mit Vorsäule, 40 mm x 8 mm (im Text RP18-Säule genannt) oder eine TRENTEC Reprosil 100 CN 5 µm, 250 mm x 8 mm, mit Vorsäule, 40 mm x 8 mm (im Text CN-Phase genannt) verwendet.

NMR-Spektroskopie

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

---

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

^{13}C-NMR Spektren wurden mit den Geräten AVS-400, DPX-400 (100 MHz) und DRX-500 (125 MHz) der Firma BRUKER aufgenommen. Das verwendete deuterierte Lösemittel ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das vom Lösemittel verursachte Signal. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ_C erfolgt in ppm, die angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren: s = Singulett (entspricht quartärem Kohlenstoff), d = Dublett (tertiärer Kohlenstoff), t = Triplett (sekundärer Kohlenstoff), q = Quartett (primärer Kohlenstoff). Sofern nötig wurden für eine vollständige Interpretation ^{1}H-^{1}H-Korrelationsspektren (COSY) oder ^{1}H-^{13}C-Korrelationsspektren (HMQC, HMBC, HSQC) durchgeführt.

Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem MICROMASS LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695). Alternativ wurden die Messungen an einer Acquity-UPLC (WATERS) Anlage gekoppelt mit einem Q-Tof Premier Massenspektrometer (WATERS) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI) oder durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). MS/MS-Fragmentierungsexperimente wurden mit Argon als Kollisionsgas bei einer Kollisionsenergie von 15 bis 35 eV durchgeführt. Für Verbindungen, die mit dieser Anlage vermessen wurden sind die Retentionszeiten der UPLC angegeben. Verbindungen, die nicht mittels ESI ionisiert werden konnten, wurden mit einem Finnigan MAT 312 mittels Elektronen-Ionisation (EI) mit einem Ionisierungspotential von 70 eV vermessen. Für alle Verbindungen sind berechnete und gefundene Masse angegeben.

Schmelzpunkte

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

5.2 ALLGEMEINE HINWEISE ZU DEN MIKROBIOLOGISCHEN ARBEITEN

Gerätschaften

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

Bakterienstämme

Der verwendete Bakterienstamm HGF073 (In der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins *AHBA* blockierte Mutante; Replikat des publizierten Stammes HGF056)[31] wurde von H.G. FLOSS zur Verfügung gestellt und als Sporensuspension [40 % Glycerin in Wasser] bei -80 °C gelagert.

YMG-Medium (Yeast-Malt-Glucose)

4.0 g Hefe-Extrakt (BACTO), 10.0 g Malz-Extrakt (SIGMA) und 4.0 g D-Glucose wurden in 1L bidest. Wasser gelöst und vor der Verwendung autoklaviert.

YMG-Agar

1L YMG-Medium (siehe oben) wurde mit 22.0 g Agar (BACTO) versetzt und vor der Verwendung autoklaviert.

KOREA-Medium

60.0 g Dextrin (Sigma), 5.25 g Cotton seed flow (PROFLO), 30.0 g D-Maltose-Monohydrat (SIGMA), 4.5 g Hefe-Extrakt (BACTO), 5.0 g Calciumcarbonat, 0.3 g Dikaliumhydrogen-phosphat (FLUKA) und 2 mg Eisensulfat-Heptahydrat wurden in 1L bidest. Wasser gelöst und vor der Verwendung autoklaviert.

Inkubator

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

Die Kultivierung von Flüssigkulturen erfolgte in einem Innova 4900 Schüttelschrank der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 29 °C mit einer Schüttelfrequenz von 200 rpm. Alle

Flüssigkulturen wurden in 250 mL Schikanekolben (bis 50 mL Medium) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (bis 125 mL Medium) mit zusätzlichem Stahlfedereinsatz fermentiert.

Spritzenpumpe

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

Allgemeine Vorschrift für die Fütterungsstudien

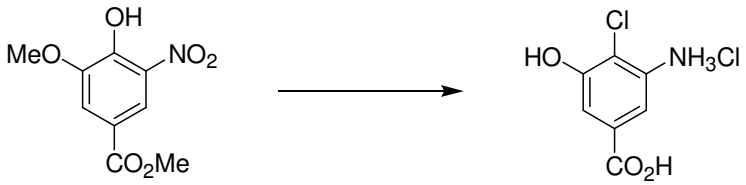
Eine bei -80 °C gelagerte Sporenprobe wurde auf einer YMG-Agar-Platte dünn ausplattiert und bei 30 °C für 72 h inkubiert. Anschließend wurden mehrere gut sporulierte Einzelkolonien selektiert, in Wasser (1 mL) suspendiert und zur Inokulation der YMG-Vorkultur (50 mL) verwendet, welche für 48 h kultiviert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

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

Zur Produktextraktion wurde mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt, zweimal mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet ($MgSO_4$) und im Vakuum eingeengt. Nicht oder schlecht angenommene Mutasynthone resultierten in der Produktion von sehr viel Biomaterial, so dass eine sehr starke Verdünnung zur Extraktion notwendig war. Diese Extraktionen wurden nach vorheriger Zentrifugation des Essigsäureethylester-Kulturgemischs vorgenommen.

5.3 VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 3.1: MUTASYNTHONE

3-Amino-4-chlor-5-hydroxybenzoesäure-Hydrochlorid 22a



24a **22a**

9.82 g (40 mmol; 1 Äq) Nitromethylvanillat **24a**, das aus der Nitrierung von Methylvanillat erhalten wurde[121], wurden in 100 mL DMF gelöst und unter Stickstoff mit 11.3 mL Oxalylchlorid (120 mmol; 3 Äq) bei -20 °C versetzt. Die Mischung wurde auf 80 °C erwärmt und rührte 3 Stunden bei dieser Temperatur. Nach dem Akühlen wurde die Mischung unter intensivem Rühren auf Eis gegossen. Die Mischung wurde filtriert und der Filterkuchen mit Wasser gewaschen bis das Filtrat farblos war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend mit Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 9.46 g Rohprodukt (36.4 mmol), die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

4.94 g (20.2 mmol; 1 Äq)) *4-Chlor-3-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24b** wurden in 60 mL absolutem Dichlormethan gelöst und bei –78 °C tropfenweise mit 60 mL Bortribromidlösung[122] in Dichlormethan (1 mol/L; 60 mmol; 3 Äq) versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und 48 Stunden gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde vorsichtig mit Wasser hydrolysiert und das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es konnten 4.34 g *4-Chlor-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäure* (20 mmol) isoliert werden, die direkt in die nächste Reaktion eingesetzt wurden.

---

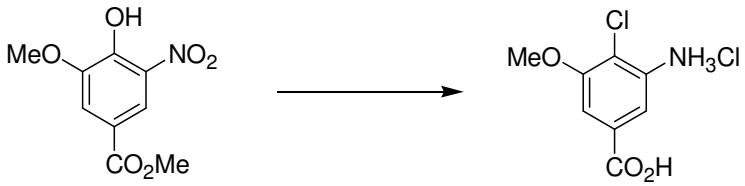
[121] A.I.Meyers, K.A.Babiak, A.L.Campbell, D.L.Comins, M.P.Fleming, R.Henning, M.Heuschmann, J.P.Hudspeth, J.M.Kane, P.J.Reider, D.M.Roland, K.Shimizu, K.Tomioka, R.D.Walkup, *J.Am.Chem.Soc*., **1983**, *105*, 5015-5024. (Nitrierung und Chlorierung)

[122] J.F.W.McOmie, M.L.Watts, D.E.West, *Tetrahedron*, Vol. 24. pp2289-2292, **1968**. (BBr3 Entschützung)

4.34 g (20 mmol; 1 Äq) *4-Chlor-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäure* **24c** wurden in 45 mL Essigsäureethylester gelöst und mit 1.5 mL Eisessig und 22.5 g Zinnchloriddihydrat[123] (100 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung wurde 5 Stunden unter Rückfluss gekocht und nach dem Akühlen auf Raumtemperatur auf Eis gegossen. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf ca. 4-5 eingestellt und das Produkt anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organsiche Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde in wenig halbkonzentrierter Salzsäure suspendiert und 1 Stunde refluxiert. Das nach dem Akkühlen auf Raumtemperatur ausgefallene Hydrochlorid der Aminosäure (3.9 g; 17.4 mmol) wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute über drei Stufen betrug 79 %.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 10.37 (1H, bs, COOH), 8.21 (2H, bs, NH_2), 7.09 (1H, s) 7.00 (1H, s) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): 167.0, 153.8, 142.1, 129.7, 111.5, 109.1, 107.2 ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_5O_3ClN$ $[M-H]^-$: berechnet 185.9958, gefunden 185.9959; **Smp.** = 233.2 °C (Zersetzung).

3-Amino-4-chlor-5-methoxybenzoesäure-Hydrochlorid 22b



24a **22b**

490 mg (2 mmol; 1 Äq) *Nitromethylvanillat* **24a**,[121] das aus der Nitrierung von Methylvanillat erhalten wurde, wurden in 5 mL DMF gelöst und unter Stickstoff mit 0.6 mL Oxalylchlorid (6 mmol; 3 Äq) bei -20 °C versetzt. Die Mischung wurde auf 80 °C erwärmt und rührte 3 Stunden bei dieser Temperatur. Nach dem Akühlen wurde die Mischung unter intensivem Rühren auf Eis gegossen. Die Mischung wurde filtriert und der Filterkuchen mit Wasser gewaschen bis das Filtrat farblos war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend mit Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum

[123] F.D.Bellamy, K.Ou, *Tet.Lett.*, **1984**, *25*, 839-842.

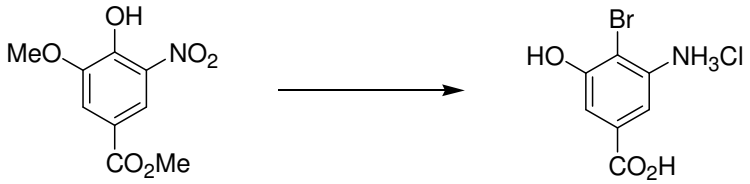
konzentriert. Es resultierten 447 mg Rohprodukt (1.82 mmol; 0.91 Äq), die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

447 mg (1.82 mmol; 1 Äq) *4-Chlor-3-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24b** wurden in 20 mL Methanol gelöst und mit 10 mL Lithiumhydroxydlösung (c = 1 mol/L; 10 mmol; 5.5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 18 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde ca. die Hälfte des Methanols im Vakuum entfernt und die Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht. 408 mg (1.76 mmol; 0.97 Äq) Produkt fielen als beiger Feststoff aus. Das Produkt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

408 mg (1.76 mmol; 1 Äq) *4-Chlor-3-methoxy-5-nitrobenzoesäure* **24d** wurden in 2.5 mL Essigsäureethylester gelöst und mit wenigen Tropfen Eisessig und 990 mg Zinnchloriddihydrat (8.8 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung wurde 5 Stunden unter Rückfluss gekocht und nach dem Akühlen auf Raumtemperatur auf Eis gegossen. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf ca. 4-5 eingestellt und das Produkt anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organsiche Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde in wenig halbkonzentrierter Salzsäure suspendiert und 1 Stunde refluxiert. Das nach dem Akkühlen auf Raumtemperatur ausgefallene Hydrochlorid der Aminosäure (347 mg; 1.46 mmol) wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute über drei Stufen betrug 73 %.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 9.1 – 7.6 (1H, bs, COOH), 7.17 (1H, s), 6.87 (1H, s), 3.83 (3H, s, OMe) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): δ_C = 167.1, 155.2, 144.3, 129.9, 110.5, 110.1, 101.0, 56.0 ppm; **HRMS (ESI)** für $C_8H_7O_3ClN$ $[M-H]^-$: berechnet 200.0114, gefunden 200.0107; **Smp.** = 229.0 °C (Zersetzung).

5-Amino-4-brom-3-hydroxybenzoesäure-Hydrochlorid 23a



24a **23a**

9.82 g (40 mmol; 1 Äq) *Nitromethylvanillat* **24a**, das aus der Nitrierung von Methylvanillat erhalten wurde,[121] wurden in 100 mL DMF gelöst und unter Stickstoff mit 11.3 mL *Oxalylbromid* (120 mmol; 3 Äq) bei -20 °C versetzt. Die Mischung wurde auf 80 °C erwärmt und rührte 21 Stunden bei dieser Temperatur. Nach dem Akühlen wurde die Mischung unter intensivem Rühren auf Eis gegossen. Die Mischung wurde mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend mit Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einrer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (3:1 → 1:1) wurden 4.19 g *4-Brom-3-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24d** erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 36 %. Ausserdem konnten 590 mg (2.15 mmol) des demethylierten Produkts *4-Brom-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24e** erhalten werden. Um das Edukt zu reisolieren wurde anschließend die Natriumhydrogencarbonatphase wieder angesäuert und ebenfalls mit Dichlormethan extrahiert. Es resultierten 2.47 g Edukt (10 mmol).

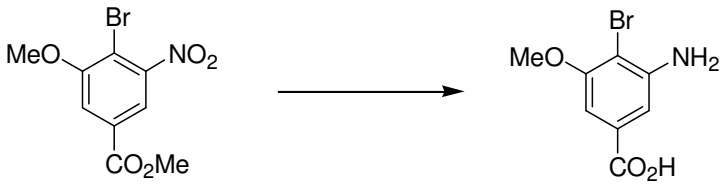
590 mg (2.15 mmol; 1 Äq)) *4-Brom-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24e** wurden in 20 mL Methanol gelöst und mit 11 mL Lithiumhydroxidlösung (c = 1 mol/L; 11 mmol; 5.1 Äq) versetzt. Die Reaktion rührte 18 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Hälfte des Methanols im Vakuum entfernt und die Lösung dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentrirert. Es konnten 516 mg *4-Brom-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäure* **24f** (1.98 mmol) isoliert werden.

502 mg *4-Brom-3-hydroxy-5-nitrobenzoesäure* **24f** (1.92 mmol; 1 Äq) wurden in 4.3 mL Essigsäureethylester gelöst und mit 0.1 mL Eisessig und 2.17 g Zinnchloriddihydrat[123] (9.62 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung refluxierte 5 Stunden und wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur auf Eis gegossen.Der pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf ca. 4-5 eingestellt und das Produkt anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organsiche Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum

konzentriert. Das Rohprodukt wurde in wenig halbkonzentrierter Salzsäure suspendiert und 1 Stunde refluxiert. Das nach dem Akkühlen auf Raumtemperatur ausgefallene Hydrochlorid der Aminosäure (402 mg; 1.5 mmol) wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.
Die Ausbeute über zwei Stufen betrug 72 %.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 11.0 - 10.0 (1H, bs, COOH), 9.2 – 7.5 (2H, bs, NH_2), 7.36 (1H, s), 7.09 (1H, s) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz, DMSO d_6 = 39.52 ppm): δ_C = 167.0, 155.0, 142.8, 130.7, 109.4, 107.4, 103.5 ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_5O_3BrN$ $[M-H]^-$: berechnet 229.9453, gefunden 229.9460; **Smp.** = 207.5 °C (Zersetzung).

3-Amino-4-brom-5-methoxybenzoesäure 23b

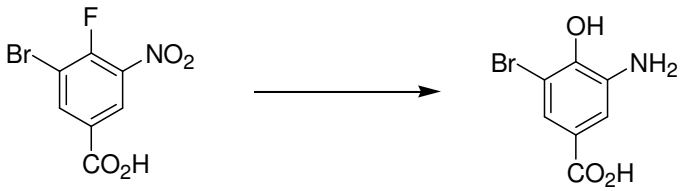


24d **23b**

4.19 g (14.5 mmol; 1 Äq) *4-Brom-3-methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester* **24d** wurden in 145 mL Methanol gelöst und mit 73 mL Lithiumhydroxidlösung (c = 1 mol/L; 73 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Reaktion rührte 18 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Hälfte des Methanols im Vakuum entfernt und die Lösung angesäuert. Die Säure fiel sofort aus und konnte abfiltriert werden. Nach dem Trocknen resultierten 3.89 g Produkt. Das entspricht einer Ausbeute von 98 %.
3.89 g *4-Brom-3-methoxy-5-nitrobenzoesäure* **24g** (14.1 mmol; 1 Äq) wurden in 32 mL Essigsäureethylester gelöst und mit 1.1 mL Eisessig und 15.9 g Zinnchloriddihydrat[123] (70.6 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung refluxierte 5 Stunden und wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur auf Eis gegossen.Der pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf ca. 4-5 eingestellt und das Produkt anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organsiche Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es konnten 3.37 g *5-Amino-4-brom-3-methoxy-benzoesäure* **23b** (13.7 mmol) isoliert werden. Die Ausbeute über zwei Stufen betrug 95 %.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 7.08 (1H, s), 6.75 (1H, s), 5.59 (2H, bs, NH_2), 3.82 (3H, s, OMe) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): δ_C = 167.3, 156.1, 147.1, 130.7, 109.14, 100.9, 99.5, 56.1 ppm; **HRMS** (ESI) für $C_8H_7O_3BrN$ $[M-H]^-$: berechnet 243.9609, gefunden 243.9607; **Smp.** = 186.6 °C.

3-Amino-5-brom-4-hydroxybenzoesäure 26



28a **26**

264 mg *3-Brom-4-fluor-5-nitrobenzoesäure*[124] **28a** (1 mmol; 1 Äq), wurden mit 224 mg Kaliumhydroxid (4 mmol; 4 Äq), 37 mg Palladiumdibenzylidenaceton (0.04 mmol; 0.04 Äq) und 34 mg ^{t}Butyl-XPhos in 5 mL Dioxan und 5 mL Wasser gelöst, die Lösung mit Argon gespült und 16 h bei 60 °C gerührt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

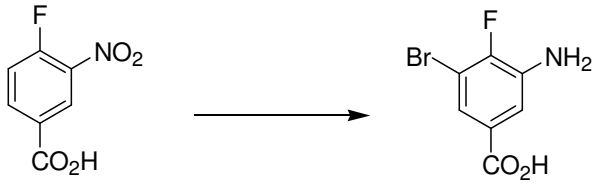
263 mg *3-Brom-4-hydroxy-5-nitrobenzoesäure* **26a** (1 mmol; 1 Äq) wurden in 5 mL Essigsäureethylester gelöst, mit einem Tropfen Essigsäure und 1.1 g Zinnchloriddihydrat[123] (5 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung refluxierte 2 Stunden und wurde dann direkt auf das etwa dreifache Volumen Eiswasser gegossen. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf 4-6 gebracht und das Rohprodukt bei diesem pH-Wert mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach einer Filtersäule mit einer Dichlormethan-Methanol-Mischung (3:1) resultierten 213 mg *3-Amino-5-brom-4-hydroxybenzoesäure* **26** (0.92 mmol) als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 92 % über 2 Stufen.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 7.26 (1H, d, J = 1.9 Hz) 7.22 (1H, d, J = 1.9 Hz) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): 166.59 (s, CO), 144.26 (s, Ar-C), 138.70 (s, Ar-C), 123.66 (s, Ar-C), 121.18 (s, Ar-C), 114.43 (d, Ar-

[124] Dargestellt wie in der Synthese von 27 beschrieben.

C), 110.07 (d, Ar-C) ppm; **HRMS** (ESI) für $C_7H_7O_3BrN$ $[M+H]^+$: berechnet 231.9609, gefunden 231.9606; **Smp.** = 163.1 °C.

3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoesäure 27



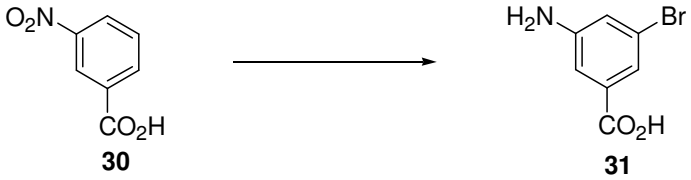
28 **27**

10 g *4-Fluor-3-nitrobenzoesäure* **28** (54 mmol; 1 Äq) wurden in 300 mL konzentrierter Schwefelsäure gelöst, mit 7.6 g Silber(II)sulfat (28.6 mmol; 0.53 Äq) und 3.2 mL Brom (62.1 mmol; 1.15 Äq) versetzt und 4 Stunden bei 115 °C refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung auf Eis gegossen und der Feststoff abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung ausgewaschen und das resultierende Filtrat wiederum mit Salzsäure (c = 1 mol/L) versetzt bis ein pH-Wert von 1 herrschte. Die dabei ausfallende *3-Brom-4-fluor-5-nitrobenzoesäure* **28a** wurde abfiltriert, getrocknet und direkt für die Reduktion der Nitrogruppe eingesetzt.

9.7 g *3-Brom-4-fluor-5-nitrobenzoesäure* **28a** (36.7 mmol; 1 Äq) wurden in 350 mL Essigsäureethylester gelöst und mit 41.4 g Zinn(II)chloriddihydrat[123] (183.5 mmol; 5 Äq) und einigen Tropfen Eisessig versetzt. Die Mischung refluxierte 3 Stunden bei 80 °C und wurde nach dem Abkühlen auf viel Eiswasser gegossen und mit Natronlauge auf pH 6 – 7 eingestellt. Bei diesem pH-Wert wurde das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Es resultierten 7 g *3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoesäure* **27** (30 mmol) als hellgrauer Feststoff. Das entspricht einer Ausbeute von 56 % über 2 Stufen.

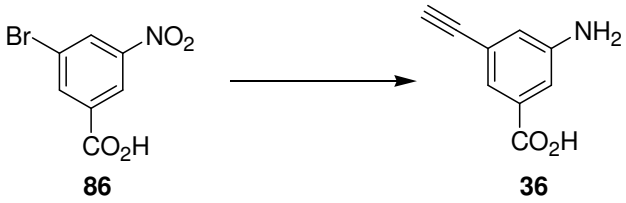
^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 7.01 (1H, bs, Ar-H), 7.00 (1H, bs, Ar-H), 5.57 (2H, bs, NH_2) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): δ_C = 164.8 (s, CO_2H), 149.8 (s, Ar-C), 147.3 (s, Ar-C), 145.9 (s, Ar-C), 120.8 (d, Ar-C), 115.1 (d, Ar-C), 109.5(d, J^{C-F} = 22.4 Hz, Ar-C-F) ppm; **HRMS** (ESI) für $C_7H_4NO_2FBr[M-H]^-$: berechnet 231.9409, gefunden 231.9409; **Smp.** = 182.9°C.

3-Amino-5-brombenzoesäure 31



Die Darstellung von *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** erfolgte wie auf Seite 156 beschrieben.

3-Amino-5-ethinylbenzoesäure 36



5.87 g *3-Brom-5-nitrobenzoesäure*[125] **86** (23.6 mmol; 1 Äq) wurden in 100 mL Methanol gelöst und mit einigen Tropfen Schwefelsäure versetzt. Die Mischung refluxierte 20 Stunden, wurde dann mit Natronlauge auf pH 3-4 eingestellt und das Methanol größtenteils im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 6.13 g *3-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester* **86a** in einer Ausbeute von 99 % als leicht gelblicher Feststoff. Dieser wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.
4.4 g *3-Brom-5-nitrobenzoesäuremethylester* **86a** (16.9 mmol; 1 Äq) wurden in 50 mL Triethylamin gelöst und unter Argon mit 385 mg Triphenylphosphin (1.7 mmol; 0.1 Äq), 64.8 mg Kupfer(I)iodid (0.34 mmol; 0.02 Äq), 195 mg $Pd(dba)_2$ (0.34 mmol; 0.02 Äq) und 4.8 mL Trimethylsilylacetylen (33.8 mmol; 2 Äq) bei Raumtemperatur versetzt[126]. Die Mischung rührte 20 Sunden bei Raumtemperatur und wurde nach dieser Zeit mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und das Rohprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet,

[125] Aus der Bromierung von Nitrobenzoesäure; siehe Verbindung **87**.

[126] T.Nishinaga, A.Tanatani, K.Oh, J.S.Moore, *J.Am.Chem.Soc.,* **2002***, 124*, 5934–5935. (Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen)

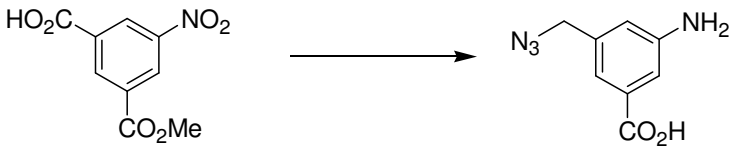
filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach einer Filtersäule mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) konnten 4.6 g *3-(Trimethylsilyl)-ethinyl-5-nitrobenzoesäuremethylester* **86b** (16.6 mmol; 1 Äq) in einer Ausbeute von 98 % isoliert werden. Das Produkt wurde direkt in die nächste Stufe eingesezt.

2.5 g *3-(trimethylsilyl)-ethinyl-5-nitrobenzoesäuremethylester* **86b** (12 mmol; 1 Äq) wurden in 60 mL Methanol gelöst und mit 60 mL Lithiumhydroxidlösung (c=1 mol/L; 60 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 1 Stunde bei 60 °C bevor sie mit Salzsäure (c = 1 mol/L) auf pH 3-4 gebracht wurde und das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 2.2 g *3-Ethinyl-5-nitrobenzoesäure* **86c** (11.5 mmol) in einer Ausbeute von 96 %, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

2.2 g *3-Ethinyl-5-nitrobenzoesäure* **86c** (11.5 mmol; 1 Äq) wurden in 25 mL Essigsäureethylester gelöst, mit einigen Tropfen Essigsäure und 12.9 g Zinn(II)chlorid-dihydrat[123] (57.5 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung refluxierte 2 Stunden bevor sie auf Eis gegossen und mit Natriumcarbonatlösung auf pH 5-6 gebracht wurde. Nach starker Verdünnung mit Wasser wurde das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser und anschließend Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Konzentration im Vakuum resultierten 1.35 g *3-Amino-5-ethinylbenzoesäure* **36** (8.4 mmol) in einer Ausbeute von 73 % in Form eines hellgelben Feststoffs.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 7.19 (1H, s, Ar-H), 7.11 (1H, s, Ar-H), 6.84 (1H, s, Ar-H), 5.53 (2H, bs, NH_2), 4.07 (1H, s, Ethinyl-H) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): δ_C = 167.1 (s, CO), 149.2 (s, Ar-C), 131.9 (s, Ar-C), 122.2 (d, Ar-C), 120.1 (s, Ar-C), 119.6 (d, Ar-C), 115.2 (d, Ar-C), 83.5 (s, Alkin-C), 79.9 (d, Alkin-C) ppm; **HRMS** (EI) für $C_9H_7O_2N$ $[M]^+$: berechnet 161.0477, gefunden 161.0478; **Smp.** = 167.8 °C.

3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure 38



38a **38**

5.5 g *5-Nitroisophthalsäuremethylester* **38a** (24.4 mmol; 1 Äq) wurden in 15 mL THF gelöst und auf –10 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden langsam 4.3 mL Boran-Dimethylsulfid-Komplex gelöst in 44 mL THF dazugetropft. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend 15 min bei 80 °C unter Rückfluss gehalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3 mL Essigsäure-Wasser-Mischung (1:1) abgebrochen und das Gemisch anschließend mit Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Das THF wurde abdestilliert und der Rückstand mit Essigsäureethylester und Wasser versetzt. Nach Extraktion des Rohprodukts mittels Essigsäureethylester wurden die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Es resultierten 6 g Rohprodukt, die säulenchromatographisch mit einer Dichlormethan-Methanol-Mischung (50:1) gereinigt wurden. Es konnten 4.9 g *3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester* **38b** (23.2 mmol; 1 Äq) in einer Ausbeute von 95 % isoliert werden, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

4.5 g *3-Hydroxymethyl-5-nitrobenzoesäuremethylester* **38b** (21.3 mmol; 1 Äq) wurden in 150 mL Ethanol gelöst und mit 0.5 g Palladium auf Kohle (0.4 mmol; 0.02 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 8 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre und wurde dann über Kieselgur filtriert. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Es konnten 3.6 g *3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester* **38c** (19.9 mmol; 0.9 Äq) in einer Ausbeute von 86 % in guter Reinheit isoliert werden. Das Produkt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

3.5 g *3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester* **38c** (19.3 mmol; 1 Äq) wurden in 55 mL THF gelöst und mit 2.7 mL Acetanhydrid (29 mmol; 1.5 Äq) und 4.0 mL Triethylamin (29 mmol; 1.5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 6 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie durch die Zugabe von Natriumbicarbonatlösung beendet wurde. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Anschließend wurde aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Es resultierten 3.2 g sauberer *3-Acetamino-5-*

hydroxymethylbenzoesäure-methylester **38d** (14.2 mmol) in einer Ausbeute von 74 %, der sofort in die nächste Stufe eingesetzt wurde.

3.1 g *3-Acetamino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester* **38d** (13.9 mmol; 1 Äq) wurden in 70 mL Dichlormethan gelöst und mit 2.47 mL Pyridin (30.6 mmol; 2.2 Äq) versetzt. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 2.2 mL Thionylchlorid (30.6 mmol; 2.2 Äq) versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser hydrolysiert. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach chromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1 → 1:1) konnten 1.6 g *3-Acetamino-5-chlormethyl-benzoesäuremethylester* **38e** (6.6 mmol) in einer Ausbeute von 47 % isoliert werden. Das Produkt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

1.5 g *3-Acetamino-5-chlormethylbenzoesäuremethylester* **38e** (6.2 mmol; 1 Äq) wurden in einer Mischung aus 10 mL Aceton und 3 mL Wasser gelöst und mit 2.4 g Natriumazid (37.2 mmol; 6 Äq) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Aceton im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und dirkekt auf Kieselgel aufrotiert. Nach einer kurzen Filtersäule mit einer Petrolether-Essigsäureethylestermischung (1:1) konnten 1.3 g *3-Acetamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester* **38f** (5.33 mmol) in einer Ausbeute von 86 % isoliert werden, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

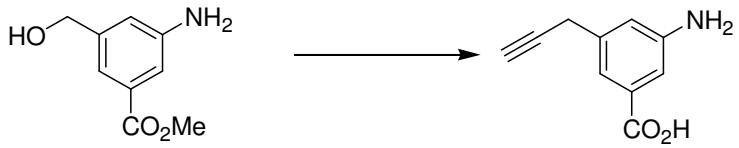
1.3 g *3-Acetamino-5-azidomethylbenzoesäuremethylester* **38f** (5.33 mmol; 1 Äq) wurden in 60 mL Methanol gelöst und mit 26.7 mL Lithiumhydroxidlösung (c= 1mol/L; 26.7 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 4 Stunden bei 55 °C. Anschließend wurde das Methanol im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. 1.2 g *3-Acetamino-5-azidomethylbenzoesäure* **38g** (5.33 mmol) konnten in quantitativer Ausbeute isoliert werden und wurden direkt für die letzte Entschützung eingesetzt.

1.2 g *3-Acetamino-5-azidomethylbenzoesäure* **38g** (5.33 mmol; 1 Äq) wurden in 25 mL Wasser gelöst und mit 5.3 mL konzentrierter Salzsäure (53 mmol; 10 Äq) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten kristallisierte das Produkt nicht aus, sodass der pH-Wert auf 5 eingestellt wurde und die Aminosäure mit Essigsäureethylester extrahiert wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden über

Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 0.7 g *3-Amino-5-azidomethylbenzoesäure* **38** (3.5 mmol) in einer Ausbeute von 66 %.

^{1}H-NMR (MeOD, 400 MHz, MeOD = 3.31 ppm): δ_H = 7.33 (1H, bs, Ar-H), 7.28 (1H, bs, Ar-H), 6.88 (1H, bs, Ar-H), 4.29 (2H, s, CH_2) ppm; **^{13}C-NMR** (MeOD, 100 MHz, MeOD = 49.00 ppm): δ_C =170.3, 149.9, 138.2, 119.8, 119.6, 116.9, 55.4 ppm; **HRMS (ESI)** für $C_8H_7O_2N_4$ $[M-H]^-$: berechnet 191.0569, gefunden 191.0569; **Smp.**: 115.9 °C.

3-Amino-5-propargylbenzoesäure 40



38c **40**

3-Amino-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester **38c** wurde wie für **38** beschrieben dargestellt. 10.6 g dieses Substrats (58.6 mmol; 1 Äq) wurden in 120 mL Ethanol gelöst und mit 14.2 mL Di^{t}butyldicarbonat (64.4 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Lösung rührte 20 Stunden bei 30 °C, bevor das Lösemittel im Vakuum entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde mit einer Dichlormethan-Methanol-Mischung (10:1) über eine kurze Filtersäule gereinigt. Es resultierten 15.5 g des Boc-geschützten Anilins (55.1 mmol; 0.9 Äq) in Form eines weißen Feststoffs und einer Ausbeute von 94 %. Das Produkt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

15.5 g des Boc-geschützten Anilins (55.1 mmol; 1 Äq) wurden in 220 mL Dichlormethan gelöst und mit 19.5 g Triphenylphosphin (74.39 mmol; 1.4 Äq) und 5.6 g Imidazol (82.7 mmol; 1.5 Äq) versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur langsam mit 3.7 mL Brom (71.6 mmol; 1.3 Äq) versetzt. Die Suspension rührte 30 min bei 0 °C und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 mL Wasser beendet und die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Thiosulfatlösung und anschließend Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Dichlormethan-Methanol-Mischung (50:1 → 20:1) gereinigt. Es resultierten 17.1 g des

Benzylbromids (49.6 mmol) in Form eines weißen Feststoffs und einer Ausbeute von 90 %. Das Produkt wurde direkt in die folgende Reaktion eingesetzt.

4 mL TMS-Acetylen (28.4 mmol) wurden unter Argon in 15 mL THF gelöst und bei -78 °C langsam mit 11.4 mL *n*-Butyllithium-Lösung (c= 2.5 mol/L Hexan) versetzt.

In einem zweiten Kolben wurden 2.26 g Indium(III)chlorid (10.2 mmol) ausgeheizt und nach dem Abkühlen in 15 mL THF suspendiert. Bei -78 °C wurde langsam die Lithium-TMS-Acetylen-Lösung zugetropft. Nach beendeter Zugabe rührte die Mischung 30 min bei -78 °C, wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und rührte auch bei dieser Temperatur nochmals 30 min.

In einem dritten Kolben wurden 5 g des Benzylbromids (14.6 mmol; 1 Äq) unter Argon in 60 mL THF gelöst und mit 0.22 g $Pd(dppf)Cl_2xCH_2Cl_2$ (0.29 mmol;0.02 Äq) versetzt. Die Mischung wurde auf 65 °C erwärmt, bei dieser Temperatur mit der vorher hergestellten Indiumtri-(trimethylsilylacetylen)-Lösung (10.2 mmol; 0.7 Äq) versetzt und 20 Stunden bei 65 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde mit Methanol hydrolysiert und das Rohprodukt direkt auf Kieselgel aufgebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1 → 5:1) konnten 4.4 g *3-Boc-Amino-5-(TMS-propargyl)-benzoesäuremethylester* **40a** (12.1 mmol) in einer Ausbeute von 83 % isoliert werden.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$ = 7.26 ppm): δ_H = 7.83 (1H, s, Ar-H), 7.71 (1H, s, Ar-H), 7.69 (1H, s, Ar-H), 3.90 (3H, s, CO_2Me), 3.66 (2H, s, Propargyl-CH_2), 1.52 (9H, s, Boc-H), 0.20 (9H, s, TMS-H) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 166.7 (s, CO_2Me), 152.5 (s, Boc-CO), 138.8 (s, Ar-C), 137.8 (s, Ar-C), 131.0 (s, Ar-C), 123.7 (d, Ar-C), 122.3 (d, Ar-C), 117.7 (d, Ar-C), 103.3 (s, Propargyl-2-C), 87.8 (s, Propargyl-1-C), 80.9 (s, Boc), 52.2 (q, CO_2Me), 28.3 (q, Boc), 26.1 (t, Propargyl-3-C), 0.0 (q, TMS) ppm; **HRMS** (EI) für $C_{19}H_{27}O_4NSi$ $[M]^+$: berechnet 361.1709, gefunden 361.1712.

4.4 g *3-Boc-Amino-5-(TMS-propargyl)-benzoesäuremethylester* **40a** (12.1 mmol; 1 Äq) wurden in 100 mL Dichlormethan gelöst und bei -55 °C langsam mit 36.3 mL Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung (c = 1 mol/L Hexan; 36.3 mmol; 3 Äq) versetzt. Nach 30 min wurde das Kühlbad entfernt und die Mischung 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da nach Ablauf dieser Zeit und auch nach dem Erwärmen auf 40 °C die Reaktion nicht abgeschlossen war, wurden 8 mL DIBAL-H-Lösung (8 mmol; 0.7 Äq) nachgegeben.

Nach zwei weiteren Stunden war die Reaktion vollständig abgeschlossen und wurde zum Hydrolysieren auf 250 mL eiskalte Kalium-Natriumtartrat-Lösung gegeben. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und zwei Stunden stark gerührt. Nach der Phasentrennung wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach einer kurzen Filtersäule mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1) resultierten 2.9 g *3-Hydroxymethyl-5-(trimethylsilyl)-propargyl-N-Boc-Anilin* **40b** (8.6 mmol; 0.7 Äq) in einer Ausbeute von 71 %, die sofort in die nächste Reaktion eingesetzt wurden.

2.9 g *3-Hydroxymethyl-5-(trimethylsilyl)-propargyl-N-Boc-Anilin* **40b** (8.6 mmol; 1 Äq) wurden in 150 mL Aceton gelöst und mit 4.3 mL Jones-Reagenz versetzt. Die rotbraune Lösung rührte 4.5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit war das Edukt umgesetzt und die Lösung grün gefärbt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 mL Isopropanol gestoppt. Nach 10 minütigem Rühren wurden 150 mL Wasser zugegeben und Aceton und Isopropanol im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 2.7 g *3-N-Boc-Amino-5-(trimethylsilyl)-propargylbenzoesäure* **40c** (7.9 mmol) in einer Ausbeute von 92 %. Das Produkt wird direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

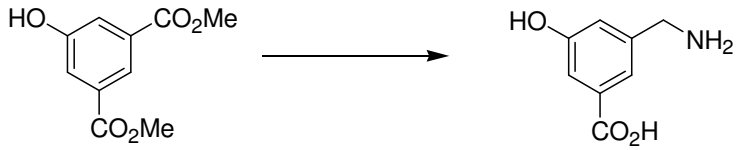
2.7 g *3-N-Boc-5-(trimethylsilyl)-propargylbenzoesäure* **40c** (7.9 mmol; 1 Äq) wurden in 300 mL Dichlormethan gelöst, mit 22.3 mL TFA (316 mmol; 40 Äq) versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zum Hydrolysieren wurde langsam Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben, bis der pH-Wert zwischen 3 und 4 lag. Die ausfallenden Salze wurden abfiltriert und das Filtrat mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser mehrmals gewaschen, anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 1.8 g *3-Amino-5-(trimethylsilyl)-propargylbenzoesäure* **40d** (7.3 mmol) in einer Ausbeute von 92 %, die direkt für die letzte Entschützung verwendet wurden.

1.8 g *3-Amino-5-(trimethylsilyl)-propargylbenzoesäure* **40d** (7.3 mmol; 1 Äq) wurden in 150 mL Methanol gelöst, auf 50 °C erwärmt und bei dieser Temperatur mit 2.1 g Kaliumfluorid (36.5 mmol; 5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 6 Stunden bevor erneut 0.85 g Kaliumfluorid (14.6 mmol; 2 Äq) zugegeben wurde. Nach 20 Stunden Reaktionszeit war noch Edukt vorhanden, so dass erneut 0.85 g Kaliumfluorid (14.6 mmol; 2 Äq) zugesetzt wurden. Die Reaktion war nach 48 Stunden abgeschlossen und wurde durch die Zugabe von Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 4 beendet. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt

und das Rohprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Der dunkle ölige Rückstand wurde mit so wenig wie möglich halbkonzentrierter Salzsäure aufgekocht und anschließend im Kalten auskristallisieren gelassen. Es resultierten 1.3 g *3-Amino-5-propargylbenzoesäure-hydrochlorid* **40** (6.1 mmol) in Form von gelb-orangen Kristallen und einer Ausbeute von 83 %.

^{1}H-NMR (DMSO d_6, 400 MHz, DMSO d_6 = 2.50 ppm): δ_H = 12.59 (1H, bs, COOH), 7.05 (1H, s, Ar-H), 7.04 (1H, s, Ar-H), 6.74 (1H, s, Ar-H), 5.35 (2H, bs, NH_2), 3.52 (2H, d, *J* = 2.7 Hz, Bn-CH_2), 3.05 (1H, t, *J* = 2.7 Hz, Propargyl-H) ppm; **^{13}C-NMR** (DMSO d_6, 100 MHz,DMSO d_6 = 39.52 ppm): 167.8 (s, CO), 149.0 (s, Ar-C), 137.1 (s, Ar-C), 131.5 (s, Ar-C), 117.2 (d, Ar-C), 116.1 (d, Ar-C), 112.9 (d, Ar-C), 82.4 (s, Propargyl-C), 73.1 (d, Propargyl-C), 23.8 (t, Bn-CH_2) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{10}H_9NO_2$ $[M]^+$: berechnet 175.0633, gefunden 175.0632; **Smp.** = 158.8 °C .

3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäure 45



46 **45**

27 g *3-Hydroxyisophthalsäuremethylester* **46** (128 mmol; 1 Äq) wurden in 200 mL Methanol gelöst und mit 8.63 g Lithiumhydroxid (360 mmol; 2.8 Äq) gelöst in 100 mL Wasser versetzt. Die Mischung rührte über Nacht bei 35 °C. Da keine Produktbildung erfolgte wurde die Temperatur auf 45 °C erhöht und nach und nach 1.72 g Lithiumhydroxid (71.8 mmol; 0.6 Äq) zur Lösung gegeben. Nach 20 Stunden war die Reaktion laut Dünnschichtchromatographie abgeschlossen. Die Mischung wurde mit Salzsäure (c=2 mol/L) angesäuert und das Rohprodukt bei pH 4 - 6 mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach Reinigung über eine Kieselgel-Filtersäule mit einer Dichlormethan-Methanol-Mischung (3:1) konnten 21.3 g *3-Hydroxyisophthalsäure-monomethylester* **46a** (109 mmol) in einer Ausbeute von 85 % isoliert werden, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

19.7 g *3-Hydroxyisophthalsäuremonomethylester* **46a** (100 mmol; 1 Äq) wurden in 100 mLTetrahydrofuran gelöst und auf -10 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 20.5 mL Boran-Dimethylsulfid-Komplex (216 mmol; 2.2 Äq) gelöst in 200 mL Tetrahydrofuran langsam zugetropft. Anschließend wurde die Temperatur 10 Minuten auf 88 °C erwärmt, dann auf Raumtemperatur gekühlt und mit 20 mL Essigsäure (v = 50 %) vorsichtig hydrolysiert. Die Mischung wurde mit Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und Tetrahydrofuran wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen und nacheinander mit Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 13.1 g *3-Hydroxy-5-hydroxymethyl-benzoesäuremethylester* **46b** (72 mmol) in einer Ausbeute von 72 %, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

5.5 g *3-Hydroxy-5-hydroxymethylbenzoesäuremethylester* **46b** (30 mmol; 1 Äq) wurden in 150 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Dichlormethan (1:1) gelöst und bei 0 °C mit 2.8 mL Phosphortribromid (30 mmol; 1 Äq) gelöst in 50 mL der Tetrahydrofuran-Dichlormethan-Mischung (1:1) tropfenweise versetzt. Die Mischung rührte 30 Minuten bei 0 °C und 20 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie zum Hydrolysieren auf Eiswasser gegossen wurde. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1) konnten 6.6 g *3-Brommethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46c** (26.9 mmol) in einer Ausbeute von 90 % isoliert werden, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

6.6 g *3-Brommethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46c** (26.9 mmol; 1 Äq) wurden in 157 mL Dimethylformamid gelöst und mit 5.23 g Natriumazid (80.5 mmol; 3 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei 50 °C. Anschließend wurde mit 200 mL Wasser hydrolysiert und das Rohprodukt mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 5.2 g *3-Azidomethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46d** (25.1 mmol) in einer Ausbeute von 93 %, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden.

5.0 g *3-Azidomethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46d** (24.1 mmol; 1 Äq) wurden in 157 mL Methanol gelöst und mit 2.57 g Palladium auf Kohle (w = 10 %; 2.4 mmol; 0.1 Äq) versetzt. Die Mischung rührte bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre. Nach 3.5 Stunden wurde die Suspension über Kieselgel filtriert, mit Methanol nachgewaschen und

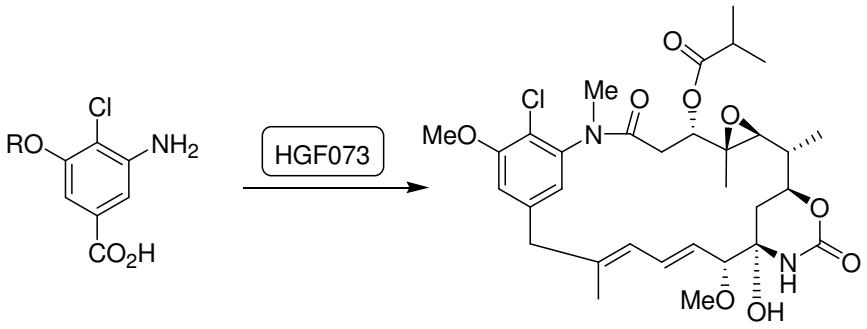
das Filtrat im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch nacheinander mit 1) Essigsäureethylester und 2) Methanol gereinigt. Es konnten 1.45 g *3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46e** (8 mmol) in einer Ausbeute von 33 % isoliert werden, die direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurden. Während der Reduktion der Azidogruppe ist eine Dimerisierung durch den Angriff des Benzylamins auf das noch vorhandene Azid aufgetreten. Es konnten 1.9 g des Dimers (5.5 mmol) in einer Ausbeute von 22 % isoliert werden.

1.25 g *3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäuremethylester* **46e** (6.8 mmol; 1 Äq) wurden in 62.5 mL Methanol gelöst und mit 62.5 mL Lithiumhydroxidlösung (c = 1 mol/L) versetzt. Die Mischung rührte 6 Stunden bei 40 °C bevor sie mit Salzsäure angesäuert wurde (c = 2 mol/L) und das Methanol im Vakuum entfernt wurde. Das Produkt konnte nicht mit Essigsäureethylester extrahiert werden, so dass die wässrige Phase auf diese Weise gereinigt wurde und dann im Vakuum konzentiert wurde. Die Produkt-Lithiumchlorid-Mischung wurde in 14 mL Salzsäure (c = 5 mol/L) aufgenommen und 1 Stunde refluxiert, bis die Substanz vollständig in Lösung war. Anschließend wurde auf 4 °C gekühlt, das ausgefallene Hydrochlorid der Aminosäure abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es resultierten 1.3 g *3-Aminomethyl-5-hydroxybenzoesäurehydrochlorid* **45** (6.4 mmol) in einer Ausbeute von 94 %.

^{1}H-NMR (MeOD, 400 MHz, MeOH = 3.31 ppm): δ_H = 7.60 (1H, bs, Ar-H), 7.47 (1H, bs, Ar-H), 7.13 (1H, bs, Ar-H), 4.11 (2H, s, CH_2) ppm; **^{13}C-NMR** (MeOD, 100 MHz, MeOD = 49.00 ppm): 169.1 (s, CO_2H), 159.5 (s, Ar-C), 136.1 (s, Ar-C), 134.2 (s, Ar-C), 121.9 (d, Ar-C), 121.4 (d, Ar-C), 118.0 (d, Ar-C), 44.0 (t, CH_2) ppm; **t_R (UPLC)** = 0.29 min; **HRMS** (ESI) für $C_8H_7O_2N_4$ $[M-H]^-$: berechnet 166.0504, gefunden 166.0501; **Smp.**: 247.0 °C (Zersetzung).

5.4 VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 3.1: ANSAMITOCIN-DERIVATE

Verfütterung der 4-Chlor-AHBA-Derivate 22a und 22b



22a: R= H
22b: R= Me

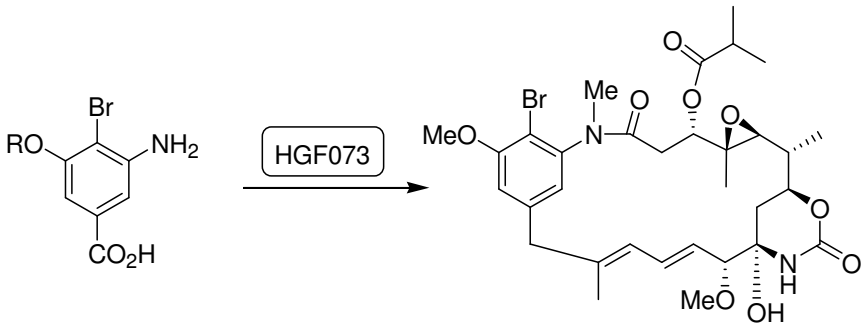
12

Die Mutasynthese mit *3-Amino-4-chlor-5-hydroxybenzoesäure* **22a** und *3-Amino-4-chlor-5-methoxybenzoesäure* **22b** wurde jeweils im 50 mL Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. Die Zufütterung der Mutasynthone erfolgte kontinuierlich über 5 Tage. Der Rohextrakt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten (80: 20 → 100 % Acetonitril; 85 min) über eine RP18-Säule gereinigt. Die Ausbeuten an *Ansamitocin P3* **12** wurden mittels HPLC-Analytik UV-spektroskopisch bei $\lambda = 248$ nm nach vorheriger Kalibration bestimmt. Sie betrug für die Zufütterung von **22a** 1.0 % (9.8 mg/L) und für **22b** 0.08 % (0.7 mg/L). Die analytischen Daten entsprachen denen des Naturstoffs.[23]

t_R (UPLC) = 2.52 min; **HRMS (ESI)** für $C_{32}H_{44}N_2O_9Cl$ $[M+H]^+$: berechnet 635.2735, gefunden 635.2720.

Die erstellte Kalibrationsgerade und die Chromatogramme befinden sich im Kapitel 3.1.2 auf Seite 24.

Verfütterung der 4-Brom-AHBA-Derivate 23a und 23b



23a: R= H
23b: R= Me

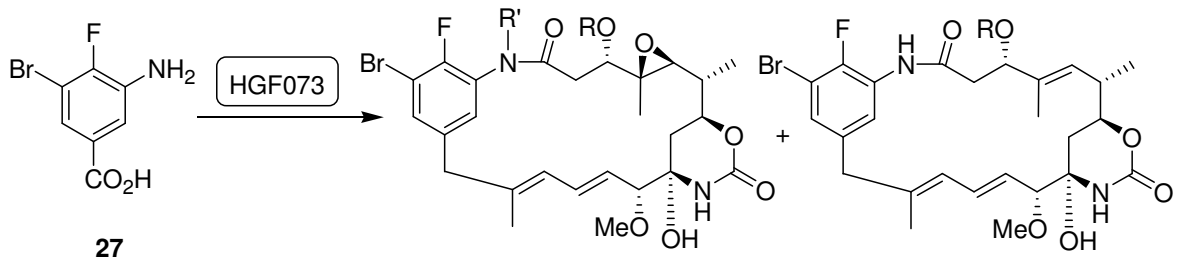
25

Die Mutasynthese und Ausbeutebestimmung mit *3-Amino-4-brom-5-hydroxybenzoesäure* **23a** und *3-Amino-4-brom-5-methoxybenzoesäure* **23b** wurde analog der mit den Chlor-AHBA-Derivaten **22a** und **22b** durchgeführt. Die Ausbeute für die Zufütterung von **23a** betrug 0.7 % (7.1 mg/L), die für die Zufütterung von **23b** 0.05 % (0.5 mg/L). Die analytischen Daten entsprachen denen des bereits beschriebenen Bromansamitocins.[17]

t_R (UPLC) = 2.45 min; **HRMS (ESI)** für $C_{32}H_{44}BrN_2O_9$ $[M+H]^+$: berechnet 679.2230, gefunden 679.2252.

Die erstellte Kalibrationsgerade und die Chromatogramme befinden sich im Kapitel 3.1.2 auf Seite 24.

Verfütterung von 3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoesäure 27



27

29a: R = $COCH(CH_3)_2$, R' = H
29b: R = $COCH(CH_3)_2$, R' = Me

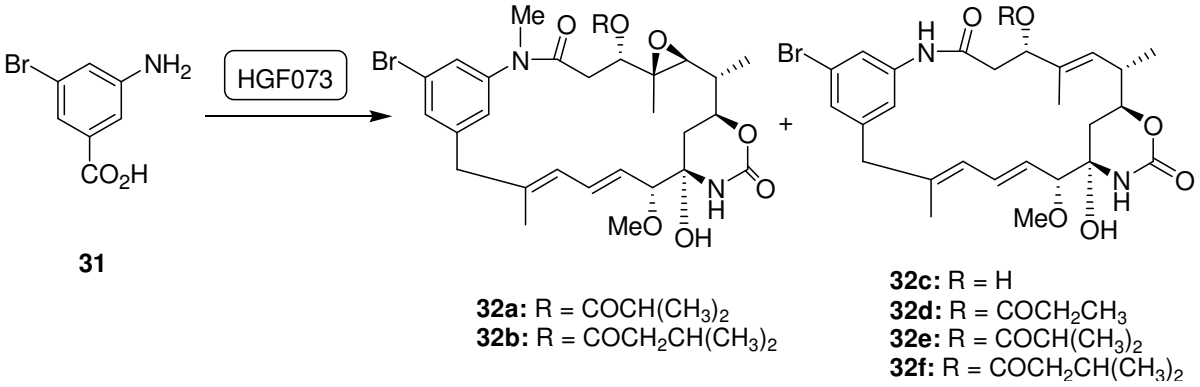
29c: R = H
29d: R = $COCH(CH_3)_2$

Die Mutasynthese mit *3-Amino-5-brom-4-fluorbenzoesäure* **27** wurde im 50mL-Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. 70 mg **27** (6 mmol/L Medium) wurden gelöst in DMSO

kontinuierlich über fünf Tage zugefüttert. Der Rohextrakt wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester vorgereinigt und anschließend mittels UPLC-MS analysiert. Massenspektrometrisch gab es Hinweise auf die Bildung von mindestens vier Ansamitocin-Derivaten **29a**, **29b**, **29c** und **29d**. Diese wiesen für Ansamitocine charakteristische Fragmentierunsmuster in den Massenspektren auf.

29a: **HRMS(ESI)** für $C_{30}H_{38}N_2O_8BrFNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 675.1693, gefunden 675.1751.
29b: **HRMS(ESI)** für $C_{31}H_{40}N_2O_8BrFNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 689.1850, gefunden 689.1843.
29c: **HRMS(ESI)** für $C_{26}H_{32}N_2O_6BrFNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 589.1325, gefunden 589.1307.
29d: **HRMS(ESI)** für $C_{30}H_{38}N_2O_7BrFNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 659.1744, gefunden 659.1739.

Verfütterung von 3-Amino-5-Bromaminobenzoesäure 31



31

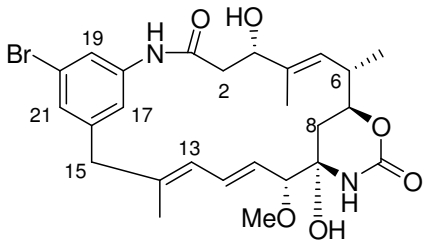
32a: R = $COCH(CH_3)_2$
32b: R = $COCH_2CH(CH_3)_2$

32c: R = H
32d: R = $COCH_2CH_3$
32e: R = $COCH(CH_3)_2$
32f: R = $COCH_2CH(CH_3)_2$

Die Mutasynthese mit *3-Amino-5-brombenzoesäure* **31** wurde im 3L-Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. 3.9 g **31** (6 mmol/L Medium) wurden gelöst in DMSO portionsweise zugefüttert. Der Rohextrakt wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester vorgereinigt und anschließend mittels HPLC mit einem Methanol-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Methanol; 90 min) über eine RP18-Säule und die so erhaltenen Fraktionen über eine CN-Phase mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (5:95 → 100 % Acetonitril; 100 min) gereinigt. Es konnten drei Ansamitocinderivate **32a** (0.9 mg), **32e** (0.6 mg) und **32c** (0.9 mg) in Ausbeuten von jeweils 0.01 % isoliert werden. Massenspektrometrisch gab es Hinweise auf die Bildung von drei weiteren Ansamitocin-Derivaten **32b**, **32d** und **32f**. Diese wiesen für Ansamitocine charakteristische UV-Spektren und Fragmentierunsmuster in den Massenspektren auf. Zusätzlich konnten die

Detoxifizierungsprodukte *3-Acetamino-5-brombenzamid* **33** und *3-Amino-5-brombenzamid* **33a** isoliert werden.

20-Brom-Ansamitocinderivat 32c



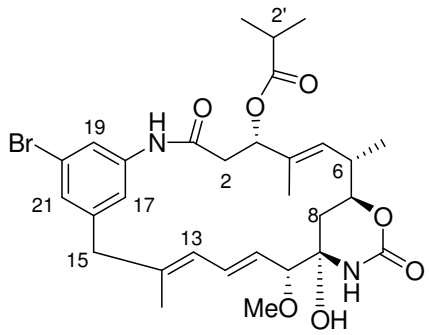
32c

Bei dieser Verbindung trat, durch die fehlende *N*-Methyl-Gruppe und die nicht vorhandene Esterseitenkette an 3-OH-Position, eine starke Signalverbreiterung in den NMR-Spektren auf. Auch eine Erhöhung der Temperatur auf 325 K konnte in diesem Fall nur eine geringfügige Verbesserung erwirken. Das Spektrum deutet trotzdem an einigen signifikanten Stellen auf das richtige Derivat hin, sodass im folgenden diese Signale angegeben sind.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$ = 7.260 ppm): δ_H = 7.36 – 7.34 (1H, s, Ar-H), 7.32 – 7.30 (1H, s, Ar-H), 7.17 – 7.15 (1H, s, Ar-H), 6.53 – 6.35 (1H, m, 12-H), 6.21 – 6.13 (1H, bs, 9-NH), 6.12 – 6.05 (1H, m, 13-H), 4.29 – 4.21 (1H, m, 7-H), 3.50 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, 10-H), 3.43 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, 15-H_a), 3.35 (3H, s, 10-OMe), 3.30 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, 15-H_b), 1.19 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 6-Me) ppm.

HRMS (ESI) für $C_{26}H_{33}N_2O_6BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 571.1420, gefunden 571.1419.

20-Brom-Ansamitocinderivat 32e



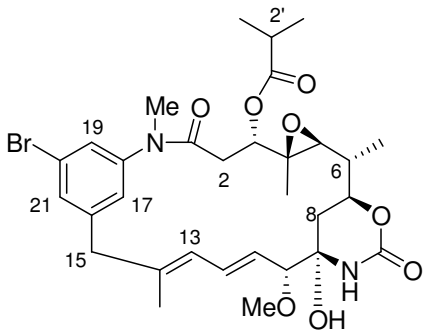
32e

Durch die fehlende *N*-Methyl-Gruppe wurden die Signale im NMR-Spektrum sehr breit. Dieses Phänomen konnte durch die Messung bei erhöhten Temperaturen (325 K) etwas verringert werden. Die Aufnahme eines ^{13}C-Spektrum war dennoch nicht möglich.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$ = 7.260 ppm): δ_H = 7.40 (1H, s, Amid-NH), 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.10 (1H, s, Ar-H), 6.97 (1H, s, Ar-H), 6.52 (1H, dd, J = 15.1, 10.8 Hz, 12-H), 6.22 (1H, s, 9-NH), 6.08 – 6.00 (1H, m, 13-H), 5.57 (1H, dd, *J* = 15.1, 9.1 Hz, 11-H), 5.49 – 5.41 (1H, m, 3-H oder 5-H), 5.30 – 5.24 (1H, m, 5-H oder 3-H), 4.37 (1H, pt, *J* = 10.5 Hz, 7-H), 3.52 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, 10-H), 3.42 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, 15-H_a), 3.35 (3H, s, 10-OMe), 3.17 (1H, d, *J* = 14.7 Hz, 15-H_b), 3.05 (1H, bs, 9-OH), 2.61 (1H, sep, *J* = 7.0 Hz, 2'-H), 1.75 (3H, s, 14-Me oder 4-Me), 1.66 (3H, s, 14-Me oder 4-Me), 1.21 (3H, d, J = 6.9 Hz, 6-Me), 1.20 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_a), 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b) ppm; nicht zugeordnet werden konnten: 2-CH_2, 8-CH_2 und 6-H.

HRMS (ESI) für $C_{30}H_{39}N_2O_7BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 641.1838, gefunden 641.1844.

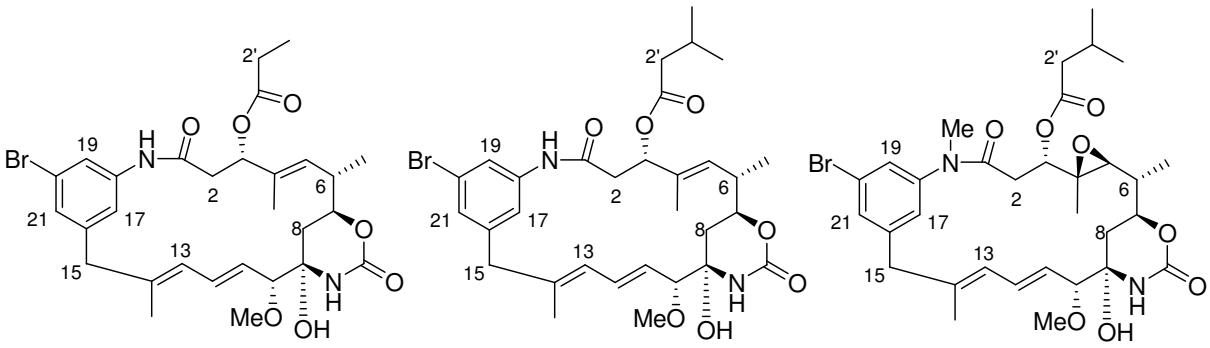
20-Brom-19-deschloransamitocin P3 32a



32a

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$ = 7.260 ppm): δ_H = 7.40 (1H, pt, *J* = 1.6 Hz, 21-H), 7.29 (1H, pt, *J* = 1.6 Hz, 19-H), 7.14 (1H, pt, *J* = 1.6 Hz, 17-H), 6.45 (1H, ddd, *J* = 15.4, 11.0 Hz, 12-H), 6.22 (1H, s, 9-NH), 6.17 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.47 (1H, dd, *J* = 15.4, 8.9 Hz, 11-H), 4.84 (1H, dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 3-H), 4.28 (1H, ddd, *J* = 12.2, 10.5, 1.9 Hz, 7-H), 3.50 (1H, d, *J* = 13.3 Hz, 15-H_a), 3.51 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, 10-H), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.22 (1H, d, *J* = 13.3 Hz, 15-H_b), 3.21 (3H, s, 1-NMe), 3.03 (1H, bs, 9-OH), 2.96 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, 5-H), 2.68 (1H, dd, *J* = 14.1, 12.0 Hz, 2-H_a), 2.60 (1H, sep, *J* = 7.0 Hz, 2'-H), 2.22 (1H, dd, *J* = 14.1, 3.0 Hz, 2-H_b), 1.69 (3H, s, 14-Me), 1.67 – 1.62 (1H, m, 8-H_a), 1.52 - 1.44 (1H, m, 6-H), 1.29 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 6-Me), 1.25 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_a), 1.28 – 1.22 (1H, m, 8-H_b), 1.20 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b), 0.87 (3H, s, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): δ_C = 175.74 (s, 1'-C), 168.44 (s, 1-C), 152.11 (s, Carbamat-CO), 145.54 (s, 18-C), 143.15 (s, 16-C), 139.77 (s, 14-C), 132.60 (d, 12-C), 131.87 (d, 21-C), 128.58 (d, 19-C), 127.89 (d, 11-C), 127.23 (d, 17-C), 124.91 (d, 13-C), 123.16 (s, 20-C), 88.26 (d, 10-C), 80.83 (d, 9-C), 76.56 (d, 3-C), 74.24 (d, 7-C), 66.14 (d, 5-C), 60.38 (s, 4-C), 56.70 (q, 10-OMe), 46.65 (t, 15-C), 38.78 (d, 6-C), 37.51 (q, N-Me), 33.83 (t, 8-C), 33.30 (d, 2'-C), 29.70 (t, 2-C), 19.95 (q, 3'-C), 17.90 (q, 3'-C), 15.88 (q, 14-Me), 14.58 (q, 6-Me), 12.42 (q, 4-C) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{31}H_{41}N_2O_8BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 671.1944, gefunden 671.1934.

20-Brom-19-deschlor-Ansamitocine 32b, 32d, 32f



32d **32f** **32b**

32d: HRMS(ESI) für $C_{29}H_{37}N_2O_7BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 627.1682, gefunden 627.1679.

32f: HRMS(ESI) für $C_{31}H_{41}N_2O_7BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 655.1995, gefunden 655.1999.

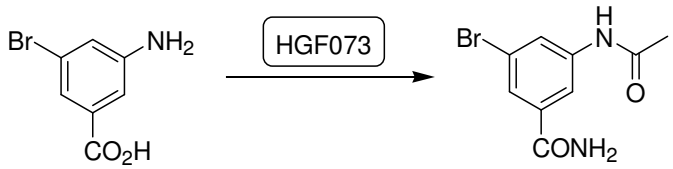
32b: HRMS(ESI) für $C_{32}H_{43}N_2O_8BrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 685.2100, gefunden 685.2103.

3-Amino-5-brombenzamid 33a

31 **33a**

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3$=7.260 ppm): δ_H = 7.23 (1H, pt, *J* = 1.5 Hz, Ar-H), 7.07 (1H, pt, *J* = 1.2 Hz, Ar-H), 6.96 (1H, pt, *J* = 2.1 Hz, Ar-H), 5.95 (1H, bs, $CONH_2$), 5.55 (1H, bs, $CONH_2$), 3.88 (2H, bs, NH_2) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_6N_2OBr$ $[M-H]^-$: berechnet 212.9663, gefunden 212.9668.

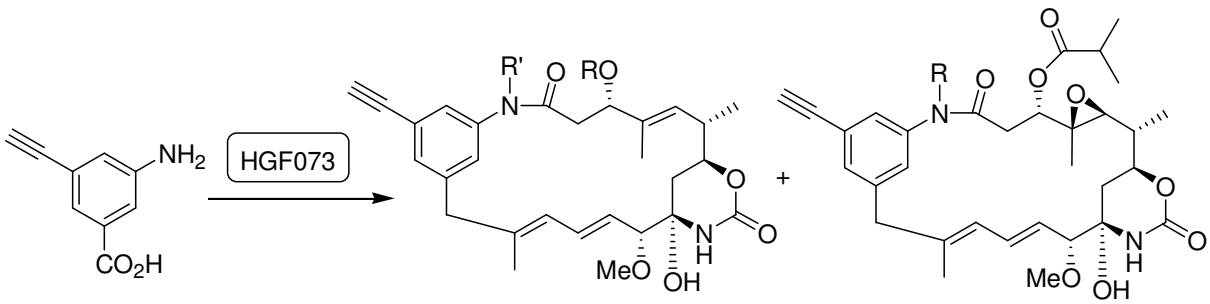
3-Acetamino-5-brombenzamid 33



31 **33**

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD, MeOH=3.310 ppm): δ_H = 8.06 (1H, pt, *J* = 1.9 Hz, Ar-H), 7.92 (1H, pt, *J* = 1.5 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, pt, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 2.14 (3H, s, Ac-CH_3) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_7H_6N_2OBr$ $[M+H]^+$: berechnet 256.9926, gefunden 256.9934.

Verfütterung von 3-Amino-5-ethinylbenzoesäure 36



36

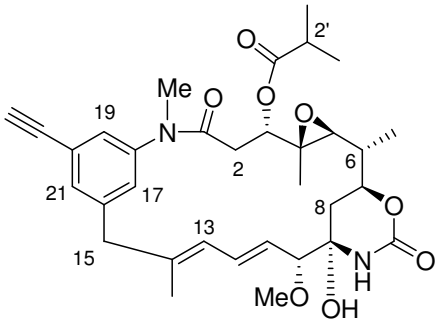
37a: R=H, R'=H
37b: R=$COCHCH_3$, R'=H
37c: R=$COCH(CH_3)_2$, R'=H
37d: R=$COCH(CH_3)_2$, R'=Me

37e: R=H
37f: R=Me

Die Mutasynthese mit *3-Amino-5-ethinylbenzoesäure* **36** wurde im 5L-Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. 1.2 g **36** (1.5 mmol/L Medium) wurden gelöst in DMSO kontinuierlich über Spritzenpumpe zugefüttert. Der Rohextrakt wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester vorgereinigt, über Sephadex (LH20) mit Methanol chromatographiert und anschließend mittels HPLC mit einem Methanol-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Methanol; 90 min) über eine RP18-Säule und die so erhaltenen Fraktionen über eine CN-Phase mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (5:95 → 100 % Acetonitril; 100 min) gereinigt. Es konnten zwei Ansamitocinderivate **37f** (15 mg) und **37c** (2.5 mg) in Ausbeuten von 0.34 % (**37f**) und 0.06 % (**37c**) isoliert werden. Massenspektrometrisch gab es Hinweise auf die Bildung von vier weiteren Ansamitocin-Derivaten **37a**, **37b, 37d** und **37e**.

Diese wiesen für Ansamitocine charakteristische UV-Spektren bei $\lambda = 248$ nm und Fragmentierunsmuster in den Massenspektren auf.

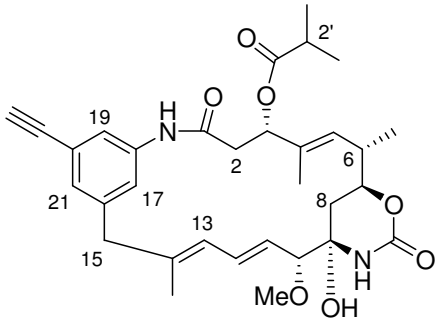
20-Ethinyl-19-deschloransamitocin P3 37f



37f

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 7.36 (1H, bs, Ar-H), 7.26 (1H, bs, Ar-H), 7.19 (1H, bs, Ar-H), 6.48 (1H, dd, *J* = 15.4, 11.0 Hz, 12-H), 6.22 (1H, bs, NH), 6.20 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.50 (1H, dd, *J* = 15.4, 9.0 Hz, 11-H), 4.87 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 3-H), 4.28 (1H, ddd, *J* = 12.2, 1.9, 10.4 Hz, 7-H), 3.53 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, 10-H), 3.52 (1H, d, *J* = 13.1 Hz, 15-H_a), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.27 (1H, d, *J* = 13.1 Hz, 15-H_b), 3.21 (3H, s, 1-NMe), 3.19 (1H, s, 23-H), 3.04 (1H, bs, 9-OH), 2.98 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, 5-H), 2.69 (1H, dd, *J* = 14.0, 12.0 Hz, 2-H_a), 2.64 (1H, sep, *J* = 7.0 Hz, 2'-H), 2.23 (1H, dd, *J* = 14.0, 2.9 Hz, 2-H_b), 1.69 (3H, s, 14-Me), 1.64 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, 8-H_a), 1.47 (1H, ddq, *J* = 10.4, 9.7, 6.3 Hz, 6-H), 1.32 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 6-Me), 1.29 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_a), 1.25 (1H, d, *J* = 13.5, 8-H_b), 1.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b) 0.85 (3H, s, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$=77.00 ppm): δ_C = 175.8 (s, 1'-C), 168.5 (s, 1-C), 152.1 (s, Carbamat-CO), 144.5 (s, Ar-C), 141.7 (s, Ar-C), 140.1 (s, 14-C), 132.7 (d, 12-C), 132.3 (d, Ar-C), 129.1 (d, 2x Ar-C), 127.7 (d, 11-C), 124.7 (s, Ar-C), 124.0 (d, 13-C), 88.3 (d, 10-C), 82.1 (s, 22-C), 80.8 (d, 9-C), 78.9 (d, 23-C), 76.5 (d, 3-C), 74.2 (d, 7-C), 66.1 (d, 5-C), 60.4 (s, 4-C), 56.7 (q, 10-OMe), 46.7 (t, 15-C), 38.8 (d, 6-C), 37.5 (q, N-Me), 35.7 (t, 8-C), 33.8 (d, 2'-C), 33.3 (t, 2-C), 20.0 (q, 3'-C_a), 17.9 (q, 3'-C_b), 15.8 (q, 14-Me), 14.6 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-C) ppm ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{33}H_{42}N_2O_8Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 617.2839, gefunden 617.2834.

20-Ethinyl-19-deschloransamitocinderivat 37c

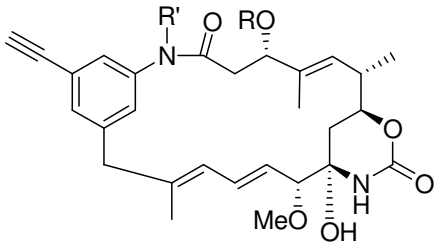


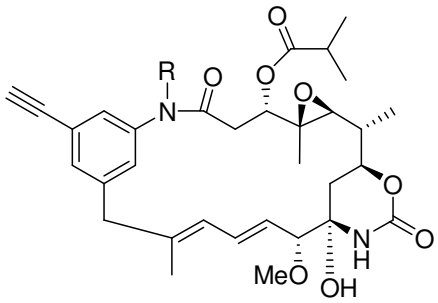
37c

Durch die fehlende *N*-Methylgruppe trat eine starke Signalverbreiterung auf, sodass die Kohlenstoffsignale über das 2D-CH-Korrelationsspektrum ausgewertet wurden. Die Signale der quartären Kohlenstoffe konnten nicht zugeordnet werden.

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 8.14 (1H, bs, Ar-H), 7.66 (1H, bs, NH), 7.09 (1H, bs, Ar-H), 6.94 (1H, bs, Ar-H), 6.52 (1H, dd, *J* = 13.8, 12.0 Hz, 12-H), 6.36 (1H, bs, NH), 6.11 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, 13-H), 5.59 (1H, dd, *J* = 13.8, 9.4 Hz, 11-H), 5.52 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 5-H), 5.22 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, 3-H), 4.41 (1H, pt, *J* = 9.9 Hz, 7-H), 3.51 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, 10-H), 3.42 (1H, d, *J* = 14.3 Hz, 15-H_a), 3.33 (3H, s, 10-OMe), 3.20 (1H, bs, 9-OH), 3.16 (1H, d, *J* = 14.3 Hz, 15-H_b), 3.06 (1H, s, 23-H), 2.85 – 2.77 (1H, m, 2-H_a), 2.69 - 2.56 (3H, m, 2-H_b, 2'-H, 6-H), 2.06 (1H, d, 8-H_a), 1.71 (3H, s, 14-Me), 1.67 (3H, s, 4-Me), 1.31 – 1.15 (10H, m, 6-Me, 2x 3'-Me, 8-H_b) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$=77.00 ppm): δ_C = 133.1 (d, 12-C), 128.0 (d, Ar-C), 127.4 (d, 5-C), 126.9 (d, 13-C), 124.7 (11-C), 119.8 (d, 2x Ar-C), 87.1 (d, 10-C), 83.2 (d, 23-C), 77.6 (d, 7-C), 74.1 (d, 3-C), 55.8 (q, 10-OMe), 44.9 (t, 15-C), 38.8 (d, 6-C), 40.2 (t, 2-C), 37.5 (d, 6-C), 33.9 (t, 8-C), 33.8 (d, 2'-C), 18.8 (q, 2x 3'-C), 17.6 (q, 6-Me), 16.8 (q, 14-Me), 15.3 (q, 4-Me) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{32}H_{40}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 587.2733, gefunden 587.2736.

20-Ethinyl-19-deschloransamitocinderivate 37a, b, d, e



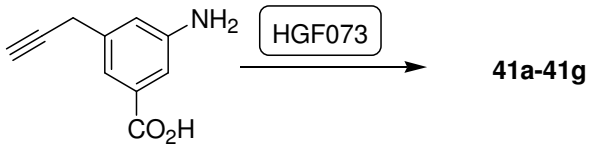


37a: R=H, R'=H
37b: R=COCHCH$_3$, R'=H
37d: R=COCH(CH$_3$)$_2$, R'=Me

37e: R=H

37e: HRMS(ESI) für $C_{32}H_{40}N_2O_8Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 603.2682, gefunden 603.2700.
37a: HRMS(ESI) für $C_{28}H_{34}N_2O_6Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 517.2315 gefunden 517.2315.
37b: HRMS(ESI) für $C_{31}H_{38}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 573.2577, gefunden 573.2573.
37d: HRMS(ESI) für $C_{33}H_{42}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 601.2890, gefunden 601.2875.

Verfütterung von 3-Amino-5-propargylbenzoesäure 40



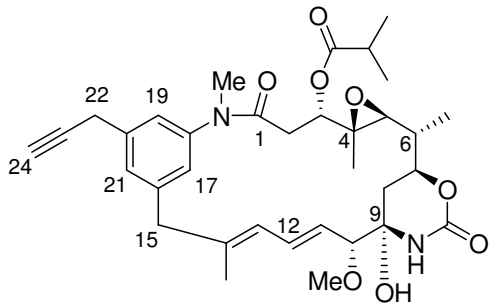
41a-41g

40

Die Mutasynthese mit *3-Amino-5-propargylbenzoesäure* **40** wurde im 2L-Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. 1.1 g **40** (3 mmol/L Medium) wurden gelöst in DMSO kontinuierlich über fünf Tage zugefüttert. Der Rohextrakt wurde säulenchromatographisch mit Essigsäureethylester vorgereinigt, und anschließend mittels Kombination verschiedener HPLC gereinigt. Die erste Trennung erfolgt mit über eine RP18-Säule mittels Methanol-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Methanol; 90 min), anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (5:95 → 100 % Acetonitril; 100 min) über eine CN-Phase gereinigt. Zur entgültigen Trennung von Verunreinigungen wurde die so erhaltenen Fraktionen nochmals mittels HPLC mit Acetonitril-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Acetonitril; 85 min) über eine RP18-Phase chromatographiert. Insgesamt konnte das Gemisch auf diese Weise in 16 einzelne Fraktionen getrennt werden, die alle das typische

UV-Spektrum bei λ = 248 nm für Ansamitocine aufwiesen. Sieben Derivate (**41b-d**, **41f-g**, **43a** und **43c**) waren in einer ausreichenden Menge für die NMR-Spektroskopie entstanden. Es gab Hinweise auf die Bildung von neun weiteren Ansamitocin-Derivaten, von denen vier (**41a**, **41e**, **43b** und **43d**) mittels massenspektrometrischen Fragmentierungen Strukturen zugeordnet werden konnten. Neben den Propargyl-Ansamitocinen konnten vier Methyl-Ansamitocine (**43a**-**43d**) isoliert werden, was auf eine Verunreinigung des zugefütterten Mutasynthons zurückzuführen ist, die NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar war.

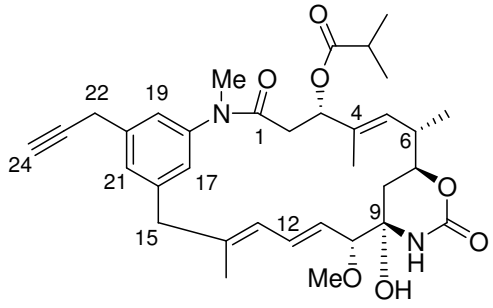
19-Propargyl-20-deschloroansamtitocin P3 41a



41a

UPLC-MS; t_R = 2.48 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{34}H_{44}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 615.3046, gefunden 615.3038.

19-Propargyl-20-deschloro-desepoxyansamitocin P3 41b

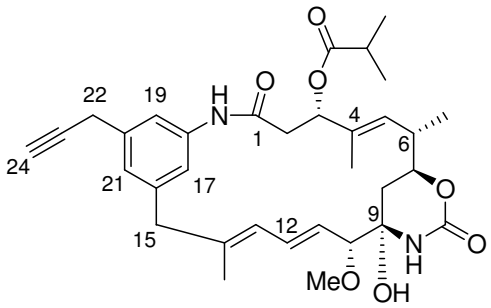


41b

Die Substanzmenge war zu gering um ^{13}C- und CH-Korrelations-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die Signale über das ^1H- und das H,H-COSY-Spektrum zugeordnet.

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, CD_3OH=3.310 ppm): δ_H = 7.31 (1H, s, Ar-H), 7.23 (1H, s, Ar-H), 7.10 (1H, s, Ar-H), 6.56 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.7 Hz, 12-H), 5.97 – 5.87 (1H, m, 13-H), 5.42 – 5.34 (2H, m, 11-H, 3-H), 5.15 – 5.11 (1H, m, 5-H), 4.02 (1H, pt, *J* = 10.0 Hz, 7-H), 3.69 (2H, d, *J* = 2.5 Hz, 22-H), 3.55 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, 10-H), 3.48 (1H, d, *J* = 13.5 Hz, 15-H_a), 3.34 (3H, s, 10-OMe), 3.31 (1H, 15-H_b liegt unter MeOH-Signal), 3.22 (3H, s, N-Me), 2.63 – 2.56 (2H, m, 24-H, 2'-H), 2.54 – 2.47 (2H, m, 6-H, 2-H_a), 2.38 – 2.31 (1H, m, 2-H_b), 1.84 (6H, bs, 4-CH_3, 14-CH_3), 1.51 (1H, dd, *J* = 14.3, 2.4 Hz, 8-H_a), 1.33 – 1.31 (1H, m, 8-H_b), 1.19 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, 3'-H_a), 1.17 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, 3'-H_b), 1.07 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 6-Me) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 2.48 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{34}H_{44}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 615.3046, gefunden 615.3038.

19-Propargyl-20-deschloro-des-*N*-methyl-desepoxyansamitocin 41c



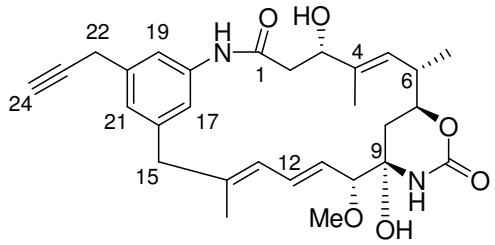
41c

Die Substanzmenge war zu gering um 2D-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die für Ansamitocine charakteristischen Signale, die eindeutig im ^{1}H-Spektrum zu erkennen waren aufgelistet.

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, CD_3OH = 3.310 ppm): δ_H = 7.97 (1H, s, Ar-H), 6.92 (1H, s, Ar-H), 6.87 (1H, s, Ar-H), 6.68 (1H, dd, *J* = 15.2, 11.6 Hz, 12-H), 6.10 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, 13-H), 5.59 (1H, dd, *J* = 15.2, 8.3 Hz, 11-H), 5.37 – 5.27 (2H, m, 5-H, 3-H), 4.27 (1H, pt, *J* = 10.7 Hz, 7-H), 3.58 (2H, bs, 22-CH_2), 3.37 (3H, s, 10-OMe), 1.76 (3H, s, 14-Me), 1.73 (3H, s, 4-Me), 1.19 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_a), 1.18 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b), 1.11 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, 6-Me) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 2.50 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{33}H_{42}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 601.2890, gefunden 601.2878.

Nicht zugeordnet werden konnten die Signale von 10-H, 15-CH_2, 24-H, 6-H, 2'-H, 2-CH_2 und 8-CH_2.

19-Propargyl-Ansamitocinderivat 41d

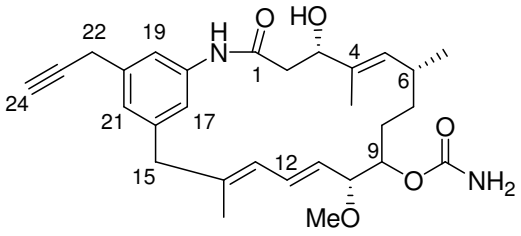


41d

Die Substanzmenge war zu gering um ^{13}C- und CH-Korrelations-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die Signale über das ^{1}H- und das H,H-COSY-Spektrum zugeordnet.

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, CD_3OH = 3.310 ppm): δ_H = 7.93 (1H, s, Ar-H), 6.64 (1H, s, Ar-H), 6.90 (1H, s, Ar-H), 6.64 (1H, dd, J = 15.3, 11.2 Hz, 12-H), 6.11 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, 13-H), 5.58 (1H, dd, *J* = 15.3, 9.4 Hz, 11-H), 5.46 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 5-H), 4.30 (1H, pt, *J* = 10.8 Hz, 7-H), 4.21 (1H, d, *J* = 6.1 Hz, 3-H), 3.57 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, 10-H), 3.55 (2H, d, *J* = 2.8 Hz, 22-CH_2), 3.42 (1H, bs, 15-H_a), 3.34 (3H, s, 10-OMe), 3.20 (1H, bs, 15-H_b), 2.84 (1H, dd, *J* = 15.5, 2.5 Hz, 2-H_a), 2.72 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.0 Hz, 2-H_b), 2.68 – 2.62 (1H, m, 6-H), 2.51 (1H, t, *J* = 2.8 Hz, 24-H), 1.97 (1H, d, *J* = 13.3 Hz, 8-H_a), 1.68 (3H, s, 14-CH_3), 1.66 (3H, s, 4-CH_3), 1.45 (1H, d, *J* = 13.3 Hz, 8-H_b), 1.14 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 6-Me) ppm;
UPLC-MS t_R = 2.47 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{29}H_{37}N_2O_6$ $[M+H]^+$: berechnet 509.2652, gefunden 509.2665.

19-Propargyl-Proansamitocin-Derivat 41f

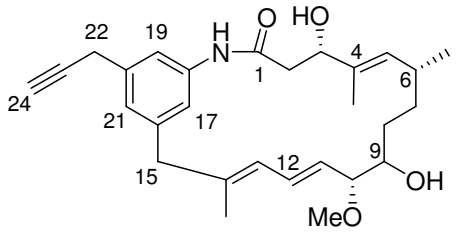


41f

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, CD_3OH = 3.310 ppm): δ_H = 7.54 (1H, s, Ar-H), 6.98 (1H, s, Ar-H), 6.95 (1H, s, Ar-H), 6.52 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, 12-H), 6.02 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.47 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 11-H), 5.33 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 4.72 – 4.67 (1H, m, 9-H), 4.36 (1H, dd, *J* = 7.9, 3.7 Hz, 3-H), 3.69 (1H, pt, *J* = 7.2 Hz, 10-H), 3.56 (2H, bd, *J* = 1.8 Hz, 22-H), 3.33 (1H, 15-H_a, liegt im MeOH-Signal), 3.31 (1H, 15-H_b, liegt im MeOH-Signal), 3.29 (3H, s, 10-OMe), 2.70 – 2.62 (2H, m, 2-CH_2), 2.51 (1H, bs, 24-H), 2.32 – 2.23 (1H, m, 6-H), 1.71 (3H, s, 14-CH_3), 1.65 (3H, s, 4-CH_3), 1.60 – 1.55 (1H, m, 8-H_a), 1.45 – 1.41 (1H, m, 8-H_b), 1.39 – 1.32(2H, m, 7-CH_2), 0.79 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 6-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, CD_3OD, CD_3OD = 49.00 ppm): δ_C = 138.6 (s, 14-C), 134.48 (s, 4-C), 132.21 (d, 5-C), 130.13 (d, 12-C), 127.55 (d, 11-C), 126.18 (d, 13-C), 124.14 (d, Ar-C), 118.84 (d, 17-C), 117.65 (d, Ar-C), 83.69 (d, 10-C), 81.31 (s, 23-C), 74.86 (d, 9-H), 71.87 (d, 3-C), 70.41 (d, 24-C), 55.39 (q, 10-OMe), 44.51 (t, 15-C), 41.05 (t, 2-C), 32.35 (t, 8-C), 31.34 (d, 6-C), 31.46 (t, 7-C), 23.04 (t, 22-C), 19.26 (q, 6-CH_3), 15.55 (q, 14-CH_3), 11.39 (q, 4-CH_3) ppm; **UPLC-MS** t_R = 2.44 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{29}H_{38}N_2O_5Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 517.2678, gefunden 509.2688.

Die ^{13}C-Signale wurden indirekt aus 2D-Korrelationsspektren (HSQC, HMBC) ermittelt. Es fehlen die quartären aromatischen Signale und die Carbonylgruppensignale des Carbamats und des Amids.

19-Propargyl-Proansamitocin-Derivat 41g

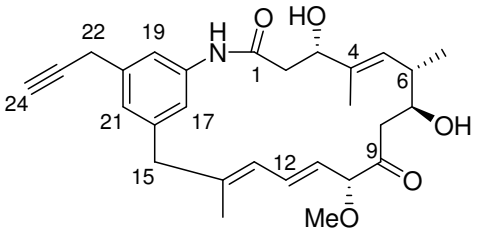


41g

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD, CD_3OH = 3.310 ppm): δ_H = 7.57 (1H, s, Ar-H), 6.98 (1H, s, Ar-H), 6.94 (1H, s, Ar-H), 6.52 (1H, dd, *J* = 15.2, 11.4 Hz, 12-H), 6.01 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, 13-H), 5.40 (1H, dd, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 11-H), 5.37 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, 5-H), 4.33 (1H, pt, *J* = 5.7 Hz, 3-H), 3.56 (2H, bs, 22-H), 3.45 – 3.42 (2H, m, 10-H, 9-H), 3.39 (1H, bs, 15-H_a), 3.36 (1H, bs, 15-H_b), 3.26 (3H, s, 10-OMe), 2.70 – 2.67 (2H, m, 2-CH_2), 2.51 (1H, bs, 24-H), 2.36 – 2.26 (1H, m, 6-H), 1.72 (3H, s, 14-CH_3), 1.65 (3H, s, 4-CH_3), 1.54 – 1.48 (2H, m, 7-CH_2), 1.36 – 1.29(2H, m, 8-CH_2), 0.83 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 6-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, CD_3OD, CD_3OD = 49.00 ppm): δ_C = 138.61 (s, 14-C), 134.04 (s, 4-C), 131.53 (d, 5-C), 130.59 (d, 12-C), 127.86 (d, 11-C), 126.23 (d, 13-C), 124.18 (d, Ar-C), 118.82 (d, 17-C), 116.88 (d, Ar-C), 87.14 (d, 10-C), 74.53 (d, 9-C), 80.75 (s, 23-C), 72.78 (d, 3-C), 69.92 (d, 24-C), 55.19 (q, 10-OMe), 45.13 (t, 15-C), 40.78 (t, 2-C), 31.79 (d, 6-C), 30.03 (t, 7-C), 29.42 (t, 8-C), 23.17 (t, 22-C), 19.67 (q, 6-CH_3), 15.63 (q, 14-CH_3), 11.74 (q, 4-CH_3) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 2.47 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{28}H_{37}NO_4Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 474.2620, gefunden 474.2643.

Die ^{13}C-Signale wurden indirekt aus 2D-Korrelationsspektren (HSQC, HMBC) ermittelt. Es fehlen die quartären aromatischen Signale und die Carbonylgruppensignale des Carbamats und des Amids.

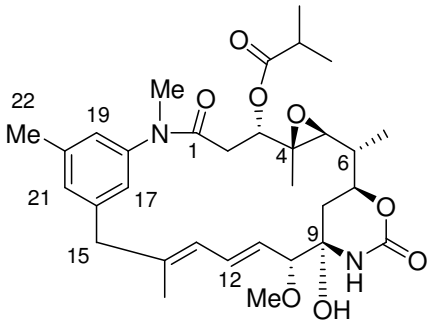
19-Propargyl-Proansamitocin 41e



41e

UPLC-MS; t_R = 2.39 min; **HRMS (ESI)** für $C_{28}H_{35}NO_5Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 488.2413, gefunden 488.2429.

19-Methyl-20-deschloroansamitoicnderivat 43a



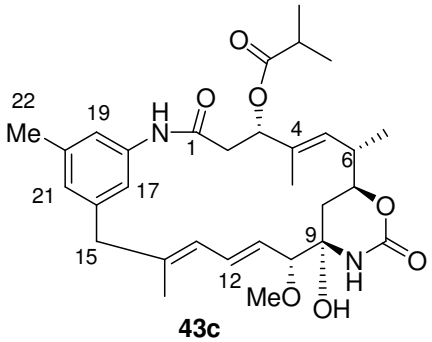
43a

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 7.17 (1H, bs, Ar-H), 7.07 (1H, bs, Ar-H), 7.04 (1H, bs, Ar-H), 6.63 (1H, dd, *J* = 15.3, 11.0 Hz, 12-H), 6.25 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.52 (1H, dd, *J* = 15.3, 8.9 Hz, 11-H), 4.73 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.7 Hz, 3-H), 4.21 (1H, dt, *J* = 11.1, 2.1 Hz, 7-H), 3.57 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, 10-H), 3.53 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, 15-H_a), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.26 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, 15-H_b), 3.19 (3H, s, 1-NMe), 2.83 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, 5-H), 2.79 (1H, dd, *J* = 14.1, 12.1 Hz, 2-H_a), 2.73 (1H, sep, *J* = 7.1 Hz, 2'-H), 2.41 (3H, 20-CH_3), 2.18 – 2.13 (1H, m, 2-H_b), 1.70 (3H, s, 14-Me), 1.62 – 1.51 (3H, m, 8-H_a, 8-H_b, 6-H), 1.27 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, 3'-H_a), 1.24 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 6-Me), 1.21 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b) 0.89 (3H, s, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): δ_C = 176.5 (s, 1'-C), 170.0 (s, 1-C), 143.9 (s, Ar-C), 140.3 (s, Ar-C), 132.9 (d, 12-C), 129.9 (d, Ar-C), 127.8 (d, 11-C), 125.2 (d, Ar-C), 124.7 (d, Ar-C), 124.3 (d, 13-C), 88.5 (d, 10-C), 76.5 (d, 3-C), 74.5 (d, 7-C), 66.2 (d, 5-C), 56.6 (q, 10-OMe), 46.2 (t, 15-C), 38.2 (d, 6-C),

36.6 (q, N-Me), 36.4 (t, 8-C), 33.6 (d, 2'-C), 33.0 (t, 2-C), 19.9 (q, 20-Me), 17.7 (q, 6-Me), 13.7 (q, 3'-C), 14.9 (q, 14-Me), 11.6 (q, 4-C) ppm; **t_R (UPLC)**= 2.51 min; **HRMS (ESI)** für $C_{32}H_{45}N_2O_8$ $[M+H]^+$: berechnet 585.3176, gefunden 585.3159.

Die Kohlenstoffsignale wurden aus 2D-Korrelationsspektren indirekt bestimmt. Nicht zugeordnet werden konnten: ein quartäres aromatisches Kohlenstoffsignal, 14-C, 9-C, 4-C und das Kohlenstoffsignal des Carbamats.

19-Methyl-20-deschloroansamitoicnderivat 43c

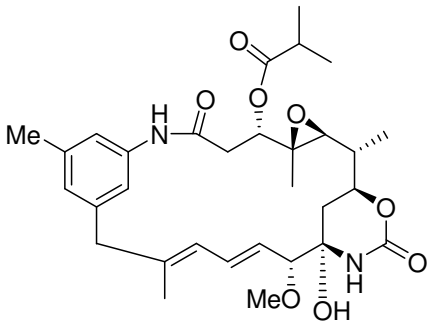


43c

Die Substanzmenge war zu gering um ^{13}C-Spektren zu erhalten. Deshalb wurden die für Ansamitocine charakteristischen Signale, die eindeutig im ^{1}H-Spektrum und über das H,H-COSY zu erkennen waren aufgelistet.

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 7.86 (1H, bs, Ar-H), 6.76 (1H, bs, Ar-H), 6.70 – 6.61 (2H, m, Ar-H, 12-H), 6.09 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, 13-H), 5.58 (1H, dd, *J* = 15.2, 9.3 Hz, 11-H), 5.43 – 5.34 (1H, m, 3-H), 5.33 – 5.26 (1H, m, 5-H), 4.27 (1H, pt, *J* = 9.8 Hz, 7-H), 3.59 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, 10-H), 3.39 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, 15-H_a), 3.35 (3H, s, 10-OMe), 3.21 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, 15-H_b), 2.90 – 2.85 (1H, m, 2-H_a), 2.72 – 2.57 (3H, m, 6-H, 2-H_b, 2'-H), 2.28 (3H, 20-CH_3), 1.98 (1H, d, 8-H_a), 1.72 (3H, s, 14-Me), 1.71 (3H, s, 4-Me), 1.54 – 1.42 (1H, m, 8-H_b), 1.19 (3H, d, *J* = 7.4 Hz, 3'-H_a), 1.16 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 3'-H_b) 1.09 (3H, d, *J* = 5.7 Hz, 6-Me),ppm; **t_R (UPLC)**= 2.55 min; **HRMS (ESI)** für $C_{31}H_{42}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 577.2890, gefunden 577.2881.

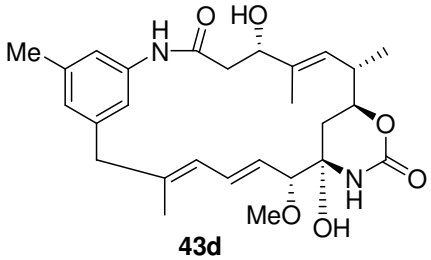
19-Methyl-20-deschloroansamitoicnderivat 43b



43b

t_R (UPLC)= 2.40 min; **HRMS (ESI)** für $C_{31}H_{43}N_2O_8$ $[M+H]^+$: berechnet 571.3019, gefunden 571.2987.

19-Methyl-proansamitoicinderivat 43d

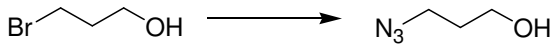


43d

t_R (UPLC)= 2.44 min; **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{37}N_2O_6$ $[M+H]^+$: berechnet 585.2652, gefunden 585.2665.

5.5 LINKERSYNTHESE UND -ANBDINDUNG

4-Azidopropanol 53

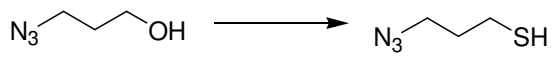


52 **53**

45 µL 4-Brompropanol **52** (0.5 mmol; 1 Äq) wurde in 1 mL DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 39 mg Natriumazid[127] (0.6 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur, bevor mit Wasser hydrolysiert wurde. Das Produkt wurde mit Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 110 mg eines farblosen Öls, das laut ^{1}H-NMR noch einem DMF:Produkt-Gemisch (2:1) entsprach. Die Ausbeute betrug 89 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 3.74 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, CH_2OH), 3.44 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, CH_2N_3), 1.93 (1H, bs, OH), 1.82 (2H, p, *J* = 6.3 Hz, 2-CH_2) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 59.8 (t, CH_2OH), 48.5 (t, CH_2N_3), 31.5 (t, 2-CH_2) ppm; **Rf** (PE/EE = 3:1) = 0.19.

4-Azidopropanthiol 54



53 **54**

28 mg 4-Azidopropanol **53** (0.28 mmol; 1 Äq) wurde in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur mit 43 µL Trifluoressigsäureanhydrid (0.31 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor ca. 10 Minuten Vakuum angelegt

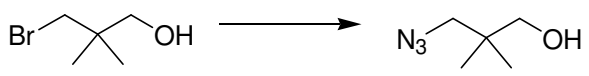
[127] *J.Org.Chem.,* **2008**, 73, 4920-4928.

wurde um restliches Trifluoressigsäureanhydrid zu entfernen. Das entstandene Trifluoracetat wurde wieder in THF gelöst und mit 26.9 mg Lithiumbromid (0.31 mmol; 1.1 Äq) und 234 µL HMPA (1.3 mmol; 4.8 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 5 Stunden bei 70 °C unter Argon. Anschließend wurde mit Wasser hydrolysiert, as Produkt wurde mit Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 101 mg eines farblosen Öls, das laut ^{1}H-NMR noch mit DMF und HMPA verunreinigt war. Das Rohprodukt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

101 mg Rohprodukt aus der Bromierung wurden in 1 mL Ethanol gelöst und mit 23.6 mg Thioharnstoff (0.31 mmol; 1.1 Äq) gelöst in 1 mL Ethanol versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei 80 °C bevor mit wässriger Natriumhydroxidlösung (w = 5 %) hydrolysiert wurde. Anschließend wurde mit verdünnter Schwefelsäure wieder angesäuert und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) gereinigt. Es resultierten 20 mg *4-Azidopropanthiol* **54** (0.17 mmol; 0.6 Äq) in einer Ausbeute von 61 % als farbloses Öl mit einem charakteristischen Geruch nach Gummireifen.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 3.43 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH_2N_3), 2.75 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_2SH), 1.99 (2H, p, *J* = 6.7 Hz, 2-CH_2) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 49.7 (t, CH_2N_3), 35.2 (2-CH_2), 28.3 (t, 2-CH_2SH) ppm; **Rf** (PE/EE = 5:1) = 0.25.

4-Azido-2,2-dimethylpropanol 56



55 **56**

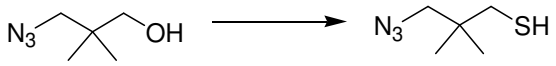
61 µL 4-Brom-2,2-dimethylpropanol **55** (0.5 mmol; 1 Äq) wurde in 1 mL DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 39 mg Natriumazid[128] (0.6 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Die Mischung

[128] *J.Org.Chem.,* **2008**, 73, 4920-4928.

rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur, bevor mit Wasser hydrolysiert wurde. Das Produkt wurde mit Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 137 mg eines farblosen Öls, das laut ^{1}H-NMR noch einem DMF:Produkt-Gemisch (2.6:1) entsprach. Die Ausbeute betrug 86 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 3.45 (2H, s, CH_2OH), 3.38 (2H, s, CH_2N_3), 1.82 (1H, bs, OH), 1.01 (6H, s, 2-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 69.1 (t, CH_2OH), 43.1 (t, CH_2N_3), 22.9 (q, 2-CH_3) ppm; **Rf** (PE/EE = 3:1) = 0.37.

4-Azido-2,2-dimethylpropanthiol 57



56 **57**

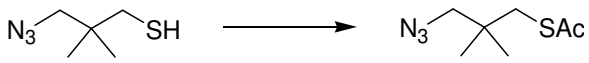
41 mg 4-Azido-2,2-dimethylpropanol **56** (0.32 mmol; 1 Äq) wurde in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur mit 49 µL Trifluoressigsäureanhydrid (0.35 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor ca. 10 Minuten Vakuum angelegt wurde um restliches Trifluoressigsäureanhydrid zu entfernen. Das entstandene Trifluoracetat wurde wieder in THF gelöst und mit 30.4 mg Lithiumbromid (0.35 mmol; 1.1 Äq) und 261 µL HMPA (1.5 mmol; 4.8 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 5 Stunden bei 70 °C unter Argon. Anschließend wurde mit Wasser hydrolysiert, das Produkt wurde mit Diethylether aus der wässrigen Phase extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 71.3 mg eines farblosen Öls, das laut ^{1}H-NMR noch mit DMF und HMPA verunreinigt war. Das Rohprodukt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

71.3 mg Rohprodukt aus der Bromierung wurden in 1 mL Ethanol gelöst und mit 26.6 mg Thioharnstoff (0.35 mmol; 1.1 Äq) gelöst in 1 mL Ethanol versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei 80 °C bevor mit wässriger Natriumhydroxidlösung (w = 5 %) hydrolysiert wurde. Anschließend wurde mit verdünnter Schwefelsäure wieder angesäuert und

20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) gereinigt. Es resultierten 31.5 mg *4-Azido-2,2-dimethylpropanthiol* **57** (0.22 mmol; 0.6 Äq) in einer Ausbeute von 68 % als farbloses Öl mit einem charakteristischen Geruch nach Gummireifen.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 3.48 (2H, s, CH_2SH), 3.39 (2H, s, CH_2N_3), 1.03 (6H, s, 2x2-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 69.2 (t, CH_2SH), 43.0 (t, CH_2N_3), 36.7 (s, 2-C), 22.9 (q, 2x2-CH_3) ppm; **Rf** (PE/EE = 5:1) = 0.15.

4-Azido-2,2-dimethylpropanacetothiol 59

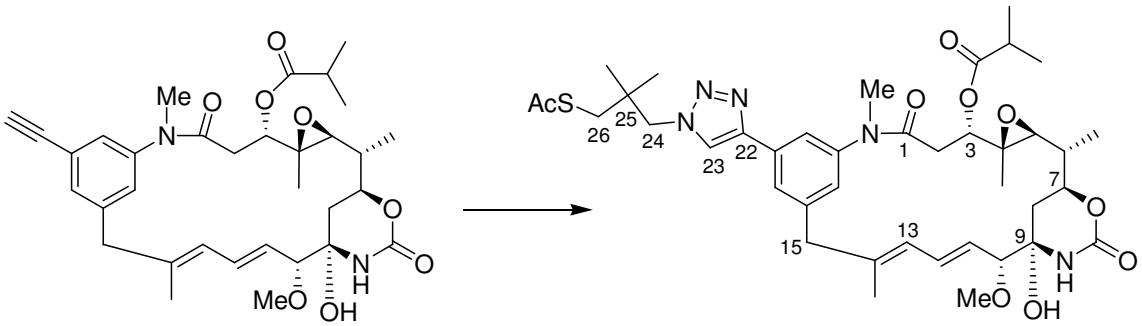


57 **59**

29 mg *4-Azido-2,2-dimethylpropanthiol* **57** (0.2 mmol; 1 Äq) wurden in 0.4 mL Tetrahydrofuran gelöst, mit 29 µL Acetylchlorid (0.4 mmol; 2 Äq) und 57 µL Triethylamin (0.4 mmol; 2 Äq) versetzt und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit wenig Wasser hydrolysiert und das Rohprodukt mit Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Es konnten 23 mg *4-Azido-2,2-dimethylpropanacetothiol* **59** (0.12 mmol) in einer Ausbeute von 61 % sauber isoliert werden. Das Produkt ist leicht flüchtig, so dass ein Teil beim Aufkonzentrieren verloren ging.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 3.93 (2H, s, CH_2SAc), 3.34 (2H, s, CH_2N_3), 2.07 (3H, s, Ac-CH_3), 1.05 (6H, 2x2-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 69.8 (t, CH_2SAc), 42.3 (t, CH_2N_3), 35.3 (s, 2-C), 23.2 (q, 2x2-CH_3), 20.8 (q, Ac-CH_3) ppm.

Ansamitocinderivat 60



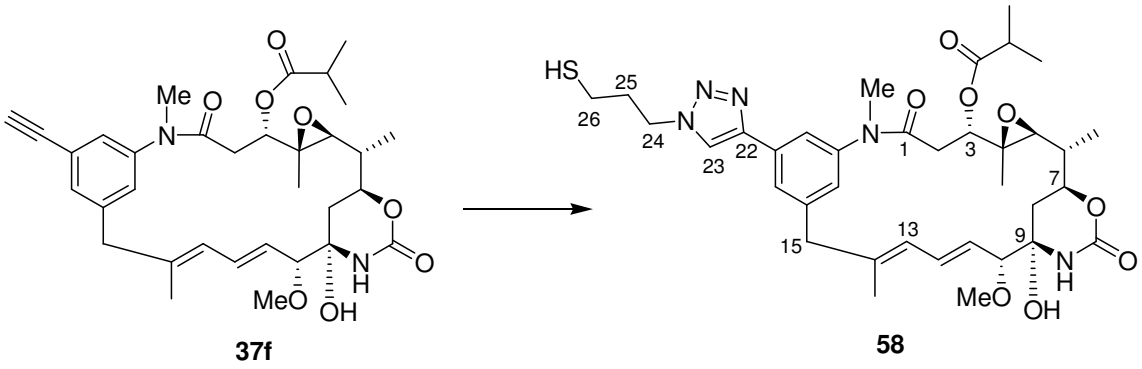
37f **60**

1 mg *20-Propargyl-19-deschloransamitocin P3* **37f** (1.7 µmol; 1 Äq) wurde in 0.5 mL Lösemittel (^{t}BuOH/THF/H_2O: 1/2/3) gelöst und mit 0.5 mg *4-Azido-2,2-dimethylpropanacetothiol* **59** (2.7 µmol, 1.6 Äq) und 0.1 mg CuBr · SMe_2 (0.5 µmol; 0.25 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 40 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie mit Phosphatpuffer hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert wurde. Der Rohextrakt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Acetonitril; 85 min, 15 min 100 % Acetonitril) über eine RP18-Säule gereinigt. Es konnten 0.8 mg des Produkts **60** (1 µmol) in einer Ausbeute von 59 % isoliert werden. Zusätzlich konnten 0.2 mg Edukt **37f** (0.3 µmol; 20 %) reisoliert werden.

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 7.72 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, Triazol-H), 7.56 (1H, bs, Ar-H), 7.47 (1H, bs, Ar-H), 7.34 (1H, bs, Ar-H), 6.65 (1H, dd, *J* = 15.2, 11.0 Hz, 12-H), 6.29 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.55 (1H, dd, *J* = 15.2, 9.0 Hz, 11-H), 4.74 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 3-H), 4.22 (1H, ddd, *J* = 11.1, 10.8, 2.4 Hz, 7-H), 3.89 (2H, s, 26-H), 3.59 (1H, d, *J* = 13.3 Hz, 15-H_a), 3.58 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, 10-H), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.36 - 3.34 (1H, m, 15-H_b), 3.22 (3H, s, 1-NMe), 2.87 (2H, s, 24-H), 2.85 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, 5-H), 2.77 – 2.70 (2H, m, 2-H_a, 2'-H), 2.23 (1H, dd, *J* = 14.1, 2.5 Hz, 2-H_b), 1.72 (3H, s, 14-Me), 1.64 – 1.50 (2H, m, 8-H_a, 6-H), 1.27 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, 3'-H_a), 1.24 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, 6-Me), 1.21 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 3'-H_b), 1.19 – 1.15 (1H, m, 8-H_b), 1.02 (6 H, s, 2x 25-CH_3), 0.93 (3H, s, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, MeOD, MeOD=49.00 ppm): δ_C = 176.4 (s, 1'-CO), 171.3 (s, Ac-CO), 169.7 (s, Amid-CO), 144.9 (s, Ar-C), 135.8 (d, 23-C), 134.3 (d, Ar-C), 133.8 (d, 12-C), 130.1 (d, 11-C), 130.0 (d, Ar-C), 129.6 (s, Ar-C), 128.4 (d, Ar-C), 126.6 (d, 13-C), 89.7 (d, 10-C), 80.4 (s, 22-C), 77.7 (d, 3-C), 75.7 (d, 7-C), 71.8 (t, 26-C), 67.5 (d, 5-C), 57.0 (q, 10-OMe), 51.4 (t, 24-C), 46.9 (t, 15-C), 39.5 (d, 6-C), 38.0 (t, 8-C),

37.8 (q, N-Me), 35.5 (s, 25-C), 35.3 (d, 2'-C), 34.2 (t, 2-C), 24.1 (q, 25-C), 20.5 (q, 3'-C), 20.3 (q, Ac-Me), 18.1 (q, 3'-C), 15.9 (q, 14-Me), 15.3 (q, 6-Me), 12.5 (q, 4-C) ppm.
Nicht zugeordnet werden konnten: Carbamat-CO, 14-C, 4-C und ein aromatiches quratäres C-Signal

Ansamitocinderivat 58



37f **58**

1 mg *20-Propargyl-19-deschloransamitocin P3* **37f** (1.7 µmol; 1 Äq) wurde in 0.5 mL Lösemittel (^{t}BuOH/THF/H_2O: 1/2/3) gelöst und mit 0.3 mg *4-Azidopropanthiol* **54** (2.5 µmol; 1.5 Äq) und 0.1 mg CuBr · SMe_2 (0.5 µmol; 0.25 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 40 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie mit Phosphatpuffer hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert wurde. Der Rohextrakt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Acetonitril; 85 min) über eine RP18-Säule gereinigt. Es resultierten 0.7 mg des Disulfids von **58**, das in wenig Methanol gelöst wurde und unter Schutzgas mit wenig Dithiothreitol versetzt wurden. Nach 4 stündigem Rühren war die Reaktion laut LC-MS-Kontrolle abgeschlossen, wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Acetonitril; 85 min) gereinigt. Es konnten 0.64 mg des Produkts **58** (0.9 µmol) in einer Ausbeute von 53 % isoliert werden. Zusätzlich konnten 0.32 mg Edukt **37f** (0.54 µmol; 32 %) reisoliert werden.

Die Substanzmenge war zu gering um CH-Korrelationsspektren oder ^{13}C-Spektren anzufertigen. Daher wurde das ^{1}H- und das H,H-COSY-Spektrum mit Hilfe des Spektrums von Derivat **60** ausgewertet.

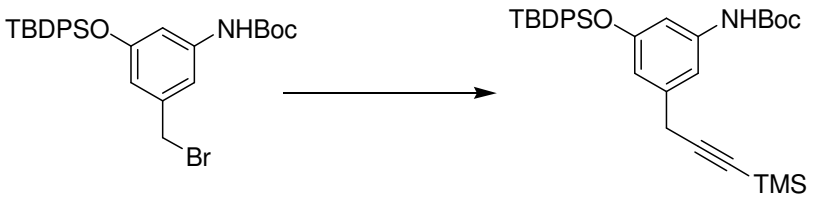
Das Produkt ist im NMR-Lösemittel wieder zum Teil dimerisiert, was massenspektrometrisch nachvollziehbar war. Deshalb liegen die Signale größtenteils gedoppelt vor. Daher sollte für folgende Versuchen das Deuteromethanol vor Benutzung entgast und mit Argon gespült werden.

^{1}H-NMR (500 MHz, MeOD, MeOH = 3.310 ppm): δ_H = 8.48 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.84 (1H, bs, Ar-H), 7.68 (1H, bs, Ar-H), 7.25 (1H, bs, Ar-H), 6.65 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.0 Hz, 12-H), 6.30 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.55 (1H, dd, *J* = 15.0, 9.0 Hz, 11-H), 4.76 – 4.73 (1H, m, 3-H), 4.58 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, 24-H), 4.22 (1H, pt, *J* = 10.9 Hz, 7-H), 3.65 – 3.57 (2H, m, 10-H, 15-H_a), 3.37 (3H, s, 10-OMe), 3.31 (1H, m, unter MeOH, 15-H_b), 3.26 (3H, s, 1-NMe), 2.87 – 2.81 (2H, m, 5-H, 2-H_a), 2.79 – 2.72 (3H, m, 25-CH_2, 2'-H), 2.37 (2H, p, *J* = 6.8 Hz, 26-H), 2.26 – 2.20 (1H, m, 2-H_b), 1.74 (3H, s, 14-Me), 1.63 – 1.50 (1H, m, 6-H), 1.25 – 1.20 (9H, m, 6-Me, 2x 3'-Me), 0.90 (3H, s, 4-Me) ppm;
nicht zugeordnet werden konnten die Signale von 8-CH_2.

t_R (UPLC)= 2.33 min; **HRMS (ESI)** für $C_{36}H_{50}N_5O_8S$ $[M+H]^+$: berechnet 712.3380, gefunden 712.3385.

5.6 VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 3.2

3-*Boc*-Amino-5-(1-Trimethylsilylpropargyl)-^{t}Butyldiphenyllsilylphenol 71a



71 **71a**

0.11 mL TMS-Acetylen (0.79 mmol) wurden unter Argon in 0.5 mL THF gelöst, bei -78 °C langsam mit 0.32 mL *n*-Butyllithium-Lösung (c= 2.5 mol/L Hexan; 0.8 mmol; 1 Äq) versetzt und 1 Stunde gerührt.

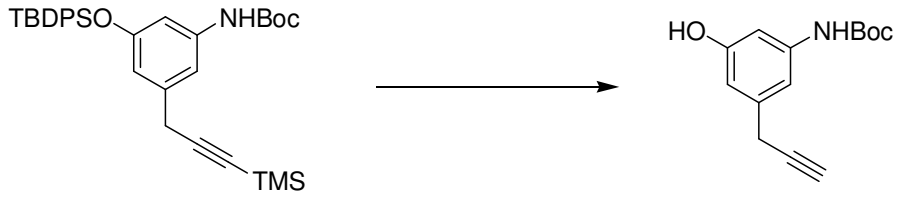
In einem zweiten Kolben wurden 44.2 mg Indium(III)chlorid (0.2 mmol) ausgeheizt und nach dem Abkühlen in 0.5 mL THF suspendiert. Bei -78 °C wurden langsam 0.7 mL der Lithium-TMS-Acetylen-Lösung zugetropft. Nach beendeter Zugabe rührte die Mischung 30 min bei -78 °C, wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und rührte auch bei dieser Temperatur nochmals 30 min.

In einem dritten Kolben wurden 199 mg des Benzylbromids **71** (0.37 mmol; 1 Äq) unter Argon in 2.5 mL THF gelöst und mit 5.7 mg $Pd(dppf)Cl_2$x CH_2Cl_2 (7 µmol;0.02 Äq) versetzt. Die Mischung wurde auf 65 °C erwärmt, bei dieser Temperatur mit der vorher hergestellten Indiumtri-(trimethylsilylacetylen)-Lösung (0.2 mmol; 0.6 Äq) versetzt und 20 Stunden bei 65 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde mit Methanol hydrolysiert und das Rohprodukt direkt auf Kieselgel aufgebracht. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (20:1 → 10:1) konnten 155 mg 3-Boc-Amino-5-(TMS-propargyl)-^{t}Butyldiphenylsilylphenol **71a** (0.28 mmol) in einer Ausbeute von 75 % isoliert werden. Die analytischen Daten entsprechen denen der Literatur.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$ = 7.26 ppm): δ_H = 7.75 – 7.71 (4H, m, TBDPS), 7.45 – 7.35 (6H, m, TBDPS), 7.05 (1H, bs, NH), 6.60 (1H, s, Ar-H), 6.49 (1H, s, Ar-H), 6.30 (1H, s, Ar-H), 3.43 (2H, s, $BnCH_2$), 1.48 (9H, s, ^{t}Bu-Boc), 1.10 (9H, s, ^{t}Bu-TBDPS), 0.15 (9H, s, TMS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 156.1 (s, Ar-C), 152.4 (s, Boc-CO), 139.1 (s, Ar-C), 138.1 (s, Ar-C), 135.4 (d, TBDPS), 132.8 (s, TBDPS), 129.8 (d,

TBDPS), 127.7 (d, TBDPS), 114.0 (d, Ar-C), 110.9 (d, Ar-C), 108.1 (d, Ar-C), 103.9 (s, Alkin-C), 86.9 (s, Alkin-C), 80.4 (s, Boc), 28.3 (q, Boc), 26.5 (q, TBDPS), 26.0 (t, Bn-CH_2), 19.4 (s, TBDPS), 0.0 (q, TMS) ppm. **HRMS** (ESI) für $C_{33}H_{43}NO_3Si_2Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 580.2679, gefunden 580.2681; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.35.

3-*Boc*-Amino-5-propargylphenol 72

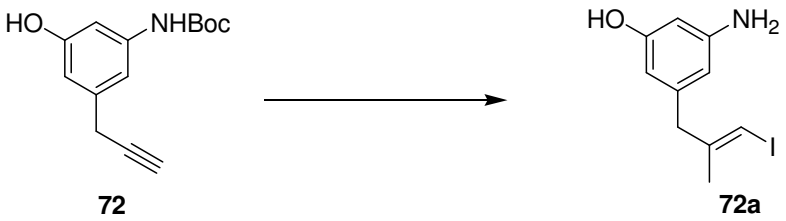


71a **72**

155 mg *3-Boc-Amino-5-(TMS-propargyl)-^{t}Butyldiphenylsilylphenol* **71a** (0.28 mmol; 1 Äq) wurden in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst und bei 0 °C mit einer Lösung aus 177 mg (0.56 mmol; 2 Äq) Tetrabutylammoniumfluorid in 1 mL Tetrahydrofuran versetzt. Die Mischung rührte 1 Stunde und wurde dann mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum konzentriert und säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (5:1 → 2:1) gereinigt. Es resultierten 64 mg *3-Boc-Amino-5-propargylphenol* **72** (0.26 mmol) in einer Ausbeute von 92 %. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.98 (1H, bs, OH), 6.77 (1H, m, Ar-H), 6.55 (1H, m, Ar-H), 6.52 (1H, m, Ar-H), 5.78 (1H, bs, NH), 3.50 (2H, d, *J* = 2.7 Hz, $BnCH_2$), 2.17 (1H, t, *J* = 2.7 Hz, Alkin-H), 1.51 (9H, s, ^{t}Bu-Boc) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 156.6 (s, Ar-C), 152.8 (s, Boc-CO), 139.5 (s, Ar-C), 138.3 (s, Ar-C), 111.0 (d, Ar-C), 109.8 (d, Ar-C), 104.2 (d, Ar-C), 81.5 (s, Alkin-C), 80.9 (s, ^{t}Bu-Boc), 70.7 (d, Alkin-CH), 28.3 (q, Boc), 24.6 (t, $BnCH_2$) ppm. **HRMS** (ESI) für $C_{14}H_{16}NO_3$ $[M-H]^-$: berechnet 246.1130, gefunden 246.1132; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.05.

(E)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropen 72a

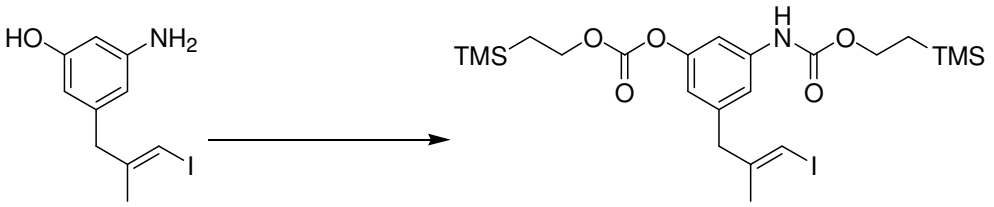


72 **72a**

228 mg Zirkonocenchlorid (0.78 mmol; 3 Äq) wurden in 3.5 mL Dichlorethan gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und langsam mit 2.3 mL Trimethylaluminiumlösung (c = 2 mol/L Toluol; 2.3 mmol; 9 Äq) versetzt. Die Mischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wieder auf 0 °C gekühlt und mit 64 mg *3-Boc-Amino-5-propargylphenol* **72** (0.26 mmol; 1 Äq) gelöst in 0.5 mL Dichlorethan versetzt. Die entstandene Suspension wurde 3 Tage bei Raumtemperatur sehr stark gerührt. Nach dieser Zeit wurde die nun gelbe und leicht trübe Suspension auf -30 °C gekühlt und mit 396 mg Iod (1.56 mmol; 6 Äq) in 1 mL THF versetzt. Die braune Mischung wurde auf 0 °C erwärmt, bei dieser Temperatur mit Kaliumnatriumtartratlösung hydrolysiert und 4 Stunden gerührt. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit Natriumthiosulfatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und direkt auf Kieselgel aufrotiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1) resultierten 35 mg *(E)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropen* **72a** (0.12 mmol) in einer Aubeute von 46 %. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.07 (1H, s, Ar-H), 6.05 (1H, m, Ar-H), 6.03 (1H, s, CHI), 5.98 (1H, s, Ar-H), 3.32 (2H, s, $BnCH_2$), 1.78 (3H, s, CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 156.7 (s, Ar-C), 147.8 (s, olef.-C), 146.8 (s, Ar-C), 141.0 (s, Ar-C), 108.4 (d, Ar-C), 106.2 (d, Ar-C), 100.5 (d, Ar-C), 76.7 (d, CHI), 45.5 (q, CH_3), 23.7 (t, $BnCH_2$) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{10}H_{11}NOI$ $[M-H]^-$: berechnet 287.9885, gefunden 287.9898; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.09.

_N,O_-Bis-Teoc-3-amino-5-(3-iodo-2-methylallyl)phenol 73



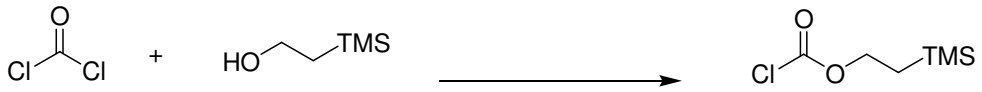
72a **73**

35 mg *(E)-3-(3-Amino-5-hydroxyphenyl)-2-methylpropen* **72a** (0.12 mmol; 1 Äq) wurden in 1 mL Dichlormethan gelöst und mit 48.5 µL Pyridin (0.6 mmol; 5 Äq) versetzt. 0.34 mL frisch hergestellte Trimethylsilylethoxycarbonylchloridlösung[129] **73a** (c=1.4 mol/L Toluol; 0.48 mmol; 4 Äq) wurden sehr langsam mittels Spritzenpumpe zugegeben während bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nachdem weitere 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 mL Phosphatpuffer beendet. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung mittels einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (20:1 →10:1) resultierten 64 mg *N,O-Bis-Teoc-3-amino-5-(3-iodo-2-methylallyl)phenol* **73** (0.11 mmol) in Form eines hellgelben Öls und in einer Ausbeute von 93 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.23 (1H, s, Ar-H), 7.00 (1H, m, Ar-H), 6.66 (1H, s, Ar-H), 6.58 (1H, s, NH), 6.02 (1H, s, CHI), 4.36 – 4.30 (2H, m, Teoc-OCH_2), 4.28 – 4.22 (2H, m, Teoc-OCH_2), 3.45 (2H, s, $BnCH_2$), 1.78 (3H, s, CH_3), 1.16 – 1.10 (2H, m, Teoc-$TMSCH_2$), 1.07 – 1.01 (2H, m, Teoc-$TMSCH_2$), 0.07 (9H, s, Teoc-TMS), 0.06 (9H, s, Teoc-TMS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 153.5 (s, Teoc), 153.4 (s, Teoc), 151.7 (s, Ar-C), 146.1 (s, Ar-C), 140.5 (s, olef.-C), 139.1 (s, Ar-C), 116.1 (d, 2x Ar-C), 109.8 (d, Ar-C), 77.4 (d, CHI), 67.4 (t, Teoc-OCH_2), 63.8 (t, Teoc-OCH_2), 45.4 (q, CH_3), 23.6 (t, $BnCH_2$), 17.7 (t, Teoc-$TMSCH_2$), 17.5 (t, Teoc-$TMSCH_2$), -1.5 (q, Teoc-TMS), -1.6 (q, Teoc-TMS) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{22}H_{35}NO_5ISi_2$ $[M-H]^-$: berechnet 576.1099, gefunden 576.1096; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.25.

[129] Siehe unten.

Teocchlorid 73a

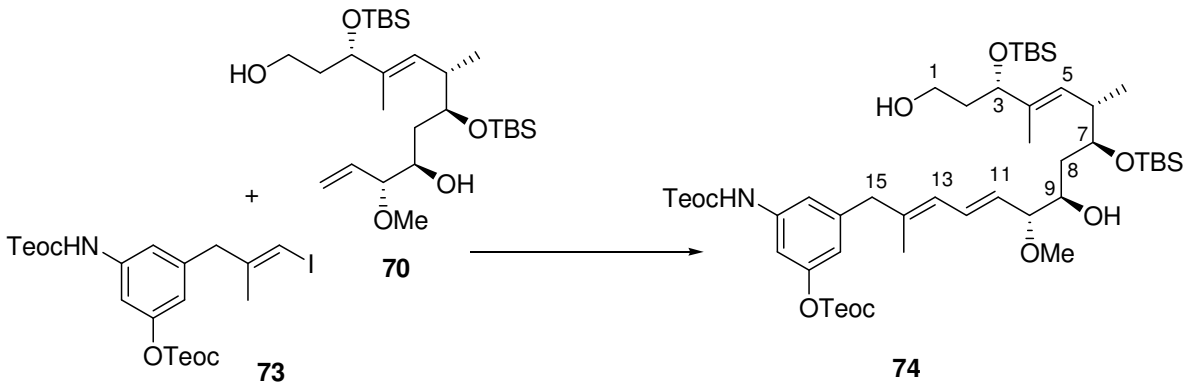


73a

912 mg Kaliumcarbonat (6.6 mmol; 0.86 Äq) wurden im zuvor ausgeheizten Kolben in 10 mL trockenem Toluol suspendiert und auf -10 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1.1 mL Trimethylsilylethanol (7.67 mmol; 1 Äq) zugegeben und anschließend 5.3 mL Phosgenlösung (w=20% in Toluol; 10 mmol; 1.3 Äq). Die Lösung rührte 30 Minuten bei -10 °C, wurde dann auf Raumtemperatur erwärmt und rührte bei dieser Temperatur eine weitere Stunde. Anschließend wurde die Lösung ca. 1 Stunde mit Argon durchströmen lassen und die Abluft in eine Waschflasche mit Natriumhydroxidlösung (c=2 mol/L) geleitet. Zur Aufarbeitung wurde Kaliumcarbonat unter Schutzgas abfiltriert, mit etwas trockenem Toluol nachgewaschen und die Lösung bei 30 °C und 45 mbar einrotiert. Die Konzentration der Trimethylsilyloxycarbonylchloridlösung in Toluol wurde mittels NMR-Analytik bestimmt. Die Ausbeute betrug 90 %, die erhaltene Lösung hatte eine Stoffmengenkonzentration von 1.4 mol/L. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H, 4.46 – 4.37 (2H, m, Teoc-OCH_2), 1.19 – 1.10 (2H, m, Teoc-$TMSCH_2$), 0.07 (9H, s, Teoc-TMS) ppm.

Diol 74

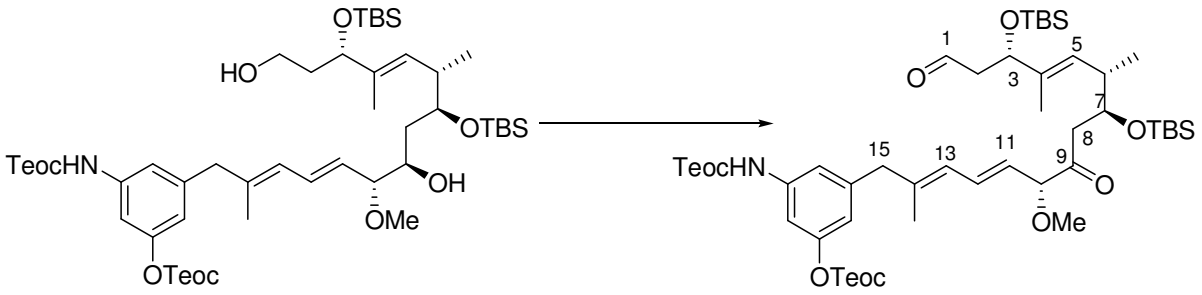


117.8 mg Olefin **70** (0.23 mmol; 1 Äq) und 174.3 mg Vinyliodid **73** (0.32 mmol; 1.4 Äq) wurden unter Argon in 1.5 mL entgastem absoluten DMF gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 73.4 mg TBAB (0.23 mmol; 1 Äq) und 81.5 mg Cäsiumcarbonat (0.25 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Der entstandenen bräunlichen Suspension wurden 51.2 mg Palladiumacetat (0.23 mmol; 1 Äq) und 32 µL Triethylamin (0.23 mmol; 1Äq) zugesetzt. Die tief dunkle Lösung rührte 6 Stunden bei RT und wurde dann mit wenig Toluol zum Nachspülen auf eine Kieselgelsäule aufgetragen, die mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (10:1) konditioniert war. Chromatographiert wurde mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (5:1). Es wurden 175 mg des Diols **74** (0.19 mmol) in Form eines hellgelben Öls isoliert. Das entspricht einer Ausbeute von 82 %. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.28 (1H, s, Ar-H), 6.96 (1H, s, Ar-H), 6.72 (1H, s, NH), 6.68 (1H, s, Ar-H), 6.44 (1H, dd, *J* = 15.0 Hz, 10.9 Hz, 12-H), 5.93 (1H, d, J = 10.9 Hz, 13-H), 5.46 – 5.38 (2H, m, 11-H, 5-H), 4.36 – 4.21 (4H, m, Teoc-CH_2O), 4.18 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, 3-H), 3.82 – 3.76 (1H, m, 7-H), 3.72 – 3.65 (3H, m, 1-CH_2, 9-H), 3.40 (1H, dd, *J* = 8.2 Hz, 6.8 Hz, 10-H), 3.32 (2H, s, 15-CH_2), 3.30 (3H, s, 10-OMe), 2.73 (1H, s, 1-OH), 2.71 – 2.64 (1H, m, 6-H), 2.38 (1H, s, 9-OH), 1.79 – 1.73 (2H, m, 2-CH_2), 1.70 (3H, s, 14-CH_3), 1.59 (3H, s, 4-CH_3), 1.57 – 1.49 (2H, m, 8-CH_2), 1.17 – 1.00 (4H, m, Teoc-CH_2TMS), 0.90 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.89 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.08 – 0.04 (30H, m, TBS-CH_3, TMS-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 153.6 (s, Teoc-CO), 153.5 (s, Teoc-CO), 151.7 (s, Ar-C), 141.7 (s, Ar-C), 139.1 (s, Ar-C), 138.0 (s, 14-C), 136.0 (s, 4-C), 131.2 (d, 12-C), 128.6 (d, 11-C), 128.3 (d, 5-C), 126.1 (d, 13-C), 116.3 (d, Ar-C), 116.3 (d, Ar-C), 109.6 (d, Ar-C), 86.4 (d, 10-C), 76.8 (d, 3-C), 74.1 (d, 7-C), 71.1 (d, 9-C),

67.3 (t, Teoc), 63.6 (t, Teoc), 60.3 (t, 1-C), 56.5 (q, 10-OMe), 46.1 (t, 15-C), 38.1 (t, 2-C), 37.2 (t, 8-C), 36.9 (d, 6-C), 26.0 (q, TBS), 25.9 (q, TBS), 18.1 (s, TBS), 18.1 (s, TBS), 17.8 (t, Teoc), 17.5 (t, Teoc), 16.5 (q, 14-CH_3), 15.9 (q, 6-CH_3), 12.8 (q, 4-CH_3), -1.5 (q, Teoc-TMS), -1.6 (q, Teoc-TMS), -4.1 (q, TBS), -4.4 (q, TBS), -4.5 (q, TBS), -5.2 (q, TBS) ppm; **UPLC-MS** t_R = 4.11 min; **HRMS** (ESI) für $C_{49}H_{91}NO_{10}Si_4Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 988.5618, gefunden 988.5617; **Rf** (PE/EE = 5:1) = 0.11.

Ketoaldehyd 75



74 **75**

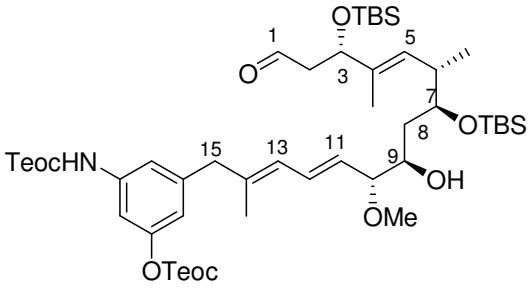
1) Swern-Oxidation

103 µL DMSO (1.44 mmol; 12 Äq) wurden unter Argon in 4.5 mL absolutem Dichlormethan gelöst, die Lösung wurde auf –60 °C gekühlt und bei dieser Temperatur langsam mit 360 µL Oxalylchlorid (0.72 mmol; 6 Äq) versetzt, wobei HCl-Gasentwicklung beobachtet werden konnte. Nach 40 min wurde 112.3 mg Diol **74** (0.12 mmol; 1 Äq) gelöst in 4 mL Dichlormethan zugetropft und die Mischung wurde bei –60 °C gerührt. Nach einer Stunde wurden 253 µL Triethylamin (1.8 mmol; 15 Äq) zugegeben und die Temperatur langsam erhöht. Bei einer Temperatur von –40 °C wurde die Reaktion durch Hydrolyse mit Phosphatpuffer (pH 7) abgebrochen. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde das Produkt mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum abdestilliert. Die entstandenen 126.2 mg dunkelgelbes Rohprodukt wurden säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (10:1) gereinigt. Es konnten 81.3 mg des leicht gelb gefärbten Ketoaldehyds **75** (0.087 mmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 73 %. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

2) TPAP-Oxidation

8 mg gepulvertes Molsieb (4 A) wurden im Schlenck-Kolben im Vakuum ausgeheizt. Nach dem Abkühlen wurden 15 mg Diol **74** (16 µmol; 1 Äq) gelöst in 0.5 mL Dichlormethan zugegeben und mit 4.7 mg NMO (40 µmol; 2.5 Äq) und 0.3 mg TPAP (0.08 µmol; 0.05 Äq) unter Argon versetzt. Die Reaktion rührte eine Stunde bei Raumtemperatur. Zu diesem Zeitpunkt war das Edukt verbraucht. Das Zugeben von weiteren Reagenzien führte nicht zum weiteren Verlauf der Reaktion. Deshalb wurde die Reaktionsmischung direkt über Kieselgel filtriert, mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1) gut nachgespült und die resultierende Lösung konzentriert. Das monooxidierte Produkt wurde direkt nach obiger Vorschrift wieder in die Reaktion eingesetzt. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit wenig Dichlormethan zum Nachspülen auf eine Kieselgelsäule gegeben, die mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (10:1) konditioniert war. Chromatographiert wurde mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (5:1). Es wurden 9 mg des Ketoaldehyds **75** (9.7 µmol) in Form eines hellgelben Öls und einer Ausbeute von 60 % isoliert. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

Aldehyd 75a

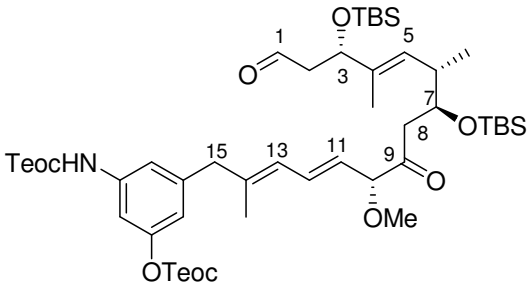


75a

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 9.73 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, CHO), 7.25 (1H, s, Ar-H), 7.00 (1H, s, Ar-H), 6.68 (1H, s, Ar-H), 6.58 (1H, s, NH), 6.44 (1H, dd, *J* = 15.1, 11.0 Hz, 12-H), 5.93 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.45 (1H, dd, *J* = 9.7, 1.1 Hz, 5-H), 5.40 (1H, dd, *J* = 15.1, 8.2 Hz, 11-H), 4.48 (1H, dd, *J* = 4.2, 0.2 Hz, 3-H), 4.34 – 4.21 (4H, m, Teoc-CH_2O), 3.81 (1H, dd, *J* = 7.2, 4.7 Hz, 9-H), 3.68 – 3.61 (1H, m, 7-H), 3.41 (1H, dd, *J* = 8.2, 7.2 Hz, 10-H), 3.32 (2H, bs, 15-CH_2), 3.30 (3H, s, 10-OMe), 2.74 (1H, s, 9-OH), 2.68 – 2.63 (1H, m, 6-H), 2.61 (1H, ddd, *J* = 15.3, 8.0, 2.7 Hz, 2-CH_2), 2.42 (1H, ddd, J = 15.3, 4.2, 2.7 Hz, 2-CH_2), 1.70 (3H, d, *J* = 1.13 Hz, 14-CH_3), 1.61 (3H, d, *J* = 1.4 Hz, 4-CH_3), 1.58

(2H, s, 8-CH_2), 1.15 – 1.00 (4H, m, Teoc-CH_2TMS), 0.90 – 0.88 (12H, m, TBS-^{t}Bu, 6-Me), 0.86 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.07 – 0.00 (30H, m, TBS-CH_3, TMS-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 202.3 (d, CHO), 153.6 (s, Teoc-CO), 153.4 (s, Teoc-CO), 151.6 (s, Ar-C), 141.8 (s, Ar-C), 139.0 (s, Ar-C), 138.1 (s, 14-C), 135.3 (s, 4-C), 131.3 (d, 12-C), 129.3 (d, 11-C), 128.4 (d, 5-C), 126.0 (d, 13-C), 116.4 (d, 2 C, Ar-C), 109.5 (d, Ar-C), 86.4 (d, 10-C), 73.7 (d, 7-C), 73.5 (d, 3-C), 71.2 (d, 9-C), 67.4 (t, Teoc), 63.7 (t, Teoc), 56.5 (q, 10-OMe), 50.3 (t, 2-C), 46.1 (t, 15-C), 37.1 (t, 8-C), 36.5 (d, 6-C), 26.0 (q, TBS), 25.7 (q, TBS), 18.1 (s, 2C, TBS), 17.7 (t, Teoc), 17.5 (t, Teoc), 16.5 (q, 14-CH_3), 15.2 (q, 6-CH_3), 12.2 (q, 4-CH_3), -1.5 (q, Teoc-TMS), -1.6 (q, Teoc-TMS), -4.1 (q, TBS), -4.4 (q, TBS), -4.5 (q, TBS), -5.2 (q, TBS) ppm; **HRMS** (ESI) für $C_{49}H_{89}NO_{10}Si_4Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 986.5461, gefunden 986.5447; **Rf** (PE/EE =5:1) = 0.25.

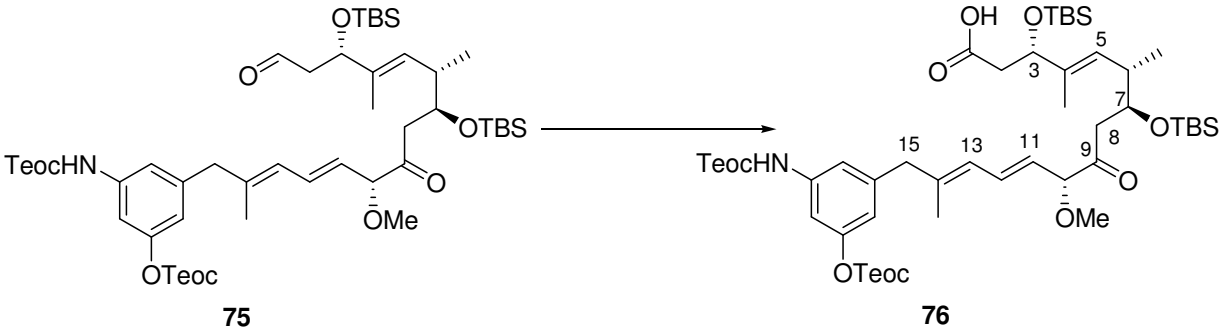
Ketoaldehyd 75



75

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 9.72 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, CHO), 7.25 (1H, s, Ar-H), 6.97 (1H, s, Ar-H), 6.69 – 6.52 (3H, m, Ar-H, 12-H, NH), 5.91 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, 13-H), 5.44 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.3 Hz, 11-H), 5.41 – 5.34 (1H, m, 5-H), 4.48 (1H, ddd, *J* = 7.7, 4.6, 0.4 Hz, 3-H), 4.36 – 4.19 (4H, m, Teoc-CH_2O), 4.15 – 4.05 (2H, m, 7-H, 10-H), 3.32 (2H, bs, 15-CH_2), 3.30 (3H, s, 10-OMe), 2.77 – 2.35 (5H, m, 8-CH_2, 2-CH_2, 6-H), 1.70 (3H, s, 14-CH_3), 1.61 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, 4-CH_3), 1.17 – 0.98 (4H, m, Teoc-CH_2TMS), 0.86 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.84 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.07 – 0.00 (30H, m, TBS-CH_3, TMS-CH_3) ppm; **HRMS** (ESI) für $C_{49}H_{87}NO_{10}Si_4Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 984.5305, gefunden 984.5312; **Rf** (PE/EE = 5:1) = 0.37.

Ketosäure 76



75 **76**

1) PINNICK-Oxidation

13.1 mg Ketoaldehyd **75** (0.014 mmol; 1 Äq) wurden in 0.8 mL ^{t}Butanol gelöst und mit 250 µL 2-Methyl-2-buten versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit einer Lösung von 14.3 mg 80 %igem Natriumchlorit (0.126 mmol; 9 Äq) und 19.3 mg Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat (0.14 mmol; 10 Äq) in 0.3 mL Wasser versetzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 30 min gerührt. Nach dieser Zeit war die Reaktion komplett und wurde mit Phosphatpuffer hydrolysiert. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Nach Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (5:1) gereinigt. Es konnten 11.8 mg Ketosäure **76** (0.012 mmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 86 %. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur[1] überein.

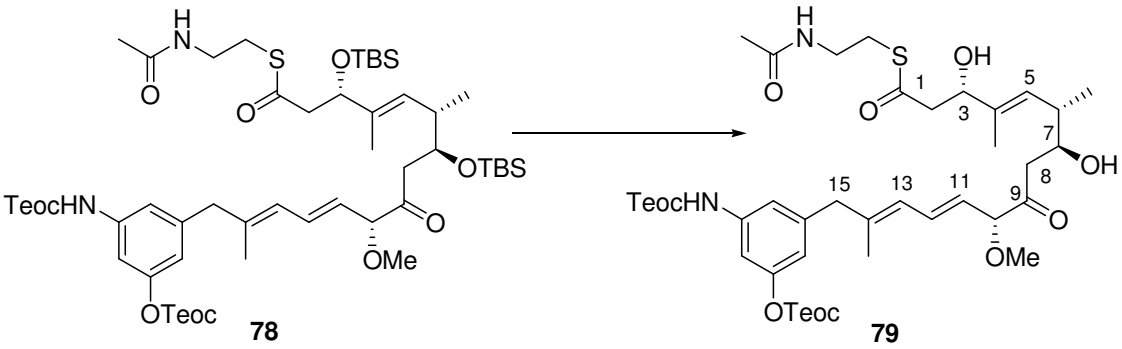
2) JONES-Oxidation

23 mg Diol **74** (25 µmol; 1 Äq) wurden in 800 µL Aceton gelöst und bei 0 °C mit 20 µL Jones-Reagenz[85] (15g CrO_3, 13 mL H_2SO_4, 50 mL H_2O) versetzt. Nach 20 min war das Edukt verbraucht und die Reaktion wurde mit Isopropanol abgebrochen und anschließend mit Wasser versetzt. Das Rohprodukt wurde mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und im Vakuum vom Lösemittel befreit. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Ethylacetat-Mischung (5:1). Es konnten 13.6 mg Ketosäure **76** (14 µmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 56 %. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

[1] frenzel paper

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.26 (1H, s, Ar-H), 6.92 (1H, s, Ar-H), 6.67 (1H, s, Ar-H), 6.62 (1H, dd, *J* = 15.1, 11.0 Hz, 12-H), 5.92 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.43 (1H, dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, 11-H), 5.35 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, 5-H), 4.43 (1H, dd, *J* = 7.0, 5.1 Hz, 3-H), 4.35 – 4.21 (4H, m, Teoc-CH_2O), 4.16 – 4.06 (2H, m, 7-H, 10-H), 3.34 (3H, s, 10-OMe), 3.32 (2H, bs, 15-CH_2), 2.66 – 2.61 (2H, m, 2-CH_2), 2.55 – 2.42 (3H, m, 8-CH_2, 6-H), 1.71 (3H, s, 14-CH_3), 1.60 (3H, s, 4-CH_3), 1.09 – 1.00 (4H, m, Teoc-CH_2TMS), 0.88 – 0-83 (21H, m, TBS-^{t}Bu, 6-Me), 0.07 – 0.03 (30H, m, TBS-CH_3, TMS-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 206.8 (s, 9-C), 175.6 (s, 1-C), 153.6 (s, Teoc-CO), 153.6 (s, Teoc-CO), 151.6 (s, Ar-C), 141.6 (s, Ar-C), 139.4 (s, 14-C), 139.0 (s, Ar-C), 135.8 (s, 4-C), 131.8 (d, 12-C), 128.9 (d, 5-C), 125.7 (d, 13-C), 125.3 (d, 11-C), 116.3 (d, 2-C, Ar-C), 109.6 (d, Ar-C), 88.6 (d, 10-C), 74.9 (d, 3-C), 71.6 (d, 7-C), 67.4 (t, Teoc), 63.7 (t, Teoc), 56.7 (q, 10-OMe), 46.0 (t, 15-C), 43.7 (t, 8-C), 41.8 (t, 2-C), 38.1 (d, 6-C), 25.9 (q, TBS), 25.7 (q, TBS), 18.1 (s, TBS), 18.0 (s, TBS), 17.7 (t, Teoc), 17.5 (t, Teoc), 16.6 (q, 14-CH_3), 15.8 (q, 6-CH_3), 12.3 (q, 4-CH_3), -1.5 (q, Teoc-TMS), -1.6 (q, Teoc-TMS), -4.5 (q, TBS), -4.5 (q, TBS), -4.5 (q, TBS), -5.3 (q, TBS) ppm; **HRMS** (ESI) für $[M-H]^-$: berechnet 976.5278, gefunden 976.5281; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.36.

SNAC-Ester 78

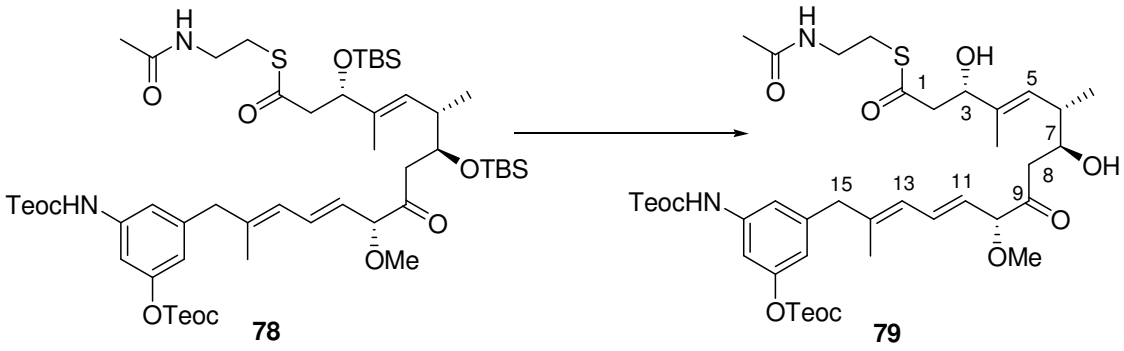


19.5 mg Säure **76** (0.02 mmol; 1 Äq) wurden unter Argon in 0.5 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Lösung wurde bei dieser Temperatur mit 8.5 µL *N*-Acetylcysteamin (0.08 mmol; 4 Äq), einem Krümel DMAP und 2.3 µL DIC (0.03 mmol; 1.3 Äq) versetzt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion war nach 1.5 Stunden abgeschlossen. Das ausgefallene Harnstoffderivat wurde abfiltriert, gut mit Dichlormethan nachgespült und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wurde mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (1:1) über eine kurze Kieselgel-

Filtersäule gedrückt. Das danach aufgenommene Roh-NMR, sowie auch das LC-MS wiesen nur wenige Verunreinigungen auf, so dass das Produkt direkt in die nächste Stufe eingesetzt wurde.

HRMS (ESI) für $[M+H]^+$: berechnet 1079.5734, gefunden 1079.5731; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.21.

Thioester 79



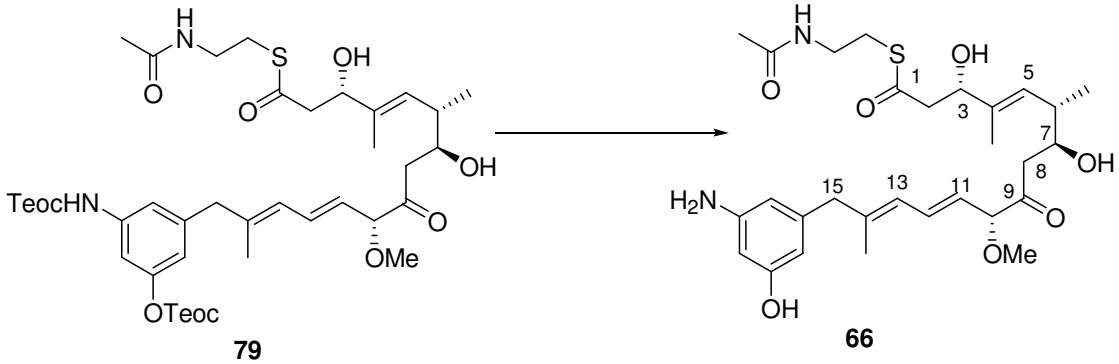
10.3 mg N-Acetylcysteamin-Thioester **78** (9.5 µmol; 1 Äq) wurden unter Argon in 50 µL THF gelöst, die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 8 µL Pyridin (95 µmol; 10 Äq) und 7.5 µL HF-Pyridin (~ 70 %) versetzt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion dauerte 9 Stunden und wurde dann durch die Zugabe von Essigsäureethylester und Phosphatpuffer beendet. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester aus der wässrigen Phase extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, dieses wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Wasser-Methanol-Gradienten (60: 40 → 100 % Methanol, 60 min; 100 % Methanol, 10 min) über eine RP18-Säule gereinigt. Es resultierten 4 mg Thioester **79** (4.6 µmol). Das entspricht einer Aubeute von 24 % über 2 Stufen. Die analytischen Daten stimmten mit denen in der Literatur[130] angegebenen überein.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.31 (1H, s, Ar-H), 6.94 (1H, s, NH), 6.89 (1H, s, Ar-H), 6.66 (1H, s, Ar-H), 6.60 (1H, ddd, *J* = 15.2, 11.0, 1.1 Hz, 12-H), 5.94

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

(1H, bs, SNAC-NH), 5.90 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.45 (1H, dd, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 11-H), 5.30 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 4.45 (1H, dd, *J* = 7.9, 4.1 Hz, 3-H), 4.35 – 4.21 (4H, m, Teoc-CH_2O), 4.16 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, 10-H), 3.84 (1H, pt, *J* = 7.5 Hz, 7-H), 3.42 (2H, pq, *J* = 6.4 Hz, SNAC-CH_2), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.32 (2H, bs, 15-CH_2), 3.05 – 3.00 (2H, m, SNAC-CH_2), 2.83 – 2.73 (3H, m, 1x 8-CH_2, 2x 2-CH_2), 2.61 – 2.47 (2H, m, 1x 8-CH_2, 6-H), 1.95 (3H, s, SNAC-CH_3), 1.72 (3H, d, *J* = 1.0 Hz, 4-CH_3), 1.65 (3H, d, *J* = 1.4 Hz, 14-CH_3), 1.15 – 1.01 (4H, m, Teoc-CH_2TMS), 1.01 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 6-Me), 0.07 (9H, s, TMS-CH_3), 0.05 (9H, s, TMS-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 210.0 (s, 9-C), 198.8 (s, 1-C), 170.5 (s, SNAC-CO), 153.4 (s, 2 C, Teoc-CO), 151.6 (s, Ar-C), 141.4 (s, Ar-C), 140.0 (s, 14-C), 139.2 (s, Ar-C), 136.3 (s, 4-C), 131.9 (d, 12-C), 128.5 (d, 5-C), 125.5 (d, 13-C), 125.1 (d, 11-C), 116.4 (d, 2 C, Ar-C), 109.7 (d, Ar-C), 88.3 (d, 10-C), 73.7 (d, 3-C), 71.6 (d, 7-C), 67.4 (t, Teoc), 63.7 (t, Teoc), 57.0 (q, 10-OMe), 49.4 (t, 2-C), 46.0 (t, 15-C), 42.3 (t, 8-C), 39.2 (t, SNAC-CH_2), 37.7 (d, 6-C), 29.0 (t, SNAC-CH_2), 23.2 (q, SNAC-CH_3), 17.7 (t, Teoc), 17.5 (t, Teoc), 16.7 (q, 14-CH_3), 16.4 (q, 6-CH_3), 12.7 (q, 4-CH_3), -1.5 (q, Teoc-TMS), -1.5 (q, Teoc-TMS) ppm; **UPLC-MS**; t_R =2.88 min ; **HRMS (ESI)** für $C_{41}H_{67}N_2O_{11}SSi_2$ $[M+H]^+$: berechnet 851.4004, gefunden 851.3994; **Rf** (DCM/MeOH = 20:1) = 0.17.

seco-Proansamitocin-*N*-Acetylcysteaminthioester 66

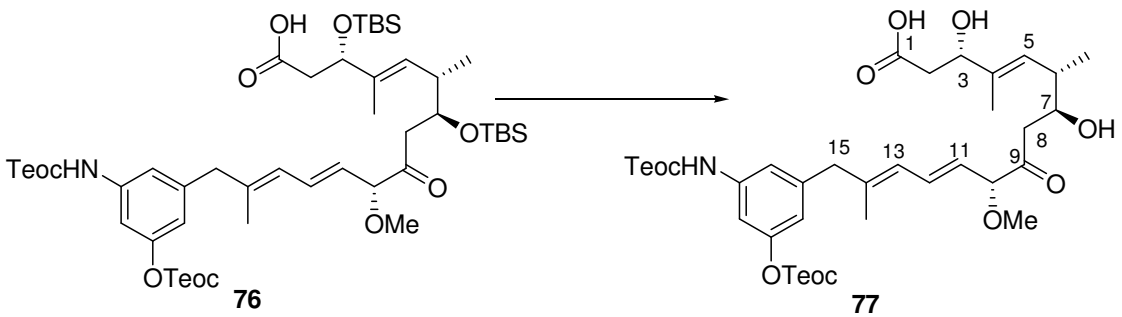


4 mg Thioester **79** (4.6 µmol; 1 Äq) wurden in 0.5 mL Nitromethan unter Argon gelöst und mit 9.4 mg Zinkchlorid (69 µmol; 15 Äq) versetzt. Die Mischung wurde mit Ultraschall behandelt, wobei ein hellbrauner Niederschlag ausfiel. Nach 2.5 Stunden war die Reaktion abgeschlossen und das entstandene Zinkat wurde durch die Zugabe von Phosphatpuffer hydrolysiert. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten

organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten (80: 20 → 100 % Acetonitril; 70 min) über eine RP18-Säule gereinigt. Es resultierten 1.3 mg *seco-Proansamitocin-N-Acetylcysteaminthioester* **66** (2.1 µmol). Das entspricht einer Aubeute von 47 %. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur überein.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.66 (1H, ddd, *J* = 15.0, 10.5, 0.6 Hz, 12-H), 6.15 (1H, bs, SNAC-NH), 6.08 – 6.07 (1H, m, Ar-H), 6.07 – 6.05 (1H, m, Ar-H), 6.03 – 6.01 (1H, m, Ar-H), 5.89 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, 13-H), 5.43 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.5 Hz, 11-H), 5.27 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, 5-H), 4.45 (1H, dd, *J* = 7.8, 3.6 Hz, 3-H), 4.17 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 10-H), 3.88 – 3.83 (1H, m, 7-H), 3.46 – 3.34 (2H, m, SNAC-CH_2), 3.36 (3H, s, 10-OMe), 3.23 – 3.14 (2H, m, 15-CH_2), 3.11 – 2.95 (3H, m, SNAC-CH_2, OH), 2.88 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.9 Hz, 2-CH_2), 2.80 – 2.71 (2H, m, 8-CH_2, 2-CH_2), 2.59 – 2.52 (2H, m, 8-CH_2, 6-H), 1.95 (3H, s, SNAC-CH_3), 1.73 (3H, d, *J* = 0.7 Hz, 14-CH_3), 1.64 (3H, d, *J* = 1.4 Hz, 4-CH_3), 1.86 – 1.38 (4H, bs, NH_2, 2x OH), 1.01 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 6-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 209.9 (s, 9-C), 198.7 (s, 1-C), 171.1 (s, SNAC-CO), 157.5 (s, Ar-C), 147.7 (s, Ar-C), 141.6 (s, Ar-C), 141.3 (s, 14-C), 136.6 (s, 4-C), 132.3 (d, 12-C), 128.1 (d, 5-C), 124.8 (d, 13-C), 124.5 (d, 11-C), 108.5 (d, Ar-C), 106.0 (d, Ar-C), 100.5 (d, Ar-C), 88.5 (d, 10-C), 73.7 (d, 3-C), 71.6 (d, 7-C), 57.0 (q, 10-OMe), 49.0 (t, 2-C), 46.1 (t, 15-C), 41.9 (t, 8-C), 39.2 (t, SNAC-CH_2), 37.6 (d, 6-C), 29.0 (t, SNAC-CH_2), 23.1 (q, SNAC-CH_3), 16.8 (q, 14-CH_3), 16.7 (q, 6-CH_3), 13.0 (q, 4-CH_3) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 1.27 min ; **HRMS** (ESI) für $C_{29}H_{43}N_2O_7S$ $[M+H]^+$: berechnet 563.2791, gefunden 563.2791; **Rf** (DCM/MeOH = 10:1) = 0.18.

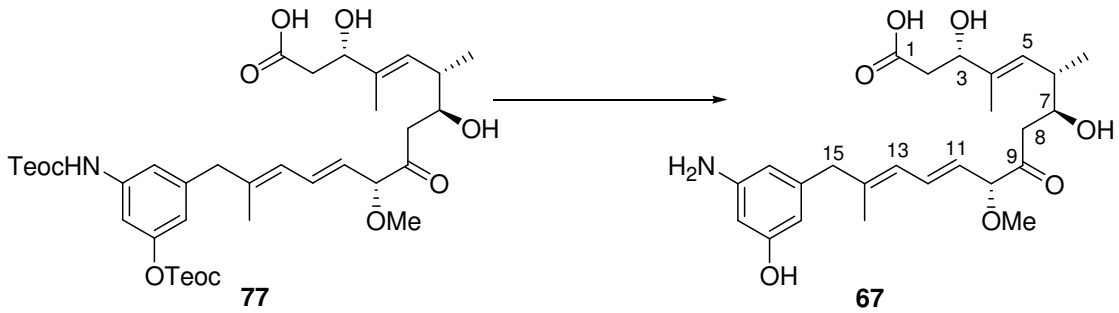
Carbonsäure 77



3.9 mg polysilylgeschützte Säure **76** (40 µmol; 1 Äq) wurden unter Argon in 50 µL THF gelöst, die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt, mit 3.2 µL HF-Pyridin (~ 70 %) versetzt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 6 Stunden trat auf der DC ein Schmierspur auf, die auf Zersetzung hindeutete. Deshalb wurde nach dieser Zeit durch die Zugabe von Essigsäureethylester und Phosphatpuffer beendet. Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureethylester aus der wässrigen Phase extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, dieses wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt auf die HPLC gegeben und erst mit einem Wasser-Methanol-Gradienten (60: 40 → 0: 100; 70 min) über eine RP18-Säule und anschließend über eine CN-Phase mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten (95: 5 → 0: 100; 90 min) gereinigt. Es resultierten 0.9 mg Carbonsäure **77** (1.2 µmol). Das entspricht einer Aubeute von 32 %. Außerdem konnten 1 mg monosilylierte Säure und 0.5 mg Edukt reisoliert werden, die beide nochmals in die Reaktion eingesetzt werden konnten. Nach drei Durchläufen dieser Prozedur konnten insgesamt 1.4 mg Produkt **77** (1.9 µmol) isoliert werden. Das entspricht einer Gesamtausbeute von 48 %.

^{1}H-NMR (MeOD, 500 MHz, MeOD = 3.31 ppm): δ_H = 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.08 (1H, s, Ar-H), 6.71 (1H, dd, *J* = 14.7, 11.0 Hz, 12-H), 6.64 (1H, s, Ar-H), 5.99 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 13-H), 5.48 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.7 Hz, 11-H), 5.26 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 4.37 – 4.30 (4H, m, Teoc-CH_2, 10-H, 3-H), 4.26 – 4.21 (2H, m, Teoc-CH_2), 3.84 – 3.79 (1H, m, 7-H), 3.36 (2H, bs, 15-H), 3.34 (3H, s, 10-OMe), 2.65 – 2.63 (1H, m, 8-H), 2.45 – 2.43 (2H, m, 2-H, 6-H), 1.75 (3H, s, 14-Me), 1.66 (3H, s, 4-Me), 1.14 – 1.04 (4H, m, 2x Teoc-CH_2), 0.98 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, 6-Me), 0.08 (18H, s, Teoc-TMS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 209.6 (s, 9-C), 176.8 (s, 1-C), 156.0 (s, Teoc-CO), 155.2 (s, Teoc-CO), 153.0 (s, Ar-C), 143.0 (s, Ar-C), 141.6 (s, Ar-C), 140.9 (s, 14-C), 138.3 (s, 4-C), 133.4 (d, 12-C), 129.7 (d, 5-C), 126.9 (d, 13-C), 126.5 (d, 11-C), 117.5 (d, Ar-C), 116.9 (d, Ar-C), 110.5 (d, Ar-C), 89.5 (d, 10-C), 75.1 (d, 3-C), 73.1 (d, 7-C), 68.3 (t, Teoc-CH_2), 64.2 (t, Teoc-CH_2), 57.2 (q, 10-OMe), 46.8 (t, 15-C), 44.9 (t, 8-C), 42.3 (t, 2-C), 39.8 (t, 6-C), 18.6 (t, Teoc-CH_2), 18.3 (t, Teoc-CH_2), 16.9 (q, 6-Me), 16.6 (q, 14-Me), 12.4 (q, 4-Me), -1.48 (q, Teoc-CH_3), -1.51 (q, Teoc-CH_3) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 3.01 min; **HRMS** (ESI) für $[M-H]^-$: berechnet 748.3548, gefunden 748.3551; **Rf** (DCM/MeOH = 10:1) = 0.19.

seco-Proansamitocin 67



1.4 mg Teoc-geschützte Säure **77** (1.9 mmol; 1 Äq) wurden in 0.3 mL Nitromethan unter Argon gelöst und mit 3.9 mg Zinkchlorid (28 µmol; 15 Äq) versetzt. Die Mischung wurde mit Ultraschall behandelt, wobei ein hellbrauner Niederschlag ausfiel. Nach 1 Stunde war die Reaktion abgeschlossen und das entstandene Zinkat wurde durch die Zugabe von Phosphatpuffer hydrolysiert. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten (80: 20 → 0: 100; 70 min) über eine RP18-Säule gereinigt. Es resultierten 0.4 mg *seco-Proansamitocin* **67** (0.87 µmol) in einer Aubeute von 47 %.

^{1}H-NMR (MeOD, 500 MHz, MeOD = 3.31 ppm): δ_H = 6.73 (1H, dd, *J* = 15.2, 10.5 Hz, 12-H), 6.09 (1H, s, Ar-H), 6.06 (1H, s, Ar-H), 6.01 (1H, s, Ar-H), 5.97 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, 13-H), 5.44 (1H, dd, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 11-H), 5.28 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, 5-H), 4.34 – 4.30 (2H, m, , 10-H, 3-H), 3.85 – 3.78 (1H, m, 7-H), 3.37 (3H, s, 10-OMe), 3.18 (2H, bs, 15-H), 2.65 – 2.62 (2H, m, 8-H), 2.46 – 2.40 (1H, m, 6-H), 2.38 – 2.34 (2H, m, 2-H), 1.73 (3H, s, 14-Me), 1.65 (3H, s, 4-Me), 0.99 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 6-Me) ppm; **UPLC-MS**; t_R = 1.76 min; **HRMS** (ESI) für $[M-H]^-$: berechnet 460.2335, gefunden 460.2353.

Verfütterungsexperimente mit seco-Proansamitocinen 66 und 67

Die Mutasynthesen mit *seco-Proansamitocin-SNAC-Ester* **66** und *seco-Proansamitocin* **67** wurden im 50 mL Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. Die Zufütterung der Mutasynthone erfolgte mit 0.85 mg **66** (1.5 µmol) und 0.4 mg **67** (0.85 µmol) gelöst in 1 mL sterilfiltriertem DMSO portionsweise über 3 Tage. Nach einer Fermentationszeit von weiteren 5 Tagen wurden die Kulturen mit Essigsäureethylester extrahiert, die Rohextrakte direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (20:80 → 100 % Acetonitril; 85 min) über eine RP18-Säule gereinigt. In beiden Extrakten konnte zur Retentionszeit 52 min ein Peak mit zu *Ansamitocin P3* identischem UV-Spektrum detektiert werden. Nach massenspektrometrischem Nachweis von *Ansamitocin P3* in den entsprechenden Fraktionen, wurde die Ausbeute über die UV-Absorption bei λ = 248 nm bestimmt. Die Kalibration erfolgte vorab mit *Ansamitocin P3*. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13. Kalibration und Ausbeuteberechnnung für die Verfütterungsexperimente.

Injizierte Probe	Fläche [AU, λ=248nm]]	m(**12**) [µg]	Ausbeute
	0	0	
Ansamitocin P3	438553	1	
Ansamitocin P3	7801282	20	
Verfütterungsextrakt: **66**	782979	**1.9**	3 nmol = **0.2 %**
Verfütterungsextrakt: **67**	293606	**0.7**	0.11 nmol = **0.13 %**

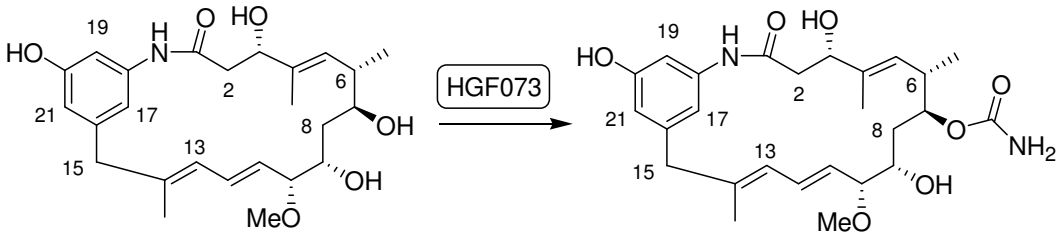
Die erstellte Kalibrationsgerade, die Chromatogramme und die Massenspektren befinden sich im Anhang.

5.7 VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 3.3

Verfütterungsexperimente mit modifiziertem Proansamitocin 83

Die Mutasynthese mit *9-Hydroxyproansamitocin* **83** wurde im 50 mL Maßstab wie unter 5.2 beschrieben durchgeführt. Die Zufütterung des Substrats (5 mg; 11.2 µmol) erfolgte kontinuierlich über 5 Tage. Nach einer Fermentationszeit von weiteren 5 Tagen wurde die Kultur mit Essigsäureethylester extrahiert, der Rohextrakt wurde direkt auf die HPLC gegeben und mit einem Wasser-Methanol-Gradienten Wasser-Methanol-Gradienten (90:10 → 100 % Methanol; 100 min) über eine RP18-Säule und anschließend mit einem Wasser-Acetonitril-Gradient (95: 5 → 100 % Acetonitril; 80 min) über eine CN-Phase gereinigt. Es konnten zwei Mutasyntheseprodukte **84** (2.5mg; 5.1 µmol) und **85** (2.5mg, 5.0 µmol) in Ausbeuten von jeweils 45 % isoliert werden. Die NMR-spektroskopische Analyse zeigte bei verschiedenen Temperaturen ein Konformerengemisch, das bei 283 K am besten auszuwerten war. Deshalb sind von beiden entstandenen Derivaten **84** und **85** jeweils die Signalsätze beider Konformere angegeben.

7-Carbamoyl-9-hydroxyproansamitocin 84



83 **84**

Konformer 1

^{1}H-NMR (500 MHz, 283 K, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): δ_H= 7.19 (1H, s, Ar-H), 6.56-6.46 (1H, m, 12-H), 6.51 (1H, s, Ar-H), 6.41 (1H, s, Ar-H), 6.05 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, 13-H), 5.61 (1H, dd, *J* = 15.1, 8.6 Hz, 11-H), 5.47-5.43 (1H, m, 5-H), 4.81 (1H, pt, *J* = 9.1 Hz, 7-H), 4.31 (1H, dd, *J* = 6.3, 2.8 Hz, 3-H), 3.81 (1H, dd, *J* = 11.1, 2.2 Hz, 9-H) 3.57 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 10-H) 3.34 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, 15-H_a), 3.31 (3H, 10-OMe, unter MeOH), 3.12 (1H, d, *J* = 13.7 Hz, 15-H_b), 2.77-2.69 (1H, m, 2-H_a), 2.77-2.69 (1H, m, 6-H), 2.62 (1H, dd, *J* = 14.3, 2.8 Hz, 2-H_b), 1.71 (3H, s, 14-Me), 1.59 (3H, s, 4-Me), 1.57-1.49 (1H, m, 8-H_a), 1.26-

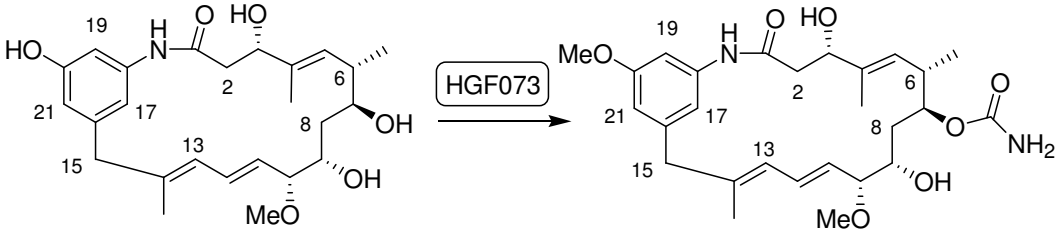
1.21 (1H, m, 8-H_b), 0.92 (3H, d, J = 6.7 Hz, 6-Me); **^{13}C-NMR** (125 MHz, 283 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ_C= 171.8 (s, 1-C), 160.3 (s, COONH), 158.5 (s, Ar-C), 143.4 (s, Ar-C), 140.7 (s, Ar-C), 139.4 (s, 14-C), 138.4 (s, 4-C), 132.6 (d, 12-C), 128.4 (d, 11-C), 128.2 (d, 5-C), 128.0 (d, 13-C), 113.1 (d, 17-C), 112.6 (d, Ar-C), 105.5 (d, Ar-C), 87.4 (d, 10-C), 76.2 (d, 7-C), 74.4 (d, 3-C), 71.1 (d, 9-C), 56.6 (q, 10-OMe), 46.5 (t, 15-C), 42.0 (t, 2-C), 37.8 (d, 6-C), 35.9 (t, 8-C), 17.7 (q, 6-Me), 16.9 (q, 14-Me), 13.6 (q, 4-Me) ppm;

Konformer 2

^{1}H-NMR (500 MHz, 283 K, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): δ 6.74 (1H, s, Ar-H), 6.56 (1H, s, 17-H), 6.51-6.42 (1H, m, 12-H), 6.42 (1H, s, 19-H), 5.78 (1H, d, J = 10.7 Hz, 13-H), 5.47-5.43 (1H, m, 11-H), 5.29 (1H, d, J = 9.7 Hz, 5-H), 4.68 (1H, pt, J = 10.5 Hz, 7-H), 4.38 (1H, dd, J = 6.4, 2.8 Hz, 3-H), 3.81 (1H, dd, J = 11.1, 2.2 Hz, 9-H) 3.46 (1H, dd, J = 9.6, 2.2 Hz, 10-H) 3.36 (1H, d, J = 13.7 Hz, 15-H_a), 3.27 (3H, s, 10-OMe), 3.14 (1H, d, J = 13.7 Hz, 15-H_b), 2.53-2.48 (1H, m, 6-H), 2.41-2.39 (2H, m, 2-H), 1.78 (3H, s, 14-Me), 1.57-1.49 (1H, m, 8-H_a), 1.44 (3H, s, 4-Me), 1.26-1.21 (1H, m, 8-H_b), 0.96 (3H, d, J = 7.8 Hz, 6-Me); **^{13}C-NMR** (125 MHz, 285 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ 175.9 (s, 1-C), 160.4 (s, COONH), 159.2 (s, Ar-C), 143.5 (s, Ar-C), 140.0 (s, Ar-C), 140.0 (s, 14-C), 138.8 (s, 4-C), 132.7 (d, 12-C), 128.8 (d, 11-C), 128.3 (d, 5-C), 126.6 (d, 13-C), 119.5 (d, Ar-C), 116.0 (d, Ar-C), 110.6 (d, Ar-C), 87.5 (d, 10-C), 75.7 (d, 7-C), 73.7 (d, 3-C), 70.1 (d, 9-C), 56.3 (q, 10-OMe), 46.8 (t, 15-C), 39.2 (d, 6-C), 38.6 (t, 2-C), 38.3 (t, 8-C), 17.7 (q, 6-Me), 17.0 (q, 14-Me), 14.1 (q, 4-Me) ppm.

t_R (UPLC) = 1.98 min; **HRMS (ESI)** für $C_{26}H_{36}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$ berechnet: 511.2420 gefunden: 511.2418.

7-Carbamoyl-9-hydroxy-20-methoxyproansamitocin 85



83 **85**

Konformer 1

^{1}H-NMR (500 MHz, 283 K, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): δ_H= 7.36 (1H, s, Ar-H), 6.61 (1H, s, Ar-H), 6.56 (1H, s, Ar-H), 6.54 (1H, dd, *J* = 15.0, 11.1 Hz, 12-H), 6.08 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, 13-H), 5.63 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.7 Hz, 11-H), 5.49 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, 5-H), 4.84 (1H, pt, *J* = 8.7 Hz, 7-H), 4.34 (1H, d, *J* = 6.3 Hz, 3-H), 3.81 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 9-H), 3.77 (3H, s, 20-OMe), 3.58 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 10-H) 3.39 (1H, d, *J* = 14.2 Hz, 15-H_a), 3.31 (3H, 10-OMe, unter MeOH), 3.18 (1H, d, *J* = 14.2 Hz, 15-H_b), 2.78-2.68 (2H, m, 2-H_a, 6-H), 2.64 (1H, dd, *J* = 14.9, 2.5 Hz, 2-H_b), 1.72 (3H, s, 14-Me), 1.60 (3H, s, 4-Me), 1.53 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, 8-H_a), 1.43 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, 8-H_b), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 6-Me); **^{13}C-NMR** (125 MHz, 283 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ_C= 171.8 (s, 1-C), 161.6 (s, Ar-C), 160.3 (s, COONH), 143.5 (s, Ar-C), 140.7 (s, Ar-C), 139.3 (s, 14-C), 138.4 (s, 4-C), 132.5 (d, 12-C), 128.5 (d, 11-C), 128.1 (d, 5-C), 128.0 (d, 13-C), 113.6 (d, 17-C), 111.8 (d, Ar-C), 103.9 (d, Ar-C), 87.4 (d, 10-C), 76.2 (d, 7-C), 74.3 (d, 3-C), 71.1 (d, 9-C), 56.6 (q, 10-OMe), 55.6 (q, 20-OMe), 46.5 (t, 15-C), 42.1 (t, 2-C), 37.8 (d, 6-C), 35.8 (t, 8-C), 17.7 (q, 6-Me), 16.9 (q, 14-Me), 13.6 (q, 4-Me) ppm;

Konformer 2

^{1}H-NMR (500 MHz, 283 K, MeOD, MeOH = 3.31 ppm): δ_H= 6.88 (1H, s, Ar-H), 6.70 (1H, s, Ar-H), 6.59 (1H, s, Ar-H), 6.43 (1H, dd, *J* = 15.1, 10.6 Hz, 12-H), 5.78 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, 13-H), 5.45 (1H, dd, *J* = 15.1, 9.8 Hz, 11-H), 5.28 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 5-H), 4.68 (1H, pt, *J* = 10.4 Hz, 7-H), 4.39 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, 3-H), 3.81 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 9-H), 3.77 (3H, s, 20-OMe), 3.58 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 10-H) 3.40 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, 15-H_a), 3.26 (3H, s, 10-OMe), 3.21 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, 15-H_b), 2.77-2.69 (2H, m, 2-H_a, 6-H), 2.64 (1H, dd, *J* = 14.9, 2.5 Hz, 2-H_b), 1.78 (3H, s, 14-Me), 1.56 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, 8-H_a), 1.42 (3H, s, 4-Me), 1.40 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, 8-H_b), 0.96 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 6-Me); **^{13}C-NMR** (125 MHz, 285 K, MeOD, MeOD = 49.0 ppm): δ 175.9 (s, 1-C), 161.6 (s, Ar-C), 160.4 (s, COONH), 143.5 (s, Ar-C), 140.1 (s, Ar-C), 139.9 (s, 14-C), 138.8 (s, 4-C), 132.7 (d, 12-C), 128.9 (d, 11-C), 128.4 (d, 5-C), 126.7 (d, 13-C), 120.6 (d, Ar-C), 114.9 (d, Ar-C), 108.9 (d, Ar-C), 87.5 (d, 10-C), 75.7 (d, 7-C), 73.8 (d, 3-C), 70.1 (d, 9-C), 56.3 (q, 10-OMe), 55.8 (q, 20-OMe), 46.8 (t, 15-C), 39.2 (d, 6-C), 38.5 (t, 2-C), 38.3 (t, 8-C), 17.7 (q, 6-Me), 17.0 (q, 14-Me), 14.1 (q, 4-Me) ppm;

t_R (UPLC) = 2.40 min; **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{38}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$ berechnet: 525.2577 gefunden: 525.2559.

3-Brombenzylbromide für die Negishi-Kupplungen

3-Brom-5-nitrobenzoesäure 86

30 **86**

4.26 g (25.5 mmol) 3-Nitrobenzoesäure **30** wurden mit 4.21 g (13.5 mmol, 0.53 Äq) Silbersulfat in 5 mL konzentrierter Schwefelsäure gelöst. 1.5 mL (29.3 mmol, 1.15 Äq) Brom wurden langsam unter starkem Rühren dazugegeben. Die Mischung refluxierte vier Stunden bei 105 °C. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung abgekühlt, langsam in Eiswasser gegossen und der Feststoff abfiltriert. Die Säure wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgewaschen und mit Salzsäure (c = 1 mol/L) wieder ausgefällt. Es wurden 5.46 g (22.2 mmol) *3-Brom-5-nitrobenzoesäure* **86** in einer Ausbeute von 87 % isoliert. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[95]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 8.90 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz), 8.65 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz), 8.59 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 168.2 (s, CO_2H), 148.9 (s, Ar-C), 138.7 (d, Ar-C), 132.2 (s, Ar-C), 131.4 (d, Ar-C), 123.8 (d, Ar-C), 123.4 (s, Ar-C) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_3NO_4Br$ $[M-H]^-$: berechnet 243.9245, gefunden 243.9247; **Smp.**: 161 – 162 °C.

3-Amino-5-brombenzoesäure 31

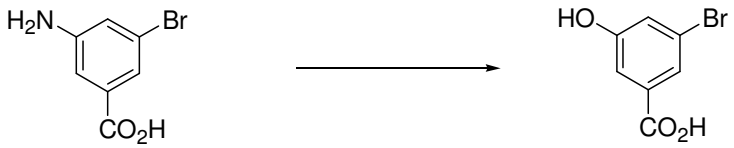
86 **31**

5.13 g (20 mmol) *3-Brom-5-nitrobenzoesäure* **86** wurden mit 23.9 g (106 mmol, 5.3 Äq) Zinn(II)chloriddihydrat in 100 mL Essigsäureethylester gelöst. Die Mischung refluxierte 30 min bei 80 °C. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung langsam auf Eis gegossen,

der pH-Wert mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf 7-8 gebracht, der Zinnniederschlag bei diesem pH-Wert ausgekocht und der Feststoff heiß abfiltriert. Die Säure wurde mit Essigsäure aus dem Filtrat ausgefällt (pH 6), abfiltirert und aus Ethanol umkristallisert. Es wurden 3.59 g (16.6 mmol) *3-Brom-5-aminobenzoesäure* **31** in Form von glänzenden Nadeln und einer Ausbeute von 83 % isoliert. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[95]

^{1}H-NMR (MeOH d_4, 400 MHz, MeOH d_3 = 3.31 ppm): δ_H = 7.34 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz), 7.26 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz), 7.02 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz) ppm; **^{13}C-NMR** (MeOH d_4, 100 MHz, MeOH d_4 = 49.0 ppm): 169.0 (s, CO_2H), 151.3 (s, Ar-C), 134.3 (s, Ar-C), 123.6 (s, Ar-C), 122.1 (d, Ar-C), 121.6 (d, Ar-C), 115.6 (d, Ar-C) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_5NO_2Br$ $[M-H]^-$: berechnet 213.9504, gefunden 213.9514; **Smp.**: 192 – 207 °C

3-Brom-5-hydroxybenzoesäure 87



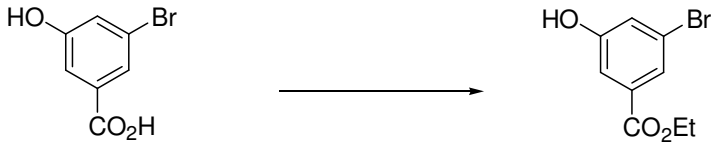
31 **87**

3.56 g (16.5 mmol) *3-Brom-5-aminobenzoesäure* **31** wurden in 30 mL Schwefelsäure (w = 33 %) bei Raumtemperatur gelöst. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt, bei dieser Temperatur mit 6.6 mL (16.5 mmol; 1 Äq) Natriumnitrit-Lösung (c = 2.5 mol/L) versetzt und 30 min gerührt. Anschließend wurde 30 min unter Rückfluß gekocht. Die orange ausgefallene *3-Brom-5-hydroxybenzoesäure* **87** wurde abfiltriert und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Es wurden 2.57 g (11.8 mmol) *3-Brom-5-hydroxybenzoesäure* **87** in Form eines rötlichen amorphen Feststoffs in einer Ausbeute von 72 % isoliert. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[95]

^{1}H-NMR (MeOH d_4, 400 MHz, MeOH d_3 = 3.31 ppm): δ_H = 7.58 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz), 7.38 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 1.7 , 1.7 Hz) ppm; **^{13}C-NMR** (MeOH d_4, 100 MHz, MeOH d_4 = 49.0 ppm): 168.3 (s, CO_2H), 159.9 (s, Ar-C), 134.8 (s, Ar-C), 124.4

(d, Ar-C), 123.7 (d, Ar-C), 123.4 (s, Ar-C), 116.5 (d, Ar-C) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_7H_4O_3Br$ $[M-H]^-$: berechnet 214.9344, gefunden 214.9352. **Smp.**: 178.0 °C

3-Brom-5-hydroxybenzoesäureethylester 88

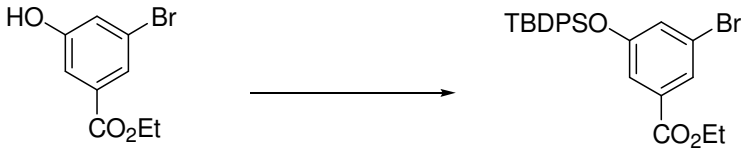


87 **87a**

2.50 g (11.5 mmol) 3-Brom-5-hydroxybenzoesäure **87** wurden in 50 mL Ethanol gelöst und mit Acetylchlorid versetzt bis ein pH-Wert von 0-1 erreicht war. Die Mischung refluxierte 20 Stunden und wurde anschließend im Vakuum weitesgehend eingeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 2.71 g (11.0 mmol) 3-Brom-5-hydroxybenzoesäureethylester **87a** in Form eines hellgelben Öls und einer Ausbeute von 96 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.75 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz), 7.47 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz), 7.21 (1H, dd, *J* = 1.5 , 1.5 Hz), 4.37 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.39 (3H, t, *J* = 7.2 Hz) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 165.2 (s, CO), 156.3 (s, Ar-C), 133.2 (s, Ar-C), 125.0 (d, Ar-C), 123.1 (d, Ar-C), 122.8 (s, Ar-C), 115.4 (d, Ar-C), 61.6 (t, Et-CH_2), 14.2 (q, Et-CH_3) ppm; **HRMS (EI)** für $C_9H_9O_3Br$ $[M]^+$: berechnet 243.9735, gefunden 243.9735.

3-Brom-5-(^{t}butyldiphenyl)silyloxybenzoesäureethylester 88

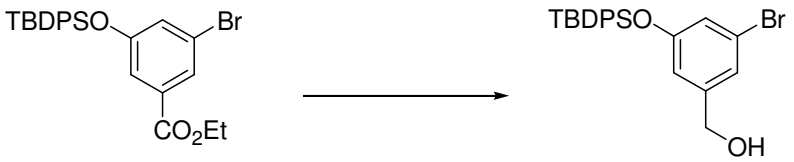


87a **88**

2.60 g (10.6 mmol) *3-Brom-5-hydroxybenzoesäureethylester* **87a** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und mit 2.75 mL (10.6 mmol; 1 Äq) ^{t}Butyldiphenylsilylchlorid, 2.16 g (31.8 mmol; 3 Äq) Imidazol und 134.4 mg (1.1 mmol; 0.1 Äq) 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von 50 mL Ammoniumchloridlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es wurden 4.87 g (10.1 mmol) *3-Brom-5-(^{t}butyldiphenyl)silyloxybenzoesäureethylester* **88** in Form eines hellgelben Öls und einer Ausbeute von 95 % isoliert.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.69 (4H, m), 7.41 (7H, m), 7.34 (1H, dd, *J* = 2.1 , 2.1 Hz),7.06 (1H, dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz), 4.27 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.30 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.12 (9H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 165.0 (s, CO), 156.3 (s, Ar-C), 135.5 (d, TBDPS), 132.8 (s, Ar-C), 131.9 (s, TBDPS), 130.2 (d, TBDPS), 128.0 (d, TBDPS), 127.2 (d, Ar-C), 125.3 (d, Ar-C), 122.1 (s, Ar-C), 119.7 (d, Ar-C), 61.2 (t, Et-CH_2), 26.5 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.5 (s, ^{t}Bu-TBDPS), 14.2 (q, Et-CH_3) ppm.

3-Brom-5-(^{t}butyldiphenyl)silyloxybenzylalkohol 89



88 **89**

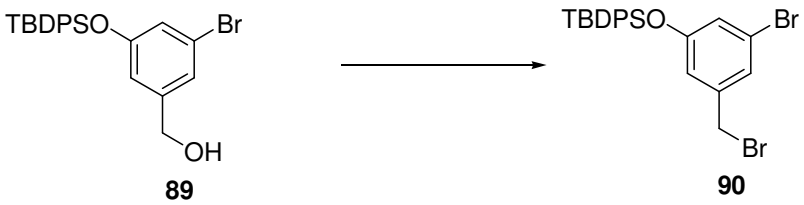
4.80 g (9.93 mmol) *3-Brom-5-(^{t}butyldiphenyl)silyloxybenzoesäureethylester* **88** wurden in 25 mL Diethylether gelöst und langsam zu einer Suspension aus 298 mg Lithiumaluminium-hydrid (w = 95 %; 7.45 mmol; 0.75 Äq) in 25 mL Diethylether unter Eiskühlung getropft,[131] so dass die Mischung gelinde siedete. Nach beendeter Zugabe wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann unter Eiskühlung mit 0.3 mL Wasser und 1.2 mL Natronlauge (c = 1 mol/L) hydrolysiert. Die ausgefallenen Aluminiumsalze wurden über Kieselgur abfiltriert und mit reichlich Diethylether nachgewaschen. Nach Entfernen des

[131] S.Kwon, A.G.Myers, *J.Am.Chem.Soc.*, **2005**, *127*, 16796-16797. (Reduktion)

Diethylethers im Vakuum verblieben 4.08 g (9.23 mmol) *3-Brom-5-(*^{t}*butyldiphenyl)silyloxy-benzylalkohol* **89** in einer Ausbeute von 93 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.69 (4H, m), 7.41 (6H, m), 7.03 (1H, s), 6.87 (1H, s), 6.62 (1H, s), 4.42 (2H, s, Bn-CH_2), 1.49 (1H, bs, OH), 1.12 (9H, s, ^{t}Bu) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 156.5 (s, Ar-C), 143.7 (s, Ar-C), 135.5 (d, TBDPS), 132.3 (s, TBDPS), 130.1 (d, TBDPS), 127.9 (d, TBDPS), 122.6 (d, Ar-C), 122.4 (s, Ar-C), 122.2 (d, Ar-C), 116.9 (d, Ar-C), 64.3 (CH_2OH), 26.6 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.5 (s, ^{t}Bu-TBDPS) ppm.

3-Brom-5-(*t*butyldiphenyl)silyloxybenzylbromid 90

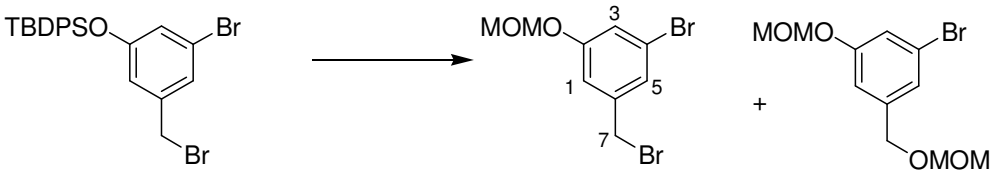


1.4 mL Brom (27.32 mmol, 1.3 eq.) wurden bei 0 °C zu einer Lösung aus 7.4 g Triphenylphosphin (28.37 mmol, 1.35 Äq.) und 2.15 g Imidazol (31.52 mmol, 1.5 Äq.) in 40 mL Dichlormethan getropft. Bei dieser Temperatur wurde die Lösung 15 Minuten rühren gelassen. Anschließend wurde das in ca. 15 mL Dichlormethan gelöste Edukt (9.277 g, 21.02 mmol, 1 Äq.) tropfenweise dazu gegeben. Die Reaktion wurde noch eine weitere Stunde bei 0°C rühren gelassen und dann durch Zugabe von Wasser abgebrochen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wiederum nacheinander mit Natriumsulfitlösung, gesättigter NH_4Cl-Lösung, dem. Wasser und mit NaCl-Lösung. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei das Rohrodukt in Form eines gelben Feststoffs zurückblieb. Chromatographische Reinigung über Kieselgel mit Petrolether/Essigsäureethylester (10:1) ergab 9647 mg Benzylbromid **90** (19.13 mmol) als hellgelbes Öl in einer Ausbeute von 91 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.71 (4H, m), 7.42 (6H, m), 7.04 (1H, dd, *J* = 1.8 , 1.8 Hz), 6.86 (1H, dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz), 6.64 (1H, dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz), 4.18 (2H,

s), 1.11 (9H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 156.4 (s, Ar-C), 140.1 (s, Ar-C), 135.5 (d, TBDPS), 132.0 (s, TBDPS), 130.2 (d, TBDPS), 127.9 (d, TBDPS), 124.8 (d, Ar-C), 123.1 (d, Ar-C), 122.3 (s, Ar-C), 119.3 (d, Ar-C), 31.9 (CH_2Br), 26.5 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.5 (s, ^{t}Bu-TBDPS) ppm; **HRMS** (EI) für $C_{23}H_{24}OBr_2Si$ $[M]^+$: berechnet 501.9963, gefunden 501.9961.

3-Brom-5-methoxymethyloxibenzylbromid 145



90 **145** **146**

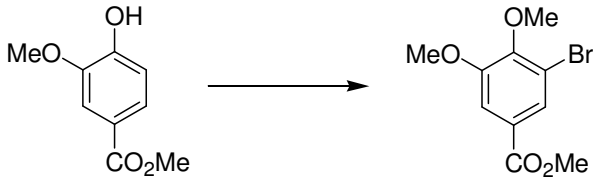
1.0 g *3-Brom-5-(^{t}butyldiphenyl)silyloxybenzylbromid* **90** (2 mmol; 1 Äq) wurden in 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und auf -10 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 688 mg (2.2 mmol; 1.1 Äq) Tetrabutylammoniumfluorid zugegeben. Nach 10 min wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert, das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach einer kurzen Kieselgelfiltersäule zum Entfernen des freigesetzten ^{t}Butyldiphenylsilylethers wurde das Rohprodukt direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

90 mg Natriumhydrid (3 mmol; 1.5 Äq) wurden bei 0 °C in 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und das Edukt wurde gelöst in 10 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 167 µL Methoxymethylchlorid (2.2 mmol; 1.1 Äq) zugetropft und weitere 3 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Kieselgel aufgebracht und säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1 → 20:1) gereinigt. Es resultierten 428 mg *3-Brom-5-methoxymethyloxybenzylbromid* **145** (1.4 mmol) in einer Ausbeute von 69 % und 151 mg des MOM-geschützten Benzylalkohols **146** (0.5 mmol) in einer Ausbeute von 26 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.19 (1H, bs, Ar-H), 7.15 (1H, bs, Ar-H), 6.99 (1H, bs, Ar-H), 5.16 (2H, s, MOM-CH_2), 4.38 (2H, s, CH_2Br), 3.48 (3H, s, MOM-OMe) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 158.0 (s, Ar-C), 140.6

(s, Ar-C), 125.5 (d, Ar-C), 122.8 (s, Ar-C), 119.5 (d, Ar-C), 115.8 (d, Ar-C), 94.5 (t, MOM-CH_2), 56.2 (q, MOM-OMe), 31.9 (t, CH_2Br) ppm. **HRMS** (EI): ber. für $C_9H_{10}O_2Br_2$ $[M]^+$: 307.9048, gef. 307.9050; Rf (PE/EE = 50:1)= 0.16.

3-Brom-4,5-dimethoxybenzoesäuremethylester 159



158 **159**

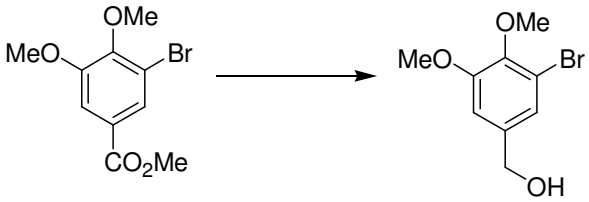
1.8 g *Methylvanillat* **158** (10 mmol; 1 Äq) wurden in 20 mL DMF gelöst und mit 1.8 g *N*-Bromsuccinimid[132] (10 mmol; 1 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann mit Wasser hydrolysiert. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde direkt in die nächste Stufe eingesetzt indem es in 100 mL Aceton gelöst wurde, mit 2.1 g Kaliumcarbonat (15 mmol; 1.5 Äq) und 1.4 mL Dimethylsulfat (15 mmol; 1.5 Äq) versetzt und 5 Stunden refluxiert wurde. Zur Aufarbeitung wurde mit Wasser hydrolysiert, das Aceton im Vakuum entfernt und das Produkt mit Dichlormethan extahiert. Es resultierten 2.27 g *3-Brom-4-5-dimethoxybenzoesäuremethylester* **159** (8.3 mmol) in einer Ausbeute von 83 % über 2 Stufen.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, Ar-H), 7.53 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, Ar-H), 3.91 (3H, s, Ar-OMe), 3.91 (3H, s, Ar-OMe), 3.90 (3H, s, CO_2Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 165.6 (s, CO), 153.3 (s, Ar-C), 150.3 (s, Ar-C), 126.6 (d, Ar-C), 117.4 (s, Ar-C), 112.6 (d, Ar-C), 60.7 (q, OMe), 56.2 (q, OMe), 52.4 (q, OMe) ppm. Rf (PE/EE = 5:1)= 0.27.

---

[132] Perchellet et al., *J.Org.Chem.* **2004**, *69*, 6065-6078. (Bromierung)

3-Brom-4,5-dimethoxybenzylalkohol 160

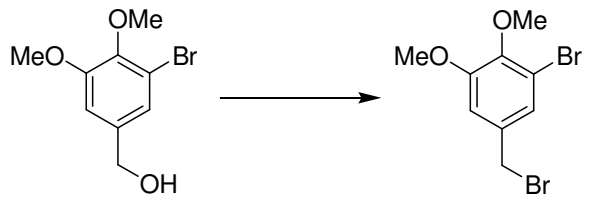


159 **160**

248 mg Lithiumaluminiumhydrid (6.2 mmol; 0.75 Äq) wurden in 50 mL Diethylether gelöst, die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 2.27 g *3-Brom-4-5-dimethoxybenzoesäuremethylester* **159** (8.3 mmol; 1 Äq) gelöst in 50 mL versetzt, so dass die Lösung gelinde siedete. Anschließend wurde ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann unter Eiskühlung mit 0.25 mL Wasser und 1 mL Natronlauge (c = 1 mol/L) hydrolysiert. Es wurde 15 Minuten gerührt, anschließend über Kieselgur filtriert und mit viel Diethylether nachgespült. Nach Konzentration im Vakuum resultierten 1.64 g *3-Brom-4,5-dimethoxybenzylalkohol* **160** (6.6 mmol) in einer Ausbeute von 80 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen in der Literatur[133] beschriebenen überein.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.11 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 6.88 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 4.61 (2H, s, CH_2OH), 3.87 (3H, s, Ar-OMe), 3.84 (3H, s, OMe), 1.89 (bs, OH) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 153.8 (s, Ar-C), 145.7 (s, Ar-C), 138.0 (s, Ar-C), 122.9 (d, Ar-C), 117.5 (s, Ar-C), 110.2 (d, Ar-C), 64.5 (t, CH_2OH), 60.6 (q, OMe), 56.0 (q, OMe) ppm. Rf (PE/EE = 5:1)= 0.04.

3-Brom-4,5-dimethoxybenzylbromid 157



160 **157**

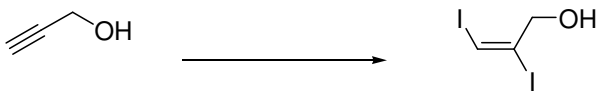
[133] M.Gerecke, A.Brossi*, Helv.Chim.Acta***, 2004,** 62, 1549–1558.

0.44 mL Brom (8.6 mmol; 1.3 Äq) wurden bei 0 °C zu einer Lösung aus 2.4 g Triphenylphosphin (9 mmol; 1.35 Äq) und 681 mg Imidazol (10 mmol; 1.5 Äq) in 50 mL Dichlormethan getropft und diese 15 Minuten gerührt. 1.6 g *3-Brom-4,5-dimethoxybenzoesäurebenzylalkohol* **160** (6.6 mmol; 1 Äq) wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst zur Bromsuspension getropft und die Mischung eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde Wasser zugegeben und das Produkt mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden nacheinander mit Natriumthiosulfatlösung, Ammoniumchloridlösung, Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet un im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1 → 5:1) resultierten 1.9 g *3-Brom-4,5-dimethoxybenzoesäurebenzylbromid* **157** (6.0 mmol) in einer Ausbeute von 91 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.16 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 6.87 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 4.40 (2H, s, CH_2Br), 3.87 (3H, s, OMe), 3.84 (3H, s, OMe) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 153.7 (s, Ar-C), 146.5 (s, Ar-C), 134.6 (s, Ar-C), 125.1 (d, Ar-C), 117.5 (s, Ar-C), 112.3 (d, Ar-C), 60.6 (q, OMe), 56.1 (q, OMe), 32.5 (t, CH_2Br) ppm; **HRMS** (EI) für $C_9H_{10}O_2Br_2$ $[M]^+$: berechnet 307.9048, gefunden 307.9050; Rf (PE/EE = 2:1)= 0.52.

Vinyliodide für die Negishi-Kupplungen

(*E*)-α,β-Diiodoallylalkohol 93



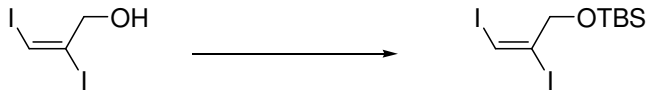
92 **93**

100 µL Propargylalkohol **92** (1.72 mmol; 1 Äq) wurden mit 539 mg Aluminiumoxid (5.29 mmol; 3.1 Äq) in 4 mL Petrolether gelöst und 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Der klebrige Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen, filtriert und vorsichtig einrotiert, da das feste Produkt sehr leicht sublimiert. Es konnten 522 mg hellgelber Feststoff in einer guten

Reinheit isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 98 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[134]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.04 (1H, s), 4.28 (2H, d, *J* = 6.1 Hz), 1.99 (1H, s, OH) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 103.99, 79.79, 70.81 ppm; **HRMS** (EI) für $C_3H_4OI_2$ [M]: 309.8352, gef. 309.8353; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.17; **Smp**.: 51.2 °C.

(E)-α,β-Diiodoallyl^{t}butyldimethylsilylether



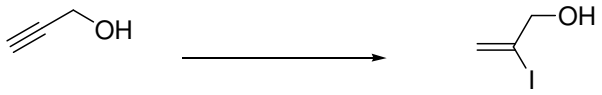
93 **94**

100 mg *Diiodoallylalkohol* **93** (0.32 mmol; 1 Äq) wurden in 3 mL Dichlormethan gelöst und mit 93 mg Imidazol (0.64 mmol; 2 Äq), 63 mg ^{t}Butyldimethylsilylchlorid (0.35 mmol; 1.1 Äq) und einer Spatelspitze Dimethylaminopyridin versetzt. Die Reaktion verlief über Nacht bei Raumtemperatur bevor sie durch Zugabe von 6 mL gesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen wurde. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es resultierten 135 mg *Diiodoallylsilylether* **94** als hellgelbes Öl. Das entspricht einer quantitativen Ausbeute.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.94 (1H, s), 4.24 (2H, d, *J* = 1.0 Hz), 0.95 (9H, s, ^{t}Bu) 0.15 (6H, s, $SiMe_2$) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 105.8, 77.8, 70.5, 25.9, 18.3, -4.9 ppm; **HRMS (EI)** für $C_5H_9OSiI_2$ [M-^{t}Bu]$^+$: berechnet 366.8512, gefunden 366.8515; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.71.

[134] S.Larson, T.Luidhardt, G.W.Kabalka, R.M.Pagni, *Tet. Lett*., **1988**, *29*, 35-36.

2-Iodallylalkohol 98

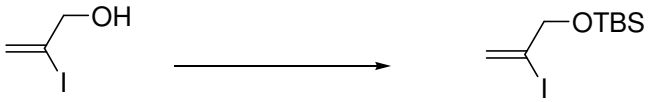


92 **98**

3.6 g Natriumiodid (24 mmol; 2.4 Äq) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst und bei Raumtemperatur mit 3.1 mL Trimethylchlorsilan (24 mmol; 2.4 Äq) und 0.22 mL Wasser (6 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Die entstandene gelb-orange Suspension wurde 15 min gerührt und dann mit 0.58 mL *Propargylalkohol* **92** (10 mmol; 1.0 Äq) in 5 mL Acetonitril gelöst versetzt. Die Mischung rührte bei Raumtemperatur wobei die Farbe von gelb-orange nach dunkelrot wechselte. Nach 90 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Wasser beendet. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Säulenchromatographie mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) ergab 1.1 g *2-Iodoallylalkohol* **98** (6.0 mmol). Das entspricht einer Ausbeute von 58 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[135]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppmî: δ_H = 6.39 (1H, dt, *J* = 1.7 Hz), 5.87 (1H, m), 4.18 (2H, m) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 124.5, 110.4, 71.1 ppm. **HRMS** (EI) für C_3H_5OI $[M]^+$: berechnet 183.9385, gefunden 183.9386.; **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.27.

2-Iod-*^{tert}*butyldimethylsilylallylalkohol 99



98 **99**

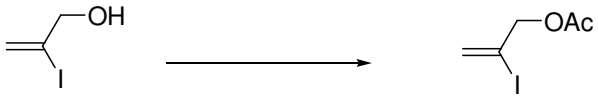
404 mg *2-Iodallylalkohol* **98** (2.2 mmol; 1 Äq) wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst und mit 300 mg Imidazol (4.4 mmol; 2 Äq), 364 mg *^{tert}*Butyldimethylsilylchlorid (2.4 mmol;

[135] N.Kamiya, Y.Chikami, Y.Ishii, *SYNLETT,* **1990**, 675-676.

1.1 Äq) und einer Spatelspitze DMAP versetzt. Die Mischung rührte über Nacht bei Raumtemperatur, bevor die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumchloridlösung abgebrochen wurde. Das Produkt wurde mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es resultierten 536 mg *2-Iod-^{tert}butyldimethylsilylallylalkohol* **99** als hellgelbes Öl (1.8 mmol). Das entspricht einer Ausbeute von 82 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.44 (1H, pq, *J* = 1.7 Hz), 5.84 (1H, pq, J = 1.7 Hz), 4.20 (2H, pt, *J* = 1.7 Hz), 0.91 (9H, s), 0.09 (6H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 123.0 (s, olef. CH_2), 109.7 (p, olef.), 71.1 (s, CH_2OTBS), 25.8 (q, ^{t}Bu), 18.3 (s, ^{t}Bu), -5.4 (q, Me) ppm. **HRMS** (EI) für $C_5H_{10}OISi$ $[M-^tBu]^+$: berechnet 240.9546, gefunden 240.9547; **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.73.

2-Iod-acetylallylalkohol 100

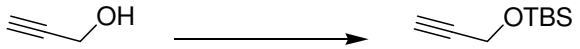


98 **100**

150 mg *2-Iodallylalkohol* **98** (0.82 mmol; 1 Äq) wurden in 15 mL Pyridin gelöst und mit 3.84 mL Acetanhydrid (40.75 mmol; 50 Äq) tropfenweise versetzt. Die gelbe Lösung rührte über Nacht bei Raumtemperatur, bevor die Reaktion durch Zugabe von 12 mL Methanol abgebrochen wurde. Pyridin wurde mit Kupfer(II)-sulfatlösung komplexiert und das Produkt mit Essigsäureethylester aus der wässrigen Phase extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Nach Reinigen mittels einer Filtersäule (Petrolether/Essigsäureethylester 4:1) resultierten 185.3 mg *2-Iod-acetylallylalkohol* **100** als hellgelbes Öl (0.82 mmol). Das entspricht einer Ausbeute von 98 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.35 (1H, s), 5.93 (1H, s), 4.67 (2H, s), 2.13 (3H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 169.9 (s, CO), 127.2 (t, olef. CH_2), 102.2 (s, olef.), 70.8 (t, CH_2OAc), 20.8 (q, Me) ppm. **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.48. Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

^{t}Butyldimethylsilylpropargylalkohol 96

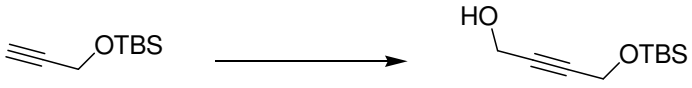


92 **96**

0.963 mL *Propargylalkohol* **92** (35.7 mmol; 1 Äq) wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und mit 5.9 g TBSCl (39.2 mmol; 1.1 Äq), 4.9 g Imidazol (71.4 mmol; 2 Äq) und 2.2 g DMAP (17.85 mmol; 0.5 Äq) versetzt. Die Mischung rührte über Nacht bei Raumtemperatur und wurde anschließend durch die Zugabe von Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum resultierten (35.0 mmol) silylgeschützter Propargylalkohol **96**. Das entspricht einer Ausbeute von 98 %. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[136]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 4.31 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, CH_2OTBS), 2.39 (1H, t, *J* = 2.4 Hz, CH), 0.91 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.13 (6H, s, Me-TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 82.4 (s, CCH), 72.8 (d, HCC), 51.5 (t, CH_2OTBS), 25.8 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.3 (s, TBS), -5.2 (q, Me-TBS) ppm; **Rf** (PE/EE = 20:1) = 0.55.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

^{t}Butyldimethylsilylbut-2-indiol 119a



96 **119a**

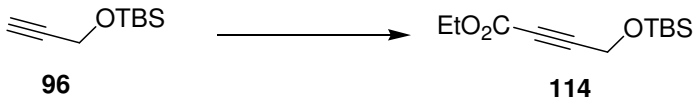
170 mg ^{t}*Butyldimethylsilylpropargylalkohol* **96** (1 mmol; 1 Äq) wurden in 5 mL THF gelöst und auf –78 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 0.63 mL *n*Butyllithium-Lösung (c = 2.5 mol/L in Hexan; 1 mmol; 1 Äq) zutropfen gelassen, eine Stunde bei –78 °C gerührt und anschließend mit 75 mg Paraformaldehyd (2.5 mmol; 2.5 Äq) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Die gelartige Masse

[136] M.E.Layton, C.A.Morales, M.D.Shair, *J.Am.Chem.Soc*., **2002,** *5*, 773-775.

wurde am nächsten Tag vorsichtig mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet un im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mittels einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) konnten 175.6 mg Diol **119a** (0.88 mmol) isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 88 %. Zusätzlich wurden 24.4 mg Edukt resisoliert (0.12 mmol; 12 %). Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[137]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 4.35 (2H, pt, *J* = 1.9 Hz, CH_2OH), 4.30 (2H, bs, CH_2OTBS), 1.59 (1H, bs, OH), 0.91 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.12 (6H, s, Me-TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 84.5 (s, Alkin-C), 82.9 (Alkin-C), 51.7 (t, CH_2OH), 51.2 (t, CH_2OTBS), 25.8 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.3 (s, ^{t}Bu-TBS), - 5.2 (q, Me-TBS) ppm.; **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.32.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

4-^{t}Butyldimethylsiloxybutinsäureethylester 114



96 **114**

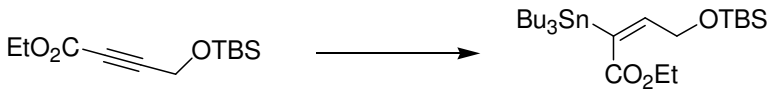
3.41 g *Silylpropargylalkohol* **96** (20 mmol; 1 Äq) wurden in 50 mL THF gelöst und die Mischung auf –78 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 13.8 mL Methyllithium-Lösung (c = 1.6 mol/L in Et_2O; 22 mmol; 1.1 Äq) zugetropft und eine Stunde bei –78 °C gerührt. Dann wurden langsam 2.28 mL Chlorameisensäureethylester zugetropft und eine Stunde bei –20 °C und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde zur Aufarbeitung auf gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (20:1) gereinigt. Es resultierten 3.93 g Produkt (15.3 mmol;

[137] J.Robertson, R.J.D.Hatley, *Chem.Comm.,* **1999***,* 1455-1456.

0.8 Äq) in Form eines hellgelben Öls. Das entspricht einer Ausbeute von 77 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur[138] überein.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 4.43 (2H, s, CH_2OTBS), 4.23 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 1.31 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3), 0.91 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.13 (6H, s, Me-TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 153.3 (s, CO), 85.7 (s, Alkin-C), 76.7 (s, Alkin-C), 62.0 (t , CO_2Et-CH_2), 51.4 (t, CH_2OTBS), 25.7 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.2 (s, ^{t}Bu-TBS), 14.0 (q, CO_2Et-CH_3), -5.3 (q, Me-TBS) ppm. **HRMS (EI)** für $C_8H_{13}O_3Si$ $[M-^tBu]^+$: berechnet 185.0634, gefunden 185.0635; **Rf** (PE/EE = 20:1) = 0.33.

Stannan 113a



114 **113a**

Eine entgaste Lösung aus 1.45 g Tributylzinnhydrid (5 mmol, 1 Äq) in 10 mL THF wurde langsam zu einer Lösung aus 1.4 g *4-^{t}Butyldimethylsiloxybutinsäureethylester* **114** (5.5 mmol; 1.1 Äq) und 116 mg Tetrakistriphenylphosphin-Palladium (0.1 mmol; 0.02 Äq) in 10 mL THF getropft. Die Lösung rührte 4 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur bevor das Rohprodukt direkt auf Kieselgel aufrotiert und über eine kurze Filtersäule mit einer Petrolether/Essigsäureethylester-Mischung (50:1) gereinigt wurde. Es konnten 2.2 g Stannan **113a** (4.14 mmol) als weißlich trübes Öl isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 75 %. Die Analytik stimmte mit der in der Literatur[139] angegebenen überein.

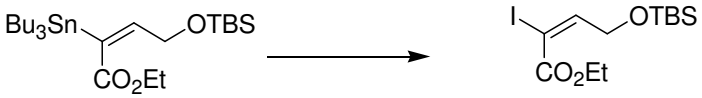
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$ = 7.26 ppm): δ_H = 6.33 (1H, t, *J* = 4.6 Hz, olef.-H), 4.66 (2H, d, *J* = 4.6 Hz, CH_2OTBS), 4.18 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 1.55 – 1.44 (6H, m, SnBu), 1.32 – 1.24 (6H, m, SnBu), 0.93 – 0.87 (24H, m, TBS-^{t}Bu, SnBu), 0.07 (6H, s, TBS-Me) ppm; **HRMS (EI)** für $C_{24}H_{50}O_3SiSnNa$ $[M+Na]^+$:berechnet 557.2449, gefunden 557.2475; **Rf** (PE/EE = 100:1) = 0.07.

---

[138] R.Rossi, A.Carpita, P.Cossi, *Tetrahedron,* **1992**, *48*, 8801-8824.

[139] *Tetrahedron,* **1992**, 48, 40, 8801-8824.

Vinyliodid 113

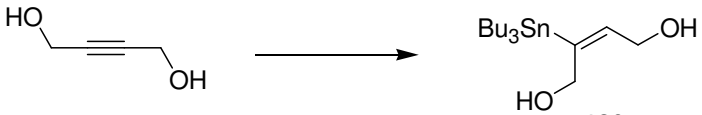


113a **113**

2.2 g Stannan **113a** (4.1 mmol; 1 Äq) wurden in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argonstrom mit 1.1 g Iod (4.5 mmol; 1.1 Äq) gelöst in 50 mL Dichlormethan versetzt. Die Mischung rührte 1 Stunde bei Raumtemperatur und wurde dann mit 100 mL wässriger KF-Lösung versetzt und für 1 Stunde sehr stark gerührt. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert, direkt auf Kieselgel aufrotiert und mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1) über eine kurze Filtersäule gereinigt. Es konnten 1.4 g Vinyliodid **113** (3.7 mmol) in einer Ausbeute von 91 % als hellgelbes Öl isoliert werden. Die analytischen Daten stimmen mit denen der Literatur[139] überein.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.10 (1H, t, *J* = 4.8 Hz), 4.58 (2H, d, *J* = 4.8 Hz), 4.22 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 1.32 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 0.90 (9H, s), 0.07 (6H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 163.26 (s, CO), 159.39 (d, olef.CH), 82.98 (s, olef. C), 64.03 (t, CH_2OTBS), 62.53 (t, Ester-CH_2), 25.83 (q, TBS), 18.24 (q, Ester-CH_3), 14.06 (s, TBS), -5.35 (q, TBS) ppm. **HRMS (EI)** für $C_8H_{14}IO_3Si$ $[M-^tBu]^+$: berechnet 312.9757, gefunden 312.9754; **Rf** (PE/EE = 50:1) = 0.24.

Vinylstannan 120a



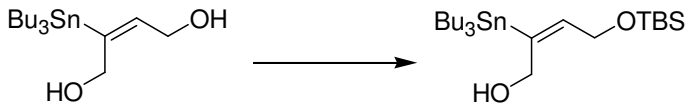
119 **120a**

258 mg *2-Butin-1,4-diol* **119** (3 mmol; 1 Äq) wurden mit 139 mg Tetrakistri(triphenyl-phosphin)palladium (0.12 mmol; 0.04 Äq) in 3 mL Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur unter Argon mit 888 µL Tributylzinnhydrid (3.3 mmol; 1.1 Äq) gelöst in 3 mL Tetrahydrofuran versetzt. Die Mischung rührte 20 min bei Raumtemperatur und wurde dann direkt auf Kieselgel aufrotiert. Nach chromatographischer Reinigung mit einer

Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1 → 2:1) resultierten 1 g *2-Butenyl-(tributylstannan)-1,4-diol* **120a** (2.65 mmol) in einer Ausbeute von 88 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.79 (1H, m), 4.39 (2H, s), 4.20 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 1.62 (2H, bs), 1.53 – 1.45 (6H, m), 1.36 – 1.28 (6H, m), 0.96 – 0.85 (15 H, m) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 149.4 (s, olef.), 138.0 (d, olef.), 63.6 (t, CH_2OH), 59.9 (t, CH_2OH), 29.2 (SnBu), 27.4 (SnBu), 13.7 (SnBu), 10.1 (SnBu) ppm; **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.09.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

Vinylstannan 120



120a **120**

1 g *2-Buten-(tributylstannan)-1,4-diol* **120a** (2.65 mmol; 1 Äq) wurde in 2.5 mL Tetrahydrofuran gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 180.4 mg (2.65 mmol; 1 Äq) Imidazol und 400 mg ^{t}Butyldimethylsilylchlorid (2.65 mmol; 1 Äq) zugegeben. Die Mischung rührte 4 Stunden bei 0 °C. Da nach dieser Zeit noch Edukt vorhanden war wurde jeweils eine Spatelspitze Imidazol und ^{t}Butyldimethylsilylchlorid zugegeben, die Reaktion rührte über Nacht und wurde dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Ammoniumchloridlösung beendet, die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach chromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (20:1) resultierten 1.16 g *2-Buten-(tributylstannan)-1-^{t}butyldimethylsilylether-4-ol* **120** (2.37 mmol) in einer Ausbeute von 89 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[140]

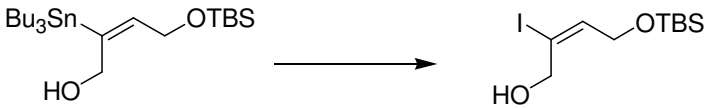
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.70 (1H, m), 4.34 (2H, m), 4.22 (2H, d, *J* = 5.4 Hz), 1.85 (1H, t, *J* = 5.4 Hz), 1.58 – 1.39 (6H, m), 1.36 – 1.24 (6H, m), 0.95 – 0.83

[140] A.Pollex, M.Hiersemann, *Org.Lett.*, **2005**, 7, 5705-5708.

(24 H, m), 0.07 (6 H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 147.2 (s, olef.), 138.8 (d, olef.), 63.8 (t, CH_2OH), 60.7 (t, CH_2OTBS), 29.2 (SnBu), 27.4 (SnBu), 25.9 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.3 (s, ^{t}Bu-TBS), 13.7 (SnBu), 10.0 (SnBu), -5.1 (q, Me-TBS) ppm; **Rf** (PE/EE = 20:1) = 0.17.

Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

Vinyliodid 121

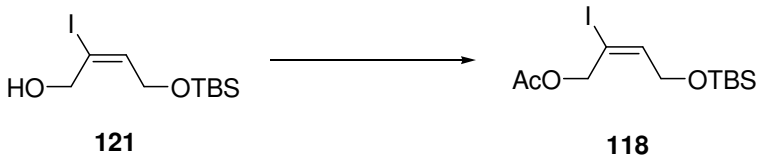


120 **121**

1.2 g *2-Buten-(tributylstannan)-1-^{t}butyldimethylsilylether-4-ol* **120** (2.37 mmol; 1 Äq) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und auf –78 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 721 mg Iod (2.84 mmol; 1.2 Äq) gelöst in 5 mL Dichlormethan zugegeben. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur war die Reaktion abgeschlossen und wurde durch die Zugabe von gesättigter Kaliumfluoridlösung hydrolysiert und zwei Stunden stark gerührt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Natriumthiosulfatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, über Kieselgur filtriert und im Vakuum konzentriert. Der Kolben sollte während der Reaktion und auch während der Konzentration im Vakuum mit Alufolie umwickelt sein, da sonst Zersetzung eintritt, die an der Braunfärbung der Lösung bzw. des Rohprodukts zu erkennen ist. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelfiltersäule mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) gereinigt. Es resultierten 747 mg *2-Buten-iodo-1-^{t}butyldimethyl-silylether-4-ol* **121** (2.28 mmol; 1 Äq) als hellgelbes Öl in einer Ausbeute von 96 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[140]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.45 (1H, t, *J* = 6.1 Hz), 4.28 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, CH_2OH), 4.21 (2H, d, *J* = 6.1 Hz, CH_2OTBS), 2.50 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, OH), 0.90 (9H, s), 0.08 (6 H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 141.5 (d, olef.), 104.7 (s, olef.), 66.7 (t, CH_2OH), 61.2 (t, CH_2OTBS), 25.8 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.3 (s, ^{t}Bu-TBS), -5.3 (q, Me-TBS) ppm. **HRMS** (ESI) für $C_{10}H_{21}IO_2SiNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 351.0253, gefunden 351.0263; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.15.

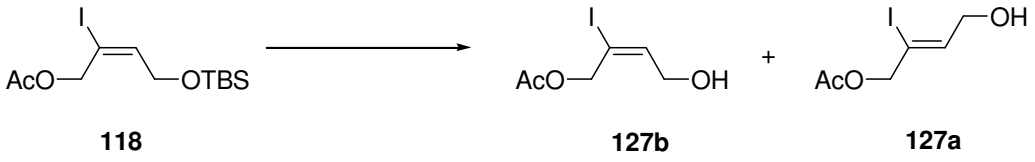
Vinyliodiddiol 118



75 mg *2-Iod-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenol* **121** (0.23 mmol; 1 Äq) wurde in 9.1 mL Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 2.3 mL Acetanhydrid (24.3 mmol; 106 Äq) versetzt. Die Mischung rührte eine Stunde bei Raumtemperatur bevor mit Methanol hydrolysiert wurde. Das Pyridin wurde durch die Zugabe von Kupfersulfatlösung komplexiert, das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinten organischen Phasen erneut mit Kupfersulfatlösung, Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es resultierten 85 mg *2-Iod-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenolacetat* **118** (0.23 mmol; 1 Äq) als gelbes Öl in einer quantitativen Ausbeute.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.53 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 4.76 (2H, s, CH_2OAc), 4.26 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, CH_2OTBS), 2.12 (3H, s, Ac), 0.89 (9H, s), 0.07 (6 H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 168.2 (s, Ac-CO), 145.6 (d, 3-C), 92.9 (s, 2-C), 66.1 (t, 1-C), 61.3 (t, 4-C), 25.8 (q, ^{t}Bu-TBS), 20.9 (q, Ac-CH_3), 13.6 (s, ^{t}Bu-TBS), -5.3 (q, Me-TBS) ppm; **Rf** (PE/EE: 2:1) = 0.73.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

Vinyliodiddiole 127 a, 127b



85 mg *E-2-Iod-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenolacetat* **118** (0.23 mmol; 1 Äq) wurden in 1.8 mL Tetrahydrofuran gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 145 mg Tetrabutylammoniumfluorid (0.46 mmol; 2 Äq) versetzt. Nach einer Stunde war die Reaktion abgeschlossen und wurde durch die Zugabe von Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Das Produkt wurde mit

Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Konzentration im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (4:1 → 2:1) resultierten 42.2 mg des gewünschten Produkts **127b** (0.17 mmol) in einer Ausbeute von 69 % und 15.8 mg des isomerisierten *Z*-Produkts **127a** (0.06 mmol) in einer Ausbeute von 26 %.

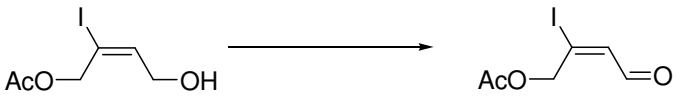
E-Produkt **127b**:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.41 (1H, t, *J* = 7.5 Hz), 4.62 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, CH_2OH), 4.35 (2H, s, CH_2OAc), 2.50 (1H, bs, OH), 2.07 (3H, s, Ac) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 171.1, 135.9, 109.4, 66.4, 61.0, 20.9 ppm. **HRMS (ESI)** für $[M+Na]^+$: berechnet 278.9494, gefunden 278.9492; **Rf** (PE/EE: 2:1) = 0.19.

Z-Produkt **127a**:

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.68 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 4.82 (2H, s, CH_2OAc), 4.23 (2H, pt, *J* = 6.5 Hz, CH_2OAc), 2.41 (1H, t, *J* = 6.5 Hz, OH), 2.13 (3H, s, Ac) ppm; **HRMS (ESI)** für $[M+Na]^+$: berechnet 278.9494, gefunden 278.9492; **Rf** (PE/EE: 2:1) = 0.17.

Vinyliodid 128



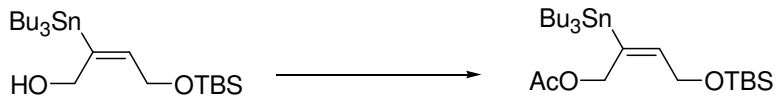
127b **128**

38 mg *E-3-Iod-4-O-Acetat-1-butenol* **127b** (0.15 mmol; 1 Äq) wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 40 mg Natriumhydrogencarbonat (0.50 mmol; 3.3 Äq) und 70 mg DESS-MARTIN-Periodinan (0.17 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Nach einer Stunde wurde eine Spatelspitze von jedem Reagenz nachgegeben und nach einer weiteren Stunde war die Reaktion abgeschlossen. Es wurde mit 2 mL Natriumhydrogencarbonatlösung und 2 mL Natriumthiosulfatlösung hydrolysiert und die Mischung eine Stunde gerührt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat

getrocknet, über Kieselgur filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 32 mg hellgelbes *E-3-Iod-1-butenal-4-acetat* **128** (0.13 mmol) in einer Ausbeute von 84 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 8.66 (1H, s, CHO), 7.38 (1H, t, *J* = 5.1 Hz), 4.92 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, CH_2OAc), 2.14 (1H, s, Ac) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 186.6 (d, CO), 170.4 (s, CO) , 154.9 (d, 2-C), 109.9 (s, 3-C), 67.3 (t, 4-C), 20.6 (q, Ac-Me) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_6H_6O_3I$ $[M+H]^+$: berechnet 252.9362, gefunden 252.9355; **Rf** (PE/EE: 10:1) = 0.16.

Vinylstannandiol 120b

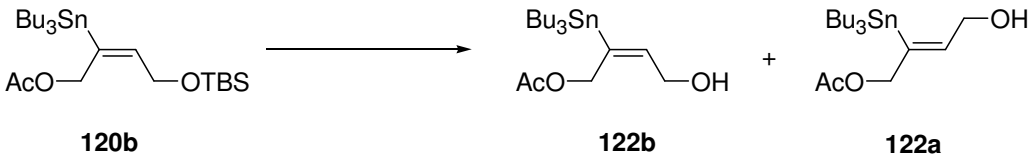


120 **120b**

239 mg *E-2-(tributylstannyl)-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenol* **120** (0.49 mmol; 1 Äq) wurden in 9.2 mL Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 2.3 mL Acetanhydrid (24.3 mmol; 106 Äq) versetzt. Die Mischung rührte fünf Stunden bei Raumtemperatur bevor mit Methanol hydrolysiert wurde. Das Pyridin wurde durch die Zugabe von Kupfersulfatlösung komplexiert, das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinten organischen Phasen erneut mit Kupfersulfatlösung, Wasser und Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es resultierten 234.7 mg *2-(tributylstannyl)-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenolacetat* **120b** (0.44 mmol) als farbloses Öl in einer Ausbeute von 89 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.74 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 4.77 (2H, s, CH_2OAc), 4.25 (2H, d, *J* = 5.5 Hz), 2.06 (3H, s, Ac), 1.53 – 1.43 (6H, m), 1.37 – 1.25 (6H, m), 0.95 – 0.85 (24 H, m), 0.07 (6H, s) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 170.6 (s, CO), 141.3 (d, 3-C), 139.6 (s, 2-C), 66.5 (t, 1-C), 60.9 (t, 4-C), 29.1 (SnBu) , 27.3 (SnBu), 25.9 (q, TBS), 21.0 (q, Ac-CH_3), 18.3 (s, TBS), 13.7 (SnBu), 10.1 (SnBu), -5.2 (q, TBS) ppm. **HRMS (EI)** für $C_{20}H_{41}O_3SiSn$ $[M\text{-}tBu]^+$:berechnet 477.1847, gefunden 477.1844; **Rf** (PE/EE: 10:1) = 0.47.

Vinylstannandiol 122a, 122b



120b **122b** **122a**

180 mg *E-2-(tributylstannyl)-4-^{t}Butyldimethylsilyloxy-1-butenolacetat* **120b** (0.34 mmol; 1 Äq) wurden in 2.6 mL Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 220 mg Tetrabutylammoniumfluorid (0.70 mmol; 2 Äq) versetzt. Nach zwei Stunden war die Reaktion abgeschlossen und wurde durch die Zugabe von Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Konzentration im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) resultierten 90.5 mg des gewünschten Produkts **122b** (0.22 mmol) in einer Ausbeute von 64 % und 43.3 mg des isomerisierten *Z*-Produkts **122a** (0.10 mmol) in einer Ausbeute von 31 %.

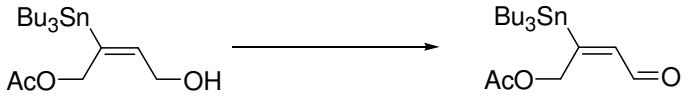
(E)-Produkt

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.87 (1H, tt, *J* = 5.7, 2.1 Hz), 4.82 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, CH_2OAc), 4.24 (2H, pt, *J* = 5.6 Hz), 3.00 (3H, s, Ac), 1.67 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 1.53 – 1.44 (6H, m), 1.36 – 1.26 (6H, m), 0.95 – 0.86 (15 H, m) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 170.8 (s, Ac-CO), 142.2 (s, olef.), 140.4 (d, olef.), 66.1 (t, CH2OAc), 59.7 (t, CH2OTBS), 29.0 (SnBu), 27.4 (SnBu), 21.0 (q, Ac), 13.7 (SnBu), 10.0 (SnBu) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{18}H_{36}O_3SnNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 443.1584, gefunden 443.1596; **Rf** (PE/EE: 4:1) = 0.25.

(Z)-Produkt

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.87 (1H, tt, *J* = 5.7, 2.1 Hz), 4.82 (2H, d, *J* = 2.1 Hz, CH_2OAc), 4.24 (2H, pt, *J* = 5.6 Hz), 3.00 (3H, s, Ac), 1.67 (1H, t, *J* = 5.6 Hz), 1.53 – 1.44 (6H, m), 1.36 – 1.26 (6H, m), 0.95 – 0.86 (15 H, m) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 170.8 (s, Ac-CO), 142.2 (s, olef.), 140.4 (d, olef.), 66.1 (t, CH_2OAc), 59.7 (t, CH_2OTBS), 29.0 (SnBu), 27.4 (SnBu), 21.0 (q, Ac), 13.7 (SnBu), 10.0 (SnBu) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{18}H_{36}O_3SnNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 443.1584, gefunden 443.1596; **Rf** (PE/EE: 4:1) = 0.34.

Vinylstannandiol 123

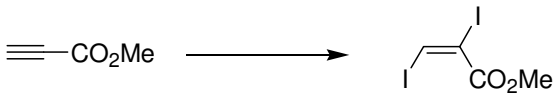


122b **123**

41 mg *E-3-(tributylstannyl)-4-O-Acetat-1-butenol* **122b** (0.10 mmol; 1 Äq) wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit 26 mg Natriumhydrogencarbonat (0.33 mmol; 3.3 Äq) und 46 mg DESS-MARTIN-Periodinan (0.11 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Nach zwei Stunden war die Reaktion abgeschlossen. Es wurde mit 2 mL Natriumhydrogencarbonatlösung und 2 mL Natriumthiosulfatlösung hydrolysiert und die Mischung eine Stunde gerührt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organsiche Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, über Kieselgur filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 30 mg farbloses *E-3-(tributylstannyl)-1-butenal-4-O-acetat* **123** (0.07 mmol) in einer Ausbeute von 73 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 9.87 (1H, d, *J* = 6.1 Hz, CHO), 6.26 (1H, dt, *J* = 6.1, 2.4 Hz), 5.34 (2H, d, *J* = 2.4 Hz, CH_2OAc), 2.12 (3H, s, Ac), 1.51 – 1.46 (6H, m), 1.35 – 1.28 (6H, m), 0.92 – 0.87 (15 H, m) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 187.7 (d, CO), 171.5 (s, Ac-CO), 136.4 (d, 2-C), 77.2 (s, 3-C), 67.4 (t, CH_2OAc), 28.9 (SnBu), 27.2 (SnBu), 20.9 (q, Ac-CH_3), 13.6 (SnBu), 10.7 (SnBu) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{18}H_{34}O_3SnNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 441.1428 gefunden 441.1444; **Rf** (PE/EE: 10:1) = 0.34.

Vinyldiiodid 133



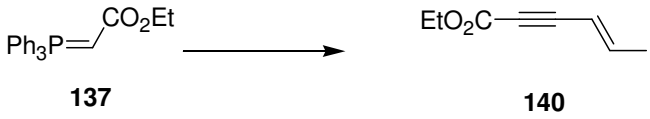
132 **133**

37.5 mg Natriumiodid (0.25 mmol; 1 Äq) wurden zu einer Lösung aus 81.2 mg Iodchlorid in 4.5 mL trockenem Dichlormethan unter Argon gegeben. Die entstandene Suspension wurde auf 0 °C gekühlt, 44.5 µL des Methylpropiolats **132** wurden gelöst in 1 mL Dichlormethan

zugetropft und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 5 Stunden war die Reaktion abgeschlossen und wurde über Kieselgur filtriert, mit Natriumthiosulfatlösung gewaschen, bis die organische Phase leicht gelb gefärbt war und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Konzentration im Vakuum resultierten 71.3 mg *Methylacrylat-2,3-diiodid* **133** (0.21 mmol) als gelbes Öl in einer Ausbeute von 85 %. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[141]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.76 (1H, s, olef.), 3.86 (3H, s, OMe) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 164.1 (s, CO), 87.6 (d, olef.), 85.5 (s, olef.), 53.4 (q, OMe) ppm; **Rf** (PE/EE = 50:1) = 0.18.

Hex-2-in-trans-4-ensäureethylester 140



137 **140**

3.5 g (10 mmol; 1 Äq) Phosphorylid **137** wurden in 150 mL Benzol gelöst, mit 3.1 mL N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) (12 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Die Lösung wurde auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur tropfenweise mit 1.25 mL Chrotonylchlorid (10 mmol; 1 Äq) versetzt. Die gelbliche Lösung rührte 2.5 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert wurde. Die wässrige Phase wurde mit Toluol extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels im Vakuum resultierten 3.5 g eines hochviskosen orange-braunen Öls, das ohne weitere Reinigung in die Pyrolyse eingesetzt wurde.

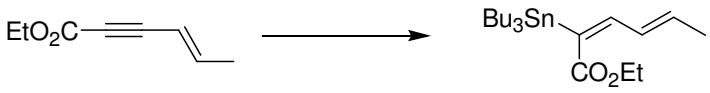
Dafür wurde das Öl in einer Kugelrohrdestille im Hochvakuum bei 220 °C zersetzt und destillativ getrennt. In der mit Trockeneis gekühlten Vorlage konnten 0.88 g des Produkts in Form einer farlosen Flüssigkeit aufgefangen werden. Das entspricht einer Ausbeute von 64 % über 2 Stufen. Da das ^{1}H-Spektrum mit der Literatur übereinstimmte wurde das Produkt direkt in die nächste Stufe eingesetzt.[111]

---

[141] N.Henaff, S.K.Stewart, A.Whiting, *Tet.Lett.*, **1997**, *38*, 4525-4526.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.54 (1H, dq, J = 16.0, 6.9 Hz, 5-H), 5.61 (1H, dd, J = 16.0, 1.7 Hz, 4-H), 4.26 (2H, q, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 1.89 (3H, dd, J = 7.0, 1.7 Hz, 6-H), 1.34 (3H, t, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3) ppm; **Rf** (PE/EE 50:1) =0.09.

Hex-2,4-dien-2-tributylstannylsäureethylester 141

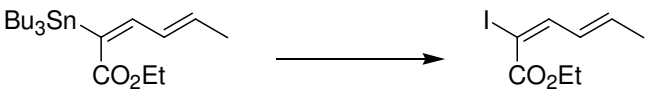


140 **141**

100 mg Enin **140** (0.72 mmol; 1 Äq) wurden unter Schutzgas in 1.6 mL entgastem THF gelöst und mit 18 mg (0.016 mmol; 0.02 Äq) Tetrakistriphenylphopin-Palladium versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur tropfenweise mit 0.21 mL Tributylstannan (0.78 mmol; 1.1 Äq) gelöst in 1.6 mL THF versetzt. Nach 2 Stunden war die Reaktion beendet und das Rohprodukt wurde direkt aus der Reaktionslösung auf Kieselgel gezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1) wurden 264 mg (0.62 mmol; 0.85 Äq) Produkt **141** als farloses Öl erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 85 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.00 (1H, ddq, J = 15.1, 10.8, 1.6 Hz, 4-H), 6.56 (1H, d, J = 10.8 Hz, 3-H), 5.98 (1H, dd, J = 15.1, 6.8 Hz, 5-H), 4.19 (2H, q, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 1.86 (3H, dd, J = 6.8, 1.6 Hz, 6-H), 1.32 (3H, t, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3) ppm ; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 170.7 (s, CO), 150.6 (d, 3-C), 137.0 (d, 5-C), 129.7 (d, 4-C), 124.9 (s, 1-C), 60.1 (t, CO_2Et-CH_2), 28.9 (SnBu), 27.3 (SnBu), 18.4 (q, 6-Me), 14.4 (q, CO_2Et-CH_3), 13.7 (SnBu), 10.3 (SnBu) ppm; **Rf** (PE/EE 50:1) =0.17.

Hex-2,4-dien-2-iodsäureethylester 142



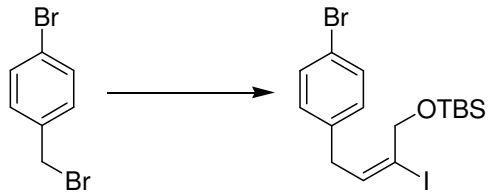
141 **142**

70 mg Stannan **141** (0.16 mmol; 1 Äq) wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt. 50 mg Iod (0.2 mmol; 1.2 Äq) wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst zur Reaktionslösung getropft, bis die Rotfärbung bestehen bleibt. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 5 min gerührt bevor sie mit Natriumthiosulfatlösung versetzt und mit Dichlormethan extrahiert wurde. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1) verblieben 59 mg hellgelbes Produkt **142**, das noch leicht mit Distannan verunreinigt war. Die Reaktion verlief quantitativ.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.34 (1H, d, J = 11.2 Hz, 3-H); 7.02 (1H, ddq, J = 14.9, 11.2, 1.7 Hz, 4-H), 6.04 (1H, dq, J = 14.9, 6.9 Hz, 5-H), 4.26 (2H, q, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 1.83 (3H, dd, J = 6.9, 1.7 Hz, 6-H), 1.34 (3H, t, J = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 163.7 (s, CO), 153.7 (d, 2-C), 140.6 (d, 4-C), 129.8 (d, 3-H), 82.7 (s, C-I), 62.3 (t, CO_2Et-CH_2), 18.6 (q, 5-C), 14.1 (q, CO_2Et-CH_3) ppm; **Rf** (PE/EE 50:1) =0.12.

Negishi-Kupplungsprodukte

2-Iod-4-parabromphenyl-2-butenol-^{t}butyldimethylsilylether 95



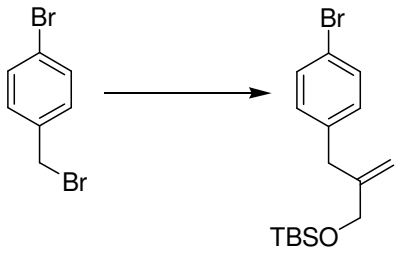
91 **95**

39 mg Zinkstaub (0.6 mmol; 4.5 Äq) wurden in 0.5 mL Tetrahydrofuran unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit 5 µL frisch destilliertem Dibromethan (0.06 mmol; 0.45 Äq) versetzt. Die Suspension wurde mehrmals für kurze Zeit auf 60 – 70 °C erhitzt, bis keine Blasenbildung mehr zu beobachten war und wurde dann auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 50 mg 4-Brombenzylbromid **91** (0.2 mmol; 1.5 Äq) in 0.5 mL THF

gelöst zugetropft, 45 Minuten bei 0 °C gerührt, dann der Überschuß Zinkstaub absetzen gelassen und die Zinkorganyllösung in eine Lösung aus 55 mg *2,3-Diiodpropenol-^{t}butyldimethylsilylether* **94** (0.13 mmol; 1 Äq) und 2 mg PEPPSI (2.9 µmol; 0.02 Äq) in 0.2 mL Tetrahydrofuran und 0.35 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon bei Raumtemperartur getropft. Die Reaktion war nach 2 Stunden abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1 → 50:1) resultierten 53 mg *2-Iod-4-parabromphenyl-2-butenol-^{t}butyldimethyl-silylether* **95** (0.11 mmol) in einer Ausbeute von 94 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.42 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.05 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 6.40 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 3-H), 4.35 (2H, s, 1-H), 3.44 (2H, d, *J* = 7.85 Hz, 4-H), 0.94 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.13 (6H, s, Me-TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 139.7 (d, 3-C), 137.6 (s, Ar-C), 131.7 (d, Ar-C), 130.2 (d, Ar-C), 120.3 (s, Ar-C), 103.9 (s, 2-C), 65.7 (t, 1-C), 36.5 (t, 4-C), 25.9 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.4 (s, TBS), -5.1 (q, Me-TBS) ppm. **HRMS** (EI) für $C_{12}H_{15}BrIOSi$ $[M-^tBu]^+$: berechnet 408.9120 gefunden 408.9122; **Rf** (PE/EE = 50:1) = 0.28.

2-Parabromphenyl-2-propenol-^{t}butyldimethylsilylether 101



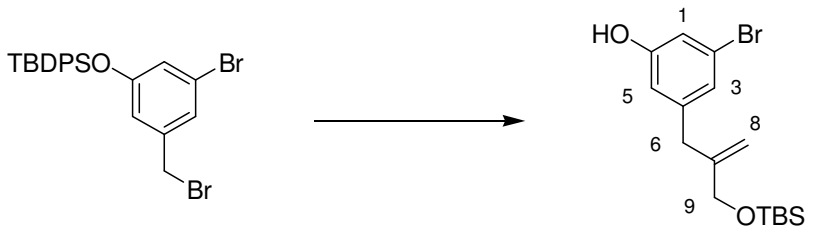
91 **101**

46 mg Zinkstaub (0.7 mmol; 5 Äq) wurden in 0.5 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit 1.8 mg Iod (0.07 mmol; 0.05 Äq) versetzt. Die Suspension rührte bei Raumtemperatur bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde dann auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 50 mg 4-Brombenzylbromid **91** (0.2 mmol; 1.5 Äq) in 1 mL THF gelöst zugetropft, 45 Minuten bei 0 °C gerührt, dann der Überschuß Zinkstaub absetzen gelassen und die Zinkorganyllösung in eine Lösung aus 39 mg

2-Iod-2-propenol-^{t}butyldimethylsilylether **99** (0.13 mmol; 1 Äq) und 4.7 mg PEPPSI (7 µmol; 0.05 Äq) in 1 mL Tetrahydrofuran und 0.5 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon bei Raumtemperartur getropft. Die Reaktion war nach 3 Stunden abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1 → 20:1) resultierten 27 mg *2-Parabromphenyl-2-propenol-^{t}butyldimethylsilylether* **101** (0.08 mmol) in einer Ausbeute von 62 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.40 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 7.07 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 5.12 (1H, s, 3-H_a), 4.80 (1H, s, 3-H_b), 4.00 (2H, s, CH_2OTBS), 3.31 (2H, s, CH_2Ar), 0.90 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.03 (6H, s, Me-TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 147.5 (s, 2-C), 138.3 (s, Ar-C), 131.3 (d, Ar-C), 130.7 (d, Ar-C), 119.9 (s, Ar-C), 111.2 (t, 3-C), 65.3 (t, CH_2OTBS), 38.9 (t, CH_2Ar), 25.9 (q, ^{t}Bu-TBS), 18.3 (s, TBS), -5.4 (q, Me-TBS) ppm. **HRMS** (EI) für $C_{15}H_{22}BrOSi$ $[M\text{-}Me]^+$: berechnet 325.0623 gefunden 325.0624; **Rf** (PE/EE = 20:1) = 0.22.

NEGISHI-Kupplungsprodukt 102a



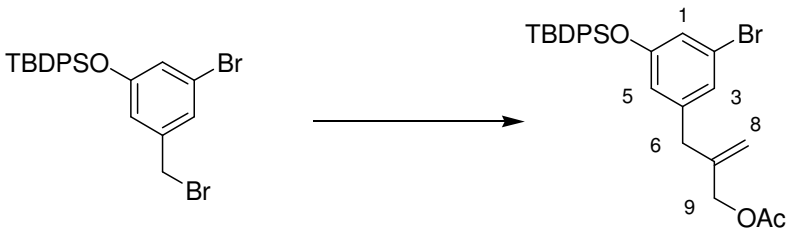
90 **102a**

24.5 mg Zinkstaub (0.375 mmol; 1.875 Äq) wurden in 0.25 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit 5.1 mg Iod (0.02 mmol; 0.1 Äq) versetzt. Die Suspension rührte bei 60 °C bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde bei dieser Temperatur mit 126 mg *3-Brom-5-^{t}butyldiphenylsilyloxibenzylbromid* **90** (0.25 mmol; 1.25 Äq) in 0.5 mL THF gelöst versetzt und 1 Stunde bei 60 °C gerührt bis die Zinkinsertion abgeschlossen war. 112.6 mg Zinkbromid (0.5 mmol; 2.5 Äq) und eine Lösung aus 51 mg Vinyliodid **99** (0.17 mmol; 1 Äq) und 14 mg PEPPSI (0.02 mmol; 0.1 Äq) in 0.5 mL Tetrahydrofuran und 0.25 mL N-Methyl-2-pyrrolidon wurde bei 60 °C zugetropft. Die

Reaktion war nach 2 Stunden abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1) resultierten 102 mg des noch verunreinigten aromatischen Bausteins **102**. Aufgrund der starken Unpolarität des Produkts konnte keine zufriedenstellende chromatographische Trennung von Nebenprodukten und Verunreinigungen erreicht werden. Deshalb wurde der phenolische Silylether gespalten. Dafür wurde das Rohprodukt in 1 mL THF gelöst, die Mischung auf -10 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 66 mg Tetrabutylammoniumfluorid (0.25 mmol) versetzt. Nach 20 Minuten war die Reaktion abgeschlossen und wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Nach chromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1 → 20:1) konnten 68 mg eines Gemischs aus Produkt und ^{t}Butyldiphenylsilylalkohol erhalten werden. Die Ausbeute an Produkt wurde aus dem Verhältnis der Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum bestimmt und betrug 78 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.93 (1H, bs, Ar-H), 6.86 (1H, bs, Ar-H), 6.60 (1H, bs, Ar-H), 5.14 (2H, bs, 8-H_a, Ph-OH), 4.86 (1H, s, 8-H_b), 4.01 (2H, s, H-9), 3.27 (2H, s, H-6), 0.91 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.05 (6H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 156.3 (s, Ar-C), 146.9 (s, Ar-C), 142.9 (s, olef.-C), 124.5 (d, Ar-C), 122.5 (s, Ar-C), 116.6 (d, Ar-C), 114.8 (d, Ar-C), 111.6 (t, olef.-CH_2), 65.2 (t, CH_2O), 39.1 (t, CH_2Ar), 25.9 (q, TBS-^{t}Bu), 18.3 (s, TBS-^{t}Bu) ppm. **HRMS** (ESI) für $C_{16}H_{24}O_2SiBr$ $[M-H]^-$: berechnet 355.0729, gefunden 355.0731; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.26.

NEGISHI-Kupplungsprodukt 103

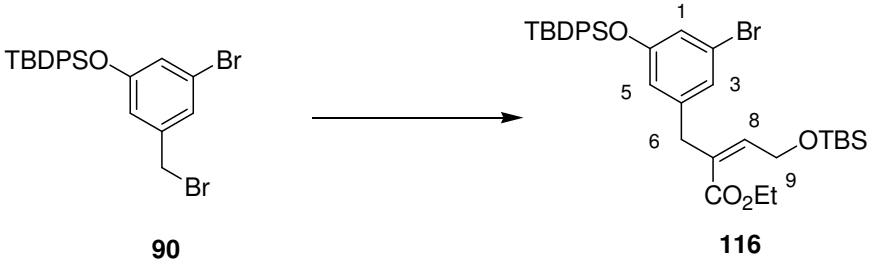


90 **103**

24.5 mg Zinkstaub (0.375 mmol; 1.875 Äq) wurden in 0.25 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit 5.1 mg Iod (0.02 mmol; 0.1 Äq) versetzt. Die Suspension rührte bei 60 °C bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde bei dieser Temperatur mit 126 mg *3-Brom-5-^{t}butyldiphenylsilyloxibenzylbromid* **90** (0.25 mmol; 1.25 Äq) in 0.5 mL THF gelöst versetzt und 1 Stunde bei 60 °C gerührt bis die Zinkinsertion abgeschlossen war. 112.6 mg Zinkbromid (0.5 mmol; 2.5 Äq) und eine Lösung aus 38.5 mg Vinyliodid **100** (0.17 mmol; 1 Äq) und 14 mg PEPPSI (0.02 mmol; 0.1 Äq) in 0.5 mL Tetrahydrofuran und 0.25 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon wurde bei 60 °C zugetropft. Die Reaktion war nach 1 Stunde abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1 → 50:1) resultierten 73.8 mg des aromatischen Bausteins **103** (0.14 mmol) in einer Ausbeute von 83 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.69 – 7.65 (4H, m, arom. TBDPS), 7.46 – 7.35 (6H, m, arom. TBDPS), 6.85 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-3), 6.41 (1H, s, H-5), 4.97 (1H, s, H-8a), 4.72 (1H, s, H-8b), 4.26 (2H, s, H-9), 3.11 (2H, s, H-6), 2.01 (3H, s, Ac), 1.09 (9H, s, TBDPS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 170.5 (s, CO), 156.3 (s, COTBDPS), 142.0 (s, C-7), 141.2 (s, C-4), 135.4 (t, TBDPS), 132.2 (s, TBDPS), 130.1 (t, TBDPS), 127.8 (t, TBDPS), 124.8 (t, C-3), 122.2 (s, C-2), 121.2 (t, C-1), 119.2 (t, C-5), 114.9 (C-8), 66.0 (s, C-9), 39.4 (s, C-6), 26.4 (q, TBDPS), 20.8 (q, Ac), 19.4 (s, TBDPS) ppm; **Rf** (PE/EE = 50:1) = 0.06.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

NEGISHI-Kupplungsprodukt 116



90 **116**

61 mg Zinkstaub (0.94 mmol; 1.875 Äq) wurden in 0.5 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit 6.5 mg Iod (0.025 mmol; 0.05 Äq) versetzt. Die Suspension rührte bei 60 °C bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde bei dieser Temperatur mit 315 mg *3-Brom-5-^{t}butyldiphenylsilyloxibenzylbromid* **90** (0.625 mmol; 1.25 Äq) in 1 mL THF gelöst versetzt und 1 Stunde bei 60 °C gerührt bis die Zinkinsertion abgeschlossen war. 281.5 mg Zinkbromid (1.25 mmol; 2.5 Äq) und eine Lösung aus 185 mg Vinyliodid **113** (0.5 mmol; 1 Äq) und 17 mg PEPPSI (0.025 mmol; 0.05 Äq) in 1 mL Tetrahydrofuran und 0.5 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon wurde bei 60 °C zugetropft. Die Reaktion war nach 1 Stunde abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (100:1) resultierten 210 mg des aromatischen Bausteins **116** (0.32 mmol) in einer Ausbeute von 63 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.69 – 7.65 (4H, m, arom. TBDPS), 7.45 – 7.35 (6H, m, arom. TBDPS), 6.85 (1H, s, Ar-H), 6.77 (1H, s, Ar-H), 6.48 (1H, s, Ar-H), 5.97 (1H, t, *J* = 4.6 Hz, H-8), 4.57 (2H, d, *J* = 4.6 Hz, H-9), 4.04 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 3.32 (2H, s, H-6), 1.16 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3), 1.09 (9H, s, TBDPS), 0.90 (9H, s, TBS), 0.06 (6H, s, TBS) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 166.2 (s, CO), 156.2 (s, C-7), 147.8 (d, C-8), 142.1 (s, Ar-C), 135.4 (d, TBDPS), 132.4 (s, TBDPS), 130.1 (d, TBDPS), 128.5 (s, Ar-C), 127.8 (d, TBDPS), 124.8 (d, Ar-C), 122.0 (s, Ar-C), 121.0 (d, Ar-C), 119.1 (d, Ar-C), 62.1 (t, CH_2OTBS), 60.4 (t, CO_2Et-CH_2), 39.0 (t, C-6), 26.5 (q, ^{t}Bu-TBS), 25.9 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.5 (s, ^{t}Bu-TBDPS), 18.3 (s, ^{t}Bu-TBS), 14.1 (q, CO_2Et-CH_3), -5.2 (q, TBS-Me) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{35}H_{47}O_4Si_2BrK$ $[M+K]^+$: berechnet 705.1833, gefunden 705.1843; **Rf** (PE/EE = 50:1)= 0.31.

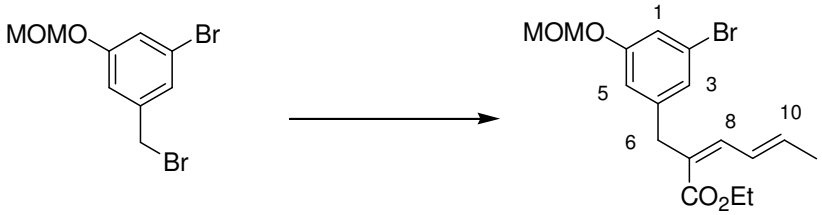
Entschützungsprodukt 117

116 **117**

Die getesteten Entschützungsbedingungen sind in Tabelle 9 auf Seite 68 zusammengefasst.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.70 – 7.66 (4H, m, arom. TBDPS), 7.46 – 7.36 (6H, m, arom. TBDPS), 6.97 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, 8-H), 6.97 (1H, s, Ar-H), 6.37 (1H, s, Ar-H), 6.33 (1H, pt, Ar-H), 4.56 (2H, d, *J* = 1.7 Hz, 9-H), 3.29 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, 6-H), 3.29 (9H, s,TBDPS-^{t}Bu) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.00 ppm): 173.5 (s, CO), 156.5 (s, Ar-C), 145.5 (d, Ar-C), 139.7 (s, Ar-C), 135.5 (d, TBDPS), 133.1 (s, Ar-C), 132.2 (s, TBDPS), 130.1 (d, TBDPS), 127.9 (d, TBDPS), 124.8 (d, Ar-C), 122.6 (s, Ar-C), 121.8 (d, Ar-C), 119.1 (d, Ar-C), 70.1 (t, CH_2O), 31.1 (t, C-6), 26.3 (q, ^{t}Bu-TBS), 19.4 (s, ^{t}Bu-TBDPS) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{27}O_3SiBrNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 529.0811, gefunden 529.0830; **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.18.

NEGISHI-Kupplungsprodukt 147



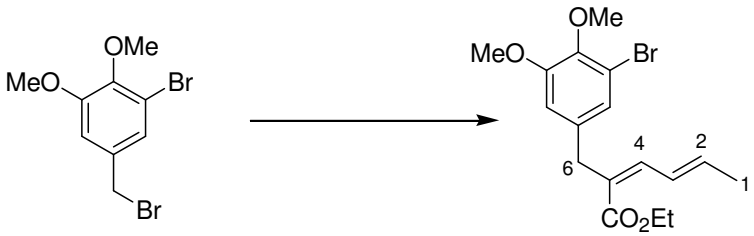
145 **147**

1.6 mg Zinkstaub (24 µmol; 1.875 Äq) wurden in 0.05 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit einem Krümel Iod versetzt. Die Suspension rührte bei 60 °C bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde bei dieser Temperatur mit 5 mg *3-Brom-5-methoxymethyloxibenzylbromid* **145** (16 µmol; 1.25 Äq) in 0.1 mL THF gelöst versetzt und 1.5 Stunden bei 60 °C gerührt bis die Zinkinsertion abgeschlossen war. 7.4 mg

Zinkbromid (0.033 mmol; 2.5 Äq) und eine Lösung aus 3.5 mg Vinyliodid **142** (13 µmol; 1 Äq) und 0.9 mg PEPPSI (1.3 µmol; 0.1 Äq) in 0.1 mL Tetrahydrofuran und 0.05 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon wurde bei 60 °C zugetropft. Die Reaktion war nach 3 Stunden abgeschlossen, wurde mit Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert und mit Essigsäure-ethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromato-graphischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1 → 20:1) resultierten 1.3 mg des aromatischen Bausteins **147** (3.6 µmol) in einer Ausbeute von 28 %. Dieser wurde nach der Aufnahme eines ^{1}H-NMR-Spektrums direkt für die Tests zur HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung eingesetzt.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.08 – 6.95 (3H, m, 2x Ar-H, 9-H), 6.75 (1H, bs, Ar-H), 6.41 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-8), 6.00 (1H, dq, *J* = 14.8, 7.0 Hz, 10-H), 5.12 (2H, s, MOM-CH_2) 4.16 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 3.47 (3H, s, MOM-CH_3), 3.46 (2H, CH_2Br), 1.85 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 10-Me), 1.24 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3) ppm;
Rf (PE/EE = 100:1) = 0.12.

NEGISHI-Kupplungsprodukt 161



157 **161**

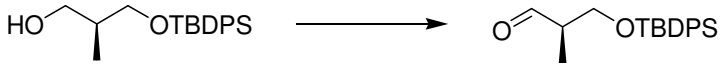
50 mg Zinkstaub (0.75 mmol; 1.875 Äq) wurden in 2 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon unter Argon gelöst und bei Raumtemperatur mit einem Krümel Iod versetzt. Die Suspension rührte bei 60 °C bis die Iodfärbung verschwunden war und wurde bei dieser Temperatur mit 155 mg *3-Brom-5-methoxymethyloxibenzylbromid* **157** (0.5 mmol; 1.25 Äq) in 2 mL THF gelöst versetzt und 1 Stunde bei 60 °C gerührt bis die Zinkinsertion abgeschlossen war. 225 mg Zinkbromid (1 mmol; 2.5 Äq) und eine Lösung aus 106 mg Vinyliodid **142** (0.4 mmol; 1 Äq) und 27 mg PEPPSI (0.04 mmol; 0.1 Äq) in 2 mL Tetrahydrofuran wurde bei 60 °C zugetropft. Die Reaktion war nach 2 Stunden abgeschlossen, wurde mit

Ammoniumchloridlösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1 → 20:1) resultierten 117 mg des aromatischen Bausteins **161** (0.32 mmol) in einer Ausbeute von 79 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.12 (1H, ddd, *J* = 15.0, 11.3, 1.7 Hz, 3-H), 6.95 (d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 6.68 (d, *J* = 1.7 Hz, Ar-H), 6.40 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, 4-H), 6.00 (1H, dq, *J* = 15.0, 7.1 Hz, 2-H), 4.18 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 3.83 (3H, s, Ar-OMe), 3.53 (2H, s, 6-H), 4.18 (3H, s, Ar-OMe), 1.86 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, 1-H), 1.25 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3), ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): 167.9 (s, 5-C), 167.0 (s, CO), 153.4 (2C, s, 7-C, 9-C), 144.6 (s, 10-C), 141.7 (d, 4-C), 138.3 (d, 2-C), 128.8 (d, 3-C), 124.1 (d, Ar-C), 117.3 (s, 11-C), 111.9 (d, Ar-C), 60.5 (q, OMe), 60.3 (t, CO_2Et-CH_2), 66.0 (q, OMe), 39.9 (t, 6-CH_2), 19.0 (q, 1-Me), 14.2 (q, CO_2Et-CH_3) ppm. **HRMS (EI)** für $C_{17}H_{21}O_4Br$ $[M]^+$: berechnet 368.0623, gefunden 368.0620; **Rf** (PE/EE = 10:1)= 0.11.

Testbausteine für HECK- und HARTWIG-BUCHWALD-Kupplungen

(*R*)-2-Methyl-3-*t*butyldiphenylsiloxypropanal 106



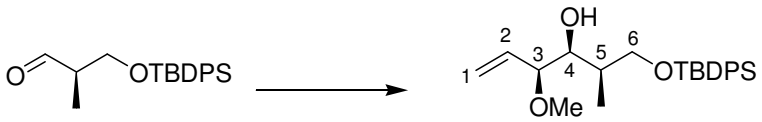
105 **106**

1.0 g *(S)-2-Methyl-3-tbutyldiphenylsiloxypropanol*[78] **105** (3.04 mmol; 1 Äq) wurden in 60 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 817 mg Natriumhydrogencarbonat (10.05 mmol; 3.3 Äq) und 1425 mg DESS-MARTIN-Periodinan (3.35 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 1 Stunde bei 0 °C. Da nach dieser Zeit die dünnschichtchromatographische Kontrolle keinen Fortschritt der Reaktion zeigte, es aber noch Edukt vorhanden war wurde jeweils eine Spatelspitze Natriumhydrogencarbonat und DESS-MARTIN-Periodinan zugegeben. Nach 30 Minuten war die Reaktion abgeschlossen und wurde mit einer Mischung aus 120 mL Natriumthiosulfatlösung und 120 mL

Natriumhydrogencarbonatlösung beendet und 15 Minuten stark gerührt. Anschließend wurde das Produkt mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 993 mg *(R)-2-Methyl-3-^{t}butyldiphenylsiloxypropanal* **106** (3.04 mmol; 1 Äq) in einer quantitativen Ausbeute. Die analytischen Daten stimmten mit denen der Literatur überein.[78]

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 9.79 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, 1-H), 7.66 – 7.63 (4H, m, TBDPS-H), 7.45 – 7.37 (6H, m, TBDPS-H), 3.93 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.3 Hz, 3-H_a), 3.87 (1H, dd, *J* = 6.5, 10.3 Hz, 3-H_b) 2.59 (1H, dddq, *J* = 1.6, 5.2, 6.5, 6.8 Hz, 2-H), 1.13 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 2-Me), 1.04 (9H, s, TBDPS-H) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C =204.5 (d, 1-C), 135.6 (d, TBDPS), 133.2 (s, TBDPS), 129.8 (d, TBDPS), 127.8 (d, TBDPS), 64.1 (t, 3-C), 48.8 (d, 2-C), 26.7 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.2 (s, ^{t}Bu-TBDPS), 10.3 (q, 2-Me) ppm. **Rf** (PE/EE = 4:1) = 0.50.

(*S*)-2-Methyl-(R)-3-hydroxy-(S)-4-methoxy-5-hexen-^{t}butyldiphenylsiloxan 108



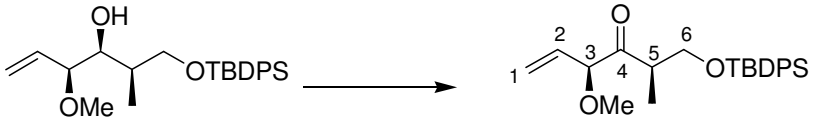
106 **108**

1.74 mL Allylmethylether (18.62 mmol; 2.04 Äq) wurden unter Argon in 7.5 mL Tetrahydrofuran gelöst, bei – 78 °C langsam mit 11.95 mL *sec*-Butyllithium-Lösung (c= 1.3 mol/L Cyclohexan; 15.51 mmol; 1.7 Äq) versetzt und 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. 4.90 g frisch hergestelltes (-)$(ipc)_2$BOMe[78] (15.51 mmol; 1.7 Äq) wurde in 14 mL Tetrahydrofuran gelöst und langsam zur Lithiumspezies getropft. Die Mischung rührte 1 Stunde bei –78 °C und wurde dann nacheinander mit 1.97 mL $BF_3 \cdot OEt_2$ (15.51 mmol; 1.7 Äq) und 2988 mg *(R)-2-Methyl-3-^{t}butyldiphenylsiloxypropanal* **106** (9.13 mmol; 1 Äq) gelöst in 11 mL Tetrahydrofuran versetzt. Die Mischung rührte 3 Stunden bei –78 °C und wurde dann über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert, das Rohprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (50:1) resultierten 2.34 g des

sauberen Produkts **108** (5.87 mmol) in einer Ausbeute von 64 %. Zusätzlich konnten 0.66 g eines Gemischs des Produkts mit dem unerwünschten Diastereomer in einer Ausbeute von 18 % isoliert werden.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.69 – 7.66 (4H, m, TBDPS-H), 7.44 – 7.36 (6H, m, TBDPS-H), 5.81 (1H, ddd, *J* = 17.5, 10.1, 7.4 Hz, 2-H), 5.30 (1H, ddd, *J* = 1.1, 1.9, 10.1 Hz, 1-H_a), 5.23 (1H, ddd, *J* = 1.1, 1.9, 17.5 Hz, 1-H_b), 3.71 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, 6-H_a), 3.69 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, 6-H_b) 3.63 (1H, dd, *J* = 7.4, 5.1 Hz, 3-H), 3.51 (1H, dd, *J* = 5.6, 5.1 Hz, 4-H), 3.29 (3H, s, 3-OMe), 2.08 – 1.98 (1H, m, 5-H), 1.58 (1H, bs, 4-OH), 1.05 (9H, s, ^{t}Bu-TBDPS-H), 0.96 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C =135.6 (d, TBDPS), 135.6 (d, 2-C), 133.3 (s, TBDPS), 129.7 (d, TBDPS), 127.7 (d, TBDPS), 118.8 (d, 1-C), 83.7 (d, 3-C), 77.5 (d, 4-C), 66.9 (t, 6-C), 56.5 (q, 3-OMe), 37.0 (d, 5-C), 26.8 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.1 (s, ^{t}Bu-TBDPS), 14.3 (q, 5-Me) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{24}H_{35}O_3Si$ $[M+H]^+$: berechnet 399.2355, gefunden 399.2355; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.15.

(S)-2-Methyl-3-carboxy-(S)-4-methoxy-5-hexen-^{t}butyldiphenylsiloxan 109



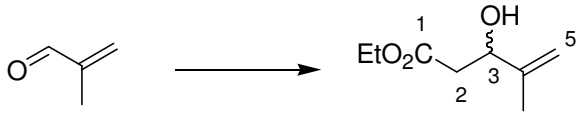
108 **109**

25 mg *(S)-2-Methyl-(R)-3-hydroxy-(S)-4-methoxy-5-hexen-^{t}butyldiphenylsiloxan* **108** (0.06 mmol; 1 Äq) wurden in 4 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 17 mg Natriumhydrogencarbonat (0.21 mmol; 3.3 Äq) und 30 mg DESS-MARTIN-Periodinan (0.07 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und rührte 2 Stunden. Da nach dieser Zeit Zersetzungserscheinungen auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar wurden, wurde mit einer Mischung aus 2 mL Natriumthiosulfatlösung und 2 mL Natriumhydrogencarbonat-Lösung hydrolysiert und 15 Minuten stark gerührt. Anschließend wurde das Produkt mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Petrolether-

Essigsäureethylester-Mischung (50:1 → 20:1) resultierten 16.5 mg *(S)-2-Methyl-3-carboxy-(S)-4-methoxy-5-hexen-^{t}butyldiphenylsiloxan* **109** (0.04 mmol) in einer Ausbeute von 69 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.70 – 7.60 (4H, m, TBDPS-H), 7.45 – 7.35 (6H, m, TBDPS-H), 5.73 (1H, ddd, J = 17.2, 7.0, 10.1 Hz, 2-H), 5.47 (1H, ddd, J = 1.2, 1.4, 17.2 Hz, 1-H_a), 5.38 (1H, ddd, J = 1.1, 1.4, 10.1 Hz, 1-H_b), 4.32 (1H, d, J = 7.0 Hz, 3-H), 3.83 (1H, dd, J = 9.7, 8.3 Hz, 6-H_a) 3.58 (1H, dd, J = 9.7, 5.5 Hz, 6-H_b), 3.36 (3H, s, 3-OMe), 3.17 (1H, ddq, J = 6.8, 5.5, 8.3 Hz, 5-H), 1.03 (9H, s, ^{t}Bu-TBDPS-H), 0.98 (3H, d, J = 6.8 Hz, 4-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 210.2 (s, 4-CO), 135.5 (d, TBDPS), 133.3 (s, TBDPS), 132.2 (d, 2-C), 129.7 (d, TBDPS), 127.7 (d, TBDPS), 120.7 (d, 1-C), 89.0 (d, 3-C), 77.5 (d, 4-C), 66.5 (t, 3-C), 57.0 (q, 3-OMe), 44.2 (d, 5-C), 26.8 (q, ^{t}Bu-TBDPS), 19.2 (s, ^{t}Bu-TBDPS), 13.1 (q, 5-Me) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{24}H_{32}O_3SiNa$ $[M+Na]^+$: berechnet 419.2018, gefunden 419.2019; **Rf** (PE/EE = 10:1) = 0.35.

3-Hydroxy-4-methyl-4-pentensäureethylester 151a



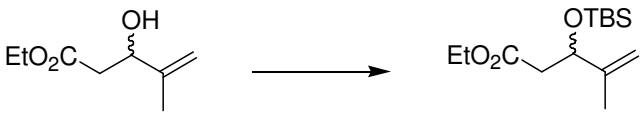
150 **151a**

2.1 mL frisch destilliertes Diisopropylamin (14.69 mmol; 1.2 Äq) wurden in 10.5 mL THF gelöst und bei 0 °C mit 6 mL *n*-Butyllithium-Lösung (c = 2.5 mol/L Hexan; 14.9 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Die Mischung rührte 15 Minuten bei 0 °C, wurde dann auf –60 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 1 mL Essigsäureethylester (12.14 mmol; 1 Äq) versetzt. Es wurde 30 Minuten bei –60 °C gerührt bevor 1 mL Methacrolein (12.14 mmol; 1 Äq) gelöst in 1 mL THF langsam zugetropft wurde. Dabei färbte sich die Lösung grün. Die Temperatur wurde auf –30 °C erhöht und die Mischung 50 Minuten bei dieser Temperatur gerührt bevor sie auf eine eisgekühlte Mischung aus Ammoniumchloridlösung und Essigsäureethylester gegossen wurde. Es wurde wenige Minuten gerührt und dann das Rohprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das gelbe Rohprodukt wurde destillativ bei einem Druck von 1 mbar gereinigt. Es resultierten 1.03 g *3-Hydroxy-4-methyl-4-pentensäure-ethylester* **151a** (7.92 mmol; 0.7 Äq) in Form einer klaren Flüssigkeit

und einer Ausbeute von 65 %. Das Isomerenverhältnis betrug 1:1. Die analytischen Daten stimmten mit der Literatur[142] überein.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.04 (1H, s, 5-H_a), 4.89 (1H, s, 5-H_b), 4.50 (1H, ddd, *J* = 8.1, 4.05, 4.05 Hz, 3-H), 4.21 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, Et-CH_2), 2.93 (1H, d, *J* = 4.05 Hz, OH), 2.60 (1H, d, *J* = 4.05 Hz, 2-Ha), 2.58 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, 2-Hb), 1.76 (3H, s, 4-CH_3), 1.30 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, Et-CH_3) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 172.6 (s, CO), 145.5 (s, 4-C), 111.5 (t, 5-C), 71.5 (d, 3-C), 60.8 (t, Et-CH_2), 40.0 (t, 2-C), 18.2 (q, 4-Me), 14.2 (q, Et-CH_3) ppm; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.42.

3-^{t}Butyldimethylsiloxy-4-methyl-4-pentensäureethylester 151



151a **151**

1.03 g *3-Hydroxy-4-methyl-4-pentensäure-ethylester* **151a** (7.92 mmol; 1 Äq) wurden in 12 mL Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit 1.31 g ^{t}Butyldimethylsilylchlorid (8.71 mmol; 1.1 Äq), 1.08 g Imidazol (15.84 mmol; 2 Äq) und 0.48 g DMAP (3.96 mmol; 0.5 Äq) versetzt. Die Lösung rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur bevor mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert wurde. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen nacheinander mit Ammoniumchloridlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 1.75 g *3-^{t}Butyldimethylsiloxy-4-methyl-4-pentensäureethylester* **151** (6.43 mmol) in Form eines milchigen Öls und einer Ausbeute von 81 %. Die analytischen Daten entsprachen denen der Literatur.[143]

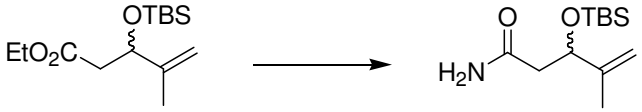
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 4.95 (1H, s, 5-H_a), 4.79 (1H, s, 5-H_b), 4.55 (1H, dd, *J* = 8.9, 4.4 Hz, 3-H), 4.12 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, Et-CH_2), 2.54 (1H, dd, *J* = 14.3, 8.9 Hz, 2-H_a), 2.41 (1H, dd, *J* = 14.3, 4.4 Hz, 2-H_b), 1.71 (3H, s, 4-CH_3), 1.26 (3H, t, *J* =

[142] R.Zibuck, J.M.Streiber, *J.Org.Chem.*, **1989**, 54, 19, 4717-4719.

[143] T.A.Mitchell, D.Romo, *J.Org.Chem.*, **2007**, *72*, 9053-9059.

7.2 Hz, Et-CH_3) 0.86 (9H, s, TBS-H) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 171.4 (s, CO), 146.6 (s, 4-C), 111.5 (t, 5-C), 73.8 (d, 3-C), 60.4 (t, Et-CH_2), 42.6 (t, 2-C), 25.7 (q, TBS-C), 18.1 (s, TBS-C), 16.9 (q, 4-Me), 14.2 (q, Et-CH_3), -4.8 (q, TBS-C), -5.4 (q, TBS-C) ppm; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.71.
Ionisierung für die Massenspektrometrie war weder mittels EI noch mittels ESI möglich.

3-^{t}Butyldimethylsiloxy-4-methyl-4-pentensäureamid 152



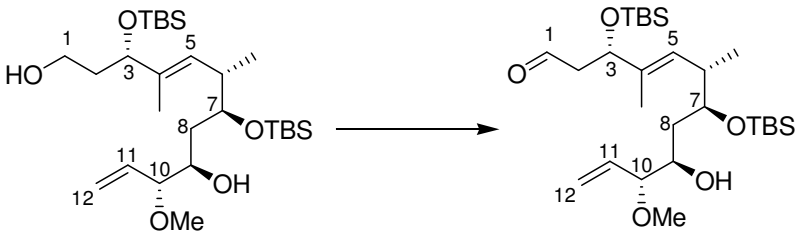
151 **152**

Zu einer Suspension aus 179 mg Ammoniumchlorid (3.34 mmol; 3.7 Äq) in 15 mL Toluol wurde bei 0 °C 1.7 mL Trimethylaluminiumlösung (c= 2 mol/L Toluol; 3.34 mmol; 3.7 Äq) getropft, die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend wieder auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 246 mg *3-^{t}Butyldimethylsiloxy-4-methyl-4-pentensäureethylester* **151** (0.90 mmol; 1 Äq) in 16 mL Toluol gelöst zugegeben. Die Mischung wurde auf 50 °C erwärmt und 16 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde auf 0 °C gekühlt, mit Essigsäureethylester versetzt und anschließend mit 10% iger Salzsäure in gesättigter Natriumchloridlösung. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen nacheinander mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Es resultierten 220 mg *3-^{t}Butyldimethylsiloxy-4-methyl-4-pentensäureamid* **152** (0.9 mmol) in quantitativer Ausbeute.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.08 (1H, bs, NH_a), 5.53 (1H, bs, NH_b), 5.02 (1H, s, 5-H_a), 4.85 (1H, s, 5-H_b), 4.45 (1H, dd, *J* = 5.3, 5.3 Hz, 3-H), 2.44 (2H, m, 2-H_{a+b}), 1.72 (3H, s, 4-CH_3), 0.90 (9H, s, TBS-H), 0.08 (3H, s, TBS-Me), 0.05 (3H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$ = 77.0 ppm): δ_C = 173.3 (s, CO), 145.9 (s, 4-C), 111.6 (t, 5-C), 73.2 (d, 3-C), 43.3 (t, 2-C), 25.8 (q, TBS-C), 18.1 (s, TBS-C), 18.3 (q, 4-Me), -4.9 (q, TBS-C), -5.4 (q, TBS-C) ppm. **HRMS (ESI)** für $C_{12}H_{26}NO_2Si$ $[M+H]^+$: berechnet 244.1733, gefunden 244.1727; **Rf** (PE/EE = 2:1) = 0.08.

Überführung der Ansa-Kette in das Amid

Aldehyd 163



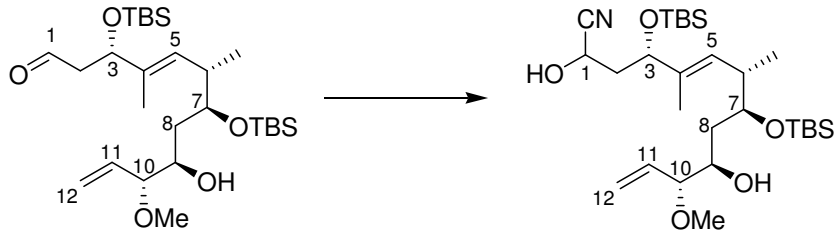
70 **163**

100 mg Diol **70** (0.2 mmol; 1 Äq) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 54 mg Natriumhydrogencarbonat (0.66 mmol; 3.3 Äq) und 94 mg DESS-MARTIN-Periodinan (0.22 mmol; 1.1 Äq) versetzt. Die Suspension rührte 1.5 Stunden bei Raumtemperatur und wurde dann mit einer Mischung aus Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Natriumthiosulfat-Lösung (1:1) hydrolysiert. Nach weiterem 1.5 stündigem Rühren wurde das Produkt mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach Filtrieren über Kieselgel mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (5:1) resultierten 99 mg Aldehyd **163** (0.2 mmol) in einer quantitativen Ausbeute.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 9.73 (1H, t, *J* = 2.7 Hz, 1-H), 5.63 (1H, ddd, *J* = 17.4, 10.2, 7.3 Hz, 11-H), 5.46 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 5-H), 5.34 (1H, dd, *J* = 10.2, 1.5 Hz, 12-H_a), 5.30 (1H, d, *J* = 17.4 Hz, 12-H_b), 4.48 (1H, dd, *J* = 7.9, 4.4 Hz, 3-H), 3.80 (1H, dd, *J* = 7.2, 4.9 Hz, 7-H), 3.62 (1H, ddd, *J* = 9.6, 7.3, 2.5 Hz, 9-H), 3.34 (1H, dd, *J* = 7.3, 7.3 Hz, 10-H), 3.31 (3H, s, 10-OMe), 2.73 (1H, bs, 9-OH), 2.68 – 2.60 (1H, m, 6-H), 2.61 (1H, ddd, *J* = 15.2, 7.9, 2.7 Hz, 2-H_a), 2.42 (1H, ddd, *J* = 15.2, 4.4, 2.7 Hz, 2-H_b), 1.68 (1H, ddd, *J* = 14.4, 7.2, 2.5 Hz, 8-H_a), 1.63 (3H, s, 4-Me), 1.51 (1H, ddd, *J* = 14.4, 9.6, 4.9 Hz, 8-H_b), 0.88 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.86 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.84 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 6-Me), 0.06 (6H, s, TBS-Me), 0.04 (3H, s, TBS-Me), 0.02 (3H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 202.2 (d, CO), 135.3 (s, 4-C), 134.9 (d, 11-C), 129.3 (d, 5-C), 120.1 (t, 12-C), 86.9 (d, 10-C), 73.7 (d, 7-C), 73.5 (d, 3-C), 71.0 (d, 9-C), 56.5 (q, 10-OMe), 50.3 (t, 2-C), 36.9 (t, 8-C), 36.4 (d, 6-C), 25.9 (q, TBS-^{t}Bu), 25.7 (q, TBS-^{t}Bu), 18.1 (s, TBS-^{t}Bu), 15.1 (q, 6-Me), 12.2 (q, 4-Me), -4.2 (q, TBS-Me), -4.4 (q, TBS-Me), -4.5 (q,

TBS-Me), -5.2 (q, TBS-Me) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{55}O_5Si_2$ $[M+H]^+$: berechnet 515.3588, gefunden 515.3592; **Rf** (PE/EE = 10:1)= 0.11.

Cyanhydrin 164



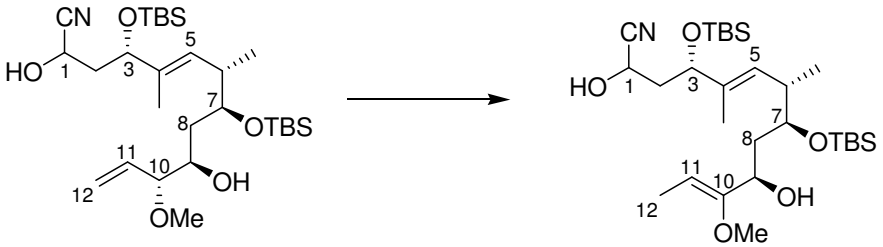
163 **164**

100 mg Aldehyd **163** (0.2 mmol; 1 Äq) wurden in 2 mL Dichlormethan gelöst und mit 40 µL Aceton-Cyanhydrin (0.4 mmol; 2 Äq) und 6 µL Triethylamin (0.04 mmol; 0.2 Äq) versetzt. Die Lösung rührte 20 Stunden bei Raumtemperatur bevor sie im Vakuum konzentriert und anschließend chromatographisch über Kieselgel mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (5:1) gereinigt wurde. Es resultierten 93 mg Cyanhydrin **164** (0.17 mmol) in einer Ausbeute von 86 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.69 – 5.58 (1H, m, 11-H), 5.48 (1H, pt, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 5.36 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, 12-H_a), 5.30 (1H, d, *J* = 15.7 Hz, 12-H_b), 4.69 – 4.62 (1H, m, 3-H), 4.48 (0.6 H, dd, *J* = 8.0, 2.9 Hz, 1-H, Diastereomer 1), 4.22 (0.4 H, pt, *J* = 4.2 Hz, 1-H, Diastereomer 2), 3.83 – 3.63 (2H, m, 7-H, 9-H), 3.35 (1H, dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 10-H), 3.35 (3H, s, 10-OMe), 2.85 (2H, bs, 9-OH, 1-OH), 2.73– 2.65 (1H, m, 6-H), 2.22 – 1.89 (2H, m, 2-H_a, 2-H_b), 1.69 (1H, ddd, *J* = 14.3, 7.1, 1.6 Hz, 8-H_a), 1.60 (3H, s, 4-Me), 1.54 (1H, ddd, *J* = 14.3, 10.0, 5.2 Hz, 8-H_b), 0.92 – 0.87 (22H, m, ^{t}Bu-TBS, 6-Me), 0.11 - 0.03 (12H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 134.8 (s, 4-C), 134.7, 134.2 (d, 11-C), 130.4, 129.2 (d, 5-C), 120.3, 120.1 (s, CN-C), 120.3, 119.6 (d, 12-C), 86.9 (d, 10-C), 76.2, 74.5 (d, 1-C), 74.1, 73.7 (d, 7-C), 70.8, 70.4 (d, 9-C), 59.9, 58.3 (d, 3-C), 56.5 (q, 10-OMe), 41.4, 39.4 (t, 2-C), 36.9, 36.7 (t, 8-C), 36.9, 36.8 (d, 6-C), 25.9 (q, TBS-^{t}Bu), 25.8 (q, TBS-^{t}Bu), 18.1 (s, TBS-^{t}Bu), 18.0 (s, TBS-^{t}Bu), 16.4, 15.4 (q, 6-Me), 13.0, 12.6 (q, 4-Me), -4.1 (q, TBS-Me), -4.3 (q, TBS-Me), -4.5 (q, TBS-Me), -5.3 (q, TBS-Me) ppm; **t_R (UPLC)** = 3.08 min; **HRMS (ESI)** für $C_{28}H_{55}NO_5Si_2Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 564.3517, gefunden 564.3490; **Rf** (PE/EE = 5:1)= 0.12.

Im Kohlenstoffspektrum sind aufgrund des Diastereomerengemischs teilweise zwei Signale angegeben.

Cyanhydrin 164a



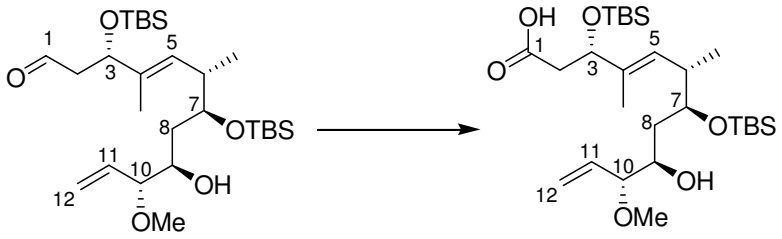
164 **164a**

11 µL Oxalylchlorid (0.12 mmol; 1.2 Äq) wurden in 1 mL Dichlormethan gelöst, auf –78 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 29 µL Dimethylsulfoxid (0.4 mmol; 4 Äq) versetzt. Nach 15 minütigem Rühren wurde eine Lösung aus 54 mg Cyanhydrin **164** (0.1 mmol; 1 Äq) in 1 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Es wurde 30 Minuten bei –78 °C gerührt, dann auf –25 °C erwärmt, 30 Minuten gerührt und wieder auf –78 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 71 µL Triethylamin (0.5 mmol; 5 Äq) zugegeben und die Mischung langsam auf –40 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurde mit Methanol hydrolysiert und langsam, innerhalb von 16 Stunden, auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Hydrolyse mit Wasser wurde das Rohprodukt mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Nach chromatographischer Reinigung über Kieselgel mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1 → 5:1) resultierten 41.9 mg Cyanhydrin **164a** (0.078 mmol) in einer Ausbeute von 78 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.29 (1H, q, *J* = 7.2 Hz, 11-H), 5.45 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 4.68 – 4.60 (1H, m, 3-H), 4.48 (1H, dd, *J* = 7.9, 2.7 Hz, 1-H), 4.26 – 4.10 (2H, m, 7-H, 9-H), 3.65 (3H, s, 10-OMe), 2.88 – 2.77 (1H, m, 2-H_a), 2.66 – 1.52 (2H, m, 6-H, 2-H_b), 2.18 – 2.04 (1H, m, 8-H_a), 1.99 – 1.89 (1H, m, 8-H_b), 1.83 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.62 (3H, s, 4-Me), 0.92 – 0.84 (22H, m, ^{t}Bu-TBS, 6-Me), 0.08 - 0.02 (12H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 155.4 (s, 10-C), 136.4 (s, 4-C), 129.2 (d, 5-C), 124.8 (d, 11-C), 119.6 (s, CN-C), 76.5 (d, 1-C), 72.5 (2C, d, 7-C, 9-C), 59.9 (d, 3-C), 59.6 (q, 10-OMe), 42.7 (t, 2-C), 39.4 (t, 8-C), 38.4 (6-C), 25.6 (q, TBS-^{t}Bu), 18.0 (s,

TBS-^{t}Bu), 16.1 (q, 6-Me), 12.8 (q, 4-Me), 12.1 (q, 12-Me), -3.6 (q, TBS-Me), -4.5 (q, TBS-Me) ppm; **t_R (UPLC)** = 3.23 min; **HRMS (ESI)** für $C_{28}H_{53}NO_5Si_2Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 562.3360, gefunden 562.3356; **Rf** (PE/EE = 5:1)= 0.24.

Säure 166



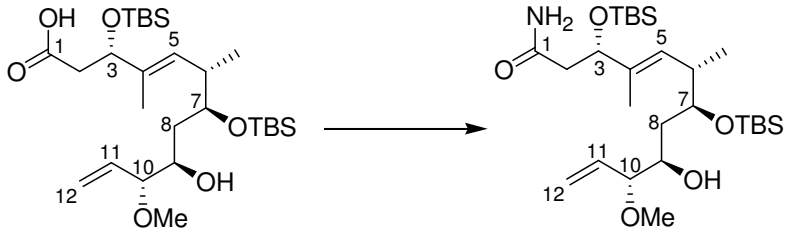
163 **166**

106 mg Aldehyd **163** (0.2 mmol; 1 Äq) wurden in 5 mL ^{t}Butanol gelöst und mit 2.5 mL 2-Methyl-2-buten versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit einer Mischung aus 210 mg Natriumchlorit (w = 80 %; 1.9 mmol; 9 Äq) und 283 mg Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (2.1 mmol; 10 Äq) gelöst in 0.5 mL Wasser versetzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und rührte eine Stunde. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Phosphatpuffer abgebrochen, das Produkt mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtiert und im Vakuum konzentriert. Chromatographische Reinigung über Kieselgel mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (5:1) ergab 82 mg Säure **166** (0.15 mmol) in einer Ausbeute von 77 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 5.65 (1H, ddd, *J* = 17.2, 10.1, 7.7 Hz, 11-H), 5.44 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, 5-H), 5.34 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, 12-H_a), 5.30 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, 12-H_b), 4.44 (1H, dd, *J* = 7.7, 4.6 Hz, 3-H), 3.79 (1H, dd, *J* = 7.1, 5.0 Hz, 7-H), 3.65 (1H, ddd, *J* = 9.6, 6.9, 2.7 Hz, 9-H), 3.35 (1H, dd, *J* = 6.9, 7.7 Hz, 10-H), 3.31 (3H, s, 10-OMe), 2.68 – 2.60 (1H, m, 6-H), 2.56 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.7 Hz, 2-H_a), 2.47 (1H, dd, *J* = 14.7, 4.6 Hz, 2-H_b), 1.67 (1H, ddd, *J* = 14.3, 7.1, 2.7 Hz, 8-H_a), 1.62 (3H, s, 4-Me), 1.53 (1H, ddd, *J* = 14.3, 9.6, 5.0 Hz, 8-H_b), 0.89 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.88 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.84 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, 6-Me), 0.06 (9H, s, TBS-Me), 0.03 (3H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 175.2 (d, CO), 134.9 (s, 4-C), 134.8 (d, 11-C), 129.6 (d, 5-C), 120.0 (t, 12-C), 86.9 (d, 10-C), 74.7 (d, 3-C), 73.8 (d, 7-C), 70.9 (d, 9-C), 56.5 (q, 10-

OMe), 42.0 (t, 2-C), 37.0 (t, 8-C), 36.6 (d, 6-C), 25.9 (q, TBS-^{t}Bu), 25.7 (q, TBS-^{t}Bu), 18.1 (s, TBS-^{t}Bu), 15.3 (q, 6-Me), 12.0 (q, 4-Me), -4.2 (q, TBS-Me), -4.4 (q, TBS-Me), -4.5 (q, TBS-Me), -5.4 (q, TBS-Me) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{53}O_6Si_2$ $[M-H]^-$: berechnet 529.3381, gefunden 529.3363; **Rf** (PE/EE = 3:1)= 0.26.

Amid 148



166 **148**

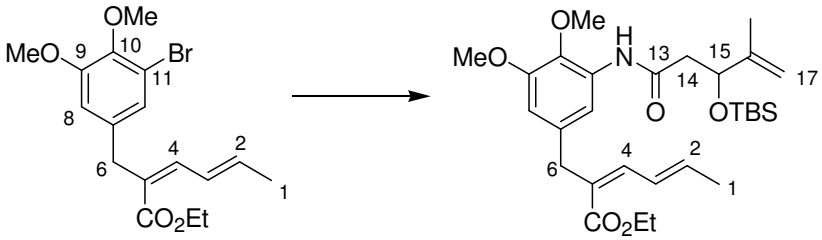
64 mg Säure **166** (0.12 mmol; 1 Äq) wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und auf –20 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde die Lösung mit 35 µL Triethylamin (0.25 mmol; 2.1 Äq) und anschließend mit 14 µL Chlorameisensäureethylester (0.15 mmol; 1.2 Äq) versetzt. Es wurde 40 Minuten bei –20 °C gerührt und anschließend ca. 5 Minuten Ammoniakgas durch die Lösung geleitet. Nach Hydrolyse mit Wasser wurde mit Diethylether extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (2:1 → 1:1) ergab 49 mg Amid **148** (0.09 mmol) in einer Ausbeute von 77 %.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 6.06 (1H, bs, NH), 5.66 (1H, ddd, *J* = 17.3, 10.5, 7.4 Hz, 11-H), 5.54 (1H, bs, NH), 5.47 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, 5-H), 5.33 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, 12-H_a), 5.29 (1H, d, *J* = 17.3 Hz, 12-H_b), 4.36 (1H, dd, *J* = 6.8, 4.1 Hz, 3-H), 3.77 (1H, ddd, *J* = 5.5, 5.2, 6.6 Hz, 7-H), 3.66 (1H, ddd, *J* = 9.5, 7.0, 2.5 Hz, 9-H), 3.36 (1H, dd, *J* = 7.5, 7.4 Hz, 10-H), 3.30 (3H, s, 10-OMe), 2.92 (1H, bs, OH), 2.69 – 2.60 (1H, m, 6-H), 2.49 – 2.34 (2H, m, 2-H_a, 2-H_b), 1.68 (1H, ddd, *J* = 14.3, 6.6, 2.5 Hz, 8-H_a), 1.60 (3H, s, 4-Me), 1.52 (1H, ddd, *J* = 14.3, 9.5, 5.2 Hz, 8-H_b), 0.89 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.88 (9H, s, ^{t}Bu-TBS), 0.85 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 6-Me), 0.06 (9H, s, TBS-Me), 0.03 (3H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 173.8 (d, CO), 135.1 (s, 4-C), 135.0 (d, 11-C), 12.9 (d, 5-C), 119.9 (t, 12-C), 86.8 (d, 10-C), 74.4 (d, 3-C), 74.1 (d, 7-C), 70.8 (d,

9-C), 56.5 (q, 10-OMe), 43.7 (t, 2-C), 36.9 (t, 8-C), 36.9 (d, 6-C), 25.9 (q, TBS-^{t}Bu), 25.8 (q, TBS-^{t}Bu), 18.0 (s, TBS-^{t}Bu), 15.8 (q, 6-Me), 12.8 (q, 4-Me), -4.2 (q, TBS-Me), -4.3 (q, TBS-Me), -4.6 (q, TBS-Me), -5.3 (q, TBS-Me) ppm; **HRMS (ESI)** für $C_{27}H_{55}NO_5Si_2Na$ $[M+Na]^+$: berechnet 552.3517, gefunden 552.3492; **Rf** (PE/EE = 1:1)= 0.15.

Test für die HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung

Amid 167



162 **167**

7.4 mg Phenylbromid **162** (0.02 mmol; 1 Äq) wurden mit 7.3 mg Amid **152** (0.03 mmol; 1.5 Äq) in 0.5 mL Toluol gelöst und mit 5.5 mg Kaliumcarbonat (0.04 mmol; 2 Äq), 1 mg CuI (5.3 µmol; 0.26 Äq) und einem Tropfen *N,N*-Dimethylaminoethandiamin versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde fest verschlossen und die blaue Mischung bei 110 °C 40 Stunden gerührt. Die braune Suspension wurde ohne Aufarbeitung direkt auf eine Kieselgelsäule aufgebracht, die mit einer Petrolether-Essigsäureethylester-Mischung (10:1) konditioniert war. Nach chromatographischer Reinigung konnten 5.8 mg Amid **167** (0.01 mmol) in einer Ausbeute von 55 % isoliert werden.

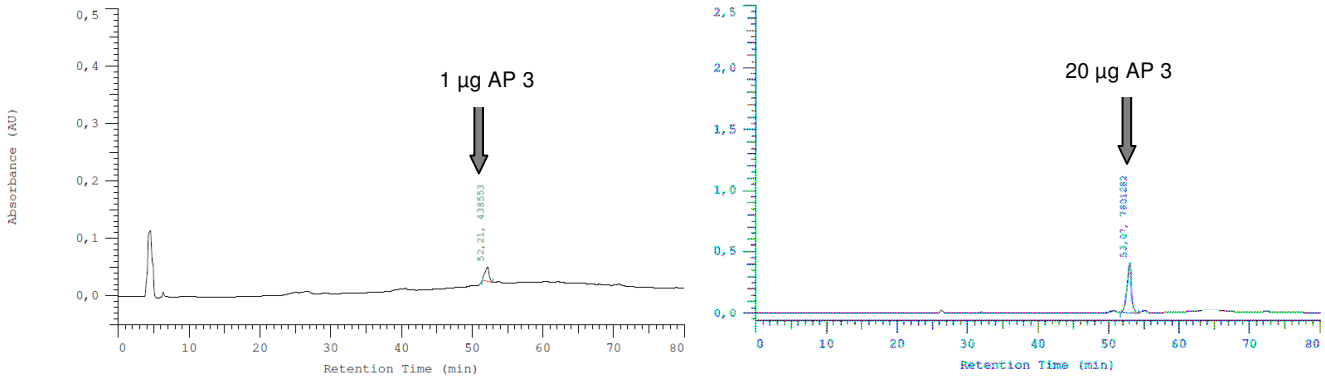
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, $CHCl_3$= 7.26 ppm): δ_H = 7.67 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, 12-H), 7.36 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, 8-H), 7.10 (1H, dd, *J* = 14.7, 11.1 Hz, 3-H), 6.37 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, 4-H), 5.94 (1H, dq, *J* = 14.7, 7.0 Hz, 2-H), 5.09 (1H, bs, 17-H_a), 4.86 (1H, bs, 17-H_b), 4.57 – 4.51 (1H, m, 15-H), 4.18 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_2), 3.82 (6H, s, 9-OMe, 10-OMe), 3.56 (2H, s, 6-H), 2.67 – 2.54 (2H, m, 14-H), 1.83 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 1-H), 1.75 (3H, s, 16-Me), 1.25 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CO_2Et-CH_3), 0.87 (9H, s, TBS-^{t}Bu), 0.07 (3H, s, TBS-Me), 0.05 (3H, s, TBS-Me) ppm; **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz, $CDCl_3$= 77.00 ppm): δ_C = 169.0 (s, Amid-CO), 167.3 (s, CO_2Et-CO), 151.3 (s, 10-C), 145.8 (s, 16-C), 141.2 (d, 4-C), 137.5 (d, 2-C), 135.9 (s, 9-C), 135.5 (d, 12-C), 132.4 (s, 7-C), 130.1 (s, 11-C), 128.9 (d, 3-C), 127.9 (d,

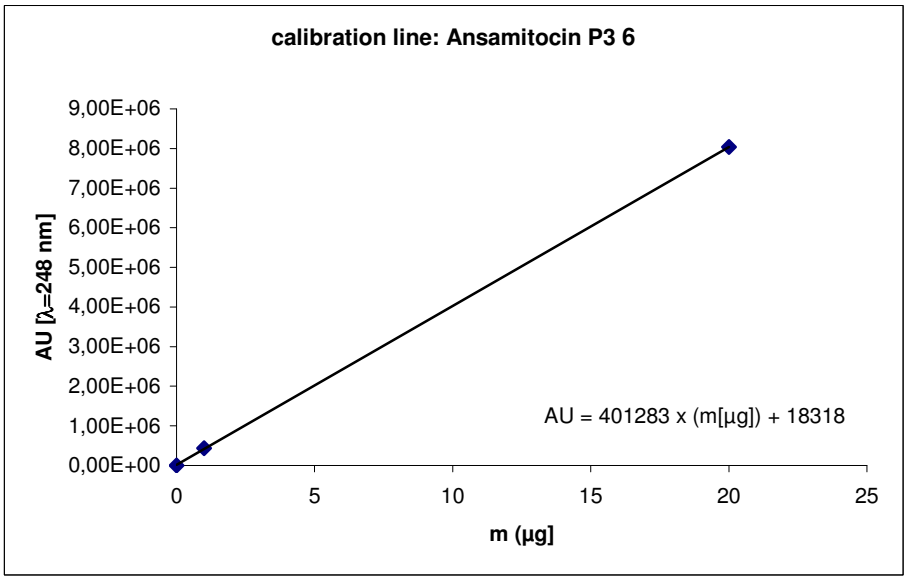
8-C), 111.7 (17-C), 73.5 (d, 15-C), 60.7 (q, OMe), 60.2 (t, CO_2Et-CH_2), 55.8 (q, OMe), 45.6 (t, 14-C), 40.4 (t, 6-C), 25.8 (q, TBS), 18.6 (q, 1-Me), 18.3 (q, 16-Me), 18.2 (s, TBS), 14.2 (q, CO_2Et-CH_3), -4.9 (q, TBS-Me), -5.3 (q, TBS-Me) ppm; **t_R (UPLC)** = 3.18 min; **HRMS (ESI)** für $C_{29}H_{46}NO_6Si$ $[M+H]^+$: berechnet 532.3094, gefunden 532.3077; **Rf** (PE/EE = 5:1) = 0.16.

Das Signal des quartären Kohlenstoffatoms 5-C konnte nicht zugeordnet werden.

6. ANHANG

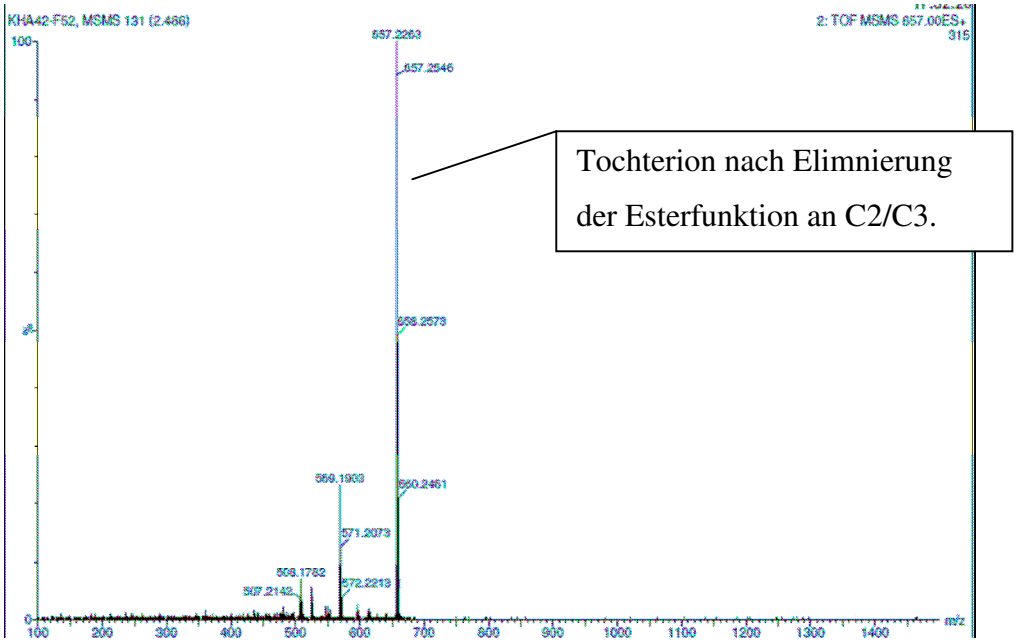
6.1 Verfütterungsexperimente mit seco-Proansamitocinen **66** und **67**





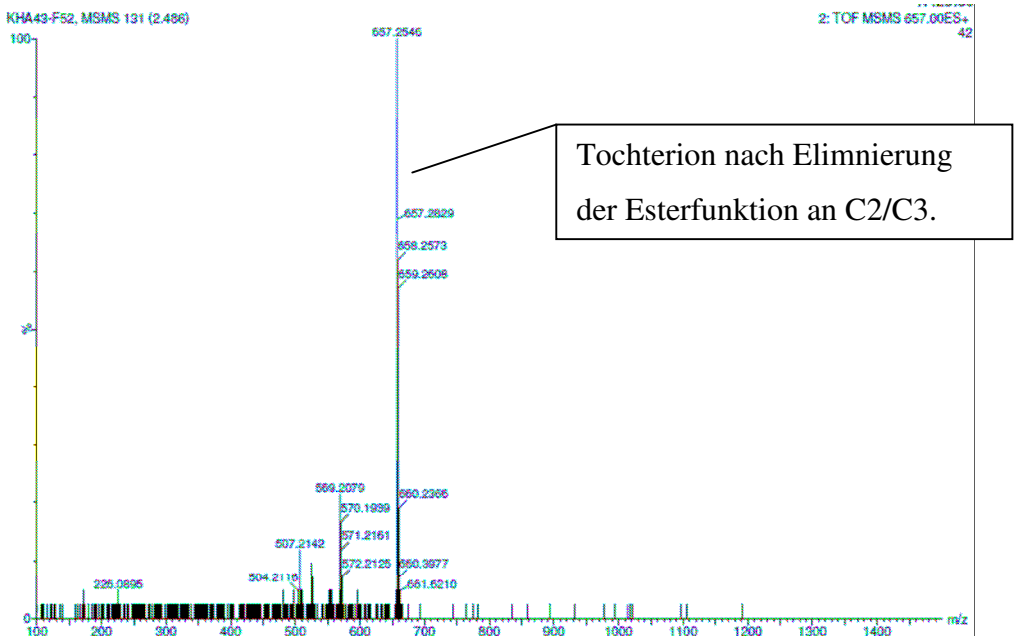
Die Chromatogramme der Fermentationsextrakte nach der Verfütterung von 66 und 67 sind in Kapitel 3.4.3 auf Seite 53 dargestellt.

Zufütterung seco-Proansamitocin-SNAC-ester 67



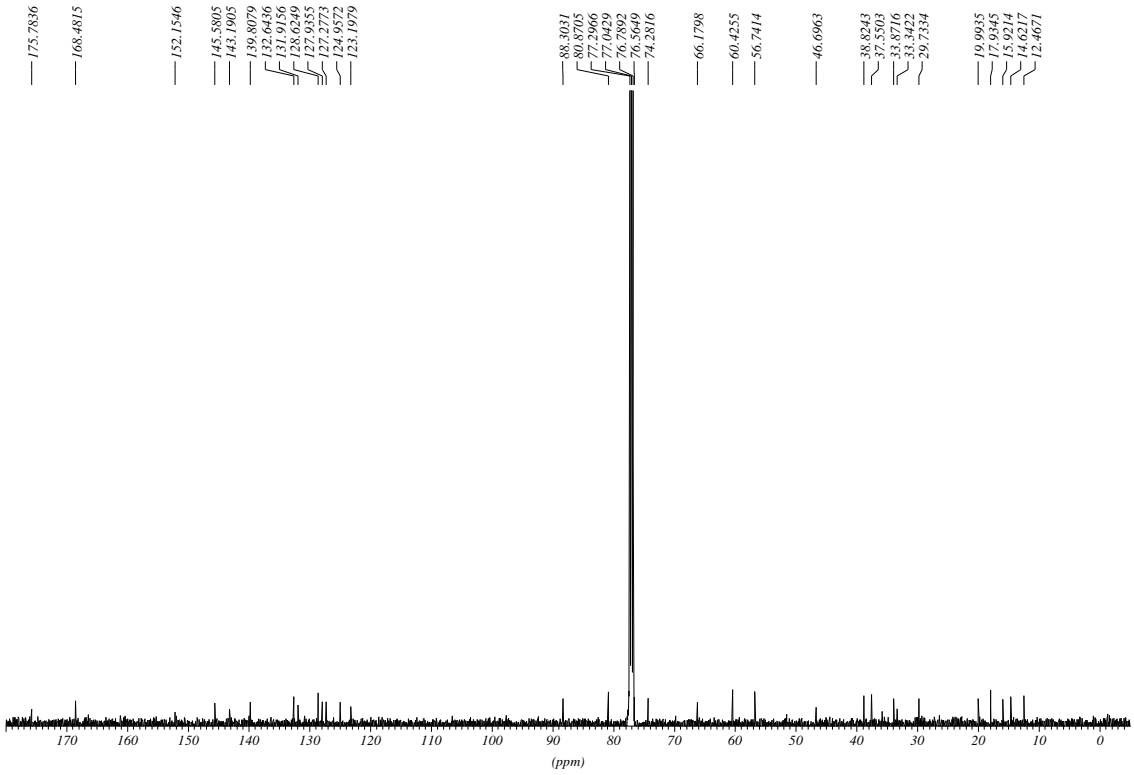
HRMS (ESI)für $C_{32}H_{43}N_2O_9ClNa$ $[M+Na]^+$, berechnet 657.2555, gefunden 657.2543.

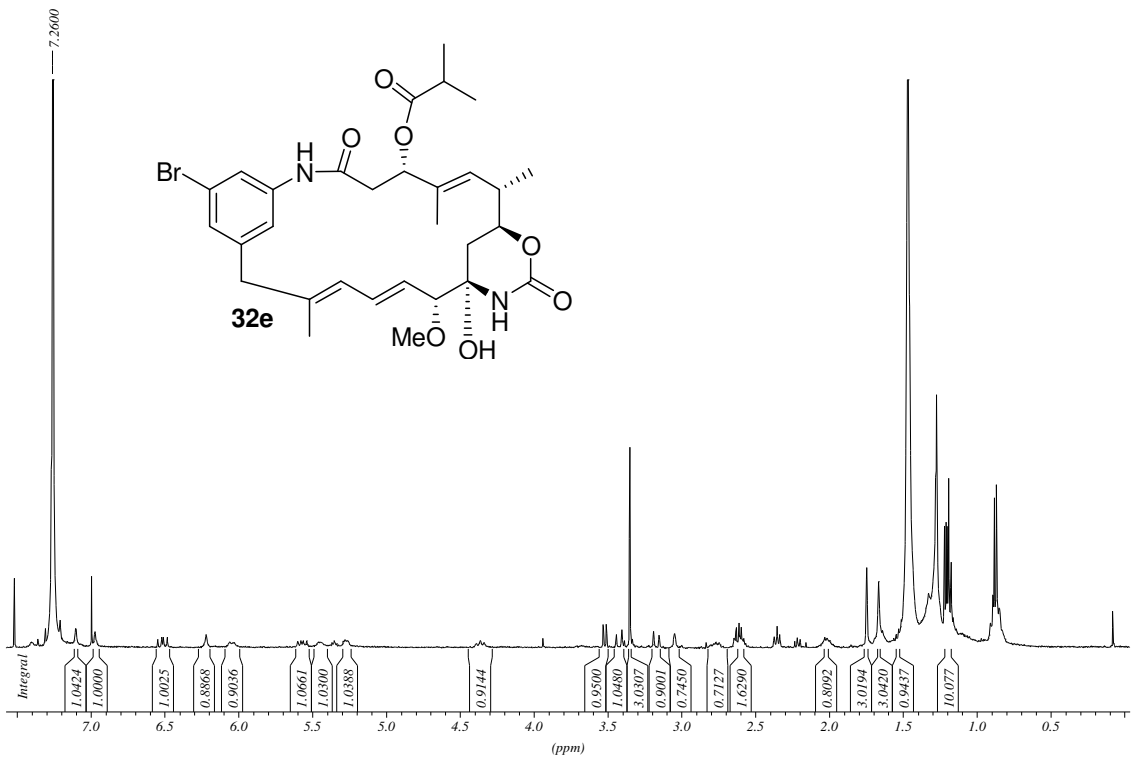
Supplementation with seco-Proansamitocin 2c

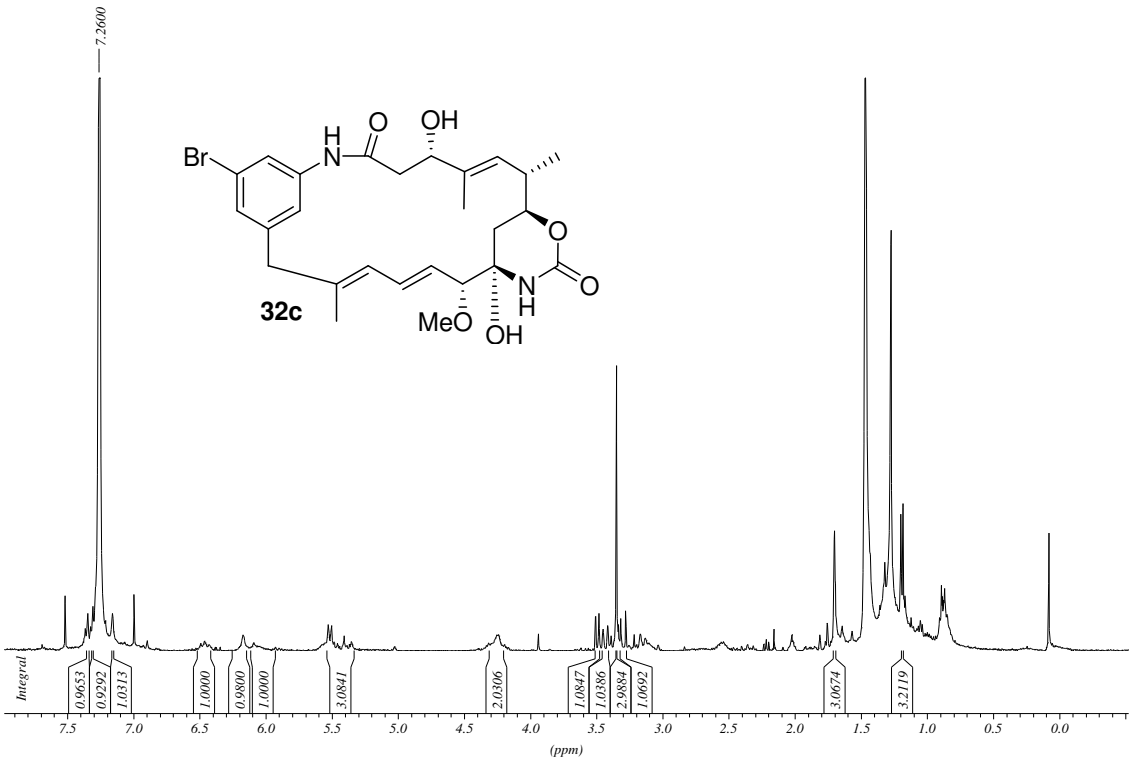


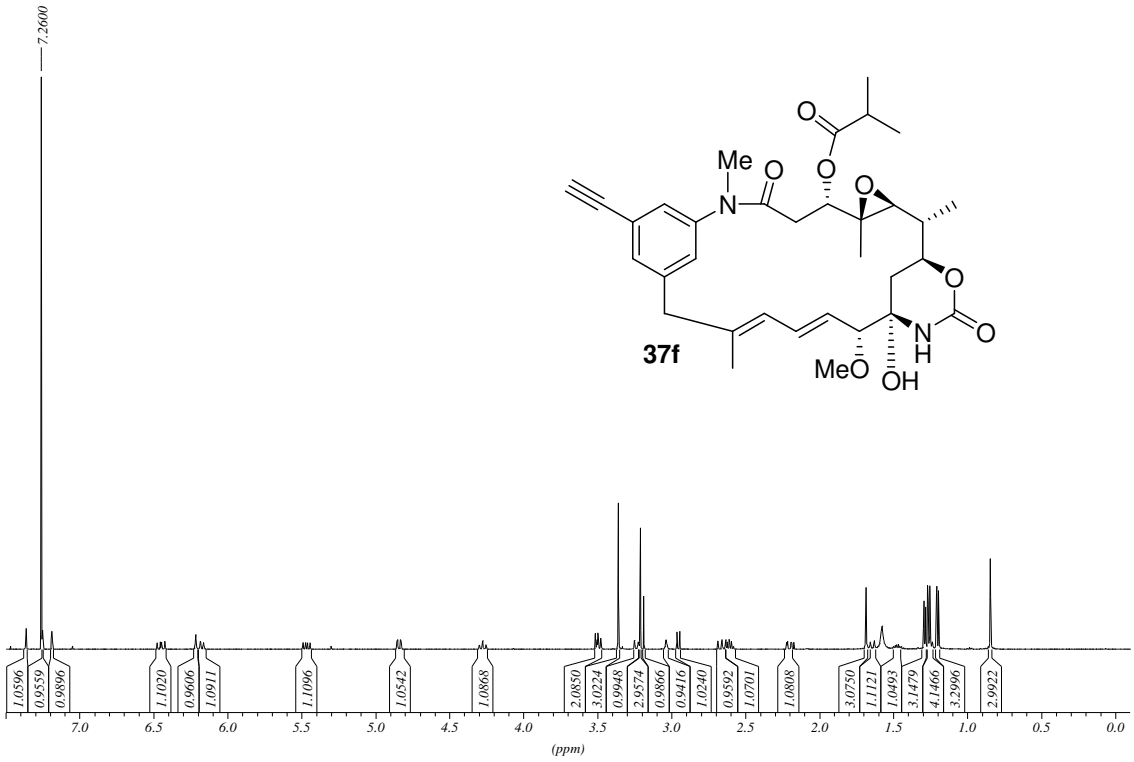
HRMS (ESI)für $C_{32}H_{43}N_2O_9ClNa$ $[M+Na]^+$, berechnet 657.2555, gefunden 657.2524.

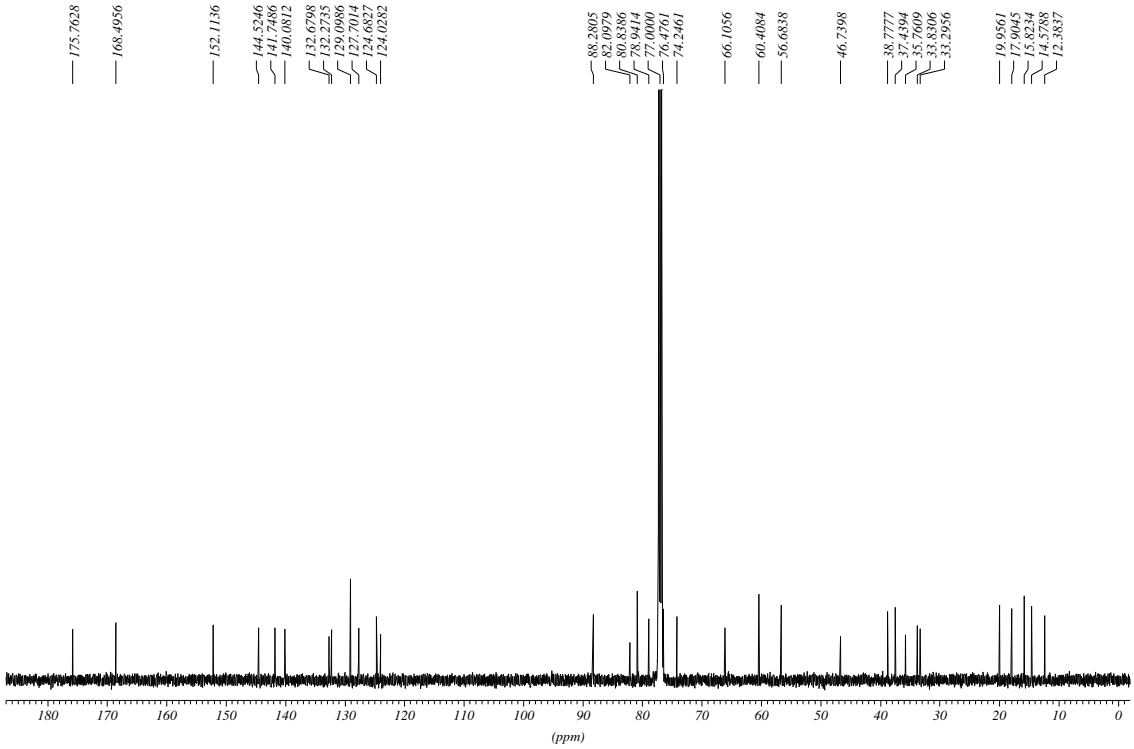
6.2 NMR-SPEKTREN

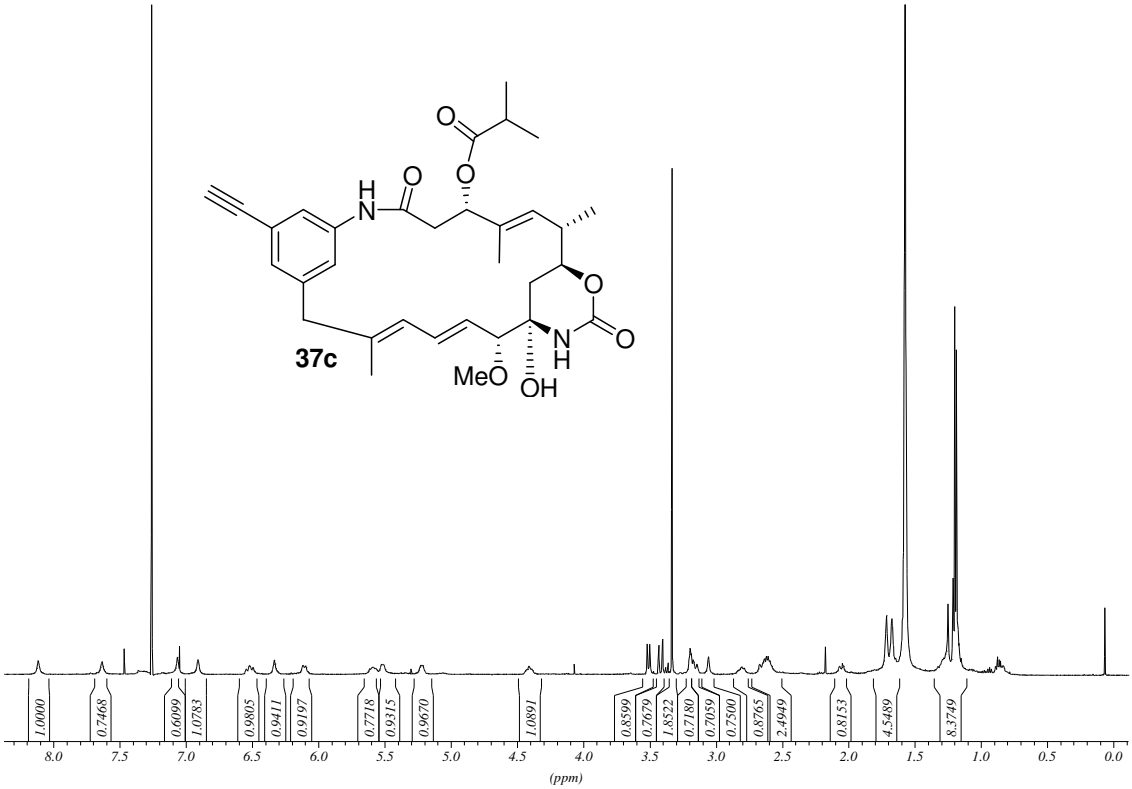


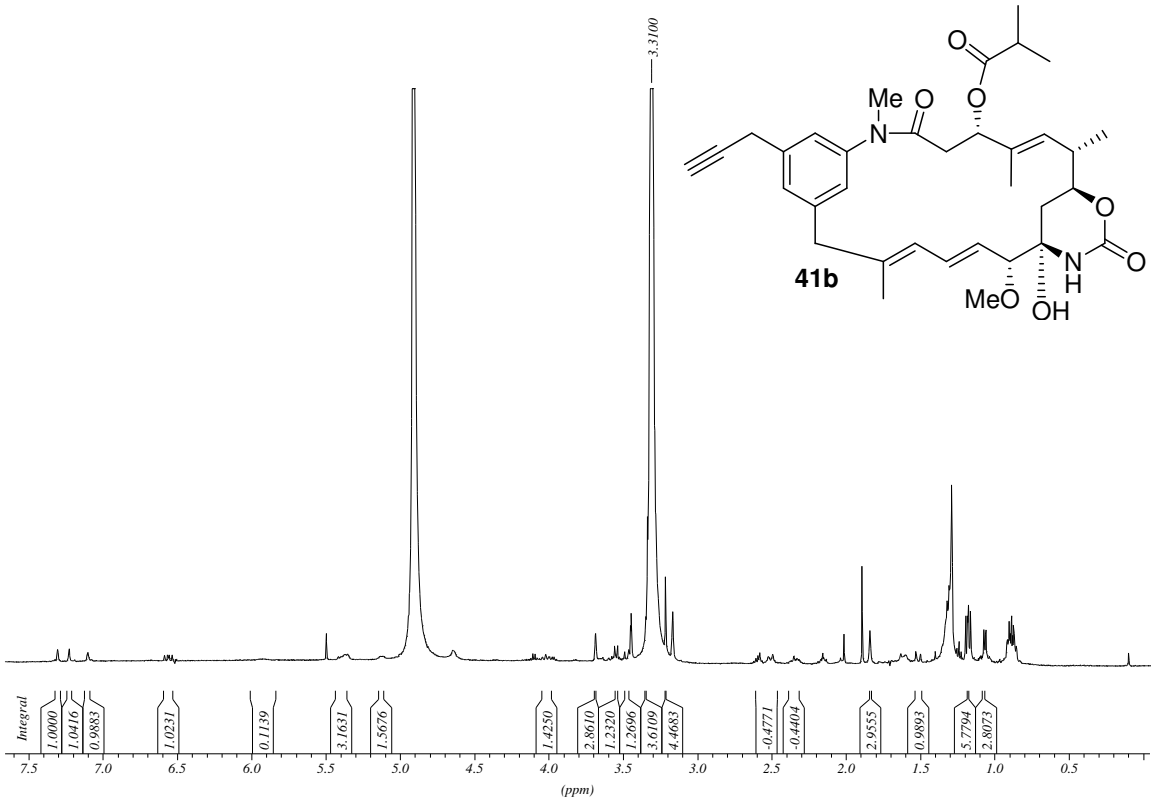

7.2600
Br
H
N
O
O
O
O
N
H
O
MeO
OH
32e
Integral
1.0424
1.0000
1.0025
0.8868
0.9036
1.0661
1.0300
1.0388
0.9144
0.9500
1.0480
3.0307
0.9001
0.7450
0.7127
1.6290
0.8092
3.0194
3.0420
0.9437
10.077
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
(ppm)

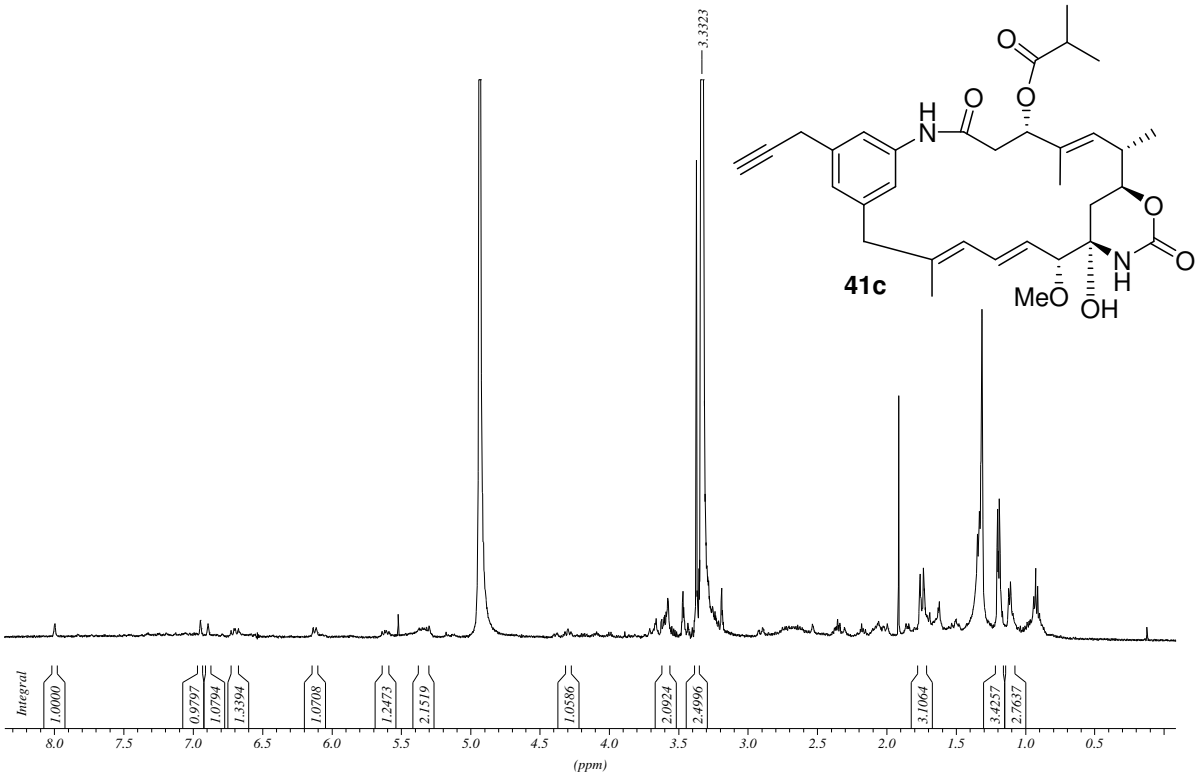

7.2600
Br
H
N
O
OH
O
O
N
H
O
MeO
OH
32c
Integral
0.9653
0.9292
1.0313
1.0000
0.9800
1.0000
3.0841
2.0306
1.0847
1.0386
2.9884
1.0692
3.0674
3.2119
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

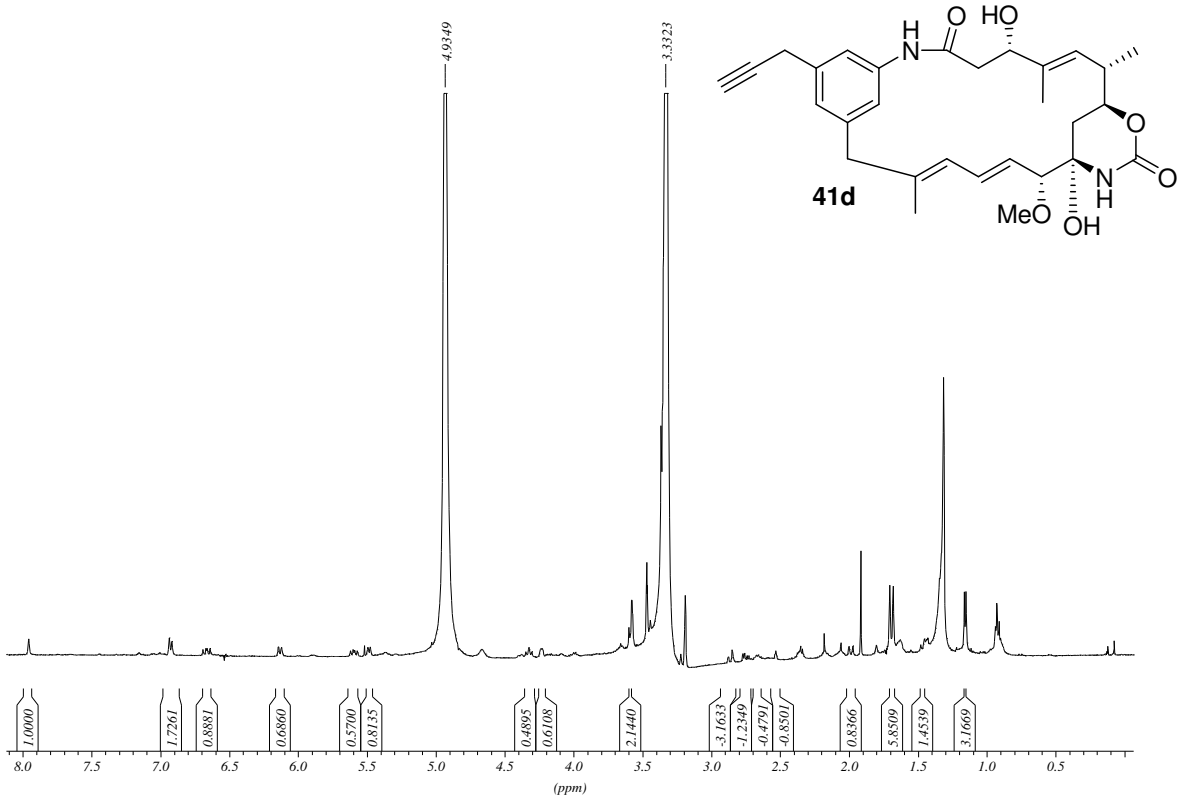

7.2600
Me
N
O
O
O
O
O
O
N
H
MeO
OH
37f
1.0596
0.9559
0.9896
1.1020
0.9606
1.0911
1.1096
1.0542
1.0868
2.0850
3.0224
0.9948
2.9574
0.9866
0.9416
1.0240
0.9592
1.0701
1.0808
3.0750
1.1121
1.0493
3.1479
4.1466
3.2996
2.9922
(ppm)

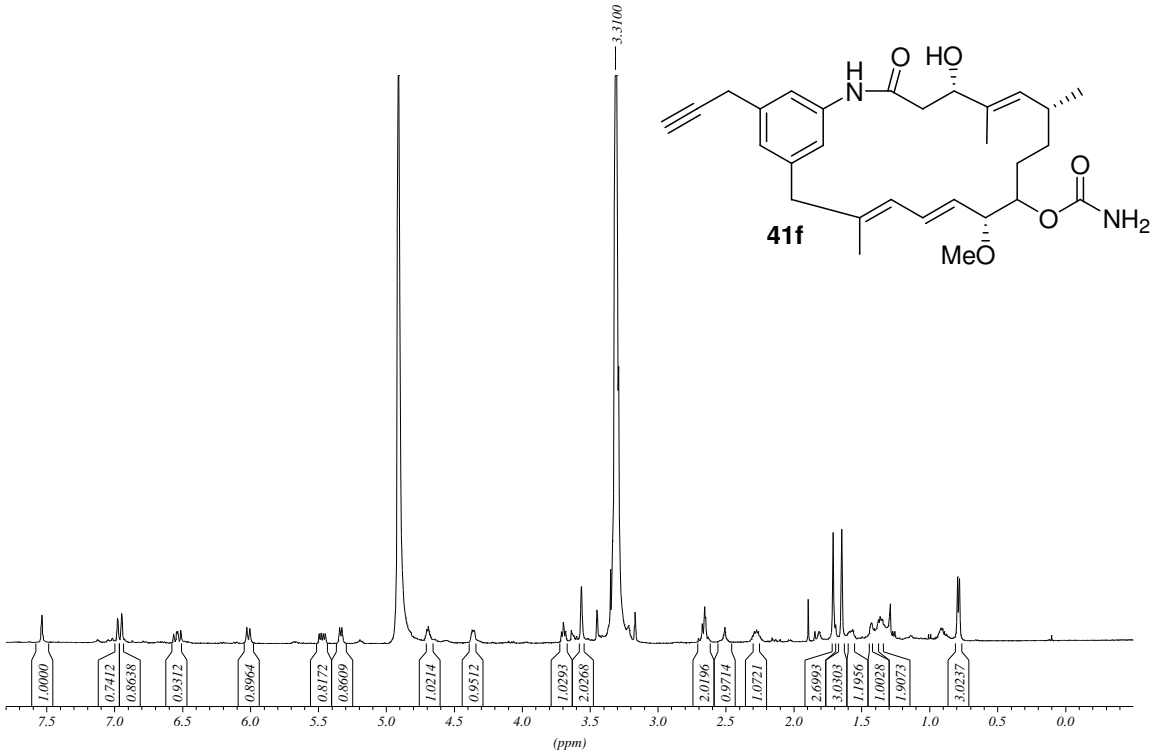

175.7628
168.4956
152.1136
144.5246
141.7486
140.0812
132.6798
132.2735
129.0986
127.7014
124.6827
124.0282
88.2805
82.0979
80.8386
78.9414
77.0000
76.4761
74.2461
66.1056
60.4084
56.6838
46.7398
38.7777
37.4394
35.7609
33.8306
33.2956
19.9561
17.9045
15.8234
14.5788
12.3837
(ppm)

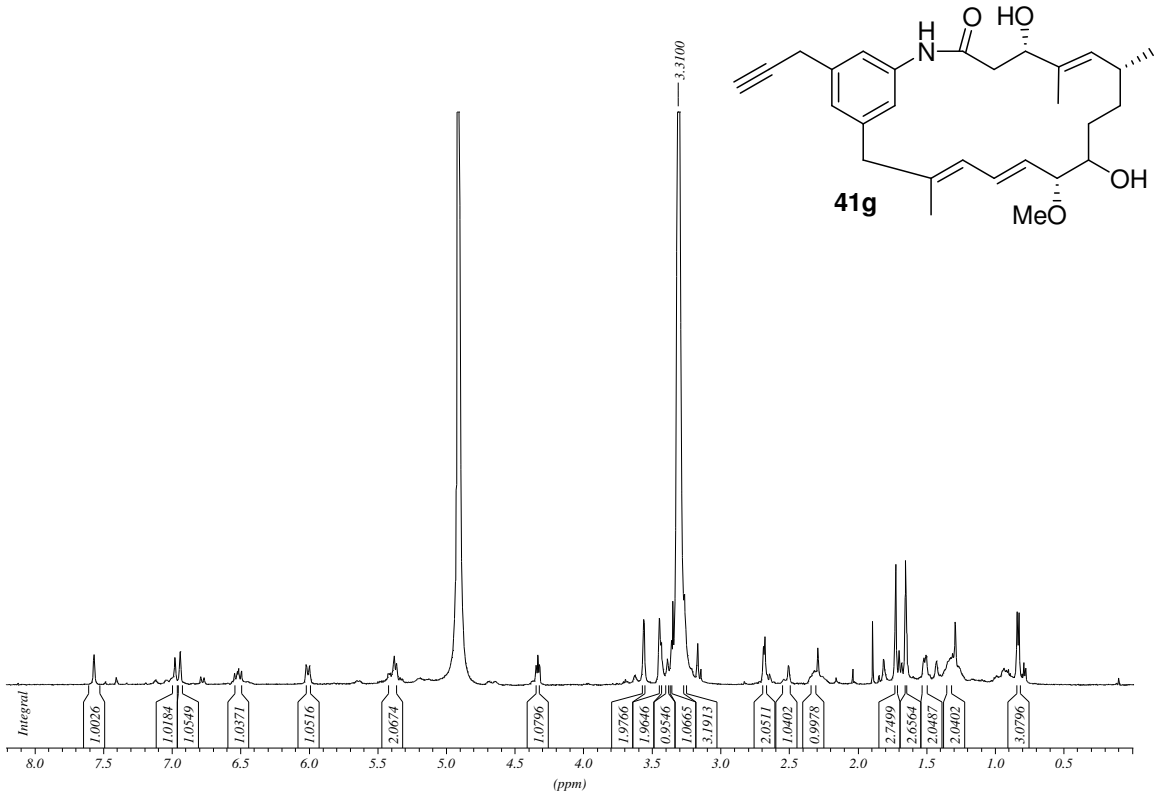

37c
1.0000
0.7468
0.6099
1.0783
0.9805
0.9411
0.9197
0.7718
0.9315
0.9670
1.0891
0.8599
0.7679
1.8522
0.7180
0.7059
0.7500
0.8765
2.4949
0.8153
4.5489
8.3749
(ppm)

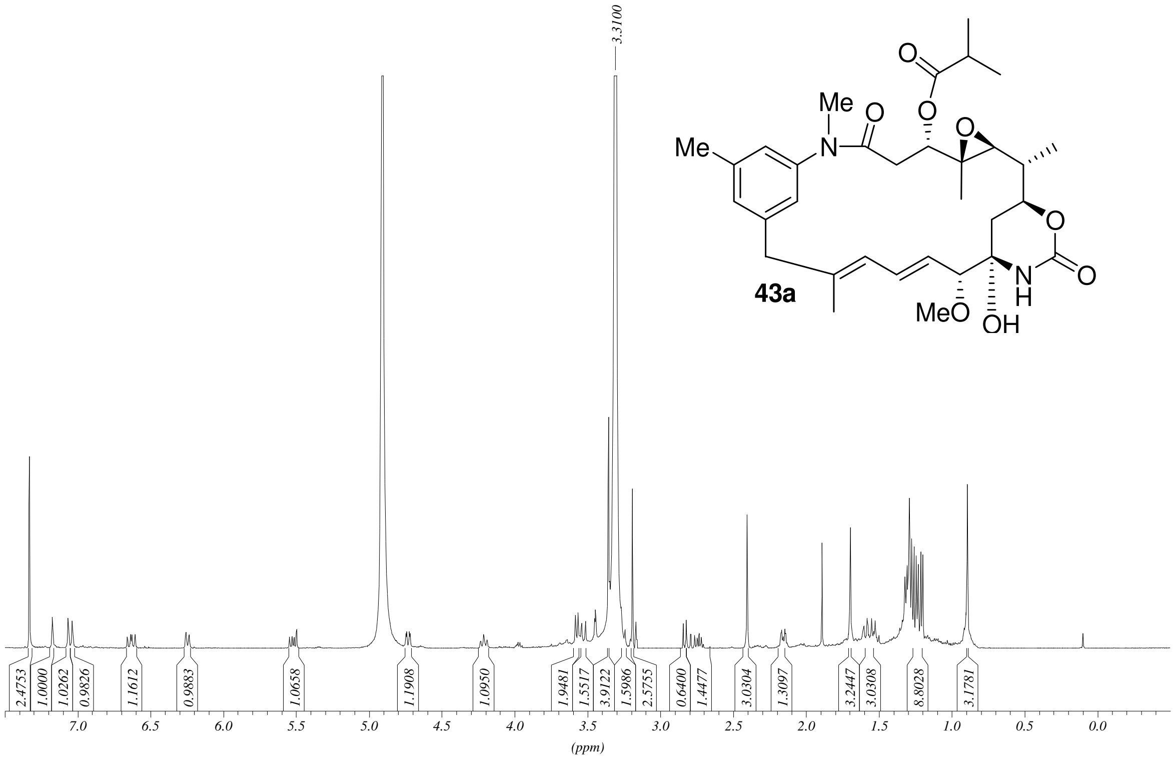

41b
3.3100
Integral
1.0000
1.0416
0.9883
1.0231
0.1139
3.1631
1.5676
1.4250
2.8610
1.2320
1.2696
3.6109
4.4683
0.4771
0.4404
2.9555
0.9893
5.7794
2.8073
(ppm)

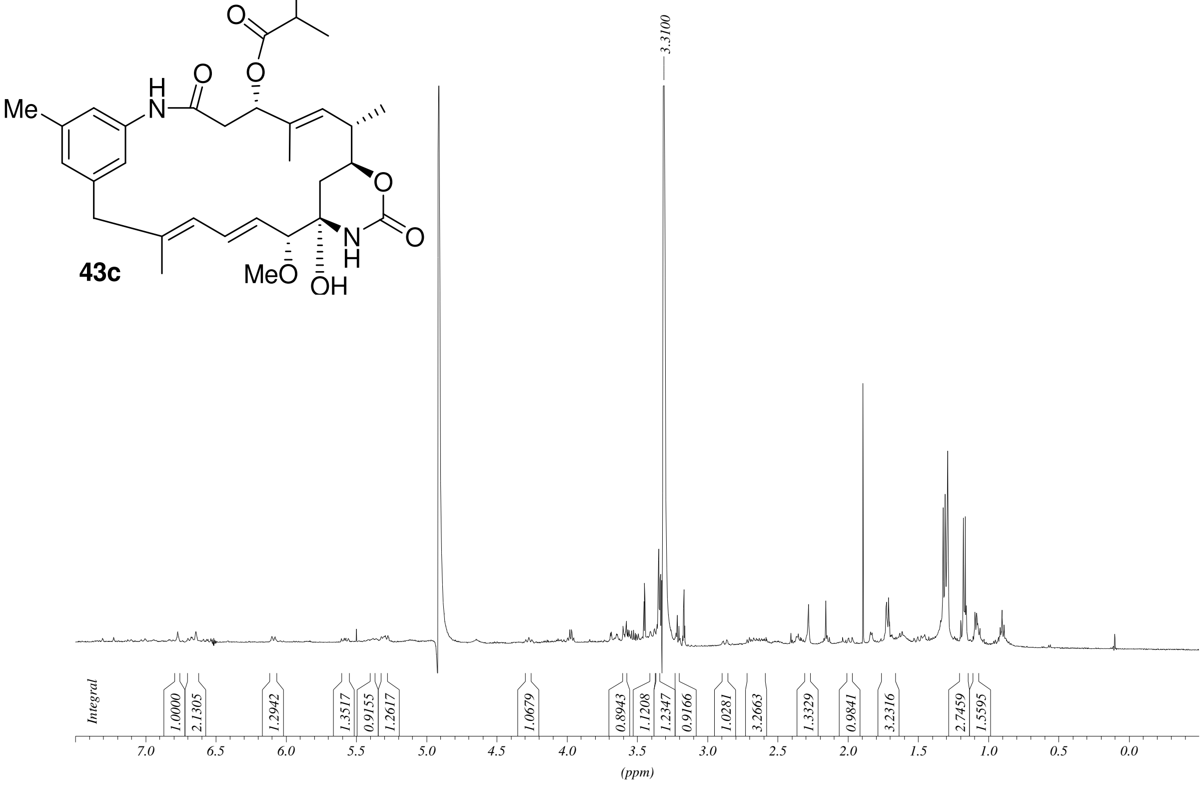

3.3323
41c
Integral
1.0000
0.9797
1.0794
1.3394
1.0708
1.2473
2.1519
1.0586
2.0924
2.4996
3.1064
3.4257
2.7637
(ppm)

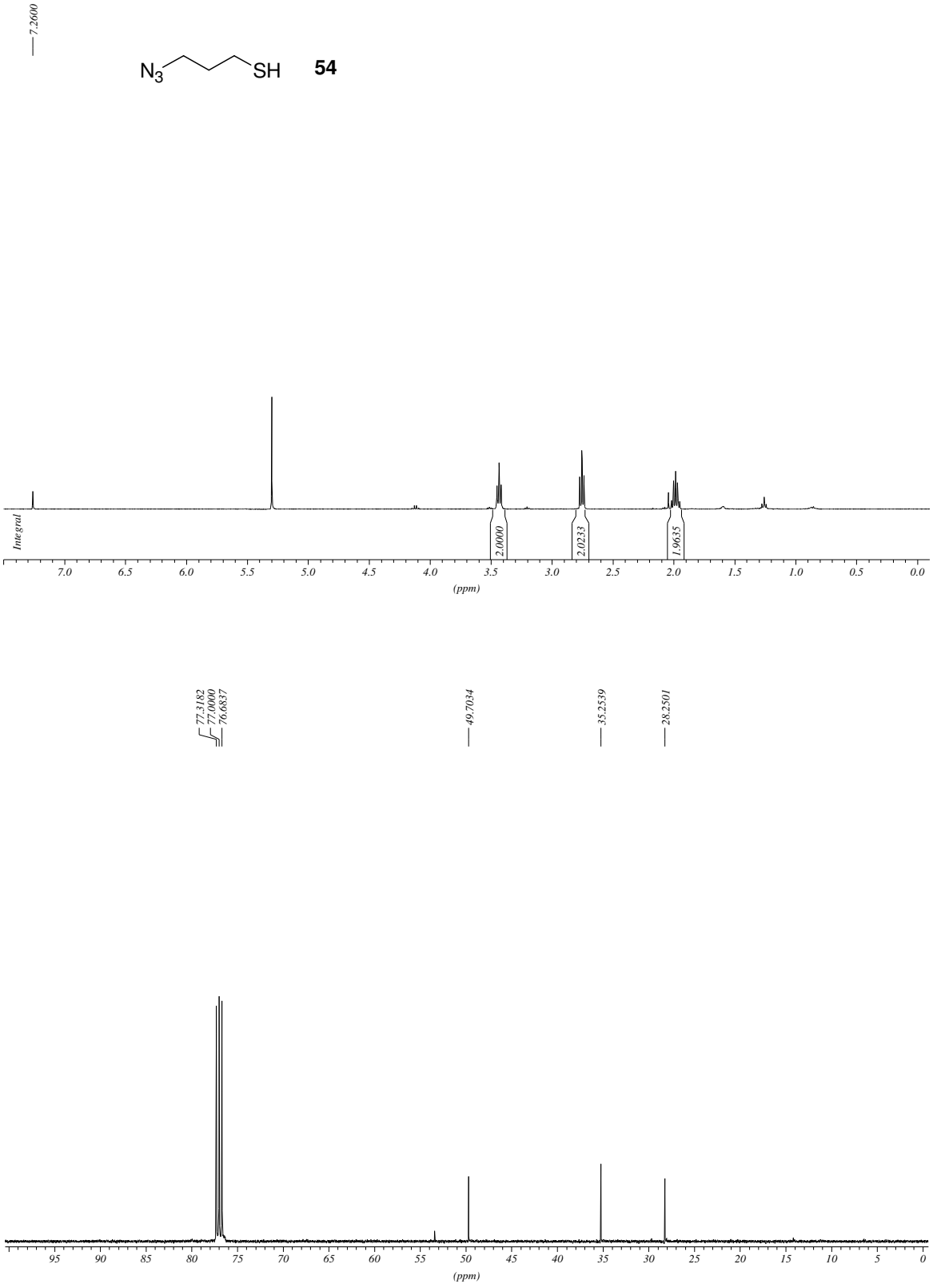

4.9349
3.3323
41d
1.0000
1.7261
0.8881
0.6860
0.5700
0.8135
0.4895
0.6108
2.1440
-3.1633
-1.2349
-0.4791
-0.8501
0.8366
5.8509
1.4539
3.1669
(ppm)

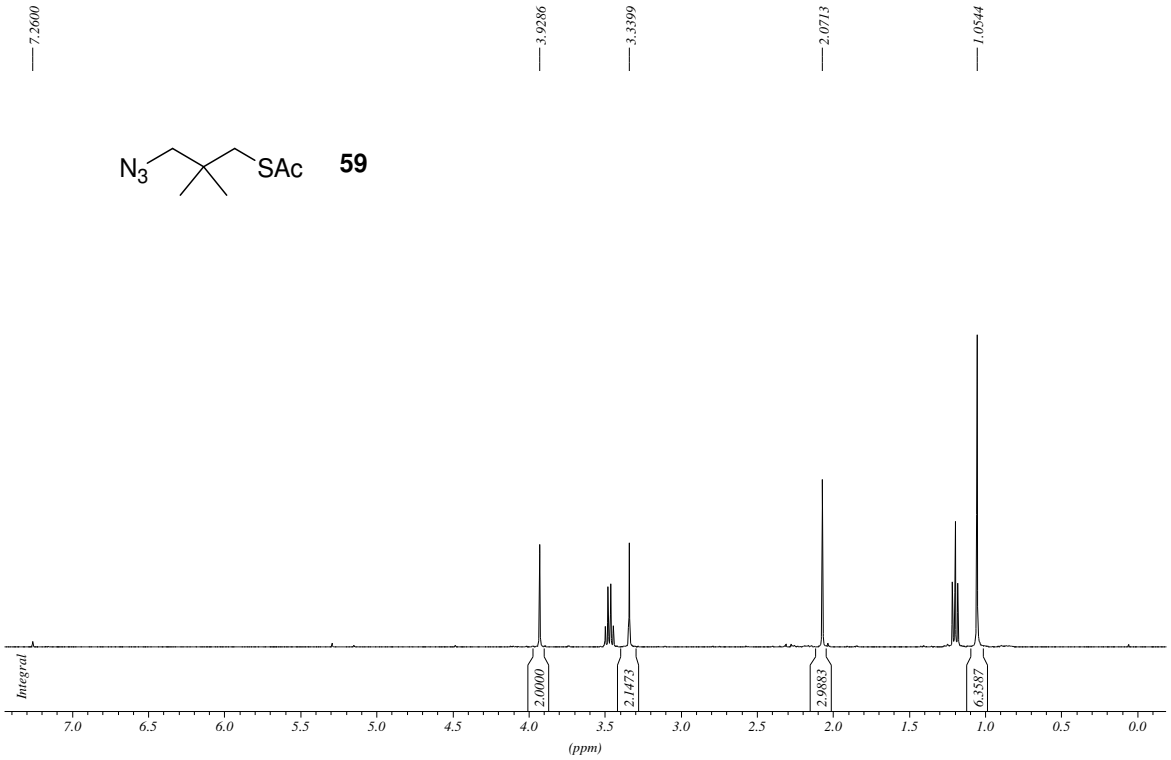

3.3100
41f
1.0000
0.7412
0.8638
0.9312
0.8964
0.8172
0.8609
1.0214
0.9512
1.0293
2.0268
2.0196
0.9714
1.0721
2.6993
3.0303
1.1956
1.0028
1.9073
3.0237
(ppm)

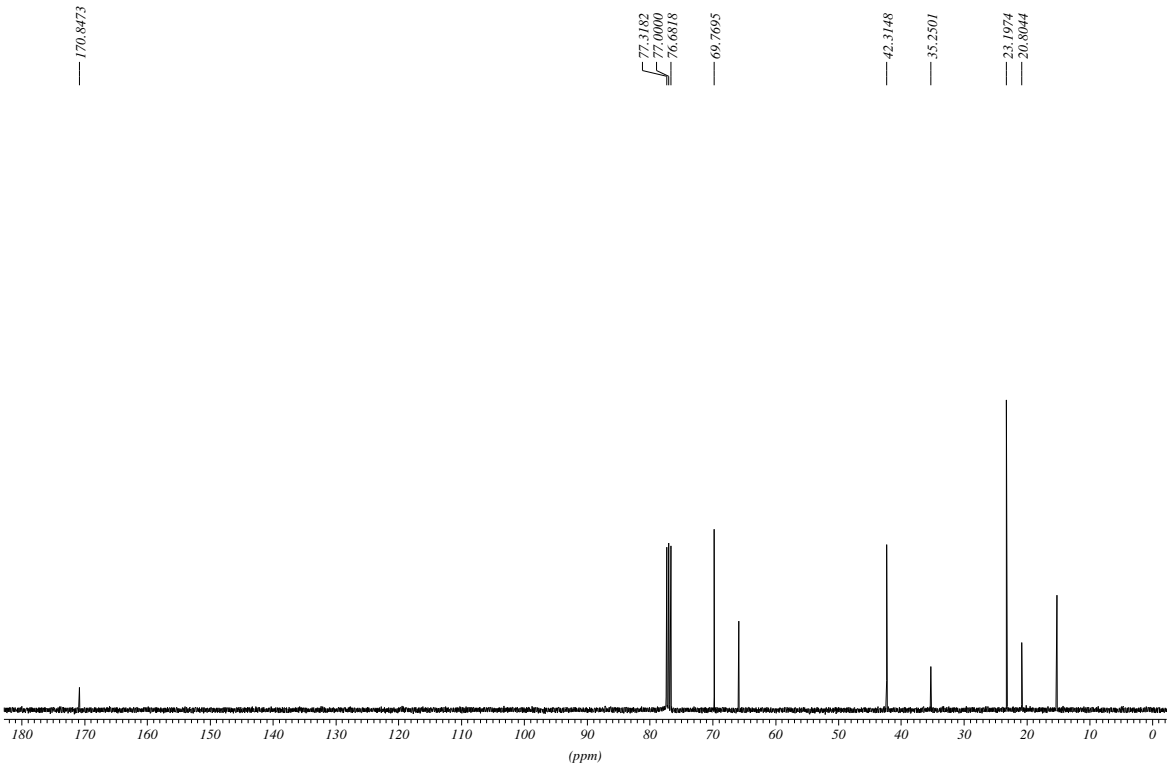

3.3100
41g
Integral
1.0026
1.0184
1.0549
1.0371
1.0516
2.0674
1.0796
1.9766
1.9646
0.9546
1.0665
3.1913
2.0511
1.0402
0.9978
2.7499
2.6564
2.0487
2.0402
3.0796
(ppm)

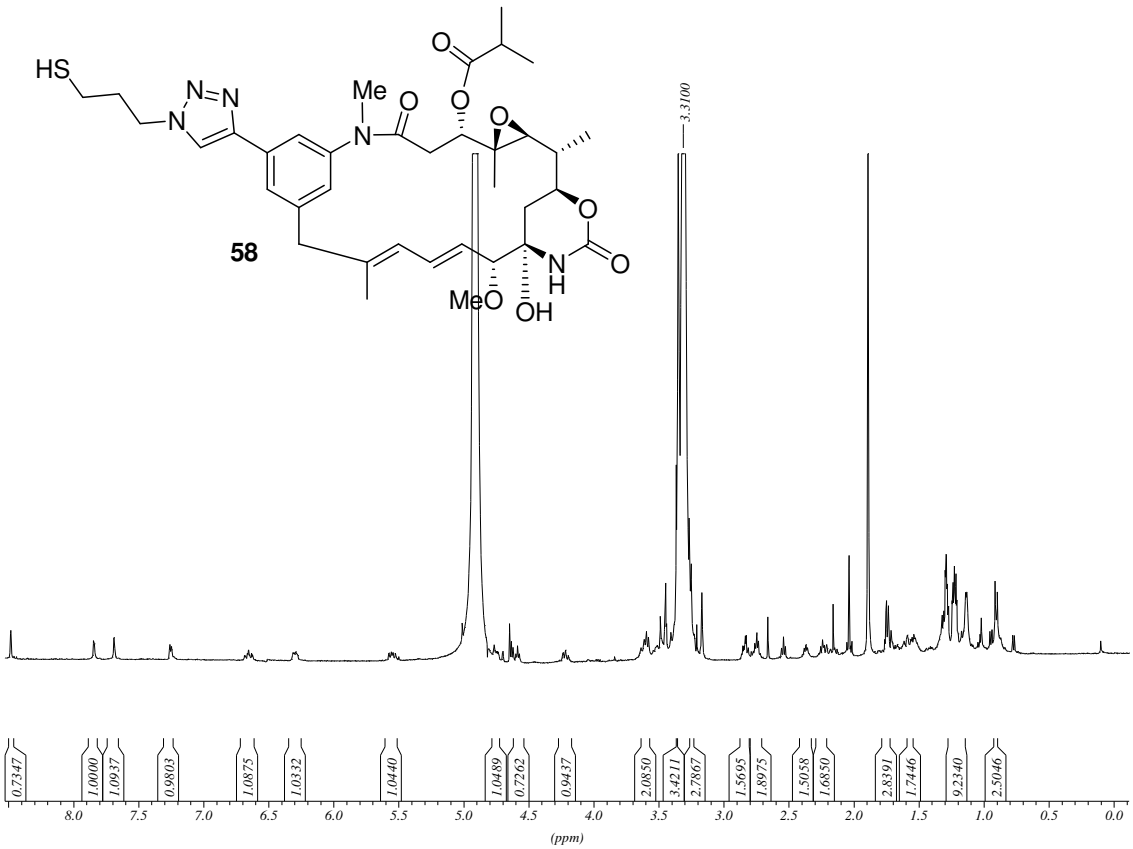

43a
Me
MeO
OH
3.3100
2.4753
1.0000
1.0262
0.9826
1.1612
0.9883
1.0658
1.1908
1.0950
1.9481
1.5517
3.9122
1.5986
2.5755
0.6400
1.4477
3.0304
1.3097
3.2447
3.0308
8.8028
3.1781
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

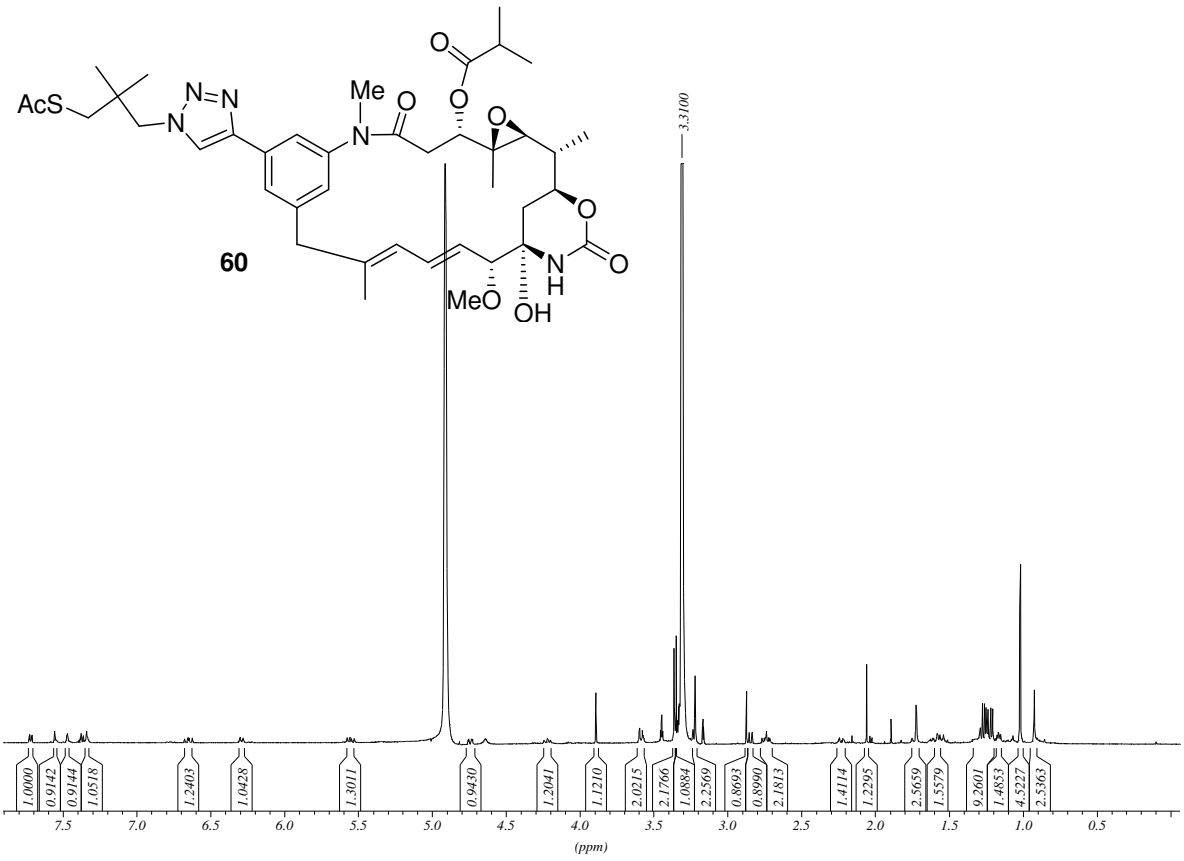

43c
Me
MeO
OH
3.3100
Integral
1.0000
2.1305
1.2942
1.3517
0.9155
1.2617
1.0679
0.8943
1.1208
1.2347
0.9166
1.0281
3.2663
1.3329
0.9841
3.2316
2.7459
1.5595
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

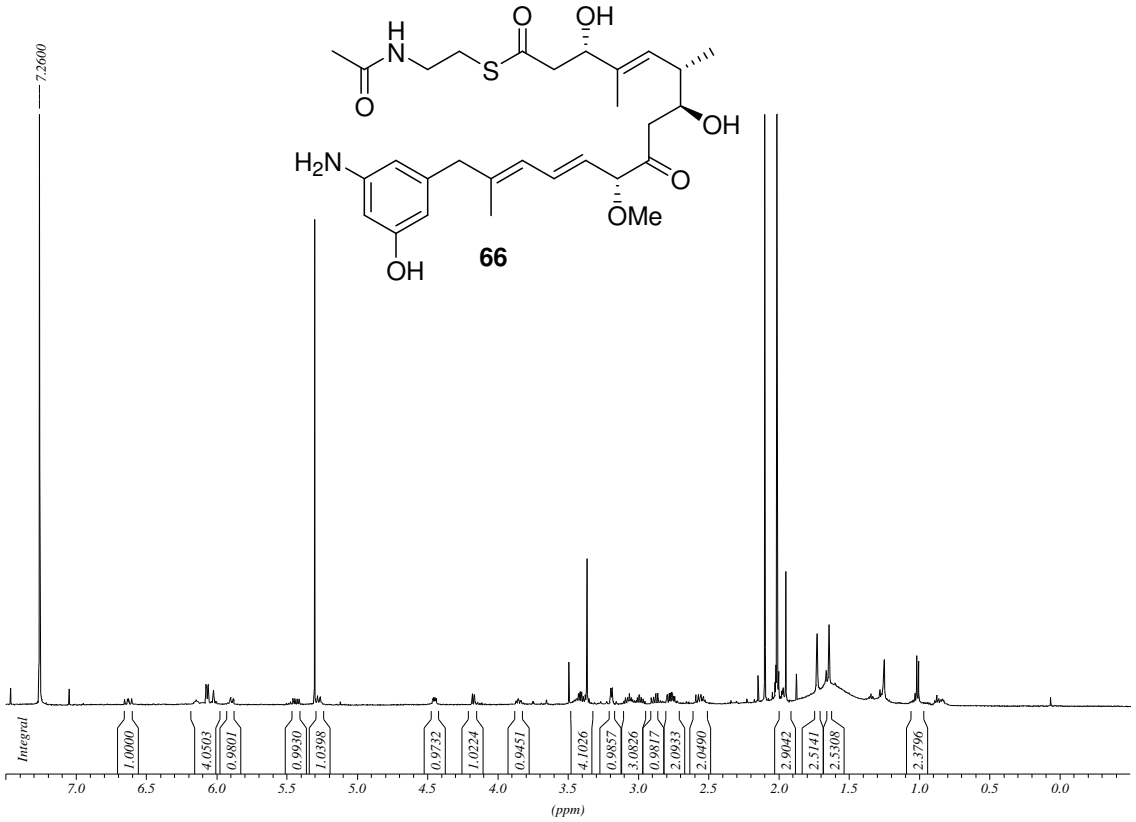

7.2600
N3
SH
54
Integral
2.0000
2.0233
1.9635
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)
77.3182
77.0000
76.6837
49.7034
35.2539
28.2501
95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0
(ppm)

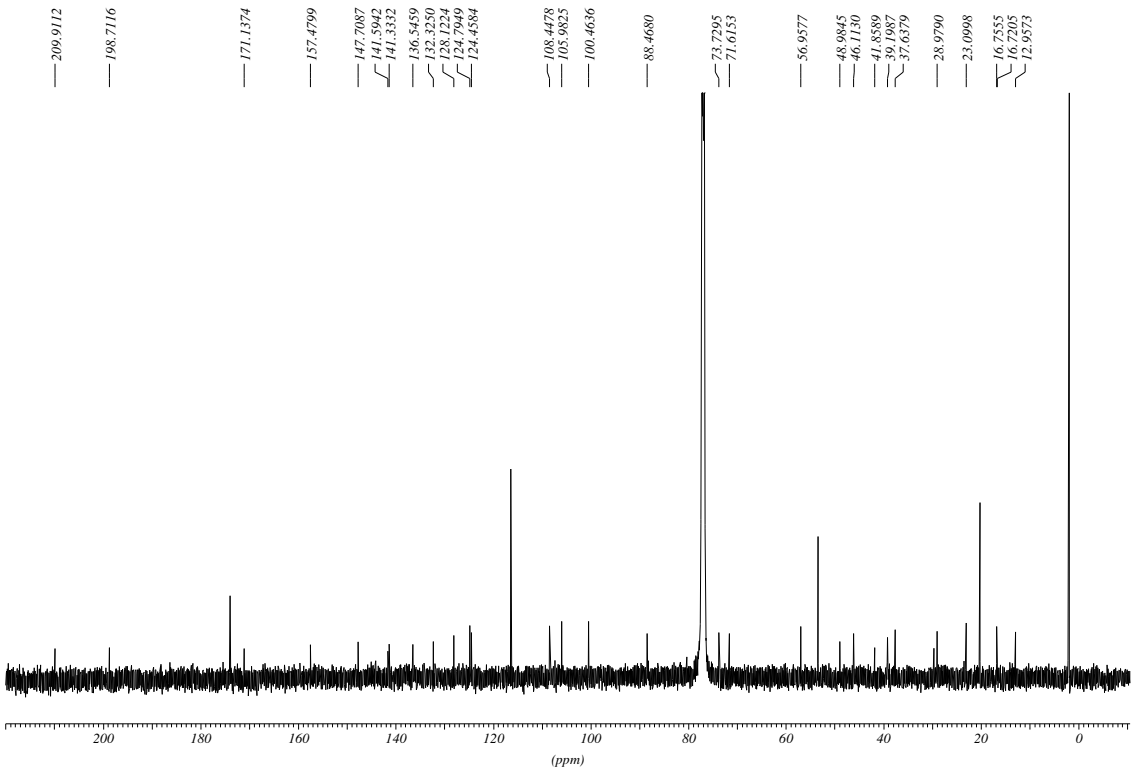

7.2600
3.9286
3.3399
2.0713
1.0544
N3
SAc
59
Integral
2.0000
2.1473
2.9883
6.3587
(ppm)

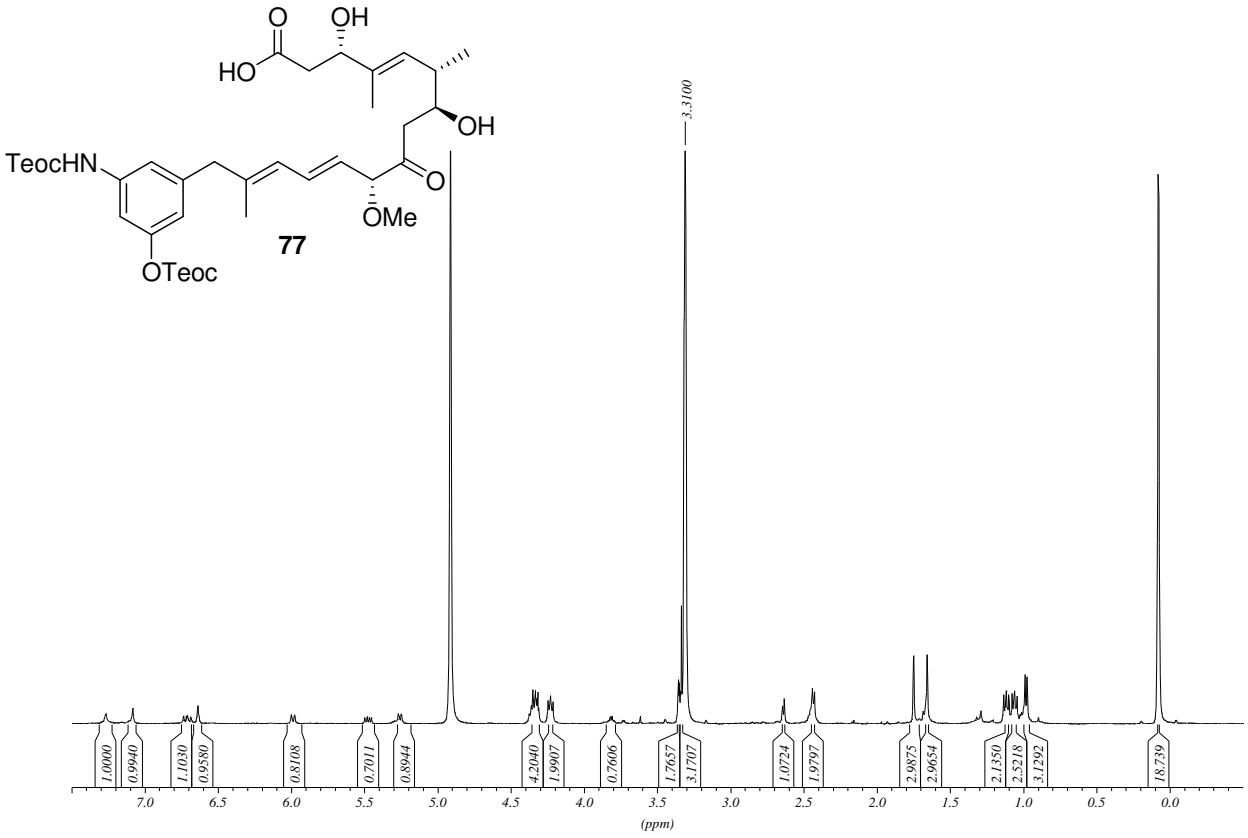

170.8473
77.3182
77.0000
76.6818
69.7695
42.3148
35.2501
23.1974
20.8044
(ppm)

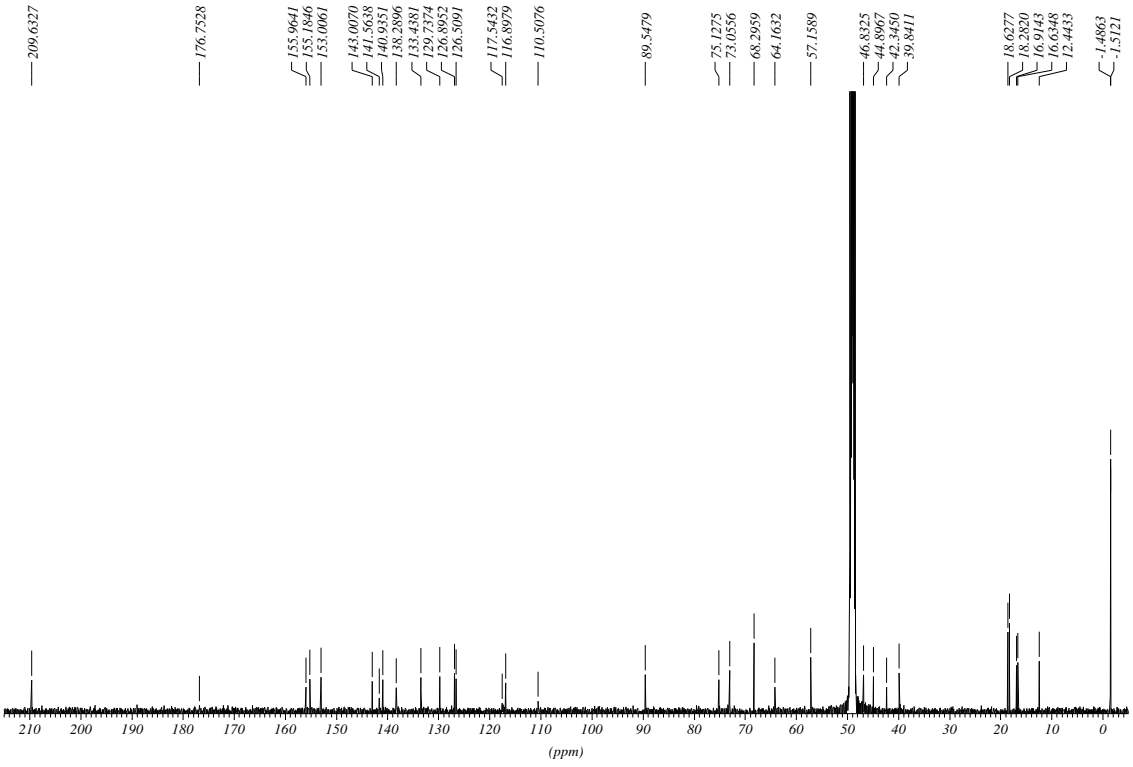

HS
N=N
N
Me
O
N
O
O
O
O
O
N
H
O
MeO
OH
58
3.3100
0.7347
1.0000
1.0937
0.9803
1.0875
1.0332
1.0440
1.0489
0.7262
0.9437
2.0850
3.4211
2.7867
1.5695
1.8975
1.5058
1.6850
2.8391
1.7446
9.2340
2.5046
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

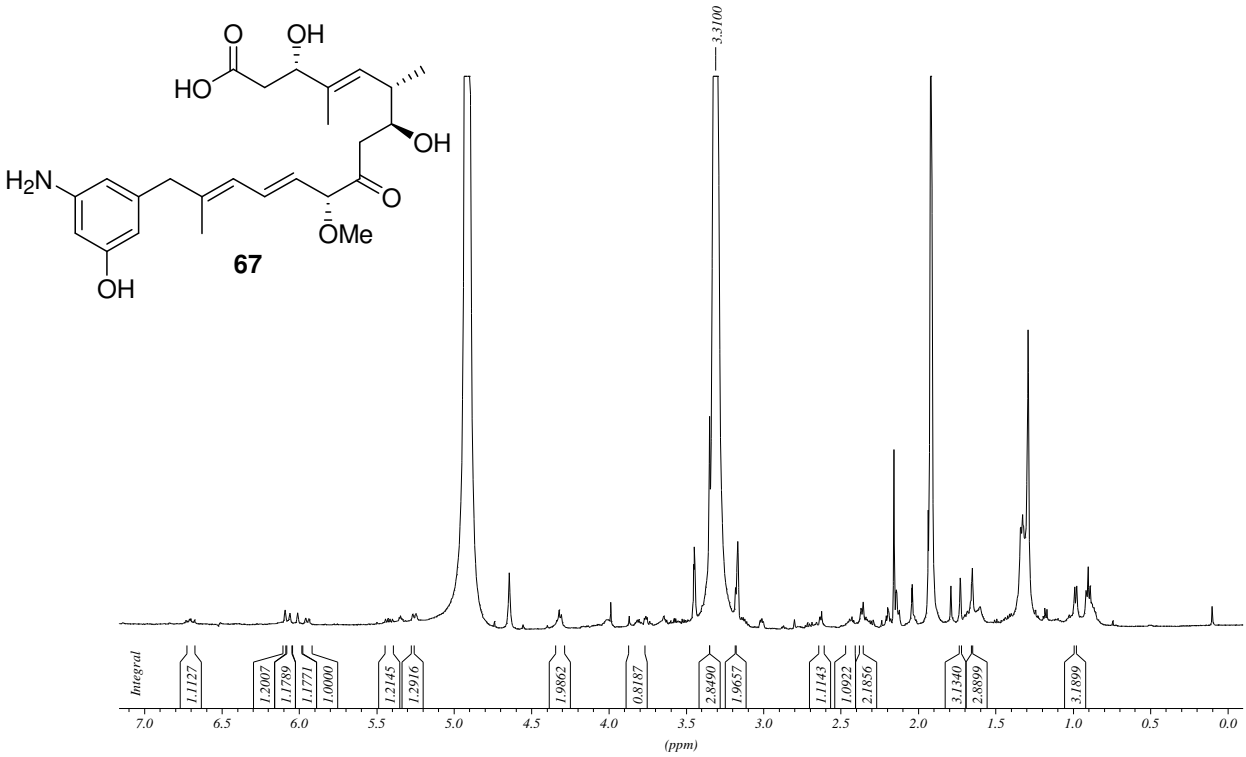

AcS
N=N
N
Me
O
N
O
O
O
O
O
N
H
O
MeO
OH
60
3.3100
1.0000
0.9142
0.9144
1.0518
1.2403
1.0428
1.3011
0.9430
1.2041
1.1210
2.0215
2.1766
1.0884
2.2569
0.8693
0.8990
2.1813
1.4114
1.2295
2.5659
1.5579
9.2601
1.4853
4.5227
2.5363
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
(ppm)

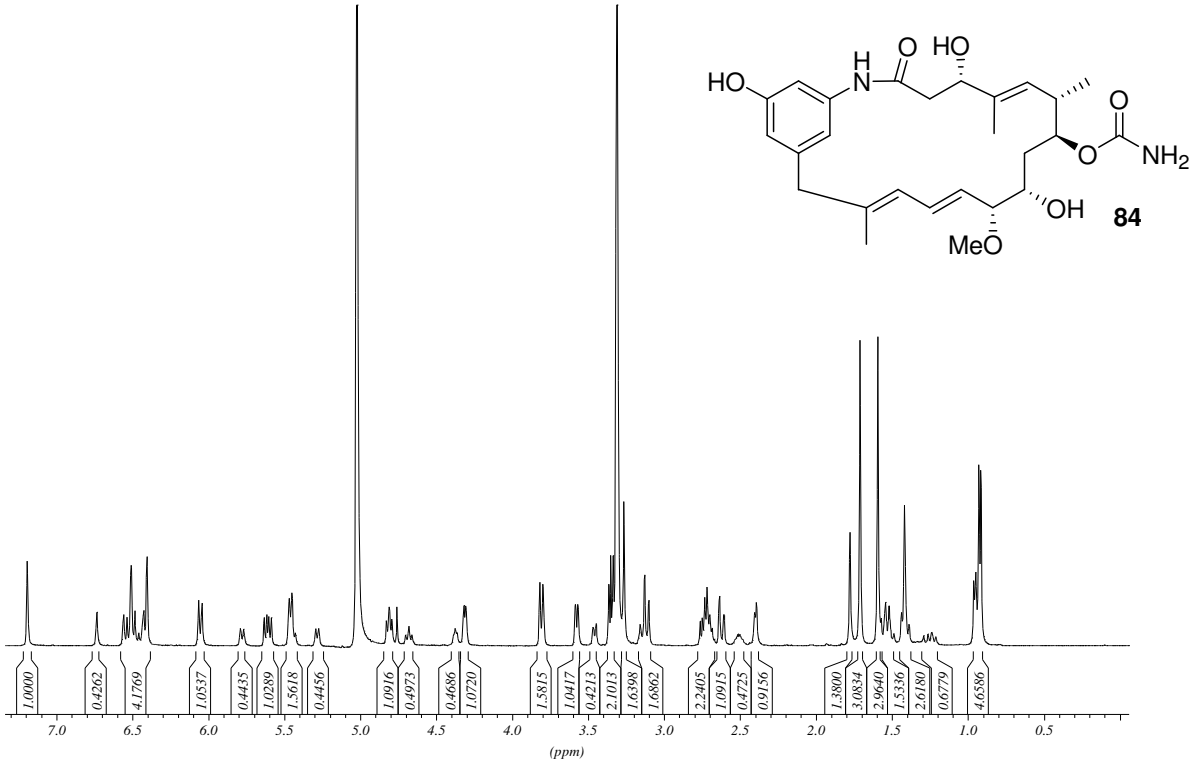

7.2600
Integral
1.0000
4.0503
0.9801
0.9930
1.0398
0.9732
1.0224
0.9451
4.1026
0.9857
3.0826
0.9817
2.0933
2.0490
2.9042
2.5141
2.5308
2.3796
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

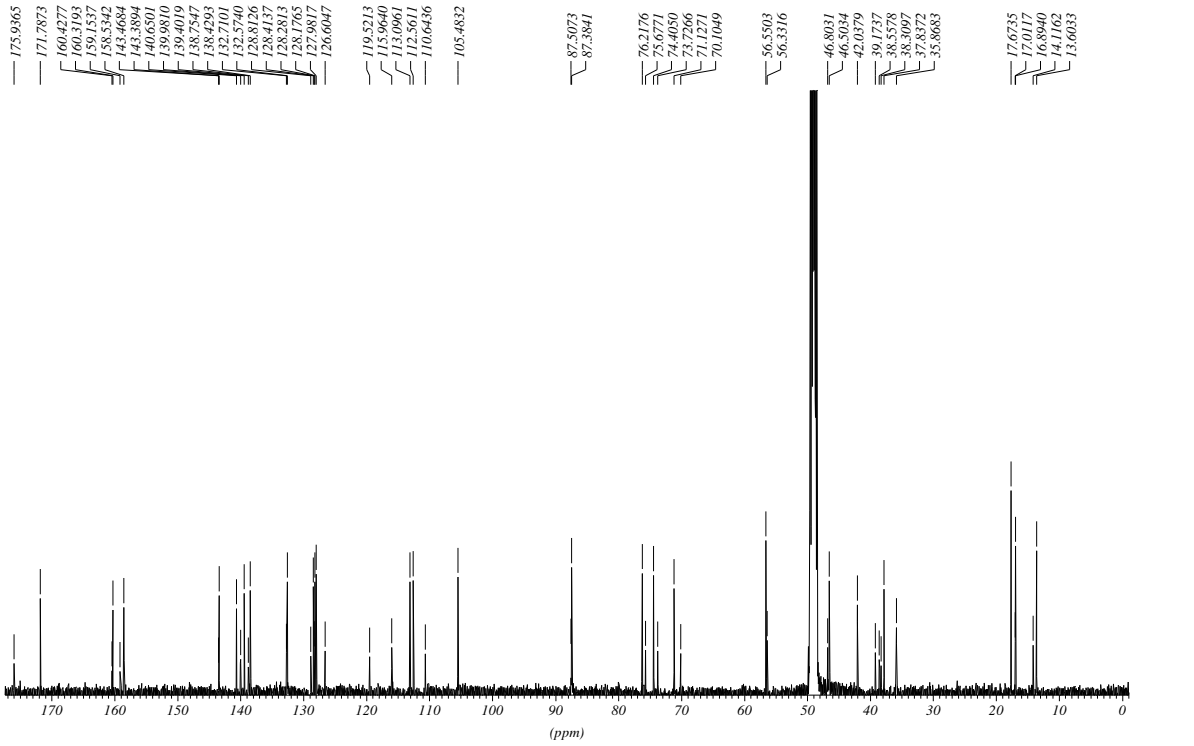

209.9112
198.7116
171.1374
157.4799
147.7087
141.5942
141.3332
136.5459
132.3250
128.1224
124.7949
124.4584
108.4478
105.9825
100.4636
88.4680
73.7295
71.6153
56.9577
48.9845
46.1130
41.8589
39.1987
37.6379
28.9790
23.0998
16.7555
16.7205
12.9573
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
(ppm)

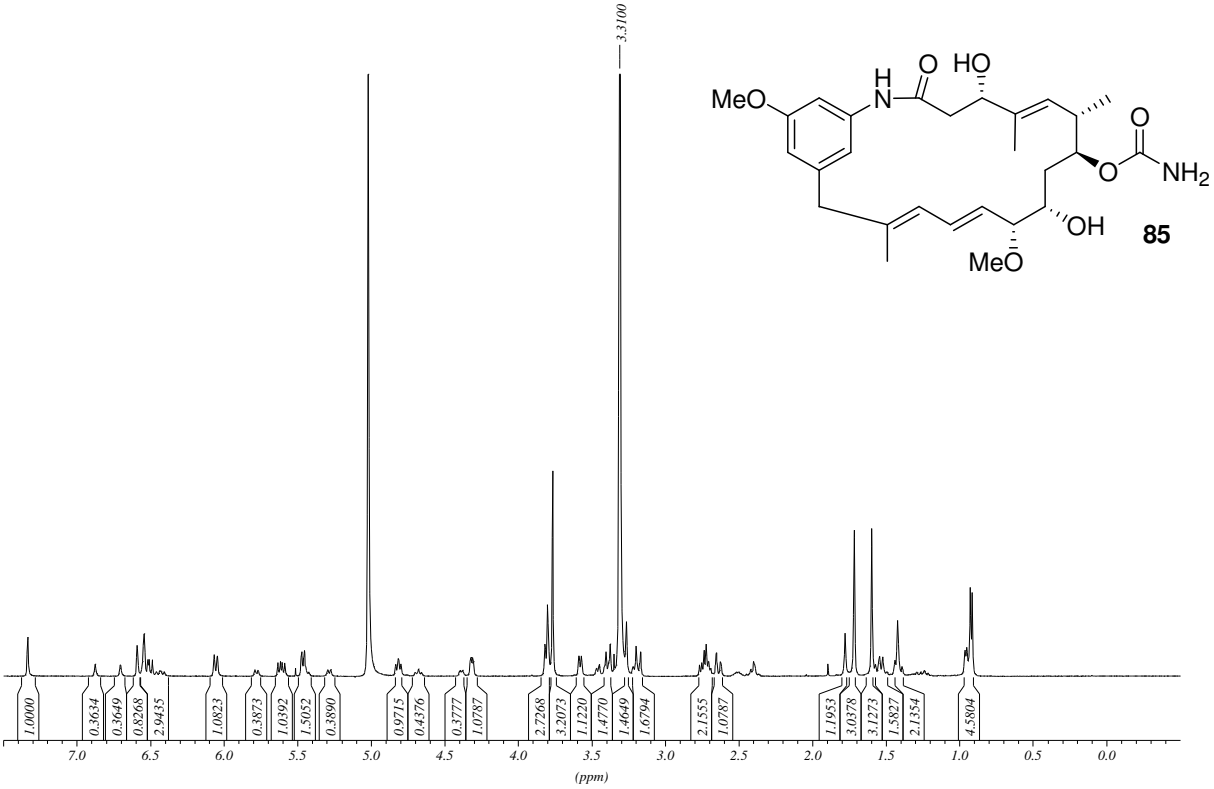

O
OH
HO
OH
TeocHN
O
OMe
77
OTeoc
3.3100
1.0000
0.9940
1.1030
0.9580
0.8108
0.7011
0.8944
4.2040
1.9907
0.7606
1.7657
3.1707
1.0724
1.9797
2.9875
2.9654
2.1350
2.5218
3.1292
18.739
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)


209.6327
176.7528
155.9641
155.1846
153.0061
143.0070
141.5638
140.9351
138.2896
133.4381
129.7374
126.8952
126.5091
117.5432
116.8979
110.5076
89.5479
75.1275
73.0536
68.2959
64.1632
57.1589
46.8325
44.8967
42.3450
39.6411
18.6277
18.2820
16.9143
16.6348
12.4433
-1.4863
-1.5121
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

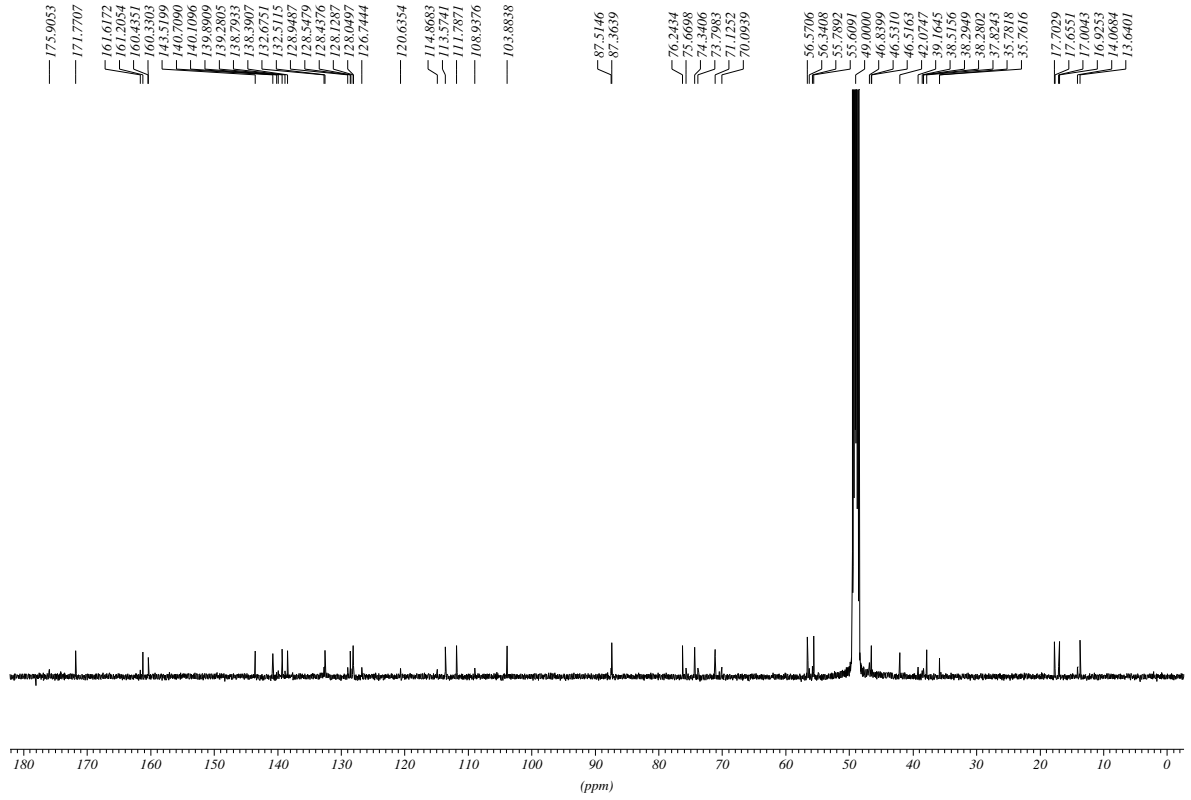

O
OH
HO
OH
H2N
O
OMe
OH
67
3.3100
Integral
1.1127
1.2007
1.1789
1.1771
1.0000
1.2145
1.2916
1.9862
0.8187
2.8490
1.9657
1.1143
1.0922
2.1856
3.1340
2.8899
3.1899
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

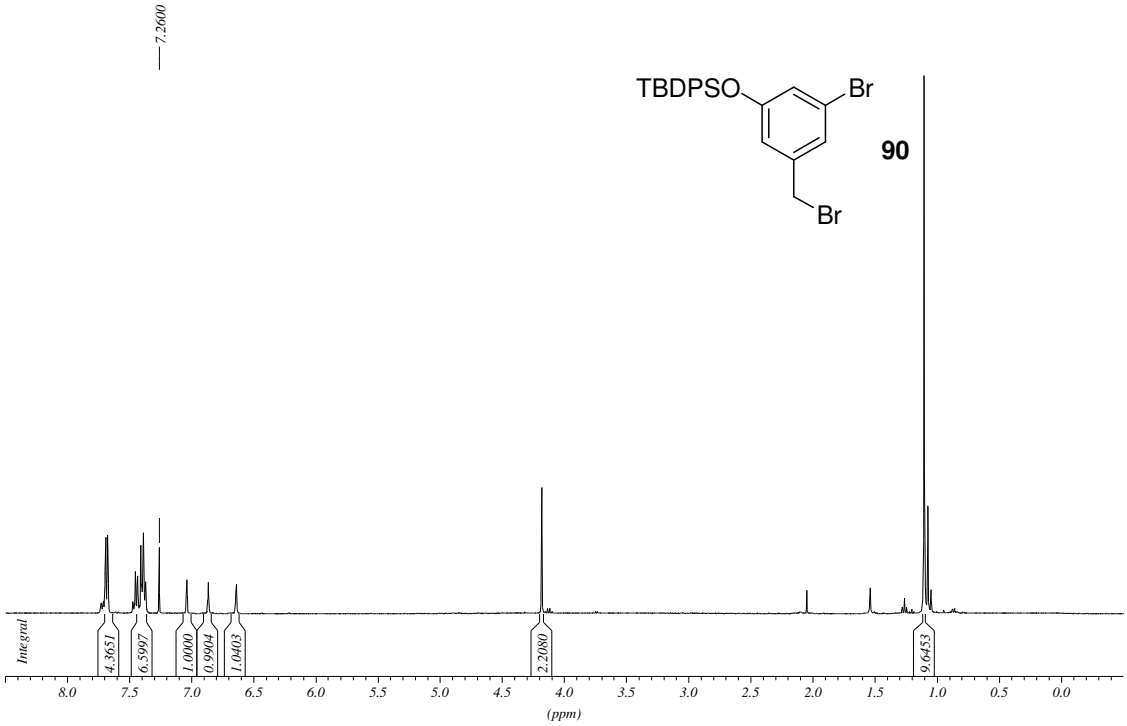

HO
H
N
O
HO
O
O
NH2
OH
MeO
84
1.0000
0.4262
4.1769
1.0537
0.4435
1.0289
1.5618
0.4456
1.0916
0.4973
0.4686
1.0720
1.5815
1.0417
0.4213
2.1013
1.6398
1.6862
2.2405
1.0915
0.4725
0.9156
1.3800
3.0834
2.9640
1.5336
2.6180
0.6779
4.6586
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
(ppm)

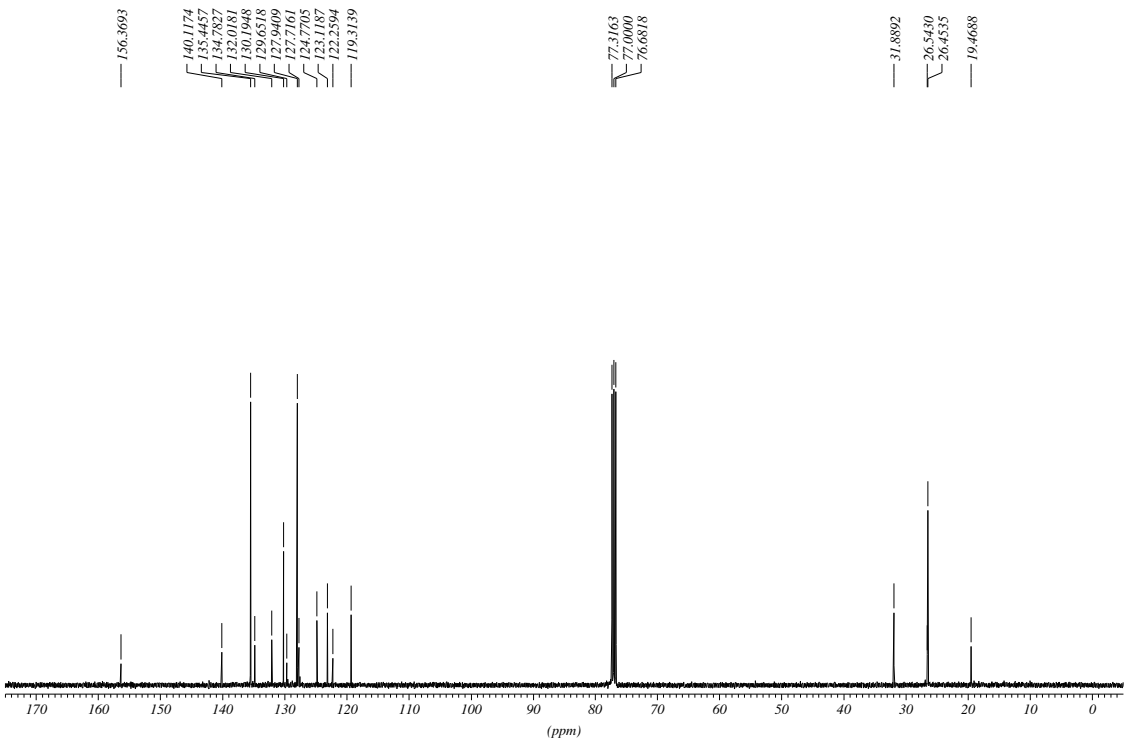

175.9365
171.7873
160.4277
160.3193
159.1537
158.5342
143.4684
143.3894
140.6501
139.9810
139.4019
138.7547
138.4293
132.7101
132.5740
128.8126
128.4137
128.2813
128.1765
127.9817
126.6047
119.5213
115.9640
113.0961
112.5611
110.6436
105.4832
87.5073
87.3841
76.2176
75.6771
74.4050
73.7266
71.1271
70.1049
56.5503
56.3316
46.8031
46.5034
42.0379
39.1737
38.5578
38.3097
37.8372
35.8683
17.6735
17.0117
16.8940
14.1162
13.6033
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

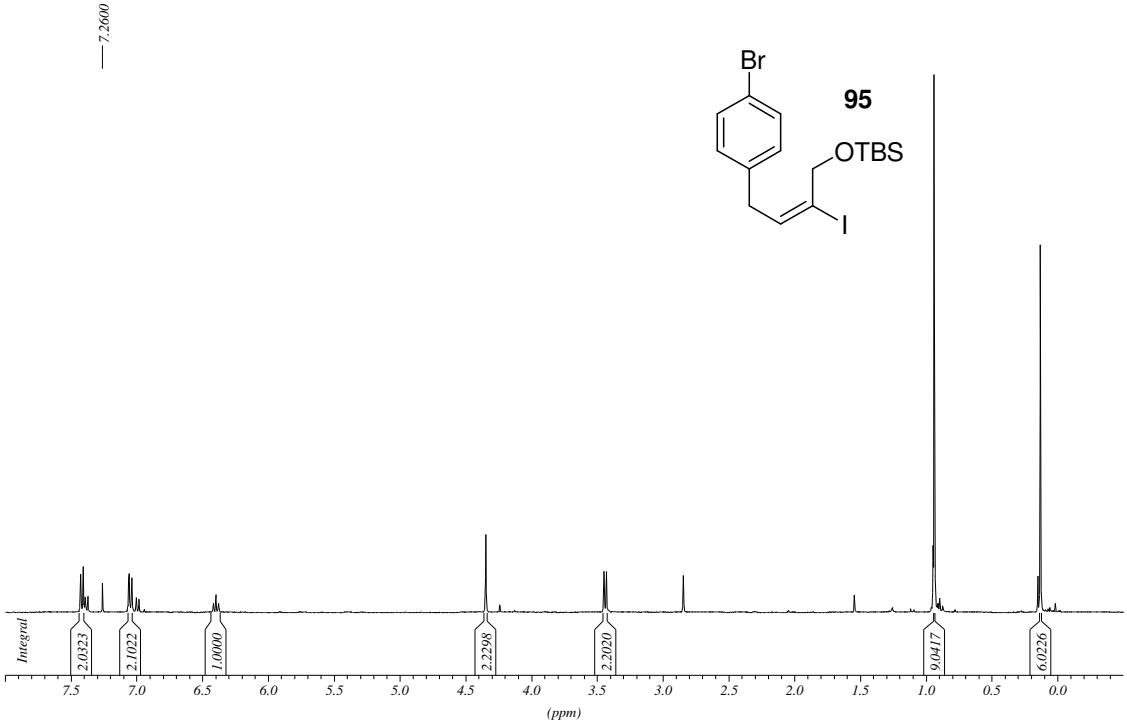

3.3100
1.0000
0.3634
0.3649
0.8268
2.9435
1.0823
0.3873
1.0392
1.5052
0.3890
0.9715
0.4376
0.3777
1.0787
2.7268
3.2073
1.1220
1.4770
1.4649
1.6794
2.1555
1.0787
1.1953
3.0378
3.1273
1.5827
2.1354
4.5804
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

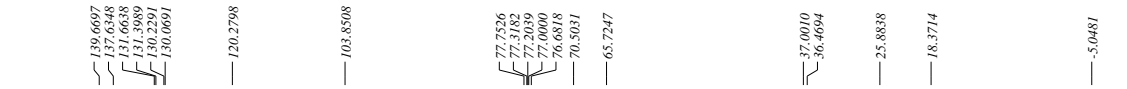
MeO
H
N
O
HO
O
O
NH2
OH
MeO
85

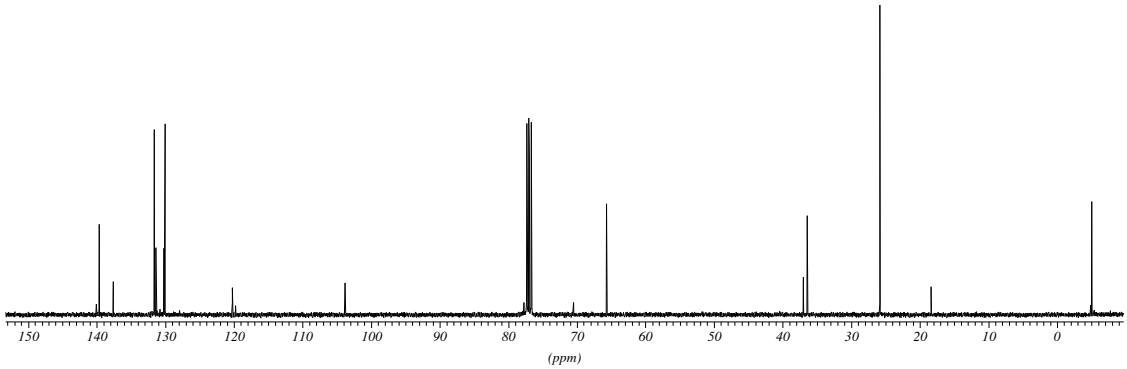

175.9053
171.7707
161.6172
161.2054
160.4351
160.3303
143.5199
140.7090
140.1096
139.8909
139.2805
138.7933
138.3907
132.6751
132.5415
128.9467
128.5479
128.4376
128.1287
128.0497
126.7444
120.6354
114.8683
113.5741
111.7871
108.9376
103.8838
87.5146
87.3639
76.2434
75.6698
74.3406
73.7983
71.1252
70.0939
56.5706
56.3408
55.7892
55.6091
49.0000
46.8399
46.5310
46.5163
42.0747
39.1645
38.5156
38.2949
38.2802
37.8243
35.7818
35.7616
17.7029
17.6551
17.0043
16.9253
14.0684
13.6401
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

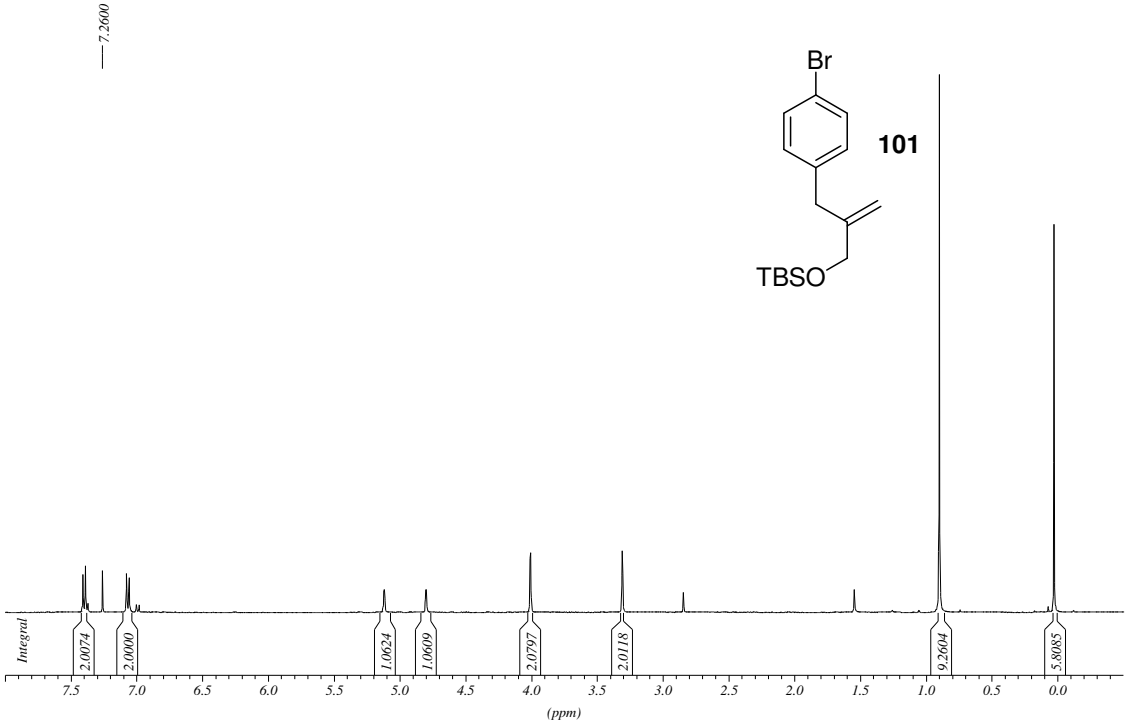

7.2600
TBDPSO
Br
Br
90
Integral
4.3651
6.5997
1.0000
0.9904
1.0403
2.2080
9.6453
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

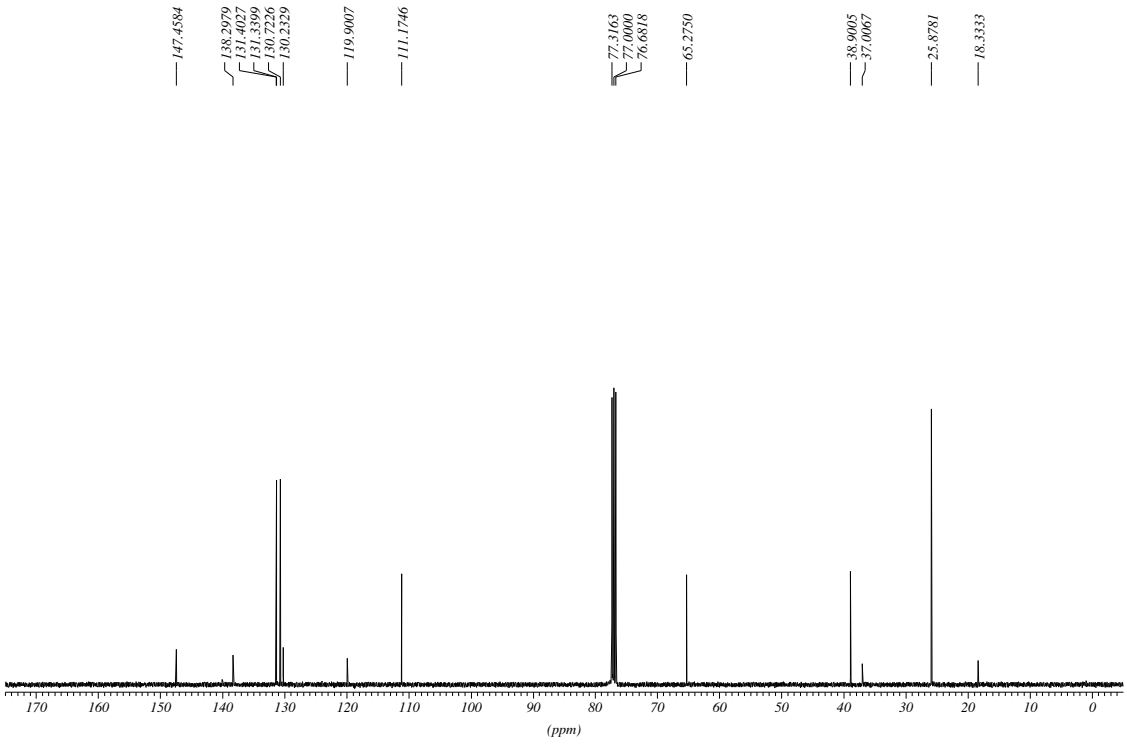

156.3693
140.1174
135.4457
134.7827
132.0181
130.1948
129.6518
127.9409
127.7161
124.7705
123.1187
122.2594
119.3139
77.3163
77.0000
76.6818
31.8892
26.5430
26.4535
19.4688
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

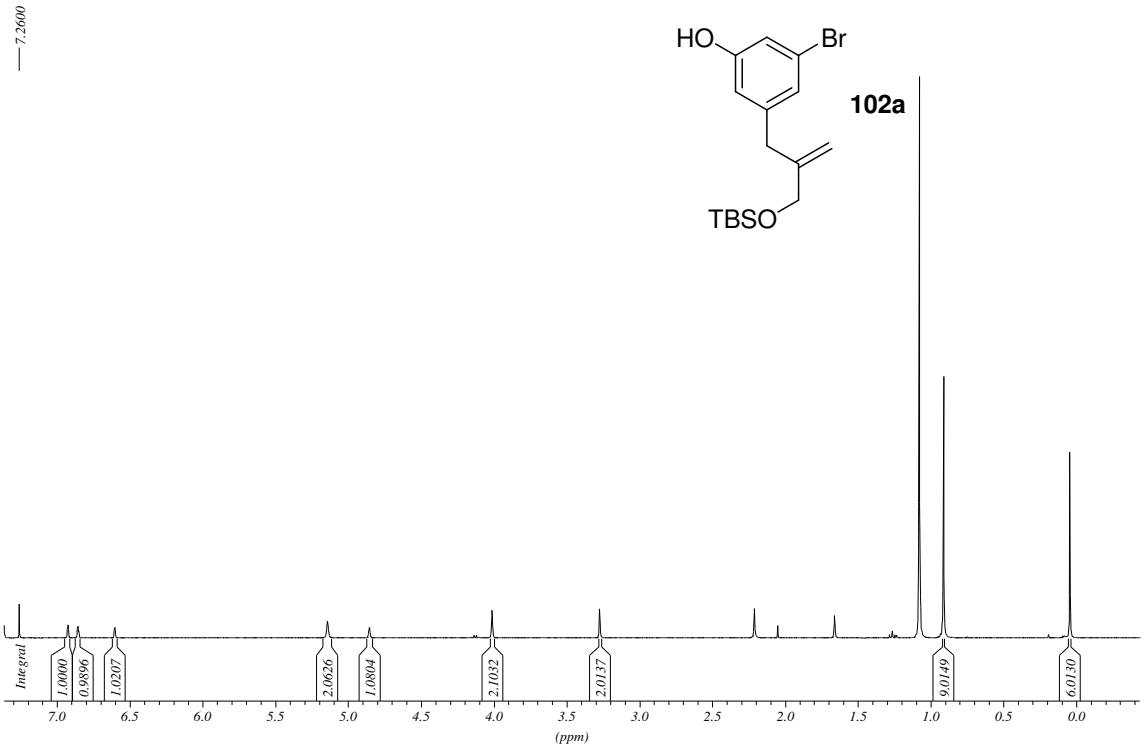

7.2600
Br
95
OTBS
I
Integral
2.0223
2.1022
1.0000
2.2298
2.2020
9.0417
6.0226
(ppm)

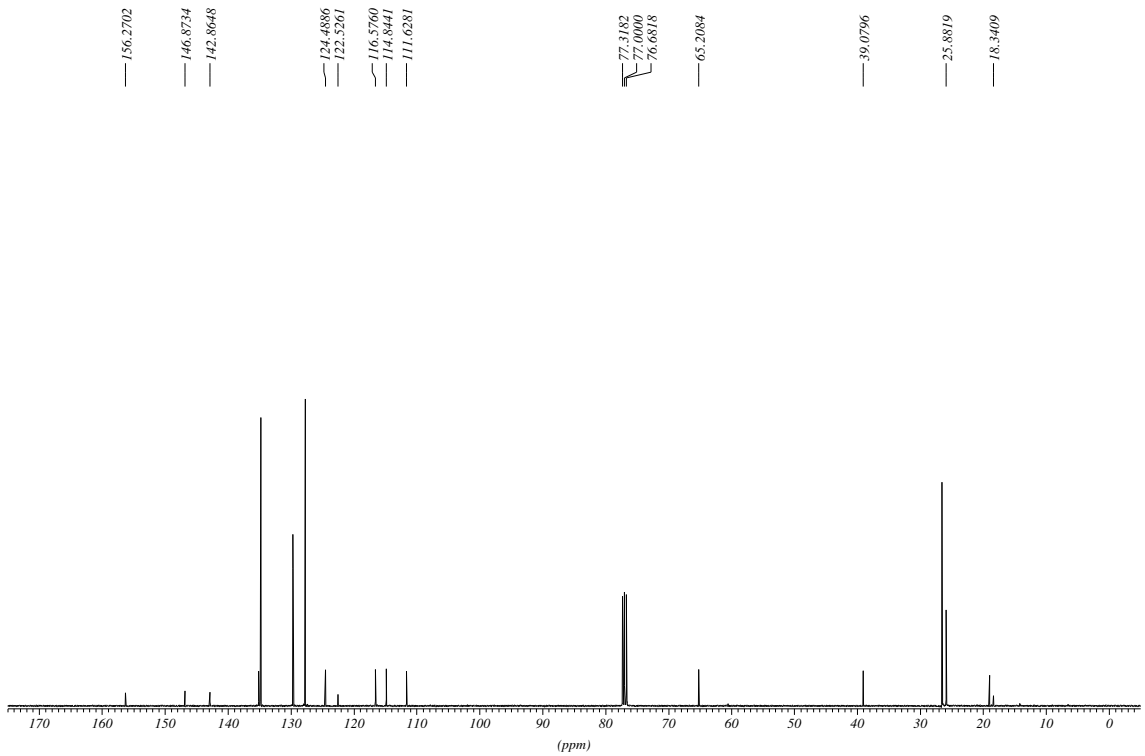

139.6697
137.6348
131.0638
131.3989
130.2291
130.0691
120.2798
103.8508
77.7526
77.3182
77.2039
77.0000
76.6818
70.5031
65.7247
37.0010
36.4694
25.8838
18.3714
-5.0481

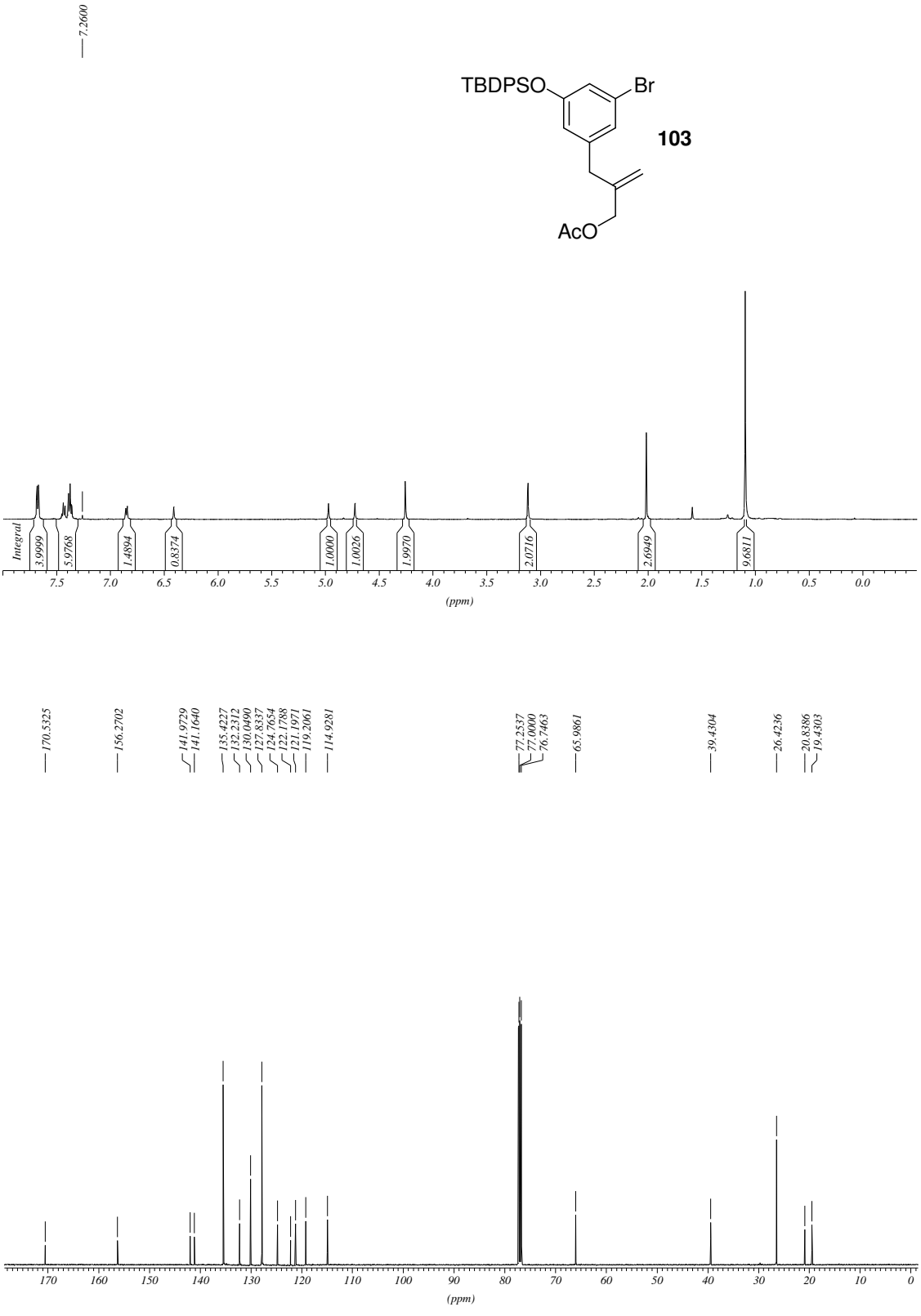

(ppm)

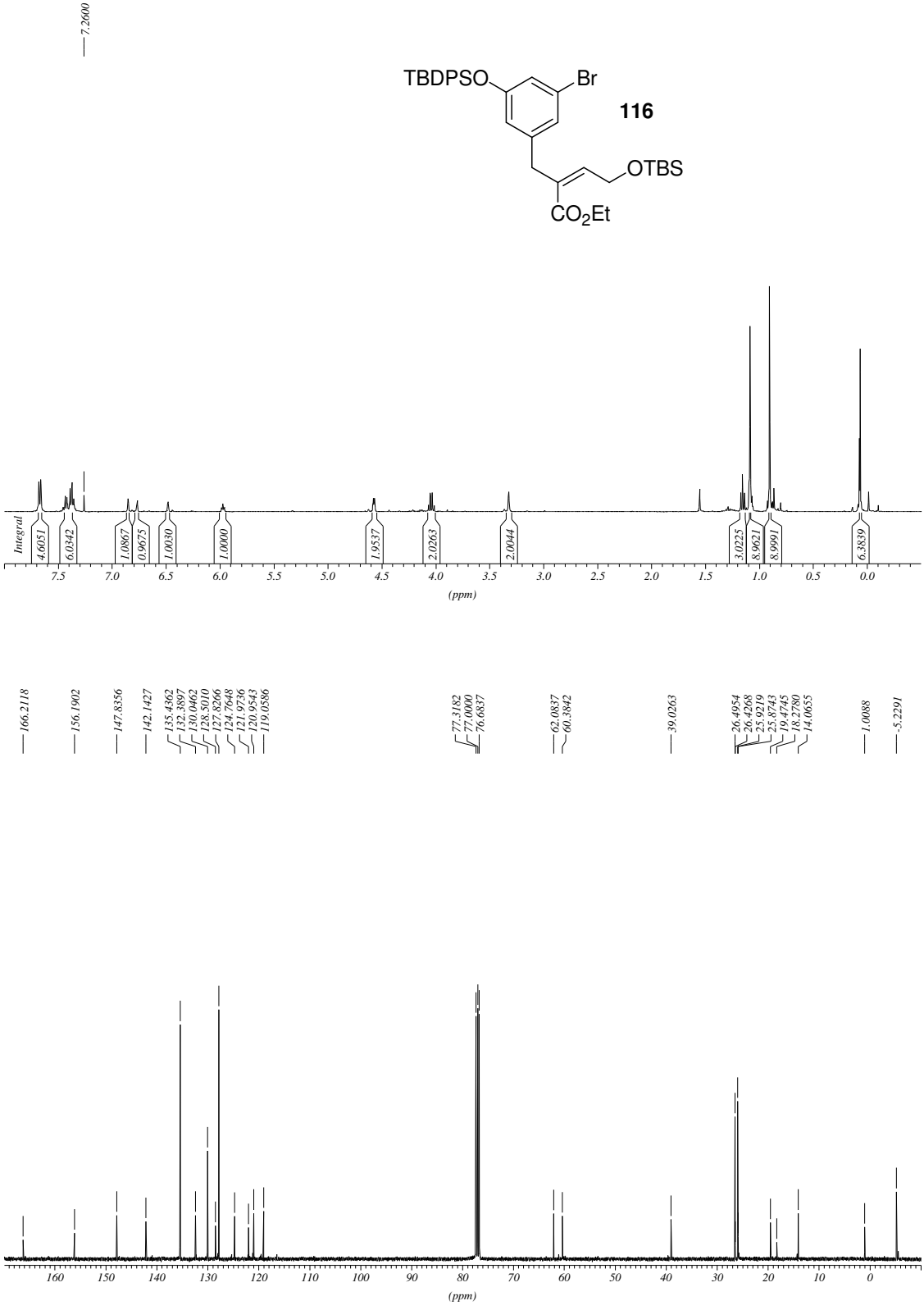

7.2600
Br
101
TBSO
Integral
2.0074
2.0000
1.0624
1.0609
2.0797
2.0118
9.2604
5.8085
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

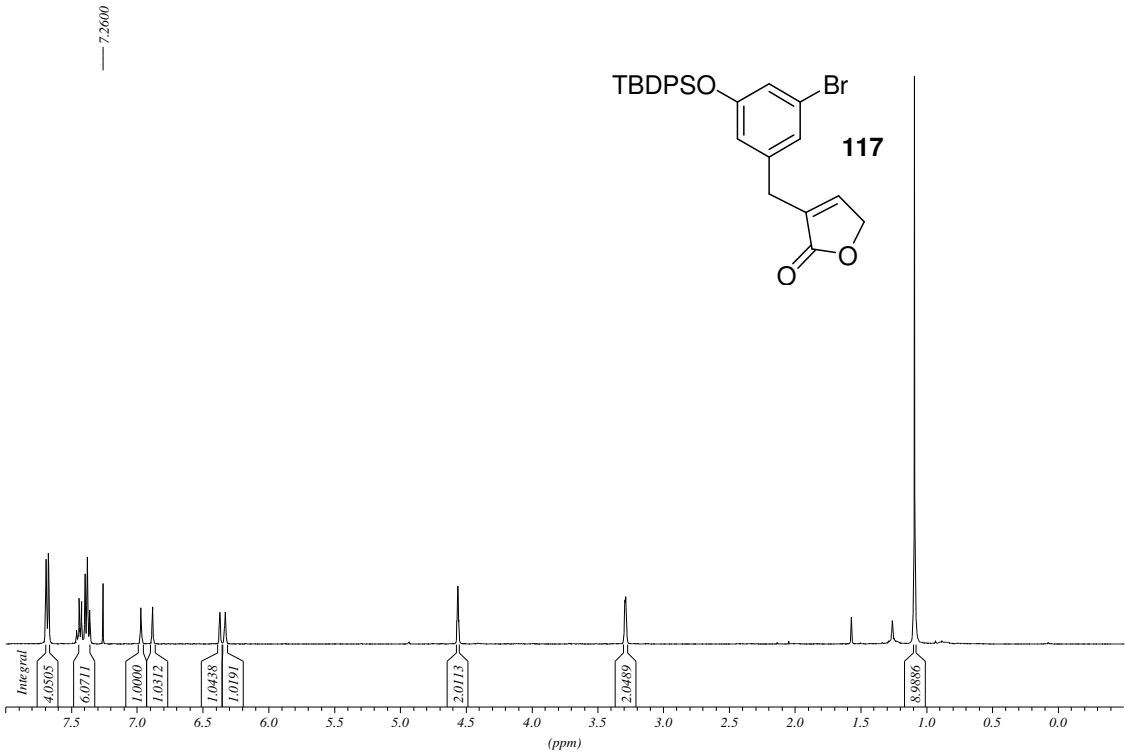

147.4584
138.2979
131.4027
131.3399
130.7226
130.2329
119.9007
111.1746
77.3163
77.0000
76.6818
65.2750
38.9005
37.0067
25.8781
18.3333
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

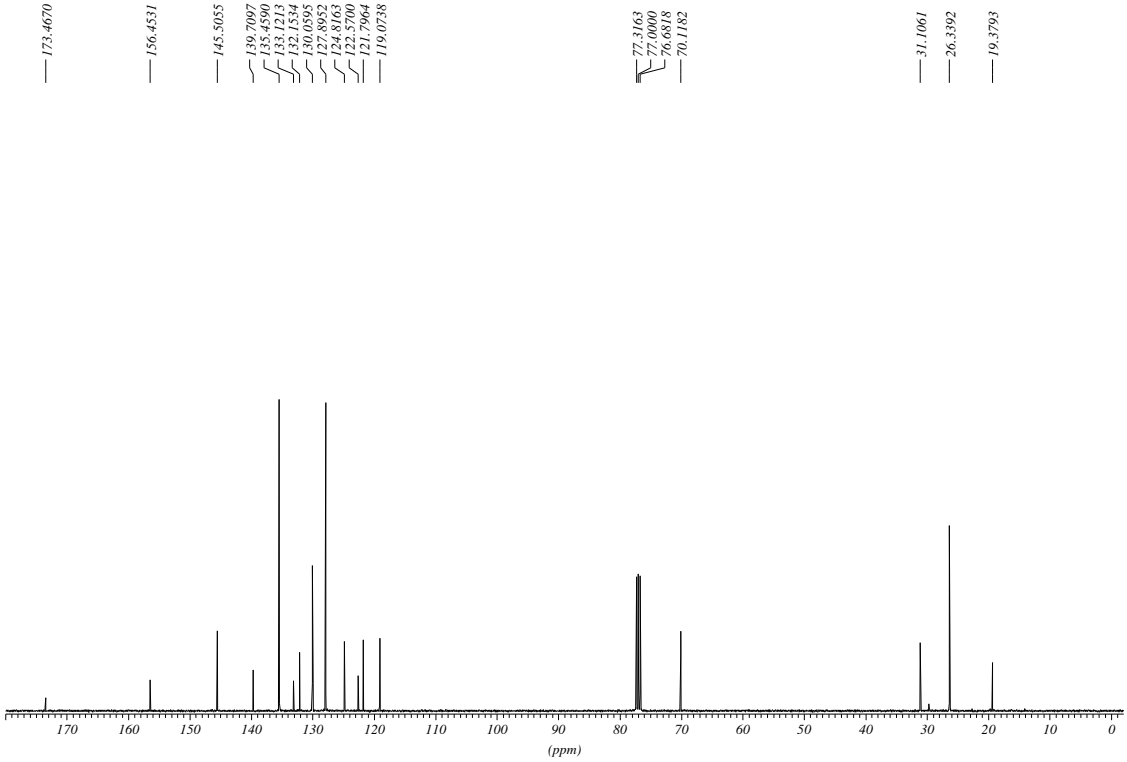

7.2600
HO
Br
102a
TBSO
Integral
1.0000
0.9896
1.0207
2.0626
1.0804
2.1032
2.0137
9.0149
6.0130
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

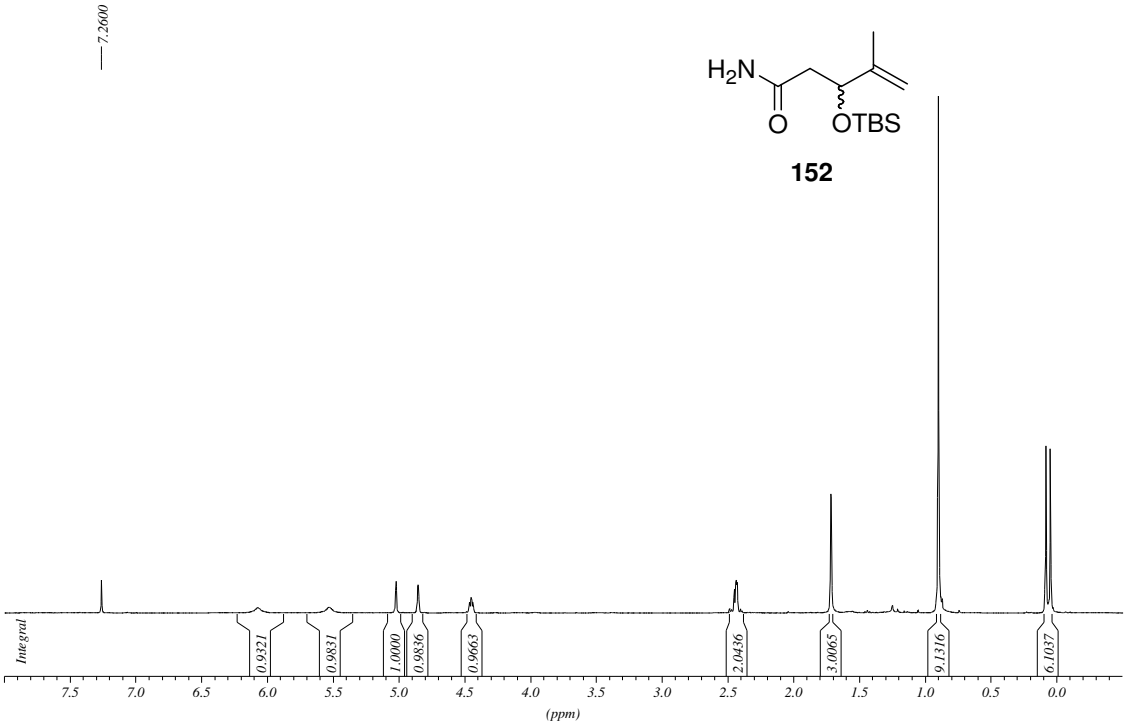

156.2702
146.8734
142.8648
124.4886
122.5261
116.5760
114.8441
111.6281
77.3182
77.0000
76.6818
65.2084
39.0796
25.8819
18.3409
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

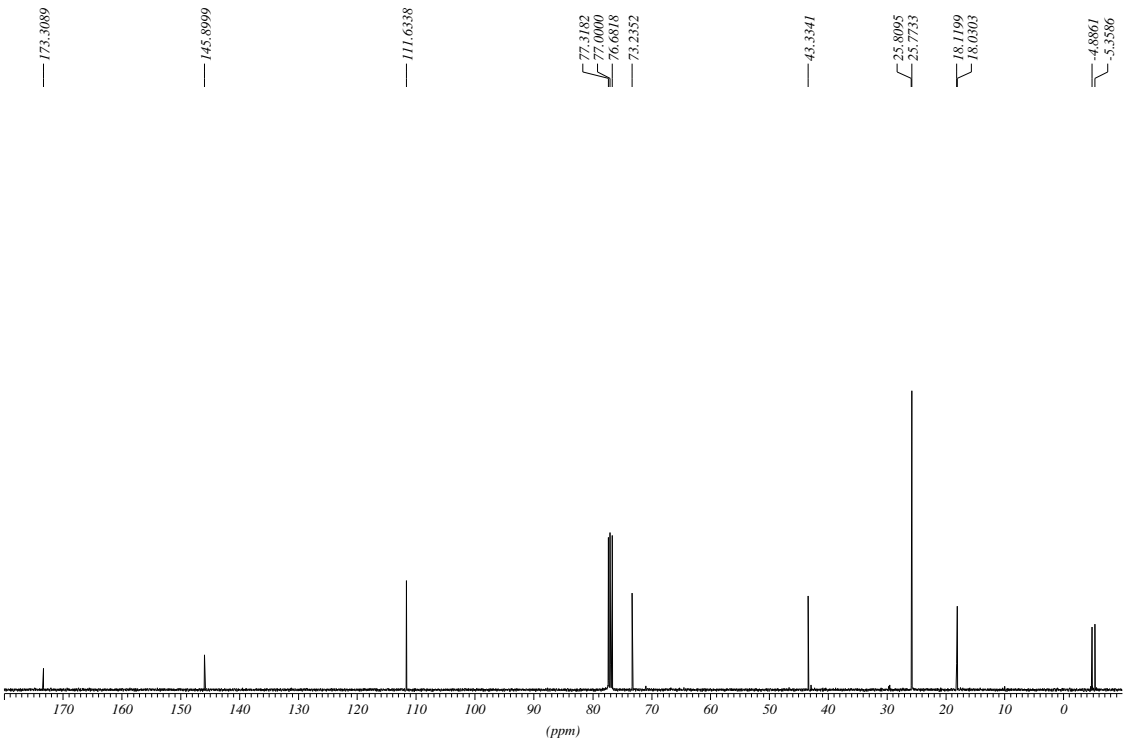

7.2600
TBDPSO
Br
103
AcO
Integral
3.9999
5.9768
1.4894
0.8374
1.0000
1.0026
1.9970
2.0716
2.6949
9.6811
(ppm)
170.5325
156.2702
141.9729
141.1640
135.4227
132.2312
130.0490
127.8337
124.7654
122.1788
121.1971
119.2061
114.9281
77.2537
77.0000
76.7463
65.9861
39.4304
26.4236
20.8386
19.4303
(ppm)

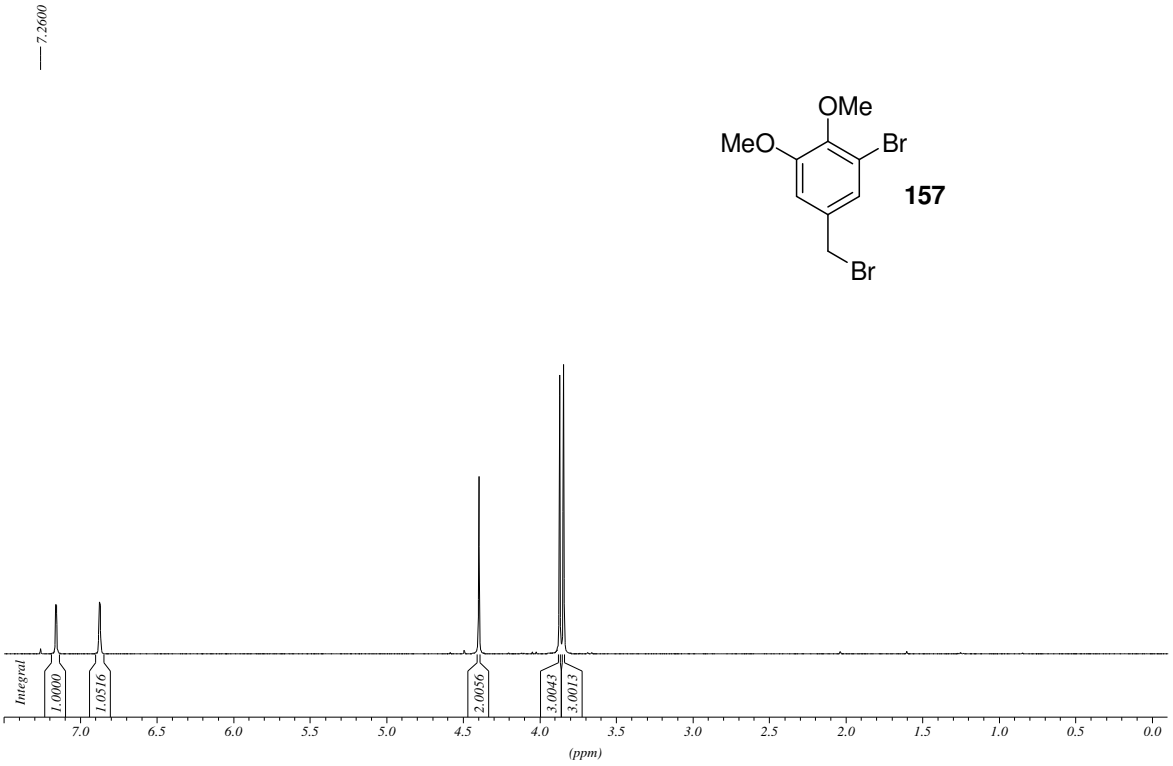

7.2600
TBDPSO
Br
116
OTBS
CO2Et
Integral
4.6051
6.0342
1.0867
0.9675
1.0030
1.0000
1.9537
2.0263
2.0044
3.0225
8.9621
8.9991
6.3839
(ppm)
166.2118
156.1902
147.8356
142.1427
135.4362
132.3897
130.0462
128.5010
127.8266
124.7648
121.9736
120.9543
119.0386
77.3182
77.0000
76.6837
62.0837
60.3842
39.0263
26.4954
26.4268
25.9219
25.8743
19.4745
18.2780
14.0655
1.0088
-5.2291
(ppm)

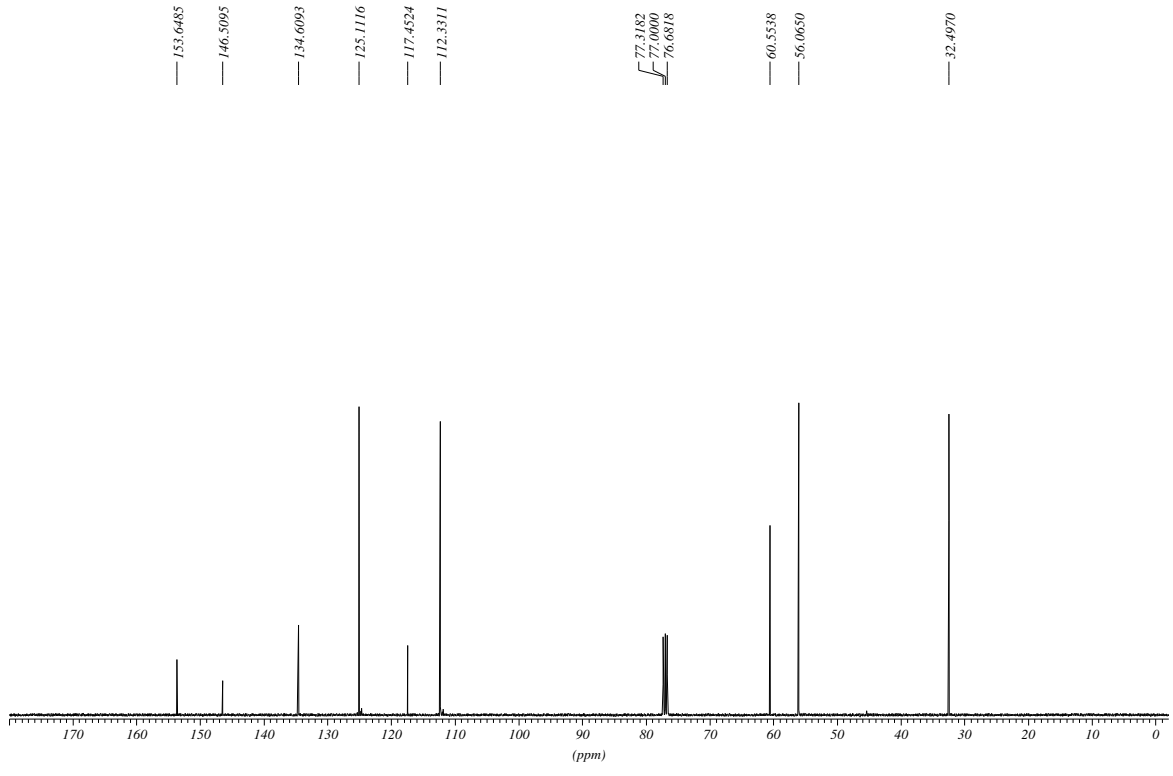

7.2600
TBDPSO
Br
117
O
O
Integral
4.0505
6.0711
1.0000
1.0312
1.0438
1.0191
2.0113
2.0489
8.9886
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

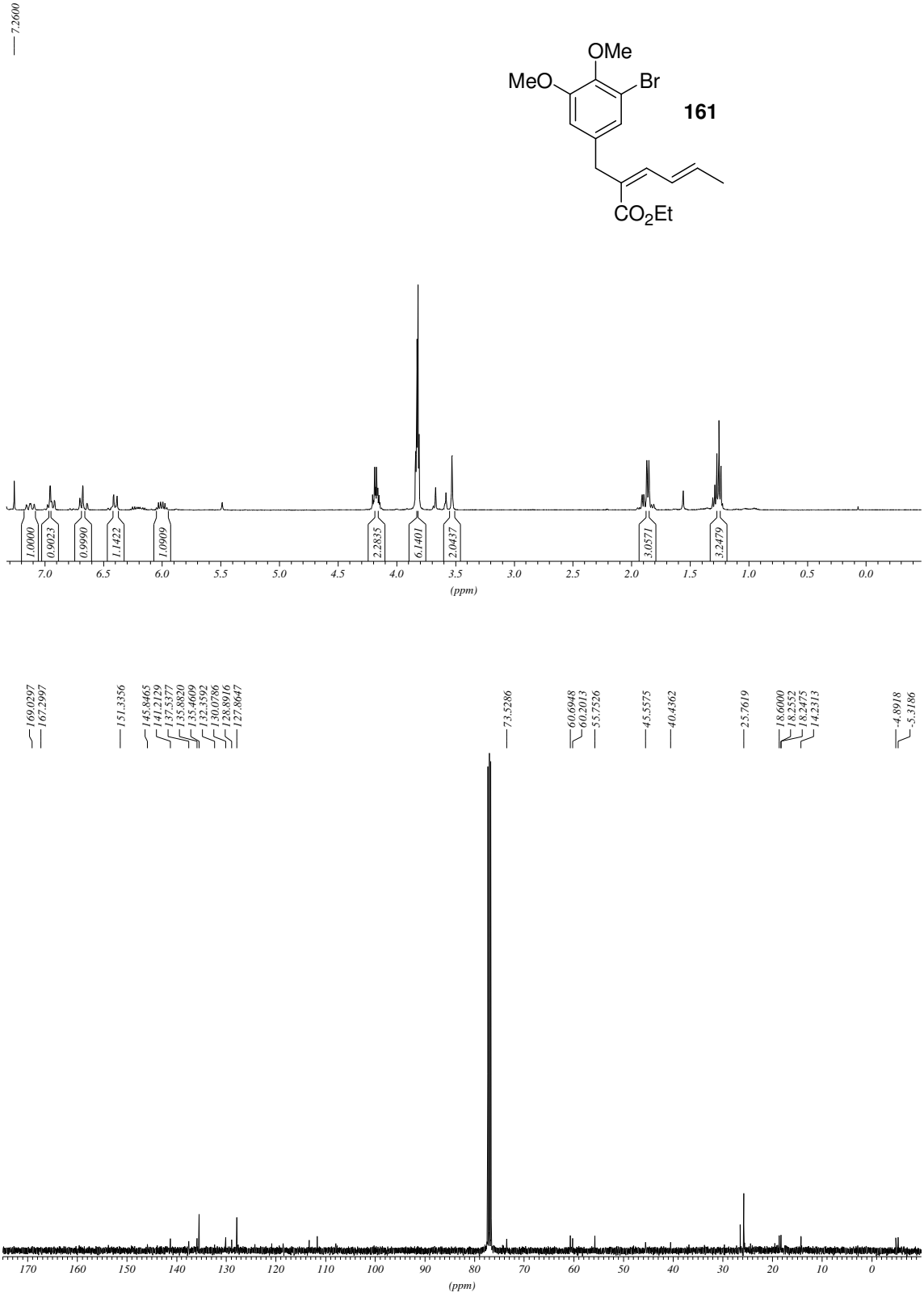

173.4670
156.4531
145.5055
139.7097
135.4590
133.1213
132.1534
130.0595
127.8952
124.8163
122.5700
121.7964
119.0738
77.3163
77.0000
76.6818
70.1182
31.1061
26.3392
19.3793
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

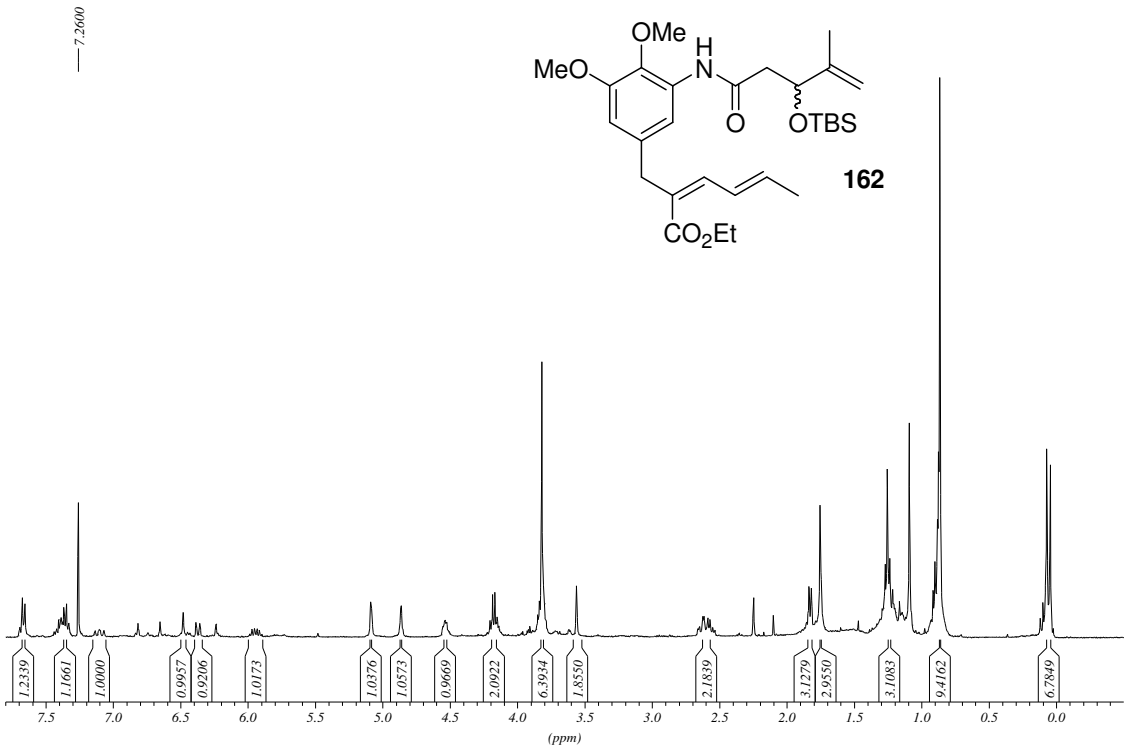

7.2600
H2N
O
OTBS
152
Integral
0.9321
0.9831
1.0000
0.9836
0.9663
2.0436
3.0065
9.1316
6.1037
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

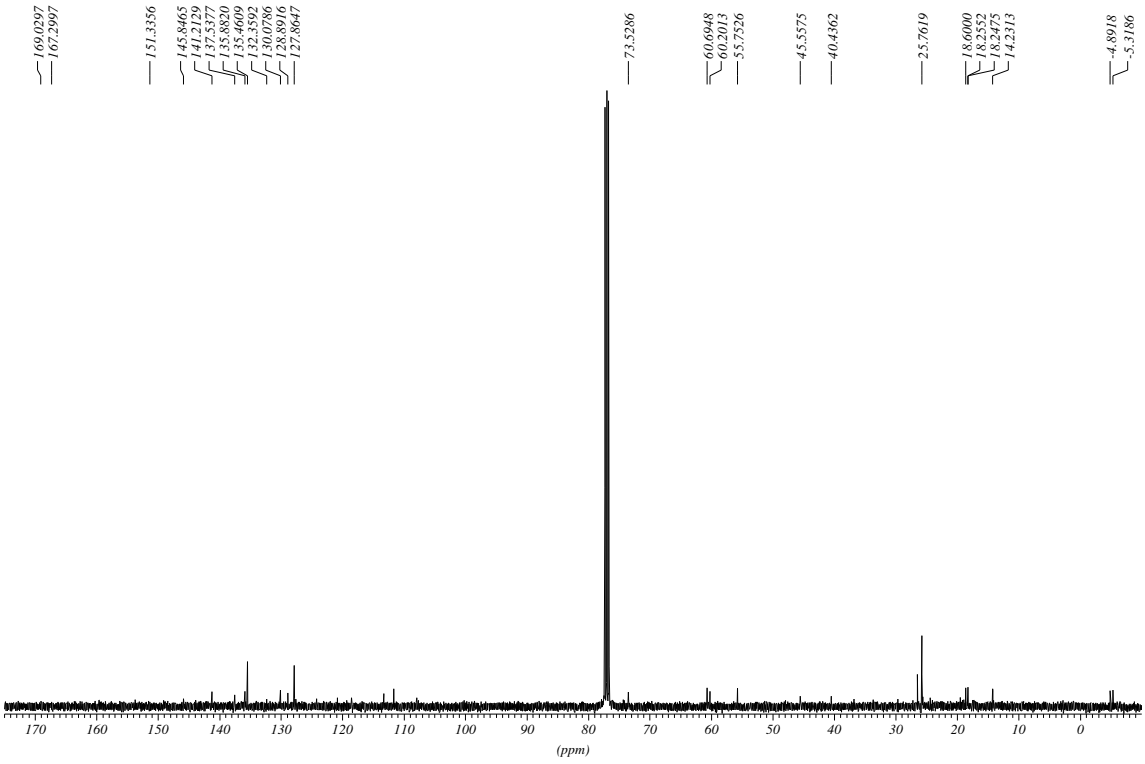

173.3089
145.8999
111.6338
77.3182
77.0000
76.6818
73.2352
43.3341
25.8095
25.7733
18.1199
18.0303
-4.8861
-5.3586
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

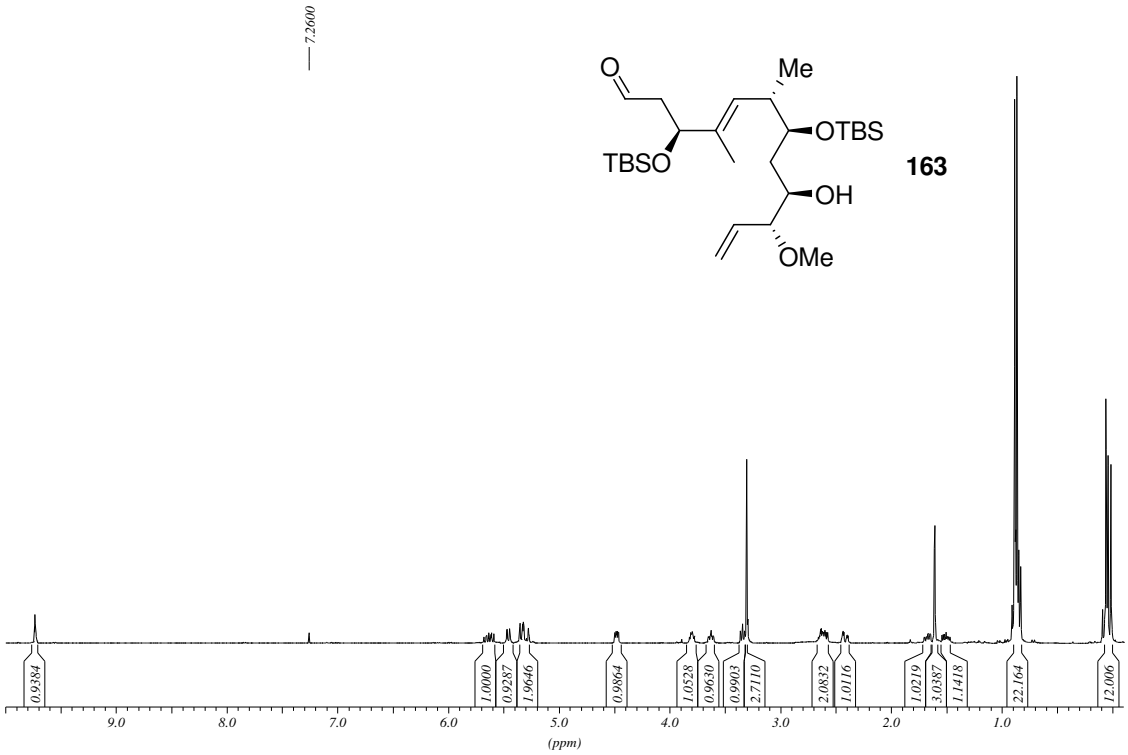

7.2600
OMe
MeO
Br
Br
157
Integral
1.0000
1.0516
2.0056
3.0043
3.0013
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

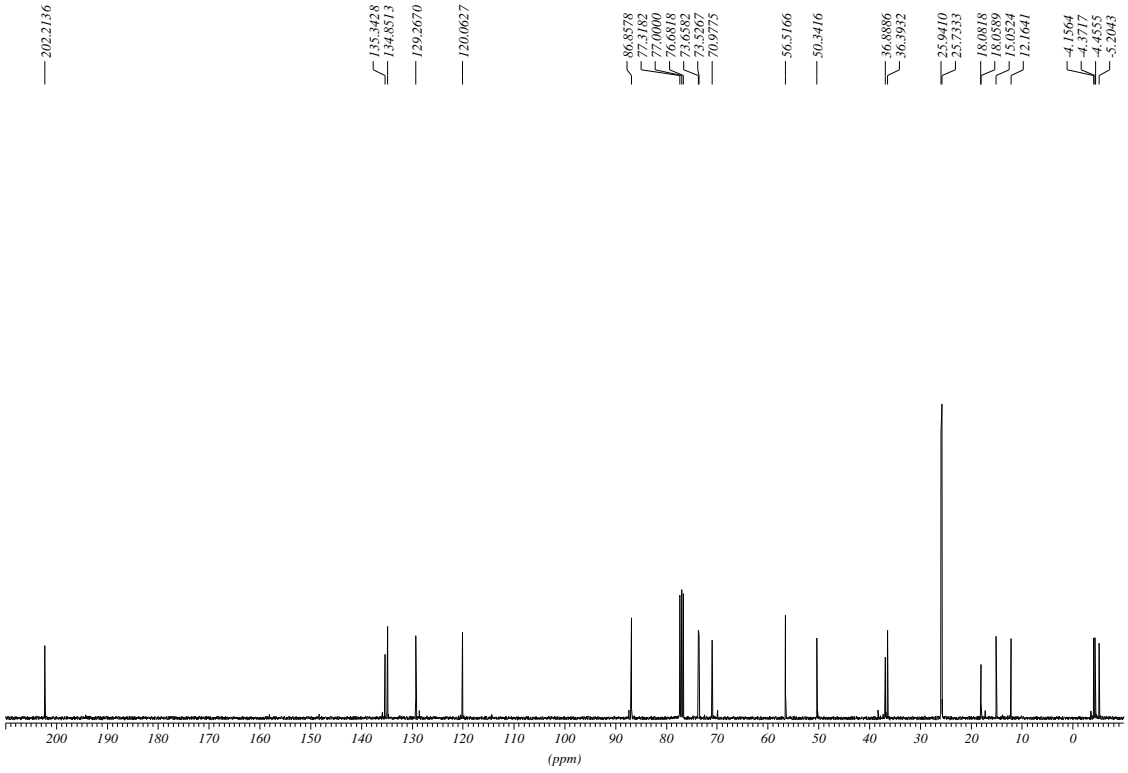

153.6485
146.5095
134.6093
125.1116
117.4524
112.3311
77.3182
77.0000
76.6818
60.5538
56.0650
32.4970
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

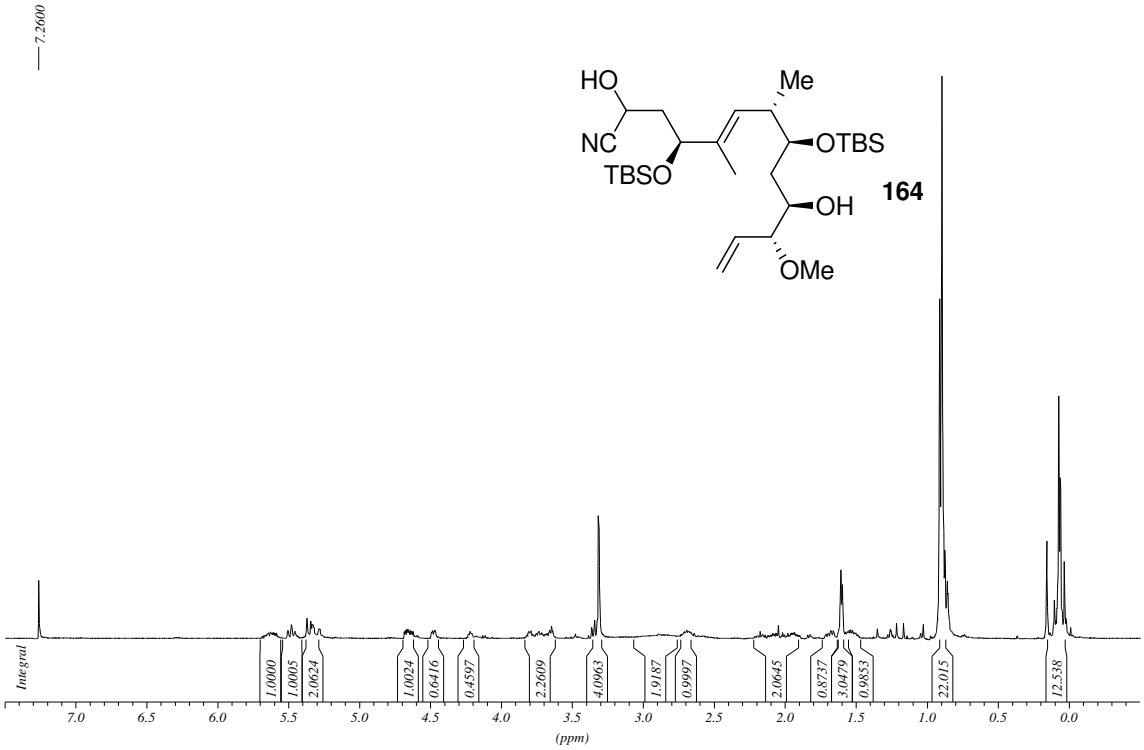

7.2600
OMe
MeO
Br
161
CO2Et
1.0000
0.9023
0.9990
1.1422
1.0909
2.2835
6.1401
2.0437
3.0571
3.2479
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)
169.0297
167.2997
151.3356
145.8465
141.2129
137.5377
135.8820
135.4609
132.3592
130.0786
128.8916
127.8647
73.5286
60.6948
60.2013
55.7526
45.5575
40.4362
25.7619
18.6000
18.2552
18.2475
14.2313
-4.8918
-5.3186
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

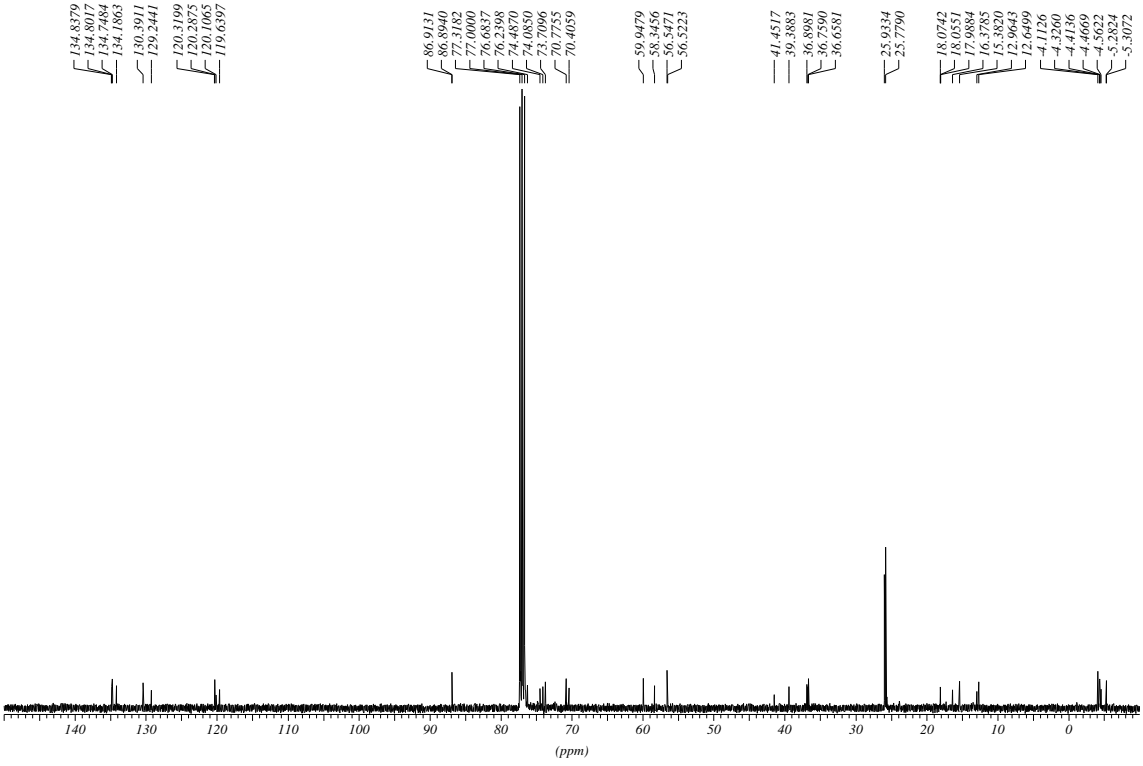

7.2600
OMe
MeO
H
N
O
OTBS
CO2Et
162
1.2339
1.1661
1.0000
0.9957
0.9206
1.0173
1.0376
1.0573
0.9669
2.0922
6.3934
1.8550
2.1839
3.1279
2.9550
3.1083
9.4162
6.7849
(ppm)

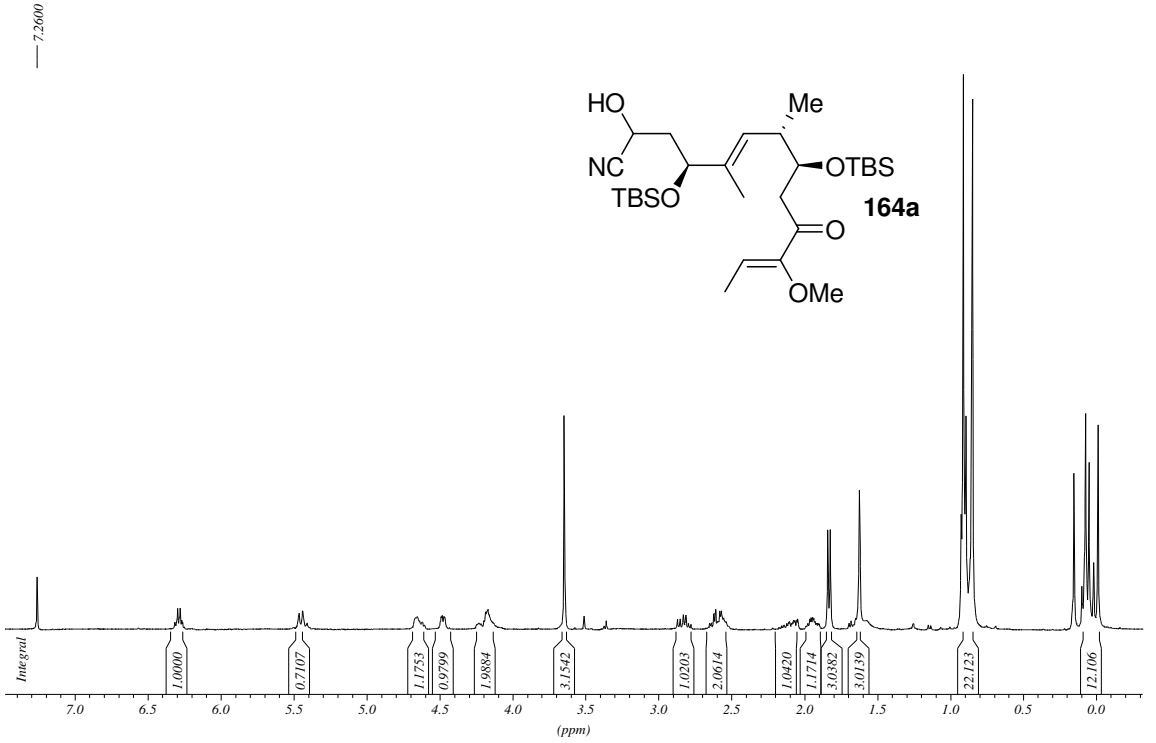

169.0297
167.2997
151.3356
145.8465
141.2129
137.5377
135.8820
135.4609
132.3592
130.0786
128.8916
127.8647
73.5286
60.6948
60.2013
55.7526
45.5575
40.4362
25.7619
18.6000
18.2552
18.2475
14.2313
-4.8918
-5.3186
(ppm)

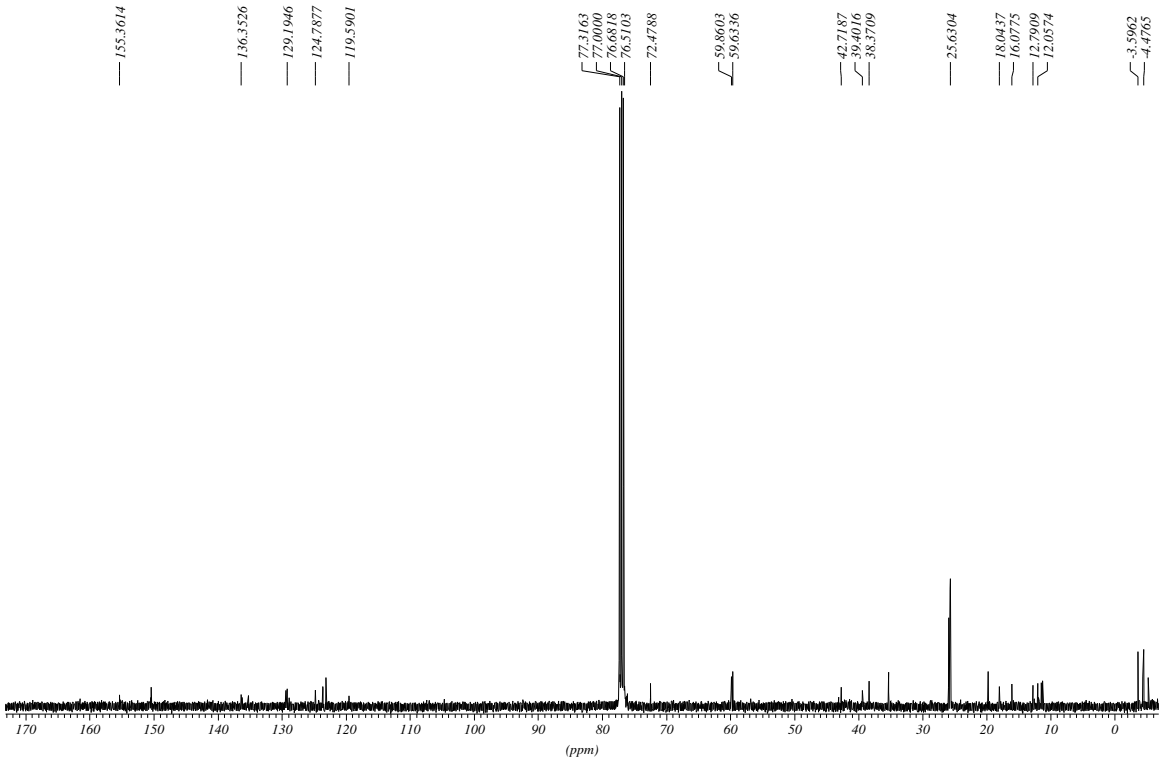

7.2600
O
Me
OTBS
TBSO
OH
OMe
163
0.9384
1.0000
0.9287
1.9646
0.9864
1.0528
0.9630
0.9903
2.7110
2.0832
1.0116
1.0219
3.0387
1.1418
22.164
12.006
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
(ppm)

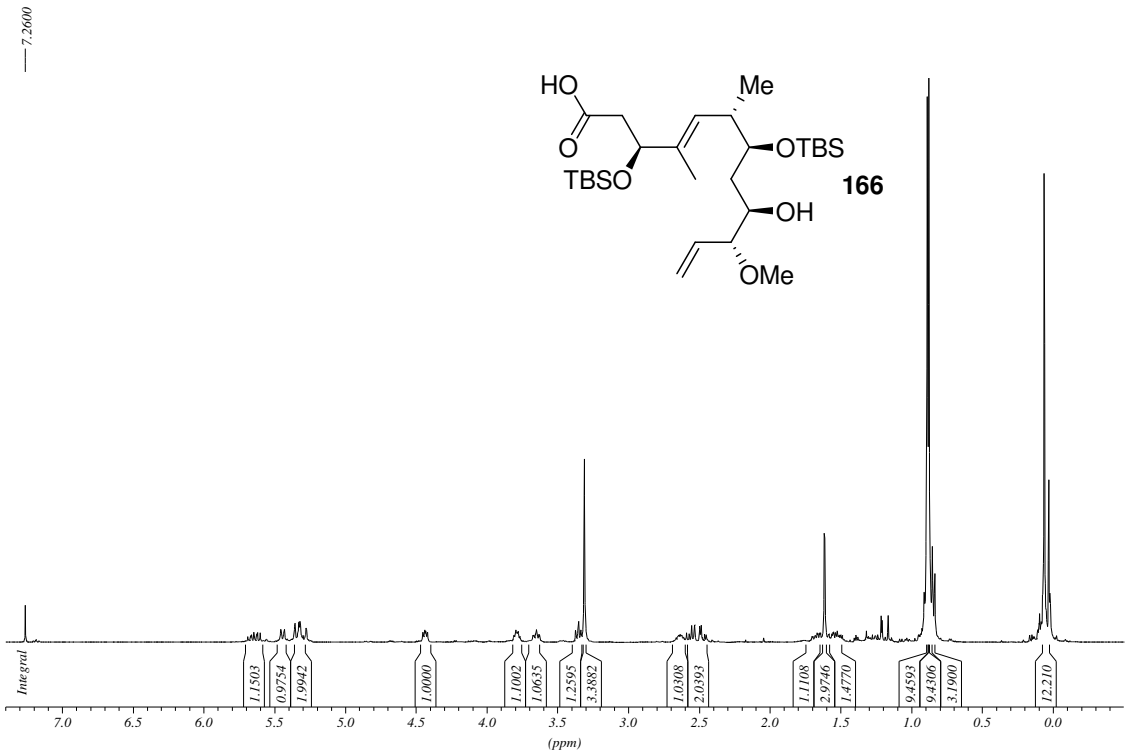

202.2136
135.3428
134.8513
129.2670
120.0627
86.8578
77.3182
77.0000
76.6818
73.6582
73.3267
70.9775
56.5166
50.3416
36.8886
36.3932
25.9410
25.7333
18.0818
18.0589
15.0524
12.1641
-4.1564
-4.3717
-4.4555
-5.2043
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

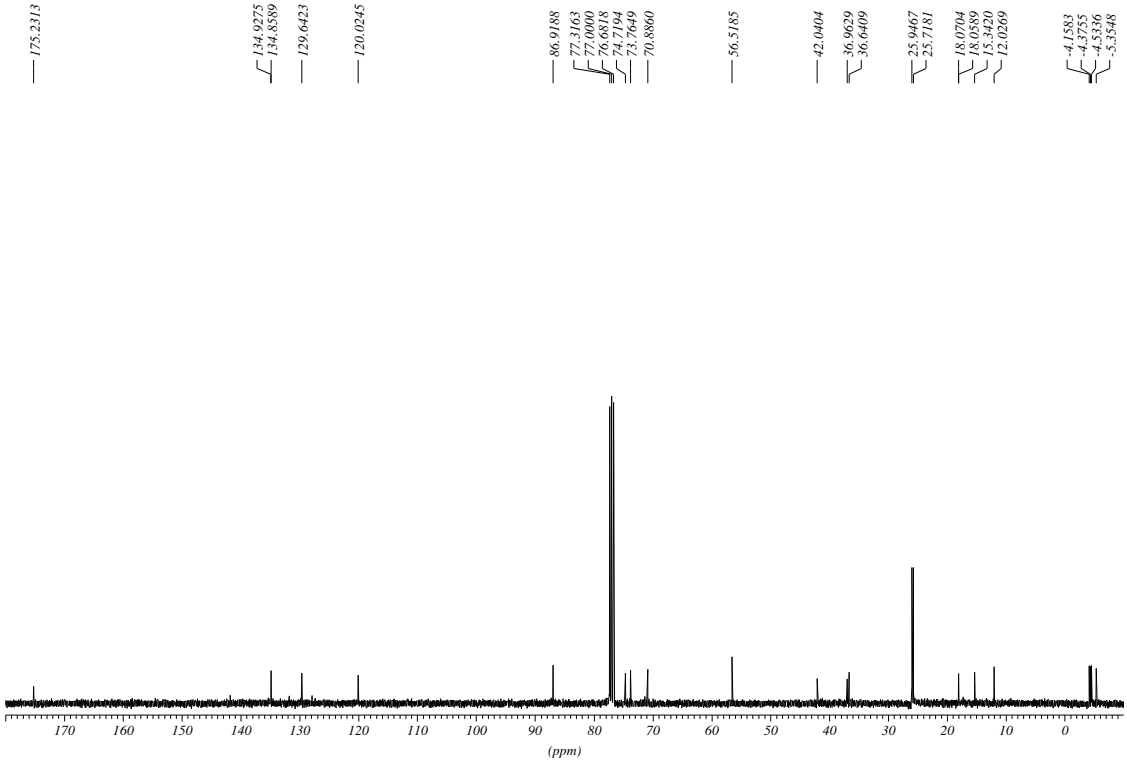

7.2600
HO
Me
NC
OTBS
TBSO
OH
OMe
164
Integral
1.0000
1.0005
2.0624
1.0024
0.6416
0.4597
2.2609
4.0963
1.9187
0.9997
2.0645
0.8737
3.0479
0.9853
22.015
12.538
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)

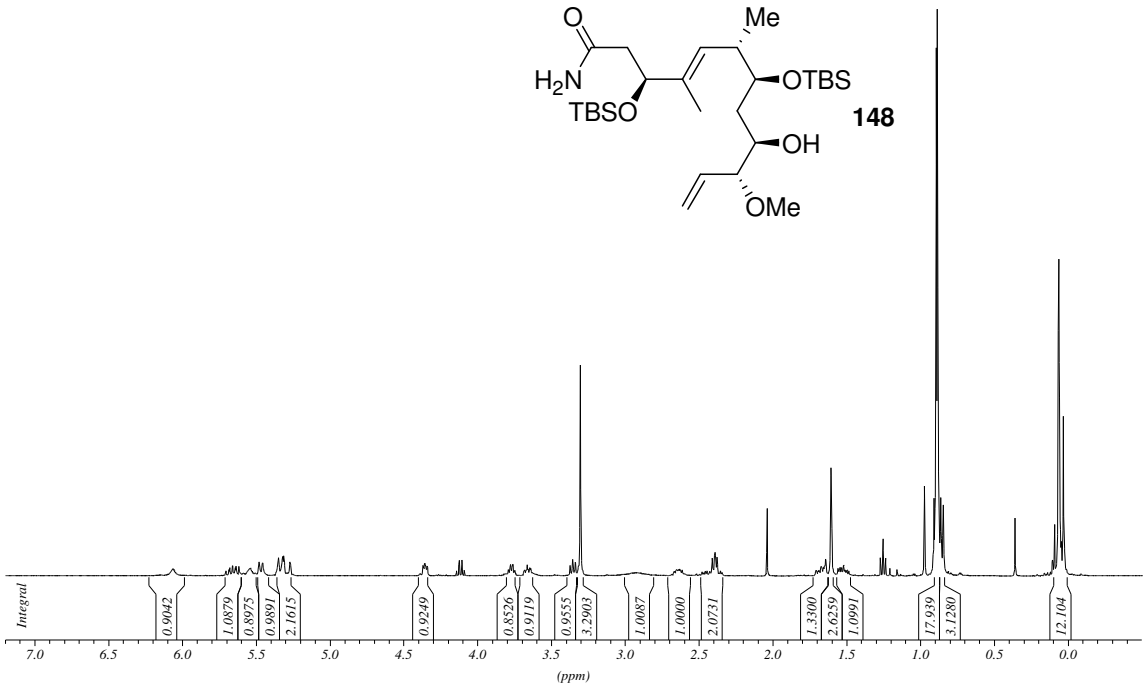

134.8379
134.8017
134.7484
134.1863
130.3911
129.2441
120.3199
120.2875
120.1065
119.6397
86.9131
86.8940
77.3182
77.0000
76.6837
76.2398
74.4870
74.0850
73.7096
70.7755
70.4059
59.9479
58.3456
56.5471
56.5223
41.4517
39.3883
36.8981
36.7590
36.6581
25.9334
25.7790
18.0742
18.0551
17.9884
16.3785
15.3820
12.9643
12.6499
-4.1126
-4.3260
-4.4136
-4.4669
-4.5622
-5.2824
-5.3072
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)

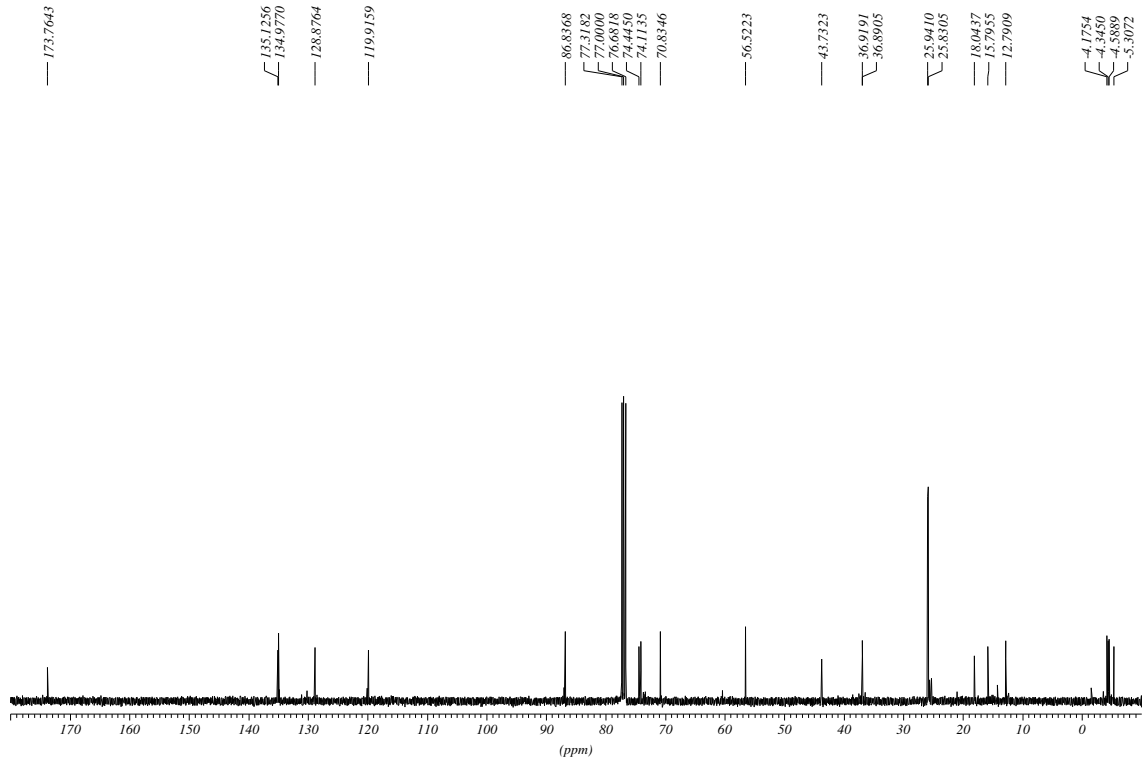

7.2600
HO
Me
NC
OTBS
TBSO
164a
O
OMe
Integral
1.0000
0.7107
1.1753
0.9799
1.9884
3.1542
1.0203
2.0614
1.0420
1.1714
3.0382
3.0139
22.123
12.106
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)


155.3614
136.3526
129.1946
124.7877
119.5901
77.3163
77.0000
76.6818
76.5103
72.4788
59.8603
59.6336
42.7187
39.4016
38.3709
25.6304
18.0437
16.0775
12.7909
12.0574
-3.5962
-4.4765
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)


7.2600
HO
Me
O
OTBS
TBSO
166
OH
OMe
Integral
1.1503
0.9754
1.9942
1.0000
1.1002
1.0635
1.2595
3.3882
1.0308
2.0393
1.1108
2.9746
1.4770
9.4593
9.4306
3.1900
12.210
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
(ppm)


175.2313
134.9275
134.8589
129.6423
120.0245
86.9188
77.3163
77.0000
76.6818
74.7194
73.7649
70.8860
56.5185
42.0404
36.9629
36.6409
25.9467
25.7181
18.0704
18.0589
15.3420
12.0269
-4.1583
-4.3755
-4.5336
-5.3548
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(ppm)


O
Me
H2N
OTBS
TBSO
148
OH
OMe
Integral
0.9042
1.0879
0.8975
0.9891
2.1615
0.9249
0.8526
0.9119
0.9555
3.2903
1.0087
1.0000
2.0731
1.3300
2.6259
1.0991
17.939
3.1280
12.104
7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)


173.7643
135.1256
134.9770
128.8764
119.9159
86.8368
77.3182
77.0000
76.6818
74.4450
74.1135
70.8346
56.5223
43.7323
36.9191
36.8905
25.9410
25.8305
18.0437
15.7955
12.7909
-4.1754
-4.3450
-4.5889
-5.3072
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich an erster Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Andreas Kirschning für seine Unterstützung und Hilfe während dieser Arbeit, aber auch für die Freiheiten, die ich bezüglich der Gestaltung des Projekts hatte. Ich weiss, dass das nicht selbstverständlich ist.

Prof. Markus Kalesse danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich bei Prof. Heinz G. Floss bedanken. Ohne seine grundlegenden Arbeiten und ohne die von seiner Gruppe erzeugte Blockmutante wären große Teile dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen.

Bei Gerald Dräger möchte ich mich für seine Unterstützung in allen Bereichen von A – wie Animpfen - über K – wie Knallvorlesung und Kanutour – und M – wie Massenspektrometrie - bis Z - wie Zuhören - während meiner Zeit im OCI bedanken.

Ein großer Dank geht an meine jetzigen und ehemaligen Laborkollegen Klaas Mennecke, Christoph Brochwitz, Antonella Migliorini, Anja Heutling und Andreas Kipke. Ganz besonders danke ich meiner Laborkollegin Simone Eichner für die lustige und schöne gemeinsame Zeit im Labor und auf unseren Ausflügen.

Ich bedanke mich bei dem ganzen AK Kirschning (was natürlich auch die Ehemaligen mit einschließt) für eine richtig tolle Atmosphäre während der Arbeit, während der Kaffeepausen und auch außerhalb der Arbeitszeit. Das vermisse ich jetzt schon.

Ein besonderer Dank geht an die Mutanten: Florian Taft, Tobi Knobloch, Simone Eichner, Anja Heutling, Anne Pieper und die stillen Teilnehmer Moni Vogt und Sascha Ceylan für die tolle Zusammenarbeit während des gemeinsamen Projekts.

Bei Simone Eichner, Silke Oelze, Anja Heutling, Sascha Ceylan, Nadin Schläger, Jenny Barbier und Martin Bock bedanke ich mich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Danke an alle Kollegen, die mir bei analytischen Messungen und Fragestellungen geholfen haben: Monika Rettstadt, Dagmar Körtje, Edgar Hofer, Jörg Fohrer und Rainer Nöthel.

Danke auch an Kristina Struckmeier und Monika Griese aus dem Sekretariat.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine Eltern, meine Schwestern und meine Oma, die während des ganzen Studiums, aber insbesondere auch in den letzten Jahren, immer hinter mir standen und mich in jeder Hinsicht unterstützt und geholfen haben wo es nur ging.

Zum Schluß geht ein riesiges Dankeschön an meinen Freund Dirk Blumenthal, der das alles mit ertragen musste, mir eine sehr große Stütze war und jetzt außerdem der bestimmt chemisch gebildetste Nichtchemiker der Welt ist.

Lebenslauf

KIRSTEN REBEKKA HARMROLFS

GEBOREN AM 26.05.1979 IN BERLIN, LEDIG.

Schulbildung:

1985 – 1989	Grundschule Schwarmstedt
1989 – 1991	Orientierungsstufe Schwarmstedt
1991 – 1998	Gymnasium Walsrode
26.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

01.08.1998 – 13.06.2001	Ausbildung zur Chemielaborantin bei der „BUNDESANSTALT FÜR GEOWISSENSCHAFTEN UND ROHSTOFFE“ (BGR) in Hannover
14.06.2001 – 30.09.2001	Beschäftigung als Chemielaborantin bei der BGR Hannover

Studium:

01.10.2001 – 13.12.2006	Diplomstudiengang Chemie an der „LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER“
01.08.2005 – 01.11.2005	Schwerpunktpraktikum bei „SOLVAY PHARMACEUTICALS“
15.05.2006 – 15.11.2006	Diplomarbeit am „INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE“ der „LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER“ im Arbeitskreis von Prof. A. Kirschning:

„Synthese eines bromierten Ausschnitts des aromatischen Teils der Ansamitocine und methodische Untersuchungen zur Funktionalisierung mittels katalytischen C-C-Knüpfungen.“

01.12.2006 – 10.06.2010	Doktorarbeit am „INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE“ der „LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER“ im Arbeitskreis von Prof. A. Kirschning:

„Chemische und chemoenzymatische Synthesezugänge zu neuen Ansamitocinderivaten“

Publikationen:

[1] A. Kirschning, K. Harmrolfs, K. Mennecke, J. Messinger, U. Schön, K. Grela: “Homo- and Heterogeneous Ru-based Metathesis Catalysts in Cross-Metathesis of 15-Propenyl Estrone - Towards 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors”, *Tet.Lett.*, **2008**, *49*, 3019-3022.

[2] A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch: “The chemistry and biology of the maytansinoid antitumor agents”, *C. R. Chim.* **2008***, 11*, 1523-1543.

Wissenschaftliche Vorträge:

[1] “Ansamitocin compound libraries by mutasynthesis”, Vortrag, The Chemistry and Biology of Natural Products IV, Bristol UK, **2008**.

[2] “New Ansamitocin-derivatives using a mutabiosynthetic approach”, Posterpräsentation, 42nd IUPAC-Congress: Chemistry Solutions, Glasgow UK, **2009**.