

Chemische Synthese von Struktur- modifikationen des Naturstoffs Collinolacton zur Target-Identifizierung und Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR)

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Jan-Niklas Fricke
aus Hamburg

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

07.11. 2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephanie Grond

2. Berichterstatter:

Prof Dr. Thomas Ziegler

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen sowie im Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen von Januar 2009 bis Juni 2012 durchgeführt.

Ich danke Frau Prof. Dr. Stephanie Grond herzlich für die interessante Aufgabenstellung und für die wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Abkürzungsverzeichnis

4-PPy	4-(1-Pyrrolidiny)pyridin	DMSO	Dimethylsulfoxid
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation	DNBG	Dilute Nutrient Broth Gellan
ATP	Adenosintriphosphat	EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid hydrochlorid
BHB	4-Brom-2-Hydroxy- benzoesäure	Eq	Äquivalente
CAN	Cerammoniumnitrat	ESI	Elektrospray-Ionisation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	HMB	4-(Hydroxymethyl)- benzoesäure-Spacer
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]- undec-7-en	HMPA	Hexamethylphosphorsäuretri amid
DC	Dünnschichtchromatographie	HPE	4-Hydroxyphenylessigsäure- Spacer
DCM	Dichlormethan	HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4- benzochinon	HR	High Resolution
DEAC	7-(Diethylamino)coumarin-3- carbonsäure	HTS	High Throughput Screening
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid	HV	Hochvakuum
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin	HVG	Humin Vitamin Gellan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	ICAT	Isotope coded affinity tag

ITRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantification	PPTS	Pyridinium <i>p</i> -Toluolsulfonat
K _d	Dissoziationskonstante, Maß für die Affinität eines Liganden zu einem Protein	R _f	Retentionsfaktor
KSP	Kinesin Spindel Protein	RP	Reversed Phase
LC/MS	Mit Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie	rpm	Umdrehungen pro Minute
LDA	Lithiumdiisopropylamid	RT	Raumtemperatur
Lev	Lävulinoyl	SAR	Structure Activity Relationship
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation	SDS	Natriumdodecylsulfat
MANT	<i>N</i> -Methylantraniloyl	SILAC	Stable Isotope Labeling
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography	SILIC	Stable Isotope Labeled Inhibitors for Cross-Linking
MS	Massenspektrometrie	SPE	Solid Phase Extraction
n.t.	Nicht getestet	TBAB	Tetra- <i>n</i> -butylammonium-bromid
PAL	Photoaffinity Labeling	THF	Tetrahydrofuran
PEG	Polyethylenglykol	t _R	Retentionszeit
PMB	<i>p</i> -Methoxybenzyl	vvm	Volumen Luft pro Flüssigkeitsvolumen und Minute
ppm	parts per million		

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil

1	Einführung: Aktuelle Konzepte der Krebstherapie.....	1
2	Aufgabenstellung	9
2.1	Der Cyclodecatrien-Naturstoff Collinolacton (20a, 20b)	9
2.2	Synthese oxidierter Derivate des Naturstoffes Brevinsäure(22)	11
2.3	Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Aktinomyceten	11
3	Der Cyklodecatrien-Naturstoff Collinolacton (20a, 20b) aus <i>Streptomyces sp.</i>.....	12
3.1	Biologische Aktivität von Collinolactonderivaten.....	14
4	Synthesestudien zu Collinolacton-Glykosiden.....	17
4.1	Stabilität von Collinolacton (20a, 20b) unter synthetischen Bedingungen.....	18
4.2	Synthesestrategie zu Collinolactonglykosiden.....	21
4.3	Analyse der Zerfallsprodukte von Collinolacton (20a, 20b) unter lewis-sauren Bedingungen.....	25
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	28
5	Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Derivaten des Naturstoffes Collinolacton (20a, 20b)	29
5.1	Einleitung: Strategien der Target-Identifizierung von biologisch aktiven Naturstoffen	29
5.2	Ausgangspunkt der Identifizierung des Wirkortes von Collinolactonderivaten	39
5.3	Fluoreszenzmarkierung	40
5.4	Konzept des Target-Fishings nach an Collinolactonderivate bindenden Proteinen: Strategie I - Glutarsäure- und Terephtalsäure-Spacer	48
5.5	Target-Fishing Strategie II: 4-Brom-2-Hydroxybenzoesäure (BHB)-, Glutarsäure- und Terephtalsäurespacer	54
5.6	Studien zu Reaktionsbedingungen zur Synthese von 4-O-Collinolacton-Analoga.....	64

5.7 Target-Fishing Strategie III: 4-(Hydroxymethyl)benzoyl-(HMB)- und 4-Hydroxyphenyl-essigsäure-(HPE)-Spacer	68
6 Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) und biologischer Aktivität von Collinolactonderivaten	87
6.1 Einleitung: Kinesin-Motorproteine und bipolare Spindelbildung in der Mitose.....	87
6.2 Studien der biologischen Aktivität von Collinolactonderivaten	90
6.3 Untersuchungen zur Bildung monoastraler Halbspindeln und Zytotoxizität	91
6.4 Wirkungen auf das Aktinzytoskelett	102
6.5 Untersuchung des Wirkmechanismus	106
6.6 Weitere Untersuchungen zur biologischen Aktivität.....	109
6.7 Diskussion der Aktivität von Collinolactonabbauprodukten.....	111
6.8 Zusammenfassung der zellbiologischen Phänomene durch Collinolactonderivate.....	114
7 Synthese von oxidierten Derivaten des Naturstoffes Brevinsäure (23, 168).....	116
7.1 Synthese, Stabilität und Chromatographie.....	117
7.2 Biologische Aktivität	121
7.3 Diskussion des Brevinsäureprojektes	122
8 Produktion von Collinolacton (20a, 20b) aus <i>Streptomyces sp.</i> Gö40/10	123
8.1 Optimierung der Sauerstoffzufuhr	123
8.2 Medienoptimierung.....	124
8.3 Produktion	125
9 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Actinomyceten	127
9.1 Konzept des umweltmimetischen Naturstoff-Screenings	128
9.2 Isolierung seltener Actinomyceten	130
9.3 Der Stamm FJ-4-B4.1b	132
9.4 Zusammenfassung und Diskussion des Screening-Ansatzes	134
10 Zusammenfassung der Ergebnisse	135
11 Summary of results.....	139

B. Experimenteller Teil

1 Instrumentelle Analytik	143
1.1 Chromatographische Methoden.....	144
1.2 Mikrobiologische Methoden und Geräte	149
2 Collinolacton-Produktion aus <i>Streptomyces sp. Gö 40/10</i>.....	152
2.1 Stammhaltung.....	152
2.2 Standard-Vorkulturen.....	152
2.3 Standardkultivierung in Schüttelkolben.....	152
2.4 Kultivierung in Fermentern.....	152
2.5 Optimierung des Nährmediums	154
2.6 Aufarbeitung	155
2.7 Chromatographische Aufreinigung	155
3 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Actinomyceten	157
4 Synthesestudien zu Collinolacton-Glykosiden.....	161
5 Synthese-Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Derivaten des Naturstoffes Collinolacton (20a, 20b)	170
5.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Collinolacton-Derivate	170
5.2 Target-Fishing-Strategie I: Glutarsäure-Spacer.....	178
5.3 Target-Fishing-Strategie I: Terephtalsäure-Spacer	184
5.4 Target-Fishing-Strategie II: Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker.....	191
5.5 Target-Fishing-Strategie II: Terephtalyl-Nitrobenzyl-Linker	196
5.6 Target-Fishing-Strategie II: 4-Brom-2-hydroxybenzoyl-Spacer (BHB-Spacer)	201
5.7 Target-Fishing-Strategie III: 4-(Hydroxymethyl)-Benzoessäure (HMB)-Spacer	211
5.8 Target-Fishing-Strategie III: 4-Hydroxyphenylelessigsäure (HPE)–Spacer.....	224
6 Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR)- und biologischer Aktivität von Collinolactonderivaten	231
6.1 Einfluss des Collinolacton-Gerüsts	231

6.2	Strukturoptimierung der Benzoessäureeinheit biologisch aktiver Collinolactonanaloga.....	238
6.3	Studien der biologischen Aktivität von Collinolactonderivaten	256
7	Synthese von oxidierten Derivaten des Naturstoffes Brevinsäure (23, 169).....	260
C.	Literaturverzeichnis	266
D.	Danksagung	279

A. Theoretischer Teil

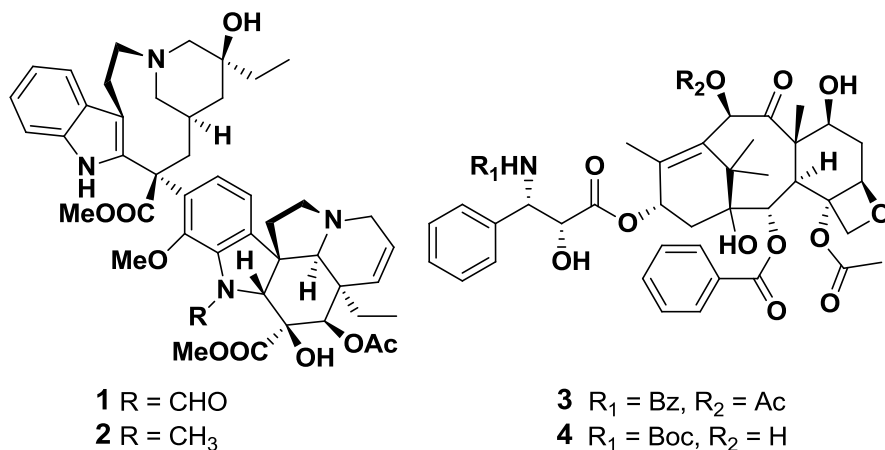
1 Einführung: Aktuelle Konzepte der Krebstherapie

Aktueller Überblick

Krebserkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen in modernen industriellen Gesellschaften. Längere Lebenserwartung, vielfältige schädliche Umwelteinflüsse und starkes Wachstum der Weltbevölkerung führen seit Jahren zu einer weltweiten Zunahme von Krebserkrankungen. Schätzungen der Internationalen Agentur für Krebsforschung in der Weltgesundheitsorganisation (IARC-WHO) gehen von einer Zunahme der jährlichen Krebstoten von 6.7 Mio. 2002 auf 17.0 Mio. 2030 aus^[1]. Trotz dieser Zahlen haben Fortschritte in der Krebstherapie zu einer verringerten Mortalität in vielen Krebsarten geführt. Auswertung der relativen 5- bzw. 10-Jahresüberlebensraten in den USA zwischen 1998 und 2003 zeigte eine signifikante Verbesserung für 14 von 24 untersuchten Krebsarten. Stärkste Veränderungen konnten bei Prostata- und Nierenkrebs sowie Non-Hodgkin-Lymphoma festgestellt werden. Ebenso waren 90 % der Brustkrebspatienten 5 Jahre nach Behandlungsbeginn noch am Leben^[2]. Vermehrt auftretende Resistenzen gegen gängige Krebstherapeutika^[3] und schwere Nebenwirkungen erfordern weitere Forschungen hin zu neuen, minimalinvasiven Therapieansätzen.

Frühe Krebstherapeutika wurden aufgrund ihrer *in vitro* entdeckten zytotoxischen Wirkung gegenüber Krebszellen identifiziert und weiterentwickelt. Sie zielen auf essentielle Zellfunktionen, die in Krebszellen wie auch in gesunden Zellen vertreten sind. Aufgrund der schnellen Teilung und Vermehrung von Krebszellen wird eine Unterscheidung erreicht, die jedoch einen geringen therapeutischen Index und oft schwere Nebenwirkungen zur Folge hat^[4]. Gängige Mitosehemmer^[5] der Vinca Alkaloide (Vincristin, **1**, Vinblastin, **2**) oder Taxane^[6] (Paclitaxel, **3**, Docetaxel, **4**) wirken zum Beispiel auf die Tubulindynamik und verhindern somit die Tei-

lung maligner Zellen. Tubulin ist allerdings auch ein wichtiger Bestandteil des neuronalen Transports, sodass Tubulinhemmer schwere Nebenwirkungen wie sensorische Neuropathie und kumulative Neurotoxizität besitzen^[7].

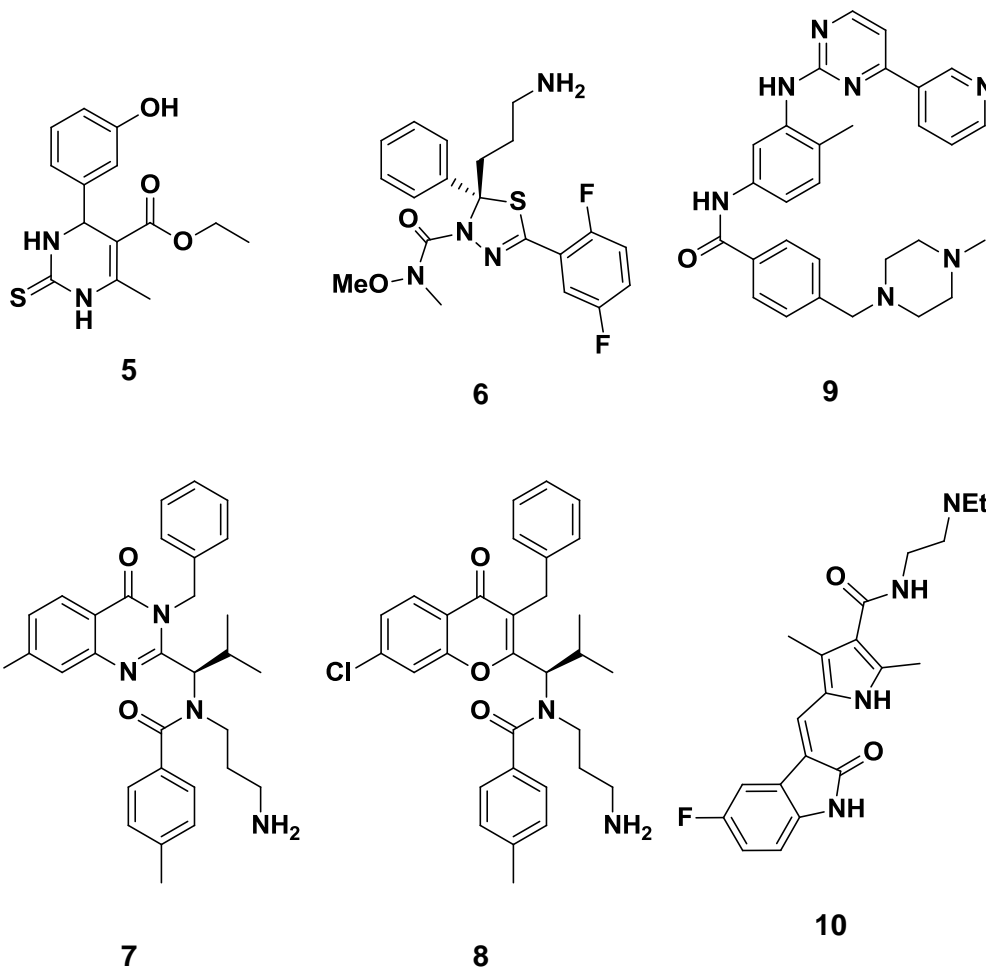


Modernere Ansätze der Chemotherapie verfolgen daher den auf Ehrlichs Magische-Kugel-Theorie zurückgehenden Ansatz, über selektive Wirkstoffe Nebenwirkungen zu minimieren. Ausgehend von geeigneten Wirkorten werden in Hochdurchsatz-Screenings (HTS) selektiv an diese bindende Wirkstoffe identifiziert. Ist *in vivo* ebenfalls Inhibition von Tumorwachstum festzustellen, so kann von einem selektiven Wirkmechanismus ausgegangen werden. Alternativ können durch Rational Design synthetisch selektive Wirkstoffe mit geeigneten pharmakologischen Eigenschaften und verbessertem therapeutischen Index für ein ausgewähltes Target entwickelt werden.^[4, 8]

Kinesin-Inhibitoren

Einen interessanten, selektiveren Ansatz der Mitosehemmung verspricht die neue Gruppe der Kinesin Spindel Protein (KSP)-Hemmer^[9]. Diese durch die Entdeckung von Monastrol (**5**)^[10] in einem HTS-Screening erstmals bekannt gewordenen Wirkstoffe hemmen Mikrotubuli assoziierte Kinesin-Motorproteine wie Eg5 oder CENPE (centromer protein E) und induzieren einen monoastralen Phänotyp während der Mitose. Zelltod durch Apoptose ist die Folge^[9a] (s. auch Kap. 6). In bisherigen Untersuchungen konnte dieser selektiv die Zellteilung verhindernde Mechanismus in nicht-teilenden Zellen gängige Nebenwirkungen der Krebsthera-

pie wie Neuropathie, gastrointestinale Toxizität und Haarausfall vermeiden^[11]. Der am weitesten fortgeschrittene Wirkstoff Ispinesib (SB-715992, **7**, *Cytokinetics*) zeigte allerdings in Phase II der klinischen Studien keine signifikante Aktivität, wahrscheinlich aufgrund von Resistenz durch Effluxpumpen (MDR1)^[9b]. Verschiedene Wirkstoffe der zweiten Generation wie Ispinesib-Analogon ARRY-520 (**6**, *Array Biopharma*)^[12] oder SB-743921 (**8**) oder werden zurzeit in klinischen Studien der Phase I und II untersucht. Erste Ergebnisse erscheinen viel versprechend^[13].



Tyrosin-Kinase-Hemmstoffe

Anfang der 2000er Jahre belegte außerdem die Einführung der neuen Gruppe der Tyrosinkinasehemmer^[14] den Erfolg selektiver Krebstherapeutika. Mutierte Tyrosinkinasen fördern unkontrollierte Zellproliferation und spielen eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese. Die Hemmung dieser nichtessentiellen Proteine

führt zu geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu generell zytotoxischen Medikamenten. Tyrosinkinase-Zytostatika werden bei renalen Karzinomen (z.B. Sorafenib^[15], *Bayer*), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (z.B. Erlotinib^[16], *Hoffmann-La Roche*), Mammakarzinoma (Lapatinib^[17], *GlaxoSmithKline*) und weiteren Krebsarten eingesetzt. Der ebenfalls gegen gastrointestinale Stromatumoren (GIST) wirksame Wirkstoff Imatinib^[18] (Glivec, **9**, *Novartis*) ermöglichte weiterhin durch Inhibition der Tyrosinkinase BCR-ABL erstmals eine Therapie von Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) mit hohen Erfolgsraten. Erste Langzeitstudien zeigen, dass nach 5 Jahren bis zu 90 % der Patienten keine Krebszellen mehr aufweisen^[19]. Es konnte jedoch bewiesen werden, dass die eingeschränkte Sichtweise von einem Wirkstoff und einem Target-Protein nicht zutreffend ist. Imatinib hemmt ebenfalls C-Abl Kinase in gesunden Zellen, was langfristig zu Cardiotoxizität führen kann^[20]. Noch eindrucksvoller zeigt dies bei renalen Karzinoma angewendetes Sunitinib^[21] (**10**, *Pfizer*). **10** bindet an 79 Protein-Kinasen mit einem K_d unter $10 \mu\text{M}$ ^[22]. Trotz dieser Vielzahl an Bindungspartnern werden verhältnismäßig geringe Nebenwirkungen festgestellt. Diese Ergebnisse belegen die Notwendigkeit einer detaillierten Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und dem gesamten Proteom humaner Zellen.

PI3K/Akt-Hemmstoffe

Eine Weiterführung des Ansatzes der Tyrosinkinasehemmung wird zurzeit durch Inhibition des ebenfalls an der Tumorgenese beteiligten Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges untersucht^[23] (s. Abb. 1). Ein interessanter neuer Ansatz ist hier die allosterische Hemmung der Kinase Akt durch beispielsweise den Naturstoff Lactoquinomycin (**11**, aus *Streptomyces sp.* LL-AF101)^[24]. Viele Kinasehemmer binden an die ATP-Bindungsstelle der Enzyme. Die Fokussierung auf einen kompletten Signalweg zeigt die heutige Bedeutung des Verständnisses der als Interaktomik bezeichneten Protein/Protein-Wechselwirkungen. Selektive Inhibitoren tragen zu einem Verständnis dieser Wechselwirkungen bei und helfen somit auch potentielle Nebenwirkungen besser vorhersagen zu können.

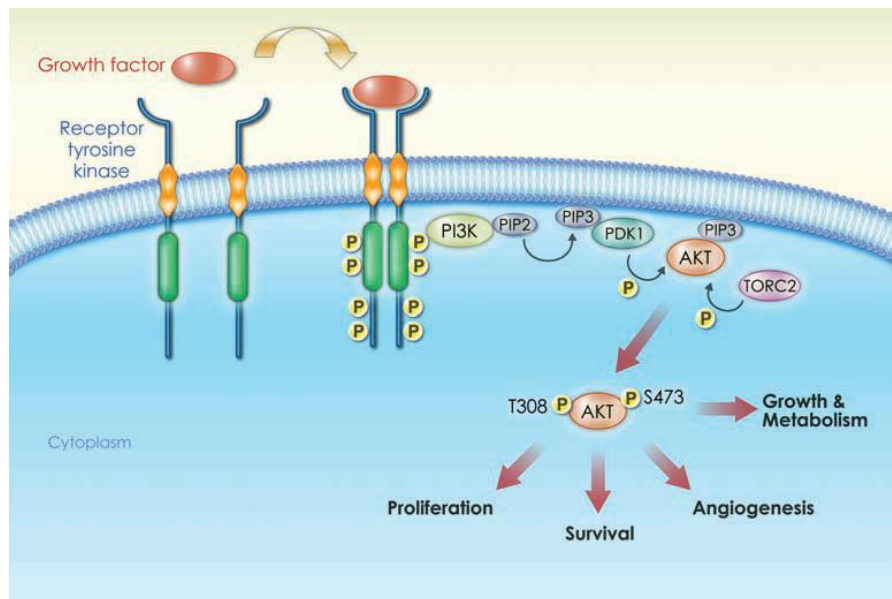
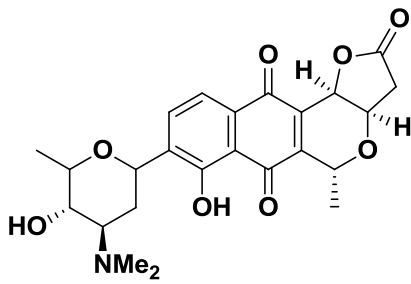


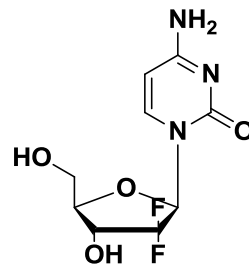
Abb. 1: Schematischer Aufbau des PI3K/Akt-Signalweges (Abb. aus [23]).

Vom Target-orientierten Ansatz zum Kontext-orientierten Ansatz

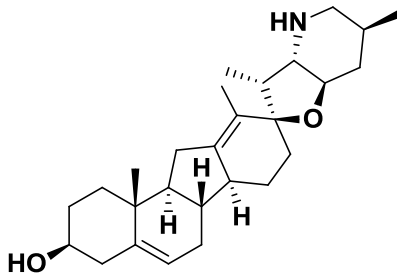
Die auch als Netzwerk-Pharmakologie^[4] bezeichnete Fokussierung auf multiple statt einzelner Wirkorte bietet die Chance, Resistenzmechanismen zu umgehen, welche durch Mutation einzelner Aminosäuren entstehen. In der Netzwerk-Pharmakologie können beispielsweise Kombinationstherapien selektiv wirkender Stoffe mit unterschiedlichen Wirkorten genutzt werden, wie bereits erfolgreich in der antiretroviralen Therapie bei HIV-Erkrankungen bewiesen. Ebenfalls können synergistische Wechselwirkungen von Wirkstoffen genutzt werden, die einzeln eventuell nicht ausreichend zytostatisch wirken^[4]. Inhibitoren des aus Entwicklungsprozessen bekannten Hedgehog-Signalweges^[25] unterbinden Tumorstadium und Metastasierung durch Unterbrechung der Kommunikation zwischen dem Tumor und der ihn versorgenden Umgebung. Wirkstoffe wie das aus dem Naturstoff Cyclopamin (**13**) entwickelte Derivat Saridegib (IPI-926, **14**, *Infinity Pharmaceuticals*) sind bisher alleine nicht ausreichend, um Krebszellen zu töten^[26]. Eine Kombinationstherapie aus IPI-926 und dem zytotoxischen Cytidin-Analogen Gemcitabin (**12**, *Eli Lilly*) zeigte jedoch eine deutlich erhöhte Überlebensrate von Patienten mit Gemcitabin-Resistenz^[27].



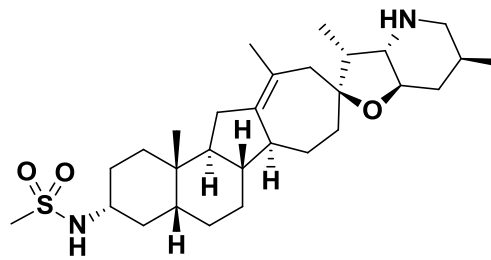
11



12



13



14

Das Beispiel des Hedgehog-Signalweges zeigt eine heute verbreitete Umorientierung vom Target-orientierten Ansatz hin zum Kontext-orientierten Ansatz^[28]. Der kontext-orientierte Ansatz nutzt zur Entwicklung selektiver Zytostatika mit breitem therapeutischen Index intrinsische genetische oder epigenetische Veränderungen der Krebszellen sowie extrinsische Veränderungen der Mikroumgebung des Tumors. Diese Veränderungen bewirken eine erhöhte Abhängigkeit der Krebszellen von bestimmten Targets („Oncogen addiction“)^[29]. Verschiedene mögliche Abhängigkeiten sind hier denkbar. Beispielsweise führt genetisch bedingter Ausfall eines von zwei kollateralen Signalwegen zu einer erhöhten Abhängigkeit vom anderen Signalweg. Solche Gen-Gen vermittelten Abhängigkeiten werden als Synthetic Lethality^[28, 30] bezeichnet. In diesem Fall wird die Mutation von Gen A oder Gen B toleriert, sind jedoch beide mutiert, führt dies zum Zelltod. Hemmt nun ein Wirkstoff das in Gen B kodierte Enzym, so hat dies in gesunden Zellen keinen Effekt. In der Tumorzelle vorhandene Mutation von Gen A führt in Kombination selektiv zum Absterben der Zelle. Möglicherweise wirken bereits einige zugelassene Krebsmedikamente zumindest teilweise durch Synthetic Lethality. Noch ist allerdings die Kenntnis molekularer Netzwerke in Zellen rudi-

mentär. Genomweite RNA-Interferenz-Screenings und chemische Screenings unter Vergleich des Wildtyps einer Zelle und ihrer Tumor-Supressor-Gen-defizitären Mutante ermöglichen erstmals HTS-Identifikation von oncogener Abhängigkeit^[28].

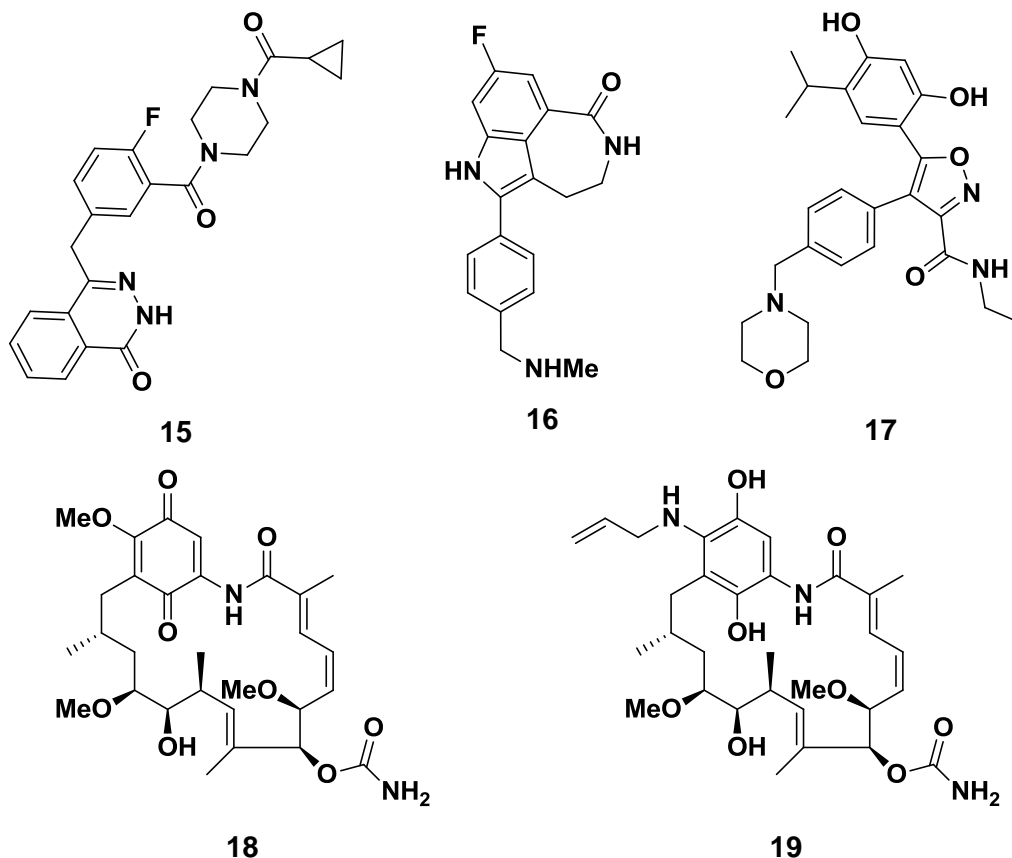
Gen A	Gen B	
A	B	Lebensfähig
A	b	Lebensfähig
a	B	Lebensfähig
a	b	Tötlich

Abb. 2: Gen-Gen vermittelte Abhängigkeit durch Synthetic Lethality: Mutation in einem Gen wird toleriert. Tritt jedoch im anderen Gen ebenfalls eine Mutation auf oder wird das Genprodukt durch einen Wirkstoff inhibiert, erfolgt Zelltod.

Poly ADP Ribose Polymerase (PARP) behebt DNA-Schäden durch Basen-Exzisionsreparatur (BER)^[30]. Wird PARP inhibiert, kann eine Reparatur nur durch homologe Rekombination erfolgen, Schlüsselenzyme sind hier BRCA1 und BRCA2. Diese auch als Tumorsuppressoren wirkenden Proteine fehlen aufgrund von Mutationen in angeborenen Ovarial- und Mammakarzinoma. Eine Inhibition von PARP führt daher zu selektivem Zelltod in Tumoren, nicht jedoch in gesunden Zellen, in welchen homologe Rekombination erfolgt. Wirkstoffe wie Olaparib^[31] (**15**, Astra Zeneca) oder Rucaparib^[32] (**16**, Clovis Oncology) konnten diese selektive Wirkung in klinischen Studien der Phasen I und II belegen. Die weitere Entwicklung von Olaparib wurde jedoch eingestellt, da bisherige Ergebnisse keine verbesserte Überlebensrate der Patienten beweisen konnten^[33].

In einem weiteren Ansatz konnte gezeigt werden, dass durch Mutation in den an Zellproliferation beteiligten Enzymen BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) und EGFR (epidermal growth factor receptor) eine Abhängigkeit vom molekularen Chaperon HSP90 (heat shock protein von 90 kDa) entsteht. HSP90 ist sowohl an der Stabilisierung von Proteinen, als auch an ihrem Abbau beteiligt. Durch Stabilisierung von an Tumorwachstum beteiligten

Proteinen trägt HSP90 ebenfalls zur Tumorgenese bei.^[28] Klinische Untersuchungen der zumeist vom Naturstoff Geldanamycin (**18**) abgeleiteten Inhibitoren der ersten Generation sind bis auf Retaspimycin (IPI-504, **19**, *Infinity Pharmaceuticals*) aufgrund schlechter Löslichkeit und Toxizität eingestellt worden. Inhibitoren der zweiten Generation wie NVP-AUY922 (**17**, *Vernalis/Novartis*) befinden sich zur Zeit in klinischen Untersuchungen^[34].

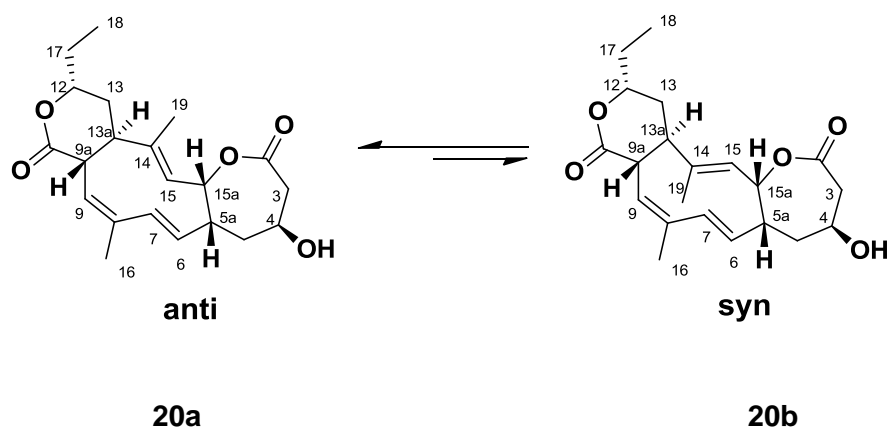


Zusammenfassend ermöglichte der technische Fortschritt in genomweiten genetischen Technologien erstmals einen ganzheitlicheren Blick auf Interaktionen in Zellen und trägt so zur Identifikation geeigneter selektiver Wirkorte für Krebstherapeutika bei. Jedoch befinden sich daraus entwickelte Ansätze wie Netzwerk-Pharmakologie^[4] und Synthetic Lethality^[28] noch in den Kinderschuhen. Bisher untersuchte Wirkstoffe bieten geringe Nebenwirkungen, können ihr Potential als Zytostatika jedoch meist nur in Kombinationstherapien entfalten. Die Erfolge von

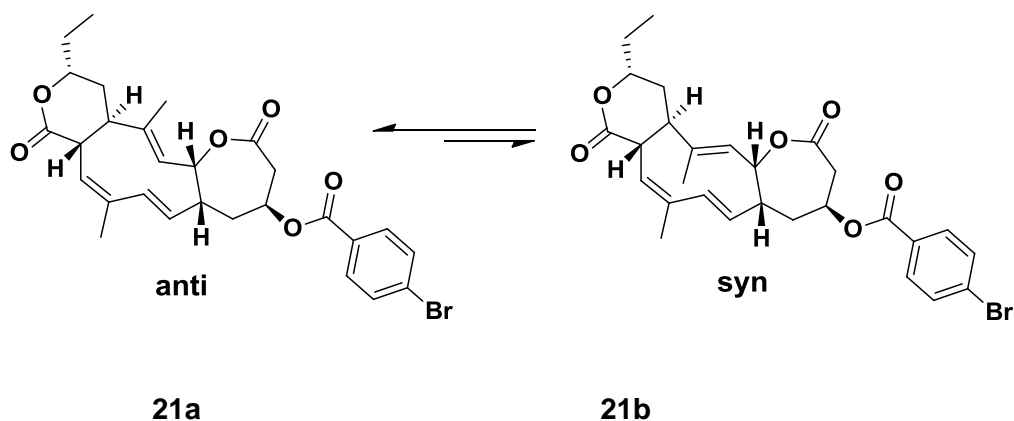
Tyrosinkinasehemmern sowie neueste Ergebnisse von KSP-Hemmern unterstreichen daher die Notwendigkeit, selektive, zytotoxische Wirkstoffe zu erforschen. Kombinationsstrategien können auch hier vorteilhaft sein und den therapeutischen Index erhöhen.

2 Aufgabenstellung

2.1 Der Cyclodecatrien-Naturstoff Collinolacton (20a, 20b)



Der aus *Streptomyces sp.* isolierte Naturstoff Collinolacton (**20a**, **20b**) weist die bisher einzigartige Struktur eines trizyklischen Cyclodecatriensystems auf, ein Bislacton mit 6-10-7 Ringanordnung. Semisynthetisch hergestellte 4-O-Collinolactonester wie **21** zeigen in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien Zytotoxizität sowie Auswirkungen auf das Mikrotubulinetzwerk. In Nierenzellen einer australischen Beutelratte (PtK2) induzierten Ester von **20** die Bildung des in der aktuellen Forschung intensiv untersuchten monoastralen Phänotyps in der Mitose^[35]. Collinolacton (**20a**, **20b**) zeigte in bisherigen Untersuchungen^[35-36] selbst keine biologische Aktivität. Zurzeit in verschiedenen klinischen Phasen entwickelte Krebstherapeutika der Kinesin-Spindelprotein-Hemmer induzieren dieses Phänomen durch Hemmung des Kinesin-Motorproteins Eg5^[9a]. In einer Industriekooperation konnte bewiesen werden, dass Collinolactonderivate nicht mit Eg5 interagiert^[35b]. Collinolactonderivate sind somit potentiell interessante Leitstrukturen für Krebstherapeutika mit geringeren Nebenwirkungen oder können in Zukunft als biochemische Tools genutzt werden.



Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher ein angepasster affinitätschromatographischer Ansatz zur Identifizierung des Wirkortes und der Target-Proteine von Collinolactonderivaten entwickelt werden. Voruntersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem Collinolacton sollten ein mögliches zelluläres Target eingrenzen.

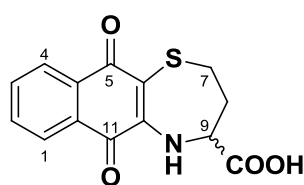
Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die semisynthetische Herstellung einer Bibliothek neuer Collinolactonderivate. Im Rahmen der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen sollten in Kooperation Derivate mit gesteigerter Zytotoxizität gegenüber Krebszellen identifiziert werden. Diese sollten weiterhin monoaurale Phänotypen in Zellen induzieren.

Zur Beantwortung der Fragestellung, warum Collinolacton (**20a**, **20b**) selbst keine biologische Aktivität besitzt wurde überlegt, ob **20** ein biosynthetischer Vorläufer von bisher nicht isolierten, aktiven Collinolactonglykosiden ist. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eine chemische Syntheseroute zur Herstellung von Collinolactonglykosiden ausgehend von **20** entwickelt werden. Semisynthetisch hergestellte Derivate sollten anschließend in Kooperation auf antibiotische und zytotoxische Wirkung untersucht werden.

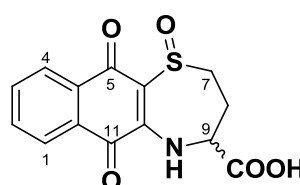
Die Grundlage für die geplanten Derivatisierungen ist eine zuverlässig hohe Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) in *Streptomyces sp.* Bisher verwendete Kultivierungsparameter wurden daher auf eine mögliche verbesserte Produktion von **20** untersucht.

2.2 Synthese oxidierter Derivate des Naturstoffes Brevinsäure(22)

Im Rahmen des Metagenom-Verbundprojektes „Erschließung schwer kultivierbarer, mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden“ wurden von FRANK SURUP die Naturstoffe Brevinsäure (**22**) und Brevinsäuresulfoxid (**23**) isoliert und eine erste chemische Synthese vorgeschlagen^[37]. **23** zeigte in biologischen Untersuchungen antibiotische Aktivität. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten daher chemisch-synthetisch weitere oxidierte Brevinsäurederivate hergestellt werden und in Kooperation auf ihre biologische Aktivität untersucht werden. Durch Verwendung enantiomerenreiner Edukte sollten weiterhin Aktivitätsunterschiede der Enantiomere von Brevinsäurederivaten bestimmt werden.



22

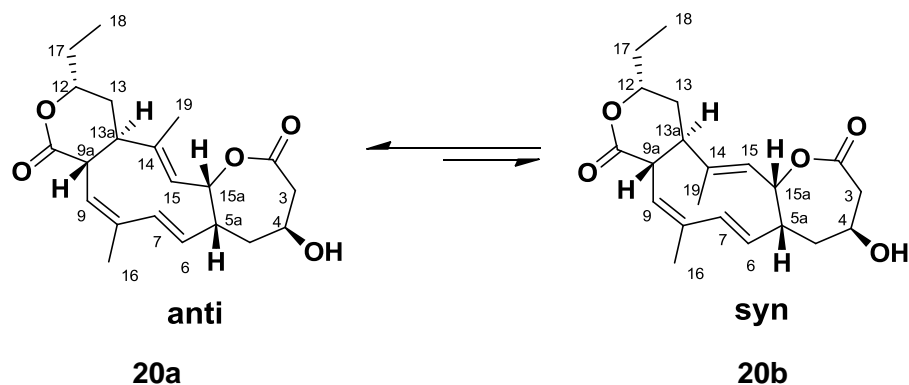


23

2.3 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Aktinomyceten

Etablierte Kultivierungsmethoden von Mikroorganismen bilden nur in geringem Maße natürliche Wachstumsbedingungen ab. Dies bedingt, dass geschätzte 99% aller Bakterien bisher nicht kultivierbar sind^[38]. Neue umweltmimetische Kultivierungsbedingungen können somit zur Isolierung bisher nicht kultivierbarer Mikroorganismen beitragen. Viele klinisch verwendete Antibiotika sind Naturstoffe aus Bakterien oder von diesen abgeleitet^[39]. Das heutige vermehrte Auftreten von gegen gängige Antibiotika resistenten Krankheitserregern zeigt die Notwendigkeit der Identifizierung neuer antibiotischer Wirkstoffe^[40]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein umweltmimetischer Screeningansatz nach bisher unkultivierten Bakterien entwickelt. Diese sollten in Folge auf die Produktion antibiotischer Wirkstoffe untersucht werden.

3 Der Cyclodecatrien-Naturstoff Collinolacton (20a, 20b) aus *Streptomyces* sp.



Vorarbeiten: Collinolacton (**20a**, **20b**) ist der erste Vertreter einer neuartigen Klasse von Cyclodecatrien-Naturstoffen. **20** wird in *Streptomyces* sp. auf dem Polyketid-Biosyntheseweg (PKS Typ I) aus sechs Acetateinheiten, drei Propionateinheiten und anschließender Zyklisierung hergestellt. In einem post-PKS Schritt erfolgt durch Baeyer-Villiger-Oxidation zwischen C-2 und C-15a eine Ringerweiterung unter Lactonbildung. Im Arbeitskreis PROF. DR. STEPHANIE GROND sind zwei Streptomyceten Stämme (Tü 1892 und Gö 40/10)¹ vorhanden, welche Collinolacton (**20a**, **20b**) produzieren. Bisherige taxonomische Bestimmungen der Stämme Tü 1892 und Gö40/10 lieferten keine eindeutigen Ergebnisse. Der *Streptomyces* sp. Stamm Tü 1892 wurde aus einer Bodenprobe bei Kamakura (Japan) isoliert. WEBER ET AL. entdeckten Ansatrienin A und B in einem Screening nach antimykotischen Naturstoffen aus Tü 1892^[41]. RÜDIGER KIND untersuchte in seiner Dissertation ausführlich das Metabolitenspektrum von Tü 1892^[42]. Der Stamm Gö 40/10 wurde aus einer bolivianischen Bodenprobe

¹ Wir danken Prof. Dr. Axel Zeeck, Georg-August-Universität Göttingen, für die Überlas-

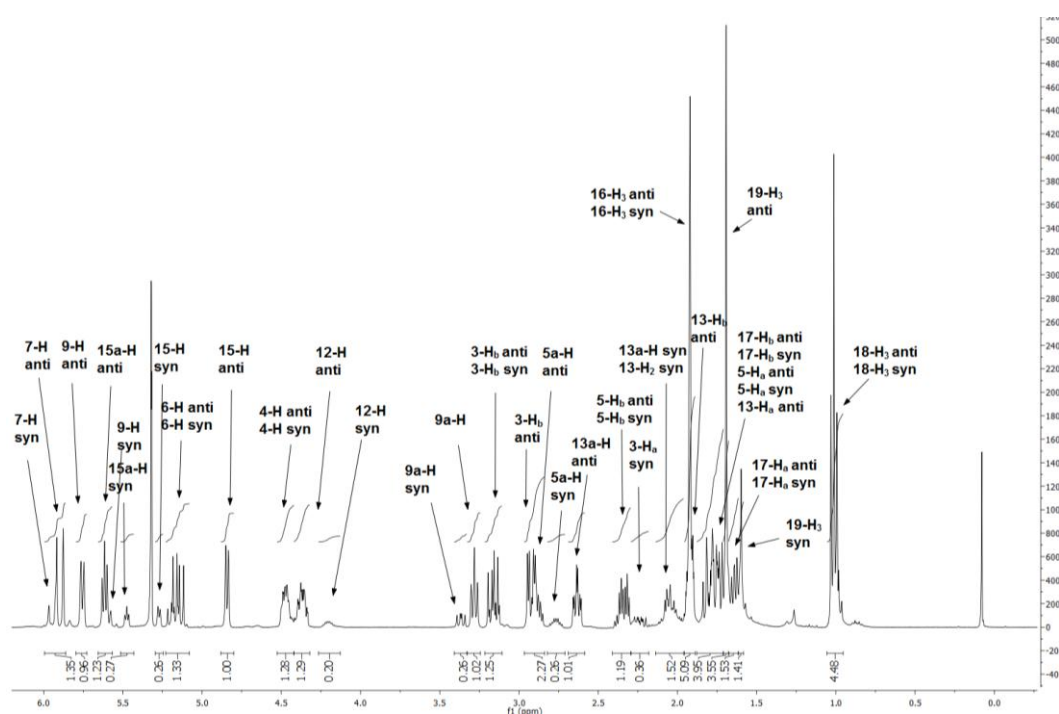


Abb. 3: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_2Cl_2) von Collinolacton (**20a**, **20b**) mit *syn*- und *anti*-Rotameren.

isoliert. In einem von GABRIELA BACH durchgeführten biologischen Screening auf anti-HIV-Aktivität zeigten seine Extrakte anti-HIV-Aktivität zeigten seine Extrakte keine antivirale oder toxische Wirkung^[43]. HANS-JÖRG SCHIEWE isolierte in seiner Dissertation erstmals Collinolacton (**20a**, **20b**) aus *Streptomyces* sp. Gö40/10 und schlug eine erste Struktur vor^[36]. Auffällig war eine chromatographisch nicht entfernbare Minderkomponente im NMR-Spektrum, welche einen ähnlichen Signalsatz wie Collinolacton (**20a**, **20b**) besaß. HANS-JÖRG SCHIEWE postulierte ein E-/Z-Isomerengemisch der Doppelbindung zwischen C-14 und C-15^[36]. Von LUISE HOFFMANN durchgeführte NMR-Untersuchungen und chemische Berechnungen legten in späteren Arbeiten die Existenz eines Gemisches von *syn/anti*-Rotameren in Bezug auf die Methylgruppen C-16 und C-19 nahe^[35a]. Bisher konnte Collinolacton (**20a**, **20b**) zur Bestimmung der absoluten Konfiguration mittels Röntgenstrukturanalyse nicht kristallisiert werden. LUISE HOFFMANN gelang jedoch die Kristallisation des Collinolacton-Derivats Collazulen (**24**), ein Hydroazulen^[44], über dessen Struktur Rückschlüsse auf die absolute Stereokonfiguration von **20** gezogen werden können.

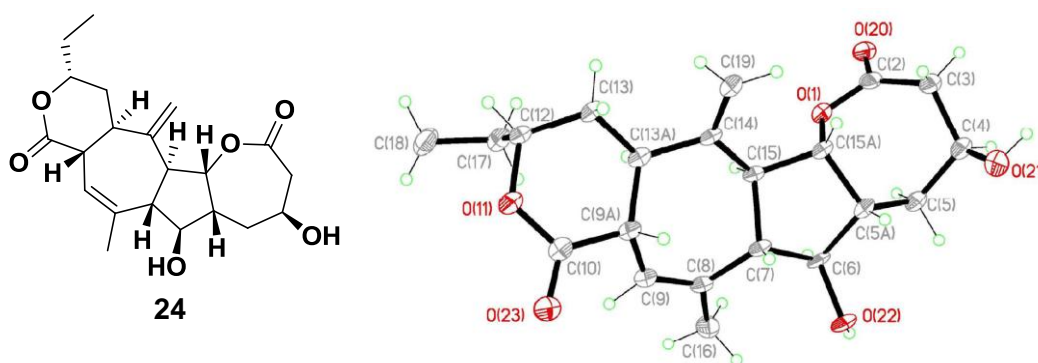


Abb. 4: Von Luise Hoffmann kristallisiertes Collinolactonderivat Collazulen (**24**)^[35a].

3.1 Biologische Aktivität von Collinolactonderivaten

Im Rahmen der Dissertation von LUISE HOFFMANN^[35A] konnte erstmals die Bildung des ungewöhnlichen monoastralen Phänotyps in Beutelrattenzellen (PtK2) durch Inkubation mit 4-O-*p*-Brombenzoyl-collinolacton (**21a**, **21b**) festgestellt werden. Collinolacton (**20a**, **20b**) selbst zeigte bisher keine biologische Aktivität^[35-36]. LUISE HOFFMANN konnte ebenfalls nur eine geringe Zytotoxizität des Derivates 4-O-Acetylcollinolacton (**29a**, **29b**) in Mauszellen (L929) berichten. Zwei weitere Collinolactonderivate zeigten jedoch ebenfalls Wirkung auf das Mikrotubulinetzwerk. So induzierte das von ihr synthetisierte Derivat 4-O-*o*-Brombenzoylcollinolacton (**26a**, **26b**) die Bildung von Halb- und Krüppelspindeln in PtK2-Zellen, hingegen induzierte 4-O-Benzoyl-collinolacton (**25a**, **25b**) eine Vakuolisierung im Endoplasmatischen Retikulum. Im Arbeitskreises von THOMAS U. MAYER (Universität Konstanz) durchgeführte in Vivo-Tests mit Leberepithelzellen von Affen (BSC1) konnten ebenfalls die Bildung monoastraler Phänotypen durch **25** nachweisen. Das in PtK2-Zellen aktive Derivat **21** zeigte in BSC1-Zellen dieses Phänomen wiederum nicht. **25** wirkte in einem Tubulin-Assay ebenfalls depolymerisierend und könnte daher möglicherweise ein Inhibitor der Kinesin-13-Familie sein. Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[35b] konnte in einer Industriekooperation nachgewiesen werden, dass Collinolacton (**20a**, **20b**) nicht durch Interaktion mit Kinesin Eg5 wirkt.

Die unterschiedlichen zellulären Effekte von Collinolactonderivaten wurden daher im Rahmen meiner Diplomarbeit, der Zulassungsarbeit von Nina Fetzer und der

vorliegenden Arbeit durch umfassende Studien von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) näher untersucht.

Im Rahmen der Zulassungsarbeit von Nina Fetzer^[45] wurde außerdem im Arbeitskreis DR. SABINE MÜLLER (Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen (ZMBP), Tübingen) die Wirkung von Collinolactonfettsäure- und Benzoylestern auf Zellen von *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) untersucht. Es konnte keine Veränderung der Spindelstruktur und Teilungsfrequenz der untersuchten Zellen festgestellt werden. Von den getesteten Derivaten zeigten Untersuchungen im HZI Braunschweig nur für 4-O-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-succinyl-Collinolacton (**28a**, **28b**) die Bildung monoastraler Phänotypen in Ptk2-Zellen.

Eine antibiotische Wirkung von Collinolactonderivaten konnte in bisherigen Arbeiten von LUISE HOFFMANN^[35A] und NINA FETZER^[45] weder in Eukaryonten noch in Prokaryonten nachgewiesen werden. Collinolactonderivate besitzen somit kein Potential als Antibiotika.

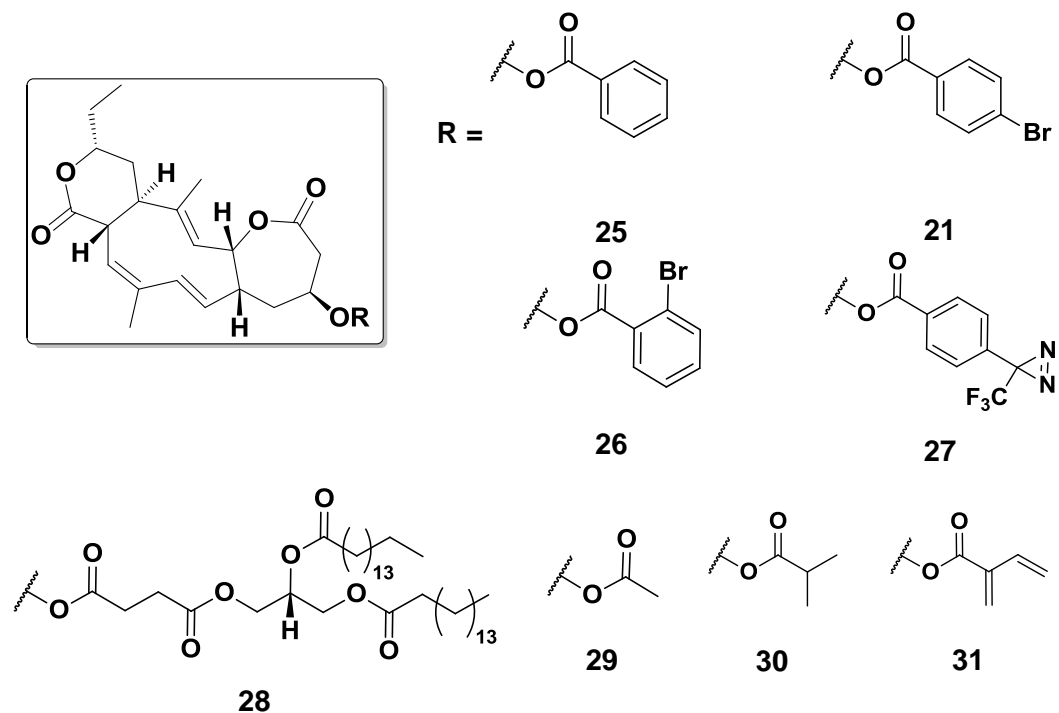


Abb. 5: In bisherigen Arbeiten synthetisierte biologisch, aktive Collinolactonderivate. **25**, **21**, **26**, **29** Luise Hoffmann^[35a]; **27**, **30**, **31** Jan-Niklas Fricke^[35b]; **28** Nina Fetzer^[45].

Zusammenfassend induzieren Collinolactonderivate interessante Phänomene während der Zellteilung. Möglicherweise besitzen diese ein bisher unbekanntes zelluläres Target und sind somit potentiell interessante Leitstrukturen für Krebstherapeutika mit erweitertem therapeutischen Fenster oder können in Zukunft als biochemische Tools zur Untersuchung des Zellzyklus genutzt werden.

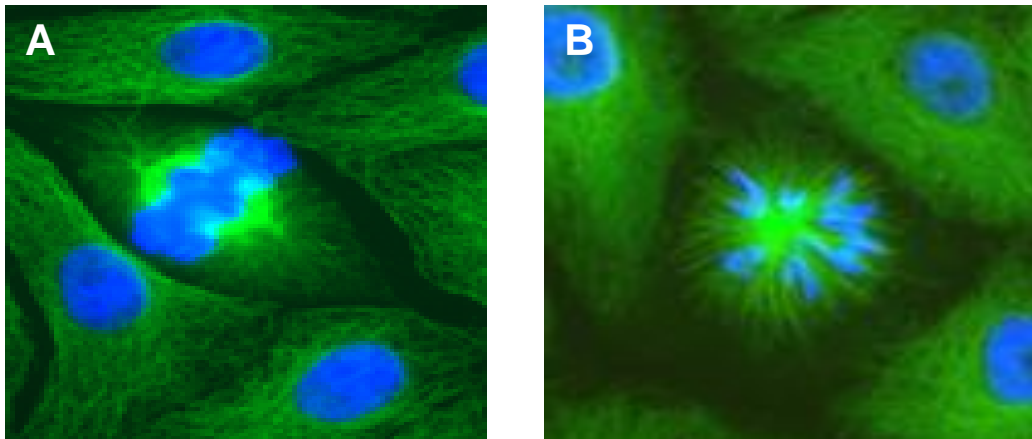
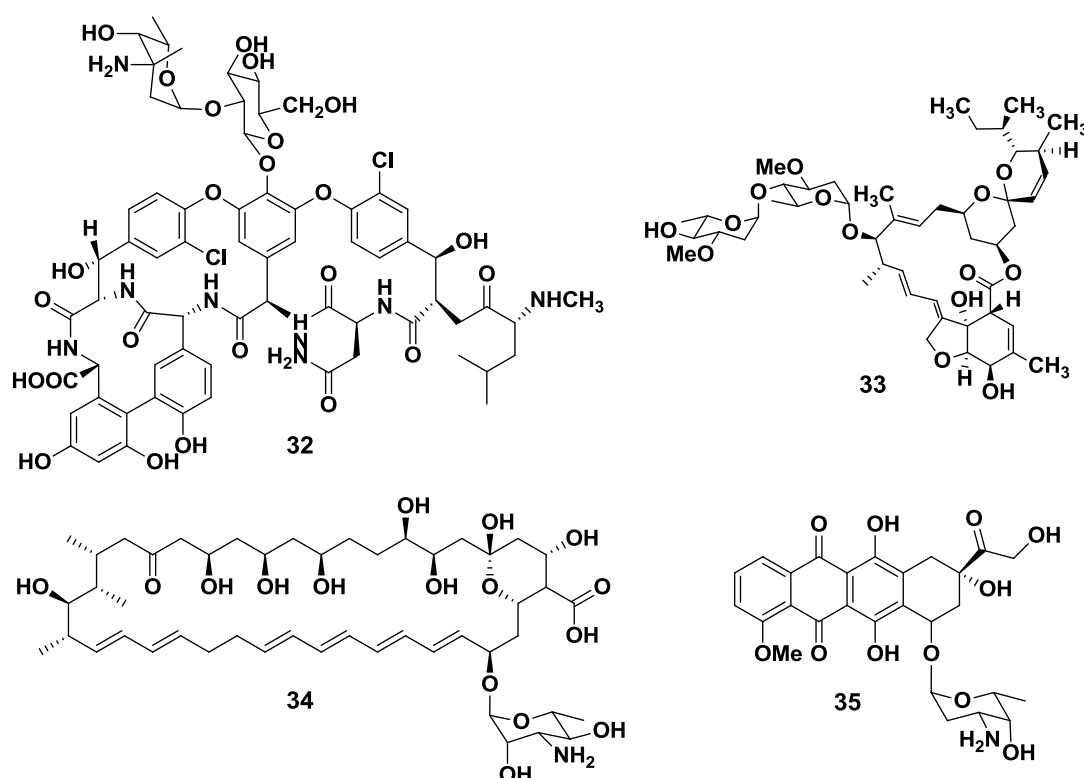


Abb. 6: Durch 4-O-*p*-Brombenzoyl-collinolacton (**21a**, **21b**) induzierter monoastraler Phänotyp in der Mitose von Zellen einer australischen Beutelratte (PtK2-Zellen): (A) Kontrolle. (B) monoastraler Phänotyp nach Inkubation mit **21**. Mikrotubuli durch Immunofluoreszenz grün, DNA mit DAPI blau. Abbildungen aus [35a].

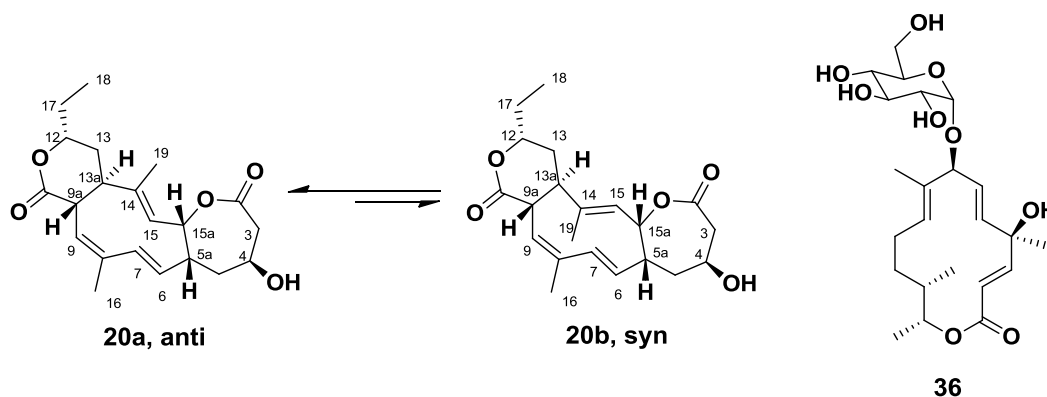
4 Synthesestudien zu Collinolacton-Glykosiden

Eine Vielzahl an Naturstoffglykosiden sind bekannt, unter ihnen wichtige Antibiotika (z.B. Vancomycin, **32**), antiparasitische Wirkstoffe (z.B. Avermectin B_{1a}, **33**), Antimykotika (z.B. Nystatin, **34**), und Krebstherapeutika (z.B. Doxorubicin, **35**). Die Saccharide dieser Naturstoffe sind sowohl für pharmakokinetische Eigenschaften als auch für biologische Aktivität von entscheidender Bedeutung. Ein Verlust der von Sacchariden im Targetprotein vermittelten hydrophilen oder hydrophoben Wechselwirkungen kann zu einem vollständigen Verlust der Wirkung des Naturstoffes führen^[46].



Der underivatisierte Naturstoff Collinolacton (**20a**, **20b**) zeigte in bisherigen Untersuchungen^[35-36] keine biologische Aktivität. Hingegen wirken semisynthetisch hergestellte 4-O-Collinolactonesterderivate zytotoxisch und induzieren verschiedene Phänomene im Mikrotubulinnetzwerk von eukaryotischen

Zellen^[35]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass **20** in einem weiteren biosynthetischen Schritt zu einem biologisch aktiven Wirkstoff umgesetzt werden könnte. Bisher ist dieser noch nicht identifiziert worden. HANS-JÖRG SCHIEWE isolierte allerdings im Rahmen seiner Dissertation^[36] aus dem Collinolacton produzierenden Stamm *Streptomyces* sp. Gö 40/10 mehrere glykosidierte Cineromycine (z.B. **36**). Es kann daher vermutet werden, dass auch das biologisch nicht aktive Aglykon Collino-lacton (**20a**, **20b**) durch Glykosidierung aktiviert werden könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine chemische Synthesestrategie zur Herstellung verschiedener Collinolactonglykoside entwickelt und durchgeführt werden. Erfolgreich hergestellte Derivate sollten in Folge durch Kooperationspartner auf ihre biologische Aktivität untersucht werden.



4.1 Stabilität von Collinolacton (**20a**, **20b**) unter synthetischen Bedingungen

Untersuchungen im Rahmen der Dissertation von LUISE HOFFMANN^[35A] und meiner Diplomarbeit^[35b] hatten gezeigt, dass Collinolacton (**20a**, **20b**) unter verschiedenen synthetischen Bedingungen instabil ist. In wässriger Lösung werden weder saure (pH < 4) noch basische Bedingungen (pH > 9) toleriert. Unter Wasserausschluss ist **20** jedoch in abs. THF und Triethylamin (2:1) oder Pyridin (1:1) bis 60°C stabil. Wahrscheinlich führt die Anwesenheit guter Nucleophile unter basischen Bedingungen zu einer Öffnung der Lactonringe. LUISE HOFFMANN konnte in ihrer Dissertation^[35a] weiterhin NMR-spektroskopisch zeigen, dass Collinolacton ab 100°C thermisch zerfällt. Typische Entschützungsbedingungen von

Benzylschutzgruppen durch Hydrierung über Palladium auf Aktivkohle führten zu einer Hydrierung der konjugierten Doppelbindungen zwischen C-6 und C-9 von Collinolacton (**20a**, **20b**). Eine Reaktion mit mCPBA oxidierte ebenjene konjugierte Doppelbindungen, was eine Umlagerung unter Ringschluss zu Collazulen (**24**, s. auch Abb. 11) zur Folge hatte. LUISE HOFFMANN^[35a] konnte die Konfiguration von **24** durch eine Röntgenstruktur beweisen (s. Abb. 4). KITAGAWA ET AL.^[47] berichteten weiterhin eine Umlagerung des strukturverwandten Naturstoffes Germacren-C (**37**) unter Einwirkung von Luftsauerstoff. Auch Collinolacton (**20a**, **20b**) zeigt bei längerem Stehen in Lösung (> 7 Tage) eine Bildung von bisher nicht identifizierten Zerfallsprodukten, mit Oxidantien wie DDQ erfolgte in Vorversuchen mit **20** jedoch keine Reaktion.

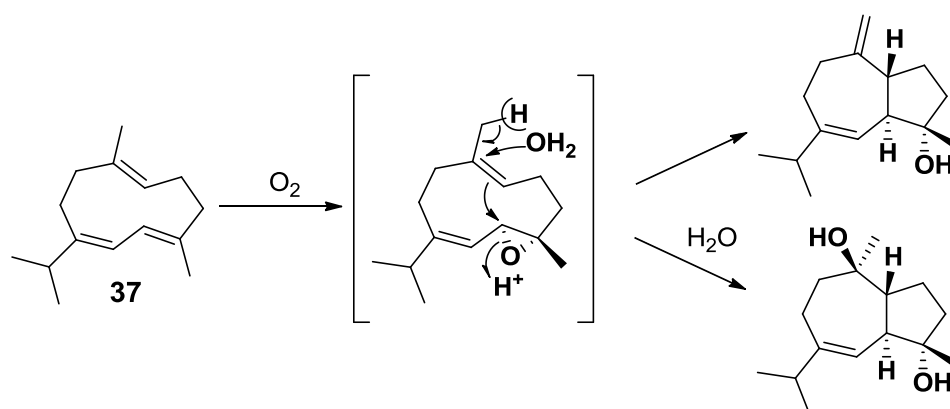


Abb. 7: Von KITAGAWA ET AL. berichtete Umlagerung des aus einer Weichkoralle (*Xenia sp.*) isoliertem Germacren-C (**37**)^[47].

Ebenfalls beobachtet werden konnte eine Eliminierung von Wasser aus **20** zu Collinolactenon (**38a**, **38b**). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Dehydrationsreaktion bei der Entschützung eines Trimethylsilylethanol-geschützten Collinolacton-derivates mit TBAF erstmals festgestellt (s. Kap. 5.4). Eine Reaktion mit Fluorwasserstoff in Pyridin zeigte jedoch keinen Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**). Selektiv konnte **38** durch Reaktion mit Burgess-Reagenz^[48] und anschließendem Erhitzen auf $60^\circ C$ hergestellt werden (s. Abb. 8).

Die aufgeführten Einschränkungen der Synthesebedingungen verringern die Anzahl der zulässigen Schutzgruppen für eine Collinolactonglykosid-Synthese auf wenige Möglichkeiten. Auch die Kupplungsbedingungen für den geschützten Zucker an Collinolacton (**20a**, **20b**) sind somit eingeschränkt.

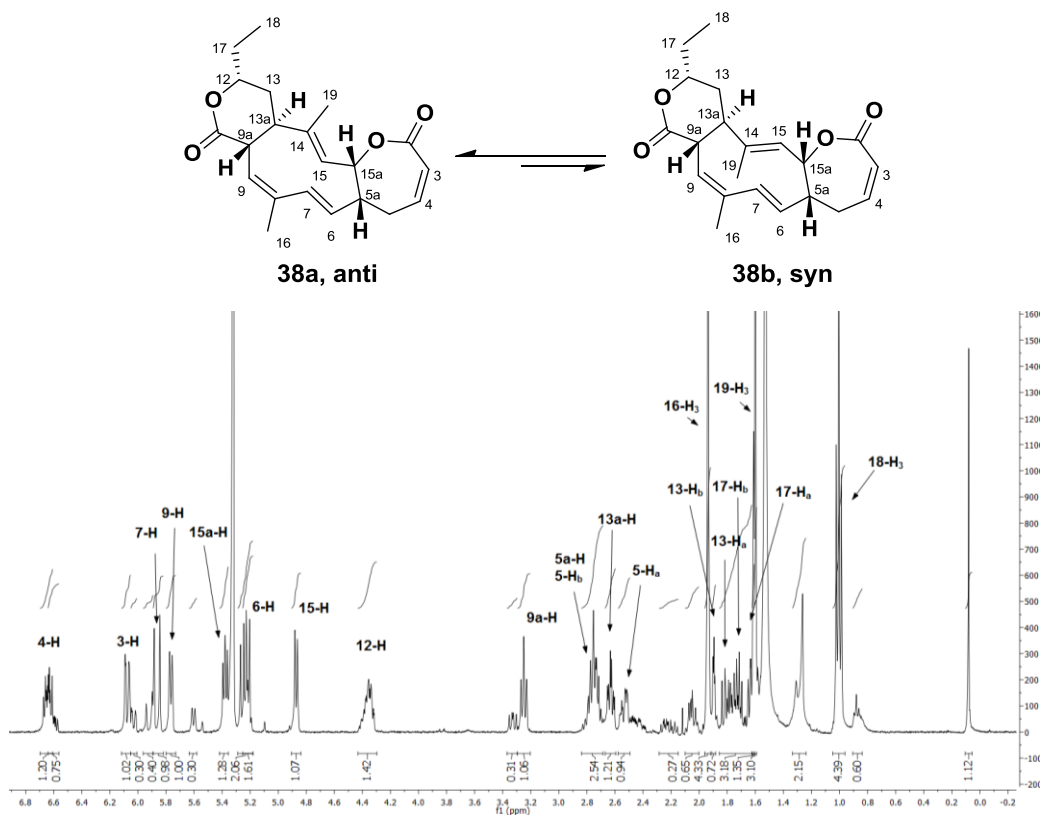


Abb. 8: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_2Cl_2) von Collinolacton (**38a**, **38b**). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur Signale von **38a** markiert.

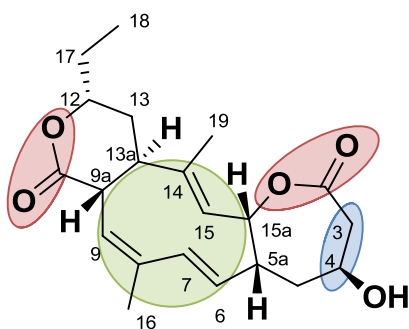


Abb. 9: Molekülteile in Collinolacton (**20a**, **20b**), die unter aufgeführten Bedingungen einen Zerfall von **20** bedingen. Saure oder basische Öffnung der Lactonringe (Rot), Eliminierung von Wasser durch TBAF (Blau), Ringschluss durch oxidative Bedingungen und Verlust der konjugierten Doppelbindungen bei Hydrierung (Grün).

4.2 Synthesestrategie zu Collinolactonglykosiden

Die aufgeführten Beschränkungen zur Synthese von Collinolactonglykosiden (s. Abb. 9) führten zur Durchführung eines dualen Ansatzes. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten geschützter Monosaccharide^[49] wurden parallel sowohl ein vollständig mit Etherschutzgruppen geschütztes Monosaccharid („armed“)^[49] als auch ein vollständig mit Esterschutzgruppen geschütztes Monosaccharid („disarmed“)^[49] synthetisiert. Somit steht eine größere Möglichkeit der Schutzgruppenwahl zur Verfügung. Für die Glykosidierungsreaktion fiel die Wahl auf die gut zu handhabende Trichloracetimidat-Aktivierung. Diese bietet durch Wahl der Reaktionsbedingungen einen einfachen synthetischen Zugang zu sowohl α - als auch β -Glykosiden. Nachteilig für die Collinolactonglykosid-Synthese ist die benötigte Lewissäurekatalyse, welche eventuell zu einem Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**) führen kann. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass die nötigen wasserfreien Bedingungen und geringen Konzentrationen sowie niedrige Temperaturen einen Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**) ausreichend verhindern sollten.

Als Esterschutzgruppe fiel die Wahl auf die mit Hydrazinacetat mild abspaltbare Lävulingruppe^[50]. Ausgehend von L-Rhamnose (**39**) wurde diese in einer STEGLICH-Veresterung^[51] mit Lävulinsäure zum vollgeschützten 1,2,3,4-Tetra-O-lävulinoyl-L-rhamnopyranosid (**40**) umgesetzt (s. Abb. 10). Das anomere Zentrum konnte anschließend selektiv mit Porcine Pancreas Lipase zu **41** entschützt werden^[52]. Möglicherweise sind hier durch Verwendung eines unpolaren organischen Lösungsmittels noch Ausbeutesteigerungen gegenüber der literaturbeschriebenen Entschützung möglich. Lipasen arbeiten an einer Grenzfläche zwischen polarer und unpolarer Phase^[53]. Diese ist hier nicht gegeben. Die ebenfalls literaturbekannte Verwendung von Butylamin^[52] zur Entschützung führte nicht zur Bildung des Produktes 2,3,4-Tri-O-lävulinoyl-L-rhamnopyranosid (**41**). Die Bildung des aktivierten β -Trichloracetimidats **42** erfolgte unter kinetischen Bedingungen fast quantitativ. Durch thermodynamische Bedingungen wäre in späteren Synthesen ebenfalls das α -Trichloracetimidat zugänglich.

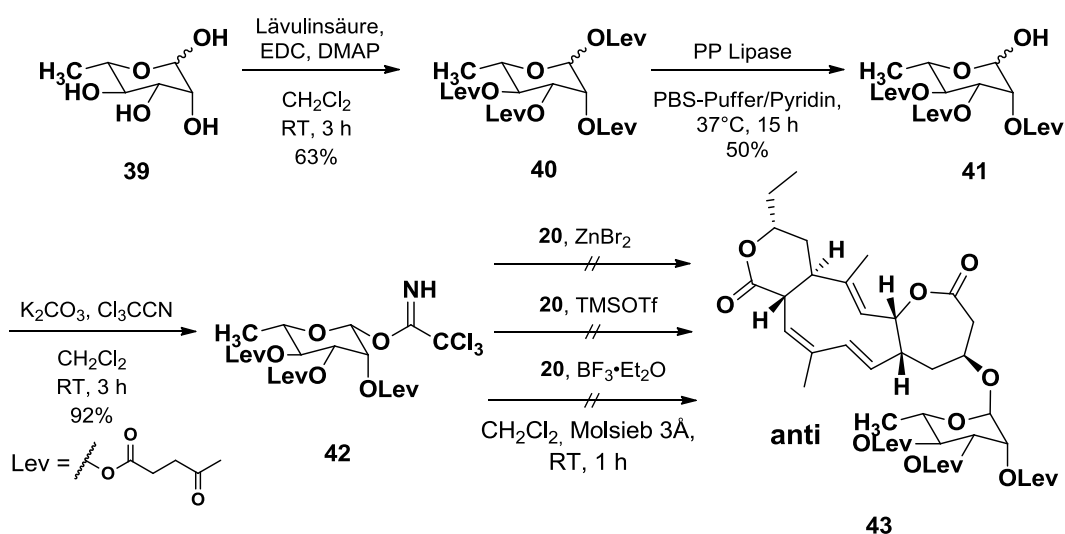


Abb. 10: Strategie zur Synthese eines Collinolactonglykosids mit Esterschutzgruppen.

Eine anschließende lewisäurekatalysierte Collinolactonrhamnosid-Synthese zu **43** zeigte unter verschiedenen Bedingungen (s. Abb. 10) die Bildung von drei Hauptprodukten, welche als Collinolactonderivate identifiziert werden konnten. In $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchungen waren jedoch keine charakteristischen Signale von Collinolacton-Doppelbindungen vorhanden. Es konnten stattdessen zwei charakteristische Singulets einer neu gebildeten exozyklischen Doppelbindung zwischen C-14 und C-19 identifiziert werden. Somit muss eine Umlagerung des Decatriensystems stattgefunden haben (s. Abb. 11). Eine gesicherte Bestimmung der Strukturen konnte jedoch nicht erfolgen, da die Signale der Levulinoyl-Methylengruppen entsprechende Signale des umgelagerten Zyklodecatrienringes überdeckten. Auch in 2D-NMR-Experimenten konnte aufgrund der geringen Substanzmenge keine genaue Zuordnung getroffen werden. Hochauflösende Massenspektrometrie eines unter Trimethylsilyltriflat-Katalyse entstandenen Produktes lieferte jedoch eine molekulare Masse von 800.36136 g/mol, die exakt der Summenformel des gewünschten geschützten Collinolactonrhamnosids **43** entspricht ($\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{O}_{15}$). Hier muss eine Umlagerung ohne die bei Collazulenbildung bisher aufgetretene Anlagerung von Sauerstoff stattgefunden haben. Diese geschieht möglicherweise durch formale Wanderung eines Wasserstoffatoms von C-19 an C-6.

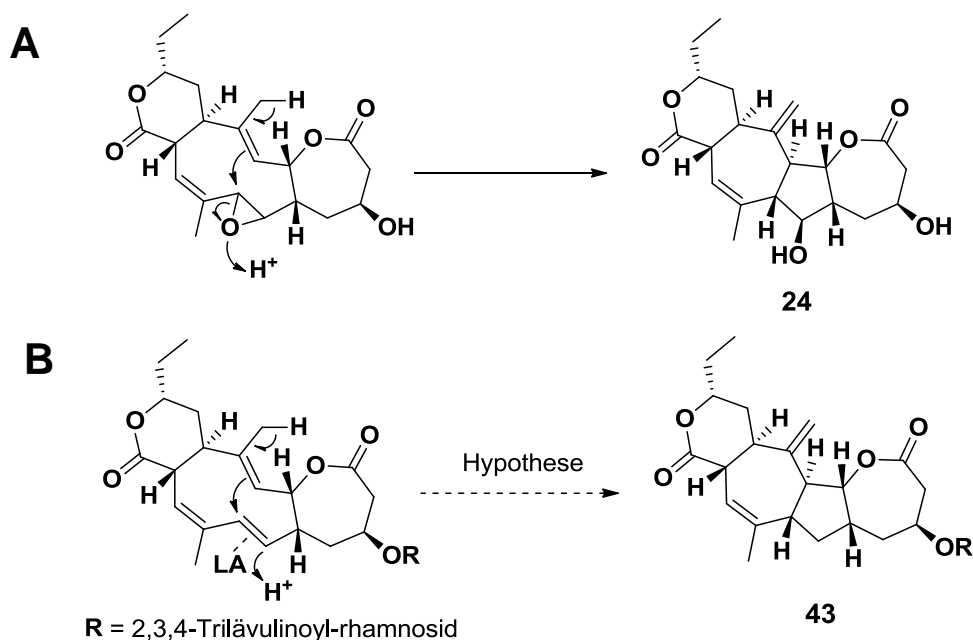


Abb. 11: Umlagerung von Collinolactonderivaten zu Collazulenderivaten. (A) durch Oxidation mit mCPBA^[35a] (B) postulierter Mechanismus der in dieser Arbeit aufgetretenen Wanderung eines Wasserstoffatoms unter Ringschluss.

Als Etherschutzgruppe wurde eine *p*-Methoxybenzyl-Schutzgruppe (PMB oder MPM) gewählt. Diese erschien nach Überprüfung der Collinolactonstabilität unter den mild oxidativen Abspaltbedingungen mit 2,3-Dicyano-5,6-Dichlorobenzochinon (DDQ) gut geeignet. Ausgehend von α -D-Methylglucose (**44**) wurde Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)- α -D-glucopyranosid (**45**) in moderaten Ausbeuten (48%) mittels Natriumhydrid und *p*-Methoxybenzylchlorid hergestellt (s. Abb. 12). Die nachfolgende saure Entschützung des anomeren Zentrums führte unter identischen Bedingungen der Entschützen von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannose^[54] zu einem Substanzgemisch.

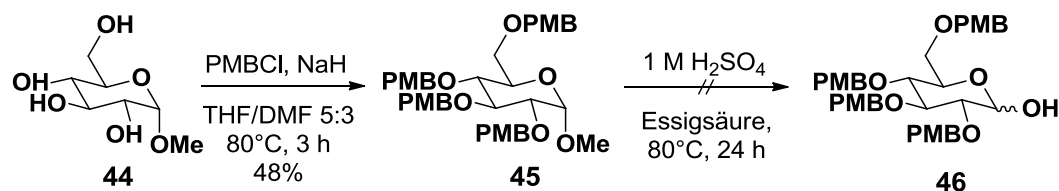


Abb. 12: Verwendete Syntheseroute zu 2,3,4,6-Tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-D-glucopyranosid (**46**).

Die Bildung des gewünschten Produktes **46** konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Unter schwach sauren Bedingungen erfolgte hingegen keinen Umsatz des Edukts (s. Tabelle 1). Da keine selektive Entschützung des anomeren Zentrums in **45** erreicht werden konnte, wurde, trotz der für Collinolacton (**20a**, **20b**) ungeeigneten Entschützungsbedingungen unter Hydrierung, aus Methyl- α -D-glucopyranosid (**47**) Methyl-2,3,4,6-Tetra-benzyl- α -D-glucopyranosid (**48**) hergestellt (s. Abb. 13). Hiermit sollten die Bedingungen der Glykosidierungsreaktion eines „armed“-Zuckers mit **20** überprüft werden.

Säure	Lösungsmittel	Temp.	Zeit	Beobachtung
Essigsäure/ 1 M H ₂ SO ₄ 4:1 ^[54]	-	80°C	1 d	Substanzgemisch, kein Produkt
2 N HCl ^[55]	-	50°C	4 d	Kein Umsatz
konz. HCl	Aceton	50°C	20 h	Substanzgemisch, Kein Produkt
2 N HCl	Acetonitril	70°C	20 min	Substanzgemisch, kein Produkt
Amberlite IR 120 (H ⁺) ^[56]	Aceton	56°C	5 d	Kein Umsatz
Dowex50 WX4 (H ⁺) ^[57]	Acetonitril/ Wasser 10:1	80°C	1 d	Kein Umsatz

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Ansätze zur anomeren Entschützung von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)- α -D-glucopyranosid (**45**).

Methyl-2,3,4,6-tetra-benzyl- α -D-glucosid (**48**) konnte unter Reflux in Essigsäure/1 M Schwefelsäure anomer entschützt werden. Die geringe Ausbeute ist dem bei der Umkristallisierung in der Mutterlauge verbliebendem Produkt **49** geschuldet. Die anschließende Synthese des β -Trichloracetimidats **50** verlief in guten Ausbeuten (69%). Jedoch konnte auch unter Vermeidung von Lewisäuren wie Bortrifluorid keine Bildung des Collinolactonglykosides **51** nachgewiesen werden. Eine PPTS-katalysierte Reaktion^[58] führte erneut zu Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**). Hingegen zeigte eine Reaktionsführung mit Chloral nach SCHMIDT ET AL.^[59] keinen Umsatz der Edukte. Es wurde daher von weiteren Ver-

suchen zur Synthese von Collinolactonglykosiden über Trichloracetimidat-Aktivierung abgesehen.

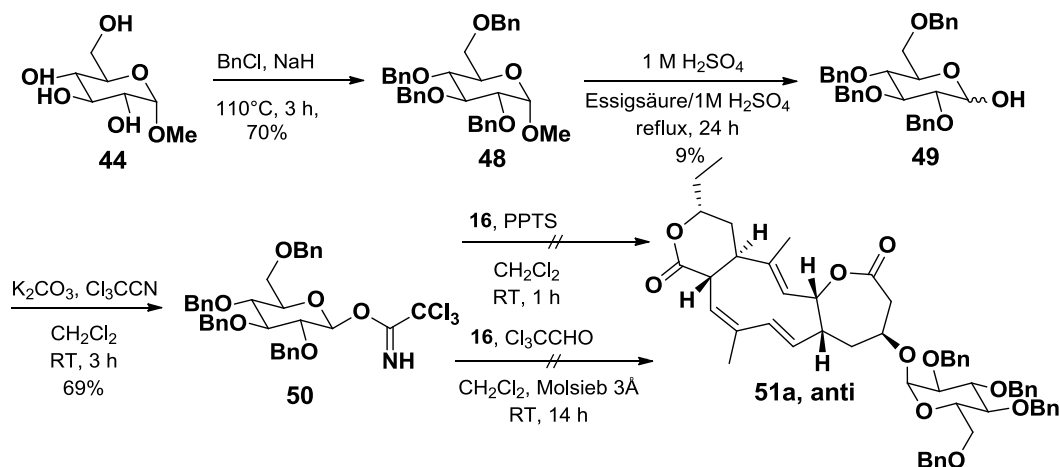


Abb. 13: Strategie zur Synthese eines Collinolactonglykosids mit Etherschutzgruppen.

4.3 Analyse der Zerfallsprodukte von Collinolacton (20a, 20b) unter lewissauren Bedingungen

Zur Untersuchung der Zerfallsprodukte von Collinolacton (**20a**, **20b**) unter wasserfreien, lewissauren Bedingungen wurde **20** in abs. DCM bei 0°C mit wenigen Tropfen Bortrifluorid-Diethyletherat versetzt und 20 h gerührt. Bei Zugabe konnte eine sofortige Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden. Nach wässriger Aufarbeitung wurde der dunkelbraune Rückstand der organischen Phase mittels hochauflösender LC/MS an einem BRUKER maXis 4G-Massenspektrometer analysiert (s. Abb. 14). Es konnte eine geringe Menge einer Substanz mit der Masse von Collinolacton (**20a**, **20b**) gefunden werden, alle Hauptkomponenten der untersuchten Mischung besaßen jedoch höhere molekulare Massen als **20** (s. Tabelle 2). Die Masse von Collinolactenon (**38a**, **38b**) wurde nur in geringen Spuren identifiziert, **38** wurde wahrscheinlich während der Massenspektrometrie gebildet.

Die Abwesenheit weiterer massenneutraler Umlagerungsprodukte lässt entweder auf nicht ausreichend wasserfreie Reaktionsbedingungen oder auf Bildung instabiler Zwischenprodukte schließen, welche bei wässriger Aufarbeitung unter Was-

seranlagerung reagierten. In mehreren identifizierten Massen konnten ebenfalls ein nucleophiler Angriff von Methanol identifiziert werden. Dieses stammt wahrscheinlich aus dem Lösungsmittel der HR-LC/MS-Messung. Eine Bildung von Methanoladdukten während der Massenspektrometrie kann aufgrund der Identifikation aller Summenformeln durch mehrere Ionenpaare ausgeschlossen werden (s. Tabelle 2). Entsprechende Summenformeln lassen sich auch durch eine Anlagerung von Wasser und einer formalen Methyleneinheit generieren. Für eine Addition einer Methyleneinheit an Collinolacton sind in der Reaktion allerdings keine Edukte vorhanden und eine Beteiligung des Lösungsmittels Dichlormethan kann ausgeschlossen werden^[60]. Somit scheinen wichtige Degradationswege von Collinolacton unter lewis-sauren Bedingungen durch nucleophilen Angriff zu erfolgen. Ob dieser analog dem von KITAGAWA ET AL.^[47] postulierten Angriff am Cyclodecatrienring (s. Abb. 7) oder durch Öffnung des Lactonringes erfolgt, lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht entnehmen. Die in Folge beobachtete Eliminierung von Wasser kann in beiden Fällen erfolgen. Wahrscheinlich treten beide Produktfamilien auf, was das mehrfache Auftreten gleicher Summenformeln bei unterschiedlichen Retentionszeiten erklärt. Interessant wäre in zukünftigen Arbeiten die Isolierung und NMR-spektroskopische Identifizierung der Additionsprodukte. Dies könnte mögliche Reaktionswege aufklären.

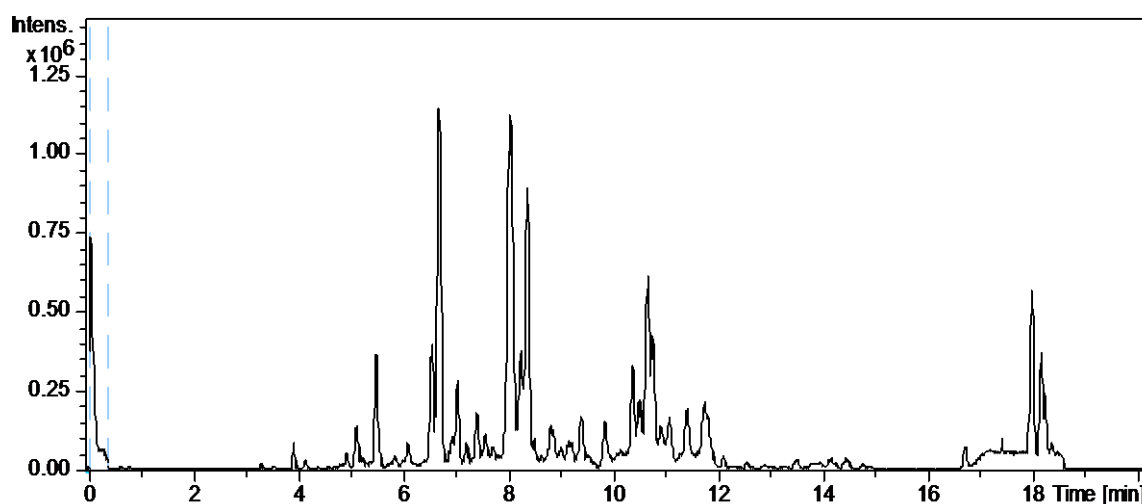


Abb. 14: Base-Peak-Chromatogramm (positive Ionen) der HR-LC/MS-Messung von mit Bortrifluorid umgesetztem Collinolacton (**20a**, **20b**).

Synthesestudien zu Collinolacton-Glykosiden

t_R [min.]	identifizierte Molmasse [g/mol]	identifiziert durch	Summenformel	Fehler [ppm]	mögliche Substanz
5,49	360,191	$[M+H]^+$, $[M+H_2O+H]^+$	$C_{21}H_{28}O_5$	4,3	Collinolacton (16a , 16b)
6,55	378,203	$[M+H]^+$, $[2M+H]^+$	$C_{21}H_{30}O_6$	0,7	Collinolacton + H_2O
6,69	410,230	$[M+H]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{34}O_7$	4,5	Collinolacton + H_2O + CH_3OH
7,03	378,203	$[M+H]^+$, $[2M+H]^+$	$C_{21}H_{30}O_6$	0,7	Collinolacton + H_2O
8,03	392,220	$[M-H_2O+H]^+$, $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{32}O_6$	0,9	Collinolacton + CH_3OH
8,25	392,220	$[M-H_2O+H]^+$, $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[3M+Na]^+$	$C_{22}H_{32}O_6$	0,6	Collinolacton + CH_3OH
8,36	392,220	$[M-H_2O+H]^+$, $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[3M+Na]^+$	$C_{22}H_{32}O_6$	0,1	Collinolacton + CH_3OH
10,36	374,209	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$, $[3M+Na]^+$	$C_{22}H_{30}O_5$	0,5	Collinolacton + CH_3OH - H_2O
10,49	372,190	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{28}O_5$	1,0	Collinolacton + CH_3OH - H_2O - H_2
10,64	372,193	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{28}O_5$	1,5	Collinolacton + CH_3OH - H_2O - H_2
10,75	374,209	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{30}O_5$	1,3	Collinolacton + CH_3OH - H_2O
11,39	372,193	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{28}O_5$	1,1	Collinolacton + CH_3OH - H_2O - H_2
11,71	374,209	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$	$C_{22}H_{30}O_5$	0,1	Collinolacton + CH_3OH - H_2O

Tabelle 2: In HR-LC/ESI-MS-Untersuchung identifizierte molekulare Massen sowie Summenformeln der Zerfallsprodukte von Collinolacton (**20a**, **20b**) unter Bortrifluoridkatalyse.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Syntheserouten zu Trichloracetimidat-aktivierten Monosacchariden mit Esterschutzgruppen sowie Etherschutzgruppen entwickelt und durchgeführt. Eine nachfolgende Collinolactonglykosidsynthese konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die hierfür nötige Verwendung katalytischer Mengen Lewissäure zu einem Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**) führt. Alternative Verfahren mit PPTS oder Choral zeigten ebenfalls keine Bildung eines Collinolactonglykosids. Eine nachfolgende HR-LC/MS-Analyse des Zerfalls von Collinolacton (**20a**, **20b**) unter lewissauren Bedingungen zeigt interessante Einblicke in die Reaktivität von **20**, beweist aber, dass eine Verwendung der Trichloracetimidataktivierung für die Synthese von Collinolactonglykosiden nicht geeignet ist.

In zukünftigen Arbeiten sollen daher zwei weitere Ansätze untersucht werden. MARTIN KONNERTH untersucht zurzeit eine mögliche Synthese von Collinolactonglykosiden über Thioglykoside. Diese kann beispielsweise durch Überführung in reaktivere Sulfoxide^[61] oder durch das von HANESSIAN entwickelte Remote Activation Prinzip^[62] noch erweitert werden.

Ein sehr interessanter neuer Ansatz ist die Gold(I)-katalysierte Glykosidsynthese über Glykosyl-*ortho*-alkynylbenzoate^[63]. Diese als sehr mild und effizient beschriebene Reaktion bietet aufgrund der bevorzugten Reaktion von Gold(I) mit Dreifachbindungen^[64] einen schonenden Ansatz für den Cyclodecatrienring von Collinolacton (**20a**, **20b**). Eine Eignung dieser Methode für Reaktionen mit **20** muss durch Voruntersuchungen erst noch überprüft werden.

5 Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Derivaten des Naturstoffes Collinolacton (20a, 20b)

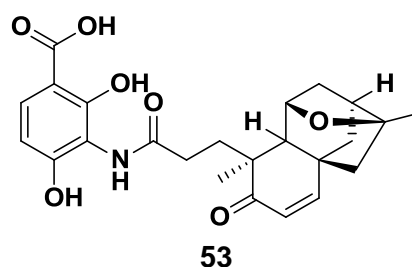
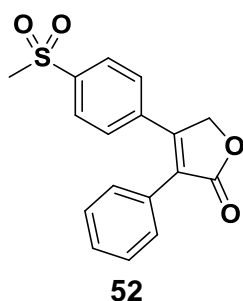
5.1 Einleitung: Strategien der Target-Identifizierung von biologisch aktiven Naturstoffen

Die Entwicklung eines neuen Medikaments ist mit geschätzten 12 Jahren^[65] und rund 1 Milliarde Dollar^[66] langwierig und kostenintensiv. Selbst nach erfolgreichem Abschluss aller klinischen Phasen und Zulassung durch die Regulatorbehörden zeigen 10% der neuen chemischen Wirkstoffe (NCEs, new chemical entities) schwere Nebenwirkungen (ADR, adverse drug reactions)^[67]. Wird in Folge der Nebenwirkungen das Medikament vom Markt genommen, drohen weiterhin hohe Kosten durch Klagen geschädigter Patienten. Der US-Pharmakonzern Merck zahlte im Zuge der Marktrücknahme des Schmerzmittels Vioxx (Rofecozib, **52**) 4.8 Milliarden Dollar, um einen Großteil anstehender Klagen beizulegen^[68]. Eine frühzeitige Erkennung von möglichen Nebenwirkungen durch Identifizierung aller Targets von Wirkstoffen kann daher immense Kosten einsparen. In jüngster Zeit findet eine rapide Entwicklung auf dem Feld der Target-Identifizierung biologisch aktiver Verbindungen statt. Neue Techniken ermöglichen eine schnellere Untersuchung des Wirkmechanismus und tragen so ebenfalls zur Erforschung neuer Targetproteine für zukünftige Medikamente bei. So zielt die personalisierte Medizin auf eine individuell angepasste Therapie durch Kenntnis des Genoms des Patienten ab. Sowohl in der Entwicklung traditioneller Medikamente als auch in der wachsenden personalisierten Medizin ist ein tieferes Verständnis von Drug-Target-Wechselwirkungen heute unabdingbar.

Molekularbiologische Methoden der Target-Identifizierung

Methoden zur Target-Identifizierung lassen sich in genomweite, genetische Methoden und chemische Proteomik einteilen und werden durch Genexpressionsanalyse und bioinformatische *in silico* Modelle unterstützt^[69]. Weit verbreitete

genetische Methoden^[70] sind Phagen Display^[71] und Haploinsufficiency profiling (HIP) sowie homozygous profiling (HOP)^[70]. In HIP wird eine Bibliothek aus Hefezellen hergestellt, in denen jeweils eine Kopie eines essentiellen heterozygoten Gens durch einen Marker ersetzt wird. Dies induziert eine Hypersensitivität der Zellen auf Wirkstoffe, die das Genprodukt hemmen. Somit identifiziert eingeschränktes Wachstum einer Kultur durch Auslesen der Marker das Protein-Target des Wirkstoffes. HOP identifiziert durch Knockout eines essentiellen homozygoten Gens Signalwege, die eine Hemmung durch einen Wirkstoff umgehen. Im Phagen Display werden einzelne Peptide oder Proteine auf der Oberfläche von Phagen präsentiert. Somit ist es nicht wie in HIP oder HOP möglich die Gesamtheit der Drug-Target-Wechselwirkungen in lebenden Zellen zu untersuchen. HIP und HOP werden oft mit dem komplementären Multicopy suppression profiling (MSP) kombiniert, in dem durch Wirkstoffzugabe Resistenz in Zellen entwickelt wird und diese durch PCR-Amplifikation der Resistenzplasmide qualitativ nachgewiesen wird. Die Kombination nutzt die Vorteile aller Methoden und erhöht die Genauigkeit der erhaltenen Informationen^[70, 72]. Durch den Aufbau der Assays ist die Wahl verschiedener Zellarten in HIP, HOP und MSP allerdings nicht möglich. Alle erwähnten Systeme sind gut für HTS-Screening in industrieller Anwendung geeignet. Aufbau und Durchführung eines solchen Screenings übersteigt allerdings die Möglichkeiten der meisten akademischen Forschungsgruppen. Weitere genetische Methoden sind z.B. mRNA Display^[73] und das Yeast three-hybrid-System (Y3H)^[74]. Das bekannteste Medikament, welches aus einem genomweiten genetischen Ansatz identifiziert wurde ist das Reserveantibiotikum Platensimycin (**53**). Dieses bindet an das zum Veröffentlichungszeitpunkt neue Target β -Ketoacyl Acyl Carrier Protein Synthase FabF^[75], einem essentiellen Enzym der bakteriellen Fettsäurebiosynthese.



Die heutige Verbreitung von DNA-Microarrays ermöglicht zur Unterstützung des Wirkstoff-Entwicklungsprozesses routinemäßig Genexpressionsanalysen durchzuführen^[76]. Diese liefern wertvolle Hinweise auf molekulare Targets und mögliche Nebenwirkungen neuer biologisch aktiver Verbindungen in lebenden Zellen. Der zur Target-Identifikation angewandte Vergleich zwischen Expressionsprofilen von wirkstoff-behandelten Zellen und Single-Knock-Out-Zellen kann jedoch ungenau sein und ist daher durch weitere Experimente zu validieren^[69].

Bioinformatische Methoden können den Target-Identifikationsprozess durch Vorhersagen des Bindungsverhaltens von Wirkstoffen an bekannte Targets und Vorhersagen der zellulären Antwort auf den Wirkstoff unterstützen^[69]. Für alle Anwendungen der modernen Targetidentifizierung ist außerdem eine anspruchsvolle bioinformatische Analyse der entstehenden umfangreichen Datenmengen unverzichtbar.

Chemische Proteomik

In Folge wird nur der im Rahmen der vorliegenden chemischen Forschungsarbeit zur Identifikation der Target-Proteine des Naturstoffes Collinolacton (**20a**, **20b**) verfolgte Ansatz der Chemischen Proteomik näher ausgeführt. Unter dem Begriff der Chemischen Proteomik werden auf hochauflösender Massenspektrometrie basierende affinitätschromatographische Methoden zusammengefasst. Diese bieten einen proteomweiten Ansatz zur Identifikation von Protein-Wirkstoff-Wechselwirkungen in natürlicher zellulärer Umgebung. Vorteile wie die Erkennung posttranslationaler Modifikationen und Verwendung krankheitsrelevanter Zellen stehen dem Nachteil einer notwendigen chemischen Modifikation des Wirkstoffes zur Identifikation gebundener Proteine gegenüber^[77].

Photoaffinitäts-Markierungen

Die vorhandenen Methoden der chemischen Proteomik können in kovalente Drug-Target-Bindung (Aktivitätsbasiertes Protein Profiling, ABPP) und nicht-kovalente Bindung (Compound-centric chemical Proteomics, CCCP) eingeteilt werden^[77]. ABPP^[78] bezeichnet oft die Suche nach neuen Wirkstoffen für be-

stimmte Enzymklassen mit einer nucleophilen Cystein- oder Seringruppe im aktiven Zentrum. Diese bindet irreversibel an eine elektrophile Gruppe des Wirkstoffes. Ist dieser mit einer Fluoreszenzmarkierung verküpfert, so können Target-Proteine in einer anschließenden Gelelektrophorese selektiv identifiziert werden. ABPP umfasst aber auch das universell einsetzbare Photo-Affinity-Labeling (PAL, s. Abb. 15)^[79]. Im Folgenden wird als ABPP-Methode nur Photo-Affinity-Labeling diskutiert, da weitere Methoden nicht für die Identifizierung biologischer Proteintargets von Collinolactonderivaten geeignet sind.

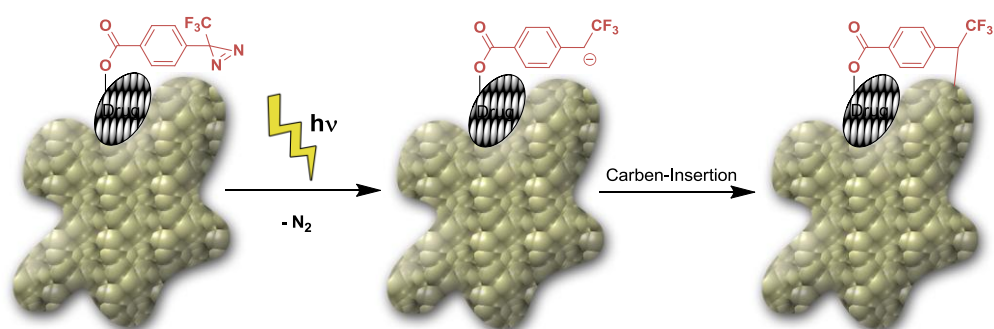


Abb. 15: Wirkungsweise des Photo-Affinity-Labelings (PAL) mit Diazirinen. Nach Bindung eines PAL-markierten Wirkstoffes an sein Proteintarget erfolgt Belichtung und Eliminierung von Stickstoff. Hierdurch entsteht ein hochreaktives Carben, welches in Bindungen der nahegelegenen Proteintasche kovalent inseriert.

Im Photoaffinitäts-Labeling wird nach Bindung eines Wirkstoffes an sein Proteintarget eine kovalente Bindung zwischen PAL-markiertem Wirkstoff und seinem Targetprotein hergestellt. Dies ermöglicht selbst die Identifikation schwach bindender Proteine und gibt anders als im CCCP-Ansatz Aufschluss über den genauen Bindungsort im Protein. Der markierte Wirkstoff kann mit dem Lysat beliebiger Zellen inkubiert werden. Gängige Photoaffinitäts-Label wie Arylazide, Benzophenone oder 3-Aryldiazirine^[80] bilden dann unter Belichtung hochreaktive Carben-Intermediate, welche in Folge in benachbarte Bindungen der Proteinumgebung inserieren (s. Abb. 15). Nach enzymatischem Verdau kann der Wirkstoff-Peptid-Komplex durch Gelelektrophorese aufgereinigt werden und massenspektrometrisch analysiert werden. Die Identifikation des gelabelten Peptidfragments erfolgt durch Verwendung radioaktiver^[81], perfluorierter^[82],

fluoreszenzierender^[83] oder stabiler Isotopenmarker^[84]. Diese werden entweder direkt im Photoaffinitäts-Label integriert oder mit diesem über einen Abstandshalter verbunden. Radioaktive Markierungen (meist ³H- oder ¹⁴C-Markierung) sind durch die notwendige Durchführung in Isotopenlaboren aufwendig und nicht für Hochdurchsatzverfahren geeignet. Auch fluoreszenzbasierte Gelelektrophorese-Verfahren sind aufgrund des zusätzlichen Arbeitsschrittes der Elektrophorese für HTS-Screenings nur bedingt geeignet. Durch fortschreitende Entwicklungen in der Massenspektrometrie und der bioinformatischen Auswertung der erhaltenen Daten ist die gelfreie Identifikation durch Markierung von Wirkstoff-Peptidfragmenten mit stabilen Isotopen zurzeit der modernste Ansatz. Im Optimalfall lässt sich das isotopenmarkierte Photoaffinitäts-Label wie im SILIC-Ansatz (Stable Isotope Labeled Inhibitors for Cross-Linking)^[84] synthetisch in das Wirkstoffmolekül integrieren. Dies erleichtert die Identifikation von Target-Peptidfragmenten in Anwesenheit einer Vielzahl anderer Peptide des Verdaus und minimiert die Gefahr einer veränderten Targetspezifität durch die Einführung großer Gruppen, welche gerade durch Fluoreszenzmarkierung gegeben ist. Im SILIC-Verfahren wird ein doppelter PAL-Ansatz unter Verwendung eines deuterierten und nicht-deutertierten Photoaffinitäts-Labels gleichzeitig im Massenspektrometer analysiert. Peptide gleicher Retentionszeit und einer Massendifferenz der beiden Label identifizieren Target-Proteine des getesteten Wirkstoffes und können durch bioinformatische Analyse sicher aus der großen Menge vorhandener Peptide bestimmt werden. SONG ET AL.^[85] haben die Verwendung isotopenmarkierter Photoaffinitäts-Label darüberhinaus mit Fluorous-Solid-Phase-Extraction (FSPE) verbunden und bieten so eine schnelle, gelfreie Aufreinigung in Kombination mit sicherer Detektion spezifisch bindender Proteine. Noch ist diese Methode allerdings nicht durch Identifizierung von Proteintargets validiert worden. Ist eine direkte Integration des Photoaffinitäts-Labels in das Wirkmolekül nicht möglich, so kann die Verknüpfung über geeignete langkettige Abstandshalter erfolgen.

Nicht-kovalente Verfahren der chemischen Proteomik

Moderne, nicht-kovalente CCCP-Verfahren haben sich aus seit vielen Jahren etablierten Affinitätschromatographie-Verfahren entwickelt. In der Affinitäts-

chromatographie wird der Wirkstoff über einen langkettigen Abstandshalter an einer festen Phase (meist Sepharose) immobilisiert. Nach Inkubation mit einem Zellysat können nichtbindende Proteine in einem Waschschrift entfernt werden. Je nach Bedingungen können aufgrund der nicht-kovalenten Natur der Protein-Wirkstoffbindung in diesem Schritt ebenfalls schwach bindende Proteine verloren gehen. In einem Elutionsschrift, z.B. durch Pufferwechsel, werden nachfolgend die gebundenen Proteine erhalten, welche nach Verdau und SDS-Gelelektrophorese massenspektrometrisch (MALDI oder ESI) analysiert werden. Alternativ kann der Wirkstoff über ein Spacermolekül mit Biotin verbunden werden, welches nach Inkubation des Wirkstoff-Biotin-Komplexes mit Zellysat spezifische Bindung an eine feste Avidinmatrix vermittelt. Nach Waschen und Elution erfolgen identische analytische Schritte zur Identifikation der gebundenen Proteine. Vorteilhaft an der Nutzung eines Wirkstoff-Biotin-Komplexes ist, dass alle Syntheseschritte gut analysiert werden können, Festphasensynthese bietet dagegen den Vorteil einer sehr einfachen Aufreinigung.

Vergleichende affinitätschromatographische Verfahren (ICAT)

Die Unterscheidung zwischen nicht-spezifisch an die feste Phase oder den Spacer bindenden Proteinen und Proteinen, die spezifisch den Wirkstoff binden, hat eine Vielzahl verschiedener Methoden hervorgebracht. Diese unterteilen sich in vergleichende und kompetitive Verfahren. Seit langer Zeit etablierte vergleichende Affinitätschromatographie nutzt einen doppelten Ansatz aus einer biologisch aktiven immobilisierten Verbindung und einem strukturverwandten inaktiven immobilisierten Derivat. Der visuelle Vergleich der SDS-Gele beider Ansätze identifiziert spezifisch an den aktiven Wirkstoff bindende Proteine. Zwar ist dieses Verfahren apparativ einfach, jedoch ist die Identifikation quantitativ gering in der Zelle vorkommender Proteine und Automatisierung nur schwer möglich.

Im moderneren, gelfreien ICAT-Verfahren (Isotope-coded affinity tag) wird ein dualer Ansatz durch Vergleich der gebundenen Proteine eines immobilisierten, biologisch aktiven Wirkstoffes und einer nicht aktiven immobilisierten Modellverbindung genutzt (s. Abb. 16). Von der inaktiven Matrix eluierte Proteine werden in

einem weiteren Schritt mit einem isotoopenmarkierten Biotin-Label gekoppelt. Proteine der aktiven Matrix werden dagegen mit einem nichtmarkierten Biotinlabel versehen. Nach Verdauung und Aufreinigung über eine Avidinsäule werden die beiden Ansätze gemeinsam massenspektrometrisch analysiert. Ein Peptidfragment eines spezifischen Binders besitzt im Gegensatz zu Peptidfragmenten unspezifischer Bindern keinen doppelten Signalsatz, da er nur mit einem leichten Biotin-Label verbunden ist. Höhere Genauigkeit und eine mögliche Automatisierung führen hier zu einem erhöhten apparativem Aufwand und der Notwendigkeit einer differenzierten bioinformatischen Analyse. Ebenfalls nachteilig bei vergleichenden Verfahren ist die Notwendigkeit einer strukturell ähnlichen, biologisch aber nicht aktiven Verbindung. Diese in biologischen Tests zu identifizieren und zu immobilisieren bedeutet weiteren Mehraufwand.

Kompetitive affinitätschromatographische Verfahren (SILAC, ITRAQ)

Kompetitive affinitätschromatographische Verfahren nutzen Verdrängungsexperimente immobilisierter Wirkstoffe durch deren freie Analoga unter Verwendung von Isotoopenmarkierung und quantitativer hochauflösender HPLC-MS (s. Abb. 16). Das interessanteste Verfahren ist hier SILAC (Stable Isotope Labeling by amino acids in cell culture)^[86]. Im SILAC-Verfahren werden jeweils Zellkulturen in Gegenwart einer deuterierten Aminosäure (meist Lysin oder Arginin) und der jeweiligen leichten Aminosäure kultiviert. Nach Vorbehandlung der „schweren“ Kultur mit freiem Wirkstoff erfolgt parallel die affinitätschromatographische Aufreinigung über Matrices mit immobilisiertem Wirkstoff. Durch gemeinsame LC/MS-Analyse der beiden verdauten Ansätze und bioinformatische Analyse können spezifisch an den Wirkstoff bindende Proteine zuverlässig identifiziert werden. Sie sind aufgrund des Verdrängungsexperimentes mit freiem Wirkstoff quantitativ abgereichert, daher ist auch das Signal ihres deutierten Peptidfragments abgereichert. Spezifisch bindende Proteine lassen sich somit durch einen Vergleich der relativen Intensitäten von deuterierten und nichtdeuterierten Peptidfragmenten von unspezifisch bindenden Proteinen unterscheiden. Auch in geringer Konzentration vorhandene Proteine,

Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Collinolacton

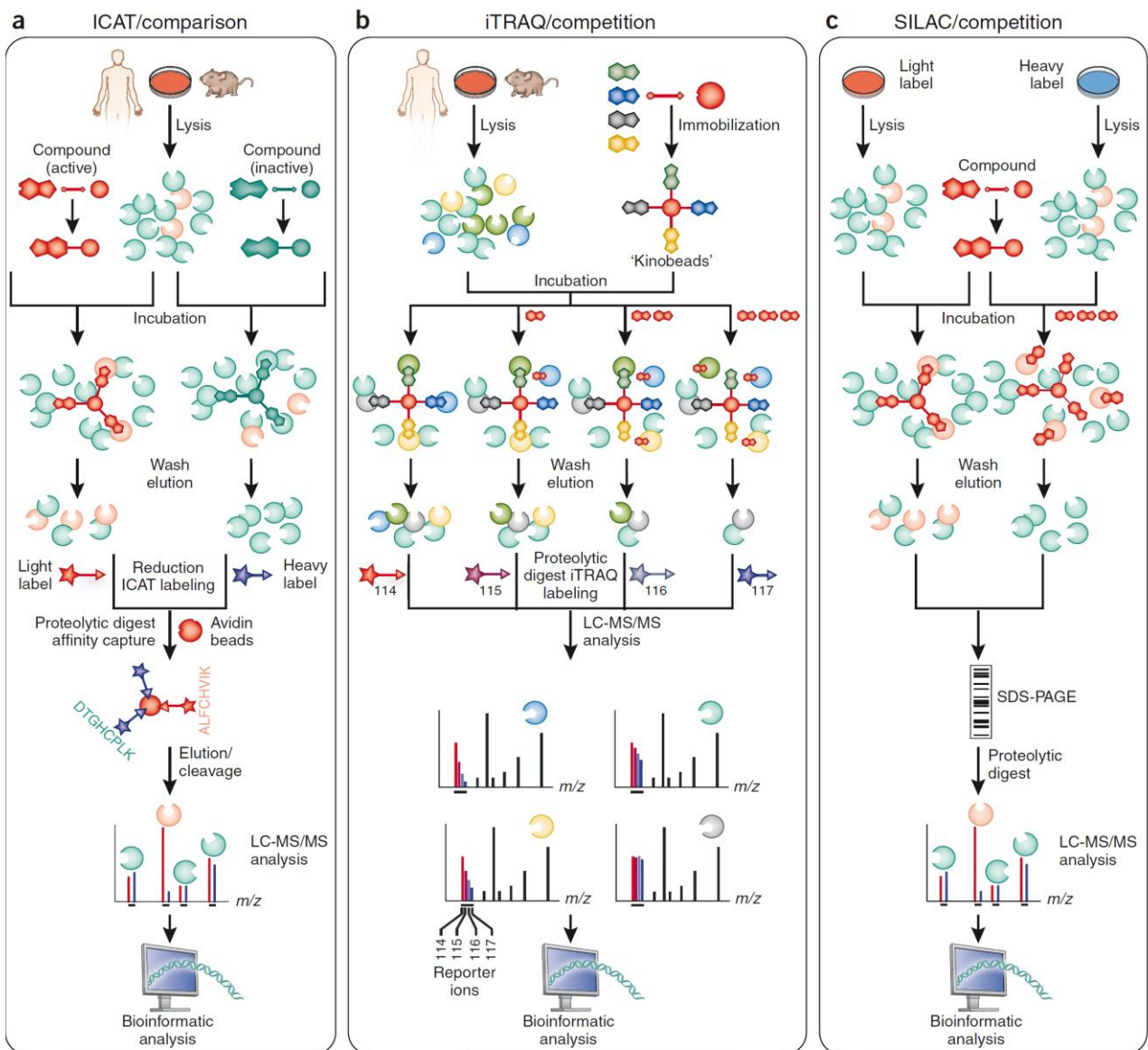


Abb. 16: Isotopenmarkierte quantitative Massenspektrometrie-Ansätze in der Chemischen Proteomik. (a) ICAT Verfahren: Vergleich zweier Experimente mit aktivem (Rot) und inaktivem (Türkis) Wirkstoff. (b) ITRAQ-Verfahren: Spezifitäts- und Affinitätsbestimmung von Kinase-Inhibitoren (Rot) durch Verdrängung von Proteinen, die an eine mit nicht-spezifischen Kinase-Inhibitoren (Schwarz, Gelb, Blau, Grün) belegte Matrix („Kinobeads“) binden. Peptidfragmente jedes Kanals werden mit ITRAQ-Labels versehen. (c) SILAC-Verfahren: Vergleich schwerer und leichter Peptidfragmente aus SILAC-Ansätzen mit und ohne Verdrängungsexperimenten durch den Wirkstoff (Rot). Protein-Targets sind nach den an sie bindenden Molekülen gefärbt. (Abb. aus [77])

welche in einem gelbasierten, visuellen Ansatz übersehen worden wären, werden somit erfasst. Weiterhin vorteilhaft ist die relativ einfache Durchführung des Pulldowns. Das SILAC-Verfahren bietet identische Bedingungen zwischen Kontrolle und Experiment und erspart einen affinitätschromatographischen Schritt gegenüber dem ICAT-Verfahren. SILAC ist weiterhin hauptsächlich für Zellkulturen von Säugetieren geeignet, Prokaryonten metabolisieren die verwendeten schweren Aminosäuren^[87]. Ein Ausweg ist Labeling durch reduktive Methylierung^[88] oder genetische Modifikation des Organismus^[89]. Auch die SILAC-Methode benötigt ein geeignetes hochauflösendes Massenspektrometer und entsprechende Software (z.B. MaxQuant^[90]), sowie für die umfangreiche bioinformatische Analyse geschultes Personal.

Ein weiteres sehr interessantes Hochdurchsatzverfahren ist das von BANTSCHOFF ET AL. entwickelte ITRAQ-Verfahren (isobaric tags for relative and absolute quantification)^[91]. Hierbei wird eine mit vier unspezifischen Kinaseinhibitoren belegte Festphase („Kinobeads“) in einem vierfachen Ansatz mit Zelllysat inkubiert (4-Kanal ITRAQ). In jedem Kanal werden mit unterschiedlichen Konzentrationen an zu testendem Wirkstoff Verdrängungsexperimente durchgeführt und gebundene Proteine nach Waschen und Elution verdaut. Die erhaltenen Peptidfragmente werden je Kanal mit einem isobaren Label versehen, welches in nachfolgenden Tandem-MS-Experimenten jedoch eine für den Kanal spezifische Reportergruppe freisetzt. Die aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl eingebauter schwerer ¹³C- oder ¹⁵N-Atome verschiedenen Massen der Reportergruppen, werden durch eine neutral abspaltende Balancegruppe ausgeglichen (s. Abb. 17). Die LC-MS/MS Analyse erfolgt von allen Kanälen im selben Experiment. Eine quantitative Analyse der Reporter-Ionen der einzelnen Kanäle gibt, zusätzlich zu Informationen über spezifische Binder, Aufschluss über die Bindungsstärke des Wirkstoffes im Targetprotein. Dieser Ansatz bietet die schnelle, automatisierte Generierung einer hohen Menge an Informationen über Target-Wirkstoff-Wechselwirkungen. Kommerziell erhältliche Kinobeads machen außerdem chemische Modifikationen des Wirkstoffes obsolet. Anfängliche Probleme der Detektion kleiner Massenfragmente in Ionenfallen-Massenspektrometern konnten durch die Anwendung der Pulsed Q Dissociation (PQD)-Technik behoben werden^[92]. Diese besteht aus einer hochenergetischen Aktivierung der Vorgänger-

Ionen, einer Zeitverzögerung, um den Zerfall zu ermöglichen und einem anschließenden niederenergetischen Puls, welcher die Fragmentationen in der Ionenfalle einfängt.

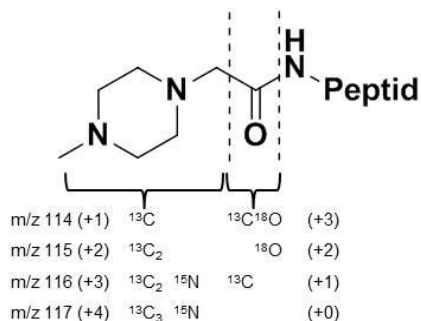


Abb. 17: Aufbau isobarer ITRAQ-Label: Reportergruppen verschiedener Massen werden durch Balancegruppen zu einer Masse von $m/z = 145$ ausgeglichen. Tandem-MS setzt die spezifischen Reporterionen verschiedener Massen frei^[93].

Trotz der apparativ einfachen Durchführung eines ITRAQ-Experimentes werden auch in dieser Technik hohe Anforderungen an zu verwendene Massenspektrometer und nachfolgende bioinformatische Analyse gestellt. ITRAQ beschränkt sich durch die Verwendung von Kinobeads ausschließlich auf das Kinom, die Gesamtheit aller zellulären Kinasen. Weitere Wirkorte könnten nur durch die Entwicklung neuer fester Phasen erschlossen werden.

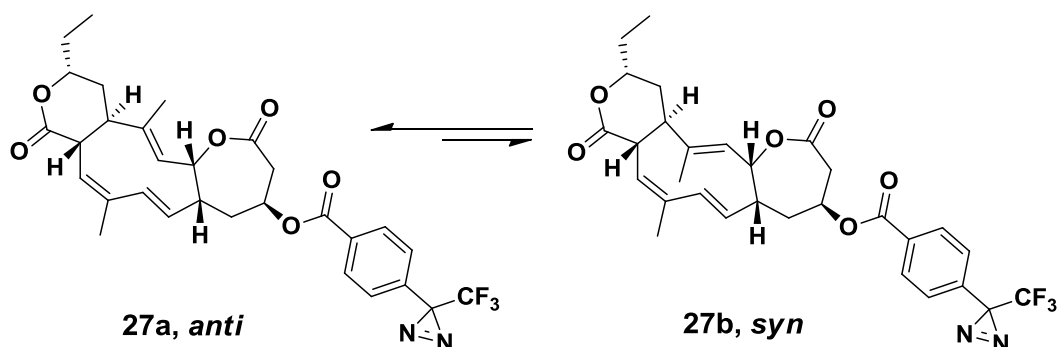
Abschließend muss erwähnt werden, dass bei allen verwendeten affinitätschromatographischen Verfahren, die auf nichtkovalenten Wechselwirkungen beruhen, nur die unter den jeweiligen Bedingungen löslichen Proteine identifiziert werden können. Eine Zuordnung des Bindungsortes ist nicht möglich. Es werden in diesem Verfahren weiterhin Proteinkomplexe isoliert, „2nd oder third-Shell binder“ (Piggybacking) werden ebenfalls als Binder erkannt. Durch Verwendung von Proteindatenbanken (IntAct or Mint^[94]) können bekannte „Piggybacker“ allerdings identifiziert und entfernt werden.^[77]

Weiterhin ist nach Identifikation von spezifisch bindenden Proteinen eine sorgfältige Validierung notwendig. Weitere Affinitätsuntersuchungen können durch Techniken wie H/D-Austausch^[95], Isothermische Kalorimetrie^[96]/ Dynamische Dif-

ferenzkalorimetrie, Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (surface plasmon resonance spectroscopy, SPR)^[97] oder NMR erhalten werden. Röntgenstrukturanalyse des Protein-Wirkstoffkomplexes, sofern möglich, liefert Informationen über Ort und Art der Bindung. Um Bindungen in lebenden Zellen zu untersuchen, kann Fluoreszenz-Labeling oder Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) genutzt werden. Sollte dies nicht vor dem Target-Fishing erfolgt sein, müssen funktionelle Auswirkungen des Wirkstoffes auf Zellen untersucht werden. Mögliche Ansätze hierfür stellen ein Zellproliferationsassay, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder die Genexpressionsanalyse^[77] dar.

5.2 Ausgangspunkt der Identifizierung des Wirkortes von Collinolactonderivaten

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde ein im Arbeitskreis PROF. GROND vorhandenes Diazirinylbenzoesäure-Photoaffinitätslabel^[81] erfolgreich mit Collinolacton (**20a**, **20b**) zu **27** verestert und seine Zytotoxizität in Kooperation nachgewiesen^[35b]. In einem nachfolgenden Protein-Fishing könnte die Verwendung eines ¹⁴C-markierten Photoaffinitätsmarkers zur Identifikation gebundener Proteine mittels SDS-PAGE und Autoradiographie genutzt werden. Somit wäre eine direkte Identifizierung der Bindungsstelle in Target-Proteinen möglich. Dieser Ansatz birgt allerdings den inhärenten Nachteil der Durchführung des Protein-Fishings in einem Isotopenlabor, was einen beträchtlichen apparativen Mehraufwand bedeutet.

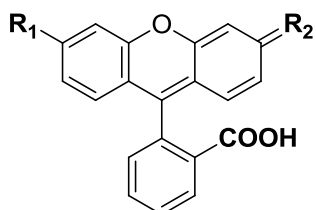


Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein alternatives, Affinitätschromatographie-basiertes Konzept erarbeitet werden, welches eine verlässliche und praktikable

Identifikation von an Collinolactonderivaten bindenden Proteinen gewährleistet. Collinolacton (**20a**, **20b**) bildet hier einen Sonderfall, da es erst nach Veresterung in 4-Position biologische Aktivität zeigt. Eine direkte Immobilisierung an kommerziell verfügbaren Affinitätschromatographiematrizes wie Sepharose- oder Toyopearl-Matrizes war somit ausgeschlossen. Diese können erst nach Modifikation durch einen individuell für **20** gestalteten Spacer unter Sicherstellung gleichbleibender biologischer Aktivität genutzt werden. Parallel zu dem affinitätschromatographischen Ansatz sollte im Rahmen einer Kooperation mit PROF. DR. STEPHAN ZÄHLER (LMU München) eine Untersuchung des Bindungsortes in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Diese Untersuchungen mit einem zu synthetisierenden, fluoreszierenden Collinolactonderivat sind auch in Hinblick auf die später notwendige Validierung des Targets von Interesse.

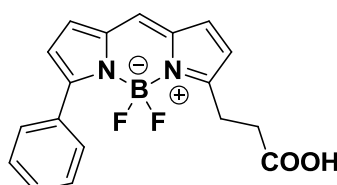
5.3 Fluoreszenzmarkierung

Um erste, schnelle Informationen über den Bindungsort in der Zelle zu erhalten, sollte ein fluoreszierendes Collinolacton-Analogon synthetisiert werden. Per Fluoreszenzmikroskopie sollte so eine Zuordnung zu einzelnen Zellorganellen möglich sein. Eine Vielzahl von Fluoreszenzmarkern ist kommerziell erhältlich, aufgrund der angestrebten hohen Quantenausbeute meist bestehend aus großen konjugierten, polyzyklischen, aromatischen Grundgerüsten (z.B. Fluorescein- (**54**), Rhodamin- (**55**) oder BODIPY-Marker wie BODIPY R6G, **56**).

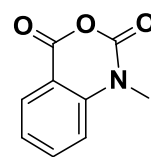


54 R₁ = OH, R₂ = O

55 R₁ = NEt₂, R₂ = Et₂N⁺Cl⁻



56



57

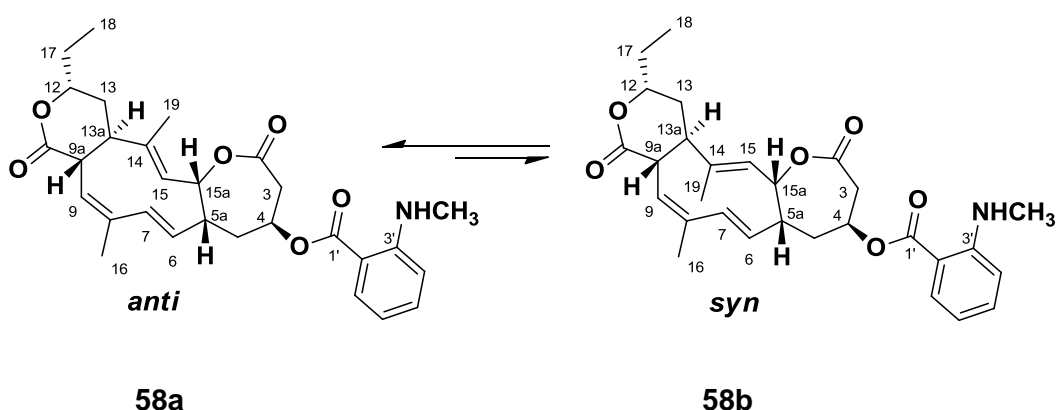
Es ist anzunehmen, dass eine Kopplung von Collinolacton (**20a**, **20b**) an einen Fluoreszenzmarker desselben oder größeren Molekulargewichts eine starke Än-

derung seiner biologischen Aktivität zur Folge haben würde^[98]. Die Größe des Fluoreszenzmarkers könnte sogar eine Bindung an den natürlichen Rezeptor unmöglich machen. Es wäre möglich diesen Effekt durch einen ausreichend langen Spacer, wie z.B. eine längere aliphatische Kette oder ein Polyethylenglykol-Spacer (PEG-Spacer), zwischen Marker und Collinolacton (**20a**, **20b**) zu minimieren. Allerdings erfordert dies weitere Syntheseschritte. Länge sowie chemische Natur des Spacers können ebenfalls Einfluss auf die biologische Aktivität haben^[99] (s.a. Kap. 5.7.1). Die Auswahl wird ebenfalls beschränkt durch die einzige für eine Derivatisierung zur Verfügung stehende Alkoholgruppe und die Notwendigkeit von sehr milden Reaktionsbedingungen bei der Derivatisierung von **20** (s. Kap. 4.1).

5.3.1 N-Methylantraniloyl-Marker

Betrachtet man die Wirkung von Collinolactonderivaten auf biologische Systeme, so zeigen gerade Benzoessäurederivate auffällige biologische Aktivität (s. Kap 1 und 6). Sie besitzen Zytotoxizität und wirken sowohl auf das Mikrotubuli- als auch auf das Aktinnetzwerk. Ein fluoreszierendes Benzoessäurederivat mit ausreichender Quantenausbeute und geeigneter Extinktions- und Emissionswellenlänge wäre somit optimal für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geeignet.

N-Methylisatosäure-Anhydrid (**57**) ist als Fluoreszenzmarker für Polysaccharide^[100] und Ribonucleotide^[101] bekannt. Die synthetisierten N-Methylantraniloyl-Ribonukleotide (MANT-Ribonukleotide) zeigen eine Extinktionswellenlänge von 330-350 nm und ein Emissionsmaximum bei 430-445 nm in wässriger Lösung. Die Quantenausbeute in wässriger Lösung beträgt 0.12-0.24, wobei die Fluoreszenz sensibel auf die Polarität des Lösungsmittels reagiert, in DMF wurde sogar eine Quantenausbeute von 0.83-0.93 gemessen^[102]. Diese Daten ließen auf eine gute Eignung des Markers für die Detektion kleiner Mengen des Collinolactonderivats in Zellen schließen. Die strukturelle Ähnlichkeit zu bereits biologisch getesteten Derivaten wie 4-O-(*p*-Brombenzoyl)-collinolacton (**21a**, **21b**) legte eine vergleichbare biologische Aktivität nahe.

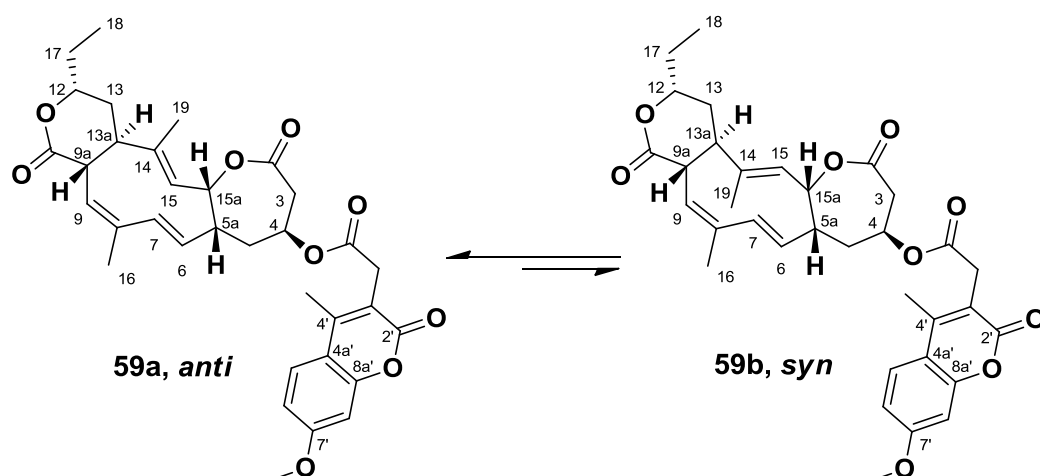


Die Synthese erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichen *N*-Methylisatosäure-Anhydrid unter der Verwendung von DMAP^[103], wobei die Ausbeute nach HPLC-Aufreinigung in allen Fällen gering war (5 – 23%). Die Reaktion erfolgte erst bei Temperaturen von 40-50°C, wobei auf höhere Temperaturen aus Rücksicht auf die Temperaturinstabilität von Collinolacton (**20a**, **20b**) verzichtet wurde (s. Kap. 4.1). Die niedrige Ausbeute liegt wahrscheinlich sowohl in der geringen Nucleophilie der Hydroxylgruppe von Collinolacton (**20a**, **20b**) als auch in der elektronenschiebenden Wirkung der *N*-Methylaminogruppe und damit verbundenen Desaktivierung der Carbonsäure begründet. Es konnte trotzdem eine ausreichende Menge von 2.5 mg MANT-markiertem Collinolacton (**58a**, **58b**) synthetisiert werden, welches im Arbeitskreis von PROF. DR. STEFAN ZÄHLER an der LMU München fluoreszenzmikroskopisch untersucht und auf Zytotoxizität getestet wurde. Es konnte trotz vorhandener Zytotoxizität keine eindeutige Lokalisierung in der Zelle festgestellt werden. Vielmehr zeigte das gesamte Zytosol Fluoreszenz (s. auch Kap. 6).

5.3.2 Coumarin-Marker

N-Methylisatosäure-markiertes Collinolacton (**58a**, **58b**) zeigte nicht die erhoffte Lokalisierung an einem bestimmten Zellorganell. Dies könnte seine Ursache einerseits im Targetprotein von Collinolacton-Derivaten haben, welches frei im Zytosol vorliegt, könnte aber andererseits auch auf ein verändertes Bindungsverhalten aufgrund der veränderten Polarität des Anthranilsäurerests gegenüber bisher getesteten Benzoesäurederivaten schließen lassen. Ebenso ist eine intrazelluläre Metabolisierung oder ein Zerfall des markierten Derivats vorstellbar, was zu einer

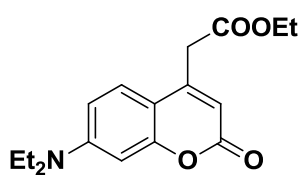
unspezifischen Markierung der Zelle führen könnte. Um Effekte des Markers auf das Bindungsverhalten ausschließen zu können, wurden Coumarinderivate als eine weitere Klasse fluoreszierender Marker für Collinolacton (**20a**, **20b**) ausgewählt. Erste Untersuchungen auf Zytotoxizität und Bildung des monoastralen Phänotyps durch Collinolactonbenzoesäurederivaten hatten eine Toleranz von Methoxygruppen sowie eine gewisse räumliche Toleranz in *para*-Position der Benzoesäure gezeigt (s. Kap. 6.3.3). Daher erschien die Verwendung eines 7-Methoxy-4-methyl-coumarin-2-carbonsäure-Markers geeignet, ein fluoreszierendes Derivat von **20** unter Erhalt der biologischen Aktivität herzustellen. Die Reaktivität der Veresterung wurde durch Verwendung eines (2-(7-methoxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)acetyl)-Marker weiter erhöht. Einführung einer Methylen-einheit zwischen Carbonsäure und aromatischem Ring hatte in Untersuchungen der Benzoesäurederivate bereits zu einer Reaktivitätssteigerung der Veresterung geführt. Diese Modifikation wurde ebenfalls im biologischen Test toleriert (s. Kap. 6).



Die Reaktion erfolgte durch Carbodiimidaktivierung unter vollständigem Umsatz von Collinolacton (**20a**, **20b**) zum Rohprodukt von **59**. Nach flashchromatographischer und HPLC-Aufreinigung war jedoch noch immer eine Verunreinigung im NMR erkennbar. Des Weiteren zeigte sich, dass die Extinktions-/Emissionswerte des freien Markers von $\lambda_{\text{ex}} = 324 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$ in Wasser trotz einer Quantenausbeute von 0.77 für eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nicht optimal geeignet sind. Im Nahen UV wird im Fluoreszenzmikroskop wahrscheinlich zu viel des ein- bzw. ausgestrahlten Lichtes von

den Linsen absorbiert, um ein starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Das erhaltene Derivat **59** wurde daher nicht für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet.

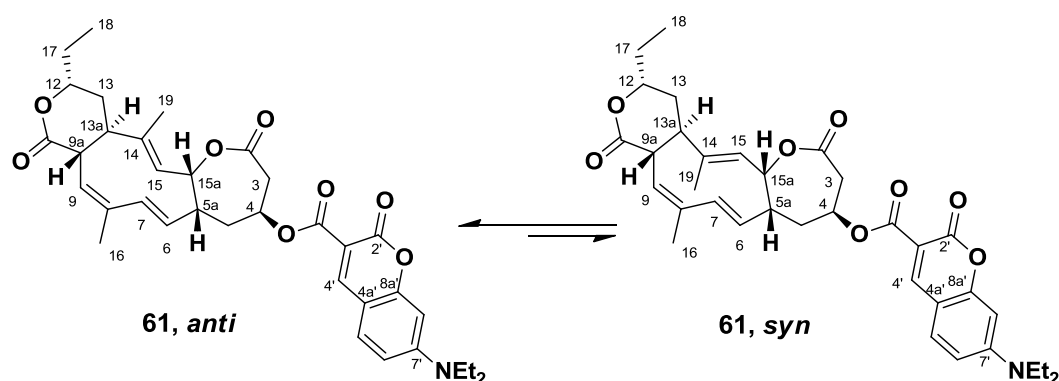
Es wurde in Folge auf einen 7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonsäure-Marker (DEAC-Marker) umgestellt, welcher als blauer Fluorophor mit guten Extinktions-/Emissionswerten von $\lambda_{\text{ex}} = 409 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 473 \text{ nm}$ (in 0.1 M Tris-Puffer, pH = 9.0)^[105] geeignet schien. Die erneute Einführung eines Amins ließ sich nicht vermeiden, da dieses als einzige funktionelle Gruppe die Extinktions- und Emissionswellenlängen des Marker ausreichend bathochrom verschieben konnte. Vorteilhaft ist allerdings, dass eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine biologische Aktivität des Markers selbst besteht. Der verwandte 7-Dimethylaminocoumarin-4-acetyl-ethylester (**60**) wurde aufgrund fehlender biologischer Aktivität von ALEXANDER ET AL.^[104] erfolgreich als Basis für eine vergleichende Fluoreszenzmarkierung diverser Naturstoffe gewählt, ist aber ver-



60

gleichsweise teuer. ALEXANDER unterstreicht die Notwendigkeit fehlender biologischer biologischer Aktivität durch Beispiele von Rhodamin-Farbstoffen, wie Rhodamin 123 oder Rhodamin B, welche sich in Mitochondrien anreichern und BODIPY-Farbstoffen, welche im Zellkern sowie im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisieren. Durch eine Verwendung des DEAC-Markers scheint unwahrscheinlich, dass eine biologische Wirkung des Collinolactonderivats durch den Marker induziert wird.

Die Synthese von DEAC-Collinolacton (**61a**, **61b**) erfolgte durch Carbodiimidaktivierung unter vollständigem Umsatz von Collinolacton (**20a**, **20b**). Nach flashchromatographischer Aufreinigung, waren allerdings in der LC/MS (HPLC D, Säule: Maisch Supersphere C18ec, Methanol/Wasser, Programm A) drei deutliche getrennte Signale zu erkennen, welche die gleiche Masse und ein identisches Fragmentierungsmuster besaßen. Im DAD-Detektor (HPLC B, Kromasil C18, 65% Acetonitril/Wasser isokratisch) zeigte jeder Peak das



identische UV-Spektrum (s. Abb. 19). Nach Trennung mittels semipräparativer HPLC erwies sich der Stoff mit Signal „Peak 3“ in der NMR-Spektroskopie als Gemisch zweier *anti*-Zielprodukte DEAC-Collinolacton (**61a**, **61b**), zeigte allerdings im $^1\text{H-NMR}$ vier Signale unterschiedlicher Intensität für $4'$ -H des Coumaringerüsts. „Peak 2“ (4% Ausbeute) konnte erfreulicherweise in der NMR-Spektroskopie als reines *anti*-DEAC-Collinolacton (**61b**) identifiziert werden. Es ist nicht wie sonst üblich ein zweites Signalsatz einer Minderkomponente zu erkennen. Deshalb sollte die räumliche Anordnung der Substituenten zweifelsfrei mittels 2D-NMR-Spektroskopie belegt werden. Die Zuordnung erfolgte durch *H-H*-COSY- und HSQC- sowie die räumliche Anordnung durch NOESY-Experimente (s. Abb. 18). Hier zeigte sich eine räumliche Nähe von 16-H_3 und 13a-H sowie 15-H und 13a-H , aber keine Nähe von 16-H_3 und 19-H_3 . Unter Berücksichtigung der weiteren Kopplungen (s. Abb. 18) konnte *anti*-DEAC-Collinolacton (**61b**) zweifelsfrei bewiesen werden. Die Summenformel wurde weiterhin durch FT-ICR-MS bestätigt. Interessanterweise ist im $^{13}\text{C-NMR}$ eine Aufspaltung der Signale von C- $2'$, C- $3'$, C- $4\text{a}'$ und C- $8\text{a}'$ des Coumarinrestes in ein Dublett zu sehen. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Aufgrund der Regelmäßigkeit der Signale und fehlenden weiteren Signalen ist eine Verunreinigung ausgeschlossen.

Ebenso unbekannt sind die Gründe für eine Konformationsstabilität von *anti*-4-*O*-DEAC-Collinolacton (**61b**), aufgrund derer in NMR-Spektroskopie kein **61a** und kein *syn*-Rotamer aufzufinden war. Weiterhin sind die Ursachen für die unterschiedliche Retention von *anti*-4-*O*-DEAC-Collinolacton (**61b**) fraglich. Eine Reinjektion des HPLC-reinen *anti*-Gemisches von **61a** und **61b** („Peak 3“) führte

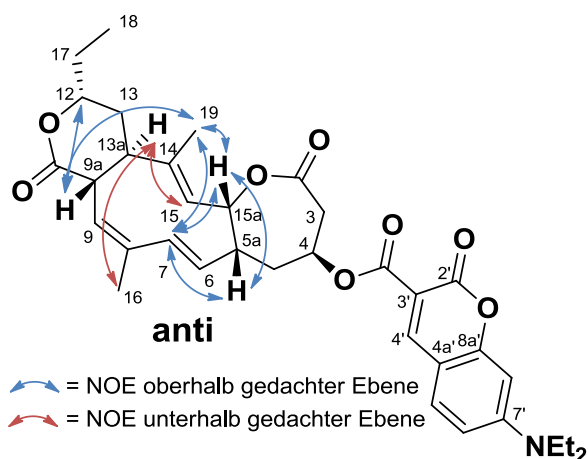


Abb. 18: Relative Konfiguration von *anti*-4-O-DEAC-Collinolacton (**61a**) zeigt an charakteristischen NOE-Korrelationen.

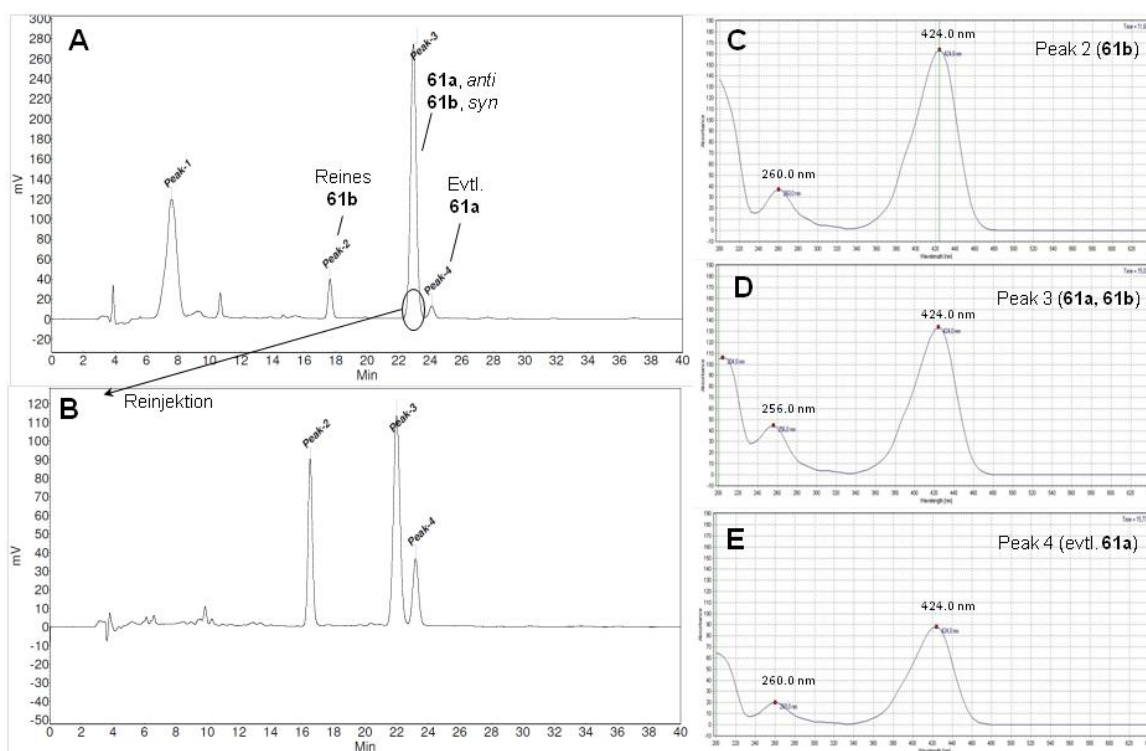


Abb. 19: (A) HPLC-Chromatogramm von flashchromatographisch aufgereinigtem 4-O-DEAC-Collinolacton (**61a**, **61b**). (B) HPLC-Chromatogramm: Reinjektion des mittels HPLC aufgereinigten Gemisches von **61a**, **61b**. (C) UV-VIS Spektrum von Peak 2 (**61b**). (D) UV-VIS Spektrum von Peak 3 (**61a**, **61b**). (E) UV-VIS Spektrum von Peak 4 (evtl. **61a**).

wiederum zu Bildung von insgesamt drei Signalen, unter ihnen **61b** („Peak2“) und wahrscheinlich **61a** („Peak4“, s. Abb. 19 B). Dies beweist Umlagerung des Gemisches in 2 stabile Konformere. Das vermutlich nach dem Gemisch eluierende **61a** war für NMR-spektroskopische Untersuchungen nicht in genügender Menge vorhanden. Warum allerdings das Gemisch eine andere Retentionszeit besitzt als seine einzelnen Bestandteile ist unbekannt. Eventuell werden **61a** und **61b** durch π -Stacking-Wechselwirkungen zwischen dem Coumarinring und dem Zyklodecatrienring stabilisiert. Eine erste einfache Energieminimierung (MM2) mit dem Programm Chem3D Pro 12.0 zeigte allerdings, dass sich der Coumarinring aus der Collinolactonebene herausdreht. Eine Stabilisierung könnte hier nur über schwache C-H...O-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen 2'- oder 3'-Carbonylgruppen und den Wasserstoffatomen von C-3 und C-5 erfolgen. Ob diese Wechselwirkungen ausreichen ist zweifelhaft.

Im Zytotoxizitätstest des Arbeitskreises von PROF. DR. STEFAN ZÄHLER konnte keine Zytotoxizität des Gemisches von DEAC-Collinolacton (**61a**, **61b**), wie auch von **61b** festgestellt werden. Auch in L929 und PtK2-Zellen (DR. SASSE) wurde keine zytotoxische Wirkung festgestellt (s. Kap. 6). Des Weiteren konnte erneut keine lokalisierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine weitere Suche nach Fluoreszenzmarkern scheint aufgrund der vorliegenden Daten zurzeit nicht sinnvoll. Es werden daher die Ergebnisse des Target-Fishings abgewartet und auf Basis dieser neuen Daten alternative Ansätze zur Validierung des Targets entwickelt.

5.4 Konzept des Target-Fishings nach an Collinolactonderivate bindenden Proteinen:

Strategie I - Glutarsäure- und Terephtalsäure-Spacer

Zur genauen Untersuchung der biologischen Targets von Collinolactonderivaten ist der Aufbau eines geeigneten affinitätschromatographischen Systems nötig. Dieses besteht im einfachsten Fall aus drei Teilen: der aktiven Verbindung („Wirkstoff“), einem Linker und einer Immobilisierung in Form eines festen Harzes oder einer Biotin-Funktion, welche in Folge an Avidin oder Streptavidin gebunden wird.

Vergleichende Affinitätschromatographie an Sepharose

Der erste in dieser Arbeit verfolgte Ansatz (s. Abb. 20) bediente sich eines einfachen Systems aus EAH Sepharose 4B-Beads, einem weitverbreitetem Standardsystem zur Immobilisierung, Collinolacton (**20a**, **20b**) als Wirkstoff und einer Verknüpfung über einen Glutarsäure- bzw. Terephtalsäurespacer. Collinolacton stellt im Gegensatz zu vielen anderen biologisch aktiven Naturstoffen einen Sonderfall dar, da es erst durch chemische Derivatisierung seiner Hydroxylfunktion biologische Effekte zeigt. Dies ermöglicht einen vergleichenden affinitätschromatographischen Ansatz, in dem durch Wahl des verknüpfenden Spacers ein biologisch aktives System für das Target-Fishing sowie ein nicht-aktives System als Negativkontrolle hergestellt werden kann. Eine strukturell ähnliche Negativkontrolle ist in diesem Ansatz nötig, um unspezifisch an den Spacer- Bead-Komplex bindende Proteine zu identifizieren und diese von spezifischen Bindern abzugrenzen. Da Collinolactonbenzoesäure-Derivate als biologisch besonders aktiv identifiziert wurden (s. Kap. 1 und 6), bot sich für die Verknüpfung des aktiven Systems mit der festen Phase die Verwendung eines Terephtalsäurespacers an. Dieser stellte nur eine kleine Modifikation gegenüber früheren Benzoesäurederivaten dar und konnte daher als ebenfalls biologisch aktiv angenommen werden. Die geringe biologische Aktivität von 4-O-Acetylcollinolacton (**29a**, **29b**) und fehlende Induktion eines monoastralen Phänotyps^[35a] ließ vermuten, dass aliphatische Derivate als Negativkontrolle geeignet wären. Eine Verlängerung der Kettenlänge sollte eine weitere Herabsetzung der Zytotoxizität bewirken.

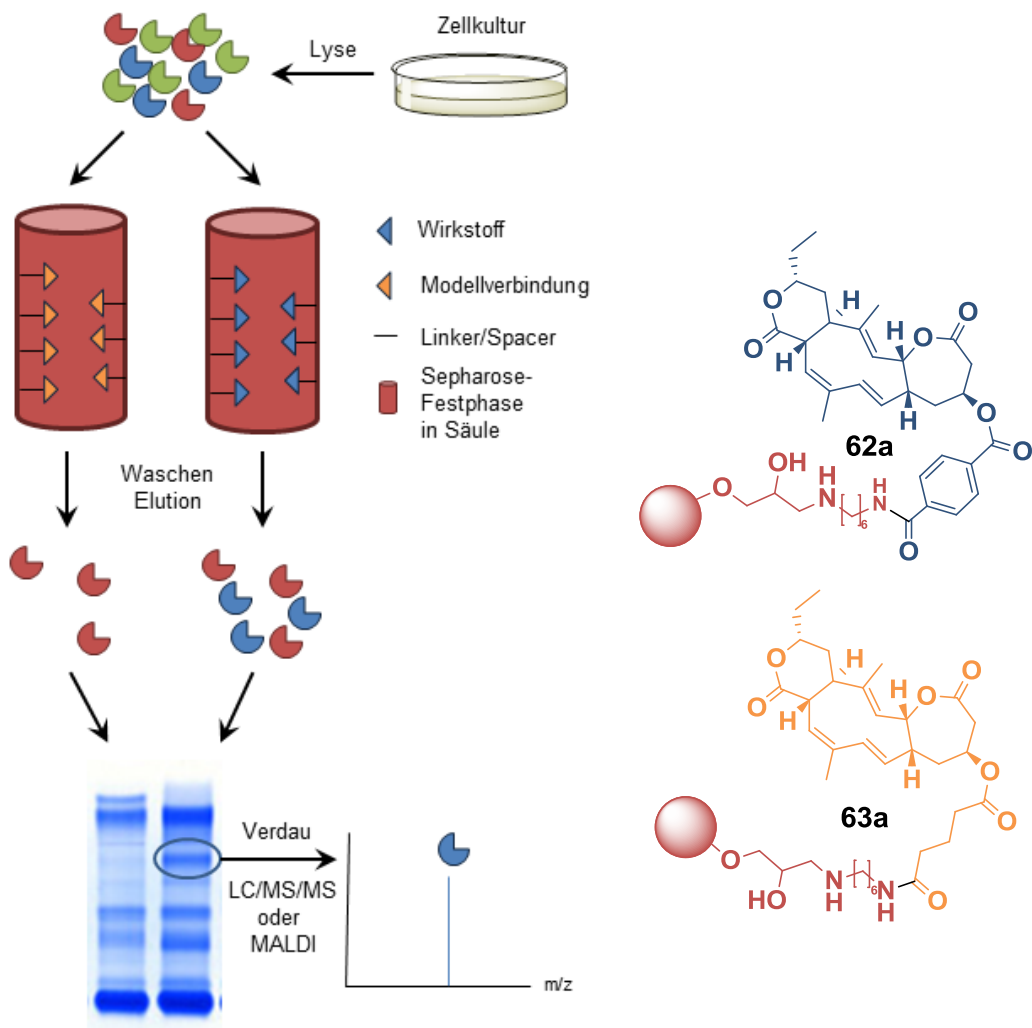
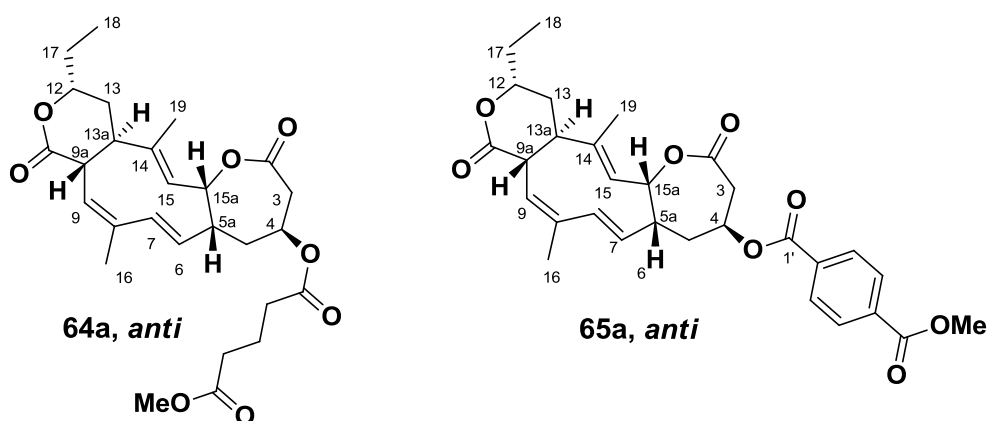


Abb. 20: Konzept der ersten in dieser Arbeit verfolgten Target-Fishing-Strategie (Vergleichende Affinitätschromatographie): Target-Proteine des Wirkstoffes aus dem Zelllysate werden über Affinitätsmatrices mit aktivem Wirkstoff (**62a**, **62b**) sowie mit inaktiver Modellverbindung (**63a**, **63b**) aufgereinigt. Durch visuellen Vergleich der eluierten Proteine beider Matrices in Gelelektrophorese können spezifisch bindende Proteine identifiziert und analysiert werden.

Die Wahl fiel daher auf einen Glutarsäurespacer. Die biologischen Aktivitäten dieser Collinolactonspacer sollten vor Beginn des Target-Fishings in den Arbeitskreisen der Kooperationspartner PROF. DR. STEFAN ZÄHLER (LMU München) und DR. FLORENZ SASSE (HZI Braunschweig) getestet werden. Synthetisch wurde zuerst aus Glutarsäure bzw. Terephthalsäure mono-geschützt, per Carbodiimid-Aktivierung mit Collinolacton (**20a**, **20b**) verknüpft und anschließend entschützt



(siehe Abb. 21 und Abb. 22). Die Wahl der Schutzgruppe war, wie in Kap. 4.1 erläutert, stark eingeschränkt und in Synthesestudien optimiert. Es wurde sich für eine Trimethylsilylethanol-(TMSE)-Schutzgruppe^[106] entschieden, welche mit Tetrabutylammonium-Fluorid (TBAF) besonders milde Abspaltungsbedingungen besitzt und ausschließlich wasserlösliche (Tetrabutylammoniumsalz) oder leicht flüchtige Spaltprodukte (Ethylen, Fluortrimethylsilan) liefert^[107]. Im biologischen Test wurden anstatt der freien Säuren Glutarsäure- bzw. Terephtalsäuremethylester von Collinolacton (**64a**, **64b** bzw. **65a**, **65b**) synthetisiert. Dies diente der Simulation einer weiterführenden Spacerkette.

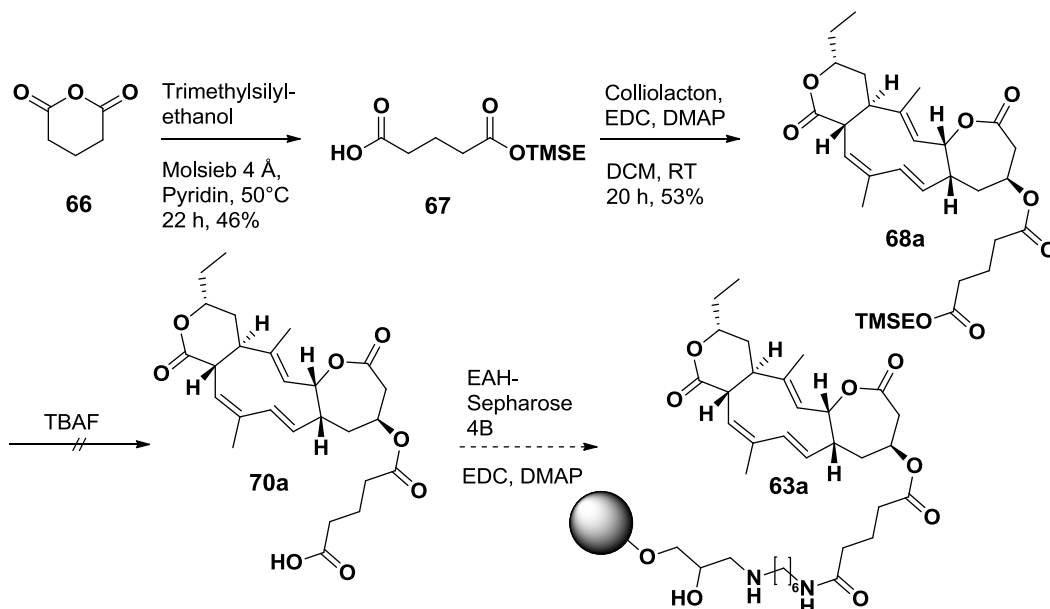
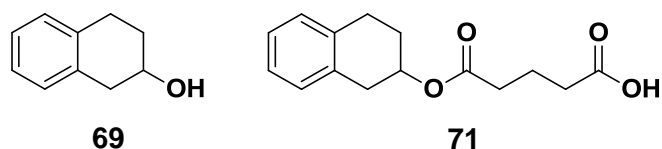


Abb. 21: Synthesepfad für die Immobilisierung des als Negativkontrolle vorgesehenen Collinolactonglutarylderivats **63**. Die Entschützung von **68** führte zu Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**).

Die Synthese von Glutarsäureanhydrid (**66**) zu Mono-TMSE-Glutarsäure (**67**) erfolgte, wie auch die Kupplung der Glutaryl-derivate an Collinolacton (**20a**, **20b**) zu **68**, in moderaten Ausbeuten (46% bzw. 53%, s. Abb. 21). Die Reaktionsbedingungen der Veresterung mit Collinolacton (**20a**, **20b**) wurden aufgrund der geringen Verfügbarkeit von **20** mit 1,2,3,4-Tetrahydro-2-Naphthol (**69**) als Modellverbindung erfolgreich und in guten Ausbeuten überprüft. Hier gelang ebenfalls die schutzgruppenfreie Kupplung von Glutarsäure und **69** unter Verwendung von Glutarsäureanhydrid (**66**) zu **71**. Es zeigte sich allerdings eine geringe Übertragbarkeit der Reaktionsbedingungen auf Reaktionen mit Collinolacton. Eine schutzgruppenfreie Synthese von 4-O-Glutaryl-Collinolacton (**70a**, **70b**) war nicht möglich.



Carbodiimid-vermittelte Schützung von Terephtalsäure (**72**) führte nach Überwindung starker Löslichkeitsprobleme von **72** zu einem Gemisch aus Mono- und Di-TMSE-Terephtalsäure (**73**, **74**), wobei der Diester **74** nach der Methode von CHENOT ET AL.^[108] wieder in den Monoester **73** überführt werden kann (s. Abb. 22). Somit kann eine bessere Atomökonomie erreicht werden. Die Gesamtausbeute der beiden Schritte betrug 65%. Eine Veresterung von Mono-TMSE-Terephtalsäure (**73**) mit Collinolacton (**20a**, **20b**) verlief mit schwankenden Ausbeuten. Auch 4-O-(Methylterephthalyl)collinolacton (**65a**, **65b**) ließ sich nur in niedrigen Ausbeuten synthetisieren. Möglicherweise ist dies durch Verluste in der HPLC-Aufreinigung aufgrund geringer Wasserlöslichkeit zu erklären. Die breite Peakform von **65** könnte ein Indikator hierfür sein.

Die Entschützung sowohl von 4-O-(TMSE-glutaryl)-collinolacton (**68a**, **68b**)- als auch von 4-O-(TMSE-terephthalyl)-collinolacton (**75a**, **75b**) erwies sich als unerwartet schwierig. Das Standardverfahren mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF^[109] führte sowohl bei **68** als auch bei **75** zum vollständigen Zerfall der Collinolactonester.

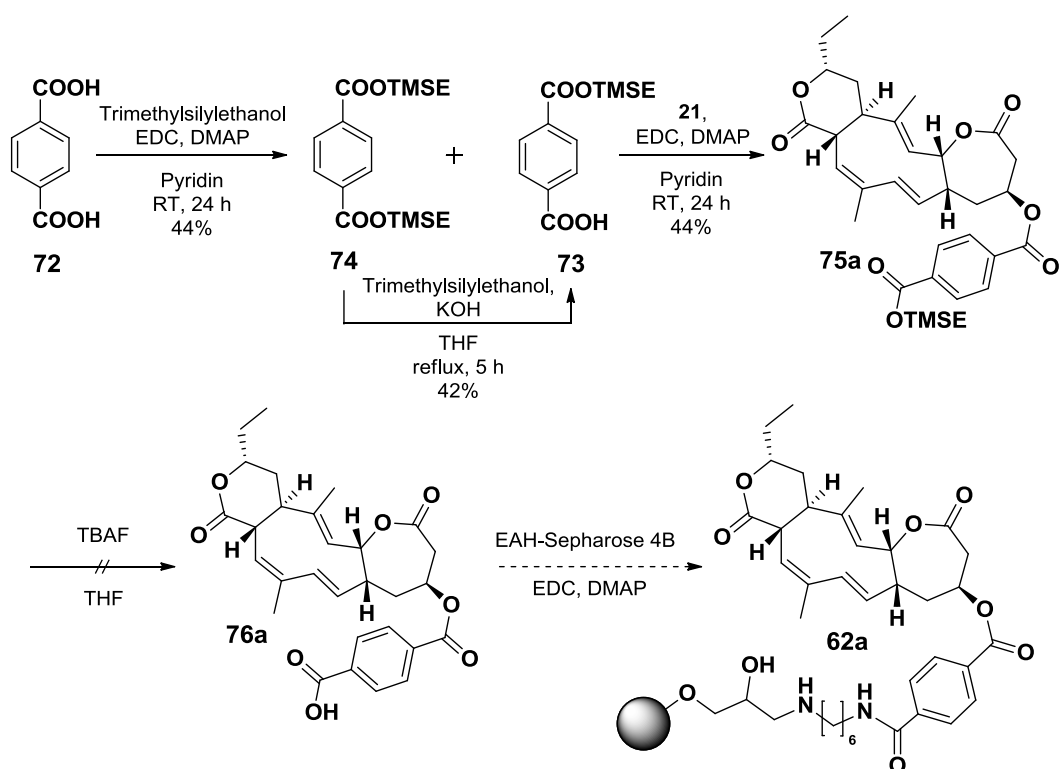
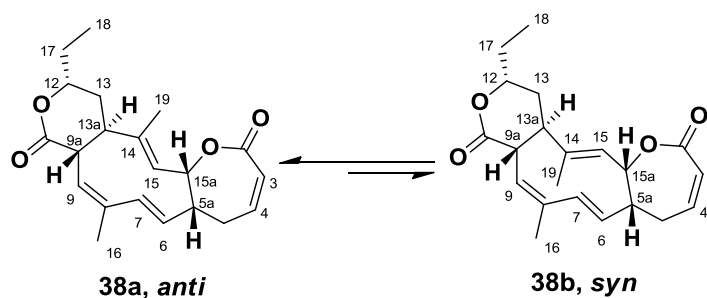


Abb. 22: Synthesepfad für die Immobilisierung des zum Target-Fishing vorgesehenen Collinolacton-terephthalatderivats **62**. Die Entschützung von **75** führte zu Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**).

In der Synthese eines Analogons des Depsipeptids Tendamistat berichten SEFLER ET AL.^[110], dass aufgrund des Restwassergehaltes kommerziell erhältlichen TBAFs in signifikanter Menge Hydrolyse vorhandener Esterbindungen auftrat. Der Wechsel auf wasserfreies und in der Literatur außerdem als reaktiver angegebenes TBAF auf Kieselgel^[111] unterdrückte diese Nebenreaktion. Analoge Bedingungen führten bei der Synthese von 4-O-Glutaryl-Collinolacton (**70a**, **70b**) und 4-O-Terephthalyl-Collinolacton (**76a**, **76b**) zu einem Teilumsatz der Edukte. In beiden Fällen erwies sich das gebildete Hauptprodukt jedoch LC/MS-spektrometrisch als Collinolactonenon (**38a**, **38b**). Ein Zerfall des gewünschten entschützten Produkts im Massenspektrometer ist unwahrscheinlich, da bei der LC/MS-Analyse der Reaktion von 4-O-(TMSE-glutaryl)-collinolacton (**68a**, **68b**) mit TBAF auf Kieselgel zu einer früheren Reaktionszeit mit sehr geringer UV- und TIC-Intensität das gewünschte Produkt 4-O-Glutaryl-Collinolacton (**70a**, **70b**)

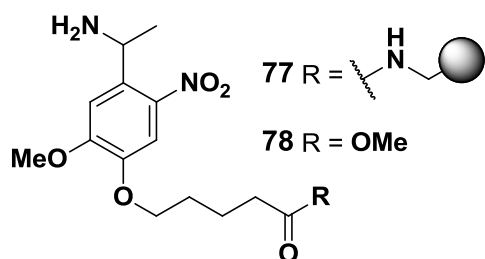


detektiert werden konnte. Da Collinolactonester bei der verwendeten Wellenlänge (254 nm) deutliche Signale liefern ist davon auszugehen, dass nur geringe Mengen des Produktes **70** gebildet wurden. Wurde zur Entschützung Fluorwasserstoff in Pyridin eingesetzt, konnten selbst nach drei Tagen und 800 Eq. HF/Pyridin bei RT noch größere Mengen Edukt und kein Produkt **70** nachgewiesen werden. Um eine Reaktion des Fluorwasserstoffs mit Glas des Reaktionsgefäßes auszuschließen, wurde die Reaktion in Kunststoff-Falcon-Tubes durchgeführt.

Eine stöchiometrische Entschützung konnte in diesem System nicht erreicht werden, was die Wahl einer alternativen Schutzgruppe erforderte. Zwei aufeinanderfolgende Synthesestufen mit Collinolacton (**20a**, **20b**) benötigen außerdem eine verhältnismäßig große Menge an **20**, sodass eine Optimierung der Synthesestrategie ratsam schien.

5.5 Target-Fishing Strategie II: 4-Brom-2-Hydroxybenzoesäure (BHB)-, Glutarsäure- und Terephtalsäurespacer

Im Zuge der Optimierung der Target-Fishing-Strategie wurden sämtliche Bestandteile einer Prüfung unterzogen. Betrachtet man EAH Sepharose 4B näher, so besitzt dieses eine geringe Verträglichkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln. Kupplung an die feste Phase erfolgen meist in wässrigen Lösungen^[112]. 4-O-Collinolactonester wie **64** oder **65** zeigen eine geringe Wasserlöslichkeit, was eine Immobilisierung an Sepharose schwierig gestaltet. Des Weiteren ist eine Bestimmung der Beladung der festen Phase wichtig und nur durch Abspaltung vom Bead möglich. Bei EAH Sepharose 4B-Beads erfolgt diese im sauren Milieu, was mit großer Wahrscheinlichkeit zum Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**) führt. Eine Bestimmung der Beladung wäre somit nicht möglich, ist aber gerade bei niedriger Reaktivität der zu amidierenden freien Säuregruppe am Spacer notwendig (wie z.B. im Terephtalsäurespacer **73**). Im weiteren Verlauf des Target-Fishings werden nach Waschen die am Wirkstoff gebundenen, spezifisch bindenden Proteine durch Veränderung der Pufferzusammensetzung eluiert. Oft ist dies allerdings nicht ausreichend und die Linkerbindung wird zusätzlich durch saure Hydrolyse oder Reduktion (Disulfide, Diazobenzole)^[77] gespalten. Die Empfindlichkeit von Collinolacton (**20a**, **20b**) ist hier sehr problematisch. Alternativ lassen sich gebundene Target-Proteine auch durch Verdrängung mittels einer Lösung von einem nicht-immobilisierten Collinolactonderivat eluieren^[112]. Dies erhöht wiederum die benötigte Menge an schwer zugänglichem Collinolacton (**20a**, **20b**), welche ein kritischer Faktor ist.



ZIEGLER ET AL. verwendeten in einem neuen Verfahren zur selektiven, affinitätschromatographischen Bindung und Freisetzung Azid-funktionalisierter Biomoleküle^[113] erfolgreich einen photospaltbaren Nitrobenzyl-Linker (**77**), welcher auf Toyopearl[®]-Beads immobilisiert wurde^[113]. Toyopearl[®] besitzt eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber

chemischen Lösungsmitteln, typische Veresterungsbedingungen für Collinolacton (**20a**, **20b**) stellen also kein Problem dar. Die Verwendung eines photospaltbaren Linkers eröffnet eine sehr milde Abspaltung des immobilisierten Wirkstoffes von der festen Phase. Dieser Nitrobenzyl-Linker ermöglicht sowohl eine Bestimmung der Beladungsdichte des Harzes als auch eine schonende Abspaltung der an den Wirkstoff gebundenen spezifischen Targetproteine im Target-Fishing. Freundlicherweise sicherte THOMAS KUTTER aus dem Arbeitskreis PROF DR. THOMAS ZIEGLER die Bereitstellung des immobilisierten Nitrobenzyl-Linkers zu². Weiterhin stellte er den in 5'-Position O-Methyl-geschützten Nitrobenzyl-Linker (**78**) für Synthesen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung.

Mittels des Derivats **78** wurden Studien zu Reaktionsbedingungen für die Kuppelung der mono-geschützten Spacer an den Nitrobenzyl-Linker **78** durchgeführt. Nach Entschützung und Veresterung mit Collinolacton (**20a**, **20b**) sollten in Folge die biologischen Aktivitäten der nicht-immobilisierten Analoga der Collinolacton-Spacer-Linker-Komplexe **79-81** in den Arbeitskreisen PROF. ZÄHLER und Dr. Sasse evaluiert werden.

Als Spacer zwischen Collinolacton (**20a**, **20b**) und dem Nitrobenzyl-Linker (**78**) wurden weiterhin Glutarsäure und Terephtalsäure verwendet (Derivate **81** und **79**). Aufgrund der problematischen Löslichkeit von Terephtalsäure und der größeren Ähnlichkeit zum aktiven Derivat 4-O-(*p*-Brombenzoyl)collinolacton (**21a**, **21b**) wurde außerdem ein neuer, auf 4-Brom-2-hydroxybenzoesäure basierender Spacer synthetisiert (Spacer in **80**, in Folge als BHB-Spacer bezeichnet). Die Verwendung eines in 2-Position der Benzoesäure angebrachten Valeriansäureethers sollte die räumliche Distanz zum Nitrobenzyl-Linker **78** erhöhen und so für Flexibilität des Derivates **80** in der Bindungstasche sorgen.

² Ich danke Dipl. Chem. THOMAS KUTTER und PROF DR. THOMAS ZIEGLER für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Nitrobenzyl-Linkers **78**.

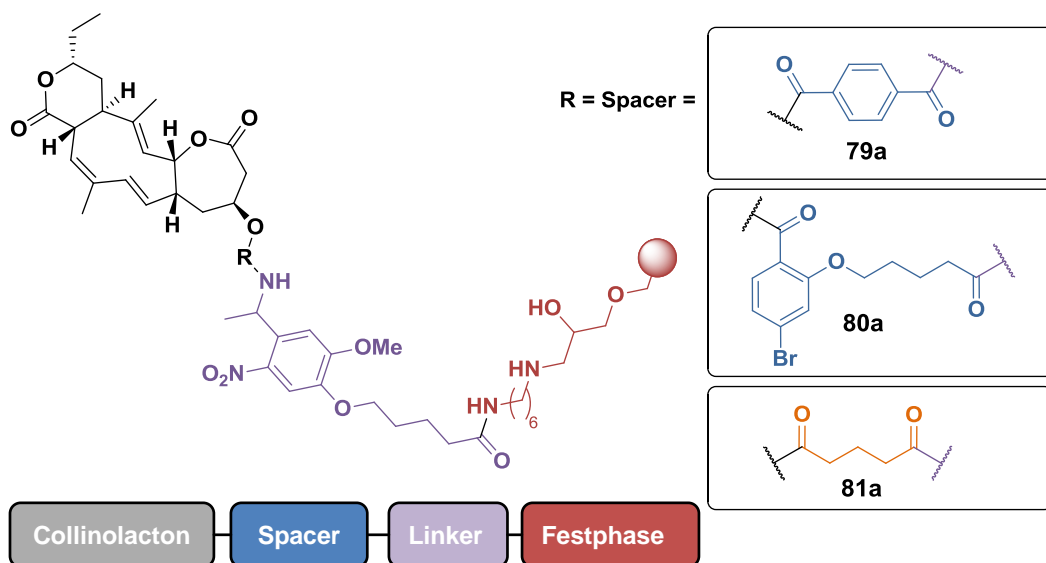


Abb. 23: Geplanter Aufbau der vergleichenden Affinitätschromatographiematrix in der zweiten in dieser Arbeit verfolgten Target-Fishing-Strategie: Eine Matrix des AK PROF DR. ZIEGLER bestehend aus Nitrobenzyl-Linker **77** (Violett) auf Toyopearl AF-amino-650m (Rot) wird mit einem in dieser Arbeit hergestellten Spacer synthetisch verbunden. In Folge wird Collinolacton (**20a**, **20b**) unter Bildung eines aktiven (Blau, **79a**, **79b**, **80a**, **80b**) oder inaktiven (Orange, **81a**, **81b**) Collinolacton-Spacerderivats an diese Matrix geknüpft. Für Biotests wurde statt des immobilisierten Linkers **77** der freie Linker **78** verwendet.

5.5.1 Glutaryl- und Terephthalyl-Spacer

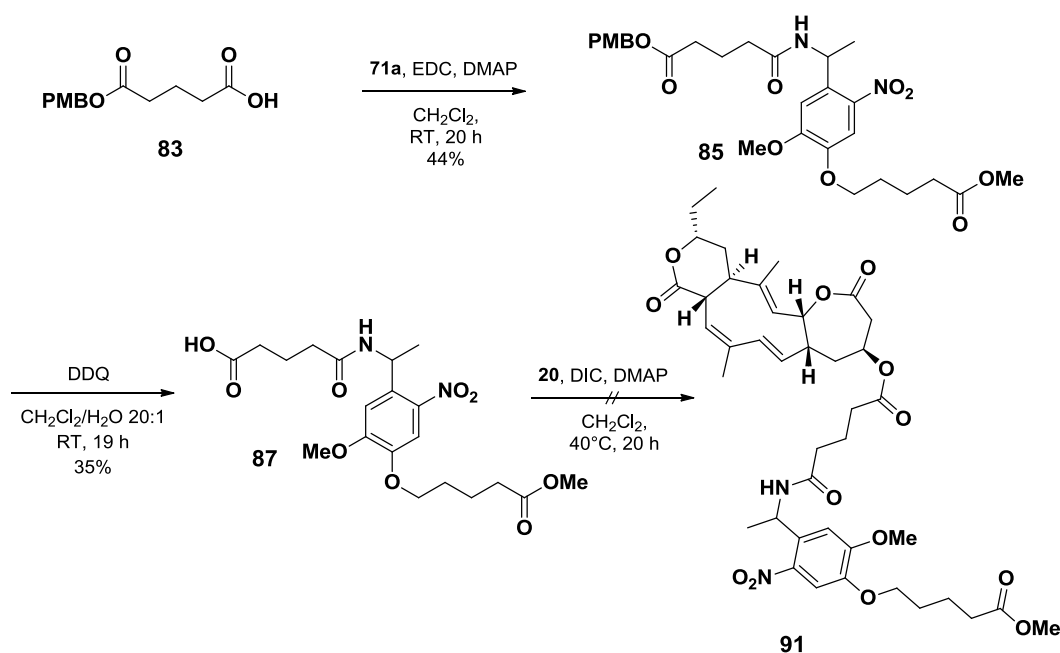


Abb. 24: Syntheschema für freien Collinolacton-Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (**91**).

Für erste Synthesen der freien Glutaryl- und Terephthalylanaloga wurde eine 4-Methoxybenzyl-(PMB)-Schutzgruppe^[114] gewählt (s. Abb. 24 und Abb. 25). Diese besitzt durch oxidative Abspaltung orthogonale Bedingungen zu dem aliphatischen Methylester des Linkers. Kupplung der mittels *N,N*-diisopropyl-*O*-(4-methoxybenzyl)isoharnstoff (**82**) hergestellten Mono-PMB-Glutaryl (**83**)- und Mono-PMB-Terephthalylester (**84**) an den freien Nitrobenzyl-Linker **78** erfolgte durch STEGLICH-Veresterung in moderaten bis niedrigen Ausbeuten (44 % bzw. 27 %). Die hier erhaltenen Ausbeuten sind zum Teil auf die Verwendung unreinen Nitrobenzyl-Linker-Edukts **78** zurückzuführen, da dieses trotz Vermeidung von Licht Zerfall zeigte. Ebenfalls erforderte die Löslichkeit der Spacer-Nitrobenzyl-Linker-Produkte **85** und **86** eine Optimierung der Laufmittel für die chromatographische Aufreinigung. Am Besten geeignet sind Dichlormethan und Aceton.

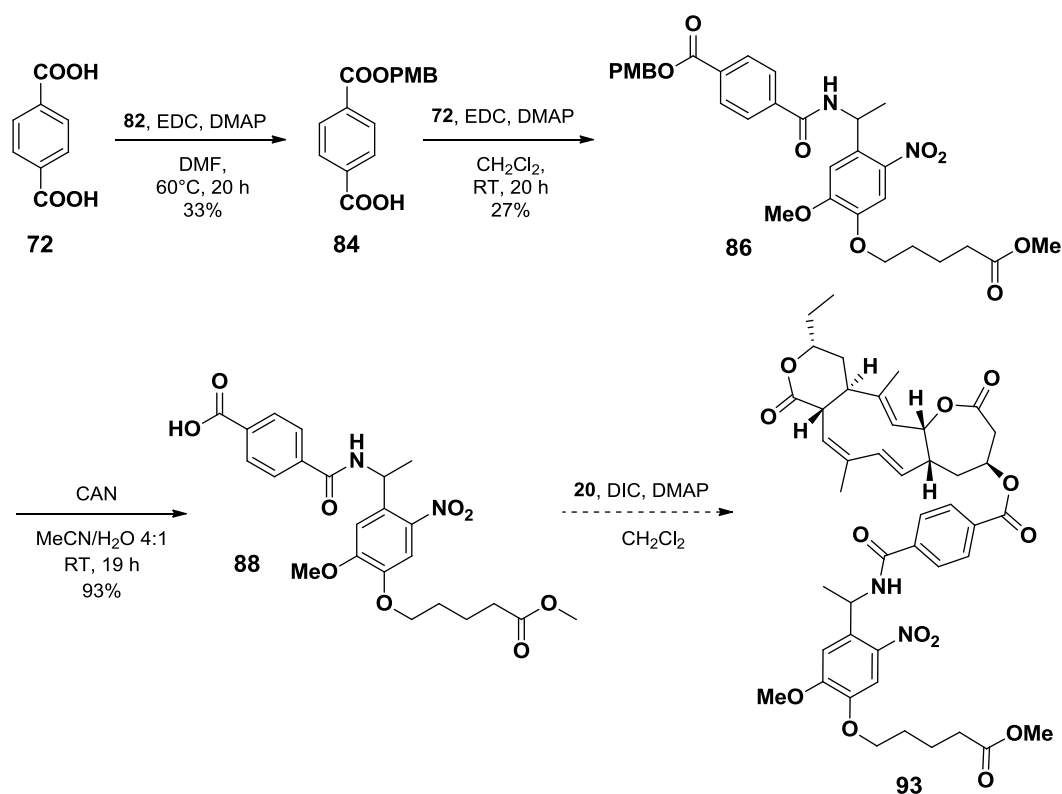


Abb. 25: Syntheschema für freien Collinolacton-terephthalyl-Nitrobenzyl-Linker (**93**).

Die Spacer-Nitrobenzyl-Produkte **85** und **86** wurden oxidativ zu den freien Säuren **87** und **88** entschützt. Cer-Ammoniumnitrat^[115] lieferte hier eine sehr gute Ausbeute (93%) im Gegensatz zu dem ebenfalls gängigen DDQ^[116] (35 %). In späteren Synthesen des Glutaryl-Nitrobenzylspacers wurde aufgrund einer einfacheren Reaktionsführung eine tert.-Butyl-Schutzgruppe anstatt der PMB-Schutzgruppe verwendet. Nach SEEBACH ET AL.^[117] hergestellte *mono*-tert-butyl-glutarsäure (**89**) wurde in niedriger Ausbeute mit Nitrobenzyl-Linker **78** umgesetzt. In Folge gelang die Entschützung des tert-Butyl-glutaryl-Nitrobenzyl-Linkers (**90**) mit Trifluoressigsäure in guten Ausbeuten (70%, s. Abb. 26).

Als problematisch erwies sich wieder die folgende Veresterungsreaktion mit Collinolacton (**20a**, **20b**) zu **91**. In Vorversuchen verlief die EDC und 4-PPy-vermittelte Reaktion mit *mono*-Methylglutarsäure zu 4-O-Methylglutaryl-collinolacton (**64a**, **64b**) laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle fast vollständig. Moderate Ausbeuten scheinen durch Verwendung nicht HPLC-reinen **20**

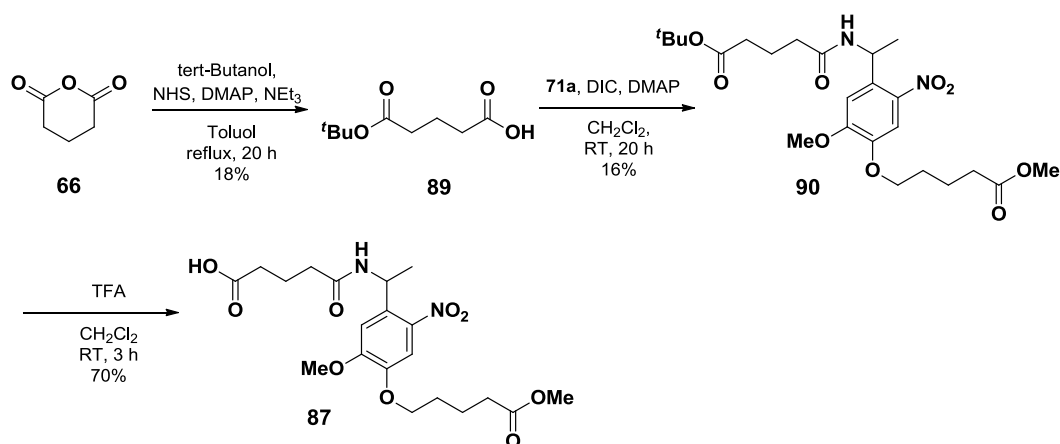


Abb. 26: Syntheseschema für Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (**87**) unter Verwendung einer tert-Butyl-Schutzgruppe.

bedingt. Versuche Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (**87**) und Collinolacton (**20a**, **20b**) zu verknüpfen führten weder mit EDC und DMAP in Dichlormethan noch mit DIC und DMAP in THF zum Erfolg (s. Abb. 24). LC-MS-Untersuchung der Reaktionen zeigten noch vorhandene Edukte **20** und **87** sowie eine größere Menge einer Nebenkomponente mit der Molmasse 422.2 g/mol. Hierbei könnte es sich um die Bildung eines Glutaryl-imids handeln, welche bei Verwendung von DMAP literaturbekannt ist^[118] und somit der Reaktion Edukt **87** entzieht. Eine im Massenspektrometer häufig vorkommende, prozessbedingte Abspaltung eines Hydroxyl-Anions aus der Carboxylfunktion des Edukts Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (**87**) lässt sich durch die deutlich frühere Retentionszeit der unerwünschten Nebenkomponente im Vergleich zum Edukt **87** ausschließen.

Mono-Methyl-terephthalsäure (**92**) reagierte in Vorversuchen trotz Aktivierung mittels EDC und DMAP oder 4-PPy nur teilweise (9% Ausbeute) mit Collinolacton (**20a**, **20b**). Terephthalyl-Nitrobenzyl-Linker (**88**) zeigte keine Reaktion zu **93**. Grund für die niedrigen Ausbeuten trotz Erwärmung auf 50°C sind wahrscheinlich Solvenseffekte des Lösungsmittels DMF, welches aufgrund der geringen Löslichkeit von **92** verwendet wurde. Diese Effekte erniedrigen die Reaktionsgeschwindigkeit stark^[51]. Da mit dem BHB-Spacer als Ersatz für den Terephthalsäure-Spacer eine in organischen Lösungsmitteln besser lösliche Verbindung vorlag, wurde von einer Kopplung von Terephthalsäure an den Nitrobenzyl-Linker **78** abgesehen.

5.5.2 4-Brom-2-hydroxybenzoesäure-(BHB)-Spacer

Der 4-Brom-2-hydroxybenzoesäure-Spacer (in Folge BHB-Spacer genannt) wurde nach Schützung von **94** über eine Williamson-Ethersynthese aus tert-Butyl-4-brom-2-hydroxybenzoat (**95**) und 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) hergestellt. Er sollte sowohl für die Überprüfung der biologischen Aktivität als auch für die spätere Synthese des immobilisierten Collinolactonderivats geeignet sein. Daher waren orthogonale Schutzgruppen an der Benzoesäuregruppe und der aliphatischen Säurefunktion notwendig. Diese sollten wenig basenlabil sein, um Nebenprodukte während der Williamson-Ethersynthese der beiden Fragmente zu vermeiden. Somit fiel die Wahl auf eine tert.-Butylschutzgruppe. Mit einer Methylschutzgruppe für die aliphatische Säurefunktion sollte eine einheitliche Funktionalisierung der verschiedenen biologisch getesteten Spacer gewährleistet werden (s. Kap. 6.3.4).

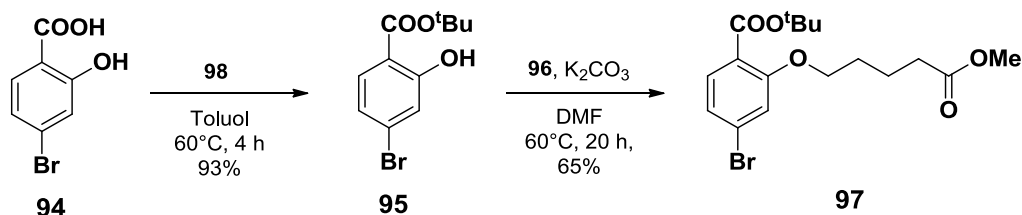


Abb. 27: Synthese des geschützten BHB-Spacers (**97**).

5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) wurde in sehr guten Ausbeuten (98%) säurekatalysiert in Methanol hergestellt. Eine einfachere Reaktionsführung bietet hier die Verwendung eines stark sauren Ionenaustauschers (z.B. Dowex[®] 50W-X8). Tert-Butyl-4-brom-2-hydroxybenzoat (**95**) ließ sich durch Veresterung mittels tert-Butyl-*N,N'*-Diisopropyl-isoharnstoff (**98**) selektiv und in guten Ausbeuten (bis 93 %) herstellen. Die vorherige Aktivierung des Alkohols tert.-Butanol mit Carbodiimid verhindert eventuelle Nebenreaktionen durch die ungeschützte phenolische Hydroxylfunktion. Nachfolgend gelang die Williamson-Ethersynthese zu **97** bei 60°C mit Kaliumcarbonat. Die Verwendung einer stärkeren Base zur besseren Deprotonierung des Edukts **95** ist nicht möglich. Spätere Untersuchungen zeigten, dass das Methylvalerat **96** unter diesen Bedingungen nicht stabil ist (s. Kap 5.7.1.1).

Zur nachfolgenden Kupplung des BHB-Spacers **97** an den Nitrobenzyl-Linker (**78**) ist die regioselektive Entschützung der Methylgruppe unter Erhaltung der tert-Butyl-Funktion notwendig. In der Literatur ist die Entschützung mittels Bariumhydroxid Octahydrat in Methanol^[119] beschrieben, welche für den BHB-Spacer **97** allerdings das vollständig entschützte Derivat lieferte. Erfolgreicher ist die Entschützung zu **99** mittels *C. antarctica* Lipase, welche bei 50–60°C an der organisch, wässrigen Grenzfläche stattfindet^[53]. Am besten geeignet war ein System aus Toluol und PBS-Puffer, welches nach 5 Tagen einen moderaten Umsatz (57 %) liefert. Einziges Nebenprodukt ist das nichtentschützte Edukt **97**. Es wurde für eine schnellere Aufarbeitung auf Acryl-Festphase immobilisierte *C. antarctica* Lipase verwendet.

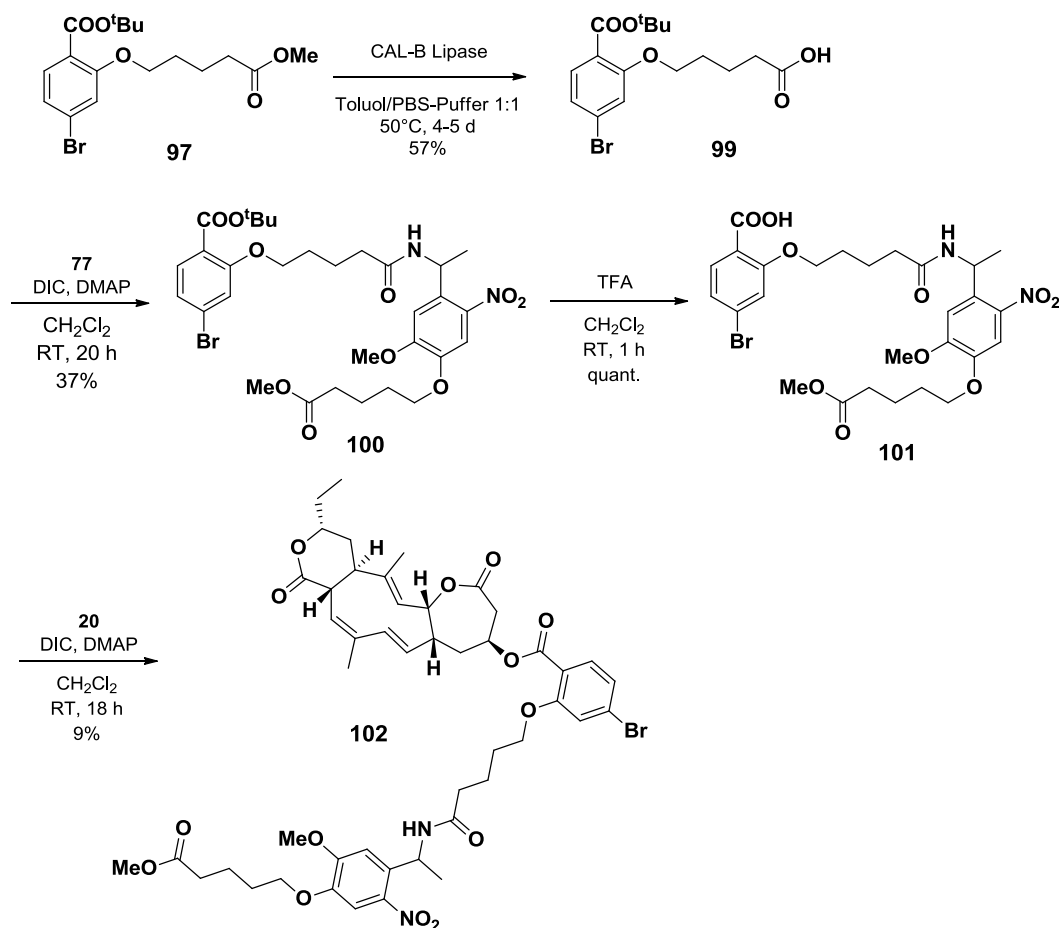


Abb. 28: Syntheschema für freies Collinolacton-BHB-Nitrobenzyl-Linker-Produkt (**102**).

Die Kupplung des entschützten BHB-Spacer **99** an den Nitrobenzyl-Linker (**78**) zu **100** erfolgte mittels Carbodiimid-Aktivierung, wobei die moderate Ausbeute (37 %) wieder teilweise auf gut angereichertes, aber nicht reines Edukt **78** zurückzuführen ist. In zukünftigen Arbeiten könnte ebenfalls eine alternative Aktivierung z.B. durch 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) erwägt werden. Waschen der Reaktionslösung mit Wasser vor der chromatographischen Aufreinigung verringerte den Anteil an Nebenprodukten deutlich. Anschließend konnte die tert-Butyl-Schutzgruppe in quantitativer Ausbeute mittels Trifluoressigsäure zu **101** entfernt werden^[120].

Eine abschließende Veresterung des BHB-Nitrobenzyl-Linkers **101** mit Collinolacton (**20a**, **20b**) stellte sich erneut als problematisch dar. Eine Standardveresterung mittels Carbodiimid-Aktivierung lieferte sowohl mit EDC, als auch mit dem aktiveren DIC und DMAP sehr geringe Ausbeuten (maximal 9 %). Andere Verfahren wie Pentafluorphenyl-Aktivierung^[121] oder Yamaguchi-Veresterung^[122] mit anschließender DMAP-Aktivierung zeigten ebenfalls sehr geringen oder keinen Umsatz. Die Verwendung von 4-PPy, von STEGLICH ET AL.^[51] als reaktiver gegenüber DMAP beschrieben, hatte in früheren Synthesen von Collinolactonestern nicht zu einer Ausbeutesteigerung geführt und wurde daher nicht verwendet. Für die chromatographische Aufreinigung eignet sich aufgrund des großen Massenunterschiedes zwischen Edukten und dem Produkt die Größenausschlusschromatographie (SEC) an Sephadex-LH20. Eine vollständige Aufreinigung konnte nicht erreicht werden. Aufgrund der erhaltenen geringen Menge von 1.3 mg des Produktes **102** war weitere chromatographische Aufreinigung nicht sinnvoll. Präparative Aufreinigung mittels HPLC ist durch die Lichtempfindlichkeit des Nitrobenzyl-Linkers **78** nicht oder nur ohne UV-Detektion möglich. Daher wurde das verunreinigte Produkt zur Überprüfung der biologischen Aktivität genutzt, um zumindest einen Hinweis auf noch vorhandene Aktivität zu erlangen. Ein Grund für die geringe Veresterungsreaktivität des BHB-Nitrobenzyl-Linkers **101** gegenüber Collinolacton (**20a**, **20b**) kann sterische Hinderung des tetraedrischen Übergangszustandes durch den *o*-Valerylether des BHB-Spacer sein. Gleichzeitig könnte diese Salicylsäurestruktur mesomer den positiv gelade-

nen Übergangszustand des aus DMAP entstehenden *N*-Benzoylpyridium-Ions stabilisieren und so die Veresterungsreaktivität absenken (s. Abb. 29).

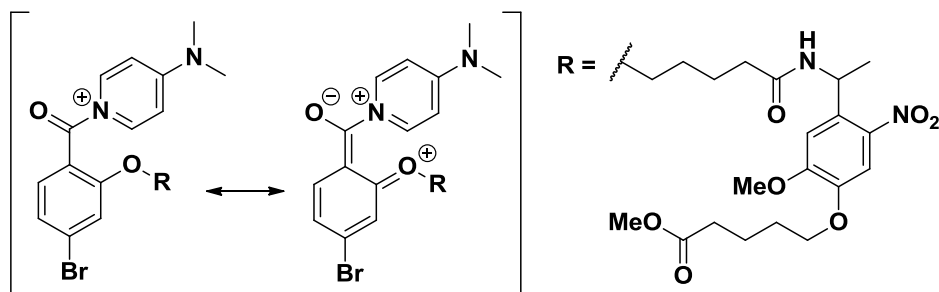


Abb. 29: mesomere Stabilisierung des *N*-Benzoylpyridium-Ions nach DMAP-Aktivierung des BHB-Nitrobenzyl-Linkers **101**.

5.5.3 Bewertung der synthetisierten Spacer für die Target-Fishing-Strategie

4-*O*-Methylglutaryl (**64a**, **64b**)- und 4-*O*-BHB-Nitrobenzyl-collinolacton (**102a**, **102b**) zeigten in biologischen Tests der Arbeitsgruppen PROF. ZÄHLER und DR. SASSE moderate Zytotoxizität. 4-*O*-Methylterephthaly-collinolacton (**65a**, **65b**) hingegen besitzt nur niedrige Zytotoxizität. Diese Ergebnisse standen entgegengesetzt zur erwarteten biologischen Aktivität, eine angenommene sterische Ähnlichkeit zu 4-*O*-*p*-Brombenzoyl-collinolacton (**21a**, **21b**) konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sowohl 4-*O*-Methylglutaryl (**64a**, **64b**)- als auch 4-*O*-Methylterephthaly-collinolacton (**65a**, **65b**) Auswirkungen auf das Aktinskelett durch Bildung eines verdickten, kortikalen Aktinringes. Eine Verwendung eines der Derivate als Negativkontrolle war somit ausgeschlossen (detaillierte Ergebnisse siehe Kap. 6).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit, der geringen Veresterungsreaktivität und der geringen biologischen Aktivität wurde von einer weiteren Verwendung eines Terephthaly-Spacers Abstand genommen. Auch der Glutaryl-Spacer erwies sich nach Amidierung mit dem Nitrobenzyl-Linker **78** als wenig reaktiv. Die Möglichkeit einer Imidbildung bei der Aktivierung für die Kupplung an Collinolacton (**20a**, **20b**) schränkt die Anwendung des Spacers ein. Dies wäre durch einen zweistufigen

Mechanismus aus Veresterung des monogeschützten Derivats mit Collinolacton (**20a**, **20b**) und anschließender Entschützung zu umgehen. Eine Folge wäre aber wiederum der dem Einsatz einer größeren Menge an **20**. Aufgrund der synthetischen Probleme eignet sich der Glutaryl-Spacer, trotz guter biologischer Aktivität von 4-O-Methylglutaryl-collinolacton (**64a**, **64b**), nicht zur Verwendung im Target-Fishing. Abschließend zeigte sich auch bei Veresterung des BHB-Nitrobenzyl-Linkers **101** eine niedrige Reaktivität. Weitere Arbeiten an Spacersystemen wurden daher unterbrochen, um zuerst die Reaktionsbedingungen und Reaktionspartner für die Reaktion mit Collinolacton (**20a**, **20b**) zu optimieren. Offensichtlich erfordert die niedrige Nucleophilie von **20** eine ausreichend elektrophile und gut sterisch zugängliche Carbonsäure als Reaktionspartner in Veresterungen.

5.6 Studien zu Reaktionsbedingungen zur Synthese von 4-O-Collinolacton-Analoga

Um die Suche nach einem geeigneten Spacer für ein Collinolacton-Derivat mit guter biologischer Aktivität und optimaler Veresterungsreaktivität auf eine solide Datenbasis zu stellen, wurde eine kleine Bibliothek aus neun verschiedenen Collinolactonbenzoesäureestern (**104-112**) hergestellt. Es sollte somit eine genauere Vorhersage vor- oder nachteiliger Modifikationen getroffen werden. Weiterhin sollten die gewonnenen Daten zu biologischer Aktivität im Rahmen von SAR-Studien genutzt werden. Verwendete Benzoesäure-Edukte wurden bis auf 4-(Methoxymethyl)-benzoesäure (**103**) kommerziell erworben. **103** wurde aus 4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure mit Kaliumhydroxid und Methyljodid^[123] in quantitativer Ausbeute hergestellt. Betrachtet man den aromatischen BHB-Nitrobenzyl-Linker **102** so erwies sich eine Modifikation in *ortho*-Position der Benzoesäure für die Reaktion mit Collinolacton (**20a**, **20b**) als nachteilig. Die ist wahrscheinlich auf sterische Hinderung der Veresterung mit Collinolacton (**20a**, **20b**) zurückzuführen. *meta*- und *para*-substituierte Derivate dürften ausreichenden Raum für eine Veresterung bieten. Ein weiterer Effekt auf die Lage des Gleichgewichts der Veresterung ist die Stabilisierung des *N*-Benzoylpyridinium-Übergangszustandes (s. Abb. 29). *Meta*-Substituenten tragen hier nur über ihren induktiven Effekt bei. *Para*-Substituenten können diesen auch mesomer stabili-

sieren. Ihr induktiver Effekt wird aufgrund der Entfernung zur Säurefunktion wenig Einfluss haben. Dies zeigt sich auch bei Vergleich der pKs-Werte von *ortho*-, *meta*- und *para*-Bromsubstituierter Benzoesäuren. Hier nimmt der pKs-Wert aufgrund des induktiven Effekts des Bromsubstituenten von *ortho*-Brombenzoesäure (pKs = 2.85) zu *para*-Brombenzoesäure (pKs = 3.97) zu und besitzt bei *para*-Brombenzoesäure fast den Wert unsubstituierter Benzoesäure (pKs = 4.2)^[124]. *Para*-Substitution hatte bei 4-O-(*p*-Brombenzoyl)collinolacton (**21a**, **21b**) Induktion von monoastralen Phänotypen bewirkt. Mittels Synthese verschiedener Collinolactonbenzoesäurester wurden nun die notwendigen Parameter biologische Aktivität und Veresterungsreaktivität simultan überprüft (s. Abb. 30).

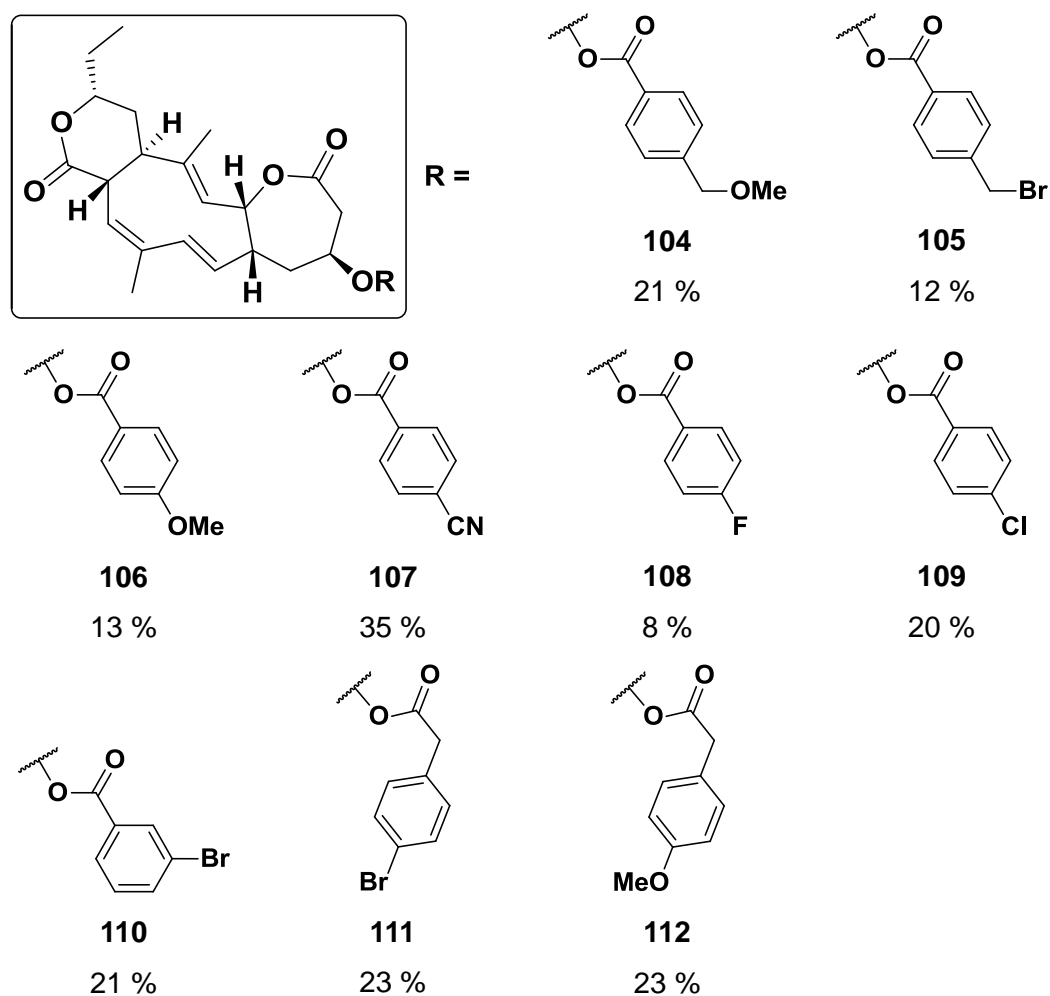


Abb. 30: Hergestellte 4-O-Collinolactonbenzoyl ester für die Profilierung der 4-O-Veresterungsaktivität von **20** und biologischer Aktivität der erhaltenen Collinolacton ester **104-112**. Ausbeute des HPLC-reinen Veresterungsprodukt in %.

Zunächst stellte sich die Frage, ob ein Austausch des *p*-Brom-Substituenten des Benzoylrestes unter Erhalt der biologischen Aktivität, wie Zytotoxizität und Induktion des monoastralen Phänotyps in Mitose, toleriert wird. Alle im Rahmen der Überprüfung der Reaktionsparameter DIC und DMAP-vermittelt synthetisierten Derivate 104-112 (s. Abb. 30) zeigten Zytotoxizität, mehrere sogar deutlich höhere als **21**. Auch die Induktion monoastraler Phänotypen bei Modifikation des *para*-Substituenten blieb gewährleistet (detaillierte Auswertung Kap. 6). Eine *para*-Modifikation der aromatischen Substituenten unter Erhalt der biologischen Aktivität ist also möglich. Darüberhinaus konnte mit 4-*O*-(*p*-Brommethyl)-benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**) die höchste gemessene Zytotoxizität von Collinolactonderivaten festgestellt werden. Ebenso wie **111** zeigte es Bildung monoastraler Phänotypen in PtK2-Zellen und Bildung eines sehr ausgeprägten kortikalen Aktinringes in menschlichen Nabelschnurepithelzellen. Die Substitution von Brom durch eine Methoxygruppe zeigte in Derivaten **111** und **112** vergleichbare biologische Aktivität. Die einzige getestete *meta*-Substitution 4-*O*-*m*-Brombenzoylcollinolacton (**110a**, **110b**) zeigte eine vergleichbare Zytotoxizität wie der Großteil der *para*-modifizierten Derivate und ebenfalls die Bildung monoastralen Phänotyps.

Reaktivität von Collinolacton (20a, 20b) in Veresterungen mit Benzoessäuren

Der zweite untersuchte Parameter war die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes hin zu 4-*O*-Collinolactonestern (**104-112**) durch geringere Mesomeriestabilisierung der aromatischen Säuren. Herstellung hauptsächlich induktiv wirksame Derivate wie **108** oder **109** zeigten vollständigen oder nahezu vollständigen Umsatz des Edukts Collinolacton (**20a**, **20b**). Synthese von 4-*O*-*p*-Methoxy-benzoylcollinolacton (**106a**, **106b**) hingegen zeigt aufgrund des +M-Effektes der Methoxygruppe nur teilweisen Umsatz. Hier scheint Mesomeriestabilisierung vorzuliegen. Wurde stattdessen, wie in **107**, *p*-Cyanbenzoessäure (-M-Effekt des Cyansubstituenten) eingesetzt, erfolgte Komplettumsatz. Die Einführung einer Methylengruppe zwischen Methoxygruppe und aromatischem Ring (**104a**, **104b**) oder zwischen Carbonsäure und aromatischem Ring (**112a**, **112b**) hob den mesomeren Effekt auf. Collinolacton (**20a**, **20b**) wurde voll-

ständig verestert. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine Aufhebung des mesomeren Effektes durch die Einführung einer Methylengruppe auch in weiteren Derivaten eine verbesserte Veresterungsreaktivität von **20** ermöglichen kann. Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen der Derivate **104-112** hatte weiterhin eine gewisse sterische Toleranz in *para*-Position der Benzoesäure gezeigt (s. o.). Es wurde daher angenommen, dass die Methoxygruppen der Derivate **104** und **112** unter Erhalt der biologischen Aktivität und Veresterungsreaktivität durch eine längere Seitenkette ersetzt werden können. Die erhaltenen Spacervarianten 4-(Hydroxymethyl)benzoyl- und 4-Hydroxyphenyl-essigsäure-Spacer werden in Folge als HMB- und HPE-Spacer bezeichnet (s. Abb. 32).

5.7 Target-Fishing Strategie III: 4-(Hydroxymethyl)benzoyl-(HMB)- und 4-Hydroxyphenyl-essigsäure-(HPE)-Spacer

Mit den Varianten 4-(Hydroxymethyl)benzoyl-(HMB, **113**, **114**)- und 4-Hydroxyphenyl-essigsäure-(HPE, **115**, **116**)-Spacer standen nun zwei Möglichkeiten zur Verfügung, ein biologisch aktives Collinolactonderivat zu immobilisieren, dass mittels Veresterung in guten Ausbeute darzustellen sein sollte.

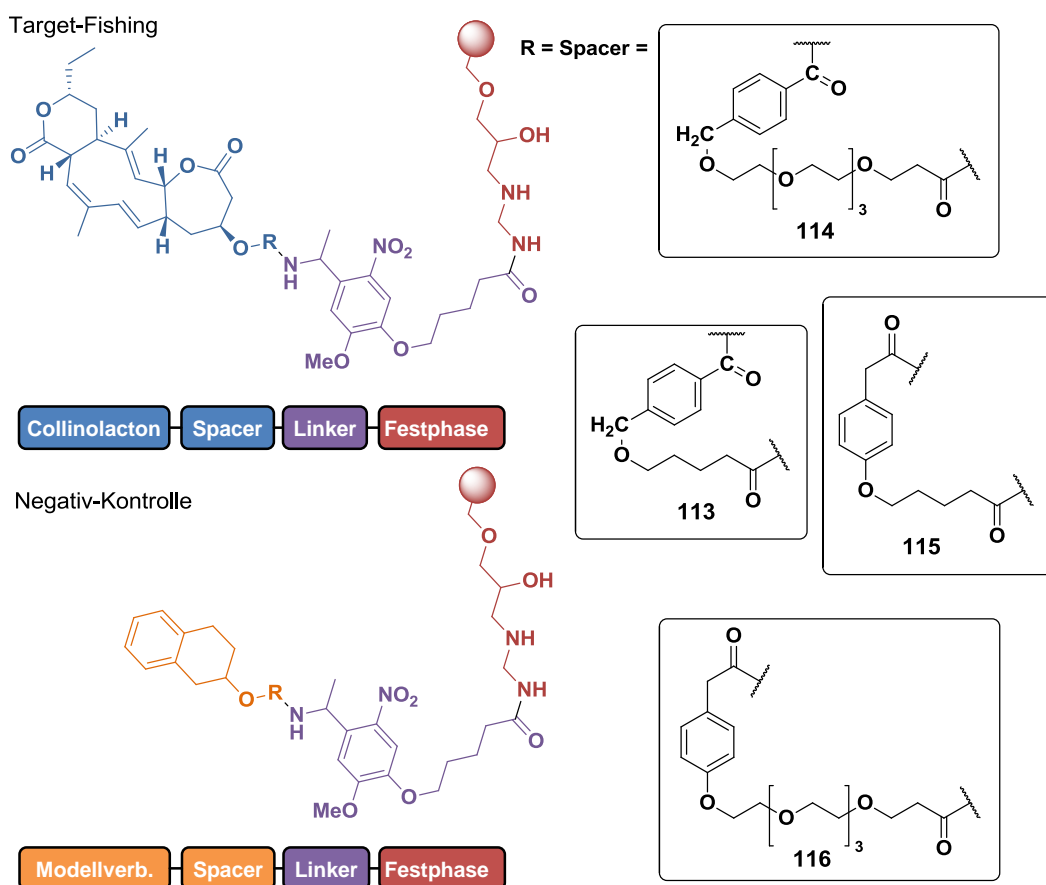


Abb. 31: Geplanter Aufbau der vergleichenden Affinitätschromatographiematrix in der dritten in dieser Arbeit verfolgten Target-Fishing-Strategie: Eine Matrix bestehend aus Toyopearl AF-Amino-650m (Rot) wird mit einem der in dieser Arbeit hergestellten HMB- (**113** oder **114**)- oder HPE-Spacer (**115** oder **116**) synthetisch verbunden. In Folge wird Collinolacton (**20a**, **20b**) unter Bildung eines aktiven Collinolacton-Spacerderivats (Blau) oder die Modellverbindung 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**) unter Bildung eines inaktiven Modellverbindungs-Spacerderivats (Orange) an diese Matrix geknüpft. Für biologische Tests wurden statt der immobilisierten Collinolacton- oder Modellverbindungs-Spacerderivate die freien Methylester der Derivate verwendet.

Die Verknüpfung mit dem Nitrobenzyl-Linker sollte nicht direkt an der Benzoesäure vorgenommen werden, um eine erhöhte Flexibilität des Systems zu gewährleisten, eine verlängerte Spacereinheit war daher Teil des Konzepts. Diese konnte durch Williamson-Ethersynthese an der Hydroxylfunktionen eingeführt werden. Die Länge und Hydrophilie dieses Spacers ist von entscheidender Bedeutung. Ist die Kette zu kurz oder zu lang behindert sie eventuell die Bindung der zu untersuchenden Verbindung an ihr Zielprotein. Besitzt dieses eine lipophile Bindungstasche, so ist die Verwendung einer aliphatischen Spacerkette beispielsweise einem hydrophilen Polyethylenglykol-(PEG)-Spacer vorzuziehen. Hydrophile Spacer führen allerdings in manchen Fällen zu einer bemerkenswerten Reduktion von unspezifischer Bindung. SHIYAMA ET AL.^[125] konnten in der Target-Identifikation von FK506 (Trapoxin) die deutliche Reduktion häufig beobachteter, nicht-spezifischer Bindung von Aktin und Tubulin an die Matrix durch Verwendung hydrophiler Spacer nachweisen. Die besten Resultate lieferte hier ein Tetramer von Tartrat-Spacer **117**, welches nicht-spezifische Bindung von Tubulin an die affinitätschromatographische Matrix auf 35% und von Aktin auf 10% reduzierte^[125]. Allerdings ist es in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen, dass Collinolactonderivate spezifisch an Aktin oder Tubulin binden. Somit würde ein Spacer wie **117** eventuell eine Bindung des immobilisierten Collinolactonderivates schwächen und die Ergebnisse des Target-Fishings verfälschen. In einem Tubulin-Assay im Arbeitskreis von PROF. DR. THOMAS MAYER in Konstanz konnte im Rahmen der Dissertation von LUISE HOFFMANN^[35a] eine Tubulin-depolymerisierende Wirkung von 4-O-Benzoyl-collinolacton (**25a**, **25b**) festgestellt werden. Um Effekte eines hydrophilen Spacers abwägen zu können, sollten sowohl der HMB-Spacer, als auch der HPE-Spacer jeweils mit einem Valeriansäurespacer (**118** bzw. **119**), als auch einem kommerziell erhältlichen tetrameren PEG-Spacer (**120** bzw. **121**) synthetisiert werden. Nach Evaluierung der Resultate aus den biologischen Tests der Kooperationspartner, sollte ein System gewählt werden, welches eine möglichst hohe biologische Aktivität besitzt. Die beobachteten biologischen Phänomene werden kritisch vergleichend bewertet (s. Kap. 5.7.5 und 6.3.4).

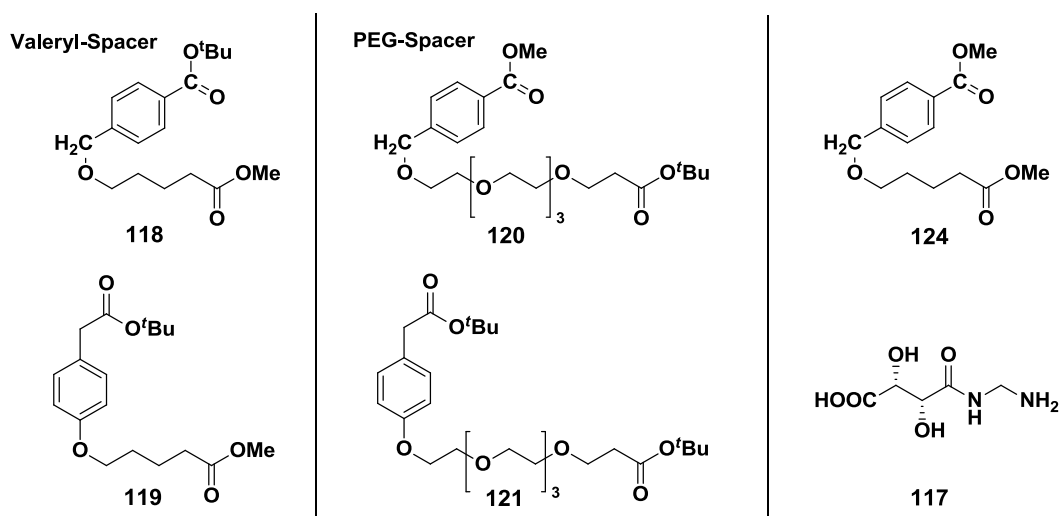
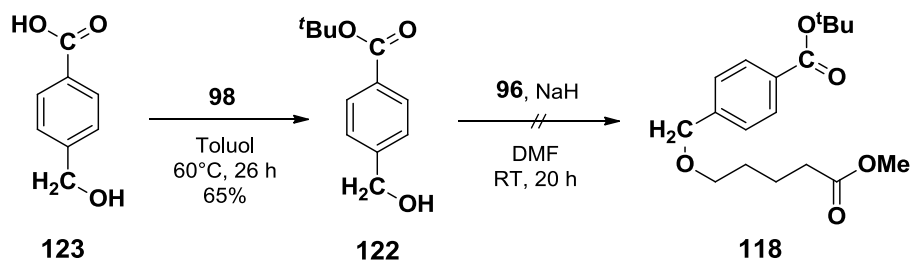


Abb. 32: Geplante Variationen der HMB- bzw. HPE-Spacer als Valeryl- (**118** und **119**) und PEG-Ether (**120**, **121**), Tartrat-Spacer **117** aus Literatur sowie Nebenprodukt der HMB-Valerylsynthese (**124**).

5.7.1 4-(Hydroxymethyl)benzoyl-(HMB)-Spacer

5.7.1.1 HMB-Valeryl-Spacer

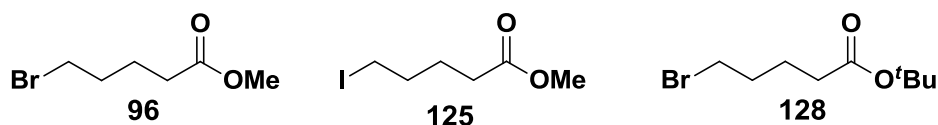


Analog zum Aufbau des BHB-Spacers (s. Kap. 5.5.2) sollte die Synthese des HMB-Valeryl-Spacers über die Kopplung von tert.-Butyl-geschützter 4-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**122**) mit 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) durchgeführt werden. Die Schützung von **123** mit *N,N*-Di-isopropyl-*O*-tert.-butylisourea (**98**) verlief nach Standard-Protokoll in guten Ausbeuten mit bis zu 65 %. Problematisch war die Williamson-Ethersynthese des Produktes **118** (Übersicht s. Abb. 34). Kaliumcarbonat in DMF erwies sich erwartungsgemäß als eine zu schwache Base zur Deprotonierung der Hydroxymethyl-Gruppe. Es konnte trotz Zusatz eines Phasentransferkatalysators (TBAB^[126]) kein Umsatz erzielt werden. Natriumhydrid in DMF hingegen führte zu einem Multikomponentengemisch, von

denen eine Hauptkomponente NMR-spektroskopisch als 4-(5-Methoxy-5-oxopentyloxy)-methyl-benzoesäure-methylester (**124**) charakterisiert wurden. Das gewünschte Produkt **118** konnte weder aufgereinigt werden, noch dieses LC/MS-spektrometrisch nachgewiesen werden. Es zeigte sich weiterhin, dass Natriumhydrid in DMF unter Bildung von Natriumdimethylamin eine literaturbekannte Entschützungs-methode von tert-Butyl-Schutzgruppen ist^[127]. Die Verwendung von THF als Lösungsmittel^[128] führte allerdings ebenfalls zu einem Produktgemisch.

Edukte	Base	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit	Produktanalyse mittels DC
122, 96	K ₂ CO ₃	DMF	60°C	26 h	-
122, 96	K ₂ CO ₃ + TBAB	DMF	85°C	20 h	-
122, 96	NaH	THF	RT	0.6 h	Zerfall
122, 96	NaH	DMF	RT	20 h	Startfleck
122, 96	DBU	THF	60°C	6 h	Startfleck
			RT	3 d	
122, 96	KO ^t Bu 18-Krone-6-Ether	THF	RT	20 h	Teilumsatz, Edukt und drei Nebenprodukte
122, 125	KO ^t Bu 18-Krone-6-Ether	THF	RT	20 h	Sehr geringer Umsatz
122, 125	Silber(I)Oxid	THF	45°C	48 h	Sehr geringer Umsatz
122, 96	Silber(I)Oxid	Toluol	80°C	16 h	Sehr geringer Umsatz
122, 96	LDA	THF	RT	24 h	Teilumsatz

Abb. 33: Synthesebedingungen für die Darstellung des HMB-Valeryl-Spacerderivats **118**.



Eine Verwendung sterisch gehinderter Basen zur Ethersynthese wie DBU in THF und Kalium-tert-butanolat sowie 18-Krone-6-Ether in THF führte zu keinem oder sehr geringem Umsatz. Auch die für Ethersynthesen gängige Verwendung von Silber(I)oxid in Toluol^[129] oder THF führte zu keiner Produktbildung. Eine Verbes-

serung der Abgangsgruppenqualität im Edukt **96** durch Synthese von 5-Iodvaleriansäuremethylester (**125**) zeigte ebenfalls keine Verbesserung der Reaktion. Gerade bei stärkeren Basen konnte die Bildung eines Startfleckes auf Kieselgel-DCs festgestellt werden. Vermutlich entsteht dieser durch Verlust der tert-Butylschutzgruppe von Produkt **118** oder Edukt **122** und anschließender Deprotonierung zum Carboxylat. Erst die Verwendung von LDA in THF bei RT lieferte geringen Teilumsatz. Es konnten dabei NMR-spektroskopisch Oligomere des Edukts 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass dieses in Nebenreaktionen verbraucht wird, bevor es mit dem primären Alkohol **122** reagieren kann. Im basischen Milieu ist eine Verseifung des Methylesters mittels Restwasser des Lösungsmittels möglich, da abs. THF aus einem Solvent-Purification-System entnommen wurde, welches einen höheren Restwassergehalt besitzt als über Kalium getrocknetes THF. Anschließend könnte die deprotonierte Säure das Brom eines weiteren Moleküls 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) nucleophil ausgetauscht haben. Wahrscheinlicher ist eine Enolat-Reaktion durch Deprotonierung des aciden 2-H von **96**, z.B. eine Claisen-Kondensation.

Zur Stabilisierung des Edukts 5-Bromvaleriansäure (**96**) gegen Hydrolyse wurden die Schutzgruppen der Reaktion vertauscht. Mittels *N,N'*-Di-isopropyl-*O*-methylisoharnstoff (**126**) wurde in moderaten Ausbeuten 4-(Hydroxymethyl)benzoesäure-methylester (**127**) hergestellt, was wahrscheinlich an der relativen Instabilität dieses Isoharnstoffes liegt. 5-Brom-valeriansäure-tert-butylester (**128**) wurde in quantitativer Ausbeute mittels Oxalylchlorid und katalytischer Mengen DMF hergestellt^[130]. Die anschließende Ethersynthese zu **129** mit Natriumhydrid in DMF verlief erstmals in moderaten Ausbeuten (52 %), so dass 29 mg für weitere Synthesen zur Verfügung standen. Auch hier zeigte sich kein kompletter Umsatz des Edukts **127**. Möglicherweise wäre hier ein unpolares Lösungsmittel besser geeignet, um den nucleophilen Angriff des Alkoholats behindernde Solvationseffekte zu minimieren. Dies würde auch der Entschützung der tert-Butyl Schutzgruppe vorbeugen, welche eventuell zu Verlust des Valerylesters **128** führt. Es konnten aber erstmals ausreichende Mengen für eine weitere Synthese des HMB-Spacers hergestellt werden.

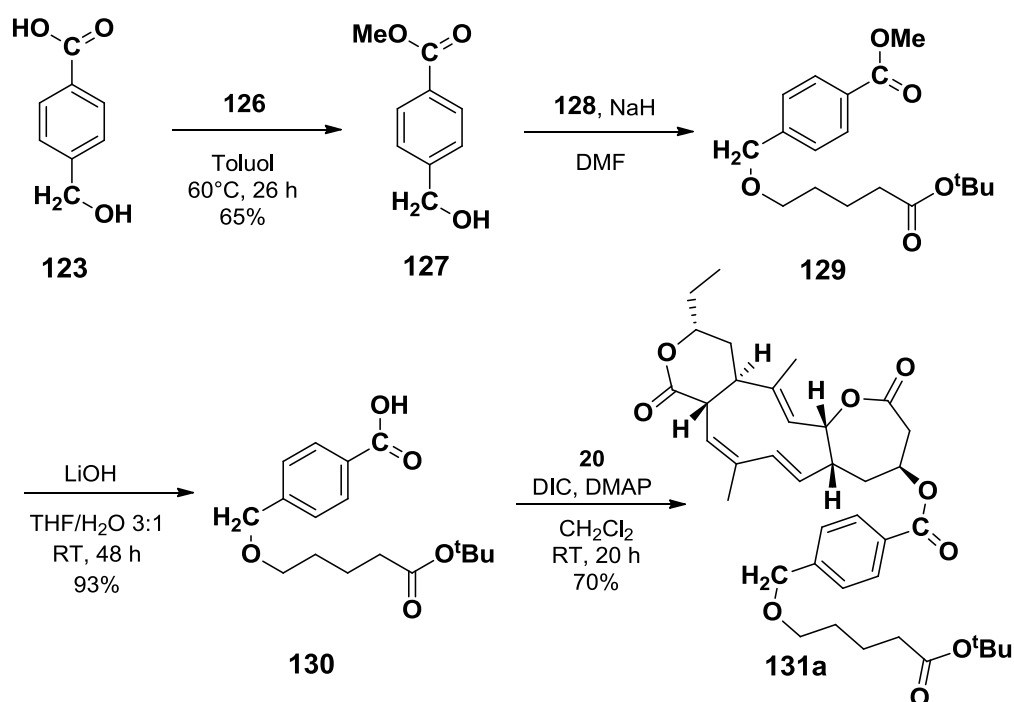
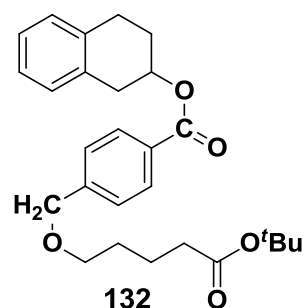


Abb. 34: Synthesepfad mit veränderten Schutzgruppen zur Herstellung von 4-O-HMB-collinolacton (**131a**, **131b**).

Die Entschützung der Benzoessäurefunktion zu **130** konnte in sehr guten Ausbeuten (93 %) mit Lithiumhydroxid in THF/Wasser^[131] durchgeführt werden. Eine ebenfalls überprüfte Entschützung mit Natriumcyanid in HMPA^[132] führte zu keinem Umsatz und ist aufgrund der Giftigkeit der eingesetzten Reagenzien problematisch.

Wie vorhergesagt verlief die Veresterung des HMB-Spacers mit Collinolacton (**20a**, **20b**) zu 4-O-HMB-Collinolacton (**131a**, **131b**) unter Carbodiimid-Aktivierung in guten Ausbeuten (70 %). Auch die Reaktion mit der Modellverbindung 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**) zum HMB-Ester (**132**) verlief erfolgreich. Im Test der biologischen Aktivität konnte leider keine Übereinstimmung der gemessenen Zytotoxizität mit den Vorhersagen festgestellt werden (s. Kap. 6). Auch waren weder Effekte auf das Aktin- noch auf das Mikrotubulinnetzwerk feststellbar. Die überraschend



geringe biologische Aktivität von 4-O-HMB-Collinolacton (**131 a**, **131b**) lässt daher eine weitere Nutzung des HMB-Spacers nicht zu. Es scheint, dass in diesem Derivat eine Valerylsubstitution die Bindung an Target-Proteine verhindert.

5.7.2 HMB-PEG-Spacer (**120**)

Für die Synthese des HMB-PEG-Spacers **120** wurde ein kommerziell erhältliches PEG-Tetramer (**133**) verwendet. Dieses sollte mit Methyl(4-Brommethyl)benzoat (**134**) basisch verestert werden (s. Abb. 35).

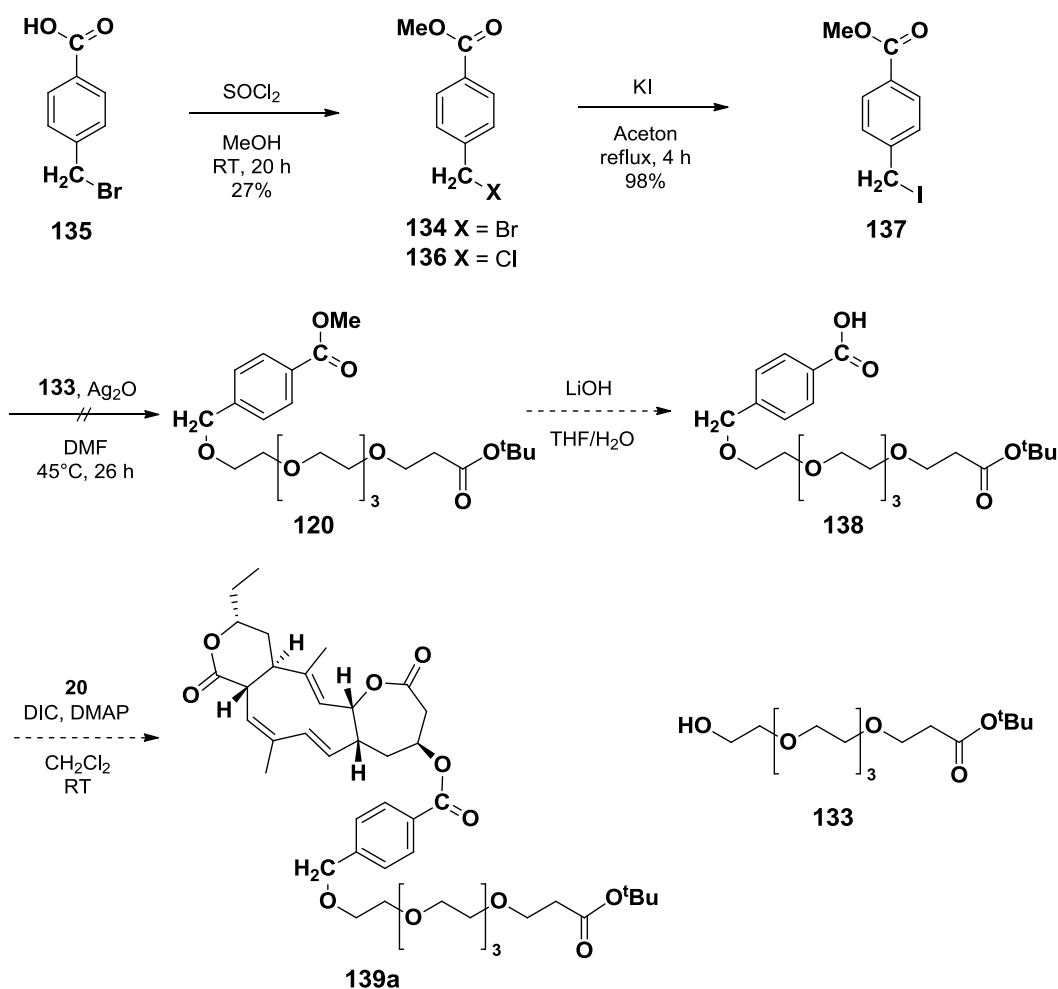


Abb. 35: Synthesepfad von freiem und immobilisiertem 4-O-HMB-PEG-Collinolacton (**139a**, **139b**).

134 wurde aus **135** mittels Thionylchlorid in Methanol hergestellt. Man erhielt dabei ein Gemisch von Methyl(4-Brommethyl)benzoat (**134**) und 4-(Chlormethyl)benzoesäuremethylester (**136**). Zur Vereinheitlichung der späteren Reaktionsbedingungen wurde dieses in einer Finkelsteinreaktion^[133] fast quantitativ zu dem reaktiveren 4-(Iodmethyl)benzoesäuremethylester (**137**) umgesetzt. Alternativ hätte die Verwendung von Thionylbromid wahrscheinlich das gewünschte Produkt geliefert. Direkte Synthese von **134** mittels *N,N'*-Di-isopropyl-*O*-methylisourea (**126**) oder FISCHER-Veresterung in Methanol waren nicht erfolgreich, letzteres führte zur Bildung von 4-(Methoxymethyl)benzoesäuremethylester.

Bis dato führte die geplante Ethersynthese des geschützten HMB-PEG-Spacer (**120**) aus **137** und **133** nicht zum Erfolg. Die Verwendung von Natriumhydrid in DMF bei RT führte zu einem breiten Produktspektrum, wohingegen Silber(I)oxid in DMF bei 45°C^[134] fast keinen Umsatz des Edukts **120** bewirkte. Wurde LDA in THF genutzt, so erhielt man eine Hauptkomponente, welche RP-dünnschichtchromatographisch einen deutlich höheren R_f -Wert besaß und mit Anisaldehyd, wie auch das PEG-Edukt, violett anfärbt. Dies konnte jedoch nicht als das gewünschte Produkt **120** identifiziert werden. Weitere Syntheseschritte zum entschützten HMB-PEG-Spacer **138** und 4-O-HMB-PEG- Collinolacton (**139a**, **139b**) konnten daher bisher nicht durchgeführt werden.

5.7.3 Diskussion der HMB-Spacer

Im biologischen Test von 4-O-HMB-Collinolacton (**131a**, **131b**) in den Arbeitsgruppen DR. SASSE und PROF. ZÄHLER konnte weder Zytotoxizität, noch Wirkungen auf Aktinzytoskelett oder Mikrotubulinetzwerk festgestellt werden (s. Kap. 6.3.4 und 6.4). Eine Nutzung des Spacers zur affinitätschromatographischen Identifikation der Targetproteine von Collinolactonderivaten ist somit ausgeschlossen. Möglicherweise besitzt Derivat **131** eine zu geringe Flexibilität, um sich der Bindungstasche anzupassen. Eine Synthese von des HMB-PEG-Spacer **120** wird daher nicht weiterverfolgt.

5.7.4 4-Hydroxyphenylelessigsäure-(HPE)-Spacer

Phenoether lassen sich wegen der leichteren Deprotonierbarkeit der phenolischen Hydroxylfunktion deutlich einfacher herstellen als Alkylether. Wie schon in der Synthese des BHB-Spacers **97** gezeigt (s. Kap. 5.5.2) ist Kaliumcarbonat als Base ausreichend. Aus Zeitgründen konnte nur die Synthese des HPE-Valerylethers durchgeführt werden, die Synthese des HPE-PEG-Spacers steht noch aus. Analog der Synthese des BHB-Spacers wurde (4-Hydroxyphenyl)essigsäure (**140**) mittels *N,N*-Di-isopropyl-*O*-tert.-butyl-isourea (**98**) in moderater Ausbeute (55 %) tert.-Butyl-geschützt zu (**141**) und in einer Williamson-Ethersynthese mit Kaliumcarbonat und 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**) in moderater Ausbeute (53 %) zu **119** umgesetzt. Aus Zeitgründen konnte keine Optimierung der Reaktions- und Aufreinigungsbedingungen vorgenommen werden. Es ist daher anzunehmen, dass hier noch bessere Ausbeuten zu erzielen sind. Die Entschützung der Benzoesäure zu **142** erfolgte durch Trifluoressigsäure in gewohnt hoher Ausbeute (94 %) und auch die Veresterung mit Collinolacton (**20a**, **20b**, Standardbedingungen) führte zu einem dünn-schichtchromatographisch beobachteten vollständigem Umsatz des Edukts

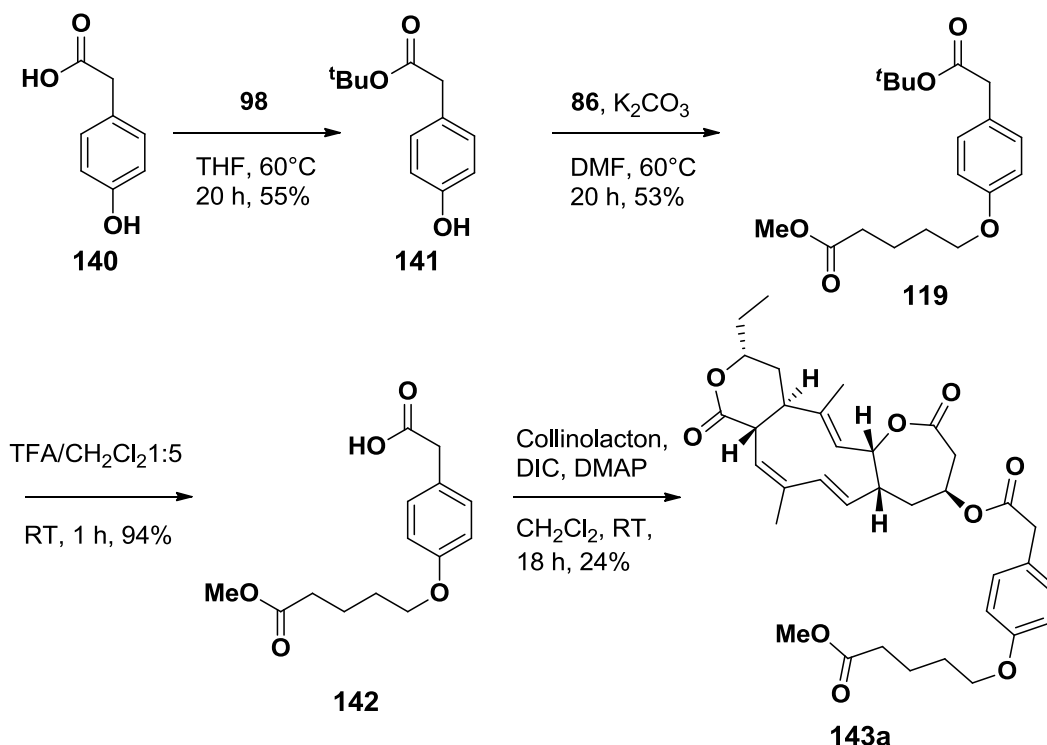
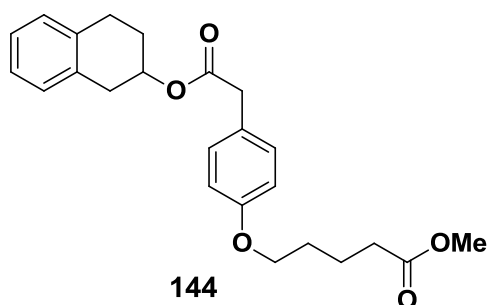


Abb. 36: Synthesestrategie zur Herstellung von 4-O-HPE-Collinolacton(**143a**, **143b**).

20. Erneut konnte die Ausbeute an **143** nach präparativer HPLC (24 %) diesen Umsatz nicht wiedergeben. Auch hier ist die Ursache vermutlich verunreinigtes Collinolacton-Edukt. In zukünftigen Arbeiten ist zu überprüfen, ob es in der HPLC-Aufreinigung zu Verlusten durch Präzipitation des Produktes **143** kommt. Auch der HPE-Ester von 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**144**) wurde aufgrund einer nicht optimierten HPLC-Aufreinigung nur in geringen Ausbeuten erhalten (11 %). Die erhaltenen Mengen im von je ca. 5 mg waren jedoch ausreichend, um die biologischen Eigenschaften der HPE-Derivate **143** und **144** von den Kooperationspartnern testen zu lassen (detaillierte Ergebnisse siehe Kap 6).



5.7.5 Diskussion des HPE-Spacers

Der HPE-Spacer **119** ist als erstes an Collinolacton (**20a**, **20b**) angepasstes Spacersystem synthetisch zuverlässig zugänglich und biologisch aktiv. Weitere Optimierungen der Reaktions- und Aufreinigungsbedingungen sowie die durch Verwendung von Festphasensynthese zur Herstellung der Affinitätsmatrix vereinfachte Aufreinigung werden aller Voraussicht nach in Zukunft gute Ausbeuten hervorbringen. Die Verwendung einer Valerylseitenkette in 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**) führte zwar zu einer Verringerung der Zytotoxizität gegenüber 4-O-(p-Methoxyphenylacetyl)-collinolacton (**112a**, **112b**). Diese befindet sich trotz dessen allerdings in einem befriedigenden Bereich (25 μM in PtK2-Zellen). Weitaus interessanter ist die vorhandene Induktion eines monostralen Phänotyps in PtK2-Zellen durch 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**). Diese konnte weder mit den freien HPE-Spacern **119** und **142** noch mit 2-O-HPE-1,2,3,4-Tetrahydronaphthol (**144**) nachgewiesen werden (s. Kap. 6.3.4). Ebenfalls

konnten visuell auswertbare Auswirkungen auf das Aktinnetzwerk festgestellt werden, eine Untersuchung der Migrationsinhibition steht noch aus.

Zusammenfassend ist der HPE-Spacer zur affinitätschromatographischen Identifikation des Target-Proteins von Collinolactonestern gut geeignet. Zurzeit ist eine Immobilisierung des HPE-Spacers **119** auf Nitrobenzyl-Linker modifiziertem Toyopearl AF-Amino-650 (**77**) noch nicht erfolgt. Diese wird zeitnah durchgeführt. Hierbei wird der geschützte HMB-Spacer **119** selektiv durch Lithiumhydroxid an der Valerylcarbonsäure entschützt (**145**) und mit **77** zu **146** verestert (s. Abb. 37). Nach Entfernung der tert-Butylschutzgruppe mit TFA zu **147** wird durch Carbodiimid-aktivierte Kopplung von Collinolacton (**20a**, **20b**) an die Festphase die Affinitätsmatrix für das Target-Fishing (**115**) hergestellt.

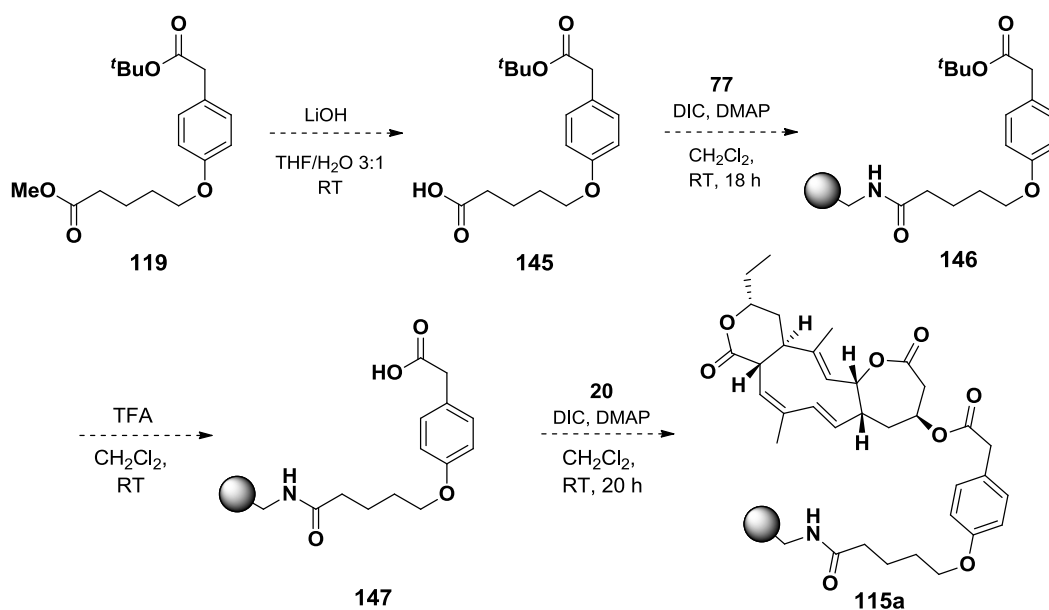


Abb. 37: Synthesepfad für die zukünftige Kopplung des HPE-Spacers an Nitrobenzyl-Linker modifiziertes Toyopearl AF-Amino-650 (**77**) und nachfolgende Immobilisierung von Collinolacton (**20a**, **20b**) zu **115**.

5.7.6 Ausblick: Diskussion einer zukünftigen Target-Fishing-Strategie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Sicherstellung biologischer Aktivität (s. Kap. 6) ein synthetisch zuverlässig zugänglicher Spacer, 2-(4-Valeroxyphenyl)acetyl-Spacers (HPE-Spacer), für die Identifikation der Target-Proteine von Collinolactonderivaten hergestellt werden. Dieser individuell angepasste Spacer **119** bietet für den weiteren Aufbau eines modularen affinitätschromatographischen Festphasensystems vielfältige Möglichkeiten. Er kann mit der etablierten Toyopearl AF-Amino-650-Festphase oder auch mit Biotin gekoppelt werden. Alternativ kann ein 4-O-HPE-Collinolacton über einen verlängerten Spacer mit einer Kombination aus Photoaffinitäts- und Fluoreszenzmarker verknüpft werden (z.B. Diaziriny- und Coumarin-Marker).

Der Aufbau des hier im Rahmen dieser Arbeit etablierten Systems ist durch die geplante Target-Fishing-Strategie bedingt. Hier stehen zukünftig im Wesentlichen drei grundlegende massenspektrometrie-basierte Strategien zur Verfügung, welche in Folge diskutiert werden: Vergleichende Affinitätschromatographie (ICAT), Kompetitive Affinitätschromatographie (SILAC) und Photoaffinitätslabeling (SILIC).

Vor der Entscheidung für eine generelle Strategie ist es wichtig auszuschließen, dass das tatsächlich aktive Prinzip von Collinolacton-Derivaten durch Eliminierung entstandenes Collinolactenon (**38a**, **38b**) ist (s. Kap. 6.7). Unterschiede in der Reaktivität der Ester **104-112** wären dann durch unterschiedliche Abgangsgruppenqualität oder Zellmembranpermeabilität zu erklären. Dies ist nach vorhandenen Ergebnissen nicht wahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Eine Verknüpfung von **38** mit einem Spacer oder PAL-Label ohne Verlust des α,β -ungesättigten Systems oder sterischer Hinderung ist aus aktueller Sicht schwer möglich, es fehlen funktionelle Gruppen. Modifikationen des Cyclodecatrien-Systems führten zu einer Kondensationsreaktion unter Verlust der biologischen Aktivität, wohingegen Hydrolyse der Lactonringe zu einer Vielzahl von Zerfallsprodukten führt. Hier sind eine angepasste Fishing-Strategie und eine gewissenhafte Validierung der gefundenen Targets notwendig. Somit müssen

identifizierte Target-Proteine sowohl auf die Bindung von Collinolactonestern untersucht werden, als auch auf eine Bindung von Collinolactenon (**38a**, **38b**). Wird die Bildung von **38** nicht berücksichtigt, so besteht die Gefahr, dass die im Target-Fishing verfälschte Ergebnisse ermittelt werden.

5.7.7 Vergleichende Affinitätschromatographie

Die in ersten Target-Fishing-Strategien dieser Arbeit angestrebte vergleichende Affinitätschromatographie benötigt ein strukturell ähnliches, aber biologisch inaktives Derivat zur Identifikation unspezifisch bindender Proteine. Die bisher verwendete Modellverbindung 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**) erwies sich als biologisch aktiv und kann nicht weiter verwendet werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde Mevalonolacton erwägt, welches sich aufgrund des deutlichen Größenunterschiedes und literaturbekannter biologischer Aktivität^[135] jedoch ebenfalls nicht eignet. Die Auswahl weiterer, kommerziell erhältlicher Verbindungen ist sehr begrenzt. Am besten geeignet scheint daher die Verwendung von mittels mCPBA behandelten Collinolactonestern, den Collazulenestern, bei welchen der Cyclodecatrien-Ring durch Umlagerung kondensiert ist (**151**, **152**). Diese zeigen eine hohe Strukturähnlichkeit und in biologischen Tests der Kooperationspartner keine Aktivität. Sie müssen allerdings über einen weiteren Schritt synthetisiert werden, was wiederum die benötigte Menge an Collinolacton (**20a**, **20b**) erhöht.

Verwendet man zur Identifikation spezifisch bindender Proteine das ICAT-Verfahren (s. Kap. 5.1), welches durch ICAT-Labeling einen zweiten affinitätschromatographischen Schritt besitzt, so steigt der Aufwand des Target-Fishings weiter. Zusammenfassend ist die Nutzung des ICAT-Konzeptes zur Identifikation an Collinolactonderivate bindender Proteine mit einem hohen apparativen Aufwand und der weiteren Entwicklung einer geeigneten Modellverbindung verbunden. Andere Ansätze erscheinen hier attraktiver und schneller realisierbar.

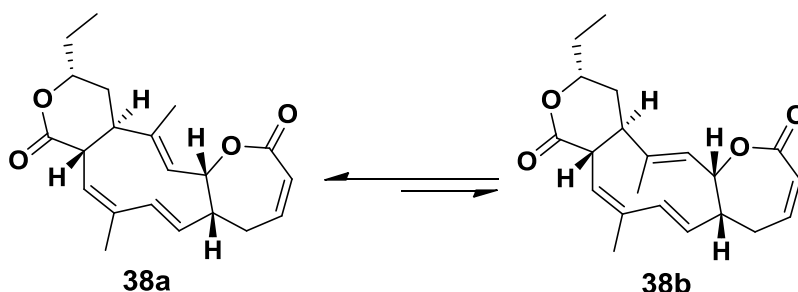
5.7.8 Kompetitive Affinitätschromatographie

Das interessanteste kompetitive Affinitätschromatographieverfahren für die hier angestrebte Identifizierung der Target-Proteine von Collinolactonderivat **115** ist SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture)^[86]. Das SILAC-Verfahren ist für die Identifikation von an Collinolactonderivaten bindenden Proteinen gut geeignet. Es bietet identische Bedingungen zwischen Negativkontrolle und Experiment, was eine Verfälschung durch selektiv an die Positivkontrolle bindende Proteine ausschließt. Durch die anschließende bioinformatische Analyse werden spezifisch an den Wirkstoff bindende Proteine relativ sicher identifiziert. Auch in geringer Konzentration vorhandene Proteine, welche in einem Gel-basierten Ansatz übersehen worden wären, könnten mittels SILAC erfasst werden. Des Weiteren vorteilhaft ist die relativ einfache Durchführung des Pulldowns.

Nachteilig bei dieser Methode ist die Notwendigkeit eines geeigneten massenspektrometrischen Systems und entsprechender Software, sowie für die bioinformatische Analyse geschulten Personals. Diese Anforderungen können für das vorliegende Projekt nur im Rahmen einer Kooperation erfüllt werden. Die notwendige kostenintensive isotoopenmarkierte Kultivierung von Zellkulturen mit ¹³C- oder ¹⁵N-markierten Aminosäuren kann in Kooperation mit PROF. DR. STEPHAN ZÄHLER in dessen Arbeitskreis erfolgen. Zurzeit wird je nach verwendeter isotoopenmarkierter Aminosäure mit 200-500 € pro SILAC-Experiment gerechnet. Des Weiteren wird zusätzlich ein freies Collinolactonderivat für Verdrängungsexperimente benötigt, was die verwendete Menge an Collinolacton (**20a**, **20b**) erhöht. Pro SILAC-Experiment sollten aufgrund der Sensitivität des Experimentes allerdings insgesamt nicht mehr als 2-3 mg immobilisiertes und freies Collinolactonderivat (**20a**, **20b**) benötigt werden^[136]. Diese Nachteile schränken die Anwendbarkeit des SILAC-Verfahrens zur Identifikation des Targets von Collinolactonderivaten nicht entscheidend ein. Zur Realisierung des SILAC-Ansatzes ist sowohl die Nutzung des immobilisierten Collinolacton-HPE-Esters **115**, als auch eines biotinylierten Collinolacton-HPE-Esters möglich. Wird ein Festphasensystem genutzt, so ist eine Verknüpfung der festen Phase mit dem Collinolacton-HPE-Ester über einen photospaltbaren Linker zu empfehlen. Nur so kann die

Beladung der festen Phase überprüft werden. Mit Nitrobenzyl-Linker **77** des Arbeitskreises PROF. DR. THOMAS ZIEGLER steht ein photospaltbarer Linker zur Verfügung, welcher gut unter Standardbedingungen mit dem HPE-Spacer **145** amidiert werden kann. Zu überlegen wären weitere Tests eines nichtimmobilisierten Derivats des Collinolacton-HPE-Nitrobenzyl-Linker-Konstrukts **115** zur Sicherstellung biologischer Aktivität. Die getestete biologische Aktivität von 4-O-BHB-Nitrobenzyl-collinolacton (**102a**, **102b**) lässt allerdings annehmen, dass die Einführung des Nitrobenzyl-Linkers **78** keinen gravierenden Einbruch der biologischen Aktivität zur Folge hat.

Ebenso kann über Länge und Art einer optimalen Seitenkette des Spacers diskutiert werden. Vorteile hydrophiler Spacer in der Seitenkette wurden bereits erwähnt. Da eine gute biologische Aktivität von 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**) nachgewiesen wurde und weitere Modifikationen auch einen Verlust dieser Aktivität bewirken können, ist die Verwendung des vorliegenden HPE-Spacers **119** empfehlenswert. Die Durchführung eines SILAC-Target-Fishings zur Identifikation an Collinolactonderivate bindender Proteine ist mittels des entwickelten HPE-Spacers **119** gut möglich und könnte nach Herstellung der gewünschten Immobilisierung begonnen werden.



Um weitere Hinweise zu erhalten, ob Collinolactonderivate oder Collinolactenon (**38a**, **38b**) für die biologische Aktivität verantwortlich ist, bietet das SILAC-Verfahren die einzigartige Möglichkeit in einem doppelten Experiment sowohl Verdrängung mit einem freien Collinolactonderivat als auch mit Collinolactenon (**38a**, **38b**) zu überprüfen. Da beide biologische Aktivität zeigen, sind entweder beide aktiv oder **38** bildet sich durch unspezifischen Zerfall in der Zelle aus Collinolactonderivaten, welche als „Pro-Drug“ wirken, und ist in beiden Fällen das aktive Prinzip. Sind beide aktiv, so ist es unwahrscheinlich, dass beide gleiche

Targetproteine besitzen. Aufgrund der Elektrophilie des α,β -ungesättigten Systems von Collinolactenon (**38a**, **38b**) ist eine Reaktion mit nucleophilen Gruppen wie den Seitenketten von Cystein oder Serin wahrscheinlich (s. Kap 6.7). Führt man also parallel zwei SILAC-Ansätze durch und nutzt im ersten ein freies Collinolactonderivat (z.B. 4-O-HPE-Collinolacton, **143a**, **143b**) zur Verdrängung, im zweiten dagegen Collinolactenon (**38a**, **38b**), so müssten beide Verfahren unterschiedliche Resultate liefern (s. Abb. 38). Eine Erniedrigung der gebundenen Proteinmenge durch Bildung von **38** aus den immobilisierten Derivaten sollte in allen Ansätzen gleich sein, kann also vernachlässigt werden. Eine Verdrängung mit Collinolactonderivat **143** im schweren Ansatz würde, wie generell in SILAC-Verfahren, zu einer Erniedrigung der Detektion spezifisch bindender Proteine führen, was diese identifiziert.

Verwendet man im parallelen Ansatz nun stattdessen Collinolactenon (**38a**, **38b**), so sollte dies, sofern es nicht das gleiche Target wie 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**) besitzt, nicht zu einer Reduktion der gleichen Proteine führen. Dies wäre ein starker Hinweis, dass **38** und **143** unterschiedliche Targets besitzen. Eine Bewertung der gebundenen Proteine und Validierungsexperimente können nun beweisen, dass Collinolactonderivate selber für die biologische Aktivität verantwortlich sind.

Findet man stattdessen identische Resultate spezifisch gebundener Proteine in beiden SILAC-Ansätzen, so ist von gleichen Targets auszugehen. Die Aktivität von Collinolactonderivaten könnte in diesem unwahrscheinlichen Fall erst durch Validierungsexperimente bewiesen werden. Erhält man keine spezifischen Resultate, so ist eine hohe Bildung von Collinolactenon (**38a**, **38b**) aus dem immobilisierten Collinolactonderivat anzunehmen. Es erfolgt daher keine spezifische Bindung, **38** und sämtliche eigentlich bindenden Proteine werden im Waschschrift entfernt. Dieses Ergebnis würde einen Wirkmechanismus von Collinolactonderivaten durch Bildung von Collinolactenon (**38a**, **38b**) nahelegen.

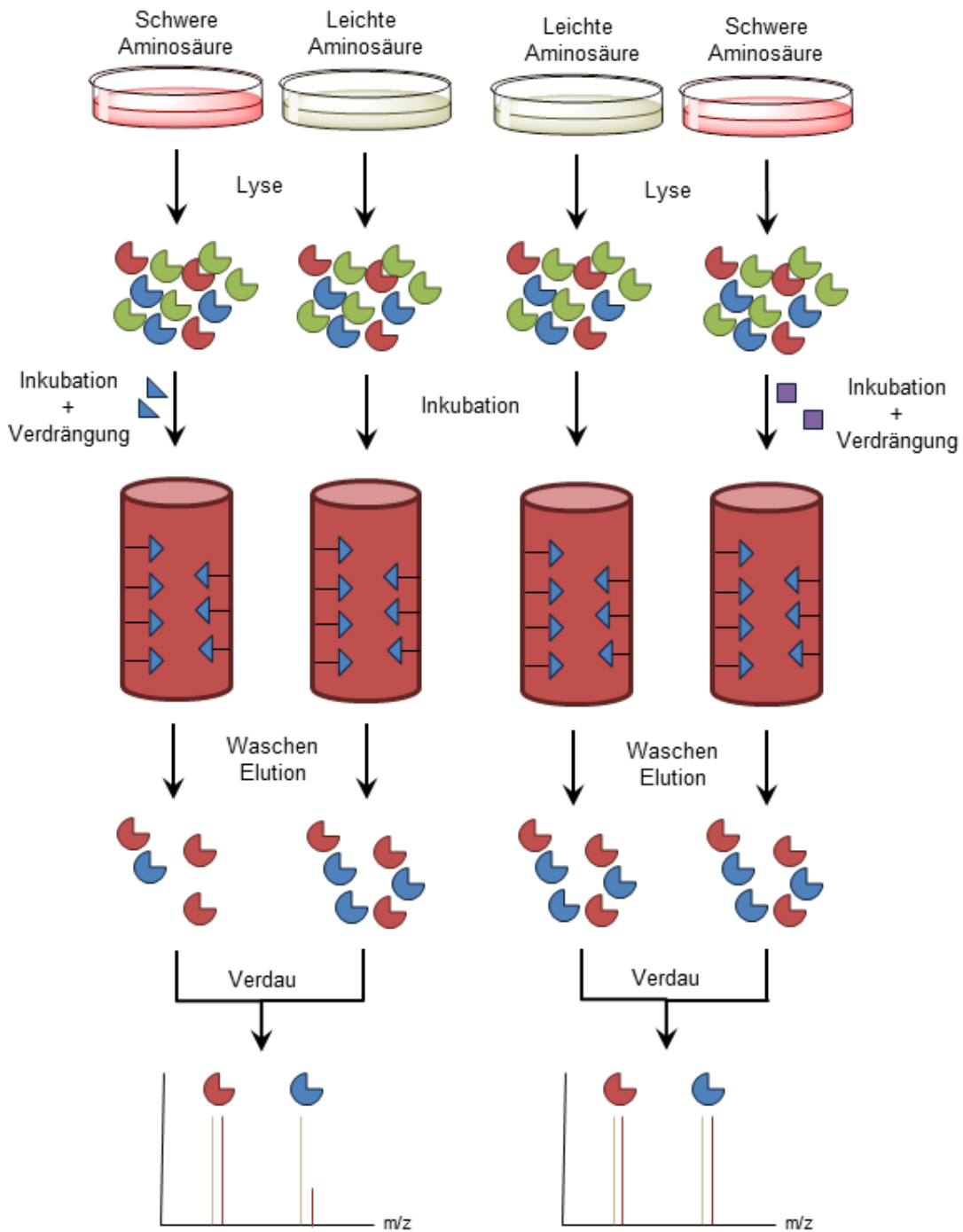
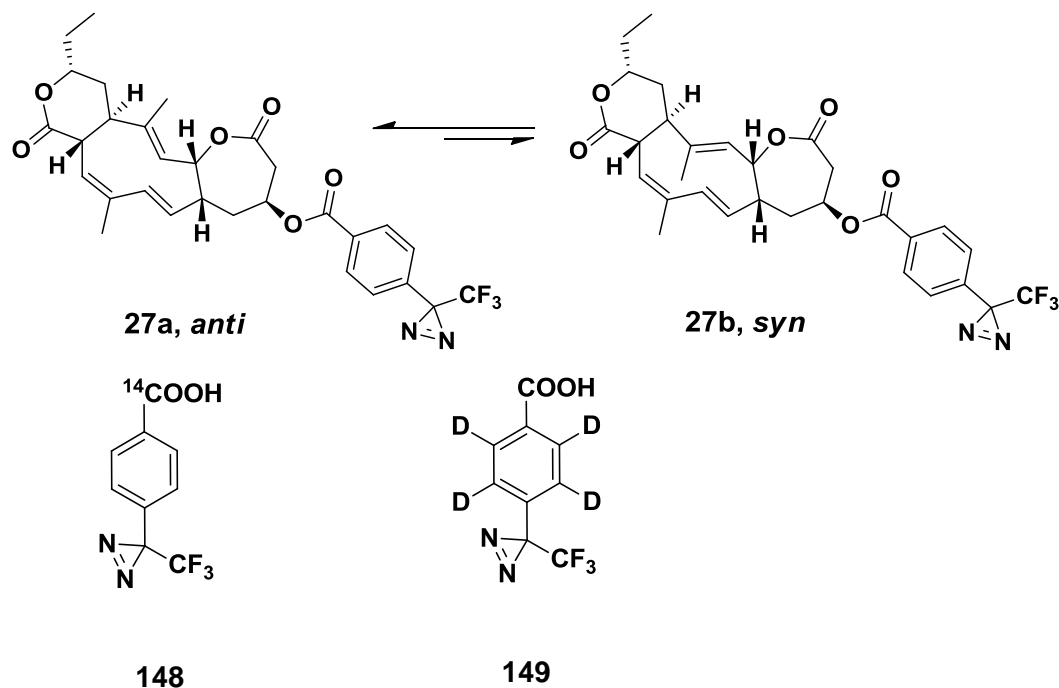


Abb. 38: In dieser Arbeit entwickeltes doppeltes SILAC-Verfahren zur Identifikation der Target-Proteine von Collinolactonderivaten (Blau). Führt eine parallel durchgeführte Verdrängung mit dem möglichen Zerfallsprodukt Collinolactenon (**38a**, **38b**, Violett) zu keiner Verringerung der Intensität der Peptidsignale von Targetproteinen mit schweren Aminosäuren, so beweist dies unterschiedliche Target-Proteine beider Substanzen.

Ein SILAC-Ansatz bietet somit eine einzigartige Möglichkeit spezifisch an Collinolactonderivate bindende Proteine zu identifizieren und gleichzeitig die Aktivität von Collinolactonderivaten von der Aktivität des Collinolactenon (**38a**, **38b**) abzugrenzen. Targetproteine von **38** können in diesem Ansatz nicht ermittelt werden, diese können aufgrund fehlender funktioneller Gruppen auch nicht durch andere affinitätschromatographische Ansätze ermittelt werden. Einzige Ausnahme wäre ein ABPP-Ansatz unter Verwendung isotopenmarkierten Collinolactenon (**38a**, **38b**). Dies kann allerdings nur totalsynthetisch hergestellt werden.

5.7.9 Photoaffinitätslabeling

Photoaffinitätsmarkierung (PAL) bietet den besonderen Vorteil nicht nur bindende Proteine zu identifizieren, sondern durch kovalente Bindung auch den Bindungs-ort in diesen Proteinen. Ein mit einem Photoaffinitäts-Label verestertes Collinolacton-derivat (**27a**, **27b**) wurde bereits hergestellt, ist aber noch nicht eingesetzt worden^[35b]. Das ¹⁴C- markierte radioaktive Diazirinyl-Photoaffinitäts-Label **148** ist dem AK PROF. DR. GROND aus eigenen Arbeiten in Kooperation mit dem Arbeitskreis PROF. DR. VON ZEZSCHWITZ im 100 mg-Maßstab zugänglich.



Für die Identifikation spezifisch an Collinolactonderivate bindender Proteine wäre ein SILIC-Ansatz (Stable isotope labeled inhibitors for cross-linking)^[84] unter Verwendung des deuterierten Diazinirylbenzoesäure-Photoaffinitäts-Labels **149** besonders geeignet. Dieses könnte aus vierfach deuteriertem 1,4-Dibrombenzol nach BENDER ET AL.^[81] hergestellt werden. Ein entsprechendes Collinolactonderivat besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu vorhandenen Systemen und eine bereits getestete biologische Aktivität. Es können somit diskutierte Probleme von Fluoreszenz- und Radiolabeln umgangen werden und eine genaue Bestimmung spezifisch bindender Proteine gewährleistet werden. Eine Verwendung eines Spacers ist nicht nötig.

Ein Photoaffinitäts-Labeling-Ansatz kann jedoch keine Aussage über einen eventuellen Anteil von Collinolacton (**38a**, **38b**) an biologischen Effekten von Collinolactonanaloga treffen. Die Bildung von **38** in der Zelle würde zu Verlust des PAL-Labels führen und nachfolgende Identifikation bindender Proteine unmöglich machen. Somit sollte die Durchführung eines Protein-Target-Fishings zuerst mittels SILAC-Verfahren erfolgen. Der Bindungsort an gefundenen Target-Proteinen von Collinolactonderivaten kann nach positivem Abschluss des SILAC-Verfahrens und Beweis der Aktivität von Collinolactonderivaten durch Validierungsexperimente wie Inhibitionsstudien mit isolierten Proteinen untersucht werden. Hierfür eignet sich Photoaffinitäts-Labeling, in welchem der AK GROND ausgewiesene Erfahrungen durch Forschungsarbeiten mit V-ATPase-Protein^[81-82, 137] und den Inhibitoren Archazolid, Bafilomycin und Concanamycin besitzt.

6 Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) und biologischer Aktivität von Collinolactonderivaten

6.1 Einleitung: Kinesin-Motorproteine und bipolare Spindelbildung in der Mitose

Kinesine sind als unidirektionale Motorproteine an verschiedenen Phasen der Zellteilung^[138] beteiligt und sind wichtig für den Transport von Vesikeln und Organellen^[139]. Mehr als 650 eukaryotische Kinesine (auch als Kifs bezeichnet) sind bekannt, 45 davon im Menschen. Prokaryonten besitzen dagegen keine Kinesine. Zurzeit befinden sich Inhibitoren von drei Kinesinen in verschiedenen klinischen Phasen (Eg5, CENPE, MPP1), fast alle wirken wie der erste entdeckte Kinesinhemmer Monastrol (**5**) auf Eg5^[9a]. Eg5 (auch als KSP, Kif11 oder Kinesin-5 bezeichnet) ist an der Bildung bipolarer Spindeln beteiligt. Seine Inhibition aktiviert den Spindle Checkpoint, was mitotischen Arrest und Zelltod durch Apoptose zur Folge hat.^[9b]

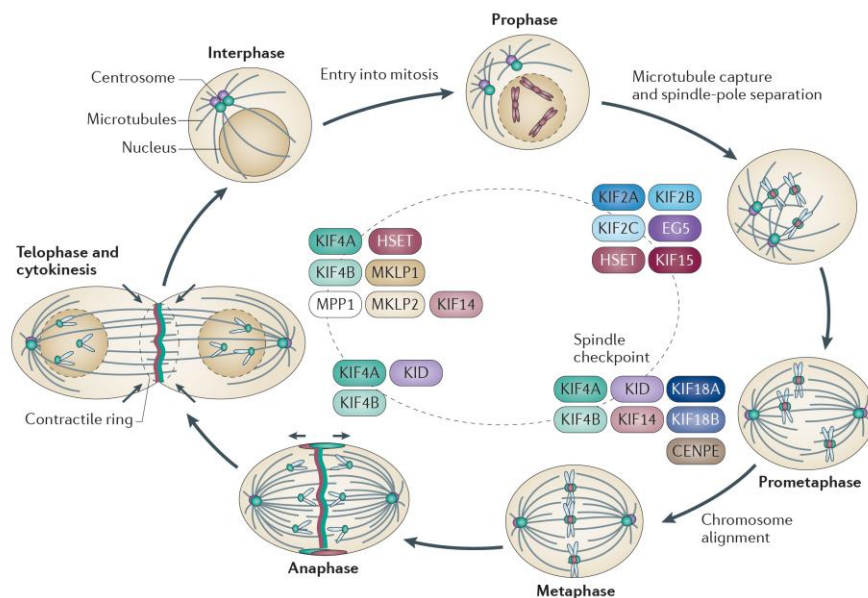


Abb. 39: An Mitose und Zytokinese beteiligte Kinesine. Kinesine können außer den hier aufgeführten Funktionen noch weitere Funktionen in der Mitose besitzen. Sie können ebenfalls außerhalb der Mitose aktiv sein, beispielsweise in neuronalen Transportvorgängen. Abbildung aus RATH ET AL. [9a].

Selektive Inhibitoren wie ARRY-520 (**6**) oder Ispinesibanaloga (**7**, **8**), welche in klinischen Studien als Krebstherapeutika untersucht werden, binden an eine Eg5-spezifische Bindungstasche der Motordomäne und hemmen ausschließlich Eg5. Andere Wirkstoffe binden an die ATP- oder die Mikrotubuli-Bindungsstelle, was zu einer Hemmung mehrerer unterschiedlicher Kinesine führt^[9a]. Mitotischer Arrest nach Eg5-Inhibierung hat meist die Ausbildung eines monoastralen Phänotyps zur Folge^[10]. Studien der zellulären Auswirkungen von Antimitotika konnten jedoch sowohl zwischen verschiedenen Zelllinien als auch innerhalb einer Zelllinie unterschiedliche Phänotypen und eine unterschiedliche zeitliche Ausbildung dieser feststellen^[140]. Neben Zelltod konnte nach mitotischem Arrest Entgleiten in eine weitere Mitosephase (mitotic slippage) unter Bildung tetraploider Zellen beobachtet werden. Diese Zellen sterben in der folgenden Interphase, blieben im Ruhezustand oder unterlaufen eine weitere Mitosephase ohne Teilung.

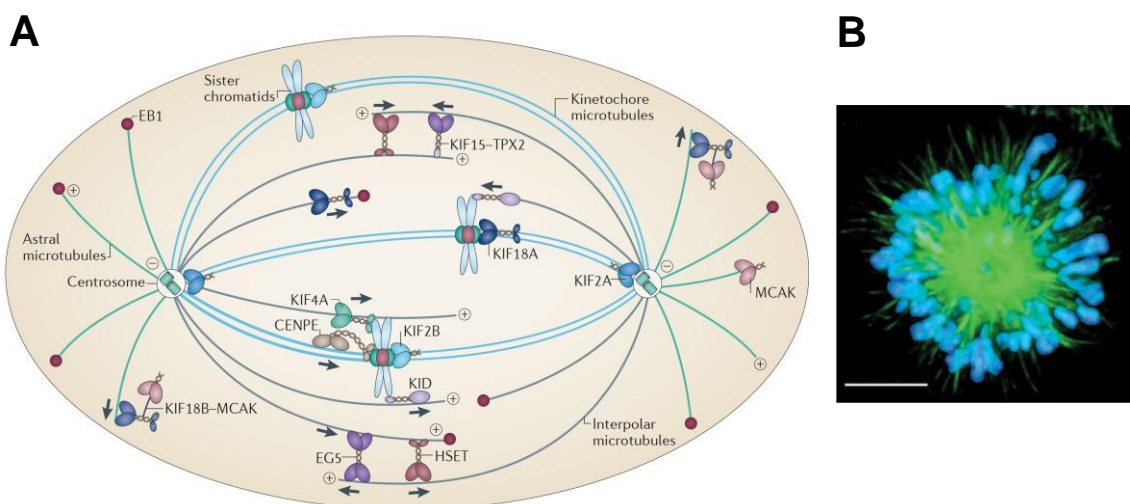


Abb. 40: (A) Vereinfachte Darstellung der Rolle von Kinesinen in der Mitose. Für multifunktionelle Kinesine ist nur eine Funktion gezeigt. Abbildung aus RATH ET AL.[9a].

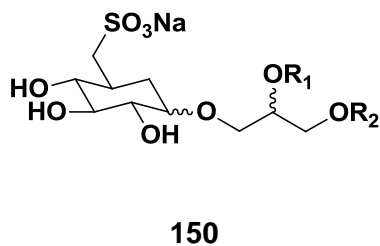
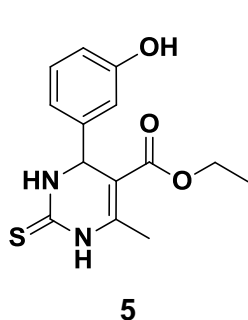
(B) Durch Monastrol (**5**) induzierter monoastraler Phänotyp in BSC-1 Zellen. Immunofluoreszenzfärbung: α -Tubulin grün, Chromatin blau. Abbildung aus KAPOOR ET AL. [10].

Das ebenfalls als Drug-Target genutzte Kinetochor-assoziierte Kinesin CENPE besitzt keinen Einfluss auf die bipolare Spindelbildung^[141]. Es verbindet Mikrotubuli und Kinetochore und trägt so zu Ausrichtung und Kongression der Chromo-

somen bei. CENPE ist essentiell für den Übergang von Metaphase zu Anaphase. Seine Rolle in der Tumorgenese ist unklar, in Cyclin B1 überexprimierenden Mammakarzinoma konnte eine Hochregulierung von CENPE festgestellt werden^[142], in hepatozellulären Karzinoma dagegen eine Herunterregulierung^[143].

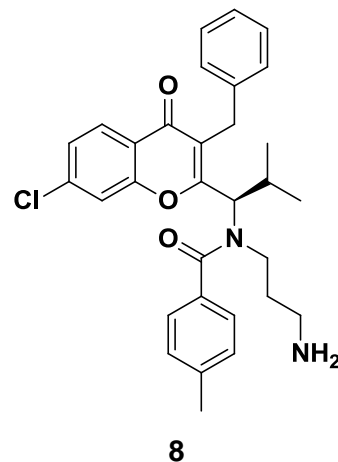
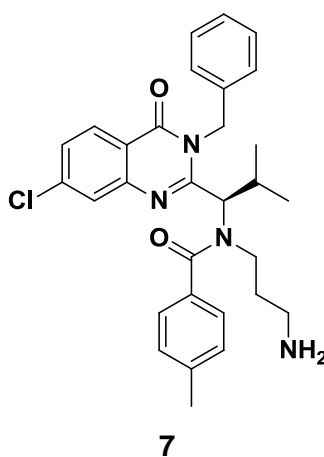
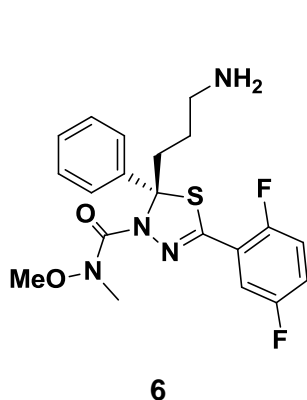
Ein weiteres an der bipolaren Spindelbildung beteiligtes Kinesin ist HSET (KIFC1)^[144]. Über seine genaue Funktion besteht noch Uneinigkeit^[9a]. Es konnte allerdings bei Inhibition von HSET die Bildung multipolarer Spindeln nachgewiesen werden, in einer anderen Studie wurden lediglich kürzere und breitere Spindeln festgestellt.

Auch Kinesine der Familie 13 (KIF2A, KIF2B, MCAK, KIF24)^[145] sind an der bipolaren Spindelbildung beteiligt. Sie sind nichtbewegliche M-Typ Mikrotubuli-Depolymerasen und an der Regulation der Mikrotubulidynamik in der Mitose beteiligt. Kinesine-13 werden ihrerseits von mitotischen Kinasen wie Plk 1, Aurora1 und Aurora 2 reguliert, welche Teil der generellen Kontrolle des Zellzyklus sind^[9a].



a α-Anomer $R_1 = H$, $R_2 = 18:1$ Fettsäure

b β-Anomer $R_1 = R_2 =$ Stearinsäure



Außer von bekannten Eg5-Inhibitoren ist nur der Einfluss MCAK-inhibierender Sulfoquinovosylacylglycerole (**150a, b**) auf die Spindelbipolarität bekannt. Neue Hemmstoffe könnten daher zu einem weiteren Verständnis der Rolle einzelner Kinesine beitragen und möglicherweise neue Wirkorte für die Krebstherapie identifizieren.

6.2 Studien der biologischen Aktivität von Collinolactonderivaten

Semisynthetisch hergestellte 4-O-Collinolactonbenzoesäureester wie 4-O-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a, 21b**) bewirken in eukaryotischen Zellen verschiedene Effekte. Neben Zytotoxizität konnte in Nierenzellen einer australischen Beutelratte (PtK2) die Bildung eines monoastralen Phänotyps durch Ester von **20** beobachtet werden^[35]. In einer Industriekooperation konnte bewiesen werden, dass Collinolactonderivate dieses Phänomen nicht durch eine literaturbekannte Hemmung des Kinesin-Motorproteins Eg5 induzieren^[35b] (s. a. Kap. 3.1).

Kooperationspartner in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Bildung monoastraler Phänotypen und der Wirkung auf das Mikrotubulinetzwerk war die Gruppe von DR. FLORENZ SASSE (HZI Braunschweig). Die Arbeitsgruppe von PROF. DR. STEFAN ZÄHLER (LMU München) untersuchte als weiterer Kooperationspartner Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett, Zellproliferation und -migration. Weitere Untersuchungen zur Wirkung auf den Zellzyklus erfolgten in der Arbeitsgruppe von THOMAS U. MAYER (Universität Konstanz).

6.3 Untersuchungen zur Bildung monoastraler Halbspindeln und Zytotoxizität

Die im Arbeitskreis von DR. FLORENZ SASSE durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mehrheitlich von Aruna Raja³ durchgeführt. Es wurde die Bildung eines monoastralen Phänotyps durch Collinolactonderivate in Leberephitelzellen von Beutelratten (PtK2) überprüft sowie Zytotoxizität gegenüber adhärennten Mausfibroblastenzellen (L929), Mammakarzinomzellen (MCF7) und PtK2-Zellen untersucht. Die erhaltenen Zytotoxizitätsdaten sind in Kap. 6.3.1 aufgeführt. Zur Diskussion der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Collinolactonderivaten werden in Folge auch im Rahmen der Arbeit von L. HOFFMANN^[35A] und N. FETZER^[45] synthetisierte Derivate diskutiert, deren Herkunft in den jeweiligen Abbildungen vermerkt ist.

6.3.1 Collinolactonderivate mit modifiziertem Grundgerüst

Wie sich bereits in der Dissertation von Luise Hoffmann^[35a] andeutete, zeigen Collinolactonderivate, deren Grundgerüst chemisch modifiziert wurde (s. Abb. 41), keine Zytotoxizität und keine Induktion des monoastralen Phänotyps in PtK2-Zellen. Die einzige Ausnahme ist Collinolactenon (**38a**, **38b**), welches eine hohe biologische Aktivität aufweist (19 μM in PtK2-Zellen, s. Kap. 6.7). In Untersuchungen von 4-*O*-*p*-Brombenzoyl-Collazulen (**151**) und 4-*O*-*p*-Brombenzoyl-9,9a-Epoxy-Collazulen (**152**) konnten weder Zytotoxizität noch Effekte auf das Mikrotubulinnetzwerk festgestellt werden. Die Collazulene **151** und **152** wurden oxidativ mit *m*CPBA aus dem biologisch aktiven 4-*O*-(*p*-Brombenzoyl)-collinolacton (**21a**, **21b**) hergestellt (25 % bzw 27 % Ausbeute). Die fehlende Aktivität der Produkte unterstreicht erneut die Notwendigkeit des Cyclodecatrien-Grundgerüsts von Collinolactonderivaten für biologische Aktivität. Eine selektive Oxidation der

³ Ich danke Aruna Raja und Dr. Florenz Sasse für die exzellente Zusammenarbeit

4-Hydroxylgruppe von Collinolacton (**20a**, **20b**) mittels Dess-Martin-Periodinan (Derivat **153a**, **153b**, 46 % Ausbeute) führte ebenfalls nicht zu gesteigerter biologische Aktivität.

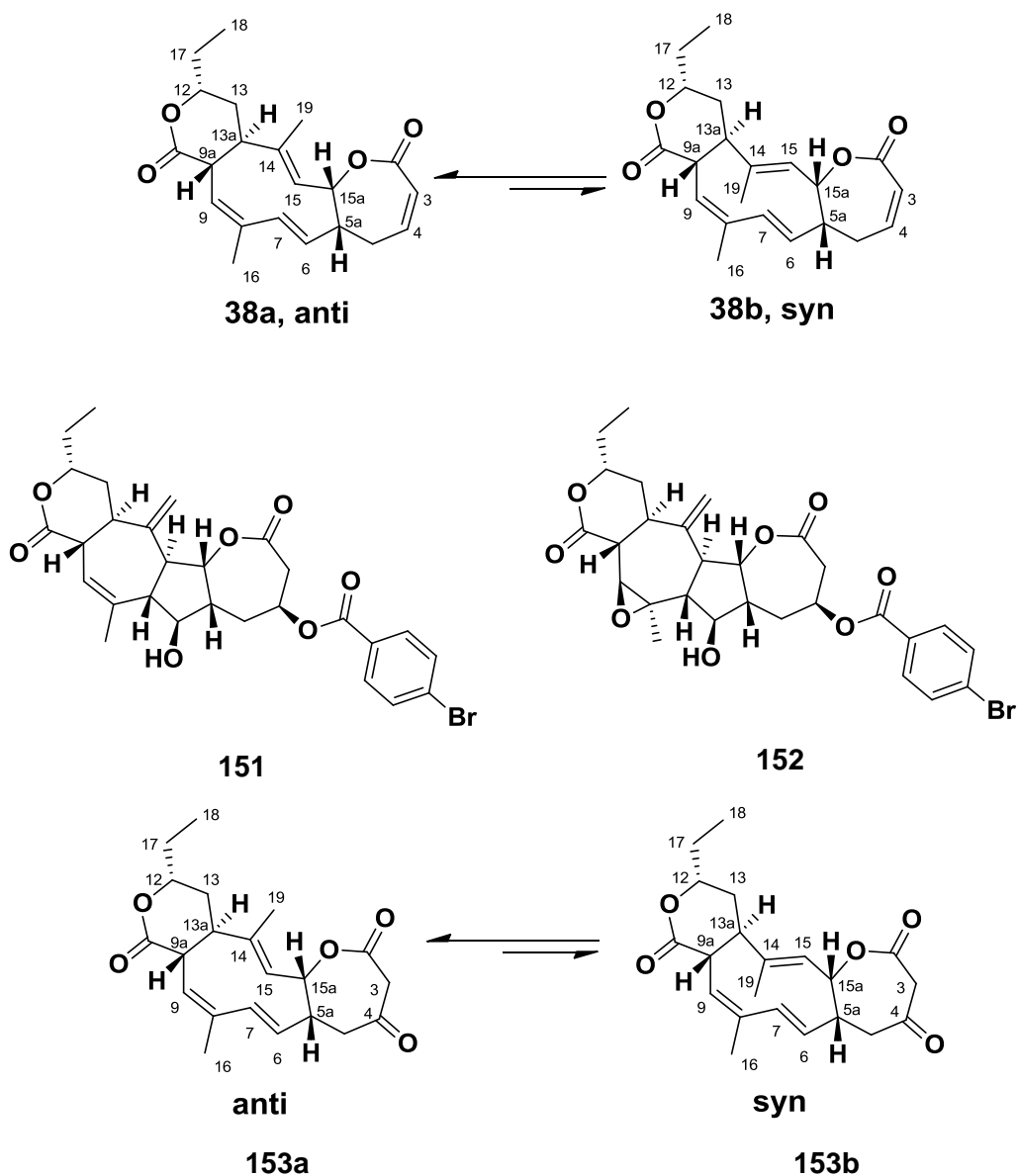


Abb. 41: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Derivate von Collinolacton (**20a**, **20b**) mit chemisch modifiziertem Grundgerüst.

6.3.2 4-O-Collinolactonester aliphatischer Verbindungen

Betrachtet man 4-O-Collinolactonester aliphatischer Verbindungen (s. Abb. 42 und Abb. 43) so zeigt sich hinsichtlich der Bioaktivität ein uneinheitliches Bild. Ester kurzer, aliphatischer Ketten (bis 6 Kohlenstoffatome) besitzen moderate bis hohe Zytotoxizität. Lange Ketten wie Stearyl- und Perfluorundecylester (**155a**, **155b** und **156a**, **156b**) zeigen hingegen keine biologische Aktivität. Durchbrochen wird diese Regelmäßigkeit durch die im Vergleich hohe Zytotoxizität von 4-O-Perfluornonyl (16 μM in PtK2-Zellen, **154a**, **154b**) und 4-O-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-succinyl-Collinolacton (6 μM in PtK2-Zellen, **28a**, **28b**), wobei **28** auch Induktion monoastraler Phänotypen zeigt. Weitere Unregelmäßigkeit zeigte 4-O-Acetyl-collinolacton (**29a**, **29b**). Konnte in L929-Zellen nur schwache Zytotoxizität nachgewiesen werden (50 μM), wurde in MCF7-Zellen die höchste bisher gemessene Zytotoxizität von Collinolactonderivaten gemessen (1 μM). Diese Daten sind allerdings nur bedingt aussagekräftig, da die Daten in verschiedenen Arbeitskreisen in unterschiedlichen Experimenten ermittelt wurden.

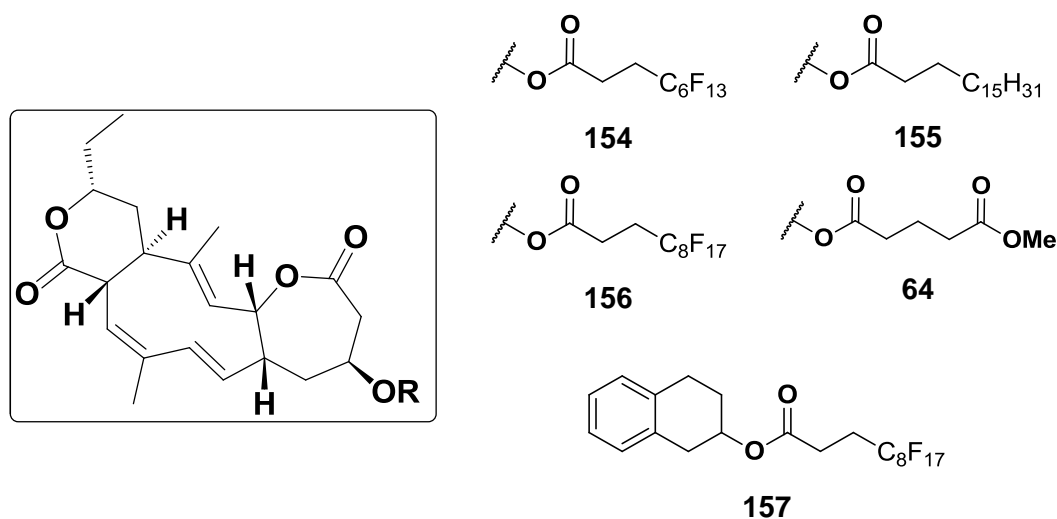


Abb. 42: Langkettige, aliphatische Collinolactonderivate und eine Modellverbindung mit aliphatischem Rest (**157**). **64** im Rahmen dieser Arbeit, **154**, **155**, **156**, **157** von Nina Fetzer^[45] synthetisiert.

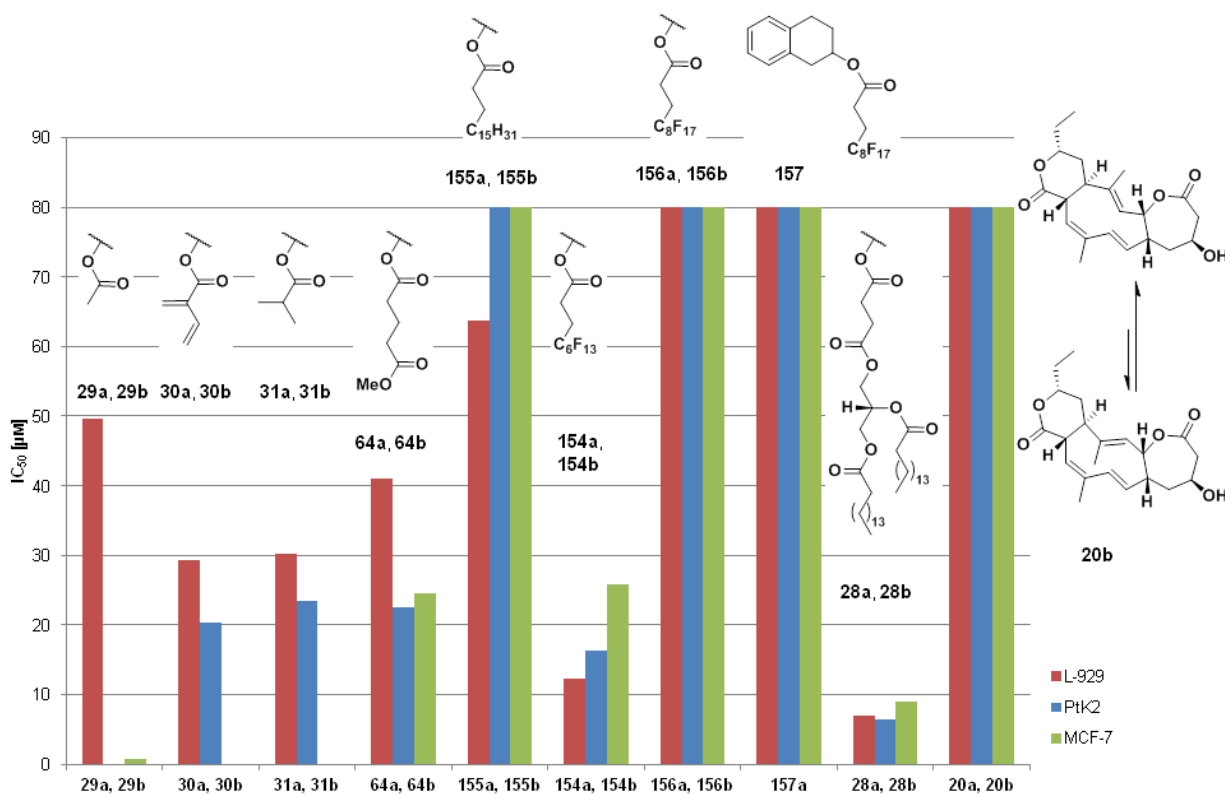


Abb. 43: Zytotoxizität von aliphatischen Collinolacton- und Modellverbindungsderivaten in verschiedenen Zelllinien. **29** Dissertation L. HOFFMANN^[35A]; **30**, **31** Diplomarbeit J.-N. FRICKE^[35B]; **28**, **154**, **155**, **156**, **157** Zulassungsarbeit NINA FETZER^[45]. **64** im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Hier mit 80 µM angegebene Proben besitzen eine Aktivität von >80 µM.

Ebenfalls keine klare Linie für die Aussage zu SAR-Beziehungen zeigt sich bei der Induktion von monoastralen Phänotypen in PtK2-Zellen. 4-O-Tiglyl- (**31a**, **31b**) und 4-O-Isobutyrylcollinolacton (**30a**, **30b**) zeigen diese, 4-O-Acetylcollinolacton (**29a**, **29b**) nicht.

Zur Erklärung der nicht einheitlichen Tendenz innerhalb der SAR-Studien aliphatischer Collinolactonderivate könnte man überlegen, ob Derivate wie **154** und **28** eventuell andere Targetproteine haben als andere Collinolactonderivate. Diese Proteine hätten dann auch andere Bindungstaschen als bisherige Target-Proteine. Dies ist aufgrund der großen Ähnlichkeit des biologisch inaktiven 4-O-2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-Perfluorundecyl-collinolacton (**156**) zu **154** sehr unwahrschein-

lich. Zudem zeigt Derivat **28** Induktion monoastraler Phänotypen in PtK2-Zellen, was andere Target-Proteine noch unwahrscheinlicher macht. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass Collinolactonderivate als Pro-Drugs wirken. Intrazellulärer Abbau würde aus dem inaktiven Pro-Drug das aktive Prinzip freisetzen. Unterschiedliche gemessene biologische Aktivitäten der Derivate haben ihre Ursache somit in unterschiedlicher Abbaukinetik. Da dieser Aspekt entscheidend für die biologische Aktivität und Identifikation der Target-Proteine von Collinolactonderivaten ist, wird dieser detailliert in Kap. 6.7 diskutiert.

Zusammenfassend lässt sich daher keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Kettenlänge aliphatischer 4-O-Collinolactonester auf die biologische Aktivität machen.

6.3.3 4-O-Collinolactonester aromatischer Verbindungen

Der Vergleich 18 aromatischer Collinolactonester, davon 13 im Milligramm-Maßstab in dieser Arbeit hergestellt, zeigt, dass viele Benzoessäurederivate die Bildung monoastraler Phänotypen in PtK2-Zellen induzieren. Quantifizierungen ergaben, dass z.B. nach Inkubation mit 4-O-(*p*-Methoxyphenylacetyl)-collinolacton (**104a**, **104b**) 50% aller mitotischen Zellen monoastrale Halbspindeln zeigten (20 µg/mL über Nacht), bei 4-O-*m*-Brombenzoylcollinolacton (**110a**, **110b**) sogar 69% (10 µg/mL über Nacht). Durchschnittlich besitzen Collinolactonbenzoyl ester außerdem eine etwas höhere Zytotoxizität als größere, aromatische oder aliphatische Analoga. Diese scheint relativ unabhängig von der Position und chemischen Natur des Ringsubstituenten zu sein, 4-O-(*p*-Methoxyphenylacetyl)-(**104a**, **104b**) und 4-O-*m*-Brombenzoyl-collinolacton (**110a**, **110b**) zeigen ungeachtet der unterschiedlich starken Halbspindelbildung vergleichbare Zytotoxizität (13 µM in PtK2-Zellen). Die Einführung einer Methylengruppe in **104** zeigt allerdings neben einer besseren Reaktivität in Veresterungsreaktionen auch eine höhere Zytotoxizität gegenüber 4-O-*p*-Methoxybenzoylcollinolacton (**106a**, **106b**, 20 µM in PtK2-Zellen), was in einer höheren sterischen Flexibilität begründet sein kann. Die höchste biologische Aktivität besitzt 4-O-*p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**, 3 µM in PtK2-Zellen). Es zeigt ebenfalls die Induktion von monoastralen Phänotypen in PtK2-Zellen und

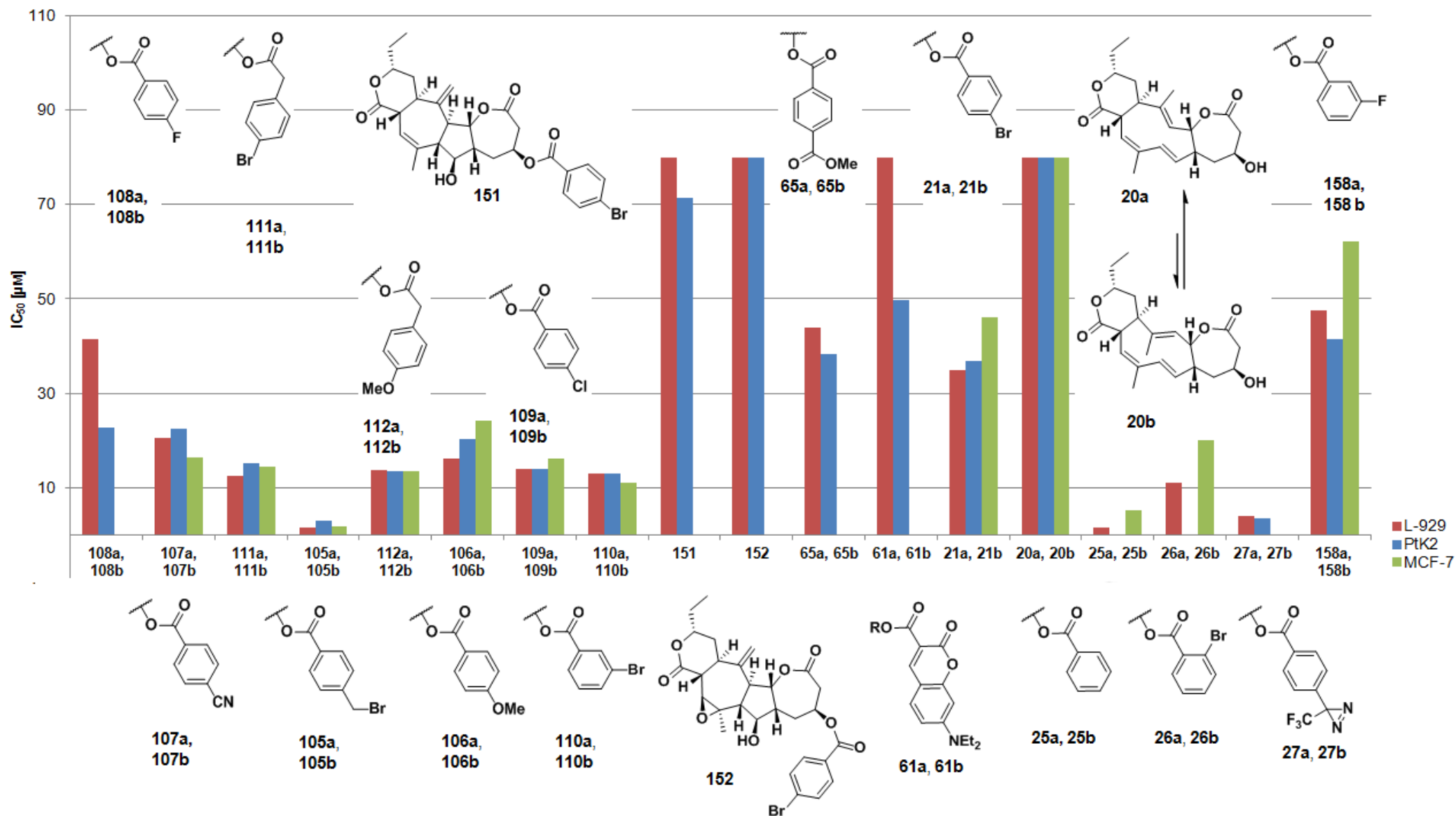


Abb. 44: Zytotoxizität von aromatischen Collinolactonderivaten in verschiedenen Zelllinien. Hier mit 80 µM angegebene Proben besitzen eine Aktivität von >80 µM. Derivate wurden bis auf **25**, **26** (L. HOFFMANN^[35A]), **27** (J.-N.FRICKE^[35B]) und **158** (NINA FETZER^[45]) im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

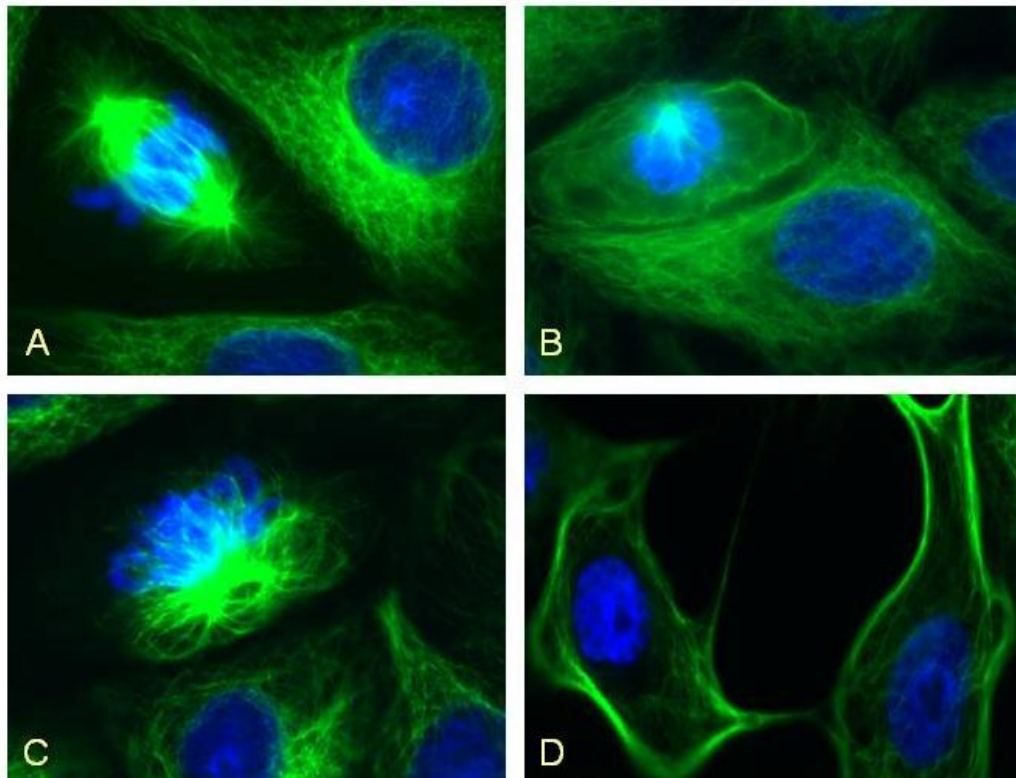


Abb. 45 PtK2-Zellen nach Inkubation mit Collinolactonderivaten über Nacht, Mikrotubuli durch Immunfluoreszenz grün, DNA mit DAPI blau. (A) 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**) zeigte in 2 Testreihen normale, bipolare Mitotisespindeln und keine monoastrale Spindelbildung. (B) monoastrale Spindelbildung bei 4-*O*-(*p*-Bromphenylacetoyl)-collinolacton (**111a**, **111b**) und (C) 4-*O*-*p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**, 1 µg/mL). (D) Bei höheren Konzentrationen an **105** (2 µg/mL) generelle Effekte auf Mikrotubulstruktur.

scheint daher für den Aufbau eines Spacersystems zur Target-Identifikation von Collinolactonderivaten gut geeignet zu sein. Einführung eines größeren Ringsystems wie in 4-*O*-DEAC-Collinolacton (**61a**, **61b**) führt zu einem Verlust der Zytotoxizität. Interessant ist ebenfalls die niedrige biologische Aktivität von fluorierten Benzoessäurederivaten (**108a**, **108b**, 23 µM in PtK2-Zellen; **158a**, **158b**, 41 µM in PtK2-Zellen) und 4-*O*-(Methoxyterephthyl)-collinolacton (**65a**, **65b**, 38 µM in PtK2-Zellen). Durch sterische Effekte lässt sich diese nicht erklären. Des Weiteren haben im Rahmen der Dissertation von Luise Hoffmann^[35a]

getestete Collinolactonbenzoylderivate durchweg eine höhere biologische Aktivität als im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Collinolactonbenzoylanaloga. Dies trifft auch auf die Kontrolle 4-*O-p*-Brombenzoyl-collinolacton (**21a**, **21b**) zu. Gründe hierfür werden in der Diskussion der möglichen biologischen Aktivitäten der Zerfallsprodukte von Collinolactonderivaten analysiert (Kap. 6.7).

Zusammenfassend induziert eine große Anzahl 4-*O*-Collinolactonbenzoylderivate die Bildung monoastraler Phänotypen in PtK2-Zellen. Viele Derivate besitzen außerdem eine hohe Zytotoxizität, wobei eine selektive Zytotoxizität, wie in LUISE HOFFMANN'S Dissertation^[35a] festgestellt, nicht erkannt werden konnte. Collinolactonbenzoyl-ester können somit als Ausgangspunkt zur Entwicklung von an Collinolacton angepasste Spacer zur affinitätschromatographischen Identifikation von an Collinolactonderivate bindenden Proteinen genutzt werden.

6.3.4 4-*O*-Collinolacton-Spacerderivate

In dieser Arbeit synthetisierte 4-*O*-Collinolacton-Spacer-Derivate zeigen eine geringere Zytotoxizität als die meisten 4-*O*-Collinolactonbenzoylderivate. Dies war aufgrund der sterisch anspruchsvollen aliphatischen Seitenketten zu erwarten. 4-*O*-Methylterephthylcollinolacton (**65a**, **65b**, 38 μM in PtK2-Zellen) als erstes untersuchtes Spacerderivat zeigt trotz Abwesenheit dieser Seitenkette nur schwache Zytotoxizität. 4-*O*-Methylglutaryl-collinolacton (**64a**, **64b**, 23 μM in PtK2-Zellen) hingegen gehört zu den Collinolacton-Spacerderivaten mit der höchsten Toxizität. Wie 4-*O*-BHB-Nitrobenzyl-collinolacton (**102a**, **102b**, 33 μM in PtK2-Zellen), welches in geringer Reinheit getestet wurde und wahrscheinlich eine höhere Toxizität besitzt, wurde allerdings auch **64** aufgrund von unzureichendem synthetischen Zugangs nicht weiterverwendet (s. Kap 5.5.3). Die vorhandene Aktivität von **102** legt allerdings eine mögliche Verwendbarkeit des Nitrobenzyl-Linkers ohne bedeutenden Verlust biologischer Aktivität nahe. Unerwarteterweise zeigte auch das optimierte Spacerderivat 4-*O*-HMB-Collinolacton (**131a**, **131b**) keine biologische Aktivität. Dies könnte in der geringeren Flexibilität gegenüber 4-*O*-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**, 25 μM in PtK2-Zellen) begründet

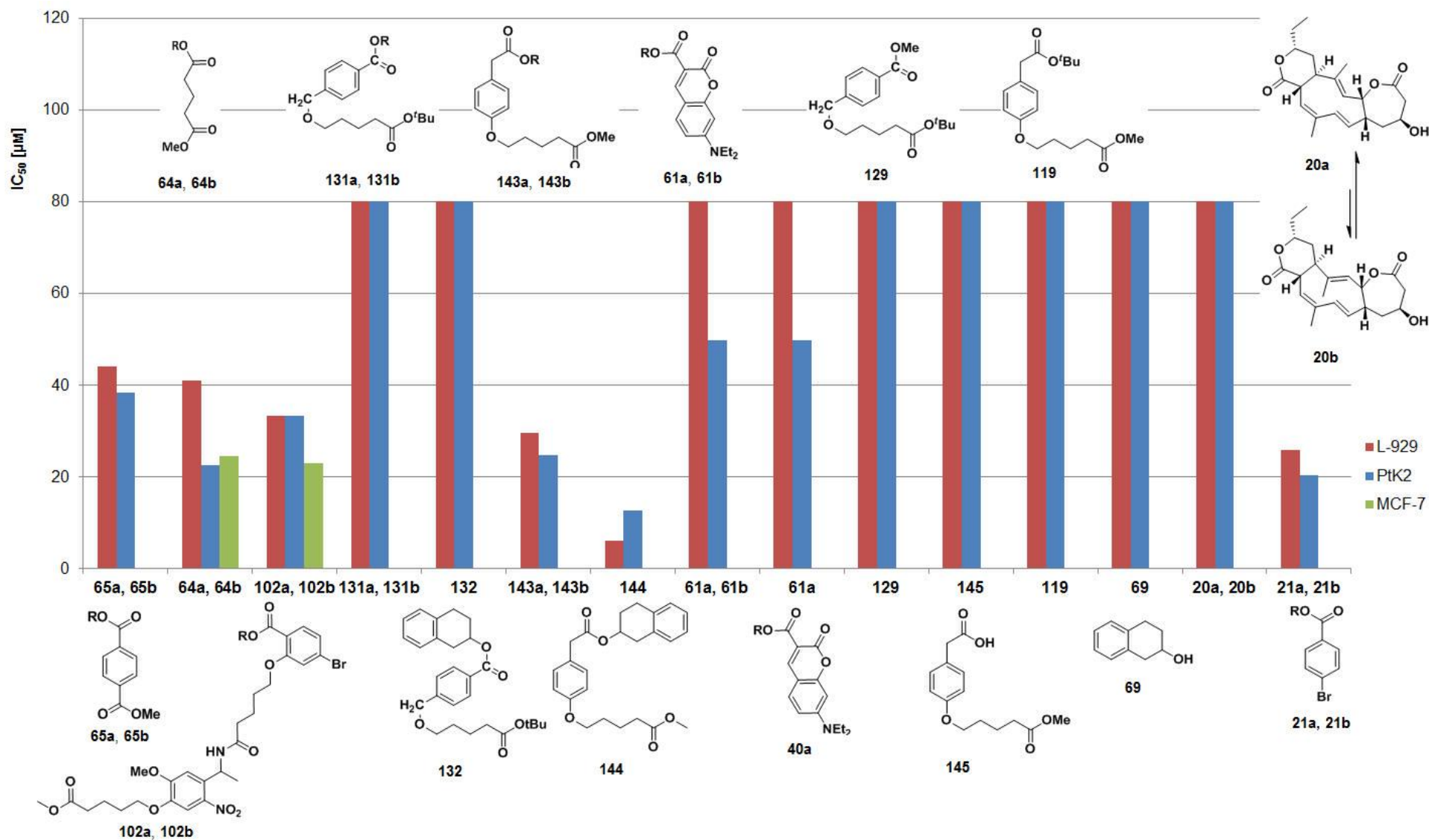
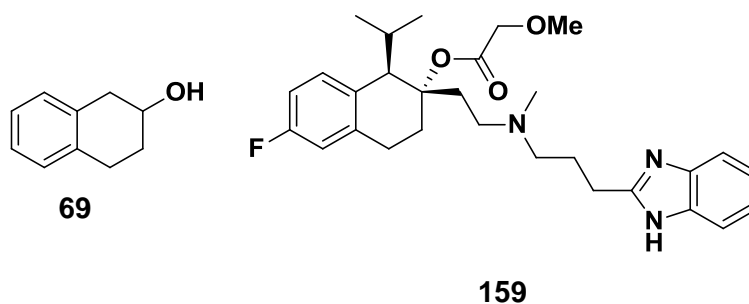


Abb. 46: Zytotoxizität von Collinolacton- und Modellverbindungs-Spacerderivaten sowie Spacerredukten in verschiedenen Zelllinien. **69** wurde kommerziell erworben. Weitere hier aufgeführte Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Hier mit 80 µM angegebene Proben besitzen eine Aktivität von >80 µM.

liegen. Das synthetisch leichter zugängliche Derivat **143** zeigt moderate Zytotoxizität und eine gute Induktion monoastraler Halbspindelbildung in PtK2-Zellen (80% bei 30 µg/mL über Nacht). Der HPE-Spacer scheint daher gut für spätere affinitätschromatographische Untersuchungen geeignet zu sein.

Die im Vergleich stärkere Zytotoxizität des HPE-Esters der Modellverbindung (**144**, 13 µM in PtK2-Zellen) stellt allerdings die Aktivität von **143** in Frage. Eine biologische Aktivität des Spacers selber, konnte durch Untersuchung des freien Spacers (**119**, **142**) widerlegt werden. Es konnte weiterhin Zytotoxizität der Modellverbindung 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**) nachgewiesen werden (15 µg/mL in PtK2-Zellen), aufgrund des geringen Molekulargewichts ist diese jedoch größer als 80 µM. 2-O-HPE-1,2,3,4-Tetrahydronaphthol (**144**) zeigt allerdings keine Bildung monoastraler Halbspindeln. Eine Literaturrecherche ergab, dass verwandte Tetralinderivate nephrotoxische Wirkung in Ratten^[146] besitzen. Derivate von **69** wirken außerdem als Antagonisten von T-Typ Calcium Kanälen, Mibefradil (**159**) wurde beispielsweise bei Hypertonie und Angina Pectoris eingesetzt^[147]. Ebenso zeigt **69** Inhibition von Bakterien der menschlichen Mundhöhle im niedrigen millimolaren Bereich^[148].



1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**) ist daher aufgrund seiner vielseitigen biologischen Aktivität nicht als Modellverbindung für Collinolacton (**20a**, **20b**) geeignet. Die Aktivität von 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**) konnte durch die vorliegenden Daten bestätigt werden. Somit ist der HPE-Spacer für die affinitätschromatographische Identifikation von an Collinolactonderivaten bindenden Proteinen gut geeignet.

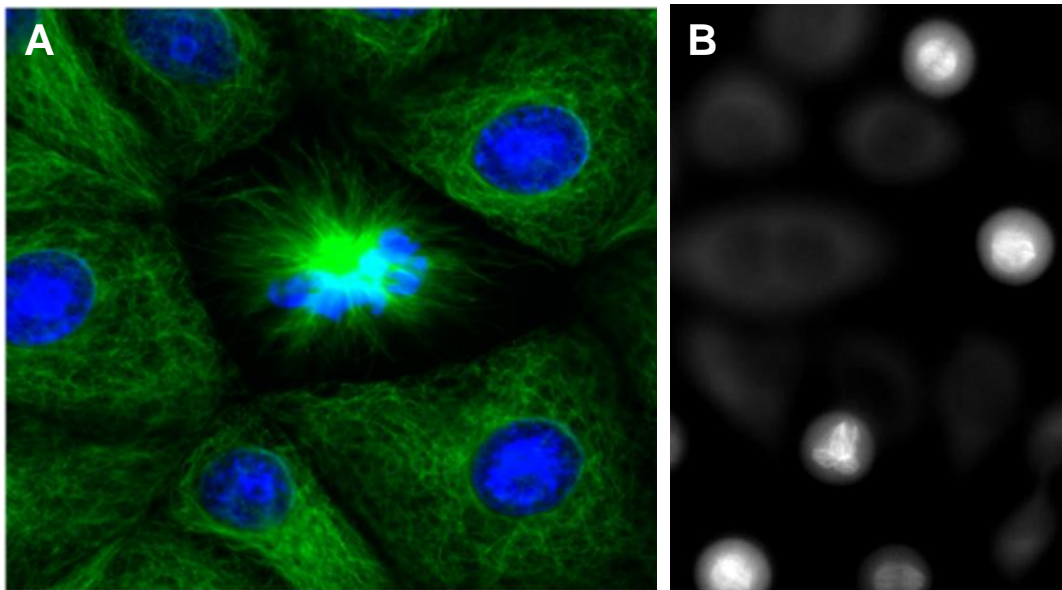


Abb. 47 (A) monoastrale Spindelbildung in PtK2-Zellen nach Inkubation mit 4-O-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**, 30 µg/mL) über Nacht, Mikrotubuli durch Immunofluoreszenz grün, DNA mit DAPI blau. (B) Bildung tetraploider HeLa Zellen im Live-Cell-Imaging nach Inkubation mit 10 µM 4-O-*p*-(Brommethyl)-benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**).

Zu weiteren Untersuchungen der Wirkung von Collinolacton (**20a**, **20b**), 4-O-Benzoyl-collinolacton (**25a**, **25b**), 4-O-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**), 4-O-*p*-(Brommethyl)-benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**) und 4-O-*p*-(Methoxymethyl)benzoyl-collinolacton (**104a**, **104b**) wurde im Arbeitskreis von THOMAS U. MAYER (Universität Konstanz) Live-Cell-Imaging durchgeführt. Es konnte keine Bildung von monoastralen Phänotypen in menschlichen Zervixkarzinomzellen (HeLa) bei einer Endkonzentration von 10 µM nachgewiesen werden. Wurde stattdessen eine Konzentration von 30 µM verwendet, zeigte sich vielfältige Wirkung auf das Mikrotubulinetzwerk wie Bildung multipolarer Spindeln und tetraploide Zellen. In ungefähr der Hälfte der Zellen konnte Zelltod durch Apoptose beobachtet werden. Zytotoxische Wirkung ist also vorhanden. Laut mündlicher Kommunikation des Arbeitskreises T. U. MAYER schließen die vorhandenen Daten eine Wirkung von Collinolactonderivaten auf Kinesin Eg5 aus. Des Weiteren wurde die Inhibition der an Zellzyklusregulation beteiligten Kinase PIK1 untersucht. Kein Collinolactonderivat zeigte hier Aktivität.

6.4 Wirkungen auf das Aktinzytoskelett

In der Arbeitsgruppe von PROF. DR. STEPHAN ZÄHLER wurden Effekte von Collinolactonderivaten auf das Aktinnetzwerk von menschlichen Nabelschnurepithelzellen untersucht. Es konnte die Bildung eines ungewöhnlich verdickten, kortikalen Aktinringes beobachtet werden. Des Weiteren wurde die Wirkung ausgewählter Derivate auf Zellmigration und -proliferation untersucht.

6.4.1 Bildung eines verdickten kortikalen Aktinringes

Untersuchungen des Arbeitskreises von PROF. DR. STEPHAN ZÄHLER konnten nachweisen, dass Collinolactonderivate in menschlichen Nabelschnurepithelzellen eine Verdickung des Zellkortex unter Bildung kortikaler Aktinringe induzieren. In Lungenepithelzellen erhöht dieses Phänomen im Zusammenspiel mit interzellulären Proteinen die Barrierefunktion des Gewebes und erniedrigt die Permeabilität^[149]. Die zur Verdickung führende Signalkaskade wird hier durch die zelluläre Calcium-Konzentration induziert. Diese reguliert ebenfalls die Phagozytose der Zelle. BUSTAMENTE ET AL.^[150] berichten von Effekten extrazellulärer Osmolalität auf das Aktinzytoskelett, durch welche Zellen unter Aktivierung des MAP-Kinase-Weges schrumpfen. Mitogen-activated protein-(MAP)-Kinasen regulieren eine Vielzahl von Mechanismen der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums. Somit ist eine die Wirkung von Collinolactonderivaten sowohl auf Mikrotubuli als auch auf das Aktinzytoskelett ein interessantes Phänomen, welches möglicherweise durch Inhibierung des gleichen Target-Proteines hervorgerufen wird. Sicher ist dies zurzeit nicht, da in Zellen des Arbeitskreises PROF. DR. ZÄHLER keine Bildung monoastraler Halbspindeln beobachtet werden konnte.

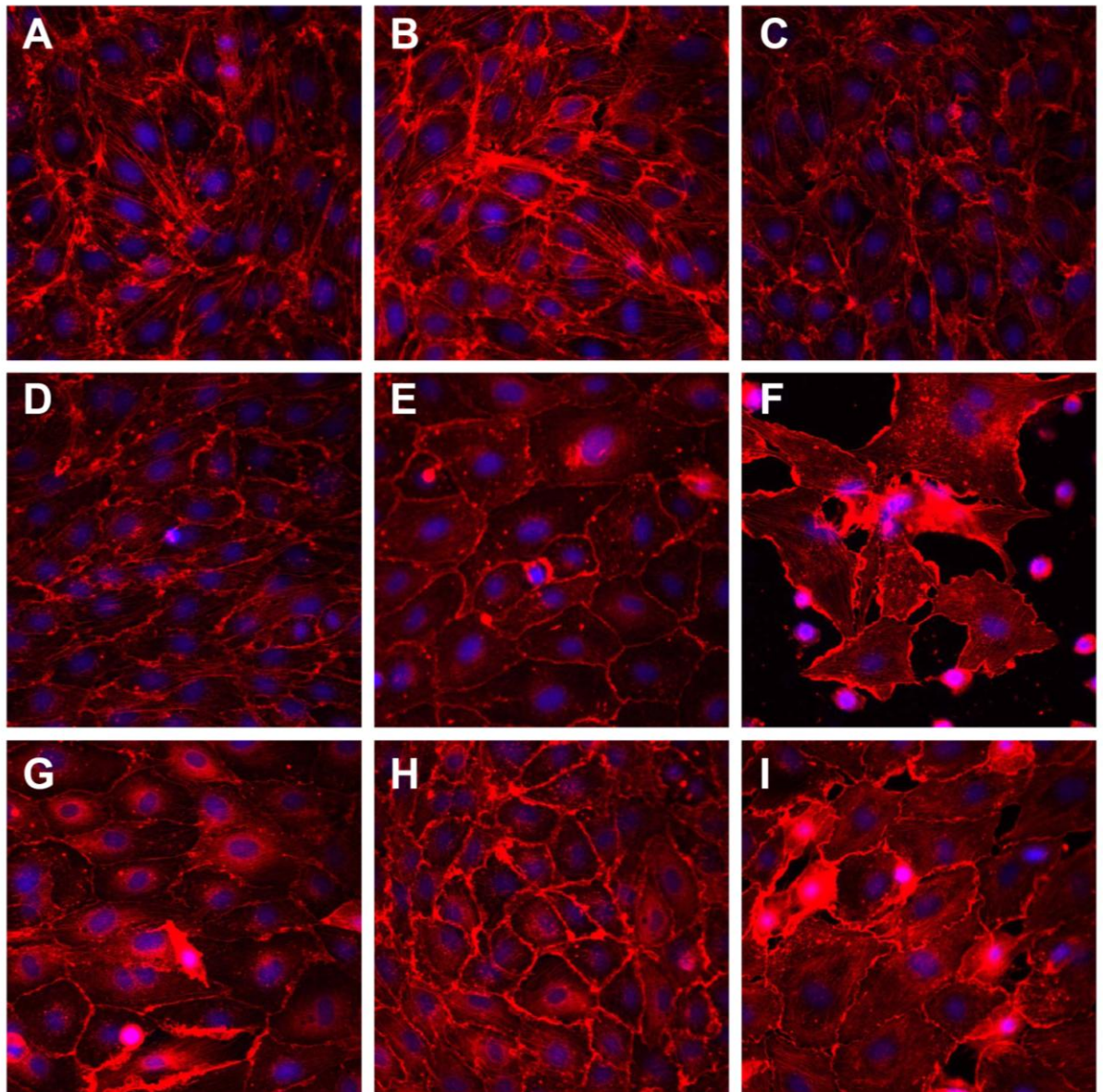


Abb. 48: Bildung eines verdickten kortikalen Aktinringes in menschlichen Nabelschnurepithelzellen nach 24 h Inkubation (A) Kontrolle 1; (B) Kontrolle 2; (C) Collinolacton (**20a**, **20b**); (D) 4-O-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**); (E) 4-O-(*p*-Bromphenylacetyl)-collinolacton (**111a**, **111b**); (F) 4-O-*p*-(Brommethyl)-benzoyl-collinolacton (**105a**, **105b**); (G) 4-O-(*p*-Methoxyphenylacetyl)-collinolacton (**112a**, **112b**); (H) 4-O-(*p*-Chlorbenzoyl)-collinolacton (**109a**, **109b**); (I) 4-O-(*m*-Brombenzoyl)-collinolacton (**110a**, **110b**), Aktinfilamente rot, DNA blau.

6.4.2 Wirkungen auf Zellproliferation und Zellmigration

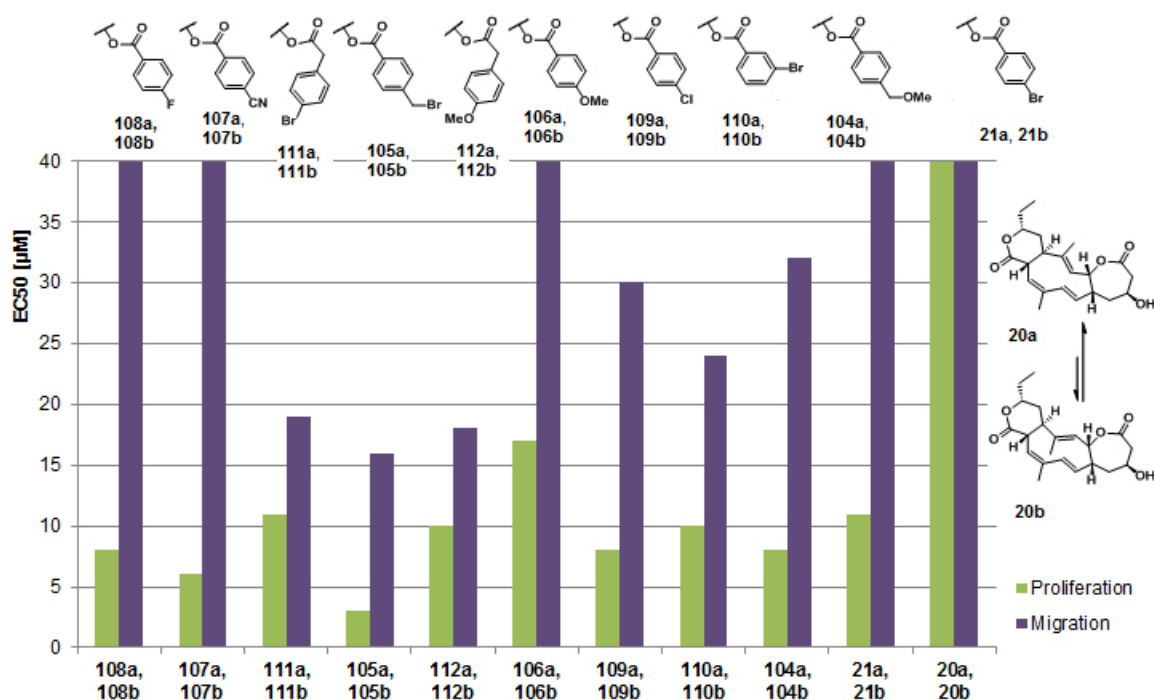


Abb. 49: Proliferations- und Migrationsinhibition von Collinolactonderivaten. Aufgeführte Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Hier mit 40 μM angegebene Proben besitzen eine Aktivität von >40 μM.

Die potentielle Nutzung von Collinolactonderivaten als biochemische Tools zur Erforschung des Zellzyklusses erfordert eine Wirkung auf proliferierende Zellen. In Untersuchungen des Arbeitskreises PROF. DR. ZÄHLER zeigten sämtliche Collinolactonbenzoylderivate der SAR-Studien eine Inhibition der Zellproliferation, Collinolacton (**20a**, **20b**) selbst allerdings nicht (s. Abb. 49). Auch hier besitzt 4-*O*-*p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**, EC₅₀ = 3 μM) die höchste biologische Aktivität. Die bis auf Ausnahmen geringen Unterschiede in der biologischen Aktivität lassen allerdings wenig Auswirkung vorgenommener struktureller Veränderungen vermuten. Für das Target-Fishing entwickelte Collinolacton-Spacerderivate zeigen bis auf 4-*O*-(Methoxyterepharyl)collinolacton (**65a**, **65b**) ebenfalls Inhibition der Proliferation (s. Abb. 50). Analog der Zytotoxizitätswerte (s. Kap. 6.3.4) zeigt 4-*O*-HMB-Collinolacton (**131a**, **131b**, EC₅₀ = 77 μM) überraschenderweise eine sehr geringe Proliferationsinhibition. 4-*O*-HPE-Collinolacton (**143a**, **143b**, EC₅₀ = 15 μM) hingegen zeigt eine vergleichbare Inhibitionswirkung

wie das strukturell verwandte 4-*O*-(*p*-Methoxyphenylacetyl)-collinolacton (**112a**, **112b**, $EC_{50} = 10 \mu\text{M}$). Die zwischen Carboxylfunktion und Phenylring eingeführte Methylengruppe scheint eine größere strukturelle Flexibilität in der Bindungstasche gegenüber einer rigideren Benzoylgruppe zu erlauben.

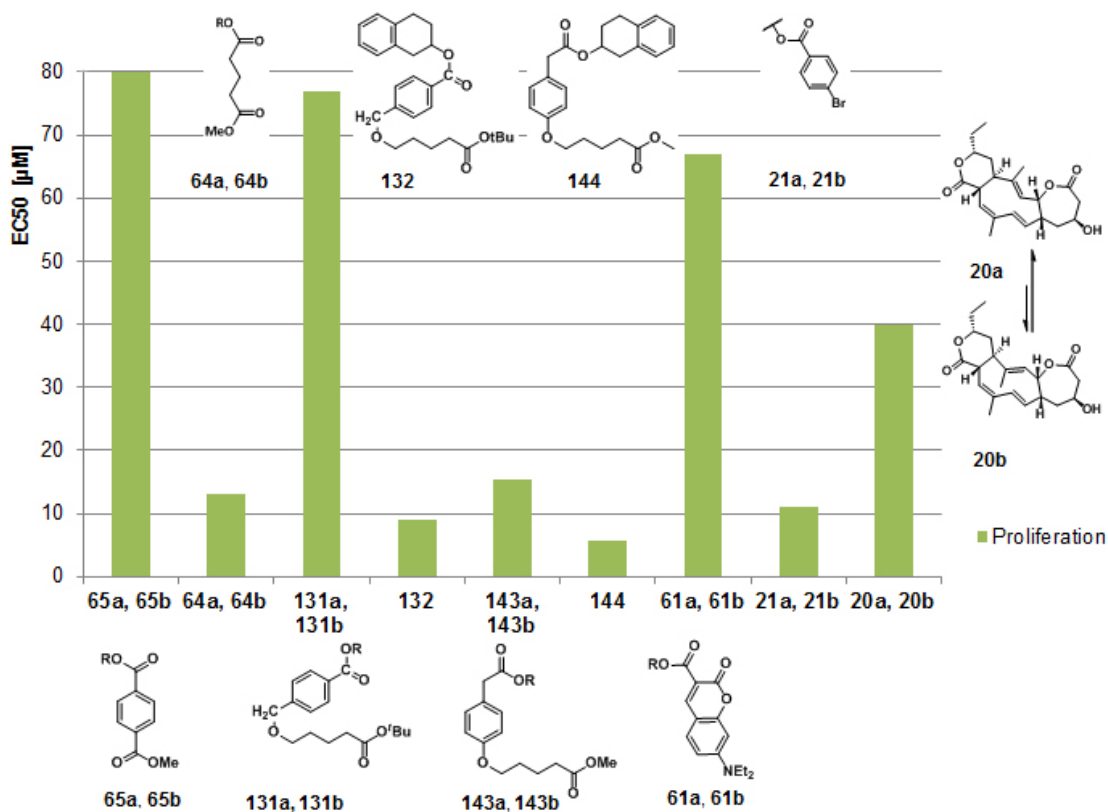


Abb. 50: Proliferationsinhibition durch Collinolacton- und Modellverbindungsderivate. Hier mit $80 \mu\text{M}$ angegebene Proben besitzen eine Aktivität von $>80 \mu\text{M}$. Aufgeführte Derivate wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

Die Mehrheit der untersuchten Collinolactonbenzoylderivate zeigte ebenfalls Inhibition der Zellmigration (s. Abb. 49). Zellmigration wird durch Aktindynamik ermöglicht. Wie erwartet ist daher eine Ähnlichkeit der Aktivitätsverteilung zu der bei kortikaler Aktinringbildung vorhandenen zu sehen. 4-*O*-*p*-Brombenzoyl-collinolacton (**21a**, **21b**) und 4-*O*-*p*-Methoxy-benzoyl-collinolacton (**106a**, **106b**) weisen beispielsweise trotz ausgeprägter Proliferationshemmung ($EC_{50} = 11$ bzw. $17 \mu\text{M}$) nur eine sehr geringe Hemmung der Zellmigration ($EC_{50} > 40 \mu\text{M}$) auf, haben aber ebenfalls nicht zu einer merklichen Verdickung des Zellkortex geführt.

Die 4-O-HPE-Collinolacton-verwandten Derivate **111** ($EC_{50} = 19 \mu\text{M}$) und **112** ($EC_{50} = 18 \mu\text{M}$) wiesen bei einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ eine Migrationsinhibierung von über 75% der Zellen auf. Auch in dieser Untersuchung war 4-O-*p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**, $EC_{50} = 16 \mu\text{M}$) mit einer fast kompletten Inhibierung der Migration das aktivste Derivat. Spacerderivate sind, abgesehen von nicht aktiven Derivaten **64** und **65** (beide $EC_{50} > 40 \mu\text{M}$), zur Zeit noch nicht untersucht worden. Aufgrund fehlender sichtbarer Aktineffekte ist allerdings auch nicht von einer Inhibition der Zellmigration auszugehen. Eine längere aliphatische Seitenkette scheint zur Inhibierung der Zellmigration nicht toleriert zu werden. Dies müsste durch Test weiterer Spacerderivate auf Zellmigration bestätigt werden.

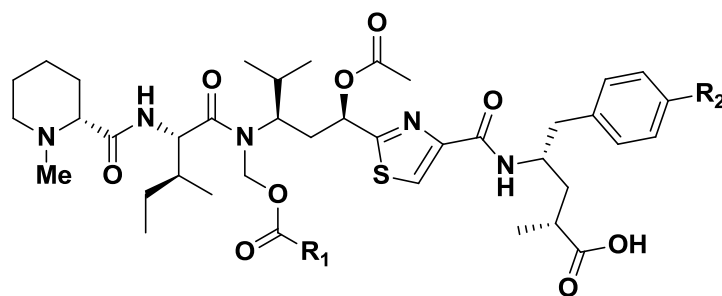
6.5 Untersuchung des Wirkmechanismus

Im Arbeitskreis DR. SASSE wurden mit dem Roche xCELLigence-System Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Collinolactonderivaten durchgeführt. Das xCELLigence-System misst Impedanzsignale von lebenden Zellkulturen und bietet daher eine Label-freie zelluläre Analyse der Effekte von Wirkstoffen^[151]. Die Ergebnisse aller Derivate legen eine Ähnlichkeit zu den Wirkmechanismen von Tubulysin und Griseofulvin nahe, eine Übereinstimmung ist nicht vorhanden (s. Abb. 51). Aus Myxobakterien isolierte Tubulysine wirken ebenfalls auf Mikrotubuli. Tubulysin A (**160a**) führt aufgrund depolymerisierender Wirkung auf Tubulin zu einem kompletten Verschwinden der Mikrotubulinetzwerkes, während das picomolar aktive Tubulysin D (**160b**) multipolare Spindeln induziert^[152]. Ähnliche Phänomene konnten ebenfalls bei Untersuchungen von Collinolactonderivaten im Arbeitskreis PROF T. U. MAYER festgestellt werden. (**160** zeigt ebenfalls Auswirkungen auf das Aktinskelett, welche aber wahrscheinlich ein Produkt des Verschwindens des Mikrotubulinetzwerkes sind^[153]. Bindungsort von Tubulysinen ist die Peptid-Site der Vinca-Domäne von β -Tubulin^[154].

Griseofulvin (**161**) bindet an zwei verschiedene Stellen von Tubulin und unterbindet so die zur Funktionsweise nötige dynamische Instabilität der Mikrotubuli. Es können daher unter Einwirkung von **161** fehlerhaft kondensierte oder ausgerich-

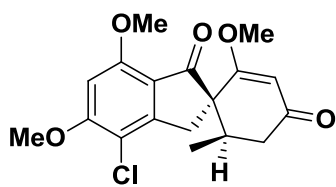
tete Chromosomen sowie multipolare Spindeln beobachtet werden^[155]. Inkubation mit 4-*O-p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**) zeigte ebenfalls einen Nocodazol (**162**) ähnlichen Wirkmechanismus. **162** bindet an die Vinca-Bindungsstelle von Tubulin. Im Arbeitskreis T. U. MAYER zeigte von LUISE HOFFMANN synthetisiertes 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**25a**, **25b**) zwar depolymerisierende Wirkung in einem Tubulinassay, ein Nocodazol-ähnlicher Mechanismus konnte aber nicht bestätigt werden.

Somit belegen diese Untersuchungen Wirkung von Collinolactonderivaten auf das Mikrotubulinetzwerk, können aber keinen genauen Wirkmechanismus vorschlagen. Sämtliche in xCELLigence-Messungen identifizierte Wirkstoffe mit ähnlichem Wirkmechanismus zeigen jedoch Interaktion mit Tubulin.

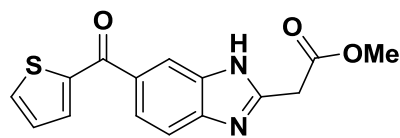


160a R₁= *i*Bu R₂= OH

160b R₁= *i*Bu R₂= H



161



162

Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) und biologischer Aktivität

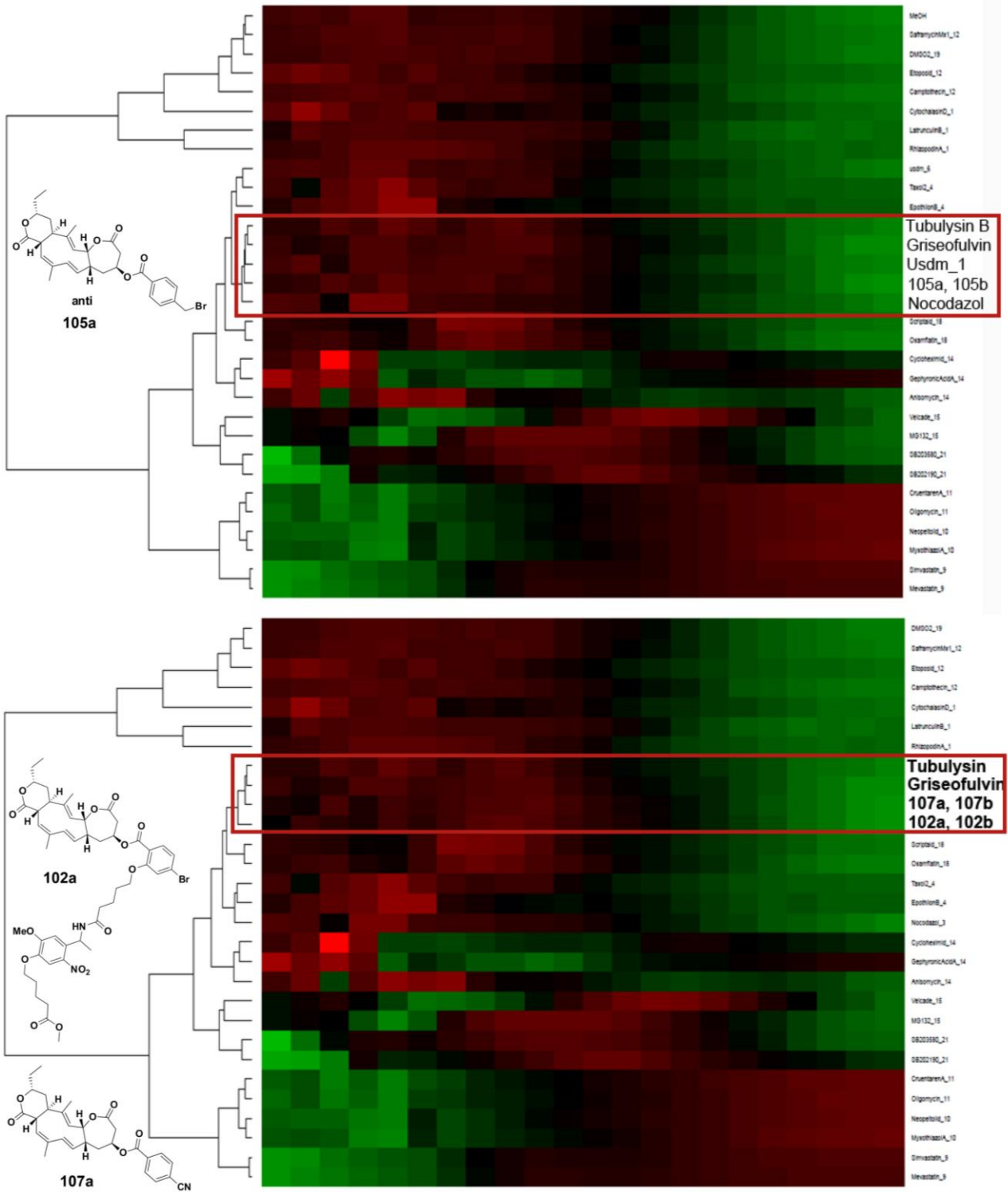


Abb. 51: xCELLigence Untersuchungen des Wirkmechanismus von Collinolactonderivaten **105**, **102** und **107**. Zeitabhängige Impedanzmessungen der mit Wirkstoffen inkubierten Zellkulturen werden in Heatmaps verglichen. Ein ähnlicher zeitlicher Impedanzverlauf deutet auf ähnliche zelluläre Targets von Wirkstoffen hin.

6.6 Weitere Untersuchungen zur biologischen Aktivität

In weiteren Untersuchungen wurde am Swiss Tropical Institute (Basel) die Wirkung von Collinolactonderivaten auf die tropische Krankheitserreger *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900, Trypomastigoten), *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen C4, Amastigoten), *Leishmania donovani* (MHOM-ET-671L82, Amastigoten) und *Plasmodium falciparum* (K1, IEF) untersucht und die Zytotoxizität der Derivate an Skelettmuskelzellen von Ratten (L6) bestimmt (s. Tab. 1).

	T. b. rhod. IC ₅₀ [µg/mL]	T. cruzi IC ₅₀ [µg/mL]	L. don. axen. IC ₅₀ [µg/mL]	P. Falc. K1 IC ₅₀ [µg/mL]	Zytotoxizität IC ₅₀ [µg/mL]
Collinolacton(20a,20b)	2,75	18,73	9,89	3,96	13,64
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)- collinolacton(21a,21b)	1,97	36,32	3,41	4,18	38,84
Kontrolle	0,003	0,0316	0,206	0,072	0,005
verw. Kontrolle	Melarsoprol	Benznidazol	Miltefosin	Chloroquin	Podophyllotoxin

Tabelle 3: Wirkung von Collinolactonderivaten auf tropische Krankheitserreger.

Die getesteten Collinolactonproben **20** und **21** haben eine deutlich geringere Aktivität gegen tropische Krankheitserreger als vorhandene Wirkstoffe, zeigen allerdings erstmals Aktivität gegen Einzeller. Diese Ergebnisse sind besonders interessant, wenn man die Wirkung von Collinolactonderivaten auf Mikrotubuli und Aktinzytoskelett bedenkt. Sowohl Trypanosomen als auch Leishmanien besitzen Geißeln zur Fortbewegung, welche aus Mikrotubuli bestehen. Diese spielen in *T. brucei* eine essentielle Rolle in Morphogenese, der ungewöhnlichen Zellteilung und Umgehung des Immunsystems des Wirtsorganismuses^[156]. Plasmodien wiederum tragen nur während der kurzen Phase als Mikrogameten eine Geißel. Infektiöse Formen in Mücken wie Sporozoiten und Ookineten zeichnen sich allerdings durch ihre amöbiode Form aus, in welcher Actomyosin Motoren für Gleiten der Plasmodienzellen und Invasion der Wirtszellen verantwortlich sind^[157]. Collinolacton (**20a, 20b**) und 4-O-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a, 21b**)

zeigen in humanen Nabelschnurepithelzellen allerdings nur geringe Migrationsinhibition, was eher auf eine Interaktion mit dem Mikrotubulinetzwerk während der Zellteilung von *P. falciparum* deuten könnte. Andere Collinolactonderivate wie 4-O-*p*-(Brommethyl)benzoyl-collinolacton (**105a**, **105b**) zeigten aber in Untersuchungen von PROF. DR. ZÄHLER deutliche Einflüsse auf Zellmigration. Es wäre daher möglich, dass diese *P. falciparum* deutlich stärker inhibieren als **20** und **21**.

Aus zwei weiteren Gründen sind diese Daten besonders interessant. Erstens zeigt Collinolacton (**20a**, **20b**) erstmals biologische Aktivität. In keiner weiteren Zelllinie konnte bisher Zytotoxizität festgestellt werden. Sollte **20** wirklich in *P. falciparum* durch Inhibition der Zellmigration wirken, so besteht die Möglichkeit dass **20** auch in Amöben wirkt. Daher könnten *Streptomyces sp.* Gö40/10 und Tü1892 Collinolacton (**20a**, **20b**) produzieren, um sich vor im Boden häufig vorkommenden bakteriovoren Amöben zu schützen. Dies muss in künftigen Arbeiten durch biologische Tests untersucht werden.

Zweitens zielen bisherige medikamentöse Therapien von Plasmodien und Leishmanien fast ausschließlich auf verschiedene spezifische Stoffwechselfvorgänge der Erreger ab oder interferieren mit der Zellmembran. Zellteilung oder Zellmigration sind bisher nicht genutzte Targets. Nur in Leishmanien zeigen DNA-Topoisomerase II-Hemmer (z.B. Ciprofloxacin, Valrubicin) und mit Tubulin interagierende Medikamente wie Vinorelbin oder Vincristin Wirkung^[158], werden aber nicht eingesetzt oder haben nur temporären, reversiblen Effekt^[159]. Die geringe Nutzung von Targets der Zellteilung und -migration ist wahrscheinlich in der geringen Erregerspezifität und Nebenwirkungen der zytotoxischen Wirkstoffe zu suchen. Gerade heute in der Behandlung von Trypanosomen verfügbare Medikamente zeigen jedoch oft ebenfalls hohe Toxizität^[160]. Auch Collinolactonderivate zeigen Zytotoxizität, könnten aber durch Identifikation eines neuen Targets zu der Suche nach neuen, weniger toxischen Wirkstoffen einen wichtigen Beitrag leisten.

Untersuchungen im Arbeitskreis von PROF. DR. ELKE DITTMANN (Universität Potsdam) zur Wirkung von Collinolacton (**20a**, **20b**) und 4-O-(*p*-Brombenzoyl)-collinolacton (**21a**, **21b**) auf Cyanobakterien konnten keinen Effekt der getesteten

Substanzen nachweisen. Dies unterstreicht erneut, dass Collinolactonderivate nur in eukaryotischen Zellen Wirkung zeigen.

6.7 Diskussion der Aktivität von Collinolactonabbauprodukten

Die Interpretation der Struktur-Wirkungsbeziehungen von Collinolactonderivaten wirft derzeit noch einige Fragen auf. Bei im Rahmen der Zulassungsarbeit von Nina Fetzer^[45] synthetisierten Collinolactonderivate mit langkettigen aliphatischen Resten wurden ungewöhnliche Tendenzen in den SAR-Untersuchungen der biologischen Aktivität beobachtet. Zeigen 4-*O*-2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-Perfluorononylcollinolacton (**154a**, **154b**) und 4-*O*-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-succinylcollinolacton (**28a**, **28b**) hohe Zytotoxizität, so konnte bei Derivaten 4-*O*-2*H*,2*H*,3*H*,3*H*-Perfluorundecanylcollinolacton (**156a**, **156b**) und 4-*O*-Stearylcollinolacton (**155a**, **155b**) nur sehr geringe bis nicht messbare Zytotoxizität festgestellt werden.

Collinolacton (**20a**, **20b**) selbst zeigte in Untersuchungen in menschlichen (HM02, HepG2, MCF7, HeLa) sowie tierischen Zellen (PtK2, BSC1, L929) keine biologische Aktivität, Untersuchungen in Skelettmuskelzellen von Ratten (L6) zeigten jedoch Zytotoxizität. Vergleicht man des Weiteren die im MTT-Assay ermittelte Zytotoxizität von verschiedenen Proben 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**, s. Abb. 52), so stellt man hier signifikante Unterschiede fest. Auch die verhältnismäßig niedrige Zytotoxizität von fluorierten Collinolactonbenzoylderivaten gibt Rätsel auf.

Es besteht daher die Möglichkeit, dass nicht Collinolactonester biologische Aktivität zeigen, sondern die gesamte biologische Aktivität oder nur Teile hiervon durch Abbaureaktionen von Collinolacton hervorgerufen wird. Unterschiedliche Aktivitäten ließen sich durch ungleichen Abbau unterschiedlicher Derivate unter gegebenen Bedingungen erklären. So kann eine Abbaureaktion entweder vor Beginn der Untersuchung, während Transport und Lagerung, aufgetreten sein oder durch physiologische Bedingungen der Zelle. In der Tat zeigen Collinolactonderivate bei längerem Stehen in Lösung bei Raumtemperatur bisher nicht näher identifizierte Abbaureaktionen, möglicherweise oxidativ entstandene Umlagerungsprodukte

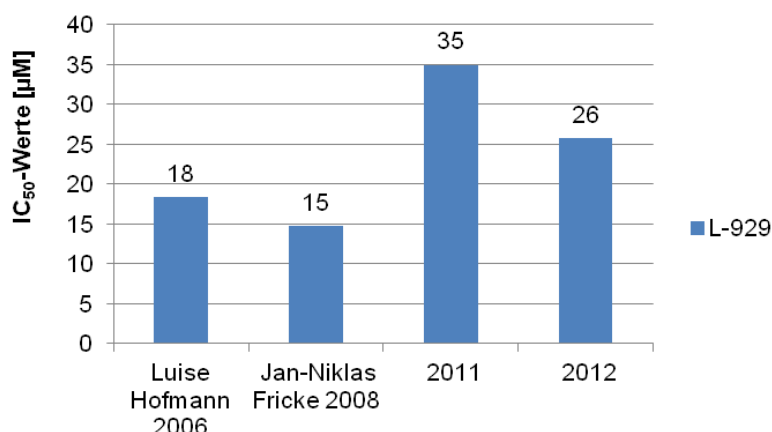


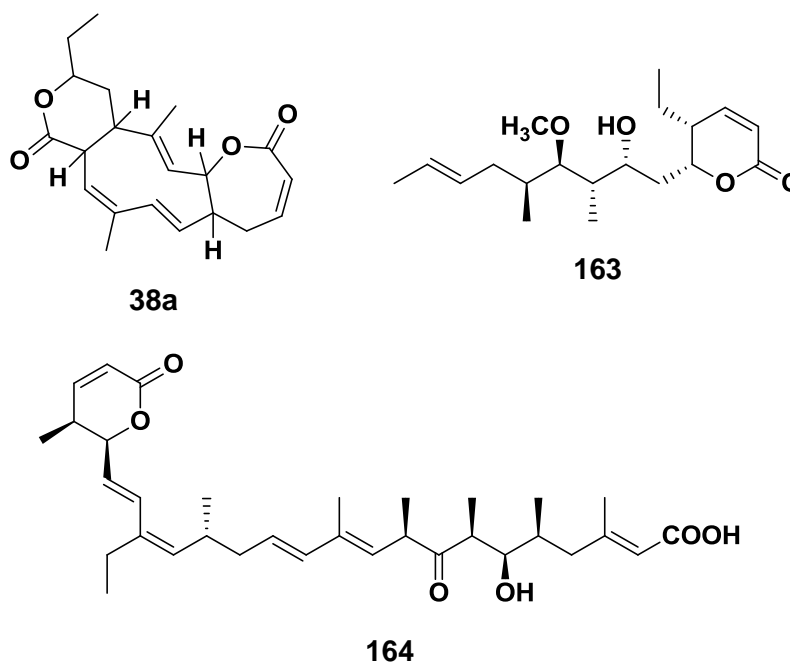
Abb. 52: Zytotoxizität verschiedener Proben 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**) in L-929-Zellen.

von **20** (s. Kap. 4.1), diese traten bei -20°C allerdings nicht auf, ebensowenig im Feststoff. Lagerung und Transport erfolgten bei -20°C, sodass Abbaureaktionen vor Beginn der Untersuchungen sehr unwahrscheinlich sind.

Eine intrazelluläre Metabolisierung ist hingegen denkbar. Collinolactonderivate wären somit Pro-Drugs, die das aktive Prinzip erst in der Zelle freisetzen. Die Freisetzung erfolgt unter den physiologischen Bedingungen der Zelle entweder unspezifisch oder spezifisch durch Enzymkatalyse. Im katalysierten Fall würde die biologische Aktivität der Derivate damit durch unterschiedliche Substrateignung für metabolisierende Enzyme erklärt werden.

Isolierte Derivate, deren Cyclodecatrienring nach Oxidation durch eine perizyklischen Reaktion zu einem bizyklischen System umgelagert wurde (**151**, **152**), zeigen keine biologische Aktivität, ein Beitrag dieser Oxidationsprodukte zur Zytotoxizität ist daher ausgeschlossen. Ein weiterer möglicher Zerfall wäre die Eliminierung zu Collinolactenon (**38a**, **38b**), welcher bereits im Rahmen dieser Arbeit erstmals selektiv hergestellt werden konnte. Literaturbekannte Wirkstoffe mit α,β -ungesättigtem Lactonring binden über eine Michael-Reaktion kovalent an ihre Targets und zeigen vielfältige Einflüsse auf den Zellzyklus. Leptomycin B (**163**) aus *Streptomyces* sp. AT51287 bindet an Cys529 des Proteins Exportin 1 (CRM1) und inhibiert so den durch Erkennung der leucinreichen nuclear export sequence (LR-NES) vermittelten Austritt von Proteinen aus dem Zellkern^[161].

NESs wurden in mehr als 300 Proteinen entdeckt^[162], unter ihnen Transkriptionsfaktoren^[163], Zell Zyklus Regulatoren^[164], Ribonucleoprotein Komplexe^[165], Translationsfaktoren^[166] und virale Proteine^[167]. Pironetin (**164**) aus *Streptomyces prunicolor* PA-4815 zeigt selektive Bindung an Lys352 des α -Tubulin und hemmt so die Bildung von Mikrotubuli, was die Zelle in der Metaphase des Zellzyklusses festhält^[168]. Sowohl in Biosynthese^[169] als auch in Synthese^[170] dieser Naturstoffe wird allerdings der α,β -ungesättigtem Lactonring durch eine finale Lactonisierung, nicht durch Elimination hergestellt.



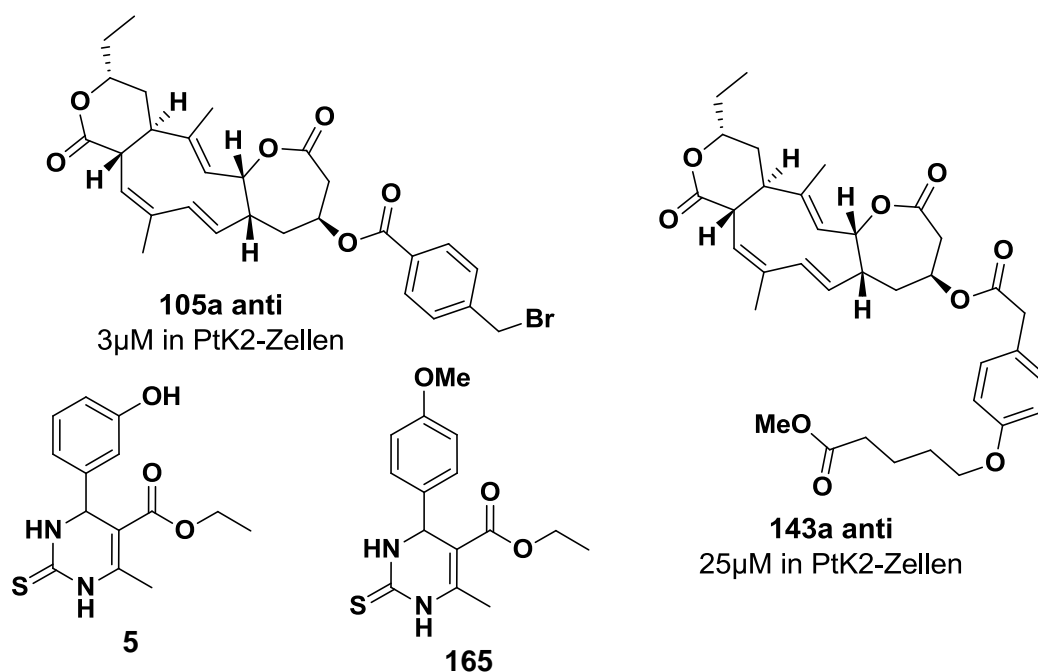
Semisynthetisch hergestelltes Collinolactenon (**38a**, **38b**) zeigte in Untersuchungen der Kooperationspartner eine hohe Zytotoxizität, allerdings etwas niedriger als 4-*O*-*p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**). Es wurde ebenfalls die Bildung monoastraler Halbspindeln in PtK2-Zellen beobachtet (52% der Zellen), auch hier in geringerer Häufigkeit als bei 4-*O*-HPE-collinolacton (**143a**, **143b**, 80% der Zellen). Untersuchungen der Wirkung auf das Aktinskelett werden zurzeit im Arbeitskreis von PROF. DR. ZHALER durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von **38** möglicherweise zur biologischen Aktivität beiträgt. Sie muss in weiteren Untersuchungen wie auch dem geplanten Targetprotein-Fishing berücksichtigt werden (s. Kap. 5.7.8).

HPLC/HR-MS-Untersuchungen einer mit Bortrifluorid-Etherat in DCM behandelten Collinolactonprobe zeigen allerdings die Bildung einer Vielzahl weiterer Zerfallsprodukte. Es ist in zukünftigen Arbeiten zu überprüfen, ob Collinolactenon (**38a**, **38b**) als einziges Abbauprodukt zur biologischen Aktivität beiträgt.

6.8 Zusammenfassung der zellbiologischen Phänomene durch Collinolactonderivate

Collinolactoderivate induzieren vielfältige, in der Forschung aktuelle zellbiologische Phänomene in eukaryotischen Zellen. Es konnten bisher keine Einflüsse auf Pilz oder Hefezellen nachgewiesen werden. In Zellen höherer Eukaryoten wurden nach Inkubation mit Collinolactonderivaten (**104-112**, **143**) monoastrale Halbspindelbindung sowie die Bildung eines verdickten, kortikalen Aktinringes festgestellt. Ebenfalls konnte Zytotoxizität (L929, MCF7, PtK2-Zellen) sowie Zellproliferations- und Zellmigrationsinhibierung (humane Nabelschnur-Epithelzellen) beobachtet werden.

Für Induktion von monoastralen Phänotypen und Bildung eines kortikalen Aktinringes ist eine Veresterung von Collinolacton (**20a**, **20b**) notwendig, abgesehen von Collinolactenon (**38a**, **38b**) zeigen nur veresterte Derivate zelluläre Effekte. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein intakter Zyklodecatrienring für biologische Aktivität notwendig ist. Betrachtet man Zytotoxizität von Collinolactonestern, so scheint generell ein aliphatischer oder aromatischer Rest des sterischen Anspruchs eines p-Brombenzoylrests gut toleriert zu werden, der größere Cumarinring hingegen führt zu Verlust der biologischen Aktivität. Derivate mit langkettigen aliphatischen Resten zeigen keine einheitliche Zytotoxizität (L929, MCF7, PtK2-Zellen). Generell scheint sich vorhandene Flexibilität bei sterisch anspruchsvolleren Derivaten vorteilhaft auszuwirken, wie sich in der biologischen Aktivität von 4-O-HMB-(**131a**, **131b**)- und 4-O-HPE-collinolacton (**143a**, **143b**) zeigt. Die Bildung monoastraler Halbspindeln, wie auch die Inhibition der Zellproliferation scheinen einem ähnlichen Trend zu folgen, wobei auch hier Unterschiede zwischen sterisch ähnlichen Derivaten ohne Informationen über die Bindungstasche nicht erklärt werden können.

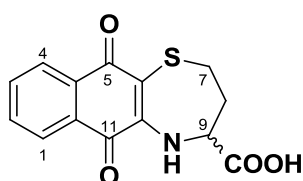
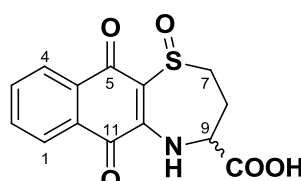


Wirkungen auf das Aktinskelett, wie auch auf die Zellmigration treten allgemein erst bei höheren Konzentrationen im Vergleich zu Mikrotubulieffekten auf und zeigen andere Regelmäßigkeiten. Die Einführung größerer Reste, wie in Spacerderivaten führt zu einem Verlust der biologischen Aktivität. Große Unterschiede zwischen sterisch sehr ähnlichen Derivaten, wie wenig aktivem 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**21a**, **21b**) und sehr aktivem 4-*O-p*-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**) lassen sich ohne Kenntnis der Bindungstasche nicht erklären. Dass kleine sterische Veränderungen große Änderungen in biologischer Aktivität zur Folge haben können, zeigten schon T. U. MAYER ET AL.^[10] in Untersuchungen von an Kinesin Eg5-bindendem Monastrol (**5**). Das strukturell sehr ähnliche DHP2 (**165**) zeigte bis 200 µM keinen signifikanten Einfluss auf Eg5-vermittelte Microtubuli-Motilität.

Zusammenfassend scheinen eventuell zwei oder mehrere verschiedene Effekte vorzuliegen. Zur weiteren Erklärung der vorhandenen Phänomene ist die Identifikation der Targetproteine von Collinolactonderivaten notwendig. Hierbei muss die eventuelle Bildung aktiver Collinolactonzerfallsprodukte berücksichtigt werden. Weiterhin sollte zur Aufklärung der Wirkung von Collinolacton (**20a**, **20b**) selbst der Einfluss auf Amöben getestet werden.

7 Synthese von oxidierten Derivaten des Naturstoffes Brevinsäure (22, 169)

FRANK SURUP isolierte im Rahmen des BMBF-geförderten Metagenom-Projekts „Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden“ erstmals ein oxidiertes Derivat des Naturstoffes Brevinsäure (**22**)^[37]. Ziel des Projektes war es, in Cosmid- bzw. Bacterial Artificial Chromosome (BAC)-Banken erfasste Gene bisher unkultivierter Bakterien heterolog in Wirtsstämmen zu exprimieren. Die Isolierung neuer, biologisch aktiver Naturstoffe aus diesen Stämmen sollte die Anwendbarkeit der verfolgten Metagenomstrategie beweisen. Der Brevinsäure (**22**) produzierende Klon *E. coli* EPI100 M49.K9 fiel in einen Overlayexperiment durch eine Hemmung von *B. subtilis* auf. Brevinsäure und seine Strukturverwandten sind als Naturstoffe aus *Brevibacterium flavum* und *B. lactofermentum* bzw. *Corynebacterium acetoacidophilum*, *C. glutamicum* und *C. glycinophilum* beschrieben und ebenfalls als synthetische Farbstoffe bekannt^[171]. Das wahrscheinlich oxidativ während der chromatographischen Aufreinigung an Kieselgel entstandene Brevinsäuresulfoxid (**23**) zeigte anders als Brevinsäure in Plattendiffusionstests Hemmung von *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, und *Candida albicans*. FRANK SURUP konnte eine Synthese von **22** und **23** vorschlagen^[37].

**22****23**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zur Untersuchung weiterer Struktur-Wirkungsbeziehungen synthetisch oxidierte Derivate der racemischen DL- sowie der enantiomerenreinen L-Brevinsäure hergestellt und deren biologische Aktivität in Kooperation getestet werden.

7.1 Synthese, Stabilität und Chromatographie

Die Synthese von DL- bzw. L-Brevinsäure (**22**) erfolgte nach F. SURUP^[37] aus DL-Homocystein (**166**) und 2,3-Dichloro-1,4-naphtochinon (**167**). Es konnte eine beschleunigte Aufreinigung mittels Kieselgel-SPE neu etabliert werden. Brevinsäuresulfoxid (**23**) wurde ebenfalls nach F. SURUP hergestellt, als Lösungsmittel wurde statt Essigsäure Methanol verwendet.

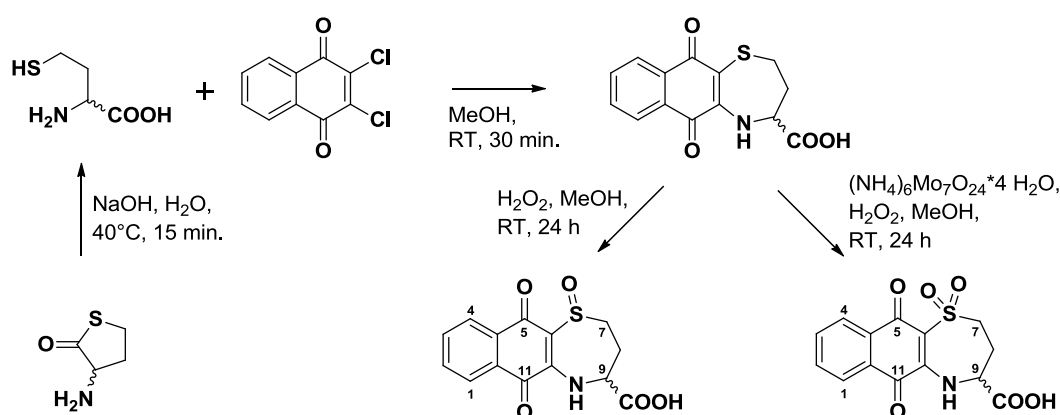


Abb. 53: Syntheseweg zu oxidierten Brevinsäurederivaten **23** und **168**.

Versuche von FRANK SURUP zur Herstellung von Brevinsäuresulfon (**169**) durch Erhitzen des für **23** verwendeten Ansatzes auf 80°C waren nicht erfolgreich^[37]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher Wasserstoffperoxid in Kombination mit verschiedenen Oxidationsvermittlern eingesetzt. Eine Fülle Katalysatoren zur Herstellung von Sulfonen aus Sulfiden ist literaturbeschrieben^[172]. Aus Gründen der schnellen Verfügbarkeit wurden erste Versuche der Oxidation von Brevinsäure (**22**) mit 2.5 Äquivalenten Natriumpercarbonat durchgeführt, welches in situ aus Natriumcarbonat und Wasserstoffperoxid generiert wird^[173]. Dünnschichtchromatographisch besonders auffällig war die Bildung einer deutlich unpolaren, hellgelben Substanz. In massenspektrometrischen Untersuchungen konnte neben unidentifizierten Nebenprodukten allerdings nur die Bildung eines monooxidierten Brevinsäurederivats festgestellt werden, welches nicht weiter charakterisiert wurde. Auch ein Wechsel auf das als deutlich reaktiver beschriebene Natriumperborat^[174] in Essigsäure bei Temperaturen zwischen 50-80°C lieferte mehrere Pro-

dukte verschiedener Brauntöne. Keines konnte massenspektrometrisch als Brevinsäuresulfon (**169**) identifiziert werden. Sulfoxide und Sulfone mit β -ständigem Wasserstoffatom und elektronenziehender Gruppe in Nachbarschaft sind weiterhin als hitzelabil beschrieben, was synthetisch beispielsweise in der Synthese α,β -ungesättigter Systeme genutzt wird^[175]. Die Bildung eines Michael-Systems unter Sulfoxid- oder Sulfoneliminierung ist in oxidierten Brevinsäurederivaten nicht direkt möglich. In weiteren Syntheseansätzen wurde trotzdem auf eine Erwärmung verzichtet. Die nach Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen waren noch immer stark verunreinigt. Es konnte daher keine nähere Untersuchung der sehr uneinheitlichen Reaktionsprodukte erfolgen.

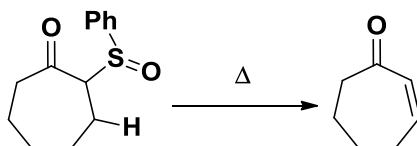


Abb. 54: Literaturbekannte Eliminierung von Sulfoxiden mit β -ständigem Wasserstoffatom und elektronenziehender Gruppe in Nachbarschaft^[175].

Die Verwendung von Wasserstoffperoxid und katalytischen Mengen Ammoniummolybdat bei Raumtemperatur^[176] lieferte schließlich das hellgelbe Brevinsäuresulfon (**169**) mit nur geringer Menge Nebenprodukt. **169** ist im Gegensatz zu Brevinsäuresulfoxid (**23**) nur mäßig löslich in Methanol, gut dagegen in Aceton.

Präparative Chromatographie von Brevinsäuresulfoxid (23) und Brevinsäuresulfon (169)

Die Aufreinigung der oxidierten Brevinsäurederivate **23** und **169** für biologische Tests erwies sich als unerwartet schwierig. Es wurde dünnschichtchromatographisch ein starkes Schleifen der Produktbanden festgestellt, was durch Wechsel des Lösungsmittelgemisches auf Chloroform/Methanol (6:4) mit 0.05 % Ameisensäure unterbunden wurde. Dieses Lösungsmittelsystem konnte jedoch keine vollständige Aufreinigung von Brevinsäuresulfoxid (**23**) oder Brevinsäuresulfon (**169**) gewährleisten. Es wurden nach Säulenchromatographie Nebenprodukte mit deutlich unterschiedlichem R_f -Wert beobachtet, hierbei handelte es sich scheinbar um

Zerfallsprodukte. Weitere Optimierungsversuche scheiterten an der geringen Löslichkeit von **23** und **169** in unpolaren Lösungsmitteln wie Cyclohexan oder Toluol oder an zu geringer Elutionskraft der Gemische.

Eine HPLC-Aufreinigung erwies sich ebenfalls als sehr schwierig. Geeignete Säulen zur Aufreinigung der polaren Brevinsäurederivate **23** und **169** sind Nucleosil C8 und Nucleodur Sphinx RP. Um eine Retention zu erhalten musste 0.05% Ameisensäure zugesetzt und ein geringer Anteil an organischem Lösungsmittel verwendet werden. Die geringe Löslichkeit von **23** und **169** in wässrigen Lösungen führte in semipräparativer HPLC besonders bei **23** zu Präzipitation und Verstopfen der Säule, Methanol und Acetonitril konnten hier somit nicht verwendet werden. Ein Wechsel auf Aceton verbesserte besonders die Löslichkeit von **169**. Zur weiteren Vermeidung von Präzipitation im Auftragsventil oder dem Säulenkopf wurde die Probe in DMSO injiziert. Trotz dieser Optimierungen zeigten Fraktionen nach HPLC-Aufreinigung weitaus mehr Nebenprodukte als vor der Aufreinigung. Die Reinjektion einer HPLC-Fraktion unter identischen Bedingungen der Aufreinigung (s. Abb. 55B) zeigte mehrere UV-Signale von Substanzen bei früherer Retentionszeit und kein UV-Signal bei der Retentionszeit der isolierten Fraktion. Eine LC/MS-Analyse der gleichen Fraktion (s. Abb. 55C) mit einem anderen Programm zeigte eine Vielzahl verschiedener Substanzen. Es konnte ein breites Signal der Molmasse 274.7 g/mol identifiziert werden, sowie vier weitere der Molmassen 306.7, 320.8, 292.9 und 322.9 g/mol. Eine weitere Aufklärung mittels NMR ist aufgrund von Zerfall nicht möglich.

Der Zerfall oxidierter Brevinsäurederivate unter HPLC-Bedingungen ist somit bewiesen. Ein Grund könnte die verwendete Säure sein. OSTERMAYER und TARBELL berichten säureinduzierten Zerfall von S-Methyl-L-cysteinsulfoxid^[177]. Ebenfalls denkbar in Anwesenheit von Säure ist ein Bruch der C-S-Bindung zum Benzochinon durch Eliminierung der guten Sulfoxid- oder Sulfonabgangsgruppen. Ohne Verwendung von Säure konnte jedoch keine Retention von **23** und **169** erreicht werden. Unter neutralen oder basischen Bedingungen könnte außerdem ein nucleophiler Austausch der Sulfoxid- oder Sulfongruppen stattfinden.

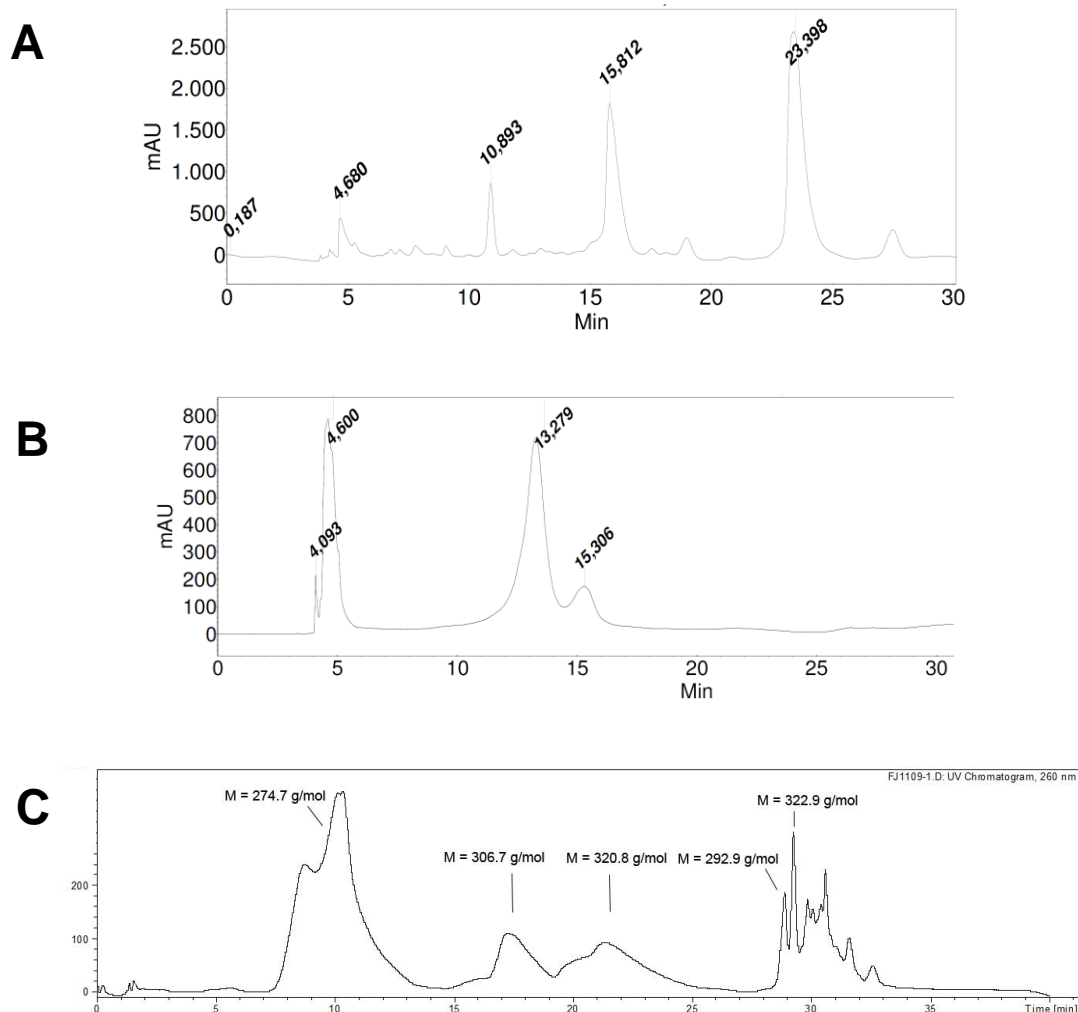


Abb. 55: Chromatogramme der HPLC-Trennung von DL-Brevinsäuresulfoxid (**23**). (A) Trennung der aus Säulenchromatographie erhaltenen Fraktion mit **23**. (B) Reinjektion des aus A erhaltenen Fraktion des UV-Signals bei 15.8 min. (C) LCMS-Chromatogramm des aus A erhaltenen Peaks bei 15.8 min. Verwendete Bedingungen: (A), (B) HPLC A, Nucleosil C8, isokratisch 20% Methanol + 0.05 % Ameisensäure, Probe in DMSO aufgetragen, $\lambda = 240$ nm. (C) HPLC D, Saphir C8, Methanol/Wasser + 0.05 % Ameisensäure, Programm H, Probe in DMSO aufgetragen, $\lambda = 260$ nm.

Als letzte mögliche säulenchromatographische Aufreinigung wurde Größenausschlusschromatographie von Brevinsäuresulfon (**169**) an Sephadex LH-20 in Aceton versucht. Es konnte hierbei eine Gelbfärbung der gesamten Säule beobachtet und erneut nur verunreinigtes **169** isoliert werden. Auch unter diesen Bedingungen scheint **169** nicht stabil zu sein.

Die finale Aufreinigung von **23** und **169** vor biologischen Tests wurde daher durch mehrmalige Umkristallisation aus Wasser erreicht, wobei große Ausbeuteverluste entstanden (Finale Ausbeute 10-20 %). Verunreinigungen wurden NMR-spektroskopisch nur noch in geringer Menge festgestellt.

7.2 Biologische Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Brevinsäurederivate DL- bzw. L-Brevinsäure (**22**), DL- bzw. L-Brevinsäuresulfoxid (**23**) sowie DL- bzw. L-Brevinsäuresulfon (**169**) wurden von DR. FRANK SURUP am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig auf antibiotische und zytotoxische Wirkung in Flüssigkulturen getestet. Nur DL- und L-Brevinsäuresulfoxid (**23**) zeigten in diesen Untersuchungen nennenswerte biologische Aktivität. Es wurde eine geringe Hemmung in Flüssigkulturen von *Mucor hiemalis* und *Chromobacterium violaceum* (ca. 110 µM) durch DL- und L-Brevinsäuresulfoxid (**23**) sowie eine moderate Hemmung von *Escherichia coli* TolC und *Staphylococcus aureus* festgestellt (ca.

Substanz	IC ₅₀ [µM]
L-Brevinsäure (22)	51
DL -Brevinsäure (22)	76
L -Brevinsäuresulfoxid (23)	32
DL-Brevinsäuresulfoxid (23)	14
L -Brevinsäuresulfon (169)	>100
DL -Brevinsäuresulfon (169)	>100

Tabelle 4: Hemmung von Methicillin-resistentem S. Aureus (MRSA) in Flüssigkultur durch oxidierte Brevinsäurederivate **22**, **23** und **169**.

27 µM bei DL- und 54 µM bei L-Brevinsäure-sulfoxid, **23**). Ebenfalls konnte eine Hemmung in Flüssigkulturen von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) durch **23** beobachtet werden (s. Tabelle 4). Interessant ist hier die höhere Wirksamkeit von DL-Brevinsäuresulfoxid

(**23**, 14 μM) gegenüber L-Brevinsäure-sulfoxid (**23**, 32 μM), welche eventuell auf eine gesteigerte biologische Aktivität von D-Brevinsäuresulfoxid (**23**) zurückzuführen ist. Dies müsste durch Synthese und Test der biologischen Aktivität von D-Brevinsäuresulfoxid (**23**) weiter untersucht werden. Bei Untersuchungen der Zytotoxizität in L929-Zellen konnte eine geringe Wirkung von DL-Brevinsäuresulfoxid (**23**, ca. 110 μM) nachgewiesen werden. Andere Derivate zeigten keine Wirkung. Es konnte außerdem keine antibiotische Wirkung der getesteten Substanzen gegen *Escherichia coli* 2-DC 14PS, *Candida albicans*, *Hansenula anomala*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mikrococcus luteus* und *Mycobacterium phlei* festgestellt werden. Somit ist die interessanteste biologische Wirkung die moderate Hemmung von MRSA durch DL- bzw. L-Brevinsäuresulfoxid (**23**).

7.3 Diskussion des Brevinsäureprojektes

Im Rahmen dieser Arbeit konnten DL- bzw. L-Brevinsäuresulfoxid (**23**) und DL- bzw. L-Brevinsäuresulfon (**169**) selektiv hergestellt und in Kooperation getestet werden. Besonders interessant ist die moderate Hemmung von MRSA durch DL- bzw. L-Brevinsäuresulfoxid (**23**, 27 μM bzw. 54 μM). Hier scheint D-Brevinsäuresulfoxid eine höhere Aktivität zu besitzen als L-Brevinsäuresulfoxid (**23**), was durch eine gezielte, enantiomerenreine Synthese und biologischen Test zu beweisen wäre. Ebenfalls überlegenswert ist eine enantioselektive Oxidation von Brevinsäure, jedoch ist sowohl eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses als auch Aufreinigung mittels HPLC an chiraler Phase aufgrund der Instabilität von **23** bisher nicht etabliert. Aus gleichen Gründen ist nicht sicher, ob die biologische Aktivität durch **23** oder eventuell durch eines seiner Zerfallsprodukte bedingt ist. Die Bildung von Nebenprodukten aus **23** während chromatographischer Aufreinigung und seine geringe Löslichkeit machen somit weitere Untersuchungen schwierig. Eine Optimierung der MRSA-hemmenden Wirkung von Brevinsäuresulfoxid durch weitere SAR-Studien erscheint daher nicht sinnvoll.

8 Produktion von Collinolacton (20a, 20b) aus *Streptomyces sp.* Gö40/10

In bisherigen Arbeiten durchgeführte Fermentationen von *Streptomyces sp.* Gö40/10 lieferten schwankende Mengen an Collinolacton (**20a**, **20b**) zwischen 1 und 35 mg/L^[35, 45, 178]. Vorkulturen von 48 h (VK) dienten als Inokulum der Produktionskulturen (Hauptkultur, HK). Durch Zusatz von Amberlite XAD-16 in die Hauptkultur nach 24 h konnte diese bis zu vierfach gesteigert werden. Fermentation in Schüttelkolben lieferte immer höhere Ausbeuten als Fermentation in Rührkessel-Fermentern. Die beste erreichte Ausbeute in Schüttelkolben war 35 mg/L im Vergleich zu 11 mg/L in Fermentern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Optimierungen der Fermentationsbedingungen durchgeführt mit dem Ziel, die Ausbeute in Fermentern zu steigern.

8.1 Optimierung der Sauerstoffzufuhr

Eine Erklärung der unterschiedlichen Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) in Schüttelkolben und Fermentern könnte der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Kulturmedium sein. Dieser hat einen deutlichen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten^[179]. Möglicherweise besteht in Schüttelkolben ein höherer Sauerstoffeintrag und die Ausbeute in Fermentern kann somit durch erhöhte Sauerstoffzufuhr verbessert werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[35b] wurde ein deutlicher Anstieg der Collinolactonproduktion in Rührkesselfermentern durch zusätzliche Sauerstoffzufuhr festgestellt. Jedoch wurde anfänglich ein sehr hoher Sauerstoffanteil verwendet und dieser im weiteren Verlauf verringert. Daher sollte in Zusammenarbeit mit FABIAN SCHMITT^[178A] eine kontinuierliche Zufuhr geringerer Mengen Sauerstoff überprüft werden, um eine möglicherweise toxische Konzentration zu verhindern. Die Einstellung des Sauerstoffpartialdruckes der gelösten Gase erwies sich mit der aktuell zugänglichen Ausstattung apparativ als sehr schwierig, was zeitweilige potentiell toxische Sauerstoffsättigung bis 100 % zur Folge hatte. Zusätzlich verstopfte gebildetes Luftmyzel die Abluft, was zu temporärem Überdruck im Fermenter führte. Es wurde trotzdem bewußt auf Zugabe

von Antischaummittel verzichtet, da dieses in früheren Fermentationen zu Ausbeuteverlusten geführt hatte. MASUREKAR^[180] erklärt dieses Phänomen durch eine geringere Sauerstoffverfügbarkeit nach Zugabe von Antischaummittel. Die erreichte Ausbeute an **20** in dieser Fermentation mit nur 2.2 mg/L war aufgrund der aufgetretenen Probleme gering (s. Tab. 3). Möglicherweise liegt dies auch an einem verschobenen Erntezeitpunkt durch Sauerstoffzufuhr. DICK ET AL.^[181] konnten dies in der Kultivierung von *Streptomyces griseoflavus* feststellen. Aufgrund der apparativen Schwierigkeiten wurde von einer weiteren Optimierung des Gehaltes von gelöstem Sauerstoff abgesehen.

8.2 Medienoptimierung

L. HOFFMANN hatte im Rahmen ihrer Dissertation^[35a] bereits erste Optimierungen des Nährmediums durchgeführt und durch Verwendung eines Soja-Mannit-Mediums die Ausbeute an Collinolacton (**20a**, **20b**) gegenüber früheren Nährmedien deutlich gesteigert. In Zusammenarbeit mit MARTIN KONNERTH^[178a] wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut eine Nährmedienoptimierung in Schüttelkolben durchgeführt. Eine Veränderung der Ausbeute an **20** wurde durch relativen Vergleich der in HPLC ermittelten UV-Signalfäche von **20** aus den einzelnen Fermentationen untereinander ermittelt. Es wurde keine quantitative Ausbeute bestimmt. Neben der Optimierung der Nährmedien wurden ebenfalls der Einfluss von Acetatzugabe und der Einfluss des Zugabezeitpunktes des Absorberharzes XAD-16 untersucht.

Auch in dieser Nährmedienoptimierung zeigte sich in SM-Medium die höchste Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**). Kultivierung in CPI-Medium führte ebenfalls zu einer hohen Produktion an **20** unter geringerer Bildung anderer Sekundärmetabolite. Dies könnte eine einfachere Aufarbeitung ermöglichen. Wurde Acetat zum Nährmedium zugegeben, führte dies in SM-Medium zu einer geringeren Bildung von **20**, hatte in CPI aber keine Auswirkung. Zugabe des biosynthetischen Vorläufers Acetat scheint daher keinen positiven Einfluss auf die Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) zu haben. Der Zeitpunkt der XAD-16-Zugabe zum Medium vor dem Autoklavieren oder nach 24 h scheint ebenfalls geringen

Medium	Acetat	4 mL Extrakt [mg]	Retentionszeit von 20 [min.]	Rel. Menge an 20 [%]	Kulturfarbe
SM/XAD	-	9.3	11.7	107	Gelbgrün
SM/XAD	+	10	11.7	22	Grün
SM	-	5.4	11.7	125	Dunkerot
SM	+	6.4	11.7	53	Orangerot
TSB	-	4.1	11.7	23	Farblos
TSB	+	5.0	11.7	11	Farblos
KM1	-	3.9	11.7	12	Farblos
KM1	+	2.0	11.7	14	Farblos
NL14	-	3.9	11.9	2	Farblos
NL14	+	3.4	11.7	7	Farblos
CPI	-	4.4	11.7	72	Gelbgrün
CPI	+	3.3	11.8	79	Gelbgrün
Gauze	-	2.6	11.7	18	Hellgelb
Gauze	+	3.1	11.8	17	hellgelb

Tabelle 5: Optimierung der Nährmedien zur Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) aus *Streptomyces sp.* Gö40/10 in Schüttelkolben.

Einfluss auf die Produktion von **20** zu besitzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Zusammenfassend steht mit dem CPI-Medium eine neue Nährmedialternative zur Verfügung. Möglicherweise lassen sich Bestandteile der Medien SM und CPI auch zu einem weiter optimierten Nährmedium mischen. Es wurde in Folge untersucht, ob diese neuen Medien auch in größeren Maßstäben in Schüttelkolben und Rührkesselfermentationen zu einer verbesserten Ausbeute an **20** führen.

8.3 Produktion

Auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kultivierungen von *Streptomyces sp.* Gö40/10 zeigten eine bessere Produktion an Collinolacton (**20a**, **20b**) in Schüttelkolben. In Zusammenarbeit mit MARTIN KONNERTH^[178b] parallel durchgeführte Kultivierungen in Rührkesselfermentern unter Verwendung von CPI-

Medium führten nicht zu einer Ausbeutesteigerung von **20**. Möglicherweise ist dies auf nach dem Autoklavieren ausgefallene Stärke zurückzuführen. Gegenüber Schüttelkolben standen so weniger Nährstoffe gelöst zur Verfügung. In zukünftigen Fermentationen sollte das Abkühlen des Nährmediums unter Rühren stattfinden, um ein Ausfallen der gelösten Stärke zu vermeiden. Es wurde den Fermentationen außerdem Antischaummittel zugegeben, was einen weiteren Ausbeuteverlust bewirkt haben kann. In Schüttelkolben zeigte sich dagegen ohne Zugabe von Antischaummittel gute Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**), vergleichbar mit SM-Medium. Wurde in CPI D-Glucose durch Mannit ersetzt (CPM-Medium), so konnte keine Verbesserung der Collinolactonbildung festgestellt werden. DOROTHEE WEISBROD erzielte dagegen im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit^[182] durch die Verwendung eines Hybridmediums aus SM und CPI (Soja-Mannit-Glucose-Stärke-(SMGS)Medium) die höchste gemessene Ausbeute in Schüttelkolben von 39.2 mg/L. Sie fügte dem Medium ebenfalls XAD-16 zu Beginn der Kultivierung zu. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Medium VK/HK	Volumen	Fermentation	XAD-16 (w/v) [%/Zeit]	Antischaum ja/nein	Ausbeute [mg]	Ausbeute [mg/L]
SM/SM	4 L	Rührkesself. mit O ₂ -Zufuhr	10/24 h	Nein	8.8	2.2
SM/CPI	8 L	Rührkesself.	10/24 h	Ja	50.6	6.3
SM/CPI	8 L	Rührkesself.	10/24 h	Ja	48.7	6.1
SM/CPI	8 L	Rührkesself.	10/24 h	Ja	52.6	6.6
SM/SM	4 L	Schüttelkolben	10/24 h	Nein	33.2	8.2
SM/SM	4 L	Schüttelkolben	10/24 h	Nein	29.6	7.4
SM/CPI	2.5 L	Schüttelkolben	20/24 h	Nein	53.4	21.4
SM/CPM	2.5 L	Schüttelkolben	20/24 h	Nein	45.2	18.1

Tabelle 6: Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) aus *Streptomyces sp.* Gö40/10 in Schüttelkolben und Fermentern .

9 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Actinomyceten

Mehr als 25 % der Todesfälle weltweit gehen auf Infektionskrankheiten zurück^[183]. Seit Jahren steigt aus vielfältigen Gründen der Anteil multiresistenter Keime, gegen welche nur Reserveantibiotika wirksam sind^[184]. Die Anzahl neu zugelassener Antibiotika ist jedoch seit Jahren sinkend. Diese bestehen zu einem großen Teil aus verbesserten Derivaten bereits zugelassener Wirkstoffe^[39-40]. Nur ein zurzeit in fortgeschrittenen klinischen Phasen untersuchter Wirkstoff gehört zu einer neuen Klasse^[185]. Es besteht daher ein dringender Bedarf, Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen zu entwickeln. 67 % der zugelassenen antibakteriellen Wirkstoffe sind von Naturstoffen abgeleitet^[39], daher erscheint die Suche nach neuen antibiotischen Naturstoffen ein besonders zielführender Ansatz zu sein. Technische Fortschritte in Aufreinigungsverfahren und Analytik sowie genetischen Methoden ermöglichen heute industriell die Untersuchung von Naturstoffen in Hochdurchsatzscreenings (HTS)^[186]. Hierfür werden Extrakte benötigt, welche mit geringer Wahrscheinlichkeit bereits untersucht wurden. Es können chemische oder biologische Screenings verwendet werden.

Besonders Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl verschiedener antibakterieller Wirkstoffe. Aus bekannten Bakterienstämmen können durch Genom-Mining^[187] oder Pathway Engineering^[188] bisher unbekannte, aktive Wirkstoffe gewonnen werden. Die Isolierung neuer Mikroorganismen kann mit traditionellen Methoden durch Suche an ungewöhnlichen Orten erfolgen, wie der Tiefsee oder heißen Quellen^[189]. Alternativ können neue Isolierungsverfahren die Kultivierung bisher unkultivierter Bakterien ermöglichen. In mehr als 7 Jahrzehnten antibiotischer Forschung wurden wahrscheinlich bereits Millionen Bakterien isoliert und in Screenings erforscht^[186a], jedoch wird davon ausgegangen, dass bis zu 99 % der Bakterien bisher nicht kultivierbar sind^[38]. Auch wenn nur ein Bruchteil dieser Organismen neue Naturstoffe produziert, hat die Erforschung mikrobieller Naturstoffe das Potential einen entscheidenden Beitrag zur Überwindung der antibiotischen Krise zu leisten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher durch

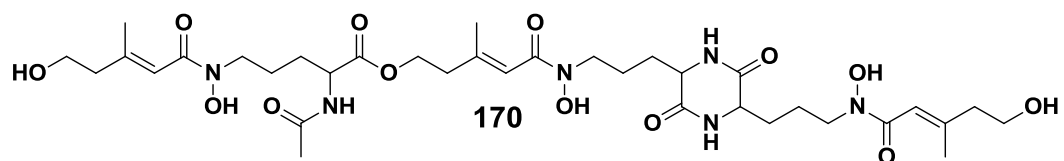
einen geeigneten Ansatz bisher unkultivierte Bakterien isoliert und ihre Extrakte auf anitbiotische Wirkung untersucht werden.

9.1 Konzept des umweltmimetischen Naturstoff-Screenings

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein umweltmimetischer Ansatz zur Isolierung neuer, seltener Actinomyceten verfolgt. Actinomyceten sind eine der reichsten Quellen biologisch aktiver Naturstoffe^[189]. 45 % aller biologisch aktiven, mikrobiellen Naturstoffe stammen aus Bakterien der Ordnung *Actinomycetales*, 80 % davon aus der Gattung *Streptomyces*^[190]. Trotz bereits jahrzehntelanger Erforschung ihrer Sekundärmetabolite wird geschätzt, dass erst 10 % der Naturstoffe, welche Actinomyceten produzieren können, entdeckt wurden^[191]. Daher bieten die Isolierung seltener Actinomyceten einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Identifikation neuer, biologisch aktiver Naturstoffe. Hierfür ist eine sorgfältige taxonomische Bestimmung der isolierten Stämme notwendig, um die erneute Bearbeitung bekannter Stämme zu verhindern. Die Isolierung bisher unbekannter Aktinomyzeten sollte durch ein umweltmimetisches Nährmedium und lange Kultivierungszeiten bevorzugt werden. Nach Kultivierung und Vereinzelung visuell ausgewählter Stämme sollte eine schnelle Bestimmung der Gattung mittels der Analyse der Fragmentverteilung aus 16S rDNA Restriktionsverdau erfolgen^[192]. Somit können seltene Actinomyceten identifiziert werden, welche in Folge in einem biologischen Screening näher untersucht werden. Aus Kostengründen sollte eine genauere taxonomische Bestimmung des Stammes erst im Falle biologischer Aktivität des Extraktes erfolgen. Eine antibiotische Aktivität der im biologischen Screening erhaltenen Extrakte und Fraktionen wurde durch Plattendiffusionstest festgestellt.

Im Rahmen des verwendeten Screeningansatzes sollten durch lange Kultivierungszeit (13 Wochen) und umweltmimetische Nährmedien langsamwachsende Bakterien identifiziert werden. JANSSEN ET AL. konnten zeigen, dass bis 12 Wochen Kultivierungszeit die Gesamtkeimzahl stetig zunimmt^[193]. Mikrobiologische Standard-Nährmedien besitzen oft einen sehr hohen Nährstoffgehalt, der schnellwachsenden Mikroorganismen einen Selektionsvorteil bietet. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Bakterien bekannt sind, ist hoch. Da sich auf Bakterien

aus terrestrischen Quellen beschränkt wurde, fiel die Nährmedienwahl auf eine abgewandelte Variante des Humin-Vitamin-Agar^[194]. Huminsäuren sind neben Stoffwechselprodukten von Algen eine wichtige natürliche Form organischen Materials für das Wachstum von Bakterien. Je nach Bodenbeschaffenheit besitzen Huminsäuren eine andere Zusammensetzung und Bioverfügbarkeit.^[195] Aus Gründen der Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit wurde in dieser Arbeit kommerziell erhältliches Natriumhumat (*Carl Roth*) verwendet. Als zweites Nährmedium wurde das bereits von JANSSEN ET AL.^[193] erfolgreich angewendete verdünnte DNB-Medium (Dilute Nutrient Broth, Verdünnung 1:100) verwendet. Um das DNB-Medium weiter an natürliche Bedingungen anzupassen, wurde in DNB enthaltener Fleischextrakt und Pepton durch pflanzliche Analoga (Vegetable Extract No. 1 und Vegetable Peptone, *Fluka*) ersetzt. Zur Vergleichbarkeit wurde auch DNB Vitaminlösung zugesetzt. Weiterhin wurden beiden Medien Spurenelementlösungen zugesetzt (SL-10) sowie eine Selen-Wolfram-Lösung, welche in manchen Organismen wachstumsstimulierende Wirkung besitzen^[196]. Weiterhin vorteilhaft für die Isolierung bisher unkultivierter Bakterien sind Siderophore. Viele Bakterien können diese Wachstumsfaktoren nicht selbst herstellen und sind auf Siderophorproduktion von anderen Bakterien angewiesen^[197]. D'ONOFRIO ET AL. konnten in Anwesenheit von Desferricoprogen (**170**) Wachstum von Bakterien nachweisen, die ohne Zugabe des Siderophores nicht gewachsen sind^[197]. Daher wurde beiden in dieser Arbeit verwendeten Medien ebenfalls **170** zugegeben. Abschließend wurde statt üblicherweise verwendetem Agar Gellan verwendet. Gellan zeigte in Untersuchungen eine höhere Anzahl entwicklungsfähiger Bakterien als Agar^[193]. Zur Festigung von Gellan ist allerdings eine erhöhte Menge divalenter Kationen (Calcium, Magnesium) notwendig. Da Böden mit einer hohen Calcium und Magnesiumkonzentration eine höhere Biodiversität^[198] aufweisen, ist dies möglicherweise von Vorteil. Die so zusammengestellten Nährmedien werden in Folge als HVG+ (Humin-Vitamin-Gellan-Medium mit Zusätzen) und DNBG+ (Dilute Nutrient Broth Gellan Medium mit Zusätzen) bezeichnet.



9.2 Isolierung seltener Actinomyceten

In verschiedenen Habitaten wurden aus der obersten Bodenschicht Erdproben entnommen und vor Ort an der Luft getrocknet. Je ein Gramm der erhaltenen 15 Erdproben wurde in sterilem Wasser suspendiert und seriell verdünnt. Hiermit wurde auf Sporenbildner selektiert. Da das Ziel des Screenings war, eine Vielzahl möglicher Umweltfaktoren wiederzugeben, wurde auf eine weitere Vorbehandlung der Erdprobe verzichtet, auch wenn dies eine einfachere Kultivierung seltener Actinomyceten ermöglicht hätte. Es wurden dem Nährmedium ebenfalls keine Antibiotika gegen gram-negative Bakterien und Eukaryoten zugesetzt. Hiermit sollte ermöglicht werden, dass durch diese Organismen produzierte Wachstumsfaktoren das Wachstum bisher unkultivierter seltener Actinomyceten stimulieren. Die Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} jeder Erdprobe wurden jeweils auf 3 Platten jedes Mediums kultiviert. In einem parallelen Ansatz wurden zusätzlich zwei Verdünnungsstufen jeder Erdprobe (10^{-3} und 10^{-5}) auf Filterplättchen aufgetragen, welche 13 Tage auf Gellanplatten der verwendeten Nährmedien inkubiert wurden. Die verwendete Porengröße ließ ein Wachstum von Actinomyceten-Hyphen durch den Filter auf die Platte zu, schloss aber Pilze aus. Die Kultivierung aller Platten erfolgte für 90 Tage bei 28°C und unter Lichtausschluss.

Bei der ersten Kontrolle nach 13 Tagen zeigten nur von 4 Erdproben angeimpfte Platten deutliches Wachstum von Mikroorganismen. Diese zeigten auch in der zweiten Kontrolle nach 48 Tagen und bei Abbruch der Kultivierung nach 90 Tagen die größte Vielzahl an mikrobiellen Kolonien. Insgesamt konnte ein starkes Wachstum von Pilz und großflächig wachsenden, schleimigen Organismen festgestellt werden. Es wurde ein besseres Wachstum von Mikroorganismen auf HVG+-Platten gegenüber DNBG+ beobachtet.

Aufgrund der begrenzten noch zu Verfügung stehenden Zeit musste ein direkterer Kultivierungsversuch als geplant durchgeführt werden. Platten mit sehr starkem Pilzwachstum wurden nicht weiter bearbeitet und die weiter verwendeten Platten nicht erneut auf HVG+ oder DNBG+ kultiviert. LEWIS ET AL.^[199] sowie NICHOLS ET AL.^[200] konnten in Arbeiten mit Diffusionskammern zeigen, dass bisher

unkultivierbare Stämme bei wiederholter Ko-Kultivierung „domestizierte“ Varianten bilden. Diese wachsen in Folge auch auf mikrobiologischen Standardmedien. 25 % der von ihnen isolierten „unkultivierbaren“ Mikroorganismen wuchsen schon nach dem ersten Transfer auf Standardmedien. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit in Folge ein direkter Weg zu Produktionsbedingungen in Flüssigkultur gewählt und 20 visuell ausgewählte Kolonien auf KM4-Gellanplatten (KM4G) vereinzelt. Erneut wurde hier ein doppelter Ansatz gewählt. Um Wachstum von Pilzen zu unterbinden wurde jede Kolonie auf einem Filterplättchen ausgestrichen und anschließend auf KM4G inkubiert. Dieselbe Kolonie wurde ebenfalls auf KM4G-Platten mit Antibiotika ausgestrichen, welche Wachstum von gramnegativen und eukaryotischen Organismen hemmen (Cycloheximid, Nalidixinsäure, Nystatin). Wie erwartet wuchsen von den 20 ausgewählten Kolonien nur 6 an. Es wäre von Interesse die Platten der nicht angewachsenen Kolonien erneut auf HVG+ oder DNBG+ zu kultivieren, um zu überprüfen, ob diese durch wiederholte Kokultivierung „domestizierte“ Varianten bilden. Dies muss in zukünftigen Arbeiten erfolgen. Zur Aufreinigung der erhaltenen 6 Stämme und zur Vorbereitung einer Flüssigkultivierung wurden diese erneut auf SM-Agar mit Antibiotika-Overlay (Cycloheximid, Nalidixinsäure, Nystatin) vereinzelt. Hierbei wuchsen 2 Organismen nicht an, möglicherweise aufgrund des verwendeten Nährmediums. 3 weitere wurden von Bacillus-ähnlichen Kulturen überwachsen, welche auf den ursprünglichen Platten nicht zu sehen waren. Als einziger visuell als Aktinomyzet zu identifizierender Stamm wuchs FJ-4-B4.1b an.



Abb. 56: Im Rahmen des umweltmimetischen Naturstoffscreenings isolierter Stamm FJ-4-B-4.1b auf Soja-Mannit-Agar.

9.3 Der Stamm FJ-4-B4.1b

Kolonien des Stammes FJ-4-B4.1b wurden auf SM-Agar erst nach 5 Tagen bei 28°C sichtbar und bildeten bis zum 8. Tag weißes Luftmyzel sowie ein den Agar rotfärbendes Pigment. Eine geplante Bestimmung der Gattung mittels Analyse der Fragmentverteilung aus 16S rDNA Restriktionsverdau^[192] konnte aus Zeitgründen nicht erfolgen. Eine Flüssigkultivierung von FJ-4-B4.1b wurde in Schüttelkolben und SFM-Medium (0.5 L) bei 28°C für 96 h durchgeführt. Es konnte eine starke Rotfärbung des Mediums beobachtet werden. Kulturfiltrat und Acetonextrakt des Mycels wiesen dünnschichtchromatographisch eine hohe Ähnlichkeit auf und wurden daher vereinigt. Eine erste chromatographische Aufreinigung erfolgte an Sephadex LH-20, wobei eine gut sichtbare rote Bande auffiel. Ebenso zeigten weitere Fraktionen nach Entfernung des Lösungsmittels violette bis rötliche Farben. Im anschließenden Plattendiffusionstest konnte bei zwei Fraktionen Hemmung von *S. aureus* und *B. subtilis* beobachtet werden. Beide Fraktionen wiesen im Dünnschichtchromatogramm und in LC/MS-Analyse teilweise Übereinstimmungen auf (s. Abb. 57). Ein Datenbankvergleich im AK PROF. DR. FIEDLER⁴ zeigte abgesehen vom aus dem SM-Medium stammenden Daidzein keine der Datenbank bekannten Substanzen. Es wurde daher eine der aktiven Fraktionen über präparative HPLC aufgetrennt und die Fraktionen erneut in Plattendiffusionstest untersucht. In Folge konnte in keiner Fraktion biologische Aktivität festgestellt werden. Möglicherweise besaß die biologisch aktive Substanz geringe Stabilität und ist während Lagerung oder Aufreinigung zerfallen. Denkbar ist auch eine synergistische Wirkung mehrerer Verbindungen, welche einzeln nur geringe Aktivität besitzen. Genauere Untersuchungen in zukünftigen Arbeiten erfordern eine erneute Flüssigkultivierung, um die bisherigen Ergebnisse zu reproduzieren.

⁴ Ich danke Andreas Kulik und Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler für die LC/MS-Analyse und die Möglichkeit des Datenbankabgleiches.

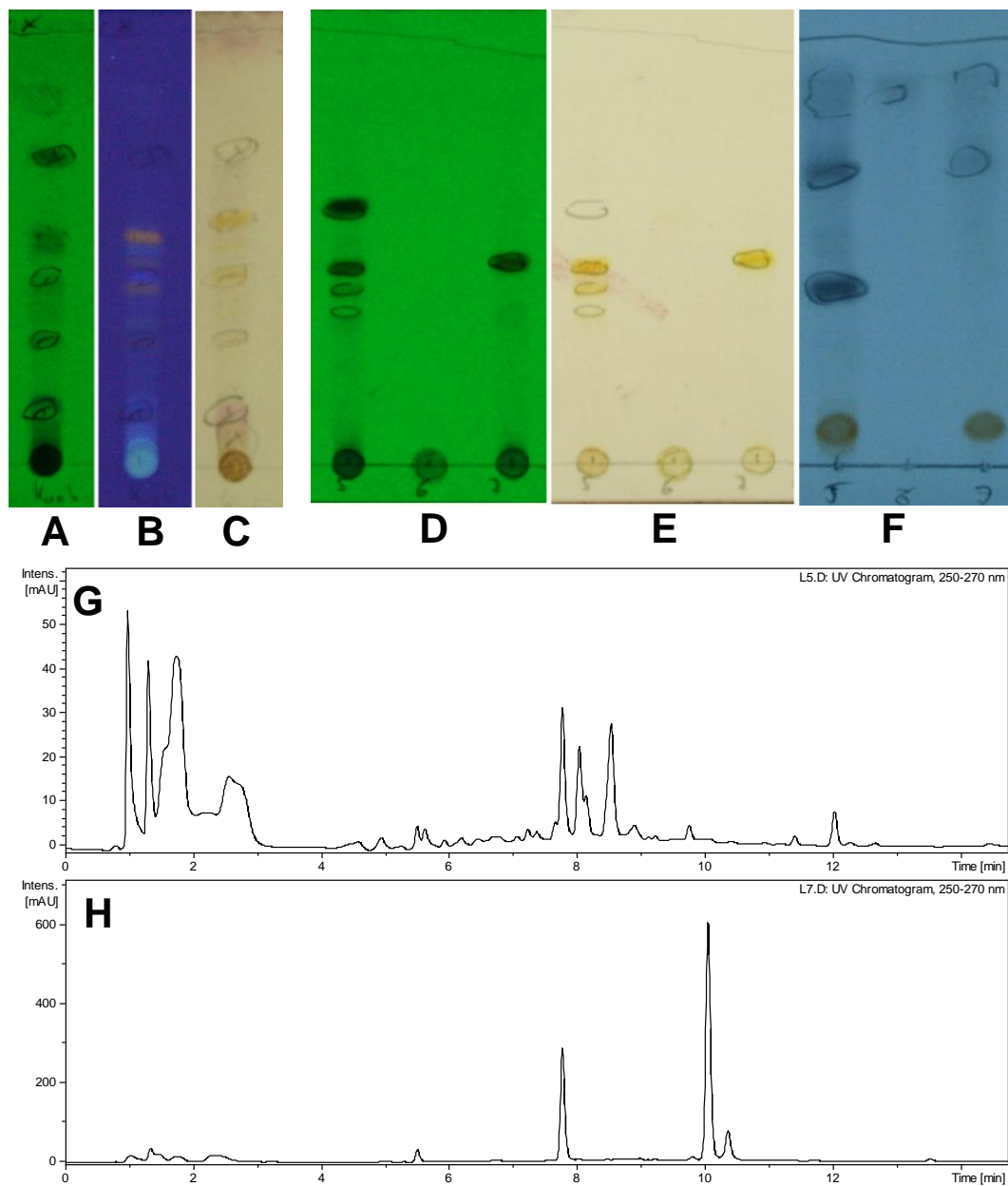


Abb. 57: Chromatographische Analytik der Extrakte von Stamm FJ-4-B4.1b: Dünnschichtchromatogramme der Acetonextrakte des Mycel (A) 254 nm, (B) 366 nm, (C) mit Anisaldehyd-Lösung entwickelt; Laufmittel Chloroform/Methanol = 9:1; Dünnschichtchromatogramme der antibiotisch wirkenden Sephadex-LH20 Fraktionen 5 und 7 (D) 254 nm, (E) mit Anisaldehyd-Lösung entwickelt; Laufmittel Chloroform/Methanol = 9:1; (F) 254 nm, RP18, Laufmittel Methanol/Wasser = 7:3; LC/MS-Chromatogramm von Sephadex-LH20 Fraktion 5 (G) und 7 (H). HPLC E, Säule Nucleosil-100 C18, 3 μ m, Programm I, Acetonitril + 0.06% HCOOH/Wasser + 0.1 % HCOOH, 0.4 mL/min.

9.4 Zusammenfassung und Diskussion des Screening-Ansatzes

Im Rahmen des verwendeten Screening Ansatzes wurde ein Stamm isoliert, dessen Extrakt in Plattendiffusionstests antibiotische Wirkung zeigt. Antibiotisch wirksame Naturstoffe des Extraktes konnten bisher nicht isoliert werden. Hierzu ist in zukünftigen Arbeiten eine Flüssigkultivierung in größerem Maßstab notwendig. Die verwendete umweltmimetische Strategie zur Isolierung bisher unkultivierter, seltener Actinomyceten konnte aufgrund der kurzen zur Verfügung stehenden Zeit nicht in ihrem vollen Potential genutzt werden. Eine geplante mehrfache Kokultivierung langsamwachsender Kolonien auf den Medien HVG+ und DNBG+ zur Bildung „domestizierter“ Varianten konnte aus Zeitgründen nicht erfolgen. Gerade Kolonien, welche erst nach mehrfacher Kokultivierung auf mikrobiologischen Standardmedien wachsen, haben eine hohe Wahrscheinlichkeit, bisher nicht bekannt zu sein. Ebenso erfolgte keine Bestimmung der Gattung des isolierten Stammes FJ-4-B4.1b, es kann sich daher auch um einen Streptomycceten handeln. Der Stammes FJ-4-B4.1b beweist jedoch, dass die Isolierung von Actinomyceten unter den verwendeten Bedingungen möglich ist. Da viele Erdproben kein oder nur geringes Wachstum von Mikroorganismen zeigten, muss die Isolierungsstrategie verbessert werden. Denkbar wären ein zusätzliches Rühren der Erdprobensuspension und eine serielle Verdünnung mit Nährmedium statt dest. Wasser. Das hohe Auftreten von eukaryotischen Kulturen ist Teil der verwendeten Strategie, jedoch muss in zukünftigen Arbeiten die Vereinzelung langsam wachsender Kolonien aus den Kokulturen optimiert werden. Zusammenfassend muss das umweltmimetische Naturstoffscreening in zukünftigen Arbeiten in seinem vollen Umfang durchgeführt werden, das heißt unter mehrfacher Kokultivierung und 16-rDNA-Bestimmung der Gattung des isolierten Actinomyceten. Erste Ergebnisse zeigen seine Eignung zur Isolierung von Mikroorganismen.

10 Zusammenfassung der Ergebnisse

10.1 Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Derivaten des Naturstoffes Collinolacton (20a, 20b)

- Das Target-Fishing von Derivaten des neuartigen Naturstoffes Collinolacton (**20a**, **20b**), welche die Zellteilung durch Bildung eines monoastralen Phänotyps hemmen, wurde bearbeitet.
- Syntheserouten zu fünf an Collinolacton (**20a**, **20b**) angepassten Spacer- und Linkerkonstrukten wurden ausgearbeitet und erfolgreich durchgeführt. Diese sind besonders geeignet für die affinitätschromatographische Identifikation der Targetproteine von Collinolactonderivaten. Gängige kommerzielle Spacer können nicht verwendet werden, da im Konzept für **20** die Spacer Teil des Pharmakophors sind.
- Validierung der biologischen Aktivität erhaltener Collinolacton-Spacerderivate **64**, **65**, **102**, **131** und **143** in Kooperation mit der Zellbiologie (F. SASSE, S. ZÄHLER) bewies die besondere Eignung eines 2-(4-Valeroxyphenyl)acetyl-Spacers (HPE-Spacer, **119**). Sein Collinolactonester **143** zeigte Zytotoxizität und induzierte sowohl Effekte im Mikrotubulinetzwerk als auch im Aktinzytoskelett untersuchter Zellen. Alle Produkte wurden den biologischen Partnern nach HPLC-Aufreinigung und detaillierter Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie in Milligramm-Mengen zur Verfügung gestellt.
- Zur sicheren Identifizierung der zellulären Target-Proteine von Collinolactonderivaten in zukünftigen Arbeiten wurde ein für SILAC geeignetes isotope markiertes, affinitätschromatographisches Verfahren vorgeschlagen. Dieses kann im Gegensatz zu etablierten affinitätschromatographischen Protokollen zusätzliche Informationen zu einer möglichen Beteiligung intrazellulär gebildeter Collinolactonprodukte an den beobachteten biologischen Phänomenen liefern.

- Zwei Fluoreszenzmarkierte Collinolactonderivate (**58**, **61**) wurden erfolgreich semisynthetisch hergestellt. Diese erlaubten in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Zellbiologie jedoch keine Rückschlüsse auf zelluläre Targets zytotoxischer Collinolactonderivate.

10.2 Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR)- und biologischer Aktivität von Collinolactonderivaten

- Für SAR-Studien wurde eine Bibliothek von 18 neuen Collinolactonderivaten (**38**, **61**, **64**, **65**, **102**, **105-112**, **131**, **143**, **151-153**), semisynthetisch hergestellt, darunter 4-O-Ester diverser Benzoesäuren. Die Derivate wurden mittels HPLC aufgereinigt und detailliert NMR-spektroskopisch charakterisiert. Reinsubstanzen wurden in Kooperation mit der Zellbiologie (F. SASSE, S. ZÄHLER) auf die Effekte chemisch-synthetischer Veränderungen der Molekülstruktur auf die biologische Aktivität detailliert und mit großen Erfolg untersucht. Zehn Derivate (**38**, **105-112**, **143**) zeigten eine Inhibition der Zellproliferation durch Induktion eines monoastralen Phänotyps in der Mitose von PtK2-Zellen.
- Erstmals wurde in Kooperation mit dem Zellbiologen S. ZÄHLER die Wirkung von 16 Collinolactonderivaten (**20**, **21**, **61**, **64**, **65**, **104-112**, **131**, **143**) auf das Aktinzytoskelett untersucht. 9 Derivate (**64**, **65**, **104**, **105**, **109-112**, **143**) induzieren die Bildung eines verdickten, kortikalen Aktinringes und zeigen außerdem Inhibition der Zellmigration.
- Das in dieser Arbeit hergestellte Derivat 4-O-(*p*-Brommethyl)benzoylcollinolacton (**105a**, **105b**) zeigt in der Zellbiologie (F. SASSE, S. ZÄHLER) die bisher höchste bekannte Aktivität von Collinolactonderivaten (Zytotoxizität: IC₅₀: 2 µM in menschlichen Mammakarzinomazellen, MCF7).
- Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit selektiv Collinolactenon (**38a**, **38b**) hergestellt und seine biologische Aktivität bewiesen werden (Zytotoxizität: IC₅₀: 4 µM in Mauszellen, L929).

10.3 Synthesestudien zu Collinolacton-Glykosiden

- Eine Syntheseroute zu unterschiedlichen Trichloracetimidat-aktivierten Monosacchariden (**42**, **50**) wurde entwickelt und erfolgreich durchgeführt. Hierbei wurden für eine chemische Glykosidierung des Naturstoffes Collinolacton (**20a**, **20b**) geeignete Schutzgruppen genutzt.
- Die anschließende Glykosidierungsreaktion führte unter einer Vielzahl an Reaktionsbedingungen zum Zerfall von Collinolacton (**20a**, **20b**). Auftretende Zerfallsprodukte wurden NMR-spektroskopisch und mittels HR-LC/MS umfassend untersucht.

10.4 Produktion von Collinolacton (**20a**, **20b**) aus *Streptomyces sp.*

- Der Naturstoff Collinolacton (**20a**, **20b**) wurde zuverlässig in Ausbeuten von bis zu 21 mg/L in *Streptomyces sp.* Gö40/10 produziert. **20** wurde aus dem Mycelextrakt chromatographisch aufgereinigt und für semi-synthetische Ansätze zur Verfügung gestellt.
- Eine in dieser Arbeit durchgeführte Variation von sechs Nährmedien und drei weiteren Kultivierungsparametern identifizierte optimierte Kultivierungsbedingungen von *Streptomyces sp.* Gö40/10. Diese ermöglichten im Rahmen der Zulassungsarbeit von DOROTHEE WEISBROD^[182] eine erhöhte Produktion von 39.2 mg/L Collinolacton (**20a**, **20b**).

10.5 Synthese oxidierter Derivate des Naturstoffes Brevinsäure(**22**)

- Es konnten erfolgreich das neue Derivat Brevinsäuresulfon (**169**) hergestellt sowie enantiomerenreine Synthesen von Brevinsäurederivaten **22**, **23** und **169** durchgeführt werden. Erstmals wurden Auswirkungen der chromatographischen Bedingungen auf die Stabilität von Brevinsäurederivaten genau untersucht.

- In Kooperation mit dem Labor des Biotechnologen M. STADLER konnte eine Inhibition von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) durch Brevinsäuresulfoxid (**23**) festgestellt werden (IC_{50} von DL-**23**: 14 μ M).

10.6 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Actinomyceten

- Es wurde ein umweltmimetischer biologischer Screeningansatz zur Isolierung bisher unkultivierter seltener Actinomyceten entwickelt.
- Kultivierung des im entwickelten Screeningansatz isolierten Stammes FJ-4-B4.1b zeigte antibiotische Aktivität einzelner Fraktionen. In einer Datenbanksuche nach LC-DAD-MS-Analyse der Fraktionen konnten keine der Datenbank bekannten Naturstoffe identifiziert werden. Eine Isolierung und Sturkturaufklärung wird in zukünftigen Arbeiten erfolgen.

11 Summary of results

11.1 Target identification strategies for derivatives of the natural product Collinolactone (20a, 20b)

- A target fishing strategy was established for derivatives of the unique natural product Collinolactone (**20a**, **20b**), which inhibit cell proliferation by inducing a monoastral phenotype during mitosis.
- Synthetic routes to five individually adapted spacers (**64**, **65**, **102**, **131**, **143**) for Collinolactone (**20a**, **20b**) were developed and successfully implemented. In future work spacers will be used for the identification of target proteins of **20** in an affinity chromatographic approach. As in the concept for **20** spacers are part of the pharmacophore, current commercially available Spacers are not suitable.
- Validation of biologically active Collinolactone spacer derivatives **64**, **65**, **102**, **131** and **143** in cooperation with cell biologists (F. SASSE, S. ZÄHLER) proved the exceptional suitability of a 2-(4-valeroxyphenyl)acetyl-spacer (HPE-spacer) for target fishing. A HPE Collinolactone ester (**143**) showed cytotoxicity and induced effects on both microtubule and actin cytoskeleton in cells. After HPLC purification and thorough analysis by NMR spectroscopy and mass spectrometry all spacer products were provided to biological partners on a milligram scale.
- An isotope coded affinity chromatography strategy for the reliable identification of Collinolactone derivative target proteins in future work was proposed. This SILAC based approach provides a unique insight into a possible contribution of intracellularly formed metabolic products of collinolactone to the observed biological phenomena.

- Two semisynthetically fluorescence labelled derivatives of Collinolactone (**58**, **61**) were successfully produced. Fluorescence microscopy in the lab of cell biologist S. ZÄHLER could draw no conclusions on cellular targets of cytotoxic collinolactone derivatives.

11.2 Structure activity relationship (SAR) studies and biological activity of Collinolactone derivatives

- In SAR studies a library of 18 novel Collinolactone derivatives (**38**, **61**, **64**, **65**, **102**, **105-112**, **131**, **143**, **151-153**), among them a variety of 4-*O*-esters of different benzoic acids, was semisynthetically produced. Derivatives were purified by HPLC and thoroughly characterized by NMR spectroscopy. In a cooperation with the cell biologists F. SASSE and S. ZÄHLER the effects of chemical structure modifications on the biological activity of pure collinolactone derivatives were evaluated with great success. Ten derivatives (**38**, **105-112**, **143**) showed inhibition of cell proliferation by induction of a monoastral phenotyp during mitosis in PtK2 cells.
- In cooperation with cell biologist S. ZÄHLER the effect of 16 collinolactone derivatives (**20**, **21**, **61**, **64**, **65**, **104-112**, **131**, **143**) on the actin cytoskeleton of human cells was examined for the first time. Various analogues (**64**, **65**, **104**, **105**, **109-112**, **143**) induce the formation of a cortical actin ring and additionally show inhibition of cell migration.
- Derivative 4-*O*-(*p*-Bromomethyl)benzoyl-collinolactone (**105a**, **105b**), synthesised in this thesis, exhibits the most potent activity of collinolactone analogues known to date (cytotoxicity: IC₅₀: 2 µM in human mamma carcinoma cells, MCF7).
- In this thesis the hypothetical intracellular metabolic product Collinolactenone (**38a**, **38b**) was selectively synthesized for the first time. Its biological activity was proven in cooperation with cell biologists F. SASSE and S. ZÄHLER (cytotoxicity: IC₅₀: 4 µM in murine cells, L929).

11.3 Synthetic studies to collinolactone glycosides

- On a route to chemical glycolysated Collinolactone derivatives trichloroacetimidate-activated monosaccharides **42** and **50** were successfully synthesised. Mild cleavable protecting groups, suitable for the chemical glycolysation to Collinolactone (**20a**, **20b**), were used in this strategy.
- The subsequent glycolysation reaction gave rise to degradation of collinolactone (**20a**, **20b**) under a plethora of conditions. Degradation products were comprehensively analysed by NMR-spectroscopy and HR-LC/MS.

11.4 Production of Collinolactone (**20a**, **20b**) from *Streptomyces sp.*

- The natural product Collinolactone (**20a**, **20b**) was reliably produced from *Streptomyces sp.* Gö40/10 in yields up to 21 mg/L. **20** was purified from the mycelium extract by flash chromatography and HPLC and provided for subsequent semisynthetic derivatisation reactions.
- A variation of six nutrition media and three further cultivation parameters identified optimised cultivation conditions for *Streptomyces sp.* Gö40/10. Based on this work DOROTHEE WEISBROD^[182] achieved an increased production of 39 mg/L Collinolactone (**20a**, **20b**).

11.5 Synthesis of oxidised derivatives of the natural product Brevinic acid (**22**)

- The novel congener Brevinic sulfone (**169**) as well as enantiopure brevinic acid derivatives **22**, **23** and **169** were successfully synthesised. For the first time the impact of chromatographic conditions on the stability of brevinic acid derivatives was evaluated in detail.

- In cooperation with the microbiological lab of M. STADLER inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) induced by Brevinic acid sulfoxide (**23**) was revealed (IC₅₀ of DL-**23**: 14 µM).

11.6 Alternative screening methods for new antibiotics from previously uncultured rare actinomycetes

- An environment mimetic biological screening approach for the isolation of previously uncultured rare actinomycetes was developed.
- Fermentation of the strain FJ-4-B4.1b, isolated by the developed approach, exhibited antibiotic activity of several culture broth fractions. Database search after LC-DAD-MS analysis of the fractions revealed no natural products known to the database. In future works isolation and structure elucidation will be continued.

B. Experimenteller Teil

1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren: ESI-MS: *Finnigan* LC-Q (Ionenfalle), *Bruker Daltonik* microTOF (TOF-MS), *Bruker Daltonik* Esquire 3000+ (Ionenfalle, Reaktantgas: He). **EI-MS:** *Finnigan* Doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95, 70 eV. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95 200 eV (Reaktandgas: NH₃). Angegeben sind jeweils die Quotienten aus Masse zu Ladung (m/z) sowie die relativen Intensitäten bezogen auf den Basispeak.

¹H-NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (600 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Inova-300 (300 MHz), *Bruker* AMX-600 (600 MHz); *Bruker* Avance-400 (400 MHz). Chemische Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben; Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz). Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Kopplungen um skalare ³ J (H,H)-Kopplungen. Die ¹H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Quintett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, dddd = Dublett vom Dublett vom Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, tt = Triplett vom Triplett, qt = Quartett vom Triplett, m = Multiplett, br = breit.

¹³C-NMR-Spektren: *Varian* Inova 600 (150.8 MHz), *Varian* Inova 500 (125.7 MHz) unter Verwendung einer Kryosonde ¹³C {¹H} *PFG Cold* Probe der Firma *Varian* bei einer Empfänger- und Verstärkertemperatur von 25 K gemessen, *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz), *Bruker* AMX-600 (150.3 MHz), *Bruker* Avance-400 (100.6 MHz). Alle chemischen Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben. Aufgrund der Ähnlichkeit von *syn*- und *anti*-Collinolactonsignalen wird die chemische Verschiebung mit zwei Nachkommastellen angegeben.

2D-NMR-Spektren: $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY ($^1\text{H},^1\text{H}$ -Correlated Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Singular Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity).

1.1 Chromatographische Methoden

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert. Für HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und Reinstwasser (Millipore Milli-Q Reference A+) verwendet. Vor Benutzung wurden die Lösungsmittel für die HPLC zunächst für jeweils 10 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Dünnschichtchromatographie (DC): Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm; Merck DC-Alufolien RP-18 F_{254s}, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_F-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Anfärbereagenzien: Nach Merck, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie^[201]. Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100°C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure. Sprühreagenz.

Bromkresolgrün (Nr. 42): 0.04 g Bromkresolgrün in 100 mL Ethanol gelöst. Die Lösung wird mit Natronlauge 0.1 M bis zu einer auftretenden Blaufärbung versetzt.

Molybdatophosphorsäure (Nr. 204): Eine 5-10 %ige Lösung von Molybdatophosphorsäure in Ethanol. Tauchreagenz.

Säulenchromatographie und Gelchromatographie: Chromatographische Trennungen erfolgten an Macherey-Nagel Kieselgel 60 (40–63 µm, 230–400 mesh ASTM) (nach STILL ET AL.^[202]) und an Merck Kieselgel 60 RP-18 (40–63 µm). Für die Gelchromatographie wurde Sigma-Aldrich Sephadex LH-20 eingesetzt.

Mitteldrucksäulenchromatographie:

MPLC A: Pumpe: *Knauer* Wellchrom Maxi-Star K-1000; Säule: *Merck* Lobar[®]-Fertigsäule, Größe A (240–10), Größe B (310–25), Größe C (440–37); Säulenmaterial: *Merck*: Li Chroprep[®] RP-18 (40–63 µm).

MPLC B: *Varian* IntelliFlash, Software: *Varian* 971-FP Version 3.1.524. ELSD-Detektor: *Varian* 385-LC. Fertigsäulen von *Agilent*.

Angegebene Retentionszeiten beziehen sich ausschließlich auf MPLC B.

Standardgradient für die MPLC:

Es werden jeweils zwei Lösungsmittel in verschiedenen Anteilen (Stufen) verwendet:

7 min Stufe 1, in 3 min auf Stufe 2, 7 min bei Stufe 2, in 3 min auf Stufe 3, 7 min bei Stufe 3, in 3 min auf Stufe 4, 7 min bei Stufe 4, in 3 min auf Stufe 5, 7 min bei Stufe 5.

Wurden in den folgenden Synthesen weniger Stufen verwendet, so werden nur die aufgeführt, die verwendet wurden.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Analytische/Semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung:

HPLC A: Pumpe: *Jasco* PU-2080 Plus; Mischkammer: *Jasco* LG-2080-02; Entgaser: *Jasco* DG-2080-53; PDA-Detektor: *Jasco* MD-2010 Plus; ELSD-Detektor: *Varian* 385-LC; Autosampler: *Jasco* AS-2055 Plus mit *Rheodyne* 100 µL Auftragschleife; Säulenofen: *Jasco* CO-2065; Datensystem bis 2009: *Jasco* Borwin[®] mit *Jasco* Borwin[®] PDA Version 1.50 (Chromatographie), *Jasco* Borwin[®] HSS-2000 Version 3.5.2. (Steuerung); ab 2009: *Jasco* ChromPass Chromatography Data System, Version 1.8.6.1.

HPLC B: Pumpe *Jasco* PU-1580; Mischkammer *Jasco* LG-1580-02; Entgaser *Jasco* DG-2080-53; MD-Detektor *Jasco* MD-2010plus; ELSD-Detektor: *Varian* 385-LC; CD-Detektor: *Jasco* CD-995; AD-Wandler: *Jasco* LC-Net II/ADC; Autosampler *Jasco* AS-1555 mit *Rheodyne* 100 µL Auftragsschleife; Datensystem: *Jasco* ChromPass Chromatography Data System, Version 1.8.6.1.

Analytische HPLC mit ESI-MS-Kopplung:

HPLC C: Pumpe und Mischkammer: *Flux Instruments* Rheos 4000; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Autosampler: *Jasco* 851-AS mit variabler Aufgabeschleife 0–100 µL; PDA-Detektor: *Thermo Finnigan* Surveyor; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Datensysteme: HPLC: *Flux Instruments* Janeiro 1.10.0 (Steuerung); *Thermo/Finnigan* TunePlus Version 1.3 (Steuerung ESI-MS); *Thermo Finnigan* Xcalibur® Version 1.3 (Datenauswertung).

HPLC D: *Agilent* 1100 series; Massendetektor: *Bruker Daltonik*, Esquire 3000+ (Ionenfalle, Reaktandgas: He); Software: HPLC: *Agilent* ChemStation for LC, Version: Rev.A.08.03 (847); ESI-MS: *Bruker Daltonik* esquireControl Version 5.0 Build No. 65.0; *Bruker Daltonics* esquire 5.0 Build 169; DataAnalysis Version 3.0 (Build 49).

HPLC E: *Agilent* 1200 series mit Diodenarraydetektor (DAD), 10 mm Standard Flusszelle; Massendetektor (ESI-MS): *Agilent* LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330. Software: *Agilent* LC/MSD ChemStation Rev. B.01.03; *Bruker Daltonik*, 6300 Series Trap Control Version 6.1. MS-Parameter: ESI Interphase (positive, negative, alternierend); Mode Ultra Scan; Kapillarspannung 3.5 kV; Temperatur 350 °C.

Präparative HPLC:

HPLC F: Pumpe: *Jasco* PU-1587 (0-50 mL/min), Mischkammer: *Jasco* 1000 µL; UV-Detektor: *Jasco* UV 1575; manuelles Probenaufgabeeventil: *Rheodyne* mit 2.0 mL Auftragsschleife; Software: *Jasco* Borwin® Ver. 1.50 (Chromatographie), *Jasco* Borwin® HSS-200 Version 3.5.2 (Steuerung).

HPLC G: *Thermo Scientific* Ultimate 3000, Pumpe: HPG 3200 BX, *Knauer* Online Degasser, Autosampler: WPS-3000SL mit 2.5 mL Auftragsschleife, manuelles *Rheodyne* Bioline Probenauftragsventil mit 1.0 mL Auftragsschleife, DAD-Detektor: DAD-3000RS mit semipräparativer Messzelle, Ultimate 3000 Fraction Collector AFC-3000, SR-3000 Solvent Rack, Software: Chromeleon® Version 6.80.

HPLC-Säulen:

Analytisch/semipräparativ:

Säule A: (Standardsäule 1 für HPLC-ESI-MS) Grom Superspher-100 RP-18, endcapped, 100 x 2 mm, 4 µm, mit Vorsäule: Grom Superspher 100 RP-18, endcapped, 10 x 2 mm, 4 µm, Flussrate: 0.3 mL/min.

Säule B: (Standardsäule 2 für HPLC-ESI-MS) *Dr. Maisch* Nucleosil 100 C18, 100 x 2 mm, 3 µm, mit Vorsäule. Flussrate: 0.3 mL/min.

Säule C: *Jasco* oder *Dr. Maisch* Kromasil-100 C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule D: *Jasco* oder *Dr. Maisch* Kromasil-100 C18, 250 x 8 mm, 5 µm, Flussrate: 2.5 mL/min.

Säule E: *Knauer* Eurospher II 100 C18a, 250 x 4 mm, 5 µm, mit Vorsäule, Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule F: *Knauer* Eurospher II 100 C18a, 250 x 8 mm, 5 µm, mit Vorsäule, Flussrate: 2.5 mL/min.

Säule G: *Macherey-Nagel* Nucleodur Sphinx RP, 250 x 3 mm, 5 µm, mit Vorsäule, Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule H: *Macherey-Nagel* Nucleodur Sphinx RP, 250 x 8 mm, 5 µm, mit Vorsäule, Flussrate: 2.5 mL/min.

Säule I: *Macherey-Nagel* Nucleosil 100 C8, 250 x 3 mm, 5 µm, mit Vorsäule. Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule J: *Macherey-Nagel* Nucleodur 100 C18ec, 250 x 3 mm, 5 µm, mit Vorsäule. Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule K: *Macherey-Nagel* Nucleodur Pyramid C18, 250 x 3 mm, 5 µm, mit Vorsäule. Flussrate: 0.5 mL/min.

Säule L: *Grom* Saphir 110 C8, 100 x 2 mm, 5 µm, mit Vorsäule.
Flussrate: 0.3 mL/min.

Präparativ:

Säule M: *Jasco* Kromasil-100 C18, 250 x 20 mm, 5 µm, Flussrate: 18.0 mL/min.

Säule N: *Dr. Maisch* Kromasil-100 C18, 250 x 20 mm, 7 µm.

Säule O: *Macherey-Nagel* Nucleodur 100 C18ec, 250 x 20 mm, 5 µm.

Programme für die HPLC (analytisch):

Programm A: (Standardprogramm 1 für die Analytik) Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm B: Gradient: von 30 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 30 % B in 2 min, 8 min bei 30 % B.

Programm C: Gradient: von 40 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 40 % B in 2 min, 8 min bei 40 % B.

Programm D: Gradient: von 50 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 50 % B in 2 min, 8 min bei 50 % B.

Programm E: Gradient: von 40 % auf 70 % B in 20 min, 10 min bei 70 % B, von 70 % auf 40 % B in 2 min, 8 min bei 40 % B.

Programm F: Gradient: von 30 % auf 60 % B in 20 min, 10 min bei 60 % B, von 60 % auf 30 % B in 2 min, 8 min bei 30 % B.

Programm G: Gradient: von 60 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 60 % B in 2 min, 8 min bei 60 % B.

Programm H: Gradient: 20 min bei 20 % B, in 5 min auf 100 % B, 8 min bei 100 % B, in 2 min auf 20% B, 5 min bei 20 % B.

Programm I: Gradient von 0% auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B.

1.2 Mikrobiologische Methoden und Geräte

Alle mikrobiologischen Arbeiten wie Stammhaltung, Überimpfen und Fermentation wurden unter den hier üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nährmedienbestandteile:

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acros: Stärke löslich

Applichem: Gellan

BD: Bacto Trypton, Bacto Soyton

Carl Roth: Agar, Glycerin, Hefeextrakt, Huminsäure (Natriumsalz, 45 – 65%)

EMC microcollections: Desferricoprogen

Fluka : Malzextrakt, Vegetable Extract No. 1, Vegetable Peptone

Henselwerk GmbH: Sojamehl fettarm

Merck: Casein Pepton, Fleischextrakt

Riedel-de Häen: D-Mannitol

Sigma-Aldrich: D-Glucose, N-Z-Amin-A, Vitamin-Lsg. RPMI-1640.

Verwendete Nährmedien:

Die Nährmedien wurden mit Leitungswasser angesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden jeweils 20 g/L Agar zugesetzt. Nach Einstellen des pH-Werts mit 0.5 bzw 1 M HCl und 0.5 bzw. 1 M NaOH wurde für 30 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

SM (Soja/Mannit): Soja-Mehl fettarm 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH = 7.0.

M2 (Medium 2): Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, D-Glucose 4 g/L, pH = 7.0.

NL14: D-Glucose 3 g/L, Casein-Pepton 10 g/L, Natriumchlorid 5 g/L, Calciumcarbonat 10 g/L, pH = 7.2.

KM1: Casein-Pepton 5 g/L, Fleischextrakt 3 g/L Natriumchlorid 5 g/L, 1.0 L deion. Wasser pH = 7.0.

CPI: Stärke 20 g/L, D-Glucose 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, N-Z-Amin[®]-A 5 g/L, Calciumcarbonat 1 g/L, Cobaltchlorid Hexahydrat 2 mg/L, pH = 7.3.

CPM: Stärke 20 g/L, Mannit 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, N-Z-Amin[®]-A 5 g/L, Calciumcarbonat 1 g/L, Cobaltchlorid Hexahydrat 2 mg/L, pH = 7.3.

TSB: Bacto Trypton 17 g/L, Bacto Soyton 3 g/L, D-Glucose 1 g/L, Natriumchlorid 5 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 2.5 g/L, 1.0 L deion. Wasser, pH = 7.3.

GAUZE-Medium: Stärke löslich 20.0 g/L, Kaliumnitrat 1.00 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 1.33 g/L, Natriumcitrat 170 mg, Magnesiumsulfat Heptahydrat 1.20 g/L, pH = 7.2.

Stammhaltung:

Für die Kultivierung der Stämme wurden Agarplatten der Nährmedien SM bzw. M2 verwendet. Nach dem Beimpfen wurde für 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Bewachsene Agarplatten wurden mit Verschlussfolie (Brand Parafilm® M) verschlossen und bei 4 °C für maximal 4 Monate gelagert.

Verwendete Geräte:

Schüttler:

Braun Inkubationsschüttelschrank BS-4, *Braun* Certomat® RM, *Braun* Certomat®U+HK, *Braun* Certomat® BS-1.

Autoklaven:

Fedegari FSV II, *Thermo Scientific* Varioklav 135S

Fermenter:

Braun Biostat B (5 L, AK PROF. GROND) und *Braun* Biostat E (10 L, AK PROF. FIEDLER) mit *Ingold* O₂-Elektrode.

Weitere Geräte

Tischzentrifuge *Eppendorf* Typ 5415D; Zentrifuge *Sigma* 4K15; Vakuumzentrifuge *Eppendorf* Concentrator 5301; Flowbox *Thermo SCIENTIFIC* MSC-ADVANTAGE; UV-Lampe *Schütt Labortechnik*; Ultraschallbad *Qualilab*; Fraktionssammler *Pharmacia Biotech* RediFrac; Evaporator *Biotage* V-10 mit EV10 Karussell ; Gefriertrocknung: *Christ* Beta 2-8 LD plus; *Christ* LOC 2m (AK PROF. DR. NACHTSHEIM); Rotationsverdampfer *Büchi* R-200 mit V-800 Vakuumcontroller, *Büchi* R-215 mit V-855 Vakuumcontroller und V-700 Vakuumpumpe.

2 Collinolacton-Produktion aus *Streptomyces sp. Gö 40/10*

2.1 Stammhaltung

Die SM-Agarplatten wurden mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und bei 28°C für 5 Tage inkubiert. Frisch inkubierte Platten wiesen weißes Luftmycel auf, welches sich bei Lagerung durch Sporenbildung grau färbte. Die Platten wurden bei 4°C nicht länger als 4 Monate gelagert.

2.2 Standard-Vorkulturen

Vorkulturen wurden in 250 mL Erlenmeyer-Kolben mit drei Schikanen und Schaumstoffkappe bei 28°C und 250 rpm für 48 h kultiviert. Die Schüttelkolben enthielten 100 mL SM Medium und wurden mit ca. 1/10 einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes *Streptomyces sp. Gö 40/10* beimpft.

2.3 Standardkultivierung in Schüttelkolben

Hauptkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und 150 mL SM-Medium bei 28°C und 250 rpm durchgeführt. Diese wurden mit jeweils 10 mL einer 48 h alten Standard-Vorkultur inokuliert und 72 h kultiviert. Nach 24 h wurde jedem Kolben ca. 7 g steriles, feuchtes Amberlite® XAD-16 in wenig sterilem Wasser zugesetzt.

2.4 Kultivierung in Fermentern

2.4.1 Rührkesselfermenter (5 L) mit XAD-16⁵

4 L SM-Medium wurden mit 400 mL einer 48 h alten Standard-Vorkultur angeimpft und 72 h bei 28°C und 300 rpm kultiviert. Nach 24 h wurde Amberlite® XAD-16 (150 g) zugesetzt.

2.4.2 Rührkesselfermenter (5 L) mit Sauerstoffzufuhr und XAD-16⁵

4 L SM-Medium wurden mit 400 mL einer 48 h alten Standard-Vorkultur angeimpft und 72 h bei 28°C und 300 rpm kultiviert. Nach 24 h wurde Amberlite® XAD-16 (150 g) zugesetzt. Während der gesamten Kultivierung wurde mit Sauerstoff angereicherte Luft eingeleitet (1 - 4 vvm, angestrebter O₂-Gehalt 35-40%), wobei der Sauerstoffgehalt über das Reduzierventil der Sauerstoffflasche geregelt wurde.

2.4.3 Rührkesselfermenter (10 L)⁶

Die zweite Vorkultur wurde in 1 L Erlenmeyer-Kolben mit drei Schikanen und Schaumstoffkappe bei 28°C und 250 rpm für 48 h kultiviert. Schüttelkolben enthielten 150 mL SM Medium und wurden mit 7.5 mL einer ersten 48 h alten Standard-Vorkultur angeimpft.

Hauptkulturen wurden parallel in drei identischen 10 L Fermentern angezogen. Pro Fermenter wurden 8.33 L CP1-Medium mit jeweils 450 mL der 2. Vorkultur beimpft, 1 mL Antischaum zugegeben und 72 h bei 28°C und 200 rpm kultiviert. Die Sauerstoffzufuhr wurde auf 3 L/min geregelt. Nach 24 h wurde jedem Fermenter Amberlite® XAD-16 (133 g) zugegeben.

⁵ Diese Fermentation wurde in Zusammenarbeit mit FABIAN SCHMITT durchgeführt ^[178]

⁶ Fermentation erfolgte im AK PROF DR. FIEDLER in Zusammenarbeit mit Dipl. Ing. (FH) ANDREAS KULIK und MARTIN KONNERTH. Ich danke PROF. FIEDLER für die Bereitstellung des Fermenters und ANDREAS KULIK für die Hilfe bei der Fermentation.

2.5 Optimierung des Nährmediums⁷

Hauptkulturen wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und 100 mL Medium (s. Tabelle 7, Acetatzugabe 0.5 g/L) bei 28°C und 250 rpm durchgeführt. Diese wurden mit jeweils 5 mL einer 48 h alten Standard-Vorkulturinokuliert und 48 h kultiviert. Nach 24 h wurde Amberlite® XAD-16 (10 g pro Kolben) zugesetzt. Zwei Kolben mit SM-Medium wurden sofort nach ihrer Beimpfung mit Amberlite® XAD-16 versetzt.

Kultur	Anzahl Ansätze	Acetatzugabe	XAD-16 Zugabe	pH-Wert 48 h	Trockenes Extrakt [mg]
SM	2	+	sofort	7.4	9.3
SM	2	-	sofort	7.1	10
SM	2	+	24 h	6.9	5.4
SM	2	-	24 h	7.1	6.4
NL 14	2	+	24 h	9.0	3.4
NL 14	2	-	24 h	9.0	3.9
KM 1	2	+	24 h	8.5	2.0
KM 1	2	-	24 h	8.5	3.9
CPI	2	+	24 h	7.4	3.3
CPI	2	-	24 h	6.7	4.4
TSB	2	+	24 h	9.0	5.0
TSB	2	-	24 h	8.5	4.1
Gauze	2	+	24 h	6.6	3.1
Gauze	2	-	24 h	6.5	2.6

Tabelle 7: Parameter der Medienoptimierung für *Streptomyces sp. Gö 40/10*. Ein Ansatz entspricht 400 mL.

⁷ Optimierung erfolgte in Zusammenarbeit mit MARTIN KONNERTH^[178].

2.6 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung (s. Abb. 58A) erfolgte für Fermenter und Schüttelkolben nach derselben Methode. Die Kulturbrühe wurde mit Celite versetzt (4 Esslöffel/L) und filtriert. Im Kulturfiltrat konnte dünnschichtchromatographisch kein Collinolacton (**20a**, **20b**) nachgewiesen werden, es wurde nur der Mycel-Rückstand weiterverwendet. Dieser wurde mit Aceton (3 × 500 ml/L Fermentationsansatz) im Ultraschallbad für 15 min extrahiert und die organischen Phasen am Vakuum eingengt. Die vollständige Trocknung des Rohproduktes erfolgte durch Lyophilisierung.

2.7 Chromatographische Aufreinigung

Die chromatographische Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton = 3:2), Kieselgel-Flashchromatographie (MPLC B, Diisopropylether (A)/ Aceton (B), Si 35, 5 min bei 2% B, in 5 min auf 8% B, 10 min bei 8% B, in 5 min auf 16% B, 10 min bei 16% B, in 5 min. auf 25% B, 10 min bei 25% B, in 5 min auf 32% B, 10 min bei 32% B) und RP-18-Flashchromatographie (MPLC B, Wasser (A)/Methanol (B), LOBAR C, 10 min bei 35% B, in 2 min auf 50% B, 8 min bei 50% B, in 2 min auf 70% B, 30 min bei 70% B) (s. Abb. 58B-C).

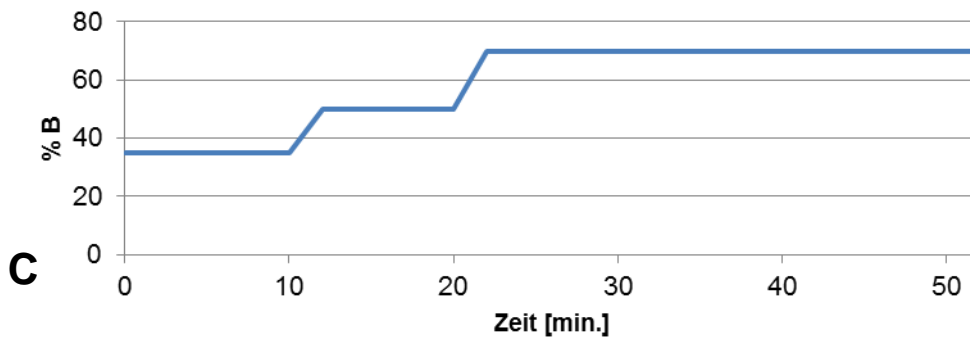
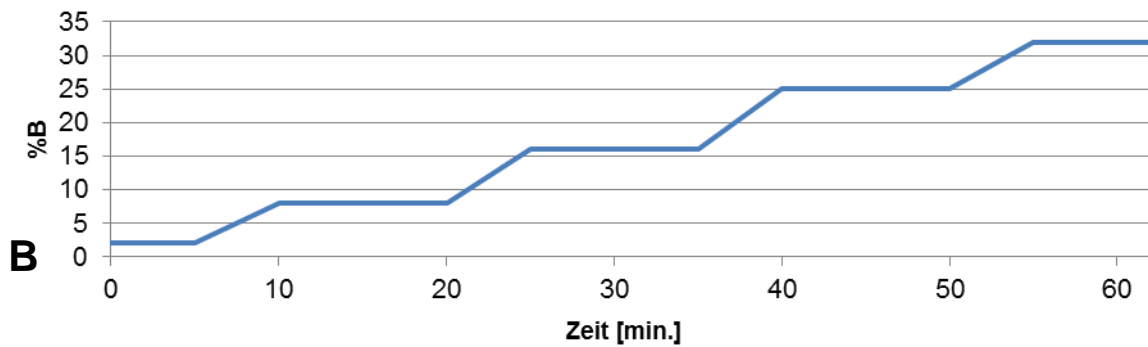
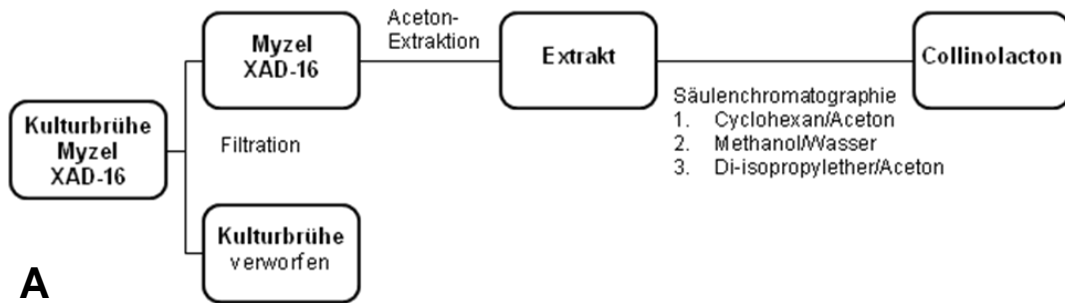


Abb. 58: (A) Aufarbeitungsschema: Aufreinigung von Collinolacton (**20a**, **20b**) aus Kultivierungen von *Streptomyces* sp. Gö40/10. (B) Stufengradient der Kieselgel-Flashchromatographie mit Di-isopropylether (A)/ Aceton (B). (C) Stufengradient der RP18-Flashchromatographie mit Wasser (A)/Methanol (B).

3 Alternative Screeningmethoden für neue Antibiotika aus seltenen Actinomyceten

Verwendete Nährmedien:

Zur Herstellung von Gellan-Platten wurden 8 g/L Gellan und zur Herstellung von Agarplatten jeweils 20 g/L Agar zugesetzt. Nach Einstellen des pH-Werts mit 0.5 bzw 1 M HCl und 0.5 bzw. 1 M NaOH wurde für 30 min bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf 1 L Leitungswasser.

HVG+ (Humin-Vitamin-Gellan +): Natrium-Humat (gelöst in 10 mL 0.2 N NaOH) 1.0 g, Natriumhydrogenphosphat 0.5 g, Kaliumchlorid 1.71 g, Magnesiumsulfat-heptahydrat 50.0 mg, Eisen(II)sulfat-heptahydrat 10.0 mg, Calciumchlorid-dihydrat 88.2 mg, Selen/Wolfram-Lösung 1.0 mL, Spurenelement-Lsg. SL-10 1.0 mL. pH = 7.2, Nach dem Autoklavieren wurden steril zugegeben: Desferricoprogen (1 mg/mL in Wasser) 4 µL, Vitamin-Lsg. RPMI-1640 (1 x) 1 mL.

DNBG+ (Difco Nutrient Broth Gellan +): Vegetable Extract No. 1 30.0 mg, Vegetable Peptone 50.0 mg, Calciumchlorid-dihydrat 88.2 mg, Selen/Wolfram-Lösung 1.0 mL, Spurenelement-Lsg. SL-10 1.0 mL. pH = 6.8, Nach dem Autoklavieren wurden steril zugegeben: Desferricoprogen (1 mg/mL in Wasser) 4 µL, Vitamin-Lsg. RPMI-1640 (1 x) 1 mL.

Selen-Wolfram-Lösung: Natriumhydroxid 0.5 g in 10 mL deion. Wasser, Natriumselenit 2.0 mg, Natriumwolframat dihydrat 4.0 mg, auf 1 L mit deion. Wasser auffüllen.

Spurenelement-Lösung SL-10: Eisen(II)chlorid 1.50 g in 10 mL Salzsäure (25% in Wasser) lösen, auf 1 L mit deion. Wasser auffüllen, Zink(II)chlorid 70.0 mg, Mangan(II)chlorid dihydrat 0.10 g, Borsäure 6.0 mg, Kobalt(II)chlorid hexahydrat

0.19 g, Kupfer(II)chlorid dihydrat 2.0 mg, Nickel(II)chlorid hexahydrat 24.0 mg, Natriummolybdat dihydrat 36.0 mg.

KM4G (KM4-Gellan): Hefeextrakt 4.0 g, Malzextrakt 10.0 g, Glucose 4.0 g, Calciumchlorid dihydrat 88.2 mg, pH = 7.3.

SM (Soja/Mannit): Sojamehl fettarm 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH = 7.0.

Antibiotika-Lösung: 1:1:1 Mischung aus 1.5 mg/mL Nalidixinsäure in 150 mM Natriumhydroxid-Lsg., 2.5 mg/mL Cycloheximid in Methanol, 2.5 mg/mL Nystatin in Methanol.

SFM (Soybean Flour Medium): Hefeextrakt 5 g/L, Sojamehl (fettarm) 5 g/L, Dikaliumhydrogenphosphat 5 g/L, Natriumchlorid 5 g/L, Glycerin 20 g/L, deion. Wasser 1L.

Erdprobenaufbereitung:

15 Erdproben von verschiedenen Standorten wurden bearbeitet. 1 g Erdprobe wurde in 100 mL sterilem, deion. Wasser suspendiert und 15 min. im Ultraschallbad behandelt. Der Überstand wurde unter sterilen Bedingungen jeweils 1:10 auf Verdünnungsstufen 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} verdünnt.

Kultivierung:

Jede Erdprobe wurde auf zwei Nährmedien (HVG+ und DNBG+) kultiviert. Pro Nährmedium wurden die Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-5} auf einem Filterpapier (*Sartorius Stedim* Cellulose Nitrate Filter, 0.2 μ m Porengröße) aufgetragen verwendet sowie 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} ohne Filterpapier. Alle Platten einer Erdprobe wurden zusammen in einem Plastikbeutel (*Neolab*) verpackt und bei 28°C 13 Wochen inkubiert.

Selektion:

Aufgrund üppigen Pilz und Hefenwachstums wurden nur morphologisch erkennbare Actinomyceten sowie interessante, kleinwachsende Kolonien auf KM4G-Platten überimpft. Dieselbe Kolonie wurde jeweils auf einer Platte mit Antibiotika (Nystatin 50 mg/mL, Cycloheximid 50 mg/mL und Nalidixinsäure 20 mg/mL) und auf einer Platte mit Filterpapier (*Sartorius Stedim* Cellulose Nitrate Filter, 0.2 µm Porengröße) 8 Tage bei 28°C kultiviert.

Von diesen Platten wurden Kolonien von Interesse erneut auf SM-Agar (Overlay mit 500 µL Antibiotika-Lösung) vereinzelt und 6-8 Tage bei 28°C kultiviert.

Flüssigkultivierung:

Es wurden 5 x je 100 mL SFM-Medium in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikannen mit einem ca. 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte von TÜFJ-4-B4.1b inokuliert. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 28°C und 180 U/min für 96 h.

Aufarbeitung:

Die Kulturbrühen aller Kolben wurden vereinigt und zentrifugiert (4500 U/min, 15 min). Das Mycel wurde im Ultraschallbad mit Aceton/Methanol (7:3) aufgeschlossen (2 x 250 mL) und der Extrakt *in vacuo* bis zur Trockene eingengt. Das Kulturfiltrat wurde mit 1 N HCl auf pH = 5 eingestellt und an Amberlite XAD-2 (100 mL) adsorbiert. Das Adsorberharz wurde mit 50-100 mL Wasser gewaschen, die adsorbierten Substanzen mit Methanol (200 mL) eluiert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Biologisches Screening:

Da Kulturfiltrat und Myceleextrakt ein ähnliches Metabolitenmuster aufwiesen, wurden diese vereinigt und über Sephadex-LH20 (Methanol, 100 cm x 3 cm)

fraktioniert. Fraktionen mit ähnlichem Metabolitenmuster wurden vereinigt und die Aktivität der Fraktionen in einem Agardiffusionstest (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mucor hiemalis*, *Rhodotorula rubra*) auf antibiotische Wirkung getestet (s. Tabelle 8). Gegen *E. coli*, *M. hiemalis*, *R. rubra* konnte keine antibiotische Wirkung festgestellt werden.

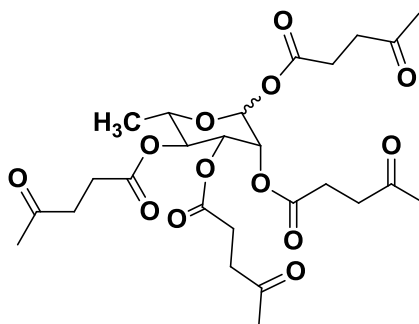
Fraktion	Hemmhof [cm]	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. Aureus</i>
L5	1.5	1.2
L7	1.8	1.3
Vancomycin	3.0	1.7
Ampicillin	3.0	2.3
Chloramphenicol	3.5	2.0

Tabelle 8: Antibiotische Eigenschaften von Sephadex-LH20-Fraktionen des Kulturextrakts von FJ-4-B4.1. Hemmhöfe in cm.

Aktive Fraktionen L5 und L7 wurden mittels HPLC (HPLC G, Kromasil, Methanol/Wasser, Programm F) weiter fraktioniert und die Fraktionen bzw. Reinstoffe erneut in einem Agardiffusionstest untersucht. Es konnte keine Aktivität der vorhandenen Fraktionen festgestellt werden.

4 Synthesestudien zu Collinolacton- Glykosiden

4.1 Synthese von 1,2,3,4-Tetra-O-lävulinoyl-L-rhamnopyranosid (40)



$C_{26}H_{36}O_{13}$ (556,56)

40

L-Rhamnose Monohydrat (**39**, 273 mg, 1.50 mmol, 1.0 Eq.) wurde azeotrop vortrocknet (1 x Acetonitril p.A., 2 x Ethanol p.A.) und am HV getrocknet. Unter Argonatmosphäre wurden abs. DCM (5 mL), EDC (1.44 g, 7.50 mmol, 5.0 Eq.), DMAP (97.1 mg, 0.76 mmol, 0.5 Eq.) und Lävulinsäure (871 mg, 7.50 mmol, 5.0 Eq.) zugegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL) und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (4 x 25 mL) gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$, Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton = 1:1) erhielt man ein farbloses Öl (653.8 mg, 0.95 mol, 63 %, α/β = 6:5).

R_f -Wert: 0.35 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) m/z = 579.2 $[M+Na]^+$, 1135.4 $[2M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet) m/z = 579.2048 $[M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) m/z = 579.2049 $[M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) m/z = 573.2 $[M+H_2O-H]^-$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, **α-Anomer**) δ = 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, 5-CH₃), 2.12 - 2.23 (m, 12H, Lev-5'-H₃), 2.53 – 2.88 (m, 16H, Lev-2'-H₂, 3'-H₂), 3.53 - 3.73 (m, 1H, 5-H), 5.10 (dd, *J* = 10.0 Hz, 1H, 4-H), 5.21 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, 2-H), 5.29 (dd, *J* = 10.2, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.96 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 1-H).

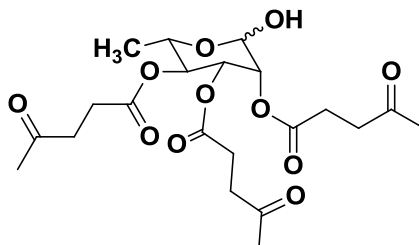
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, **α-Anomer**) δ = 17.58 (5-CH₃), 27.94, 28.07 (4 x Lev-C-2')*, 29.91, 29.93, 29.97, 30.01 (4 x Lev-C-5')*, 37.76, 37.87, 37.89, 37.94, 37.98 (4 x Lev-C-3')*, 68.90 (C-3, C-5), 70.45 (C-4), 70.63 (C-2), 90.89 (C-1), 170.32, 170.43, 171.45, 171.64, 171.79, 171.85 (4 x Lev-COOR)*, 205.90, 205.96, 206.00, 206.30, 206.43, 206.49 (4 x Lev-CO)*.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, **β-Anomer**) δ = 1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, 5-CH₃), 2.12 - 2.23 (m, 12H, Lev-5'-H₃), 2.53 – 2.88 (m, 16H, Lev-2'-H₂, 3'-H₂), 3.96 (dq, *J* = 9.6, 6.0 Hz, 1H, 5-H), 5.03 – 5.07 (m, 2H, 4-H, 3-H), 5.38 – 5.46 (m, 1H, 2-H), 5.79 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, 1-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, **β-Anomer**) δ = 17.50 (5-CH₃), 27.94, 28.07 (4 x Lev-C-2')*, 29.91, 29.93, 29.97, 30.01 (4 x Lev-C-5')*, 37.76, 37.87, 37.89, 37.94, 37.98 (4 x Lev-C-3')*, 68.69 (C-5), 68.90 (C-3), 70.31 (C-4), 71.66 (C-2), 90.74 (C-1), 170.32, 170.43, 171.45, 171.64, 171.79, 171.85 (4 x Lev-COOR)*, 205.90, 205.96, 206.00, 206.30, 206.43, 206.49 (4 x Lev-CO)*.

*Es konnte keine genauere Zuordnung getroffen werden.

**1.1 Synthese von 2,3,4-Tri-O-lävulinoyl-L-rhamnopyranosid^[203]
(41)**



C₂₁H₃₀O₁₁ (458,46)

41

40 (22.5 mg, 40.4 μmol) in PBS-Puffer (3 mL, pH = 7,4, 13 % V/V DMF) wurde mit Porcine Pancreas Lipase (200 mg) versetzt und 15 h bei 37°C gerührt. Es wurde mit Ethylacetat auf 10 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels erhielt man das Produkt (12.0 mg, 20.3 μmol, 50 %, α/β = 2:5).

R_F-Wert: 0.67 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

Anfärbeverhalten: grün-gelb-bräunlich (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 481.2 [M+Na]^+$, $939.4 [2M+ Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet) $m/z = 481.1680 [M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) $m/z = 481.1681 [M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 457.2 [M-H]^-$, $915.3 [2M-H]^-$, $1373.5 [3M-H]^-$.

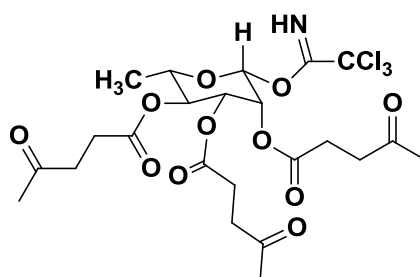
HR-ESI-MS: (negative Ionen, berechnet) $m/z = 457.1715 [M-H]^-$.

HR-ESI-MS: (negative Ionen, gefunden) $m/z = 457.1711 [M-H]^-$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, α-Anomer) δ = 1.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 5-CH₃), 2.11-2.23 (m, 9H, Lev-5'-H₃), 2.36 – 2.88 (m, 12H, Lev-2'-H₂, Lev-3'-H₂), 3.56 (dq, $J = 8.4, 5.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.89 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, 1-H), 4.93 – 5.07 (m, 1H, 3-H, 4-H), 5.37 (m, 1H, 2-H).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, **β-Anomer**) δ = 1.21 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, 5-CH₃), 2.11 - 2.23 (m, 9H, Lev-5'-H₃), 2.36 – 2.88 (m, 12H, Lev-2'-H₂, Lev-3'-H₂), 4.11 (dq, *J* = 9.8, 6.3 Hz, 1H, 5-H), 5.04 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 4-H), 5.12 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 1-H), 5.22 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H, 2-H), 5.35 (dd, *J* = 10.2, 3.4 Hz, 1H, 3-H).

1.2 Synthese von *O*-(2,3,4-Tri-*O*-lävulinoyl-β-L-rhamnopyranosyl)-trichloracetimidat^[204] (**42**)



C₂₃H₃₀Cl₃NO₁₁ (602,84)

42

41 (62.7 mg, 0.137 mmol, 1.0 Eq.) und Kaliumcarbonat (0.500 g, 3.62 mmol, 26 Eq.) wurden im HV getrocknet, mit abs. Dichlormethan (2 mL) und Trichloracetoneitril (0.500 mL, 4.99 mmol, 36 Eq.) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Aceton = 1:1) gereinigt (76.1 mg, 0.126 mmol, 92 %)

R_f-Wert: 0.44 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

Anfärbeverhalten: grün-gelb-bräunlich (Anisaldehyd)

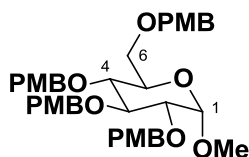
HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet) *m/z* = 624.0777 [M(³⁵Cl₃)+Na]⁺, 626.0749 [M(³⁵Cl₂, ³⁷Cl₁)+ Na]⁺, 628.0719 [M(³⁵Cl₁, ³⁷Cl₂)+ Na]⁺.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) *m/z* = 624.0774 [M(³⁵Cl₃)+Na]⁺, 626.0749 [M(³⁵Cl₂, ³⁷Cl₁)+ Na]⁺, 628.0732 [M(³⁵Cl₁, ³⁷Cl₂)+ Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, 5-CH₃), 2.14 – 2.22 (m, 12H, Lev-CH₃), 2.38 – 2.88 (m, 16H, Lev-2'-H₂, Lev-3'-H₂), 4.07 (dq, *J* = 10.2, 6.2 Hz, 1H, 5-H), 5.15 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 4-H), 5.36 (dd, *J* = 10.1, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.41 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, 2-H), 6.17 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, 1-H), 8.71 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 17.62 (5-CH₃), 27.93, 28.06, 28.09 (3 x Lev-C-2'), 29.90, 29.94, 29.99 (3 x Lev-C-5'), 37.85, 37.95, 37.98 (3 x Lev-C-3'), 68.44 (C-5), 68.85 (C-2), 69.48 (C-4), 70.30 (C-3), 90.75 (CCl₃), 94.68 (C-1), 159.92 (CONH), 171.49, 171.74, 171.91 (3 x Lev-COOR), 205.90, 206.32, 206.43 (3 x Lev-CO).

4.2 Synthese von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-(*p*-methoxybenzyl)- α -D-glucopyranosid (45)



C₃₉H₄₆O₁₀ (674,78 g/mol)

45

Natriumhydrid (156 mg, 6.50 mmol, 4.2 Eq.) in abs. DMF (3 ml) wurde bei 0°C langsam zu einer Lösung aus α -D-Methylglucose (**44**, 300 mg, 1.55 mmol, 1.0 Eq.) und *p*-Methoxybenzylchlorid (838 μ L, 6.18 mmol, 4.0 Eq.) in abs. THF (5 mL) zugetropft. Nach Erwärmen auf RT wurde 3 h bei 80°C gerührt. Es wurde mit Cyclohexan auf 50 mL aufgefüllt und mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (4 x 20 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (4 x 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (4 x 20 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄, Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1) erhielt man ein gelbes Öl (504 mg, 0.75 mol, 48 %).

R_F-Wert: 0.53 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

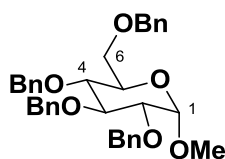
Anfärbeverhalten: rotbraun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 697.30 [M+ Na]^+$, $713.27 [M+K]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2) $\delta = 3.36$ (s, 3H, 1-OMe), 3.49 (dd, $J = 9.7, 3.6$ Hz, 1H, 6- H_a), 3.52 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, 6- H_b), 3.57 – 3.62 (m, 1H, 4-H), 3.64 – 3.71 (m, 3H, 2-H, 3-H, 5-H), 3.76 – 3.82 (m, 12H, 4 x PMB-OMe), 4.37 – 4.42 (m, 2H, PMB- CH_2), 4.51 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, PMB- CH_2), 4.58 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, PMB- CH_2), 4.63 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, 1-H), 4.68 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, PMB- CH_2), 4.70 – 4.75 (m, 2H, PMB- CH_2), 4.85 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, PMB- CH_2), 6.78 – 6.90 (m, 6H, PMB-4'-H, 6'-H), 7.05 – 7.11 (m, 2H, PMB-4'-H, 6'-H), 7.23 – 7.31 (m, 8H, PMB-3'-H, 7'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_2Cl_2) $\delta = 55.65$ (PMB- OCH_3), 55.87 (PMB- OCH_3), 55.89 (PMB- OCH_3), 55.90 (PMB- OCH_3), 58.93 (1- OCH_3), 69.05 (C-6), 70.77 (C-5), 73.34 (PMB-C-1'), 73.58 (PMB-C-1'), 75.11 (PMB-C-1'), 75.75 (PMB-C-1'), 78.16 (C-4), 80.47 (C-3), 82.32 (C-2), 98.68 (C-1), 114.18 (PMB-C-4', C-6'), 114.21 (PMB-C-4', C-6'), 114.26 (PMB-C-4', C-6'), 114.31 (PMB-C-4', C-6'), 129.95 (PMB-C-3', C-7'), 130.06 (PMB-C-3', C-7'), 130.12 (PMB-C-3', C-7'), 130.81 (PMB-C-2'), 131.08 (PMB-C-2'), 131.29 (PMB-C-2'), 131.83 (PMB-C-2'), 159.66 (PMB-C-5'), 159.71 (PMB-C-5'), 159.79 (PMB-C-5'), 159.89 (PMB-C-5').

4.3 Synthese von Methyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-glucopyranosid^[204] (48)



$\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (554,67)

48

α -D-Methylglucose (**44**, 1.00 g, 5.15 mmol) wurde mit Benzylchlorid (30 mL) und Natriumhydrid (1.80 g, 75.0 mmol) versetzt und 3 h bei 110°C gerührt. Die Reaktionssuspension wurde filtriert, das restliche Benzylchlorid *in vacuo* entfernt und säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1, 24 x 5 cm Kieselgel)

aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als leicht gelbliches Öl (2.01 g, 3.62 mmol, 70%)

R_F-Wert: 0.58 (Cyclohexan/Aceton = 3:1)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 577.3$ [M+ Na]⁺, 1131.7 [2M+Na]⁺.

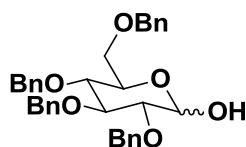
HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet) $m/z = 577.2561$ [M+ Na]⁺, 578.2594 [M(¹³C₁)+ Na]⁺, 579.2628 [M(¹³C₂)+ Na]⁺.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) $m/z = 577.2552$ [M+ Na]⁺, 578.2585 [M(¹³C₁)+ Na]⁺, 579.2613 [M(¹³C₂)+ Na]⁺.

¹H-NMR (301 MHz, CDCl₃) $\delta = 3.37$ (s, 3H, OMe), 3.55 (dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz, 1H, 6-H_a), 3.59 – 3.78 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H_b), 3.92 – 4.03 (m, 1H, 2-H), 4.39 – 5.02 (m, 9H, Bn-CH₂; 1-H), 7.08 – 7.42 (m, 20H, Bn-CH).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) $\delta = 55.32$ (OMe), 68.65 (C-6), 70.20 (C-5), 72.25, 73.52, 73.62, 75.15 (4 x Bn-CH₂), 77.81 (C-4), 79.98 (C-3), 82.26 (C-2), 98.31 (C-1), 127.62, 127.67, 127.69, 127.72, 127.82, 127.89, 127.94, 128.01, 128.18, 128.36, 128.39, 128.40, 128.43, 128.44, 128.49, 128.61, 128.77 (20 x Bn-CH), 137.96, 138.21, 138.31, 138.84 (4 x Bn-C-2').

4.4 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-glucopyranosid^[54] (49)



C₃₄H₃₆O₆ (540,65)

49

48 (986.0 mg, 1.78 mmol) in Essigsäure (25 mL, 80% in H₂O) wurde mit 1 M Schwefelsäure (6.25 mL) versetzt und 24 h unter Reflux erhitzt. Die Reaktionslösung wurde zu Natriumacetat in Eiswasser gegeben und weiteres Natrium-

acetat bis zur Neutralisation zugegeben. Es wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand in kaltem Wasser (130 mL) aufgenommen und mit Diethylether (3 x 50 mL) und Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 50 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Umkristallisation (Cyclohexan/Diethylether 1:1) erhielt man das Produkt als weiße Kristalle (81.8 mg, 0.151 μmol , 9%, $\alpha/\beta = 1:2$)

R_f-Wert: 0.24 (Cyclohexan/Aceton = 4:1)

0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 563.2 [M+ Na]^+$, $579.2 [M+K]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet) $m/z = 563.2404 [M+ Na]^+$, $564.2438 [M(^{13}C_1)+ Na]^+$, $565.2471 [M(^{13}C_2)+ Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) $m/z = 563.2406 [M+ Na]^+$, $564.2438 [M(^{13}C_1)+ Na]^+$, $565.2460 [M(^{13}C_2)+ Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 585.3 [M+HCOO]^-$.

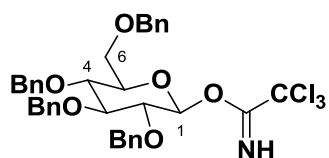
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂), **α -Anomer:** $\delta = 1.63$ (s, 1H, OH), 3.35 (dd, $J = 8.8$, 7.8 Hz, 1H, 6-H_a), 3.44 – 3.75 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H_b), 4.01 (ddd, $J = 10.0$, 4.1, 2.0 Hz, 1H, 2-H), 4.43 – 4.98 (m, 8H, Bn-CH₂), 5.27 (dd, $J = 4.2$, 1.4 Hz, 1H, 1-H), 7.13 – 7.46 (m, 20H, Bn-CH).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **α -Anomer:** $\delta = 69.68$ (C-6), 73.92 (Bn-CH₂), 75.03 (C-5), 75.21 (Bn-CH₂), 75.40 (Bn-CH₂), 75.95 (Bn-CH₂), 78.36 (C-4), 83.77 (C-2), 85.06 (C-3), 98.04 (C-1), 128.01, 128.11, 128.16, 128.19, 128.38, 128.41, 128.43, 128.46, 128.48, 128.51, 128.59, 128.80, 128.87, 128.90, 128.95 (20 x Bn-CH), 138.67, 138.93, 139.25, 139.40 (4 x Bn-C-2').

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **β-Anomer**: δ = 1.63 (s, 1H, OH), 3.44 – 3.75 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H₂), 3.92 (dd, *J* = 9.2, 9.2 Hz, 1H, 2-H), 4.43 – 4.98 (m, 9H, Bn-CH₂; 1-H), 7.13 – 7.46 (m, 20H, Bn-CH).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **β-Anomer**: δ = 69.59 (C-6), 70.91 (C-5), 73.48, 73.83, 75.39, 75.95 (4 x Bn-CH₂), 78.36 (C-4), 80.87 (C-2), 82.09 (C-3), 91.58 (C-1), 128.01, 128.11, 128.16, 128.19, 128.38, 128.41, 128.43, 128.46, 128.48, 128.51, 128.59, 128.80, 128.87, 128.90, 128.95 (20 x Bn-CH), 138.71, 138.80, 139.12, 139.55 (4 x Bn-C-2').

4.5 Synthese von **O-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-β-D-glucopyranosyl)-trichloracetimidat**^[205] (**50**)



C₃₆H₃₆Cl₃NO₆ (685,03)

50

49 (27.9 mg, 51.6 μmol, 1.0 Eq.) und Kaliumcarbonat (0.300 g, 2.17 mmol, 42 Eq.) wurden im HV getrocknet, mit abs. Dichlormethan (2 mL) und Trichloracetonitril (0.30 mL, 2.99 mmol, 58 Eq.) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Aceton = 2:1) gereinigt (24.3 mg, 35.5 μmol, 69%).

R_F-Wert: 0.57 (Cyclohexan/Aceton = 2:1)

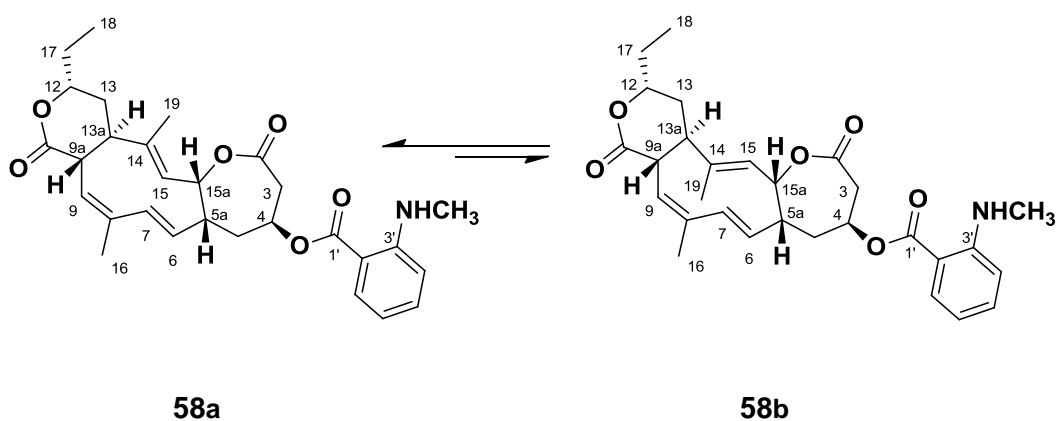
Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) *m/z* = 706.4 [M(³⁵Cl₃)+ Na]⁺, 708.2 [M(³⁵Cl₂, ³⁷Cl₁)+ Na]⁺, 722.3 [M(³⁵Cl₃)+ K]⁺, 724.2 [M(³⁵Cl₂, ³⁷Cl₁)+ K]⁺.

5 Synthese-Strategien zur Identifizierung des Wirkortes von Derivaten des Naturstoffes Collinolacton (20a, 20b)

5.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Collinolacton-Derivate

5.1.1 Darstellung von 4-O-(*N*-Methyl-anthranoyl)-collinolacton (58a, 58b)



$C_{29}H_{35}NO_6$ (493,59)

Collinolacton (**20a**, **20b**, 15.0 mg, 41.6 μmol , 1 Eq.) in abs. DCM (3.5 mL) wurde mit Molsieb 3 Å, *N*-Methylisatosäureanhydrid (**57**, 36.1 mg, 204 μmol , 5.0 Eq.) und DMAP (0.5 mg, 4 μmol , 0.1 Eq.) versetzt und 20 h bei 40°C gerührt. Die Lösung wurde mit DCM auf 20 mL aufgefüllt und mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (4 x 20 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt nach Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton = 1:1) erhalten (4.6 mg, 9.3 μmol , 23%).

R_F-Wert: 0.80 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

t_R-Wert: 21.6 min. (HPLC B, Kromasil C18, 40 min. 65% Acetonitril/Wasser)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 516.3 [M+Na]^+$, 1009.5 $[2M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 538.2 [M+HCOO]^-$, $1031.5 [2M+HCOO]^-$.

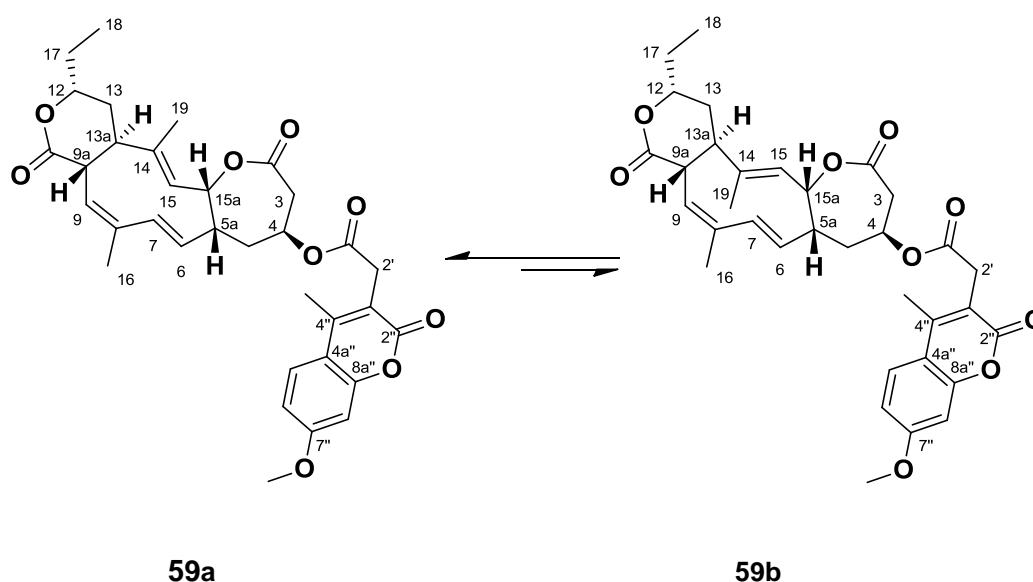
¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **58a, anti:** $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.70 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H, 19-H₃), 1.72 – 1.76 (m, 1H, 17-H_b), 1.77 – 1.84 (m, 1H, 13-H_a), 1.85 – 1.92 (m, 2H, 5-H_a, 13-H_b), 1.92 – 1.96 (m, 3H, 16-H₃), 2.59 – 2.66 (m, 2H, 5-H_b, 13a-H), 2.84 – 2.99 (m, 4H, NCH₃, 5a-H), 3.06 (dd, $J = 15.7, 4.2$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.19 – 3.30 (m, 1H, 9a-H), 3.43 (dd, $J = 15.7, 10.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.33 - 4.39 (m, 1H, 12-H), 4.87 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 15-H), 5.14 – 5.24 (m, 1H, 6-H), 5.48 – 5.53 (m, 1H, 4-H), 5.67 (t, $J = 6.5, 5.9$ Hz, 1H, 15a-H), 5.74 – 5.81 (m, 1H, 9-H), 5.92 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.55 – 6.64 (m, 1H, 6'-H), 6.72 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1H, 4'-H), 7.43 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.7$ Hz, 1H, 5'-H), 7.65 (s, 1H, NH), 7.91 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H, 7'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CD₂Cl₂) **58a, anti:** $\delta = 9.90$ (C-18), 13.51 (C-19), 20.03 (C-16), 28.69 (C-17), 30.03 (NCH₃), 32.31 (C-5), 32.72 (C-13), 40.82 (C-9a), 41.19 (C-3), 44.54 (C-5a), 46.90 (C-13a), 65.39 (C-4), 78.56 (C-12), 82.41 (C-15a), 111.57 (C-4'), 114.67 (C-6'), 123.85 (C-9), 126.17 (C-6), 131.42 (C-7'), 133.78 (C-15), 133.98 (C-14), 135.56 (C-5'), 135.92 (C-8), 139.48 (C-7), 152.88 (C-3'), 167.78 (C-1'), 170.74 (C-2), 173.66 (C-10).

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **58b, syn:** $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5, 7.4, 2.0$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.58 – 1.67 (m, 4H, 17-H_a; 19-H₃), 1.72 – 1.76 (m, 1H, 17-H_b), 1.77 - 1.84 (m, 1H, 5-H_a), 1.85 – 1.92 (m, 1H, 5-H_b), 1.92 – 1.96 (m, 3H, 16-H₃), 2.00 – 2.11 (m, 2H, 13-H₂), 2.25 (ddd, $J = 11.9, 9.2, 7.0$ Hz, 1H, 13a-H), 2.80 (dd, $J = 10.1, 4.6$ Hz, 1H, 5a-H), 2.84 – 2.99 (m, 3H, NCH₃), 3.06 (dd, $J = 15.7, 4.2$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.35 – 3.41 (m, 1H, 9a-H), 3.43 (dd, $J = 15.7, 10.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.39 - 4.45 (m, 1H, 12-H), 5.27 – 5.35 (m, 1H, 15-H), 5.43 – 5.48 (m, 1H, 4-H), 5.48 – 5.53 (m, 1H, 15a-H), 5.57 – 5.65 (m, 2H, 6-H, 9-H), 5.98 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.55 – 6.64 (m, 1H, 6'-H), 6.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, 4'-H), 7.39 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.7$ Hz, 1H, 5'-H), 7.65 (s, 1H, NH), 7.83 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H, 7'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CD₂Cl₂) **58b**, **syn**: δ = 10.22 (C-18), 20.65 (C-16), 23.90 (C-19), 28.82 (C-17), 30.03 (NCH₃), 33.04 (C-5), 35.31 (C-13), 41.08 (C-3), 45.39 (C-5a), 45.67 (C-13a), 46.83 (C-9a), 65.42 (C-4), 78.76 (C-12), 80.41 (C-15a), 111.57 (C-4'), 114.67 (C-6'), 120.75 (C-6), 121.69 (C-15), 124.13 (C-9), 131.65 (C-7'), 135.53 (C-5'), 138.07 (C-8), 138.87 (C-7), 148.92 (C-14), 152.88 (C-3'), 167.91 (C-1'), 170.61 (C-2), 173.78 (C-10).

5.1.2 Darstellung von 4-O-(2-(7-Methoxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetyl)-collinolacton (**59a**, **59b**)



C₃₄H₃₈O₉ (590,66)

Zu einer Lösung aus 2-(7-Methoxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (34.4 mg, 139 μmol, 5.0 Eq.), DIC (21.5 μL, 139 μmol, 5.0 Eq.) und DMAP (1.7 mg, 14 μmol, 0.5 Eq.) in abs. DCM (1 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.0 mg, 27.7 μmol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) zugetropft und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (2 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat, Entfernen des Lösungsmit-

tels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung erhielt man das Produkt als weißen Feststoff (6.0 mg, 10.2 μ mol, 37%).

t_R -Wert (MPLC): 29 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 25% B, Stufe 4: 40% B)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 591.2$ [M+H]⁺.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 589.1$ [M-H]⁻.

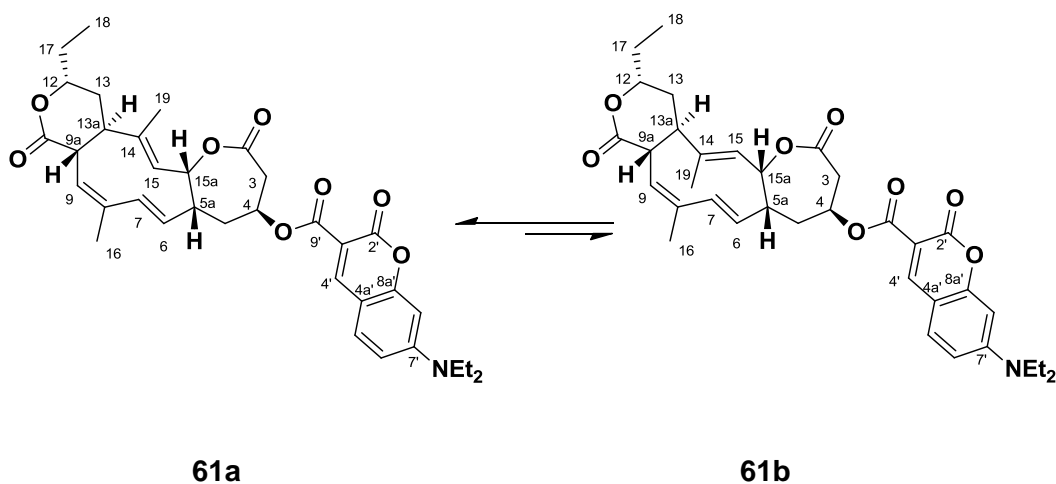
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **59a, anti:** $\delta = 0.98 - 1.08$ (m, 3H, 18-H₃), 1.51 (s, 3H, 19-H₃), 1.54 – 1.87 (m, 5H, 13-H_b, 13-H_a, 5-H_a, 17-H_b, 17-H_a), 1.91 (s, 3H, 16-H₃), 2.39 - 2.45 (m, 3H, 4''-Me), 2.49 (dd, $J = 15.1, 5.1$ Hz, 1H, 5-H_b), 2.59 (dt, $J = 8.4, 2.7$ Hz, 1H, 13a-H), 2.64 – 2.78 (m, 1H, 5a-H), 2.96 (dd, $J = 15.5, 4.3$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.21 (dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 1H, 9a-H), 3.32 (dd, $J = 15.6, 10.2$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.72 (s, 2H, 2''-H₂), 3.87 (s, 3H, OMe), 4.23 – 4.34 (m, 1H, 12-H), 4.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 15-H), 5.11 (dd, $J = 16.4, 10.1$ Hz, 1H, 6-H), 5.33 – 5.39 (m, 1H, 4-H), 5.52 (dd, $J = 6.0$ Hz, 1H, 15a-H), 5.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 9-H), 5.82 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.83 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, 8''-H), 6.91 (dt, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, 6''-H), 7.60 (dd, $J = 8.9, 1.5$ Hz, 1H, 5''-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **59a, anti:** $\delta = 9.84$ (C-18), 13.14 (C-19), 15.88 (4''-CH₃), 19.96 (C-16), 28.62 (C-17), 31.97 (C-5), 32.68 (C-13), 33.96 (C-2'), 40.56 (C-3), 40.71 (C-9a), 44.06 (C-5a), 46.78 (C-13a), 56.40 (OMe), 66.31 (C-4), 78.61 (C-12), 82.34 (C-15a), 101.26 (C-8''), 112.75 (C-6''), 114.26 (C-4a''), 116.88 (C-3''), 123.86 (C-9), 126.76 (C-5), 133.72 (C-14), 134.14 (C-15), 136.00 (C-8), 139.41 (C-7), 149.70 (C-8a''), 154.65 (C-7''), 163.05 (C-2''), 170.15 (C-1'), 170.77 (C-2), 173.89 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **59b, syn:** $\delta = 0.98 - 1.08$ (m, 3H, 18-H₃), 1.58 (s, 1H, 19-H₃), 1.59 – 1.87 (m, 3H, 5-H_a, 17-H₂), 1.91 (s, 3H, 16-H₃), 1.98 – 2.09 (m, 3H, 5-H_b, 13-H₂), 2.13 – 2.28 (m, 1H, 13a-H), 2.39 – 2.45 (m, 4H, 4''-CH₃, 9a-H), 2.54 - 2.59 (dddd, $J = 8.4, 8.4, 2.7, 2.7$ Hz, 1H, 5a-H), 2.96 (dd, $J = 15.5, 4.3$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.24 - 3.30 (m, 1H, 3-H_b), 3.72 (s, 2H, 2''-H₂), 3.87 (s, 3H, OMe),

4.37 - 4.48 (m, 1H, 12-H), 5.11 (m, 2H, 6-H, 15-H), 5.33 – 5.39 (m, 2H, 4-H, 15a-H), 5.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 9-H), 5.82 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.83 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, 8''-H), 6.91 (dt, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, 6''-H), 7.60 (dd, $J = 8.9, 1.5$ Hz, 1H, 5''-H).

5.1.3 Darstellung von 4-O-(7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonyl)collinolacton (61a, 61b)



$C_{35}H_{41}NO_8$ (603,70)

Zu einer Lösung aus 7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonsäure (21.7 mg, 83.2 μmol , 3.0 Eq.), DIC (21.5 μl , 139 μmol , 5.0 Eq.) und DMAP (1.7 mg, 14 μmol , 0.5 Eq.) in abs. DCM (2 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.0 mg, 27.7 μmol , 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) zutropft und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie und HPLC aufgereinigt. Man erhielt 2 Produkte als neongelbe Feststoffe (5.1 mg, 10 μmol , 36%).

**Produkt 1: 4-O-(7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonyl)-collinolacton
(61a, 61b)**

Ausbeute: 4.5 mg, 7.4 μ mol, 27%

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

R_F-Wert: 0.55 (Diisopropylether/Aceton = 2:1)

t_R-Wert (MPLC): 20 min (Diisopropylether (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 15% B, Stufe 4: 25% B).

t_R-Wert (HPLC):

23.0 min (HPLC B, Kromasil C18, 65% Acetonitril/Wasser 40 min. isokratisch)

34.3 min (HPLC D, Maisch Superspher C18ec, Methanol/Wasser, Programm A)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 604.4 [M+H]^+$, $626.4 [M+Na]^+$.

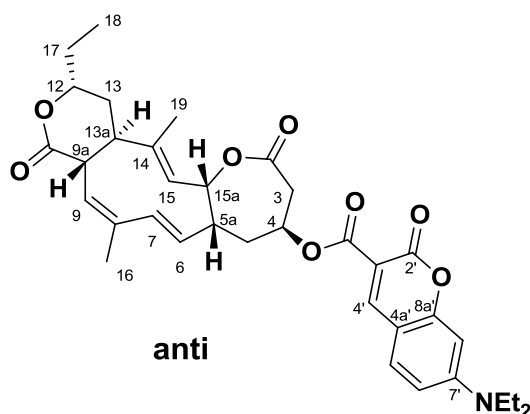
ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 648.4 [M+HCOO]^-$.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **61a, anti:** $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.23 (dt, $J = 7.1, 1.4$ Hz, 6H, 2 x NEt-H₃), 1.57 – 1.75 (m, 2H, 17-H₂), 1.80 (s, 3H, 19-H₃), 1.77 – 1.90 (m, 1H, 13-H_b), 1.93 (s, 3H, 16-H₃), 1.95 - 2.12 (m, 1H, 5-H_a), 2.41 - 2.53 (m, 1H, 5-H_b), 2.53 – 2.70 (m, 1H, 13a-H), 2.90 - 3.04 (m, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, $J = 15.8, 3.9$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.30 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.39 (dd, $J = 17.9, 7.7$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.43 – 3.54 (m, 4H, 2 x NEt-H₂), 4.34 – 4.51 (m, 1H, 12-H), 4.84 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 15-H), 5.19 (dt, $J = 16.3, 10.3, 10.3$ Hz, 1H, 6-H), 5.72 – 5.82 (m, 2H, 9-H, 15a-H), 5.93 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, 7-H), 6.49 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 8'-H), 6.68 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, 6'-H), 7.41 (dd, $J = 8.9, 3.0$ Hz, 1H, 5'-H), 8.47 (s, 1H, 4'-H).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **61b, anti:** $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, 2 x NEt-H₃), 1.57 – 1.75 (m, 2H, 17-H₂), 1.76 (s, 3H, 19-H₃), 1.77 – 1.90 (m, 1H, 13-H_a), 1.93 (m, 3H, 16-H₃), 1.95 – 2.12 (m, 2H, 13-H_b, 5-H_a),

2.13 – 2.41 (m, 1H, 5-H_b), 2.44 – 2.60(m, 1H, 13a-H), 2.75 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, 9a-H), 2.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, $J = 15.8, 3.9$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.39 (dd, $J = 17.9, 7.7$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.43 – 3.54 (m, 4H, 2 x N-Et-H₂), 4.30 (ddd, $J = 11.0, 7.0, 3.6$ Hz, 1H, 12-H), 4.98 - 5.11 (m, 1H, 15a-H), 5.42 – 5.48 (m, 1H, 4-H), 5.56 – 5.72 (m, 3H, 9-H, 15-H, 6-H), 6.03 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, 7-H), 6.49 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, 8'-H), 6.68 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, 6'-H), 7.41 (dd, $J = 8.9, 3.0$ Hz, 1H, 5'-H), 8.34 (s, 1H, 4'-H).

Produkt 2: *anti*-4-O-(7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonyl)-collinolacton (**61b**)



C₃₅**H**₄₁**NO**₈ (**603,70**)

61a

Ausbeute: 0.6 mg, 1.0 μ mol, 4%

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

R_F-Wert: 0.55 (Diisopropylether/Aceton = 2:1)

t_R-Wert (MPLC): 20 min (Diisopropylether (A)/Aceton (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 15% B, Stufe 4: 25% B)

t_R-Wert (HPLC):

17.7 min (HPLC B, Kromasil C18, 65% Acetonitril/Wasser isokratisch)

33.8 min (HPLC D, Maisch Superspher C18ec, Methanol/Wasser, Programm A)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 604.4 [M+H]^+$, $626.4 [M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet): $m/z = 626.272438 [M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden): $m/z = 604.277119 [M+H]^+$,
 $626.271907 [M+Na]^+$, $642.235875 [M+K]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 602.1 [M-H]^-$, $648.0 [M+HCOO]^-$.

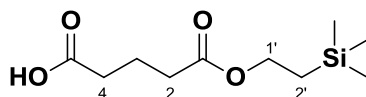
¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **61a, anti:** $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, 2 x NEt-H₃), $1.56 - 1.68$ (m, 1H, 17-H_a), 1.73 (dd, $J = 14.3$, 7.2 Hz, 1H, 17-H_b), 1.76 (s, 3H, 19-H₃), $1.78 - 1.84$ (m, 1H, 13-H_a), 1.98 (s, 3H, 16-H₃), $2.00 - 2.07$ (m, 1H, 13-H_b), 2.36 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, 5-H_b), $2.44 - 2.57$ (m, 2H, 13a-H, 5-H_a), 2.75 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, 9a-H), 2.94 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.24 (dd, $J = 15.4$, 5.4 Hz, 1H, 3-H_a), $3.36 - 3.42$ (m, 1H, 5a-H), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, 2 x NEt-H₂), 4.30 (dt, $J = 10.9$, 5.2 Hz, 1H, 12-H), 5.07 (dd, $J = 11.6$, 3.4 Hz, 1H, 15a-H), 5.45 (dd, $J = 4.6$ Hz, 1H, 4-H), 5.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, 9-H), 5.63 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, 15-H), 5.68 (dd, $J = 12.8$, 7.6 Hz, 1H, 6-H), 6.03 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, 7-H), 6.50 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, 8'-H), 6.68 (dd, $J = 8.9$, 2.4 Hz, 1H, 6'-H), 7.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 5'-H), 8.34 (s, 1H, 4'-H).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₂Cl₂) **61a, anti:** $\delta = 9.82$ (C-18), 12.75 (NEt-CH₃), 13.10 (C-19), 27.32 (C-16), 28.58 (C-17), 31.46 (C-13), 33.16 (C-5), 40.25 (C-5a), 42.06 (C-3), 43.25 (C-9a), 45.67 (NEt-CH₂), 46.17 (C-13a), 66.84 (C-4), 76.95 (C-15a), 78.49 (C-12), 97.06 (C-8'), 108.07 (C-4a')*, 108.30 (C-4a)*, 110.22 (C-6'), 118.93 (C-15), 124.47 (C-9), 125.41 (C-3'), 131.69 (C-6), 131.87 (C-5'), 134.07 (C-7), 139.11 (C-8), 143.51 (C-14), 149.78 (C-4'), 153.82 (C-7'), 158.21 (C-8a)*, 159.23 (C-8a)*, 159.92 (C-2')*, 161.03 (C-2)*, 162.74 (C-9)*, 163.03 (C-9)*, 170.74 (C-2), 173.35 (C-10).

*Signale doppelt vorhanden. Es konnte keine genauere Zuordnung getroffen werden

5.2 Target-Fishing-Strategie I: Glutarsäure-Spacer

5.2.1 Synthese von Mono-trimethylsilylethyl-glutarsäure (67)



C₁₀H₂₀O₄Si (232,35)

67

Glutarsäureanhydrid (**66**, 318 mg, 2.79 μ mol, 1.0 Eq) in abs. Pyridin (10 mL) wurde mit Molsieb 4 Å und Trimethylsilylethanol (TMSE, 400 μ l, 2.79 μ mol, 1.0 Eq.) versetzt und bei 50°C 22 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt nach chromatographischer Aufreinigung (Chloroform/Methanol = 8:2, 24 x 3 cm) als weißer Feststoff erhalten (298 mg, 1.28 mmol, 46%)

R_f-Wert: 0.74 (Chloroform/Methanol = 8:2)

0.79 (Cyclohexan/Aceton = 1:3)

Anfärbeverhalten: weißgelb (Bromkresolgrün)

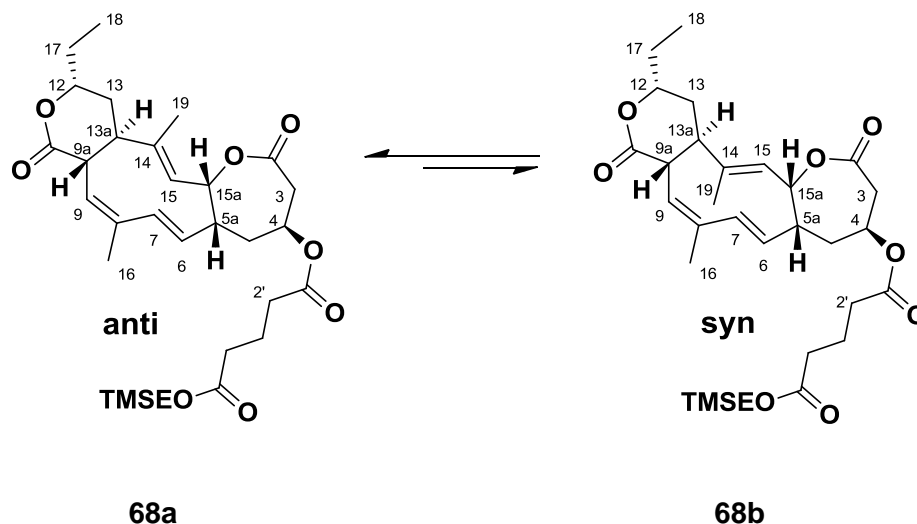
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 254.8$ [M+Na]⁺.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 231.6$ [M-H]⁻.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = -0.06 - 0.12$ (m, 9H, SiMe₃), 0.84 – 1.06 (m, 2H, 2'-H₂), 1.94 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, 3-H₂), 2.36 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2-H₂), 2.42 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 4-H₂), 4.04 – 4.29 (m, 2H, 1'-H₂), 9.93 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = -1.56$ (SiMe₃), 17.27 (C-2'), 19.79 (C-3), 32.97 (C-2), 33.31 (C-4), 62.71 (C-1'), 173.06 (COOR), 178.97 (COOH).

5.2.2 Synthese von 4-O-(5'-O-Trimethylsilylethyl-glutaryl)-collinolacton (68a, 68b)



C₃₁H₄₆O₈Si (574,78)

67 (33.7 mg, 145 μmol, 5.0 Eq.), EDC (8.3 mg, 44 μmol, 1.5 Eq.) und DMAP (0.4 mg, 3 μmol, 0.1 Eq.) in abs. DCM (1.5 mL) wurden 5 min bei RT gerührt. Es wurde langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.5 mg, 29.0 μmol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (3 x 25 mL), ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat, Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung (LOBAR A, Aceton/Wasser = 7:3 isokratisch, Flussrate 0.4 mL/min.) erhielt man das Produkt als farbloses Öl (8.8 mg, 15 μmol, 53%).

R_F-Wert: 0.55 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 597.3$ [M+Na]⁺.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 573.4$ [M-H]⁻.

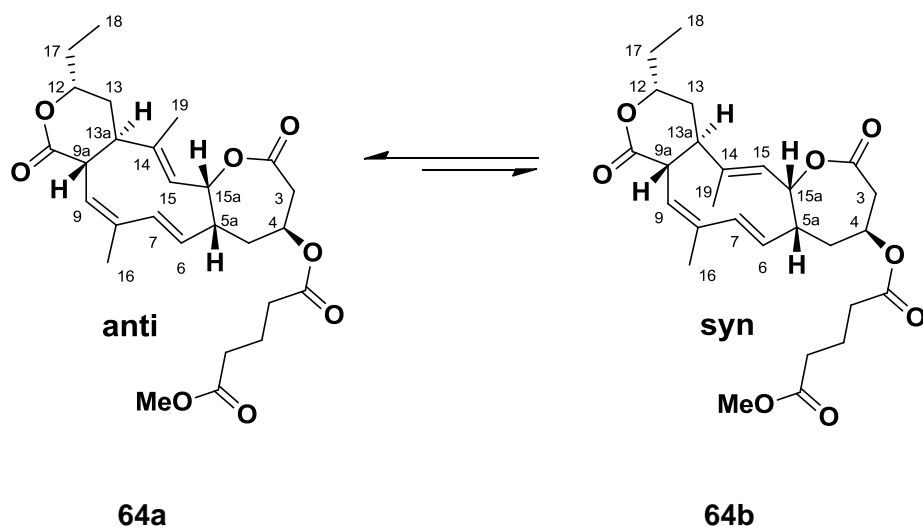
¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆), **68a, anti**: δ = -0.10 (s, 9H, SiMe₃), 0.82 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.19 (s, 3H, 19-H₃), 1.22 – 1.30 (m, 2H, 13-H_a, 17-H_a), 1.32 – 1.52 (m, 3H, 13-H_b, 17-H_b, 5-H_a), 1.83 (s, 3H, 16-H₃), 1.84 – 1.92 (m, 2H, 3'-H₂), 2.08 - 2.23 (m, 6H, 2'-H₂; 4'-H₂, 13a-H, 5-H_b), 2.34 (dd, J = 15.5, 4.4 Hz, 1H, 3-H_a), 2.54 (dq, J = 16.2, 5.4 Hz, 1H, 5a-H), 2.79 (t, J = 8.1 Hz, 1H, 9a-H), 3.18 (dd, J = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 3.74 – 3.85 (m, 1H, 12-H), 4.10 - 4.22 (m, 2H, 1''-H₂), 4.77 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 4.92 (dd, J = 16.4, 10.1 Hz, 1H, 6-H), 4.96 - 5.01 (m, 1H, 4-H), 5.22 (t, J = 5.9 Hz, 1H, 15a-H), 5.65 (d, J = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 6.13 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 9-H).

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆) **68a, anti**: δ = -1.62 (Si-Me₃), 9.61 (C-18), 12.69 (C-19), 17.55 (C-2''), 19.83 (C-16), 20.49 (C-3'), 28.33 (C-17), 31.64 (C-5), 32.52 (C-13), 33.32 (C-4'), 33.34 (C-2'), 40.39 (C-3, C-9a), 44.00 (C-5a), 46.30 (C-13a), 62.70 (C-1''), 65.47 (C-4), 77.01 (C-12), 81.52 (C-15a), 124.61 (C-9), 125.72 (C-6), 133.32 (C-14), 133.95 (C-15), 134.99 (C-8), 139.52 (C-7), 169.21 (C-2), 171.28 (C-1'), 172.15 (C-10), 172.61 (C-5').

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆), **68b, syn**: δ = -0.10 (s, 9H, SiMe₃), 0.88 (ddd, J = 8.6, 7.1, 2.9 Hz, 5H, 1'-H₂; 18-H₃), 1.22 – 1.30 (m, 1H, 17-H_a), 1.35 (s, 3H, 19-H₃), 1.32 - 1.52 (m, 2H, 5-H_a, 17-H_b), 1.52 – 1.57 (m, 2H, 13-H₂), 1.79 (s, 3H, 16-H₃), 1.84 - 1.92 (m, 2H, 3'-H₂), 2.08 – 2.23 (m, 6H, 2'-H₂; 4'-H₂, 13a-H, 5-H_b), 2.40 (dd, J = 15.9, 4.0 Hz, 2H, 3-H_a, 5a-H), 2.92 (dd, J = 11.9, 8.4 Hz, 1H, 9a-H), 3.17 (dd, J = 15.8, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 3.89 (dd, J = 10.5, 5.6 Hz, 1H, 12-H), 4.10 - 4.22 (m, 2H, 1''-H₂), 4.68 (d, J = 4.6 Hz, 1H, 15-H), 4.87 (dd, J = 16.4, 9.2 Hz, 1H, 6-H), 4.96 - 5.01 (m, 2H, 4-H, 15a-H), 5.61 (d, J = 15.8 Hz, 1H, 7-H), 5.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 9-H).

¹³C-NMR (101 MHz, C₆D₆) **68b, syn**: δ = -1.62 (Si-Me₃), 9.92 (C-18), 17.55 (C-2''), 20.24 (C-16), 20.49 (C-3'), 23.70 (C-19), 28.57 (C-17), 32.32 (C-5), 33.25 (C-2'), 33.32 (C-4'), 33.34 (C-2'), 34.86 (C-13), 40.26 (C-3), 44.87 (C-5a), 45.10 (C-13a), 46.30 (C-9), 62.70 (C-1''), 65.34 (C-4), 77.24 (C-12), 79.61 (C-15a), 121.33 (C-15), 121.67 (C-9), 123.47 (C-6), 136.99 (C-8), 138.78 (C-7), 148.59 (C-14), 169.08 (C-2), 171.43 (C-1'), 172.26 (C-10), 172.61 (C-5').

5.2.3 Synthese von 4-O-(5-methoxyglutaryl)-collinolacton (64a, 64b)



C₂₇H₃₆O₈ (488,57)

Monomethylglutarsäure (40.5 mg, 277 μ mol, 10.0 Eq.), EDC (53.2 mg, 277 μ mol, 10.0 Eq.) und 4-PPy (4.1 mg, 28 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (7 mL) wurden bei 0°C 5min gerührt. Es wurde langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.0 mg, 27.7 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (3 mL) zugegeben und 20 h bei 40°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (3 x 25 mL), ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat, Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und HPLC-Aufreinigung erhielt man das Produkt als farbloses Öl (2.2 mg, 4.5 μ mol, 16%).

R_F-Wert: 0.70 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

Anfärbeverhalten: grün(Anisaldehyd)

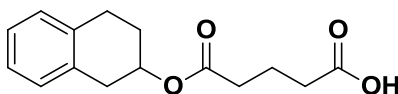
t_R-Wert (HPLC):

18.8 min (HPLC B, Kromasil C18, 50% Acetonitril/Wasser 40 min. isokratisch)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 511.8$ [M+Na]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) **64a, anti**: δ = 0.81 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.14 (s, 3H, 19-H₃), 1.23 (m, 3H, 17-H_a, 13-H_a, 5-H_a), 1.33 – 1.51 (m, 3H, 5-H_b, 13-H_b, 17-H_b), 1.71 – 1.81 (m, 2H, 3'-H₂), 1.83 (s, 3H, 16-H₃), 2.00 – 2.11 (m, 4H, 2', 4'-H₂), 2.08 – 2.17 (m, 1H, 5-H_b), 2.19 (td, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H, 13a-H), 2.28 (dd, J = 15.5, 4.4 Hz, 1H, 3-H_a), 2.51 (dddd, J = 16.1, 5.3, 5.3, 5.2 Hz, 1H, 5a-H), 2.76 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.16 (dd, J = 15.5, 10.2 Hz, 1H, 3-H_b), 3.29 (s, 3H, OMe), 3.78 (dt, J = 7.2, 5.4 Hz, 1H, 12-H), 4.76 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 4.91 (dd, J = 16.4, 10.1 Hz, 1H, 6-H), 5.18 (t, J = 5.9 Hz, 1H, 15a-H), 5.62 (d, J = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 6.14 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 9-H).

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) **64b, syn**: δ = 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.23 (m, 2H, 17-H_a, 5-H_a), 1.33 – 1.51 (m, 1H, 17-H_b), 1.51 – 1.57 (m, 5H, 19-H₃, 13-H₂), 1.71 – 1.81 (m, 5H, 3'-H₂, 16-H₃), 2.00 – 2.11 (m, 4H, 2'-H₂, 4'-H₂), 2.08 – 2.17 (m, 1H, 5-H_b), 2.19 (td, J = 8.8, 8.7, 2.3 Hz, 1H, 13a-H), 2.35 (dd, J = 15.9, 3.9 Hz, 1H, 3-H_a), 2.35 – 2.43 (m, 1H, 5a-H), 2.91 (dd, J = 11.9, 8.4 Hz, 1H, 9a-H), 3.15 (dd, J = 15.7, 10.2 Hz, 1H, 3-H_b), 3.26 (s, 1H, OMe), 3.82 – 3.92 (m, 1H, 12-H), 4.66 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 15-H), 4.86 (dd, J = 16.5, 9.2 Hz, 1H, 6-H), 4.94 (t, J = 5.2, 5.2 Hz, 2H, 4-H, 15a-H), 5.60 (d, J = 16.3 Hz, 1H, 7-H), 5.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 9-H).

5.2.4 Synthese von 2-O-Glutaryl-1,2,3,4-tetrahydronaphthol (71)**C₁₅H₁₈O₄ (262,30)****71**

Glutarsäureanhydrid (**66**, 308 mg, 2.67 mmol, 10.0 Eq.) und 4-PPy (40.0 mg, 0.270 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. THF (6 mL) wurden mit 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**, 40.0 mg, 270 μ mol, 1.0 Eq.) versetzt und 19 h bei 65°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether auf 35 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (3 x 30 mL), ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 30 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 30 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* erhielt man das Produkt als transparentes Öl (61.1 mg, 233 μ mol, 86%)

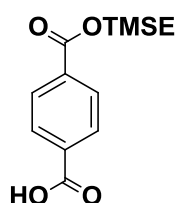
R_f-Wert: 0.48 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)**Anfärbeverhalten:** weißgelb (Bromkresolgrün)
rosa (Anisaldehyd)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.88 - 2.00 (m, 3H, 3'-H₂, 3-H_a), 2.06 (dddd, J = 11.7, 5.8, 3.2, 1.5 Hz, 1H, 3-H_b), 2.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 2'-H₂), 2.43 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 4'-H₂), 2.76 - 3.02 (m, 3H, 1-H_a, 4-H₂), 3.12 (dd, J = 16.6, 5.1 Hz, 1H, 1-H_b), 5.09 - 5.37 (m, 1H, 2-H), 7.02 - 7.20 (m, 4H, 5, 6, 7, 8-H), 8.85 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 19.97 (C-3'), 26.54 (C-7), 27.93 (C-4), 33.08 (C-2'), 33.59 (C-4'), 34.66 (C-1), 70.04 (C-2), 126.07 (C-6), 126.19 (C-7), 128.72 (C-5), 129.43 (C-8), 133.68 (C-4a), 135.61 (C-8a), 172.69 (COOR), 179.05 (COOH).

5.3 Target-Fishing-Strategie I: Terephtalsäure-Spacer

5.3.1 Synthese von Mono-trimethylsilylethyl-terephtalsäure (73)



$C_{13}H_{18}O_4Si$ (266,37)

73

Terephtalsäure (**72**, 100 mg, 602 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. Pyridin (5 mL) wurde bei 0°C mit EDC (115 mg, 602 μ mol, 1.0 Eq.) und DMAP (7.4 mg, 60 μ mol, 0.1 Eq.) versetzt. Es wurde langsam Trimethylsilylethanol (86.3 μ L, 602 μ mol, 1.0 Eq.) zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Cyclohexan (50 mL) extrahiert und der Extrakt filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (Chloroform/Methanol = 6:4) erhielt man zwei Produkte (82.6 mg, 263 μ mol, 44%).

Produkt 1: Mono-trimethylsilylethyl-terephtalsäure (73)

Ausbeute: 37.4 mg, 140 μ mol, 23%

R_f-Wert: 0.72 (Chloroform/Methanol = 8:2)

0.33 (Methanol/Wasser = 7:3)

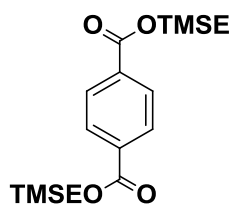
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 288.9 [M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 264.7 [M-H]^-$.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) $\delta = 0.09$ (s, 9H, TMSE-SiMe₃), 1.10 – 1.22 (m, 2H, TMSE-2'-H₂), 4.40 – 4.52 (m, 2H, TMSE-1'-H₂), 8.03 – 8.15 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = -1.46 (TMSE-SiMe₃), 18.19 (TMSE-C-2'), 64.69 (TMSE-C-1'), 100.97 (C-2, C-5), 130.34 (C-3, C-7), 130.69 (C-4, C-6), 167.39 (COOH, COOR).

Produkt 2: Di-trimethylsilylethyl-terephthalsäure (74)



C₁₈H₃₀O₄Si₂ (366,60)

74

Ausbeute: 45.2 mg, 123 μmol, 20%

R_f-Wert: 0.94 (Chloroform/Methanol = 8:2)

ESI-MS: (positive Ionen) *m/z* = 388.9 [M+Na]⁺, 754.9 [2M+Na]⁺.

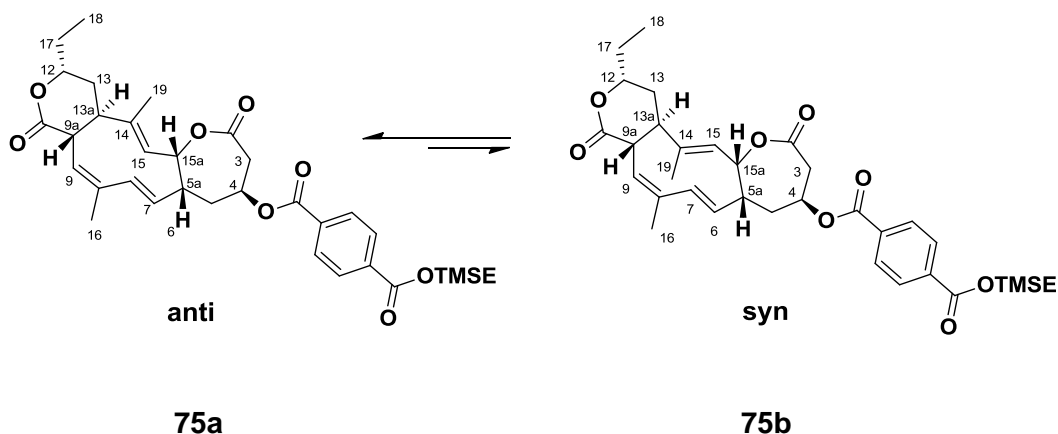
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.03 – 0.15 (m, 18H, 2 x TMSE-SiMe₃), 1.10 - 1.19 (m, 4H, 2 x TMSE-2'-H₂), 4.39 – 4.49 (m, 4H, 2 x TMSE-1'-H₂), 8.09 (s, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = -1.30 (TMSE-SiMe₃), 17.57 (TMSE-C-2'), 63.87 (TMSE-C-1'), 129.58 (C-3, C-4, C-6, C-7), 134.44 (C-2, C-5), 166.18 (COOR).

5.3.2 Umwandlung von Di-trimethylsilylethyl-terephthalsäure (74) in Mono-trimethylsilylethyl-terephthalsäure^[108] (73)

74 (198 mg, 541 μmol , 1.0 Eq.), Trimethylsilylethanol (640 mg, 541 μmol , 1.0 Eq.) und Kaliumhydroxid (30.3 mg, 541 μmol , 1.0 Eq.) in THF (5 mL) wurden unter Reflux 5 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (LOBAR B, Methanol/Wasser 7:3). Man erhielt das Produkt als weissen Feststoff (61.2 mg, 23.0 μmol , 42%).

5.3.3 Synthese von 4-O-((O-Trimethylsilylethyl)-terephthalyl)-collinolacton (75a, 75b)



$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{Si}$ (608,79)

73 (24.1 mg, 90.3 μmol , 1.5 Eq.), EDC (17.3 mg, 90.3 μmol , 1.5 Eq.) und DMAP (0.7 mg, 6 μmol , 0.1 Eq.) in abs. DCM (1.5 mL) wurden 5 min bei 0°C gerührt. Es wurde langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 21.7 mg, 60.2 μmol , 1.0 Eq.) in abs. DCM (1.5 mL) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 20 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Aceton = 3:2) erhielt man das Produkt als weissbraunen Feststoff (21.7 mg, 35.6 μmol , 59%).

R_f-Wert: 0.82 (Chloroform/Methanol = 95:5)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

APCI-MS: (positive Ionen) $m/z = 609.2 [M+H]^+$.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **75a, anti:** $\delta = 0.10$ (s, 9H, SiMe₃), 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.10 – 1.20 (m, 3H, 2''-H₂), 1.57 – 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.71 (s, 3H, 19-H₃), 1.72 – 1.78 (m, 1H, 17-H_b), 1.78 – 1.86 (m, 1H, 13-H_a), 1.89 – 1.93 (m, 1H, 13-H_b), 1.93 (s, 3H, 16-H₃), 1.95 – 1.98 (m, 1H, 5-H_a), 2.61 – 2.72 (m, 2H, 13a-H, 5-H_b), 2.89 (dddd, $J = 16.2, 5.4, 5.4, 5.4$ Hz, 1H, 5a-H), 3.10 (dd, $J = 15.6, 4.4$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.48 (dd, $J = 15.6, 10.2$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.32 – 4.40 (m, 1H, 12-H), 4.40 – 4.52 (m, 2H, 1''-H₂), 4.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 15-H), 5.20 (dt, $J = 16.4, 9.9$ Hz, 1H, 6-H), 5.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 9-H), 5.93 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 8.10 - 8.20 (m, 4H, Ar-H).

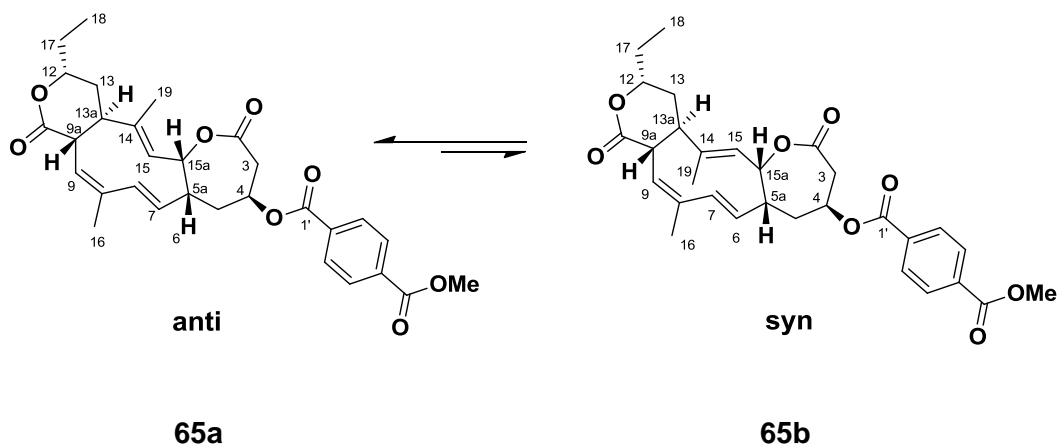
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **75a, syn:** $\delta = 0.10$ (s, 9H, SiMe₃), 1.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.10 – 1.20 (m, 2H, 2''-H₂), 1.63 (s, 3H, 19-H₃), 1.57 – 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.72 – 1.78 (m, 1H, 17-H_b), 1.78 – 1.86 (m, 1H, 13-H_a), 1.89 – 1.93 (m, 1H, 13-H_b), 1.93 (s, 3H, 16-H₃), 1.95 – 1.98 (m, 1H, 5-H_a), 2.01 – 2.09 (m, 1H, 13-H_b), 2.22 – 2.30 (m, 1H, 13a-H), 2.79 (ddd, $J = 20.7, 10.3, 5.9$ Hz, 1H, 5a-H), 3.10 (dd, $J = 15.6, 4.4$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.37 (dd, $J = 11.8, 8.5$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.40 – 4.52 (m, 2H, 1''-H₂, 12-H), 5.20 (dt, $J = 16.4, 9.9$ Hz, 1H, 6-H), 5.30 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 15-H), 5.51 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, 15a-H), 5.54 – 5.63 (m, 1H, 4-H, 9-H), 5.99 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 8.10 – 8.20 (m, 4H, Ar-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **75b, anti:** $\delta = -1.25$ (SiMe₃), 9.84 (C-18) 13.52 (C-19), 17.84 (C-2''), 19.97 (C-16), 28.64 (C-17), 32.19 (C-5), 32.67 (C-13), 40.78 (C-3), 40.85 (C-9a), 44.36 (C-5a), 46.85 (C-13a), 64.41 (C-1''), 66.84 (C-4), 78.61 (C-12), 82.44 (C-15a), 124.03 (C-9), 126.14 (C-6), 130.00 (Ar-CH), 130.11 (Ar-CH), 133.81 (C-15), 133.84 (C-14), 134.17 (C-5'), 135.69 (C-8),

136.02 (C-2'), 139.70 (C-7), 165.39 (C-1'), 166.13 (C-8'), 170.56 (C-2), 173.83 (C-10).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **75b**, **syn**: δ = -1.25 (SiMe₃), 10.16 (C-18), 17.84 (C-2''), 20.58 (C-16), 23.88 (C-19), 28.78 (C-17), 32.94 (C-5), 35.24 (C-13), 40.78 (C-3), 45.28 (C-5a), 45.61 (C-13a), 46.85 (C-9a), 64.41 (C-1''), 66.81 (C-4), 78.81 (C-12), 80.46 (C-15a), 120.92 (C-9), 121.64 (C-15), 124.03 (C-6), 130.03 (Ar-CH), 130.11 (Ar-CH), 134.17 (C-5'), 136.02 (C-2'), 138.17 (C-8), 139.11 (C-7), 149.27 (C-14), 165.25 (C-1'), 166.13 (C-8'), 170.44 (C-2), 173.93 (C-10).

5.3.4 Synthese von 4-O-(Methoxy-terephthyl)-collinolacton (**65a**, **65b**)



C₃₀H₃₄O₈ (**522,59**)

Monomethylterephthalsäure (30.0 mg, 166 μmol, 10.0 Eq.), 4-PPy (2.5 mg, 16.6 μmol, 1.0 Eq.) und EDC (31.9 mg, 166 mmol, 10.0 Eq.) in abs. DMF (2 mL) wurden bei 0°C mit Collinolacton (**20a**, **20b**, 6.0 mg, 17 μmol, 1.0 Eq.) versetzt und über Nacht bei 50°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach

HPLC-Aufreinigung erhielt man das Produkt als weissen Feststoff (0.75 mg, 1.4 μmol , 9%).

R_F-Wert: 0.49 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

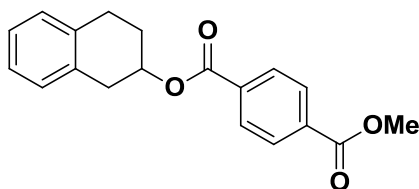
t_R-Wert (HPLC): 17.0 min (HPLC B, Kromasil C18, 65% Methanol/Wasser 40 min. isokratisch)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 523.2$ [M+H]⁺.

¹H-NMR (600 MHz, C₆D₆) **65a, anti:** $\delta = 0.81$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.00 (s, 3H, 19-H₃), 1.11 – 1.52 (m, 5H, 17-H₂, 13-H₂, 5-H_a), 1.82 (s, 3H, 16-H₃), 2.05 - 2.14 (m, 1H, 5-H_b), 2.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, 13a-H), 2.21 – 2.30 (m, 1H, 3-H_a), 2.44 (dddd, $J = 10.9, 10.9, 5.8, 5.7$ Hz, 1H, 5a-H), 2.75 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, 9a-H), 3.18 (dd, $J = 16.1, 10.3$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.45 (s, 3H, COOMe), 3.77 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, 12-H), 4.75 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 15-H), 4.91 (dd, $J = 16.4, 10.1$ Hz, 1H, 6-H), 5.03 – 5.11 (m, 1H, 4-H), 5.15 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, 15a-H), 5.54 (s, 1H, 7-H), 6.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, 9-H), 8.00 – 8.04 (m, 2H, Ar-H), 8.18 – 8.14 (m, 2H, Ar-H).

¹H-NMR (600 MHz, C₆D₆) **65b, syn:** $\delta = 0.90$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.11 - 1.52 (m, 3H, 17-H₂, 5-H_a), 1.54 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 19-H₃), 1.56 – 1.75 (m, 2H, 13-H₂), 1.79 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, 16-H₃), 2.05 – 2.14 (m, 2H, 5-H_b, 13a-H), 2.21 – 2.30 (m, 2H, 3-H_a, 5a-H), 2.81 (dd, $J = 19.3, 7.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.21 (dd, $J = 16.3, 10.0$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.41 (s, 3H, COOMe), 3.77 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, 12-H), 4.62 (s, 1H, 15-H), 4.85 (dd, $J = 16.1, 9.3$ Hz, 1H, 6-H), 5.03 – 5.11 (m, 1H, 4-H), 5.50 – 5.53 (m, 2H, 7-H, 15a-H), 5.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 9-H), 8.00 - 8.04 (m, 2H, Ar-H), 8.14 – 8.18 (m, 2H, Ar-H).

5.3.5 Synthese von 2-O-(O-Methylterephthalyl)-1,2,3,4-tetrahydro-naphthol (171)



C₁₉H₁₈O₄ (310,34)

171

Monomethoxyterephthalsäure (486 mg, 2.70 mmol, 10.0 Eq), 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**, 40.0 mg, 0.270 μ mol, 1.0 Eq.) und 4-PPy (40.0 mg, 0.270 mmol, 1.0 Eq.) in abs. DMF (17 mL) wurden bei 0°C mit EDC (517 mg, 2.70 mmol, 10.0 Eq.) versetzt und 5 min gerührt. Es wurde auf 40°C erwärmt und weitere 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand mit Ethylacetat (2 x 25 mL) extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 40 mL) und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (4 x 40 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Aceton = 3:2) erhielt man das Produkt als weissen Feststoff (74.4 mg, 0.240 μ mol, 89%).

R_F-Wert: 0.73 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

Anfärbeverhalten: rosabraun (Anisaldehyd)

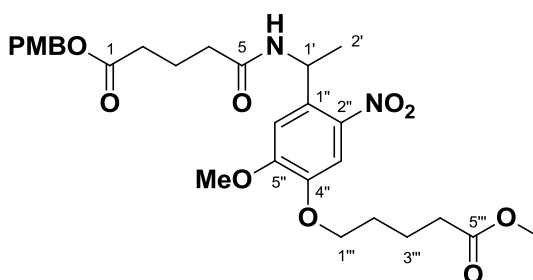
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 2.06 – 2.24 (m, 2H, 3-H₂), 2.86 – 2.98 (m, 1H, 1-H_a), 2.99 - 3.10 (m, 2H, 4-H₂), 3.25 (dd, *J* = 16.7, 5.1 Hz, 1H, 1-H_b), 3.94 (s, 3H, OMe), 5.44 – 5.54 (m, 1H, 2-H), 7.06 – 7.20 (m, 4H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H), 8.08 (s, 4H, 3'-H, 4'-H, 6'-H, 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 26.53 (C-3), 27.98 (C-4), 34.66 (C-1), 52.53 (OMe), 71.05 (C-2), 126.14 (C-6), 126.25 (C-7), 128.77 (C-5), 129.46 (C-8), 129.61 (C-4', C-6'), 129.67 (C-3', C-7'), 133.55 (C-2'), 133.96 (C-5'), 134.49 (C-4a), 135.56 (C-8a), 165.45 (COOR), 166.40 (COOMe).

5.4 Target-Fishing-Strategie II: Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker

5.4.1 Synthese von *p*-Methoxybenzyl-Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (85)

1-(4-Methoxybenzyl)-5-((1'-(5''-methoxy-4''-((5'''-methoxy-5'''-oxopentyl)oxy)-2''-nitrophenyl)ethyl)amino)-5-oxopentanoat



$C_{28}H_{36}N_2O_{10}$ (560,59)

85

Mono-PMB-glutarsäure (**83**, 45.0 mg, 178 μ mol, 1.0 Eq.), EDC (51.3 mg, 268 μ mol, 1.5 Eq.) und DMAP (2.6 mg, 18 μ mol, 0.1 Eq.) in abs. DCM (2 mL) wurden bei 0°C 5 min gerührt. Es wurde langsam Nitrobenzyl-Linker (**78**, 58.2 mg, 178 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (2.9 mL) zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand flash-chromatographisch aufgereinigt. Man erhielt man das Produkt als gelblichen Feststoff (44.2 mg, 78.8 μ mol, 44%).

R_f -Wert: 0.55 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

R_f -Wert (MPLC): 3 min (Chloroform (A)/Methanol (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 1% B, Stufe 3: 5% B)

ESI-MS: (positive Ionen) m/z = 561.1 [M+H]⁺, 583.1 [M+Na]⁺.

ESI-MS: (negative Ionen) m/z = 605.5 [M-H]⁻.

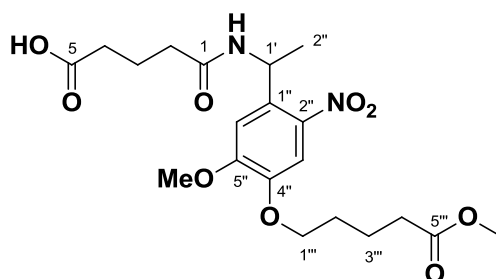
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.51 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-H₃), 1.77 – 1.99 (m, 4H, 3-H₂, 4-H₂), 2.25 (td, J = 7.1, 5.2 Hz, 2H, 3'''-H₂), 2.35 (td, J = 7.0, 2.4 Hz, 2H, 2'''-H₂), 2.37 – 2.44 (m, 4H, 2'-H₂, 4'''-H₂), 3.67 (s, 3H, COOMe), 3.80 (s, 3H,

PMB-OMe), 3.91 (s, 3H, 7-OMe), 4.04 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 1''-H₂), 5.03 (s, 2H, PMB-1-H₂), 5.52 (p, $J = 6.9$ Hz, 1H, 1'-H), 6.76 (s, 1H, NH), 6.84 – 6.91 (m, 2H, PMB-4-H, 6-H), 6.92 (s, 1H, 6''-H), 7.27 (dt, $J = 6.1, 2.8$ Hz, 2H, PMB-3-H, 7-H), 7.51 (s, 1H, 3''-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 20.98$ (C-3'''), 21.16 (C-2'), 21.55 (C-3), 28.40 (C-4), 33.32 (C-4'''), 33.65 (C-2), 35.18 (C-2'''), 47.37 (C-1'), 51.68 (COOMe), 55.37 (PMB-OMe), 56.49 (5-OMe), 66.25 (PMB-C-1), 68.95 (C-1'''), 109.76 (C-3), 110.62 (C-6), 114.06 (PMB-C-4, C-6), 128.02 (PMB-C-2), 130.18 (PMB C-3, C-7), 133.69 (C-1), 140.59 (C-2), 147.22 (C-4), 153.90 (C-5), 159.76 (PMB C-5), 171.93 (COOPMB), 173.19 (CONH), 173.86 (COOMe).

5.4.2 Synthese des Glutaryl-Nitrobenzyl-Linkers^[116] (87)

5-((1-(5-Methoxy-4-((5-methoxy-5-oxopentyl)oxy)-2-nitrophenyl)ethyl)amino)-5-oxopentansäure



C₂₀H₂₈N₂O₉ (440,44)

87

85 (29.6 mg, 52.8 μ mol, 1.0 Eq.) und DDQ (14.4 mg, 63.4 mmol, 1.2 Eq.) wurden in DCM (3 mL) und Wasser (150 μ L) über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 20 mL aufgefüllt und mit ges. Natriumchlorid-Lösung (3 x 20 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung erhielt man das Produkt als gelblichen Feststoff (8.2 mg, 19 μ mol, 35%).

R_f-Wert: 0.49 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R -Wert (MPLC): 24 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 8 g Si35,
7 min 2% B, in 2 min auf 20% B, 6 min bei 20% B, in 5 min auf 40% B, 10 min bei
40% B, in 2 min auf 50% B, 6 min bei 50%B)

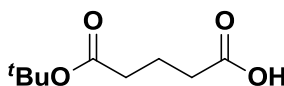
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 441.0 [M+H]^+$, 462.9 $[M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 439.1 [M-H]^-$.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 1.62$ (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 2'-H₃), 1.73 – 1.95 (m, 10H, 3-H₂, 4-H₂, 2''-H₂, 3''-H₂, 4''-H₂), 2.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2-H), 3.68 (s, 3H, COOMe), 3.95 (s, 3H, 5-OMe), 4.08 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, 5''-H₂), 5.50 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, 1'-H), 6.86 (s, 1H, 6-H), 7.59 (s, 1H, 3-H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 20.17$ (C-3'''), 21.59 (C-2', C-3), 28.43 (C-4), 33.69 (C-2, C-2''', C-4'''), 48.89 (C-1'), 51.76 (COOMe), 56.63 (5-OMe), 69.14 (C-1'''), 110.36 (C-3''), 111.58 (C-6''), 130.72 (C-1''), 140.75 (C-2''), 147.98 (C-4''), 154.16 (C-5''), 170.75 (COOR), 173.85 (COOMe), 181.46 (COOH).

5.4.3 Synthese von Glutarsäure-mono-tert-butylester^[117] (89)



C₉H₁₆O₄ (188,22)

89

Glutarsäureanhydrid (**66**, 5.00 g, 43.8 mmol, 1.0 Eq.) in abs. Toluol (25 mL) wurde nacheinander mit *N*-Hydroxysuccinimid (1.51 g, 13.1 mmol, 0.3 Eq), DMAP (0.54 g, 4.38 mmol, 0.1 Eq.), abs. *tert.*-Butanol (12.6 mL, 9.74 g, 132 mmol, 3.0 Eq.) und abs. Triethylamin (1.83 mL, 1.33 g, 13.1 mmol, 0.30 Eq.) versetzt und über Nacht unter Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat auf 50 mL aufgefüllt und mit 10%iger Zitronensäurelösung (3 x 50 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat, Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und

flashchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten (1.45 g, 7.70 mmol, 18%).

R_F-Wert: 0.67 (Chloroform/Methanol = 3:2)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

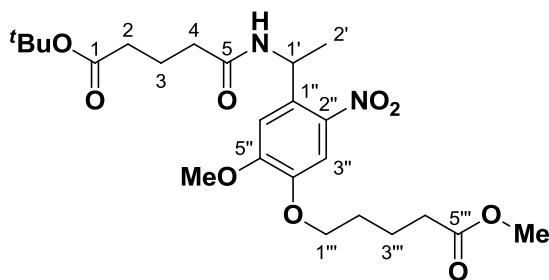
t_R-Wert (MPLC): 16 min (Chloroform (A)/Methanol (B), 40 g Si35, Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 5% B, Stufe 3: 10% B).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.42 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.89 (qi, *J* = 7.4 Hz, 2H, 3-H₂), 2.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 4-H₂), 2.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2-H₂), 10.39 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 20.08 (C-3), 28.16 (^tBu-CH₃), 33.14 (C-4), 34.53 (C-2), 80.65 (^tBu-C), 172.45 (C=O ^tBu), 179.30 (C=O OH).

5.4.4 Synthese von tert.-Butyl-Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker (90)

tert.-Butyl-5-((1-(5-methoxy-4-((5-methoxy-5-oxopentyl)oxy)-2-nitrophenyl)ethyl)amino)-5-oxopentanoat



C₂₄H₃₆N₂O₉ (496,55)

90

Zu einer Lösung des Nitrobenzyl-Linkers **78** (100 mg, 0.306 mmol, 1.0 Eq.) in abs. Dichlormethan (5 mL) wurde bei 0°C und unter Lichtausschluss DIC (142 µL, 116 mg, 0.919 mmol, 3.0 Eq.) sowie DMAP (11.2 mg, 919 µmol, 0.3 Eq.) gegeben und 5 min. gerührt. Es wurde Glutarsäure-mono-tert.-butylester (**89**, 115 mg, 0.613 mmol, 2.0 Eq.) in abs. Dichlormethan (2 mL) hinzugefügt und bei

RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt und mit Wasser (2 x 25 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt nach Flashchromatographie als leicht gelblicher Feststoff erhalten (49.5 mg, 0.099 mmol, 16%).

R_F-Wert: 0.56 (Chloroform/Aceton = 9:1)

t_R-Wert (MPLC): 13 min (Chloroform (A)/Aceton (B), 8 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 5% B).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.41 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.52 (d, *J* = 7.0, 3H, 2'-H₃), 1.74 – 1.94 (m, 6H, 4-H₂, 3'-H₂, 3'''-H₂), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 4'''-H₂), 2.27 (dt, *J* = 7.5 Hz, 3.1, 2H, 2'''-H₂), 2.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, 2-H₂), 3.65 (s, 3H, COOMe), 3.92 (s, 3H, 5''-OMe), 4.03 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, 1'''-H₂), 5.54 (dq, *J* = 6.9 Hz, 1H, 1'-H), 6.96 (s, 1H, 6''-H), 7.00 (bs, 1H, NH), 7.50 (s, 1H, 3''-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.20 (C-3'''), 21.29 (C-3), 21.55 (C-2'), 28.16 (^tBu-CH₃), 28.40 (C-4), 33.65 (C-2), 34.57 (C-4'''), 35.21 (C-2'''), 47.27 (C-1'), 51.66 (COOMe), 56.54 (Ar-OMe), 68.96 (C-1'''), 80.67 (^tBu-C), 109.70 (C-3''), 110.51 (C-6''), 133.79 (C-1''), 140.56 (C-2''), 147.21 (C-4''), 153.94 (C-5''), 172.27 (CONH), 172.75 (COO^tBu), 173.84 (COOMe).

5.4.5 Synthese von Glutaryl-Nitrobenzyl-Linker^[120] (87)

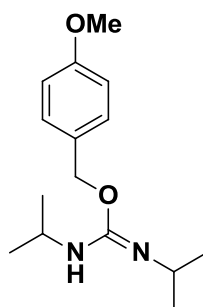
1-(1'-(5''-Methoxy-4''-(5'''-methoxy-5'''-oxopentyloxy)-2''-nitrophenyl)ethylamino)-5-oxopentansäure

90 (49.5 mg, 99.2 μmol) in abs. DCM (3 mL) und TFA (0.6 mL) wurde 3 h bei RT gerührt. Nach Trocknung *in vacuo* erhielt man das Produkt als gelblichen Feststoff (30.8 mg, 69.6 μmol, 70%)

R_F-Wert: 0.23 (Chloroform/Aceton = 9:1)

5.5 Target-Fishing-Strategie II: Terephталyl-Nitrobenzyl-Linker

5.5.1 Synthese von *N,N'*-Disopropyl-*O*-(*p*-methoxybenzyl)-isoharnstoff (DIC-PMB-IU, 82)^[114]



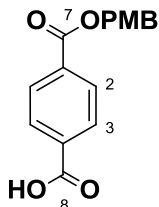
C₁₅H₂₄N₂O₂ (264,36)

82

Zu einer Suspension aus DIC (1.00 mL, 1.23 mg, 9.72 mmol, 1.0 Eq.) und Kupfer(I)chlorid (5.0 mg, 0.051 mmol, 0.005 Eq.) wurde bei 0°C langsam *p*-Methoxybenzylalkohol (1.21 mL, 1.34 g, 9.72 mmol, 1.0 Eq.) zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Es wurde über Aluminiumoxid (neutral) filtriert und die Aluminiumoxidsäule mit Petrolether (20 ml) sowie Diethylether (5 ml) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* erhielt man das Produkt als farbloses Öl (1.873 mg, 7.09 mmol, 73%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.05–1.17 (m, 12H, CH₃), 3.20 (hept, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 3.39 – 3.54 (m, 1H, NH), 3.73 – 3.84 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, PMB-OMe), 5.01 (s, 2H, PMB-CH₂), 6.78 – 6.96 (m, 2H, PMB-CH), 7.22 – 7.39 (m, 2H, PMB-CH).

5.5.2 Synthese Terephtalsäure-mono-(p-methoxybenzyl)-ester (**84**) nach [114]



C₁₆H₁₄O₅ (286,28)

84

Zu Terephtalsäure (**72**, 500 mg, 3.01 mmol, 1.0 Eq.) in abs. DMF (10 mL) wurde langsam **82** (1.19 g, 4.52 mmol, 1.5 Eq.) gegeben und 20 h bei 60°C sowie 6 h bei 80°C gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und Flashchromatographie erhielt man das Produkt als weißen Feststoff (283 mg, 987 μmol, 33%).

R_F-Wert: 0.42 (Chloroform/Methanol = 9:1 + 0.05% Ameisensäure)
0.49 (Methanol/Wasser = 7:3)

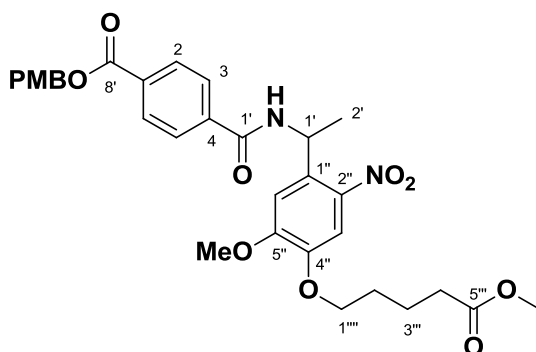
t_R-Wert (MPLC): 11 min (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 12 g Si35,
7 min bei 10% B in 3 min auf 30% B, 5 min bei 30% B, in 2 min auf 50% B, 5 min bei 50% B).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 3.79 (s, 3H, PMB-OMe), 5.30 (s, 2H, PMB-CH₂), 6.90 – 6.97 (m, 2H, PMB-CH), 7.37 – 7.42 (m, 2H, PMB-CH), 8.09 (s, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 55.71 (OMe), 68.02 (PMB-CH₂), 114.98 (PMB-CH), 129.33 (PMB-C), 130.51 (PMB-CH), 130.77 (C-2, C-6), 131.24 (C-3, C-5), 135.23 (C-1, C-4), 161.34 (PMB-CO), 167.03 (COOPMB), 168.76 (COOH).

5.5.3 Synthese von *p*-Methoxybenzyl-Terephthalyl-Nitrobenzyl-Linker (86)

(4-Methoxybenzyl)-4-((1'-(5''-methoxy-4''-(5'''-methoxy-5''''-oxopentyl)oxy)-2''-nitrophenyl)ethyl)carbamoyl)benzoat



$C_{31}H_{34}N_2O_{10}$ (594,61)

86

Eine Lösung aus **84** (84.2 mg, 294 μ mol, 1.2 Eq.), EDC (70.5 mg, 368 μ mol, 1.5 Eq.) und DMAP (3.60 mg, 24.5 μ mol, 0.1 Eq.) in abs. Dichlormethan (8 mL) wurde bei 0°C und unter Lichtausschluss mit Nitrobenzyl-Linker **78** (80.0 mg, 245 μ mol, 1.0 Eq.) versetzt und bei RT 20 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan auf 20 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (3 x 25 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Flashchromatographie erhielt man das Produkt als leicht gelblichen Feststoff (37.3 mg, 66.5 μ mol, 27%)

R_F-Wert: 0.64 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

t_R-Wert (MPLC): 3 min (Dichlormethan (A)/Methanol (B), 8 g Si35, 15 min bei 0% B, in 2 min 5% B, 6 min bei 5% B.

t_R-Wert (HPLC): 22.7 min. (HPLC D, Supersphere C18ec, Methanol/Wasser + 0,05% Ameisensäure, Programm C)

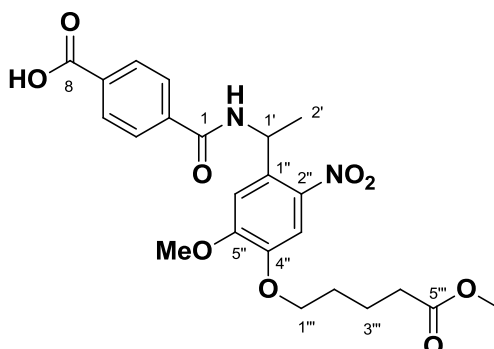
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 595.2 [M+H]^+$, 617.3 $[M+Na]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 594.0 [M-H]^-$, 639.4 $[M+HCOO]^-$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2-H₃), 1.75 – 1.93 (m, 4H, 2''-H₂, 3''-H₂), 2.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.66 (s, 3H, COOMe), 3.80 (s, 3H, PMB-OMe), 3.91 (s, 3H, 5''-OMe), 4.04 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, 1'''-H₂), 5.29 (s, 2H, PMB-CH₂), 5.68 (dq, *J* = 7.1, 7.0 Hz, 1H, 1-H), 6.86 – 6.95 (m, 2H, PMB-H), 6.97 (s, 1H, 6''-H), 7.32 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, NH), 7.35 – 7.41 (m, 2H, PMB-H), 7.54 (s, 1H, 3''-H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 8.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 3-H, 5-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 20.74 (C-2'), 21.55 (C-3'''), 28.40 (C-2'''), 33.65 (C-4'''), 48.73 (C-1'), 51.70 (COOMe), 55.40 (PMB-OMe), 56.51 (5''-OMe), 67.07 (PMB-CH₂), 69.01 (C-1'''), 111.67 (C-6''), 114.13 (PMB-CH), 127.10 (C-3, C-5), 127.87 (C-2''), 130.07 (PMB-CH), 130.29 (C-2, C-6), 133.13 (C-1), 138.05 (C-4), 140.81 (C-2''), 147.46 (C-4''), 153.96 (C-5''), 159.87 (PMB-CO), 165.74 (COOPMB), 165.85 (CONH), 173.86 (COOMe).

5.5.4 Synthese von Terephthalsäure-Nitrobenzyl-Linker^[115] (88)



C₂₃H₂₆N₂O₉ (474,46)

88

86 (13.6 mg, 22.9 μmol, 1.0 Eq.) in Acetonitril/Wasser (4:1, 3 mL) wurde mit CAN (62.7 mg, 114 μmol, 5.0 Eq.) versetzt und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Chloroform auf 20 mL aufgefüllt und mit ges. Natriumchloridlösung (3 x 20 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand flashchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als leicht gelblichen Feststoff (10.1 mg, 21.3, mg, 93%).

R_F-Wert: 0.83 (Dichlormethan/Methanol = 95:5)

t_R -Wert (MPLC): 24 min (Dichlormethan (A)/Methanol (B), 8 g Si35, 15 min bei 0% B, in 2 min auf 5% B, 16 min bei 5% B, in 2 min auf 10% B, 16 min bei 10% B).

t_R -Wert (HPLC): 18.0 min. (HPLC D, Supersphere C18ec, Methanol/Wasser + 0,05% Ameisensäure, Programm C)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 475.0 [M+H]^+$, $497.0 [M+Na]^+$.

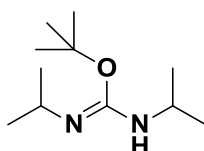
ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 473.2 [M-H]^-$.

1H -NMR (400 MHz, DMF- d_7) $\delta = 1.69$ (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'-H₃), 1.73 – 1.82 (m, 2H, 3'''-H₂), 1.82 – 1.93 (m, 2H, 2'''-H₂), 2.45 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 4'''-H₂), 3.64 (s, 3H, COOMe), 3.93 (s, 3H, 5''-OMe), 4.16 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 1'''-H₂), 5.83 (qi, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1-H), 7.51 (s, 1H, 6-H''), 7.60 (s, 1H, 3-H''), 8.04 – 8.13 (m, 4H, 3-H, 4-H, 6-H, 7-H), 9.24 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, CONH).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMF- d_7) $\delta = 22.24$ (C-2'), 22.46 (C-3'''), 29.29 (C-2''), 34.06 (C-4'''), 46.32 (C-1'), 51.94 (COOMe), 57.08 (5''-OMe), 69.72 (C-1'''), 110.81 (C-6), 128.66 (C-3, C-5), 130.46 (C-2, C-6), 130.64 (C-3''), 134.56 (C-1), 139.46 (C-4), 141.90 (C-2''), 148.07 (C-4''), 154.94 (C-5''), 166.55 (CONH), 167.92 (COOH), 174.43 (COOMe).

5.6 Target-Fishing-Strategie II: 4-Brom-2-hydroxybenzoyl-Spacer (BHB-Spacer)

5.6.1 Synthese von *N,N'*-Di-isopropyl-*O*-*tert.*-butyl-isourea (DIC-*O*-*t*Bu-IU, 98)^[114]



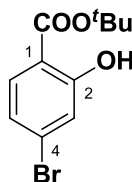
C₁₁H₂₄N₂O (200,32)

98

Zu einer Suspension aus DIC (5.00 mL, 4.08 g, 32.3 mmol, 1.0 Eq.) und Kupfer(I)-Chlorid (20 mg, 200 μmol, 0.06 Eq.) wurde bei 0°C langsam *tert.*-Butanol (3.10 mL, 2.40 g, 32.3 mmol, 1.0 Eq.) zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Die entstandene Suspension wurde mit Petrolether auf 30 mL aufgefüllt und über Aluminiumoxid (neutral, 15 g) filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Produkt als farbloses Öl (3.70 g, 18.5 mmol, 57%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.04 (d, *J* = 5.9 Hz, 6H, CH₃), 1.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH₃), 1.45 (s, 9H, *t*Bu-CH₃), 3.05 – 3.18 (m, 1H, CH), 3.59 – 3.70 (m, 1H, NH), 3.78 – 3.92 (m, 1H, CH).

5.6.2 Synthese von 4-Brom-2-hydroxybenzoesäure-*tert.*-Butylester^[120] (95)



C₁₁H₁₃BrO₃ (273,12)

95

Zu 4-Brom-2-hydroxybenzoesäure (50.0 mg, 0.230 mmol, 1.0 Eq.) in abs. Toluol (2 mL) wurde DIC-*O*-*t*Bu-IU (231 mg, 1.15 mmol, 5.0 Eq.) gegeben und 4 h bei

60°C gerührt. Es wurde filtriert, mit Toluol (5 mL) nachgespült und das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt ein gelbliches Öl (58.7 mg, 0.215 mmol, 93%)

t_R-Wert: 0.84 (Toluol)

0.90 (Diisopropylether)

0.70 (Cyclohexan/Chloroform = 3:1)

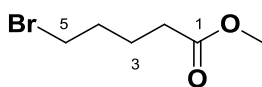
t_R-Wert (MPLC): 16 min (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 40 g Si35, 10 min bei 0% B, in 3 min auf 10% B, 7 min bei 10% B, in 3 min auf 20% B).

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 270.6 [M(^{79}\text{Br})\text{-H}]^-$, $272.6 [M(^{81}\text{Br})\text{-H}]^-$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.61$ (s, 9H, ^tBu-CH₃), 6.98 (dd, $J = 8.5$ Hz, 1.9, 1H, 5-H), 7.14 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, 3-H), 7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 7-H), 11.11 (s, 1H, 2-OH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 28.31$ (^tBu-CH₃), 83.53 (^tBu-C), 112.99 (C-1), 120.85 (C-3), 122.49 (C-5), 129.35 (C-4), 131.27 (C-6), 162.33 (C-2), 169.48 (C=O^tBu).

5.6.3 Synthese von 5-Bromvaleriansäuremethylester (96)



C₆H₁₁BrO₂ (195,05)

96

5-Bromvaleriansäure (5.00 g, 27.6 mmol) in Methanol (30 mL) wurde mit 10 Tropfen konz. Salzsäure versetzt und 20 h bei 50°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Diethylether (50 mL) aufgenommen. Es wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (3 x 50 mL) gewaschen und die wässrige Phase erneut mit Diethylether (2 x 100 mL) extrahiert. Nach Wa-

schen der gesammelten organischen Phasen mit Wasser (1 x 100 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (1 x 100 mL) wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt als farbloses Öl erhalten (5.29 g, 27.1 mmol, 98%).

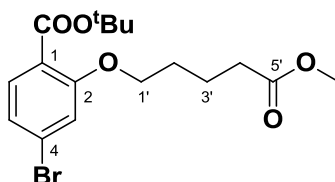
R_F-Wert: 0.94 (Chloroform/Methanol = 95:5 + 0.05% Ameisensäure)

Anfärbeverhalten: weiss (Cerium-Molybdat)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.68 – 1.81 (m, 2H, 3-H₂), 1.81 – 1.94 (m, 2H, 4-H₂), 2.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2-H₂), 3.39 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, 5-H₂), 3.66 (s, 3H, OMe).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 23.58 (C-3), 32.08 (C-4), 33.12 (C-2), 33.14 (C-5), 51.71 (OMe), 173.66 (COOMe).

5.6.4 Synthese von *tert*-butyl-4-Brom-2-(5'-methoxy-5'-oxopentyloxy)benzoat (**97**)



C₁₇H₂₃BrO₅ (387,27)

97

Zu einer Lösung von **95** (170.2 mg, 623.2 μmol, 1.0 Eq.) und Kaliumcarbonat (129.2 mg, 934.8 μmol, 1.5 Eq.) in abs. DMF (5 mL) wurde 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**, 182.3 mg, 934.8 μmol, 1.5 Eq.) gegeben und über Nacht bei 60°C gerührt. Überschüssiges Kaliumcarbonat wurde durch Filtrieren entfernt, die Reaktionslösung zur Trockene eingedampft und das Produkt nach flashchromatographischer Aufreinigung als farbloses Öl erhalten (156.4 mg, 403.9 μmol, 65%).

R_F-Wert: 0.76 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

0.50 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 32 min. (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 8 g Si35,

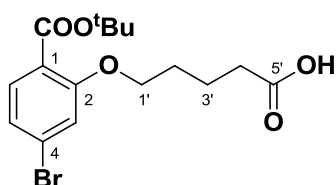
7 min bei 0% B, in 2 min auf 2% B, 6 min bei 2% B, in 2 min auf: 5% B, 8 min bei 5% B, in 1 min auf 20% B, 7 min. bei 20%B, in 2 min auf 40% B, 5 min. bei 40% B).

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 408.9 [M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $410.8 [M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.55$ (s, 9H, ^tBu-CH₃), $1.75 - 1.91$ (m, 4H, 2'-H₂, 3'-H₂), 2.39 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 4'-H₂), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.99 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, 1'-H₂), 7.04 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 3-H), 7.07 (dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 21.63$ (C-3'), 28.32 (^tBu-CH₃), 28.60 (C-2'), 33.68 (C-4'), 51.63 (OMe), 68.60 (C-1'), 81.48 (^tBu-C), 116.45 (C-3), 121.67 (C-1), 123.35 (C-5), 126.55 (C-4), 132.47 (C-6), 158.54 (C-2), 165.31 (COO^tBu), 173.81 (COOMe).

5.6.5 Synthese von 4-Brom-2-(5'-oxopentyloxy)benzoat (99)



C₁₆H₂₁BrO₅ (373,24)

99

97 (116.6 mg, 301.1 μmol) in Toluol (9 mL) und PBS-Puffer (9 mL) wurde mit *C. Antarctica* Lipase Acrylic Resin (150 mg, *Sigma-Aldrich*) versetzt und 5 Tage bei 50°C gerührt. Der pH-Wert wurde in dieser Zeit mit 1 N Natronlauge bei ca. 7 gehalten. Die organische Phase wurde abgetrennt und filtriert. Die wässrige Phase wurde eingedampft und mit Aceton (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden *in vacuo* eingeeengt und mittels Flashchromatographie aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als farbloses Öl (64.5 mg, 172 μmol , 57%).

R_F-Wert: 0.53 (Cyclohexan/Aceton = 1:1)

t_R-Wert (MPLC): 29 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 8 g Si35,
10 min bei 0% B, in 3 min auf 10% B, 7 min bei 10% B, in 3 min auf 20% B,
17 min bei 20% B).

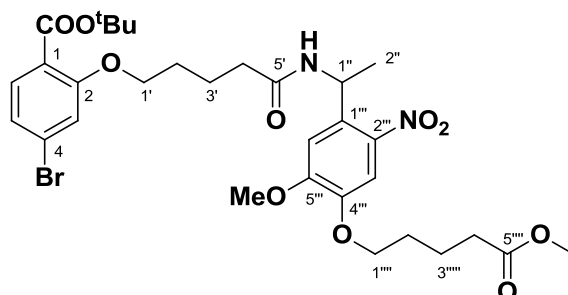
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 394.7 [M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $396.7 [M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.56$ (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.79 – 1.95 (m, 4H, 2'-H₂, 3'-H₂), 2.45 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 4'-H₂), 4.00 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, 1'-H₂), 7.05 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, 3-H), 7.07 (dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 6-H), 9.71 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) $\delta = 21.44$ (C-3'), 28.31 (^tBu-C), 28.49 (C-2'), 33.67 (C-4'), 68.59 (C-1'), 81.62 (^tBu-C), 116.44 (C-3), 121.59 (C-1), 123.39 (C-5), 126.61 (C-4), 132.50 (C-6), 158.53 (C-2), 165.39 (COO^tBu), 179.54 (COOH).

5.6.6 Synthese von tert.-Butyl-BHB-Nitrobenzyl-Linker (100)

tert-Butyl-4-brom-2-(5'-(1''-(5'''-methoxy-4'''-(5''''-methoxy-5''''-oxopentyloxy)-2'''-nitrophenyl)ethylamino)-5'-oxopentyloxy)benzoat



$C_{31}H_{41}BrN_2O_{10}$ (681,57)

100

99 (137 mg, 368 μ mol, 1.2 Eq.) in abs. Dichlormethan (3 mL) wurde bei 0°C und Lichtausschluss mit DIC (142 μ l, 116 mg, 919 μ mol, 3.0 Eq.) versetzt. Nach 5 min. Rühren wurde DMAP (11.2 mg, 91.9 μ mol, 0.3 Eq.) und Nitrobenzyl-Linker **78** (100.0 mg, 306.4 μ mol, 1.0 Eq.) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan auf 25 mL aufgefüllt und mit Wasser (3 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Flashchromatographie wurde das Produkt als gelbbrauner Feststoff erhalten (76.9 mg, 113 μ mol, 37%).

R_f-Wert: 0.81 (Chloroform/Methanol = 95:5)

Anfärbeverhalten: lila (Anisaldehyd)

t_R-Wert (MPLC): 5 min (Dichlormethan (A)/Methanol (B), 4 g Si35,

10 min bei 0% B, in 2 min auf 5% B, 8 min bei 5% B)

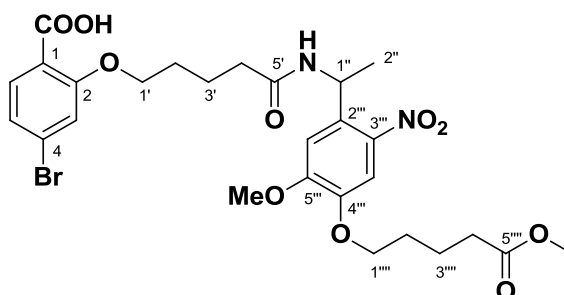
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.54 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2''-H₃), 1.55 – 1.59 (m, 9H, ^tBu-CH₃), 1.71 – 1.96 (m, 8H, 2'-H₂, 3'-H₂, 2''''-H₂, 3''''-H₂), 2.29 – 2.50 (m, 4H, 4'-H₂, 4''''-H₂), 3.66 (s, COOMe), 3.79 (s, 3H, 5'''-OMe), 3.94 - 4.09 (m, 4H,

5'-H₂, 1''''-H₂), 5.66 (qi, *J* = 6.9 Hz, 1H, 1''-H), 6.21 (s, 1H, NH), 7.05 – 7.13 (m, 3H, 3-H, 5-H, 6''''-H), 7.51 (s, 1H, 3''-H), 7.57 (dd, 1H, C-6).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.57 (C-2'), 21.72 (C-3'), 23.75 (C-3'''''), 27.39 (C-2'''''), 28.32 (tBu-CH₃), 28.43 (C-2'), 33.68 (C-4'), 35.57 (C-4'''''), 46.55 (C-1'''), 51.69 (COOMe), 56.28 (5''''-OMe), 68.93 (C-1'), 69.95 (C-1'''''), 81.85 (tBu-C), 109.48 (C-3'''''), 110.12 (C-6'''''), 116.27 (C-3), 120.59 (C-1), 123.41 (C-5), 127.33 (C-4), 132.70 (C-6), 134.82 (C-1'''''), 140.52 (C-2'''''), 147.04 (C-4'''''), 153.89 (C-5'''''), 158.92 (C-2), 165.31 (COO^tBu), 172.90 (CONH), 173.86 (COOMe).

5.6.7 Synthese von BHB-Nitrobenzyl-Linker (101)

4-Brom-2-(5'-(1''-(5''''-methoxy-4''''-(5''''-methoxy-5''''-oxopentyloxy)-2''-nitrophenyl)ethylamino)-5''''-oxopentyloxy)benzoat



C₂₇H₃₃BrN₂O₁₀ (625,46)

101

100 (76.9 mg, 113 μmol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (4 mL) wurde mit TFA (0.4 mL) versetzt und 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und TFA-Reste azeotrop mit Toluol (2 x 25 mL) entfernt. Man erhielt das Produkt als gelblichen Feststoff (70.4 mg, 113 μmol, quant.).

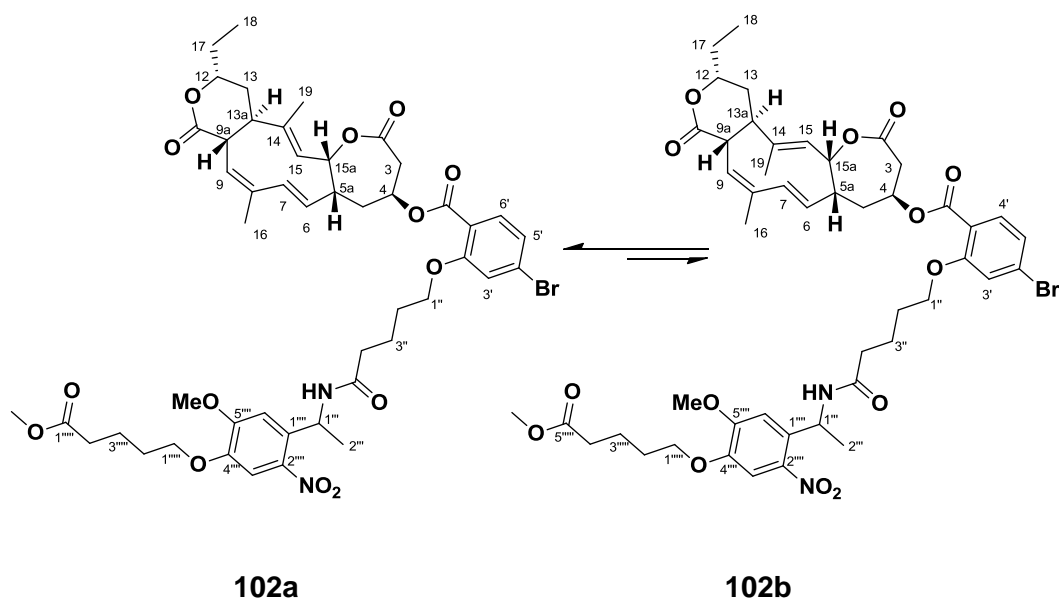
ESI-MS: (positive Ionen) *m/z* = 625.3 [M(⁷⁹Br)+H]⁺, 627.3 [M(⁸¹Br)+H]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.56 (t, *J* = 9.9 Hz, 3H, 2''-H₃), 1.75 – 1.93 (m, 8H, 2'-H₂, 3'-H₂, 2''''-H₂, 3''''-H₂), 2.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, 4'-H₂), 2.44 – 2.53 (m, 2H, 4''''-H₂), 3.67 (s, 3H, COOMe), 3.92 (d, *J* = 9.1 Hz, 3H, 5''-OMe), 4.02 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 4.16 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, 1''''-H₂), 5.53 – 5.66 (m, 1H, 1''-H), 7.05 (s, 1H, NH), 7.14 - 7.20 (m, 2H, 3-H, 6''-H), 7.20 – 7.26 (m, 1H, 5-H), 7.46 (s, 1H, 3''-H), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 6-H), 8.00 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.08 (C-3'), 21.59 (C-2''), 22.75 (C-3'''), 28.00 (C-2'''), 28.45 (C-2'), 33.70 (C-4'), 35.04 (C-4'''), 47.58 (C-1''), 51.76 (COOMe), 56.76 (5'''-OMe), 69.02 (C-1'), 70.27 (C-1'''), 109.48 (C-3'''), 110.95 (C-6'''), 116.51 (C-3), 117.03 (C-1), 125.17 (C-5), 129.40 (C-4), 132.86 (C-6), 134.44 (C-1'''), 140.59 (C-2'''), 147.45 (C-4'''), 154.06 (C-5'''), 158.36 (C-2), 166.17 (COOH), 173.96 (COOMe, CONH).

5.6.8 Synthese von 4-O-(BHB-Nitrobenzyl-Linker)-collinolactonester (102a, 102b)

4-O-(4'-Brom-2'-((5''-((1'''-(5''''-methoxy-4''''-(5''''''-methoxy-5''''''-oxopentyl)oxy)-2''''-nitrophenyl)ethylamino)-5''-oxopentyl)oxy)benzoyl)-collinolacton



C₄₈H₅₉BrN₂O₁₄ (967.89 g/mol)

Zu **101** (18.0 mg, 28.8 μmol, 1.5 Eq.) in abs. DCM (1 mL) wurde bei 0°C und unter Lichtausschluss DIC (14.8 μL, 95.9 μmol, 5.0 Eq.), DMAP (1.2 mg, 9.6 μmol, 0.5 Eq.) und Collinolacton (**20a**, **20b**, 6.9 mg, 19.2 μmol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt und mit Wasser (3 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (Sephadex LH-20, Aceton) wurde das verunreinigte Produkt erhalten (1.3 mg, 1.7 μmol, 9%).

R_F-Wert: 0.47 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

R_f-Wert (HPLC): 18.3 min (HPLC D, Saphir C8, Acetonitril/Wasser, Programm D)

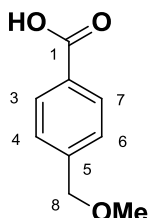
ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 967.4$ [M(⁷⁹Br)+H]⁺, 969.3 [M(⁸¹Br)+H]⁺, 989.5 [M(⁷⁹Br)+Na]⁺, 991.5 [M(⁸¹Br)+Na]⁺.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **102a***: $\delta = 1.01$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.50 - 1.52 (m, 3H, 2^{'''}-Me), 1.64 (s, 3H, 19-H₃), 1.68 - 1.88 (m, 13H, 5-H_a, 13-H₂, 17-H₂, 2^{''}-H₂, 3^{''}-H₂, 2^{''''}-H₂, 3^{''''}-H₂), 1.92 (s, 3H, 16-H₃), 2.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H, 4^{''}-H₂, 4^{''''}-H₂), 2.25 - 2.34 (m, 1H, 5-H_b), 2.58 - 2.67 (m, 1H, 13a-H), 2.75 - 2.87 (m, 1H, 5a-H), 3.01 - 3.14 (m, 1H, 3-H_a), 3.29 (dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, 1H, 9a-H), 3.34 - 3.46 (m, 1H, 3-H_b), 3.64 (s, 3H, COOMe), 3.87 (s, 3H, 5^{''''}-OMe), 4.24 - 4.40 (m, 4H, 1^{''}-H₂, 1^{''''}-H₂), 4.71 - 4.79 (m, 1H, 12-H), 4.85 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, 15-H), 5.17 (dd, $J = 16.4, 10.2$ Hz, 1H, 6-H), 5.52 (m, 2H, 4-H, 1^{'''}-H), 5.65 (dd, $J = 5.0, 5.0$ Hz, 1H, 15a-H), 5.77 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, 9-H), 5.89 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 7-H), 6.61 (s, 1H, NH), 7.00 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.08 (s, 1H, 6^{''''}-H), 7.49 (s, 1H, 3^{''''}-H), 7.67 - 7.74 (m, 1H, 6'-H).

* Die Zuordnung erfolgte aufgrund der starken Verunreinigung und geringen Menge durch Vergleich mit Edukten sowie Collinolactonbenzoesäureestern. Eine gesicherte Zuordnung ist nicht möglich.

5.7 Target-Fishing-Strategie III: 4-(Hydroxymethyl)-Benzoessäure (HMB)-Spacer

5.7.1 Synthese von 4-(Methoxymethyl)-benzoessäure (103)



C₈H₈O₃ (152,15)

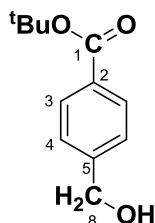
103

Zu Kaliumhydroxid (147.5 mg, 2.629 mmol, 4.0 Eq.) in DMSO wurden nach 5 min 4-(Hydroxymethyl)benzoessäure (50.0 mg, 0.329 mmol, 1.0 Eq.) und Methyljodid (82,0 µL, 186.6 mg, 1.315 mmol, 8.0 Eq.) gegeben und 40 min bei RT gerührt. Es wurde mit Wasser (25 mL) aufgefüllt und weitere 45 min gerührt. Die Lösung wurde mit 1 N Salzsäure neutralisiert und mit DCM (3 x 25 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhielt man einen farblosen Feststoff (54.9 mg, 0.330 mmol, quant.).

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ = 3.39 (s, 3H, OMe), 4.50 (s, 2H, 8-H₂), 7.42 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 4-H, 6-H), 8.00 (d, J = 8.3 Hz, 2H, 3-H, 7-H).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD) δ = 58.59 (OMe), 74.89 (C-8), 128.37 (C-4, C-6), 130.80 (C-3, C-7), 131.29 (C-2), 144.92 (C-5), 169.72 (COOH).

5.7.2 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (122)



C₁₂H₁₆O₃ (208,25)

122

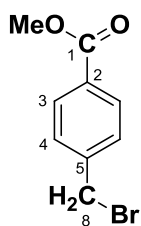
4-(Hydroxymethyl)-Benzoessäure (200 mg, 1.31 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. THF (5 mL) wurde mit **98** (1.32 g, 6.57 mmol, 5.0 Eq.) versetzt und 26 h bei 60°C gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten (189.5 mg, 910.0 μ mol, 69%).

R_f-Wert: 0.61 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

t_R-Wert (MPLC): 8 - 16 min (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 4 g Si35, Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 25% B, Stufe 4: 40% B)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) = 1.57 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 2.69 (s, 1H, OH), 4.69 (s, 2H, 8-H₂), 7.35 (d, *J* = 8.5, 2 H, 4-H; 6-H), 7.86 – 7.97 (m, 2 H, 3-H, 7-H).

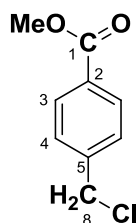
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 28.25 (^tBu-CH₃), 64.60 (CH₂-OH), 81.16 (^tBu-C), 126.37 (C-4, C-6), 129.67 (C-3, C-5), 131.06 (C-2), 145.74 (C-5), 165.88 (C=O^tBu).

5.7.3 Synthese von 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (134)**C₉H₉BrO₂ (229,07)****134**

4-(Brommethyl)-benzoesäure (250 mg, 1.16 μmol, 1.0 Eq.) in abs. Methanol (4 mL) wurde im Wasserbad mit Thionylchlorid (337 μL, 4.65 μmol, 4.0 Eq.) versetzt und 20 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und SPE-Aufreinigung (10 g Kieselgel, Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1) erhielt man ein 3:1 Gemisch von 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (**134**) und 4-(Chlormethyl)-benzoesäuremethylester (**136**) ein farbloses Öl (71.6 mg, 312.6 μmol, 27%).

Produkt 1: 4-(Brommethyl)-benzoesäuremethylester (134)**R_F-Wert:** 0.76 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ = 3.91 (s, 3H, OMe), 4.49 (s, 2H, CH₂Br), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.96 – 8.06 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).**¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ = 32.32 (CH₂-Br), 52.30 (OMe), 128.57 (C-4, C-6), 130.10 (C-3, C-7), 130.19 (C-2), 142.71 (C-5), 166.66 (COOMe).

Produkt 2: 4-(Chlormethyl)-benzoesäuremethylester (136)



C₉H₉ClO₂ (184,62)

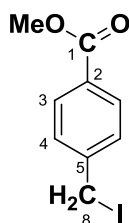
136

R_F-Wert: 0.76 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.91 (s, 3H, OMe), 4.60 (s, 3H, CH₂Cl), 7.45 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.96 – 8.06 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 45.46 (CH₂-Cl), 52.30 (OMe), 128.57 (C-4, C-6), 130.10 (C-3, C-7), 130.16 (C-2), 142.33 (C-5), 166.66 (C=O OMe).

5.7.4 Synthese von 4-(Iodmethyl)-benzoesäuremethylester (137)



C₉H₉IO₂ (276,07)

137

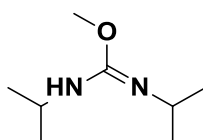
Ein Gemisch aus **134** und **136** (50.0 mg, 218 μmol, 1.0 Eq.) in abs. Aceton (5 mL) wurde mit Kaliumiodid (54.4 mg, 327 μmol, 1.5 Eq.) versetzt und 4 h unter Reflux gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels SPE aufgereinigt (2 g Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1). Man erhielt das Produkt als farbloses Öl (58.8 mg, 213 μmol, 98%).

R_F-Wert: 0.44 (Cyclohexan/Ethylacetat = 9:1)

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-D₆) δ = 3.87 (s, 3H, OMe), 4.66 (s, 2H, CH₂I), 7.51-7.60 (m, 2H, 4-H, 6-H), 7.87–7.98 (m, 2H, 3-H, 7-H).

¹³C-NMR (101 MHz, Aceton-D₆) δ = 4.82 (CH₂-I), 52.50 (OMe), 129.95 (C-4, C-6), 130.43 (C-2), 130.71 (C-3, C-7), 146.27 (C-5), 166.85 (C=O).

5.7.5 Synthese von *N, N'*-Di-isopropyl-*O*-methyl-isoharnstoff (DIC-OMe-IU)^[114] (126)



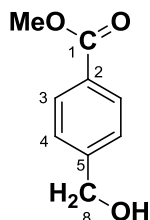
C₈H₁₈N₂O (158.24)

126

Zu einer Suspension aus DIC (10.0 mL, 8.15 mg, 64.6 mmol, 1.0 Eq.) und Kupfer(I)chlorid (40.0 mg, 404 μmol, 0.006 Eq.) wurde bei 0°C langsam Methanol (2.62 mL, 2.07 g, 64.6 mmol, 1.0 Eq.) zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionssuspension wurde mit Petrolether (30 ml) aufgefüllt und über Aluminiumoxid (neutral) filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man das Produkt als leicht grünliches Öl (9.37 g, 59.2 mmol, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.06 (d, *J* = 6.4, 12 H, CH₃), 3.13 (s, 1 H, NH), 3.25 – 3.53 (m, 1 H, CH), 3.61 (s, 3 H, OMe), 3.65 – 3.84 (m, 1 H, CH).

5.7.6 Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure-methylester (127) nach [114]



C₉H₁₀O₃ (166,17)

127

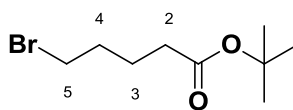
Zu 4-(Hydroxymethyl)-benzoesäure (1.00 g, 6.57 mmol, 1.0 Eq.) in abs. THF (10 mL) wurde bei 0°C DIC-OMe (**126**, 6.24 g, 39.4 mmol, 6.0 Eq.) langsam zugegeben und nach Erwärmen über Nacht bei 60°C gerührt. Es wurde filtriert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt flashchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als durchsichtiges Öl (495 mg, 2.98 mmol, 45%).

R_f-Wert: 0.33 (Toluol/Ethylacetat = 2:1)

t_R-Wert (MPLC): 13 min (Toluol (A)/Ethylacetat (B), 24 g Si35,
Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B, Stufe 3: 50% B)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3.07 (s, 1 H, OH), 3.88 (s, 3 H, OMe), 4.69 (s, 2H, 8-H₂), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 4-H; 6-H), 7.93 – 7.99 (m, 2 H, 3-H; 7-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 52.16 (OCH₃), 64.43 (C-8), 126.44 (C-4, C-6), 129.06 (C-2), 129.77 (C-3, C-7), 146.29 (C-5), 167.18 (C=O OMe).

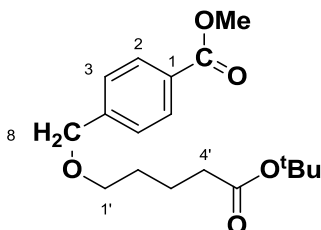
5.7.7 Synthese von 5-Bromvaleriansäure-*tert*-butylester^[130] (128)**C₉H₁₇BrO₂ (237,13)****128**

5-Bromvaleriansäure (1.00 g, 5.52 mmol, 1.0 Eq.) in abs. DCM (10 mL) wurde bei 0°C Oxalylchlorid und einige Tropfen abs. DMF zugefügt. Es wurde 1 h bei 0°C und 1 h bei RT gerührt. Zu der Reaktionslösung wurde *tert*-Butanol (2.10 mL, 1.64 g, 22.1 mmol, 4.0 Eq.) gegeben und weitere 30 min bei RT gerührt. Abschließend wurden die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt als leicht gelbliches Öl erhalten (1.31 g, 5.52 mmol, quant.).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.40 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.63 – 1.75 (m, 2H, 3-H), 1.78 – 1.93 (m, 2H, 4-H), 2.21 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 3.36 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 5-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 23.69 (C-3), 28.12 (^tBu-CH₃), 32.04 (C-4), 33.18 (C-5), 34.56 (C-2), 80.40 (^tBu-C), 172.63 (C=O^tBu).

5.7.8 4-(((5'-(tert-Butoxy)-5'-oxopentyl)oxy)methyl)-benzoesäuremethylester (129)



C₁₈H₂₆O₅ (322,40)

129

Zu einer Lösung aus 4-(Hydroxymethyl)-benzoesäuremethylester (**127**, 28.9 mg, 174 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. DMF (2 mL) wurde bei 0°C Natriumhydrid (5.0 mg, 208 μ mol, 1.2 Eq. 60% in Paraffin) zugefügt und 10 min gerührt. Es wurde über 15 min. 5-Bromvaleriansäure-*tert.*-butylester (**128**, 61.8 mg, 260.8 μ mol, 1.5 Eq.) in abs. DMF (1 mL) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde in ges. Natriumchlorid-Lösung (25 mL) gegeben, mit Ethylacetat extrahiert (3 x 25 mL) und mit Wasser gewaschen (3 x 25 mL). Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung erhielt man das Produkt als durchsichtiges, leicht gelbliches Öl (29.0 mg, 90.0 μ mol, 52%).

R_F-Wert: 0.49 (Toluol/Ethylacetat = 2:1)

t_R-Wert (MPLC): 7 min (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 12 g Si35,

Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 20% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert: 16.8 min (HPLC D, Supersphere C18ec, Acetonitril/Wasser, Programm B)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 322.8$ [M+H]⁺.

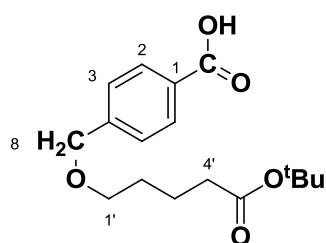
ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 340.0$ [M+H₂O-H]⁻.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.41$ (s, 9 H, ^tBu-CH₃), 1.64 (m, 4 H, 2'-H₂, 3'-H₂), 2.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H, 4'-H₂), 3.47 (t, $J = 6.1$ Hz, 2 H, 1'-H₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃),

4.52 (s, 2H, 8-H₂), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.95 – 8.02 (m, 2 H, 2-H, 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.89 (C-3'), 28.15 (tBu-CH₃), 29.14 (C-2'), 35.28 (C-4'), 52.10 (OCH₃), 70.35 (C-1'), 72.28 (C-8), 80.13 (tBu-C), 127.15 (C-3, C-5), 129.29 (C-1), 129.73 (C-2, C-6), 144.00 (C-4), 167.01 (COOMe), 172.99 (COOtBu).

5.7.9 4-(((5'-(tert-Butoxy)-5'-oxopentyl)oxy)methyl)-benzoesäure^[131](130)



C₁₇H₂₄O₅ (308,37)

130

129 (56.0 mg, 174 μmol, 1.0 Eq) und Lithiumhydroxid (20.8 mg, 869 μmol, 5.0 Eq.) wurden in einem Gemisch aus THF/Wasser (3:1, 4 mL) 48 h bei RT gerührt. Es wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (3 x 20 mL) aufgefüllt und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die Lösung wurde eingengt, filtriert und das restliche Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt das Produkt als weissen Feststoff (49.3 mg, 160 μmol, 93%).

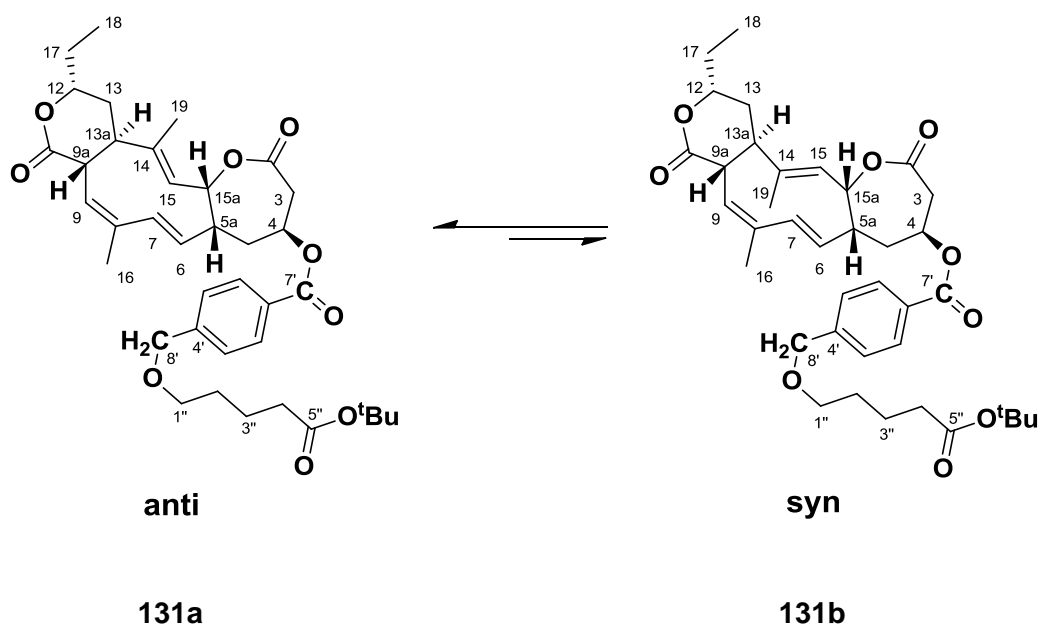
R_F-Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:2 mit 0.05% Ameisensäure)

ESI-MS: (negative Ionen) *m/z* = 306.9 [M-H]⁻.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.43 (s, 9H, tBu-CH₃), 1.68 (dt, *J* = 9.9 Hz, 5.2, 4H, 2'-H₂, 3'-H₂), 2.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, 4'-H₂), 3.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 4.56 (s, 2H, 8-H₂), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 3-H, 5-H), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2-H, 6-H), 11.39 (s, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ = 21.95 (C-3'), 28.22 ($^t\text{Bu-CH}_3$), 29.18 (C-2'), 35.37 (C-4'), 70.47 (C-1'), 72.31 (C-8), 80.30 ($^t\text{Bu-C}$), 127.26 (C-3, C-5), 128.67 (C-1), 130.43 (C-2, C-6), 144.95 (C-4), 171.88 ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 173.19 ($\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$).

5.7.10 4-O-(4'-(((5''-(tert-Butoxy)-5''-oxopentyl)oxy)methyl)benzoyl)-collinolacton (131a, 131b)



$\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_9$ (650,80)

Zu einer Lösung aus **130** (25.6 mg, 83.2 μmol , 4.7 Eq.), DIC (21.5 μl , 139 μmol , 7.8 Eq.) und DMAP (1.7 mg, 14 μmol , 0.8 Eq.) in abs. DCM (1 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C langsam Collinolacton (**20a**, **20b**, 6.4 mg, 18 μmol , 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) zugetropft und 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und flashchromatographischer Aufreinigung erhielt man das Produkt als weissen Feststoff (8.1 mg, 12.4 μmol , 70%).

R_F-Wert: 0.67 (Diisopropylether/Aceton = 2:1)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

t_R-Wert (MPLC): 9 min (Diisopropylether (A)/Aceton (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 15% B, Stufe 3: 25% B).

t_R-Wert (HPLC):

19.0 min (HPLC B, Kromasil C18, 65% Acetonitril/Wasser 30 min. isokratisch)

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 695.3 [M+HCOO]^-$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): 131 a, anti: $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.42 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.54 – 1.69 (m, 5H, 2''-H₂, 3''-H₂, 17-H_a), 1.71 (s, 3H, 19-H₃), 1.71 - 1.90 (m, 3H, 17-H_b, 5-H_a, 13-H_a), 1.91 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, 13-H_b), 1.93 (s, 3H, 16-H₃), 2.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 4''-H₂), 2.61 – 2.73 (m, 1H, 13a-H), 2.90 (m, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, $J = 15.7, 4.3$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (td, $J = 15.6, 10.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.52 (t, $J = 6.0$, 2H, 1''-H₂), 4.36 (dt, $J = 10.6, 5.6$ Hz, 1H, 12-H), 4.56 (s, 2H, 8'-H₂), 4.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 15-H), 5.14 – 5.24 (m, 1H, 6-H), 5.48 – 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.68 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 9-H), 5.93 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 8.03 (dd, $J = 8.3, 3.5$ Hz, 2H, 2-H, 6-H).

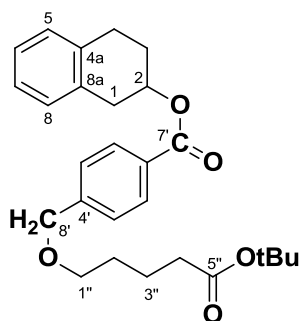
¹³C-NMR (151 MHz, CD₂Cl₂): 131a, anti: $\delta = 9.84$ (C-18), 13.51 (C-19), 19.98 (C-16), 22.41 (C-3''), 28.39 (^tBu-CH₃), 28.64 (C-17), 29.67 (C-2''), 32.24 (C-5), 32.66 (C-13), 35.72 (C-4''), 40.79 (C-3), 40.97 (C-9a), 44.39 (C-5a), 46.86 (C-13a), 66.24 (C-4), 71.05 (C-8'), 72.57 (C-1''), 78.61 (C-12), 80.35 (^tBu-C), 82.45 (C-15a), 123.97 (C-9), 126.28 (C-6), 127.76 (C-3', C-5'), 129.29 (C-1'), 130.06 (C-2', C-6'), 133.87 (C-15), 134.11 (C-14), 136.05 (C-8), 139.61 (C-7), 145.60 (C-4'), 165.81 (C-7'), 170.75 (C-2), 173.25 (C-5''), 173.85 (C-10).

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): 131b, syn: $\delta = 1.02$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.42 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.54 – 1.69 (m, 8H, 2''-H₂, 3''-H₂, 19-H₃, 17-H_a), 1.71 – 1.90 (m, 2H, 5-H_a, 17H_b), 1.93 (s, 3H, 16-H₃), 1.96 (s, 1H, 13-H_b), 1.99 – 2.14 (m, 1H, 5-H_b), 2.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, 4''-H₂), 2.61 – 2.73 (m, 3H, 13a-H), 2.74 – 2.83 (m,

1H, 5a-H), 2.90 (ddt, $J = 10.7, 5.5$ Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, $J = 15.7, 4.3$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (dd, $J = 15.6, 10.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.52 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, 1''-H₂), 4.36 (dt, $J = 10.6, 5.6$ Hz, 1H, 12-H), 4.56 (s, 2H, 8'-H₂), 5.14 – 5.24 (m, 1H, 6-H), 5.51 (dd, 1H, 15a-H), 5.48 – 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 9-H), 5.98 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 7-H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 8.03 (dd, $J = 8.3, 3.5$ Hz, 2H, 2-H, 6-H).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₂Cl₂): **131b**, syn: $\delta = 10.16$ (C-18), 20.59 (C-16), 22.41 (C-3''), 23.87 (C-19), 28.39 (t-Bu-CH₃), 28.78 (C-17), 29.67 (C-2''), 32.92 (C-5), 35.26 (C-13), 35.72 (C-4''), 40.91 (C-3), 45.32 (C-5a), 45.62 (C-13a), 46.82 (C-9a), 66.18 (C-4), 71.02 (C-8'), 72.57 (C-1''), 78.80 (C-12), 80.35 (t-Bu-C), 80.44 (C-15a), 120.85 (C-9), 121.71 (C-15), 124.16 (C-6), 27.71 (C-3', C-5'), 129.31 (C-1'), 130.18 (C-2', C-6'), 139.03 (C-7), 145.60 (C-4'), 149.17 (C-14), 165.93 (C-7'), 170.64 (C-2), 173.25 (C-1''), 173.96 (C-10).

5.7.11 2-(4'-(((5''-(tert-Butoxy)-5''-oxopentyl)oxy)methyl)benzoyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthol (**132**)



C₂₇H₃₄O₅ (438,56)

132

Zu einer Lösung aus **130** (20.0 mg, 64.9 μ mol, 1.0 Eq.), DIC (33.4 μ L, 325 μ mol, 5.0 Eq.) und DMAP (4.0 mg, 32.5 μ mol, 0.5 Eq.) in abs. DCM (2 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (**69**, 8.7 μ L, 65 μ mol, 1.0 Eq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges.

Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, flashchromatographischer und HPLC-Aufreinigung erhielt man das Produkt als durchsichtiges Öl (15.1 mg, 34.4 μ mol, 53%).

R_F-Wert: 0.95 (Toluol/Aceton = 2:1)
0.72 (Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1)

Anfärbeverhalten: rosa (Anisaldehyd)

t_R-Wert (MPLC): 16 min (Toluol (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 5% B, Stufe 3: 10% B, Stufe 3: 20% B).

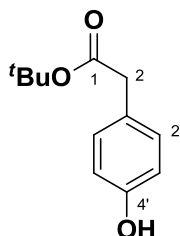
t_R-Wert (HPLC): 12.0 min (HPLC B, Kromasil C18, 70% Acetonitril/ Wasser 30 min. isokratisch)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.44 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 1.54 – 1.77 (m, 4H, 2''-H₂, 3''-H₂), 1.98 – 2.21 (m, 2H, 3-H₂), 2.21 – 2.29 (m, 2H, 4''-H₂), 2.91 (ddd, *J* = 16.9, 7.8, 6.0 Hz, 1H, 1-H_b), 2.98 – 3.09 (m, 2H, 4-H₂), 3.24 (dd, *J* = 16.8, 5.2, 1H, 1-H_a), 3.44 – 3.53 (m, 2H, 1''-H₂), 4.54 (s, 2H, 8'-H₂), 5.47 (dddd, *J* = 8.2, 6.7, 5.1, 3.3, 1H, 2-H), 7.07 – 7.19 (m, 4H, 5-H; 6-H; 7-H; 8-H), 7.34 – 7.41 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.91 – 8.05 (m, 2H, 2'-H; 6'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.99 (C-3''), 26.62 (C-4), 28.08 (C-3), 28.26 (^tBu-CH₃), 29.25 (C-2''), 34.77 (C-1), 35.40 (C-4''), 70.38 (C-1''), 70.41 (C-8'), 72.39 (C-2), 80.24 (^tBu-C), 126.10 (C-6), 126.18 (C-7), 127.20 (C-3', C-5'), 128.77 (C-5), 129.50 (C-8), 129.84 (C-1', C-2'; C-6'), 133.81 (C-4a), 135.73 (C-8a), 144.04 (C-4'), 166.17 (C-7'), 173.08 (COO^tBu).

**5.8 Target-Fishing-Strategie III:
4-Hydroxyphenylessigsäure(HPE)–Spacer**

5.8.1 2-(4'-Hydroxyphenyl)essigsäure-*tert*-butylester (141)



C₁₂H₁₆O₃ (208.25 g/mol)

141

Zu (4-Hydroxyphenyl)essigsäure (200 mg, 1.31 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. THF (4 mL) wurde langsam **98** (790 mg, 3.94 μ mol, 3.0 Eq.) zugetropft und über Nacht bei 60°C gerührt. Die Lösung wurde filtriert und flashchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als leicht gelbliches Öl (150 mg, 0.718 μ mol, 55%).

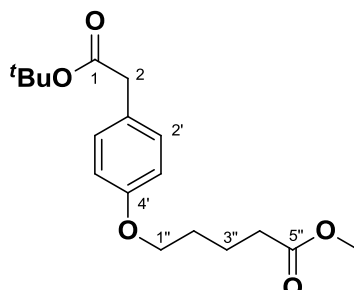
R_f-Wert: 0.70 (Toluol/Aceton = 2:1)

t_R-Wert (MPLC): 17 min (Cyclohexan (A)/Ethylacetat (B), 24 g Si35,
Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B, Stufe 3: 50% B).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.45 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 3.45 (s, 2H, 2-H₂), 6.68 - 6.74 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 28.13 (^tBu-C), 41.88 (C-2), 81.35 (^tBu-C), 115.63 (C-3', C-5'), 126.18 (C-1'), 130.40 (C-2', C-6'), 155.12 (C-4'), 172.45 (C=O^tBu).

5.8.2 O-tert.-Butyl-2-(4'-((5''-methoxy-5''-oxopentyl)oxy)phenyl)essigsäure (119)



C₁₈H₂₆O₅ (322,40)

119

Zu einer Lösung von **141** (111 mg, 0.531 mmol, 1.0 Eq.) und Kaliumcarbonat (149 mg, 1.08 mmol, 1.5 Eq.) in abs. DMF (4 mL) wurde nach 10 min Rühren bei RT langsam über 30 min 5-Bromvaleriansäuremethylester (**96**, 210 mg, 1.08 mmol, 1.5 Eq.) in abs. DMF (1 mL) zugetropft. Es wurde über Nacht bei 60°C gerührt, die entstandene Suspension filtriert und das Filtrat flashchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als leicht gelbliches Öl (91.0 mg, 0.282 µmol, 53%)

R_F-Wert: 0.54 (Cyclohexan/Aceton = 2:1)

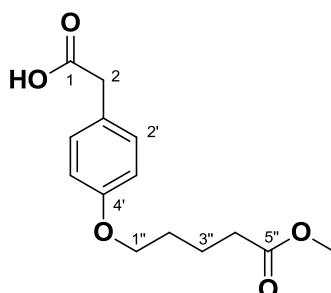
t_R-Wert (MPLC): 56 min (Wasser (A)/Aceton (B), 30 g RP-C18,

Stufe 1: 5% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 25% B, Stufe 4: 40% B, Stufe 5: 60% B, Stufe 6: 80% B).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.42 (s, 3H, ^tBu-CH₃), 1.73 – 1.88 (m, 2H, 2''-H, 3''-H), 2.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, 4'-H), 3.44 (s, 1H, 2-H₂), 3.66 (s, 1H, OMe), 3.94 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, 1''-H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 3-H; 5-H), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 2-H; 6-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 21.71 (C-3'), 28.10 (^tBu-CH₃), 28.74 (C-2'), 33.73 (C-4'), 41.79 (C-2), 51.57 (OMe), 67.37 (C-1'), 80.68 (^tBu-C), 114.50 (C-3', C-5'), 126.83 (C-1'), 130.23 (C-2', C-6'), 157.93 (C-4'), 171.32 (C-7'), 173.92 (C-5'').

5.8.3 2-(4'-((5''-Methoxy-5''-oxopentyl)oxy)phenyl)essigsäure (142)



C₁₄H₁₈O₅ (266,29)

142

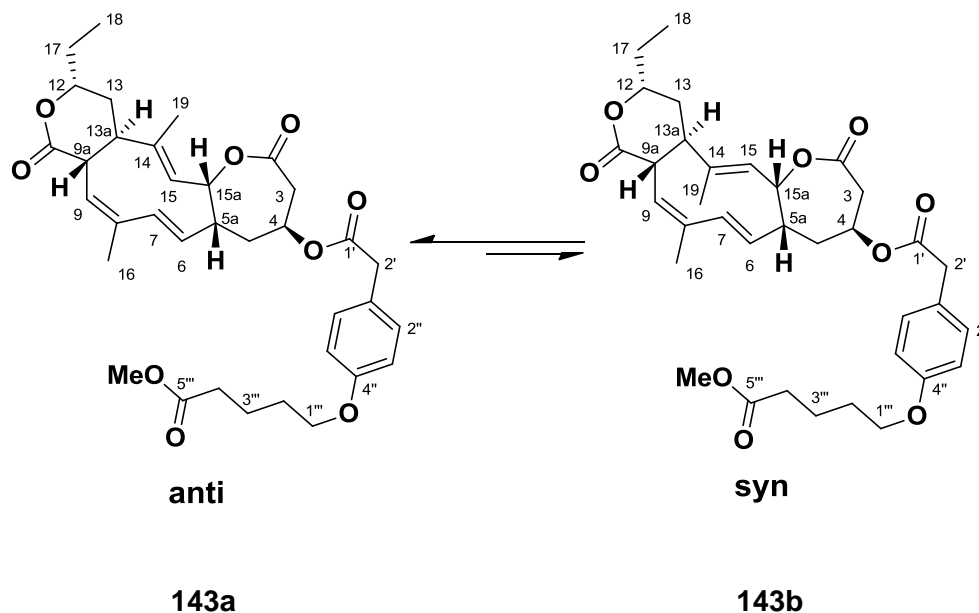
119 (91.0 mg, 282 μ mol) in abs. DCM (2 mL) wurde mit Trifluoressigsäure (0.4 mL) 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und TFA-Reste azeotrop mit DCM (1 x 5 mL) und Wasser (1 x 5 mL) entfernt. Man erhielt das Produkt als weissen Feststoff (70.6 mg, 265 μ mol, 94%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.81 (m, 4H, 2''-H₂; 3''-H₂), 2.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.57 (m, 2H, 2-H₂), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.95 (m, 2H, 1''-H₂), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2'-H; 6'-H), 10.68 (s, 1H, COOH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ = 22.03 (C-3''), 29.03 (C-2''), 34.09 (C-4''), 40.56 (C-2), 52.05 (OMe), 67.75 (C-1''), 115.02 (C-3', C-5'), 125.69 (C-1'), 130.79 (C-2', C-6'), 158.61 (C-4'), 174.60 (COOMe), 178.52 (COOH).

5.8.4 4-O-HPE-Collinolacton (143a, 143b)

(2'-(4''-((5'''-Methoxy-5'''-oxopentyl)oxy)phenyl)acetyl)-collinolacton



C₃₅H₄₄O₉ (608.72)

Zu einer Lösung aus **142** (22.2 mg, 83.2 μ mol, 3.0 Eq.), DIC (21.5 μ L, 139 μ mol, 5.0 Eq.) und DMAP (1.7 mg, 14 μ mol, 0.5 Eq.) in abs. DCM (1 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C über 10 min Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.0 mg, 27.7 μ mol, 1.0 Eq.) zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und HPLC-Aufreinigung erhielt man das Produkt als farbloses Öl (4.1 mg, 6.7 μ mol, 24%)

R_F-Wert: 0.35 (Cyclohexan/Aceton = 2:1)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

t_R-Wert (HPLC): 22.9 min (HPLC G, Kromasil C18, 65% Acetonitril/ Wasser 40 min. isokratisch, 12.5 mL/min.)

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): **143a, anti**: δ = 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.58 (s, 3H, 19-H₃), 1.59 – 1.70 (m, 2H, 17-H_a, 17-H_b), 1.70 – 1.83 (m, 6H, 2''-H₂, 3''-H₂, 13-H_a, 5-H_a), 1.90 (s, 3H, 16-H₃), 1.87 – 2.15 (m, 1H, 13-H_b), 2.38 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, 4'-H₂), 2.46 (ddt, *J* = 15.0, 9.8, 5.5 Hz, 1H, 5a-H), 2.60 (ddd, *J* = 11.2, 9.7, 4.2 Hz, 1H, 13a-H), 2.85 (ddd, *J* = 16.1, 15.5, 4.0 Hz, 1H, 3-H_a), 3.18 – 3.40 (m, 2H, 3-H_b, 9a-H), 3.62 (s, 2H, 4''-H), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.94 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, 1''-H), 4.29 – 4.43 (m, 1H, 12-H), 4.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.10 (dd, *J* = 16.3, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.22 – 5.31 (m, 1H, 4-H), 5.42 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 15a-H), 5.76 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, 9-H), 5.82 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 6.81 – 6.92 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.15 – 7.26 (m, 2H, 2''-H, 6''-H).

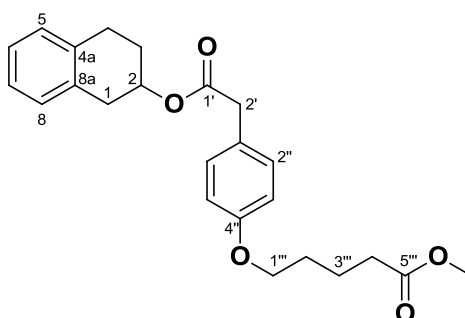
¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): **143a, anti**: δ = 9.86 (C-18), 13.42 (C-19), 20.01 (C-16), 22.16 (C-3'''), 28.64 (C-17), 29.24 (C-2'''), 32.05 (C-5), 32.57 (C-13), 34.09 (C-4'''), 40.51 (C-3), 40.81 (C-9a), 41.05 (C-2'), 43.93 (C-5a), 46.86 (C-13a), 51.89 (OMe), 65.86 (C-4), 68.11 (C-1'''), 78.65 (C-12), 82.33 (C-15a), 115.16 (C-3''; C-5''), 123.97 (C-9), 126.38 (C-1''), 126.47 (C-6), 130.72 (C-2''; C-6''), 133.76 (C-14), 134.09 (C-15), 136.01 (C-8), 139.39 (C-7), 158.86 (C-4''), 170.63 (C-7''), 171.37 (C-2), 173.82 (C-10), 174.17 (COOMe).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): **143b, syn**: δ = 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.55 (s, 1H, 19-H₃), 1.59 – 1.70 (m, 2H, 17-H_a, 17-H_b), 1.70 – 1.83 (m, 5H, 2'''-H₂; 3'''-H₂; 5-H_a), 1.90 (s, 3H, 16-H₃), 1.87 – 2.15 (m, 3H, 5-H_b, 13-H₂), 2.22 (ddd, *J* = 11.8, 9.8, 7.1 Hz, 1H, 13a-H), 2.38 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, 4''-H₂), 2.46 (ddt, *J* = 15.0, 9.8, 5.5 Hz, 1H, 5a-H), 2.85 (ddd, *J* = 16.1, 15.5, 4.0 Hz, 1H, 3-H_a), 3.18 – 3.40 (m, 2H, 3-H_b, 9a-H), 3.60 (s, 1H, 2''-H₂), 3.64 (s, 3H, OMe), 3.94 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, 1'''-H), 4.45 – 4.59 (m, 1H, 12-H), 5.10 (dd, *J* = 16.3, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.18 (t, *J* = 4.7 Hz, 0H, 15a-H), 5.22 – 5.31 (m, 1H, 4-H), 5.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 9-H), 5.71 (d, 1H, 7-H), 6.81 – 6.92 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.15 – 7.26 (m, 2H, 2''-H, 6''-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): **143b, syn**: δ = 10.22 (C-18), 20.52 (C-16), 22.07 (C-3'''), 23.72 (C-19), 28.82 (C-17), 29.13 (C-2'''), 32.17 (C-5), 34.05 (C-4'''), 35.25 (C-13), 40.71 (C-3), 40.81 (C-9a), 41.24 (C-2'), 44.86 (C-5a), 45.50 (C-13a), 51.89 (OMe), 65.86 (C-4), 68.29 (C-1'''), 78.81 (C-12), 80.17 (C-15a), 115.23 (C-3''; C-5''), 120.82 (C-9), 121.54 (C-15), 123.88 (C-6), 126.38 (C-1''), 126.47 (C-6), 130.92 (C-2''; C-6''), 138.12 (C-8), 138.79 (C-7), 158.83 (C-4''), 170.63 (C-1'), 171.19 (C-2), 173.94 (C-10), 174.17 (COOMe).

5.8.5 2-O-HPE-1,2,3,4-tetrahydronaphthol (**144**)

2-O-(2'-(4''-O-(5'''-methoxy-5'''-oxopentyl)oxyphenyl)-acetyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthol



C₂₄H₂₈O₅ (396,48)

144

Zu einer Lösung aus **142** (18.0 mg, 67.4 μmol, 1.0 Eq.), DIC (20.9 μL, 135 μmol, 2.0 Eq.) und DMAP (1.6 mg, 14 μmol, 0.2 Eq.) in abs. DCM (2 mL) wurde nach 5 min. Rühren bei 0°C 1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (10.0 mg, 67.4 μmol, 1.0 Eq.) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit DCM auf 25 mL aufgefüllt, mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) und Wasser (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels und HPLC-Aufreinigung (Kromasil C18, isokratisch 65% Acetonitril/Wasser) erhielt man das Produkt als farbloses Öl (3.0 mg, 7.6 μmol, 11%).

R_F-Wert: 0.61 (Cyclohexan/Aceton = 2:1)

Anfärbeverhalten: rosa (Anisaldehyd)

t_R -Wert (HPLC):

6.7 min (HPLC G, Kromasil C18, 65% Acetonitril/Wasser, 30 min. isokratisch, 12.5 mL/min.)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 1.77 – 1.87 (m, 4H, 2''-H₂; 3''-H₂), 1.88 – 2.07 (m, 2H, 3-H₂), 2.36 – 2.44 (m, 2H, 4''-H₂), 2.76 – 2.96 (m, 3H, 1-H_b, 4-H₂), 3.09 (dd, J = 16.7, 4.9 Hz, 1H, 1-H_a), 3.53 (s, 2H, 2'-H₂), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.91 - 4.00 (m, 2H, 1''-H₂), 5.16 – 5.27 (m, 2H, 2-H), 6.78 – 6.86 (m, 2H, 3''-H; 5''-H), 7.01 – 7.14 (m, 4H, 5-H; 6-H; 7-H; 8-H), 7.15 (d, J = 8.6 Hz, 2H, 2''-H; 6''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ = 21.80 (C-3'''), 26.49 (C-4), 27.85 (C-3), 28.83 (C-2'''), 34.62 (C-1), 40.92 (C-2'), 51.70 (OMe), 67.50 (C-1'''), 70.24 (C-2), 114.66 (C-3'', C-5''), 126.05 (C-6), 126.17 (C-7), 126.34 (C-1''), 128.73 (C-5), 129.45 (C-8), 130.34 (C-3'', C-5''), 133.76 (C-4a), 135.70 (C-8a), 158.15 (C-4''), 171.74 (C-1'), 174.04 (COOMe).

6 Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR)- und biologischer Aktivität von Collinolactonderivaten

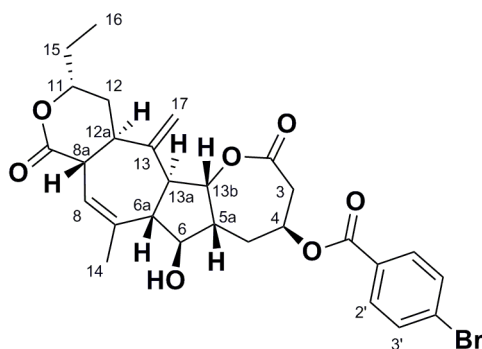
6.1 Einfluss des Collinolacton-Gerüsts

6.1.1 Reaktion von 4-O-(*p*-Brombenzoyl)collinolacton (21a, 21b) mit *m*-Chlor-perbenzoesäure

4-O-(*p*-Brombenzoyl)-collinolacton (**21a, 21b**, 22.1 mg, 40.6 μmol , 1.0 Eq.) in abs DCM (0.5 mL) wurde tropfenweise mit *m*-Chlor-perbenzoesäure (*m*CPBA) in abs. DCM (0.5 mL) versetzt und 4 h bei RT gerührt. Es wurde mit DCM auf 10 mL aufgefüllt, mit ges. Natriumthiosulfat-Lsg. (1 x 10 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (1 x 10 mL) und ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton = 3:2) erhielt man zwei Produkte (11.8 mg, 20.8 μmol , 51%)

Produkt 1: 4-O-(*p*-Brombenzoyl)-collazulen (**151**)

(4*S*,5*aR*,6*S*,6*aS*,8*aS*,11*R*,12*aR*,13*aS*,13*bS*)-11-ethyl-6-hydroxy-7-methyl-13-methylene-2,9-dioxo-3,4,5,5*a*,6,6*a*,8*a*,9,11,12,12*a*,13,13*a*,13*b*-tetra-decahydro-2H-pyrano[3',4':6,7]azuleno[1,2-*b*]oxepin-4-yl-4-brombenzoat



$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{BrO}_7$ (559,45)

151

Ausbeute: 5.6 mg, 10 μmol , 25%

R_f-Wert: 0.48 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 559.4$ $[M+H]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, berechnet): $m/z = 581.1145$ $[M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, 582.1179 $[M(^{79}\text{Br}^{13}\text{C})+\text{Na}]^+$, 583.1127 $[M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$, 584.1159 $[M(^{81}\text{Br}^{13}\text{C})+\text{Na}]^+$, 585.1192 $[M(^{79}\text{Br}^{13}\text{C}_2)+\text{Na}]^+$.

HR-ESI-MS: (positive Ionen, gefunden) $m/z = 581.1146$ $[M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, 582.1195 $[M(^{79}\text{Br}^{13}\text{C})+\text{Na}]^+$, 583.1135 $[M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$, 584.1163 $[M(^{81}\text{Br}^{13}\text{C})+\text{Na}]^+$, 585.1164 $[M(^{79}\text{Br}^{13}\text{C}_2)+\text{Na}]^+$.

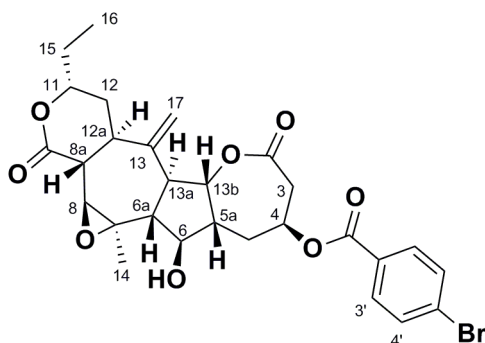
ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 557.1$ $[M(^{79}\text{Br})-\text{H}]^-$, 558.1 $[M(^{81}\text{Br})-\text{H}]^-$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 1.04$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 16-H₃), 1.62 – 1.71 (m, 1H, 15-H_a), 1.72 – 1.81 (m, 2H, 12-H_a, 15-H_b), 1.85 (ddd, $J = 14.9, 12.0, 3.2$ Hz, 1H, 13a-H), 2.02 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 14-H₃), 2.18 – 2.24 (m, 1H, 12-H_b), 2.31 (td, $J = 8.5, 3.1$ Hz, 1H, 12a-H), 2.37 – 2.51 (m, 3H, 5a-H; 5-H_a, 6a-H), 2.90 (dd, $J = 7.5, 6.4$ Hz, 1H, 8a-H), 2.96 (dd, $J = 13.5, 7.6$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.27 (dd, $J = 13.7, 8.7$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.08 (dd, $J = 9.5$ Hz, 1H, 6-H), 4.38 (ddd, $J = 14.9, 7.4, 1.7$ Hz, 1H, 11-H), 5.03 (s, 1H, 17-H_a), 5.10 (s, 1H, 17-H_b), 5.21 (dd, $J = 7.9, 4.5$ Hz, 1H, 13b-H), 5.48 – 5.55 (m, 1H, 4-H), 6.23 – 6.31 (m, 1H, 8-H), 7.63 - 7.68 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.91 – 7.95 (m, 2H, 2', 6'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 9.90$ (C-16), 21.40 (C-14), 28.48 (C-15), 31.33 (C-5), 33.16 (C-12), 39.74 (C-3), 42.14 (C-13a), 44.70 (C-12a), 45.64 (C-8a), 53.56 (C-5a), 55.25 (C-6a), 67.59 (C-13b), 78.81 (C-11), 79.19 (C-6), 79.86 (C-4), 104.99 (C-17), 128.13 (C-8), 129.01 (C-4'), 129.32 (C-1'), 131.70 (C-2', C-6'), 132.45 (C-3', C-5'), 138.89 (C-7), 153.92 (C-13), 165.29 (COOR), 170.02 (C-2), 173.34 (C-9).

Produkt 2: 4-O-(*p*-Brombenzoyl)-collazulen (152)

(4*S*,5*aR*,6*S*,6*aS*,8*aS*,11*R*,12*aR*,13*aS*,13*bS*)-11-ethyl-6-hydroxy-7-methyl-13-methylene-2,9-dioxo-3,4,5,5*a*,6,6*a*,8*a*,9,11,12,12*a*,13,13*a*,13*b*-hexadecahydro-7-oxireno-2*H*-pyrano[3',4':6,7]azuleno[1,2-*b*]oxepin-4-yl-4-brombenzoat



C₂₈H₃₁BrO₈ (575,44)

152

Ausbeute: 6.2 mg, 10.8 μmol, 27%

R_F-Wert: 0.40 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 597.1 [M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $599.1 [M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $1171.2 [2M(^{79}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $1172.2 [2M(^{79}\text{Br}^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$, $1173.2 [2M(^{81}\text{Br})+\text{Na}]^+$.

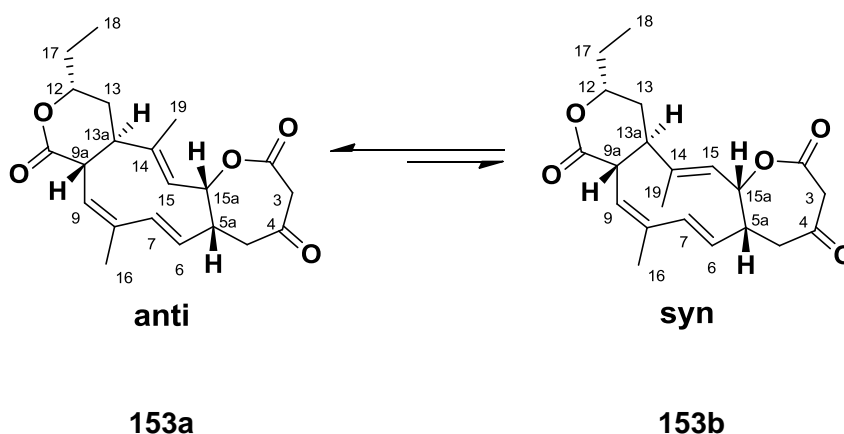
ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 573.1 [M(^{79}\text{Br})-\text{H}]^-$, $575.1 [M(^{81}\text{Br})-\text{H}]^-$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 1.05$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 16-H₃), 1.46 (s, 3H, 14-H₃), $1.64 - 1.87$ (m, 5H, 5-H_a, 6a-H, 12-H_a, 15-H₂), 2.18 (dd, $J = 8.8, 8.0$ Hz, 1H, 8a-H), $2.21 - 2.27$ (m, 1H, 12-H_b), $2.35 - 2.45$ (m, 1H, 5a-H), 2.49 (ddd, $J = 15.2, 4.2, 3.6$ Hz, 1H, 5-H_b), 2.56 (t, $J = 8.6, 8.6$ Hz, 1H, 12a-H), 2.67 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1H, 13a-H), 2.96 (dd, $J = 13.7, 7.2$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.29 (d,

$J = 7.8$ Hz, 1H, 8-H), 3.31 (dd, $J = 13.9, 8.7$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.61 (s, 1H, OH), 4.02 (dd, $J = 10.1, 10.1$ Hz, 1H, 6-H), 4.25 – 4.33 (m, 1H, 11-H), 5.00 (s, 1H, 17-H_a), 5.06 (s, 1H, 17-H_b), 5.17 (dd, $J = 7.6, 4.2$ Hz, 1H, 13b-H), 5.52 (dddd, $J = 7.1, 7.1, 7.0, 3.1$ Hz, 1H, 4-H), 7.62 – 7.66 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.89 – 7.94 (m, 2H, 3'-H, 5'-H).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₂Cl₂) $\delta = 9.48$ (C-16), 18.58 (C-14), 28.17 (C-15), 31.06 (C-5), 33.25 (C-12), 38.54 (C-13a), 39.69 (C-3), 44.45 (C-12a), 47.47 (C-8a), 51.48 (C-5a), 57.45 (C-6a), 57.98 (C-7), 62.34 (C-8), 67.28 (C-13b), 77.99 (C-6), 78.88 (C-11), 79.71 (C-4), 106.24 (C-17), 128.85 (C-4'), 129.12 (C-1'), 131.49 (C-2', C-6'), 132.28 (C-3', C-5'), 151.61 (C-13), 165.09 (COOR), 169.64 (C-2), 172.81 (C-9).

6.1.2 Synthese von 4-Keto-Collinolacton (153a, 153b)



C₂₁H₂₆O₅ (358,43)

Zu Dess-Martin-Periodinan (26.1 mg, 61.5 μ mol, 2.2 Eq.) wurde Collinolacton (10.3 mg, 28.6 μ mol, 1.0 Eq.) in abs. DCM gegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM auf 10 mL aufgefüllt, mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (1 x 10 mL) und Wasser (1 x 10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1) erhielt man das Produkt als farbloses Öl (4.7 mg, 13.1 mg, 46%).

R_F-Wert: 0.75 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:2)

0.54 (Cyclohexan/Ethylacetat = 1:1)

0.12 (Cyclohexan/Ethylacetat = 2:1)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 358.9$ [M+H]⁺.

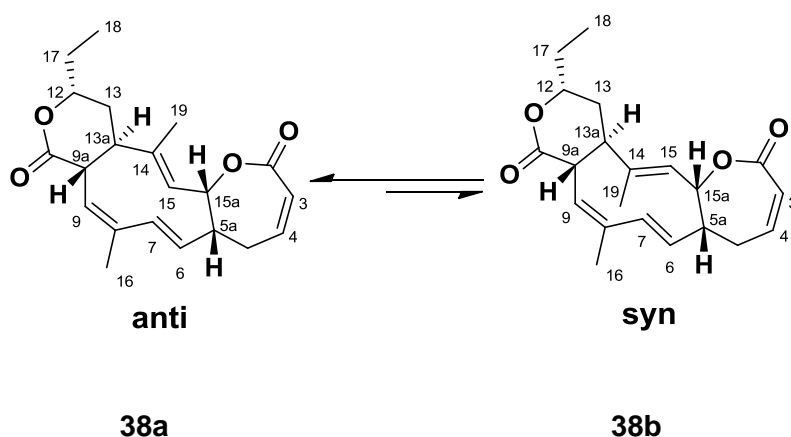
¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **153a, anti:** $\delta = 1.01$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.58 - 1.64 (m, 1H, 17-H_a), 1.64 (s, 3H, 19-H₃), 1.68 - 1.78 (m, 1H, 17-H_b), 1.79 - 1.84 (m, 1H, 13-H_a), 1.88 - 1.92 (m, 1H, 13-H_b), 1.93 - 1.94 (m, 3H, 16-H₃), 2.64 (ddd, $J = 8.6, 8.5, 2.8$ Hz, 1H, 13a-H), 2.77 (ddd, $J = 17.6, 11.0, 5.7$ Hz, 1H, 5a-H), 2.82 - 3.02 (m, 3H, 5-H_a, 3-H₂), 3.25 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, 9a-H), 3.56 (d, $J = 19.6$ Hz, 1H, 5-H_a), 3.84 (d, $J = 19.6$ Hz, 1H, 5-H_b), 4.31 - 4.37 (m, 1H, 12-H), 4.87 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, 15-H), 5.14 - 5.23 (m, 1H, 6-H), 5.51 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, 15a-H), 5.81 (dt, $J = 7.6, 1.2, 1.2$ Hz, 1H, 9-H), 5.90 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 7-H).

¹³C-NMR (126 MHz, CD₂Cl₂) **153a, anti:** $\delta = 9.89$ (C-18), 13.64 (C-19), 19.95 (C-16), 28.67 (C-17), 32.62 (C-13), 40.81 (C-9a), 45.04 (C-3), 46.89 (C-13a), 47.35 (C-5a), 49.73 (C-5), 78.55 (C-12), 82.59 (C-15a), 124.43 (C-9), 124.54 (C-6), 132.91 (C-15), 134.88 (C-14), 135.62 (C-8), 140.32 (C-7), 168.25 (C-2), 173.44 (C-10), 200.78 (4-CO).

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂) **153b, syn:** $\delta = 1.01$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.58 - 1.64 (m, 1H, 17-H_a), 1.65 (s, 3H, 19-H₃), 1.68 - 1.78 (m, 1H, 17-H_b), 1.94 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, 16-H₃), 2.02 - 2.07 (m, 2H, 13-H₂), 2.28 (m, 1H, 13a-H), 2.67 - 2.72 (m, 1H, 5a-H), 2.81 - 2.93 (m, 3H, 5-H_a, 3-H₂), 3.33 (dd, $J = 11.9, 8.4$ Hz, 1H, 9a-H), 3.54 (d, $J = 19.8$ Hz, 1H, 5-H_a), 3.77 (d, $J = 20.4$ Hz, 1H, 5-H_b), 4.39 (m, 1H, 12-H), 5.14 - 5.23 (m, 2H, 6-H; 15H), 5.30 (dd, $J = 9.9, 5.1$ Hz, 1H, 15a-H), 5.64 (dt, $J = 8.5, 1.5, 1.5$ Hz, 1H, 9-H), 5.97 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_2Cl_2) **153b, syn**: δ = 10.20 (C-18), 20.53 (C-16), 23.93 (C-19), 28.81 (C-17), 35.07 (C-13), 45.39 (C-3), 45.75 (C-13a), 46.89 (C-9a), 48.30 (C-5a), 49.34 (C-5), 78.75 (C-12), 80.91 (C-15a), 120.46 (C-15), 121.21 (C-9), 122.46 (C-6), 137.76 (C-8), 139.68 (C-7), 150.01 (C-14), 167.93 (C-2), 173.51 (C-10), 201.11 (4-CO).

6.1.3 Synthese von Collinolactenon (**38a**, **38b**)



$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$ (**342,43**)

Zu einer Lösung von Collinolacton (**20a**, **20b**, 6.0 mg, 16.6 μmol , 1.0 Eq.) in abs. Toluol (3 mL) wurde Burgess-Reagenz (Methoxycarbonylsulfamoyl)triethylammoniumhydroxid, 14.9 mg, 62.4 μmol , 3.8 Eq.) gegeben und bei 60°C 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Toluol auf 25 mL aufgefüllt und mit Wasser (3 x 25 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* und HPLC-Aufreinigung erhielt man das Produkt als weissen Feststoff (1.1 mg, 3.1 μmol , 19%).

ESI-MS: (positive Ionen) m/z = 343.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 365.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 707.5 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2) **38a, anti**: δ = 1.01 (t, J = 7.5 Hz, 3H, 18- H_3), 1.60 (s, 3H, 19- H_3), 1.63 – 1.86 (m, 3H, 13- H_a , 17- H_2), 1.88 – 1.91 (m, 1H, 13- H_b), 1.94 (s, 3H, 16- H_3), 2.49 – 2.58 (m, 1H, 5- H_a), 2.63 (td, J = 8.4, 3.0 Hz, 1H, 13a-H), 2.69 – 2.84 (m, 2H, 5a-H, 5- H_b), 3.25 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 4.30 – 4.43

(m, 1H, 12-H), 4.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 15-H), 5.24 (dd, $J = 16.4, 9.3$ Hz, 1H, 6-H), 5.35 – 5.42 (m, 1H, 15a-H), 5.76 (dt, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H, 9-H), 5.86 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.07 (ddd, $J = 10.6, 2.2, 0.9$ Hz, 1H, 3-H), 6.64 (ddd, $J = 10.6, 8.1, 5.5$ Hz, 1H, 4-H).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_2Cl_2) **38b, syn**: $\delta = 1.01$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 18- H_3), 1.61 (s, 3H, 19- H_3), 1.63 – 1.86 (m, 2H, 17- H_2), 1.94 (s, 3H, 16- H_3), 2.00 – 2.10 (m, 2H, 13- H_2), 2.15 – 2.28 (m, 1H, 13a-H), 2.49 – 2.58 (m, 1H, 5-Ha), 2.69 – 2.84 (m, 2H, 5a-H, 5- H_b), 3.33 (dd, $J = 11.7, 8.4$ Hz, 1H, 9a-H), 4.30 – 4.43 (m, 1H, 12-H), 5.18 – 5.26 (m, 3H, 6-H, 15-H, 15a-H), 5.60 (dt, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H, 9-H), 5.92 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H, 7-H), 6.03 (ddd, $J = 10.9, 2.3, 1.0$ Hz, 1H, 3-H), 6.56 – 6.63 (m, 1H, 4-H).

6.2 Strukturoptimierung der Benzoessäureeinheit biologisch aktiver Collinolactonanaloga

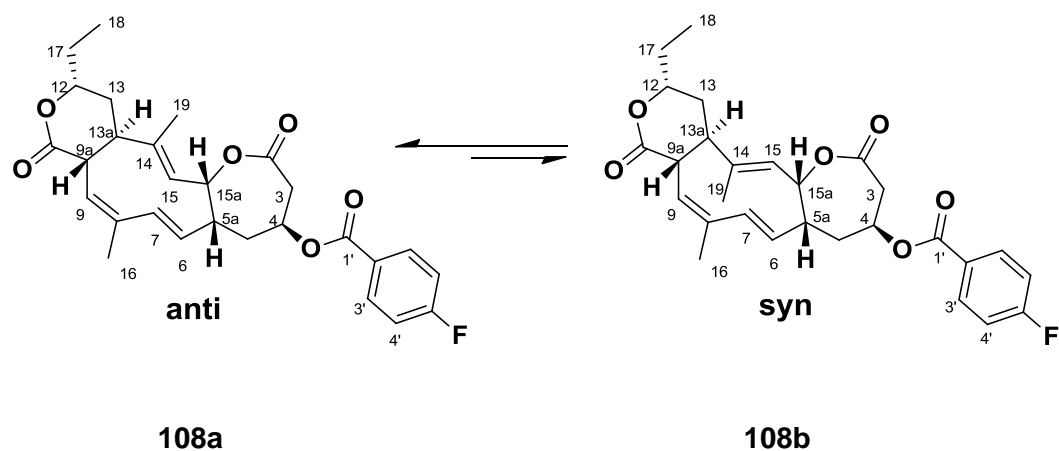
6.2.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Die folgende Synthesevorschrift wurde für alle Reaktionen dieses Kapitels angewandt. Die Aufreinigung erfolgt unterschiedlich anhand angepasster flashchromatographischer bzw. HPLC Programme.

Benzoessäurederivat (138.7 μmol , 5.0 Eq.) in abs. Dichlormethan (2 mL) wurde mit DIC (21.5 μl , 139 μmol , 5.0 Eq.) und DMAP (1.7 mg, 13.9 μmol , 0.5 Eq.) 5 min bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von Collinolacton (**20a**, **20b**, 10.0 mg, 27.7 μmol , 1.0 Eq.) in abs. DCM (1 mL) wurde bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Dichlormethan auf 25 mL aufgefüllt und mit ges. Ammoniumchlorid-Lsg. (2 x 25 mL), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. (2 x 25 mL) sowie ges. Natriumchlorid-Lsg. (1 x 25 mL) gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumcarbonat wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie und HPLC aufgereinigt.

Anfärbeverhalten aller Verbindungen: grün (Anisaldehyd)

6.2.2 4-O-(*p*-Fluorbenzoyl)collinolacton (108a, 108b)



C₂₈H₃₁FO₆ (482,54)

Ausbeute: 1.1 mg, 2.3 μmol, 8%

R_F-Wert: 0.52 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (HPLC):

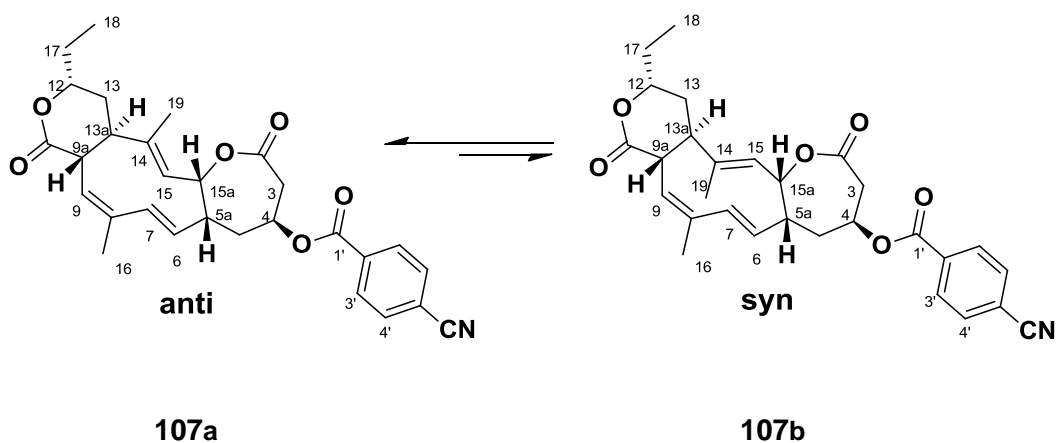
20.7 min (HPLC B, Kromasil C18, 55% Acetonitril/Wasser 40 min. isokratisch)

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **108a, anti:** δ = 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.55 - 1.69 (m, 2H, 17-H_a, 17-H_b), 1.70 (s, 3H, 19-H₃), 1.70 – 1.88 (m, 2H, 5-H_a, 13-H_a), 1.88 - 1.92 (m, 1H, 13-H_b), 1.92 – 1.96 (m, 3H, 16-H₃), 1.96 – 2.10 (m, 1H, 5-H_b), 2.59 – 2.73 (m, 2H, 13a-H), 2.87 (tt, *J* = 10.9, 5.5 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, *J* = 15.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, *J* = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 4.31 – 4.48 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, 15-H), 5.13 – 5.24 (m, 1H, 6-H), 5.45 – 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.66 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.93 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.13 – 7.23 (m, 2H, 4'-H, 6'-H), 8.05 – 8.13 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **108b, syn:** δ = 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.55 - 1.69 (m, 2H, 17-H_a, 17-H_b), 1.63 (s, 3H, 19-H₃), 1.70 – 1.88 (m, 2H, 5-H_a, 13-H_a), 1.88 - 1.92 (m, 1H, 13-H_b), 1.92 – 1.96 (m, 3H, 16-H₃), 1.96 – 2.10 (m,

1H, 5-H_b), 2.26 (ddd, $J = 11.9, 9.1, 7.3$ Hz, 1H, 13a-H), 2.71 – 2.84 (m, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, $J = 15.5, 4.5$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.37 (dd, $J = 11.8, 8.5$ Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, $J = 15.6, 10.1$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.31 – 4.48 (m, 1H, 12-H), 5.13 - 5.24 (m, 1H, 6-H), 5.24 – 5.30 (m, 1H, 15-H), 5.45 – 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 9-H), 5.66 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, 15a-H), 5.98 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 7.13 – 7.23 (m, 2H, 4'-H, 6'-H), 8.05 – 8.13 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

6.2.3 4-O-(p-Cyanobenzoyl)collinolacton (107a, 107b)



C₂₉H₃₁NO₆ (489,56)

Ausbeute: 4.8 mg, 9.8 μmol, 35%

R_f-Wert: 0.49 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 26 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC):

13.4 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 60% Acetonitril/Wasser 40 min.
isokratisch)

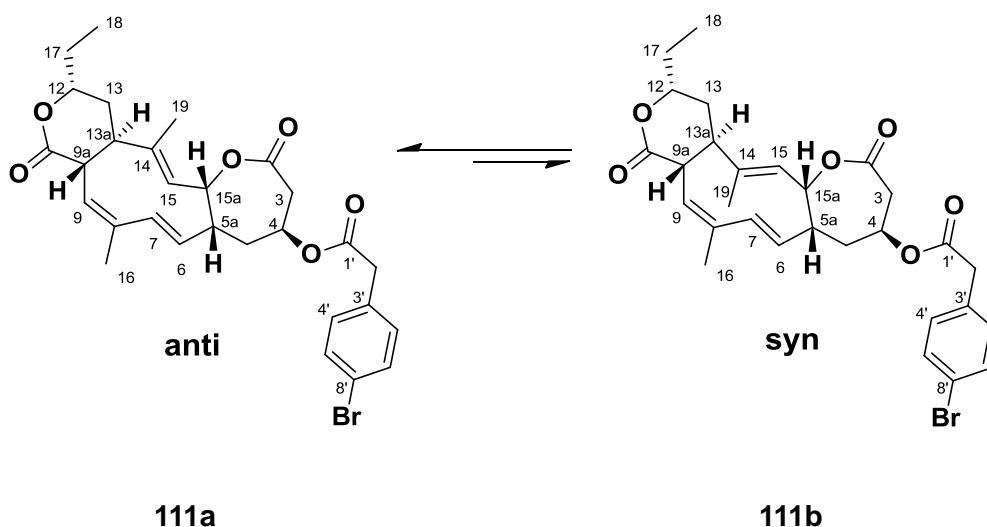
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **107a, anti**: δ = 0.95 – 1.07 (m, 3H, 18-H₃), 1.64 - 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.69 (s, 3H, 19-H₃), 1.71 – 1.91 (m, 3H, 17H_b, 13-H_a, 5H_a), 1.91 - 1.98 (m, 3H, 16-H₃), 2.61 – 2.74 (m, 2H, 13a-H, 5H_b), 2.86 (tt, *J* = 10.9, 5.4 Hz, 1H, 5a-H), 3.10 (dd, *J* = 15.3, 4.7 Hz, 1H, 3-H_a), 3.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.43 - 3.53 (m, 1H, 3-H_b), 4.29 – 4.48 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.12 – 5.25 (m, 1H, 6-H), 5.58 (ddt, *J* = 9.8, 4.9, 2.5 Hz, 1H, 4-H), 5.62 - 5.69 (m, 1H, 15a-H), 5.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.93 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.82 (dt, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 8.16 (dt, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **107a, anti**: δ = 9.84 (C-18), 13.53 (C-19), 20.00 (C-16), 28.64 (C-17), 32.23 (C-5), 32.60 (C-13), 40.62 (C-3), 40.80 (C-9a), 44.22 (C-5a), 46.86 (C-13a), 67.46 (C-4), 78.64 (C-12), 82.43 (C-15a), 117.50 (C-5'), 118.35 (CN), 124.11 (C-9), 126.16 (C-6), 130.52 (C-3'; C-7'), 133.07 (C-4'; C-6'), 133.74 (C-15), 134.04 (C-2'), 134.20 (C-14), 136.00 (C-8), 139.72 (C-7), 164.56 (C-1'), 170.36 (C-2), 173.81 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **107b, syn**: δ = 0.95 – 1.07 (m, 3H, 18-H₃), 1.63 (s, 3H, 19-H₃), 1.64 – 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.71 – 1.91 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.91 - 1.98 (m, 3H, 16-H₃), 1.94 – 2.11 (m, 3H, 5-H_b, 13-H₂), 2.27 (ddd, *J* = 11.9, 9.0, 7.3 Hz, 1H, 13a-H), 2.77 (dt, *J* = 10.4, 5.1 Hz, 1H, 5a-H), 3.10 (dd, *J* = 15.3, 4.7 Hz, 1H, 3-H_a), 3.31 – 3.44 (m, 1H, 9a-H), 3.43 – 3.53 (m, 1H, 3-H_b), 4.29 - 4.48 (m, 1H, 12-H), 5.12 – 5.25 (m, 1H, 6-H), 5.25 – 5.31 (m, 1H, 15-H), 5.48 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, 15a-H), 5.58 (ddt, *J* = 9.8, 4.9, 2.5 Hz, 1H, 4-H), 5.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.99 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.82 (dt, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 2H, Ar-H), 8.16 (dt, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **107b, syn**: δ = 10.17 (C-18), 20.58 (C-16), 23.90 (C-19), 28.79 (C-17), 32.98 (C-5), 35.17 (C-13), 40.62 (C-3), 45.26 (C-5a), 45.58 (C-13a), 45.86 (C-9a), 67.32 (C-4), 78.86 (C-12), 80.48 (C-15a), 117.50 (C-5'), 118.35 (CN), 120.99 (C-9), 121.52 (C-15), 123.92 (C-6), 130.65 (C-3'; C-7'), 133.00 (C-4'; C-6'), 134.04 (C-2'), 136.00 (C-8), 138.14 (C-7), 149.37 (C-14), 164.56 (C-1'), 170.25 (C-2), 173.81 (C-10).

6.2.4 4-O-(p-Bromphenylacetyl)collinolacton (111a, 111b)



$C_{29}H_{33}BrO_6$ (557,47)

Ausbeute: 3.6 mg, 6.5 μ mol, 23%

R_f -Wert: 0.55 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R -Wert (MPLC): 26 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 10% B, Stufe 3: 30% B)

t_R -Wert (HPLC): 14.8 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 65% Acetonitril/ Wasser 30 min. isokratisch)

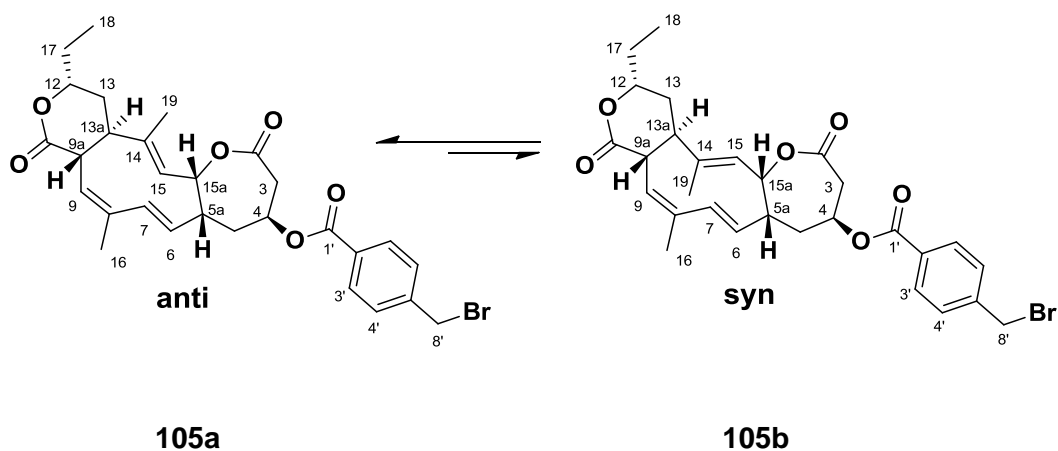
1H -NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) **111a, anti:** δ = 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18- H_3), 1.49 (s, 3H, 19- H_3), 1.61 – 1.86 (m, 5H, 13- H_b , 13- H_a , 5- H_a , 17- H_b , 17- H_a), 1.91 (s, 3H, 16- H_3), 2.48 (m, 1H, 5a-H), 2.60 (td, J = 8.5, 2.9 Hz, 1H, 13a-H), 2.83 (dd, J = 15.3, 4.7 Hz, 1H, 3- H_a), 3.21 – 3.41 (m, 2H, 3- H_b , 9a-H), 3.67 (s, 1H, 2'- H_2), 4.31 – 4.44 (m, 1H, 12-H), 4.78 (d, J = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.09 (dd, J = 16.3, 9.8 Hz, 1H, 6-H), 5.33 – 5.40 (m, 2H, 15a-H, 4-H), 5.76 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 9-H), 5.80 (d, J = 16.6 Hz, 1H, 7-H), 7.15 – 7.25 (m, 2H, 4', 8'-H), 7.44 – 7.54 (m, 2H, 5'-H, 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **111a, anti**: δ = 9.89 (C-18), 13.42 (C-19), 19.99 (C-16), 28.65 (C-17), 32.02 (C-5), 32.65 (C-13), 40.46 (C-3), 40.76 (C-9a), 41.41 (C-2'), 43.88 (C-5a), 46.80 (C-13a), 66.26 (C-4), 78.66 (C-12), 82.32 (C-15a), 121.80 (C-6'), 123.96 (C-9), 126.29 (C-6), 131.60 (C-4'; C-8'), 132.40 (C-5'; C-7'), 133.57 (C-14), 133.67 (C-3'), 134.21 (C-15), 135.98 (C-8), 139.45 (C-7), 170.44 (C-1'), 170.52 (C-2), 173.88 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **111b, syn**: δ = 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.57 (s, 3H, 19-H₃), 1.61 – 1.86 (m, 5H, 13-H₂, 5-H_a, 17-H₂), 1.97 (s, 3H, 16-H₃), 2.00 – 2.29 (m, 1H, 5-H_b), 2.10 – 2.30 (m, 1H, 13a-H), 2.48 (m, 1H, 5a-H), 2.85 (dd, *J* = 16.0, 3.8 Hz, 1H, 3-H_a), 3.21 – 3.41 (m, 2H, 3-H_b, 9a-H), 3.65 (s, 2H, 2'-H₂), 4.43 – 4.56 (m, 1H, 12-H), 5.09 (dd, *J* = 16.3, 9.8 Hz, 1H, 6-H), 5.24 - 5.31 (m, 1H, 15-H), 5.33 – 5.40 (m, 2H, 15a-H, 4-H), 5.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 9-H), 5.80 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, 7-H), 7.15 – 7.25 (m, 2H, 4', 8'-H), 7.44 - 7.54 (m, 2H, 5', 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **111b, syn**: δ = 10.24 (C-18) 20.57 (C-16), 23.81 (C-19), 28.85 (C-17), 30.25 (C-5), 35.07 (C-13), 40.67 (C-3), 41.45 (C-2'), 44.95 (C-5a), 45.49 (C-13a), 46.99 (C-9a), 65.96 (C-4), 78.90 (C-12), 80.18 (C-15a), 120.91 (C-9), 121.35 (C-15), 121.80 (C-6'), 123.83 (C-6), 131.80 (C-4'; C-8'), 132.26 (C-5'; C-7'), 133.67 (C-3'), 137.85 (C-8), 138.92 (C-7), 170.47 (C-1'), 170.52 (C-2), 173.91 (C-10).

6.2.5 4-O-p-(Brommethyl)benzoylcollinolacton (105a, 105b)



C₂₉H₃₃BrO₆ (557,47)

Ausbeute: 1.8 mg, 3.2 μmol, 12%

R_F-Wert: 0.55 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 28.4 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 55% Acetonitril/ Wasser 40 min. isokratisch)

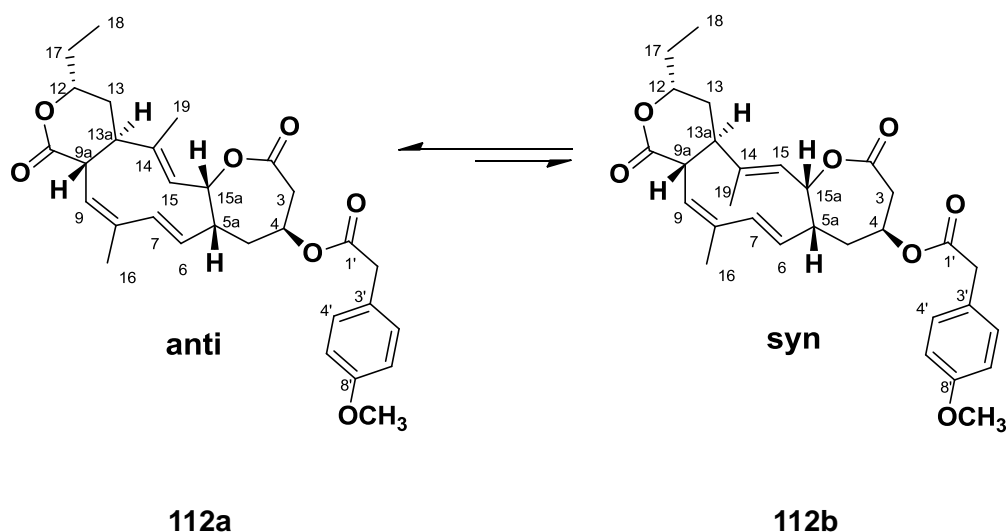
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **105a, anti:** δ = 1.02 (s, 3H, 18-H₃), 1.60 – 1.72 (m, 1H, 17-H_a), 1.69 – 1.94 (m, 4H, 17-H_b, 5-H_a, 13-H_a, 13-H_b), 1.94 (s, 3H, 16-H₃), 2.60 - 2.72 (m, 2H, 13a-H, 5-H_b) 2.88 (dddd, *J* = 11.0, 11.0, 5.4, 5.4 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, *J* = 15.4, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.40 - 3.52 (m, 1H, 3-H_b), 4.31 – 4.46 (m, 1H, 12-H), 4.55 (s, 2H, 8'-H₂), 4.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.20 (dt, *J* = 16.4, 9.7 Hz, 1H, 6-H), 5.51 – 5.61 (m, 1H, 4-H), 5.67 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.91 (s, 1H, 7-H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 4', 6'-H), 8.00 – 8.09 (m, 2H, 3', 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **105a, anti:** δ = 9.85 (C-18), 13.53 (C-19), 20.00 (C-16), 28.65 (C-17), 32.25 (C-5), 32.65 (C-13), 32.78 (C-8'), 40.80 (C-3), 40.87 (C-9a), 44.34 (C-5a), 46.87 (C-13a), 66.53 (C-4), 78.62 (C-12), 82.44 (C-15a), 124.02 (C-9), 126.27 (C-6), 129.82 (C-4', C-6'), 130.22 (C-2'), 130.51 (C-3', C-7'), 133.85 (C-15), 134.13 (C-14), 136.04 (C-8), 139.64 (C-7), 144.07 (C-5'), 165.40 (C-1'), 170.62 (C-2), 173.82 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **105b, syn:** δ = 1.02 (s, 3H, 18-H₃), 1.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, 17-Ha), 1.61 (s, 3H, 19-H₃), 1.69 – 1.94 (m, 2H, 17-Hb, 5-Ha), 1.94 (s, 3H, 16-H₃), 1.97 – 2.02 (m, 2H, 13-H₂), 2.01 – 2.11 (m, 1H, 5-H_b), 2.66 (m, 1H, 13a-H), 2.73 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, *J* = 15.4, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 3.32 – 3.45 (m, 1H, 9a-H), 3.40 – 3.52 (m, 1H, 3-H_b), 4.31 – 4.46 (m, 1H, 12-H), 4.55 (s, 2H, 8'-H₂), 5.20 (dt, *J* = 16.4, 9.7 Hz, 1H, 6-H), 5.26 – 5.32 (m, 1H, 15-H), 5.46 – 5.55 (m, 1H, 15a-H), 5.61 (dt, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H, 9-H), 5.92 – 6.02 (m, 1H, 7-H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 4', 6'-H), 8.00 – 8.09 (m, 3H, 3', 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **105b, syn:** δ = 10.17 (C-18), 20.59 (C-16), 23.87 (C-19), 28.65 (C-17), 32.25 (C-5), 32.65 (C-13), 32.78 (C-8'), 40.80 (C-3), 40.87 (C-9a), 45.33 (C-5a), 45.62 (C-13a), 66.47 (C-4), 78.81 (C-12), 82.44 (C-15a), 120.90 (C-9), 121.66 (C-15), 124.08 (C-6), 129.75 (C-4', C-6'), 130.22 (C-2'), 130.64 (C-3', C-7'), 136.04 (C-8), 139.64 (C-7), 144.07 (C-5'), 147.35 (C-14), 165.40 (C-1'), 170.62 (C-2), 173.82 (C-10).

6.2.6 4-O-(p-Methoxyphenylacetyl)collinolacton (112a, 112b)



C₃₀H₃₆O₇ (508,60)

Ausbeute: 3.3 mg, 6.5 μmol, 23%

R_f-Wert: 0.47 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 25 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 9.7 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 70% Acetonitril/ Wasser 30 min. isokratisch)

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **112a, anti:** δ = 1.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.55 (s, 3H, 19-H₃), 1.59 – 1.70 (m, 1H, 17-H_a), 1.70 – 1.85 (m, 3H, 13-H_a, 5-H_a, 17-H_b), 1.91 (s, 3H, 16-H₃), 1.93 – 2.10 (m, 1H, 13-H_b), 2.47 (m, 1H, 5a-H), 2.61 (td, *J* = 8.7, 3.3 Hz, 1H, 13a-H), 2.83 (dd, *J* = 15.2, 4.7 Hz, 1H, 3-H_a), 3.20 - 3.36 (m, 2H, 3-H_b, 9a-H), 3.63 (s, 2H, 2'-H₂), 3.78 (s, 3H, OMe), 4.37 (ddt, *J* = 10.3, 7.3, 3.8 Hz, 1H, 12-H), 4.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, 15-H), 5.01 - 5.16 (m, 1H, 6-H), 5.29 – 5.35 (m, 1H, 4-H), 5.41 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, 15a-H), 5.76 (d, *J* = 7.5 Hz,

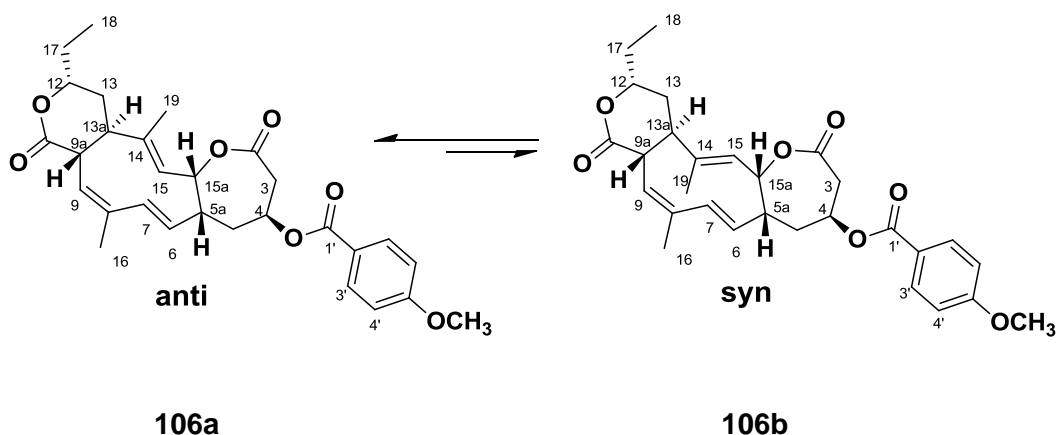
1H, 9-H), 5.82 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.88 (m, 2H, 5'-H; 7'-H), 7.21 (m, 2H, 4'-H; 8'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **112a, anti**: $\delta = 9.87$ (18-H₃), 13.40 (C-19), 20.01 (C-16), 28.64 (C-17), 32.05 (C-5), 32.60 (C-13), 40.54 (C-3), 40.80 (C-9a), 41.07 (C-2'), 43.95 (C-5a), 46.84 (C-13a), 55.76 (OMe), 65.90 (C-4), 78.67 (C-12), 82.34 (C-15a), 114.62 (C-5'; C7'), 123.95 (C-9), 126.46 (C-6, C-3'), 130.75 (C-4'; C-8'), 133.75 (C-14), 134.10 (C-15), 136.03 (C-8), 139.39 (C-7), 159.46 (C-6'), 170.66 (C-1'), 171.36 (C-2), 173.86 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **112b, syn**: $\delta = 1.06$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 18-H₃), 1.55 (s, 3H, 19-H₃), 1.59 – 1.70 (m, 2H, 17-H₂), 1.70 – 1.85 (m, 1H, 5-H_a), 1.90 (s, 3H, 16-H₃), 1.93 – 2.10 (m, 3H, 5-H_b, 13-H₂), 2.15 – 2.28 (m, 1H, 13a-H), 2.47 (ddt, $J = 15.2, 9.8, 5.4$ Hz, 1H, 5a-H), 2.83 (dd, $J = 15.2, 4.7$ Hz, 1H, 3-H_a), 3.20 - 3.36 (m, 2H, 3-H_b, 9a-H), 3.61 (s, 2H, 2'-H₂), 3.76 (s, 3H, OMe), 4.45 – 4.57 (m, 1H, 12-H), 5.01 – 5.16 (m, 2H, 6-H, 15 H), 5.21 – 5.30 (m, 1H, 15a-H), 5.29 – 5.35 (m, 1H, 4-H), 5.57 (dt, $J = 8.5, 1.4$ Hz, 1H, 9-H), 5.71 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, 7-H), 6.88 (m, 2H, 5'-H; 7'-H), 7.21 (m, 2H, 4'-H; 8'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **112b, syn**: $\delta = 10.20$ (18-H₃), 20.53 (C-16), 23.72 (C-19), 28.84 (C-17), 32.10 (C-5), 35.18 (C-13), 40.74 (C-3), 41.30 (C-2'), 43.95 (C-5a), 44.88 (C-13a), 45.48 (C-9a), 55.82 (OMe), 65.69 (C-4), 78.88 (C-12), 80.13 (C-15a), 114.62 (C-5'; C7'), 120.89 (C-9), 121.52 (C-15), 123.91 (C-6), 126.46 (C-6, C-3'), 130.99 (C-4'; C-8'), 138.07 (C-8), 138.77 (C-7), 148.85 (C-14), 159.38 (C-6'), 170.65 (C-1'), 171.12 (C-2), 173.98 (C-10).

6.2.7 4-O-(p-Methoxybenzoyl)collinolacton (106a, 106b)



C₂₉H₃₄O₇ (494,58)

Ausbeute: 1.8 mg, 3.7 μ mol, 13%

R_f-Wert: 0.48 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 15 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,

Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 11.7 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 65% Acetonitril/ Wasser 30 min. isokratisch).

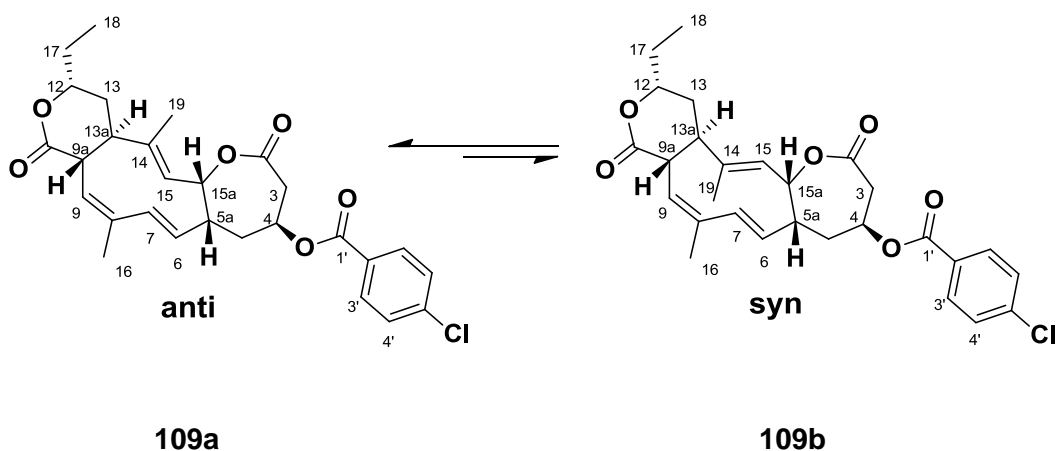
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **106a, anti:** δ = 1.02 (s, 3H, 18-H₃), 1.71 (s, 3H, 19-H₃), 1.73 – 1.87 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.87 – 1.99 (m, 6H, 5-H_b, 16-H₃, 13-H_a, 13-H_b), 2.57 – 2.72 (m, 2H, 13a-H; 5-H_b), 2.89 (dddd, J = 11.5, 11.5, 5.7, 5.7 Hz, 1H, 5a-H), 3.06 (dd, J = 15.6, 4.3 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (dd, J = 15.6, 10.2 Hz, 1H, 3-H_b), 3.88 (s, 3H, OMe), 4.30 – 4.49 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 5.19 (dd, J = 16.4, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.45 – 5.56 (m, 1H, 4-H), 5.67 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.77 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.92 (d, J = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 6.99 (s, 2H, 4'-H; 6'), 8.00 (s, 2H, 3'-H; 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **106a, anti**: δ = 9.84 (C-18), 13.48 (C-19), 19.99 (C-16), 28.65 (C-17), 32.26 (C-5), 32.65 (C-13), 40.81 (C-3), 41.06 (C-9a), 44.43 (C-5a), 46.87 (C-13a), 56.12 (OMe), 65.90 (C-4), 78.62 (C-12), 82.44 (C-15a), 114.39 (C-4'; C-6'), 122.62 (C-2'), 123.96 (C-9), 126.34 (C-6), 132.06 (C-3'; C-7'), 133.93 (C-15), 134.05 (C-14), 136.07 (C-8), 139.57 (C-7), 164.42 (C-5'), 165.63 (C-1'), 170.84 (C-2), 173.84 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **106b, syn**: δ = 1.02 (s, 3H, 18-H₃), 1.63 (s, 4H, 17-H_a, 19-H₃), 1.73 – 1.87 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.87 – 1.99 (m, 4H, 5-H_b, 16-H₃), 1.99 - 2.11 (m, 2H, 13-H₂), 2.19 – 2.30 (m, 1H, 13a-H), 2.79 (ddd, *J* = 15.1, 10.0, 4.9 Hz, 1H, 5a-H), 3.06 (dd, *J* = 15.6, 4.3 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (dd, *J* = 15.6, 10.2 Hz, 1H, 3-H_b), 3.88 (s, 3H, OMe), 4.30 – 4.49 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 5.19 (dd, *J* = 16.4, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.25 – 5.30 (m, 1H, 15a-H), 5.45 – 5.56 (m, 1H, 4-H), 5.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 9-H), 5.98 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 6.99 (s, 2H, 4'-H; 6'-H), 8.00 (s, 2H, 3'-H; 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **106b, syn**: δ = 10.17 (C-18), 20.60 (C-16), 23.87 (C-19), 28.65 (C-17), 32.26 (C-5), 35.25 (C-13), 40.98 (C-3), 44.43 (C-5a), 45.35 (C-13a), 45.61 (C-9a), 56.12 (OMe), 65.87 (C-4), 78.83 (C-12), 80.44 (C-15a), 114.31 (C-4'; C-6'), 122.62 (C-2'), 123.96 (C-9), 126.34 (C-6), 132.18 (C-3'; C-7'), 133.93 (C-15), 138.22 (C-8), 138.98 (C-7), 153.44 (C-14), 164.42 (C-5'), 165.63 (C-1'), 170.87 (C-2), 173.82 (C-10).

6.2.8 4-O-(*p*-Chlorbenzoyl)collinolacton (109a, 109b)



C₂₈H₃₁ClO₆ (499,00)

Ausbeute: 2.8 mg, 5.6 μmol, 20%

R_F-Wert: 0.62 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 21 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 28.8 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 55% Acetonitril/ Wasser 40 min. isokratisch).

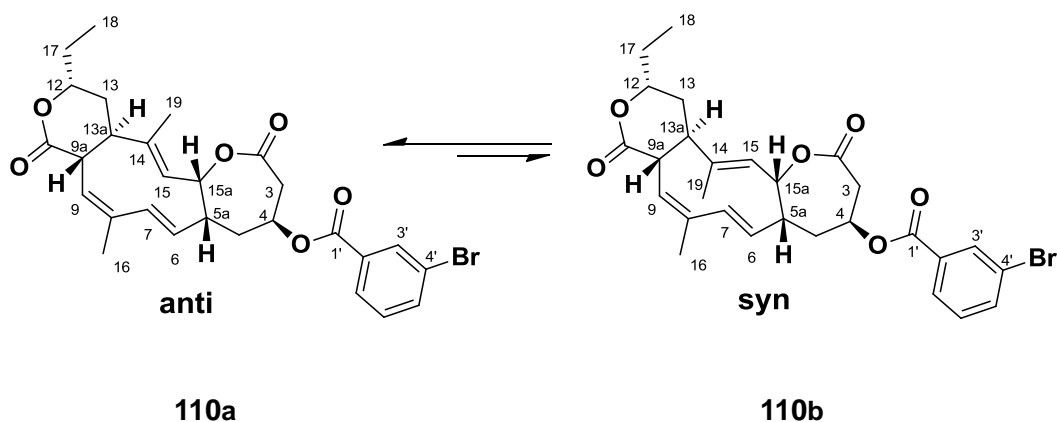
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **109a, anti:** δ = 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.57 - 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.70 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, 19-H₃), 1.71 - 1.88 (m, 2H, 17-H_a, 5-H_a), 1.88 - 1.92 (m, 1H, 13-H_a), 1.93 (m, 4H, 16-H₃, 13-H_b), 2.60 - 2.73 (m, 2H, 13a-H, 5-H_b), 2.86 (dddd, *J* = 16.3, 16.3, 5.4, 5.4 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, *J* = 15.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 3.27 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, *J* = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 4.31 - 4.46 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.18 (dd, *J* = 16.4, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.45 - 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.65 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.92 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.46 - 7.55 (m, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.96 - 8.06 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **109a, anti**: δ = 9.84 (C-18), 13.51 (C-19), 19.99 (C-16), 28.65 (C-17), 32.21 (C-5), 32.64 (C-13), 40.80 (C-3), 40.84 (C-9a), 44.33 (C-5a), 46.86 (C-13a), 66.72 (C-4), 78.62 (C-12), 82.42 (C-15a), 124.04 (C-9), 126.21 (C-6), 128.87 (C-2'), 129.52 (C-4'; C-6'), 131.45 (C-3'; C-7'), 133.82 (C-15), 134.13 (C-14), 136.03 (C-8), 139.66 (C-7), 140.40 (C-5'), 165.13 (C-1'), 170.56 (C-2), 173.80 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **109b, syn**: δ = 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.57 - 1.67 (m, 1H, 17-H_a), 1.63 (s, 3H, 19-H₃), 1.71 - 1.88 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.97 (s, 5H, 16-H₃, 13-H₂), 2.06 (ddd, *J* = 14.4, 9.0, 5.5 Hz, 1H, 5-H_b), 2.26 (ddd, *J* = 11.8, 9.0, 7.2 Hz, 1H, 13a-H), 2.73 - 2.81 (m, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, *J* = 15.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 3.33 - 3.41 (m, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, *J* = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 4.31 - 4.46 (m, 1H, 12-H), 4.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.18 (dd, *J* = 16.4, 10.2 Hz, 1H, 6-H), 5.26 - 5.30 (m, 1H, 15a-H), 5.45 - 5.59 (m, 1H, 4-H), 5.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 9-H), 5.98 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.46 - 7.55 (m, 2H, 4'-H, 6'-H), 7.96 - 8.06 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **109b, syn**: δ = 10.17 (C-18), 20.59 (C-16), 23.88 (C-19), 28.79 (C-17), 32.21 (C-5), 32.64 (C-13), 40.80 (C-3), 44.33 (C-5a), 45.29 (C-13a), 45.60 (C-9a), 66.64 (C-4), 78.83 (C-12), 80.45 (C-15a), 120.92 (C-9), 121.62 (C-15), 126.21 (C-6), 128.87 (C-2'), 129.45 (C-4'; C-6'), 131.59 (C-3'; C-7'), 136.03 (C-8), 139.09 (C-7), 140.40 (C-5'), 165.13 (C-1'), 170.54 (C-2), 173.80 (C-10).

6.2.9 4-O-(*m*-Brombenzoyl)collinolacton (110a, 110b)



$C_{28}H_{31}BrO_6$ (543,45)

Ausbeute: 3.2 mg, 5.9 μ mol, 21%

R_F-Wert: 0.54 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 21 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 30.0 min (HPLC B, Eurosphere II C18a, 55% Acetonitril/ Wasser 40 min. isokratisch)

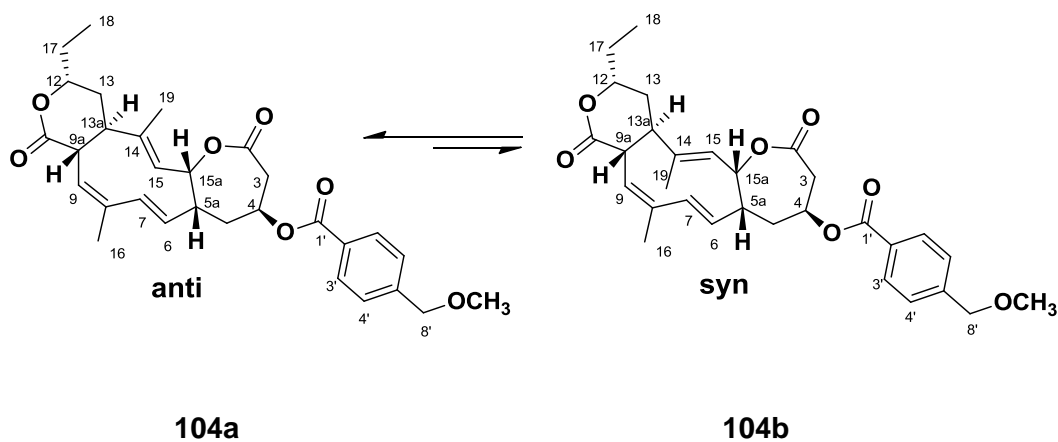
¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **110a, anti:** δ = 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.56 - 1.72 (m, 1H, 17-H_a), 1.73 (s, 3H, 19-H₃), 1.75 - 1.88 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.88 - 1.92 (m, 1H, 13-H_a), 1.94 (s, 4H, 16-H₃, 13-H_b), 2.61 - 2.71 (m, 2H, 13a-H, 5-H_b), 2.88 (dddd, J = 16.3, 5.3 Hz, 1H, 5a-H), 3.09 (dd, J = 15.6, 4.3 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, J = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 4.30 - 4.49 (m, 1H, 12-H), 4.89 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 5.18 (dd, J = 16.4, 10.0 Hz, 1H, 6-H), 5.45 - 5.64 (m, 1H, 4-H), 5.67 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 9-H), 5.92 (s, 1H, 7-H), 7.40 (td, J = 7.9, 2.4 Hz, 1H, 6'-H), 7.73 - 7.84 (m, 1H, 5'-H), 7.96 - 8.06 (m, 1H, 7'-H), 8.17 - 8.27 (m, 1H, 3'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **110a, anti**: δ = 9.83 (C-18), 13.55 (C-19), 19.97 (C-16), 28.64 (C-17), 32.18 (C-5), 32.62 (C-13), 40.82 (C-3), 40.86 (C-9a), 44.38 (C-5a), 46.88 (C-13a), 66.81 (C-4), 78.62 (C-12), 82.43 (C-15a), 123.10 (C-4'), 124.08 (C-9), 126.09 (C-6), 128.74 (C-7'), 130.89 (C-6'), 132.30 (C-2'), 132.96 (C-3'), 133.83 (C-15), 134.19 (C-14), 136.02 (C-8), 136.94 (C-5'), 139.73 (C-7), 164.62 (C-1'), 170.51 (C-2), 173.80 (C-10).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **110b, syn**: δ = 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.63 (s, 1H, 19-H₃), 1.56 – 1.72 (m, 1H, 17-H_a), 1.75 – 1.88 (m, 2H, 17-H_b, 5-H_a), 1.97 (s, 5H, 16-H₃, 13-H₂), 2.03 – 2.13 (m, 1H, 5-H_b), 2.26 (ddd, J = 11.8, 9.2, 7.0 Hz, 1H, 13a-H), 2.71 – 2.83 (m, 1H, 5a-H), 3.09 (dd, J = 15.6, 4.3 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd, J = 15.6, 10.1 Hz, 1H, 3-H_b), 4.30 – 4.49 (m, 1H, 12-H), 5.18 (dd, J = 16.4, 10.0 Hz, 1H, 6-H), 5.28 – 5.31 (m, 1H, 15-H), 5.45 - 5.64 (m, 1H, 4-H), 5.67 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.78 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 9-H), 5.99 (d, J = 16.6 Hz, 1H, 7-H), 7.40 (dd, J = 7.9, 2.4 Hz, 1H, 6'-H), 7.73 - 7.84 (m, 1H, 5'-H), 7.96 – 8.06 (m, 1H, 7'-H), 8.17 – 8.27 (m, 1H, 3'-H).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₂Cl₂) **110b, syn**: 10.16 (C-18), 20.59 (C-16), 23.88 (C-19), 28.79 (C-17), 32.97 (C-5), 35.25 (C-13), 40.63 (C-3), 44.38 (C-5a), 45.20 (C-13a), 46.84 (C-9a), 66.99 (C-4), 78.82 (C-12), 80.47 (C-15a), 120.93 (C-9), 121.65 (C-15), 123.10 (C-4'), 126.09 (C-6), 128.88 (C-7'), 130.78 (C-6'), 132.30 (C-2'), 132.96 (C-3'), 136.94 (C-5'), 138.16 (C-8), 139.11 (C-7), 149.29 (C-14), 164.62 (C-1'), 170.51 (C-2), 173.80 (C-10).

6.2.10 4-O-(*p*-(Methoxymethyl)-benzoyl)collinolacton (104a, 104b)



C₃₀H₃₆O₇ (508,60)

Ausbeute: 3.0 mg, 5.9 μ mol, 21%

R_F-Wert: 0.49 (Cyclohexan/Aceton = 3:2)

t_R-Wert (MPLC): 16 min (Cyclohexan (A)/Aceton (B), 4 g Si35,
Stufe 1: 0% B, Stufe 2: 15% B, Stufe 3: 30% B)

t_R-Wert (HPLC): 24.3 min. (HPLC D, Supersphere C18ec; Programm A,
Methanol/Wasser)

22.0 min (HPLC B, Kromasil C18, 55% Acetonitril/Wasser 40 min. isokratisch)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 509.0 [M+H]^+$, $531.1 [M+Na]^+$

ESI-MS: (negative Ionen) $m/z = 506.9^-$, $552.9 [M+HCOO]^-$

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **104a, anti:** δ = 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.64 - 1.69 (m, 1H, 17-H_a), 1.71 (s, 3H, 19-H₃), 1.71 – 1.88 (m, 2H, 13-H_a, 17-H_b), 1.89 - 1.92 (m, 1H, 13-H_b), 1.92 – 1.97 (m, 3H, 16-H₃), 2.66 (m, 2H, 5-H_b, 13a-H), 2.89 (dddd, J = 10.8, 10.8, 5.4, 5.4 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, J = 15.6, 4.2 Hz, 1H, 3-H_a), 3.28 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.41 (s, 3H, OMe), 3.41 – 3.52 (m, 1H, 3-H_b), 4.36 (ddt, J = 10.3, 7.3, 3.8 Hz, 1H, 12-H), 4.52 (s, 2H, 8'-H₂), 4.88 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 15-H), 5.20 (dt, J = 16.4, 9.6 Hz, 1H, 6-H), 5.51 – 5.60 (m, 1H, 4-H), 5.68 (t, J = 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.77 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 5.92 (d, J = 16.4 Hz, 1H, 7-H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 8.00 – 8.08 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) **104b, syn:** δ = 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, 18-H₃), 1.64 - 1.69 (m, 1H, 17-H_a), 1.71 (s, 3H, 19-H₃), 1.71 – 1.88 (m, 1H, 17-H_b), 1.92 - 1.97 (m, 3H, 16-H₃), 2.01 – 2.12 (m, 2H, 13-H₂), 2.66 (m, 2H, 5-H_b, 13a-H), 2.79 (ddt, J = 9.8, 9.8, 5.2 Hz, 1H, 5a-H), 3.08 (dd, J = 15.6, 4.2 Hz, 1H, 3-H_a), 3.34 - 3.38 (m, 1H, 9a-H), 3.41 (s, 3H, OMe), 3.41 – 3.52 (m, 1H, 3-H_b), 4.40 - 4.46 (m, 1H, 12-H), 4.52 (s, 2H, 8'-H₂), 5.27 – 5.31 (m, 1H, 15-H), 5.20 (m, 1H, 6-H), 5.47 – 5.55 (m, 1H, 15a-H), 5.51 – 5.60 (m, 1H, 4-H), 5.61 (dt, J = 8.5, 1.4 Hz, 1H, 9-H), 5.98 (d, J = 16.6 Hz, 1H, 7-H), 7.46 (d, J = 8.4 Hz, 2H, 4'-H, 6'-H), 8.00 – 8.08 (m, 2H, 3'-H, 7'-H).

6.3 Studien der biologischen Aktivität von Collinolactonderivaten

6.3.1 Untersuchungen zur Bildung monoastraler Halbspindeln und Zytotoxizität

Collinolactonderivate mit modifiziertem Grundgerüst

Verbindung	L-929		PtK2		MCF-7		Monoastraler Phänotyp?
	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	
4-Keto-Collinolacton (153a , 153b)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)-collazulen (151)	>80	>80	71	>80	n.t.	n.t.	n.t.
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)-9,9a-Epoxy-collazulen (152)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
Collinolactenon (38a , 38b)	4	11	19	38	n.t.	n.t.	✓
Collinolacton (20a , 20b)	>80	>80	>80	>80	>80	>80	X

4-O-Collinolactonester aromatischer Verbindungen

Verbindung	L-929		PtK2		MCF-7		Monoastraler Phänotyp?
	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	IC ₉₀ (µM)	
4-O-(<i>p</i> -Fluorbenzoyl)-collinolacton (108a , 108b)	41	64	23	62	n.t.	n.t.	✓
4-O-(<i>p</i> -Cyanobenzoyl)-collinolacton (107a , 107b)	20	59	22	61	16	>80	✓
4-O-(<i>p</i> -Bromphenylacetoyl)-collinolacton (111a , 111b)	13	22	15	45	14	34	✓
4-O- <i>p</i> -(Brommethyl)benzoyl-collinolacton (105a , 105b)	2	3	3	6	2	4	✓
4-O-(<i>p</i> -Methoxyphenylacetoyl)-collinolacton (112a , 112b)	14	23	13	29	13	29	✓
4-O-(<i>p</i> -Methoxybenzoyl)-collinolacton (106a , 106b)	16	36	20	61	24	71	✓
4-O-(<i>p</i> -Chlorbenzoyl)-collinolacton (109a , 109b)	14	24	14	46	16	70	✓
4-O-(<i>m</i> -Brombenzoyl)-collinolacton (110a , 110b)	13	22	13	22	11	37	✓
Collinolacton (20a , 20b)	>80	>80	>80	>80	>80	>80	X
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)-collinolacton (21a , 21b)	35	59	37	>80	46	>80	X

4-O-Collinolacton-Spacerderivate

Verbindung	L-929		PtK2		MCF-7		Monoastraler Phänotyp?
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)	
4-O-(Methoxy-terephthyl)-collinolacton (65a , 65b)	44	61	38	>80	n.t.	n.t.	n.t.
4-O-(5-methoxy-glutaryl)-collinolacton (64a , 64b)	41	65	23	59	25	72	n.t.
4-O-(BHB-Nitrobenzyl-Linker)-collinolacton (102a , 102b)	33	49	33	>80	23	>80	n.t.
4-O-HMB-collinolacton (131a , 131b)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	X
2-O-HMB-1,2,3,4-Tetrahydronaphthol (132)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
4-O-HPE-collinolactonester (143a , 143b)	30	53	25	54	n.t.	n.t.	✓
1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol-HPE-ester (144)	6	15	13	25	n.t.	n.t.	X
4-O-DEAC-collinolacton (61a , 61b)	>80	>80	50	>80	n.t.	n.t.	n.t.
<i>anti</i> 4-O-DEAC-collinolacton (61a)	>80	>80	50	>80	n.t.	n.t.	n.t.
HMB-Spacer (129)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
HPE-Spacer-Carbonsäure (142)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
HPE-Spacer (119)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	X
1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol (69)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	n.t.
Collinolacton (20a , 20b)	>80	>80	>80	>80	n.t.	n.t.	X
4-O-(p-Brombenzoyl)-collinolacton (21a , 21b)	26	59	20	59	n.t.	n.t.	X

n.t. = nicht getestet

6.3.2 Wirkungen auf Aktinzytoskelett, Zellproliferation und Zellmigration

4-O-Collinolactonester aromatischer Verbindungen

Verbindung	Proliferation	Migration	Kortikaler Actinring
	EC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ (µM)	
4-O-(<i>p</i> -Fluorbenzoyl)-collinolacton (108a, 108b)	8	40	X
4-O-(<i>p</i> -Cyanobenzoyl)-collinolacton (107a, 107b)	6	40	X
4-O-(<i>p</i> -Bromphenylacetoyl)-collinolacton (111a, 111b)	11	19	✓
4-O- <i>p</i> -(Brommethyl)benzoyl-collinolacton (105a, 105b)	3	16	✓
4-O-(<i>p</i> -Methoxyphenylacetoyl)-collinolacton (112a, 112b)	10	18	✓
4-O-(<i>p</i> -Methoxybenzoyl)-collinolacton (106a, 106b)	17	40	X
4-O-(<i>p</i> -Chlorbenzoyl)-collinolacton (109a, 109b)	8	30	✓
4-O-(<i>m</i> -Brombenzoyl)-collinolacton (110a, 110b)	10	24	✓
4-O- <i>p</i> -(Methoxymethyl)benzoyl-collinolacton (104a, 104b)	8	32	✓
Collinolacton (20a, 20b)	40	40	X
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)-collinolacton (21a, 21b)	11	40	✓

n.t. = nicht getestet

4-O-Collinolacton-Spacerderivate

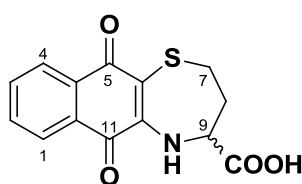
Verbindung	Proliferation	Migration	Kortikaler Actinring
	EC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ (µM)	
4-O-(Methoxy-terephthyl)-collinolacton (65a , 65b)	80	40	✓
4-O-(5-methoxy-glutaryl)-collinolacton (64a , 64b)	13	40	✓
4-O-HMB-collinolacton (131a , 131b)	77	n.t.	X
2-O-HMB-1,2,3,4-Tetrahydronaphthol (132)	9	n.t.	X
4-O-HPE-collinolactonester (143a , 143b)	15	n.t.	✓
1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthol-HPE-ester (144)	6	n.t.	X
4-O-DEAC-collinolacton (61a , 61b)	67	n.t.	X
Collinolacton (20a , 20b)	40	n.t.	X
4-O-(<i>p</i> -Brombenzoyl)-collinolacton (21a , 21b)	11	n.t.	

n.t. = nicht getestet

7 Synthese von oxidierten Derivaten des Naturstoffes Brevinsäure (23, 169)

Die Synthesen von DL- bzw. L-Brevinsäure (**22**) und ihrer Vorstufen wurden nach F. SURUP^[37] durchgeführt.

7.1 DL-Brevinsäure (**22**)



C₁₄H₁₁NO₄S (289,31)

22

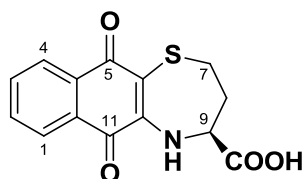
DL-Homocysteinlacton Hydrochlorid (**166**, 1.00 g, 6.51 mmol, 1.0 Eq.) wurde in 5 N Natriumhydroxid-Lösung (10 mL) 15 min. bei 40°C gerührt. Es wurde auf 0°C gekühlt und über 10 min 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**167**, 1.48 g, 6.51 mmol, 1.0 Eq.) in Methanol (80 mL) zugetropft. Nach 40 min Rühren bei RT wurde mit Wasser (130 ml) und 2 N Salzsäure (40 ml) aufgefüllt und mit Ethylacetat (3 x 250 mL) extrahiert. Die gesammelten org. Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (3 x 200 mL) gewaschen, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Reaktionsgemisch mittels Kieselgel-SPE (Waschen mit Ethylacetat, Eluieren mit Chloroform/Methanol = 7:3) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als violetten Feststoff (1.82 g, 6.29 mmol, 97%).

R_f-Wert: 0.45 (Chloroform/Methanol = 7:3 + 0.05% Ameisensäure)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 2.22 (ddd, J = 13.0, 8.6, 3.5 Hz, 1H, 7-H_a), 2.49 (dq, J = 18.9, 6.2 Hz, 1H, 7-H_b), 3.11 (dd, J = 14.7, 6.6 Hz, 1H, 8-H_a), 3.64 – 3.75 (m, 1H, 8-H_b), 5.39 (dd, J = 11.2, 5.1 Hz, 1H, 9-H), 7.66 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 2-H)*, 7.74 (s, 1H, 3-H)*, 7.96 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 4-H)*, 7.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1-H)*.

*Zuordnung untereinander nicht gesichert

7.2 L-Brevinsäure (22)



C₁₄H₁₁NO₄S (289,31)

22

L-Homocysteinlacton Hydrochlorid (**166**, 60.0 mg, 390 μ mol, 1.0 Eq.) wurde in 5 N Natriumhydroxid-Lösung (1 mL) 15 min. bei 40°C gerührt. Es wurde auf 0°C gekühlt und über 10 min 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**167**, 88.7 mg, 390 μ mol, 1.0 Eq.) in Methanol (20 mL) zugetropft. Nach 30 min Rühren bei RT wurde mit Wasser (15 ml) aufgefüllt und die Lösung mit 1 N Salzsäure auf pH = 1 eingestellt. Es wurde mit Ethylacetat (3 x 50 mL) extrahiert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt das Reaktionsgemisch mittels Kieselgel-SPE (5 x 1 cm, Waschen mit Ethylacetat, Eluieren mit Chloroform/Methanol = 6:4) aufgereinigt. Man erhielt das Produkt als violetten Feststoff (85 g, 294 μ mol, 75%).

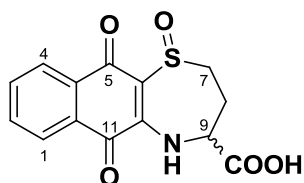
R_F-Wert: 0.45 (Chloroform/Methanol = 6:4)

0.45 (Methanol/Wasser = 4:6)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 2.11 – 2.33 (m, 2H, 7-H_a), 2.50 (tdd, J = 11.9, 6.8, 5.5 Hz, 1H, 7-H_b), 3.10 (ddd, J = 14.4, 6.6, 1.0 Hz, 1H, 8-H_a), 3.69 (ddd, J = 14.8, 11.6, 5.8 Hz, 1H, 8-H_b), 5.35 (dd, J = 11.4, 5.1 Hz, 1H, 9-H), 7.67 (dt, J = 7.5, 3.8 Hz, 1H, 3-H)*, 7.72 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H, 2-H)*, 7.97 (d, J = 7.2 Hz, 1H, 4-H)*, 8.01 (dd, J = 7.5, 0.8 Hz, 1H, 1-H)*.

*Zuordnung untereinander nicht gesichert

7.3 DL-Brevinsäure-sulfoxid (23)



C₁₄H₁₁NO₅S (305,31)

23

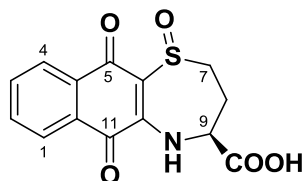
DL-Brevinsäure (**22**, 406 mg, 1.40 mmol, 1.0 Eq.) in Methanol (10 mL) wurde unter Lichtausschluss mit Wasserstoffperoxid (2 mL, 30% in Wasser) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Es wurde mit Methanol/Wasser (1:1, 3 x 5 mL) versetzt und wieder eingengt. Nach Umkristallisation aus Wasser erhielt man das Produkt als gelbbraunen Feststoff (1.4 mg, 4.5 µmol, 0.3%).

R_f-Wert: 0.29 (Chloroform/Methanol = 7:3 + 0.05% Ameisensäure)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 2.43 (dddd, *J* = 13.6, 12.4, 6.0, 1.4 Hz, 1H, 8-H_a), 2.79 (ddd, *J* = 14.3, 12.6, 6.0 Hz, 1H, 8-H_b), 2.89 – 3.00 (m, 1H, 7-H_a), 3.45 (ddd, *J* = 14.4, 6.3, 1.2 Hz, 1H, 7-H_b), 4.80 – 4.87 (m, 3H, 9-H), 7.78 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, 3-H^{*}), 7.87 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, 2-H^{*}), 8.14 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, 4-H^{*}), 8.16 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, 1-H^{*}).

*Zuordnung untereinander nicht gesichert

7.4 L-Brevinsäuresulfoxid (23)



C₁₄H₁₁NO₅S (305,31)

23

L-Brevinsäure (**22**, 15.4 mg, 53.2 µmol, 1.0 Eq.) in Methanol (2.5 mL) wurde unter Lichtausschluss mit Wasserstoffperoxid (1 mL, 30% in Wasser) versetzt und 20 h bei RT gerührt. Es wurde mit Methanol/Wasser (1:1, 3 x 5 mL) versetzt und wieder eingengt. Nach Umkristallisation aus Wasser erhielt man das Produkt als dunkelgelben Feststoff (1.9 mg, 6.2 µmol, 12%).

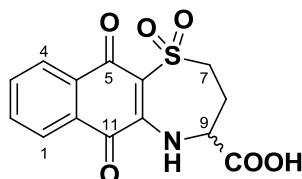
R_f-Wert: 0.29 (Chloroform/Methanol = 7:3 + 0.05% Ameisensäure)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 305.9 [M+H]^+$, $327.8 [M+ Na]^+$.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 2.38 – 2.51 (m, 1H, 8-H_a), 2.79 (ddd, $J = 14.4, 12.6, 5.9$ Hz, 1H, 8-H_b), 2.86 – 3.00 (m, 1H, 7-H_a), 3.40 – 3.48 (m, 1H, 7-H_b), 4.82 – 4.86 (m, 1H, 9-H), 7.79 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, 3-H^{*}), 7.88 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, 2-H^{*}), 8.15 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H, 4-H^{*}), 8.17 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H, 1-H^{*}).

^{*}Zuordnung untereinander nicht gesichert

7.5 DL-Brevinsäure-sulfon (169)



C₁₄H₁₁NO₆S (321,31)

169

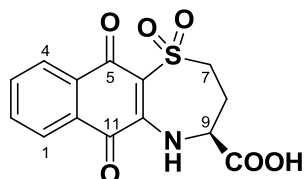
DL-Brevinsäure (**22**, 12.6 mg, 43.5 μ mol, 1.0 Eq.) in Methanol (5 mL) wurde mit Ammoniummolybdat (5.4 mg, 4.4 μ mol, 0.1 Eq.) und Wasserstoffperoxid (1 mL, 30% in Wasser) versetzt und 20 h bei RT gerührt. Es wurde mit Wasser aufgefüllt und zur Trockene eingeeengt (3 x 5 mL). Nach Umkristallisation aus Wasser umkristallisiert erhielt man das Produkt als hellgelben Feststoff (3.1 mg, 9.6 μ mol, 22%).

R_f-Wert: 0.47 (Chloroform/Methanol = 7:3 + 0.05% Ameisensäure)

ESI-MS: (positive Ionen) $m/z = 344.8 [M+Na]^+$, $360.6 [M+K]^+$.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-D₆) $\delta = 2.36 - 2.51$ (m, 1H, 8-H_a), 2.77 (ddd, $J = 19.0, 12.3, 6.1$ Hz, 1H, 8-H_b), 3.37 (ddd, $J = 15.4, 6.4, 1.2$ Hz, 1H, 7-H_a), 3.74 (ddd, $J = 15.5, 12.3, 6.3$ Hz, 1H, 7-H_b), 4.86 (dt, $J = 12.8, 4.8$ Hz, 1H, 9-H), 7.78 (s, 1H, NH), 7.83 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H, 3-H^{*}), 7.93 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H, 2-H^{*}), 8.08 (dd, $J = 7.7, 0.9$ Hz, 1H, 4-H^{*}), 8.11 (dd, $J = 7.7, 0.9$ Hz, 1H, 1-H^{*}).

*Zuordnung untereinander nicht gesichert

7.6 L-Brevinsäuresulfon (169)**C₁₄H₁₁NO₆S (321,31)****169**

L-Brevinsäure (**22**, 10.0 mg, 34.6 μ mol, 1.0 Eq.) in Methanol (2 mL) wurde mit Ammoniummolybdat (4.3 mg, 3.5 μ mol, 0.1 Eq.) und Wasserstoffperoxid (0.5 mL, 30% in Wasser) versetzt und 20 h bei RT gerührt. Es wurde zur Trockene eingengt, in Aceton (1 mL) und über Kieselgel-SPE (1 g, Aceton) und aus Wasser umkristallisiert. Man erhielt das Produkt als hellgelben Feststoff (2.1 mg, 6.5 μ mol, 19%)

R_F-Wert: 0.71 (Chloroform/Methanol = 6:4)

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-D₆) δ = 2.36 – 2.47 (m, 1H, 8-H_a), 2.78 (dq, J = 18.9, 6.1 Hz, 1H, 8-H_b), 3.36 (ddd, J = 15.4, 6.5, 1.4 Hz, 1H, 7-H_a), 3.74 (ddd, J = 15.5, 12.3, 6.4 Hz, 1H, 7-H_b), 4.84 (dd, J = 12.9, 5.7 Hz, 1H, 9-H), 7.83 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, 3-H^{*}), 7.93 (td, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H, 2-H^{*}), 8.08 (dd, J = 7.7, 0.9 Hz, 1H, 4-H^{*}), 8.12 (d, J = 0.9 Hz, 1H, 1-H^{*}).

^{*}Zuordnung untereinander nicht gesichert

C. Literaturverzeichnis

- [1] P. Boyle, B. Levin, I. A. f. R. o. Cancer, in *World cancer report 2008*, IARC Press, Lyon, **2008**.
- [2] H. Brenner, A. Gondos, V. Arndt, *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, 3274-3280.
- [3] D. Turk, G. Szakacs, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12*, 246-252.
- [4] A. L. Hopkins, *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 682-690.
- [5] R. O. Carlson, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2008**, *17*, 707-722.
- [6] D. G. I. Kingston, *Chemical Communications* **2001**, 867-880.
- [7] G. Cavaletti, P. Marmioli, *Nat Rev Neurol* **2010**, *6*, 657-666.
- [8] A. Duenas-Gonzalez, P. Garcia-Lopez, L. A. Herrera, J. L. Medina-Franco, A. Gonzalez-Fierro, M. Candelaria, *Mol Cancer* **2008**, *7*, 82.
- [9] a O. Rath, F. Kozielski, *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 527-539; b V. Sarli, A. Giannis, *Clinical cancer research* **2008**, *14*, 7583-7587.
- [10] T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, *286*, 971-974.
- [11] J. W. Purcell, J. Davis, M. Reddy, S. Martin, K. Samayoa, H. Vo, K. Thomsen, P. Bean, W. L. Kuo, S. Ziyad, J. Billig, H. S. Feiler, J. W. Gray, K. W. Wood, S. Cases, *Clinical Cancer Research* **2010**, *16*, 566-576.
- [12] R. Woessner, B. Tunquist, C. Lemieux, E. Chlipala, S. Jackinsky, W. de Wolf, W. Voegtli, A. Cox, S. Rana, P. Lee, D. Walker, *Anticancer Research* **2009**, *29*, 4373-4380.
- [13] K. D. Holen, C. P. Belani, G. Wilding, S. Ramalingam, J. L. Volkman, R. K. Ramanathan, L. S. Vasist, C. J. Bowen, J. P. Hodge, M. M. Dar, P. T. Ho, *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2011**, *67*, 447-454.
- [14] J. T. Hartmann, M. Haap, H.-G. Kopp, H.-P. Lipp, *Current Drug Metabolism* **2009**, *10*, 470-481.
- [15] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R. M. Bukowski, *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 125-134.
- [16] F. A. Shepherd, J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, E. H. Tan, V. Hirsh, S. Thongprasert, D. Campos, S. Maoleekoonpiroj, M. Smylie, R. Martins, M. van

- Kooten, M. Dediu, B. Findlay, D. Tu, D. Johnston, A. Bezjak, G. Clark, P. Santabábara, L. Seymour, *New England Journal of Medicine* **2005**, 353, 123-132.
- [17] C. E. Geyer, J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, C. G. Romieu, T. Pienkowski, A. Jagiello-Gruszfeld, J. Crown, A. Chan, B. Kaufman, D. Skarlos, M. Campone, N. Davidson, M. Berger, C. Oliva, S. D. Rubin, S. Stein, D. Cameron, *New England Journal of Medicine* **2006**, 355, 2733-2743.
- [18] M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker, *Blood* **2005**, 105, 2640-2653.
- [19] B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, I. Gathmann, H. Kantarjian, N. Gattermann, M. W. N. Deininger, R. T. Silver, J. M. Goldman, R. M. Stone, F. Cervantes, A. Hochhaus, B. L. Powell, J. L. Gabilove, P. Rousselot, J. Reiffers, J. J. Cornelissen, T. Hughes, H. Agis, T. Fischer, G. Verhoef, J. Shepherd, G. Saglio, A. Gratwohl, J. L. Nielsen, J. P. Radich, B. Simonsson, K. Taylor, M. Baccarani, C. So, L. Letvak, R. A. Larson, *New England Journal of Medicine* **2006**, 355, 2408-2417.
- [20] R. Kerkela, L. Grazette, R. Yacobi, C. Iliescu, R. Patten, C. Beahm, B. Walters, S. Shevtsov, S. Pesant, F. J. Clubb, A. Rosenzweig, R. N. Salomon, R. A. Van Etten, J. Alroy, J.-B. Durand, T. Force, *Nat Med* **2006**, 12, 908-916.
- [21] R. J. Motzer, B. L. Rini, R. M. Bukowski, *Journal of the American Medical Association* **2006**, 295, 2516-2524.
- [22] M. A. Fabian, W. H. Biggs, D. K. Treiber, C. E. Atteridge, M. D. Azimioara, M. G. Benedetti, T. A. Carter, P. Ciceri, P. T. Edeen, M. Floyd, J. M. Ford, M. Galvin, J. L. Gerlach, R. M. Grotzfeld, S. Herrgard, D. E. Insko, M. A. Insko, A. G. Lai, J.-M. Lelias, S. A. Mehta, Z. V. Milanov, A. M. Velasco, L. M. Wodicka, H. K. Patel, P. P. Zarrinkar, D. J. Lockhart, *Nat Biotech* **2005**, 23, 329-336.
- [23] C. Garcia-Echeverria, W. R. Sellers, *Oncogene* **2008**, 27, 5511-5526.
- [24] L. Toral-Barza, W.-G. Zhang, X. Huang, L. A. McDonald, E. J. Salaski, L. R. Barbieri, W.-D. Ding, G. Krishnamurthy, Y. B. Hu, J. Lucas, V. S. Bernan, P. Cai, J. I. Levin, T. S. Mansour, J. J. Gibbons, R. T. Abraham, K. Yu, *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, 6, 3028-3038.
- [25] a T. Curran, J. M. Y. Ng, *Nature* **2008**, 455, 293-294; b Y. Li, M. i. Y. Maitah, A. Ahmad, D. Kong, B. Bao, F. H. Sarkar, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2012**, 16, 49-66.
- [26] P. Heretsch, L. Tzagkaroulaki, A. Giannis, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 3492-3502.
- [27] K. P. Olive, M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. DeNicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Rückert, R. Grützmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H.

- Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, D. A. Tuveson, *Science* **2009**, *324*, 1457-1461.
- [28] W. G. Kaelin, *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 689-698.
- [29] I. B. Weinstein, A. Joe, *Cancer Research* **2008**, *68*, 3077-3080.
- [30] J. D. Iglehart, D. P. Silver, *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 189-191.
- [31] K. A. Gelmon, M. Tischkowitz, H. Mackay, K. Swenerton, A. Robidoux, K. Tonkin, H. Hirte, D. Huntsman, M. Clemons, B. Gilks, R. Yerushalmi, E. Macpherson, J. Carmichael, A. Oza, *The Lancet Oncology* **2011**, *12*, 852-861.
- [32] N. J. Curtin, *Drug Discovery Today: Disease Models* **2012**, *9*, e51-e58.
- [33] M. Guha, *Nat Biotech* **2011**, *29*, 373-374.
- [34] L. Neckers, P. Workman, *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*, 64-76.
- [35] a L. Hoffmann, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **2006**;
b J.-N. Fricke, Diplomarbeit, Göttingen Georg-August-Universität Göttingen **2008**.
- [36] H.-J. Schiewe, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **1997**.
- [37] F. Surup, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **2007**.
- [38] K. E. R. Davis, S. J. Joseph, P. H. Janssen, *Applied and environmental microbiology* **2005**, *71*, 826-834.
- [39] D. J. Newman, G. M. Cragg, *Journal of natural products* **2012**, *75*, 311-335.
- [40] S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, D. Jabes, *J Antibiot* **2010**, *63*, 423-430.
- [41] W. Weber, H. Zähler, M. Damberg, P. Russ, A. Zeeck, *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* **1981**, *2*, 122-139.
- [42] R. Kind, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **1991**.
- [43] G. Bach, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen **1996**.
- [44] R. J. Giguere, S. M. Duncan, J. M. Bean, L. Purvis, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 6071-6073.
- [45] N. Fetzer, Zulassungsarbeit, Eberhard Karls Universität Tübingen **2011**.
- [46] a J. S. Thorson, T. Vogt, in *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**, pp. 685-711; b J. A. Salas, C. Mendez, *Trends Microbiol* **2007**, *15*, 219-232.

- [47] I. Kitagawa, M. Kobayashi, C. U. I. Zheng, Y. Kiyota, M. Ohnishi, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1986**, 34, 4590-4596.
- [48] E. M. Burgess, H. R. Penton, E. A. Taylor, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, 5224-5226.
- [49] D. R. Mootoo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110, 5583-5584.
- [50] H. J. Koeners, J. Verhoeven, J. H. van Boom, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1981**, 100, 65-72.
- [51] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angewandte Chemie* **1978**, 90, 602-615.
- [52] Y. Ichikawa, M. M. Sim, C. H. Wong, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 2943-2946.
- [53] F. Theil, *Enzyme in der organischen Synthese*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], **1997**.
- [54] S. Koto, N. Morishima, Y. Miyata, S. Zen, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1976**, 49, 2639-2640.
- [55] T. Suami, K.-i. Tadano, Y. Iimura, H. Tanabe, *Carbohydrate research* **1985**, 135, 319-323.
- [56] S. K. Sinha, K. Brew, *Carbohydrate research* **1980**, 81, 239-247.
- [57] S. G. Withers, D. J. MacLennan, I. P. Street, *Carbohydrate research* **1986**, 154, 127-144.
- [58] K. C. Nicolaou, R. A. Daines, Y. Ogawa, T. K. Chakraborty, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110, 4696-4705.
- [59] R. R. Schmidt, H. Gaden, H. Jatzke, *Tetrahedron Letters* **1990**, 31, 327-329.
- [60] E. M. Arnett, C. Petro, *Journal of the American Chemical Society* **1978**, 100, 5408-5416.
- [61] K. Toshima, K. Tatsuta, *Chemical Reviews* **1993**, 93, 1503-1531.
- [62] S. Hanessian, C. Bacquet, N. Lehong, *Carbohydrate research* **1980**, 80, C17-C22.
- [63] Y. Li, X. Yang, Y. Liu, C. Zhu, Y. Yang, B. Yu, *Chemistry – A European Journal* **2010**, 16, 1871-1882.
- [64] D. J. Gorin, B. D. Sherry, F. D. Toste, *Chemical Reviews* **2008**, 108, 3351-3378.

- [65] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski, *Journal of Health Economics* **2003**, 22, 151-185.
- [66] R. Collier, *Canadian Medical Association Journal* **2009**, 180, 279-280.
- [67] R. J. Vaz, T. Klabunde, *Antitargets: prediction and prevention of drug side effects*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [68] <http://www.spiegel.de/wirtschaft/vioxx-skandal-merck-kauft-sich-von-anspruechen-frei-a-516376.html>, 09.11.2007.
- [69] J. N. Y. Chan, C. Nislow, A. Emili, *Trends in Pharmacological Sciences* **2010**, 31, 82-88.
- [70] T. Roemer, J. Davies, G. Giaever, C. Nislow, *Nat Chem Biol* **2012**, 8, 46-56.
- [71] A. Sergeeva, M. G. Kolonin, J. J. Molldrem, R. Pasqualini, W. Arap, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1622-1654.
- [72] F. Cong, A. K. Cheung, S.-M. A. Huang, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2012**, 52, 57-78.
- [73] B. Seelig, *Nat. Protocols* **2011**, 6, 540-552.
- [74] F. Becker, K. Murthi, C. Smith, J. Come, N. Costa-Roldán, C. Kaufmann, U. Hanke, C. Degenhart, S. Baumann, W. Wallner, A. Huber, S. Dedier, S. Dill, D. Kinsman, M. Hediger, N. Bockovich, S. Meier-Ewert, A. F. Kluge, N. Kley, *Chemistry & Biology* **2004**, 11, 211-223.
- [75] J. Wang, S. M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y. S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, Á. Basilio, J. R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S. H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L. L. Silver, J. D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J. W. Becker, D. Cully, S. B. Singh, *Nature* **2006**, 441, 358-361.
- [76] M. V. Chengalvala, V. M. Chennathukuzhi, D. S. Johnston, P. E. Stevis, G. S. Kopf, *Current genomics* **2007**, 8, 262-270.
- [77] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat Chem Biol* **2009**, 5, 616-624.
- [78] a K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat Meth* **2007**, 4, 822-827; b M. C. Hagenstein, N. Sewald, *Journal of Biotechnology* **2006**, 124, 56-73; c M. G. Paulick, M. Bogyo, *Current Opinion in Genetics & Development* **2008**, 18, 97-106.
- [79] P. Geurink, L. Prely, G. van der Marel, R. Bischoff, H. Overkleeft, *Vol. 324* (Ed.: S. A. Sieber), Springer Berlin / Heidelberg, **2012**, pp. 85-113.
- [80] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2008, 2513-2523.

- [81] T. Bender, M. Huss, H. Wieczorek, S. Grond, P. von Zezschwitz, *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 2007, 3870-3878.
- [82] N. Burkard, T. Bender, J. Westmeier, C. Nardmann, M. Huss, H. Wieczorek, S. Grond, P. von Zezschwitz, *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 2010, 2176-2181.
- [83] A. Waggoner, *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10, 62-66.
- [84] S. A. Wacker, S. Kashyap, X. Li, T. M. Kapoor, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 12386-12389.
- [85] Z. Song, W. Huang, Q. Zhang, *Chemical Communications* **2012**, 48, 3339-3341.
- [86] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Molecular & Cellular Proteomics* **2002**, 1, 376-386.
- [87] K. F. Geoghegan, D. S. Johnson, in *Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol. Volume 45* (Ed.: E. M. John), Academic Press, **2010**, pp. 345-360.
- [88] S.-E. Ong, M. Mann, *Nat Chem Biol* **2005**, 1, 252-262.
- [89] W. Schütz, M. Franz-Wachtel, B. Macek, *Biospektrum* **2010**, 5, 552-554.
- [90] a J. Cox, M. Mann, *Nat Biotech* **2008**, 26, 1367-1372; b J. Cox, I. Matic, M. Hilger, N. Nagaraj, M. Selbach, J. V. Olsen, M. Mann, *Nat. Protocols* **2009**, 4, 698-705.
- [91] M. Bantscheff, D. Eberhard, Y. Abraham, S. Bastuck, M. Boesche, S. Hobson, T. Mathieson, J. Perrin, M. Raida, C. Rau, V. Reader, G. Sweetman, A. Bauer, T. Bouwmeester, C. Hopf, U. Kruse, G. Neubauer, N. Ramsden, J. Rick, B. Kuster, G. Drewes, *Nat Biotech* **2007**, 25, 1035-1044.
- [92] M. Bantscheff, M. Boesche, D. Eberhard, T. Mathieson, G. Sweetman, B. Kuster, *Molecular & Cellular Proteomics* **2008**, 7, 1702-1713.
- [93] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin, *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, 3, 1154-1169.
- [94] B. A. Shoemaker, A. R. Panchenko, *PLoS Comput Biol* **2007**, 3, e42.
- [95] M. J. Chalmers, S. A. Busby, B. D. Pascal, Y. He, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, P. R. Griffin, *Analytical chemistry* **2006**, 78, 1005-1014.
- [96] R. O'Brien, R. Brown, in *Label-Free Technologies for Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Ltd, **2011**, pp. 83-99.

- [97] a J. Yuan, Y. Wu, M.-I. Aguilar, *Vol. 5*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**, pp. 225-247; b K. S. Phillips, C. Quan, *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **2007**, 387, 1831-1840.
- [98] B. Valeur, *Molecular fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], **2002**.
- [99] C. Hubschwerlen, J.-L. Specklin, D. K. Baeschlin, Y. Borer, S. Haefeli, C. Sigwalt, S. Schroeder, H. H. Locher, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, 4229-4233.
- [100] P. L. DeAngelis, *Analytical Biochemistry* **2000**, 284, 167-169.
- [101] S. K. Woodward, J. F. Eccleston, M. A. Geeves, *Biochemistry* **1991**, 30, 422-430.
- [102] T. Hiratsuka, *Biochimica et biophysica acta* **1983**, 742, 496-508.
- [103] M. C. Venuti, *Synthesis* **1982**, 1982, 266-268.
- [104] M. D. Alexander, M. D. Burkart, M. S. Leonard, P. Portonovo, B. Liang, X. Ding, M. M. Joullié, B. M. Gullledge, J. B. Aggen, A. R. Chamberlin, J. Sandler, W. Fenical, J. Cui, S. J. Gharpure, A. Polosukhin, H.-R. Zhang, P. A. Evans, A. D. Richardson, M. K. Harper, C. M. Ireland, B. G. Vong, T. P. Brady, E. A. Theodorakis, J. J. La Clair, *ChemBioChem* **2006**, 7, 409-416.
- [105] <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [106] H. Gerlach, *Helvetica Chimica Acta* **1977**, 60, 3039-3044.
- [107] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3. ed. , Thieme, Stuttgart [u.a.], **2004**.
- [108] E. D. Chenot, D. Bernardi, A. Comel, G. Kirsch, *Synthetic Communications* **2007**, 37, 483-490.
- [109] T. M. Willson, P. Kocienski, K. Jarowicki, K. Isaac, A. Faller, S. F. Campbell, J. Bordner, *Tetrahedron* **1990**, 46, 1757-1766.
- [110] A. M. Sefler, M. C. Kozlowski, T. Guo, P. A. Bartlett, *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 93-102.
- [111] J. H. Clark, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1978**, 789-791.
- [112] A. Biosciences, *Affinity Chromatography - Principles and Methods*, Amersham Biosciences, Uppsala, **2002**.
- [113] M. Golkowski, C. Pergola, O. Werz, T. Ziegler, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, 10, 4496-4499.
- [114] M. F. Wang, B. T. Golding, G. A. Potter, *Synthetic Communications* **2000**, 30, 4197-4204.

- [115] J. A. Wright, J. Q. Yu, J. B. Spencer, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 4033-4036.
- [116] K. Horita, T. Yoshioka, T. Tanaka, Y. Oikawa, O. Yonemitsu, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3021-3028.
- [117] G. Lelais, M. A. Campo, S. Kopp, D. Seebach, *Helvetica Chimica Acta* **2004**, *87*, 1545-1560.
- [118] T. Kometani, T. Fitz, D. S. Watt, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 919-922.
- [119] I. Paterson, R. A. Ward, J. D. Smith, J. G. Cumming, K.-S. Yeung, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9437-9466.
- [120] R. M. Burk, G. D. Berger, R. L. Bugianesi, N. N. Girotra, W. H. Parsons, M. M. Ponpipom, *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 975-978.
- [121] H. Zhao, T. R. Burke Jr, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4219-4230.
- [122] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1979**, *52*, 1989-1993.
- [123] R. A. W. Johnstone, M. E. Rose, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2169-2173.
- [124] Z. Rappoport, *CRC handbook of tables for organic compound identification*, 3. ed., CRC Press, Boca Raton, **1985**.
- [125] T. Shiyama, M. Furuya, A. Yamazaki, T. Terada, A. Tanaka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 2831-2841.
- [126] F. F. Hilário, R. C. de Paula, M. L. T. Silveira, G. H. R. Viana, R. B. Alves, J. R. C. S. Pereira, L. M. Silva, R. P. de Freitas, F. de Pilla Varotti, *Chemical Biology & Drug Design* **2011**, *78*, 477-482.
- [127] S. Paul, R. R. Schmidt, *Synlett* **2002**, *2002*, 1107-1108.
- [128] X. Sun, T. Chu, X. Wang, *Nuclear Medicine and Biology* **2010**, *37*, 117-123.
- [129] M. Tanabe, R. H. Peters, *Org. Synth.* **1981**, *60*, No pp. given.
- [130] *Int. Pat.* **2011** WO2011053519A1.
- [131] E. J. Corey, I. Székely, C. S. Shiner, *Tetrahedron Letters* **1977**, *18*, 3529-3532.
- [132] P. Müller, B. Siegfried, *Helvetica Chimica Acta* **1974**, *57*, 987-994.
- [133] R. C. Fuson, H. G. Cooke, *Journal of the American Chemical Society* **1940**, *62*, 1180-1183.
- [134] K. Ramalingam, W. Zeng, P. Nanjappan, D. P. Nowotnik, *Synthetic Communications* **1995**, *25*, 743-752.

- [135] T. J. Scallen, P. L. Mann, University of New Mexico, USA . **1992**, p. 59 pp.
- [136] S.-E. Ong, M. Schenone, A. A. Margolin, X. Li, K. Do, M. K. Doud, D. R. Mani, L. Kuai, X. Wang, J. L. Wood, N. J. Tolliday, A. N. Koehler, L. A. Marcaurelle, T. R. Golub, R. J. Gould, S. L. Schreiber, S. A. Carr, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 4617-4622.
- [137] S. Bockelmann, D. Menche, S. Rudolph, T. Bender, S. Grond, P. von Zezschwitz, S. P. Muench, H. Wiczorek, M. Huss, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 38304-38314.
- [138] L. Wordeman, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2010**, *21*, 260-268.
- [139] N. Hirokawa, Y. Noda, Y. Tanaka, S. Niwa, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10*, 682-696.
- [140] a J. Shi, J. D. Orth, T. Mitchison, *Cancer Research* **2008**, *68*, 3269-3276;
b K. E. Gascoigne, S. S. Taylor, *Cancer Cell* **2008**, *14*, 111-122.
- [141] H. S. Sardar, V. G. Luczak, M. M. Lopez, B. C. Lister, S. P. Gilbert, *Current Biology* **2010**, *20*, 1648-1653.
- [142] R. Agarwal, A.-M. Gonzalez-Angulo, S. Myhre, M. Carey, J.-S. Lee, J. Overgaard, J. Alsner, K. Stemke-Hale, A. Lluch, R. M. Neve, W. L. Kuo, T. Sorlie, A. Sahin, V. Valero, K. Keyomarsi, J. W. Gray, A.-L. Borresen-Dale, G. B. Mills, B. T. Hennessy, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 3654-3662.
- [143] Z. Liu, K. Ling, X. Wu, J. Cao, B. Liu, S. Li, Q. Si, Y. Cai, C. Yan, Y. Zhang, Y. Weng, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2009**, *28*, 156.
- [144] S. Cai, L. N. Weaver, S. C. Ems-McClung, C. E. Walczak, *Molecular Biology of the Cell* **2009**, *20*, 1348-1359.
- [145] S. C. Ems-McClung, C. E. Walczak, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2010**, *21*, 276-282.
- [146] M. P. Serve, B. M. Llewelyn, K. O. Yu, G. M. McDonald, C. T. Olson, D. W. Hobson, *Journal of toxicology and environmental health* **1989**, *26*, 267-275.
- [147] I. Kobrin, G. Bieska, V. Charlon, E. Lindberg, R. Porody, *Cardiology* **1998**, *89 Suppl 1*, 23-32.
- [148] S. Shapiro, B. Guggenheim, *Quant Struct-Act Rel* **1998**, *17*, 327-337.
- [149] N. F. Voelkel, S. Rounds, *The pulmonary endothelium*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex ;Hoboken, NJ, **2009**.
- [150] M. Bustamante, F. Roger, M. L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, P. Y. Martin, E. Feraille, *American journal of physiology. Renal physiology* **2003**, *285*, F336-347.

- [151] C. Bird, S. Kirstein, *Nature Methods* **2009**, *6*, V-VI.
- [152] F. Sasse, H. Steinmetz, J. Heil, G. Hofle, H. Reichenbach, *The Journal of antibiotics* **2000**, *53*, 879-885.
- [153] M.-W. Khalil, Doktorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig **1999**.
- [154] M. W. Khalil, F. Sasse, H. Lünsdorf, Y. A. Elnakady, H. Reichenbach, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 678-683.
- [155] K. Rathinasamy, B. Jindal, J. Asthana, P. Singh, P. Balaji, D. Panda, *BMC Cancer* **2010**, *10*, 213.
- [156] a T. C. Hammarton, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2007**, *153*, 1-8;
b E. Ogbadoyi, K. Ersfeld, D. Robinson, T. Sherwin, K. Gull, *Chromosoma* **2000**, *108*, 501-513.
- [157] S. H. I. Kappe, C. A. Buscaglia, L. W. Bergman, I. Coppens, V. Nussenzweig, *Trends in parasitology* **2004**, *20*, 13-16.
- [158] F. Zhu, Z. Shi, C. Qin, L. Tao, X. Liu, F. Xu, L. Zhang, Y. Song, X. Liu, J. Zhang, B. Han, P. Zhang, Y. Chen, *Nucleic Acids Research* **2012**, *40*, D1128-D1136.
- [159] L. Kratzerová, E. Dráberová, C. Juliano, V. r. Viklický, P. L. Fiori, P. Cappuccinelli, P. Dráber, *Experimental Cell Research* **2001**, *266*, 270-278.
- [160] B. Bouteille, O. Oukem, S. Bisser, M. Dumas, *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2003**, *17*, 171-181.
- [161] N. Kudo, N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, S. Horinouchi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 9112-9117.
- [162] D. Xu, N. V. Grishin, Y. M. Chook, *Molecular Biology of the Cell* **2012**.
- [163] R. A. Fridell, U. Fischer, R. Luhrmann, B. E. Meyer, J. L. Meinkoth, M. H. Malim, B. R. Cullen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 2936-2940.
- [164] a W. Wen, J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, S. S. Taylor, *Cell* **1995**, *82*, 463-473;
b M. E. Liku, V. Q. Nguyen, A. W. Rosales, K. Irie, J. J. Li, *Molecular Biology of the Cell* **2005**, *16*, 5026-5039.
- [165] a J. H. Ho, G. Kallstrom, A. W. Johnson, *The Journal of cell biology* **2000**, *151*, 1057-1066; b K. Murdoch, S. Loop, F. Rudt, T. Pieler, *European journal of cell biology* **2002**, *81*, 549-556.
- [166] C. S. Vissinga, T. C. Yeo, S. Warren, J. V. Brawley, J. Phillips, K. Cerosaletti, P. Concannon, *Molecular and cellular biology* **2009**, *29*, 1000-1006.

- [167] U. Fischer, S. Meyer, M. Teufel, C. Heckel, R. Luhrmann, G. Rautmann, *The EMBO journal* **1994**, *13*, 4105-4112.
- [168] T. Usui, H. Watanabe, H. Nakayama, Y. Tada, N. Kanoh, M. Kondoh, T. Asao, K. Takio, H. Watanabe, K. Nishikawa, T. Kitahara, H. Osada, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 799-806.
- [169] S. Kobayashi, K. Tsuchiya, M. Nishide, T. Nishikiori, T. Nakagawa, N. Shimada, *The Journal of Antibiotics* **1995**, *48*, 893-895.
- [170] M. Kalesse, M. Christmann, *Synthesis* **2002**, *2002*, 0981-1003.
- [171] a *Japan Pat.* **1977**, JP 52084220 19770713, CAN 87:186079, AN 1977:586079; b *Japan Pat.* **1976**, JP 51050938 19760506, CAN 86:28618, AN 1977:28618; c C. Eguchi, Y. Yokokawa, *Heterocycles* **1984**, *21*, 470.
- [172] a K. Kaczorowska, Z. Kolarska, K. Mitka, P. Kowalski, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8315-8327; b K. Sato, M. Hyodo, M. Aoki, X.-Q. Zheng, R. Noyori, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2469-2476.
- [173] C. A. S. Regino, D. E. Richardson, *Inorganica Chimica Acta* **2007**, *360*, 3971-3977.
- [174] J. Muzart, *Synthesis* **1995**, 1325-1347.
- [175] J. Clayden, *Organic chemistry*, Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], **2007**.
- [176] H. Akita, N. Sutou, T. Sasaki, K. Kato, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11592-11598.
- [177] F. Ostermayer, D. S. Tarbell, *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 3752-3755.
- [178] a F. Schmitt, Zulassungsarbeit, Universität Tübingen **2011**; b M. Konnerth, Diplom-Arbeit, Universität Tübingen (Tübingen), **2012**.
- [179] S. K. Song, Y.-S. Jeong, P.-H. Kim, G.-T. Chun, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *16*, 1690-1698.
- [180] P. S. Masurekar, *Prog. Drug Res.* **2008**, *65*, 291, 293-328.
- [181] O. Dick, U. Onken, I. Sattler, A. Zeeck, *Appl Microbiol Biotechnol* **1994**, *41*, 373-377.
- [182] D. Weisbrod, Zulassungsarbeit **2012**.
- [183] D. M. Morens, G. K. Folkers, A. S. Fauci, *Nature* **2004**, *430*, 242-249.
- [184] J. L. Martínez, *Science* **2008**, *321*, 365-367.

- [185] a A. R. M. Coates, G. Halls, Y. Hu, *British Journal of Pharmacology* **2011**, *163*, 184-194; b M. S. Butler, M. A. Cooper, *J Antibiot* **2011**, *64*, 413-425.
- [186] a K. S. Lam, *Trends in Microbiology* **2007**, *15*, 279-289; b J. A. Leeds, E. K. Schmitt, P. Krastel, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2006**, *15*, 211-226; c F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 206-220.
- [187] M. Zerikly, G. L. Challis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 625-633.
- [188] H. Dhamankar, K. L. J. Prather, *Current Opinion in Structural Biology* **2011**, *21*, 488-494.
- [189] M. Goodfellow, H.-P. Fiedler, *Antonie van Leeuwenhoek* **2010**, *98*, 119-142.
- [190] J. Berdy, *J Antibiot* **2005**, *58*, 1-26.
- [191] M. Watve, R. Tickoo, M. Jog, B. Bhole, *Archives of Microbiology* **2001**, *176*, 386-390.
- [192] A. E. Cook, P. R. Meyers, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2003**, *53*, 1907-1915.
- [193] P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, M. Sait, *Applied and environmental microbiology* **2002**, *68*, 2391-2396.
- [194] a M. Hayakawa, H. Nonomura, *Journal of Fermentation Technology* **1987**, *65*, 501-509; b M. Hayakawa, H. Nonomura, *Journal of Fermentation Technology* **1987**, *65*, 609-616.
- [195] A. P. Hunt, J. D. Parry, J. Hamilton-Taylor, *Limnology and Oceanography* **2000**, *45*, 237-241.
- [196] a J. B. Jones, T. C. Stadtman, *Journal of Bacteriology* **1977**, *130*, 1404-1406; b L. Schoenborn, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. Hugenholtz, P. H. Janssen, *Applied and environmental microbiology* **2004**, *70*, 4363-4366.
- [197] A. D'Onofrio, J. M. Crawford, E. J. Stewart, K. Witt, E. Gavrish, S. Epstein, J. Clardy, K. Lewis, *Chemistry & biology* **2010**, *17*, 254-264.
- [198] H. Faoro, A. C. Alves, E. M. Souza, L. U. Rigo, L. M. Cruz, S. M. Al-Janabi, R. A. Monteiro, V. A. Baura, F. O. Pedrosa, *Applied and environmental microbiology* **2010**, *76*, 4744-4749.
- [199] K. Lewis, S. Epstein, A. D'Onofrio, L. L. Ling, *J Antibiot* **2010**, *63*, 468-476.
- [200] D. Nichols, K. Lewis, J. Orjala, S. Mo, R. Ortenberg, P. O'Connor, C. Zhao, P. Vouros, T. Kaeberlein, S. S. Epstein, *Applied and environmental microbiology* **2008**, *74*, 4889-4897.
- [201] Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie, Merck KGaA, Darmstadt, **1980**.

Literaturverzeichnis

- [202] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [203] O. T. Schmidt, T. Auer, H. Schmadel, *Chemische Berichte* **1960**, *93*, 556-557.
- [204] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Annalen der Chemie* **1984**, *1984*, 1343-1357.
- [205] W. J. Hennen, H. M. Sweers, Y. F. Wang, C. H. Wong, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 4939-4945.

D. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Stephanie Grond für die interessante Aufgabenstellung. Ganz besonders danke ich, dass sie immer ein Ohr für offene Fragen hatte und stets in wertvollen Diskussionen neue Anregungen gegeben hat.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich zu allen Zeiten unterstützt hat. Ihr seid ganz besondere Menschen!

Den Jungs, meiner zweiten Familie, danke ich für alles, was wir zusammen durchgemacht haben. Ohne euch wäre das Leben grau. Das schließt auch die Mädels der Gruppe ein.

Aus dem Arbeitskreis danke ich besonders den fleissigen Korrekturlesern dieser Arbeit Nadja, Martin, Doro, Philipp, Christian und Matthias. Ihnen sowie Torben, Verena, dem Zufl, Nina, Martina und Fabi bin ich sehr dankbar für die offene, witz- und wortreiche Arbeitsatmosphäre. Verena danke ich weiterhin ganz besonders für die stetige Hilfe bei Kultivierungen und Screening! Matthias danke ich außerdem für hervorragende Diskussionen! Ebenfalls danke ich Hans-Jörg Langer für seine Hilfe in Diplom- und Doktorarbeit und die vielen Fussballdiskussionen.

Ich danke Dr. Sasse und Aruna Raja für die schnell und gründlich durchgeführten biologischen Tests und die gute Zusammenarbeit.

Ebenfalls danke ich Prof. Zahler für biologische Tests, das stete Interesse am Collinolactonprojekt und wertvolle Diskussionen.

Prof. T. U. Mayer und Martin Möckel danke ich für die Durchführung des Live-Cell-Imaging.

Danksagung

Prof. Ziegler und Dipl. Chem. Thomas Kutter danke ich für den zu Verfügung gestellten Nitrobenzyl-Linker, Thomas Kutter besonders für die wertvollen Diskussionen.

Ich danke Prof. Fiedler und Dipl.-Ing (FH) Andreas Kulik für vielfältige Unterstützung in Fermentationen und Mikrobiologie.

Jun.-Prof. Boris Nachtsheim danke ich für das offene Ohr und wertvolle Tips.

Den Mitarbeitern der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie danke ich für die durchgeführten Analysen und die Hilfe bei aufgetretenen Fragen.

Den Mitarbeitern der Werkstätten danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe.

Weiterhin danken möchte ich auch meinem zweiten Wohnzimmer, dem Laden, insbesondere Asli für all die spannenden Diskussionen bei Jever fun!

Niklas, Eva und Lukas danke ich für die gemeinsame Zeit in Tübingen, sei es auf dem Holzmarkt, beim Tatort oder im Laden.

Ich danke ebenfalls den Trainern und Mitgliedern vom Kampfkunztzentrum Reutlingen für die inspirierende und schweißtreibende Zeit.

Außerdem danke ich allen, die ich noch nicht erwähnt hab, weil ich zu vergesslich bin. Ihr habt einen gut bei mir!