Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist an der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt (http://www.ub.tuwien.ac.at).

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology (http://www.ub.tuwien.ac.at/englweb/).

DIPLOMARBEIT

Bioreduktion von Carbonylderivaten für Taxoide der zweiten Generation

Institut für Angewandte Synthesechemie
Arbeitsbereich Organische Chemie
Technische Universität Wien

betreut von

A.o. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Marko D. Mihovilovic

durchgeführt von

Diana Orski-Ritchie
Stanislausg. 2
1030 Wien
Matr. Nr.: 9526447

Wien, im März 2005

Für meine Mutter

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Betreuer Ao.Univ.Prof.DI.Dr. Marko D. Mihovilovic für die interessante Themenstellung, die Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und die Schaffung hervorragender Arbeitsbedingungen und A.o.Univ.Prof.DI.Dr. Peter Stanetty für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Des weiten danke ich DI Michael Schnürch, DI Marko Susnik, DI Markus Spina und DI Florian Rudroff für das Messen unzähliger NMR, DI Thomas Fischer, DI Florian Rudroff, Dr. Celine Fosse und MSc Radka Snajdrova für die vielen GC-Messungen, DI Thomas Fischer und DI Florian Rudroff für die Messungen auf der GC-MS und DI Christian Einzinger für die schwierigen Messungen auf der HPLC.

Schließlich möchte ich allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe, vor allem meinen Laborkollegen DI Thomas Fischer, DI Markus Spina und DI Florian Rudroff, für die nette Zeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Tante für die jahrelange Unterstützung ohne die mein Studium und damit diese Arbeit nicht zustande gekommen wären.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **4**

FORMELSCHEMATA **8**

Syntheseteil **8**
β - Ketoester Methode 8
β - Lactam Methode 9

BIOREDUKTION VON CARBONYLDERIVATEN FÜR TAXOIDE DER ZWEITEN GENERATION **10**

Taxol und Taxolderivate **10**
Biokatalyse 12

Retrosynthetischer Ansatz **16**
β - Ketoester Methode 16
β - Lactam Methode 17

ERGEBNISSE UND DISKUSSION **19**

1. B-KETOESTER METHODE **19**
1.1. Synthese der β- Ketoester 19
1.2 Synthese der 2-Chlor-3-oxo-ethylester 20
1.3 Chemische Reduktion mit Natriumborhydrid 21

2. B–LACTAM-METHODE **22**

2.1 Synthese der 1-Methoxyaldehyde **22**

2.1.1 Synthese durch Alkenspaltung **22**
2.1.1.1 Synthese von Ethenylalkoholen 22
2.1.1.2 Synthese von 1-Ethenyl-1-methoxycyclen 23

2.1.2 Synthese der Aldehyde durch oxidative Spaltung mittels OsO_4 / KIO_4 ..... **24**

2.2 Reaktion zu den Iminen **26**

2.3 Cyclisierung der Imine mit Et_3N / Acetoxyessigsäurechlorid **27**

2.4 Esterhydrolyse **28**

2.5 Oxidation zu den α-Keto-β-lactamen **29**

2.6 Reduktion mit Natriumhydrid **31**

3 ENZYMATISCHE REDUKTION ZUM ALKOHOL **32**

3.1 Biotransformation der β-Ketoester **32**

3.2 Biotransformation der β-Lactame **38**

EXPERIMENTELLER TEIL 41

Allgemeines 41

Medien für die Biotransformation: 43

Medien für die Proteinreinigung 44

AV I: Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der β-Ketoester 45
5-Methyl-3-oxo-hexansäureethylester (2c) 45
4,4-Dimethyl-pentansäureethylester (2d) 46

AV II: Allgemeine Vorschrift zur Chlorierung: 47
2-Chlor-3-oxo-3-phenyl-propionsäureethylester (3a) 47
2 Chlor-4-ethyl-3-oxo-pentansäureethylester (3b 48
2-Chloro-5-methyl-3-oxo-hexansäureethylester (3c) 49
Pentansäure-2-chloro-4,4-dimethyl-3-oxo-ethylester (3d) 50

AV III: Allgemeine Vorschrift zur chemischen Reduktion 51
2-Chloro-3-hydroxy-3-phenyl-propionsäureethylester (4a) 51
2-Chloro-3-hydroxy-5-methyl-hexansäureethylester (4c) 52
2-Chloro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäureethyl ester (4d) 53

AV IV: Allgemeine Vorschrift zur Grignardaddition 54
1-Ethenylcyclohexanol (6a) 54
1-Ethenylcycloheptanol (6b) 55
4-Ethenyl-tetrahydropyran-4-ol (6c) 56

AV V: Allgemeine Vorschrift zur Methylierung 57
1-Ethenyl-1-methoxycyclohexan (7a) 57
1-Ethenyl-1-methoxycycloheptan (7b) 58
4-Ethenyl-4-methoxytetrahydropyran (7c) 59

AV VI: Allgemeine Vorschrift zur Alkenspaltung 60
1-Methoxycyclohexancarbaldehyd (8a) 60
1-Methoxycycloheptancarbaldehyd (8b) 61
4-Methoxy-tetrahydropyran-4-carbaldehyd (8c) 62

AV VII: Allgemeine Vorschrift zur Iminsynthese 63
N-(1-Methoxy-cyclohexylmethylen)-4-methoxyanilin (9a) 63
N-(1-Methoxy-cycloheptylmethylen)-4-methoxyanilin (9b) 64
4-Methoxy-N-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-ylmethylen)-anilin (9c) 65

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Acetoxyessigsäure 66

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Acetoxyessigsäurechlorid 67

AV VIII: Allgemeine Vorschrift zur Azetidincyclisierung mit Acetoxyessigsäurechlorid 68
3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)-azetidin-2-on (10a) 68
3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)-azetidin-2-on (10b) 70
cis-3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2-on (10c) 71

AV IX: Allgemeine Vorschrift zur hydrolytischen Abspaltung der O-Acetylgruppe 72
3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)- azetidin-2-on (11a) 72
3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)- azetidin-2-on (11b) 73
cis-3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2-on (*cis*-11c) 74

AV X: Allgemeine Vorschrift zur Alkoholoxidation mit P_4O_{10}/DMSO 75
1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)-azetidin-2,3-dion (12a) 75
1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)-azetidin-2,3-dion (12b) 76
1-(4-Methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2,3-dion (12c) 77

XI: Allgemeine Vorschrift zur chemischen Reduktion **78**
cis-3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d) 78
cis-4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (13e) 79

AV XII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur präparativen Hefereduktion **80**

β-Lactame **80**

AV XIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit growing cells **82**
Methode A: 82
Methode B: 84

AV XIV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit non growing cells **85**

AV XV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bioreduktion mit GST-Fusion Proteinen **86**
3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d) 87
4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (13e) 87

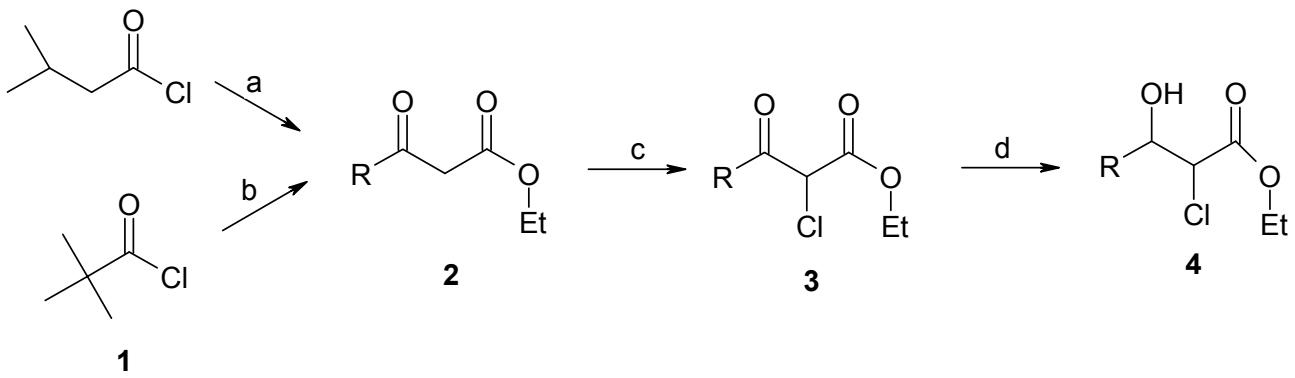
Referenzen **89**

Chemische Verbindungen sind mit fetten arabischen Ziffern bezeichnet. Alle bisher nicht bekannten Substanzen sind durch unterstrichene Substanznummern gekennzeichnet. Literaturstellen sind durch hochgestellte arabische Ziffern bezeichnet.

Formelschemata

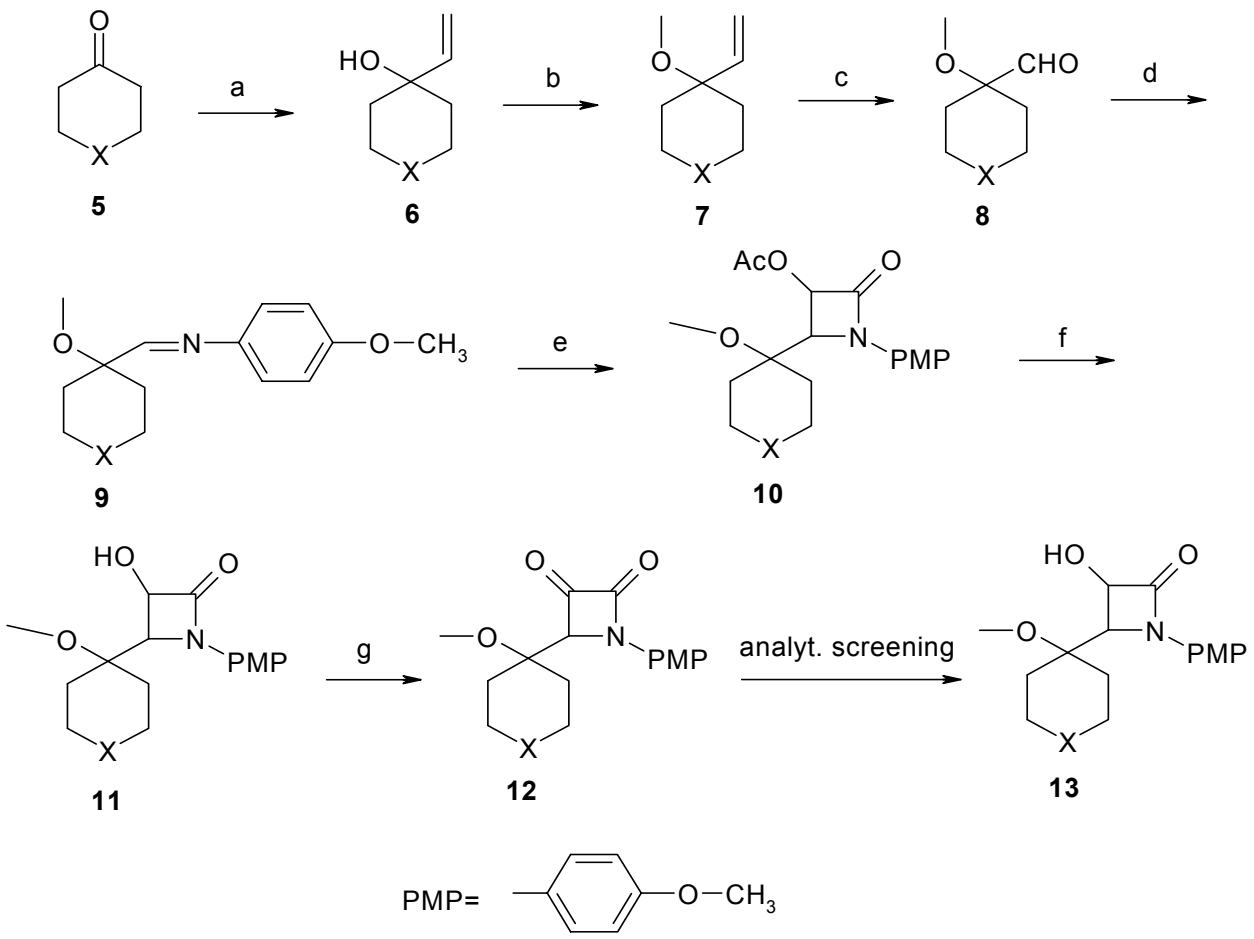
Syntheseteil

β - Ketoester Methode



R	a	b	c	d
C_6H_5-	-	-	95	61
$(CH_3)_2$-CH_2-	-	-	58	24
$(CH_3)_2$-CH_2-CH_2-	62	-	92	37
$(CH_3)_3C$-	-	68	91	29
CF_3-	-	-	-	-

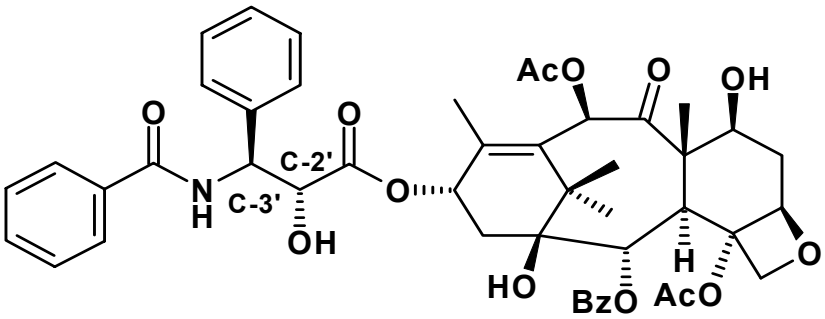
β - Lactam Methode



X	a	b	c	d	e	f	g
$-CH_2-$	66	91	89	49	24	quant.	26
$-CH_2-CH_2-$	75	93	96	56	28	98	34
-O-	69	86	72	86	11	quant.	37

Bioreduktion von Carbonylderivaten für Taxoide der zweiten Generation

Taxol und Taxolderivate



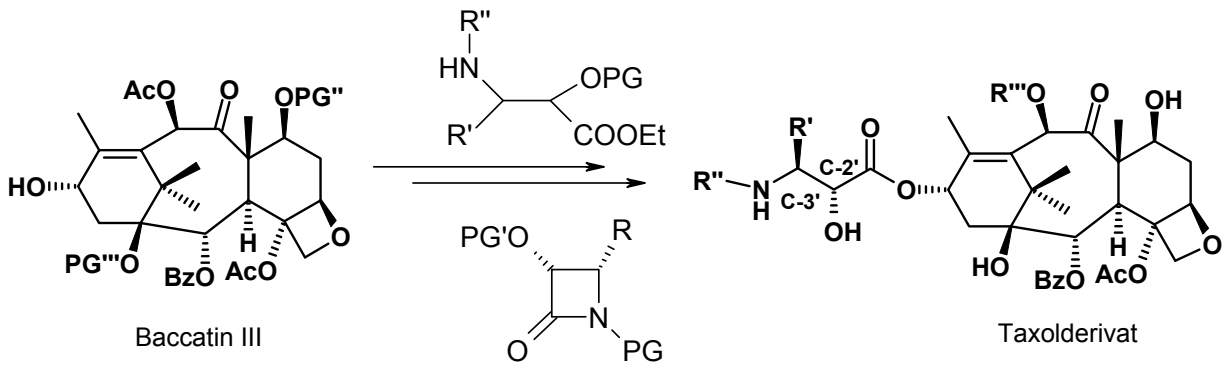
Taxol

Die Erforschung von Taxol als Krebstherapeutikum begann bereits in den 1960er Jahren und gewann an Dynamik mit der Publikation der chemischen Struktur im Jahr 1971[1]. Eine industrielle Produktion via Totalsynthese[2] ist nicht wirtschaftlich, da dies eine Synthese von etlichen Stufen mit geringen Ausbeuten ist. Die Gewinnung des Extraktes erfolgte ursprünglich aus der Rinde der Pazifischen Eibe, wobei es zum Absterben der Naturstoffquelle kommt. Daher wurden bereits frühzeitig nachwachsende Rohstoffquellen als alternative Möglichkeiten für die Gewinnung gesucht. Es konnte eine Vorstufe des Taxols, Baccatin III, aus den Nadeln der Atlantischen Eibe isoliert werden. Dieser leicht verfügbare Rohstoff enthält den polycyclischen Grundkörper. Aus bisherigen Struktur-Wirkungs-Untersuchungen geht hervor, dass das polycyclische Gerüst nur wenige Modifikationen zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffes offen lässt. Allerdings besteht eine hohe Flexibilität für chemische Veränderungen in der Seitenkette. Durch Kupplung von Baccatin III mit z.B. funktionalisierten Carbonsäurederivaten oder β-Lactamen erhält man somit die analogen Taxoide. Dieser Ansatz ermöglicht bei der Verwendung modifizierter Seitenkettenvorstufen Zugang zu Taxoiden der zweiten Generation.

---

[1] Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327

[2] a.) Nicolaou,K.C.; Yang, Z.; Liu, J.J.; Ueno, H.; Nantermet, P.G.; Guy, R.K.; Claiborne, C.F.; Renaud, J.; Couladouros, E.A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E.J. *Nature* **1994**, *367*, 630-634; b.) Holton, R.A.; Somoza, C.; Kim, H.B.; Liang,F.; Biediger,R.J.; Boatman, P.D.; Shindo, M.; Smith, C.C.; Kim, S.; Nadizadeh, H.; Susuki, Y.; Tao, C.; Vu, P.; Tang, S.; Zhang, P.; Murthi, K.K.; Gentile, L.N.; Liu, J.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597-1600; c.) Masters, J.J.; Link, J.T.; Snyder, L.B.; Young, W.B.; Danishefsky, S.J. *Angew. Chem.* **1995**, *34*, 1723-26



Mittlerweile kann Taxol direkt auf enzymatischem[3] oder mittels Baccatin III bzw. 10-Deacetylbaccatin III auf semisynthetischem Weg[4] hergestellt werden. Taxol hat zwei Wirkungsmechanismen[5]:

- Blockade des Zellteilungsprozesses, indem es die Mikrotubilibildung in Zellen inhibiert und somit das Wachstum von Tumorzellen stoppt.
- Bindung an das Bcl-2 Protein, welches zu einer Inhibierung dieses Proteins führt und damit die Apoptose (Zelltod) einleitet.

Durch Variation der Substituenten R', R'' und R''' kann die biologische Aktivität verändert werden. Vor allem R' und R'' lassen eine große Palette an verschiedenen Möglichkeiten offen, da sie an der C-13 Seitenkette liegen und wie bereits erwähnt, sehr variabel sind. Durch diese Variationen wird versucht, Nebeneffekte wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Alopezie (Haarausfall), schwere und fiebrige Neutropenie (Mangel an weißen Blutzellen, den neutrophilen Granulozyten), sowie Gewöhnheitseffekte nach 5-7 Monaten, aber auch die problematische Applikation aufgrund der schlechten Löslichkeit, zu beheben.
Pharmazeutische Handelsprodukte wie Taxol® (halbsynthetisches Paclitaxel von der Firma Bristol-Myers Sqhibb) und Taxotere® (Derivat von Taxol, hergestellt von der Firma Aventis) werden bereits in der Krebstherapie eingesetzt.

In dieser Arbeit soll, durch Modifikationen der Seitenkette, der hydrophobe Kollaps[6], vor allem in polaren Lösungsmitteln (wie auch in Wasser), durch sperrige Reste zurückgedrängt, aber auch die Hydrophilie durch Einbringung von polaren Gruppen, erhöht werden.
Beim hydrophoben Kollaps klappt die Seitenkette unter den polycyclischen Teil des Moleküls, wodurch es zu einer Ausbildung von Nebenvalenzen zwischen dem Phenylrest von Taxol und den lipophilen Gruppen des polycyclischen Teiles kommt. Daraus resultieren vor allem die schlechte Wasserlöslichkeit und potentiell zum Teil auch die schlechte Verträglichkeit.

---

[3] Kingston, D.G.I. *Chem. Commun.* **2001**, 867-880

[4] a)Holton, R.A. Abstract of Papers, 203rd National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, CA; *Am. Chem. Soc.*: Washington, DC, **1991** b) Holton, R.A. *U.S. Patent* 5, 015,744, **1991** und 5, 136, 060, **1992**.

[5] Amos, L.A.; Löwe, J. *Chemistry and Biology* **1999**, R65-R69

[6] a) Gao, Q.; Chen, S.-H. *Tetrahedron Lett.* **1996** 37, 3425-3428 b.) Vander Velde, D.G.; Georg, G.I.; Grunewald, G.L.; Gunn, C.W.; Mitscher, L.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11650-11651 c.) Gao, Q.; Parker, W.L. *Terahedron* **1996**, *52,* 2291-2300 d.) Boge, T.C.; Wu, Z.-H.; Himes, R.H., Vander Velde, D.G., Georg, G.I. *Bio. Med. Chem. Lett.* **1999**, 3047-3052

Biokatalyse

Speziell seit dem Contergan-Vorfall ist es unverzichtbar, pharmazeutische Wirkstoffe mit chiralen Zentren in optisch reiner Form herzustellen.
Die Biokatalyse repräsentiert vor allem eine sehr umweltfreundliche und kosteneffiziente Methodik zur Produktion von chiralen Synthesebausteinen für die pharmazeutische Industrie.
Die Erweiterung des Repertoires an katalytischen Methoden um den Einsatz von Enzymen in der organischen Chemie ermöglichte eine Vielfalt neuer und enantioselektiver Transformationen.
Die Forschung auf dem Gebiet der asymmetrischen Reduktion[7] von Ketonen zu nicht racemischen chiralen Alkoholen durch Biokatalysatoren gewinnt immer mehr an Bedeutung, vor allem seit sich Erfolge in der enantioselektiven Erzeugung ohne Racemisierung eingestellt haben. Wichtige industrielle Produkte wie Pharmazeutika, Pflanzenschutzmittel und Naturstoffe können so erzeugt werden.
Eine der wichtigsten und praktischsten Anwendungen ist der Einsatz von Reduktasen als chiraler Katalysator zur Erzeugung von nicht-racemischen chiralen Alkoholen. Diese Alkohole können zu verschiedenen Funktionalitäten, wie Amine, Thiole etc., umgesetzt werden, ohne dass es dabei zu einer Racemisierung kommt.
Die Vorteile einer enzymatischen Reduktion liegen einerseits bei der hohen Umweltverträglichkeit und biologischen Abbaubarkeit, andererseits in der hohen Enantio-, Regio- und Chemoselektivität, ebenso wie in den milden Reaktionsbedingungen, im Gegensatz zu herkömmlichen chemischen Reduktionen, wodurch Nebenreaktionen vermieden werden können. Solche Biotransformationen werden in wässrigen Lösungen durchgeführt und minimieren demnach den Einsatz von organischen Lösungsmitteln sowie von Schwermetallen.

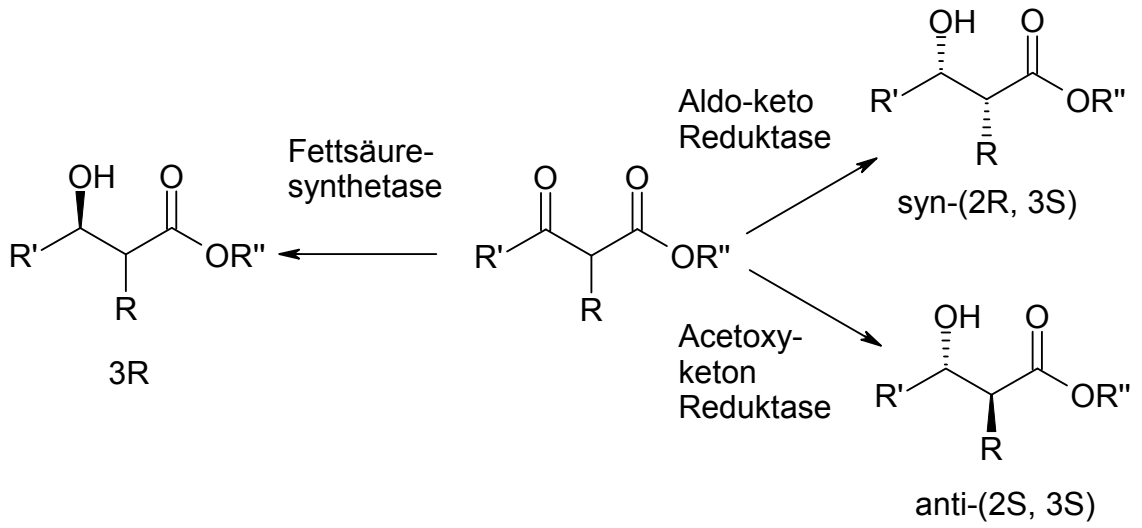
Manche der zur Reduktion verwendeten Enzyme sind bereits kommerziell erhältlich, wobei es sich sowohl um Ganz-Zell-Systeme als auch um isolierte Enzyme handelt.
Diese Enzyme können wie chemische Katalysatoren eingesetzt werden. Zu diesen Biokatalysatoren zählen Backhefe, sowie Alkoholdehydrogenase von Backhefe, *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), Pferdeleber und die Hydroxysteroid-dehydrogenase von *Pseudomonas testosteroni* und *Bacillus spherisus*.

Die Dehydrogenasen und Reduktasen, die unter E.C.1.1.1.x klassifiziert sind, katalysieren die Reduktion von Carbonylgruppen. Die natürlichen Substrate dieser Enzyme sind Alkohole, wie Ethanol, Lactame, Glycerol und die entsprechenden Carbonylverbindungen, wobei die Redoxreaktion in beide Richtungen ablaufen kann. Es können auch synthetisch erzeugte Ketone enantioselektiv reduziert werden.

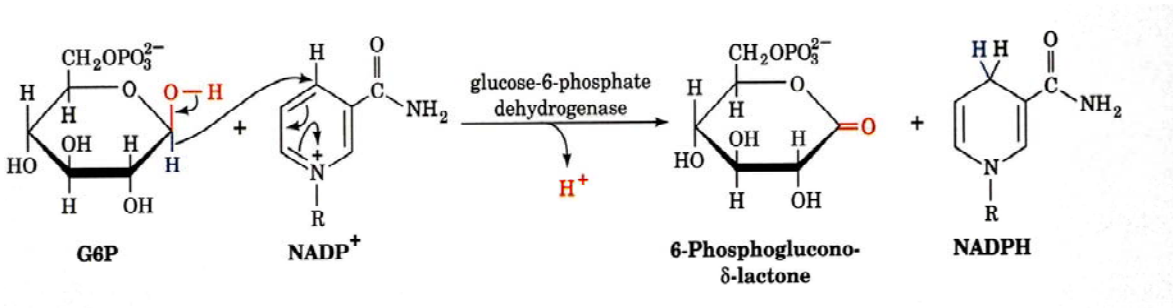
Die in dieser Diplomarbeit verwendeten Hefereduktasen wurden als Bibliothek in mehreren *E.coli* Stämmen überexprimiert. Unter diesen Reduktasen aus *S.cerevisiae* wurden in der Literatur[7a] 3 Hauptenzyme für die Reduktion von β-Ketoestern in ausgezeichneter enantio- und diastereoselektivität identifiziert. Diese sind Fettsäuresyntheasen, Aldo-keto-Reduktasen und Acetoxy-keton-Reduktasen. Zudem

[7] a.) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron* **2003**, *14,* 2659-2681
b.) Waldmann, H.; Drauz, K. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* WILEY-VCH Weinheim **2002**, 991-1064

wurde durch die Entschlüsselung des Hefe-Genoms der Zugang zu einer Vielzahl gesicherter sowie vermutlicher Reduktasen[8] eröffnet.

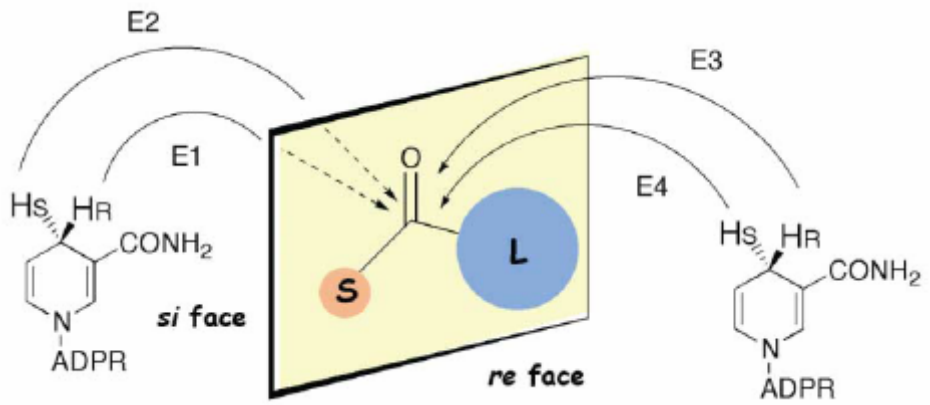


Je nach verwendetem Enzym erhält man Alkohole mit unterschiedlichen Chiralitätszentren. Damit diese Enzyme überhaupt ihre katalytische Wirkung zeigen können, benötigen sie Cofaktoren, wie NADH oder NADPH, von denen eine Wasserstoffübertragung zum Carbonylkohlenstoff stattfindet.
Die Regeneration des Cofaktors erfolgt bei lebenden Ganz-Zell-Systemen direkt in der Zelle. Verwendet man jedoch isolierte Enzyme, muß ein Cofaktorregenerationssystem verwendet werden. In dieser Arbeit wurde NADPH als Cofaktor und Glucose-6-phosphat mit Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase als Regenerationssystem eingesetzt.



Abhängig vom eingesetzten Enzym gibt es vier verschiedene stereochemische Möglichkeiten der Wasserstoffübertragung vom Cofaktor zum Carbonylkohlenstoff. *Pseudomonas subtilis* Alkoholdehydrogenase und *Lactobacillus kefir* Alkoholdehyrogenase (E1) sowie *Geotrichum candium* Glyceroldehydrogenase und *Mucor javanicus* Dihydroxyacetonreduktase (E2) greifen den Carbonylkohlenstoff von der si-Seite an, während Hefealkoholreduktase, Pferdeleberalkoholdehydrogenase, und *Moraxella subtilis* Alkoholdehydrogenase von der re-Seite angreifen.
Der si-seitige Angriff führt zu (R)-Alkoholen und der re-seitige Angriff zu (S)-Alkoholen[9].

[8] Kaluzna, I.A.; Feske, B.D.; Wittayanan, W.; Ghiviriga, I.; Stewart, J.D. *J.Org.Chem* **2005**, *1*, 342-345
[9] Faber, K. In *Biotransformations in Organic Chemistry* Springer **1997**

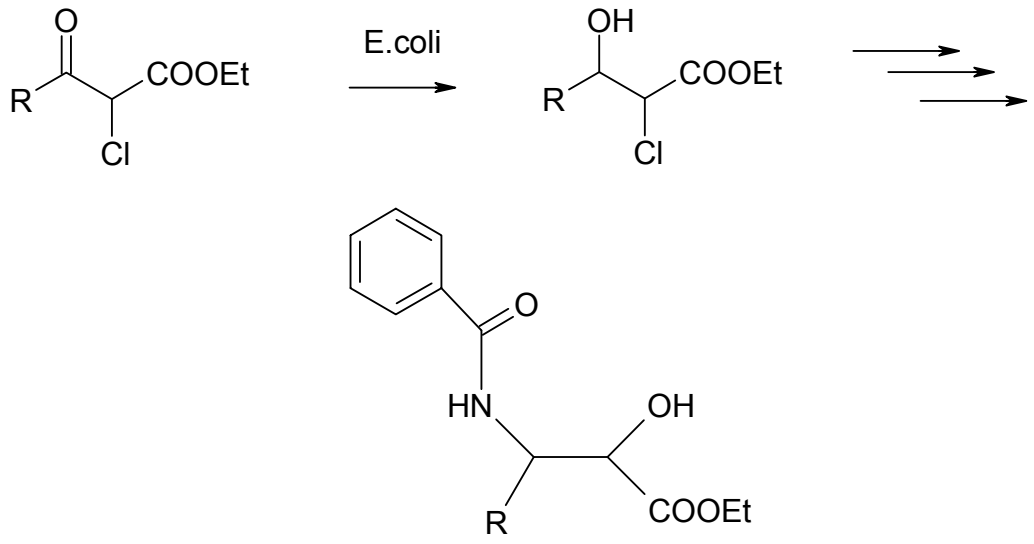


Während dieser Arbeit wurde sowohl mit Ganz-Zell-Systemen als auch mit isolierten Enzymen gearbeitet.

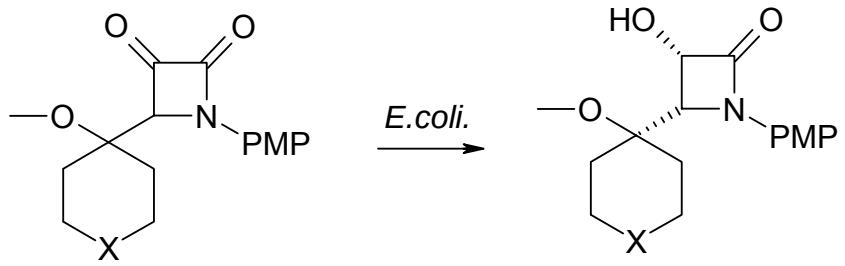
Ganz-Zell-Systeme oder isolierten Enzyme

Beide Arten der Applikation von Enzymen bergen gewisse Vor- und Nachteile.
Je nach verwendetem System beeinflusst dieses die Enantio-, Regio- und Chemoselektivität. Ob ein Cofaktor zur Anwendung kommt, spielt in wirtschaftlicher Hinsicht eine große Rolle. Durch gezielte Auswahl des Enzyms kann einerseits der Aufwand des Herstellungsprozesses und andererseits das Ausmaß der Produktgewinnung gesteuert werden.
Im Allgemeinen wird Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae)* als Ganz-Zell-System zur Reduktion verwendet. Ihr Nachteil liegt in der großen Anzahl der beinhalteten Reduktasen. Da diese unterschiedliche Selektivitäten hinsichtlich der Chemo-, Diastereo- und Enantioselektivität aufweisen, produziert sie eine Mischung aus unterschiedlichen Alkoholen. Außerdem können Schwierigkeiten bei der Produktabtrennung entstehen, da sich eine große Menge an Biomasse und Metaboliten bildet. Von Vorteil ist, dass die Zellen bereits Kohlenhydrate und Cofaktoren enthalten und somit hohen wirtschaftlichen Stellenwert besitzen. Zudem wird dadurch auch das synthetische Arbeiten mit den Zellen erleichtert.
Um diese Vorteile zu nützen, werden rekombinante Enzyme, die in Expressionswirten kloniert werden, verwendet. In dieser Arbeit wurde die Bioreduktion mittels Hefereduktasen (YGL039w → pIK 6 und YDL124w → pIK 8), die in *Escherichia coli* kloniert wurden, untersucht und danach die modifizierte Seitenkette synthetisiert.
Isolierte Enzyme weisen natürlich eine höhere Selektivität auf, da nur mehr die gewünschte Reduktase vorhanden ist. Es kommt jetzt zu keinen Konkurrenzreaktionen mehr und auch die Produktisolation ist einfacher. Dennoch sind Isolation und Reinigung des Katalysators äußerst zeitaufwändig. Zudem kann die Stabilität des isolierten Enzyms als limitierender Faktor hinzukommen. Die Cofaktoren Regenerierung ist auch in manchen Fällen sehr [illegible]er. Ob ein Cofaktor zur Anwendung kommt, spielt in wirtschaftlicher Hinsicht eine große Rolle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Bioreduktion von β-Ketoestern und β-Lactamen mittels Hefereduktasen, die in *E.coli* kloniert wurden.
Mit diesen Intermediaten sollte die enantioselektive Synthese von modifizierten C-13 Seitenketten verwirklicht werden.



R:	C_6H_5-
	$(CH_3)_2$-CH_2-
	$(CH_3)_2$-CH_2-CH_2-
	$(CH_3)_3C$-
	CF_3-

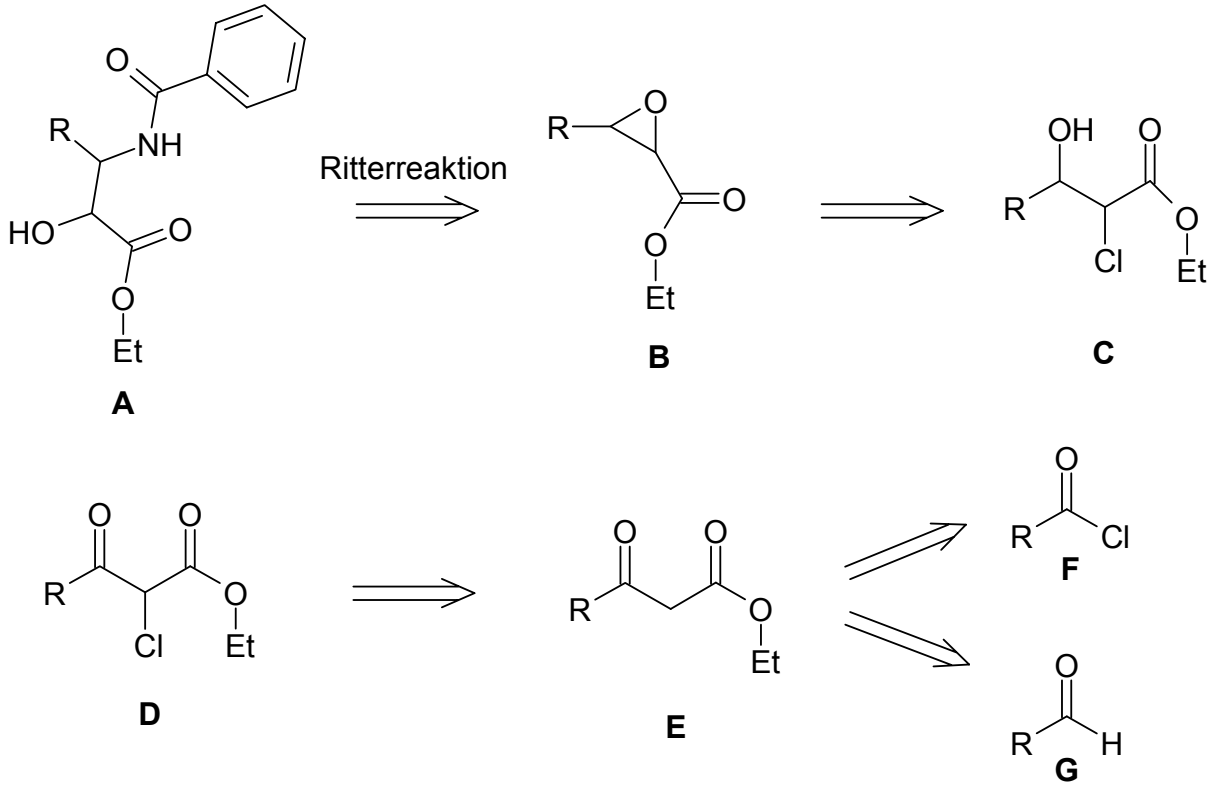


X	-CH_2-
	-CH_2-CH_2-
	-O-

Diese C-13 Seitenketten sollten in einem zukünftigen Abschnitt des Projektes zur Totalsynthese von Taxolderivaten der zweiten Generation mit potentiell verbesserten Wirkstoffeigenschaften verwendet werden.

Retrosynthetischer Ansatz

β - Ketoester Methode



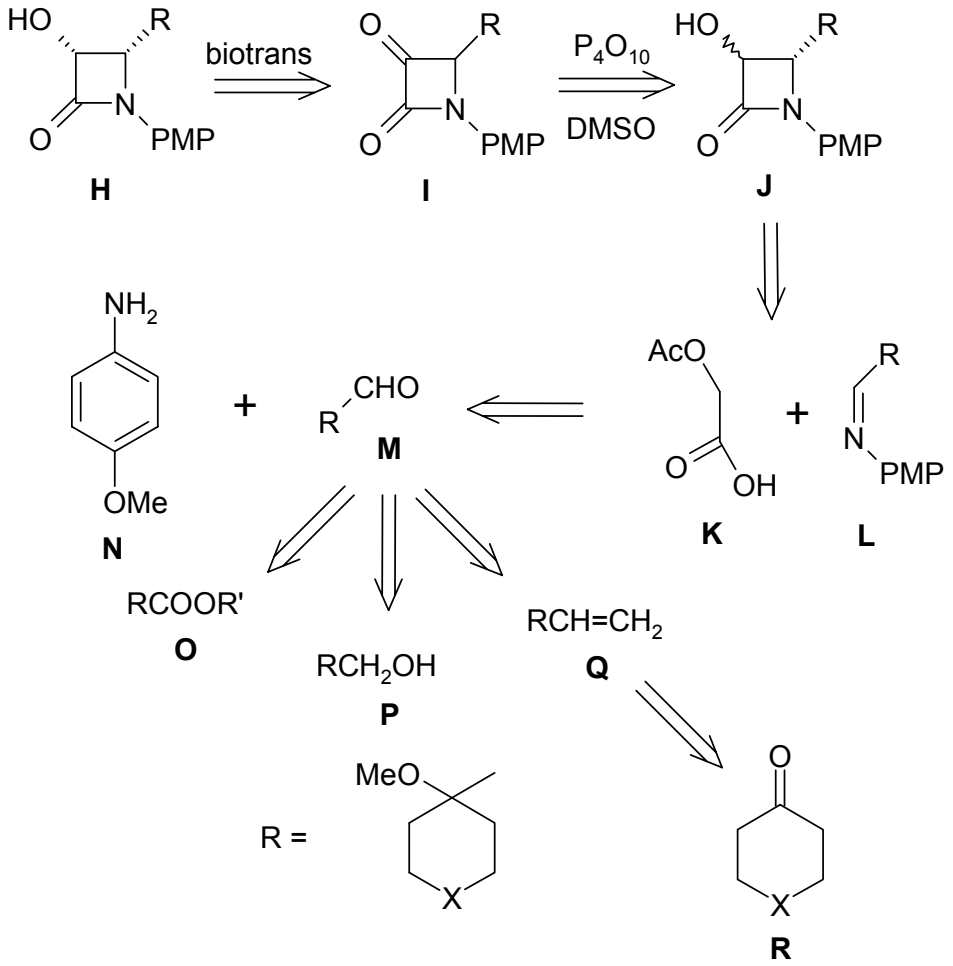
Bei der retrosynthetischen Analyse wird vom Endprodukt **A** ausgegangen. Die Einführung der Benzoylamid-Seitenkette kann mittels Benzonitril über eine Ritterreaktion[10] erfolgen. Aus der β-Hydroxy-α-chlor-Verbindung **C** kann durch Basenzugabe das Epoxid[11] **B** hergestellt werden.
Durch enzymatische Reduktion der α-Chlor-β-keto-Seitenkette kann der Alkohol[12] **C** gewonnen werden. Damit kann eine stereospezifische Reduktion erfolgen, die auf chemischem Weg (z.B.: Natriumborhydrid[13]) nicht möglich wäre, da diastereomere und racemische Alkoholgemische entstehen würden.
Das benötigte Substrat[14] **D** kann mittels Sulfurylchlorid durch Chlorierung der Seitenkette, wobei die Acidität der α-Position zur Carbonsäurefunktion ausgenützt wird, hergestellt werden.

---

[10] Voronkov, M.V.; Gontcharov, A.V.; Wang, Z.-M.; Richardson, P.F.; Kolb, H.C. *Terahedron* **2004**, *60*, 9043-9048
[11] Cabon, O.; Buisson, D.; Larcheveque, M.; Azerad, R. *Tetrahedron* **1995**, *6*, 2211-2218
[12] Kayser, M.M.; Mihovilovic, M.D.; Kearns, J.; Feicht, A.; Stewart, J.D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64,* 6603-6608
[13] Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Frithjof, G.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.; In *Organikum*; Becker, H.G.O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W.D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K.; Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, **2001**, *21*, 568-572
[14] Hahn, H.-G.; Chang, K.H.; Nam, K.D. *Bull.Kor.Chem.Soc.* **2001***, 22,* 149-153

Es bestehen mehrere Möglichkeiten um Produkt **E** durch Seitenkettenverlängerung zu erhalten. Einerseits kann vom Säurechlorid **F** ausgegangen werden und mittels einer Lithiierungsreaktion[15] direkt die Seitenkette eingebracht werden, andererseits kann auch ein Aldehyd **G** als Ausgangsmaterial dienen. Der Aldehyd kann zum Alkohol z.B. durch eine Reformatskyreaktion[16] umgesetzt werden und dieser kann anschließend mittels Swern-[17] oder die Dess-Martin-Oxidation[18] zum Keton oxidiert werden. Die Ausgangsprodukte **F** und **G** sind kommerziell erhältlich.

β - Lactam Methode



X
$-CH_2-$
$-CH_2-CH_2-$
-O-

[15] Baraldi, P.T.; Zarbin, P.HG.; Viera, P.C.; Corrêa, A.G. *Tetrahedron*, **2002** ,*13*, 621-624
[16] Ross, N.A.; MacGregor, R.R.; Bartsch, R.A. *Tetrahedron* **2004***, 60,* 2035-2041
[17] Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Frithjof, G.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.; In *Organikum*; Becker, H.G.O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W.D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K.; Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, **2001**, *21*, 433-435
[18] Bach ,T.; Kirsch, S. *Synlett* **2001,***12*, 1974-1976

Bei der retrosynthetischen Analyse wird vom bereits enzymatisch reduzierten Alkohol **H** ausgegangen. Durch Oxidation[19] des racemischen Alkoholes **J** mittels Phosphorpentoxid / DMSO kann das α-Keto-β-lactam **I** erhalten werden. Ein Vorteil dieser Oxidation ist die Homogenisierung des Produktes, denn aus Vorstudien[12,20] ist bekannt, dass bei der Cyclisierung oft Gemische aus *cis*- und *trans*-Produkten erhalten werden können.
Die Alkoholschutzgruppe, welche bei der Cyclisierung erforderlich ist, muss vor der Oxidation abgespalten werden. Der Alkohol **J** kann durch eine Cyclisierungsreaktion eines Imins **L** mit Acetoxyessigsäure **K** erhalten werden. Das Imin **L** wird aus p-Anisidin **N** und den gewünschten Aldehyden **M** hergestellt.

Die Reaktionen ab dem α-Keto-β-lactam **I** sind alle aus der Literatur bekannt[20,21,22] und wurden deshalb analog durchgeführt.

Für den reduktiven Weg wäre die Reduktion eines Säurederivates zum Alkohol mit anschließender Oxidation zum Aldehyd (Swern[17]- oder Dess-Martin-Oxidation[18]) möglich. Auch eine direkte Reduktion von Nitrilen[23] mittels geeigneter Metallhydride (z.B.: Diisobutylaluminiumhydridreduktion) direkt zur Aldehydfunktion wäre denkbar.

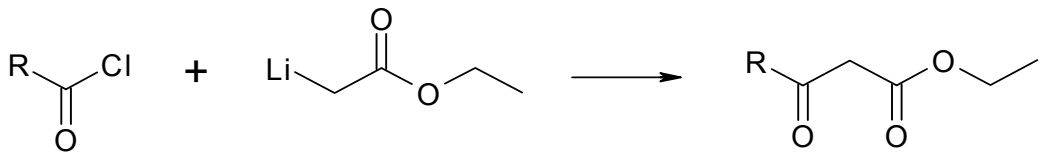
In dieser Arbeit wurde der Weg über die Alkene **Q** gewählt. Eine Möglichkeit zu deren Herstellung ist der Weg über die verschiedenen cyclischen Ketone. Diese können mittels einer Grignard-Reaktion[24] und einer anschließenden Alkylierung[25] des dabei entstandenen Alkohols zu den Alkenen **Q** umgesetzt werden.

[19] Omura, K.; Swern, D. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660
[20] Spina, M. *Diplomarbeit*, TU Wien, **2002**
[21] Mihovilovic, M.D.; Spina, M.; Müller, B.; Stanetty, P. *Monatsh. Chem*. **2004**,*7*,899-909
[22] Mihovilovic, M.D.; Spina, M.; Stanetty, P., *Arkivoc*, **2005**, 5, 33-44
[23] Hayashi, M.; Yoshiga, T; Nakatani, K.; Ono, K.; Oguni, N. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2821-2830
[24] Marcou, A.; Normant, H. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1965**, *5*, 3491-3494
[25] Maier, M.; Bugl, M. *Synlett* **1998**, 1390-1392

Ergebnisse und Diskussion

1. β-Ketoester Methode

1.1. Synthese der β- Ketoester



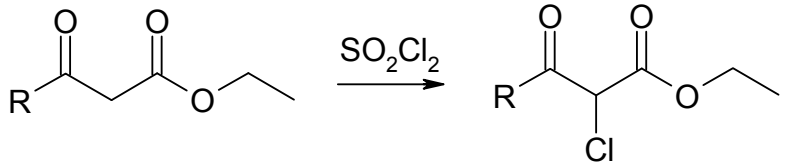
2

Produkt	R	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
2c	$(CH_3)_2$-CH-CH_2-	62	85[15]
2d	$(CH_3)_3$C-	68	65[26]

Die β-Ketoester wurden entsprechend der Literatur[15] synthetisiert, wobei eben dort die Umsetzung von Isovaleriansäurechlorid beschrieben wird. In der Literatur wurde die Hydrolyse mit wässriger Ammoniumchlorid durchgeführt, die bei den Vorversuchen den gewünschten β-Ketoester bildeten. Jedoch im größeren Maßstab bildete sich ein weißer kristalliner Feststoff. An Hand der NMR Daten stellte sich heraus, dass sich Lithiumsalz gebildet hatte, welches mit 2N HCl und anschließender Extraktion mit Ether entfernt werden konnte. Das erneute NMR ergab das richtige Produkt. Die Hydrolyse erfolgte nun mit 2N HCl, um die Salzbildung zu unterbinden.
Die öligen Produkte wurden destillativ gereinigt.
Die Substanzen **2 a, b** und **e** wurden käuflich erworben.

[26] Holmquist, C.R.; Roskamp, E.J. *J. Org. Chem*. **1989**, *54*, 3258-3260

1.2 Synthese der 2-Chlor-3-oxo-ethylester

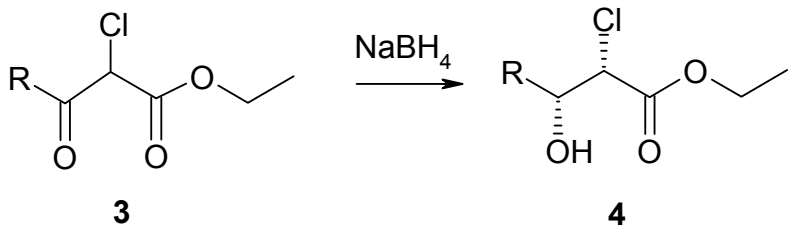


2 **3**

Produkt	R	Ausbeute [%]	Literatur [%]
3a	C_6H_5-	95	75[14]
3b	$(CH_3)_2$-CH-	58	-
3c	$(CH_3)_2$-CH-CH_2-	92	-
3d	$(CH_3)_3$C-	91	-
3e	CF_3-	-	84[14]

Die Chlorierung musste mit unterschiedlichen Äquivalenten von Sulfurylchlorid für die verschiedenen Produkte durchgeführt werden, da es sonst zu mehrfach Chlorierungen kam.
Produkt **3a-d** wurden analog der Literatur[14], wobei dort die Chlorierung der 2-Position verschiedener Acetessigsäureester mit 1 Äquivalent Sulfurylchlorid und kürzerer Reaktionszeit beschrieben wird, hergestellt. Für die einzelnen Produkte wurden die optimalen Bedingungen durch Versuchsreihen ermittelt. Der Ester wurde in abs. Benzol vorgelegt. Bei 20°C wurde 0.95 – 1 Äquivalent Sulforylchlorid zugegeben und 24h bei Raumtemperatur gerührt. Bei Produkt **3c** kam es zu einer mehrfach Chlorierung. Das gewünschte Produkt konnte aus dem Gemisch nicht isoliert werden.
Produkt **3e** wurde nach der Literatur[14] mit Chlorgas chloriert, da Sulforylchlorid nicht die gewünschte Wirkung zeigte. Bei der säulenchromatographischen Reinigung hydrolisierte jedoch das Produkt und konnte deshalb nicht isoliert werden. Aufgrund dieser äußerst limitierten Stabilität des Produktes unter wässrigen Bedingungen – wie sie auch bei enzymatischen Transformationen vorliegen - wurden keine weiteren Reaktionen mit diesem Produkt durchgeführt.

1.3 Chemische Reduktion mit Natriumborhydrid



3 **4**

Produkt	R	Ausbeute [%]	Literatur [%]
4a	C_6H_5-	61	81[39]
4b	$(CH_3)_2$-CH_2-	24	-
4c	$(CH_3)_2$-CH_2-CH_2-	37	-
4d	$(CH_3)_3C$-	29	-

Eine chemische Ketonreduktion mit Natriumborhydrid[27] wurde durchgeführt, um racemisches Vergleichsmaterial für die Bioreduktion zu erhalten. Diese Produkte sind gaschromatographisch analysiert worden.
Das jeweilige Keton wurde in abs. Ethanol auf 5°C gekühlt und ein Äquivalent $NaBH_4$ zugegeben. Nach drei Stunden Rühren bei dieser Temperatur wurde mit 2N HCl hydrolisiert und mit Ether extrahiert.
Die Zuordnung der syn und anti Produkte erfolgte an Hand von Literaturreferenzen[8,11].

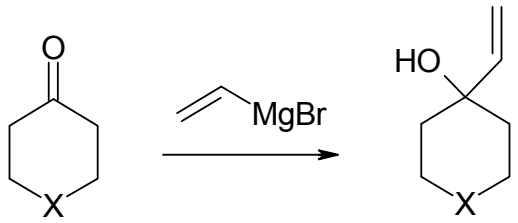
[27] Wuts, P.G.M.; Gu, R.L.; Northius, J.M. *Tetrahedron Asym.* **2000,** *11*, 2117-2123

2. β–Lactam-Methode

2.1 Synthese der 1-Methoxyaldehyde

2.1.1 Synthese durch Alkenspaltung

2.1.1.1 Synthese von Ethenylalkoholen

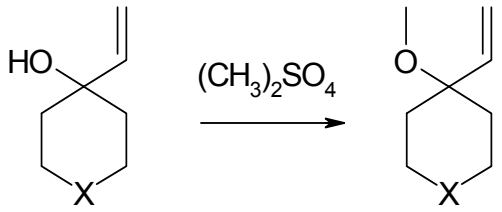


5 **6**

Produkt	X	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
6a	$-CH_2-$	66	66[20]
6b	$-CH_2-CH_2-$	75	86[20]
6c	-O-	69	69[20]

Die Produkte **6a, 6b** und **6c** wurden nach der Literatur[20] hergestellt**.** Die Ketone wurden mittels 1.3 Äquivalenten Vinylmagnesiumbromid bei –10°C umgesetzt.
Die öligen Produkte konnten mit relativ guten Ausbeuten durch Destillation oder in bereits guter Reinheit direkt nach der Reaktion isoliert werden.

2.1.1.2 Synthese von 1-Ethenyl-1-methoxycyclen

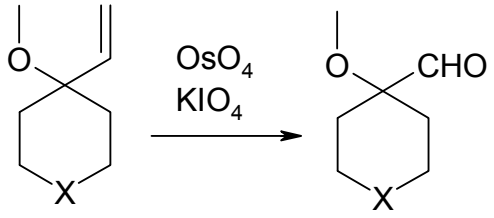


6 **7**

Produkt	X	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
7a	$-CH_2-$	91	81[20]
7b	$-CH_2-CH_2-$	93	87[20]
7c	-O-	86	76[20]

Die erhaltenen Alkohole **6a-c** wurden mit Natriumhydrid deprotoniert und mit 1 Äquivalent Dimethylsulfat bei 70°C umgesetzt. Auch diese Alkylierungen erfolgten analog zur Literatur,[20,25] wo die Alkylierung eines Allylcyclohexanols mit Allylbromid als Alkylierungsreagenz beschrieben wurde.
Die Reaktion lieferte ausgezeichnete Ausbeuten der erwünschten Produkte **2a-c**, wie man aus der Tabelle entnehmen kann.

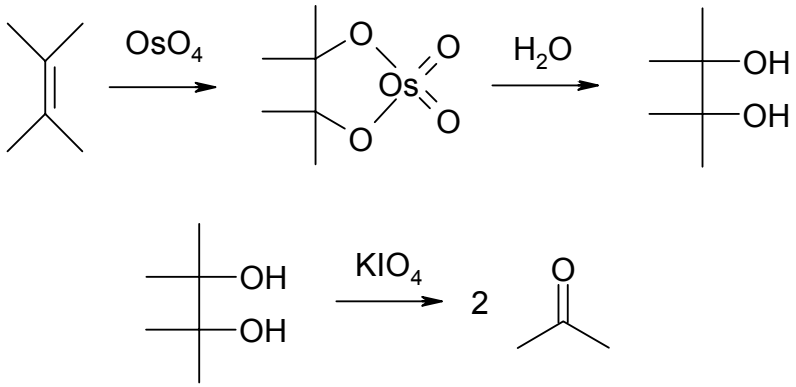
2.1.2 Synthese der Aldehyde durch oxidative Spaltung mittels OsO_4 / KIO_4



7 **8**

Produkt	X	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
8a	$-CH_2-$	89	33[20]
8b	$-CH_2-CH_2-$	96	56[20]
8c	-O-	72	95[20]

Die Alkenspaltung erfolgt in zwei Stufen: Zuerst wird das Alken mittels Osmiumtetroxid zum Diol umgesetzt und anschließend erfolgt die Spaltung des Diols mittels Kaliummetaperiodat zum Aldehyd.



Um die Mengen an Osmiumtetroxid gering zu halten ist der Einsatz eines Reoxidationsmittels wünschenswert. Diese beiden Reaktionsstufen konnten in einer Eintopfreaktion (nach E. Bush *et al.* [28]) durchgeführt werden, jedoch nur bei entsprechender Wahl der oxidierenden Spezies.

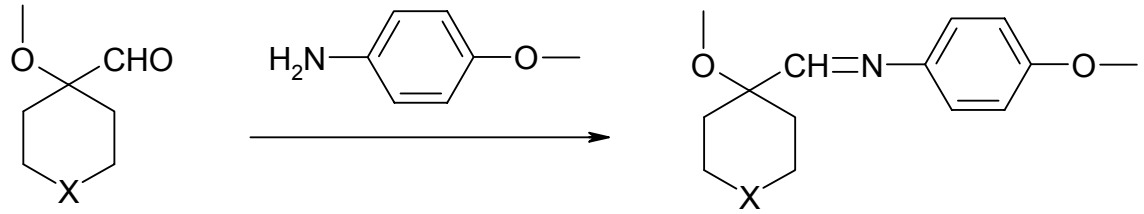
Die bereits oben angeführten 1-Ethenyl-1-methoxyprodukte **2a-c** wurden mit katalytischen Mengen Osmiumtetroxid bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus THF / Wasser gelöst, kurz gerührt und über 4 Stunden portionsweise mit 2

[28] Bush, E.; Jones, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3531-3536

Äquivalenten Kaliummetaperiodat versetzt. Anschließend wurde über Nacht weitergerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bildete.
Nach extraktiver Aufarbeitung und abdestillieren des Lösungsmittels zeigte das NMR, dass sich der Aldehyd gebildet hatte. Es waren noch geringe Mengen an Lösungsmittel zu erkennen, da ein Trockensaugen im Vakuum aufgrund des niedrigen Siedepunktes der Aldehyde nicht möglich ist.

Die Ausbeuten bei den Aldehyden waren sehr gut. Die erhaltenen Produkte konnten direkt zur Synthese der Imine verwendet werden, da laut NMR neben den Produkten nur Spuren von Lösungsmittel vorhanden waren.

2.2 Reaktion zu den Iminen



8 **9**

Diese Reaktion wurde analog zur Literatur[20,29] durchgeführt. In absolutem Methylenchlorid wurden die entsprechenden Aldehyde mit p–Anisidin und unter Anwesenheit von Natriumsulfat und etwas Molekularsieb (3 Å) zwei Tage gerührt.

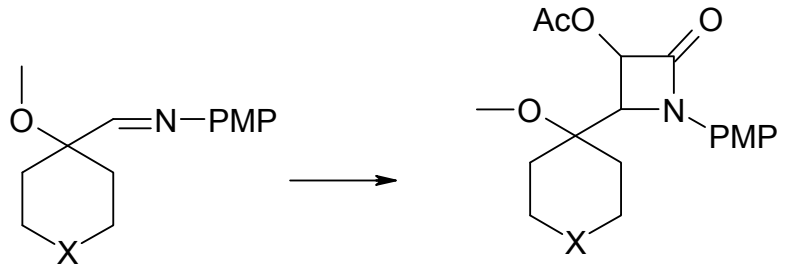
Produkt	X	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
9a	$-CH_2-$	49▪	69[20]
9b	$-CH_2-CH_2-$	56▪	81[20]
9c	-O-	86▫	55[20]

▪ kugelrohrdestilliert
▫ kein Reinigungsschritt erforderlich

Die Aldehyde konnten teilweise direkt zur Synthese der Imine eingesetzt werden. Die erhaltenen Imine wurden kugelrohdestilliert oder konnten ohne weitere Reinigung für die anschließende Cyclisierung verwendet werden.

[29] DeKimpe, N.; Nagy, M.; Boeykens, M.; Van der Schneren, D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5761-5764
DeKimpe, N.; DeSmaele, D. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8023-8026

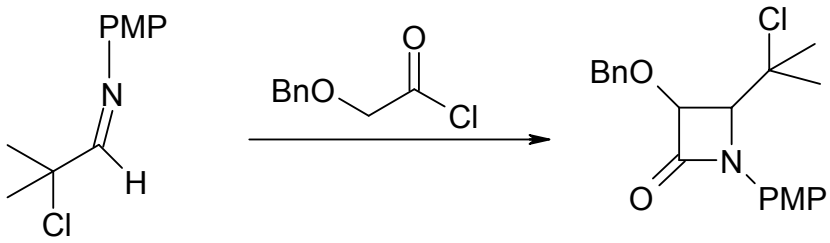
2.3 Cyclisierung der Imine mit Et_3N / Acetoxyessigsäurechlorid



9 **10**

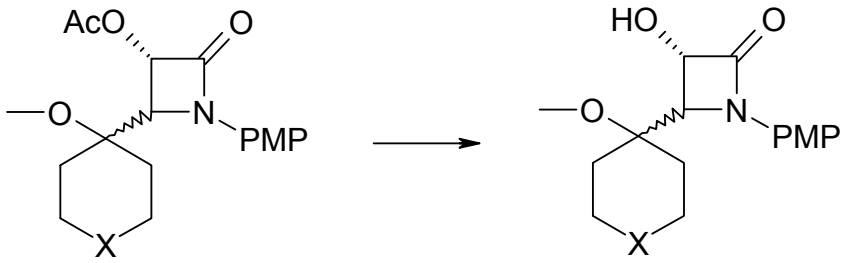
Produkt	X	Ausbeute [%]	cis/trans	Literaturausbeute [%]
10a	$-CH_2-$	24	1:1	24[20]
10b	$-CH_2-CH_2-$	28	3:2	30[20]
10c	-O-	11	1:0	23[20]

Die Cyclisierung der Imine zu den jeweiligen β-Lactamen erfolgte durch eine Staudinger ähnliche Cyclisierung anhand der Literatur[30], wobei dort die Cyclisierung verschiedener Ketene mit α- bzw. β-Halogeniminen beschrieben wird.



[30] Dejaegher, Y.; De Kimpe, N. *J.Org. Chem.* **2004**, *69,* 5974-5985

2.4 Esterhydrolyse



10 **11**

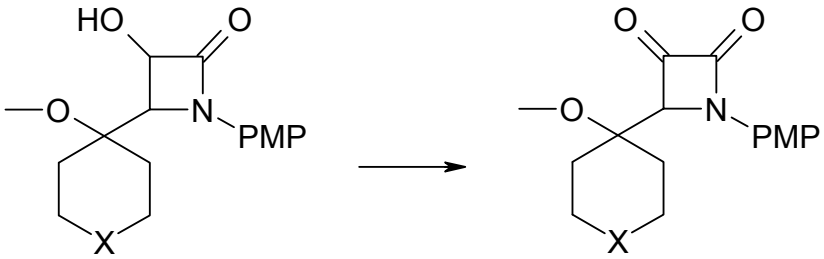
Produkt	X	Ausbeute [%]	cis/trans	Literaturausbeute [%]
11a	$-CH_2-$	quant.	1:1	87[20]
11b	$-CH_2-CH_2-$	98	3:2	91[20]
11c	-O-	quant.	1:0	92[20]

Nun wurde die O-Acylgruppe von den erhaltenen β-Lactamen (**10a, 10b, 10c**) nach einer bereits bekannten Vorschrift[20,31] abgespalten.
Dabei wurden die Edukte in eine Mischung aus THF und 2N Kalilauge (2:1) bei 0°C so lange gerührt, bis eine DC Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigte (ca. 3-4h).

Die Produkte **11a, 11b** und **11c** konnten alle mit sehr guter Ausbeute isoliert werden. Auf einen Reinigungsschritt konnte verzichtet werden, obwohl eine geringe Verunreinigung laut NMR ersichtlich war, welche aber beim weiteren Reaktionsverlauf nicht stört. Bei der Esterspaltung kam es, wie erwartet, zu keiner Änderung des Isomerenverhältnisses der jeweiligen *cis* / *trans* Gemische.

[31] Mihovilovic, M.D.; Feicht, A.: Kayser, M.M. *J. Prak. Chem*. **2000**, *342*, 585-590

2.5 Oxidation zu den α-Keto-β-lactamen



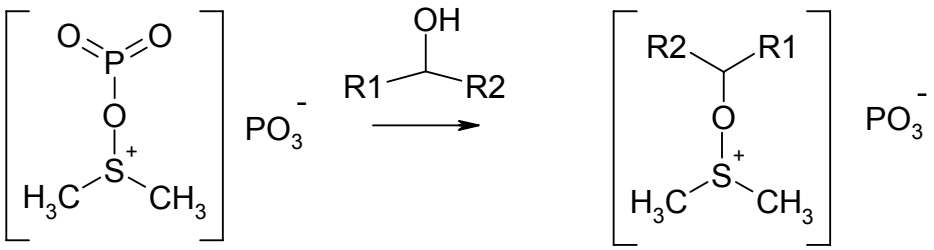
11 **12**

Produkt	X	Ausbeute [%]	Literaturausbeute [%]
12a	$-CH_2-$	26	64[20]
12b	$-CH_2-CH_2-$	34	76[20]
12c	-O-	37	72[20]

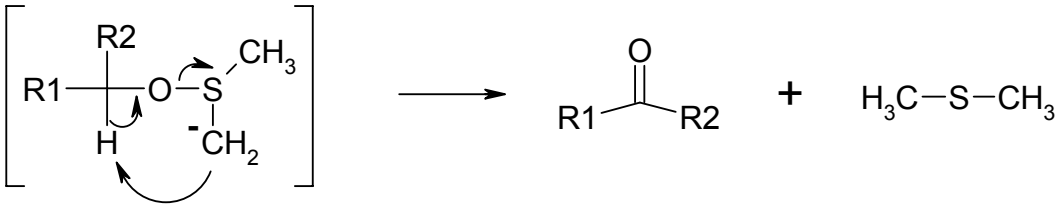
Die erhaltenen α-Hydroxy-β-lactame wurden anschließend zu den Ketonen nach einem bereits bekannten Verfahren[19,31] oxidiert.

Dabei wurden 2-3 Äquivalente Phosphorpentoxid in DMSO 10-15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit dem jeweiligen Edukt **11a, 11b, 11c** (in etwas abs. DMSO gelöst) zugetropft. Bis zum kompletten Umsatz wurde 24-48h bei Raumtemperatur gerührt.
Die Produkte konnten nach säulenchromatographischer Reinigung nur mit schlechten Ausbeuten isoliert werden. Als Grund für die schlechte Ausbeute kann entweder das veralterte Phosphorpentoxid oder das zu wasserhältige DMSO angeführt werden.

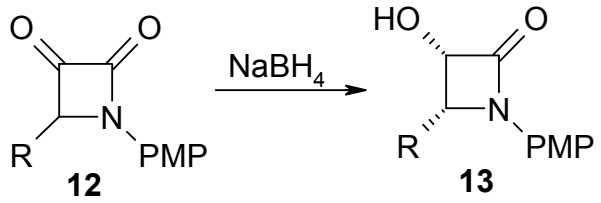
Die Reaktion basiert auf der Aktivierung von DMSO mittels Phosphorpentoxid, wodurch nachfolgend abgebildete Verbindung entsteht. Diese reagiert[19] dann mit den Edukten.



Aufgrund der hohen Acidität der Methylgruppe bedingt durch den positiven Schwefel können Wasserstoffe diese leicht deprotoniert werden (durch in situ generiertes Phosphat). Über einen intramolekularen Angriff erhält man unter Abspaltung von Dimethylsulfid die gewünschten Ketone. Auch die Anwesenheit weiterer funktioneller Gruppen stört nicht, da es sich um ein sehr mildes Verfahren handelt.



2.6 Reduktion mit Natriumhydrid



Produkt	X	Ausbeute [%]	
13d	C_6H_5-	99	cis
13e	$(CH_3)_3$-C-	96	cis

Chemische Ketonreduktionen mit Natriumborhydrid wurden nach der Literatur[32] durchgeführt um racemisches Vergleichsmaterial für die Bioreduktion zu erhalten. Diese Produkte sind gaschromatographisch-massenspektrometisch und mittels HPLC gemessen worden, womit ein Standard für das racemische *cis*-Produkt erhalten wurde.
Das jeweilige Keton wurde in abs. Ethanol auf 5°C gekühlt und ein Äquivalent $NaBH_4$ zugegeben. Nach einer Stunden rühren bei dieser Temperatur wurde mit 2N HCl hydrolysiert und weiter 3 Stunden gerührt, anschließend mit EE aufgearbeitet.

[32] Mihovilovic, M.D. *Post Doc-Bericht* **1997** Univ. New Brunswick-Saint John Campus

3 Enzymatische Reduktion zum Alkohol

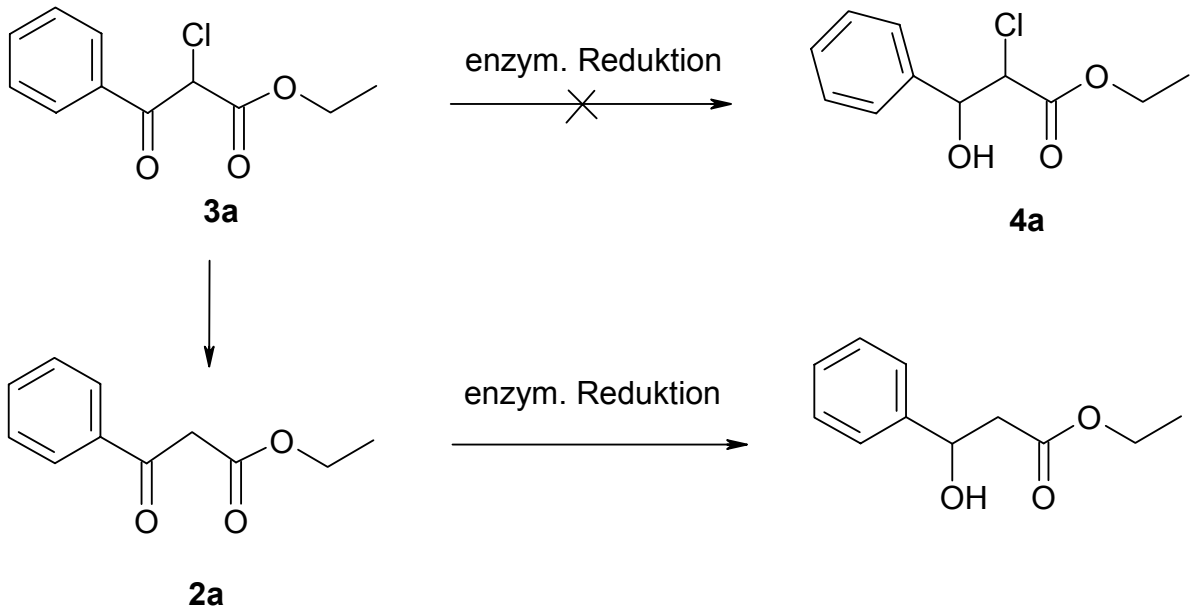
Ein Hauptteil dieser Diplomarbeit beschäftigt sich mit der enzymatischen Reduktion der β-Ketofunktionalität in der Seitenkette und der β-Lactame zu den entsprechenden Alkoholen. Es sollten hier speziell die Ganz-Zell-Systeme untersucht werden, die aufgrund genetischer Modifikationen verschiedene Reduktasen aus Hefe überexprimieren.

Verwendete Enzyme:

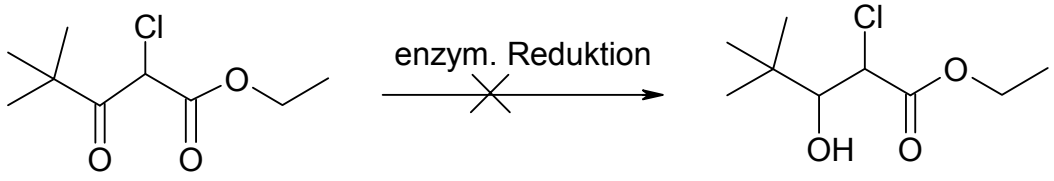
Hefegen	Plasmid	Art der Reduktase	Grösse
YGL039w	pIK6	Oxidoreductase	38.2kDa
YDL124w	pIK8	α-Ketoamidreduktase	35.5kDa

3.1 Biotransformation der β-Ketoester

Analog der Literatur[11] wurde die Biotransformation von 2-Chlor-3-oxo-3-phenyl-propionsäureethylester **3a** mit den oben genannten Enzymen exprimiert mittels Plasmide pIK6 und pIK8 mit „*growing cells*“ durchgeführt.



Es konnte jedoch keine Umsetzung beobachtet werden. Es fand zwar eine enzymatische Reduktion zum Alkohol statt, jedoch wurde zuerst die Seitenkette dechloriert und erst dann fand die Reduktion des Ketons statt. Dies bestätigte sich bei der Biotransformation von Produkt **2a** mit „*growing cells*“ von pIK 6 und pIK 8. Bei Produkt **3d** konnte überhaupt keine Reaktion festgestellt werden, es kam jediglich zur Zersetzung.



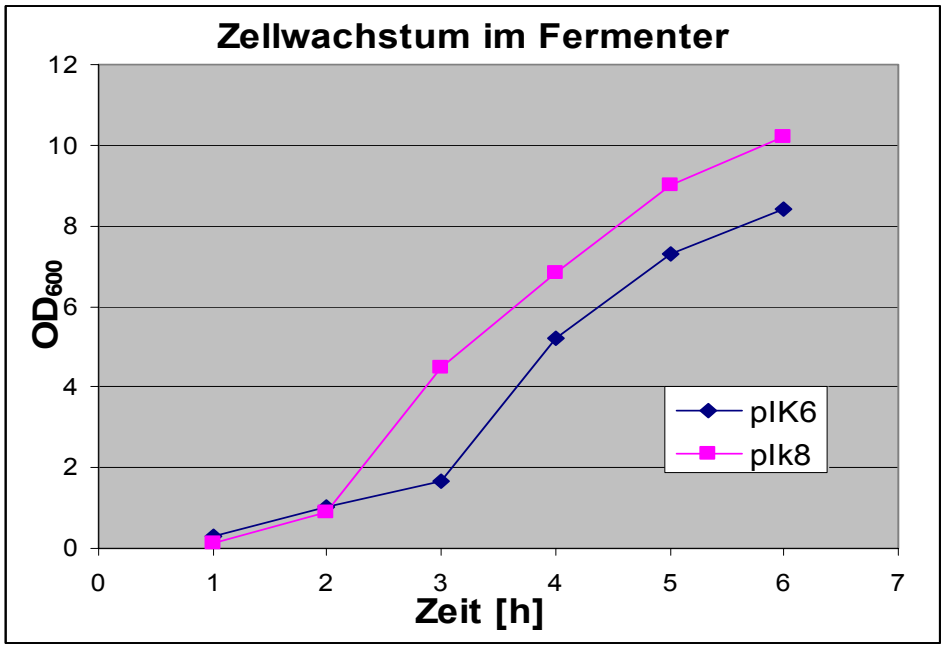
3d **4d**

Es wurde versucht die Reaktionsführung hinsichtlich Reaktionszeit und Substratkonzentration zu modifizieren, aber auch das führte nicht zum gewünschten Ergebnis, sondern es kam wie schon zuvor zu einer Dechlorierung mit anschließender Reduktion zum Alkohol oder zu gar keiner Umsetzung.

Ob die synthetisierten Edukte überhaupt als Substrat für die enzymatische Reduktion in Frage kommen wurde mittels Biotransformationen mit Hefe überprüft. Außerdem wurde eine Bioreduktion mit *E.coli* (Stamm BL21) durchgeführt, um festzustellen, ob der Expressionswirt selbst schon eine reduktive Wirkung zeigt bzw. ein Enzym beinhaltet, welches zur Dechlorierung führt.
Bei Produkt **3a** kam es bei der Umsetzung mit Hefe wie oben zur Dechlorierung und anschließender Reduktion, bei Produkt **3d** kommt es zu keiner Reaktion.
Bei den Versuchen mit *E.coli* (BL21) kam es sowohl bei Produkt **3a** als auch bei Produkt **3d** zu einer Zerstörung selbiger.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Biotransformation mit ganzen Zellen, eine davon ist das Arbeiten mit *„non growing cells“*[33]. Es wurden für beide Expessionssysteme pIK6 und pIK8 analog zur Literatur *„non growing cells“* hergestellt. In einem Fermenter ließ man die Zellen so lange Wachsen, bis der stationäre Zustand erreicht war. Es wurde jedoch das Anwachsen der Zellen dahingehend verändert, dass dieses, aus Zeitersparnis, nun in einer Schüttelflasche durchgeführt wurde. Es wurde zwar länger anwachsen gelassen, jedoch konnten mehrere Enzyme parallel kultiviert werden. Die optischen Dichten, die dabei erreicht wurden, waren etwa um 30 % niedriger als die beim Anwachsen im Fermenter, es wurden aber trotzdem genug Zellen produziert um die Reduktionen durchzuführen.

[33] Walton, A.Z.; Stewart, J. D. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 403-411



„Non growing cells“ haben einige Vorteile gegenüber den *„growing cells“*. Synthetische Substrate wirken oft und vermindern dadurch das Zellwachstum, daraus erklären sich auch die schlechteren Umsätze. Die Auswirkung der Toxizität wird bei den *„non growing cells“* aufgrund der hohen Enzymdichte gering gehalten, dadurch kann man einen hohen Substratumsatz erzielen. Die hohe Enzymdichte wird durch das Anwachsen bis zur stationären Phase erreicht. Ein weiterer Vorteil ist eine mögliche Lagerung, das heißt, die Zellen können bis zu 10 Tagen jederzeit verwendet werden.

Mit diesen Zellen wurde die enzymatische Reduktion an 2-Chlor-3-oxo-phenyl-propionsäureethylester **3a** und Pentansäure-2-chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-ethylester **3d** durchgeführt. Leider führte keiner der Versuche zum gewünschten Ergebnis. Das chlorierte Produkt **3a** wurde dehalogeniert, reduziert und teilweise zersetzt. Bei Produkt **3d** kam es zu überhaupt keiner Reaktion. Um die Ursache zu ermitteln, wurden die unchlorierten Produkte 3-Oxo-phenyl-propionsäureethylester **2a** und Pentansäure-4,4-dimethyl-3-oxo-ethylester **2d** auch mit diesen Enzymen untersucht. Das Produkt **2a** wurde reduziert, bei Produkt **2d** kam es hingegen zu überhaupt keiner Reaktion. Dies deckt sich mit den obigen Befunden hinsichtlich der Substratakzeptanz beim Bioreduktionsschritt. Um der Dechlorierung entgegenzuwirken, wurde die Probe dem Nährmedium portionsweise (über 2-5h) zugegeben. Auch dies führte zu keinem brauchbaren Ergebnis.

Als weitere Möglichkeit um die Dechlorierung zu vermeiden, wurden die Biotransformationen mit *„growing“* und *„non growing cells“* von pIK6 und pIK8 unter Zugabe von 2-Chloracetessigsäureethylester als Suizid-Substrat zur Absättigung jenes Biokatalysators durchgeführt, welcher für die Dechlorierung verantwortlich ist. Hierbei wurden unterschiedliche Zugabeintervalle ausprobiert, um damit die toxische Wirkung vom 2-Chloracetessigsäureethylester zu minimieren. Es wurde damit zwar die Dechlorierung des Substrates vermieden, da jetzt der 2-Chloracetessigsäureethylester dechloriert wurde, aber es konnte nur äußert geringe (<5%) bis keine Umsetzung beobachtet werden.

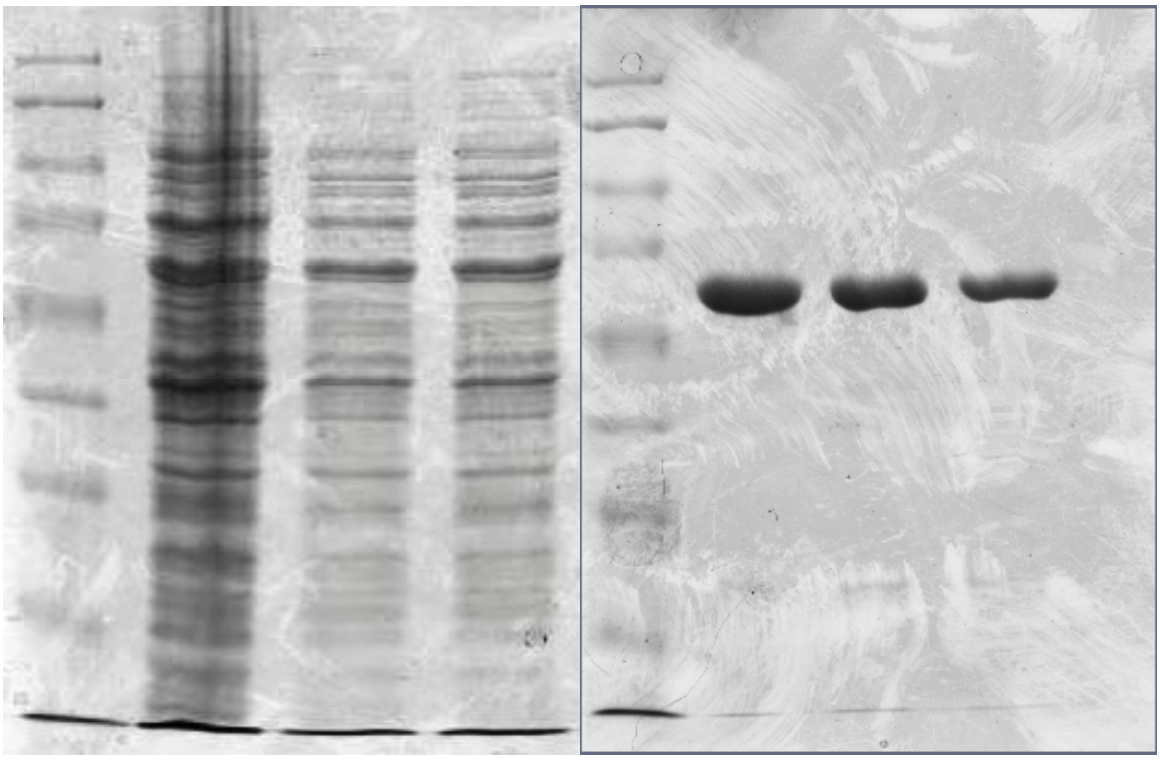
Da keine dieser verwendeten Methoden zum erwünschten Produkt führte, wurde die Umsetzung mit gereinigten GST-Fusion Proteinen aus den Expressionssystemen für pIK6 und pIK8 analog der Literatur[8,34] durchgeführt. In dieser Literatur wird unter anderem die Umsetzung von 2-Chlor-3-oxo-phenyl-propionsäureethylester **3a** beschrieben, jedoch auch dort war der Umsatz mit weniger als 20% nicht zufrieden stellend.
Der Vorteil von gereinigten GST-Fusion Proteinen liegt darin, dass durch die Affinitätschromatographie nach der Reinigung nur mehr das gewünschte isolierte Enzym über bleibt. Somit können jegliche eventuellen Nebenreaktionen, die durch andere Enzyme ausgelöst werden können, vermieden werden. Der Nachteil ist jedoch, dass nun der Einsatz eines Cofaktors mit Cofaktorregenerationssystem nötig ist, welches die Reduktion nicht wirtschaftlich macht.
Der Versuch wurde an den Produkten 2-Chlor-3-oxo-phenyl-propionsäureethylester **3a**, Pentansäure-2-chlor-4,4-dimethyl-3-oxo-ethylester **3d** und 2-Chlor-3-oxo-5-methyl-hexansäureethylester **3c** mit den gereinigten Enzymen pIK6 und pIK8 durchgeführt und auch hier kam es nicht zur gewünschten Reduktion der β-Ketogruppe zum Alkohol, es fand keine Umsetzung der Edukte statt.

[34] Kaluzna, I.A.; Matsuda, T:; Sewell, A.K.; Stewart, J.D. *J. Am. Cem. Soc.* **2004**, *40*, 12827-12832

Biokatalysator	Methode	Additive	**3a**	**3d**
E.coli (pIK6)	*growing cells*		x	-
E.coli (pIK8)	*growing cells*		-	-
E.coli (pIK6)	*growing cells*	+	<3%	
E.coli (pIK8)	*growing cells*	+	-	
Hefe	*growing cells*		x	-
BL21(DE3)	*growing cells*		※	※
E.coli (pIK6)	*nongrowing cells* im Fermenter		x	-
E.coli (pIK8)	*nongrowing cells* im Fermenter		-	-
E.coli (pIK6)	*nongrowing cells* in der Schüttelflasche		x	-
E.coli (pIK8)	*nongrowing cells* in der Schüttelflasche		-	-
E.coli (pIK6)	*nongrowing cells*	+	<5%	<5%
E.coli (pIK8)	*nongrowing cells*	+	<5%	<5%
E.coli (pIK6)	isoliertes Enzym		-	-
E.coli (pIK8)	isoliertes Enzym		<3%	-

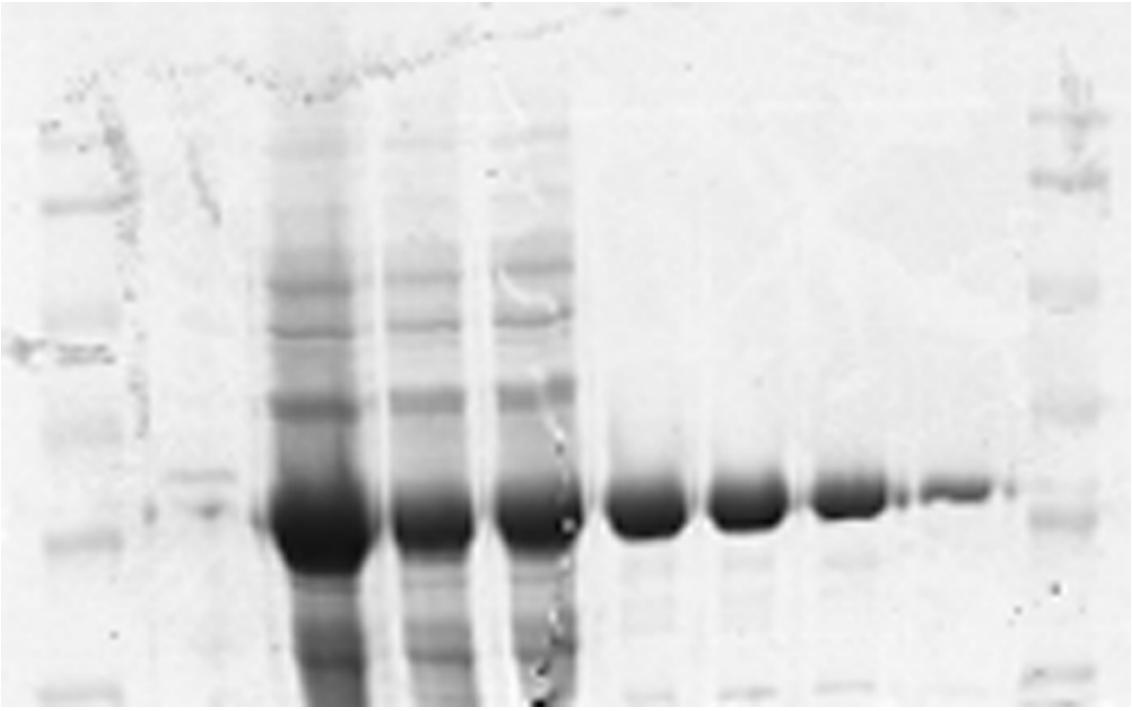
„ – „ kein Umsatz zu dem gewünschten Produkt
„ + „ Zusatz von 2-Chloracetessigsäureethylester
„ x „ Dechlorierung mit anschließender Reduktion
„ ※ „ Zersetzung

SDS-Page (12% Gel) der Reduktase aus dem Expressionssystem mit pIK6



SDS-Gelelektrophorese vor der Säule nach der Säule

SDS-Page (12% Gel) wie oben pIK8

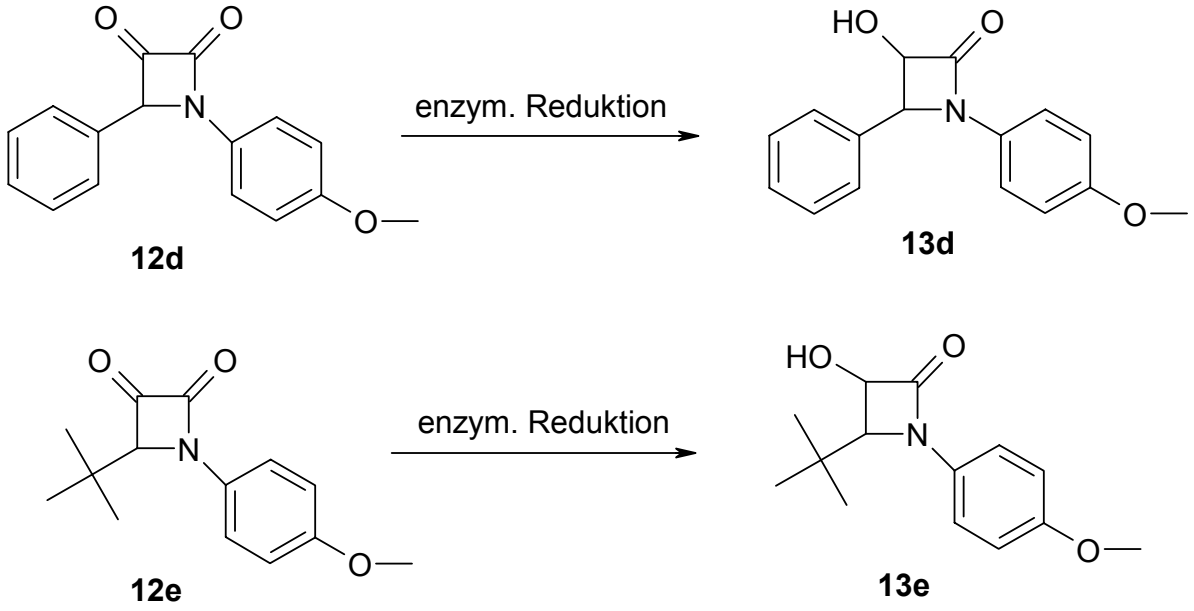


SDS-Gelelektrophorese vor Säule nach der Säule

3.2 Biotransformation der β-Lactame

Analog der Literatur[12] wurde die Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)-azedin-2,3-dion (**12a**), 1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)-azedin-2,3-dion (**12b**) und 1-(4-Methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azedin-2,3-dion (**12c**) mit isolierten Enzymen aus den Expressionssystemen mit pIK6 und pIK8 durchgeführt. Es konnte jedoch keine Umsetzung beobachtet werden

Nachdem die Ergebnisse der Biotransformation der β-Ketoester nicht sehr zufriedenstellend waren, wurden zu den drei β-Lactamen noch zwei weitere β-Lactame, die schon vorhanden waren, untersucht. Die Produkte 1-(4-Methoxy-phenyl)-4-phenyl-azetidine-2,3-dion **12d** und 4-tert-Butyl-1-(4-methoxy-phenyl)-azetidine-2,3-dione **12e** wurden analog der Literatur[12] biotransformiert. Es wurden sowohl die Umsetzungen mit *„growing cells“* als auch mit isolierten Enzymen von pIK6 und pIK8 untersucht. In beiden Fällen konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Bei der Bildung von Produkt **13d** konnte sowohl mit pIK 6 als auch mit pIK 8 im kleinen Maßstab ein guter Umsatz erzielt werden, jedoch konnte diese Umsetzung trotz mehrmaliger Versuche nicht reproduziert werden und deshalb konnten hier keine Ausbeuten angegeben werden.



Biokatalysator	Methode	**13a**	**13b**	**13c**	**13d**	**13e**
Hefe	*growing cells*	62[20]	62[20]	74[20]	87[a] , 58[b]	90[a], 52[b]
E.coli (pIK6)	*growing cells*				78[a]	75[a], 68[b]
E.coli (pIK8)	*growing cells*				67[a]	83[a], 68[b]
E.coli (pIK6)	isoliertes Enzym	-	-	-	51[a]	76[a]
E.coli (pIK8)	isoliertes Enzym	-	-	-	66[a]	

Umsätze und Ausbeuten sind in [%] angegeben
„ – „ kein Umsatz zu dem gewünschten Produkt
a) Umsätze aus screening
b) isol. Ausbeute aus präp. Fermentation

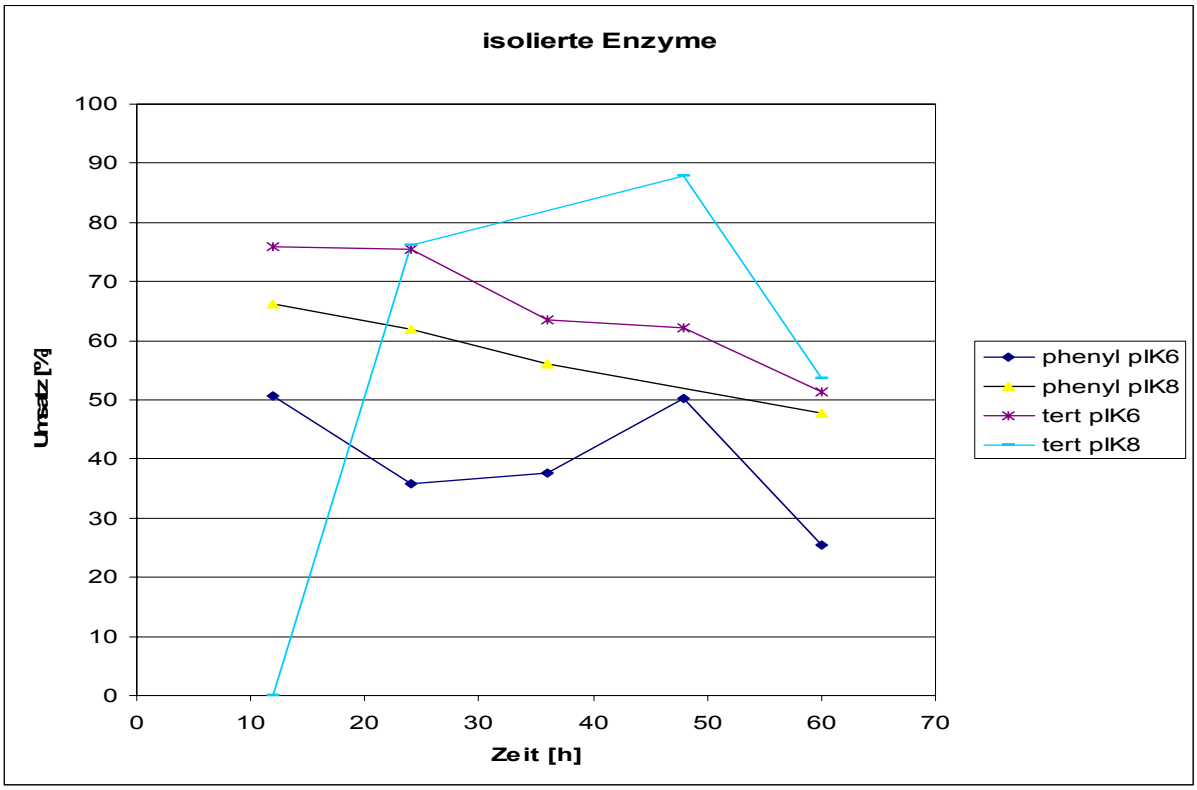
	growing cells						Isolierte Enzyme			
	Hefe		*E.coli* (pIK6)		*E.coli* (pIK8)		*E.coli* (pIK6)		*E.coli* (pIK8)	
	13d	**13e**	**13d**	**13e**	**13d**	**13e**	**13d**	**13e**	**13d**	**13e**
trans (3R,4R)	26, 38[12]	48, 43[35]	43	-	★	-	-	-	100	75
trans (3S,4S)	<5, 0[12]	- <1[35]	-	-		-	-	-	-	-
cis (3S,4R)	20, 14[12]	- 2[35]	-	50.5		50	44	63	-	-
cis (3R,4S)	53, 48[12]	52, 55[35]	57	49.5		50	56	37	-	25

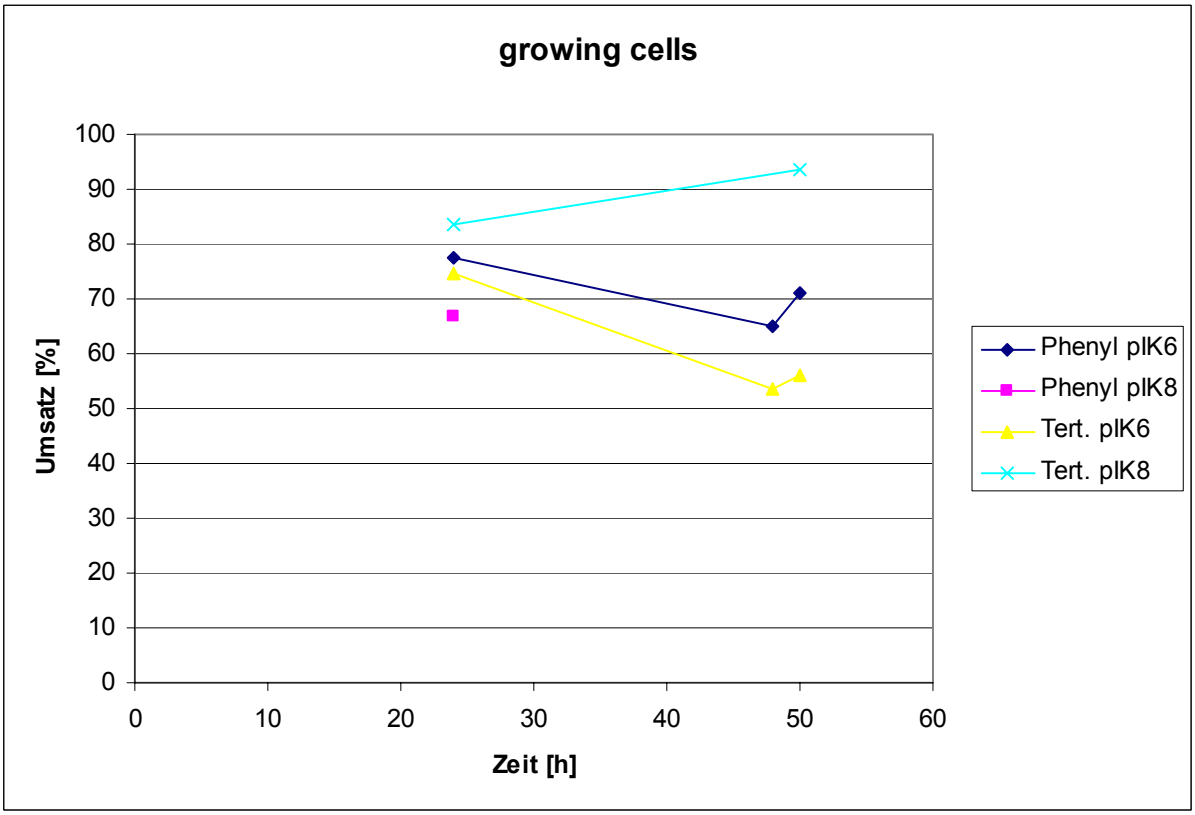
Umsätze sind in [%] angegeben
„★“ zu geringe Konz. für HPLC-Analyse

Die exakte Identität der Diastereomere konnte nicht bestimmt werden, da dies den Rahmen dieser Diplomarbeit sprengen würde. Es wurde versucht, anhand der Literatur[12,35] zuzuordnen. Die für die Hefereduktion in der Literatur[12,35] beschriebenen Ergebnisse konnten sehr gut reproduziert werden.

Allerdings kam es bei fortlaufender Reaktionszeit (ab 24h) zu einer kontinuierlich Zersetzung der Produkte. Bei den vorliegenden Daten handelt es sich um Parellelscreenings, wobei die Reproduzierbarkeit des Verfahrens nicht validiert wurde. Außerdem kam es durch die Kulturtemperatur zu ungleichmäßigen Lösungsmittelverlusten, wodurch die Reproduzierbarkeit noch zusätzlich beeinflusst wurde.

[35] Yang, Y.; Kayser, M.M.; Rochon, F.D.; Rodriguez, S.; Stewart, J.D. *J. Mol. Catal. B:Enzym*. **2005,** *32*, 167-174

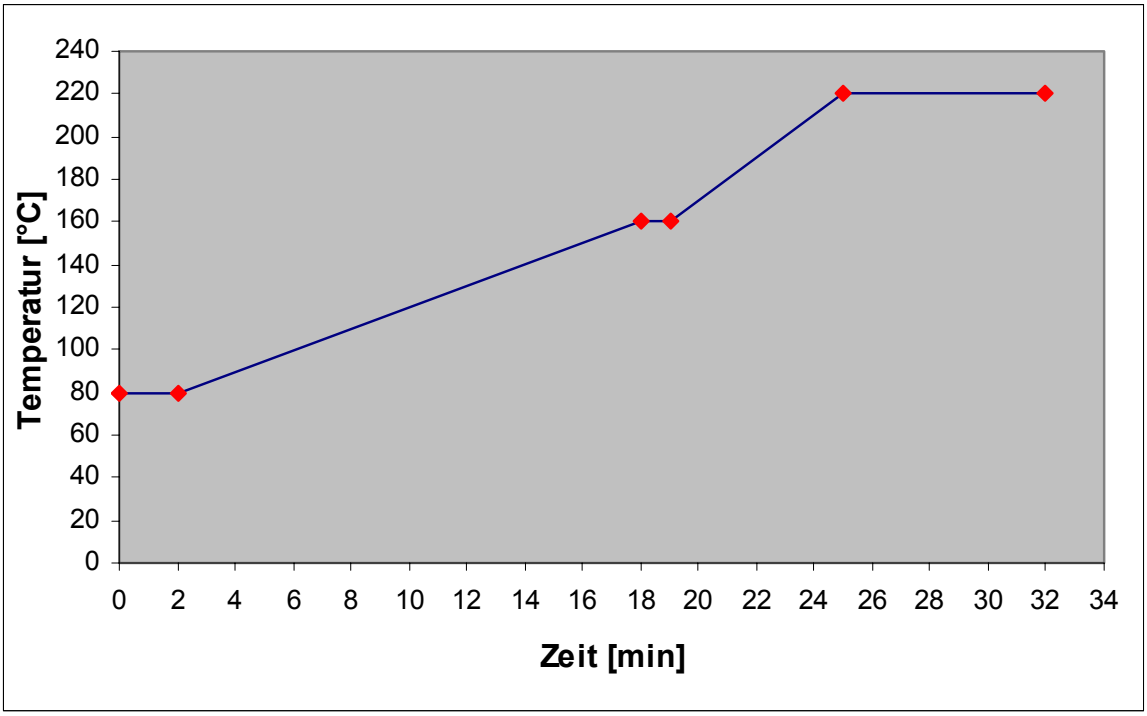

isolierte Enzyme
Umsatz [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Zeit [h]
phenyl pIK6
phenyl pIK8
tert pIK6
tert pIK8


growing cells
Umsatz [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
Zeit [h]
Phenyl pIK6
Phenyl pIK8
Tert. pIK6
Tert. pIK8

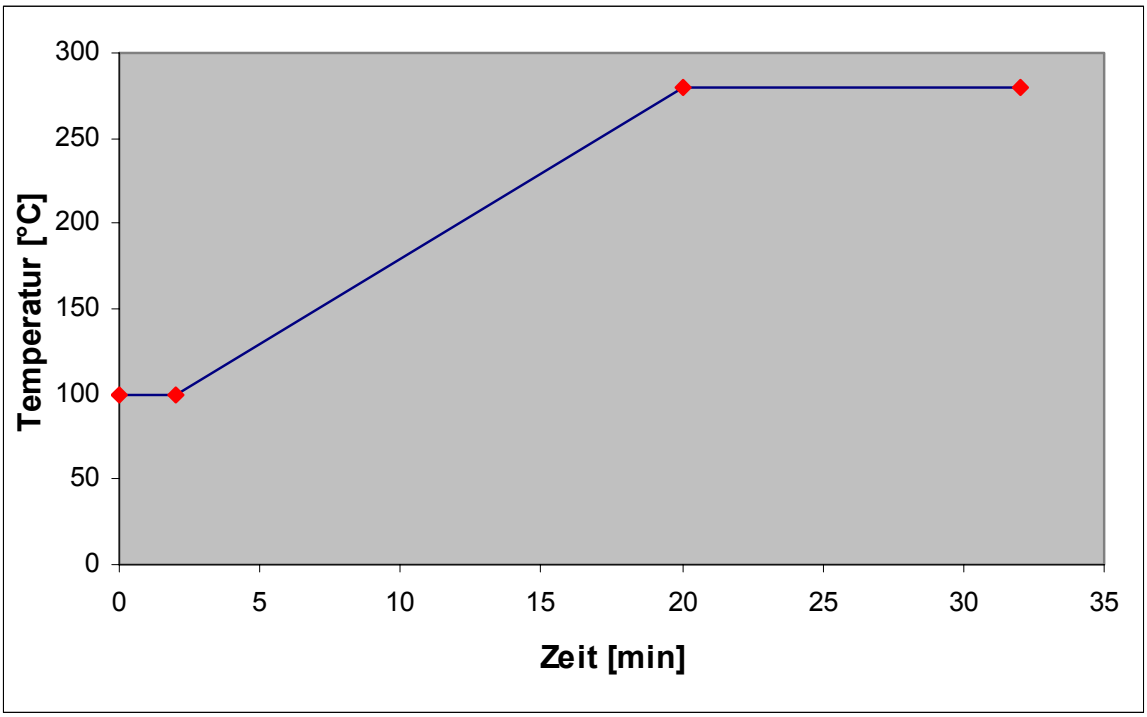
Experimenteller Teil

Allgemeines

Die bei dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel und Nährmedien wurden kommerziell erworben. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert. Alle säulenchromatischen Trennungen wurden mittels Silikagel 60 von Merck (40-63µm) durchgeführt.
Die verwendete Hefe wurde in einem Supermarkt eingekauft.
Die NMR-Spektren wurden mit $CDCl_3$ oder DMSO-d_6 Lösung auf einem Bruker AC 200 (200 MHz) aufgenommen, die chemischen Verschiebungen sind in ppm unter Verwendung von TMS als interner Standard angegeben.
Für die Biotransformation wurde Bioflow 110 Fermenter der Fa.Brunswick verwendet.
Alle GC-Messungen wurden auf einer Thermoquest Trace GC 2000 mit einer chiralen Säule BGB175 (30mx0.25mm ID, 0.25µm film) nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.



Die GC-MS Messungen wurden auf einer GC-MS Voyager 8000 Top nach folgendem Temperaturprogramm gemessen:



Die HPLC Messungen wurden auf einer Shimadzu LC-10AV mit einer Chiracel OD-H Säule und einem Laufmittel Hexan:i-Propanol 90:10 durchgeführt.

Bezeichnung für die Abkürzungen:

abs.	absolut
DMSO	Dimethylsulfoxid
Smp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
KRD	Kugelrohrdestillation
Lit.	Literaturstelle
PMP	p-Methoxyphenyl
THF	Tetrahydrofuran
PE	Petrolether
EE	Ethylacetat

Medien für die Biotransformation:

LB_{kan}-Medium

5.0 g Peptone
2.5 g Hefeextrakt
5.0 g NaCl
500 mL deion. H_2O
autoklaviert bei 121°C für 20 Minuten
1.5 mL Kanamyzin Stammlösung, bei etwa 40°C zugegeben

für das Plattenkulturnährmedium wurden zusätzlich 15g/l Agar zugegeben

5xM9-Salze

85.5g $Na_2HPO_4*12H_2O$
15.0g KH_2PO_4
2.5g NaCl
5 g NH_4Cl
1 L deoin. H_2O
autoklaviert bei 121°C für 20 Minuten

M9-Minimal Medium

200ml M9-Salze
1ml 1M $MgSO_4$-Lösung, autoklaviert bei 121°C für 20 Minuten
20ml 20% Glucoselösung
0,1ml 1M $CaCl_2$-Lösung, autoklaviert bei 121°C für 20 Minuten
750 ml deion.Wasser

Kanamyzin – Stammlösung
50mg/ mL in deion. Wasser, sterilisiert durch Filtration (0.2µm)

IPTG – Lösung
200mg/ mL in deion. Wasser, sterilisiert durch Filtration (0.2µm)

Glucose – Lösung
4g/l Glucose in deion. Wasser
autoklaviert bei 121°C für 20 Minuten

Medien für die Proteinreinigung

10xPBS-Puffer

NaCl	1.4M	41g
KCl	27mM	1g
Na_2HPO_4	101mM	9g
KH_2PO_4	18mM	1.2g
		auf 450ml H_2O

pH mit HCl auf 7.3 stellen auf 500ml auffüllen und bei 121°C 20 min autoklaviert, bei 4°C lagern

1xPBS/Triton-Puffer
10x PBS-Puffer mit dest. Wasser verdünnen und Zugabe von 1% Triton-X-100, bei 121°C 20 min autoklaviert, bei 4°C lagern

Äquilibrierungsbuffer
10ml 1xPBS/Triton-Puffer + je 10µl Proteasehemmer

Proteasehemmer (Aufbewahrung –20°C)

1000×Pepstatin A / 1 ml

Pepstatin A	1 mM	
96 % EtOH		Auf 1 ml

1000×Leupeptin / 1 ml

Leupeptin	2 mM	
Steriles Merckwasser		Auf 1 ml

1000×PMSF / 1ml

PMSF	10 mM	
96 % EtOH		Auf 1 ml

50mM Tris·HCl/ 100ml

Trisbase	50mM	0.608g
H_2O		auf 80 ml

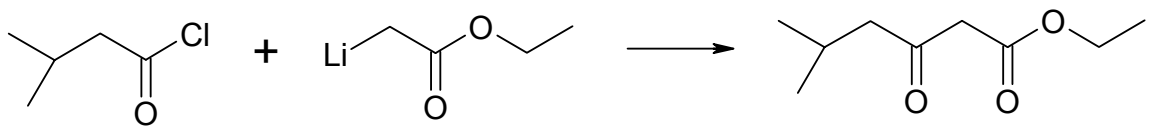
pH auf 8 Stellen, auf 100ml auffüllen und bei 121°C 20 min autoklaviert

Elutionsbuffer
0.056g Gluthation (reduziert),
+10ml 50mM Tris·HCl
+je 10µl Proteasehemmer

AV I: Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der β-Ketoester

Unter Stickstoffatmosphäre wurde Diisopropylamin (2 Äquivalente) in abs. THF bei -20°C vorgelegt und Butyllithium (2 Äquivalente, 2.5 M in Hexan) langsam zugetropft. Nach 10min rühren wurde bei -80°C abs. EE (1 Äquivalent) zugetropft und 15 min gerührt. Der jeweilige β-Ketoester (5% Lösung des Ketons in wenig THF) wurde anschließend zugetropft und die Reaktionslösung 2 Stunden bei -80°C gerührt. Danach wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (7ml) hydrolysiert und auf Raumtemperatur erwärmt. Diese Lösung wurde auf 2N HCl gegossen und 3 Mal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit.

5-Methyl-3-oxo-hexansäureethylester (2c)



2c

Diisopropylamin (24.1ml, 172mmol), Butyllithium (70.1 ml, 172mmol, 2.424M), Ethylacetat (8.4ml, 86mmol) und Isovaleriansäurechlorid (10.00g, 86mmol) wurden nach AV I umgesetzt.
Das erhaltene Produkt wurde zur Reinigung destilliert.

Sdp: 95-105°C / 11mbar (Lit.[36]: 102-104°C / 19torr)

Ausbeute: 9.23g (61%, Lit.[15]: 85%) orange Flüssigkeit

$C_9H_{16}O_3$ (172.22)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Ketoform

δ 0.92 (d, J=7 Hz, 6H, $CH_{3,iso\text{-}propyl}$), 1.27 (t, J=7 Hz, 3H, CH_3), 1.95-2.19 (m, 1H, -CH-), 2.40 (d, J=7 Hz, 2H, CH-$\underline{CH_2}$-CO), 3.40 (s, 2H, CO-CH_2-CO), 4.18 (q, J=7.2 Hz, 2H, -OCH_2-)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Enolform

δ 0.92 (d, J=7Hz, 6H, $CH_{3,iso\text{-}propyl}$), 1.27 (t, J=7 Hz, 3H, CH_3), 1.95-2.19 (m, 1H, -CH-), 2.40 (d, J=7 Hz, 2H, CH-$\underline{CH_2}$-CO), 4.18 (q, J=7 Hz, 2H, -OCH_2-), 4.88 (s, 1H, =CH-), 12.01 (s, 1H, -OH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): Ketoform

δ 14.0 (q, -CH_3), 22.3 (q, -CH_2-($\underline{CH_3}$)$_2$), 24.2(d, C5), 49.5 (t, C4), 51.7 (t, C2), 61.1 (t, -O-CH_2-), 167.1 (s, C1), 202.3 (s, C3)

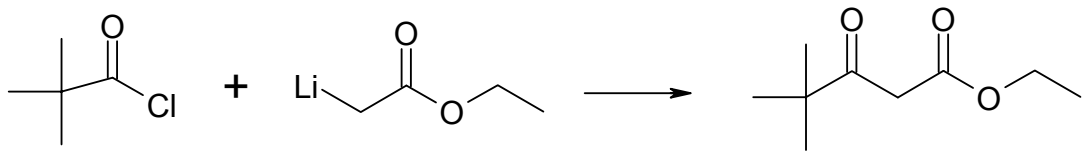
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): Enolform

δ 14.1 (q, -CH_3), 22.2 (q, -CH_2-($\underline{CH_3}$)$_2$), 26.1 (d, C5), 44.2 (t, C4), 59.7 (t, -O-CH_2-), 89.9 (d, C2), 172.6 (d, C1), 177.9 (s, C3)

---

[36] Boudon, K.; Bright, A.C. *J. Org. Res*. **1992**, 524-539

4,4-Dimethyl-pentansäureethylester (2d)



2d

Diisopropylamin (25.2ml, 180mmol), Butyllithium (76.05ml, 180mmol, 2.367 M), Ethylacetate (7.9ml, 90mmol) und Pivalinsäurechlorid (10.00g, 90mmol) wurden nach AV I umgesetzt.
Das erhaltene Produkt wurde zur Reinigung destilliert.

Sdp: 92-96°C / 11mbar (Lit.[37]: 85-89°C / 15torr)

Ausbeute: 10.23g (68%, Lit.[26]: 65%) gelbliche Flüssigkeit

$C_9H_{16}O_3$ (172.22)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Ketoform
δ 1.16 (s, 9H, $CH_{3\ tert.\ butyl}$), 1.26 (t, J=7 Hz, 3H, CH_3), 3.53 (s, 2H, $-CH_2-$) 4.18 (q, J=7 Hz, 3H, $-CH_2-CH_3$)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Enolform
δ 1.16 (s, 9H, $CH_{3\ tert.\ butyl}$), 1.26 (t, J=7 Hz, 2H, CH_3), 4.18 (q, J=7 Hz 3H, $-CH_2-CH_3$), 5.03 (s, 1H, =CH-), 12.33 (s, 1H, -OH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): Ketoform
δ 14.0 (q, $-CH_3$), 26.0 (q, tert.-Butyl), 43.8(t, C2), 44.6(s, C4), 61.0(t, $-\underline{CH_2}-CH_3$), 167.6 (s, C1), 207.9 (s, C3)

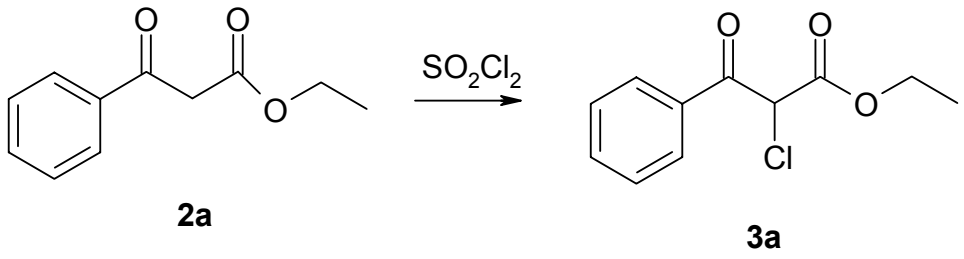
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): Enolform
δ 14.0 (q, $-CH_3$), 26.0 (q, tert.-Butyl), 44.6(s, C4), 61.0(t, $-\underline{CH_2}-CH_3$), 85.4 (d, C2),185.8 (s, C1), 207.9 (s, C3)

[37] Harbuck, J.W.; Rapoport, H. *J. Org. Chem*. **1971**, *36*, 853-855

AV II: Allgemeine Vorschrift zur Chlorierung:

In abs. Benzol wurden die jeweiligen Ester (1 Äquivalent, 5-10% Lösung) bei 5° vorgelegt und langsam Sulfurylchlorid (0.95 - 1 Äquivalente) zugetropft. Danach wurde 24h bei Raumtemperatur gerührt, Wasser zugegeben und mit Methylenchlorid extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde entfernt.

2-Chlor-3-oxo-3-phenyl-propionsäureethylester (3a)



In abs. Benzol (70ml) wurden der Ester **2a** (10g, 52.1mmol) und Sulfurylchlorid (7.03 g, 52.1mmol) nach AV II zu Produkt **3a** umgesetzt.
Das ölige Produkt war laut NMR und GC ohne weiteren Reinigungsschritt hinreichend sauber für weitere Umsetzungen.

Ausbeute: 11.23g (81%, Lit.[14]: 77%) oranges Öl

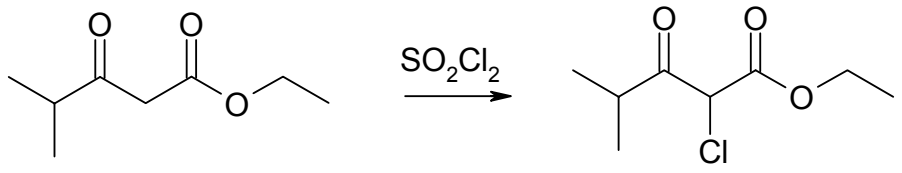
$C_{11}H_{11}O_3Cl$ 226.66g

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 1.17 (t, J=7Hz, 2H, CH_3), 4.19 (q, J=7Hz, 3H, CH_2), 5.53 (s, 1H, -CHCl-), 7.42-7.65 (m, 3H, ArH), 7.91 (d, J=7Hz, 2H, H2'/H6')

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 13.8 (q, -CH_3), 57.9 (d, -CHCl-), 63.1 (t, -O-CH_2-), 128.8 (d, C3'/C5'), 129.2 (d, C2'/C6'), 133.4 (s, C1'), 134.3 (d, C4'), 165.2 (s, -COOEt), 188.2 (s, -CO-)

Retentionszeit: 22.85min

2 Chlor-4-ethyl-3-oxo-pentansäureethylester (3b)



2b **3b**

In abs. Benzol (70ml) wurden der Ester **2b** (2g, 12.7mmol) und Sulfurylchlorid (1.71g, 12.7mmol) nach AVII zu Produkt **3b** umgesetzt.
Das ölige Produkt wurde zur Reinigung destilliert.

Sdp: 104°-106°C / 11mbar (Lit.[38]: 106-108°C / 15torr)

Ausbeute: 1.40g (58%) orange Flüssigkeit

$C_8H_{13}O_3Cl$ (192.64g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.25 (d, J=7Hz, 6H,-$(CH_3)_2$,), 1.35 (t, J=7Hz, 3H, -CH_3), 3.26 (sept, J=7Hz, -CH-), 4.35 (q, J=7Hz, -O-CH_2-), 4.86 (s, -CHCl-)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

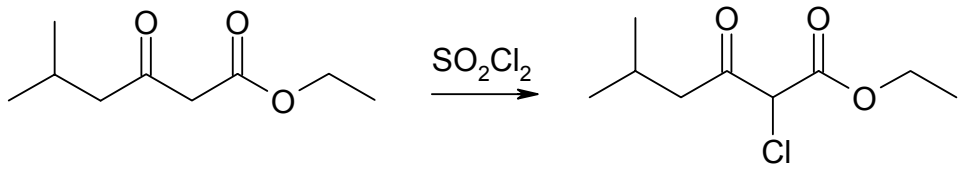
δ 13.7 (q, -CH_3), 20.8 (q, -$(CH_3)_2$), 35.7 (d, C4), 55.9 (d, C2), 63.1 (t, -OCH_2-), 163.4 (s, -COOEt), 195.9 (s, C3)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): mehrfach chloriert

δ 13.8 (q, -CH_3), 29.0/29.6 (q, -$(CH_3)_2$), 55.9 (d, C2), 63.1 (t, -OCH_2-), 70.7 (s,C4), 163.4 (s, -COOEt), 195.9 (s, C3)

[38] Bankowska, Z.; Zadrozna, I. *J. Rocs. Chem*. **1971**, *45*, 1849-1860

2-Chloro-5-methyl-3-oxo-hexansäureethylester (3c)



2c **3c**

In 70ml abs. Benzol wurden der Ester **2c** (2.00g, 11.6mmol) und Sulfurylchlorid (1.5g, 11.05mmol) nach AVII zu Produkt **3c** umgesetzt.
Das ölige Produkt wurde sehr sauber erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet.

Ausbeute: 2.10g (92%) oranges Öl

$C_8H_{15}O_3Cl$ (206.67g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Ketoform

δ 0.86 (d, J=7Hz, 6H, $CH_{3,\ iso\text{-}propyl}$), 1.24 (t, J=7Hz, 3H, $-CH_3$), 2.18 (m, 1H, $-CH-(CH_3)_2$), 2.56 (d, J=4Hz, 1H, $-CH_2-$), 4.28 (q, J=7Hz, 2H, $-O-CH_2-$), 4.75 (s, 1H, -CHCl-),

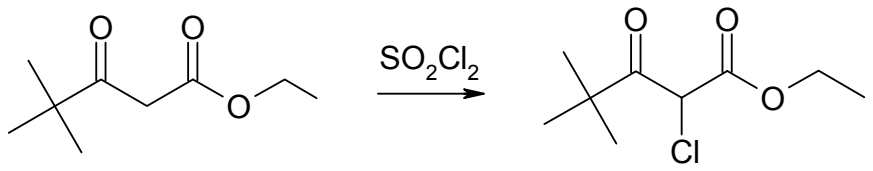
^{1}H-NMR ($CDCl_3$): Enolform

δ 0.89 (d, J=7Hz, 6H, $CH_{3,\ iso\text{-}propyl}$), 1.24 (t, J=7Hz, 3H, $-CH_3$), 2.18 (m, 1H, $-CH-(CH_3)_2$), 4.3 (q, J=7Hz, 2H, $-O-CH_2-$), 4.75 (s, 1H, -CHCl-), 5.26 (d, J= 3Hz, 1H, -CH=), 12.43 (s, 1H, -OH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 13.9 (q, $-O-CH_2-\underline{CH_3}$), 22.1 (q, C6), 22.2 (q, $-CH_3$), 24.3 (d, C5), 47.6 (t, C4), 61.1 (d, C2), 63.0 (t, $-O-\underline{CH_2}-CH_3$), 164.9 (s, C1), 198.2 (s, C3)

Pentansäure-2-chloro-4,4-dimethyl-3-oxo-ethylester (3d)



2d **3d**

In 70ml abs. Benzol wurden der Ester **2d** (3g, 17.4mmol) und Sulfurylchlorid (2.35g, 17.4mmol) nach AVII zu Produkt **3d** umgesetzt.
Das ölige Produkt konnte direkt für die weitere Reaktion verwendet werden.

Ausbeute: 3.26g (91%) oranges Öl

$C_8H_{15}O_3Cl$ (206.67g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.19 (s, 9H, $CH_{3\ tert.\ butyl}$), 1.29 (t, J=7Hz, 3H, CH_3), 4.19 (q, J=7Hz, 2H, -$\underline{CH_2}$ -CH_3), 5.15 (s, 1H, CH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

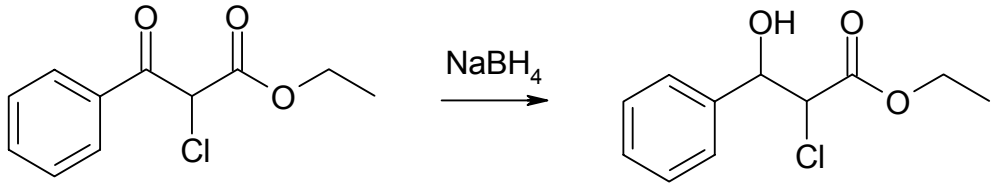
δ 13.8 (q, -CH_3), 26.3 (q, tert.-Butyl), 45.1 (s, C4), 54.5 (d, C2), 62.9 (t, -CH_2-CH_3), 165.1 (s, C1), 203.7 (s, C3)

Retentionszeit: 14.57min

AV III: Allgemeine Vorschrift zur chemischen Reduktion

Die jeweiligen Ketone (1 Äquivalent, 10% Lösung) wurden in abs. Ethanol auf 5°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Natriumborhydrid (1 Äquivalent) langsam zugegeben und drei Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurde das gleiche Volumen 2N HCl zugegeben und weitere 10min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ether extrahiert, mit ges. Natriumhydrogencarbonat gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde abdestilliert. Die Produkte wurden säulenchromatographisch gereinigt.

2-Chloro-3-hydroxy-3-phenyl-propionsäureethylester (4a)



3a **4a**

Ethanol (30ml) und 2-Chlor-3-oxo-3phenyl-propionsäureethylester **3a** (0.5g, 2.21mmol) wurden nach AV IV zum gewünschten Produkt **4a** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 1:40, PE:EE 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.27g (61%, Lit.[39]: 81%) oranges Öl

syn:anti = 50:1

$C_{11}H_{13}O_3Cl$ (228.67g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *syn*

δ 1.15 (t, J=7Hz, 3H, -CH_3), 4.14 (q, J=7Hz, 2H, -O-CH_2-), 4.47 (d, J=6Hz, 1H, -CHCl), 5.12 (d, J=6Hz, 1H, -CHOH), 7.33-7.41 (m, 5H, ArH)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *anti*

δ 1.15 (t, J=7Hz, 3H, -CH_3), 3.72 (q, J=7Hz, 2H, -O-CH_2-), 4.27 (d, J=6Hz, 1H, -CHCl), 4.99 (d, J=6Hz, 1H, -CHOH), 7.33-7.41 (m, 5H, ArH)

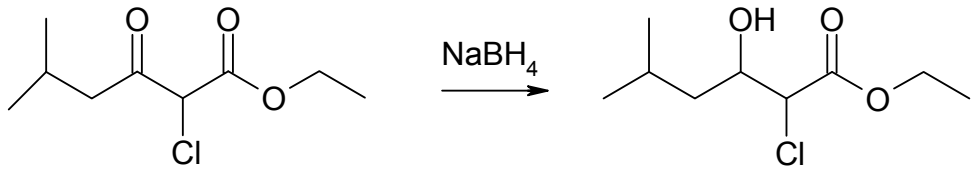
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *anti*

δ 13.8 (q, -CH_3), 62.2 (t, -OCH_2-), 63.0 (d, C-α), 74.6 (d, C-β), 126.7 (d, ArC), 128.5 (d, ArC), 128.7 (d, ArC), 138.2 (s, C1), 167.9 (s, -COOEt)

Retentionszeit: 23.20/23.22min (*syn*), 23.53/23.56min (*anti*)

[39] Mukalyama, T.; Murakami, M. *Chem. Lett.* **1981**, *8*, 1129-1132

2-Chloro-3-hydroxy-5-methyl-hexansäureethylester (4c)



3c **4c**

Ethanol (20 ml) und 2-Chlor-3-oxo-5-methyl-hexansäureethylester **3c** (0.2g, 0.96mmol) wurden nach AV IV zu Produkt **4c** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 1:80, PE:EE 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 74mg (37%) oranges Öl

$C_8H_{15}O_3Cl$ (194.67g)

syn:anti = 100:1

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

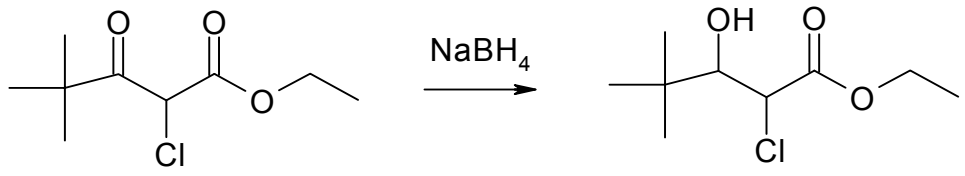
δ 0.81-0.96 (m, 6H, $-(CH_3)_2$), 1.08-1.96 (m, 6H, $-CH_3$, $-CH_2-$, -CH-), 3.95-4.33 (m, 4H, $-OCH_2-$, -CHCl-, -CHOH-)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 13.9 (q, $-CH_3$), 21.8 (q, $-(CH_3)_2$), 23.2 (q, $-(CH_3)_2$), 24.5 (d, C5), 42.5 (t, C4), 62.3 (t, $-OCH_2-$), 62.4 (d, C2), 70.1 (d, C3), 168.8 (s, C1)

Retentionszeit: 18.69/18.78min (*syn*), 20.77/20.85min (*anti*)

2-Chloro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäureethyl ester (4d)



3d **4d**

Ethanol (30ml) und 2-Chlor-3-oxo-4,4-dimethylpentansäureethylester **3d** (0.5g, 2.41mmol) wurden nach AV IV zu Produkt **4d** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (SiO_2 10g, PE:EE 10:1) gereinigt.

Smp: 96-99°C

Ausbeute: 139mg (29%) farbloser Feststoff

syn:anti = 1:32

$C_{10}H_{17}O_3Cl$ (208.67g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *syn*

δ 0.95 (s, 9H, -$(CH_3)_3$), 1.25 (t, J=7Hz, 3H, -CH_3), 3.72 (d. J=4Hz, 1H, -CHCl), 4.19 (q, J=7Hz, 2H, -O-CH_2-), 4.4 (d, J=4Hz, 1H, -CHOH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *syn*

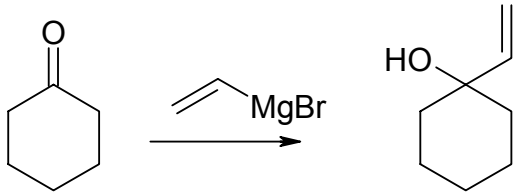
δ 13.9 (q, -CH_3), 26.4 (q, -$(CH_3)_3$), 35.5 (s, C4), 59.6 (d, C2), 62.3 (t, -OCH_2-), 77.5 (d, C3), 169.3 (s, C1)

Retentionszeit: 14.05/14.13min (*anti*), 14.25/14.34min (*syn*)

AV IV: Allgemeine Vorschrift zur Grignardaddition

1.3 Äquivalente Vinylmagnesiumbromid (1M in THF) wurden in abs. Ether gelöst und auf –10°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde nun ein Äquivalent Keton (5-10%ige Lösung des Ketons) zugegeben, so dass die Temperatur -5°C nicht überschritt. Nun wurde während 2-3 Stunden bei -10°C gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt.
Diese Reaktionslösung wurde auf 10%ige NH_4Cl Lösung/Eis gegossen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

1-Ethenylcyclohexanol (6a)



6a

Cyclohexanon (11.0g, 112.2mmol) und Vinylmagnesiumbromid (112.3ml, 112.3mmol, 1N Lösung in THF) wurden nach AV IV zum gewünschten Produkt **6a** umgesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde zur Reinigung destilliert.

Sdp: 69°C / 16 mbar (Lit.[40]: 77-80°C / 33mbar; Lit.[20]:71°C / 16mbar)

Ausbeute: 9.33g (66%, Lit.[20]: 76%) farblose Flüssigkeit

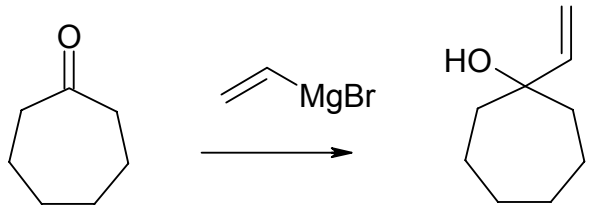
$C_8H_{14}O$ (126.19)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 1.35–1.75 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 4.97 (dd, 1H, $=CH_2$, J_1=13Hz, J_2=1Hz), 5.16 (dd, J_1=16Hz, J_2=~1Hz, 1H, $=CH_2$), 5.92 (dd, J_1=16Hz, J_2=12.7Hz, 1H, =CH-)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 21.9 (t, C3), 25.5 (t, C4), 37.5 (t, C2), 71.7 (s, C1), 111.4 (t, $=CH_2$), 146.0 (d, =CH-)

[40] Chaco, M. C.; Iyer, B.H. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 186-190

1-Ethenylcycloheptanol (6b)



6b

Vinylmagnesiumbromid (116ml, 116mmol, 1M in THF) und Cycloheptanon (10.0g, 89.2mmol) wurden nach AV IV zu Produkt **6b** umgesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde destillativ gereinigt.

Sdp: 86-92°C / 12 mbar (Lit.[24]: 89-90°C / 20mbar; Lit.[20]: 125-130°C / 20mbar KRD)

Ausbeute: 11.2g (75%, Lit.[20]: 86%) farblose Flüssigkeit

$C_9H_{18}O$ (140.20)

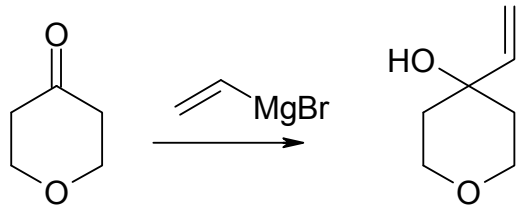
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.32–2.10 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 5.00 (dd, J_1=9Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 5.20 (dd, J_1=16Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 6.02 (dd, J_1=16Hz, J_2=9Hz, 1H, =CH-)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 22.1 (t, C3), 29.5 (t, C4), 41.1 (t, C2), 75.6 (s, C1), 110.1 (t, =CH_2), 146.6 (d, =CH-)

4-Ethenyl-tetrahydropyran-4-ol (6c)



6c

Tetrahydropyran-4-on (5.00g, 50mmol) und Vinylmagnesiumbromid (68.5ml, 68.5mmol, 1N in THF) wurden nach AV IV zum gewünschten Produkt **6c** umgesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt konnte ohne weitere Reinigung weiterverwendet werden.

Ausbeute: 4.40g (69%, Lit.[20]: 69%) farblose Flüssigkeit

$C_7H_{12}O_2$ (128.17)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.40–1.58 (m, 2H, H3/5), 1.70 – 1.90 (m, 2H,H3/5), 2.19 (bs, 1H, OH), 3.58–3.90 (m, 4H, H2/6), 5.10 (dd, J_1=12.7Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 5.26 (dd, J_1=16Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 5.99 (dd, J_1=16Hz, J_2=12.7Hz, 1H, =CH-)

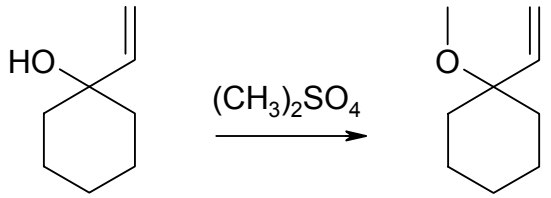
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 37.3 (t, C3), 63.5 (t, C2), 68.9 (s, C4), 112.2 (t, =CH_2), 145.0 (d, =CH-)

AV V: Allgemeine Vorschrift zur Methylierung

In abs. THF wurden zu 3 Äquivalenten Natriumhydrid (5%igen Suspension) 1 Äquivalent Ethenylalkohol **6** (in etwas abs. THF) zugegeben. Anschließend wurde 2 Stunden auf 70 °C erhitzt.
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 1 Äquivalent Dimethylsulfat (unter Gasentwicklung und Schäumen) langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Rückfluss erhitzt und über Nacht unter Rückfluss gerührt.
Die abgekühlte Reaktionsmischung wurde auf gekühlte ges. NH_4Cl Lösung gegossen und die wässrige Phase mit Ether extrahiert.
Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

1-Ethenyl-1-methoxycyclohexan (7a)



6a **7a**

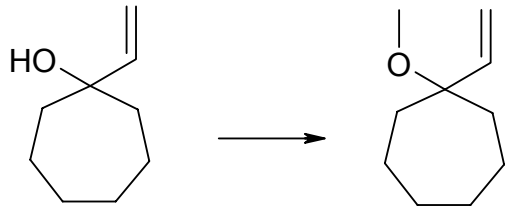
Natriumhydrid (3.87g, 161mmol), 1-Ethenylcyclohexanol (6.70g, 53.1mmol) und Dimethylsulfat (6.80g, 53.1 mmol) wurden nach AV V zu Produkt **7a** umgesetzt.
Das Rohprodukt wurde sauber ohne weitere Reinigungsschritte erhalten.

Ausbeute: 6.78g (91%, Lit.[20]: 81%) farblose Flüssigkeit

$C_9H_{16}O$ (140.22)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 1.10–1.82 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.11 (s, 3H, OCH_3), 5.01-5.23 (m, 2H, $=CH_2$), 5.71 (dd, J_1=16Hz, J_2=12.7Hz, 1H, =CH-)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 21.7 (t, C3), 25.7 (t, C4), 33.8 (t, C2), 49.2 (q, OCH_3), 75.6 (s, C1), 114.7 (t, $=CH_2$), 142.8 (d, =CH-)

1-Ethenyl-1-methoxycycloheptan (7b)



6b **7b**

Natriumhydrid (2.76g, 1138mmol), 1-Ethenylcycloheptanol (6.4g, 45.7mmol) und Dimethylsulfat (5.76g, 45.7 mmol) wurden nach AV V zu Produkt **7b** umgesetzt.
Das so erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 6.58 g (93%, Lit.[20]: 87%) farblose Flüssigkeit

$C_{10}H_{16}O$ (154.25)

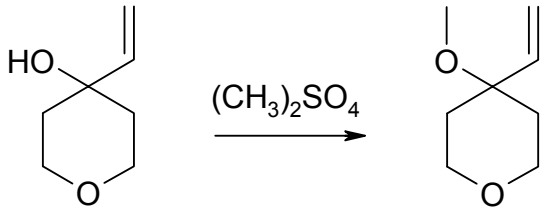
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.30–1.90 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 3.12 (s, 3H, OCH_3), 5.05 – 5.20 (m, 2H, $=CH_2$), 5.72 (dd, J_1=16 Hz, J_2=9Hz, 1H, =CH-)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 21.6 (t, C3), 29.5 (t, C4), 36.8 (t, C2), 49.8 (q, OCH_3), 80.0 (s, C1), 113.8 (t, $=CH_2$), 143.60 (d, =CH-)

4-Ethenyl-4-methoxytetrahydropyran (7c)



6c **7c**

Natriumhydrid (1.73g, 72.08mmol), Alkohol **6c** (2.3g, 18.2mmol) und Dimethylsulfat (2.27g, 18.2 mmol) wurden nach AV V zu Produkt **7c** umgesetzt. Das Produkt konnte ohne weitere Reinigung weiterverwendet werden.

Ausbeute: 2.24g (86%, Lit.[20]: 76%) farblose Flüssigkeit

$C_8H_{14}O_2$ (142.20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.70 (t, J=6Hz, 4H, H3/5), 3.11 (s, 3H, OCH_3), 3.58 – 3.81 (m, 4H, H2/6), 5.16 (dd, J_1=9Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 5.22 (dd, J_1=16Hz, J_2=~1Hz, 1H, =CH_2), 5.69 (dd, J_1=16Hz, J_2=9Hz, 1H, =CH-)

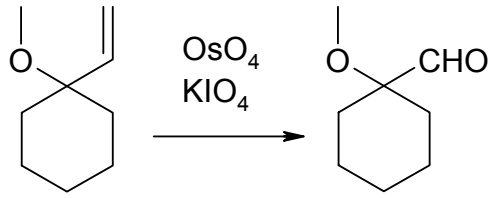
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 33.9 (t, C3), 49.4 (q, OCH_3), 63.5 (t, C2), 73,3 (s, C4), 115.7 (t, =CH_2), 141.4 (d, -CH=)

AV VI: Allgemeine Vorschrift zur Alkenspaltung

Zu einer 5%igen Lösung der Edukte **7** (1 Äquivalent) in THF:Wasser = 3:1 wurden eine Spartelspitze Osmiumtetroxid zugegeben. Anschließend wurde über 4 Stunden Kaliummetaperiodat portionsweise bei Raumtemperatur zugegeben. Über Nacht wurde das Gemisch gerührt, dann mit Wasser versetzt und anschließend mit Ether extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

1-Methoxycyclohexancarbaldehyd (8a)



7a **8a**

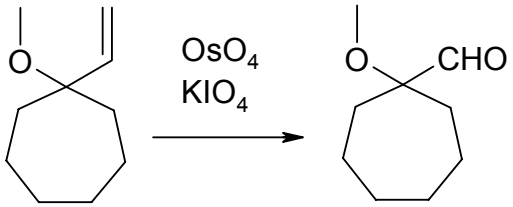
In 12ml THF und 4ml Wasser wurden **7a** (0.5g, 3.6mmol), Osmiumtetroxid (Spartelspitze) und Kaliummetaperiodat (1.54g, 7.2mmol) nach AV VI zu Produkt **8a** umgesetzt. Das Produkt wies laut NMR ein paar Verunreinigungen auf, da der Aldehyd jedoch leicht flüchtig ist, wurde auf eine Reinigung verzichtet.

Ausbeute: 0.46g (89%, Lit.[20]: 33%) farblose Flüssigkeit

$C_8H_{14}O_2$ (142.20)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 1.18 – 1.80 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 9.51 (s, 1H, CHO)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 20.9 (t, C3), 25.1 (t, C4), 28.5 (t, C2), 51.7 (q, OCH_3), 81.0 (s, C1), 204.9 (d, CHO)

1-Methoxycycloheptancarbaldehyd (8b)



7b **8b**

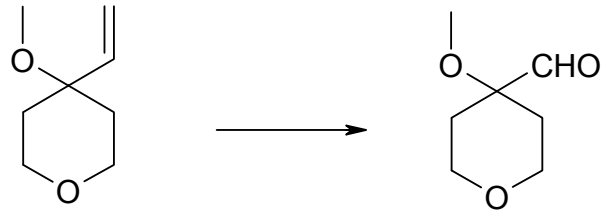
In 54ml THF und 18ml Wasser wurden **7b** (6.30g, 40.8mmol), Osmiumtetroxid (Spartelspitze) und Kaliummetaperiodat (17.55g, 81.5mmol) nach AV VI zu Produkt **8b** umgesetzt. Das Produkt wies laut NMR ein paar Verunreinigungen auf, da der Aldehyd jedoch leicht flüchtig ist, wurde auf eine Reinigung verzichtet.

Ausbeute: 6.30g (96%, Lit.[20]: 56%) farblose Flüssigkeit

$C_9H_{18}O_2$ (156.23)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 1.40 – 1.85 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 9.50 (s, 1H, CHO)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 21.5 (t, C3), 29.6 (t, C4), 31.3 (t, C2), 52.0 (q, OCH_3), 84.9 (s, C1), 204.5 (d, CHO)

4-Methoxy-tetrahydropyran-4-carbaldehyd (8c)



7c **8c**

In 30ml THF und 10ml Wasser wurden **7c** (1.10g, 7.74mmol), Osmiumtetroxid (Spartelspitze) und Kaliummetaperiodat (3.31g, 15.48mmol) nach AV VI zu Produkt **8c**[41] umgesetzt. Das Produkt wies laut NMR ein paar Verunreinigungen auf, da der Aldehyd jedoch leicht flüchtig ist, wurde auf eine Reinigung verzichtet.

Ausbeute: 0.80g (72%, Lit.[20]: 95%) farblose Flüssigkeit

$C_7H_{12}O_3$ (144.17)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.63 (m, 4H, H3/5), 3.31 (s, 3H, OCH_3), 3.66 – 3.81 (m, 4H, H2/6), 9.53 (s, 1H, CHO)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

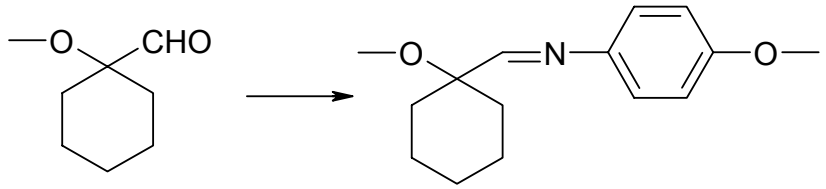
δ 28.8 (t, C3), 51.9 (q, OCH_3), 62.9 (t, C2), 78.7 (s, C4), 203.2 (d, CHO)

[41] Geoffrey, T.; Bird, C.; Olivier, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 515-520

AV VII: Allgemeine Vorschrift zur Iminsynthese

In absolutem Methylenchlorid wurde zu einer 5%igen Lösung des jeweiligen Aldehyds (**8a-c**) 0.8-0.9 Äquivalent p-Anisidin, 4 Äquivalente Natriumsulfat und etwas Molekularsieb (3Å) zugegeben. Dieses Gemisch wurde nun bei Raumtemperatur 66-90 Stunden gerührt, anschließend über Hyflo filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert.

N-(1-Methoxy-cyclohexylmethylen)-4-methoxyanilin (9a)



8a **9a**

In 170 ml abs. CH_2Cl_2 wurden Aldehyd **8a** (8.65g, 60.8mmol), p-Anisidin (5.9g, 48.64mmol) und Natriumsulfat (34.6g, 243.4mmol) nach AV VII zu Produkt **9a** umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zur Reinigung kugelrohrdestilliert.

Sdp: 150- 170°C / 0.2mbar KRD (Lit.[20] : 140-150°C / 0.2mbar)

Ausbeute: 7.40g (49%, Lit.[20]: 69%) gelbliche Flüssigkeit

$C_{15}H_{21}NO_2$ (247.34)

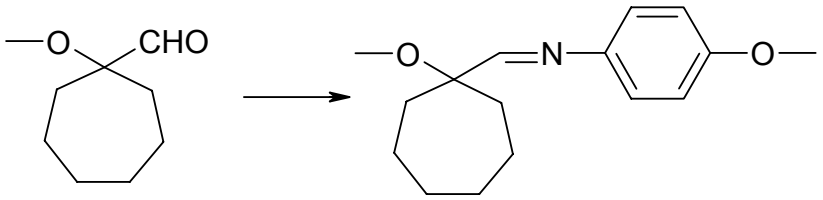
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.20–2.00 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 6.90 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.04 (d, J=6Hz, 2H, H3/5), 7.70 (s, 1H, CH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 21.6 (t, C3), 25.6 (t, C4), 31.8 (t, C2), 50.6 (q, OCH_3), 55.5 (q, $OCH_{3,PMP}$), 77.5 (s, C1), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 121.9 (d, $C3/5_{PMP}$), 144.5 (s, $C1_{PMP}$), 158.1 (s, $C4_{PMP}$), 167.6 (d, -CH=N)

N-(1-Methoxy-cycloheptylmethylen)-4-methoxyanilin (9b)



8b **9b**

In 200 ml abs. CH_2Cl_2 wurden Aldehyd **8b** (10.25g, 65.6mmol), p-Anisidin (6.50g, 52.5mmol) und Natriumsulfat (37.26g, 262.4mmol) nach AV VII zu Produkt **9b** umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zur Reinigung kugelrohrdestilliert.

Sdp: 150- 160°C / 0.2mbar KRD

Ausbeute: 9.60g (56%, Lit.[20]: 81%) gelbliche Flüssigkeit

$C_{16}H_{23}NO_2$ (261.36)

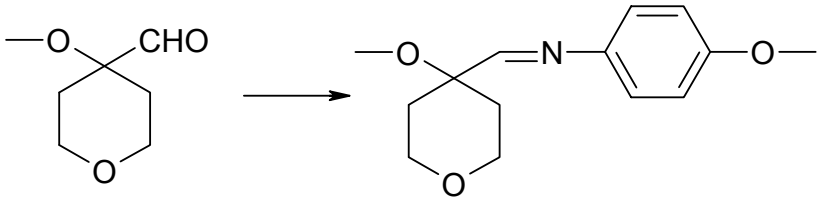
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.40 – 1.82 (m, 8H, $(CH_2)_4$), 1.89 – 2.00 (m, 4H, H2/7), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.07 (d, J=6Hz, 2H, H3/5), 7.72 (s, 1H, CH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 21.4 (t, C3), 29.5 (t, C4), 34.4 (t, C2), 51.0 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 81.5 (s, C1), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 121.8 (d, $C3/5_{PMP}$), 144.5 (s, $C1_{PMP}$), 158.0 (s, $C4_{PMP}$), 167.7 (d, -CH=N)

4-Methoxy-N-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-ylmethylen)-anilin (9c)



8c **9c**

In 25 ml abs. CH_2Cl_2 wurden Aldehyd **8c** (1.00g, 6.9mmol), p-Anisidin (0.85g, 6.9mmol) und Natriumsulfat (3.94g, 27.7mmol) nach AV VII zu Produkt **9c** umgesetzt.
Das erhaltene Produkt konnte ohne zusätzliche Reinigung weiter verwendet werden.

Ausbeute: 1.48 g (86%, Lit.[20]: 55%) schwarzes Öl

$C_{14}H_{19}NO_3$ (249.31)

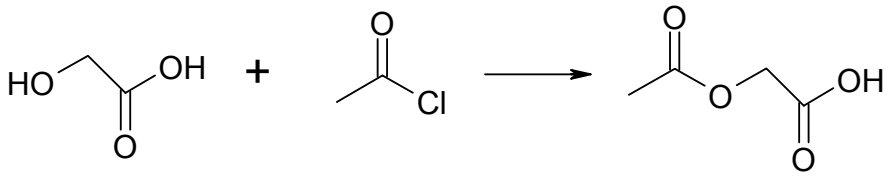
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.79 – 2.31 (m, 4H, H3/5), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.62 – 3.92 (m, 4H, H2/6), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 6.88 (d, J=6Hz, 2H, H2/6_{PMP}), 7.09 (d, J=6Hz, 2H, H3/5_{PMP}), 7.71 (s, 1H, CH)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 32.1 (t, C3), 50.6 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 63.5 (t, C2), 75.1 (s, C4), 114.2 (d, C2/6_{PMP}), 121.8 (d, C3/5_{PMP}), 143.9 (s, C1_{PMP}), 158.3 (s, C4_{PMP}), 164.7 (d, -CH=N)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Acetoxyessigsäure



14

Zu Glycolsäure (100.00g, 1.32mol) wurde langsam Essigsäurechlorid (200g, 2.55mol) zugegeben. Dabei wurden eine starke Gasentwicklung und die Bildung eines weißen Niederschlages beobachtet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch ca. 1h weitergerührt bis zum Ende der Gasentwicklung. Das überschüssige Säurechlorid wurde abdestilliert und der Rückstand aus Benzol umkristallisiert.

Smp: 60-63°C (Lit.[42] : 63-66°C)

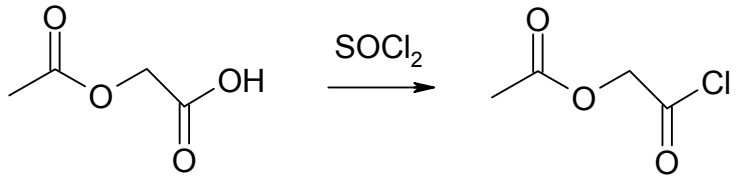
Ausbeute: 132.5g (85%, Lit.[42] : 93%)

$C_4H_6O_4$ (118.09)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 2.18 (s, 3H, CH_3), 4.69 (s, 2H, CH_2), 7.70 (bs, 1H, COOH)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 20.4 (q, CH_3), 60.3 (t, CH_2), 170.7 (s, COO), 173.6 (COOH)

[42] Rubottom, G.; Marrero, R.; Gruber J. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 861-865

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung von Acetoxyessigsäurechlorid



14 **15**

In 80 ml Thionylchlorid wurde Acetoxyessigsäure **14** (80g, 673mmol) auf Rückfluss gekocht (ca. 30 Minuten). Das überschüssige Thionylchlorid wurde anschließend abrotiert und der Rückstand im Vakuum destilliert.

Sdp: 54°C /12 mbar (Lit.[43]: 55°C / 12mbar.)

Ausbeute: 80.96g (88%, Lit.[43]: 94%)

$C_4H_5O_3Cl$ (136.53)

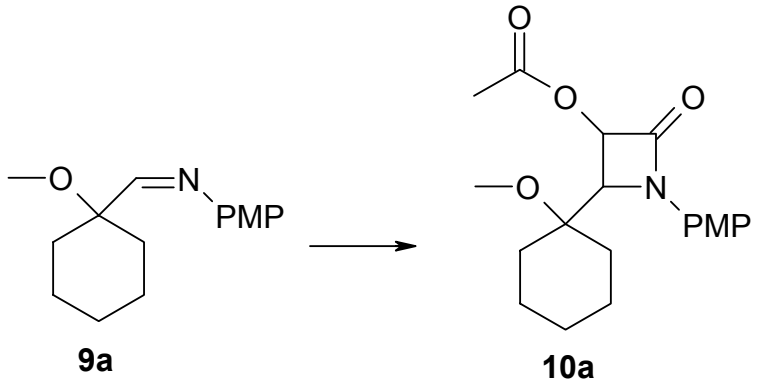
^{1}H-NMR ($CDCl_3$):
δ 2.19 (s, 3H, CH_3), 4.90 (s, 2H, CH_2)
^{13}C-NMR ($CDCl_3$):
δ 20.0 (q, CH_3), 67.1 (t, CH_2), 168.9 (s, COO), 169.5 (s, COCl)

[43] Friedman, O.; Seligman, A. *J. Am. Chem. Soc*. **1954**, *76*, 658-661

AV VIII: Allgemeine Vorschrift zur Azetidincyclisierung mit Acetoxyessigsäurechlorid

Einer 5%igen Lösung des jeweiligen Imins **9a-c** wurden unter Argonatmosphäre langsam 3 Äquivalente Triethylamin in abs. Benzol zugesetzt. Anschließend wurde auf Rückfluss erhitzt. Unter Rückfluss wurden 1.5 Äquivalente Acetoxyessigsäurechlorid **15** in absolutem Benzol zugetropft und 30min auf Rückfluss gekocht. Danach bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich zunehmend ein Feststoff absetzte.
Nun wurde die Reaktionsmischung mit 2N HCl hydrolysiert und mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter $NaHCO_3$ Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel abdestilliert.
Die Reinigung der Produkte erfolgte über Säulenchromatographie.

3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)-azetidin-2-on (10a)



Zu Imin **9a** (6.4g, 25.9mmol) wurde Triethylamin (4.245g, 38.7mmol) in 140ml abs. Benzol und Acetoxyessigsäurechlorid **15** (5.28g, 38.7mmol) gelöst in 140ml abs. Benzol nach AV VIII zu Produkt **10a** zugegeben.
Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (220g SiO_2, PE:EE = 3:1).

Smp: 102-106°C (Lit.[20]: 100-105°C)

Ausbeute: 2.15mg (24%, Lit.[20]: 24%) gelblicher Feststoff (cis, trans – Gemisch)

$C_{19}H_{25}NO_5$ (347.41)

cis:trans = 1:1

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.20–2.00 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 2.18 (s, 3H, CH_3CO), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.50 (d, J=6Hz, 1H, H4), 6.10 (d, J=6Hz, 1H, H3), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.40 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 1.20–2.00 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 2.16 (s, 3H, CH_3CO), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.24 (d, J=~1Hz, 1H, H4), 5.79 (d, J=~1Hz, 1H, H3), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.35 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

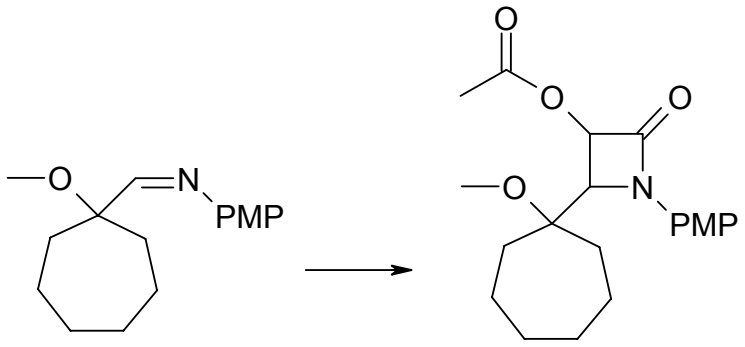
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 20.9 (q, $\underline{C}H_3CO$), 20.9 (t, CH_2), 21.2 (t, CH_2), 25.5 (t, CH_2), 29.5 (t, CH_2), 31.9 (t, CH_2), 49.4 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 61.2 (d, C4), 75.1 (d, C3), 77.2 (s, C1'), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 121.8 (d, $C3/5_{PMP}$), 130.2 (s, $C1_{PMP}$), 157.2 (s, $C4_{PMP}$), 163.7 (s, COO), 169.5 (s, C2)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 20.8 (q, $\underline{C}H_3CO$), 20.8 (t, CH_2), 21.0 (t, CH_2), 25.2 (t, CH_2), 29.1 (t,CH_2), 31.7 (t, CH_2), 48.9 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 60.1 (d, C4), 72.8 (d, C3), 75.5 (s, C1'), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 121.4 (d, $C3/5_{PMP}$), 129.9 (s, $C1_{PMP}$), 157.1 (s, $C4_{PMP}$), 162.8 (s, COO), 169.3 (s, C2)

3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)-azetidin-2-on (10b)



9b **10b**

Zu Imin **9b** (9.6g, 36.7mmol) wurde Triethylamin (6.07g, 110.4mmol) in 180ml abs. Benzol und Acetoxyessigsäurechlorid **15** (7.38g, 54.1mmol) gelöst in 180ml abs. Benzol nach AV VIII zu Produkt **10b** zugegeben.
Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (420g SiO_2, PE:EE = 3:1).

Smp: 70-80°C (Lit.[20]: 65-80°C)

Ausbeute: 3.70g (28%, Lit.[20]: 30%) brauner Feststoff

$C_{20}H_{27}NO_5$ (361.44)

cis:trans = 3:2

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.20–2.00 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 2.19 (s, 3H, CH_3CO), 3.27 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.53 (d, J=6Hz, 1H, H4), 6.10 (d, J=6Hz, 1H, H3), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.38 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 1.20–2.00 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 2.17 (s, 3H, CH_3CO), 3.22 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.26 (d, J=~1Hz, 1H, H4), 5.81 (d, J=~1Hz, 1H, H3), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.38 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

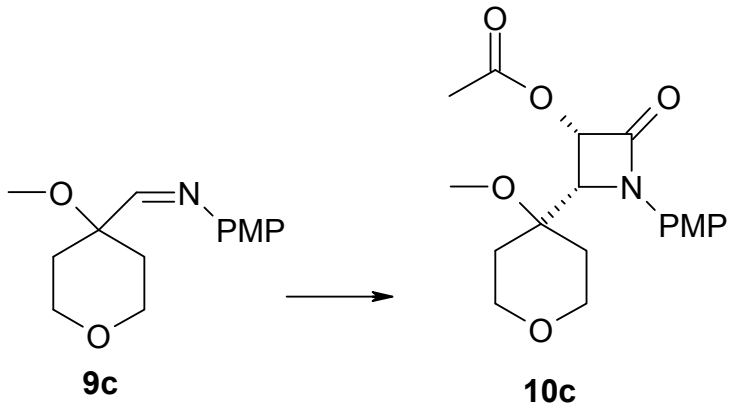
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 20.8 (q, $\underline{C}H_3CO$), 21.5 (t, CH_2), 22.3 (t, CH_2), 28.5 (t, CH_2), 29.4 (t, CH_2), 32.3 (t, CH_2), 35.8 (t, CH_2), 49.7 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 66.2 (d, C4), 75.4 (d, C3), 79.7 (s, C1'), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 122.3 (d, $C3/5_{PMP}$), 130.1 (s, $C1_{PMP}$), 157.3 (s, $C4_{PMP}$), 163.9 (s, COO), 169.4 (s, C2)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 20.6 (q, $\underline{C}H_3CO$), 20.9 (t, CH_2), 21.8 (t, CH_2), 28.2 (t, CH_2), 29.3 (t, CH_2), 31.9 (t, CH_2), 35.6 (t, CH_2), 49.3 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 62.5 (d, C4), 72.7 (d, C3), 78.6 (s, C1'), 114.2 (d, $C2/6_{PMP}$), 121.4 (d, $C3/5_{PMP}$), 129.9 (s, $C1_{PMP}$), 157.1 (s, $C4_{PMP}$), 163.0 (s, COO), 169.2 (s, C2)

cis-3-Acetoxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2-on (10c)



Zu Imin **9c** (3g, 12.0mmol) wurde Triethylamin (1.98g, 36mmol) in 60ml abs. Benzol und Acetoxyessigsäurechlorid **15** (1.7g, 12.5mmol) gelöst in 60ml abs. Benzol nach AV VIII zu Produkt **10c** zugegeben.
Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (210g SiO_2, PE:EE = 2:1).

Smp: 168-171°C (Lit.[20]: 165-170°C (Zersetzung))

Ausbeute: 450mg (11%, Lit.[20]: 23%) farblose Kristalle

$C_{18}H_{23}NO_6$ (349.39)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.61–1.96 (m, 4H, $CH_2$3/5), 2.19 (s, 3H, CH_3CO), 3.29 (s, 3H, OCH_3), 3.54 – 3.79 (m, 4H, $CH_2$2/6), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.53 (d, J=6Hz, 1H, H4), 6.12 (d, J=6Hz, 1H, H3), 6.90 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.35 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

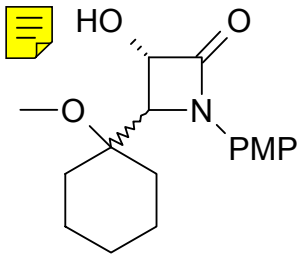
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 20.8 (q, $\underline{C}H_3CO$), 30.4 (t, $CH_2$3/5), 32.1 (t, $CH_2$3/5), 49.4 (q, OCH_3), 55.5 (q, $OCH_{3,PMP}$), 60.4 (d, C4), 62.7 (t, $CH_2$2/6), 63.1 (t, $CH_2$2/6), 72.9 (d, C3), 74.5 (s, C1'), 114.4 (d, C2/6$_{PMP}$), 121.4 (d, C3/5$_{PMP}$), 129.5 (s, C1$_{PMP}$), 157.3 (s, C4$_{PMP}$), 163.4 (s, COO), 169.5 (s, C2)

AV IX: Allgemeine Vorschrift zur hydrolytischen Abspaltung der O-Acetylgruppe

Es wurde eine 5%ige Lösung der Acetylverbindungen **10a-c** in THF auf 0°C gekühlt und anschließend mit dem halben Volumen einer 2N KOH versetzt. Nun wurde 3-4h bei 0°C gerührt, der Reaktionsverlauf wurde mittels DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit Wasser versetzt und das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)- azetidin-2-on (11a)



***11*a**

In 20ml THF wurden *cis-/trans*-Produkte **10a** (1g, 2.88mmol) nach AV IX zu Produkt **11a** umgesetzt, wobei das gleiche *cis / trans* Gemisch entstand. Das Produkt musste nicht gereinigt werden.

Smp: 143-146°C (Lit.[20]: 146-150°C)

Ausbeute: 918mg (quant., Lit.[20]: 87%) farblose Kristalle

cis:trans = 3:2

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.16–1.78 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.42 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.25 (d, J=6Hz, 1H, H4), 4.82 (d, J=12Hz, 1H, OH), 4.99 (dd, J_1=12Hz, J_2=6Hz, 1H, H3), 6.89 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.33 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 1.05–2.10 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.30 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.15 (d, J=~1Hz, 1H, H4), 4.79 (bs, 1H, H3), 4.82 (d, J=12Hz, 1H, OH), 6.87 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.31 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 21.1 (t, CH_2), 21.7 (t, CH_2), 25.3 (t, CH_2), 30.8 (t, CH_2), 32.8 (t, CH_2), 51.1 (q, OCH_3), 55.2 (q, $OCH_{3,PMP}$), 63.2 (d, C4), 77.2 (d, C3), 78.0 (s,

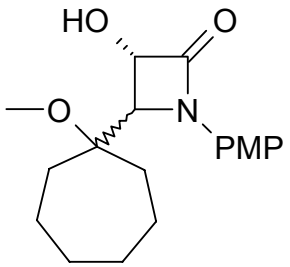
C1'), 114.3 (d, C2/6$_{PMP}$), 121.7 (d, C3/5$_{PMP}$), 130.6 (s, C1$_{PMP}$), 157.0 (s, C4$_{PMP}$), 168.3 (s, C2)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 20.9 (t, CH_2), 21.4 (t, CH_2), 25.2 (t, CH_2), 28.9 (t, CH_2), 31.7 (t, CH_2), 49.2 (q, OCH_3), 55.0 (q, $OCH_{3,PMP}$), 63.2 (d, C4), 76.5 (d, C3), 77.4 (s, C1'), 114.3 (d, C2/6$_{PMP}$), 120.5 (d, C3/5$_{PMP}$), 130.3 (s, C1$_{PMP}$), 156.7 (s, C4$_{PMP}$), 167.6 (s, C2)

Retentionszeit: 24.35min (GC-MS)

3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)- azetidin-2-on (11b)



11b

In 20ml THF wurde Produkt **10b** (1g, 2.77mmol) nach AV IX zu Produkt **11b** umgesetzt.
Es entstand ein *cis / trans* Gemisch.

Smp: 136-140°C (Lit.[20]: 140-146°C)

Ausbeute: 864mg (98%, Lit.[20]: 91%) farblose Kristalle

cis:trans = 1:1

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.30–2.09 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 3.31 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.32 (d, J=6Hz, 1H, H4), 4.65 (d, J=12Hz, 1H, OH), 4.89 (dd, J_1=12Hz, J_2=6Hz, 1H, H3), 6.88 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.30 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 1.30–2.09 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.19 (d, J=~1Hz, 1H, H4), 4.65 (d, J=12.76Hz, 1H, OH), 4.79 (m, 1H, H3), 6.86 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.34 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *cis*

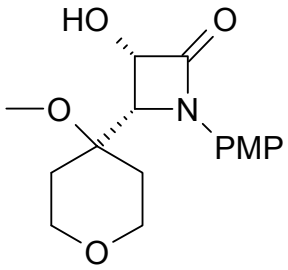
δ 21.2 (t, CH_2), 22.8 (t, CH_2), 30.3 (t, CH_2), 30.7 (t, CH_2), 33.3 (t, CH_2), 35.9 (t, CH_2), 51.1 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 64.1 (d, C4), 77.2 (d, C3), 82.3 (s, C1'), 114.2 (d, C2/6$_{PMP}$), 122.1 (d, C3/5$_{PMP}$), 130.6 (s, C1$_{PMP}$), 157.1 (s, C4$_{PMP}$), 168.5 (s, C2)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): *trans*

δ 22.2 (t, CH_2), 22.7 (t, CH_2), 29.1 (t, CH_2), 30.2 (t, CH_2), 31.9 (t, CH_2), 35.7 (t, CH_2), 49.5 (q, OCH_3), 55.3 (q, $OCH_{3,PMP}$), 64.1 (d, C4), 76.0 (d, C3), 78.7 (s, C1'), 114.1 (d, C2/6_{PMP}), 120.8 (d, C3/5_{PMP}), 130.2 (s, $C1_{PMP}$), 156.7 (s, $C4_{PMP}$), 168.2 (s, C2)

Retentionszeit: 26.74min (GC-MS)

cis-3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2-on (*cis*-11c)



cis-11c

In 5ml THF wurde Produkt **10c** (200mg, 0.57mmol) nach AV IX zu Produkt ***cis*-11c** umgesetzt.

Smp: 150-156°C (Lit.[20]: 152-158°C)

Ausbeute: 181mg (quant., Lit.[20]: 92%) farblose Kristalle

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.69–2.10 (m, 4H, $CH_2$3/5), 3.47 (s, 3H, OCH_3), 3.50 – 3.80 (m, 4H, $CH_2$2/6), 3.80 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.28 (d, J=6Hz, 1H, H4), 4.61 (d, J= 12Hz), 5.01 (dd, J_1=12, J_2=6Hz, 1H, H3), 6.88 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.33 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

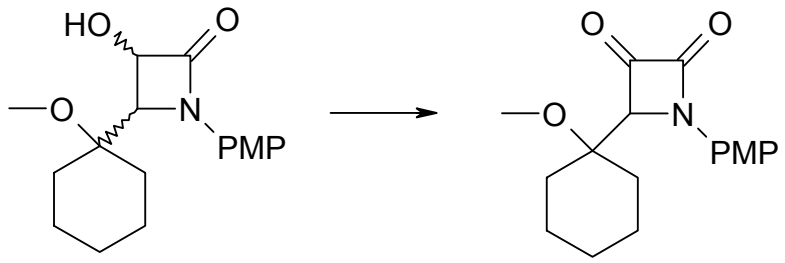
δ 31.0 (t, $CH_2$3/5), 33.4 (t, $CH_2$3/5), 49.6 (q, OCH_3), 55.4 (q, $OCH_{3,PMP}$), 63.0 (d, C4), 63.3 (t, $CH_2$2/6), 75.8 (s, C1'), 77.2 (d, C3), 114.4 (d, C2/6_{PMP}), 120.2 (d, C3/5_{PMP}), 130.2 (s, $C1_{PMP}$), 156.8 (s, $C4_{PMP}$), 167.8 (s, C2)

Retentionszeit: 24.62min (GC-MS)

AV X: Allgemeine Vorschrift zur Alkoholoxidation mit P_4O_{10}/DMSO

In der halben Menge abs. DMSO, welche für eine 10% Lösung notwendig wären, wurden 2 Äquivalente Phosphorpentoxid (P_4O_{10}) vorgelegt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde der jeweilige Alkohol **11a-c** in DMSO (5%ige Lösung im der Reaktionslösung) zugegeben und solange bei Raumtemperatur gerührt bis das DC vollständigen Umsatz zeigte. Da das Phosphorpentoxid nicht mehr die volle Aktivität hatte, musste 12-24h gerührt werden. Es wurde mit eisgekühlter ges. $NaHCO_3$ Lösung hydrolysiert, mit EE extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden 3 Mal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, um DMSO zu entfernen. Die Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde abdestilliert.

1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycyclohexyl)-azetidin-2,3-dion (12a)



11a **12a**

In 15 ml abs. DMSO wurden *cis*/*trans*-Produkt **11a** (1.27g, 4.16mmol) und Phosphorpentoxid (1.18g, 8.32mmol) nach AV X zu Produkt **12a** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (90g SiO_2, PE:EE = 5:1).

Smp: 92-95°C (Lit.[20]: 94-96°C)

Ausbeute: 328mg (26%, Lit.[20]: 64%) gelbe Kristalle

$C_{17}H_{21}NO_4$ (304.37)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

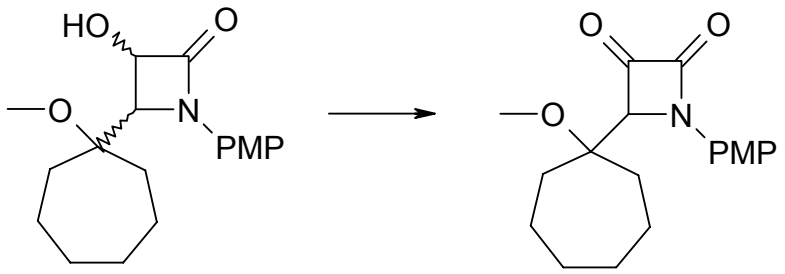
δ 1.06–2.02 (m, 10H, $(CH_2)_5$), 3.30 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.82 (s, 1H, H4), 6.95 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.61 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 20.8 (t, CH_2), 20.9 (t, CH_2), 24.9 (t, CH_2), 28.9 (t, CH_2), 32.3 (t, CH_2), 49.2 (q, OCH_3), 55.2 (q, $OCH_{3,PMP}$), 76.0 (d, C4), 76.1 (s, C1'), 114.3 (d, C2/6$_{PMP}$), 120.6 (d, C3/5$_{PMP}$), 130.1 (s, C1$_{PMP}$), 157.9 (s, C4$_{PMP}$), 160.8 (s, C2), 193.5 (s, C3)

Retentionszeit: 22.41min (GC-MS)

1-(4-Methoxyphenyl)-4-(1-methoxycycloheptyl)-azetidin-2,3-dion (12b)



11b **12b**

In 20 ml abs. DMSO wurden Produkt **11b** (2g, 6.26mmol) und Phosphorpentoxid (1.78g, 12.52mmol) nach AV X zu Produkt **12c** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (75g SiO_2, PE:EE = 5:1).

Smp: 89-93°C (Lit.[20]: 90-95°C)

Ausbeute: 683mg (34%, Lit.[20]: 76%) gelbe Kristalle

$C_{18}H_{23}NO_4$ (318.40)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

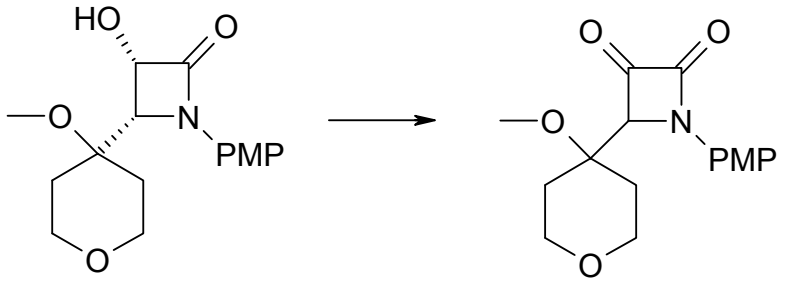
δ 1.30–2.05 (m, 12H, $(CH_2)_6$), 3.29 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.86 (s, 1H, H4), 6.95 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.61 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

δ 21.8 (t, CH_2), 22.0 (t, CH_2), 29.3 (t, CH_2), 29.5 (t, CH_2), 32.5 (t, CH_2), 35.7 (t, CH_2), 49.9 (q, OCH_3), 55.5 (q, $OCH_{3,PMP}$), 77.2 (d, C4), 80.1 (s, C1'), 114.4 (d, $C2/6_{PMP}$), 120.9 (d, $C3/5_{PMP}$), 130.2 (s, $C1_{PMP}$), 158.0 (s, $C4_{PMP}$), 161.3 (s, C2), 193.5 (s, C3)

Retentionszeit: 24.28min (GC-MS)

1-(4-Methoxyphenyl)-4-(4-methoxy-tetrahydropyran-4-yl)-azetidin-2,3-dion (12c)



11c **12c**

In 5 ml abs. DMSO wurden Produkt **11c** (300mg, 0.98mmol) und Phosphorpentoxid (278mg, 1.95mmol) nach AV X zu Produkt **12c** umgesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (20g SiO2, PE:EE = 4:1).

Smp: 115-119°C (Lit.[20]: 118-120°C)

Ausbeute: 110mg (37%, Lit.[20]: 72%) gelber Feststoff

$C_{16}H_{19}NO_5$ (305.33)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$):

δ 1.54–1.96 (m, 4H, $CH_2$3/5), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 3.45 – 3.81 (m, 4H, $CH_2$2/6), 3.85 (s, 3H, $OCH_{3,PMP}$), 4.85 (s, 1H, H4), 6.95 (d, J=6Hz, 2H, H2/6), 7.60 (d, J=6Hz, 2H, H3/5)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$):

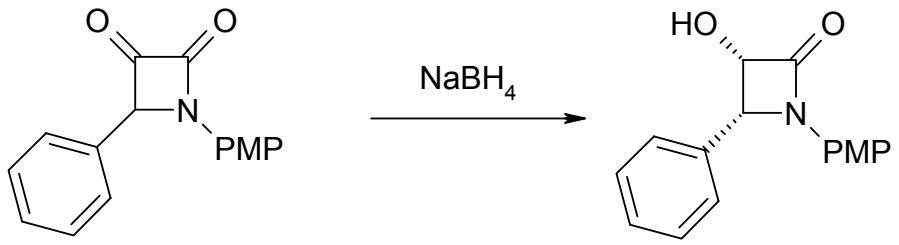
δ 29.6 (t, $CH_2$3/5), 32.8 (t, $CH_2$3/5), 50.1 (q, OCH_3), 55.5 (q, $OCH_{3,PMP}$), 62.7 (t, $CH_2$2/6), 63.1 (t, $CH_2$2/6), 74.2 (s, C1'), 75.7 (d, C4), 114.6 (d, C2/6$_{PMP}$), 120.8 (d, C3/5$_{PMP}$), 130.0 (s, C1$_{PMP}$), 158.3 (s, C4$_{PMP}$), 160.1 (s, C2), 192.7 (s, C3)

Retentionszeit: 22.68min (GC-MS)

XI: Allgemeine Vorschrift zur chemischen Reduktion

Die Ketone (1 Äquivalent, 0.1% Lösung) wurden in abs. Ethanol auf 5°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Natriumborhydrid (1 Äquivalent) langsam zugegeben und eine Stunde diese Temperatur gehalten. Anschließend wurde das gleiche Volumen 2N HCl zugegeben und weitere 3 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EE extrahiert, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Die Produkte mussten nicht gereinigt werden.

cis-3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d)



12d **13d**

Abs. Ethanol (5ml) und 3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (30mg, 0.11mmol) wurden nach AV XI zum gewünschten Produkt **13d** umgesetzt

Smp: 200-205°C (Lit.[12]: 204-208°C)

Ausbeute: 30mg (99%) farbloses Pulver

$C_{16}H_{15}NO_3$ (269.30g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 3.72 (s, 3H, -OCH_3), 5.15 (d, J=1Hz, 1H), 5.25 (d, J=1Hz, 1H), 6.81 (d, J=8Hz, 2H, -PMP), 7.29 (d, J=8Hz, 2H, -PMP), 7.25-8.25 (m, 5H, -Ph)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): *cis*

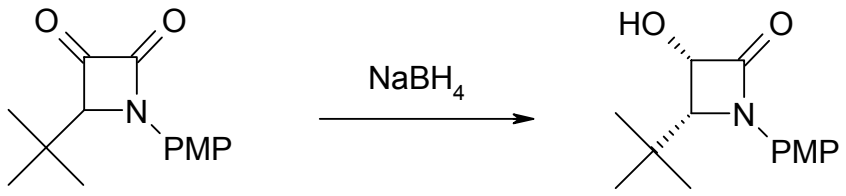
δ 55.2 (q, OCH_3), 61.8 (d, C-4), 76.8 (d, C-3), 114.4 (d, C-3‘), 118.2 (d, C-2‘), 127.7 (d, C-4‘‘), 128.0 und 128.1 (2d, C-2‘‘ und C-3‘‘), 130.7 und 134.9 (2s, C-1‘ und C-1‘‘), 155.6 (s, C-4‘), 166.3 (s, C-2).

Retentionszeit: 20.68min (Keton) (GC-MS)

Retentionszeit: 22.09min (Alkohol) (GC-MS)

Retentionszeit: 24.34/29.43min (3S,4R/3R,4S) *cis* (HPLC)

cis-4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (**13e**)



12e **13e**

Abs. Ethanol (5ml) und 4-tert-butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (30mg, 0.12mmol) wurden nach AV XI zum gewünschten Produkt **13e** umgesetzt.

Smp: 202-204°C (Lit.[44]: 215.5-216°C)

Ausbeute: 29mg (96%) farbloses Pulver

$C_{14}H_{19}NO_3$ (249.31g)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): *cis*

δ 1.00 (s, 9H, -C(CH_3)$_3$), 3.71 (s, -OCH_3), 3.99 (d, J=5Hz, 1H), 4.96 (d, J=5Hz, 1H), 6.81 (d, J=9Hz, 2H), 7.20 (d, J=9Hz, 2H)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$/DMSO-d_6): *cis*

δ 26.8 (q, C($\underline{C}H_3$)$_3$), 34.5 (s, $\underline{C}$(CH_3)$_3$), 55.1 (q, OCH_3), 67.3 (d, C-4), 75.4 (d, C-3), 113.7 (d, C-3‘), 121.2 (d, C-2‘), 130.5 (s, C-1‘), 156.2 (s, C-4‘), 168.4 (s, C-2).

Retentionszeit: 17.11min (Keton) (GC-MS)

Retentionszeit: 18.47min (Alkohol) (GC-MS)

Retensionszeit: 15.80/20.42min (3S,4R / 3R,4S) *cis* (HPLC)

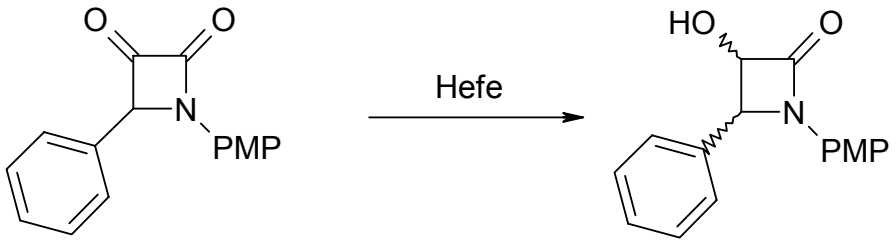
[44] Kayser, M.M.; Yang, Y.; Mihovilovic, M.M.; Feicht, A.; Rochon, F.D. *Can. J. Chem*. **2002**, *80*, 796-800

AV XII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur präparativen Hefereduktion

Zu 50 ml 10%ige Glucoselösung wurden 2g frische Backhefe (Fa. Mautner Markhof) zugegeben und diese Lösung 10 Minuten bei 30°C in einem Orbitalschüttler inkubiert.
Dann wurden der entsprechende β-Lactame **12** (50mg) und β-Cyclodextrin (1 Äquivalent) zugegeben und bei 30°C weitergeschüttelt.
Mittels GC konnte der Reaktionsverlauf verfolgt werden, wofür 500µl Fermentationslösung mit 500µl EE extrahiert wurden. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und konnte direkt für die Messung eingesetzt werden.

β-Lactame

cis-3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d)



12d **13d**

In 50ml 10% Glucose-Lösung wurden 3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (50mg, 0.19mmol) und Cyclodextrin (213mg, 0.19mmol) nach AV XII umgesetzt.
Nachdem das GC einen Umsatz von 87% zeigte, wurde die Biomasse abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde 3 Mal mit EE und 1 Mal mit ges. Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und einrotiert. Das Produkt wurde Säulenchromatographisch gereinigt (PE:EE 2:1).

Ausbeute: 29mg (58%) farbloses Pulver

cis:trans = 2.8:1

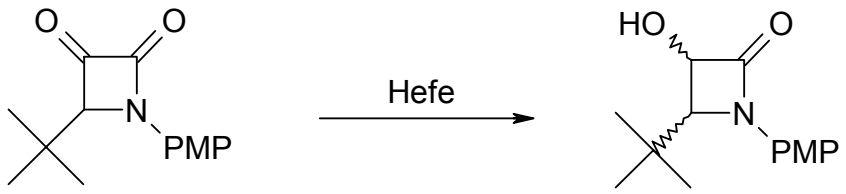
$C_{16}H_{15}NO_3$ (269.30g)

Retentionszeit: 20.68min (Keton) (GC-MS)

Retentionszeit: 22.09min (Alkohol) (GC-MS)

Retentionszeit: 16.7/23.6/28.3min (3R,4R/3S,4R/3R,4S) *trans/cis/cis* (HPLC)

4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (13e)



12e **13e**

In 50ml 10% Glucose-Lösung wurden 4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-metyl)-azetidin-2,3-one (50mg, 0.20mmol) und Cyclodextrin (230mg, 0.2mmol) nach AV XII umgesetzt. Nachdem das GC einen Umsatz von 90% zeigte, wurde die Biomasse abzentrifugiert. Die überstehende Lösung 3 Mal mit EE und 1 Mal mit ges. Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und einrotiert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE:EE 2:1).

Ausbeute: 26mg (52%)

cis:trans = 1.25:1

$C_{14}H_{19}NO_3$ (249.31g)

Retentionszeit: 17.11min (Keton) (GC-MS)

Retentionszeit: 18.47min (Alkohol) (GC-MS)

Retentionszeit: 14.1/18.6min (3R,4R/3R,4S) *trans/cis* (HPLC)

Produkt	*trans* (3R,4R)	*trans* (3S,4S)	*cis* (3S,4R)	*cis* (3R,4S)
13d	26, 38[12]	<5, 0[12]	20, 14[12]	53, 48
13e	48, 43[44]	-, <1[44]	-, 2[44]	52, 55[44]

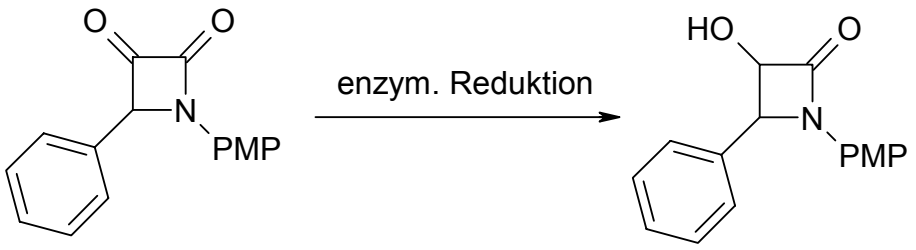
Alle Angaben sind in %

AV XIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit growing cells

Methode A:

Ein LB_{kan}-Medium (50 ml) wurde mit einer 1% Vorkultur (24 h wachsen gelassen) des entsprechenden rekombinanten *E.coli* Stammes in einer 250ml Schüttelflasche angeimpft und 2 Stunden bei 37°C in einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurden das Substrat, β-Cyclodextrin (1 Äquivalent) und IPTG-Stammlösung (0.025mM finale Konzentration in Kulturvolumen) zugegeben und bei 24°C weitergeschüttelt bis die Reaktion beendet war.
Die Biomasse (Zellen) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, die wässrige Phase 3 Mal mit EE und 1 Mal mit ges. Natriumchloridlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d)



12d **13d**

10ml LB_{kan} und 1-Methyl-4-phenyl-azetidine-2,3-dione (10mg, 0.04mmol) wurden sowohl mit pIK 6 als auch mit pIK 8 nach AV XIII Methode A umgesetzt.

<u>pIK 6:</u>

Umsatz: 78%

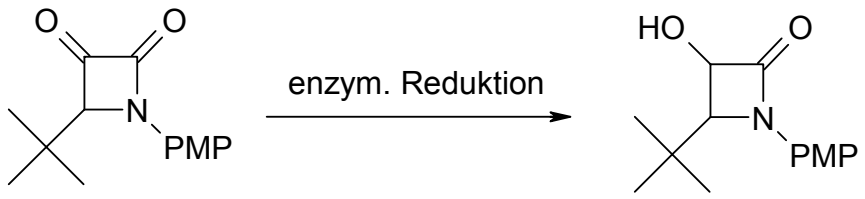
Retentionszeit: 16.4/28.6min (3R,4R/3R,4S) *trans/cis* (HPLC)

<u>pIK 8:</u>

Umsatz: 66%

Retentionszeit: 22.09min (GC-MS)

4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (13e)



12e **13e**

250ml LB_{kan} und 4-tert-butyl-1-(4-methoxy-phenyl)-azetidine-2,3-dione (50mg, 0.20mmol) wurde sowohl mit pIK 6 als auch mit pIK 8 nach AV XIII Methode A umgesetzt. Die Produkte wurden säulenchromatographisch gereinigt (PE:EE 2:1).

<u>pIK 6:</u>

Ausbeute: 34mg (68%)

Retentionszeit: 16.2/20.8min (3S,4R/3R,4S) *cis* (HPLC)

<u>pIK 8:</u>

Ausbeute: 34mg (68%)

Retentionszeit: 15.7/20.3min (3S,4R/3R,4S) *cis* (HPLC)

Retentionszeit: 18.49min (GC-MS)

Produkt	mmol [mg]	β-Cyclodextrin [mg]	Umsatz pIK 6 [%]	Ausbeute [mg/%]	Umsatz pIK 8 [%]	Ausbeute [mg/%]
13d	0.04 [10]	213	78	-	66	-
13e	0.20 [50]	230	68	34/68	68	34/68

Produkt	pIK 6				pIK 8			
	trans (3R,4R)	*trans* (3S,4S)	*cis* (3S,4R)	*cis* (3R,4S)	*trans* (3R,4R)	*trans* (3S,4S)	*cis* (3S,4R)	*cis* (3R,4S)
13d	43	-	-	17	★			
13e	-	-	50.5	49.5	-	-	50	50

Umsätze sind in [%] angegeben
„★“ zu geringe Konz. für HPLC-Analyse

Methode B:

Ein LB_{kan}-Medium (50 ml) wurde mit einer 1% Vorkultur (24 h wachsen gelassen) des entsprechenden rekombinanten *E.coli* Stammes in einer 250ml Schüttelflasche angeimpft und 2 Stunden bei 37°C in einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde IPTG (0.025mM) zugegeben, β-Cyclodextrin (1 Äquivalent) sowie 2-Chloracetessigsäureethylester (1 Äquivalent), welcher portionsweise über mehrere Stunden zugegeben wurde. Auch das Substrat wurde portionsweise der Reaktionslösung zugesetzt und anschließend bei 24°C geschüttelt bis die Reaktion beendet war.

Die Biomasse (Zellen) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und die wässrige Phase 3 Mal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit.

AV XIV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit non growing cells

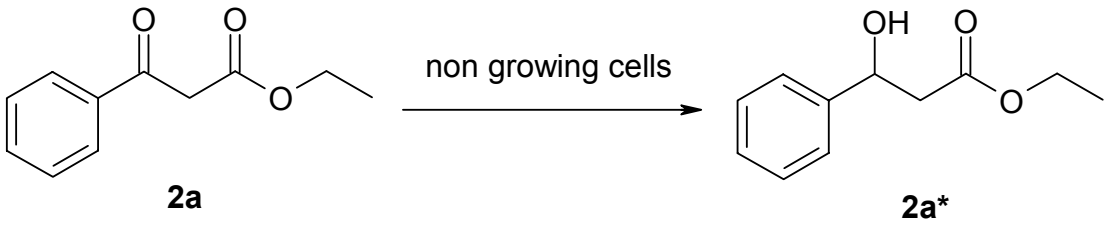
Anwachsen im Fermenter

In den 2l Fermenter wurde 1.5l LB-Medium vorgelegt und 3 Stunden bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 4.5ml Kanamyzin-Stammlösung, 30ml 20% Glucoselösung und Antifoam (3 Tropfen) zugegeben und anschließend mit 15ml Vorkultur des entsprechenden *E.coli*. Stammes inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde bei 37°C, einem Sauerstoffstrom von 5l/min und einer Rührerumdrehung von 600rpm durchgeführt.
Die Zunahme der optischen Dichte wurde in einem Photometer bei 600nm gemessen, bei einem Wert von etwa 1 wurden IPTG-Stammlösung (100µl) und weitere 20 ml 20 % Glucoselösung zugegeben.
Die Reaktion wurde beendet, sobald die stationäre Phase des Wachstums erreicht war.
Die Biomasse wurde durch Zentrifugieren (7°C, 9600rpm) abgetrennt und bei 4°C über M9-Minimal Medium (ca. 40ml) aufbewahrt.

Methode A:

In einer 250ml Schüttelflasche wurden M9-Minimal Medium (50ml), *„non growing cells“* (291mg, Nassgewicht), β-Cyclodextrin (1 Äquivalent) und Substrat (1 Äquivalent) vorgelegt und bei 32°C in einem Orbitalschüttler bei 120rpm geschüttelt.

3-Hydroxy-3-phenyl-propionsäure-ethyl-ester



In 50ml M9 minimal Media wurden Substrat **2a** (25mg, 0.11mmol), isolierte Zellen (292mg) und Cyclodextrin (148mg, 0.11mmol) nach AV XIV Methode A umgesetzt.

pIK 6:

Umsatz: 99%

pIK 8:

Umsatz: 93%

Retentionszeit: 20.67min (Keton) GC

Retentionszeit: 20.44min (Alkohol) GC

Methode B:

In einer 250ml Schüttelflasche wurden M9-Minimal Medium (50ml), *„non growing cells“* des entsprechenden rekombinanten *E.coli*. Stammes (291mg, Nassgewicht) und β-Cyclodextrin (1 Äquivalent) vorgelegt. Dieses Gemisch wurde bei 32°C in einem Orbitalschüttler bei 120rpm geschüttelt. Anschließend wurde innerhalb von 2-5 Stunden (auf 2-5 Portionen) 2-Chloracetessigsäureethylester (1 Äquivalent) zugegeben und innerhalb weiterer 2-3 Stunden das Substrat (1 Äquivalent, auf 2-3 Portionen) zugesetzt.
Der Reaktionsverlauf wurde mittels GC verfolgt, dafür wurden 500µl Reaktionslösung mit 500µl EE extrahiert und die organische Phase, nach Trocknung über Na_2SO_4, direkt für die GC-Messung verwendet.

Isolation eines GST-Fusion Proteins

Frisches LB_{kan}-Medium (250 ml) wurde mit 1% Vorkultur (24h wachsen lassen) des entsprechenden rekombinanten *E.coli*. Stammes in einer 1l Schüttelflasche angeimpft und 2 Stunden bei 37°C in einem Orbitalschüttler wachsen gelassen. Anschließend wurde IPTG (0.05mmol) zugegeben und bei 37°C weitergeschüttelt. Die Wachstumskurve wurde mittels Photometer (OD-Messung bei 600nm) kontrolliert. Die Kultivierung wurde beendet, sobald das Wachstum die stationäre Phase erreicht hat.

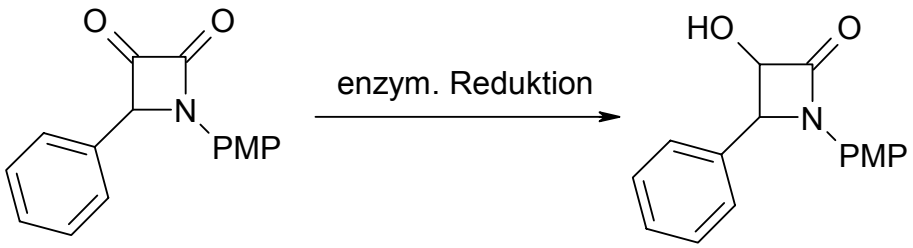
Die Lösung wurde zentrifugiert (4000rpm, 3000g) und die Biomasse abgetrennt. Diese dann in 4ml PBS/Triton-Puffer (+ Proteasehemmer) resuspendiert, in kleine Falcontubes überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde 2 Mal für 2min sonifiziert (70% Energie, Cycle 50) und bei 4°C 10min abzentrifugiert (10000rpm, 17000g). Der Überstand wurde durch 0.45µM Filter in ein neues Falcontube filtriert.
Als Säule fungierte eine 2ml Spritze mit Gummischlauch und Quetschhahn. Die Spritze wurde mit etwas Glaswolle gefüllt und mit 1-2ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Dann wurde 1-2ml Gluthathion-Sepharose Suspension aufgebracht und mit 6ml PBS/Triton-Puffer (+ Proteasehemmer) äquilibriert.
Nach der Probenaufgabe wurde die Säule 3 Mal mit 1-2 ml 1xPBS-Puffer gewaschen (dazwischen immer wieder Trockenlaufen lassen). Auf die trockene verschlossene Säule wurden 1ml Elutionspuffer pro ml Bettvolumen geben und 10min stehen gelassen. Anschließend wurden Fraktionen von etwa 0.5ml gesammelt und der Elutionsschritt 2 Mal wiederholt.
Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradford-Reagens und anschließender photometrischer Messung bei 595nm bestimmt.
Zur genaueren Überprüfung der proteinhaltigen Fraktionen wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

AV XV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bioreduktion mit GST-Fusion Proteinen

Eine KP-Pufferlösung (pH 7, 5ml) mit $NADP^+$ (1µmol), Glucose-6-phosphate (70µmol) und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase wurde mit Substrat (5mM) und gereinigtem GST-Fusion Protein versetzt und mit einem Orbitalschüttler (100rpm) bei 30°C geschüttelt.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels GC aufgezeichnet, dafür wurden 400µl Reaktionslösung mit 400µl EE extrahiert und die organische Phase, nach Trocknung über $NaSO_4$, wurde direkt für die GC-Messung verwendet.

3-Hydroxy-1-methyl-4-phenyl-azetidin-2-one (13d)



12d **13d**

In 2ml KP-Puffer wurde 1-Methyl-4-phenyl-azetidine-2,3-dione (2.7mg, 10µmol) sowohl mit pIK 6 als auch mit pIK 8 nach AV XV umgesetzt.

<u>pIK 6:</u>

Umsatz: 51%

Retentionszeit: 23.6/28.5min (3S,4R/3R,4S) *cis* (HPLC)

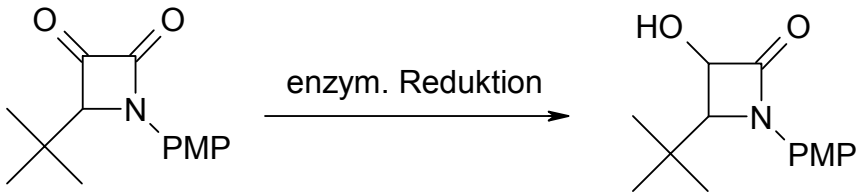
<u>pIK 8:</u>

Umsatz: 66%

Retentionszeit: 22.09min (GC-MS)

Retentionszeit: 16.3min (3R,4R) *trans* (HPLC)

4-tert-Butyl-3-hydroxy-1-methyl-azetidin-2-one (13e)



12e **13e**

In 2ml KP - Puffer und 4-tert-butyl-1-(4-methoxy-phenyl)-azetidine-2,3-dione (2.5mg, 10µmol) wurden sowohl mit pIK 6 als auch mit pIK 8 nach AV XV umgesetzt.

pIK 6:

Umsatz: 76%

Retentionszeit: 16.2/18.4min (3S,4R/3R,4S) *cis* (HPLC)

pIK 8:

Umsatz: 88%

Retentionszeit: 13.9/18.6min (3R,4R/3R,4S) *trans/cis* (HPLC)

Retentionszeit: 18.47min (GC-MS)

Produkt	µmol [mg]	Umsatz pIK 6 [%]	Umsatz pIK 8 [%]
13d	2.7 [10]	51	66
13e	2.5 [10]	76	88

Produkt	pIK 6				pIK 8			
	trans (3R,4R)	*trans* (3S,4S)	*cis* (3S,4R)	*cis* (3R,4S)	*trans* (3R,4R)	*trans* (3S,4S)	*cis* (3S,4R)	*cis* (3R,4S)
13d	-	-	44	56	100	-	-	-
13e	-	-	63	37	75	-	-	25

Umsätze sind in [%] angegeben

Referenzen

[1] Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327

[2] a.) Nicolaou,K.C.; Yang, Z.; Liu, J.J.; Ueno, H.; Nantermet, P.G.; Guy, R.K.; Claiborne, C.F.; Renaud, J.; Couladouros, E.A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E.J. *Nature* **1994**, *367*, 630-634; b.) Holton, R.A.; Somoza, C.; Kim, H.B.; Liang,F.; Biediger,R.J.; Boatman, P.D.; Shindo, M.; Smith, C.C.; Kim, S.; Nadizadeh, H.; Susuki, Y.; Tao, C.; Vu, P.; Tang, S.; Zhang, P.; Murthi, K.K.; Gentile, L.N.; Liu, J.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597-1600; c.) Masters, J.J.; Link, J.T.; Snyder, L.B.; Young, W.B.; Danishefsky, S.J. *Angew. Chem.* **1995**, *34*, 1723-26

[3] Kingston, D.G.I. *Chem. Commun.* **2001**, 867-880

[4] a)Holton, R.A. Abstract of Papers, 203rd National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, CA; *Am. Chem. Soc*.: Washington, DC, **1991** b) Holton, R.A. *U.S. Patent* 5, 015,744, **1991** und 5, 136, 060, **1992**.

[5] Amos, L.A.; Löwe, J. *Chemistry and Biology* **1999**, R65-R69

[6] a) Gao, Q.; Chen, S.-H. *Tetrahedron Lett.* **1996** 37, 3425-3428 b.) Vander Velde, D.G.; Georg, G.I.; Grunewald, G.L.; Gunn, C.W.; Mitscher, L.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11650-11651 c.) Gao, Q.; Parker, W.L. *Terahedron* **1996**, *52,* 2291-2300 d.) Boge, T.C.; Wu, Z.-H.; Himes, R.H., Vander Velde, D.G., Georg, G.I. *Bio. Med. Chem. Lett.* **1999**, 3047-3052

[7] a.) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron* **2003***, 14,* 2659-2681 b.) Waldmann, H.; Drauz, K. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* WILEY-VCH Weinheim **2002**, 991-1064

[8] Kaluzna, I.A.; Feske, B.D.; Wittayanan, W.; Ghiviriga, I.; Stewart, J.D. *J.Org.Chem* **2005**, *1*, 342-345

[9] Faber, K. In *Biotransformations in Organic Chemistry* Springer **1997**

[10] Voronkov, M.V.; Gontcharov, A.V.; Wang, Z.-M.; Richardson, P.F.; Kolb, H.C. *Terahedron* **2004**, *60*, 9043-9048

[11] Cabon, O.; Buisson, D.; Larcheveque, M.; Azerad, R. *Tetrahedron* **1995**, *6*, 2211-2218

[12] Kayser, M.M.; Mihovilovic, M.D.; Kearns, J.; Feicht, A.; Stewart, J.D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64,* 6603-6608

[13] Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Frithjof, G.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.; In *Organikum*; Becker, H.G.O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W.D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K.; Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, **2001**, *21*, 568-572

[14] Hahn, H.-G.; Chang, K.H.; Nam, K.D. *Bull.Kor.Chem.Soc.* **2001***, 22,* 149-153

[15] Baraldi, P.T.; Zarbin, P.HG.; Viera, P.C.; Corrêa, A.G. *Tetrahedron*, **2002** ,*13*, 621-624

[16] Ross, N.A.; MacGregor, R.R.; Bartsch, R.A. *Tetrahedron* **2004***, 60,* 2035-2041

[17] Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Frithjof, G.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.; In *Organikum*; Becker, H.G.O.; Beckert, R.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Habicher, W.D.; Metz, P.; Pavel, D.; Schwetlick, K.; Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, **2001**, *21*, 433-435

[18] Bach ,T.; Kirsch, S. *Synlett* **2001,***12*, 1974-1976

[19] Omura, K.; Swern, D. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651-1660

[20] Spina, M. *Diplomarbeit*, TU Wien, **2002**

[21] Mihovilovic, M.D.; Spina, M.; Müller, B.; Stanetty, P. *Monatsh.. Chem*. **2004**,*7*,899-909

[22] Mihovilovic, M.D.; Spina, M.; Stanetty, P., *Arkivoc*, **2005**, 5, 33-44

[23] Hayashi, M.; Yoshiga, T; Nakatani, K.; Ono, K.; Oguni, N. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2821-2830

[24] Marcou, A.; Normant, H. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1965**, *5*, 3491-3494

[25] Maier, M.; Bugl, M. *Synlett* **1998**, 1390-1392

[26] Holmquist, C.R.; Roskamp, E.J. *J. Org. Chem*. **1989**, *54*, 3258-3260

[27] Wuts, P.G.M.; Gu, R.L.; Northius, J.M. *Tetrahedron Asym.* **2000,** *11*, 2117-2123

[28] Bush, E.; Jones, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 3531-3536

[29] DeKimpe, N.; Nagy, M.; Boeykens, M.; Van der Schneren, D. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5761-5764 DeKimpe, N.; DeSmaele, D. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8023-8026

[30] Dejaegher, Y.; De Kimpe, N. *J.Org. Chem.* **2004***, 69,* 5974-5985

[31] Mihovilovic, M.D.; Feicht, A.; Kayser, M.M. *J.Prak.Chem*. **2000**, *342*, 585-590

[32] Mihovilovic, M.D. *Post Doc-Bericht* **1997** Univ. New Brunswick-Saint John Campus

[33] Walton, A.Z.; Stewart, J. D. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 403-411

[34] Kaluzna, I.A.; Matsuda, T.; Sewell, A.K.; Stewart, J.D. *J.Am.Cem.Soc.* **2004**, *40*, 12827-12832

[35] Yang, Y.; Kayser, M.M.; Rochon, F.D.; Rodriguez, S.; Stewart, J.D. *J. Mol. Catal. B:Enzym*. **2005,** *32*, 167-174
[36] Boudon, K.; Bright, A.C. *J. Org. Res*. **1992**, 524-539
[37] Harbuck, J.W.; Rapoport, H. *J. Org. Chem*. **1971**, *36*, 853-855
[38] Bankowska, Z.; Zadrozna, I. *J. Rocs. Chem*. **1971**, *45*, 1849-1860
[39] Mukalyama, T.; Murakami, M. *Chem. Lett*. **1981**, *8*, 1129-1132
[40] Chaco, M. C.; Iyer, B.H. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 186-190
[41] Geoffrey, T.; Bird, C.; Olivier, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 515-520
[42] Rubottom, G.; Marrero, R.; Gruber J. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 861-865
[43] Friedman, O.; Seligman, A. *J. Am. Chem. Soc*. **1954**, *76*, 658-661
[44] Kayser, M.M.; Yang, Y.; Mihovilovic, M.M.; Feicht, A.; Rochon, F.D., *Can. J. Chem*. **2002**, *80*, 796-800