

# Nachhaltige Synthese pharmazeutisch aktiver Amine und Amide

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

Vorgelegt der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld

von

**Matthias Pieper, M. Sc.**

aus Lübbecke

Bielefeld, März 2019



Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Gröger  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Industrielle Organische Chemie und Biotechnologie der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger in der Zeit von Mai 2015 bis März 2019 angefertigt.

Es wurden keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Die Dissertation wurde selbstständig verfasst und hat in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch nicht einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen.

Die Dissertation wurde von der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld genehmigt.

.....

Matthias Pieper

Matthias Pieper, Nachhaltige Synthese pharmazeutisch aktiver Amine und Amide

© März 2019



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

**Publikationen:**

M. Pieper, H. Gröger, *Combination of bio- and chemocatalysis for the synthesis of the tamsulosin precursor 4-methoxyamphetamine*  
in Vorbereitung, **2019**.

M. Pieper, H. Schleich, H. Gröger, *General Synthesis of Industrial Cephalosporine-Based Antibiotics through Amidation with Tosyl Chloride as a Coupling Reagent*,  
eingereicht bei *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**.

M. Pieper, H. Schleich, H. Gröger, *Isolation and characterization of side-products formed through  $\Delta^2$ -isomerization in the synthesis of cefpodoxime proxetil*  
eingereicht bei *J. Antibiot.* **2018**.

L. Schober, S. Ratnam, Y. Yamashita, N. Adebar, M. Pieper, A. Berkessel, V. Hessel, H. Gröger, *An Asymmetric Organocatalytic Aldol Reaction of a Hydrophobic Aldehyde in Aqueous Medium Running in Flow Mode*  
*Synthesis* **2018**, 51, 1178-1184.

M. Pieper, M. Kumpert, B. König, H. Schleich, T. Bayer, H. Gröger, *Process Development for Synthesizing the Cephalosporin Antibiotic Cefotaxime in Batch and Flow Mode*  
*Org. Res. Process Dev.* **2018**, 22, 947-954.

H. Gröger, M. Pieper, B. König, T. Bayer, H. Schleich, *Industrial Landmarks in the Development of Sustainable Production Processes for the  $\beta$ -Lactam Antibiotic Key Intermediate 7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA)*  
*Sustainable Chem. Pharm.* **2017**, 5, 72-79.

**Posterpräsentation:**

M. Pieper, B. Altemeier, H. Gröger, *Ene reductases as catalysts for the reduction of nitrodienes*  
Jahrestagung der Fachgruppe Nachhaltige Chemie, Karlsruhe, Deutschland, **2016**.



# Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Gröger, der mir das Vertrauen schenkte und mir die Promotion in seinem Arbeitskreis ermöglichte. Besonders hilfreich waren die stete wissenschaftliche Diskussion und entgegengebrachte Unterstützung, die mir im Rahmen der Promotion eine deutliche Entwicklung in beruflicher und menschlicher Sicht erlaubten. Für diese exzellente Betreuung der letzten Jahre möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Im Rahmen des *Procef*-Projekts, einem Kooperationsprojekt mit der *Provasis Hochschule Frankfurt*, der *Invenios Europe GmbH* und der *Sandoz GmbH*, konnte ich Erfahrungen im Bereich des Projektmanagements sammeln. Für die stete und angenehme Diskussionsbereitschaft bei einer Vielzahl von Projekttreffen und Telefonkonferenzen möchte ich mich bei Julia Volkmar, Mario Kumpert, Vanessa Wirth, Jens Schröder und Prof. Dr. Thomas Bayer von der *Provasis Hochschule Frankfurt*, bei Dr. Herbert Schleich und bis zu deren Ausscheiden Dr. Burghard König und Dr. Holger Schödel von der *Sandoz GmbH* und Felix Krämer und Ralf Scholz von der *Invenios Europe GmbH* bedanken. Ein besonderer Dank gilt dabei vor allem Herrn Dr. Schleich, der mir Teile seines enormen Wissens über die Chemie der Cephalosporine offenbarte und für viele Synthesen und deren Auswertung entscheidende Ideen gab. Ein weiterer spezieller Dank gilt Mario Kumpert, mit dem ich durch einen intensiven Austausch unserer gemeinsamen Ergebnisse einige praktische Probleme im Rahmen der Cephalosporin-Chemie lösen konnte.

Vielen Dank an die *Deutsche Bundesstiftung Umwelt* für die Förderung eines Teils meiner Forschung im Rahmen der Initiative „Nachhaltige Pharmazie“ (Projekt AZ 31723-32). Ein weiterer Teil dieser Arbeit wurde vom *Bundesministerium für Forschung und Bildung* im Rahmen des Projekts „Biotechnologie 2020+, Nächste Generation biotechnologischer Verfahren“ (Projekt 031A184A) gefördert, wofür ich mich bedanken möchte.

Im Rahmen meiner Forschungsarbeit wurden eine Vielzahl von NMR- und Massenspektren gemessen, sodass ein großer Dank Klaus-Peter Mester aus der NMR-Abteilung und Heinz-Werner Patruck, Sandra Heitkamp und Dr. Jens Sproß aus der Massenspektrometrie-Abteilung gilt.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Anke Hummel und während ihrer Abwesenheit Melissa Kracht, die beide einen sehr guten Job bei der Betreuung der S1-Arbeiten leisten und immer eine Antwort auf meine zahlreichen Fragen zu dieser Thematik hatten. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Dietmar Kuck, der sich immer wieder Zeit für ein wissenschaftliches Gespräch mit den im Labor arbeitenden Doktoranden genommen hat.

Die guten Seelen im Labor der OC1 sind eindeutig Thomas und Anika. Ohne euch läuft es einfach nicht rund im Labor, da ihr immer einen Ansprechpartner oder eine Lösung für nahezu alle Probleme wusstet. Im Sekretariat hat Angelika diese Rolle übernommen, sodass sich jetzt selbst die schlimmsten Verwaltungsarbeiten wie von selbst erledigen. Einen ganz großen Dank an euch drei, da ihr das Herz der OC1 seid.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Forschungspraktikanten Christoph Schwan, Bastian Altemeier, Oxana Jaroschewski und Jannis Nonnhoff für die vielen durchgeführten Synthesen bedanken. Ein weiterer Dank gilt Erich Gebel, Sören Skarabis, Moritz Fischer, Bastian Altemeier und Sebastian Wilke die im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit verschiedene Themengebiete für mich untersuchten.

Für das Korrekturlesen danke ich Julia, Nadine, Philipp, Jana und Tobias.

Ein großes Dankeschön geht an die beiden Auszubildenden Annamaria und Ingo, die im Rahmen ihrer Ausbildung unter meiner Anleitung verschiedene Synthesen für mich durchgeführt haben.

Vielen Dank auch an meine Vorgänger Wilko, Anna, Tina, Marc und Ramona aus der alten OC1, von denen ich im Rahmen meiner Masterarbeit und zu Beginn meiner Promotion viele Dinge lernen durfte. Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern der neuen OC1, Lukas, Hilmi, Michael, Jannis, Alessa, Nicklas und Yasunobu bedanken, die gerade im letzten Teil

meiner Promotion zu der Arbeitsgruppe dazugestoßen sind. Allen, sowohl den Vorgängern als auch den Nachfolgern, möchte ich für eine schöne gemeinsame Zeit in der OC1 danken.

Den größten Teil der vergangenen Jahre war jedoch die Stammbesetzung der OC1 vertreten. Ein besonderer Dank gilt somit Carmen, Ji Eun, Keiko, Franziska, Daniel, Severin, Nadine, Jana, Philipp, Tobias und Florian. Ich habe das Arbeiten mit euch wirklich genossen, da wir eine super Gruppe waren, in der es einfach gut lief. Dazu zähle ich gerne auch diverse Abendessen, Feiern, Theaterabende, Besuche des Weinfests und Weihnachtsmarktes, Betriebsausflüge oder Sushi-Abende, bei denen ich immer großen Spaß hatte. Besonders möchte ich dabei Nadine, Jana, Philipp und Tobias hervorheben, mit denen ich immer ein gutes Gespräch über fachliche Dinge oder Gott und die Welt führen konnte. Vielen Dank dafür. Meinen direkten Laborkollegen Tobias, Florian und Philipp gilt mit der größte Dank. Vielen Dank, dass wir so angenehme Jahre hatten. Besonders die Freitage werden mir mit einem Schmunzeln in Erinnerung bleiben.

Ein großer Dank gilt auch meiner ganzen Familie, die mir vor allem in stressiger Zeit häufig den Rücken freigehalten hat. Für die gesamte Unterstützung in den letzten fast zehn Jahren seit Beginn meines Studiums bin ich sehr dankbar. Besonders hervorheben möchte ich dabei meine Eltern Marlies und Friedrich-Wilhelm, meinen Bruder Carsten und meine Schwiegereltern Gabi und Uwe.

Der wichtigste Dank richtet sich an meine Frau Julia und meine kleine Lilly. Vielen Dank dafür, dass ihr mir in den letzten Monaten so viel Zeit zum Schreiben dieser Arbeit ermöglicht habt. Und einen noch größeren Dank für die Zeit, in der Ihr mich vom Schreiben abgelenkt und zum Toben und Spielen gelockt habt. Ich liebe euch sehr und bin so froh, dass ich mit euch gemeinsam durch das Leben gehen darf.



# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis .....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1.	Einleitung .....	1
2.	Synthese von Cefotaxim (1) .....	3
2.1.	Synthese der Cephalosporine.....	3
2.1.1.	Cephalosporine .....	3
2.1.2.	Amidierung von 7-ACA (3) oder deren Derivaten in 7-Position .....	7
2.1.3.	Mikroreaktionstechnik.....	13
2.2.	Motivation und Zielsetzung.....	15
2.3.	Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz .....	16
2.3.1.	Stand der Wissenschaft.....	16
2.3.2.	Ergebnisse und Diskussion .....	18
2.4.	Anhydride von Phosphorsäuren als Kopplungsreagenzien .....	22
2.4.1.	Stand der Wissenschaft.....	22
2.4.2.	Ergebnisse und Diskussion .....	23
2.5.	DMT-MM (45) als Kopplungsreagenz.....	27
2.5.1.	Stand der Wissenschaft.....	27
2.5.2.	Ergebnisse und Diskussion.....	29
2.6.	4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz .....	31
2.6.1.	Stand der Wissenschaft.....	31
2.6.2.	Synthese von Cefotaxim mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49).....	33
2.6.3.	Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess.....	39
2.6.4.	Übertragung der Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) auf ein <i>Flow-Setup</i> .....	41
2.7.	Zusammenfassung .....	44

3.	Synthese von Cefpodoximproxetil (5) und bekannter $\Delta$ 2-Nebenprodukte.....	47
3.1.	Stand der Wissenschaft .....	47
3.1.1.	Klassische Synthese von Cefpodoximproxetil (5).....	51
3.1.2.	Hydrolasen .....	56
3.2.	Motivation und Zielsetzung .....	59
3.3.	Ergebnisse und Diskussion .....	60
3.3.1.	Isolierung der Diastereomere von AMCA-Proxetil (56) .....	60
3.3.2.	Synthese der isolierten Diastereomere von Cefpodoximproxetil (5).....	65
3.3.3.	Hydrolase- <i>Screening</i> zur Anreicherung von ( <i>R</i> )-AMCA-Proxetil (( <i>R</i> )-56) oder ( <i>R</i> )-Cefpodoximproxetil (( <i>R</i> )-5).....	68
3.3.4.	$\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56).....	71
3.3.5.	Isolierung der $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil-Diastereomere ( <i>R</i> )-62 und ( <i>S</i> )-62 .....	75
3.3.6.	Darstellung zweier $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil-Diastereomere .....	76
3.4.	Zusammenfassung.....	79
4.	Chemoenzymatische Synthese von ( <i>R</i> )-4-Methoxyamphetamin ( <i>R</i> )-(77).....	81
4.1.	Stand der Wissenschaft .....	81
4.1.1.	Tamsulosin (( <i>R</i> )-78).....	81
4.1.2.	En-Reduktasen .....	87
4.2.	Motivation und Zielsetzung .....	91
4.3.	Ergebnisse und Diskussion .....	92
4.3.1.	Synthese von Substrat und Referenzsubstanzen .....	92
4.3.2.	Biokatalytische Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96) .....	94
4.3.3.	Hydrierung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (99) mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle .....	98
4.4.	Zusammenfassung.....	102
5.	Zusammenfassung.....	105
6.	Summary .....	111
7.	Experimenteller Teil .....	117

7.1.	Verwendete Chemikalien, Enzyme, Geräte und Arbeitstechniken .....	117
7.1.1.	Chemikalien.....	117
7.1.2.	Enzyme .....	117
7.1.2.1.	En-Reduktase aus <i>Gluconobacter oxydans</i> .....	117
7.1.2.2.	Glucosedehydrogenase aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	119
7.1.3.	Geräte.....	121
7.1.3.1.	Peristaltische Pumpe.....	121
7.1.3.2.	Waagen .....	121
7.1.3.3.	Automatische Säulenchromatographie .....	121
7.1.3.4.	UV/VIS-Spektroskopie.....	121
7.1.3.5.	NMR-Spektroskopie.....	121
7.1.3.6.	HPLC .....	122
7.1.3.7.	Massenspektrometrie .....	122
7.1.4.	Arbeitstechniken.....	122
7.1.4.1.	Durchführung der Experimente .....	122
7.1.4.2.	Dünnschichtchromatographie.....	122
7.1.4.3.	Temperierung.....	123
7.1.4.4.	Entfernen von Lösungsmitteln und flüchtigen Komponenten.....	123
7.1.4.5.	Extrahieren von Biotransformationen .....	123
7.1.4.6.	Reaktionen bei konstantem pH-Wert .....	123
7.1.4.7.	Hochdruckreaktionen.....	123
7.2.	Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz .....	124
7.2.1.	Darstellung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (37).....	124
7.2.2.	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von ATMO-Säurebenzylamid (35).....	125
7.2.3.	Darstellung des Dibenzylharnstoffes (38).....	125
7.2.4.	Amidierung des Triethylammoniumsalzes 37 mit Benzylamin (34) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) mit Isolierung des Produktes 35 und des Dimers 39 .....	126

7.2.5.	Amidierung des Triethylammoniumsalzes 37 mit Benzylamin (34) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) bei verschiedenen Aktivierungstemperaturen	127
7.2.6.	Amidierung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (37) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) .....	128
7.3.	Anhydride von Phosphorsäuren als Kopplungsreagenzien.....	129
7.3.1.	Untersuchung der Neutralisationsreaktion von ATMO-Säure (8) und Benzylamin (34) unter Bildung des Benzylammonium-ATMO-Salzes (36) .....	129
7.3.2.	Untersuchung der Hintergrundreaktion von Benzylamin (34) mit T3P® (40).... .....	130
7.3.3.	Versuch der Kopplung von Benzylamin (34) und ATMO-Säure (8) unter Verwendung von T3P® (40).....	131
7.3.4.	Versuch der Kopplung von Benzylamin (34) und ATMO-Säure (8) unter Verwendung verschiedener Phosphorsäureanhydride .....	132
7.4.	DMT-MM (45) als Kopplungsreagenz .....	133
7.4.1.	Darstellung von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (45) <sup>[92]</sup> .....	133
7.4.2.	Etablierung einer HPLC-Analytik .....	134
7.4.3.	Amidierung von ATMO-Säure (8) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von DMT-MM (45) in verschiedenen Lösungsmitteln .....	135
7.5.	4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz.....	136
7.5.1.	Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz.....	136
7.5.2.	Synthese von Cefotaxim (1) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz <sup>[100]</sup> .....	137
7.5.3.	AAV 1: Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Austausch von Dimethylacetamid <sup>[100]</sup> .....	139
7.5.3.1.	Dimethylformamid als Ersatz für Dimethylacetamid .....	140
7.5.3.2.	N-Methyl-2-pyrrolidon als Ersatz für Dimethylacetamid.....	140
7.5.3.3.	Acetonitril als Ersatz für Dimethylacetamid.....	141

7.5.3.4.	Tetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid .....	142
7.5.3.5.	Methyltetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid .....	142
7.5.3.6.	Aceton als Ersatz für Dimethylacetamid .....	143
7.5.3.7.	Methyl- <i>iso</i> -butylketon als Ersatz für Dimethylacetamid.....	143
7.5.3.8.	Ethylacetat als Ersatz für Dimethylacetamid.....	144
7.5.3.9.	Tetramethylharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid .....	145
7.5.3.10.	Dimethylpropylenharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid.....	146
7.5.3.11.	Dimethylcarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid.....	146
7.5.3.12.	Propylencarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid .....	147
7.5.3.13.	$\epsilon$ -Caprolacton als Ersatz für Dimethylacetamid .....	147
7.5.3.14.	Cyrene als Ersatz für Dimethylacetamid .....	148
7.5.3.15.	1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat als Ersatz für Dimethylacetamid. .....	149
7.5.4.	AAV 2: Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Austausch von Dichlormethan <sup>[100]</sup> .....	150
7.5.4.1.	Methanol als Ersatz für Dichlormethan.....	151
7.5.4.2.	Wasser als Ersatz für Dichlormethan .....	151
7.5.5.	AAV 3: Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Austausch von Triethylamin.....	152
7.5.5.1.	DBU als Ersatz für Triethylamin.....	153
7.5.5.2.	Tetramethylguanidin als Ersatz für Triethylamin.....	153
7.5.5.3.	Di- <i>iso</i> -propylamin als Ersatz für Triethylamin .....	154
7.5.5.4.	Dicyclohexylamin als Ersatz für Triethylamin.....	155
7.5.5.5.	Pyridin als Ersatz für Triethylamin .....	156
7.6.	Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess.....	157
7.6.1.	Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49).....	157
7.6.2.	Synthese von Cefpodoxim (4) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz .....	158

7.6.3.	Synthese von Cefpodoxim (4) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.....	159
7.6.4.	Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Ceftazidim- <i>tert</i> -butylester (52) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) .....	160
7.6.5.	Synthese von Ceftazidim- <i>tert</i> -butylester (52) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.....	162
7.6.6.	Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoximproxetil (5) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49).....	163
7.6.7.	Synthese von Cefpodoximproxetil (5) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz mit Ethylacetat als zweitem Lösungsmittel.....	164
7.7.	Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als <i>Flow</i> -Reaktion .....	165
7.7.1.	Versuchsaufbau .....	165
7.7.2.	AAV 4: Synthese von Cefotaxim (1) und Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als <i>Flow</i> -Reaktion.....	166
7.7.2.1.	Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als <i>Flow</i> -Reaktion mit Dichlormethan als zweitem Lösungsmittel .....	167
7.7.2.2.	Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als <i>Flow</i> -Reaktion mit Methanol als zweitem Lösungsmittel .....	167
7.7.2.3.	Synthese von Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als <i>Flow</i> -Reaktion mit Methanol als zweitem Lösungsmittel .....	168
7.8.	Diastereomere von Cefpodoximproxetil (5) .....	169
7.8.1.	Darstellung einer Lösung von 1-Iodethyl- <i>iso</i> -propylcarbonat (63) in Toluol <sup>[130]</sup> .....	169
7.8.2.	Darstellung von AMCA-Proxetil (56) <sup>[47]</sup> .....	170
7.8.3.	Isolierung der AMCA-Proxetil-Diastereomere.....	171
7.8.3.1.	( <i>R</i> )-AMCA-Proxetil (( <i>R</i> )-56) .....	171
7.8.3.2.	( <i>S</i> )-AMCA-Proxetil (( <i>S</i> )-56).....	171

7.8.4.	AAV 5: Amidierung von AMCA-Proxetil (56) unter Verwendung von MAEM (18) <sup>[21–23,27,28]</sup> .....	172
7.8.4.1.	Darstellung von Cefpodoximproxetil (5) .....	172
7.8.4.2.	Darstellung von ( <i>R</i> )-Cefpodoximproxetil (( <i>R</i> )-5).....	173
7.8.4.3.	Darstellung von ( <i>S</i> )-Cefpodoximproxetil (( <i>S</i> )-5) .....	174
7.9.	Hydrolasen- <i>Screening</i> für die Hydrolyse von Cefpodoximproxetil (5) und AMCA-Proxetil (56).....	175
7.9.1.	<i>Screening</i> für die Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für AMCA-Proxetil (56) .....	175
7.9.2.	<i>Screening</i> für die Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für Cefpodoximproxetil (5).....	179
7.9.3.	Biotransformationen zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (56) und Cefpodoximproxetil (5) in Toluol.....	183
7.9.3.1.	Biotransformationen zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (56) und Cefpodoximproxetil (5) in Cyclohexan .....	186
7.10.	Untersuchungen der $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56) .....	189
7.10.1.	AAV 6: Darstellung von $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (62) mittels Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56) .....	189
7.10.1.1.	Darstellung von $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (62).....	189
7.10.1.2.	Darstellung von ( <i>R</i> )- $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (( <i>R</i> )-62).....	190
7.10.1.3.	Darstellung von ( <i>S</i> )- $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (( <i>S</i> )-62).....	190
7.10.2.	Untersuchung der $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56) in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und Menge an Triethylamin .....	191
7.10.3.	Untersuchung der $\Delta$ 3-Isomerisierung von $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (62) .....	192
7.10.4.	AAV 7: Amidierung von $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (62) unter Verwendung von MAEM (18) <sup>[21–23,27,28]</sup> .....	193
7.10.4.1.	Darstellung von $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (61) .....	193
7.10.4.2.	Darstellung von ( <i>R</i> )- $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (( <i>R</i> )-61).....	194
7.10.4.3.	Darstellung von ( <i>S</i> )- $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (( <i>S</i> )-61).....	195
7.11.	Synthese von ( <i>R</i> )-4-Methoxyamphetamin (( <i>R</i> )-77).....	196

7.11.1.	Darstellung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96) <sup>[174]</sup> .....	196
7.11.2.	Darstellung von <i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> -99) aus 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96).....	197
7.11.3.	Darstellung von <i>rac</i> -4-Methoxyamphetamin ( <i>rac</i> -77) aus 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96).....	198
7.11.4.	Bestimmung der Aktivität der verwendeten Gox-En-Reduktase.....	198
7.11.5.	Bestimmung der Aktivität der Glucosedehydrogenase aus <i>Bacillus subtilis</i> .	199
7.11.6.	Untersuchung der Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96) .....	200
7.11.7.	Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (96) unter Verwendung der GDH aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	201
7.11.8.	Reduktion von <i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> -99) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei 5 bar Wasserstoffdruck <sup>[205]</sup> .....	202
7.11.9.	Reduktion von <i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> -99) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei verschiedenen Reaktionsbedingungen .... .....	203
7.11.10.	Reduktion von ( <i>R</i> )-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )-99) aus der Biotransformation unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle .....	204
8.	Literaturverzeichnis .....	205

## II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
7-ACA	7-Aminocephalosporansäure
A	Integrierte Signalintensität von <sup>1</sup> H-NMR-Signalen und HPLC-Signalen
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
AMCA	7-Amino-3-Methoxycephalosporansäureproxetil
Äq.	Äquivalente
Ar	Argonatmosphäre
Asp	Asparaginsäure
ATMO	(Z)-(2-Aminothiazol-4-yl)-methoxyiminoessigsäure
CDI	Carbonyldiimidazol
CAL-B	Lipase B ( <i>Candida antarctica</i> )
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DEA	Diethylamin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMC	Dimethylcarbonat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DMT-MM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
eq.	equivalents
ER	En-Reduktase
ESI	Elektronspray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EWG	elektronenziehende Gruppe

GC-MS	Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie
GDH	Glucosedehydrogenase
Gox	<i>Gluconobacter oxydans</i>
h	Stunde
HACA	3-Hydroxy-7-Aminocephalosporansäure
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IC	<i>Chiracel IC</i> HPLC-Säule von <i>Daicel</i>
IR	Infrarotspektroskopie
kg	Kilogramm
KPB	<i>potassium phosphate buffer</i> (Kaliumphosphatpuffer)
KPG-Rührer	Kerngezogenes Präzisions-Glasgerät Rührer
KP <sub>i</sub> -Puffer	Kaliumphosphatpuffer
LC-MS	Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie
m	Masse
M	molar
MAEM	2-Mercaptobenzothiazol-(Z)-2-methoxyimino-2-(2-aminothiazol-4-en)thioacetat
Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dimethylsulfat
MeOH	Methanol
MeSO <sub>2</sub> Cl	Methansulfonylchlorid
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
n	Stoffmenge
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin

NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NMR	Kernspinresonanz
Nuc	Nukleophil
OD-H	<i>Chiracel OD-H</i> HPLC-Säule von <i>Daicel</i>
OPPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphanoxid
OYE	<i>old yellow enzyme</i>
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphan
ppm	<i>parts per million</i>
PYCA	7-Amino-3-pyridiniumcephalosporansäurecarboxylat
<i>rac</i>	racemisch
RT	Raumtemperatur
Ser	Serin
t	Zeit
T	Temperatur
T3P®	trimeres Anhydrid der Propylphosphonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i>
UV	Ultravioletter Bereich
UV/VIS	Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich
w	Massenanteil
x	Molenbruch



# 1. Einleitung

Erst kürzlich veröffentlichte *Alexander Gerst*, Astronaut der Internationalen Raumstation ISS, einen Brief, der seinen noch nicht geborenen Enkelkindern galt.<sup>[1]</sup> Weltweit sorgte er damit für ein aktuelles Gesprächsthema, indem er sich bereits jetzt bei seinen zukünftigen Enkeln dafür entschuldigte, dass unsere Generation die Welt in einem schlechten Zustand für die nachfolgenden Generationen hinterlassen wird.<sup>[1]</sup> Dieses Thema ist ebenfalls täglich in Form von Berichten über die steigende Umweltverschmutzung der Weltmeere durch Kunststoffabfälle und deren Abbauprodukte, den Ausstoß von Stickoxiden durch Dieselfahrzeuge und Großschiffe sowie den Klimawandel infolge einer immer weiter ansteigenden Menge ausgestoßener Treibhausgase in den Medien.<sup>[2-4]</sup> In Anbetracht dieser Thematik bekommt der Begriff Nachhaltigkeit eine wachsende Bedeutung. Ein nachhaltiges Wirtschaften bedeutet, dass nur so viel von der Erde genommen wird, wie biologisch nachgebildet werden kann und auch nur so viel an die Erde abgegeben wird, wie diese auch wieder abbauen kann. In der chemischen Industrie ist das Thema Nachhaltigkeit schon seit längerer Zeit aktuell. Die Wichtigkeit einer sicheren und ökologisch ausgerichteten „grünen“ Chemie wird immer deutlicher; so werden von der *Gesellschaft Deutscher Chemiker* seit 1998 bereits der *Wöhlerpreis* für nachhaltige Chemie und von der *United States Environmental Protection Agency* der *Green Chemistry Challenge Award* verliehen.

Im Jahr 1998 stellten *Anastas* und *Warner* zwölf Grundprinzipien der grünen Chemie vor.<sup>[5]</sup> In Abbildung 1-1 sind diese zwölf Prinzipien zusammengestellt und wurden zur besseren Übersicht in drei Hauptbereiche eingeteilt. Der erste Bereich betrifft die Schonung von Ressourcen durch die Durchführung energieeffizienter Synthesen und die Verwendung erneuerbarer Rohstoffe. Der zweite Bereich beinhaltet eine Minimierung des Risikos, für welches die Entwicklung von sicheren Synthesen, Chemikalien, Lösungsmitteln und Reagenzien genannt werden. Der dritte, sehr große Bereich befasst sich mit der generellen Abfallproblematik. Es wird dabei die Abfallvermeidung unter Beachtung der Atomökonomie und auch der Einsatz von Echtzeitüberwachung angesprochen. Des Weiteren werden eine Reduktion des Abfalls durch den Ersatz von Reagenzien durch Katalysatoren, dem möglichen Verzicht auf Lösungsmittel und Hilfsstoffe, sowie eine Reduktion überflüssiger Syntheseschritte gefordert. Darüber hinaus ist bei der nicht vermeidbaren Entstehung von Abfall darauf zu achten, dass dieser biologisch abbaubar ist.



**Abbildung 1–1:** Einteilung der nach *Anastas* und *Warner* vorgestellten zwölf Grundprinzipien grüner Chemie.<sup>[5]</sup>

Die erläuterten Grundprinzipien werden auch bei der Verwendung von Lösungsmitteln und Chemikalien immer wichtiger. *Pfizer* stellte 2008 ein *Ranking* für Lösungsmittel und Reagenzien für verschiedene Synthesen auf, in denen Stoffe bevorzugt eingesetzt oder nach Möglichkeit eher ersetzt werden sollen.<sup>[6]</sup> Eine ähnliche, aber genauere Bewertung auf Grundlage der Bereiche Sicherheit, Auswirkungen auf die Gesundheit und Auswirkungen auf die Umwelt führte eine Gruppe aus verschiedenen Chemikern der Firmen *Sanofi-Aventis*, *GlaxoSmithKline* und *Pfizer* durch und fasste die Ergebnisse im *CHEM21 Selection Guide of classical- and less classical-solvents* zusammen.<sup>[7]</sup> Dies zeigt, dass auch der Pharmaindustrie die große Bedeutung der „grünen“ Chemie bewusst ist. Gerade die Pharmaindustrie gehört aufgrund der meist aufwändigen Reinigungsschritte auf verschiedenen Stufen zu den stark abfallproduzierenden Zweigen der chemischen Industrie. Bei vielen Pharmawirkstoffen liegt die Menge an Abfall im Bereich von 25-100 kg Abfall pro kg Produkt.<sup>[8]</sup>

Ein Ziel dieser Arbeit ist deshalb, neue Syntheserouten für bedeutende pharmazeutische Produkte und Zwischenprodukte, wie semisynthetische Cephalosporin-Antibiotika oder den *Tamsulosin-Precursor* 4-Methoxyamphetamin, im Rahmen einer nachhaltigen Synthese zu entwickeln. Insbesondere sollen dabei die verwendeten Lösungsmittel, Hilfsstoffe und Reagenzien im Rahmen der grünen Chemie eine ökonomisch und ökologisch attraktive Synthese ermöglichen.

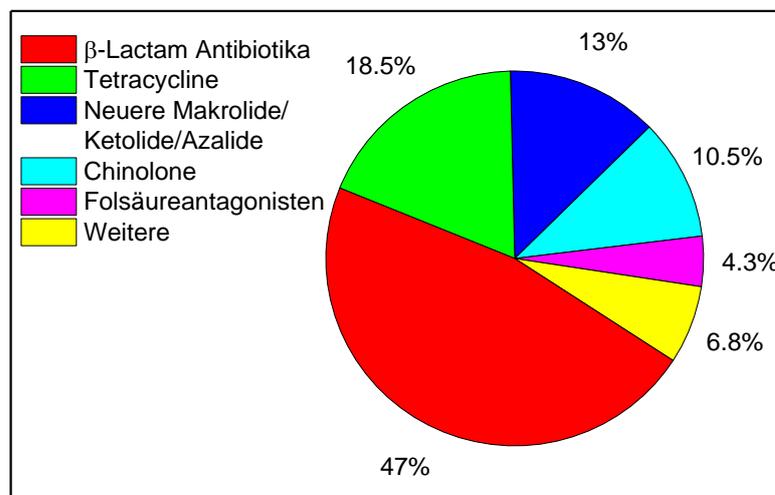
## 2. Synthese von Cefotaxim (1)

### 2.1. Synthese der Cephalosporine

#### 2.1.1. Cephalosporine

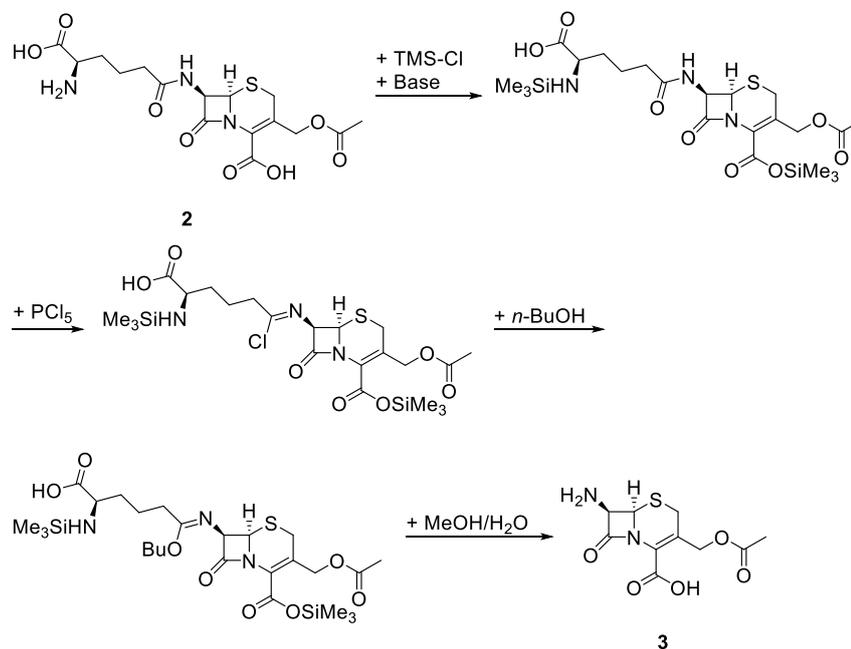
Im Rahmen einer Jubiläumsausgabe der Zeitschrift *Chemical & Engineering News* im Jahr 2013 wurden besonders wichtige Durchbrüche in der Chemie der letzten 90 Jahre zusammengestellt.<sup>[9]</sup> Einer dieser Durchbrüche war die Entdeckung der Antibiotika. Diese Medikamentenklasse zeigt einen Meilenstein der Medizingeschichte auf. Beim Vergleich der verordneten Tagesdosen verschiedener Antibiotika in Deutschland im Jahr 2012 (Abbildung 2–1)<sup>[10]</sup> fällt auf, dass mit 47% fast die Hälfte aller verordneten Präparate zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika gehören.

*Alexander Flemming* entdeckte im Jahr 1928 bei Experimenten mit Staphylokokken, dass auf einer mit einem Schimmelpilz verunreinigten Kulturprobe um den Schimmelpilz herum keine Staphylokokken wuchsen.<sup>[11]</sup> In dessen Folge konnte er zeigen, dass Schimmelpilze der Art *Penicillium chrysogenum* eine antibakterielle Substanz absondern, die Bakterienwachstum verhindern kann. Es dauerte jedoch zwölf weitere Jahre bis *Chain* und *Florey* die erste klinische Studie durchführten und in deren Folge 1945 die erste Massenproduktion von Penicillin startete.<sup>[12,13]</sup>



**Abbildung 2–1:** Anteil verordneter Tagesdosen verschiedener Antibiotikaklassen in Deutschland im Jahr 2012.<sup>[10]</sup>

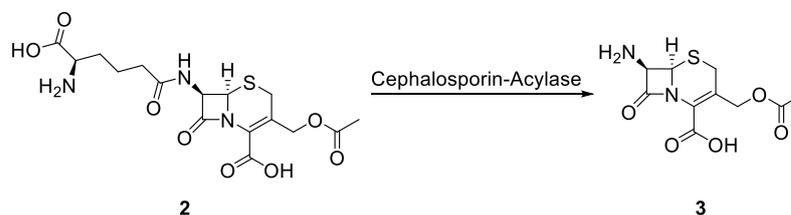
Für die Entdeckung und die klinischen Studien zur Anwendung von Penicillin erhielten *Flemming, Chain* und *Florey* im Jahr 1945 den Nobelpreis für Physiologie. Zudem wurde in den 1940er Jahren im Mittelmeer von *Brotzu* ein Schimmelpilz der Gattung *Cephalosporium acremonium* (heute *Acremonium chrysogenum*) gefunden, der ähnliche Eigenschaften wie der von *Flemming* entdeckte Schimmelpilz aufweist.<sup>[14,15]</sup> Da *Brotzu* apparativ nicht in der Lage war, die antibakterielle Komponente zu isolieren, wandte er sich 1948 an *Newton*, dem zusammen mit *Abraham* die Isolierung von Cephalosporin C (**2**) gelang.<sup>[14,15]</sup> Cephalosporin C (**2**) weist aber nur eine geringe antibakterielle Wirkung auf, sodass in der Folgezeit verschiedene semisynthetische Derivate der 7-Aminocephalosporansäure (**3**), abgekürzt 7-ACA, entwickelt wurden. 7-ACA (**3**) wird dabei aus Cephalosporin C (**2**) hergestellt (Abbildung 2–2).<sup>[16]</sup> Diese Synthese ist sehr anspruchsvoll, da neben der zu hydrolysierenden Amidbindung außerdem noch die relativ labile  $\beta$ -Lactambindung vorliegt. In der klassischen Synthese wird die freie Aminfunktion über eine Silylgruppe geschützt. Anschließend wird unter Verwendung von Phosphorpentachlorid ein Imidchlorid hergestellt, das mit *n*-Butanol zum Imidoester umgesetzt wird. Im letzten Reaktionsschritt werden Schutzgruppe und Imidoestergruppe abgespalten und das Produkt 7-ACA (**3**) erhalten.



**Abbildung 2–2:** Klassisch chemischer Prozess der Synthese von 7-ACA (**3**) ausgehend von Cephalosporin C (**2**).<sup>[16]</sup>

Neben dieser klassischen Variante ist auch eine enzymatische Variante bekannt, bei der eine Mutante einer Glutarylamidase, genannt Cephalosporin-Acylase, selektiv die gewünschte Amidbindung hydrolysiert (Abbildung 2–3).<sup>[16]</sup> Für die Synthese von 7-ACA (**3**) aus

fermentativ hergestelltem Cephalosporin C (**2**) ist ein ökonomisch und ökologisch attraktiver biokatalysierter Prozess bekannt.<sup>[16]</sup>

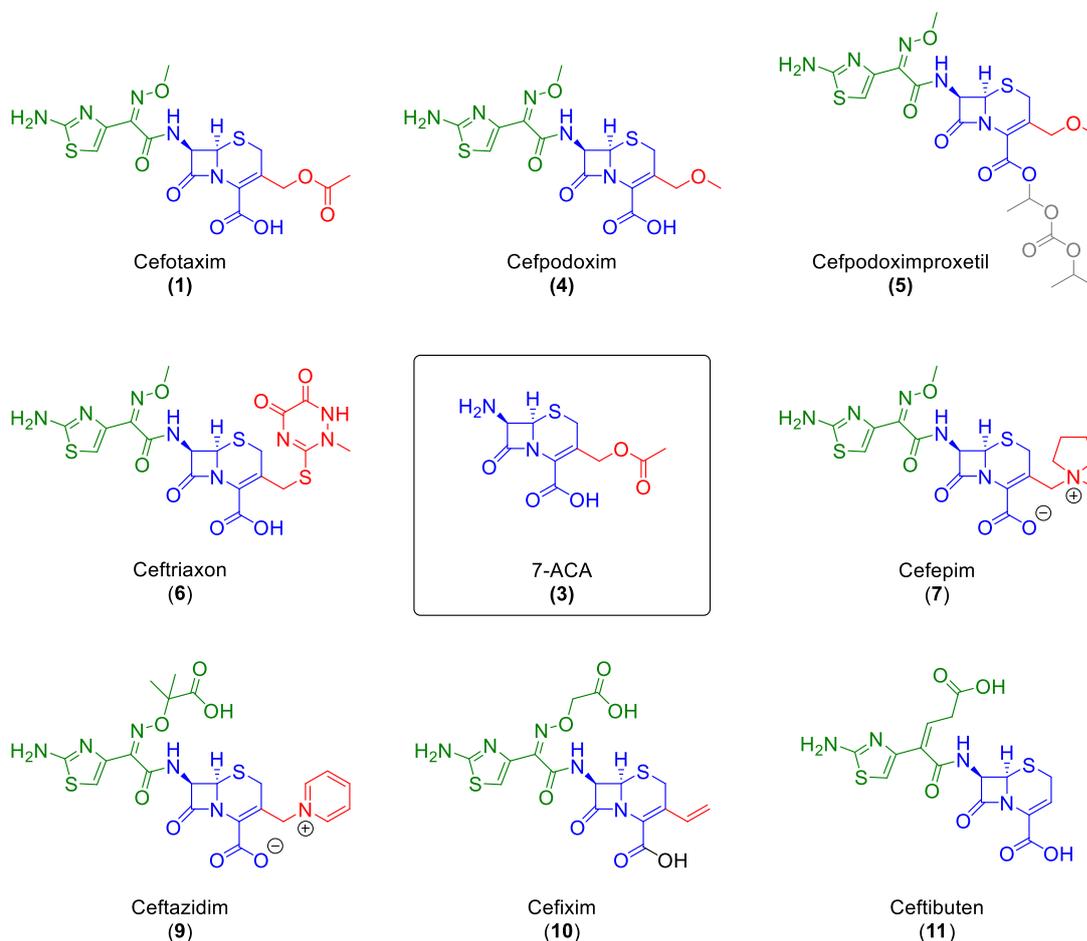


**Abbildung 2–3:** Enzymatischer Prozess der Synthese von 7-ACA (**3**) ausgehend von Cephalosporin C (**2**).<sup>[16]</sup>

Im weltweiten Vergleich der Einnahmen von Antibiotika hatten die Cephalosporin-Antibiotika im Jahr 2004 einen Anteil von 30%, während die Penicilline einen Anteil von 16% aufwiesen.<sup>[17]</sup> Dies zeigt mit insgesamt 46% die hohe Bedeutung der  $\beta$ -Lactam-basierten Antibiotika. Penicilline und Cephalosporine haben denselben Wirkmechanismus. Bei der Bakterienvermehrung wird die Peptidoglycan-Quervernetzung in den Zellwänden gehemmt, sodass die instabileren Zellwände der Bakterien aufreißen und das Bakterienwachstum verhindern.<sup>[15,17–19]</sup>

Wie bereits erwähnt ist 7-ACA (**3**) meist das Ausgangsmaterial für die Synthese semisynthetischer Cephalosporin-Antibiotika. Beispiele für verschiedene Cephalosporin-Antibiotika der dritten und vierten Generation sind in Abbildung 2–4 gezeigt.<sup>[19,20]</sup> Anhand dieser Übersicht ist deutlich zu sehen, dass das bicyclische System aus dem  $\beta$ -Lactamring und dem Hydrothiazinring (blaue Markierung) das Grundgerüst der gezeigten Cephalosporin-Antibiotika ist. Dieses Grundgerüst kann in verschiedenen Positionen derivatisiert werden, um eine Vielzahl verschiedener Wirkstoffe zu erhalten. Der eigentliche Grundstoff 7-ACA (**3**) ist in 7-Position unsubstituiert und in 4-Position an der Carboxylgruppe unverestert. In 3-Position besitzt das Molekül an der Methylengruppe einen zum Acetat veresterten Alkohol. Die gezeigten Wirkstoffe zeigen in 7-Position alle eine recht ähnliche Derivatisierung (grüne Markierung). Die fünf Wirkstoffe Cefotaxim (**1**), Cefpodoxim (**4**), Cefpodoximproxetil (**5**), Ceftriaxon (**6**) und Cefepim (**7**) wurden mit der (Z)-(2-Aminothiazol-4-yl)-methoxyiminoessigsäure (**8**) (abgekürzt ATMO-Säure) amidiert, welche als wiederkehrendes Strukturmerkmal auftritt. Ceftazidim (**9**) und Cefixim (**10**) sind mit ATMO-ähnlichen Säuren derivatisiert. Der einzige Unterschied ist eine veränderte Seitenkette der Oximfunktion mit freier Carbonsäure. Ein deutlicherer Unterschied ist bei dem Wirkstoff

Ceftibuten (**11**) zu erkennen. Hier liegt anstelle der Oximfunktion eine einfache Doppelbindung vor. Dieses Grundgerüst ist jedoch von der Molekülgeometrie ähnlich, da es sich bei beiden Funktionen um planare Systeme handelt. Auch dieses Molekül weist eine freie Säure auf, was wiederum eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Wirkstoffen Ceftazidim (**9**) und Cefixim (**10**) darstellt.



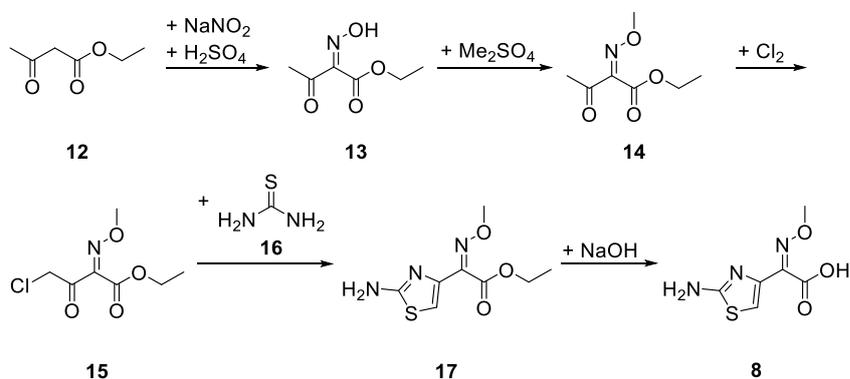
**Abbildung 2–4:** Beispiele für verschiedene Cephalosporin-Antibiotika der dritten und vierten Generation mit 7-ACA (**3**) (Mitte) als Ausgangsmaterial.<sup>[19,20]</sup>

In 4-Position ist das Spektrum an möglichen Derivaten noch geringer. Einzig der Wirkstoff Cefpodoximproxetil (**5**) ist in 4-Position verestert, was zu einer veränderten Reaktivität führt (Kapitel 3.1.). Die größte Varianz der Wirkstoffe liegt bei der Derivatisierung in 3-Position vor. Diese reicht von einem einfachen Proton im Ceftibuten (**11**) über Ethergruppen im Cefpodoxim (**4**) und Cefpodoximproxetil (**5**) und einer Estergruppe im Cefotaxim (**1**) bis hin zu der ungesättigten Verbindung Cefixim (**10**) oder Heterozyklen wie in Ceftriaxon (**6**), Cefepim (**7**) und Ceftazidim (**9**). Eine Besonderheit sind dabei die beiden zuletzt genannten Wirkstoffe Cefepim (**7**) und Ceftazidim (**9**), welche eine kationische Struktur in der Seitenkette aufweisen. Es ist somit deutlich zu erkennen, dass das Spektrum für Substituenten in 3-Position sehr groß

ist, während die Substituenten in 7-Position zueinander sehr ähnlich sind. Die in der Seitenkette wiederkehrende Grundstruktur der Oximfunktion ist von besonderer Relevanz, da die Oximfunktion die Lactamfunktion abdeckt und somit vor dem Angriff von  $\beta$ -Lactamasen schützt. Während für die Synthese des Grundstoffes 7-ACA (**3**) eine ökonomisch und ökologisch attraktive Synthese aus Fermentation und Biokatalyse bekannt ist, ist die Produktion der semisynthetischen Derivate aus ökologischer Sicht ungünstig. Um eine attraktivere Synthese zu finden, wird in dieser Arbeit die Derivatisierung der 7-Position mittels Amidierung untersucht. Wie bereits erläutert, weisen die Substituenten der Cephalosporine der dritten und vierten Generation in der 7-Position ein wiederkehrendes und stark ähnliches Strukturmerkmal auf (vgl. Abbildung 2–4).

### 2.1.2. Amidierung von 7-ACA (**3**) oder deren Derivaten in 7-Position

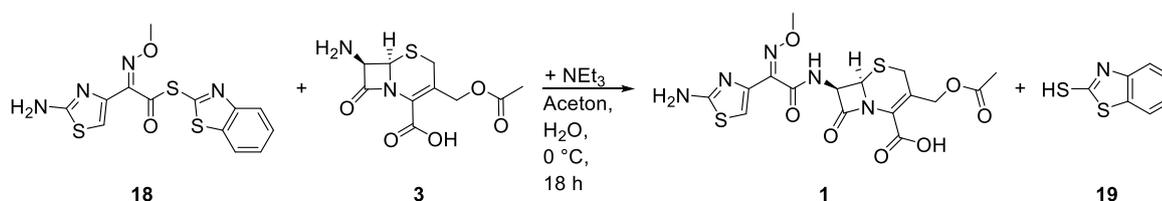
Das wiederkehrende Strukturmerkmal der Cephalosporine der dritten und vierten Generation ist der ATMO-Säurerest oder Derivate in der Oximseitenkette. Die Säure **8** wird dabei in einer fünfstufigen Synthese ausgehend von Acetessigsäureethylester (**12**) dargestellt (Abbildung 2–5). Im ersten Schritt wird mit einem Elektronenpaar des aciden Kohlenstoffatoms der  $\beta$ -Carbonylverbindung **12** an einem Nitrosylkation angegriffen, um das Oxim **13** zu erhalten. Dieses wird unter Verwendung von Dimethylsulfat zum Oximether **14** umgesetzt, der anschließend halogeniert wird, um die  $\alpha$ -Halogencarbonylverbindung **15** zu erhalten. Unter Verwendung von Thioharnstoff (**16**) wird der Heterozyklus **17** ausgebildet, der unter basischen Bedingungen zur gewünschten ATMO-Säure (**8**) hydrolysiert wird.



**Abbildung 2–5:** Synthese der ATMO-Säure (**8**) ausgehend von Acetessigsäureethylester (**12**).

Für die Ausbildung einer Amidbindung aus einer Säure und einem Amin sind entweder harsche Bedingungen wie das Heizen zum Rückfluss unter Wasserabscheidung, die Verwendung von Kopplungsreagenzien oder eine andere Form der Aktivierung nötig. Da die verwendeten

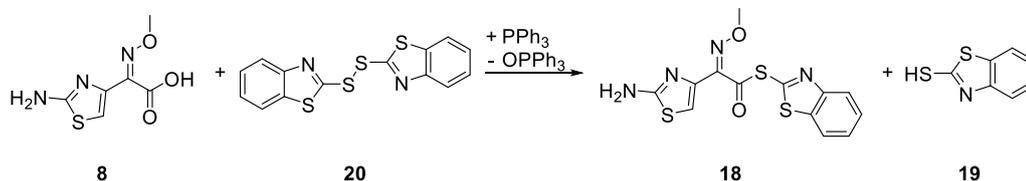
$\beta$ -Lactamverbindungen nicht sonderlich stabil sind, ist es wichtig, unter milden Bedingungen zu arbeiten. Dies führt zu der Verwendung von Kopplungsreagenzien oder einer anderen schonenden Aktivierung zur Ausbildung der Amidbindung. Die ATMO-Säure (**8**) enthält neben der Carboxylatgruppe eine Aminofunktion, die für den gewünschten Amidierungsschritt mit 7-ACA (**3**) problematisch sein kann. Die aromatische Aminfunktion sollte durch einen negativen mesomeren Effekt des aromatischen Ringes eine geringere Nucleophilie als die sekundäre Aminogruppe im gewünschten Amidonor 7-ACA (**3**) aufweisen. Jedoch würde eine zu starke Aktivierung der Säurefunktion zu einer Dimerbildung führen. Diese Problematik kann über verschiedene Ansätze umgangen werden. Der erste mögliche Ansatz ist eine genaue Einstellung der Aktivierung über die Wahl eines geeigneten Reagenzes. Für diese Reaktion muss die Aktivierung gerade so hoch sein, dass die Nucleophilie der Aminogruppe im 7-ACA (**3**) hoch genug, die der aromatischen Aminogruppe eines zweiten Moleküls der ATMO-Säure (**8**) jedoch nicht ausreichend ist. Eines der gängigsten Reagenzien und der Standardprozess für die Amidierung der 7-Position vieler semisynthetischer Cephalosporine ist die Verwendung des Aktivesters 2-Mercaptobenzothiazol-(Z)-2-methoxyimino-2-(2-aminothiazol-4-en)thioacetat (**18**), abgekürzt MAEM (Abbildung 2–6).<sup>[21–28]</sup> Bei der Verwendung des Aktivesters MAEM (**18**) ist die Aktivierung so groß, dass eine Reaktion von MAEM (**18**) mit 7-ACA (**3**) bei 0 °C und 18 Stunden Reaktionszeit vollständig abläuft, ohne dass eine Selbstkondensation mit einem weiteren Molekül des Aktivesters **18** stattfindet.



**Abbildung 2–6:** Synthese von Cefotaxim (**1**) mit dem Aktivester MAEM (**18**).<sup>[21–28]</sup>

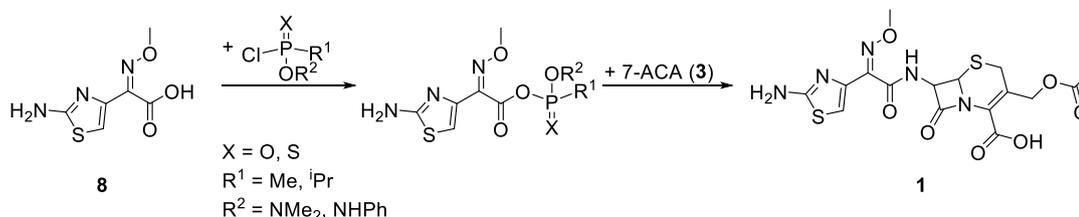
Die Verwendung von MAEM (**18**) ergibt eine aus ökonomischer und ökologischer Sicht attraktive Synthese, bei der allerdings die Seitenkette 2-Mercaptobenzothiazol (**19**) mit ihrer hohen Molekülmasse und ihrer eventuell krebsauslösenden Wirkung einen negativen Faktor darstellt. Unter Betrachtung der Synthese des Aktivesters **18**, die für eine vollständige Beurteilung unerlässlich ist, wird jedoch deutlich, dass die Verwendung von MAEM (**18**) aus ökologischer Sicht deutliche Nachteile aufweist (Abbildung 2–7).<sup>[29,30]</sup> So werden für die Synthese des Aktivesters **18** das Disulfid **20** und Triphenylphosphan in stöchiometrischen Mengen benötigt. Somit beinhaltet die reale Abfallmenge zwei Äquivalente des 2-Mercaptobenzothiazols (**19**) und ein Äquivalent Triphenylphosphanoxid. Diese hohen

Abfallmengen führen zu einem ungünstigen Verfahren. Darüber hinaus macht das krebserregende 2-Mercaptobenzothiazol (**19**) dieses Standardverfahren unattraktiv für die Synthese von Cephalosporin-Antibiotika.<sup>[31]</sup>



**Abbildung 2–7:** Herstellung des Aktivesters MAEM (**18**) ausgehend von ATMO-Säure (**8**) und dem Disulfid **20** unter Verwendung von Triphenylphosphan.<sup>[29,30]</sup>

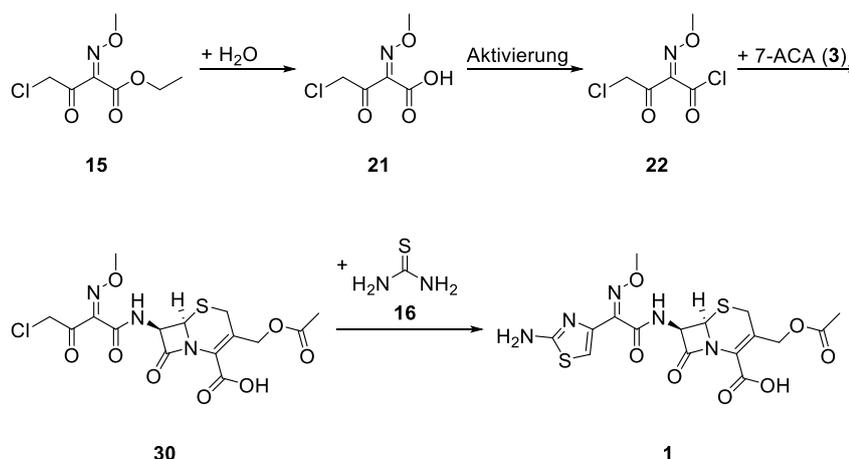
Neben der Verwendung von schwefelhaltigen Aktivestern testeten *Yoon et al.* die Verwendung von Organophosphat- und Thioorganophosphatverbindungen als mögliche Kopplungsreagenzien zur Aktivierung der ATMO-Säure (**8**) (Abbildung 2–8).<sup>[32]</sup> Problematisch bei der Verwendung von oft auch als Insektizid verwendeten Organophosphorverbindungen sind negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, indem sie die Acetylcholinesterase irreversibel hemmen und somit einen Abbau des Acetylcholins verhindern, was schwerwiegende Folgen bis hin zum Tod haben kann.<sup>[33]</sup> Die Gesundheitsgefahren der Organophosphorverbindungen in einer späten Stufe der Synthese senken daher die Attraktivität für ihren Einsatz als Kopplungsreagenzien.



**Abbildung 2–8:** Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von Organophosphat- und Thioorganophosphatverbindungen als Kopplungsreagenzien.<sup>[32]</sup>

Neben der gezielten Aktivierung gibt es zwei weitere Möglichkeiten die Amidierung der Aminofunktion der ATMO-Säure (**8**) zu verhindern. Eine Methode ist eine Umkehr der Synthesesequenz, sodass die ATMO-Säure (**8**) nicht komplett synthetisiert wird (Abbildung 2–9).<sup>[34–40]</sup> Dabei wird die  $\alpha$ -Halogen-carbonylverbindung **15** nicht direkt mit Thioharnstoff (**16**) umgesetzt, sondern erst die Estergruppe hydrolysiert, um die freie Säure **21** zu erhalten. Die Säure wird anschließend aktiviert, beispielsweise zum Säurechlorid **22**. Diese Aktivierung ist möglich, da die Aminofunktion erst später ins Molekül eingeführt wird und somit eine Amidierung mit einem weiteren Molekül nicht möglich ist. Nach Umsetzung mit dem

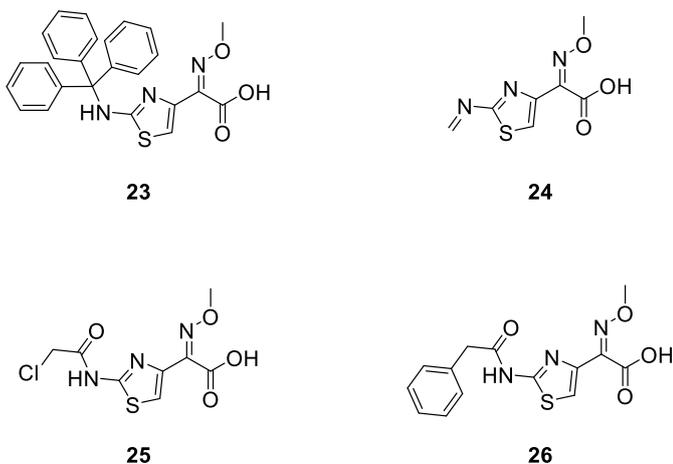
$\beta$ -Lactam, in diesem Fall 7-ACA (**3**), erfolgt der Ringschluss mit Thioharnstoff (**16**), um Cefotaxim (**1**) zu erhalten. Diese Variante wird offenkettige Darstellung genannt, da die Seitenkette erst im nicht-zyklischen Zustand **21** aktiviert und amidiert wird, bevor mit Thioharnstoff (**16**) der Ringschluss erfolgt. Beispiele für die offenkettige Variante gibt es unter anderem für die Synthesen von Cefotaxim (**1**), Ceftiofur, Ceftriaxon (**6**), Cefepim (**7**) und Cefpodoximproxetil (**5**).<sup>[34–40]</sup> Nachteilig bei diesem Verfahren ist der Einsatz von Thioharnstoff (**16**) in einer späten Reaktionsstufe, da dieser vermutlich eine krebserzeugende und teratogene Wirkung aufweist.<sup>[41]</sup>



**Abbildung 2–9:** Offenkettiges Verfahren für die Synthese von Cefotaxim mit Aktivierung über das Säurechlorid **22**.<sup>[34–40]</sup>

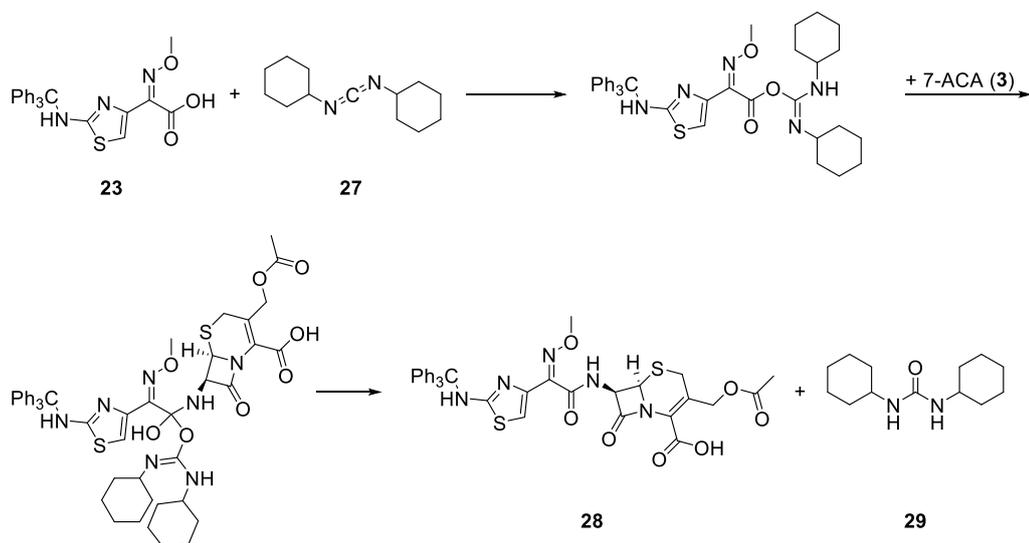
Neben der späteren Einführung der Aminofunktion im offenkettigen Verfahren gibt es auch die Möglichkeit der Verwendung von Schutzgruppen, um die Aminfunktion zu schützen. In der Literatur werden vermehrt vier verschiedene Schutzgruppen für die Aminfunktion der ATMO-Säure (**8**) genannt (Abbildung 2–10). Eine klassische, weit verbreitete Schutzgruppe in der Cephalosporin-Chemie ist die Tritylgruppe zur Schützung des Amins der ATMO-Säure **23**.<sup>[42–46]</sup> Eine weitere in der Literatur oftmals verwendete Schutzgruppe ist die Formylgruppe zur Schützung des Amins der ATMO-Säure **24**.<sup>[38,47]</sup> Beide Schutzgruppen können dabei unter sauren Bedingungen entfernt werden. Eine weitere oftmals eingesetzte Schutzgruppe ist die Chloracetylgruppe zur Schützung des Amins der ATMO-Säure **25**, ebenfalls in Abbildung 2–10 gezeigt. Diese Seitenkette kann durch den Einsatz von Thioharnstoff (**16**) entfernt werden, was als später Reaktionsschritt ebenfalls aufgrund der Gesundheitsgefahren von Thioharnstoff (**16**) ungünstig ist. Eine weitere geschützte ATMO-Säure-Variante ist die phenylelessigsäuregeschützte ATMO-Säure **26**.<sup>[48]</sup> Ein Vorteil bei der Verwendung dieser Schutzgruppe ist die sehr einfache Entfernung mittels enzymatischer Hydrolyse, da mit der

Penicillin-Acylase ein hochselektives Enzym für die Abspaltung der Phenyllessigsäure zur Verfügung steht.<sup>[48]</sup>



**Abbildung 2–10:** Geschützte ATMO-Säuren mit gängigen Schutzgruppen in der Cephalosporinchemie.

Sowohl für die Kopplung geschützter ATMO-Säuren als auch für die Kopplung der offenkettigen Säure **21** mit verschiedenen  $\beta$ -Lactambausteinen können klassische Aktivierungsmethoden verwendet werden. Ein bedeutendes Kopplungsreagenz ist dabei das Dicyclohexylcarbodiimid (**27**), das in der Peptidchemie weit verbreitet ist (Abbildung 2–11).<sup>[49]</sup>

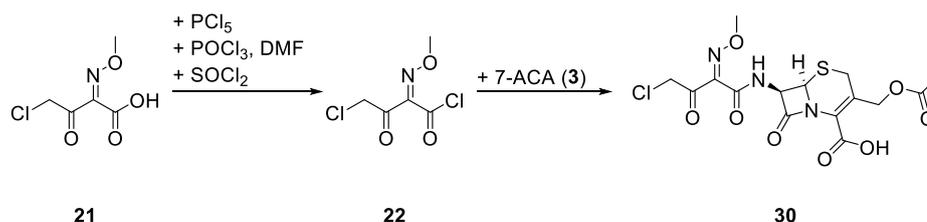


**Abbildung 2–11:** Aktivierung der Trityl-ATMO-Säure (**23**) unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (**27**).<sup>[42–44,49]</sup>

Während ein Stickstoffatom der Diimidfunktion von **27** die geschützte Säure **23** deprotoniert, kann das Carboxylation nukleophil am Kohlenstoff der Diimidfunktion angreifen. Der

gebildete O-Acylharnstoff wird nukleophil von der Aminfunktion von 7-ACA (**3**) angegriffen und nach Deprotonierung der entstandenen Hydroxyfunktion entstehen das geschützte Cefotaxim **28** und das Harnstoffderivat **29**. Die Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (**27**) als Kopplungsreagenz hat zwei bedeutende Nachteile. Dies ist zum einen die hohe Masse des als Abfallprodukt entstehenden Harnstoffderivats **29** und zum anderen die teilweise komplizierte Abtrennung dieses Moleküls. Trotz dieser Nachteile gibt es jedoch mehrere Beispiele für die Anwendung dieses Kopplungsreagenzes in der Synthese von semisynthetischen Cephalosporinen.<sup>[42–44,48]</sup>

Neben der Verwendung von Kopplungsreagenzien ist die Aktivierung über ein Säurechlorid ein Standardverfahren in der Amidsynthese (Abbildung 2–12). Die beispielsweise offenkettige Vorstufe **21** wird mit Chlorierungsreagenzien wie Thionylchlorid, Phosphorpentachlorid oder dem *Vilsmeier*-Reagenz, welches aus Dimethylformamid und Phosphoroxotrichlorid oder Oxalsäurechlorid hergestellt wird, in das Säurechlorid **22** umgewandelt. Das aktivierte Säurechlorid reagiert anschließend mit der Aminfunktion der 7-ACA (**3**) und die Cefotaximvorstufe **30** wird gebildet. In der Literatur zur Herstellung der semisynthetischen Cephalosporine gibt es eine Vielzahl von Beispielen für diesen Reaktionsweg. Dabei werden sowohl die geschützten ATMO-Säuren als auch die offenkettigen ATMO-Säure-Vorstufen mit Phosphorpentachlorid oder dem *Vilsmeier*-Reagenz in die jeweiligen Säurechloride umgewandelt.<sup>[34–38,45–47,50,51]</sup>



**Abbildung 2–12:** Verschiedene Aktivierungen der offenkettigen ATMO-Vorstufe **21** über die Stufe des aktivierten Säurechlorids **22**.<sup>[34–37]</sup>

Wie bereits beschrieben ist die Aktivierung zum Säurechlorid aber nur möglich, wenn keine freie Aminfunktion in der Säure vorliegt. Das bedeutet, dass entweder die offenkettige Vorstufe **21** oder eine geschützte ATMO-Säure verwendet werden muss. Bei der Verwendung der offenkettigen Vorstufe ist der Ringschluss auf einer späten Stufe mit dem Reagenz Thioharnstoff (**16**) wie bereits beschrieben problematisch. Die weitere Alternative ist die Verwendung von Schutzgruppen, die jedoch die Nachteile von zwei weiteren

Reaktionsschritten, der Einbringung und der Entfernung der Schutzgruppe und einer erhöhten Abfallproduktion aufweist.

### 2.1.3. Mikroreaktionstechnik

Im Jahr 2012 stellte *Chatterjee* in einem Vortrag der *Food and Drug Administration* die These vor, dass in den nächsten 25 Jahren eine deutliche Veränderung in der Produktion von Pharmazeutika erfolgen wird. Dabei ist davon auszugehen, dass die im Moment noch weit verbreitete *Batch*-Strategie von einer umweltfreundlicheren, flexibleren und effizienteren kontinuierlichen Produktion abgelöst wird.<sup>[52]</sup> Eine Variante der kontinuierlichen Produktion ist die Mikroreaktionstechnik, die ein *Flow-Setup* mit Mikrostrukturen für eine gezielte Reaktionsführung verwendet.<sup>[53]</sup> Mikroreaktoren weisen Mikrostrukturen im Bereich von 100 µm bis maximal 1 mm auf.<sup>[54]</sup> Aus diesen sehr kleinen Kapillaren resultiert ein hohes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, was einen hohen Wärmeaustausch begünstigt.<sup>[55–60]</sup> Dadurch wird ein sehr schnelles Temperieren der Reaktionsmischung ermöglicht, was sich positiv auf die Ausbeute und Selektivität einer Reaktion auswirken kann.<sup>[55,56,59]</sup> So kann beispielsweise für eine Reaktion die im *Batch*-Prozess innerhalb von zwei Minuten auf 50 °C erwärmt wird aufgrund von Nebenreaktionen nur eine Ausbeute von 25% erzielt werden. Im Mikroreaktor kann durch die schnelle Temperierung mit geringen Modifikationen für die gleiche Reaktion eine Ausbeute von 95% erzielt werden.<sup>[58]</sup>

Ein weiterer Vorteil in der Mikroreaktionstechnik sind sehr kurze Mischungszeiten im Bereich von Millisekunden.<sup>[61]</sup> Die kurzen Mischungszeiten und die hohe Wärmeabfuhr ermöglichen eine hohe Reaktionskontrolle und somit auch die Durchführung von stark exothermen Reaktionen, die in einem größeren Maßstab nicht kontrollierbar wären.<sup>[60]</sup> Darüber hinaus führt das kleinere Volumen der Apparatur zu einer Steigerung der Sicherheit, da somit stets kleine Mengen der Reaktionsmischung in der Apparatur vorliegen.<sup>[57,59,62]</sup> Somit ist ein Verlust der Kontrolle über die durchgeführten Reaktionen nahezu ausgeschlossen. Neben den physikalischen Gefahren, die über die Verwendung eines Mikroreaktors umgangen werden können, ist auch die Handhabung von äußerst toxischen Substanzen wie Blausäure, Phosgen (31) und Diazomethan beschrieben, die in der Apparatur erzeugt und direkt wieder verbraucht werden.<sup>[63–65]</sup> Die kleinen Mengen im Mikroreaktor sorgen selbst bei einem Störfall nur für eine geringe Gefährdung.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Mikroreaktoren ist die genaue Einstellung der Reaktionszeit. Diese lässt sich über das Volumen des Reaktors und die Pumpgeschwindigkeit der einzelnen Stoffströme sehr genau berechnen.<sup>[55,56]</sup> Diese genaue Steuerung der Reaktionsgeschwindigkeit macht die Mikroreaktionstechnik interessant für die Anwendung in *Screening*-Prozessen. Ein Beispiel dafür ist das *Screening* für die Entwicklung einer Epoxidhydrolase, die über gerichtete Evolution aus einem Wildtyp entwickelt wurde.<sup>[66]</sup> Für die Analytik der Enantioselektivität der untersuchten Reaktion wurde eine chirale Elektrophorese im Mikroreaktor installiert, mit der die Enantiomere von Edukt und Produkt innerhalb von 90 Sekunden erfolgreich getrennt werden konnten.<sup>[66]</sup> Neben dieser Analytik gibt es bereits Massenspektrometrie, IR-Spektroskopie, UV/VIS-Spektroskopie, sowie niedrig aufgelöste NMR-Spektroskopie als *online*-Analytik.<sup>[53]</sup> Unter Verwendung dieser Verfahren lassen sich bereits eine Vielzahl von Prozessen überwachen. Jedoch ersetzen diese Verfahren nicht die in vielen Fällen benötigten *offline*-Analytiken HPLC, LC-MS, GC-MS und hoch aufgelöste NMR-Spektroskopie.<sup>[53]</sup>

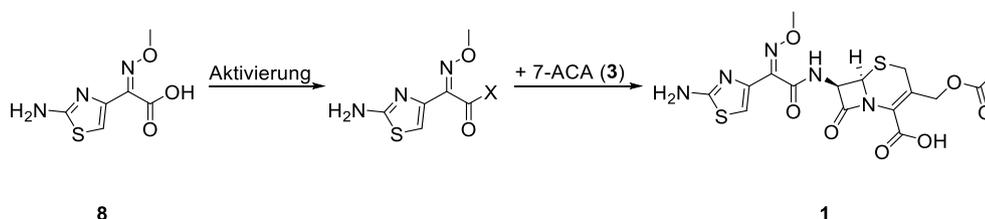
Ein weiterer großer Vorteil der Mikroreaktionstechnik liegt im Bereich des *Upscalings*. Gerade exotherme Reaktionen im *Batch* weisen Probleme im Prozess des *Upscalings* auf. Bei der Vergrößerung eines *Batch*-Reaktors sinkt das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis deutlich ab. Folgen hiervon sind ein deutlich schlechterer Wärmetransport und somit eine schlechter zu kontrollierende Reaktion.<sup>[55,56]</sup> Bei der Verwendung von Mikroreaktoren besteht dieses Problem nicht, da in diesem Fall kein *Upscaling*, sondern ein *Numbering up* betrieben wird. Es wird nicht der eigentliche Reaktor vergrößert, sondern eine größere Anzahl parallel geschalteter Reaktoren verwendet.<sup>[59,62,65]</sup> Ein weiterer Vorteil des *Numbering ups* ist, dass bei einem Ausfall einzelner Teilanlagen die Produktion keinen vollständigen Stillstand aufweist.

Die Verwendung von Mikroreaktoren weist jedoch auch Limitierungen auf, z.B. die Gefahr des Festsetzens von Substanzen in den feinen Kapillaren durch Ausfallen von Komponenten aus der Reaktionslösung.<sup>[53]</sup> Daher ist der Einsatz von Feststoffen bei der Verwendung von Mikroreaktoren nicht möglich.<sup>[53]</sup>

## 2.2. Motivation und Zielsetzung

Während das Grundgerüst aller Cephalosporin-Antibiotika 7-ACA (**3**) im Rahmen eines Prozesses aus Fermentation und Biokatalyse aus ökonomischer und ökologischer Sicht sehr gut zugänglich ist, ist der Zugang zu semisynthetischen Cephalosporin-Antibiotika hingegen gerade aus ökologischer Sicht unattraktiv. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der Substituenten in 7-Position soll die Derivatisierung in 7-Position genauer betrachtet werden. Der am häufigsten genutzte Prozess über die Verwendung des Aktivesters MAEM (**18**) ist aus Sicht der Abfallbilanz und der Entstehung des für Menschen gefährlichen Nebenproduktes 2-Mercaptobenzothiazol (**19**) zu substituieren. Dies gilt auch für die Verwendung von Schutzgruppen für die Aktivierung über die Stufe des Säurechlorids, da auch diese Reaktion zu einer erhöhten Abfallmenge und zwei weiteren Reaktionsschritten führt. Die Verwendung von Thioharnstoff (**16**) auf einer späten Reaktionsstufe ist problematisch bei der Verwendung des offenkettigen Verfahrens.

Aufgrund dessen soll als Modellreaktion für die Derivatisierung der 7-Position die Amidierung des Grundbausteins 7-ACA (**3**) mit der am häufigsten verwendeten Seitenkette, der ATMO-Säure (**8**), betrachtet und optimiert werden (Abbildung 2–13). Es soll dabei die ATMO-Säure (**8**) aktiviert und anschließend mit dem  $\beta$ -Lactam **3** umgesetzt werden. Im Anschluss soll dieser Prozess auf verschiedene weitere Reaktionen als Plattformprozess für die Derivatisierung in 7-Position übertragen werden und abschließend auf ein einfaches Mikroreaktions-*Setup* angewendet werden. Dies entspricht dann dem Startpunkt, an dem die *Proবাদis Hochschule Frankfurt*, einer der Kooperationspartner des *Procef*-Projekts, außerdem bestehend aus der *Sandoz GmbH*, der *Invenios Europe GmbH* und der *Universität Bielefeld*, die Reaktion weiter untersuchen und optimieren soll.

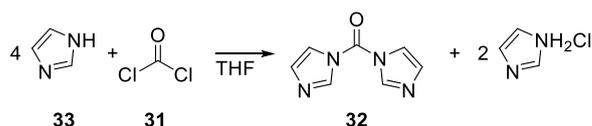


**Abbildung 2–13:** Geplante Syntheseroute für die Synthese von Cefotaxim (**1**) ausgehend von ATMO-Säure (**8**).

## 2.3. Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz

### 2.3.1. Stand der Wissenschaft

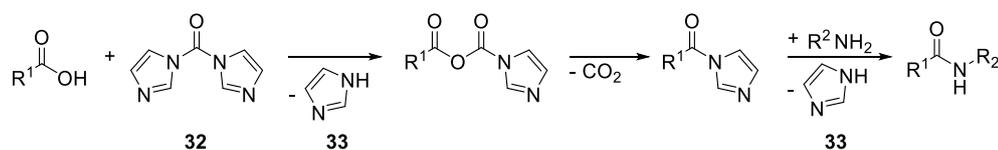
Bereits in den 1960er Jahren führten *Staab et al.* Untersuchungen zur Stabilität und Reaktivität von *N*-Acylheterocyclen durch und kamen zu der Überlegung, dass das Strukturelement eines Carbonyldiimidazols, das formal eine stabile Harnstoffeinheit besitzt, eine auch aus präparativer Sicht interessante Reaktivität aufweisen müsste.<sup>[67]</sup> Die einfachste Struktureinheit dieser Gruppe ist das Carbonyldiimidazol (32), das aus vier Äquivalenten Imidazol (33) und Phosgen (31) hergestellt werden kann (Abbildung 2–14).<sup>[67,68]</sup> Der Überschuss an Imidazol (33) fängt den entstehenden Chlorwasserstoff als unlösliches Imidazolhydrochlorid und verschiebt somit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produkts 32.



**Abbildung 2–14:** Synthese von Carbonyldiimidazol (32) aus vier Äquivalenten Imidazol (33) und Phosgen (31).<sup>[67,68]</sup>

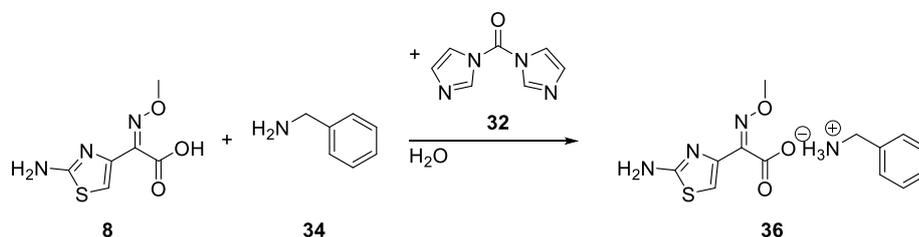
*Staab et al.* konnten die Synthese von Carbonaten, Harnstoffderivaten und Carbamaten unter Ersatz von Phosgen (31) durch Carbonyldiimidazol (32) zeigen.<sup>[67,68]</sup> Die Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) zeigt dabei verschiedene Vorteile gegenüber der Verwendung von Phosgen (31). Neben der deutlich einfacheren Handhabung aufgrund der Wägbarkeit des Feststoffs 32 und der hohen Toxizität des Gases Phosgen (31), wird bei der Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) kein Chlorwasserstoff freigesetzt, der während der Reaktion abgefangen werden muss. Die Verwendung von Imidazol (33) ist zwar ein weiterer Kostenfaktor, jedoch ist dieses günstig und kann zurückgewonnen werden.<sup>[68]</sup> Im Folgenden konnten *Paul et al.* zeigen, dass Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz für die Synthese von Amidinen aus Säuren und Aminen geeignet ist.<sup>[69]</sup> Darauf aufbauend konnten wiederum *Staab et al.* zeigen, dass Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz für die Synthese von Hydraziden und Hydroxamsäuren geeignet ist.<sup>[70]</sup> Die Synthese verläuft zweistufig (Abbildung 2–15), wobei im ersten Schritt eine Carbonsäure mit Carbonyldiimidazol (32) reagiert und unter Abgabe eines Imidazols ein gemischtes Anhydrid aus einer Carbonsäure und einer Carbamidsäure gebildet wird. Dieses bildet durch Abspaltung

von Kohlenstoffdioxid ein *N*-Acylimidazol, das mit einem Amin zum gewünschten Amid unter Abspaltung von Imidazol (**33**) reagiert.<sup>[69,70]</sup>



**Abbildung 2–15:** Amidsynthese unter Aktivierung einer Carbonsäure mit Carbonyldiimidazol (**32**).<sup>[69,70]</sup>

Carbonyldiimidazol (**32**) ist auch in der Peptidchemie ein geeignetes Kopplungsmittel. Die Vorteile der Nutzung von Carbonyldiimidazol (**32**) anstelle von Phosgen (**31**) ermöglichten dessen Einsatz in der Peptidsynthese. Bei der Betrachtung von 128 Wirkstoffsynthesen von *AstraZeneca*, *GlaxoSmithKline* und *Pfizer* mit mehr als 1000 Reaktionen wurden 84 Stickstoff-Acylierungen gezählt. Für neun dieser Reaktionen ist Carbonyldiimidazol (**32**) das Mittel der Wahl, was dies als wichtiges Kopplungsreagenz zeigt.<sup>[71]</sup> Beispiele für die Anwendung von Carbonyldiimidazol (**32**) in der industriellen Synthese sind die Prozesse der Herstellung von Sildenafil, Darifenacin und Sunitinib.<sup>[72]</sup> Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Kopplungsreagenzes **32** war es überraschend, dass *Sharma et al.* ungeschützte  $\alpha$ -Aminosäuren mit primären Aminen in Wasser in Gegenwart von Carbonyldiimidazol (**32**) zu den entsprechenden Amiden umsetzen konnten.<sup>[73]</sup> Im Rahmen von Vorarbeiten wurde versucht, ATMO-Säure (**8**) mit dem Modellsubstrat Benzylamin (**34**) in Gegenwart von Carbonyldiimidazol (**32**) zum gewünschten ATMO-Säurebenzylamid (**35**) umzusetzen (Abbildung 2–16).<sup>[74]</sup>



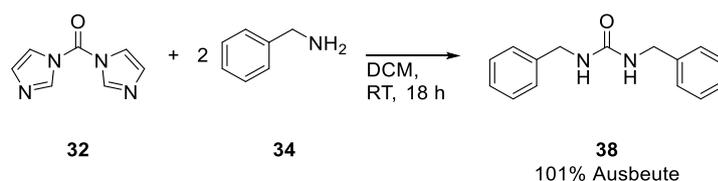
**Abbildung 2–16:** Umsetzung von ATMO-Säure (**8**) mit Benzylamin (**34**) in Wasser in Gegenwart des Kopplungsreagenzes **32**.<sup>[74]</sup>

Anstelle des gewünschten Produktes **35**, das nur in Spuren im Massenspektrum zu beobachten war, wurde jedoch das Produkt der einfachen Säure-Base-Reaktion, das Benzylammonium-ATMO-Salz (**36**), als Hauptprodukt identifiziert.<sup>[74]</sup> Die wahrscheinlichste

Erklärung dafür ist eine schnelle Hydrolyse des Kopplungsreagenzes **32**, das somit nur eine sehr geringe Produktbildung ermöglichte. Die geringe Produktbildung der Reaktion zeigt aber eine vorhandene Aktivierung der ATMO-Säure (**8**).

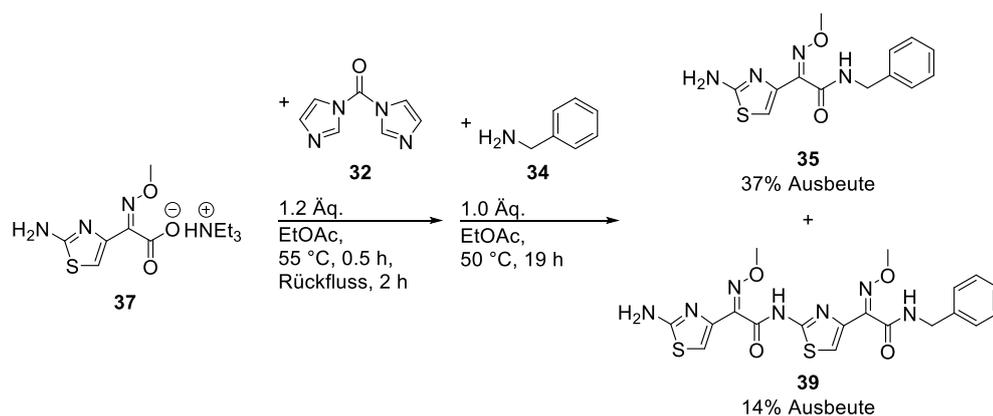
### 2.3.2. Ergebnisse und Diskussion

Um das gewünschte ATMO-Säurebenzylamid (**35**) darzustellen, wird zunächst in einer Neutralisationsreaktion ein Triethylammonium-ATMO-Salz (**37**) hergestellt, da für diesen Ausgangsstoff eine bessere Löslichkeit vermutet wird. Dieses Salz kann ausgehend von ATMO-Säure (**8**) und Triethylamin in einer Neutralisationsreaktion in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Als Referenzverbindung werden weiterhin das aus Vorarbeiten vorhandene ATMO-Säurebenzylamid (**35**) und Dibenzylharnstoff (**38**) verwendet. Der Dibenzylharnstoff (**38**) entsteht bei der Reaktion von nicht umgesetztem Kopplungsreagenz **32** mit Benzylamin (**34**). Das Harnstoffderivat **38** wird im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (Abbildung 2–17).



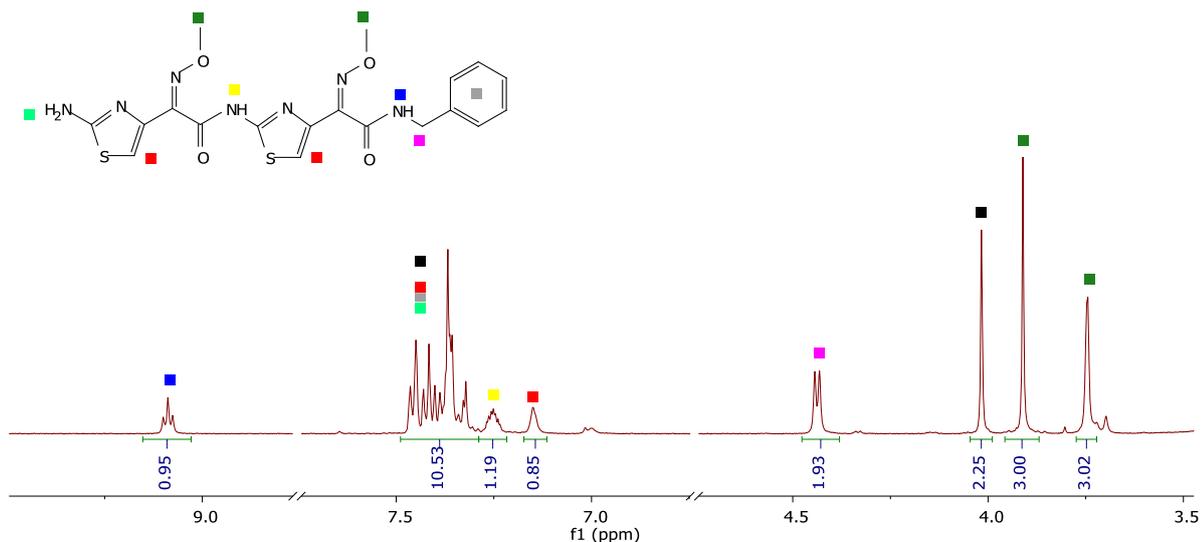
**Abbildung 2–17:** Darstellung von Dibenzylharnstoff (**38**) aus Carbonyldiimidazol (**32**) und Benzylamin (**34**).

Carbonyldiimidazol (**32**) und Benzylamin (**34**) werden dafür über Nacht in Dichlormethan gerührt. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile wird Dibenzylharnstoff (**38**) in quantitativer Ausbeute erhalten. In der Literatur wird Ethylacetat als geeignetes Lösungsmittel für die Kopplung von Amiden beschrieben.<sup>[72]</sup> In einem ersten Versuch wird das Triethylammoniumsalz **37** in Ethylacetat suspendiert, für 30 Minuten auf 55 °C und für zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird nach Zugabe von Benzylamin (**34**) 19 Stunden gerührt (Abbildung 2–18). Während der Reaktion wird eine Feststoffbildung an der Gefäßwand beobachtet. Am Ende der Reaktion wird der entstandene Feststoff filtriert. Das Filtrat wird wässrig aufgearbeitet und alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Daraufhin wird das gewünschte Produkt **35** mit einer Ausbeute von 37% erhalten.



**Abbildung 2–18:** Amidierung zwischen dem Triethylammoniumsalz **37** und Benzylamin (**34**) in Ethylacetat mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz.

Der mittels Filtration isolierte Feststoff wird in Wasser suspendiert, erneut filtriert und mit Ethylacetat gewaschen. Anschließend wird ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in deuteriertem Dimethylsulfoxid, dem einzigen Lösungsmittel, das den Feststoff löst, aufgenommen (Abbildung 2–19). Interessant sind dabei verschiedene Signalsätze, die durch ihre Intensität einem Molekül zugeordnet werden können und im Folgenden erläutert werden sollen. Auffallend ist, dass im Bereich der Signale der Methoxygruppe zwei Signale (dunkelgrüne Markierung) mit einer gleichen Intensität von jeweils drei Protonen vorhanden sind. Dies deutet auf die Bildung eines ATMO-ATMO-Dimers hin. Ebenfalls vorhanden ist ein Dublett (rosa Markierung), dass mit einem Integral von zwei Protonen wahrscheinlich den Protonen in Benzylstellung zugeordnet werden kann. Des Weiteren lässt sich ein Triplet mit gleicher Kopplungskonstante (blaue Markierung) im Tieffeld bei über 9.0 ppm dem gleichen Signalsatz zuweisen. Dieses Proton wird einem Amidproton zugeordnet, das aufgrund der gleichen Kopplungskonstante vermutlich vom Proton am Stickstoffatom des Benzylamids erzeugt wird. Zwei weitere Protonen gehören zu diesem Signalsatz. Das eine ist ein aromatisches Proton aus dem Thiazolring (rote Markierung), das einem Singulett bei etwas über 7.0 ppm zugewiesen werden kann, das andere ist ein weiteres Amidproton, das einem Multiplet im Bereich von 7.3 ppm zugeordnet wird. Es wird aufgrund dieses Signalsatzes davon ausgegangen, dass sich ein ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) gebildet hat. Die hierfür fehlenden Signale würden sich dann in einem gemeinsamen Signal knapp unter 7.5 ppm überlagern. Im Einzelnen wären das die Signale der Aminprotonen (hellgrüne Markierung), des zweiten aromatischen Thiazolringprotons (rote Markierung) und der aromatischen Protonen des Phenylrings (graue Markierung). Des Weiteren müssen in diesem Signal und einem Singulett bei ungefähr 4.0 ppm weitere Protonen einer Verunreinigung unbekannter Art (schwarze Markierung) vorhanden sein.



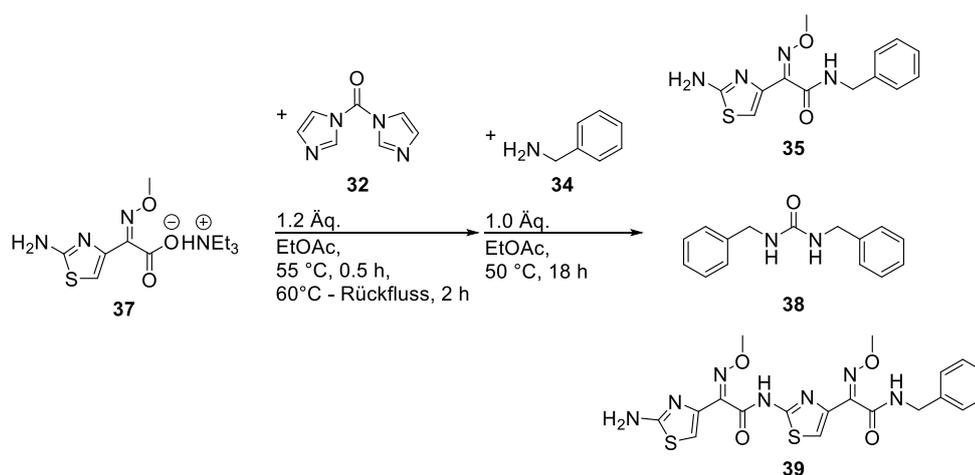
**Abbildung 2–19:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des isolierten Feststoffes der Amidierung zwischen dem Triethylammoniumsalz **37** und Benzylamin (**34**) in Ethylacetat mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz.

Das besagte ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) wurde daraufhin vom Kooperationspartner synthetisiert. Ein Abgleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren bestätigt, dass es sich bei dem Feststoff um verunreinigtes ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) handelt, das mit einer Ausbeute von 14% isoliert werden kann.

Das gefundene ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) weist auf eine zu hohe Aktivierung hin, da somit während der Aktivierungsphase ein ATMO-ATMO-Imidazol gebildet wird, das bei Zugabe von Benzylamin (**34**) mit diesem reagiert. Höhere Homologe dieser Spezies sind ebenfalls denkbar, konnten jedoch ausgehend vom gemessenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nicht identifiziert werden. Daraufhin soll die Aktivierung bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden. Dafür wird das eben genannte Experiment wiederholt und das Triethylammoniumsalz **37** mit Carbonyldiimidazol (**32**) in Ethylacetat suspendiert. Es wird 30 Minuten bei  $55\text{ }^\circ\text{C}$  und dann zwei Stunden bei verschiedenen Temperaturen zwischen  $60\text{ }^\circ\text{C}$  und Rückfluss gerührt. Nach Zugabe von Benzylamin (**34**) und 18 Stunden Rühren werden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Umsätze des Benzylamins (**34**) zum Produkt **35**, dem Harnstoffderivat **38** und des ATMO-ATMO-Benzylamids (**39**) werden über die Intensitätsverhältnisse der Benzylprotonen bestimmt, wobei das quantitativ entstehende Imidazol als interner Standard verwendet wird. Die Ergebnisse werden in Tabelle 2-1 gezeigt.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Bildung des Produkts **35** mit steigender Aktivierungstemperatur von 26% Umsatz auf 33% Umsatz ansteigt. Negativ anzumerken ist aber auch ein Anstieg der Bildung des ATMO-ATMO-Amids **39** bei steigender Aktivierungsenergie von 8% auf 16% Umsatz. Gegenläufig ist die Bildung des Harnstoffderivats **38**, die auf eine zu geringe Aktivierung hindeutet. Diese ist mit 32% Umsatz bei einer Aktivierungstemperatur von 60 °C sehr hoch, während bei Erhitzen zum Rückfluss kein Harnstoffderivat **38** zu finden ist. Diese Ergebnisse bedeuten, dass für diese Reaktion kein geeignetes Prozessfenster zu sehen ist, in dem weder eine zu geringe Aktivierung, die sich in einer Bildung des Harnstoffderivats **38** zeigt, noch eine zu starke Aktivierung in Form der Bildung eines ATMO-ATMO-Amids **39** beobachtbar ist.

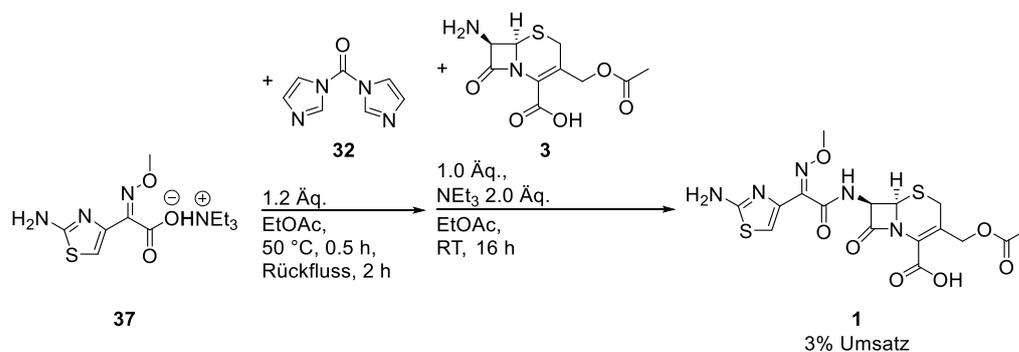
**Tabelle 2-1:** Amidierung zwischen dem Triethylammoniumsalz **37** und Benzylamin (**34**) in Ethylacetat mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz bei verschiedenen Aktivierungstemperaturen.



T [°C]	Rest <b>34</b> [%]	Umsatz <b>35</b> [%]	Umsatz <b>38</b> [%]	Umsatz <b>39</b> [%]
60	0	26	32	8
70	10	28	26	7
Rückfluss	48	33	0	16

Trotz des Ausbleibens eines geeigneten Prozessfensters wird die Reaktion leicht abgewandelt für die Synthese von Cefotaxim (**1**) getestet (Abbildung 2–20). Die ersten Reaktionsschritte sind dabei identisch zu der Modellreaktion mit einer Aktivierung von 30 Minuten bei 50 °C und zwei Stunden Rückfluss, anschließend wird 7-ACA (**3**) mit Triethylamin suspendiert in Ethylacetat zugegeben. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur werden alle flüchtigen

Verbindungen im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in deuteriertem DMSO gelöst und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht, wobei eine leichte Trübung der Probe auffällt. Dabei wird ein Umsatz von 3% Cefotaxim (**1**) unter Berücksichtigung des internen Standards Imidazol ermittelt. Die leichte Trübung der Probe könnte auf die Bildung eines ATMO-Cefotaxim hindeuten. Schon das ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) zeigte eine sehr geringe Löslichkeit, sodass die Möglichkeit besteht, dass ein ATMO-Cefotaxim eine zu geringe Löslichkeit für eine Detektion mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aufweist. Eine geringe Löslichkeit von 7-ACA kann ein Grund für den sehr niedrigen Umsatz von nur 3% sein. Dieses Ergebnis zeigt, dass Cefotaxim unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (**32**) hergestellt werden kann. Ein guter Umsatz zu Cefotaxim oder ein geeignetes Prozessfenster für die Modellreaktion konnte jedoch nicht gefunden werden, sodass von einer weiteren Untersuchung dieser Route abgesehen wird.



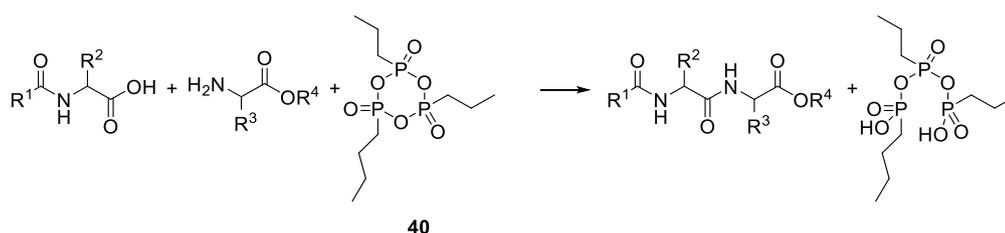
**Abbildung 2–20:** Amidierung zwischen Triethylammonium-ATMO-Salz (**37**) und 7-ACA (**3**) in Ethylacetat mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz.

## 2.4. Anhydride von Phosphorsäuren als Kopplungsreagenzien

### 2.4.1. Stand der Wissenschaft

Bereits ab den 1970er Jahren wurden verschiedene Organophosphinsäuren als Kopplungsreagenzien für die Peptidsynthese untersucht.<sup>[75,76]</sup> Unter Verwendung von Diorganylphosphinsäurechloriden konnten gemischte Anhydride aus Carbonsäuren erhalten werden. Diese gemischten Anhydride wiesen eine interessante Reaktivität bei der Umsetzung mit Nucleophilen auf. Während Stickstoff-Nucleophile unter Ausbildung einer Amidbindung am Carboxyl-Kohlenstoff angreifen, erfolgt bei der Umsetzung mit Sauerstoff-Nucleophilen

aufgrund der hohen Oxophilie des Phosphors ein Angriff am Phosphor unter Bildung eines Diorganophosphinsäureesters.<sup>[76]</sup> Die Reaktivität der gemischten Anhydride mit Aminen unter Ausbildung von Amidn ermöglicht somit eine gezielte Syntheseanwendung. In der Folgezeit wurden weitere Organoderivate der Phosphinsäure und Phosphonsäure für die gezielte Anwendung bei der Amidsynthese untersucht. Dabei entdeckten *Wissmann et al.* T3P<sup>®</sup> (**40**), das cyclische, trimere Anhydrid der Propylphosphansäure, als geeignetes Kopplungsreagenz (Abbildung 2–21).<sup>[77,78]</sup>



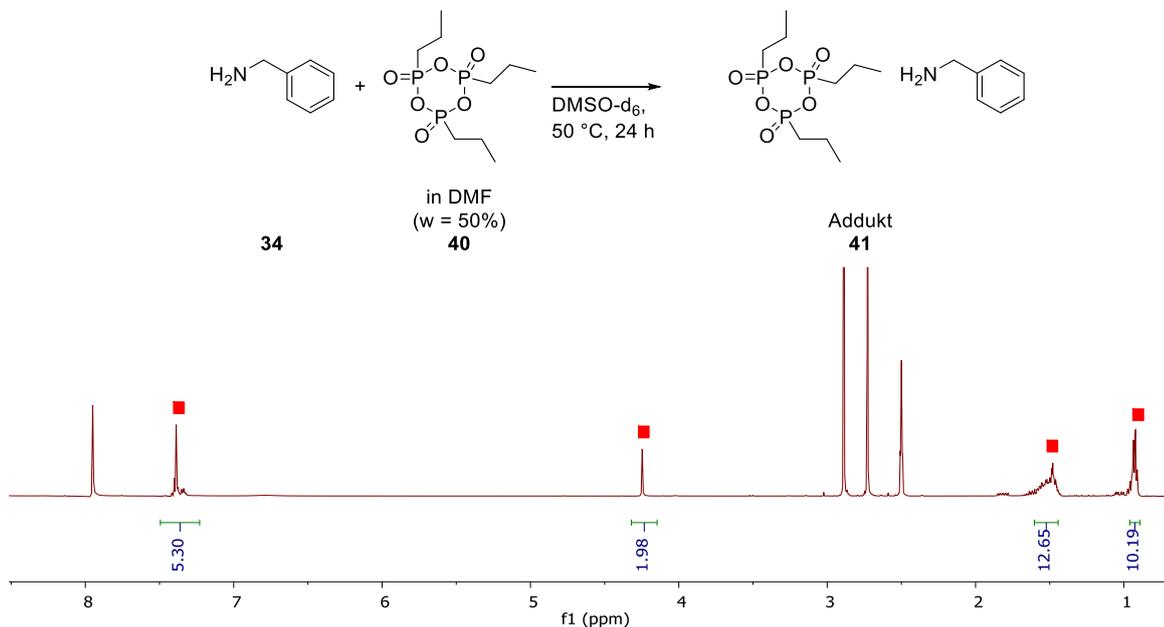
**Abbildung 2–21:** Peptidsynthese unter Verwendung von T3P<sup>®</sup> (**40**) als Kopplungsreagenz.

Die Verwendung von T3P<sup>®</sup> (**40**) weist im Gegensatz zu bekannten Kopplungsreagenzien einige Vorteile auf. Neben hohen Ausbeuten und guter Selektivität sind die entstehenden Nebenprodukte gut wasserlöslich und somit in der Regel gut abtrennbar. Die daraus entstehende, oftmals sehr einfache Aufarbeitung ist neben einer geringen Racemisierungstendenz und einer geringen Toxizität ein guter Grund für eine breite Anwendung von T3P<sup>®</sup> (**40**) als Kopplungsreagenz für Peptidbindungen, die mit über 200 Publikationen und Patenten belegt werden kann.<sup>[79,80]</sup>

## 2.4.2. Ergebnisse und Diskussion

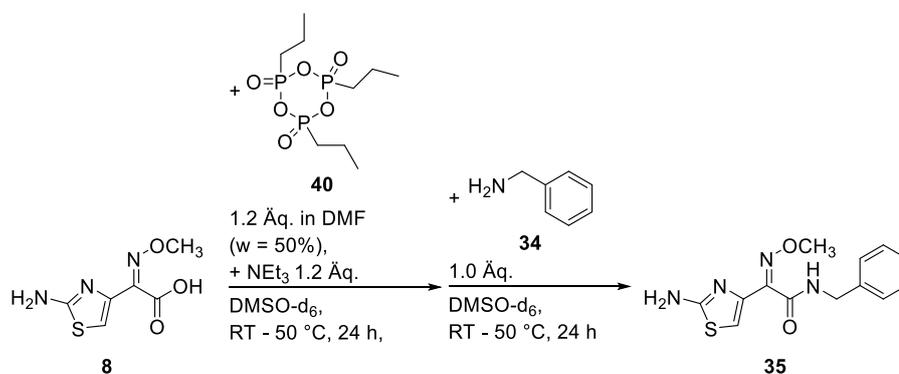
Um die Effizienz von T3P<sup>®</sup> (**40**) als Kopplungsreagenz für die gewünschte Synthese zu untersuchen, wird Benzylamin (**34**) als Modellsubstrat anstelle der empfindlichen 7-ACA (**3**) verwendet. In Vorversuchen, wie der Neutralisation von ATMO-Säure (**8**) mit Benzylamin (**34**), wird deutlich, dass die Signale der ATMO-Säure (**8**) und des Amins **34** aufgrund der vorhandenen Aminfunktionen in beiden Molekülen und der Säurefunktion in der ATMO-Säure (**8**) in <sup>1</sup>H-NMR-Spektren entsprechend dem pH-Wert variieren. Des Weiteren wird in einem Vorversuch untersucht, ob Benzylamin (**34**) mit T3P<sup>®</sup> (**40**) reagiert. Bei dieser Reaktion kann ein unbekanntes Addukt **41** im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum beobachtet werden, das jedoch weder isoliert noch genauer charakterisiert wird (Abbildung 2–22). Bei einem Vergleich der chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen mit denen im Benzylamin (**34**) (7.30 ppm

und 7.19 ppm) sind diese bei dem Addukt **41** um ca. 0.1 ppm ins Tieffeld verschoben. Ein noch deutlicherer Versatz ist bei dem Signal der benzyllischen Protonen zu sehen, das von 3.7 ppm um über 0.5 ppm ins Tieffeld verschoben ist.



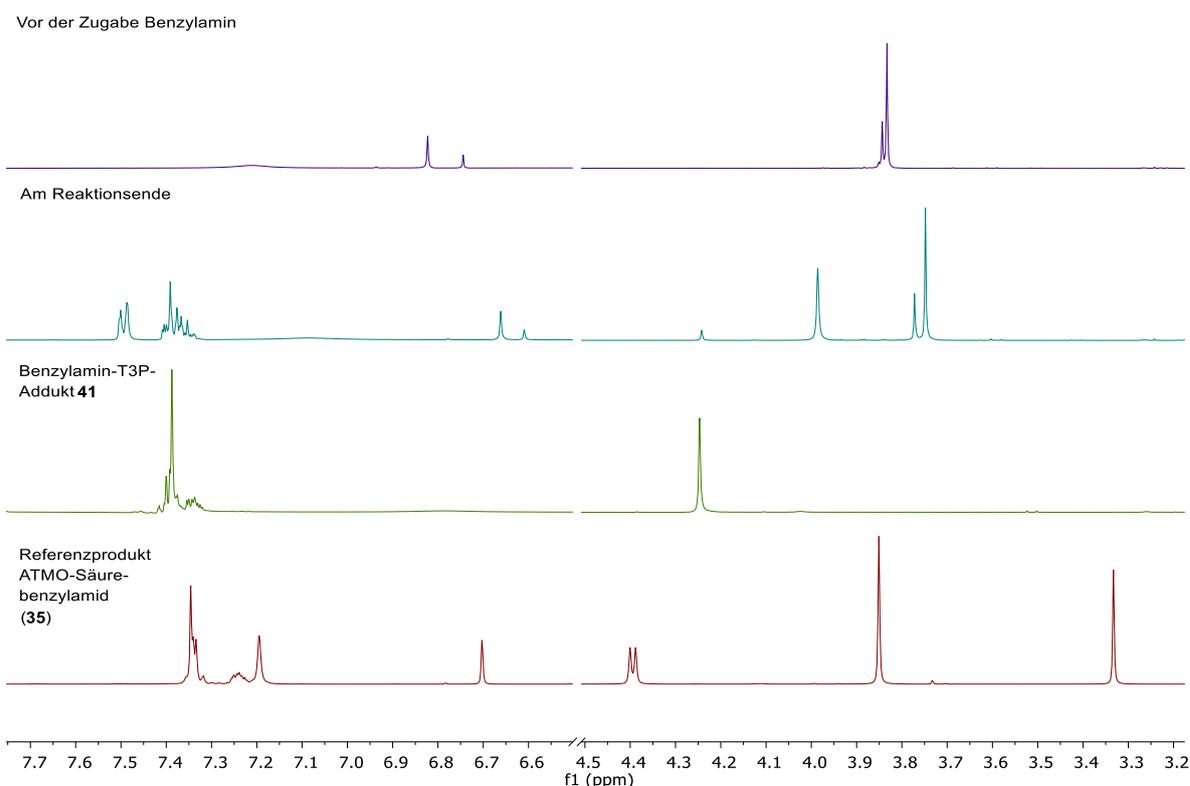
**Abbildung 2–22:** Reaktion zwischen Benzylamin (**34**) und T3P<sup>®</sup> (**40**) unter Bildung eines unbekanntes Adduktes **41** (rote Markierung), mit dem zu der Reaktion gehörigen <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

Aufgrund der Bildung des möglichen Nebenproduktes **41** wird eine zweistufige Synthesestrategie getestet (Abbildung 2–23). Dabei soll in einem ersten Schritt die ATMO-Säure (**8**) unter Verwendung von T3P<sup>®</sup> (**40**) aktiviert werden. Zu der aktivierten Spezies wird nach 24 Stunden Benzylamin (**34**) zugegeben und weitere 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wird jeweils bei Raumtemperatur und 50 °C in deuteriertem Dimethylsulfoxid durchgeführt.



**Abbildung 2–23:** Versuch der Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) mit T3P<sup>®</sup> (**40**).

Vor der Zugabe des Benzylamins (**34**) und am Ende der Reaktion wird jeweils eine Probe genommen und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht, wobei die Spektren der Reaktion bei Raumtemperatur und  $50\text{ }^\circ\text{C}$  identisch sind. Die interessanten Ausschnitte (einerseits der Bereich der aromatischen Protonen und andererseits der Bereich der Oxim- und benzylichen Protonen) der Spektren sind in Abbildung 2–24 zusammen mit den Referenzspektren des Produkts **35** und dem Addukt aus Benzylamin und  $\text{T3P}^\text{®}$  **41** dargestellt. Im weiteren Spektrum befinden sich nur Signale von DMF, Triethylamin und der Propylgruppe des  $\text{T3P}^\text{®}$  (**40**), sowie das Amidsignal des Addukts **41**.

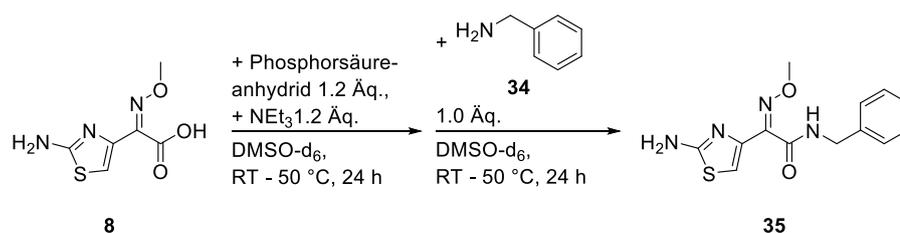


**Abbildung 2–24:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren vom Versuch der Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) mit  $\text{T3P}^\text{®}$  (**40**) mit Referenzspektren des Benzylamin- $\text{T3P}^\text{®}$ -Adduktes **41** und des Produkts **35**.

Im Spektrum vor der Zugabe von Benzylamin (**34**) sind deutlich zwei Signalsätze von einer ATMO-Säuregruppe zu sehen. Diese können nicht eindeutig zugeordnet werden. Es wird jedoch vermutet, dass diese Signale der ATMO-Säure (**8**) und einem Derivat aus dieser und  $\text{T3P}^\text{®}$  (**40**) zugeordnet werden können. Nach der Zugabe des Benzylamins (**34**) und weiteren 24 Stunden Rühren sind diese Signalsätze jedoch um ca.  $0.1\text{ ppm}$  ins Hochfeld verschoben. Neben diesen Signalen befinden sich zwei weitere Signale im Spektrum im Bereich von  $4.0$  bis  $4.5\text{ ppm}$ . Das kleinere, weiter im Tieffeld liegende Signal kann dabei dem Addukt aus

Benzylamin und T3P<sup>®</sup> **41** zugeordnet werden. Das größere Signal kann wahrscheinlich Benzylamin (**34**) zugeordnet werden. Die Summe beider Signale passt zu dem Verhältnis der Signale der Phenylgruppe im Bereich um 7.4 ppm. In jedem Fall kann das Fehlen des charakteristischen Dubletts der Benzylprotonen bei 4.4 ppm der Referenzverbindung **35** als Beweis für eine fehlende Produktbildung angesehen werden.

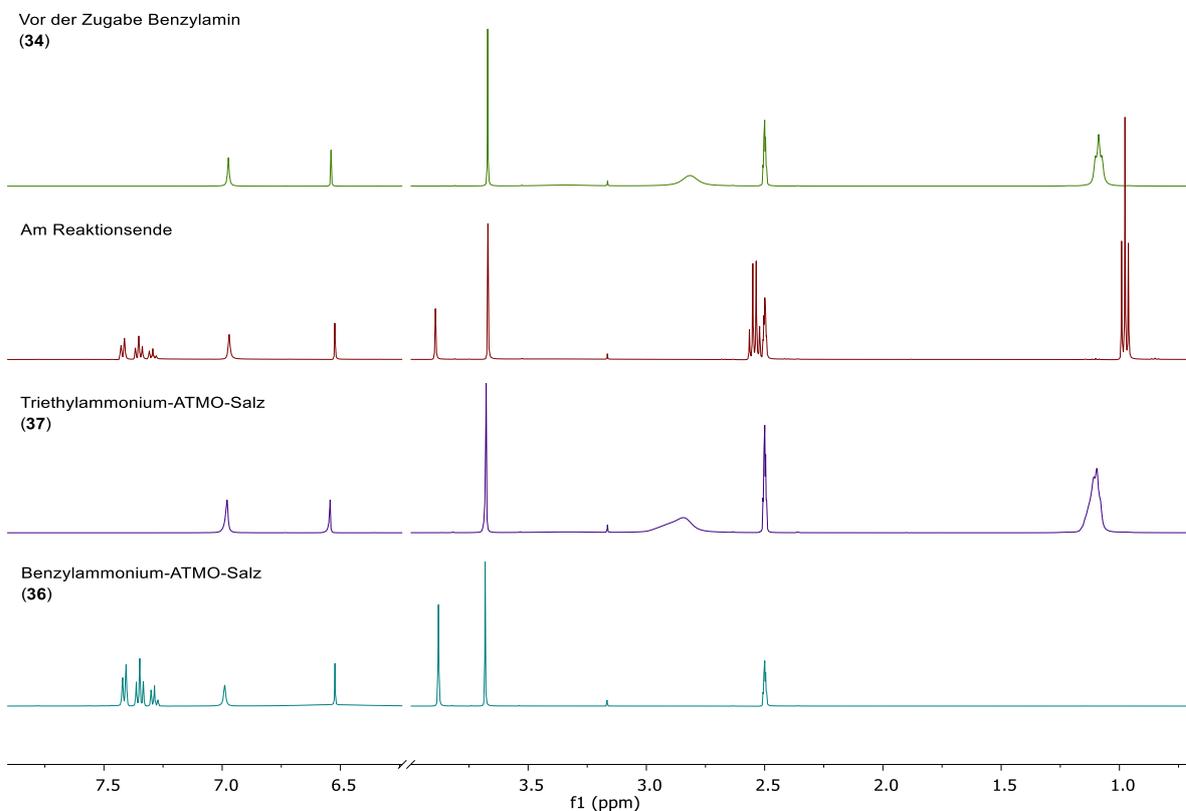
Neben T3P<sup>®</sup> (**40**) sollen günstigere und in großen Mengen verfügbare Phosphorsäureanhydride als mögliche Kopplungsreagenzien getestet werden. Dazu wird analog zu den Reaktionen mit T3P<sup>®</sup> (**40**) jeweils ATMO-Säure (**8**) mit Triethylamin und einem der drei Phosphorsäureanhydride Natriumpyrophosphat (**42**), Kaliumpyrophosphat (**43**) oder Natriumhexametaphosphat (**44**) versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur oder 50 °C gerührt. Anschließend wird Benzylamin (**34**) zugegeben und weitere 24 Stunden unter gleichen Bedingungen gerührt (Abbildung 2–25).



**Abbildung 2–25:** Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) mit verschiedenen Phosphorsäureanhydriden.

Vor Zugabe des Benzylamins (**34**) und am Reaktionsende wird jeweils ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum aufgenommen. Alle sechs Spektren vor der Zugabe des Benzylamins (**34**) waren identisch, genau wie alle sechs Spektren am Reaktionsende. In Abbildung 2–26 ist jeweils ein Spektrum zum Vergleich mit Spektren vom Triethylammonium-ATMO-Salz (**37**) und Benzylammonium-ATMO-Salz (**36**) abgebildet. Es ist deutlich zu sehen, dass das Spektrum der Reaktionsmischung vor der Zugabe von Benzylamin (**34**) identisch mit dem Spektrum des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**) ist. Dies deutet auf eine nicht erfolgte Aktivierung der ATMO-Säure (**8**), sondern auf eine einfache Säure-Base-Reaktion hin. Auch das Spektrum der Reaktion am Reaktionsende zeigt keinerlei Produktbildung, da auch hier das charakteristische Dublett des Protons in Benzylstellung des ATMO-Säurebenzylamids (**35**) fehlt. Auch hier ist das Produkt einer Säure-Base-Reaktion, das Benzylammonium-ATMO-Salz (**36**) neben einem dem teilweise protonierten Benzylamin entsprechenden Signalsatz zu erkennen. Diese

Ergebnisse unterstreichen, dass sich unter den getesteten Reaktionsbedingungen Phosphorsäureanhydride nicht für eine Aktivierung der ATMO-Säure (**8**) eignen.



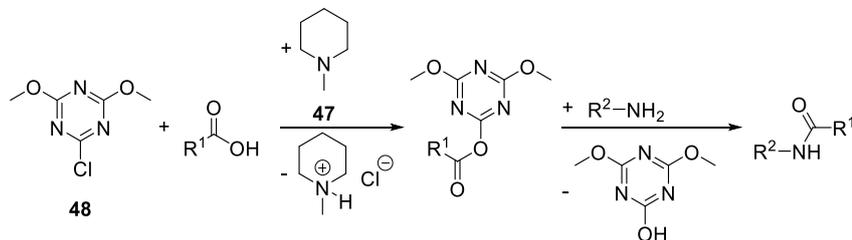
**Abbildung 2–26:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren vom Versuch der Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) unter Verwendung verschiedener Phosphorsäureanhydride mit Referenzspektren des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**) und Benzylammonium-ATMO-Salzes (**36**).

## 2.5. DMT-MM (**45**) als Kopplungsreagenz

### 2.5.1. Stand der Wissenschaft

Cyanurchlorid (**46**) ist als Säurechlorid der Cyanursäure eine Basischemikalie, die im Bereich mehrerer Hunderttausend Jahrestonnen hergestellt wird.<sup>[81]</sup> In den 1970er Jahren zeigten *Venkataraman et al.*, dass Carbonsäuren unter Verwendung von Cyanurchlorid (**46**) unter basischen Bedingungen aktiviert werden und somit das Säurechlorid **46** für die Peptidsynthese geeignet ist.<sup>[82]</sup> *Kamiński et al.* untersuchten im Folgenden Derivate des Cyanurchlorids (**46**) zur Aktivierung von Carbonsäuren unter Zugabe von *N*-Methylmorpholin (**47**) für die Synthese

von Estern, Amiden und Anhydriden. Dabei konnten sie ermitteln, dass das mit zwei Methanolmolekülen derivatisierte 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) aufgrund seiner im Vergleich zum Cyanurchlorid (**46**) geringeren Reaktivität ein für die Peptidsynthese besonders geeignetes Reagenz darstellt (Abbildung 2–27).<sup>[83]</sup>

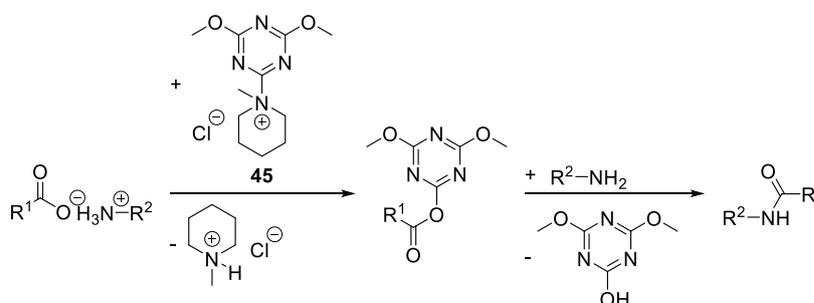


**Abbildung 2–27:** Kopplung von Carbonsäure und Amin unter Verwendung von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**).<sup>[83]</sup>

Bei dieser Reaktion greift das durch die Base deprotonierte Carboxylatanion nukleophil am Sechsering unter Abspaltung des Chloridions an. Die gebildete Spezies, die einem Anhydrid aus Carbonsäure und des Dimethylesters der Cyanursäure entspricht, wird nukleophil vom Stickstoffatom unter Abspaltung des Dimethylesters der Cyanursäure angegriffen. 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) ist eine stabile Verbindung, die aufgrund der geringeren Reaktivität im Vergleich zu Cyanurchlorid (**46**) weniger Nebenprodukte bildet.<sup>[83]</sup> Das Triazin **48** kann dabei sehr einfach aus den Basischemikalien Cyanurchlorid (**46**) und Methanol unter Zugabe von Natriumhydrogencarbonat hergestellt werden.<sup>[84–86]</sup> Aufgrund der einfachen Zugänglichkeit der Ausgangsstoffe und der einfachen Synthese von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) gibt es einige Beispiele für die Ausbildung von Amidbindungen unter Verwendung des Kopplungsreagenzes **48** und *N*-Methylmorpholin (**47**).<sup>[87–90]</sup> In einem der genannten Beispiele wird dabei ein  $\beta$ -Lactam mit ähnlicher Struktur wie 7-ACA (**3**) erfolgreich in 7-Position amidiert.<sup>[89]</sup> Neben der Anwendung von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**) als einzelne Reaktionskomponenten wurde auch ein Addukt aus beiden, das 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**), abgekürzt DMT-MM, dargestellt und als Kopplungsreagenz verwendet (Abbildung 2–28).<sup>[91,92]</sup>

Die Carbonsäure und das Amin bilden ein Ionenpaar, wobei nach Zugabe von DMT-MM (**45**) das Carboxylat mit dem Kopplungsreagenz ein gemischtes Anhydrid bildet, während das Ammoniumsalz zumindest partiell vom freigesetzten *N*-Methylmorpholin (**47**) deprotoniert wird. Das gebildete Amin greift nukleophil am gemischten Anhydrid an und bildet das Amid unter Abspaltung des Dimethylesters der Cyanursäure. In der Literatur ist eine Aufarbeitung bekannt, bei der dieser isoliert wird.<sup>[93]</sup> Im Anschluss kann durch Umsetzung mit

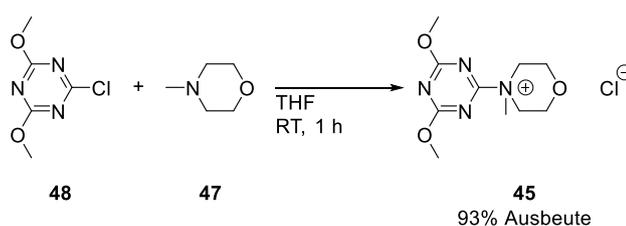
Phosphoroxchlorid 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) zurückgewonnen werden. Alternativ kann der Dimethylester mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und *N*-Methylmorpholin (**47**) direkt zu DMT-MM (**45**) rezykliert werden. Diese Rezyklisierung ermöglicht eine aus ökologischer und ökonomischer Sicht attraktive Synthese.



**Abbildung 2–28:** Kopplung von Carbonsäure und Amin unter Verwendung von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**).<sup>[91]</sup>

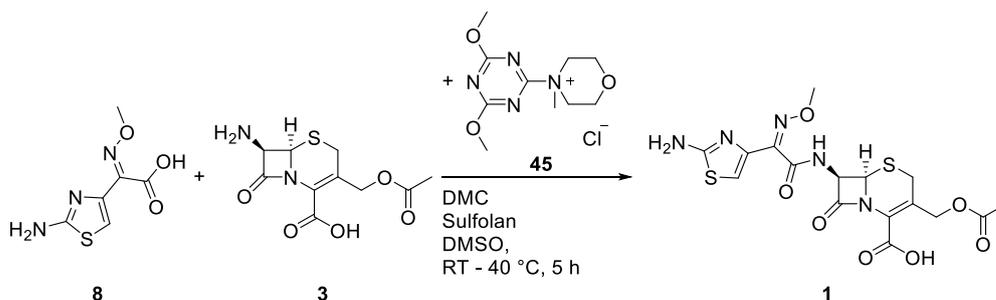
## 2.5.2. Ergebnisse und Diskussion

Das Kopplungsreagenz DMT-MM (**45**) kann in einer einfachen Synthese in Analogie zu einer bekannten Vorschrift durch Rühren von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**) dargestellt werden.<sup>[92]</sup> Der entstehende Feststoff wird filtriert und das gewünschte Kopplungsreagenz kann mit einer Ausbeute von 93% erhalten werden (Abbildung 2–29).



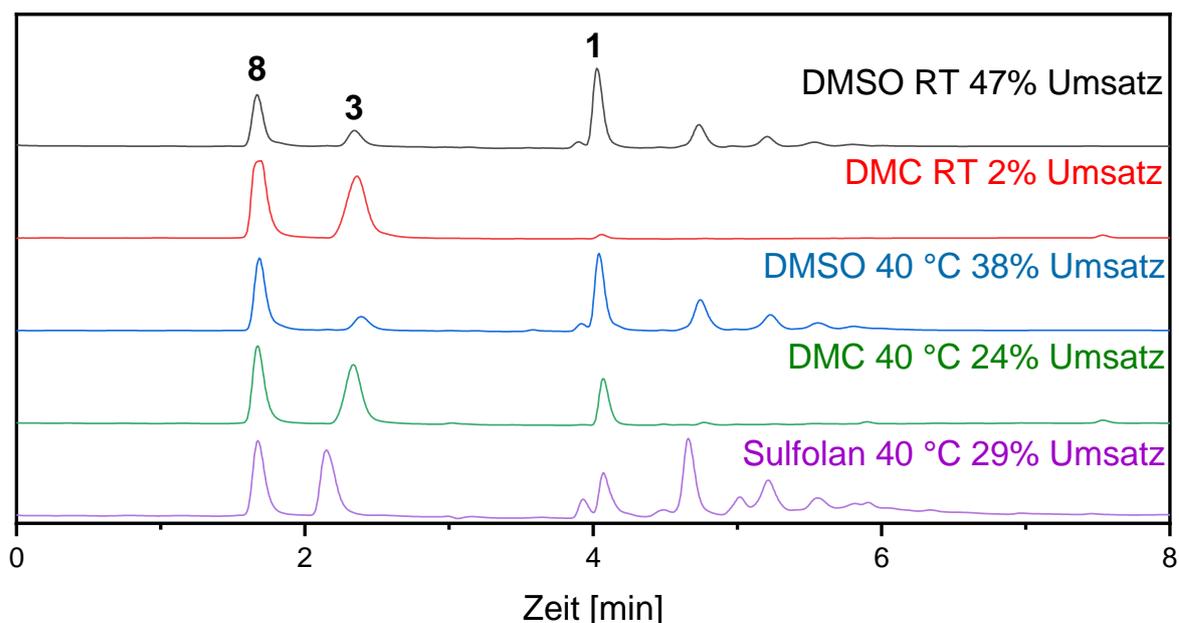
**Abbildung 2–29:** Synthese von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**) ausgehend von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**).

Als verschiedene aprotische, polare Lösungsmittel für die Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und 7-ACA (**3**) unter Verwendung von DMT-MM (**45**) werden Dimethylcarbonat (DMC), Sulfolan und Dimethylsulfoxid getestet (Abbildung 2–30). Die Reaktion wird in Dimethylcarbonat und Dimethylsulfoxid bei Raumtemperatur und 40 °C durchgeführt, während die Reaktion in Sulfolan aufgrund des Schmelzpunktes nur bei 40 °C durchgeführt werden kann.



**Abbildung 2–30:** Umsetzung von ATMO-Säure (**8**) mit 7-ACA (**3**) unter Verwendung von DMT-MM (**45**) als Kopplungsreagenz.

Nach fünf Stunden Reaktionszeit wird ein Teil der Reaktionslösung mittels HPLC-Analytik untersucht. Dabei konnten die in Abbildung 2–31 gezeigten HPLC-Chromatogramme erhalten werden. Es wird deutlich, dass bei Verwendung von Dimethylcarbonat eine sehr selektive Reaktion beobachtbar ist. Die Reaktion bei Raumtemperatur in Dimethylcarbonat zeigt neben den Signalen bei 1.7 Minuten für die ATMO-Säure (**8**) und 2.3 Minuten für 7-ACA (**3**) ein weiteres Signal bei 4.1 Minuten, das dem Produkt Cefotaxim (**1**) zugeordnet werden kann. Weitere Signale UV-aktiver Nebenprodukte können nicht beobachtet werden. Das Produkt wird dabei mit einem Umsatz von 2% bezogen auf die eingesetzte Säure **8** erhalten. Die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C hat eine Erhöhung des Umsatzes auf 24% zur Folge, wobei erneut wenig Nebenprodukt detektierbar ist. Bei Verwendung der beiden schwefelhaltigen Lösungsmittel sind hingegen deutlich mehr Signale im Spektrum beobachtbar. Während in Dimethylsulfoxid neben den eben genannten Signalen vier weitere Signale zu beobachten sind, sind es bei der Verwendung von Sulfolan mindestens sieben weitere Signale. Diese Beobachtungen deuten auf eine Vielzahl von Neben- und Abbaureaktionen bei der Verwendung dieser Lösungsmittel hin. In Dimethylsulfoxid kann bei Raumtemperatur ein Umsatz von 47% beobachtet werden. Bei der verwendeten Verhältnisanalytik werden ausschließlich die integrierten Signale verglichen. Daher muss kritisch betrachtet werden, dass Zersetzungsprodukte wie die ATMO-Säure (**8**) oder Derivate dieser unberücksichtigt bleiben. Die Säure **8** weist aber in der Regel eine deutlich höhere Stabilität als die  $\beta$ -Lactamverbindungen **3** und **1** auf. Somit könnte eine Zersetzung des Produkts **1** eine fehlerhafte Berechnung verursachen. Bei der Verwendung von DMSO bei 40 °C kann ein Umsatz von 38% ermittelt werden. Dies und die vielen Signale im Chromatogramm deuten auf eine Zersetzung des Edukts **3** oder Produkts **1** hin.



**Abbildung 2–31:** Normierte HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von ATMO-Säure (**8**) mit 7-ACA (**3**) zu Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von DMT-MM (**45**) als Kopplungsreagenz.

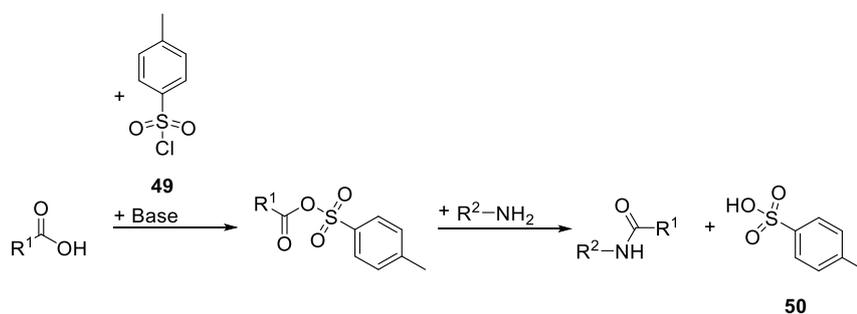
Bei der Verwendung von Sulfolan als Lösungsmittel wird ein Umsatz von 29% erhalten. Insgesamt betrachtet liefert diese Syntheseroute bei der Verwendung von Dimethylsulfoxid und Sulfolan Umsätze für interessante Startpunkte. Jedoch ist die beobachtete Nebenproduktbildung mit mindestens vier verschiedenen Nebenprodukten bei Dimethylsulfoxid und einer noch höheren Anzahl bei Sulfolan ein Ausschlusskriterium. In Dimethylcarbonat wird eine relativ selektive Reaktion beobachtet. Jedoch ist der Spielraum für weitere Änderungen an den Reaktionsparametern aufgrund der geringen Stabilität des  $\beta$ -Lactamrings gering. Bei dem geringen Umsatz von 24% wird keine weitere Untersuchung unter anderen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

## 2.6. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz

### 2.6.1. Stand der Wissenschaft

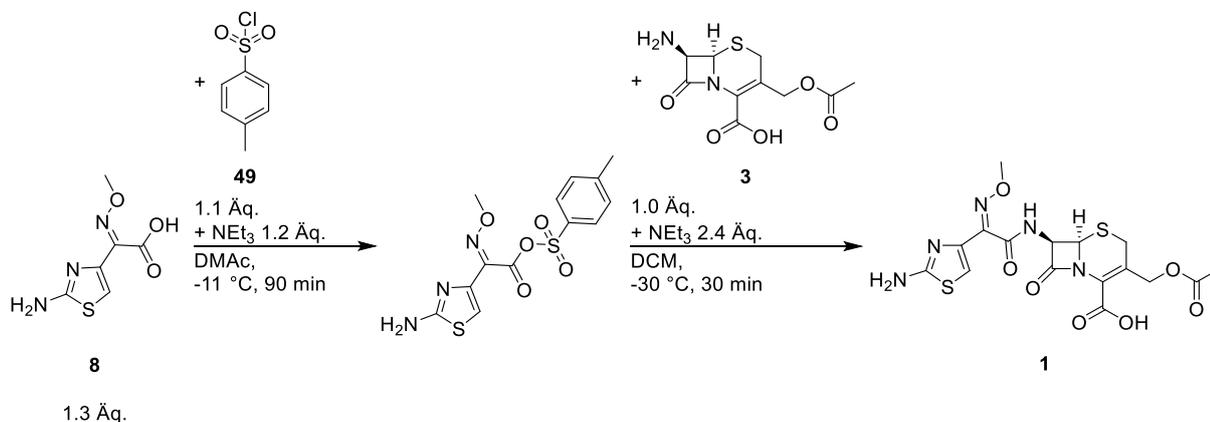
Eine weitere Variante der Aktivierung mittels gemischter Anhydride ist die Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**). Bei der Verwendung des Sulfonsäurechlorids **49** unter Zusatz von Base bildet sich mit der zu aktivierenden Carbonsäure ein gemischtes Anhydrid. Dieses

wird dann von dem Amin nukleophil angegriffen und unter Abspaltung von 4-Toluolsulfonsäure (**50**) bildet sich das Amid aus (Abbildung 2–32).<sup>[94]</sup>



**Abbildung 2–32:** Kopplung von Carbonsäure und Amin unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**).<sup>[94]</sup>

Das Sulfonsäurechlorid **49** zeichnet sich als attraktives Kopplungsreagenz aus, da während der Reaktion als Abfallprodukt nur die reizende 4-Toluolsulfonsäure (**50**) als Nebenprodukt entsteht. Außerdem ist 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) günstig und in großen Mengen verfügbar, da es im Rahmen der elektrophilen aromatischen Substitution von Toluol bei der Synthese von 2-Toluolsulfonsäurechlorid als Abfallprodukt entsteht. 2-Toluolsulfonsäurechlorid ist eine Zwischenstufe der Saccharinsynthese nach dem *Remsen-Fahlberg*-Verfahren und wird in großen Mengen hergestellt.<sup>[95,96]</sup> Für die Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz in der Amidsynthese gibt es in der Literatur zahlreiche Beispiele, die eine erfolgreiche Etablierung dieser Art der Verwendung zeigen.<sup>[94,95,97,98]</sup> Neben Beispielen für die Amidierung in 7-Position für die Synthese anderer Cephalosporine ist auch die Synthese von Cefotaxim (**1**) ausgehend von ATMO-Säure (**8**) und 7-ACA (**3**) unter Verwendung des Säurechlorids **49** literaturbekannt (Abbildung 2–33).<sup>[99–101]</sup>

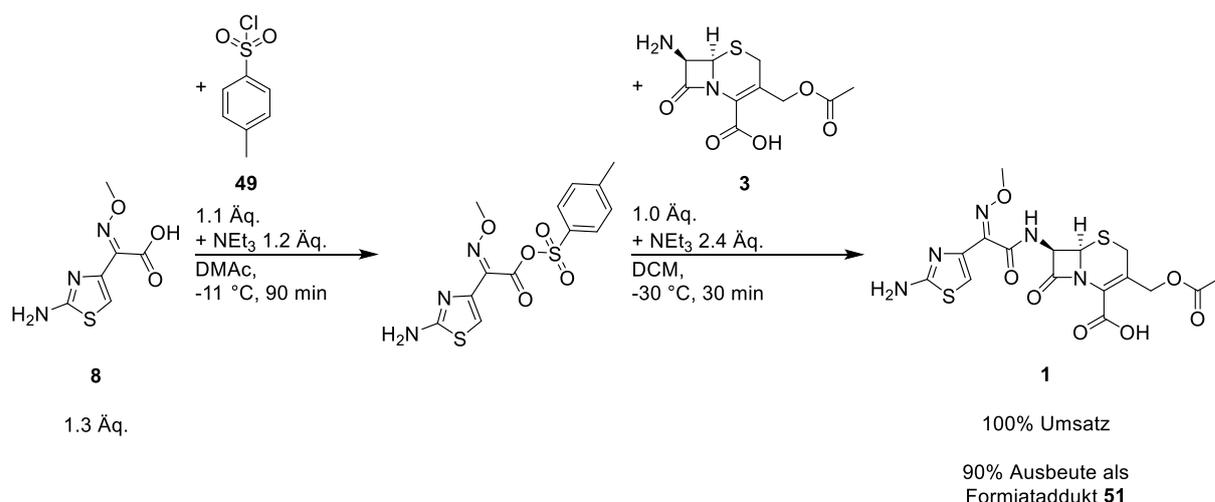


**Abbildung 2–33:** Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz.<sup>[100]</sup>

Das bekannte Verfahren hat jedoch zwei Nachteile. Dabei sind zunächst die verwendeten Lösungsmittel zu nennen, die mit Dimethylacetamid und Dichlormethan aus ökologischer Sicht ungünstig sind. Der zweite Nachteil ist die niedrige Temperatur des zweiten Reaktionsschritts, die aus ökologischer und ökonomischer Sicht unattraktiv ist, da Kühlen ein energetisch sehr aufwändiger Prozess ist.

## 2.6.2. Synthese von Cefotaxim mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49)

Zuerst wird die in der Literatur beschriebene Synthese von Cefotaxim (**1**) wiederholt (Abbildung 2–34).<sup>[100]</sup> Dafür wird das gemischte Anhydrid aus ATMO-Säure (**8**), suspendiert in Dimethylacetamid, und einer Lösung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) in Dimethylacetamid hergestellt und als Suspension zu einer Lösung von 7-ACA (**3**) in Dichlormethan unter Zusatz von Triethylamin gegeben.<sup>[100]</sup> Die Zugabe des gemischten Anhydrids zu der Lösung von 7-ACA (**3**) kann dabei als stark exotherme Reaktion beobachtet werden. Es kann ein vollständiger Umsatz bezogen auf die eingesetzte Menge von ATMO-Säure (**8**) mittels HPLC-Analytik bestimmt werden. Bei dieser Reaktion und im Folgenden wird der Umsatz auf ATMO-Säure (**8**) bezogen, obwohl diese im leichten Überschuss verwendet wird. Der Überschuss wird über die Verwendung eines Korrekturfaktors in die Rechnung einbezogen. Die Umsatzbestimmung mittels ATMO-Säure (**8**) und Cefotaxim (**1**) wird gewählt, da diese stabiler sind als das Edukt 7-ACA (**3**).



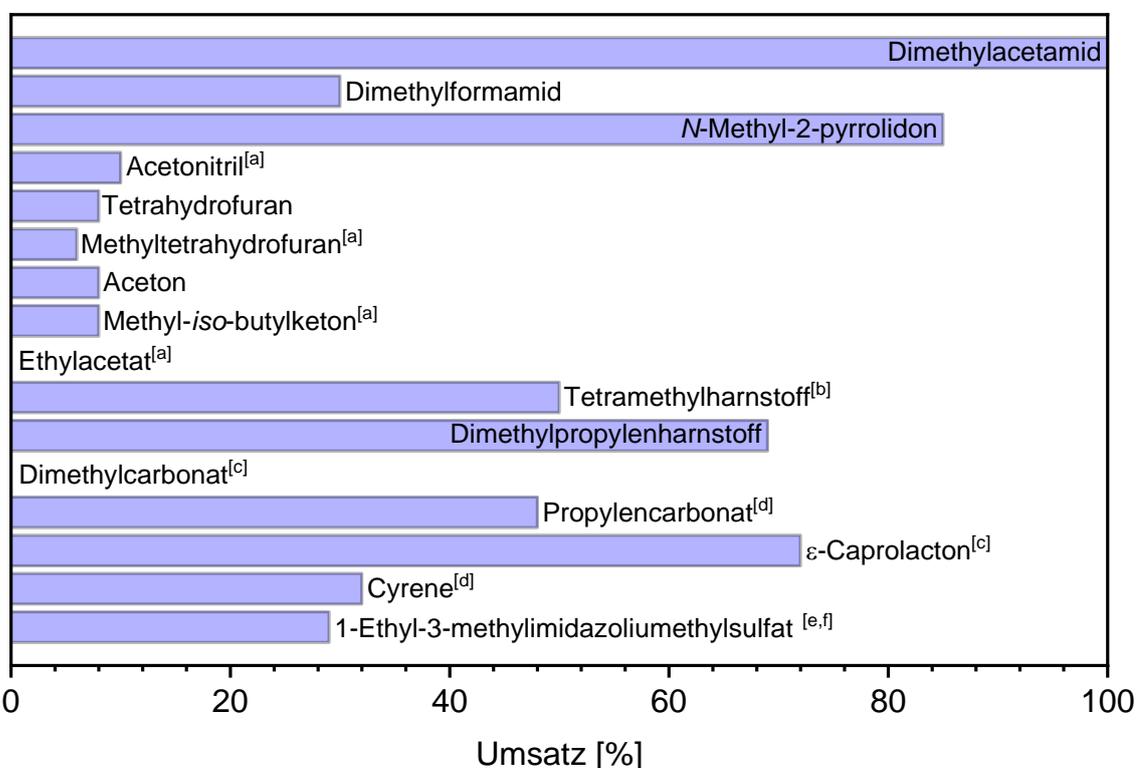
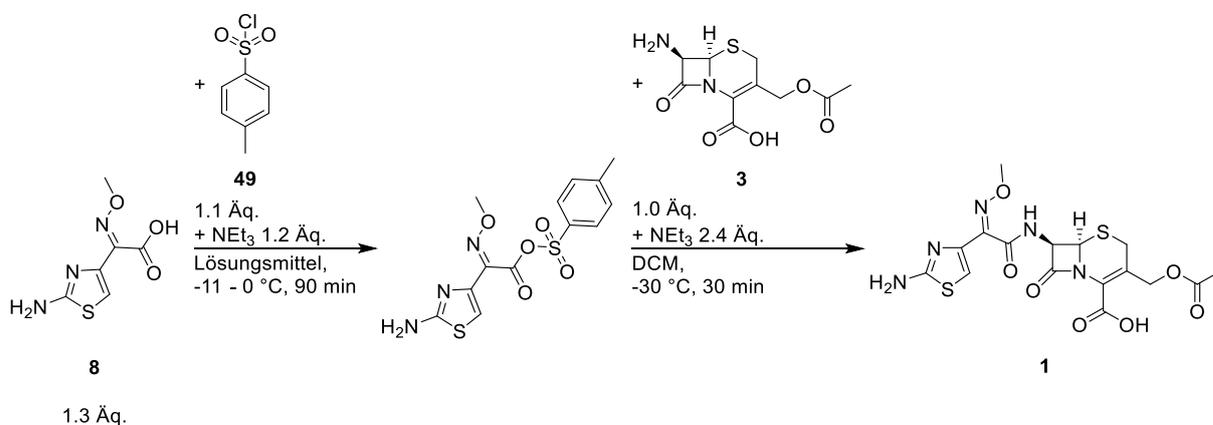
**Abbildung 2–34:** Synthese von Cefotaxim (**1**) aus ATMO-Säure (**8**) und 7-ACA (**3**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz.<sup>[100]</sup>

Im Anschluss an die Umsatzbestimmung wird das entstandene Cefotaxim (**1**) als Formiataddukt **51** gefällt.<sup>[100]</sup> Nach Filtrieren und Waschen mit Wasser kann das Formiataddukt **51** mit einer Ausbeute von 90% isoliert werden. Die in der Literatur genannte Entfernung des Formiats über ein Ausrührschritt in Ethanol wird nicht durchgeführt.<sup>[100]</sup>

Da die verwendeten Lösungsmittel und die Temperatur des zweiten Reaktionsschritts aus ökonomischer und ökologischer Sicht ungünstig sind, wird ein Lösungsmittel-*Screening*, auch im Hinblick auf eine Übertragung der Reaktion auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup*, durchgeführt. Die Reaktion wird dazu unter identischen Bedingungen durchgeführt und das erste Lösungsmittel Dimethylacetamid gegen weitere organische Lösungsmittel ausgetauscht. Dabei werden aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Säurechlorids **49** und des gemischten Anhydrids nur aprotische Lösungsmittel für die Synthese verwendet. In Abbildung 2–35 sind die getesteten Lösungsmittel zusammen mit den jeweiligen Umsätzen aufgelistet. Aufgrund von zu hohen Schmelzpunkten der Lösungsmittel und zu geringer Löslichkeit des Säurechlorids **49** wird teilweise die Temperatur des ersten Reaktionsschritts bzw. die Menge an Lösungsmittel erhöht. Zum Vergleich ist die Synthese mit Dimethylacetamid mit vollständigem Umsatz ebenfalls in der Grafik angegeben.

Es werden klassische aprotische, polare Lösungsmittel als Alternative getestet. Das dem Dimethylacetamid chemisch ähnliche Dimethylformamid, das nur um einen Methylrest verkürzt ist, zeigt unter identischen Reaktionsbedingungen nur einen Umsatz von 30%. Zum Vergleich kann mit *N*-Methyl-2-pyrrolidon ein Umsatz von 85% erreicht werden. Da *N*-Methyl-2-pyrrolidon jedoch ebenfalls zu den teratogenen Substanzen zählt, ist ein Austausch trotz des hohen Umsatzes nicht priorisiert. Acetonitril als attraktives polares, aprotisches Lösungsmittel liefert einen Umsatz von 10%, wobei eine höhere Menge für das Lösen des Säurechlorids **49** eingesetzt werden muss. Als weitere mögliche Lösungsmittel werden die cyclischen Ether Tetrahydrofuran und Methyltetrahydrofuran getestet. Während Tetrahydrofuran unter Standardbedingungen einen Umsatz von 8% liefert, muss bei Methyltetrahydrofuran eine höhere Menge zum Lösen des 4-Toluolsulfonsäurechlorids (**49**) verwendet werden. Mit Methyltetrahydrofuran kann ebenfalls nur ein unzureichender Umsatz von 6% erzielt werden. Bei Verwendung der Ketone Aceton und Methyl-*iso*-butylketon werden jeweils Umsätze von 8% erzielt, wobei die Menge des Methyl-*iso*-butylketons ebenfalls erhöht werden muss. Bei Ersatz von Dimethylacetamid durch Ethylacetat kann kein Produkt in der

Reaktionsmischung nachgewiesen werden, sodass dieses, wie auch die beiden Ketone, kein zufriedenstellendes Ergebnis liefert.



**Abbildung 2–35:** Synthese von Cefotaxim (1) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Ersatz von Dimethylacetamid. [a] 1.5-fache Menge an Lösungsmittel 1, um das Säurechlorid 49 zu lösen. [b] Erster Reaktionsschritt bei -5 °C. [c] Erster Reaktionsschritt bei 0 °C. [d] 2-fache Menge an Lösungsmittel 1, um das Säurechlorid 49 zu lösen. [e] 3.5-fache Menge an Lösungsmittel 1 nicht ausreichend, um das Säurechlorid 49 zu lösen. [f] Zugabe von Dichlormethan, um die sehr hochviskose Lösung des gemischten Anhydrids zur Lösung von 7-ACA (3) zu überführen.

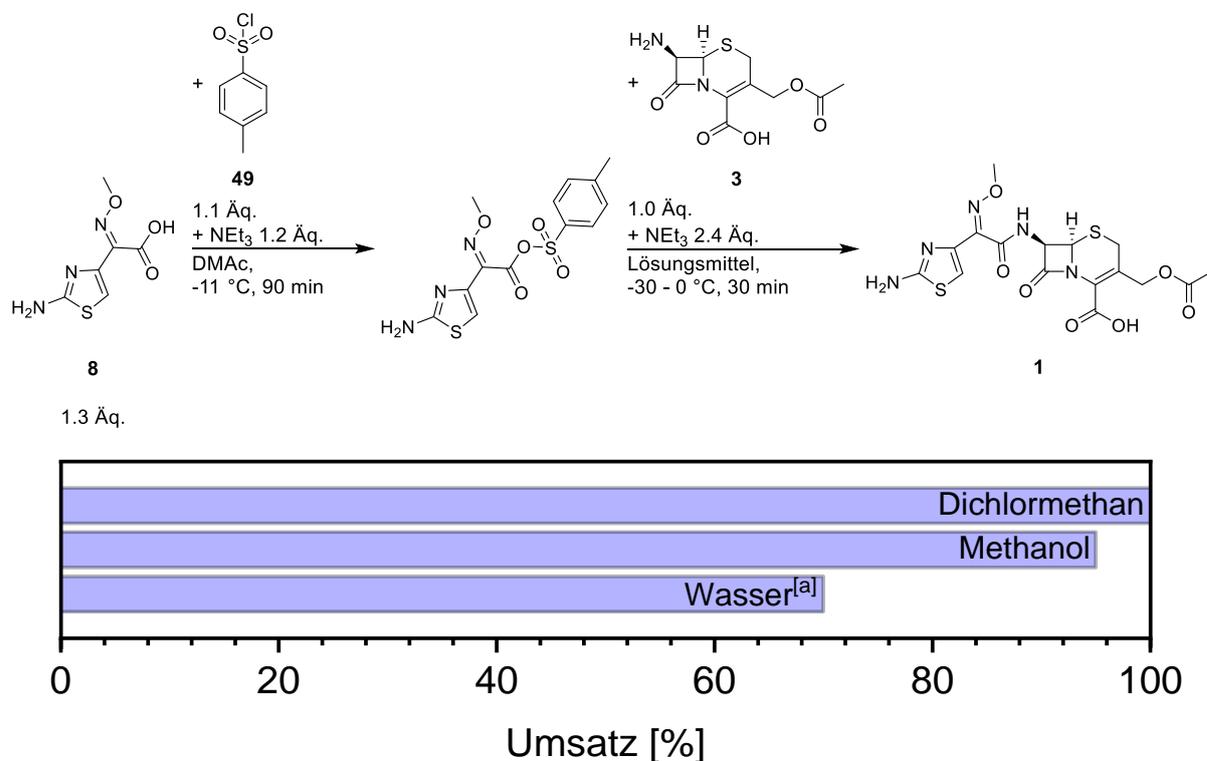
Als weitere Lösungsmittelgruppe werden Harnstoffderivate getestet. Dabei wird die Reaktion zur Bildung des gemischten Anhydrids in Tetramethylharnstoff bei -5 °C durchgeführt, wobei

ein Umsatz von 50% erreicht werden kann. Die Verwendung von Dimethylpropylenharnstoff ermöglicht es, das Produkt **1** mit einem Umsatz von fast 70% zu erhalten. Dieses Lösungsmittel steht jedoch im Verdacht, die Fruchtbarkeit zu senken und ist somit ebenfalls nicht das Mittel der ersten Wahl. Während bei der Verwendung von Dimethylcarbonat bei erhöhter Temperatur keine Produktbildung beobachtet werden kann, liefert die Verwendung von Propylencarbonat das Produkt **1** mit einem Umsatz von fast 50%. Die weiteren getesteten aprotischen Lösungsmittel Cyrene und  $\epsilon$ -Caprolacton führen zu Umsätzen von 32% und 72%. Das Ergebnis der Reaktion in  $\epsilon$ -Caprolacton stellt einen interessanten Ansatz dar. Abschließend wird die ionische Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat als Lösungsmittel getestet. Die Löslichkeit von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) ist in diesem Lösungsmittel so gering, dass nach 3.5-facher Menge eine Suspension verarbeitet wird. Die Lösung des gemischten Anhydrids ist hochviskos, sodass eine Zugabe von Dichlormethan vor dem Zutropfen nötig ist. Es kann dabei ein Umsatz von 29% erzielt werden. Dieser geringe Umsatz bei vergleichsweise hohen Kosten des Lösungsmittels macht eine Anwendung aus ökonomischer Sicht unattraktiv. Es kann somit gezeigt werden, dass keines der getesteten Lösungsmittel in der Lage ist, Dimethylacetamid als Lösungsmittel des ersten Reaktionsschritts ohne Verluste im Umsatz zu ersetzen. In Bezug auf eine Übertragung auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* ist zu sagen, dass in allen getesteten Lösungsmitteln eine Suspension des gemischten Anhydrids vorliegt und somit ein einfacher Transfer auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* nicht möglich ist.

Die einzigen Lösungsmittel, die Umsätze im interessanten Bereich ermöglichen, sind *N*-Methyl-2-pyrrolidon, Dimethylpropylenharnstoff und  $\epsilon$ -Caprolacton. Aufgrund der toxikologischen Eigenschaften von *N*-Methyl-2-pyrrolidon und Dimethylpropylenharnstoff erlauben diese keine wirkliche Verbesserung im Vergleich zu Dimethylacetamid. Die Verwendung von  $\epsilon$ -Caprolacton zeigt eine Möglichkeit, Dimethylacetamid zu ersetzen. Aufgrund der großen Ausbeutelücke von 28% wird jedoch im Folgenden mit Dimethylacetamid weitergearbeitet.

In einem zweiten *Screening* wird nach einem Ersatz für Dichlormethan gesucht. Es soll ein Lösungsmittel gewählt werden, in dem 7-ACA (**3**) gelöst werden kann, um eine schnelle Reaktion mit dem gemischten Anhydrid zu ermöglichen. Da 7-ACA (**3**) nur in wenigen Lösungsmitteln unter Zugabe von Triethylamin löslich ist, beschränkt sich das *Screening* auf Methanol und Wasser. Diese beiden protischen Lösungsmittel können mit dem gemischten Anhydrid reagieren. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Aminofunktion in 7-Position im

7-ACA (**3**) eine deutlich höhere Nucleophilie aufweist als die verwendeten Lösungsmittel. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind zusammen mit dem Ergebnis des Standardprozesses zum Vergleich in Abbildung 2–36 dargestellt.

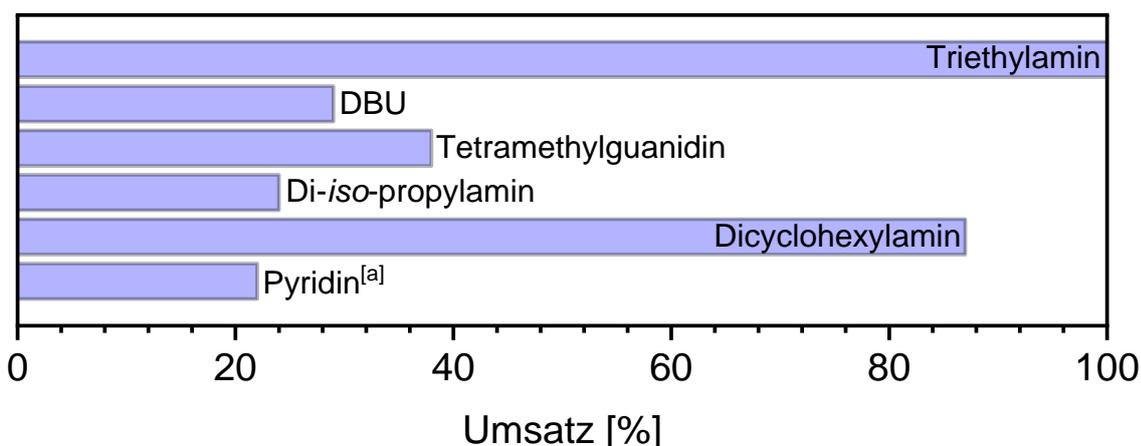
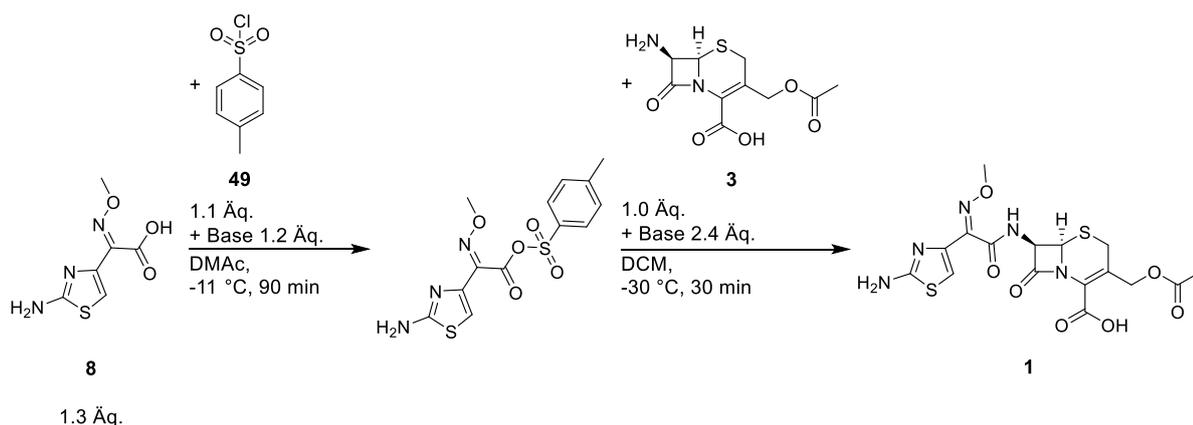


**Abbildung 2–36:** Synthese von Cefotaxim (**1**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) unter Ersatz von Dichlormethan. [a] Zweiter Reaktionsschritt bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$ .

Es ist zu sehen, dass die Verwendung von Wasser als zweites Lösungsmittel einen Einbruch des Umsatzes auf 70% zur Folge hat. Dem gegenüber zeigt sich der Einsatz von Methanol positiv, da hier ein nahezu quantitativer Umsatz möglich ist. Generell kann festgestellt werden, dass Dichlormethan durch das „grüne“ Lösungsmittel Methanol bei fast gleichbleibendem Umsatz ausgetauscht werden kann. Mit allen getesteten Alternativen für das zweite Lösungsmittel in Kombination mit Dimethylacetamid als erstem Lösungsmittel werden am Ende klare Reaktionsmischungen erhalten, sodass die Wahl des zweiten Lösungsmittels innerhalb der untersuchten Gruppe keinen nennenswerten Einfluss auf die Übertragung auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* aufweist.

In Vorbereitung auf eine Übertragung auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* werden klare Reaktionslösungen bevorzugt. Das gemischte Anhydrid liegt in allen getesteten Lösungsmitteln im ersten Reaktionsschritt bisher nur als Suspension vor. 7-ACA (**3**) kann durch Zugabe von Triethylamin in verschiedenen Lösungsmitteln vollständig gelöst werden. Darauf aufbauend

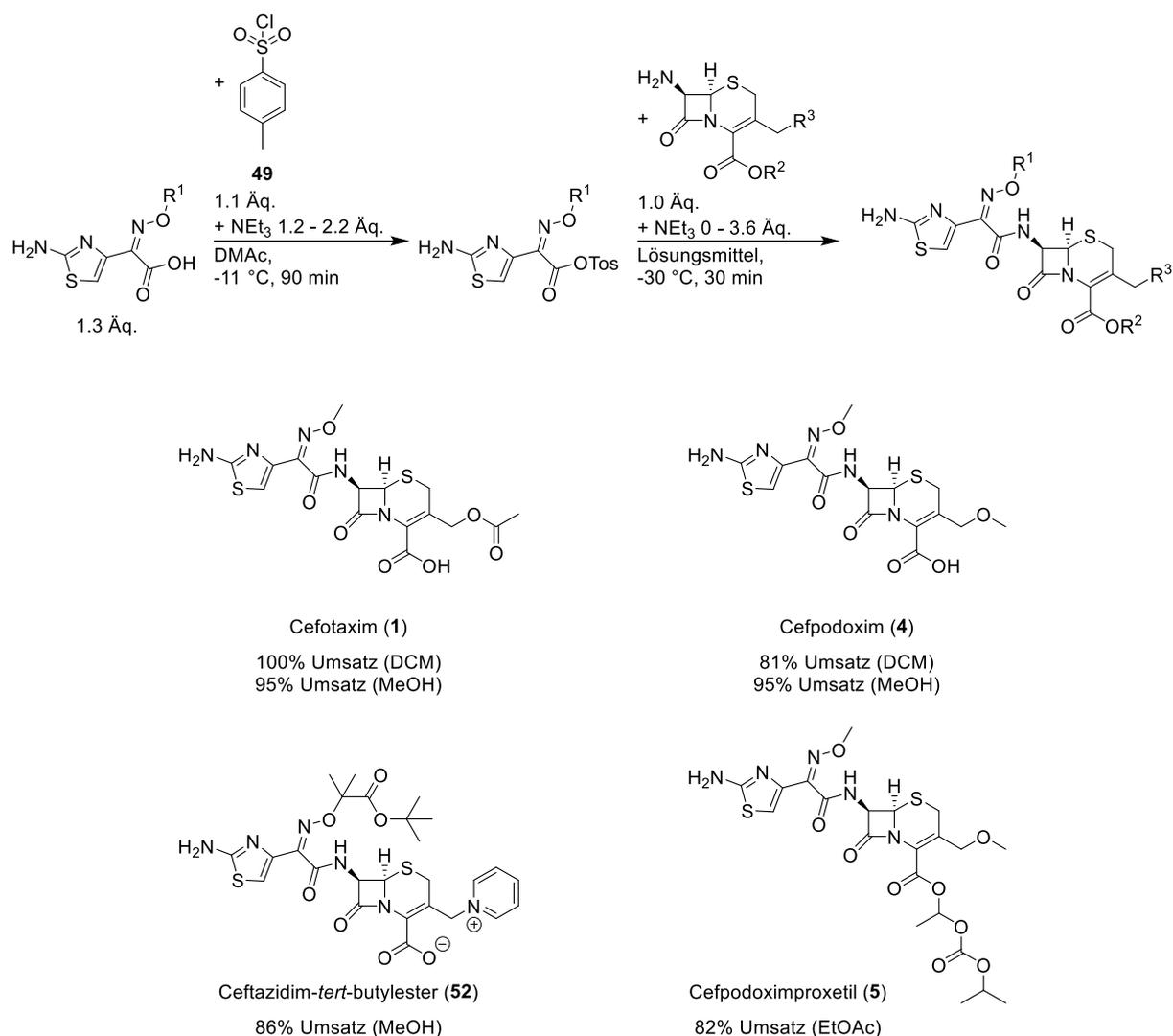
soll ein Basen-Screening zum Austausch von Triethylamin durchgeführt werden, um mögliche Alternativen zu finden, mit denen das Auftreten von störenden Suspensionen verhindert werden kann. Daraufhin werden fünf organische Basen getestet und die Ergebnisse im Vergleich zu der Verwendung von Triethylamin in Abbildung 2–37 gezeigt. Mit Pyridin kann keine Lösung von 7-ACA (**3**) in Dichlormethan erhalten werden, sodass Triethylamin zugefügt wird. Bei den übrigen Basen werden keine weiteren Anpassungen vorgenommen. Keine der verwendeten Basen kann Triethylamin direkt ohne Anpassung der Reaktionsbedingungen ersetzen. Der höchste Umsatz von 87% kann mit Dicyclohexylamin erreicht werden. Die weiteren Umsätze für DBU, Tetramethylguanidin, Di-*iso*-propylamin und Pyridin liegen zwischen 20% und 40%. Nur bei der Reaktion mit DBU kann eine Lösung ohne Feststoffanteil des gemischten Anhydrids beobachtet werden. Ein Umsatz von 29% ist jedoch zu gering, um DBU als geeignete Base zu verwenden. Eine Übertragung der Reaktion auf ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* ist somit nicht möglich.



**Abbildung 2–37:** Synthese von Cefotaxim (**1**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) unter Ersatz von Triethylamin. [a] Zum Lösen von 7-ACA (**3**) in Dichlormethan musste Triethylamin zugesetzt werden.

### 2.6.3. Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess

Die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) soll als Plattformprozess etabliert werden, da alle Cephalosporin-Wirkstoffe in 7-Position derivatisiert sind. Dafür werden neben dem bereits erfolgreich hergestellten Cefotaxim (1) weitere Zielmoleküle diskutiert. Als attraktive Zielmoleküle werden Cefpodoxim (4), Cefpodoximproxetil (5) und Ceftazidim (9) in Form des geschützten Ceftazidim-*tert*-butylesters (52) ausgewählt (Abbildung 2–38).



**Abbildung 2–38:** Beispiele für die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess.

Cefpodoxim (4) weist eine große Ähnlichkeit zu Cefotaxim (1) auf, da in diesem Molekül in der Seitenkette in 3-Position eine Ether- anstelle einer Esterfunktion enthalten ist. Eine weit verbreitete Synthesestrategie ist jedoch auch in diesem Fall die Verwendung des Aktivesters MAEM (18).<sup>[27,28]</sup> Bei dem Versuch, Cefpodoxim (4) unter den Standardbedingungen mit

Dimethylacetamid und Dichlormethan als Lösungsmittel über eine Kopplungsreaktion mit dem Säurechlorid **49** herzustellen, wird die Menge an Triethylamin zum Lösen des  $\beta$ -Lactams 7-Amino-3-Methoxycephalosporansäure (**53**), abgekürzt AMCA, auf drei Äquivalente erhöht. Unter sonst identischen Bedingungen kann ein Umsatz von 81% erzielt werden. Bei Austausch des zweiten Lösungsmittels Dichlormethan durch Methanol werden wieder zwei Äquivalente Triethylamin benötigt, da die Löslichkeit unter diesen Bedingungen höher ist. Der Umsatz liegt bei 95% und ist damit identisch zu dem Umsatz bei der Bildung von Cefotaxim (**1**) unter gleichen Bedingungen. Dies ist ein sehr gutes Ergebnis für eine nicht optimierte Synthese. Das nächste Zielprodukt ist der Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**), der ebenfalls auf der klassischen Route über eine Aktivierung durch einen 3-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-thioester dargestellt wird.<sup>[24,25]</sup> Strukturell zeigt diese Verbindung zwei deutliche Unterschiede zu Cefotaxim (**1**). In der Seitenkette in 7-Position befindet sich statt der Methyloximfunktion eine Oximfunktion einer mit *tert*-Butanol veresterten Buttersäure. Als zweiter Unterschied ist in der 3-Position statt der Esterfunktion eine kationische Pyridiniumstruktur zu nennen. Diese beiden Änderungen in der Struktur können eine stark abweichende Reaktivität bei der Kopplung von dem  $\beta$ -Lactam PYCA (7-Amino-3-pyridiniumcephalosporansäurecarboxylat) (**55**) und der Seitenkette (*Z*)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-(((1-(*tert*-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)-essigsäure (**54**) zur Folge haben. Dies wird bei Vorversuchen deutlich, da PYCA (**55**) unter Zusatz von Triethylamin in Dichlormethan nur sehr gering löslich ist. Im polareren Methanol kann jedoch eine klare Lösung erhalten werden. Die Reaktion wird unter Standardbedingungen durchgeführt, wobei Methanol als zweites Lösungsmittel gewählt wird. Unter diesen nicht optimierten Bedingungen kann ein Umsatz von 86% in dem „grünen“ Lösungsmittel Methanol erzielt werden, was ein gutes Ergebnis darstellt.

Das letzte Zielprodukt Cefpodoximproxetil (**5**) soll durch Kopplung von AMCA-Proxetil (**56**) mit ATMO-Säure (**8**) erhalten werden. Dieses Zielmolekül ist mit Ausnahme einer Veresterung in 4-Position identisch mit Cefpodoxim (**4**). Diese veresterte Seitenkette führt jedoch zu deutlich unterschiedlichen Reaktivitäten. Zum einen sind sowohl das Edukt **56** wie auch das Produkt **5** löslich in organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Ethylacetat. Zum anderen sind in 4-Position veresterte Cephalosporine empfindlich gegenüber basischen Bedingungen (Kapitel 3.1.). Bei dem Standardverfahren werden drei Äquivalente Base benötigt, um den formal entstehenden Chlorwasserstoff und die entstehende 4-Toluolsulfonsäure (**50**) abzufangen und das Edukt 7-ACA (**3**) bzw. Produkt Cefotaxim (**1**) in Lösung zu halten. Aufgrund der drohenden Nebenreaktion unter basischen Bedingungen wird die Zugabe der

Base verändert. Da das Abfangen von Chlorwasserstoff und der Säure **50** weiterhin nötig ist, werden weiterhin 2.2 Äquivalente Base eingesetzt. Diese werden zu der Lösung des gemischten Anhydrids zugegeben. Als zweites Lösungsmittel wird Ethylacetat als „grünes“ Lösungsmittel getestet. In diesem ist das Edukt **56** löslich, sodass an dieser Stelle auf die Zugabe weiterer Base verzichtet werden kann. Unter diesen Reaktionsbedingungen kann das Produkt Cefpodoximproxetil (**5**) mit einem Umsatz von 82% erhalten werden. Der Umsatz wird in diesem Fall anhand der Umsetzung von AMCA-Proxetil (**56**) bestimmt, da eine HPLC-Analytik unter den getesteten Bedingungen mit Aufspaltung der Signale von Edukt **56** und Produkt **5** nur möglich ist, wenn die Seitenkette **8** nur geringe Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufweist und somit nicht vom Einspritzsignal separiert werden kann.

#### **2.6.4. Übertragung der Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) auf ein *Flow-Setup***

Die Vorteile der Verwendung eines Mikroreaktions-Prozesses konnten bereits in Kapitel 2.1.3. aufgezeigt werden. Das Abführen der Reaktionswärme der exothermen Reaktion des gemischten Anhydrids in einem *Flow*-Reaktor kann für diese Reaktion äußerst positiv sein. Da kein Lösungsmittel gefunden wurde, in dem das gemischte Anhydrid in einer klaren Lösung vorliegt, kann eine Übertragung der Reaktion auf einen Mikroreaktor nicht erfolgen, da einer der größten Nachteile das Festsetzen der Kapillaren des Mikroreaktors ist, wenn nicht mit klaren Lösungen gearbeitet wird.<sup>[53]</sup> Es soll jedoch eine Übertragung auf ein *Flow-Setup* erfolgen, dessen Kanäle eine größere Dimension aufweisen und somit weniger empfindlich gegen Verstopfen sind. Dazu wird ein relativ einfacher Versuchsaufbau verwendet (Abbildung 2–39). Der erste wichtige Faktor ist die Auswahl der Pumpen. Da mit einer Suspension gearbeitet wird, ist ein kontinuierliches Rühren dieser Suspension unumgänglich, um eine Sedimentierung zu verhindern. Ebenfalls herausfordernd ist die dauerhafte Kühlung der beiden Eduktmischungen. Somit können nicht die sonst vielfach eingesetzten Spritzenpumpen verwendet werden, da diese nicht temperierbar sind und auch eine Sedimentation nicht verhindert werden kann. Als Alternative werden peristaltische Pumpen verwendet. Mit diesen werden die Eduktmischungen direkt aus den gekühlten Vorratsgefäßen angesaugt und zur Mischeinheit gepumpt. Die Mischeinheit ist ein simpler Y-Schlauchverbinder, an den die beiden Schläuche der Eduktmischungen angeschlossen werden. An das dritte Ende wird der Reaktionsschlauch aus Perfluorethylenpropylen mit einem Innendurchmesser von 4 mm

angeschlossen. Am Ende dieses dritten Schlauches findet eine Probenahme statt. Der Schlauch wird aufgerollt und für die Reaktion in einem Kryostaten platziert.



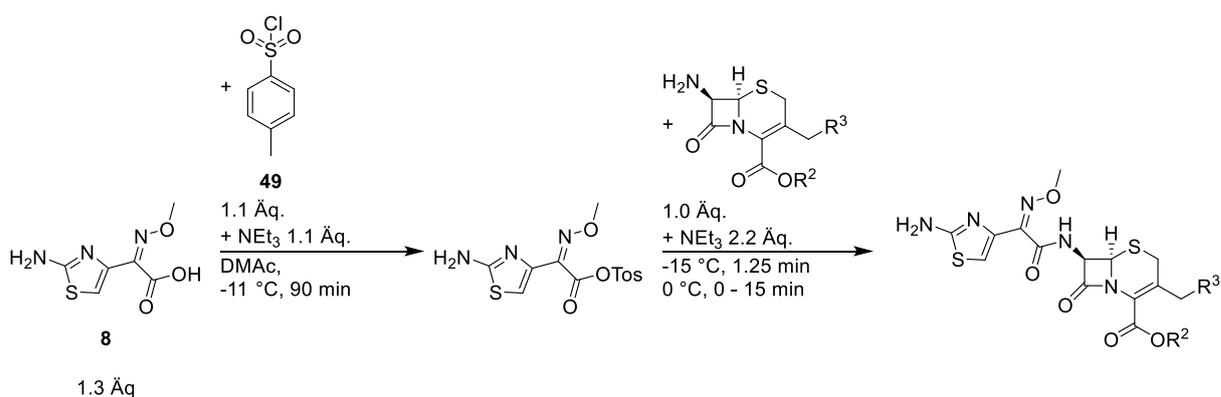
**Abbildung 2–39:** Aufbau für die Reaktion im *Flow-Setup* mit den beiden Zuläufen auf der linken Seite und dem Ablauf auf der rechten Seite. In der Mitte ist der Schlauchverbinder als Mischungseinheit zu erkennen.

Für die Übertragung der beiden Reaktionen werden die beiden Flüssigkeitsmischungen so angepasst, dass ein Volumen von 100 mL erreicht wird. Die erste Flüssigkeit enthält hierbei das gemischte Anhydrid in Dimethylacetamid suspendiert. Die zweite Flüssigkeit ist eine Lösung von 7-ACA (**3**) bzw. AMCA (**53**) in Dichlormethan bzw. Methanol. Die peristaltische Pumpe wird mit Wasser auf einen Durchfluss von 4.9 mL pro Minute kalibriert, was einer Reaktionszeit von 1.25 Minuten entspricht. Die Kalibrierung mit Wasser kann zu leichten Abweichungen in der Stöchiometrie und Reaktionszeit führen. Während diese bei der Reaktionszeit im tolerierbaren Bereich sein sollten, führt eine Ungenauigkeit in der Stöchiometrie zu einer fehlerhaften Analytik bei der Betrachtung des Umsatzes bezogen auf den Verbrauch an ATMO-Säure (**8**), weshalb für die Versuche im *Flow-Setup* der Umsatz bezogen auf den Verbrauch der  $\beta$ -Lactamkomponente 7-ACA (**3**) oder AMCA (**53**) bestimmt wird. Um den Umsatz der Reaktion nach 1.25 Minuten zu bestimmen, wird direkt am Ende der Apparatur ein definiertes Volumen von 4  $\mu$ L der Reaktionsmischung in einer Mischung aus

750  $\mu\text{L}$  Wasser und 750  $\mu\text{L}$  Acetonitril verdünnt. Die hohe Verdünnung soll ein direktes Beenden der Reaktion bewirken. Außerdem wird jeweils ein Teil der Reaktionsmischung aufgefangen und 15 Minuten bei 0 °C nachgerührt. Bei dieser Probe wird ebenfalls der Umsatz bestimmt. Aus apparativen Gründen wird für den Reaktionsschritt im *Flow-Setup* eine Temperatur von -15 °C gewählt.

Mit dem *Flow-Setup* und unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz werden Cefotaxim (**1**) und Cefpodoxim (**4**) hergestellt (Tabelle 2-2). Dabei wird mit dem Standardprozess für die Synthese von Cefotaxim (**1**) in Dimethylacetamid und Dichlormethan ein Umsatz von 68% ohne Nachrühren und ein vollständiger Umsatz mit weiterem Rühren bei 0 °C erzielt. Der Umsatz ist somit identisch zu dem Umsatz im *Batch-Setup*. Des Weiteren wird die Reaktion mit Methanol als zweitem Lösungsmittel auch auf das *Flow-Setup* übertragen, wo vor der Nachrührzeit ein Umsatz von 61% erreicht werden kann. Nach 15 Minuten Nachrühren wird ein Umsatz von 91% erzielt, der nur knapp unter dem Umsatz von 95% im *Batch* liegt. Außerdem wird Cefpodoxim (**4**) ebenfalls im *Flow-Setup* hergestellt. Bei dieser Synthese wird vor dem Nachrühren das Produkt mit einem Umsatz von 70% erhalten. Über die verlängerte Reaktionszeit kann ein Umsatz von 90% erzielt werden, der nur geringfügig unter dem Umsatz im *Batch* von 95% liegt.

**Tabelle 2-2:** Ergebnisse der Synthese von **1** und **4** im *Flow-Setup* unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**).



Eintrag	Produkt	Lösungsmittel	Umsatz ohne Nachrühren [%]	Umsatz mit 15 Minuten Nachrühren
1	<b>1</b>	DCM	68	100
2	<b>1</b>	MeOH	61	91
3	<b>4</b>	MeOH	70	90

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) auf ein *Flow-Setup* übertragen werden kann. Cefotaxim (**1**) kann mit quantitativem Umsatz in Dimethylacetamid und Dichlormethan mit 15 Minuten Nachrühren hergestellt werden. In Dimethylacetamid und Methanol können Cefotaxim (**1**) und Cefpodoxim (**4**) mit Umsätzen von ca. 90% synthetisiert werden. Dies ist ein interessanter Startpunkt für die Kooperationspartner, die dieses Verfahren in der Folge genauer untersuchen können.

## 2.7. Zusammenfassung

Die Herstellung von Cefotaxim (**1**) aus ATMO-Säure (**8**) und 7-ACA (**3**) wurde unter Verwendung der Kopplungsreagenzien Carbonyldiimidazol (**32**), T3P<sup>®</sup> (**40**), DMT-MM (**45**) und 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) getestet. Die Verwendung von Carbonyldiimidazol (**32**) wurde an einer Modellreaktion für die Kopplung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**) und Benzylamin (**34**) getestet. Dabei konnten bei unterschiedlicher Aktivierungstemperatur zwei verschiedene Nebenprodukte neben dem entsprechenden Produkt **35** identifiziert werden. Bei geringer Aktivierungstemperatur reagierte Benzylamin (**34**) mit dem Kopplungsreagenz **32** zum Harnstoffderivat **38**. Bei hoher Aktivierungstemperatur konnte das ATMO-ATMO-Benzylamid (**39**) identifiziert werden. Dieses entsteht durch die Reaktion der aktivierten ATMO-Säure mit einem weiteren Molekül des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**). Für die Synthese des Modellsubstrates konnte kein geeignetes Reaktionsfenster gefunden werden, um eine Nebenproduktbildung zu unterdrücken. Trotzdem wurde die Kopplung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**) mit 7-ACA (**3**) untersucht, wobei ein Umsatz von 3% erzielt werden konnte.

Die Verwendung von T3P<sup>®</sup> (**40**) zeigte dagegen keine Produktbildung für die Modellreaktion zwischen ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**). Es konnte lediglich ein Addukt **41** zwischen dem Kopplungsreagenz **40** und Benzylamin (**34**) detektiert werden.

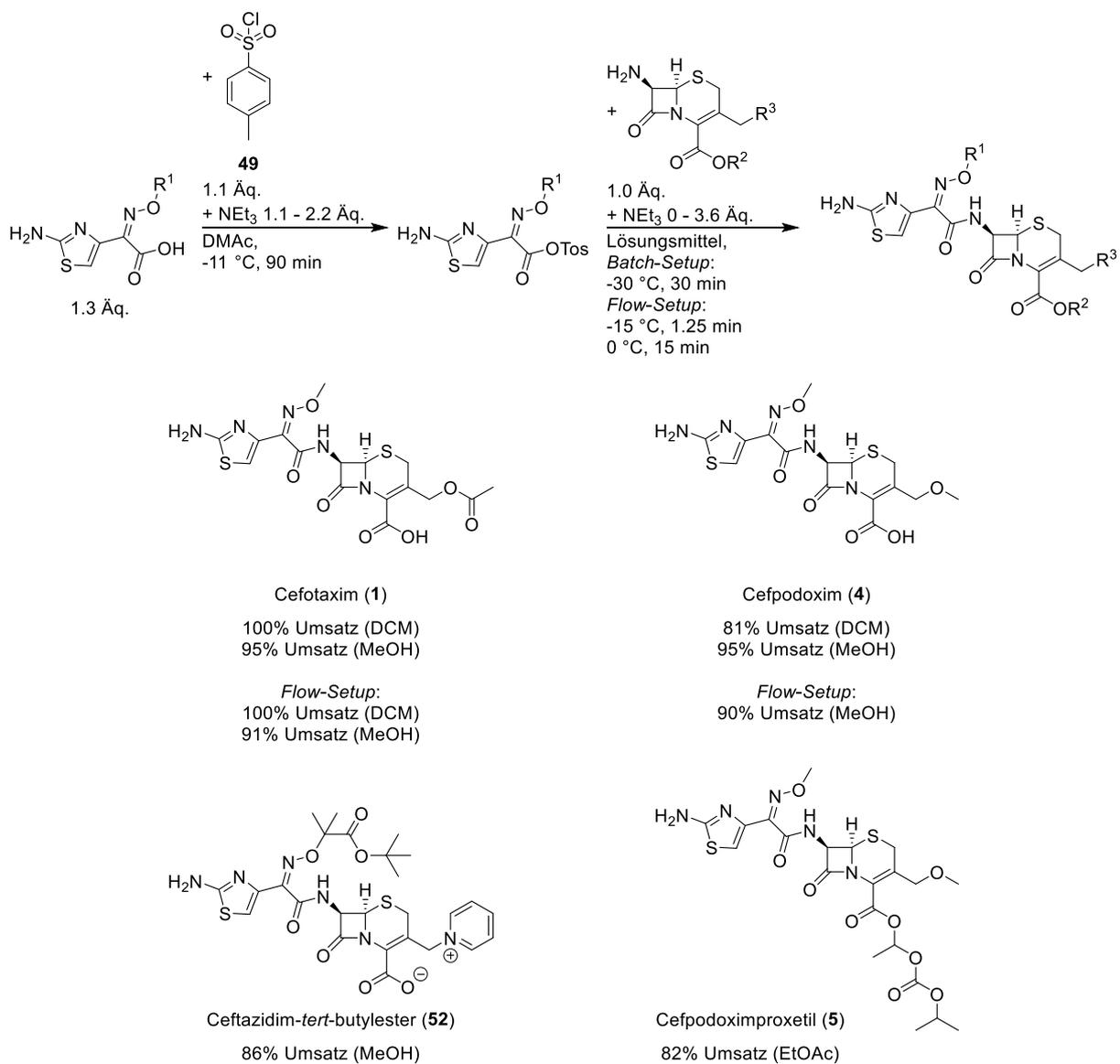
Als drittes Kopplungsreagenz wurde DMT-MM (**45**) getestet. Dieses konnte leicht aus den Edukten 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**) hergestellt werden. Es wurden drei verschiedene Lösungsmittel bei Raumtemperatur und 40 °C für die Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und 7-ACA (**3**) getestet (Abbildung 2–30). Dabei konnten in den schwefelhaltigen Lösungsmitteln Sulfolan und Dimethylsulfoxid Ausbeuten von bis zu 47% erhalten werden. Jedoch ist in den HPLC-Chromatogrammen bei der Verwendung dieser

Lösungsmittel jeweils eine größere Anzahl weiterer Signale detektierbar, die auf eine deutliche Bildung verschiedener Nebenprodukte hindeutet. Bei der Verwendung von Dimethylcarbonat ist keine Nebenproduktbildung im HPLC-Chromatogramm beobachtbar. Der Umsatz liegt bei Raumtemperatur jedoch nur bei 2% und bei 40 °C nur bei 24%. Somit kann auch bei der Verwendung des Kopplungsreagenzes **45** kein geeignetes Prozessfenster identifiziert werden.

Der Einsatz von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz konnte erfolgreich etabliert werden (Abbildung 2–40). In Anlehnung an ein bekanntes Verfahren konnte Cefotaxim (**1**) mit einem quantitativen Umsatz dargestellt werden.<sup>[100]</sup> Über ein umfangreiches *Screening* für den Austausch der verwendeten Lösungsmittel Dimethylacetamid und Dichlormethan zeigt sich, dass Methanol eine durchaus attraktive Alternative zu Dichlormethan bietet und auch zu nahezu quantitativem Umsatz führt.

Im Anschluss konnte die Kopplungsreaktion mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Plattformprozess für die Amidierung in 7-Position für verschiedene, teilweise deutlich unterschiedliche Wirkstoffe der Cephalosporin-Antibiotika gezeigt werden (Abbildung 2–40). Dabei erwies sich Methanol als einzige oder bessere Möglichkeit für die Synthese von Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) und Cefpodoxim (**4**). Für das in 4-Position veresterte Cefpodoximproxetil (**5**) konnte als Alternative aufgrund der deutlich geringeren Polarität des Moleküls Ethylacetat als Lösungsmittel verwendet werden. Für alle diese Reaktionen wurden gute Umsätze mit über 80% bei nicht optimierten Prozessen erzielt.

Außerdem wurde neben den Lösungsmittel-*Screenings* ein Basen-*Screening* durchgeführt, um eine Alternative zu Triethylamin zu finden, bei der klare Reaktionslösungen für eine Übertragung des Prozesses in ein Mikroreaktionstechnik-*Setup* vorliegen. Dieses Basen-*Screening* zeigte jedoch keine Möglichkeit dieses Ziel zu erreichen. Trotzdem gelang es aus einfachsten Labormaterialien ein *Flow-Setup* im größeren Maßstab (4 mm Durchmesser gegenüber maximal 1 mm Durchmesser in der Mikroreaktionstechnik) aufzubauen, das ähnliche Vorteile in der Reaktionsführung zeigen sollte. In diesem *Setup* mit Nachrührprozess bei 0 °C konnte Cefotaxim (**1**) unter der Nutzung von Dimethylacetamid und Dichlormethan als Lösungsmittel mit quantitativem Umsatz erhalten werden. Unter der Nutzung von Dimethylacetamid und Dichlormethan konnten Cefotaxim (**1**) und Cefpodoxim (**4**) unter gleichen Bedingungen mit guten Umsätzen von 91% und 90% hergestellt werden (Abbildung 2–40).



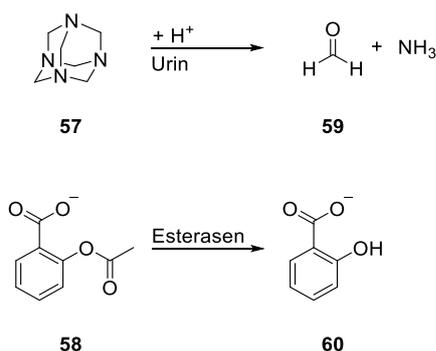
**Abbildung 2–40:** Beispiele für die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Plattformprozess.

Die Ergebnisse sind ein interessanter Startpunkt, um die Synthese von Cephalosporin-Antibiotika über den beschriebenen Prozess zu optimieren und etablieren.

# 3. Synthese von Cefpodoximproxetil (5) und bekannter $\Delta 2$ -Nebenprodukte

## 3.1. Stand der Wissenschaft

Die Verwendung von *Prodrugs* ist ein beliebtes Prinzip, um Wirkstoffe an eine gewünschte Therapieform anzupassen. Dabei wird nicht der eigentliche Wirkstoff für die Therapie appliziert, sondern eine chemisch veränderte Form. Die Verwendung dieser Derivate kann verschiedene Vorteile aufweisen. Durch Veränderung von Hydrophilie oder Lipophilie können die Aufnahme in den Körper und der Metabolismus gesteuert werden. Dies kann neben anderen Möglichkeiten bei der Applikation auch zu einer gezielten Freisetzung des aktiven Metaboliten führen. Einerseits kann durch die Verwendung des *Prodrugs* eine potentielle schnelle Ausscheidung vermieden werden, andererseits kann über einen gezielten Metabolismus über bestimmte Enzyme der aktive Wirkstoff direkt an der gewünschten Stelle freigesetzt werden.<sup>[102]</sup> Zwei bekannte Beispiele für den Einsatz von *Prodrugs* sind die Verwendung von Urotropin (**57**) und Acetylsalicylsäure (**58**) (Abbildung 3–1).



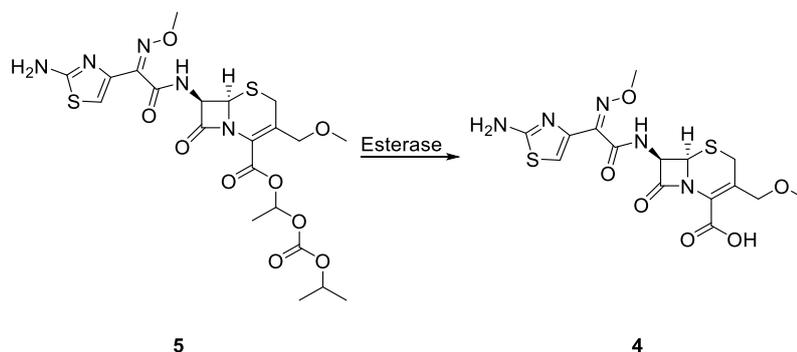
**Abbildung 3–1:** Frühe Beispiele für die Verwendung von *Prodrugs*, wobei Urotropin (**57**) im sauren Urin zum desinfizierenden Formaldehyd (**59**) und Acetylsalicylsäure (**58**) durch Esterasen in den aktiven Metaboliten Salicylsäure (**60**) umgesetzt wird.<sup>[102]</sup>

Urotropin (**57**) wurde ab 1899 unter dem Namen Methenamin gegen Beschwerden im Harntrakt eingesetzt. Im leicht sauren Urin wird Formaldehyd (**59**) freigesetzt, das desinfizierend wirkt.<sup>[102]</sup> Ebenfalls im Jahr 1899 wurde Acetylsalicylsäure (**58**), die veresterte Form der

Salicylsäure (**60**), eingeführt. Der Ester **58** erwies sich als deutlich besser verträglich und wird enzymatisch im Körper hydrolysiert, um die wirksame Salicylsäure (**60**) freizusetzen.<sup>[102]</sup>

Resorptionsester sind Beispiele für *Prodrugs* und werden eingesetzt, um hydrophile Säuren oder Alkohole in eine lipophilere Form umzuwandeln. Diese lipophilere, meist inaktive Verbindung kann oral appliziert werden und wird im Körper von verschiedenen Hydrolasen in seinen aktiven Metaboliten umgewandelt. Dabei handelt es sich um eine verbreitete Strategie, um Wirkstoffe, die eigentlich parenteral, d. h. unter Umgehung des Verdauungstraktes, angewandt werden, in eine oral applizierbare Form umzuwandeln.<sup>[102,103]</sup> Diese orale Applikation ist für Patienten deutlich schonender als eine intravenöse Applikation und kann von diesen auch selbst vorgenommen werden. Dies ermöglicht eine Reduktion ambulanter oder stationärer Behandlungen und bietet somit auch ökonomische Vorteile.<sup>[104]</sup>

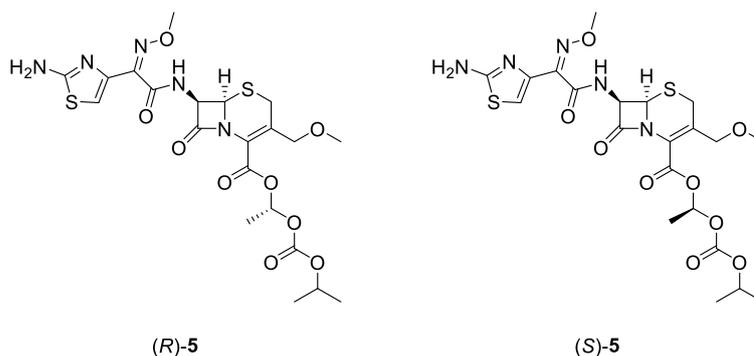
Ein Beispiel für die Verwendung von Resorptionestern ist Cefpodoximproxetil (**5**).<sup>[103]</sup> Cefpodoximproxetil (**5**) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine der dritten Generation, welche als erste Gruppe von Cephalosporinen auch eine pharmakologische Aktivität gegen gramnegative Bakterien aufweist.<sup>[105]</sup> Cefpodoximproxetil (**5**) ist dabei eine der ersten Verbindungen aus dieser Generation der Cephalosporin-Antibiotika, die für die orale und nicht parenterale Applikation geeignet sind.<sup>[105]</sup> Der Resorptionsester **5** ist, wie bei *Prodrugs* üblich, pharmakologisch nicht aktiv, während es sich bei der aktiven Komponente um den Metaboliten Cefpodoxim (**4**) handelt.<sup>[104–112]</sup> Cefpodoximproxetil (**5**) wird oral appliziert und in der Darmwand durch unspezifische Esterasen hydrolysiert, wobei die Säure **4** als pharmakologisch aktiver Metabolit freigesetzt wird (Abbildung 3–2).<sup>[104,107,108,110,112]</sup>



**Abbildung 3–2:** Metabolismus von Cefpodoximproxetil (**5**) zu Cefpodoxim (**4**).

Bei genauer Betrachtung von Cefpodoximproxetil (**5**) wird deutlich, dass das Molekül neben den beiden Stereozentren im  $\beta$ -Lactamring ein weiteres Stereozentrum in der Seitenkette aufweist. Da die beiden Stereozentren im  $\beta$ -Lactamring aufgrund des biosynthetischen

Ursprungs der Vorstufe 7-ACA (**3**) mit einer absolut reinen (*R*)-Stereokonfiguration vorliegen, besteht Cefpodoximproxetil (**5**) aus zwei Diastereomeren.<sup>[113]</sup> Diese werden zur besseren Übersicht in dieser Arbeit bei 7-Amino-3-Methoxycephalosporansäureproxetil (**56**) (AMCA-Proxetil) und Cefpodoximproxetil (**5**) als (*R*)- und (*S*)-Diastereomer bezeichnet, wobei sich die Bezeichnung dabei auf die Stereokonfiguration in der Seitenkette bezieht (Abbildung 3–3).

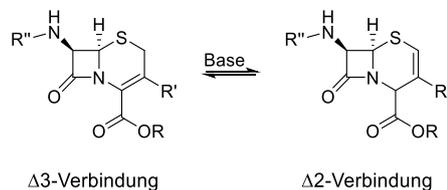


**Abbildung 3–3:** Die beiden Diastereomere (*R*)-Cefpodoximproxetil (*R*)-**5** und (*S*)-Cefpodoximproxetil (*S*)-**5**.

Obwohl beide Diastereomere (*R*)-**5** und (*S*)-**5** in ihrer biologischen Aktivität stark ähnlich sind, unterscheiden sie sich teilweise in ihren biologischen und physikochemischen Eigenschaften.<sup>[114,115]</sup> Um diese unterschiedlichen Eigenschaften zu untersuchen, wurden Verfahren entwickelt, die verschiedenen Diastereomere (*R*)-**5** und (*S*)-**5** per Kristallisation zu isolieren und zu charakterisieren. Diese Verfahren basieren auf dem Konzept AMCA-Proxetil (**56**) oder Cefpodoximproxetil (**5**) mit verschiedenen Säuren zu co-kristallisieren.<sup>[113,116]</sup> Aufgrund der unterschiedlichen biologischen und physikochemischen Eigenschaften ist es vorgeschrieben, dass für eine orale Anwendung von Cefpodoximproxetil (**5**) der Anteil von (*R*)-**5** zwischen 50% und 60% der Gesamtmenge an **5** liegen muss.<sup>[47,117,118]</sup>

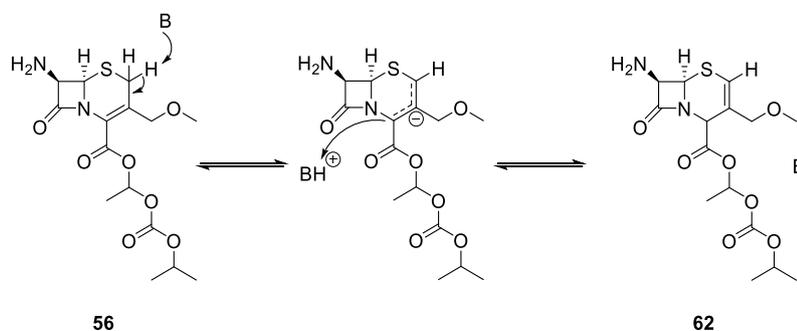
Es ist bekannt, dass in 4-Position veresterte Cephalosporine unter basischen Bedingungen zu einer Isomerisierungsreaktion neigen bei der die Doppelbindung von der ursprünglichen  $\Delta$ 3-Position in einer Gleichgewichtsreaktion in die  $\Delta$ 2-Position übergeht (Abbildung 3–4).<sup>[119–122]</sup> Dies konnte neben einer Vielzahl von Cephalosporin-Antibiotika auch bei Cefpodoximproxetil (**5**) beobachtet und detektiert werden.<sup>[123,124]</sup> Es ist zu beachten, dass in der IUPAC Nomenklatur die Doppelbindung im Cefpodoximproxetil (**5**) in  $\Delta$ 2-Position und in der isomerisierten Form **61** in  $\Delta$ 3-Position vorliegt. Jedoch wird traditionell unter den Forschern auf dem Gebiet der Cephalosporine eine andere Nomenklatur verwendet, die daher auch in

dieser Arbeit Anwendung findet. Dabei beginnt die Nummerierung beim Schwefelatom, sodass die Doppelbindung im Cefpodoximproxetil (**5**) in  $\Delta$ 3-Position und in der isomerisierten Form **61** in  $\Delta$ 2-Position vorliegt.



**Abbildung 3–4:** Basenkatalysierte Umlagerung der Doppelbindung bei in 4-Position veresterten Cephalosporinen.

Problematisch an dieser Umlagerung ist, dass die  $\Delta$ 2-Verbindung pharmakologisch nicht aktiv ist.<sup>[120,122]</sup> Deshalb ist es wichtig, die Bedingungen bei der Synthese des Resorptionsesters **5** so anzupassen, dass die Menge an  $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil **61** als Nebenprodukt minimal ist. Für eine genauere Betrachtung ist der Mechanismus dieser Isomerisierung interessant. Dafür schlugen *Bentley et al.* 1976 eine Deprotonierung in 2-Position als ersten Schritt vor. Nach Umlagerung des freien Elektronenpaares in  $\Delta$ 2-Position wandert das Elektronenpaar aus der  $\Delta$ 3-Position in 4-Position und wird reprotoniert (Abbildung 3–5).<sup>[125]</sup>

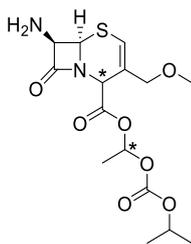


**Abbildung 3–5:** Mechanismus der basenkatalysierten  $\Delta$ 2-Isomerisierung am Beispiel von AMCA-Proxetil (**56**).<sup>[122,125,126]</sup>

Dieser Mechanismus wird ebenfalls von *Saab et al.* unterstützt, die als weitere Begründung die Stabilität der freien Säure in 4-Position gegen die basenkatalysierte  $\Delta$ 2-Isomerisierung aufführen. Diese kann mit der Deprotonierung der freien Säure in 4-Position und der negativen Ladung in direkter Umgebung der zu reprotonierenden Stelle begründet werden.<sup>[122]</sup> Der Mechanismus wurde dann im Folgenden von *Richter et al.* untersucht.<sup>[126]</sup> Sie deuterierten Cefazolinethylester in 2-Position in einer dreistufigen Synthese. Bei der Bestimmung der Reaktionsratenkonstanten für den Deprotonierungsschritt in 2-Position für den deuterierten und

den nicht deuterierten Cefazolinethylester konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsratenkonstanten des deuterierten Cefazolinethylesters um den Faktor 3.0 in Puffer und 3.7 in Blutplasma erniedrigt werden. Eine logische Erklärung für die Verlangsamung der Reaktion liefert der primäre Isotopeneffekt, der besagt, dass eine Reaktion langsamer abläuft, wenn ein Atom, das an der Reaktion teilnimmt, gegen ein schwereres Isotop ausgetauscht wird. Somit wird der prognostizierte Mechanismus unterstrichen.<sup>[126,127]</sup>

Ein interessanter Punkt ist die Bildung eines weiteren Stereozentrums in 4-Position durch die Isomerisierung der Doppelbindung in die  $\Delta^2$ -Stellung (Abbildung 3–6). Neben den aufgrund der Biosynthese in (*R*)-Konfiguration vorliegenden Stereozentren im  $\beta$ -Lactamring und dem Stereozentrum in der Seitenkette existiert nun auch das neu gebildete Stereozentrum in der 4-Position.<sup>[113]</sup> Soweit mir bekannt, wurde bisher nie gezielt untersucht, ob diese Reaktion an dem Kohlenstoffatom in 4-Position stereoselektiv verläuft und welche Konfiguration das Kohlenstoffatom in 4-Position einnimmt.



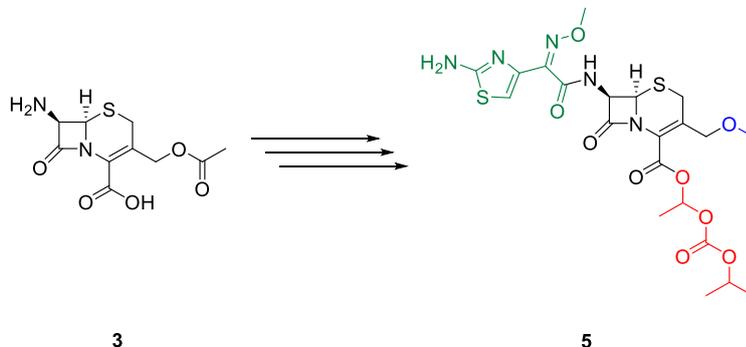
62

**Abbildung 3–6:**  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) mit insgesamt vier Stereozentren.

### 3.1.1. Klassische Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**)

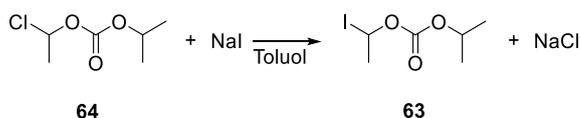
Ausgangsstoff für die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) ist 7-ACA (**3**), wie für alle Cephalosporin-Antibiotika als semisynthetische Derivate. Für die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) wird der Grundstoff **3**, wie in Abbildung 3–7 dargestellt, in drei Positionen derivatisiert. Eine dieser Veränderungen ist die Umwandlung des veresterten Alkohols in 3-Position in einen Methylether (blaue Markierung). Die zweite Derivatisierung ist die bereits zuvor erläuterte Veresterung in 4-Position (rote Markierung), die für eine orale Applikation des Wirkstoffes **5** nötig ist. Die dritte Derivatisierung ist die Acylierung des Amins in 7-Position mit der ATMO-Seitenkette (grüne Markierung).

Da die Derivatisierung in 3-Position im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht wird, wird in diesem kurzen Überblick zur Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) nur auf die Derivatisierungen in 4- und 7-Position eingegangen.



**Abbildung 3–7:** Übersicht über die drei für die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) notwendigen Derivatisierungen ausgehend von 7-ACA (**3**).

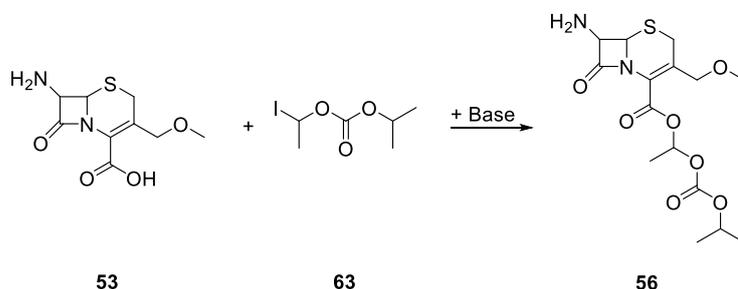
Die Einführung der Estergruppe in 4-Position verläuft in der Regel in einer Substitutionsreaktion. Dafür wird die iodierte Seitenkette 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**) in einer *Finkelstein*-Reaktion aus der chlorierten Seitenkette 1-Chlorethyl-*iso*-propylcarbonat (**64**) dargestellt (Abbildung 3–8). Bei dieser Reaktion wird in einer  $S_N2$ -Reaktion die chlorierte Verbindung **64** mit Natriumiodid in einem organischen Lösungsmittel umgesetzt. Die Triebkraft der Reaktion ist die deutlich schlechtere Löslichkeit des entstehenden Natriumchlorids im Vergleich zu dem Reagenz Natriumiodid. Durch Ausfallen wird das Gleichgewicht auf die Seite der iodierten Seitenkette **63** verschoben.<sup>[105,128–130]</sup>



**Abbildung 3–8:** *Finkelstein*-Reaktion der Synthese der iodierten Seitenkette **63** durch Umsetzung der chlorierten Seitenkette **64**.

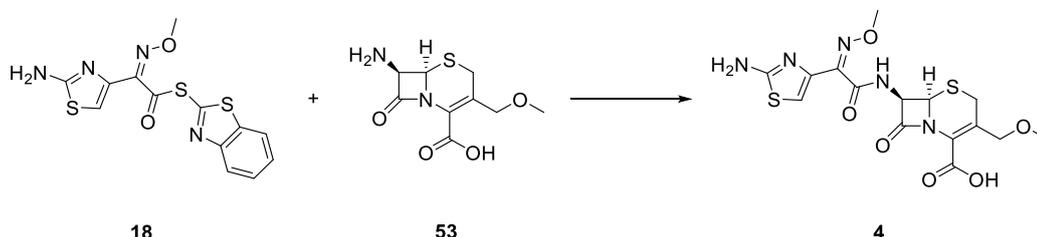
Mit der iodierten Seitenkette **63** kann im Anschluss unter Verwendung einer Base AMCA (**53**) oder Cefpodoxim (**4**) in einer nukleophilen Substitution umgesetzt werden (Abbildung 3–9).<sup>[26–28,39,40,47,105,118,130–133]</sup> Dabei greift das deprotonierte Carboxylation nukleophil am iodierten Kohlenstoffatom an und das Halogenid wird abgespalten. Da bei in 4-Position veresterten Cephalosporinen die Gefahr einer basenkatalysierten  $\Delta 2$ -Isomerisierung vorliegt, ist die Menge und Art der Base für diese Reaktion entscheidend. So wurde neben verschiedenen Basen und

deren Mischungen auch die Verwendung von Cefpodoxim-Salzen und Kronenether erfolgreich getestet, um die  $\Delta^2$ -Isomerisierung zu reduzieren und zu unterdrücken.<sup>[132–134]</sup>



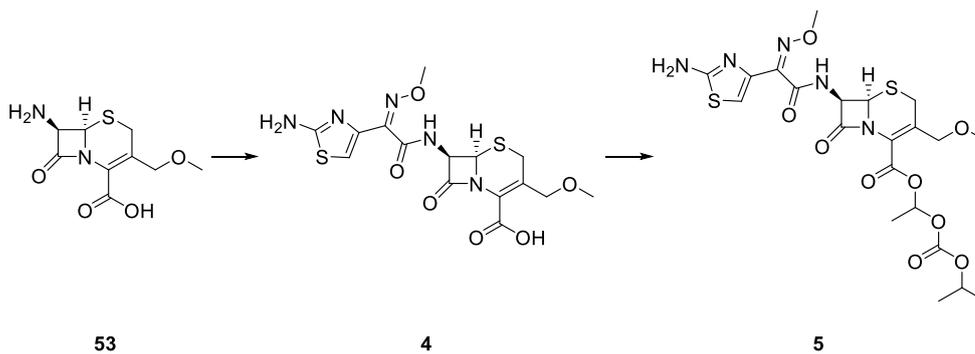
**Abbildung 3–9:** Nukleophile Substitution zur Einführung der Seitenkette in 4-Position am Beispiel von AMCA (**53**).

Die Derivatisierung der 7-Position ist bereits in Kapitel 2.1.2. ausführlich beschrieben. Die Verwendung des MAEM-Aktivesters (**18**) ist auch für das Zielmolekül die verbreitetste Variante. Der Ester **18** wird dabei mit AMCA (**53**) umgesetzt, um Cefpodoxim (**4**) zu erhalten (Abbildung 3–10).<sup>[21,27,28]</sup> Die Vor- und Nachteile der Verwendung von MAEM (**18**) als Aktivester wurden bereits in Kapitel 2.1.2. ausführlich diskutiert.



**Abbildung 3–10:** Synthese von Cefpodoxim (**4**) aus AMCA (**53**) unter Verwendung von MAEM (**18**).<sup>[21,27,28]</sup>

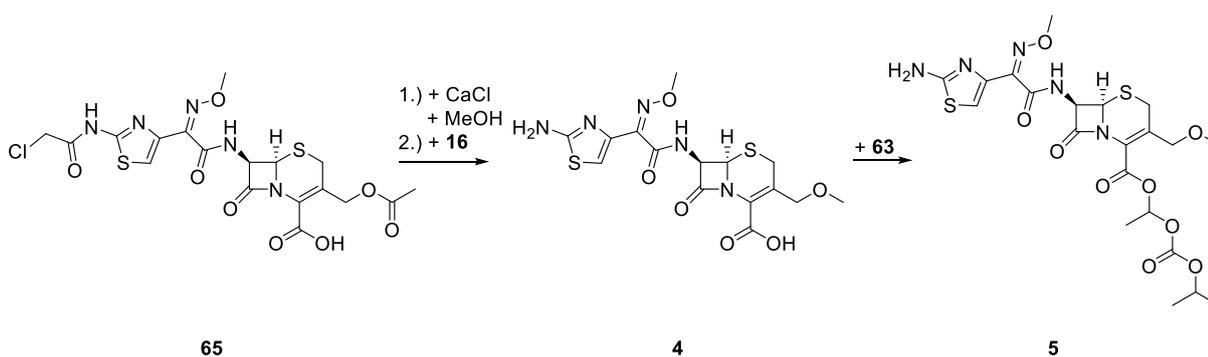
Für die Reihenfolge der Derivatisierungen in 3-, 4- und 7-Positionen bei der Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) gibt es verschiedene Ansätze. Häufig bevorzugt wird die Einführung der Proxetilgruppe in 4-Position an Cefpodoxim (**4**) als abschließender Reaktionsschritt, für die es viele Beispiele gibt.<sup>[27,28,40,130–134]</sup> Ein deutlicher Vorteil diesen Schritt als letzten durchzuführen ist die Vermeidung der Nebenreaktion der basenkatalysierten  $\Delta^2$ -Isomerisierung. Bevor die 4-Position verestert ist, besteht eine deutlich höhere Stabilität der Doppelbindung gegenüber basischen Bedingungen, die gerade bei der Amidierung in 7-Position häufig verwendet werden. Weit verbreitet ist dabei die bereits in 3-Position derivatisierte Verbindung **53** in 7-Position zu amidieren, um Cefpodoxim (**4**) zu erhalten, das im letzten Reaktionsschritt mit der Proxetilgruppe versehen wird (Abbildung 3–11).<sup>[27,28,40]</sup>



**Abbildung 3–11:** Meist verwendete Synthesereihenfolge bei der Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**).<sup>[27,28,40]</sup>

Wird AMCA (**53**) als Ausgangsstoff verwendet, bedeutet dies, dass die Derivatisierung in 3-Position zumeist der erste Reaktionsschritt ist. Dies kann damit begründet werden, dass für die Derivatisierung in 3-Position oftmals harsche Bedingungen wie der Einsatz starker Lewis- oder Brønstedsäuren erforderlich sind.<sup>[27,28]</sup>

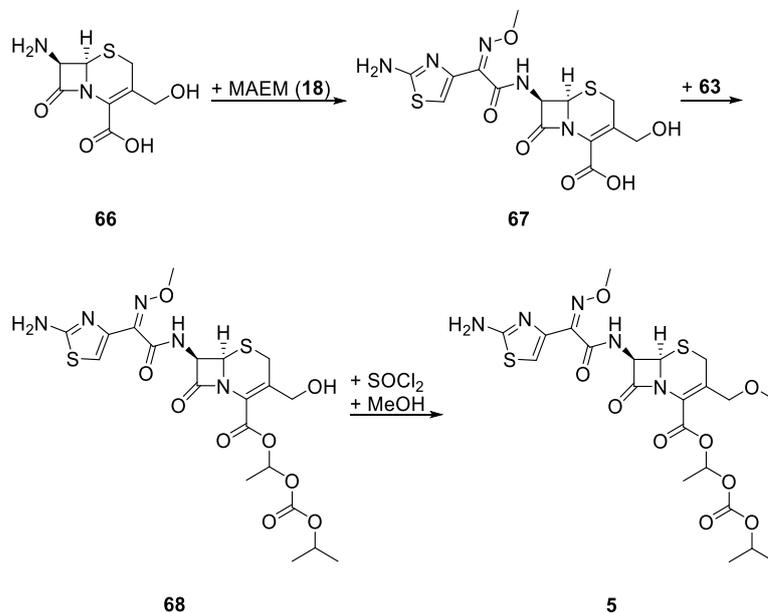
Es sind aber auch Verfahren bekannt, bei denen die 3-Position nicht zu Beginn derivatisiert wird. Bei einem dieser Verfahren wird mit Chloracetat geschütztes Cefotaxim (**65**) in 3-Position mit Calciumchlorid und Methanol in den entsprechenden Ether umgewandelt. Nach Entfernung der Schutzgruppe unter Verwendung von Thioharnstoff (**16**) wird Cefpodoxim (**4**) erhalten, das zu Cefpodoximproxetil (**5**) umgesetzt wird (Abbildung 3–12).<sup>[105]</sup>



**Abbildung 3–12:** Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) ausgehend von mit Chloracetat geschütztem Cefotaxim (**65**).<sup>[105]</sup>

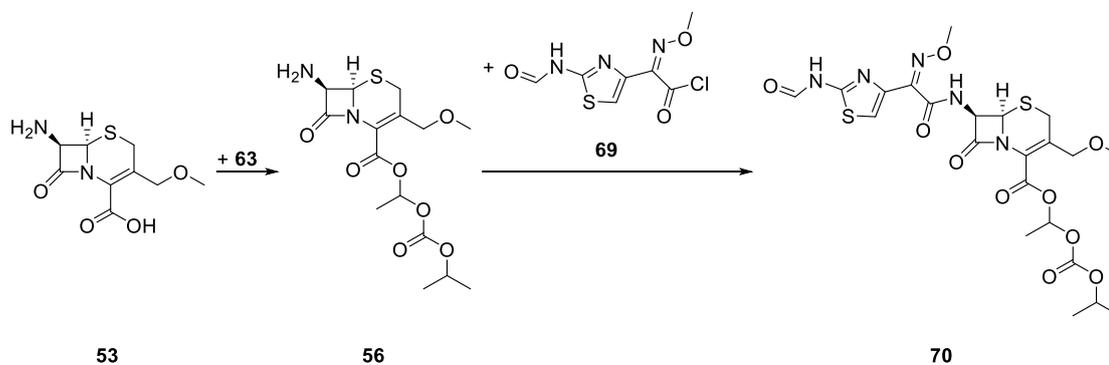
Eine weitere Variante, bei der die Derivatisierung der 3-Position in einem späteren Reaktionsschritt durchgeführt wurde, beginnt ausgehend von HACA (3-Hydroxy-7-Aminocephalosporansäure) (**66**) (Abbildung 3–13).<sup>[26]</sup> Der Alkohol wird dabei mit dem MAEM-Verfahren zum desacetylierten Cefotaxim (**67**) umgesetzt. Im Folgenden wird

nach Anbringen der Proxetilgruppe unter Verwendung der iodierten Seitenkette **63** desacetyliertes Cefotaximproxetil (**68**) erhalten, das unter Verwendung von Thionylchlorid und Methanol zu dem gewünschten Wirkstoff **5** umgesetzt wird.<sup>[26]</sup>



**Abbildung 3–13:** Alternative Syntheseroute für die Synthese von Cefpodoximproxetil ausgehend vom Alkohol **66**.<sup>[26]</sup>

Ein weiteres Beispiel für eine vorzeitige Veresterung von AMCA (**53**) ist ein Prozess der *Biochemie Gesellschaft*, bei dem im ersten Schritt die Säure **53** in einer nukleophilen Substitution mit der iodierten Seitenkette **63** verestert wird. Anschließend wird der Ester **56** mit formylgeschütztem Säurechlorid **69** zum formylgeschützten Cefpodoximproxetil **70** umgesetzt (Abbildung 3–14).<sup>[47]</sup>



**Abbildung 3–14:** Synthese von formylgeschütztem Cefpodoximproxetil **70** ausgehend von AMCA (**53**).<sup>[47]</sup>

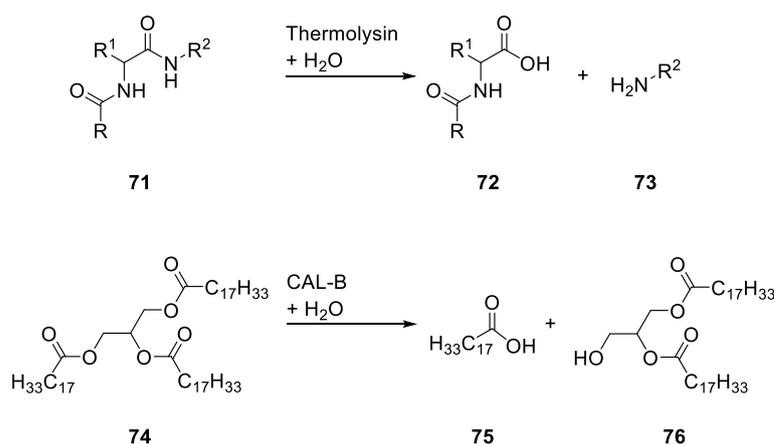
Die Isolierung des formylgeschützten Cefpodoximproxetils **70** weist noch einen weiteren Vorteil auf. Während bei der Synthese von AMCA-Proxetil (**56**) der Anteil an (*R*)-**56** immer zwischen 48% und 50% liegt, muss der Anteil an (*R*)-**5** im Wirkstoff **5** zwischen 50% und 60% liegen.<sup>[47,117,118]</sup> Eine Isolierung beider Diastereomere (*R*)-**5** und (*S*)-**5** konnte mittels einer Co-Kristallisation mit Sulfonsäure erreicht werden.<sup>[113,116]</sup> Analog zu dieser Isolierung konnte auch eine Anreicherung von (*R*)-**5** unter Verwendung von Methansulfonsäure gezeigt werden.<sup>[118]</sup> Eine andere Herangehensweise an dieses Problem ist der Umweg über formylgeschütztes Cefpodoximproxetil **70**. Neben dem Vorteil der einfachen Aktivierung der geschützten ATMO-Säure kann das (*R*)-Diastereomer (*R*)-**70** gezielt angereichert werden, um den vorgeschriebenen Anteil von 50% bis 60% zu erreichen.<sup>[47,117]</sup> Soweit bekannt, wurde nie versucht, das Diastereomerenverhältnis über eine enzymatische Reaktion mittels einer Hydrolase einzustellen.

### 3.1.2. Hydrolasen

Hydrolasen sind Enzyme, die in Organismen die Spaltung von Bindungen unter Anlagerung von Wasser katalysieren. Ihre natürliche Aufgabe ist die Hydrolyse von Nährstoffen in kleinere Stoffe im Rahmen der Verdauung.<sup>[135]</sup> Wie alle Enzyme weist die Verwendung von Hydrolasen einige Vorteile gegenüber vergleichbaren Synthesen mit Chemokatalysatoren auf. Enzyme katalysieren Reaktionen meist unter sehr milden Bedingungen, die oftmals der natürlichen Umgebung entsprechen. Dies schließt milde Temperaturen und pH-Werte sowie wässrige Reaktionsmedien ein.<sup>[136–139]</sup> Aufgrund der Anwendung in biologischen Systemen weisen Enzyme oftmals herausragende Selektivitäten auf. Die hohe Chemo- und Regioselektivität ermöglicht Reaktionen unter Erhaltung anderer funktioneller Gruppen im Molekül, die bei einer chemischen Katalyse ebenfalls mit umgesetzt werden würden. Eine hohe Enantioselektivität ermöglicht die Durchführung enantioselektiver Reaktionen, weshalb sich Enzyme somit für die Herstellung optisch reiner Verbindungen eignen. Neben der hohen Selektivität haben viele Enzyme zudem ein großes Substratspektrum für nicht natürliche Substrate und eröffnen somit ein großes Anwendungsgebiet.<sup>[136–140]</sup>

Die Hydrolasen können dabei in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die bedeutendsten sind die Proteasen, die Esterasen und die Lipasen. Proteasen katalysieren den Abbau von Proteinen in kleinere Peptide durch Hydrolyse von Amidbindungen. Beispielhaft dafür ist in Abbildung 3–15 oben mit der Spaltung eines Proteins **71** in ein kürzeres Peptid **72** und eine

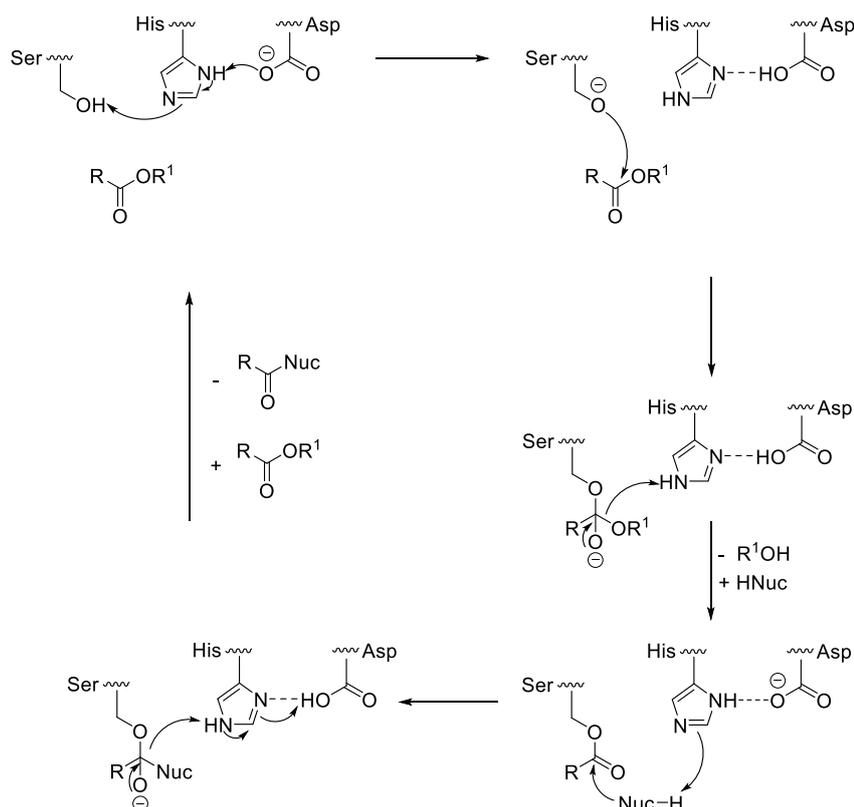
Aminosäure **73** eine typische Reaktion der Proteasen dargestellt.<sup>[135,141]</sup> Lipasen und Esterasen katalysieren als natürliche Reaktion die Hydrolyse von Esterbindungen. Die Lipasen katalysieren dabei entsprechend ihrer natürlichen Aufgabe, der Spaltung von Triglyceriden, eher lipophilere, schwer wasserlösliche Substrate als die Esterasen, die wasserlösliche Substrate besser akzeptieren. Ein Beispiel für die Hydrolyse von Estern mit einer Lipase ist in Abbildung 3–15 unten gezeigt, wo Triolin (**74**) als Triester der Ölsäure (**75**) und Glycerin zu dem Diester **76** und Ölsäure (**75**) gespalten wird.<sup>[135,141,142]</sup> Lipasen zeigen dabei häufig nur eine Aktivität, wenn neben einer wässrigen Phase auch eine organische Phase vorliegt. Dies kann häufig mit einer Konformationsänderung des Enzyms begründet werden. Im Wässrigen ist bei Lipasen das aktive Zentrum häufig mit einer Art Deckel verschlossen. Dieser öffnet sich an Grenzflächen zwischen wässriger und organischer Phase und liefert eine Erklärung für die Grenzflächenaktivität von Lipasen.<sup>[135,141,142]</sup>



**Abbildung 3–15:** Oben: Spaltung eines Proteins **71** in das kürzere Peptid **72** und die Aminosäure **73** unter Verwendung der Protease Thermolysin. Unten: Spaltung des Triesters **74** in den Diester **76** und Ölsäure (**75**) unter Verwendung der Lipase B aus *Candida antarctica*.<sup>[135]</sup>

Der Mechanismus der Katalyse der meisten Hydrolasen ist auf eine katalytische Triade zurückzuführen.<sup>[135,141,143,144]</sup> Bei einer Vielzahl von Hydrolasen sind in der aktiven Tasche des Enzyms Aminosäuren mit einer nukleophilen, einer basischen und einer sauren Seitenkette zu finden. Ein klassisches Beispiel ist eine Kombination aus Serin als nukleophile Aminosäure, Histidin als basische Aminosäure und Asparaginsäure als saure Aminosäure. In Abbildung 3–16 ist der Mechanismus der katalytischen Triade einer Lipase abgebildet. Das Aspartat bindet über eine Wasserstoffbrücke an das Proton des Histidins, was zu einer Erhöhung der Basenstärke am zweiten Stickstoff im Histidin führt. Diese basische Funktion deprotoniert die Serinseitenkette, die als stark nukleophile Gruppe am Ester angreift. Das als Zwischenstufe

entstehende Anion wird an der Alkoholatgruppe vom Histidin reprotoniert und der Alkohol als Abgangsgruppe abgespalten. Im nächsten Schritt greift ein Nukleophil an dem acetylierten Serin an, während das Proton von der Histidinseitenkette aufgenommen wird. Anschließend wird das Serin wieder protoniert und das acetylierte Nukleophil abgespalten.<sup>[135,141,143,144]</sup> Wenn Wasser als Nukleophil reagiert, wird der Ester hydrolysiert und die entsprechende Carbonsäure erhalten.



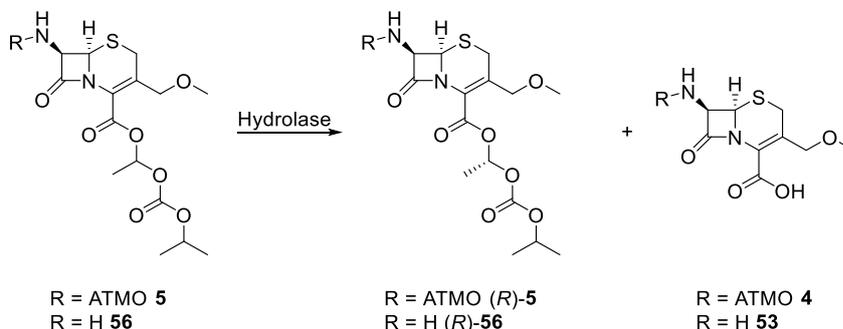
**Abbildung 3–16:** Mechanismus der Esterhydrolyse mittels katalytischer Triade.<sup>[135,141,143,144]</sup>

Es ist aber auch möglich, und in der organischen enzymatischen Synthese verbreitet, anstelle von Wasser andere Nukleophile wie Alkohole zu verwenden, um eine Umesterung durchzuführen. Auch die Verwendung von Aminen zur Amidsynthese ist möglich.<sup>[135,141,142]</sup>

Des Weiteren können Lipasen und Esterasen auch die Esterbildung als Rückreaktion der Hydrolyse ausgehend von Carbonsäure und Alkohol katalysieren. Neben der katalytischen Triade, auf die die katalytische Aktivität der Esterasen und Lipasen zurückzuführen ist, gibt es im Bereich der Proteasen auch Metalloenzyme, die über einen alternativen Mechanismus die Reaktion katalysieren. Dabei koordiniert ein Metallatom, oftmals Zink, an der Carbonylverbindung der Peptidbindung und aktiviert diese über eine Positivierung des Kohlenstoffatoms für einen Angriff des Nukleophils.<sup>[135]</sup> Hydrolasen benötigen keinen teuren

Cofaktor wie andere Enzyme und sind häufig stabil gegenüber dem Einsatz wassermischbarer Cosolventien. Bei nicht wassermischbaren Lösungsmitteln sind gerade Lipasen und Esterasen unempfindlich, aber auch einige Proteasen zeigen eine Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln.<sup>[135]</sup> Im Gegensatz zu Lipasen, die in vielen industriellen Anwendungen zu finden sind, ist der Einsatz von Esterasen nur in wenigen Beispielen beschrieben.<sup>[135]</sup> Zur Anwendung von Lipasen gibt es weitreichende Literatur in Form von Büchern und Übersichtsartikeln.<sup>[135–142,145–147]</sup>

Für die Anwendung einer Hydrolase zur Einstellung des Diastereomerengleichgewichts von AMCA-Proxetil (**56**) oder Cefpodoximproxetil (**5**) liegen aus prozesstechnischer Sicht günstige Voraussetzungen vor. Das Diastereomergemisch von AMCA-Proxetil (**56**) oder Cefpodoximproxetil (**5**) könnte in einer organischen Phase gelöst mit einer Enzymlösung gewaschen werden. Das ungewünschte Diastereomer (*S*)-**56** oder (*S*)-**5** würde selektiv hydrolysiert und AMCA (**53**) bzw. Cefpodoxim (**4**) kann über die wässrige Phase entfernt und recycelt werden (Abbildung 3–17). Über die Länge des Waschvorgangs mit der wässrigen enzymatischen Lösung könnte das Diastereomerenverhältnis entsprechend eingestellt werden.



**Abbildung 3–17:** Selektive enzymatische Hydrolyse der (*S*)-Diastereomere (*S*)-**56** oder (*S*)-**5** zur Einstellung des Diastereomerenverhältnisses.

## 3.2. Motivation und Zielsetzung

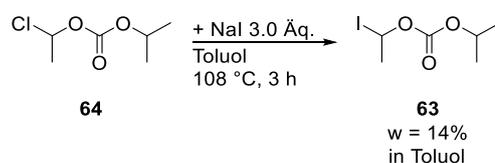
Der Wirkstoff Cefpodoximproxetil (**5**) ist ein interessantes, für die Therapie einer Vielzahl von bakteriellen Infektionen geeignetes Medikament.<sup>[104–106,108,109,111,112,148]</sup> Aufgrund von Vorschriften bei der Arzneimittelzulassung muss der Anteil von (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) zwischen 50% und 60% liegen, während dieser produktionsbedingt in einem Bereich zwischen 48% und 50% liegt.<sup>[47,117,118]</sup> Da bereits gezeigt werden konnte, dass Cefpodoximproxetil (**5**) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz ausgehend

von AMCA-Proxetil (**56**) hergestellt werden kann, ist es interessant, ob der Anteil von (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) oder (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) unter Einsatz einer Hydrolase zugunsten der (*R*)-Konfiguration verändert werden kann. Ziel meiner Arbeit ist es, jeweils beide Diastereomere von AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) zu isolieren und zu charakterisieren. Anschließend soll untersucht werden, ob das Diastereomerenverhältnis von Cefpodoximproxetil (**5**) oder AMCA-Proxetil (**56**) in Richtung von (*R*)-**5** oder (*R*)-**56** verschoben werden kann. Des Weiteren soll die  $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) untersucht werden. Es soll ermittelt werden, unter welchen Bedingungen die  $\Delta$ 2-Isomerisierung bevorzugt auftritt, bzw. unterbunden werden kann. Außerdem soll untersucht werden, ob die  $\Delta$ 2-Isomerisierung in 4-Position stereoselektiv verläuft.

### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.1. Isolierung der Diastereomere von AMCA-Proxetil (**56**)

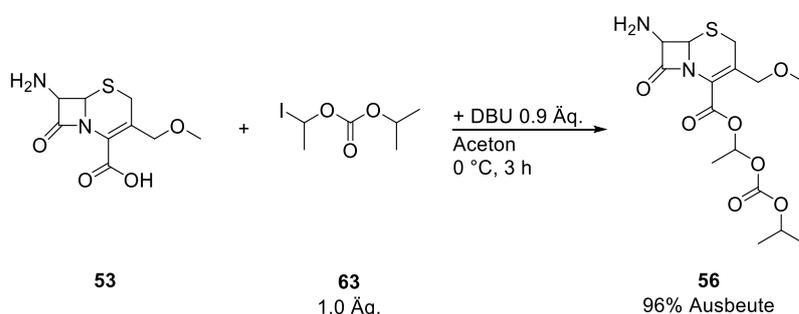
Ziel dieser Arbeit ist zunächst die Isolierung der benötigten Referenzsubstanzen. Um die Seitenkette der Proxetilgruppe einzuführen, wird 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**) in einer *Finkelstein*-Reaktion in Toluol aus 1-Chlorethyl-*iso*-propylcarbonat (**64**) dargestellt (Abbildung 3–18). Das Elektrophil **63** verbleibt dabei in einer Toluollösung, die mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und Natriumthiosulfatlösung gewaschen wird.<sup>[47,130]</sup> Die Lösung enthält die gewünschte iodidierte Spezies **63** mit einem Massenanteil von 14%.



**Abbildung 3–18:** Darstellung einer 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonatlösung (**63**).<sup>[130]</sup>

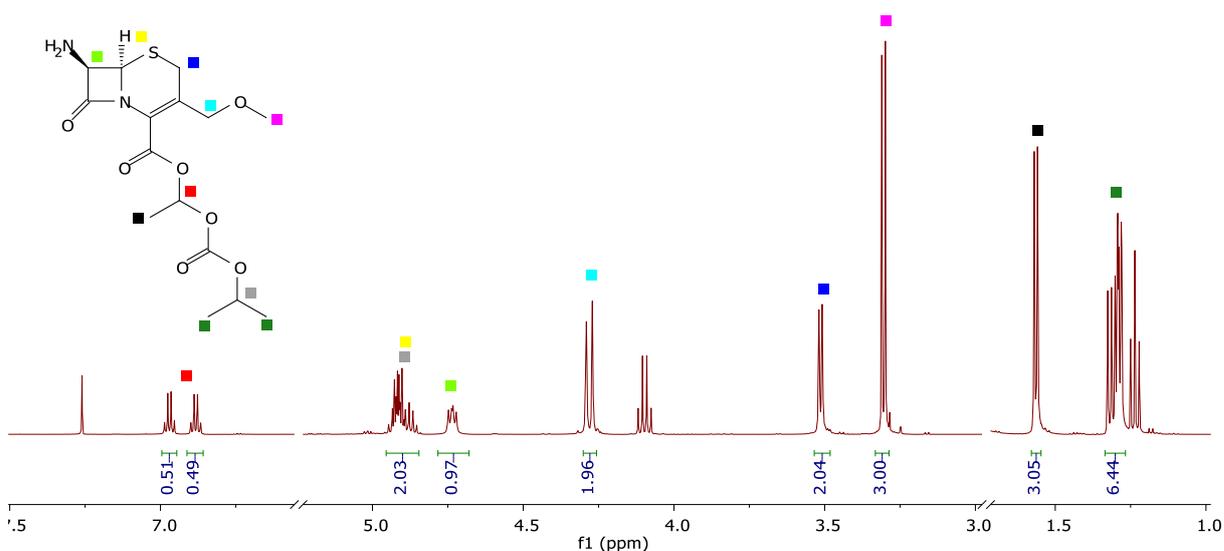
Unter Verwendung der Lösung der iodierten Seitenkette **63** wird AMCA (**53**) mit einem leichten Unterschuss der Base DBU in Aceton zum gewünschten AMCA-Proxetil (**56**) umgesetzt (Abbildung 3–19).<sup>[47]</sup> Die Verwendung des Unterschusses an Base ist sehr wichtig, da unter basischen Bedingungen eine Umlagerung zum  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) möglich ist. Für die Aufreinigung wird das Produkt unter sauren Bedingungen in die wässrige Phase extrahiert, um organische, nicht basische Nebenprodukte abzutrennen. Nach Einstellen eines leicht basischen pH-Wertes von 8.2 kann **56** in die organische Phase überführt werden, um

wasserlösliche Nebenprodukte abzutrennen. Nach Aufreinigung kann eine isolierte Ausbeute von 96% erzielt werden.



**Abbildung 3–19:** Synthese von AMCA-Proxetil (**56**) ausgehend von AMCA (**53**) und 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonatlösung (**63**).<sup>[47]</sup>

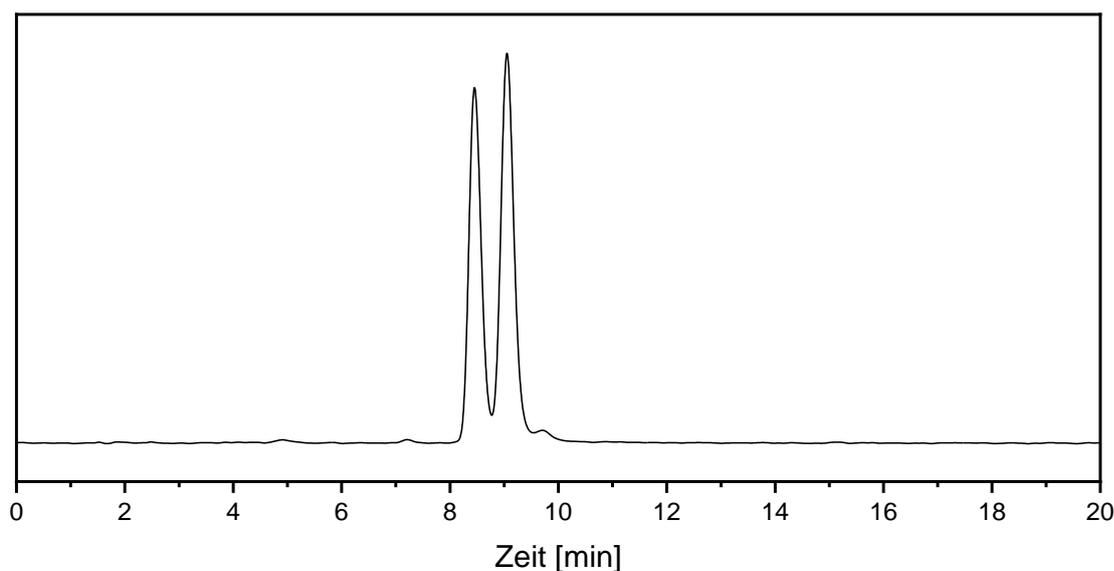
Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ist zu sehen, dass neben geringen Mengen an Ethylacetat das Produkt **56** erhalten wird (Abbildung 3–20). Auffallend ist das Vorliegen verschiedener Signalsätze, die auf die vorhandenen Diastereomere hinweisen. Diese werden erwartet, da die Seitenkette, die in 4-Position eingeführt wird, ein weiteres Stereozentrum in das Produkt **56** einbringt. Diese Seitenkette erzeugt Diastereomere, da die zwei zusätzlichen Stereozentren im β-Lactamring aufgrund der Biosynthese eine feste Konfiguration aufweisen. Am deutlichsten ist dies bei dem Signal des Protons am Stereozentrum in der Seitenkette (rote Markierung) bei etwas unter 7.0 ppm zu sehen. Dieses Proton erzeugt jeweils ein Quartett, wobei die Differenz der chemischen Verschiebung im Bereich von 0.1 ppm liegt und somit eine eindeutige Trennung und Unterscheidung der Diastereomere ermöglicht.



**Abbildung 3–20:** Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von AMCA-Proxetil (**56**).

Des Weiteren ist das Vorliegen von doppelten Signalen deutlich für die Methylengruppen in der Seitenkette in 3-Position (türkise Markierung) und in Nachbarschaft des Schwefels (blaue Markierung), sowie für die Methoxygruppe (rosa Markierung) ersichtlich. Diese Signalgruppen bestehen jeweils aus zwei Singulets, die den beiden einzelnen Diastereomeren zugeordnet werden können. Weitere überlagerte Signale mit zum Teil komplexeren Aufspaltungsmustern können den sechs terminalen, chemisch äquivalenten Protonen der Seitenkette in 3-Position (dunkelgrüne Markierung) und dem Proton in 7-Position (hellgrüne Markierung) zugeordnet werden. Das Proton in 6-Position (gelbe Markierung) und das sekundäre Proton der *iso*-Propylgruppe der Seitenkette (graue Markierung) erzeugen ein überlagertes Signal im Bereich unter 5.0 ppm und die Methylgruppe am Stereozentrum (schwarze Markierung) ein Dublett im Bereich von 1.6 ppm.

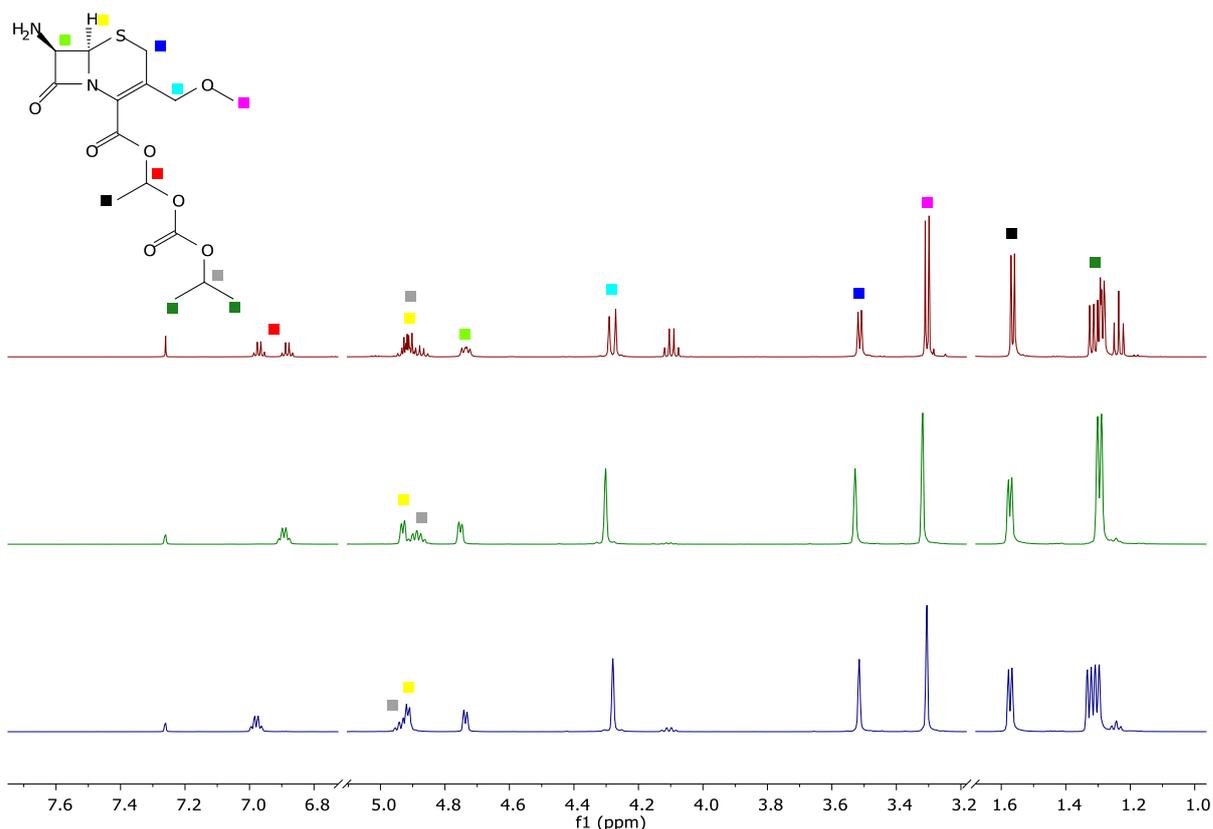
Auch eine Untersuchung mittels HPLC-Analytik zeigt zwei Signale, die ebenfalls auf das vorhandene Diastereomerenpaar hindeuten (Abbildung 3–21).



**Abbildung 3–21:** HPLC-Chromatogramm von AMCA-Proxetil (**56**).

Der nächste Schritt ist eine Auftrennung der beiden Diastereomere mittels *Flash*-Chromatographie. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften der beiden Diastereomere können aus 200 mg Gemisch **56** 40 mg des ersten Diastereomers und 56 mg des zweiten Diastereomers sowie eine Mischfraktion mit 68 mg erhalten werden. Über die Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und HPLC, die im Folgenden gezeigt wird, kann eine Zuordnung der absoluten Konfiguration der Seitenkette nicht erfolgen. Im weiteren Verlauf kann jedoch bei den beiden Diastereomeren eine absolute Konfiguration in der Seitenkette zugeordnet werden (siehe Kapitel 3.3.2). Zur besseren Übersicht wird auf die daraus

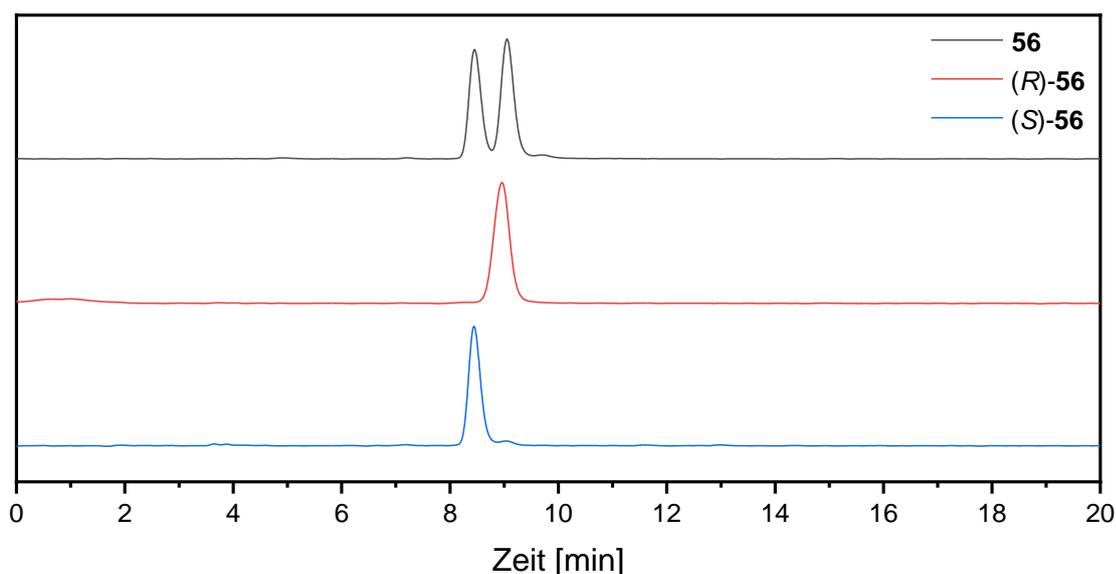
resultierenden Ergebnisse vorgegriffen und das Diastereomer 1 als (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) und das Diastereomer 2 als (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**) bezeichnet. Die Benennung mit (*R*)- und (*S*)-Nomenklatur bezieht sich dabei, wie auch im Folgenden, nur auf die Stereokonfiguration der Seitenkette in 3-Position und nicht auf die Stereozentren im  $\beta$ -Lactamring. In Abbildung 3–22 sind die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von AMCA-Proxetil (**56**) und von den beiden isolierten Diastereomere (*R*)-**56** und (*S*)-**56** abgebildet.



**Abbildung 3–22:** Vergleich von Ausschnitten der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von AMCA-Proxetil (**56**) (rotes Spektrum, oben) und den Diastereomeren (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) (grünes Spektrum, Mitte) und (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**) (blaues Spektrum, unten).

Es kann deutlich beobachtet werden, dass die beiden Signalsätze im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Mischung **56** von den beiden Diastereomeren (*R*)-**56** und (*S*)-**56** erzeugt werden. So können die Signale der Methylengruppen in der Seitenkette in 3-Position (türkise Markierung) und in Nachbarschaft des Schwefels (blaue Markierung), sowie der Methoxygruppe (rosa Markierung) deutlich Singulett in den Spektren der einzelnen Diastereomere zugeordnet werden, die in der Mischung überlagern. Ähnlich verhält es sich mit den Signalen des Protons in 7-Position (hellgrüne Markierung) und des Protons am sekundären Kohlenstoffatom der *iso*-Propylgruppe der Seitenkette in 3-Position (graue Markierung), die jedoch aufgrund der Aufspaltung als Dublett und Septett vorliegen. Das Septett der *iso*-Propylgruppe (graue Markierung) überlagert

dabei jedoch mit dem Signal des Protons in 6-Position (gelbe Markierung). Im Gegensatz zu den Protonen der Methylgruppe am Stereozentrum in der Seitenkette (schwarze Markierung), das keine signifikanten Unterschiede in der chemischen Verschiebung seiner Signale aufweist, gibt es deutliche Unterschiede bei dem Proton direkt am Stereozentrum (rote Markierung), das eine Differenz von fast 0.1 ppm aufweist. Auffällig ist die verschiedene Signalform der Signale der sechs Protonen der *iso*-Propylgruppe (dunkelgrüne Markierung). Während im (*R*)-Diastereomer (*R*)-**56** ein erwartetes Dublett erhalten wird, erzeugen die Protonen des (*S*)-Diastereomers (*S*)-**56** ein Aufspaltungsmuster höherer Ordnung. Eine Erklärung für dieses andere Signalmuster bei dem (*S*)-Diastereomer (*S*)-**56** kann nicht gegeben werden. Bei Betrachtung der HPLC-Chromatogramme (Abbildung 3–23) von AMCA-Proxetil (**56**) und den beiden isolierten Diastereomeren (*R*)-**56** und (*S*)-**56** wird deutlich, dass die beiden Signale den einzelnen Diastereomeren (*R*)-**56** und (*S*)-**56** zugeordnet werden können, wobei das (*S*)-Diastereomer (*S*)-**56** früher eluiert. Die verwendete HPLC-Methode ist dabei angelehnt an eine literaturbekannte Methode für die Trennung der Diastereomere von Cefpodoximproxetil (**5**).<sup>[114]</sup>



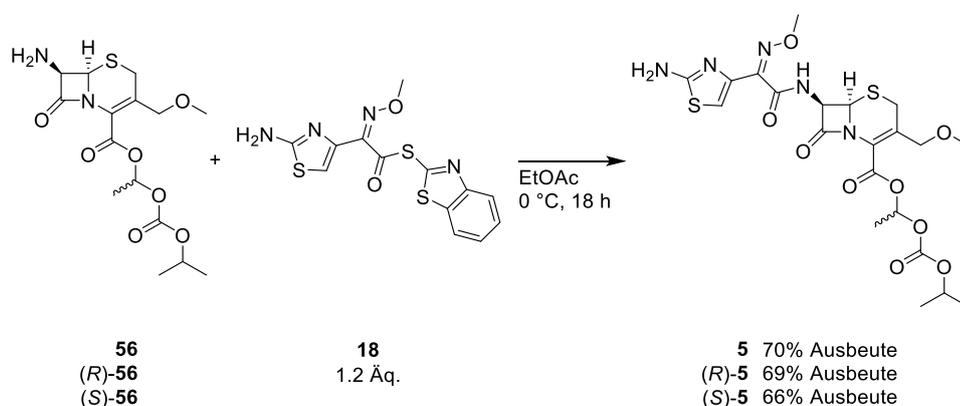
**Abbildung 3–23:** Vergleich der HPLC-Chromatogramme von AMCA-Proxetil (**56**) und den Diastereomeren (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) und (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**). Die Diagramme sind auf das jeweils höchste Signal normiert.

Eine genaue Zuordnung der beiden Diastereomere (*R*)-**56** und (*S*)-**56** ist aufgrund dieser Datenlage noch nicht möglich. Da jedoch für die beiden Diastereomere von Cefpodoximproxetil (*R*)-**5** und (*S*)-**5** eine literaturbekannte Unterscheidung möglich ist, bietet sich als nächster Schritt die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) und seinen Diastereomeren

(*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**) zur Aufklärung der Stereochemie der Seitenkette an.<sup>[114]</sup>

### 3.3.2. Synthese der isolierten Diastereomere von Cefpodoximproxetil (**5**)

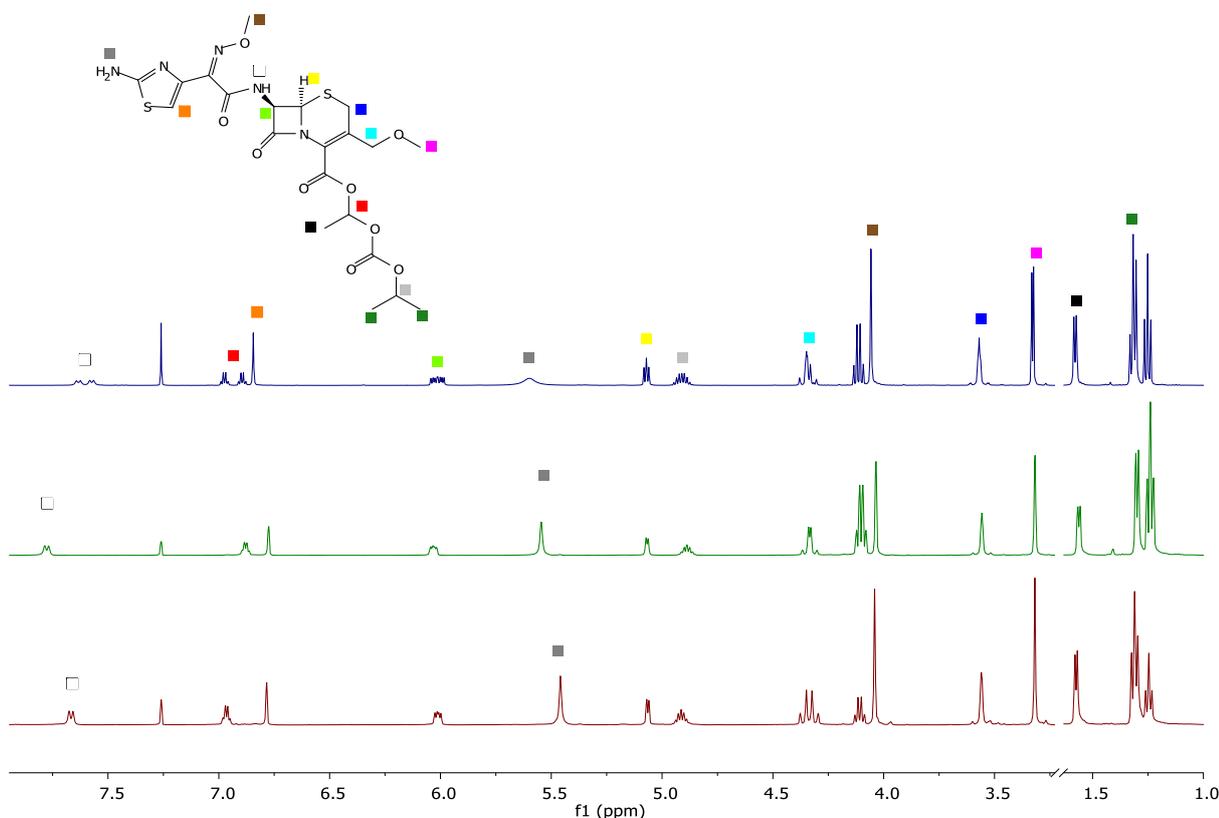
Die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) erfolgt in Anlehnung an den literaturbekannten MAEM-Prozess (Abbildung 3–24).<sup>[21–23,27,28]</sup> Neben einem Lösungsmittelwechsel von einem Aceton/Wasser-Gemisch zu Ethylacetat ist die größte Änderung der Verzicht auf die Base Triethylamin. Der Einsatz von Triethylamin ist im klassischen MAEM-Prozess für die Löslichkeit von 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) notwendig. Nach Anbringen der Proxetil-Seitenkette über die Veresterung der Carboxygruppe im AMCA-Proxetil (**56**) ist dieses deutlich unpolarer und somit im organischen Reaktionsmedium besser löslich. Ein Zusatz von Base wäre problematisch, da in 4-Position veresterte Cephalosporine unter basischen Bedingungen, wie bereits beschrieben, einer Isomerisierung zum  $\Delta^2$ -Cephalosporin unterliegen.<sup>[119–122]</sup> Das Edukt **56** wird mit dem Aktivester **18** über Nacht bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile wird nach *Flash*-Chromatographie das gewünschte Produkt erhalten.



**Abbildung 3–24:** Darstellung von Cefpodoximproxetil (**5**) sowie beider Diastereomere (*R*)-**5** und (*S*)-**5** ausgehend vom jeweiligen AMCA-Proxetil (**56**) mit dem Aktivester MAEM (**18**).

Die Amidierung der veresterten  $\beta$ -Lactame **56**, (*R*)-**56** und (*S*)-**56** funktioniert unter den gewählten Bedingungen mit guten Umsätzen. Unter nicht optimierten Bedingungen wird für die Umsetzung des Gemisches beider Diastereomere **56** das gewünschte Produkt **5** mit einer Ausbeute von 70% erhalten. Analog werden (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**) mit vergleichbaren Ausbeuten von 69% und 66% bei

Umsetzung der jeweiligen Edukte (*R*)-**56** (Produkt aus der Umsetzung von Diastereomer 1) und (*S*)-**56** (Produkt aus der Umsetzung von Diastereomer 2) erhalten.

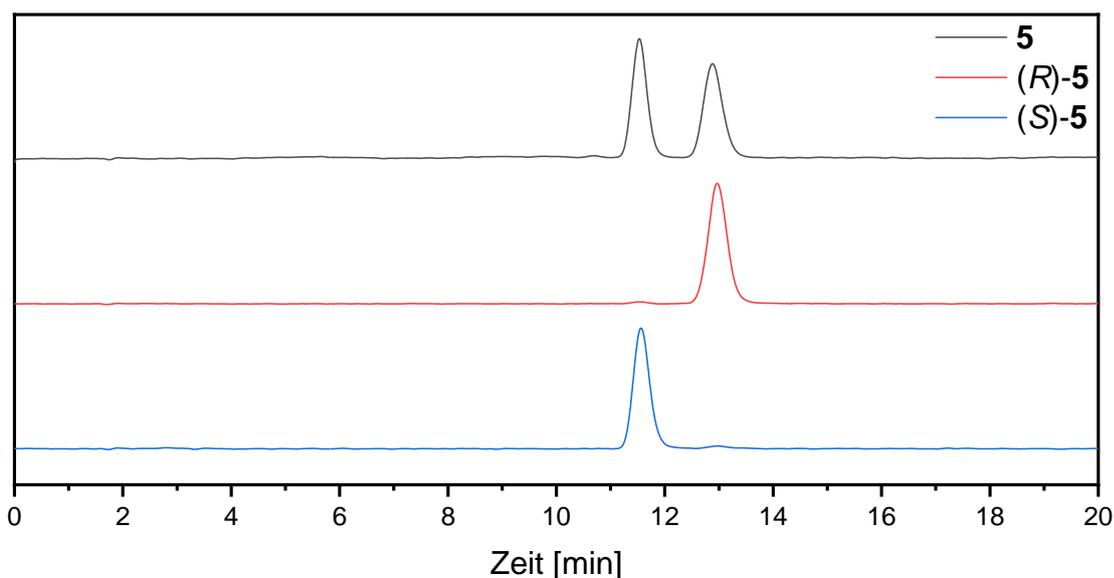


**Abbildung 3–25:** Vergleich von Ausschnitten der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Cefpodoximproxetil (**5**) (blaues Spektrum, oben) und den Diastereomeren (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) (grünes Spektrum, Mitte) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**) (rotes Spektrum, unten).

Bei der Betrachtung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (Abbildung 3–25) wird deutlich, dass alle drei Verbindungen mit Resten von Ethylacetat verunreinigt sind. Auffallend ist wie beim Edukt **56** das Signal des Protons am Stereozentrum der Seitenkette (rote Markierung) im Bereich unter 7.0 ppm, das über eine weite Aufspaltung von annähernd 0.1 ppm eine Unterscheidung der beiden Diastereomere im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ermöglicht. Deutliche Unterschiede in der Verschiebung zeigen die Signale der Aminprotonen (dunkelgraue Markierung) bei 5.5 ppm und der Amidprotonen (weiße Markierung) im Bereich über 7.5 ppm, die jedoch von der chemischen Umgebung in der  $^1\text{H}$ -NMR-Probe abhängen und somit nur eine geringfügige Aussagekraft aufweisen. Als weitere Protonen der neuen Seitenkette in 7-Position liefern die Signale des aromatischen Protons (orange Markierung) bei ungefähr 6.8 ppm und der Oximfunktion (braune Markierung) im Bereich von 4.0 ppm keine deutliche Differenz zwischen den Diastereomeren (*R*)-**5** und (*S*)-**5**. Beim Vergleich der beiden Protonensignale im  $\beta$ -Lactamring wird deutlich, dass diese leicht unterschiedliche Verschiebungen aufweisen und

in der Mischung beider Diastereomere überlagern. Wird die chemische Verschiebung mit der des Ausgangsmaterials **56** verglichen, so wird deutlich, dass das Signal des Protons in 6-Position (gelbe Markierung) im Bereich von 5.1 ppm geringfügig tieffeldverschoben ist. Eine deutlichere Verschiebung ins Tieffeld wird bei dem Signal des Protons in 7-Position (hellgrüne Markierung) erhalten, das eine chemische Verschiebung von ca. 6.0 ppm aufweist. Beide Änderungen der Verschiebungen in Richtung Tieffeld lassen sich durch die Knüpfung der Amidbindung erklären. Neben diesen deutlichen Veränderungen zeigen die Signale der Methoxyfunktion in der Seitenkette in 3-Position (rosa Markierung) bei 3.3 ppm und das Signal des Protons in 2-Position (dunkelblaue Markierung) bei 3.6 ppm mit Ausnahme einer leichten Verschiebung zwischen den Diastereomeren keine signifikanten Differenzen. Gleiches gilt für die Signale der Protonen der Methylgruppe am Stereozentrum der Seitenkette (schwarze Markierung) bei 1.6 ppm und dem Proton am sekundären Kohlenstoffatom der *iso*-Propylgruppe (hellgraue Markierung) bei 4.8 ppm. Auffallend sind die verschiedenen Kopplungsmuster beider Diastereomere bei den Protonen der Methylengruppe in der Seitenkette in 3-Position (türkise Markierung) und der sechs Protonen der Methylgruppen der *iso*-Propylgruppe in der Seitenkette in 4-Position (dunkelgrüne Markierung). Während die Protonen der Methylengruppe des (*S*)-Cefpodoximproxetils ((*S*)-**5**) ein symmetrisches Quartett erzeugen, ist dieses im (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) asymmetrisch verzerrt. Die sechs Protonen der Methylgruppen der *iso*-Propylgruppe erzeugen im Fall des (*R*)-Diastereomers (*R*)-**5** ein Dublett, während im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des (*S*)-Diastereomers (*S*)-**5** ein Dublett von Dubletts beobachtbar ist.

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Stereozentrums in der Seitenkette ist das HPLC-Chromatogramm entscheidend. Es ist bekannt, dass das (*S*)-Diastereomer (*S*)-**5** unter Verwendung einer bekannten Analytik zuerst eluiert.<sup>[114]</sup> Unter Verwendung dieser Analytik wurden die in Abbildung 3–26 gezeigten Chromatogramme aufgenommen.<sup>[114]</sup> Es ist deutlich zu sehen, dass die Mischung **5** aus zwei verschiedenen Diastereomeren besteht, die zusätzlich jeweils diastereomerenrein dargestellt werden können. Das erste Diastereomer kann aufgrund der längeren Elutionszeit dabei dem (*R*)-Diastereomer (*R*)-**5** zugeordnet werden. Bei dem zweiten Diastereomer handelt es sich demzufolge um das (*S*)-Diastereomer (*S*)-**5**. Somit sind jeweils beide möglichen Diastereomere des AMCA-Proxetils (**56**), (*R*)-**56** und (*S*)-**56**, und des Cefpodoximproxetils (**5**), (*R*)-**5** und (*S*)-**5**, erfolgreich synthetisiert und isoliert sowie charakterisiert worden.

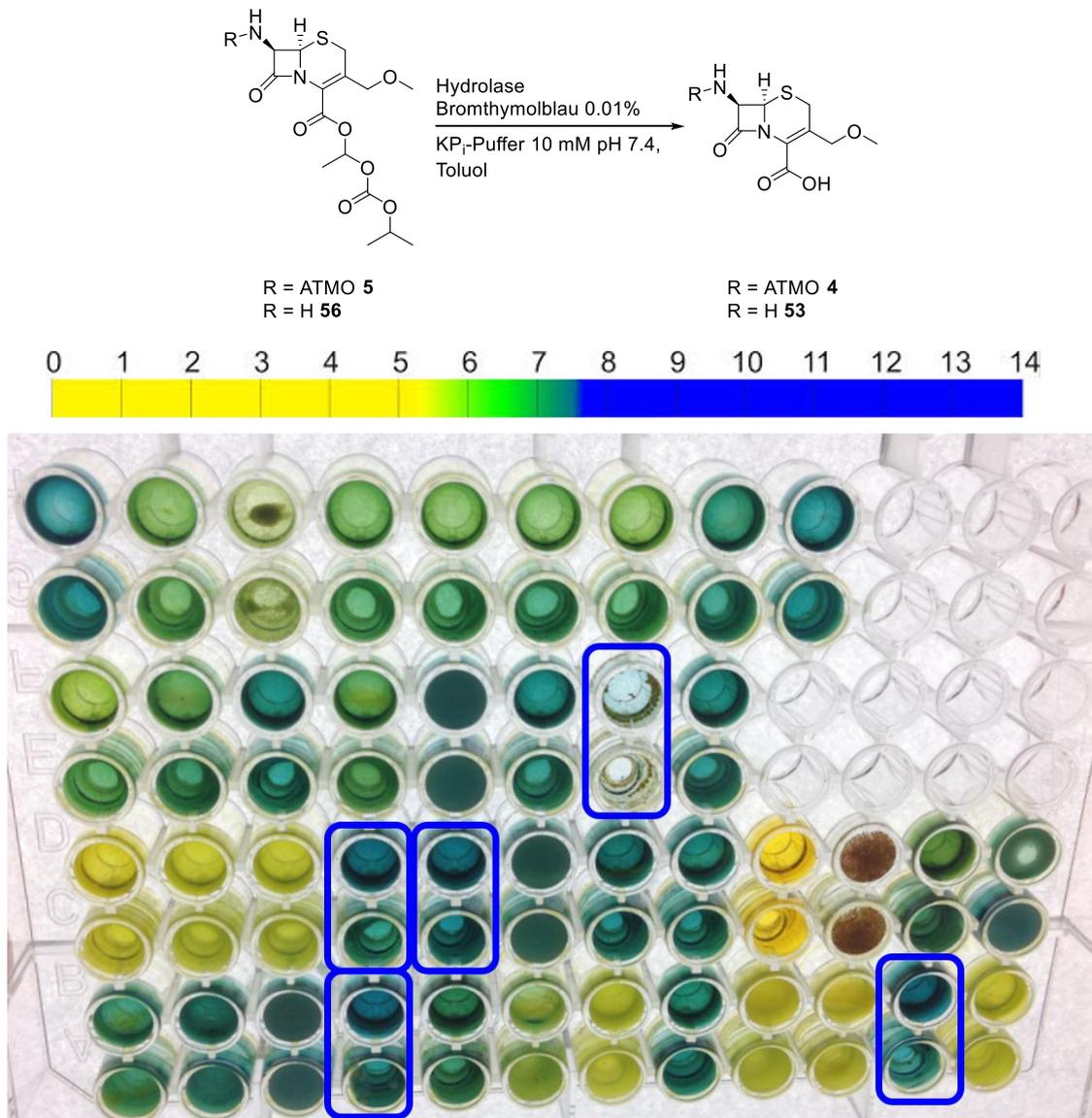


**Abbildung 3–26:** Vergleich der HPLC-Chromatogramme von Cefpodoximproxetil (**5**) und den Diastereomeren (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**). Die Diagramme sind auf das jeweils höchste Signal normiert.

### 3.3.3. Hydrolase-Screening zur Anreicherung von (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) oder (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**)

Nach der Isolierung und Charakterisierung der verschiedenen Diastereomere ist der nächste Schritt ein *Screening* verschiedener Hydrolasen, um ein Enzym zu finden, das selektiv eines der (*S*)-Diastereomere (*S*)-**56** oder (*S*)-**5** hydrolysiert. Dabei soll das Edukt als Substrat in einer organischen Phase mit dem Enzym in der wässrigen Phase gewaschen werden. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Entfernung des Hydrolyseproduktes AMCA (**53**) oder Cefpodoxim (**4**) über die wässrige Enzymphase. Im Arbeitskreis zugänglich sind 62 kommerzielle Hydrolasen, die für beide Substrate getestet werden sollen. Um diese Vielzahl von 124 Versuchen zu vereinfachen, wird ein Farb-*Screening* angewendet. Das Farb-*Screening* ermöglicht die parallele Durchführung einer Vielzahl von Experimenten sowie eine schnelle Abschätzung, welche Hydrolasen eine Aktivität für die Hydrolyse der Esterfunktion in der Seitenkette in 4-Position ermöglichen, ohne eine aufwändige und apparative Analytik unter Verwendung von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie oder HPLC-Chromatographie. Dazu wird in Anlehnung an ein Verfahren von *Moris-Varas et al.* Bromthymolblau in einem gering konzentrierten Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7.4 gelöst und mit dem jeweiligen Enzym versetzt.<sup>[149]</sup> Anschließend wird das gewünschte Substrat **56** oder **5** in Toluol gelöst hinzugegeben. Wenn eine der Hydrolasen eine Aktivität für die Hydrolyse aufweist, sinkt durch

die freiwerdende Säure **53** bzw. **4** der pH-Wert und aufgrund des  $pK_S$ -Wertes des Farbstoffes von 7.3 wird ein Farbumschlag von blau über grün nach gelb beobachtbar (Abbildung 3–27).<sup>[149]</sup>



**Abbildung 3–27:** Farb-Screening der Aktivität für die Hydrolyse von AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**).<sup>[150]</sup>

Da die Zugabe der kommerziellen Hydrolasen den pH-Wert direkt oder auch im Verlauf des *Screening*-Experiments verändern können, wird jeweils auch eine Negativkontrolle ohne Substratzugabe durchgeführt. Ein positives Ergebnis liegt somit vor, wenn bei der Probe ein stärkerer Farbumschlag als bei der Negativkontrolle stattfindet. In Abbildung 3–27 ist beispielhaft eines der *Screenings* dargestellt, wobei positive Proben mit einem blauen Kasten gerahmt wurden und die Negativkontrolle oberhalb der eigentlichen Probe liegt. Es ist zu beachten, dass ein positives Ergebnis nicht zwingend auf eine Aktivität für die gewünschte

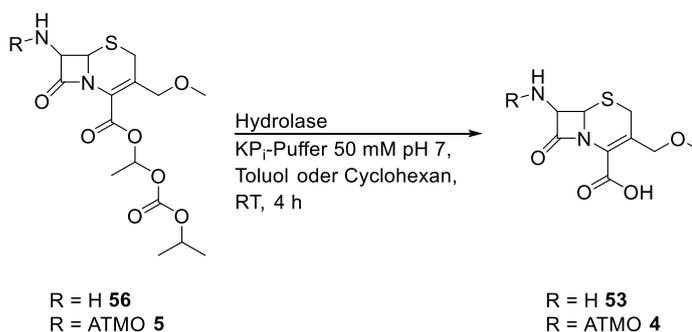
Reaktion schließen lässt, da es sich lediglich um einen indirekten Nachweis handelt. Deshalb ist bei einem positiven Ergebnis eine Biotransformation zwingend notwendig, um zu überprüfen, ob eine Aktivität vorliegt und ob die Hydrolyse stereoselektiv stattfindet.

Es werden jeweils für AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) 62 im Arbeitskreis vorhandene Hydrolasen auf Aktivität für die gewünschte Hydrolyse untersucht. Dabei können mit dem Farb-Screening 16 potentiell aktive Enzyme für die Hydrolyse von AMCA-Proxetil (**56**) und 15 potentiell aktive Enzyme für die Hydrolyse von Cefpodoximproxetil (**5**) ermittelt werden. Die Enzyme mit stärkerem Farbumschlag sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

**Tabelle 3-1:** Enzyme mit stärkerem Farbumschlag im Farb-Screening für die Hydrolyse von AMCA-Proxetil (**56**) oder Cefpodoximproxetil (**5**).

Eintrag	Enzym	Aktivität <b>56</b>	Aktivität <b>5</b>
1	$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine Pancreas</i> )	Ja	Ja
2	Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	Ja	Ja
3	Lipase B immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	Ja	Nein
4	Lipase B lyophilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	Ja	Nein
5	Lipase ( <i>Hog Pancreas</i> )	Nein	Ja
6	Lipase AP6	Ja	Nein
7	Lipase AYG	Ja	Ja
8	Lipase N Conc	Nein	Ja
9	Lipase Typ II ( <i>Porcine Pancreas</i> )	Nein	Ja
10	Lipase PS auf Diatonite	Nein	Ja
11	Lipase PS auf Toyonite	Nein	Ja
12	Lipase R	Ja	Nein
13	Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	Ja	Ja
14	Penicillin G-Amidase immobilisiert	Ja	Ja
15	Proleather	Ja	Nein
16	Protease ( <i>Bacillus species</i> )	Ja	Ja
17	Protease B	Ja	Ja
18	Protease M	Ja	Ja
19	Protease N	Ja	Nein
20	Protease S	Ja	Ja
21	Trypsin	Ja	Ja

In einem nächsten Schritt werden Biotransformationen mit den potentiell aktiven Hydrolasen durchgeführt, um zu ermitteln, ob diese in der Lage sind, das Diastereomerenverhältnis in den gewünschten Bereich zu verschieben (Abbildung 3–28). Dafür werden in einem Zweiphasengemisch aus Kaliumphosphatpuffer und Toluol oder Cyclohexan Hydrolase und Substrat **56** bzw. **5** für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die wässrige Phase extrahiert und nach Entfernen des Lösungsmittels das Diastereomerenverhältnis mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie über den Vergleich der Integrale des Protons am chiralen Kohlenstoffatom in der Seitenkette bestimmt.



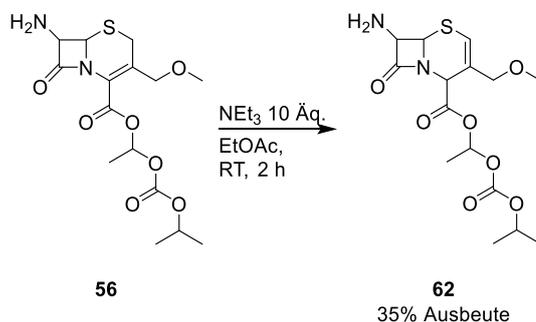
**Abbildung 3–28:** Biotransformationen der potentiell aktiven Hydrolasen für die enzymatische Verseifung von AMCA-Proxetil **56** und Cefpodoximproxetil **5**.

Die Biotransformationen ergeben, dass kein Enzym das Diastereomerenverhältnis signifikant zugunsten der (*R*)-Diastereomere (*R*)-**56** und (*R*)-**5** verschieben kann. Lediglich die Lipase B aus *Candida antarctica* kann das Diastereomerenverhältnis bei der Reaktion in einem Zweiphasengemisch aus Kaliumphosphatpuffer und Cyclohexan von 51% (*S*)-**56** auf einen Anteil von 69% erhöhen. Die weiteren Experimente führen nur zu sehr geringen Änderungen von kleiner als 3%, die im Rahmen der Messgenauigkeit liegen.

### 3.3.4. $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**)

Neben der Möglichkeit der enzymatischen Einstellung des Diastereomerenverhältnisses von AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) ist die Untersuchung der Gleichgewichtsreaktion der  $\Delta$ 2-Isomerisierung ein weiteres Ziel. Dazu wird als Referenzprodukt  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) benötigt. Für die Synthese der Referenzsubstanz **62** wird AMCA-Proxetil (**56**) in Ethylacetat mit einem Überschuss an Base bei Raumtemperatur für zwei Stunden gerührt (Abbildung 3–29). Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile und

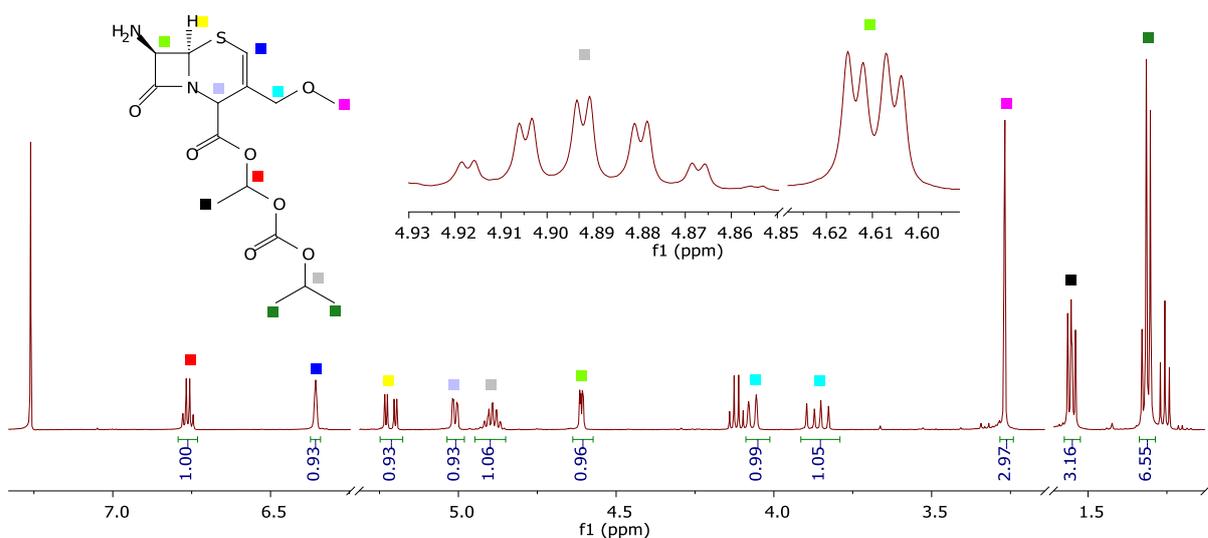
Aufreinigung des Rückstands mittels *Flash*-Chromatographie wird  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) mit einer Ausbeute von 35% erhalten.



**Abbildung 3–29:** Darstellung von  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) ausgehend von AMCA-Proxetil (**56**) unter basischen Bedingungen.

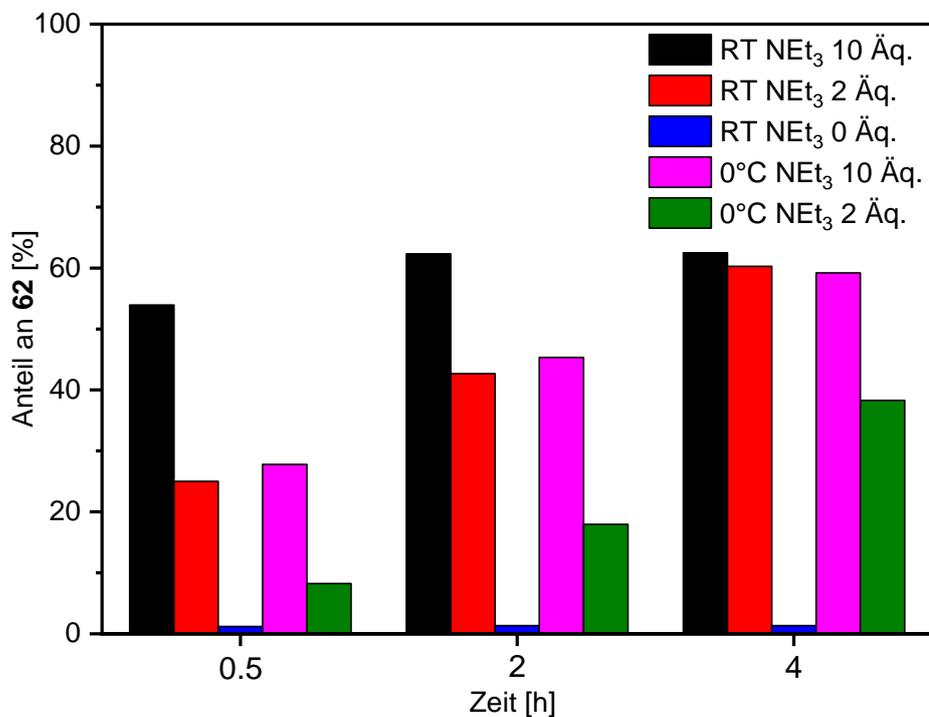
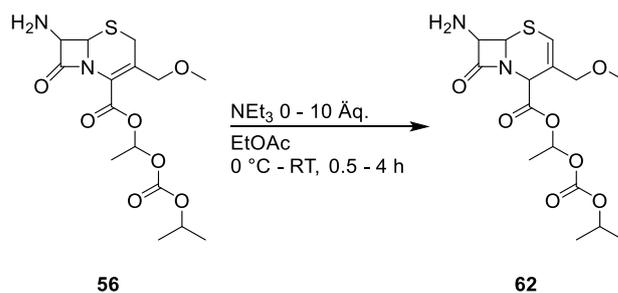
Bei der Betrachtung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des  $\Delta 2$ -Isomers **62** wird deutlich, dass es sich um eine Überlagerung von mindestens zwei Diastereomeren mit leichten Verunreinigungen an Ethylacetat handelt (Abbildung 3–30). Dies entspricht jedoch den Erwartungen, da das Edukt **56** bereits aus zwei Diastereomeren besteht. Deutliche Änderungen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwischen Edukt **56** und Produkt **62** sind für die Signale der Protonen in 2-Position (dunkelblaue Markierung), in 4-Position (violette Markierung), am Stereozentrum in der Seitenkette (rote Markierung) und der Methylengruppe in der Seitenkette in 3-Position (türkise Markierung) beobachtbar. Auffallend für das Signal am Stereozentrum in der Seitenkette (rote Markierung) ist die nicht mehr vorhandene Differenzierung beider Signale. Während im Spektrum von AMCA-Proxetil (**56**) (siehe Abbildung 3–22) zwei voneinander isolierte Quartetts beobachtbar sind, wird im Spektrum von  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) nur ein Quartett erhalten, das gegenüber dem Eduktsignal um ca. 0.2 ppm ins Hochfeld verschoben ist. Ebenfalls eine große Änderung erfährt das Signal des verbliebenen Protons in 2-Position (dunkelblaue Markierung). Dieses Proton kann einem Signal im für ungesättigte Verbindungen typischen Bereich von 6.35 ppm zugeordnet werden. Das Signal des neuen Protons in 4-Position (violette Markierung) wird bei knapp über 5.0 ppm einem Dublett zugeordnet. Dieses Kopplungsmuster resultiert aus einer Überlagerung zweier Singulets beider vorhandener Diastereomere. Eine weitere deutliche Veränderung des Kopplungsmusters ist am Signal der Protonen der Methylengruppe in der Seitenkette in 3-Position erkennbar (türkise Markierung). Während dieses im Edukt **56** ein Quartett zeigt, sind im  $\Delta 2$ -Isomer **62** hier zwei Dubletts von Dubletts mit großer Aufspaltung erkennbar. Diese überlagern nur teilweise und sind deutlich als Signalsatz zweier verschiedener Diastereomere zu erkennen. Die weiteren Signale ähneln denen im AMCA-Proxetil (**56**) stark und unterscheiden sich meist nur durch eine leichte Änderung der chemischen Verschiebung.

Das Vorliegen von zwei Signalsätzen ist dabei deutlich für die Methylgruppen in der Seitenkette in 3-Position (dunkelgrüne und schwarze Markierung), sowie das Proton in 6-Position (gelbe Markierung) zu sehen. Die Signale des Protons in 7-Position (hellgrüne Markierung), des Protons am sekundären Kohlenstoffatom der *iso*-Propylgruppe (graue Markierung) und der Methoxygruppe in der Seitenkette in 4-Position (rosa Markierung) vervollständigen das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Diese drei letztgenannten Signale zeigen ebenfalls doppelte Signalsätze, was aber nur bei guter Auflösung beobachtbar ist.



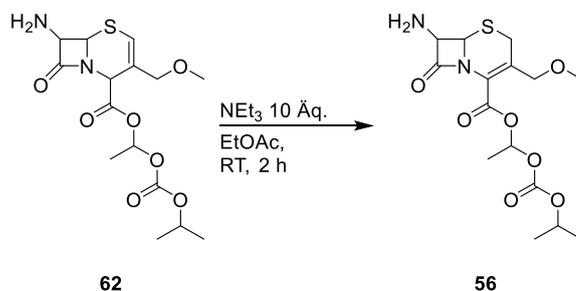
**Abbildung 3–30:** Ausschnitte des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**).

Um eine gezielte Synthese einzelner Diastereomere von  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) zu realisieren, wird zunächst ein *Screening* durchgeführt, um die Gleichgewichtsreaktion zu untersuchen und somit eine gezielte Synthese zu erleichtern (Abbildung 3–31). Dabei wird die Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) zu  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) unter Verwendung verschiedener Mengen an Triethylamin bei Raumtemperatur und  $0\text{ }^\circ\text{C}$  untersucht. Es werden dabei Reaktionszeiten von 30 Minuten, zwei Stunden und vier Stunden getestet. Das Edukt wird mit Triethylamin in Ethylacetat gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Umsatz von AMCA-Proxetil (**56**) zu  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) unter Betrachtung des Signals des Protons am Stereozentrum in der Seitenkette im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bestimmt. Anhand der Ergebnisse der Untersuchungen wird deutlich, dass der Anteil des  $\Delta^2$ -Isomers **62** mit längerer Reaktionsdauer und mit steigender Menge an Triethylamin ansteigt. Eine höhere Temperatur beschleunigt die Reaktion erwartungsgemäß ebenfalls. Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt ein asymptotischer Verlauf der Reaktion gegen einen Maximalanteil von 62% an  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) auf.



**Abbildung 3–31:** *Screening* zur Untersuchung der Gleichgewichtsreaktion der  $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) unter basischen Bedingungen.

Um die Lage des Gleichgewichts untersuchen zu können, wird auch die Rückreaktion untersucht (Abbildung 3–32). Dabei wird ein Gemisch aus dem  $\Delta$ 2-Isomer (**62**) und dem  $\Delta$ 3-Isomer (**56**) erhalten, das 63%  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) enthält.

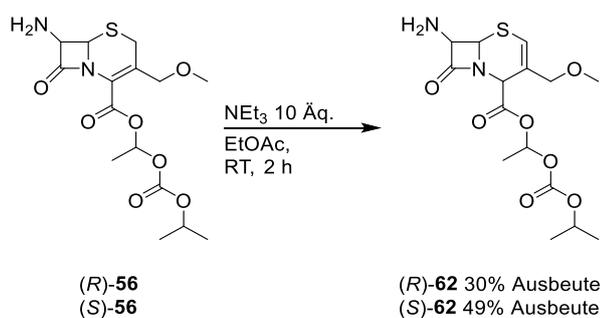


**Abbildung 3–32:** Untersuchung der Isomerisierung von  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) zu AMCA-Proxetil (**56**) unter basischen Bedingungen.

Dieses Ergebnis bestätigt eine Gleichgewichtseinstellung mit einem ungefähren Gleichgewicht von 62%  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) bei Raumtemperatur und Verwendung von zehn Äquivalenten Triethylamin.

### 3.3.5. Isolierung der $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil-Diastereomere (*R*)-**62** und (*S*)-**62**

Unter Verwendung der Informationen zur Gleichgewichtseinstellung im Basischen werden im nächsten Schritt die beiden isolierten Diastereomere (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) und (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**) unter basischen Bedingungen isomerisiert (Abbildung 3–33). Dabei konnte aus dem Reaktionsgemisch jeweils eine Verbindung neben dem Ausgangsmaterial erhalten werden. Für (*R*)- $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil ((*R*)-**62**) und (*S*)- $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil ((*S*)-**62**) konnten Ausbeuten von 30% und 49% erhalten werden.

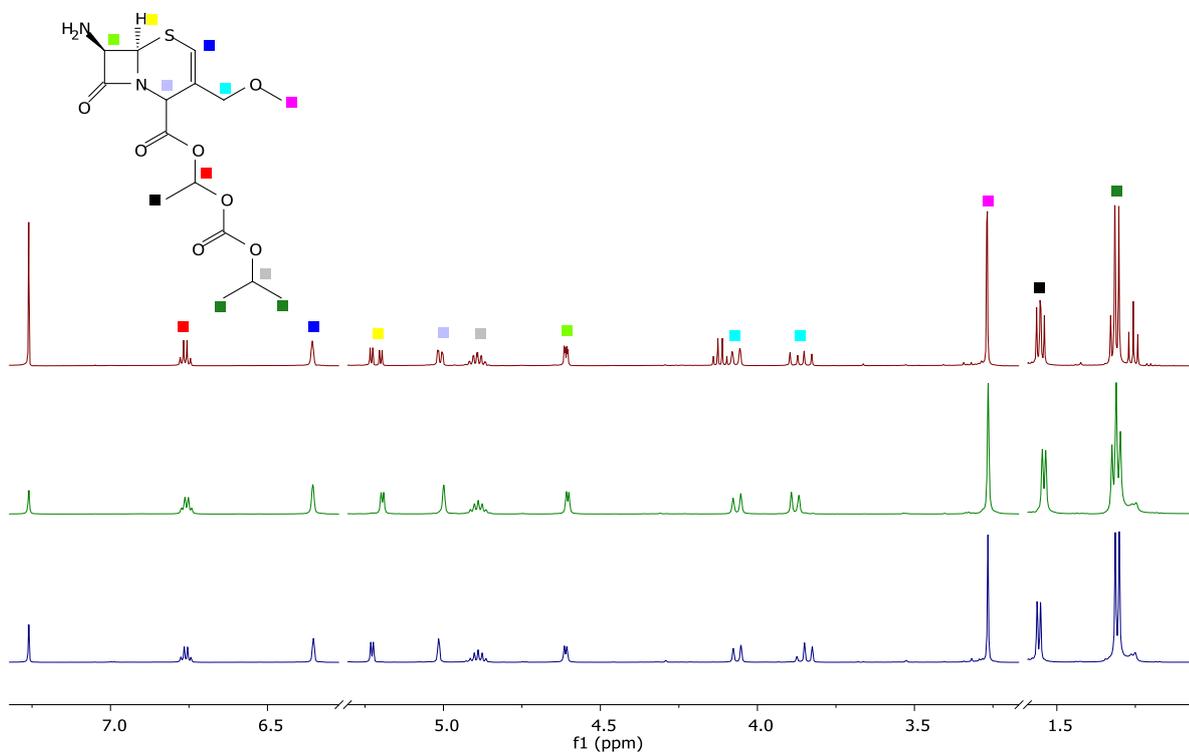


**Abbildung 3–33:** Isomerisierung der einzelnen Diastereomere (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) und (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**).

Beim Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der beiden isolierten Diastereomere (*R*)-**62** (grünes Spektrum, Mitte) und (*S*)-**62** (blaues Spektrum, unten) mit dem Produkt der  $\Delta$ 2-Isomerisierung von **56** (rotes Spektrum, oben) wird deutlich, dass diesen beiden Diastereomeren die beiden Signalsätze der Mischung zuzuordnen sind (Abbildung 3–34). Die Zuordnung der Signale ist somit identisch mit der Zuordnung der Mischung, die im Vorfeld bereits diskutiert wurde.

Beide Spektren zeigen deutliche, saubere Signalsätze, die nicht auf das Vorhandensein weiterer Diastereomerenmischungen hindeuten. Dies bedeutet, dass bei der  $\Delta$ 2-Isomerisierung die Reprotonierung in 4-Position stereoselektiv verlaufen muss, da sonst aufgrund der vorhandenen Diastereomere doppelte Signalsätze vorhanden sein müssten. Die Konfiguration des neu entstandenen Stereozentrums in 4-Position ist jedoch unbekannt und müsste in einem nächsten Schritt über eine Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht werden. Die Präfixe (*S*)- und (*R*)- beziehen sich also weiterhin auf das Stereozentrum in der Seitenkette, wobei die

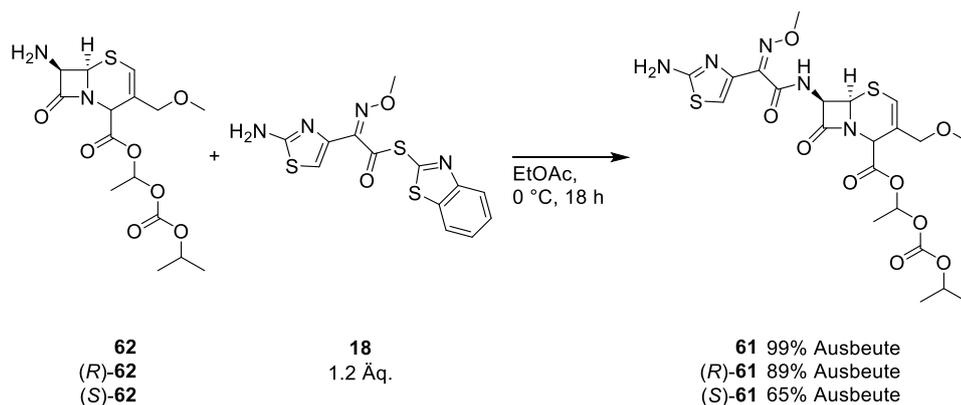
Stereozentren im  $\beta$ -Lactamring beide in (*R*)-Konfiguration vorliegen und das Stereozentrum in 4-Position eine unbekannte Stereokonfiguration aufweist.



**Abbildung 3–34:** Vergleich von Ausschnitten der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) (rotes Spektrum, oben) und den Diastereomeren (*R*)- $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil ((*R*)-**62**) (grünes Spektrum, Mitte) und (*S*)- $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil ((*S*)-**62**) (blaues Spektrum, unten).

### 3.3.6. Darstellung zweier $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil-Diastereomere

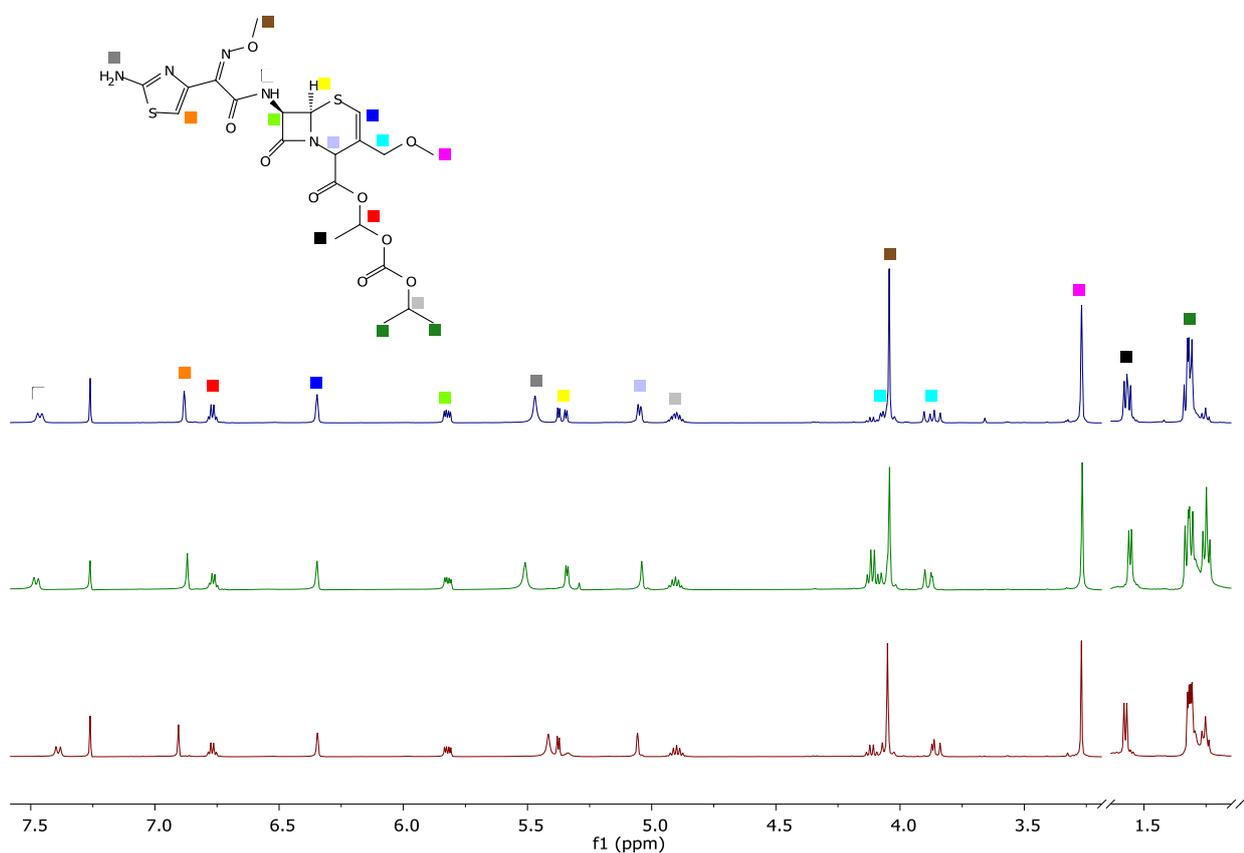
Der nächste und abschließende Schritt ist die Umsetzung der Mischung **62** und der einzelnen Diastereomere (*R*)-**62** und (*S*)-**62** zu den jeweiligen  $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil-Verbindungen **61**, (*R*)-**61** und (*S*)-**61**. Dazu werden, in Anlehnung an den MAEM-Prozess, wie in Kapitel 3.3.2 bereits für AMCA-Proxetil (**56**) beschrieben, die genannten Verbindungen mit MAEM (**18**) umgesetzt (Abbildung 3–35). Für die Diastereomerenmischung **61** kann dabei eine Ausbeute von 99% erzielt werden. Das (*R*)-Diastereomer (*R*)-**61** wird mit einer Ausbeute von 89% und das (*S*)-Diastereomer (*S*)-**61** mit einer Ausbeute von 65% erhalten.



**Abbildung 3-35:** Darstellung von  $\Delta^2$ -Cefpodoximproxetil (**61**) und den beiden Diastereomeren (*R*)-**61** und (*S*)-**61** ausgehend vom jeweiligen  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) mit dem Aktivester MAEM (**18**).

Bei der Betrachtung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wird deutlich, dass wie erwartet das Spektrum des Produkts der Mischung **61** als Kombination der Spektren der beiden Diastereomere (*R*)-**61** und (*S*)-**61** erhalten wird (Abbildung 3-36). Ein Großteil der Signale der beiden isolierten Diastereomere überlagert dabei ohne eine deutliche Unterscheidung. Diese ist jedoch beim Signal des Protons in 6-Position (gelbe Markierung) zu erkennen, wo bei einer chemischen Verschiebung von 5.3 ppm in der Mischung zwei deutliche Dubletts zu erkennen sind. Weitere deutlich überlagerte Signale sind die beiden überlagernden Singulets des Protons in 4-Position (violette Markierung) und die breiten überlagernden Dubletts von Dubletts der Protonen der Methylengruppe in der Seitenkette in 3-Position (türkise Markierung). Die Signale dieser Protonen zeigen durch die Amidierung keine deutlichen Änderungen in der chemischen Verschiebung. Dasselbe gilt auch für die Signale der Protonen der Seitenkette in 4-Position. Die Methylgruppen erzeugen weiterhin die Signale bei 1.3 ppm (dunkelgrüne Markierung) und 1.6 ppm (schwarze Markierung) im erwarteten Bereich. Das Proton am Stereozentrum (rote Markierung) kann einem nahezu unveränderten Quartett im Bereich von 6.8 ppm zugeordnet werden, während das sekundäre Proton der *iso*-Propylgruppe (graue Markierung) ein Septett bei 4.8 ppm erzeugt. Weiterhin kaum Einfluss auf die chemische Verschiebung hat das Knüpfen der Amidbindung auf die Methoxygruppe in der Seitenkette in 3-Position (rosa Markierung) bei 3.3 ppm und das Proton am ungesättigten Kohlenstoffatom in 2-Position (dunkelblaue Markierung), das bei 6.3 ppm in einem für Protonen an ungesättigten Kohlenstoffatomen typischen Bereich zu finden ist. Ein deutlicher Einfluss ist bei dem Signal des Protons in 7-Position (hellgrüne Markierung) zu erkennen, das in direkter Nachbarschaft zu der amidierten Aminfunktion liegt. Dieses Proton kann jetzt einem Dublett von Dubletts zugeordnet werden, das mit einer chemischen Verschiebung von 5.6 ppm verglichen mit dem ursprünglichen

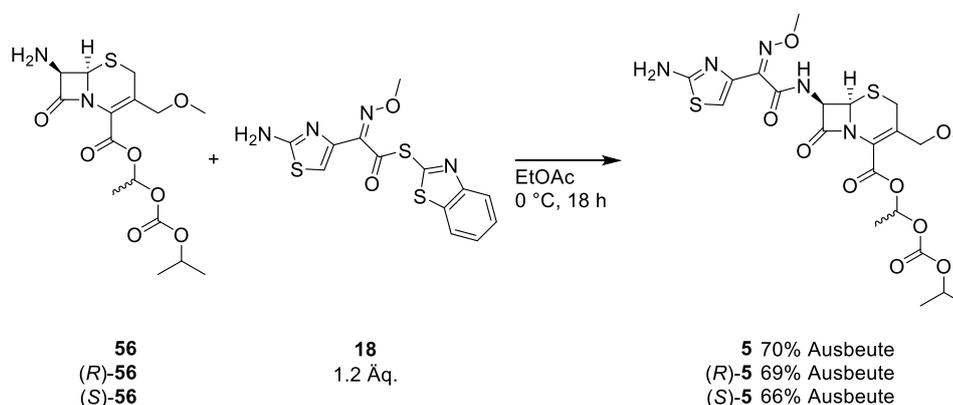
Dublett im  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) (siehe Abbildung 3–34) ungefähr 1.0 ppm zum Tieffeld verschoben ist. Außerdem vervollständigen die Signale der neu in das Molekül eingeführten Protonen das Spektrum, die alle im erwarteten Bereich zu finden sind. Dies sind im Einzelnen die Protonen der Aminfunktionen (dunkelgraue Markierung), deren chemische Verschiebung aufgrund von Änderungen der chemischen Umgebung von Probe zu Probe leicht verändert im Bereich von 5.5 ppm liegt, das aromatische Proton (orange Markierung), das einem Singulett bei 6.9 ppm zuzuordnen ist und die Protonen der Oximfunktion (braune Markierung), die ein Singulett bei 4.0 ppm erzeugen, das mit dem Signal der Methylenprotonen (türkise Markierung) überlagert. Des Weiteren ist im Spektrum das Signal des Amidprotons (weiße Markierung) zu finden, dessen Position ebenfalls abhängig von der chemischen Umgebung leicht variiert und im Bereich von 7.5 ppm zu finden ist.



**Abbildung 3–36:** Vergleich von Ausschnitten der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von  $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil (**61**) (blaues Spektrum, oben) und den Diastereomeren (*R*)- $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil (*(R)*-**61**) (grünes Spektrum, Mitte) und (*S*)- $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil (*(S)*-**61**) (rotes Spektrum, unten).

### 3.4. Zusammenfassung

Ausgehend von einer Mischung beider Diastereomere von AMCA-Proxetil (**56**) konnten unter Verwendung der *Flash*-Chromatographie die beiden Diastereomere (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**) und (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**) erfolgreich getrennt und charakterisiert werden. Dabei war es möglich, beide Diastereomere mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und HPLC-Chromatographie erfolgreich zu differenzieren. Im nächsten Reaktionsschritt wurden die beiden isolierten Diastereomere erfolgreich mit MAEM (**18**) zu den jeweiligen Diastereomeren (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**) mit Ausbeuten von 69% und 66% umgesetzt (Abbildung 3–37). Auch diese konnten erfolgreich charakterisiert und beide Diastereomere mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und HPLC-Chromatographie differenziert werden.

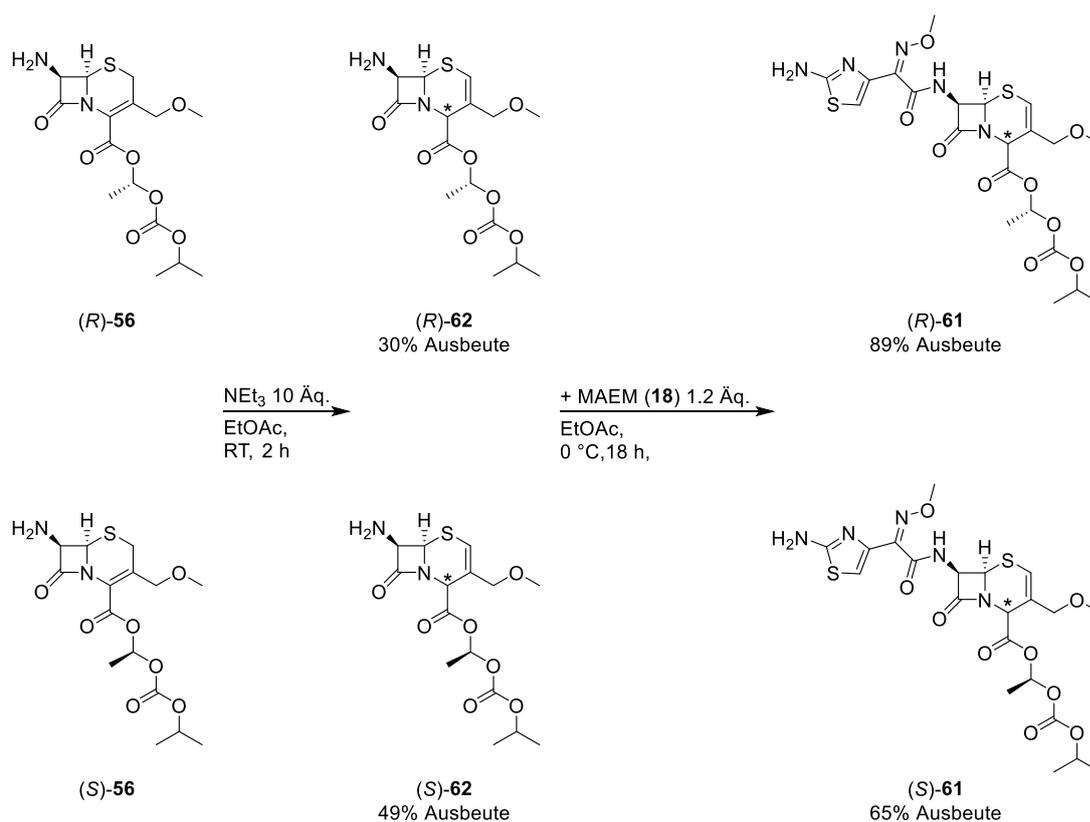


**Abbildung 3–37:** Darstellung von Cefpodoximproxetil (**5**) sowie beider Diastereomere (*R*)-**5** und (*S*)-**5** ausgehend vom jeweiligen AMCA-Proxetil (**56**) mit dem Aktivester MAEM (**18**).

Im nächsten Schritt wurde mit einem Farb-*Screening* untersucht, ob es möglich ist, das Diastereomerenverhältnis zwischen (*R*)-**56** und (*S*)-**56** bzw. (*R*)-**5** und (*S*)-**5** unter Verwendung einer Hydrolase in Richtung (*R*)-**56** bzw. (*R*)-**5** zu verschieben. Das Farb-*Screening* zeigte bei 62 getesteten Hydrolasen positive Ergebnisse für 16 Hydrolasen für die Hydrolyse von AMCA-Proxetil (**56**) und für 15 Hydrolasen für die Hydrolyse von Cefpodoximproxetil (**5**). Bei nachfolgenden Biotransformationen konnte jedoch keine der getesteten Hydrolasen das Diastereomerenverhältnis in Richtung einer Anreicherung von (*R*)-**56** bzw. (*R*)-**5** verschieben.

Zur Vorbereitung einer Synthese von Diastereomeren des  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetils (**62**) wurde die Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) unter basischen Bedingungen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei einem Überschuss von zehn Äquivalenten Triethylamin bei Raumtemperatur nach zwei Stunden 62%  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) im Gleichgewicht vorliegt.

Dieses Ergebnis konnte auch mit  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) als Ausgangsmaterial für die Isomerisierung erreicht werden. So konnte unter diesen Bedingungen jeweils ein Diastereomer bei der Isomerisierung von (*R*)-**56** und (*S*)-**56** erhalten werden (Abbildung 3–38). In den jeweiligen  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von (*R*)-**62** und (*S*)-**62** ist jeweils ein klarer Signalsatz vorhanden, der eindeutig auf ein Reaktionsprodukt und nicht auf das Vorhandensein von Diastereomeren schließen lässt. Eine Bestimmung der Konfiguration des neuen Stereozentrums in 4-Position ist nicht erfolgt, dies ist jedoch der nächste Schritt.



**Abbildung 3–38:** Übersicht zu den Produkten der gezielten  $\Delta 2$ -Isomerisierung der Diastereomere (*R*)-**56** und (*S*)-**56**, sowie die folgende Amidierung zu (*R*)-**61** und (*S*)-**61**.

Im abschließenden Schritt wurden dann die beiden Diastereomere (*R*)-**62** und (*S*)-**62** mit MAEM (**18**) zum jeweiligen  $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil (*R*)-**61** und (*S*)-**61** umgesetzt.

# 4. Chemoenzymatische Synthese von (R)-4-Methoxyamphetamin (R)-(77)

## 4.1. Stand der Wissenschaft

### 4.1.1. Tamsulosin ((R)-78)

Tamsulosin ((R)-78) wirkt im menschlichen Körper als Antagonist von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren und kann als solcher die Beschwerden des unteren Harntraktes von Männern mit einer benignen Prostatahypertrophie, im Volksmund gutartige Vergrößerung der Prostata, lindern.<sup>[151–153]</sup> Nach der erstmaligen Synthese des racemischen Tamsulosin *rac*-(78) 1981 von *Yamanouchi Pharmaceutical*, wurde im Jahr 1987 ebenfalls von diesem Unternehmen eine Synthese des (R)-Enantiomers (R)-78 patentiert (Abbildung 4–1).<sup>[154–156]</sup> Der Ausgangsstoff bei dieser Synthese ist 2-Methoxy-5-acetylbenzolsulfonamid (79), das in einer stereoselektiven reduktiven Aminierung mit (R)-Phenylethylamin (R)-80 zum sekundären Amin (R,R)-81 umgesetzt wird. Anschließend wird in einer Hydrogenolyse die Benzylgruppe abgespalten und (R)-5-(2-Aminopropyl)-2-methoxybenzolsulfonamid ((R)-82) erhalten. Abschließend wird durch Umsetzung mit der halogenierten Seitenkette 83 in einer Substitutionsreaktion der Wirkstoff Tamsulosin ((R)-78) erhalten.

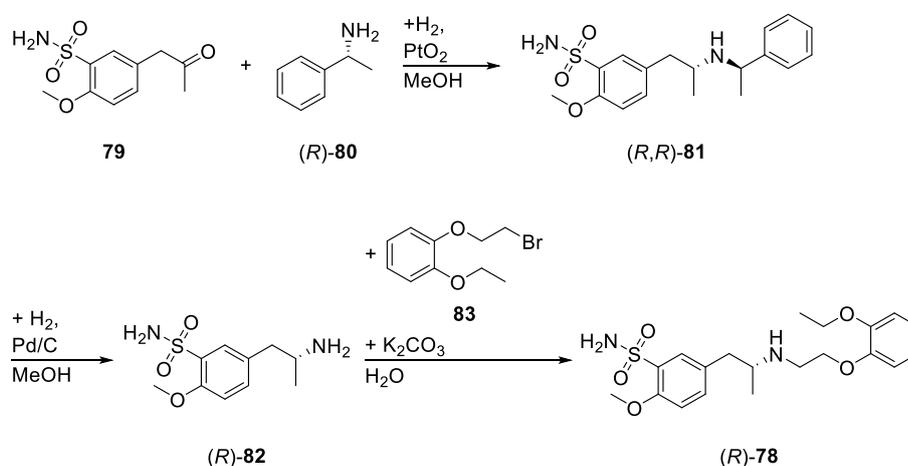
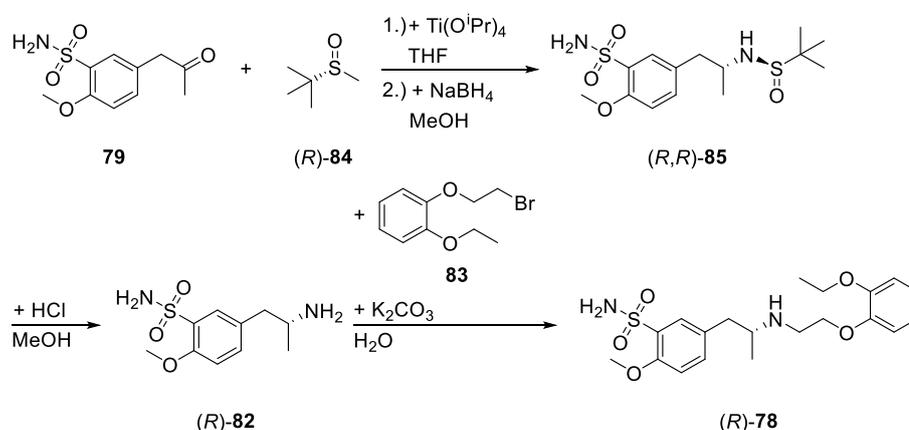


Abbildung 4–1: Erste Synthese von Tamsulosin ((R)-78) von *Yamanouchi Pharmaceutical*.<sup>[155,156]</sup>

Die chirale Information wird bei dieser Synthese des substituierten Amphetamins (*R*)-**82** über die Verwendung eines chiralen Hilfsreagenz (*R*)-**80** eingeführt. Diese Variante hat somit den Nachteil, dass das chirale Reagenz (*R*)-**80** in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden muss und daher Kosten und größere Mengen an Abfall entstehen.

Eine alternative Synthesestrategie beruht auf der Verwendung des *Ellmans*-Auxiliars ((*R*)-**84**) anstelle des Phenylethylamins (Abbildung 4–2).<sup>[157,158]</sup> Das Produkt der reduktiven Aminierung (*R,R*)-**85** wird anschließend unter sauren Bedingungen hydrolysiert, um das substituierte Amphetamin (*R*)-**82** zu erhalten, das anschließend unter bekannten Bedingungen zu Tamsulosin (*R*)-**78** umgesetzt wird.

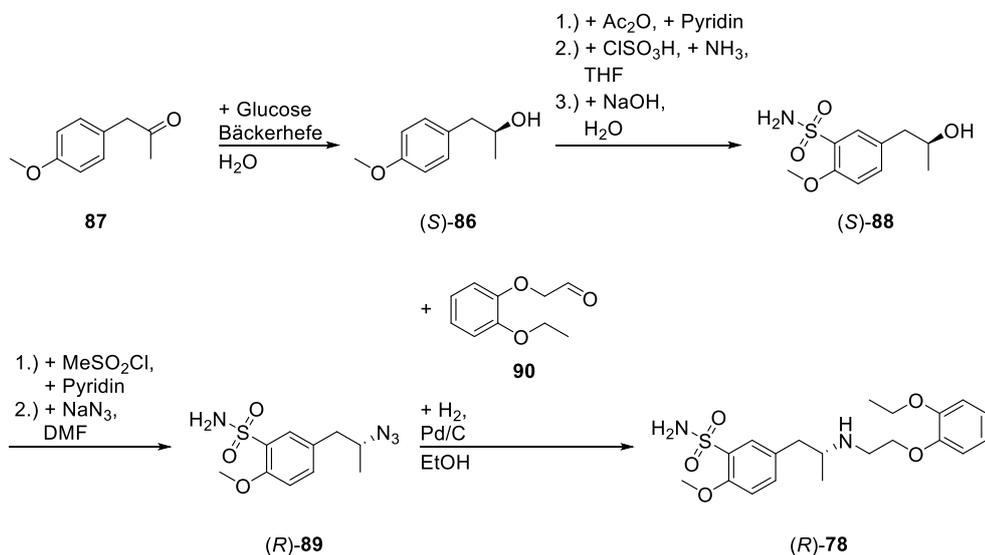


**Abbildung 4–2:** Synthese von Tamsulosin (*R*)-**78** unter Verwendung des *Ellmans*-Auxiliars ((*R*)-**84**).<sup>[157,158]</sup>

Dieses Verfahren erscheint aus ökologischer Sicht negativer als das Verfahren mit Phenylethylamin ((*R*)-**80**), da neben stöchiometrischen Mengen des Auxiliars (*R*)-**84** auch Tetra-*iso*-propyltitanat und Natriumborhydrid in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden müssen und somit für beträchtliche Mengen an Abfall sorgen. Sowohl die Nutzung des *Ellmans*-Auxiliars ((*R*)-**84**) als auch die Verwendung von Phenylethylamin ((*R*)-**80**) konnten auch erfolgreich in kontinuierliche Reaktionen übertragen werden.<sup>[159]</sup>

Eine andere Synthesestrategie für die stereoselektive Synthese lieferten *Acetti et al.* unter Verwendung eines chiralen Alkohols (*S*)-**86** als Zwischenstufe (Abbildung 4–3).<sup>[160]</sup> Dieser wird in einer enzymatischen Reduktion unter Verwendung von Bäckerhefe aus dem 4-Acetonylanisol (**87**) dargestellt. Unter Verwendung einer Schutzgruppe wird anschließend die Sulfonsäureamidgruppe eingeführt, um den chiralen Alkohol (*S*)-**88** zu erhalten. Der Alkohol wird mit Methansulfonsäurechlorid in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt und in

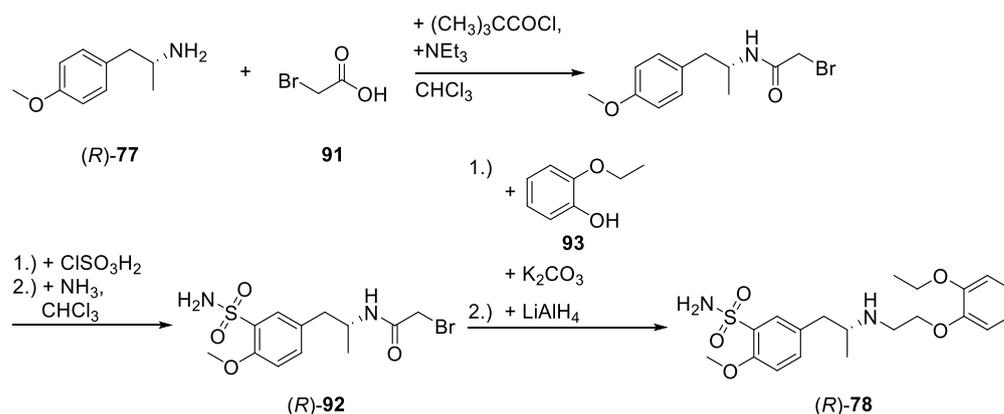
einer nukleophilen Substitution eine Azidgruppe eingeführt. Dieses Azid (*(R)*-**89**) wird unter Katalyse von Palladium und Aktivkohle mit Wasserstoff und dem Aldehyd **90** zum gewünschten Produkt Tamsulosin (*(R)*-**78**) umgesetzt.



**Abbildung 4–3:** Synthese von Tamsulosin (*(R)*-**78**) unter Einführung der Stereoinformation über die Zwischenstufe des chiralen Alkohols (*(S)*-**86**).<sup>[160]</sup>

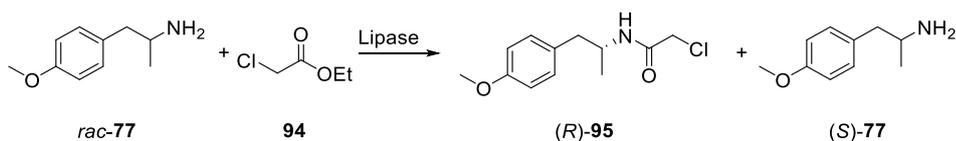
Anhand der Syntheseroute ist zu erkennen, dass für die Einführung der Sulfonsäureamidgruppe eine Schutzgruppenstrategie notwendig ist. Dies erzeugt Abfall in stöchiometrischen Mengen, der das Verfahren ökologisch unattraktiver macht. Des Weiteren ist die Verwendung von Aziden bedenklich und erfordert besondere Maßnahmen in der Arbeitssicherheit.

Da die chirale Information in der Regel bereits auf der Zwischenstufe vom eventuell substituierten Methoxyamphetamin eingeführt ist, gibt es für die folgenden Reaktionsschritte eine Alternative zur Nutzung der halogenierten Seitenkette **83** (Abbildung 4–4).<sup>[155,161]</sup> Ausgehend vom (*(R)*-4-Methoxyamphetamin (*(R)*-**77**) wird die Aminfunktion mit Bromessigsäure (**91**) amidiert und anschließend die Sulfonsäureamidgruppe eingeführt, um die halogenierte Zwischenstufe (*(R)*-**92**) zu erhalten. In einer nukleophilen Substitution mit Ethoxyphenol (**93**) und anschließender Reduktion der Amidgruppe zum sekundären Amin wird Tamsulosin (*(R)*-**78**) erhalten. Diese Syntheseroute ermöglicht den Einsatz von (*(R)*-4-Methoxyamphetamin (*(R)*-**77**) als chirales Ausgangsmolekül für die Synthese von Tamsulosin (*(R)*-**78**). Somit ist (*(R)*-4-Methoxyamphetamin (*(R)*-**77**) ein interessanter *Precursor* für die Synthese von Tamsulosin (*(R)*-**78**).



**Abbildung 4–4:** Syntheseroute für Tamsulosin ((*R*)-78) ausgehend vom chiralen Baustein (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77).<sup>[155,161]</sup>

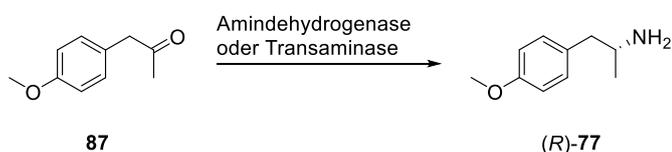
Neben der stereoselektiven Synthese gibt es auch verschiedene Ansätze für die Durchführung einer Racematspaltung. Die Verwendung von Lipasen zur Racematspaltung von Aminen mittels selektiver Amidierung ist für die Trennung der beiden Enantiomere von *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) bekannt.<sup>[162,163]</sup> Prieto und Nicolau entwickelten dabei ein Verfahren, welches einen guten Einstiegspunkt zur eben gezeigten Folgechemie (Abbildung 4–4) ausgehend von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) darstellt. Dabei wird das racemische 4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) mit Chloressigsäureethylester (94) und einer Lipase versetzt (Abbildung 4–5). Die Lipase setzt selektiv das (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) zum Chloressigsäureamid ((*R*)-95) um, während das (*S*)-4-Methoxyamphetamin ((*S*)-77) nicht reagiert.<sup>[162]</sup> Der Vorteil dieser lipasekatalysierten Reaktion ist, dass sie den nächsten Reaktionsschritt der bekannten Folgechemie katalysiert und somit das Produkt (*R*)-95 direkt weiter eingesetzt werden kann. Wie bei allen Racematspaltungen ist jedoch die maximal erreichbare Ausbeute von 50% nachteilig, da es somit zu einer erhöhten Abfallproduktion kommt. Diese kann über eine Racemisierung des ungewünschten Enantiomers in einem weiteren Reaktionsschritt oder in Form einer dynamisch kinetischen Racematspaltung vermieden werden. Verfahren dieser Art sind für sekundäre Alkohole verbreitet und werden erfolgreich verwendet.<sup>[138,164]</sup> Für die Racemisierung chiraler Amine gibt es einige Beispiele unter Verwendung von Übergangsmetallkatalysatoren, jedoch weisen diese Prozesse Nachteile wie eine hohe Katalysatormenge und oftmals kleine Substratspektren auf, sodass sie für eine industrielle Anwendung meist unattraktiv sind.



**Abbildung 4–5:** Racematspaltung unter Verwendung einer Lipase zur Synthese des enantiomerenreinen Zwischenprodukts (*R*)-95.<sup>[163]</sup>

Eine weitere Variante der Racematspaltung ist die Verwendung von enantiomerenreinen Säuren, um die diastereomeren Salze zu erhalten, die ein unterschiedliches Kristallisationsverhalten zeigen. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von Weinsäure zur Racematspaltung in der Synthese von Tamsulosin ((*R*)-78).<sup>[165]</sup>

Eine Alternative zur Racematspaltung stellt die stereoselektive Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) dar. Hierbei sind vor allem biokatalytische Verfahren bekannt, bei denen 4-Acetonylanisol (**87**) als Substrat eingesetzt wird. Für die Umwandlung einer Keto- in eine sekundäre Aminfunktion bietet sich die Verwendung von Amindehydrogenasen und Transaminasen an (Abbildung 4–6).<sup>[166–169]</sup>

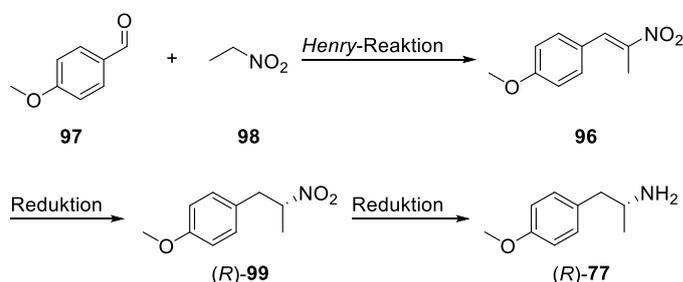


**Abbildung 4–6:** Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) ausgehend von 4-Acetonylanisol (**87**) unter Verwendung von Amindehydrogenasen oder Transaminasen.<sup>[166–169]</sup>

Wie bei einer Vielzahl von Biokatalyseprozessen weisen diese Reaktionen sehr gute Selektivitäten auf und ermöglichen die Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) in hoher optischer Reinheit. Eine technische Anwendung im größeren Maßstab findet mit Transaminasen und Amindehydrogenasen aber nur in ausgewählten Reaktionen statt.<sup>[166–169]</sup>

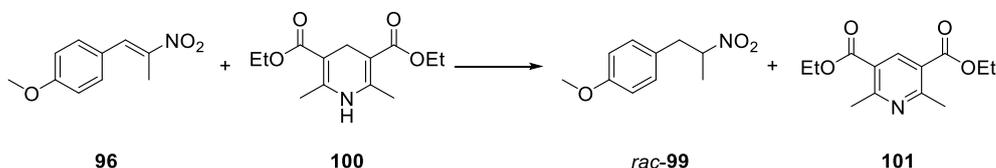
Eine weitere denkbare Variante ist die Verwendung einer anderen prochiralen Vorstufe, aus der (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) hergestellt werden kann. Denkbar wäre dabei das Ausgangsmaterial, die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Nitroverbindung **96**, in einer Nitroaldolreaktion, auch *Henry*-Reaktion genannt, aus den gut verfügbaren Ausgangsmaterialien Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**) zu erhalten (Abbildung 4–7). Der nächste Reaktionsschritt, die stereoselektive Reduktion der Doppelbindung, ist der Schlüsselschritt dieser Syntheseroute und wird im

Folgenden genauer betrachtet. Abschließend würde in einer weiteren Reaktion die Nitrogruppe zu einer Aminogruppe reduziert.



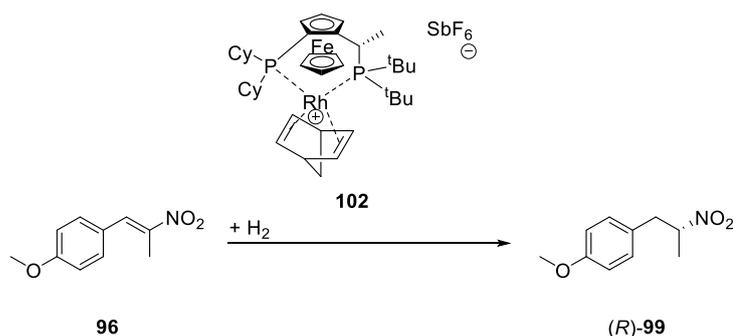
**Abbildung 4–7:** Alternative Syntheseroute für die Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77) ausgehend von Anisaldehyd (97) und Nitroethan (98).

Eine klassische Möglichkeit die Verbindung *rac*-99 aus der ungesättigten Verbindung 96 herzustellen, ist die Verwendung des *Hantzsch*-Esters (100) (Abbildung 4–8).<sup>[170,171]</sup> Dabei wird der *Hantzsch*-Ester (100) in die oxidierte Form 101 überführt, während die reduzierte Nitroverbindung 99 gebildet wird. Die Verwendung dieses Reduktionsmittels hat den Nachteil einer nicht stereoselektiven Reaktion und einer hohen entstehenden Abfallmenge.



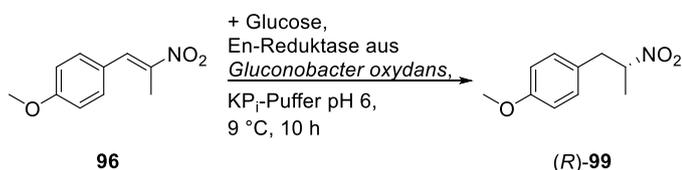
**Abbildung 4–8:** Reduktion der ungesättigten Verbindung 96 unter Verwendung des *Hantzsch*-Esters (100).<sup>[170,171]</sup>

Eine verbreitete Strategie für Reduktionsreaktionen ist der Einsatz von elementarem Wasserstoff unter Metallkatalyse. Die Reduktion der ungesättigten Nitroverbindung 96 ist beispielsweise mit Rhodiumkomplexen beschrieben.<sup>[172,173]</sup> Eine Variante mit dem chiralen Rhodiumkomplex 102, die eine stereoselektive Synthese der reduzierten Nitroverbindung (*R*)-99 ermöglicht, ist in Abbildung 4–9 dargestellt.<sup>[173]</sup> Es konnten bei einer Katalysatormenge von 2.5 mol-% eine Ausbeute von 62% und ein Enantiomerenüberschuss von 82% erreicht werden. Ein Nachteil dieser Reaktion besteht in der hohen Katalysatormenge mit dem teuren Metall Rhodium, der auch durch den Vorteil des preisgünstigen und abfallsparenden elementaren Wasserstoffs als Reduktionsmittel nicht aufgewogen werden kann.



**Abbildung 4–9:** Stereoselektive Reduktion von **96** mit elementarem Wasserstoff unter Verwendung des chiralen Metallkomplexes **102** als Katalysator.

Eine weitere enantioselektive Synthese von (*R*)-**99** ist unter Einsatz der Biokatalyse denkbar. So konnte gezeigt werden, dass Bäckerhefe und Zellen von *Escherichia coli* eine Aktivität für die Reduktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Nitroverbindung **96** aufweisen.<sup>[174–176]</sup> Die Enzymklasse, die so eine Reaktion katalysiert, ist die der En-Reduktasen, welche die Reduktion elektronenarmer Doppelbindungen katalysiert. Unter Verwendung einer isolierten En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* konnte bereits die Reduktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Nitroverbindung **96** gezeigt werden (Abbildung 4–10).<sup>[177]</sup> Dabei wurden für die Reduktion des Substrats **96** ein produktbezogener Umsatz von 30% und ein Enantiomerenüberschuss von 66% erhalten.



**Abbildung 4–10:** Biokatalytische Synthese von (*R*)-**99** unter Verwendung einer En-Reduktase vom Typ *Gluconobacter oxydans*.<sup>[177]</sup>

#### 4.1.2. En-Reduktasen

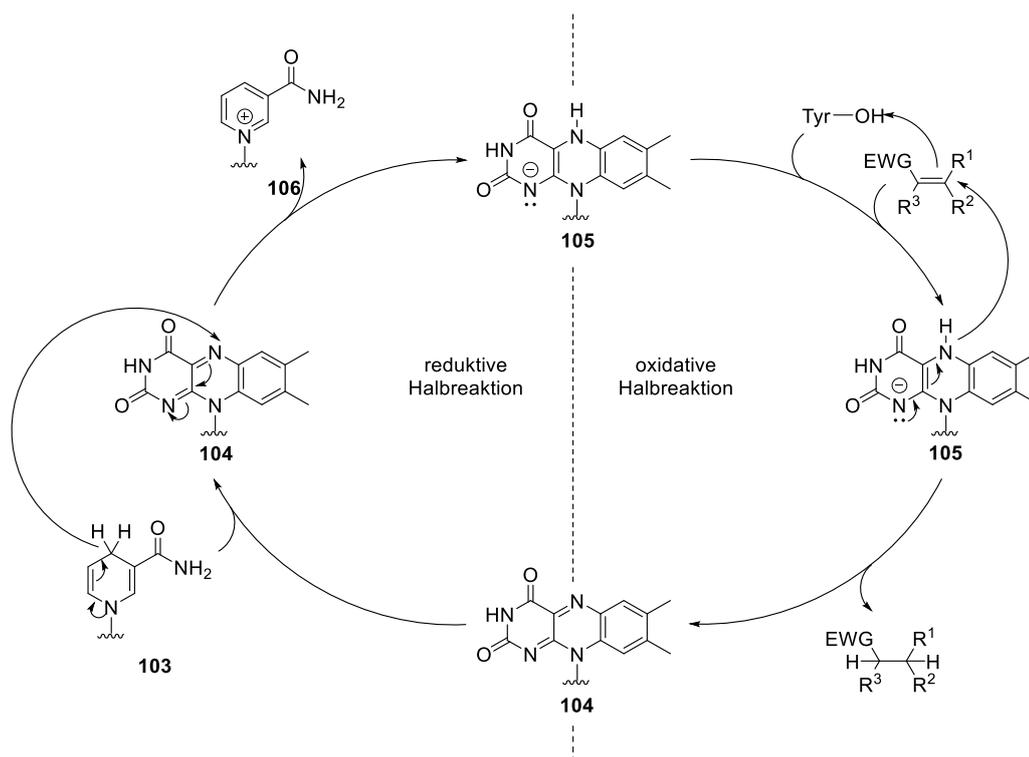
Otto Warburg isolierte 1932 aus der Bierhefe *Saccharomyces pastorianus* ein „gelbes Ferment“, das unter Entfärbung von Hexosemonophosphorsäure reduziert und unter Verwendung von Methylblau oder Luftsauerstoff wieder oxidiert wird.<sup>[178]</sup> Theorell gelang die Isolierung eines farblosen Enzyms und des gelben Cofaktors Flavinmononukleotid mittels Aufreinigung des „gelben Ferments“. Die beiden isolierten Komponenten katalysieren nicht die von Warburg beschriebenen Reaktionen, jedoch wird nach Vermischung beider Komponenten die aktive Komponente des „gelben Ferments“ erhalten.<sup>[179]</sup> Nachdem Haas 1938 ein weiteres

neues „gelbes Ferment“ isolieren konnte, wurde das von *Warburg* isolierte „gelbe Ferment“ im Folgenden einfach *old yellow enzyme* (OYE) genannt.<sup>[180]</sup> Aus diesem Namen bildete sich in der Vergangenheit eine ganze Enzymfamilie, die OYE-ähnlichen En-Reduktasen, denen über viele Jahre neue Enzyme mit einer strukturellen Ähnlichkeit zugeordnet wurden.<sup>[181,182]</sup> Im beginnenden 21. Jahrhundert wurde eine neue Klasse flavinmononukleotidabhängiger En-Reduktasen entdeckt. Diese Enzyme, die aus thermophilen Organismen isoliert wurden, unterscheiden sich in der Struktur deutlich von den OYE-ähnlichen En-Reduktasen und werden als thermophile En-Reduktasen bezeichnet.<sup>[182–186]</sup> Neben diesen zwei flavinmononukleotidabhängigen En-Reduktase-Klassen, den OYE-ähnlichen und den thermophilen En-Reduktasen konnte eine dritte Klasse, die der *non-OYE* En-Reduktasen gefunden werden. Diese Klasse der En-Reduktasen zeichnet sich durch das Fehlen des für die anderen beiden Klassen essentiellen Cofaktors Flavinmononukleotid aus.<sup>[187–189]</sup>

Da im Rahmen dieser Arbeit eine En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (Gox-ER) verwendet wurde und diese zu der Gruppe der OYE-ähnlichen En-Reduktasen gehört, wird diese Enzymklasse im Folgenden näher beschrieben.<sup>[190–194]</sup> Im Organismus *Gluconobacter oxydans* wurde 1979 die erste En-Reduktase der OYE-ähnlichen gefunden, die nicht aus Hefezellen gewonnen werden konnte.<sup>[194]</sup> Die Gox-En-Reduktase ist ein NADPH (**103**)-abhängiges Enzym, das Aktivität für die Reduktion elektronenarmer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen eines breiten Substratspektrums zeigt.<sup>[190,191,195]</sup> So sind in der Literatur Beispiele zur Reduktion von Doppelbindungen in Nachbarschaft zu Aldehyden, Ketonen, Nitroverbindungen, Carbonsäuren und Kombinationen aus Carbonsäure und Nitril bzw. Carbonsäureester und Nitril beschrieben.<sup>[177,190,195,196]</sup>

En-Reduktasen katalysieren die Reduktion von elektronenarmen Alkenen unter Verbrauch von NADPH (**103**) nach dem bi-bi ping-pong Mechanismus (Abbildung 4–11). Das bedeutet, dass das Substrat und NADPH (**103**) nicht gleichzeitig, sondern nacheinander in der aktiven Tasche des Enzyms gebunden werden.<sup>[182,197,198]</sup> Daher ist es möglich, den Katalysezyklus in zwei Halbreaktionen aufzuteilen. Die reduktive und die oxidative Halbreaktion können dabei getrennt voneinander betrachtet werden.<sup>[182,197,199]</sup> In der reduktiven Halbreaktion wird das im Enzym gebundene oxidierte Flavinmononukleotid (**104**) vom hydridischen Wasserstoff des Cofaktors NADPH (**103**) am Stickstoffatom des zentralen Ringes angegriffen. Nach intramolekularer Umlagerung wird das reduzierte Flavinmononukleotid (**105**) erhalten und der oxidierte Cofaktor NADP<sup>+</sup> (**106**) verlässt die aktive Tasche des Enzyms. Im nächsten Schritt,

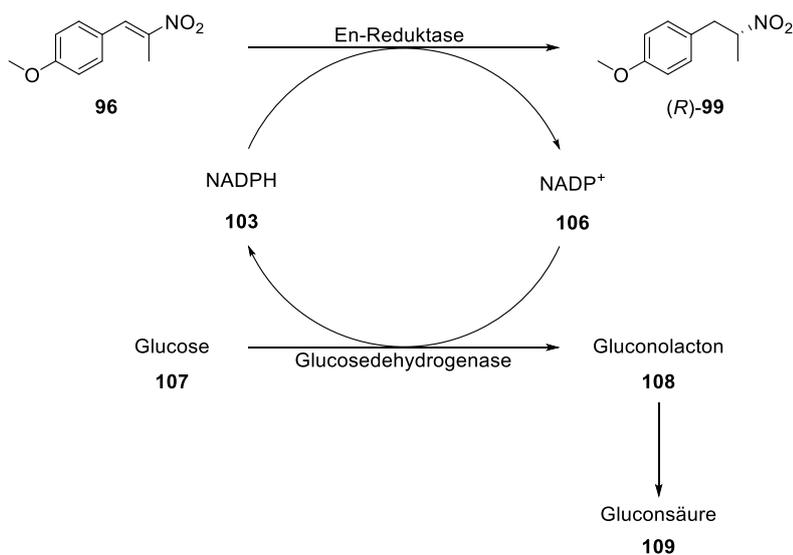
der oxidativen Halbreaktion, ersetzt ein elektronenarmes Alken den freien Platz in der aktiven Tasche. Dabei wird es von dem hydridischen Wasserstoffion am Stickstoffatom des zentralen Ringes der reduzierten Form des Flavinmononukleotids (**105**) in  $\beta$ -Position zur elektronenziehenden Gruppe angegriffen. Das entstehende Anion wird entweder in einem zweiten Schritt oder konzertiert von einem Tyrosinrest aus der aktiven Tasche protoniert.<sup>[199]</sup> Die reduzierte Spezies verlässt die aktive Tasche, sodass der reduzierte Cofaktor **103** den Zyklus erneut beginnt.<sup>[182,197,199]</sup>



**Abbildung 4-11:** Katalysezyklus der En-Reduktasen der OYE-ähnlichen Enzymklasse.<sup>[182,197,199]</sup>

Ein wiederkehrendes Strukturmuster der aktiven Tasche der OYE-ähnlichen En-Reduktasen stellt eine Kombination aus zwei Wasserstoffbrücken, einer Donorseitenkette und einer Brønsted-Säure dar. Die beiden Wasserstoffbrückendonatoren, die in der Regel Histidin- bzw. Asparaginseitenketten sind, dienen zur Ausrichtung des Alkens über eine Komplexierung.<sup>[198]</sup> Die Brønsted-Säure ist in den meisten Fällen ein Tyrosinrest. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Austausch der aciden Seitenkette gegen einen Phenylalaninrest die Aktivität für die reduktive Halbreaktion kaum beeinflusst, jedoch die Geschwindigkeit der oxidativen Halbreaktion um sechs Größenordnungen verringert wird.<sup>[199]</sup> Als Cofaktor für die Verwendung von En-Reduktasen wird NADPH (**103**) in stöchiometrischen Mengen benötigt. Da der Cofaktor teuer ist und somit die Nutzung von En-Reduktasen ökonomisch unattraktiv macht, ist die Verwendung einer Cofaktorregenerierung notwendig. Für die Cofaktorregenerierung

von NADP<sup>+</sup> (**106**) ist die Verwendung verschiedener Systeme denkbar. Eine klassische Variante ist die Nutzung einer Alkoholdehydrogenase. In diesem Fall wird ein Alkohol als Reduktionsmittel verwendet, der zum entsprechenden Keton oxidiert wird. Nachteilig ist, dass ohne eine Entfernung das entsprechende Keton in der Reaktionsmischung verbleibt und somit das Gleichgewicht der Reaktion nicht auf die Seite der Produkte verschiebt.<sup>[138,200]</sup> Bei der Verwendung einer Formiatdehydrogenase wird Formiat zugegeben und von dieser zu Kohlenstoffdioxid oxidiert, während der Cofaktor reduziert wird. Ein Vorteil gegenüber dem Regenerierungssystem mit der Alkoholdehydrogenase ist das gasförmige Nebenprodukt Kohlenstoffdioxid, das aus der Reaktionsmischung entweicht und somit das Gleichgewicht zugunsten der Produktseite verschiebt.<sup>[138,200]</sup> In dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren wird eine Glucosedehydrogenase verwendet. Dieses Enzym oxidiert Glucose (**107**) zu Gluconolacton (**108**) und reduziert dabei den oxidierten Cofaktor **106** zu der benötigten reduzierten Form **103** (Abbildung 4–12).<sup>[138,200]</sup>



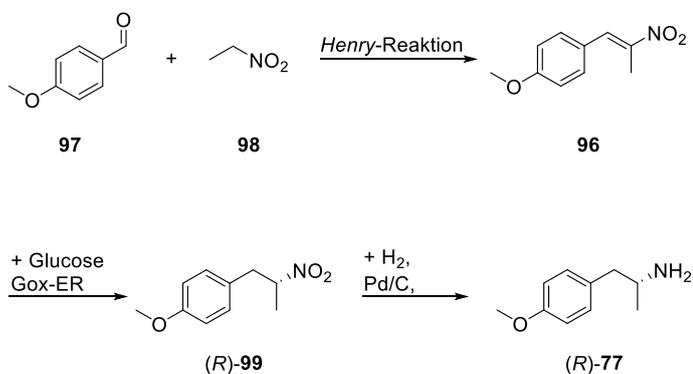
**Abbildung 4–12:** Cofaktorregenerierung unter Verwendung einer Glucosedehydrogenase.<sup>[138,200]</sup>

Das gebildete Gluconolacton (**108**) wird im wässrigen Reaktionsmedium zu Gluconsäure (**109**) hydrolysiert und im leicht basischen Reaktionsmedium deprotoniert. Dieser irreversible Reaktionsschritt verschiebt das Gleichgewicht beider Reaktionen auf die Seite des Produkts (**(R)-99**), was sich günstig auf den Umsatz der Reaktion auswirkt.<sup>[138,200]</sup> Die Glucose ist dabei ein sehr attraktives Reduktionsmittel, da sie kostengünstig ist und in großen Mengen zur Verfügung steht. Da die entstehende Gluconsäure außerdem gut abtrennbar ist, gibt es eine Vielzahl an Beispielen für die Verwendung der Glucosedehydrogenase zur

Cofaktorregenerierung.<sup>[138,200]</sup> Die meisten dieser Beispiele befassen sich dabei mit der Cofaktorregenerierung bei Reduktionsreaktionen unter Verwendung von Alkoholdehydrogenasen.<sup>[201–204]</sup> Jedoch sind auch mehrere Beispiele für die Verwendung von En-Reduktasen und Glucosedehydrogenasen zur Cofaktorregenerierung bekannt.<sup>[190,196,200]</sup>

## 4.2. Motivation und Zielsetzung

Alle hier vorgestellten Verfahren für die Synthese von Tamsulosin ((*R*)-**78**) sind abfallintensive Prozesse. Speziell der Schlüsselschritt, mit dem die chirale Information in das Molekül implementiert wird, ist aufgrund der Verwendung von chiralen Hilfsreagenzien oder der Durchführung einer Racematspaltung zumeist nachteilig. Das Ziel dieses Teils der Arbeit ist die Entwicklung eines Verfahrens zur ökonomisch und ökologisch attraktiven Herstellung von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) (Abbildung 4–13) als *Precursor* für Tamsulosin ((*R*)-**78**). Dafür soll aus den einfachen Synthesebausteinen Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**) in einer *Henry*-Reaktion 1-(4-Methoxy)-2-Nitropropen (**96**) hergestellt werden. Im nächsten Reaktionsschritt soll unter Verwendung der Gox-En-Reduktase das entstandene Produkt der *Henry*-Reaktion **96** zum (*R*)-1-(4-Methoxy)-2-Nitropropan ((*R*)-**99**) umgesetzt werden. Dieser Schritt soll stereoselektiv erfolgen und ist somit der Schlüsselschritt der geplanten Syntheseroute. In einem abschließenden Reaktionsschritt soll das entstandene (*R*)-**99** in einer weiteren Reduktionsreaktion unter Verwendung von Palladium und Aktivkohle mit elementarem Wasserstoff zum Zielprodukt (*R*)-**77** umgesetzt werden. Die Verwendung von Wasserstoff als Reduktionsmittel ist besonders attraktiv, da dieser kostengünstig ist und als Abfallprodukt nur Wasser entsteht.



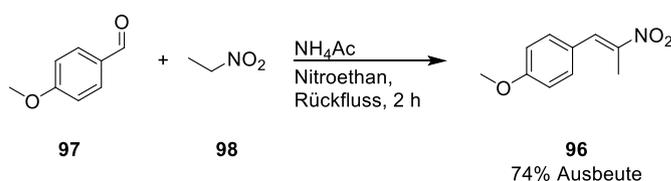
**Abbildung 4–13:** Geplante Syntheseroute für die Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) ausgehend von Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**).

Diese Synthesestrategie wurde bereits von *Reß* untersucht, wo jedoch aufgrund verschiedener Probleme kein robuster Prozess etabliert werden konnte. Bei den vorherigen Untersuchungen zeigte die Gox-En-Reduktase einen schlechten Umsatz von 30% bei einem Enantiomerenüberschuss von 66%.<sup>[177,205]</sup> *Reß* nutzte im Folgenden eine En-Reduktase aus *Methylobacterium extorquens* und konnte bei einer Substratkonzentration von 20 mM mit dieser En-Reduktase einen Enantiomerenüberschuss von 89% bei einer Ausbeute von 85% erhalten.<sup>[205]</sup> Bei der Untersuchung der Reduktion der Nitrofunktion konnte jedoch nur eine geringe Ausbeute von 35% erzielt werden, da als Nebenprodukte die Nitrosoverbindung 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan (**110**) und deren beide Tautomere 1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim (**111**) isoliert werden können.<sup>[205]</sup> Diese Nebenprodukte deuten auf eine unvollständige Reduktion hin. Ziel dieser Arbeit ist somit, ausgehend von den Vorergebnissen, einen Prozess zu entwickeln, bei dem bei möglichst hoher Substratbeladung 1-(4-Methoxy)-2-Nitropropen (**96**) unter Verwendung der Gox-En-Reduktase stereoselektiv reduziert werden kann. Im Weiteren soll die Reduktion von (*R*)-1-(4-Methoxy)-2-Nitropropan ((*R*)-**99**) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle optimiert werden.

## 4.3. Ergebnisse und Diskussion

### 4.3.1. Synthese von Substrat und Referenzsubstanzen

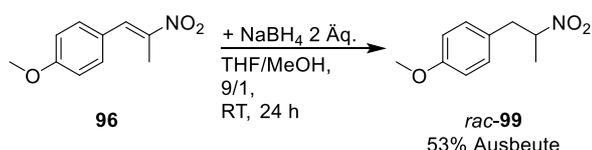
Im ersten Schritt wird das Substrat **96** aus den Ausgangsstoffen Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**) in einer ammoniumacetatkatalysierten *Henry*-Reaktion dargestellt (Abbildung 4–14).<sup>[174]</sup> Am Ende der Reaktion werden die flüchtigen Bestandteile der Reaktionsmischung im Vakuum entfernt. Das Produkt **96** kann nach Kristallisation aus Ethanol mit einer Ausbeute von 74% erhalten werden.



**Abbildung 4–14:** Substratsynthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) in einer *Henry*-Reaktion ausgehend von Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**).<sup>[174]</sup>

Der Verzicht auf umfangreiche Reinigungsschritte erlaubt somit unter nicht optimierten Bedingungen eine ökonomisch attraktive Substratsynthese mit akzeptabler Ausbeute. Diese

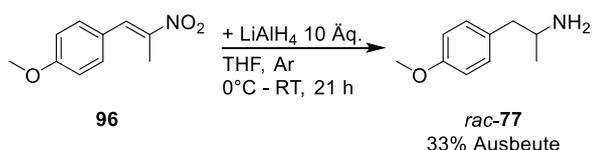
wird im Folgenden nicht weiter optimiert, da die Reduktion der entstehenden Doppelbindung als Schlüsselschritt der Syntheseroute betrachtet wird. Für die Etablierung einer Analytik zur Umsatzbestimmung und für die Bestimmung der Stereoselektivität der beiden anschließend geplanten Synthesen ist es wichtig, die beiden Produkte *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) und *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-**77**) zu synthetisieren. Im ersten Reaktionsschritt wird dafür das vorhandene Substrat **96** mit Natriumborhydrid reduziert (Abbildung 4–15). Bei dieser Reduktion wird selektiv die Doppelbindung hydriert, während die Nitrofunktion unangetastet bleibt.



**Abbildung 4–15:** Referenzsynthese von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**96**) über eine Reduktion mit Natriumborhydrid.

Das Produkt *rac*-**99** kann mit einer Ausbeute von 53% erhalten werden. Diese Ausbeute ist für diesen Reaktionstyp gering, jedoch ist die erhaltene Menge ausreichend, um die gewünschte HPLC-Analytik für die Bestimmung der Stereoselektivität zu etablieren. Für die Analytik zur Umsatzbestimmung der geplanten Biotransformation wird eine <sup>1</sup>H-NMR-Analytik etabliert.

Für die Synthese des Racemats von 4-Methoxyamphetamin (*rac*-**77**) wird die ungesättigte Nitroverbindung **96** mit Lithiumaluminiumhydrid umgesetzt (Abbildung 4–16). Im Gegensatz zu Natriumborhydrid wird in dieser Reaktion neben der Doppelbindung auch die Nitrogruppe reduziert. Das Produkt *rac*-**77** kann mit einer für diesen Reaktionstyp geringen Ausbeute von 33% erhalten werden. Jedoch war auch in diesem Fall genug Produkt vorhanden, um eine <sup>1</sup>H-NMR-Analytik für die Bestimmung des Umsatzes und eine HPLC-Analytik für die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses zu etablieren.

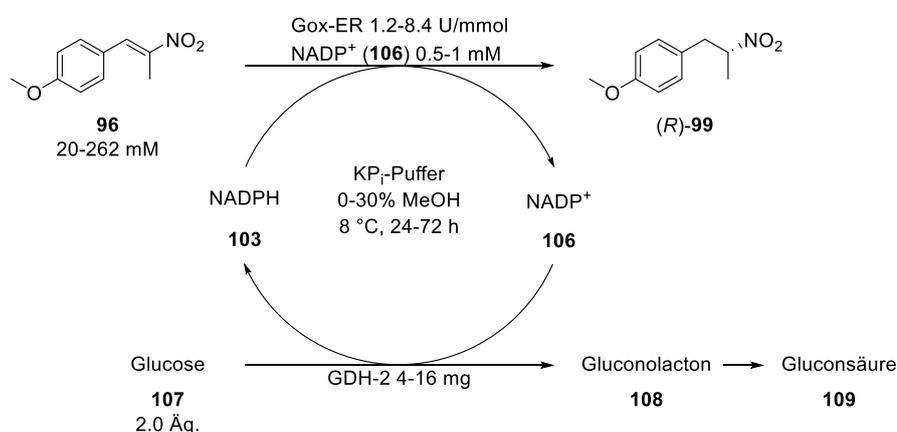


**Abbildung 4–16:** Referenzsynthese von *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-**77**) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**96**) über eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid.

### 4.3.2. Biokatalytische Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**)

Zunächst soll die Konzentration des Substrats **96** in mehreren Schritten unter Bestimmung des Umsatzes und der Enantioselektivität der Reaktion erhöht werden. Die Reaktionsmischung wird während der Reaktion über ein Reaktionsgefäß mit Kühlmantel auf einer Temperatur von 8 °C gehalten, um eine Racemisierung des Produktes zu verhindern. Durch permanente Überwachung und Einstellung des pH-Wertes mittels automatischer Titration mit Natronlauge kann der Reaktionsverlauf beobachtet werden. Es wird in einer Startreaktion in einem Volumen von 50 mL mit einer Ausgangskonzentration von 19.6 mM Substrat **96** begonnen. Die Aktivität der Gox-En-Reduktase wird photometrisch über den Verbrauch an NADPH mit gesättigter Substratlösung bestimmt. Unter Verwendung der Gox-ER mit einer Aktivität von 8.4 U/mmol und einer Cofaktorregenerierung mit GDH-2 von *Amano* und zwei Äquivalenten Glucose kann nach 44 Stunden mit einem Reaktionsvolumen von 50 mL ein quantitativer Umsatz erzielt werden. Der Enantiomerenüberschuss von (*R*)-**99** liegt bei 90% (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1:** Untersuchung der Biotransformation für die enzymatische Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).



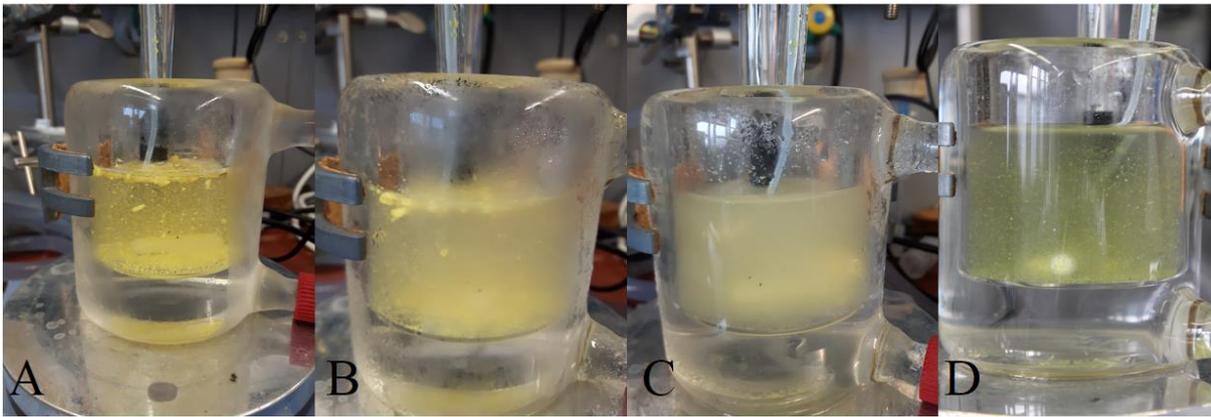
Eintrag	[ <b>96</b> ] [mM]	Aktivität Gox-ER [U/mmol]	m(GDH-2) [mg/mmol]	t [h]	Umsatz [%]	<i>ee</i> (( <i>R</i> )- <b>99</b> ) [%]
1	19.6	8.4	4.2	44	100	90
2 <sup>[a]</sup>	40.1	4.0	2.0	24	77	n.b.
3	40.2	4.1	2.0	48	93	95
4	136	2.4	1.2	48	92	95
5 <sup>[b]</sup>	262	1.2	1.3	72	83	n.b.

[a] 30% MeOH als Cosolvens, [b] doppelte Menge **106**. n.b.: nicht bestimmt.

Die Erhöhung der Substratkonzentration auf den doppelten Wert ist in Eintrag 2 und 3 in Tabelle 4-1 zu sehen. Dabei sinkt die Aktivität der Gox-ER auf ca. 4 U/mmol und die Menge an GDH-2 auf 2 mg/mmol. Die beiden Einträge unterscheiden sich darin, dass bei Eintrag 2 30% Methanol als Cosolvens verwendet und die Reaktion nach 24 Stunden beendet wurde, während Eintrag 3 48 Stunden ohne Cosolvens reagierte. Es kann in der kürzeren Variante ein Umsatz von 77% erzielt werden, wohingegen bei der zweitägigen Reaktion ohne Cosolvens ein Umsatz von 93% und ein Enantiomerenüberschuss von 95% erhalten werden. Diese Werte sind sehr zufriedenstellend, sodass die Substratmenge weiter erhöht wird.

Da die Verwendung von Methanol als Cosolvens nur eine geringfügige Verbesserung des Umsatzes zur Folge hat und die Reaktion auch ohne Cosolvens gut verläuft, wird dieses im Folgenden nicht weiterverfolgt. Stattdessen wird die Substratkonzentration von 40 mM auf 136 mM erhöht, wobei gleichzeitig die Mengen an Gox-En-Reduktase und Glucosedehydrogenase verdoppelt werden. Unter diesen Bedingungen konnte erneut das Produkt (*R*)-**99** mit einem Umsatz von 92% und einem Enantiomerenüberschuss von 95% erhalten werden. Nach einer weiteren Verdopplung der Substratkonzentration auf ca. 260 mM konnte nur ein Umsatz von 83% nach einer verlängerten Reaktionszeit von 72 Stunden erzielt werden. Der Enantiomerenüberschuss wurde bei dieser Reaktion nicht weiter bestimmt.

Bei Betrachtung der Reaktionsmischung (Abbildung 4–17) fällt die geringe Löslichkeit von Substrat **96** und Produkt (*R*)-**99** auf. Bild A zeigt die Reaktionsmischung zum Reaktionsstart, in dem die Suspension von Feststoff **96** in der Reaktionsmischung beobachtbar ist. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden in Bild B sind weiterhin deutliche Mengen an Feststoff beobachtbar, jedoch trübt der flüssige Teil der Suspension langsam ein, was auf eine Emulsion von Produkt (*R*)-**99** und der Reaktionsmischung hindeutet. In Bild C ist gut zu sehen, dass die Emulsion trüber geworden ist und nur noch geringe Mengen an Feststoff zu sehen sind. Dieser Feststoff entspricht von der Konsistenz aber eher einem Gel, was in der Reaktionsmischung bei Kontakt mit dem Rührfisch deutlich zu sehen war. Dies deutet darauf hin, dass Substrat **96** und Produkt (*R*)-**99** eine gemeinsame organische Phase bilden. In Bild D sind zwei flüssige Phasen zu erkennen, die wässrige Phase der Reaktion und die organische Phase am Boden bestehend aus Produkt (*R*)-**99** und Resten des Substrats **96**.



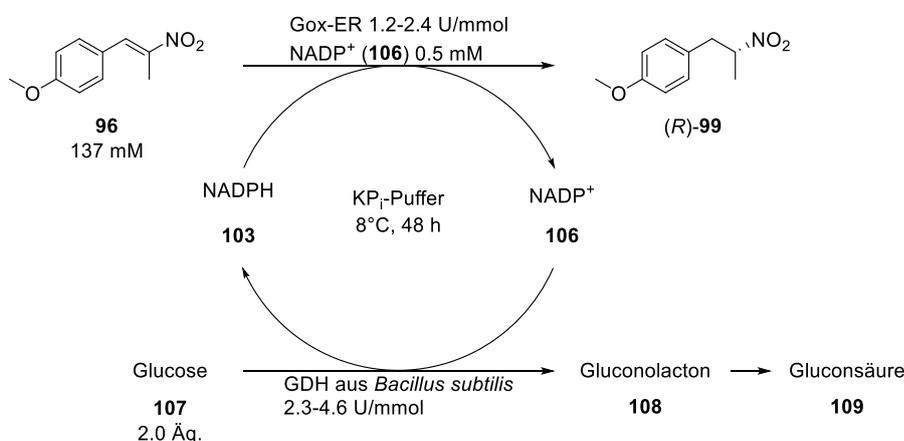
**Abbildung 4-17:** Verlauf der Reaktion (Eintrag 4 in Tabelle 4-1) anhand Fotos der Reaktionslösung vor dem Start der Reaktion (Bild A), nach drei Stunden (Bild B), nach 20 Stunden (Bild C) und nach 44 Stunden (Bild D).

Fraglich bleibt, warum die Reaktion nicht vollständig abläuft, sondern bei einem Umsatz von etwas über 90% endet. Dies kann mehrere Gründe haben. Ein möglicher Grund ist ein Aktivitätsverlust des Enzyms aufgrund der langen Reaktionszeit, was zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. Da die Reaktion jedoch bei einer geringen Temperatur stattfindet und aufgrund der geringen Löslichkeit von Substrat **96** und Produkt (*R*)-**99** die Belastung des Enzyms nur gering ist, wird dieser Faktor zunächst als zweitrangig bewertet. Eine weitere Möglichkeit ist eine Substrat- oder Produktinhibierung. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Substrat **96** und Produkt (*R*)-**99**, die die Sättigungsgrenze bereits deutlich früher erreichen, ist diese Erklärung ebenfalls eher unwahrscheinlich. Die dritte mögliche Erklärung ist ein Diffusionsproblem. Aufgrund der hohen Löslichkeit des Substrates **96** im Produkt (*R*)-**99** könnte ein Diffusionsproblem die Reaktion gegen Ende der Reaktionszeit verlangsamen bzw. ganz beenden. Dabei würde sich das Substrat **96** in der organischen Phase aus (*R*)-**99** lösen und somit die Konzentration in der wässrigen Phase deutlich absenken.

Die Reaktion mit 137 mM Substratkonzentration wird noch zweimal wiederholt, wobei die Menge der Enzyme im ersten der beiden Ansätze halbiert wird. Es wird dabei eine andere Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* verwendet (Tabelle 4-2). Diese Glucosedehydrogenase ist im Arbeitskreis als rekombinantes Enzym verfügbar. Die Verwendung eines rekombinanten Enzyms ist aus ökonomischer Sicht attraktiv, da dieses mit einfachen Mitteln hergestellt werden kann und somit die Nutzung eines kommerziellen, teureren Enzyms vermieden wird.

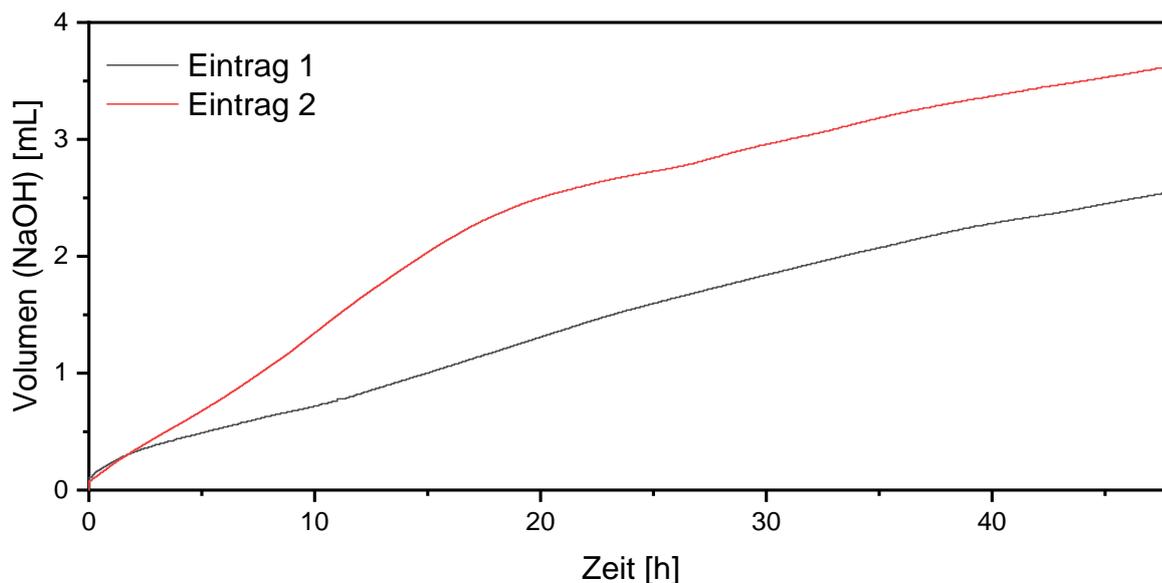
Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in Tabelle 4-2 zu sehen. Es wird deutlich, dass die halbe Enzymmenge nicht ausreichend ist, um einen hohen Umsatz (64%) zu erzielen. Die Reaktion weist mit einem Enantiomerenüberschuss von 92% für das (*R*)-Enantiomer (*R*)-**99** eine hohe Enantioselektivität auf. Mit der ursprünglichen Enzymmenge wird das Ergebnis der Reaktion mit der GDH-2 reproduziert. Es wird bei einem leicht höheren Umsatz von 93% ein etwas geringerer Enantiomerenüberschuss von ebenfalls 93% für das (*R*)-Enantiomer (*R*)-**99** erhalten.

**Tabelle 4-2:** Biotransformation der enzymatischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) unter Verwendung der GDH aus *Bacillus subtilis*.



Eintrag	[ <b>96</b> ] [mM]	Aktivität Gox-ER [U/mmol]	m(GDH) [mg/mmol]	Umsatz [%]	<i>ee</i> (( <i>R</i> )- <b>99</b> ) [%]
1	167	1.2	2.3	64	92
2	167	2.4	4.6	93	93

Der Verlauf der Biotransformationen kann über den Verbrauch der Natronlauge abgeschätzt werden. Wird der Verbrauch der Natronlauge der Biotransformationen aus Tabelle 4-2 betrachtet wird deutlich, dass die Reaktion mit der doppelten Enzymmenge im Anfangsbereich der Reaktion ungefähr doppelt so schnell verläuft (Abbildung 4-18). Nach ca. 17 Stunden sinkt die Zugabegeschwindigkeit deutlich ab. Bei der Reaktion mit halber Enzymmenge (Eintrag 1) ist das nicht der Fall.

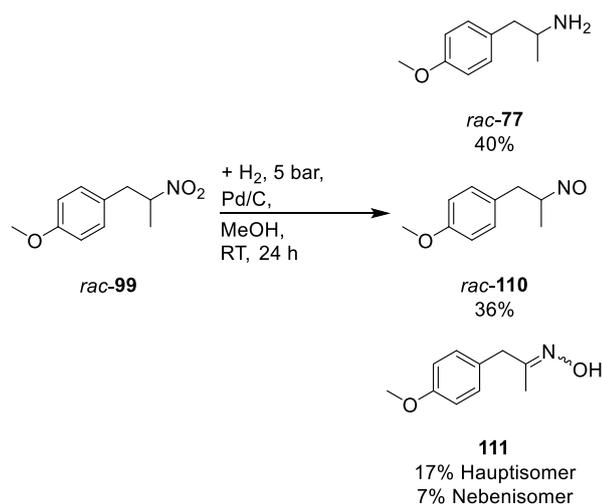


**Abbildung 4–18:** Zugabe der Natronlauge im Verlauf der in Tabelle 4-2 dargestellten Biotransformationen.

Diese Ergebnisse sprechen gegen ein Stabilitätsproblem, sowohl bei der Gox-En-Reduktase als auch bei der verwendeten GDH, da sonst auch die Reaktion mit halber Enzymmenge in diesem Bereich deutlich langsamer werden müsste. Es liegt also wahrscheinlich ein Diffusionsproblem aufgrund der Bildung der zweiten flüssigen Phase vor.

### 4.3.3. Hydrierung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**99**) mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle

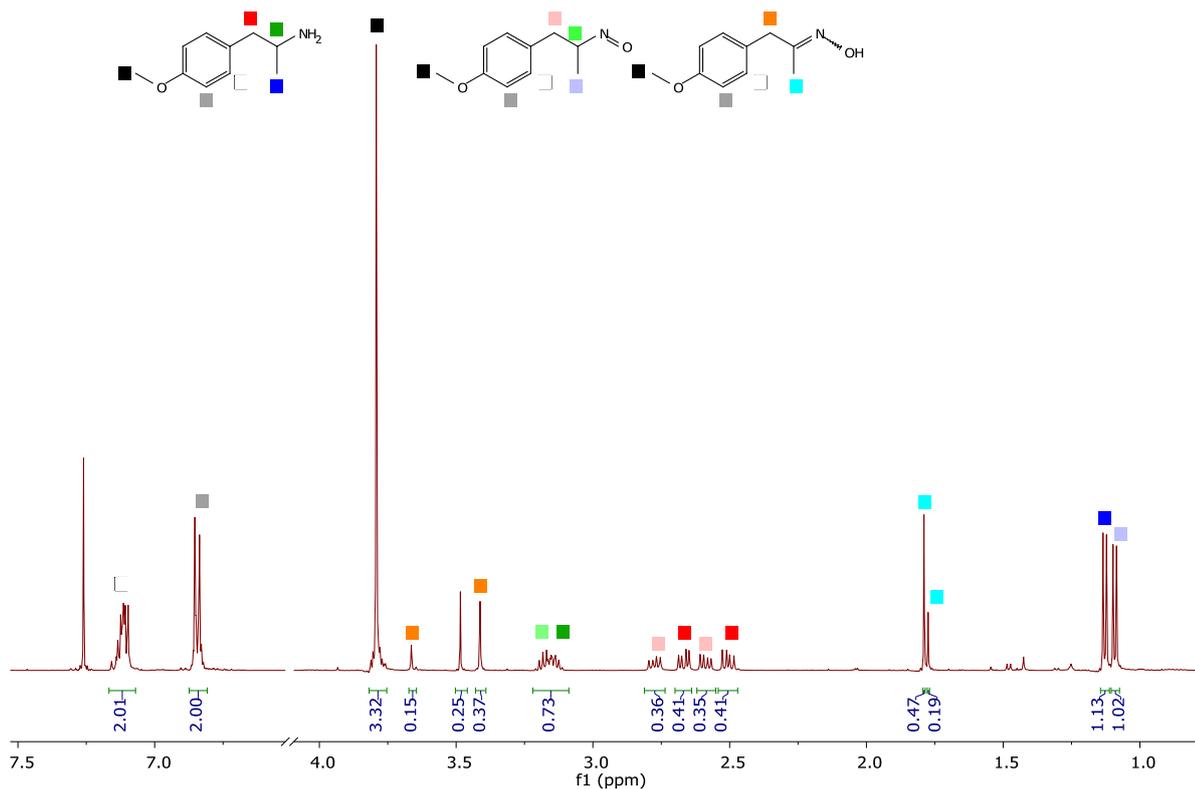
Für einleitende Versuche zur Hydrierung von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) wird auf Vorarbeiten von *Reß* zurückgegriffen.<sup>[205]</sup> Dabei wird die Nitroverbindung *rac*-**99** mit einer Konzentration von 10 mM in Methanol gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle versetzt. Unter einer Atmosphäre von 5 bar Wasserstoff wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abbildung 4–19). Verglichen mit der Vorarbeit von *Reß* entspricht das dem doppelten Druck. Nach Filtration zur Entfernung der Aktivkohle und Entfernen des Lösungsmittels vom Filtrat wird ein Rückstand erhalten, der mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht wird. Es konnte ermittelt werden, dass kein Edukt (*R*)-**99** mehr im Rückstand vorhanden ist. Neben dem gewünschten Produkt *rac*-**77**, das zu 40% aus der Nitroverbindung entstanden ist, sind eine Nitroverbindung *rac*-**110** zu 36% und zwei Isomere einer Oximverbindung **111** mit 17% und 7% gebildet worden. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von *Reß*, die ebenfalls diese Nebenproduktbildung beobachten konnte.



**Abbildung 4–19:** Hydrierung von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99) bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar.

Bei der Betrachtung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums können die Signale den Nebenprodukten und einer Verunreinigung von restlichem Methanol zugeordnet werden (Abbildung 4–20). Während die Signale der Methoxyfunktion (schwarze Markierung) und der Protonen in *ortho*-Position (graue Markierung) jeweils ein gemeinsames Signal im Spektrum liefern, ist bereits das Signal der Protonen in *meta*-Position (weiße Markierung) als Überlagerung der Signale zu erkennen. Eine deutliche Unterscheidung ist am ehemaligen  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Nitrogruppe möglich. Während die beiden Isomere **111** kein Proton an dieser Position aufweisen, erzeugen die jeweiligen Protonen des Produkts *rac*-77 (dunkelgrüne Markierung) und der Nitrosoverbindung *rac*-110 (hellgrüne Markierung) sich teilweise überlagernde Multipletts im Bereich von 3.2 ppm. Die fehlenden Protonen an der ehemaligen  $\alpha$ -Position der Oximverbindung **111** erzeugen deutlich unterschiedliche Signale für die Protonen in Benzylstellung und in der Methylgruppe. Aufgrund der benachbarten Oximfunktion sind diese Protonen jeweils deutlich tieffeldverschoben. Während die Protonen der Methylgruppe von Produkt *rac*-77 (dunkelblaue Markierung) und Nitrosoverbindung *rac*-110 (violette Markierung) zwei Dubletts mit nahezu identischer Verschiebung um 1.1 ppm erzeugen, können den beiden Isomeren von **111** (türkise Markierung) aufgrund des Mangels an Kopplungspartnern jeweils Singulets bei ca. 1.8 ppm zugeordnet werden. Ähnlich ist das für die Protonen in Benzylstellung. Während die beiden Isomere der Oximverbindung **111** (orange Markierung) zwei Singulets bei 3.4 und 3.7 ppm erzeugen, wird für die gleichen Protonen des Produkts *rac*-77 (rote Markierung) und der Nitrosoverbindung *rac*-110 (rosa Markierung) jeweils ein komplexeres Muster erhalten. Dies resultiert zum einen in der Kopplung mit den vorhandenen Protonen in  $\alpha$ -Position zur Amino- bzw. Nitroso-Gruppe, als auch in dem an diesem Kohlenstoffatom vorhandenen

Stereozentrum. Aufgrund dieses Stereozentrums sind die Protonen in Benzylstellung diastereotop und erzeugen somit eine weite  $^2J$ -Kopplung untereinander. Diese beiden Signalsätze sind im Vergleich zu den entsprechenden Signalen der Oximisomere **111** um ungefähr 1 ppm ins Hochfeld verschoben. Eine genaue Unterscheidung des Produkts *rac*-**77** und der Nebenprodukte *rac*-**110** und Haupt- bzw. Nebenisomer von **111** ist somit möglich.

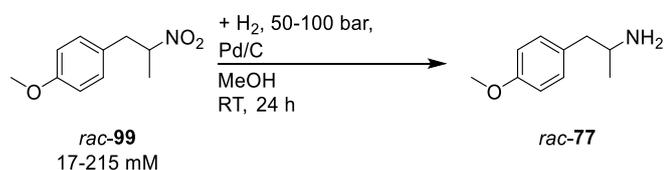


**Abbildung 4–20:** Ausschnitte des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Hydrierung von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar.

Da alle Nebenprodukte, sowohl die Nitrosoverbindung *rac*-**110** als auch die Isomere **111**, Tautomere zueinander sind, können diese als eine Gruppe von Nebenprodukten gezählt werden. Da diese Nebenprodukte weiterhin eine Stickstoff-Sauerstoff-Funktion aufweisen, handelt es sich dabei um Produkte einer unvollständigen Reduktion. Um die Triebkraft der Reaktion zu erhöhen, ist der nächste Schritt eine Steigerung des Wasserstoffdrucks. Neben diesem soll auch eine Erhöhung der Konzentration untersucht werden. Da für die Hochdruckreaktionen über 5 bar spezielle Autoklaven eingesetzt werden, wird das Reaktionsvolumen reduziert, sodass die Konzentration erhöht wird.

Die Reaktion wird in einem Maßstab von 30 mL mit einer Eduktkonzentration von 17 mM mit Drücken von 50 bar und 100 bar wiederholt. Die Konzentration wird ebenfalls auf 215 mM erhöht, sodass die Menge des Edukts *rac-99* der entspricht, die bei einer Biotransformation von **96** als Produkt erhalten wird. Die Menge an Palladium auf Aktivkohle wird konstant auf 25% der Masse des Edukts gehalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 dargestellt. Zum Vergleich ist als Eintrag 4 ebenfalls das Resultat der Reaktion bei 5 bar Wasserstoffdruck aufgelistet. Beim Vergleich mit den Einträgen 1 und 2 wird deutlich, dass eine Erhöhung des Drucks zu einem höheren Anteil an Produkt *rac-77* führt. Während bei 50 bar bereits 86% des Edukts *rac-99* zum gewünschten Produkt *rac-77* umgesetzt werden, sind es bei einem Druck von 100 bar schon 97%. Erfreulicherweise konnte eine Erhöhung der Eduktkonzentration bei 50 bar Wasserstoff einen identischen produktbezogenen Umsatz liefern. Dies bedeutet, dass die erhaltene Reaktionsmischung der Biotransformation nach Extraktion und Entfernen des Lösungsmittels in Methanol gelöst und direkt weiter umgesetzt werden kann.

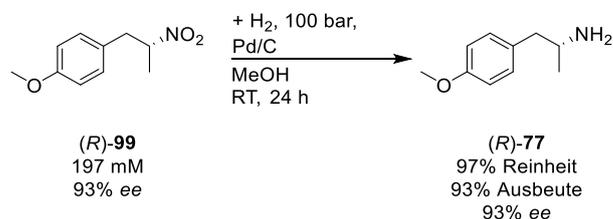
**Tabelle 4-3:** Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac-99*) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei verschiedenen Bedingungen.



Eintrag	[99] [mmol]	p(H <sub>2</sub> ) [bar]	x( <i>rac-77</i> ) [%]
1	18	50	86
2	17	100	97
3	213	50	86
4	10	5	40

Für die kombinierte Synthese wird der Extrakt der Reaktionsmischung von Eintrag 2 aus Tabelle 4-2 direkt ohne weitere Aufreinigung in Methanol gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle versetzt (Abbildung 4–21). Nach 24 Stunden bei 100 bar Wasserstoffdruck wird filtriert und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) wird mit einer Reinheit von 97% erhalten. Die korrigierte Ausbeute beträgt 93% bei einem Enantiomerenüberschuss von 93%. Dieses Ergebnis stellt einen sehr vielversprechenden Startpunkt für eine weitere Anreicherung der Diastereomere dar, zum Beispiel mittels

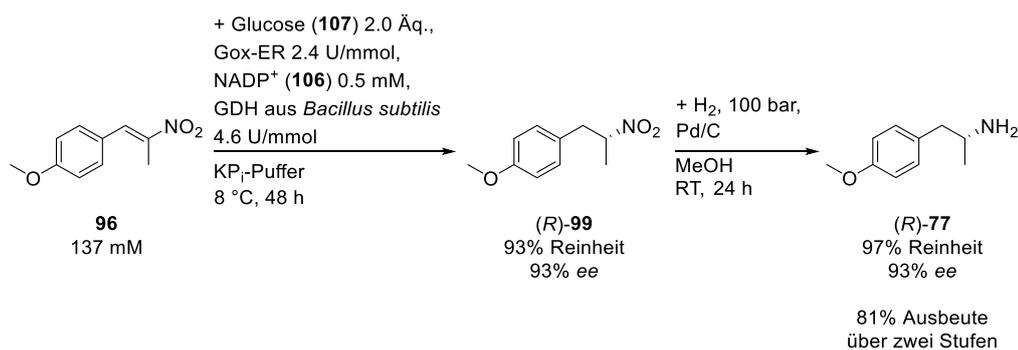
Kristallisation oder der Folgechemie, wo wie bereits in Abbildung 4–4 und Abbildung 4–5 beschrieben der erste Schritt mittels Biokatalyse mit deutlich geringeren Abfallmengen durchgeführt werden kann.<sup>[155,161,163]</sup>



**Abbildung 4–21:** Reduktion von (R)-99 als Produktmischung der Biotransformation unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff zur Synthese von (R)-77.

## 4.4. Zusammenfassung

Ausgehend von den gut zugänglichen Edukten Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**) konnte (R)-4-Methoxyamphetamin ((R)-**77**) hergestellt werden. In einer *Henry*-Reaktion wurde aus diesen beiden Stoffen das eigentliche Ausgangsmaterial 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) hergestellt. Unter Verwendung einer En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* konnte diese ungesättigte Verbindung (R)-**96** bei einer Substratkonzentration von 137 mM stereoselektiv reduziert werden. Dabei wurden ein Umsatz von 94% und ein Enantiomerenüberschuss von 93% erreicht. Die Aufarbeitung beinhaltet dabei nur einen Extraktionsschritt und das anschließende Entfernen des Extraktionsmittels. Der erhaltene Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung in Methanol gelöst und mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse reduziert, um (R)-4-Methoxyamphetamin ((R)-**77**) als gewünschtes Produkt mit einem Enantiomerenüberschuss von 93% und einer Reinheit von 97% zu erhalten. Die Gesamtausbeute über beide Stufen beträgt dabei 81%. Bei dieser Stufe wurde als einziger Aufarbeitungsschritt der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Das bedeutet, dass ohne teure Reinigungsschritte (R)-4-Methoxyamphetamin ((R)-**77**) in einer zweistufigen Synthese mit einfachem Solvenswechsel mit einer Reinheit von 97% und einer Gesamtausbeute von 81% dargestellt werden kann (Abbildung 4–22). Da es bisher mit Ausnahme von Racematspaltungen nur wenige stereoselektive Synthesen für (R)-4-Methoxyamphetamin ((R)-**77**) gibt, die jedoch alle Nachteile aufweisen, ist dies ein sehr gutes Ergebnis.



**Abbildung 4–22:** Zweistufige Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).

Während der Etablierung der einzelnen Reaktionsschritte wurde deutlich, dass die biokatalytische Reaktion nur einen Umsatz von 93% liefert. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Enzyme unter diesen Bedingungen keinen deutlichen Aktivitätsverlust innerhalb von 48 Stunden aufweisen, sodass Diffusionsprobleme der wahrscheinlichste Grund dafür sind. Für die Hydrierung konnte die Nebenproduktbildung, die bereits von *Reß* beobachtet wurde, bestätigt werden.<sup>[205]</sup> Die Verwendung eines hohen Drucks von 100 bar Wasserstoff vervollständigt die Reaktion bis auf 97% produktbezogenen Umsatz. Ein noch höherer Druck könnte die Reinheit von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) und damit auch die Ausbeute der Gesamtreaktion weiter erhöhen.



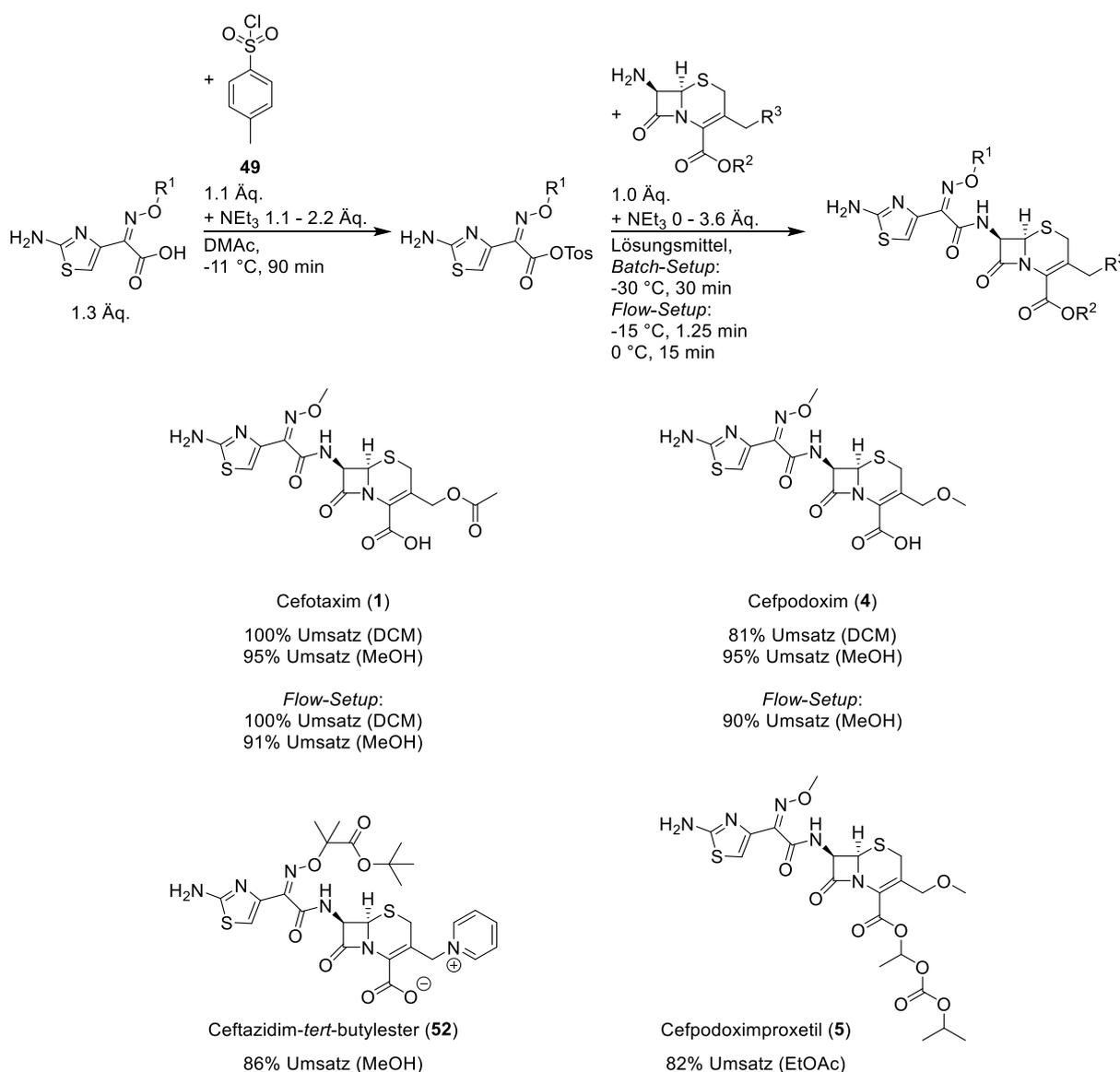
## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Darstellung verschiedener Cephalosporin-Antibiotika, sowie des Precursors von Tamsulosin ((*R*)-**78**), (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**), im Hinblick auf die Möglichkeiten zu deren nachhaltiger Synthese untersucht.

Für die Synthese von Cefotaxim (**1**) wurden verschiedene Kopplungsreagenzien für die Aktivierung der ATMO-Säure (**8**) getestet. Nachdem Carbonyldiimidazol (**32**), verschiedene Phosphorsäureanhydride und 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-methylmorpholiniumchlorid (**45**) keinen größeren Erfolg lieferten, konnte 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) erfolgreich als Kopplungsreagenz für die Synthese von Cefotaxim (**1**) etabliert werden. Für diese Reaktion wird ein gemischtes Anhydrid aus 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) und ATMO-Säure (**8**) hergestellt und zu einer Lösung aus 7-ACA (**3**) gegeben. In einem Lösungsmittel-*Screening* konnte gezeigt werden, dass das Lösungsmittel Dimethylacetamid im ersten Reaktionsschritt nicht ohne deutlichen Verlust an Umsatz ersetzbar ist. Für das Lösungsmittel der Lösung von 7-ACA (**3**) unter Zugabe von Triethylamin konnte neben Dichlormethan Methanol als Alternative ermittelt werden. Bei der Verwendung von Dichlormethan konnte Cefotaxim (**1**) mit einem Umsatz von 100% erhalten werden. Bei Austausch von Dichlormethan gegen das „grünere“ Lösungsmittel Methanol wird ein nahezu quantitativer Umsatz erhalten. Da die Cephalosporin-Antibiotika der dritten und vierten Generation eine große Ähnlichkeit bei der Derivatisierung in 7-Position aufweisen, konnte die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) erfolgreich als Plattformprozess für diese Derivatisierung etabliert werden (Abbildung 5–1). Ohne weitere Optimierungen des Verfahrens konnten dabei Cefpodoxim (**4**), Cefpodoximproxetil (**5**) und Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) erfolgreich über eine Amidierung des jeweiligen  $\beta$ -Lactams in 7-Position mit Umsätzen zwischen 81% und 95% erhalten werden.

Eine geplante Übertragung der Reaktion auf ein Mikroreaktions-*Setup* war aufgrund der geringen Löslichkeit der Edukte nicht möglich, da es zu einer Verstopfung des Mikroreaktors führen würde. Die Reaktion konnte aber erfolgreich in einem einfachen *Flow-Setup* durchgeführt werden, bei dem ein Schlauch mit einem Durchmesser von 4 mm als Reaktor verwendet wurde. Dieses, im Vergleich zu einem Mikroreaktions-*Setup* (<1 mm Durchmesser) deutlich größer dimensionierte *Flow-Setup* ermöglichte die Verwendung von Suspensionen, sollte jedoch auch die Vorteile eines Mikroreaktions-*Setups* in Form der guten

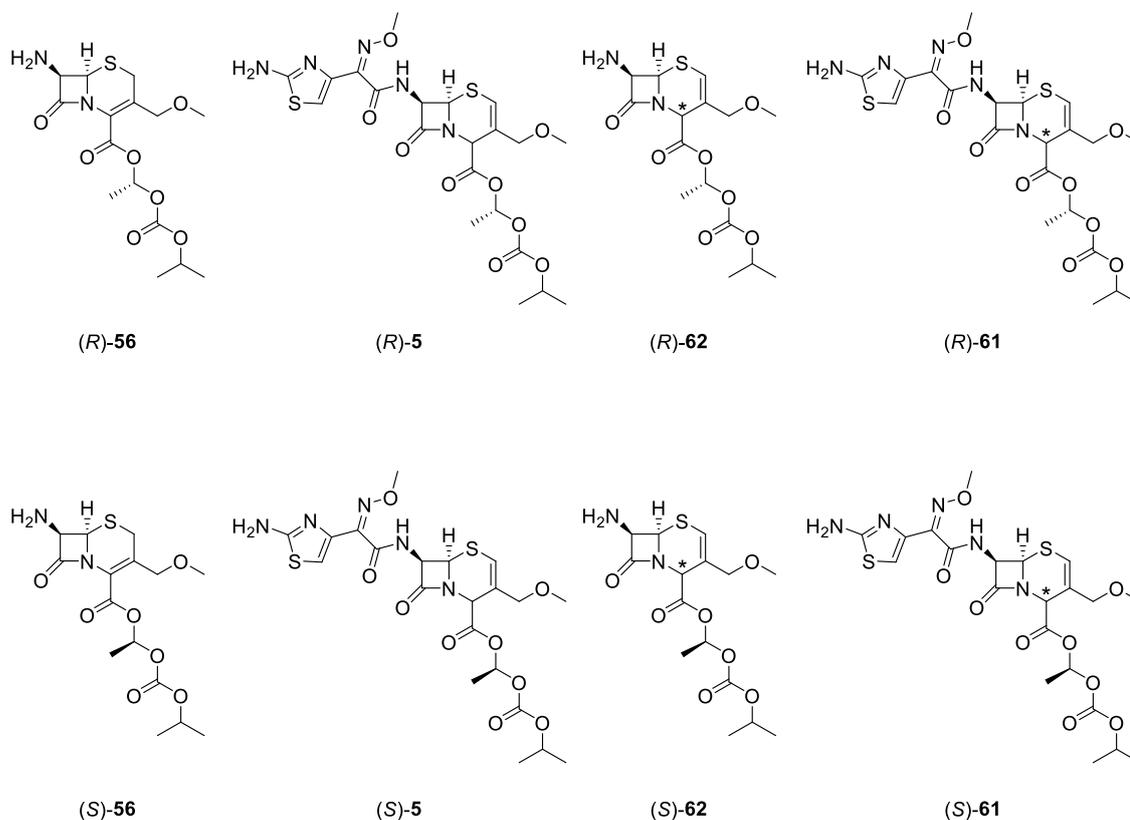
Wärmeübertragung ermöglichen. Im *Flow*-Reaktor konnte für die Bildung von Cefotaxim (1) bei  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 1.25 Minuten und 15 Minuten Nachrühren bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Dichlormethan ein quantitativer und für die Reaktion in Methanol ein hoher Umsatz von 91% erzielt werden. Cefpodoxim (4) konnte unter gleichen Bedingungen in Methanol mit einem ebenfalls zufriedenstellenden Umsatz von 90% gebildet werden.



**Abbildung 5–1:** Beispiele für die Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess.

Neben der Derivatisierung in 7-Position wurde die Verbindung Cefpodoximproxetil (5) genauer untersucht. Aufgrund der chiralen Seitenkette in 4-Position liegt dieses Cephalosporin-Antibiotikum als Diastereomergemisch aus (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-5) und (*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-5) vor. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Diastereomere

der in 7-Position unsubstituierten Vorstufe AMCA-Proxetil (**56**) mittels *Flash*-Chromatographie getrennt werden (Abbildung 5–2). Anschließend konnten die einzelnen Diastereomere von Cefpodoximproxetil (**5**) erfolgreich über eine Amidierung mit MAEM (**18**) dargestellt werden. Für Cefpodoximproxetil (**5**) ist aus regulatorischen Gründen ein Anteil von 50% bis 60% des (*R*)-Diastereomers (*R*-**5**) vorgeschrieben. Daher wurde für AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) getestet, ob das Diastereomerenverhältnis über eine gezielte Hydrolyse des (*S*)-Diastereomers mithilfe einer Hydrolase in Richtung des (*R*)-Diastereomers verschoben werden kann. Dazu wurden 62 verschiedene zur Verfügung stehende kommerzielle Hydrolasen verwendet. Jedoch konnte das Diastereomerenverhältnis von keinem der zur Verfügung stehenden Enzyme in die gewünschte Richtung verschoben werden.

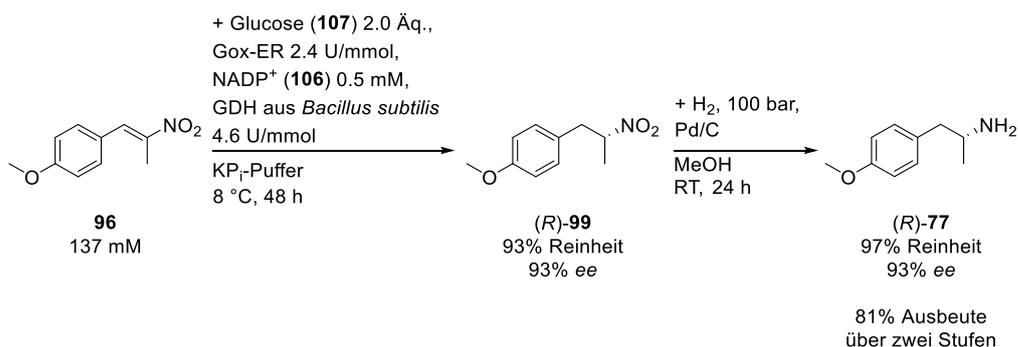


**Abbildung 5–2:** Übersicht der isolierten Diastereomere von AMCA-Proxetil (**56**), Cefpodoximproxetil (**5**),  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) und  $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (**61**).

Daraufhin wurde die  $\Delta$ 2-Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Raumtemperatur und der Zugabe von zehn Äquivalenten Triethylamin das Gleichgewicht bei ca. 62%  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) liegt. Ausgehend von den getrennten Diastereomeren von AMCA-Proxetil (**56**) konnte erfolgreich jeweils ein  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil-Diastereomer (**62**) erhalten und charakterisiert werden. Da ein neues Stereozentrum in 4-Position im Sechsring gebildet wird, ist jedoch auch die Entstehung eines

Diastereomergemisches möglich. Sowohl im HPLC-Chromatogramm als auch im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist jedoch jeweils nur ein Signal bzw. ein Signalsatz vorhanden. Eine Aussage über die Konfiguration des neu gebildeten Stereozentrums in 4-Position kann jedoch nicht getroffen werden. Positiv ist jedoch festzuhalten, dass die  $\Delta 2$ -Isomerisierung stereoselektiv zu verlaufen scheint. Abschließend wurden die beiden  $\Delta 2$ -Cefpodoximproxetil-Diastereomere (**61**) über eine Umsetzung der  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil-Diastereomere (**62**) mit MAEM (**18**) erhalten und charakterisiert.

Außerdem wurde in dieser Arbeit aufbauend auf vorherigen Arbeiten die Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) als *Precursor* des bedeutenden Wirkstoffs Tamsulosin ((*R*)-**78**) untersucht. Dabei konnte nach Betrachtung der Einzelreaktionen ein Prozess entwickelt werden, bei dem das Produkt ((*R*)-**77**) in zwei Reaktionsschritten aus der gut zugänglichen Verbindung 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) als Ausgangsmaterial dargestellt werden kann (Abbildung 5–3).



**Abbildung 5–3:** Zweistufige Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).

Im ersten Reaktionsschritt, einer enzymatischen Reduktion der ungesättigten Nitroverbindung **96**, konnte unter Verwendung einer En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* die Nitroverbindung (*R*)-**99** mit einer Reinheit von 93% und einem Enantiomerenüberschuss von 93% stereoselektiv erhalten werden. Die Aufarbeitung besteht dabei aus einer einfachen Extraktion und die mit Substrat **96** verunreinigte Reaktionsmischung wird ohne weitere Aufreinigung mit Wasserstoff unter Palladium-Aktivkohle-Katalyse zum gewünschten (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) umgesetzt. Nachdem der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt wurde, konnte das Produkt (*R*)-**77** mit einer Reinheit von 97% und einem Enantiomerenüberschuss von 93% isoliert werden. Die Gesamtausbeute dieser beiden Reaktionsschritte liegt bei 81%, was für diese zweistufige Synthese ein sehr gutes Ergebnis

darstellt. Unter Berücksichtigung des einfachen Zugangs zum Ausgangsmaterial **96** und den wenigen Aufarbeitungsschritten, die für beide Reaktionen nur eine Extraktion, einen Lösungsmittelwechsel und eine Filtration beinhalten, stellt diese Synthesestrategie einen ökonomisch und ökologisch attraktiven und interessanten Ansatz für die Darstellung von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) dar.

Zusammenfassend konnte für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung des „grüneren“ Kopplungsreagenzes 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) ein quantitativer Umsatz erhalten werden, ohne auf Schutzgruppenchemie zurückgreifen zu müssen. Das Verfahren konnte als Plattformprozess ebenfalls für die Derivatisierung in 7-Position für die ähnlichen Cephalosporin-Antibiotika Cefpodoxim (**4**), Cefpodoximproxetil (**5**) und Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) mit hohen Ausbeuten von 81-95% angewendet werden. Eine Übertragung der Synthese auf ein *Flow-Setup* lieferte ebenfalls sehr positive Ergebnisse mit Umsätzen im Bereich von 90%. Darüber hinaus erfolgte eine gezielte Analyse der einzelnen Diastereomere von AMCA-Proxetil (**56**), Cefpodoximproxetil (**5**),  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) und  $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (**61**).

Für die Synthese des Tamsulosin-*Precursors* (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-**77**) konnte ein vielversprechender Ansatz entwickelt werden, der mithilfe eines Biokatalysators für den entscheidenden Schlüsselschritt der Entstehung des stereoselektiven Zentrums und der Verwendung von Wasserstoff als Reduktionsmittel besonders umweltfreundlich ausfällt und für die Synthese von Tamsulosin ((*R*)-**78**) eine interessante Alternative bietet.

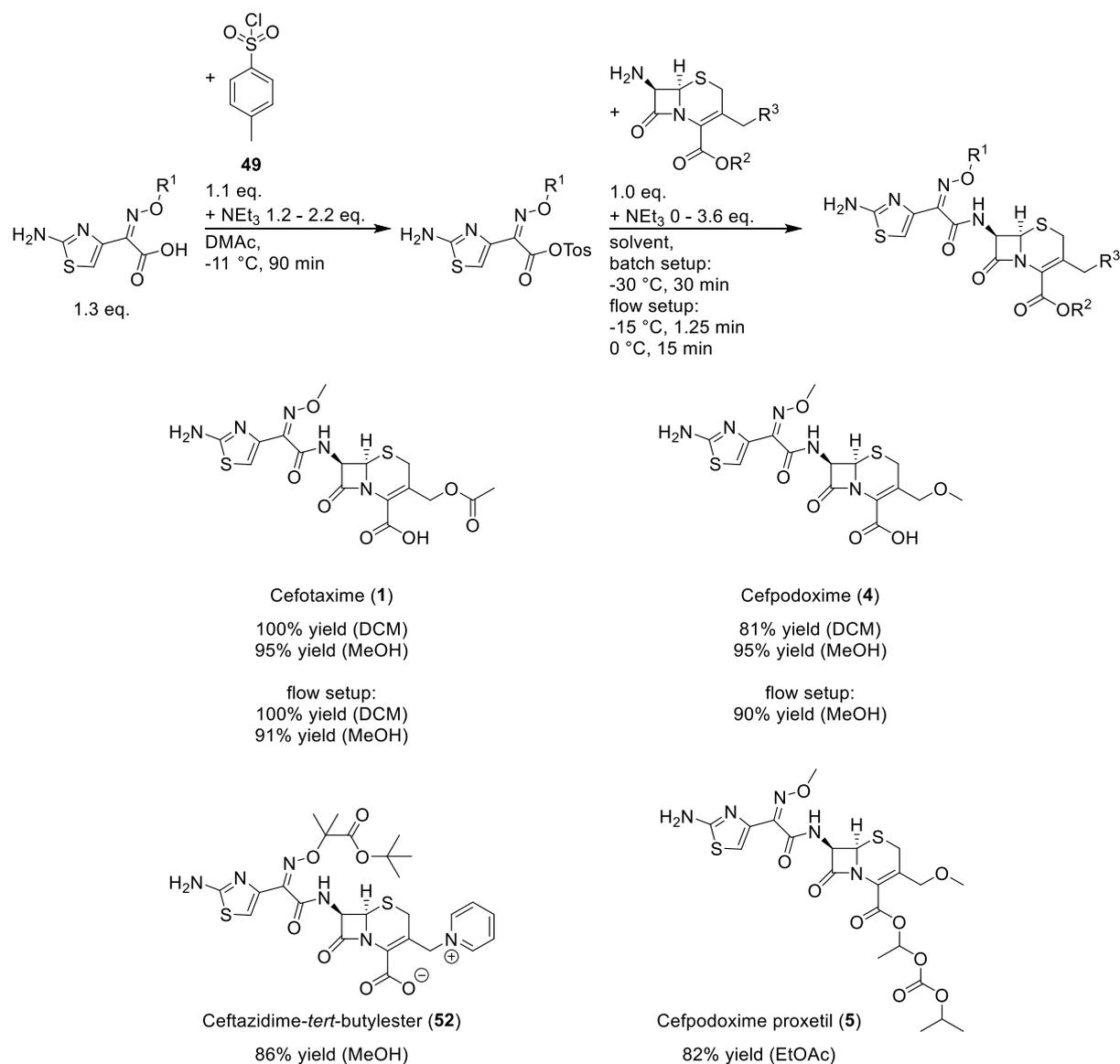


## 6. Summary

The key points of this work include the investigation of the preparation of different cephalosporin antibiotics as well as (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-**77**) as a precursor of tamsulosin ((*R*)-**78**) regarding the possibilities of a more sustainable synthesis.

For the synthesis of cefotaxime (**1**) different coupling agents have been tested for the activation of the ATMO acid (**8**). While carbonyldiimidazole (**32**), different phosphoric acid anhydrides and 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-methylmorpholinium chloride (**45**) failed, 4-toluenesulfonyl chloride (**49**) could be established successfully as coupling agent for the synthesis of cefotaxime (**1**). In this reaction, a mixed anhydride is prepared from 4-toluenesulfonyl chloride (**49**) and ATMO acid (**8**) and then added to a solution of 7-ACA (**3**). A solvent screening showed, that dimethyl acetamide as solvent of the first reaction step cannot be substituted without dramatic loss of yield. For the solvent of the solution of 7-ACA (**3**) when adding triethylamine, methanol could be identified as an alternative for methylene chloride. When using methylene chloride, cefotaxime (**1**) was yielded with 100%, while a substitution by the greener solvent methanol still led to nearly quantitative conversion. As the cephalosporin antibiotics of the third and fourth generation show a high similarity for the derivatization in 7-position, the coupling using 4-toluenesulfonyl chloride (**49**) could be established as a platform process for this derivatization (Figure 6-1). Without further optimization of the procedure, cefpodoxime (**4**), cefpodoxime proxetil (**5**), and ceftazidime-*tert*-butylester (**52**) could be obtained successfully with yields between 81% and 95% by an amidation of the respective  $\beta$ -lactam in 7-position.

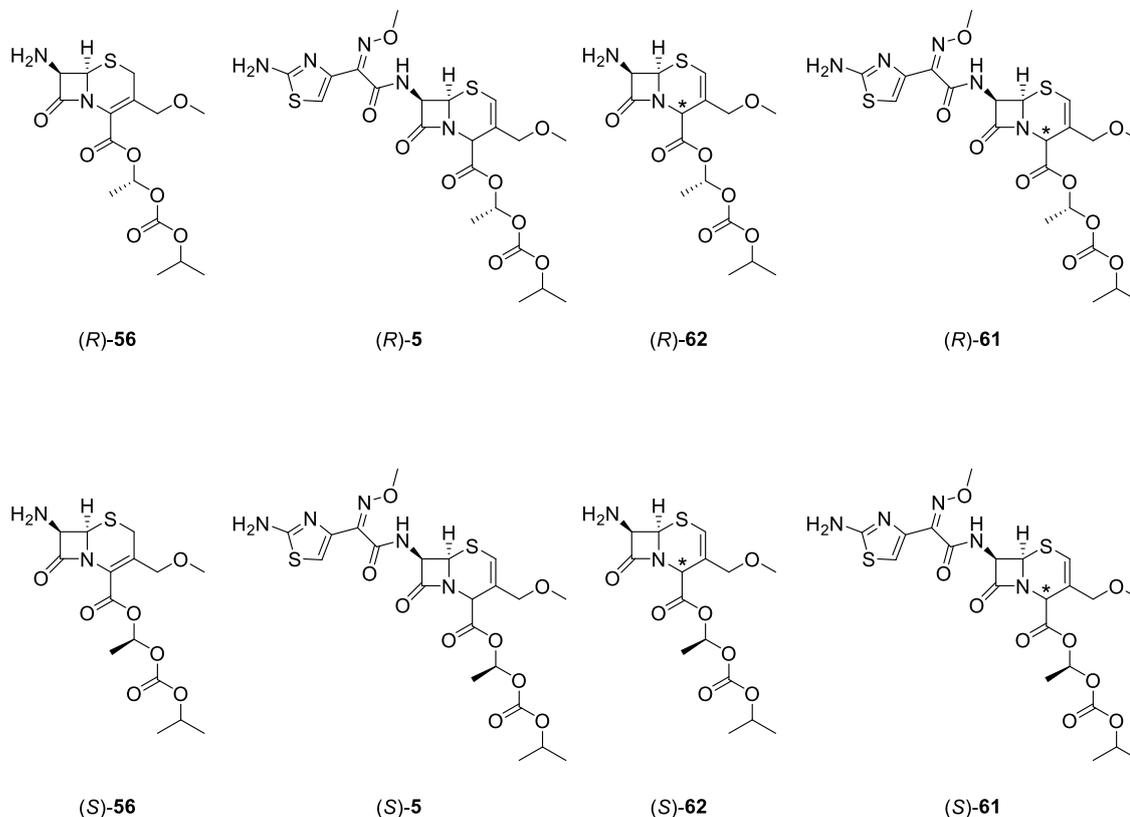
Unfortunately, due to the low solubility of the reactants, it was not possible to transfer the reaction to a microreactor, as it would lead to plugging of it. However, the reaction could be performed in a simple flow setup using a hose with a diameter of 4 mm as reactor. This setup is indeed bigger in dimension compared to a microreactor (diameter < 1 mm) but enables the use of suspensions while preserving the high heat transfer as advantage of a microreactor. With this setup a quantitative yield could be obtained for cefotaxime (**1**) in methylene chloride and a high yield of 91% in methanol at -15 °C with a reaction time of 1.25 minutes and subsequent stirring for 15 minutes at 0 °C. Under identical conditions cefpodoxime (**4**) was obtained with a satisfactory yield of 90% in methanol.



**Figure 6–1:** Examples for a platform process using 4-toluenesulfonyl chloride (**49**) as coupling agent.

Besides the derivatization in 7-position the compound cefpodoxime proxetil (**5**) has been investigated further. Due to the chiral side chain in 4-position this cephalosporin antibiotic exists as a mixture of the diastereomers (*R*)-cefpodoxime proxetil ((*R*)-**5**) and (*S*)-cefpodoxime proxetil ((*S*)-**5**). In this work, the diastereomers of the precursor AMCA proxetil (**56**), which is unsubstituted in 7-position, could be separated by flash chromatography (Figure 6-2). Starting from these, the single diastereomers of cefpodoxime proxetil (**5**) could be synthesized successfully by an amidation with MAEM (**18**). For cefpodoxime proxetil (**5**) a fraction of 50-60% of the (*R*)-diastereomer (*R*)-**5** is regulated. Therefore, it was tested for AMCA proxetil (**56**) and cefpodoxime proxetil (**5**), if the diastereomeric ratio could be shifted towards the (*R*)-diastereomer by a selective hydrolysis of the (*S*)-diastereomer with a hydrolase. For this

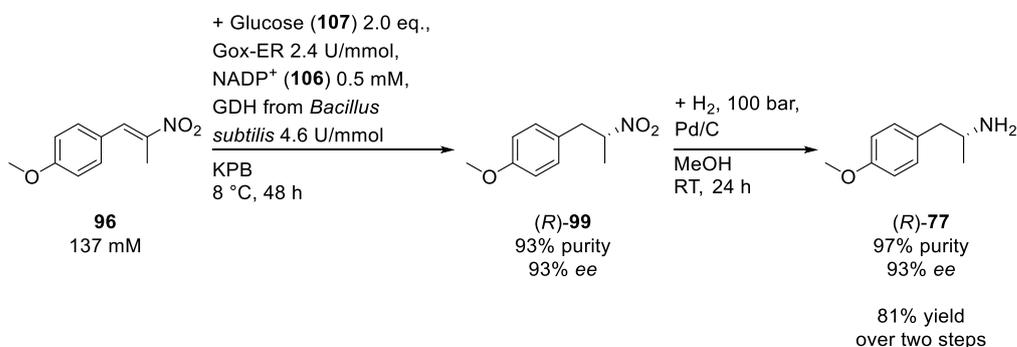
purpose, 62 different available and commercial hydrolases were used. However, the diastereomeric ratio could not be shifted to the desired direction by any of the available enzymes.



**Figure 6-2:** Overview of the isolated diastereomers of AMCA proxetil (**56**), cefpodoxime proxetil (**5**),  $\Delta$ 2-AMCA proxetil (**62**) and  $\Delta$ 2-cefpodoxime proxetil (**61**).

Thereupon, the  $\Delta$ 2-isomerization of AMCA proxetil (**56**) has been investigated. It could be shown that the equilibrium is at 62%  $\Delta$ 2-AMCA proxetil (**62**) for the addition of ten equivalents of triethylamine at room temperature. From the separated diastereomers of AMCA proxetil (**56**) the respective  $\Delta$ 2-AMCA proxetil diastereomers (**62**) could be successfully obtained and characterized. However, also the formation of a diastereomeric mixture is possible, as a new stereocenter is formed in 4-position of the six-membered ring. Both the HPLC chromatogram and the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum show a single signal or signal set, respectively. It cannot be stated, which configuration was formed at the new-built stereocenter in 4-position. However, it remains positive that the  $\Delta$ 2-isomerization seems to be stereoselective. Finally, both  $\Delta$ 2-cefpodoxime proxetil diastereomers (**61**) were obtained by a conversion of the respective  $\Delta$ 2-AMCA proxetil diastereomers (**62**) with MAEM (**18**) and characterized subsequently.

Based on previous studies, a further project of this work was the investigation of the synthesis of (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-77), which is an interesting precursor for the important agent tamsulosin ((*R*)-78). After inspection of the single reaction steps a process could be developed, which yields the product (*R*)-77 from the readily available reactant 1-(4-methoxyphenyl)-2-nitropropene (96) in two reaction steps (Figure 6-3). In the first reaction step, which is an enzymatic reduction of the unsaturated nitro compound 96, the nitro compound (*R*)-99 was obtained stereoselectively with a purity of 93% and an enantiomeric excess of 93% using an ene-reductase from *gluconobacter oxydans*. Thereby, the work-up only contains one simple extraction and the reaction mixture that is impured with the substrate 96 is converted into the desired product (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-77) with hydrogen and palladium coal catalysis without further purification. After filtration of the catalyst and elimination of the solvent the product (*R*)-77 was isolated with a purity of 97% and an enantiomeric excess of 93%. The total yield of both reaction steps is 81%, which is a good result for this two-step reaction. Considering the easy access to the starting material 96 and the few work-up steps for both reactions, namely one extraction, one solvent change and one filtration, this synthesis strategy represents an economically and ecologically attractive and interesting approach for the production of (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-77).



**Figure 6-3:** Two-step synthesis of (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-77) from 1-(4-methoxyphenyl)-2-nitropropene (96).

In summary, for the synthesis of cefotaxime (1) a quantitative yield could be obtained using the ‘greener’ coupling agent 4-toluenesulfonyl chloride (49) without the need of protective group chemistry. The procedure could be adapted as a platform process to cephalosporin antibiotics that are similar in derivatization of the 7-position, namely cefpodoxime (4), cefpodoxime proxetil (5) and ceftazidime-*tert*-butylester (52), leading to similar good results of 81-95% yield. The transfer of the synthesis to a flow setup also showed very positive results with yields in the range of 90%. Furthermore, a specific analysis of the single diastereomers of AMCA

proxetil (**56**), cefpodoxime proxetil (**5**),  $\Delta^2$ -AMCA proxetil (**62**) and  $\Delta^2$ -cefpodoxime proxetil (**61**) was performed.

For the synthesis of (*R*)-4-methoxyamphetamine ((*R*)-**77**) as a precursor of tamsulosin ((*R*)-**78**), a promising approach could be developed, which is especially ecological due to the use of hydrogen as reduction agent and a biocatalyst for the crucial key step forming the stereoselective center, delivering a very interesting alternative for the synthesis of tamsulosin ((*R*)-**78**).



# 7. Experimenteller Teil

## 7.1. Verwendete Chemikalien, Enzyme, Geräte und Arbeitstechniken

### 7.1.1. Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Carl Roth*, *Fluka analytical*, *Merck*, *Sigma Aldrich*, *TCI* und *VWR* bezogen. Ausnahmen bildeten die Antibiotika als Referenzprodukte, deren Vorstufen und Seitenketten, die von der Firma *Sandoz GmbH* zur Verfügung gestellt wurden. Alle Chemikalien wurden ohne vorherige Aufreinigung, wie erhalten verwendet. Einzig das für die Säulenchromatographie verwendete Cyclohexan wurde vor der Verwendung destilliert.

### 7.1.2. Enzyme

In dieser Arbeit wurden kommerzielle Enzyme von *Amano*, *Boehringer Mannheim*, *C-LEcta*, *Fluka*, *Novozymes*, *Sigma Aldrich* und *Toyobo* verwendet.

#### 7.1.2.1. En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans*

Die verwendete En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* wurde von *Biermann* erhalten.<sup>[206]</sup> Der Zellrohextrakt wurde von *Biermann* mittels Affinitätschromatographie an einem *Äkta Purifier* mit folgenden Modulen aufgereinigt und anschließend lyophilisiert: *CU-950*, *P-900*, *UPC-900*, *Box-900*, *M-925*, *INV-907* und *Frac-920*.

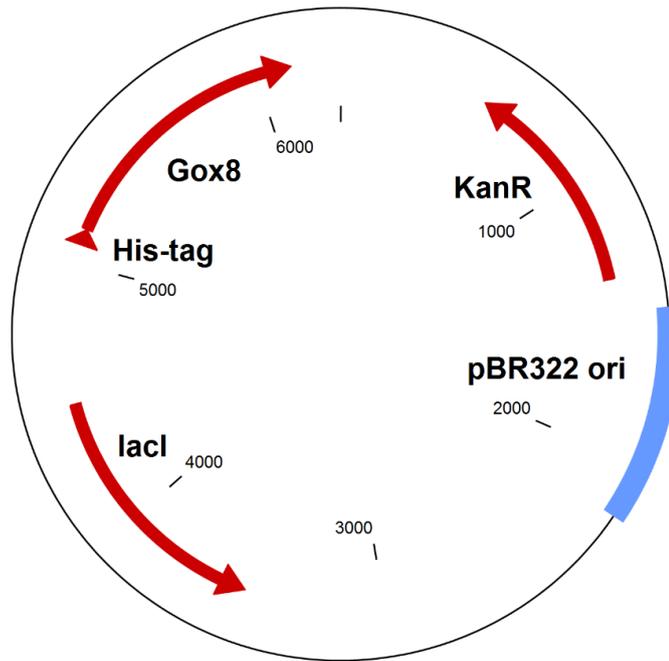
DNA Sequenz (mit His-Tag):

```
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCA
GCCATATGGCATCCGACACCATCCGCATCCCCGGCATCGACACGCCTCTCTCCCG
CGTCGCCCTCGGCACCTGGGCCATCGGCGGCTGGATGTGGGGCGGCCCCCGATGAT
GACAATGGCGTCCGCACCATTACGCGGCCCTCGATGAAGGCATCAACCTGATCG
```

ACACCGCCCCGGTCTACGGCTTCGGCCATTCCGAGGAAATCGTCGGCCGGGCACT  
CGCCGAGAAGCCCAACAAGGCGCATGTCGCCACGAAACTCGGGCTCCACTGGGT  
TGGCGAAGACGAAAAGAATATGAAGGTCTTCCGGGACTCCCGCCCCGGCCGCAT  
CCGCAAGGAAGTCGAGGACTCGCTCCGCCGTCTGCGTGTGGAGACGATCGATCTC  
GAGCAGATCCACTGGCCCGACGACAAAACCCCGATCGACGAGAGCGCCCGCGAG  
CTTCAGAAACTCCATCAGGACGGCAAGATCCGTGCCCTCGGCGTAAGCAACTTCT  
CGCCGGAGCAGATGGACATCTTCCGCGAAGTCGCCCCGCTCGCCACGATCCAGCC  
CCCGCTGAACCTTTTCGAACGCACCATCGAGAAGGACATCCTGCCCTACGCCGAA  
AAGCACAATGCCGTCGTTCTCGCTTACGGGGCCCTCTGCCGCGGCCTGCTGACAG  
GCAAGATGAACCGCGATACGACCTTCCCGAAGGATGACCTGCGTTCGAACGATCC  
GAAGTTCAGAAGCCGAATTTTCGAGAAGTACCTCGCAGCCATGGACGAGTTCGA  
AAAGCTTGCCGAAAAGCGCGGCAAGTCTGTGATGGCCTTCGCGGTTTCGCTGGGT  
CTGGATCAGGGCCCGGTAATCGCCCTGTGGGGTGCCCGCAAGCCGGGTCAGGTCT  
CAGGCGTAAAGGACGTCTTCGGCTGGTCCCTGACCGACGAAGAGAAGAAAGCCG  
TGGACGACATTCTGGCTAGGCATGTCCCAATCCCATCGACCCGACTTTCATGGC  
GCCCCCGGCACGGGACTGA

Aminosäuresequenz (mit His-Tag):

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASDTIRIPGIDTPLSRVALGTWAIGGWMWGGPDDD  
NGVRTIHAALDEGINLIDTAPVYGFHSEEIVGRALAEKPNKAHVATKLGLHWVGED  
EKNMKVFRDSRPARIRKEVEDSLRRLRVETIDLEQIHWPD DKTPIDESARELQKLHQD  
GKIRALGVS NFSPEQMDIFREVA PLATIQPPLNLFERTIEKDILPYAEKHNAVVLAYGA  
LCRGLLTGKMNRD TTFPKDDLRSNDPKFQKPNFEKYLAAMDEFEKLAEKRGKSVMA  
FAVRWVLDQGPVIALWGARKPGQVSGVKD VFGWSLTDEEKKA VDDILARHVNPID  
PTFMAPPARD



**pET28a\_Gox8(N)6His**  
**6313 bps**

**Abbildung 7–1:** Plasmidkarte mit Gen der En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* versehenen mit His-Tag.

#### 7.1.2.2. Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*

Die verwendete Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* mit Hitzemutationen E170K und Q252L wurde von *Bommarius* entwickelt und aus einer Hochzelllichtfermentation der Arbeitsgruppe *Hummel* erhalten.<sup>[207]</sup> Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Rohextrakt über eine Hitzefällung aufgereinigt.

DNA Sequenz (thermostabile Mutante E170K Q252L):

```

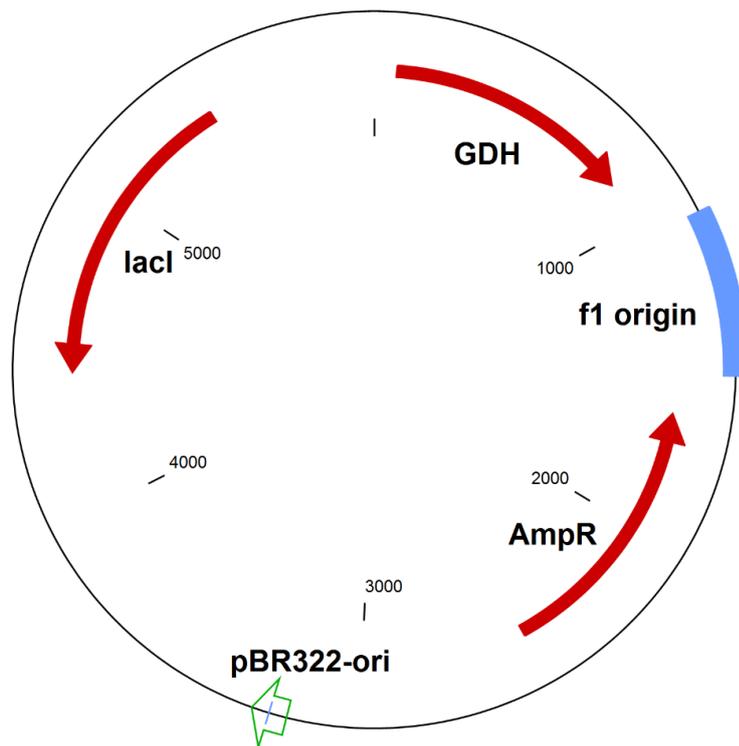
ATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCGTCGCTATTACAGGAGCTGCTTCAGGGC
TCGGAAAGGCGATGGCCATTCGCTTCGGCAAGGAGCAGGCAAAAGTGGTTATCA
ACTATTATAGTAATAAACAAGATCCGAACGAGGTAAAAGAAGAGGTCATCAAGG
CGGGCGGTGAAGCTGTTGTCGTCCAAGGAGATGTCACGAAAGAGGAAGATGTAA
AAAATATCGTGCAAACGGCAATTAAGGAGTTCGGCACACTCGATATTATGATTAA
TAATGCCGGTCTTGAAAATCCTGTGCCATCTCACGAAATGCCGCTCAAGGATTGG
GATAAAGTCATCGGCACGAACTTAACGGGTGCCTTTTTAGGAAGCCGTGAAGCGA
TTAAATATTTTCGTAGAAAACGATATCAAGGGAAATGTCATTAACATGTCCAGTGT
GCACGAAGTGATTCCCTTGGCCGTTATTTGTCCACTATGCGGCAAGTAAAGGCGGG

```

ATAAAGCTGATGACAAAGACATTAGCGTTGGAATACGCGCCGAAGGGCATTTCG  
 GTCAATAATATTGGGCCAGGTGCGATCAACACGCCAATCAATGCTGAAAAATTCCG  
 CTGACCCTAAACAGAAAGCTGATGTAGAAAGCATGATTCCAATGGGATATATCG  
 GCGAACCGGAGGAGATCGCCGCAGTAGCAGCCTGGCTTGCTTCGAAGGAAGCCA  
 GCTACGTCACAGGCATCACGTTATTCGCGGACGGCGGTATGACACTCTATCCTTC  
 ATTCCAGGCAGGCCGCGGTAA

Aminosäuresequenz (thermostabile Mutante E170K Q252L):

MYPDLKGKVVAITGAASGLGKAMAIRFGKEQAKVVINYYSNKQDPNEVKKEVIKAG  
 GEAVVVQGDVTKEEDVKNIVQTAIKEFGTLDIMINNAGLENPVPSHEMPLKDWDKVI  
 GTNLTGAFLGSREAIKYFVENDIKGNVINMSSVHEVIPWPLFVHYAASKGGIKLMTKT  
 LALEYAPKIRVNNIGPGAINTPINAEKFADPKQKADVESMIPMGYIGEPEEIAAVAA  
 WLASKEASYVTGITLFADGGMTLYPSFQAGRG



**pETDuet1\_Bs-GDH\_E170K\_Q252L**  
 5923 bps

**Abbildung 7–2:** Plasmidkarte mit Gen der thermostabilen Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*.

### 7.1.3. Geräte

#### 7.1.3.1. Peristaltische Pumpe

Für die Experimente mit dem *Flow-Setup* wurde eine *REGLO ICC Digital* Peristaltikpumpe von *Ismatec* mit einem Pumpenkopf mit vier Kanälen und jeweils acht Rollen verwendet.

#### 7.1.3.2. Waagen

Ein- und Auswaagen wurden an der Feinwaage *MCI* und der Analysenwaage *CPA225D* von *Sartorius* vorgenommen.

#### 7.1.3.3. Automatische Säulenchromatographie

Für die automatische Säulenchromatographie wurde die *Isolera One* von *Biotage* verwendet. Für die Trennungen wurden *SNAP Ultra* Kieselgelkartuschen des gleichen Herstellers der Größen 10 g, 25 g und 50 g verwendet. Das Kieselgel wies dabei eine Qualität von *HP-Sphere 25 μm* auf. Die Auftragung erfolgte entweder direkt auf die Säule oder absorbiert an *SNAP Ultra-Samplers* mit 1 g, 3 g oder 10 g Kieselgel. Für die Chromatographie wurden Laufmittelgemische aus Ethylacetat und Cyclohexan mit unterschiedlichen Gradienten verwendet.

#### 7.1.3.4. UV/VIS-Spektroskopie

Für die UV/VIS-Spektroskopie wurde ein Photometer *V630* mit einer Temperiereinheit *PSC-763* der Firma *Jasco* mit Küvetten aus Quarzglas verwendet.

#### 7.1.3.5. NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit den NMR-Spektrometern *Avance III 500* und *Avance III 500 HD* sowie *DRX 500* der Firma *Bruker* aufgenommen (Messfrequenz:  $^1\text{H}$ -NMR 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR 125 MHz). Die chemische Verschiebung der Spektren (in ppm angegeben) wurde auf die Lösungsmittelsignale kalibriert ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$  7.26 ppm,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  5.32 ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$  3.31 ppm,  $\text{D}_2\text{O}$  4.79 ppm,  $\text{DMSO-d}_6$  2.50 ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$  77.16 ppm).<sup>[208]</sup> Die Kopplungskonstanten

sind in Hz und die Spinmultiplizitäten als m (Multiplett), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Quintett), h (Sextett), hept (Heptett) und deren Kombinationen angegeben.

#### **7.1.3.6. HPLC**

Für die Aufnahme der HPLC-Chromatogramme wurden zwei Systeme von *Jasco*, eine Normalphasen- und eine *reversed phase*-HPLC verwendet. Beide Systeme enthielten die Pumpen *PU-2080Plus*, das Säulentermostat *CO-2060Plus*, den Detektor *MD-2010Plus*, den Autosampler *AS-2059-SFPlus* und den Entgaser *DG-2080-53*. Das Normalphasensystem konnte mit überkritischem Kohlenstoffdioxid betrieben werden und enthielt zusätzlich noch den Rückdruckregler *BP-2080Plus*. Für die Normalphasen-HPLC wurden die chiralen Säulen *Chiracel OD-H* und *Chiracel IC* von *Daicel* verwendet. Für die *reversed phase*-HPLC wurde eine *NUCLEODUR C<sub>18</sub> HTec* von *Macherey Nagel* verwendet.

#### **7.1.3.7. Massenspektrometrie**

Für die Aufnahme von ESI-Massenspektren wurde ein *Esquire 3000* von *Bruker Daltonic* im positiven und negativen Modus verwendet. Feinmassen wurden mit einem *6220* Massenspektrometer von *Agilent* gemessen.

### **7.1.4. Arbeitstechniken**

#### **7.1.4.1. Durchführung der Experimente**

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Synthesen und Messungen unter Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur und an Luft) durchgeführt. Bei Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurde mit der *Schlenk*-Technik gearbeitet. Dabei wurde das Vakuum mit der Drehschieberpumpe *RZ 2.5* von *Vacuumbrand* erzeugt und als Inertgas über Calciumchlorid und Trockenperlen geleitetes Argon verwendet.

#### **7.1.4.2. Dünnschichtchromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie wurden vorgefertigte Aluminiumfolien, beschichtet mit Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub> verwendet.

#### **7.1.4.3. Temperierung**

Zum Temperieren der Lösung des gemischten Anhydrids wurde ein Kolben mit Kühlmantel verwendet. Dieser und das *Flow-Setup* wurden mit einem *FP 50* Thermostat von *Julabo* temperiert. Die Biotransformationen mit der En-Reduktase wurden ebenfalls in einem Kolben mit Kühlmantel durchgeführt, der mit einem *CF 31* Thermostat von *Julabo* temperiert wurde. Alle weiteren Lösungen wurden mithilfe von Eisbädern oder Aceton-Trockeneis-Kühlmischungen gekühlt. Zum Erhitzen wurden Ölbäder und die Magnetrührer *RCT Basic* und *RCT classic* von *IKH* verwendet.

#### **7.1.4.4. Entfernen von Lösungsmitteln und flüchtigen Komponenten**

Für das Entfernen von Lösungsmitteln und allen flüchtigen Komponenten wurde ein Rotationsverdampfer *R11* der Firma *Büchi* mit einer Membranpumpe *MZ 20* von *Vacuubrand* verwendet. Dabei wurde eine Badtemperatur von 40 °C verwendet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

#### **7.1.4.5. Extrahieren von Biotransformationen**

Um eine bessere Phasentrennung bei der Extraktion der wässrigen Phasen von Biotransformationen zu ermöglichen, wurde teilweise die *Multifuge 3S-R* von *Heraeus* verwendet.

#### **7.1.4.6. Reaktionen bei konstantem pH-Wert**

Für Reaktionen, die bei einem konstanten pH-Wert durchgeführt wurden, wurde mit einem Autotitrator *TA20 plus* von *SI Analytics* der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge konstant gehalten.

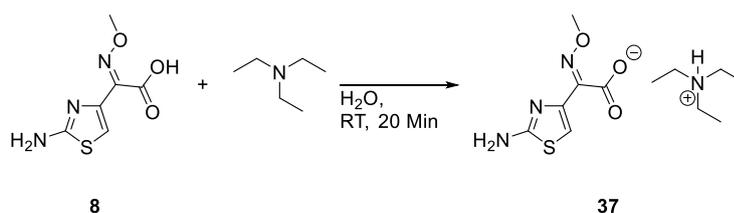
#### **7.1.4.7. Hochdruckreaktionen**

Die Hochdruckreaktionen bis 5 bar Wasserstoffdruck wurden in einem *Miniclave* von *Büchi* durchgeführt. Für Reaktionen bei höherem Druck wurde das *Series 5000 Multiple Reaktor System* von *Parr Instrument Company* verwendet. In beiden Fällen wurde der Autoklav dreimal mit Stickstoff (5 bar *Miniclave* und 50 bar *Series 5000 Multiple Reaktor System*) gespült.

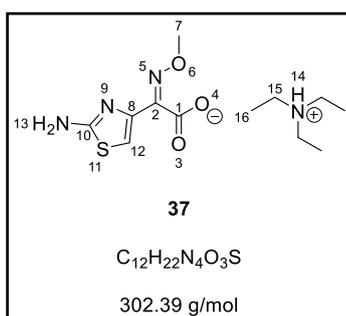
Anschließend wurde analog dreimal mit Wasserstoff gespült und die Reaktion durchgeführt. Nach der Reaktion wurde erneut dreimal mit Stickstoff gespült.

## 7.2. Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz

### 7.2.1. Darstellung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (37)



**Abbildung 7–3:** Darstellung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (**37**) durch Neutralisation der ATMO-Säure (**8**) mit Triethylamin.



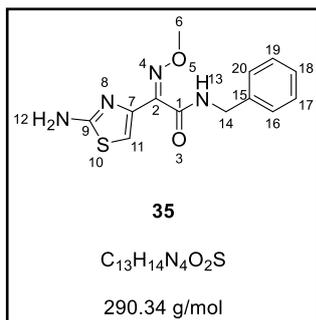
ATMO-Säure (**8**, 4.13 g, 20.5 mmol) wird in Wasser (20 mL) suspendiert und mit Triethylamin (2.86 mL, 20.5 mmol) versetzt. Nach 20 Minuten wird das Lösungsmittel der klaren, gelben Lösung im Vakuum entfernt. Der noch leicht feuchte, gelbe Feststoff wird in Ethylacetat (20 mL) suspendiert und nach zehn Minuten Rühren das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird

das Triethylammoniumsalz **37** als gelber, kristalliner Feststoff (5.98 g, 19.8 mmol, 97% Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 6.84 (s, 1H, **H12**), 3.88 (s, 3H, **H7**), 3.17 (q, *J* = 7.3 Hz, 6H, **H15**), 1.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, **H16**).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7.02 (s, 2H, **H13**), 6.57 (s, 1H, **H12**), 3.69 (s, 3H, **H7**), 2.97 (q, *J* = 6.9 Hz, 6H, **H15**), 1.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, **H16**).

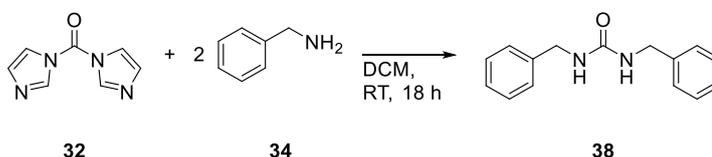
## 7.2.2. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von ATMO-Säurebenzylamid (35)



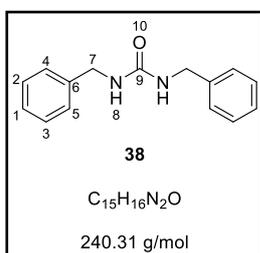
Diese Referenzprobe wurde im Rahmen von Vorarbeiten synthetisiert und hier in deuteriertem Dimethylsulfoxid vermessen.<sup>[74]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 8.98 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, **H13**), 7.34 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, **H16-20**), 7.24 (dd, *J* = 6.0, 3.2 Hz, 1H, **H16-20**), 7.19 (s, 2H, **H12**), 6.70 (s, 1H, **H11**), 4.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, **H14**), 3.85 (s, 3H, **H6**).

## 7.2.3. Darstellung des Dibenzylharnstoffes (38)



**Abbildung 7–4:** Darstellung von Dibenzylharnstoff (**38**) aus Carbonyldiimidazol (**32**) und Benzylamin (**34**).



Carbonyldiimidazol (**32**, 79.8 mg, 0.492 mmol) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst und mit Benzylamin (**34**, 215 µL, 1.97 mmol) versetzt. Nach 18 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung mit Salzsäure (1 mol/L, 2 x 10 mL) gewaschen. Nach Waschen mit Natronlauge (1 mol/L, 10 mL) und Wasser (10 mL) wird die organische

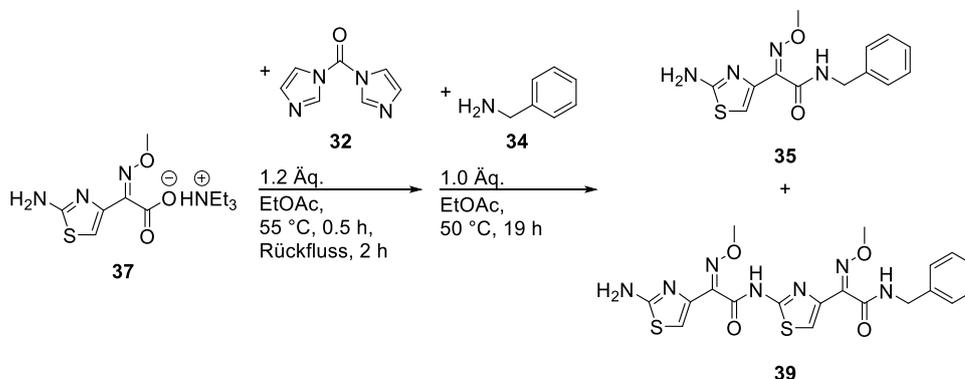
Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wird Dibenzylharnstoff (**38**) als gelber Feststoff (120 mg, 0.498 mmol, 101% Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.29 (m, 4H, **H1-5**), 7.23 (m, 6H, **H1-5**), 4.32 (s, 4H, **H7**).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ = 7.27 (m, 10H, **H1-5**), 4.98 (m, 2H, **H8**), 4.30 (d, *J* = 5.8 Hz, 4H, **H7**).

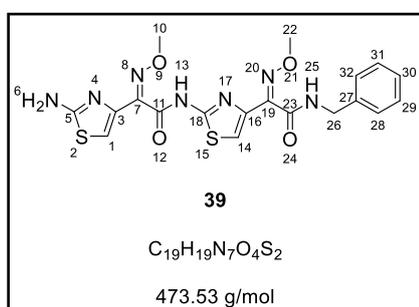
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.26 (m, 10H, **H1-5**), 6.44 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, **H8**), 4.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, **H7**).

## 7.2.4. Amidierung des Triethylammoniumsalzes **37** mit Benzylamin (**34**) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (**32**) mit Isolierung des Produktes **35** und des Dimers **39**



**Abbildung 7–5:** Amidierung des Triethylammoniumsalzes **37** mit Benzylamin (**34**) mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz.

Es wird Triethylammonium-ATMO-Salz (**37**, 302 mg, 1.00 mmol) in Ethylacetat (25 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Carbonyldiimidazol (**32**, 195 mg, 1.20 mmol) wird 30 Minuten bei 55 °C und zwei Stunden bei Rückfluss gerührt. Es bildet sich ein geringer Niederschlag an der Kolbenwand. Nach Abkühlen auf 50 °C wird Benzylamin (**34**, 109  $\mu$ L, 1.00 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Nach 19 Stunden Rühren bei 50 °C wird die Lösung filtriert. Das Filtrat wird mit Salzsäure (2 x 20 mL, 0.01 mol/L), Wasser (20 mL), NaOH (2 x 20 mL, 0.01 mol/L) und Wasser (20 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und ATMO-Säurebenzylamid (**35**) als leicht gelber Feststoff (107 mg, 368  $\mu$ mol, 37% Ausbeute) erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten aus Kapitel 7.2.2 überein.

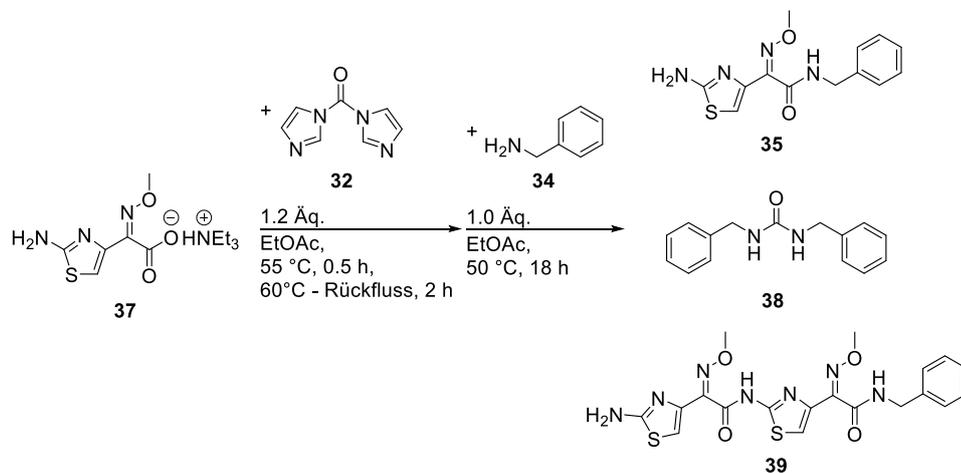


Der Niederschlag an der Kolbenwand wird in Wasser (10 mL) suspendiert und ebenfalls filtriert. Der Filterkuchen wird mit Wasser (5 x 3 mL) und Ethylacetat (5 x 3 mL) gewaschen. Das ATMO-ATMO-Benzylamin-Dimer (**39**) wird als leicht gelber Feststoff (33.5 mg, 0.070 mmol, 14% Ausbeute) mit geringer Verunreinigung erhalten.

ATMO-ATMO-Benzylamin-Dimer (**39**):

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.09 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, **H25**), 7.39 (m, 8H, **H1** oder **H14** + **H6** + **H28-32**), 7.25 (m, 1H, **H13**), 7.15 (s, 1H, **H1** oder **H14**), 4.44 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, **H26**), 3.91 (s, 3H, **H10** oder **H22**), 3.75 (s, 3H, **H10** oder **H22**).

### 7.2.5. Amidierung des Triethylammoniumsalzes **37** mit Benzylamin (**34**) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (**32**) bei verschiedenen Aktivierungstemperaturen



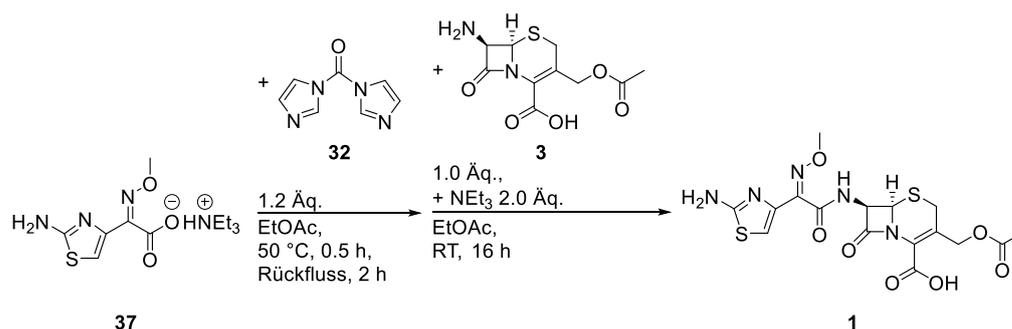
**Abbildung 7–6:** Amidierung des Triethylammoniumsalzes **37** und Benzylamin (**34**) mit Carbonyldiimidazol (**32**) als Kopplungsreagenz bei verschiedenen Aktivierungstemperaturen.

Der Versuch wird bei drei verschiedenen Aktivierungstemperaturen durchgeführt. Es wird das Triethylammoniumsalz (**37**, 0.200 mmol) in Ethylacetat (5 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Carbonyldiimidazol (**32**, 0.240 mmol) wird 30 Minuten bei 55 °C und zwei Stunden bei 60 °C, 70 °C und Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Benzylamin (**34**, 21.8 µL, 0.199 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Nach 18 Stunden Rühren bei 50 °C wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht. Die Umsätze werden über das Verhältnis der Signale der Benzylprotonen des Amids **35**, des Dimers **39**, des Harnstoffderivats **38** und Benzylamin (**34**) mit der Signalintensität der Protonen von Imidazol (**33**) bestimmt und sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

**Tabelle 7-1:** Zusammensetzung der Reaktionsgemische am Ende der Reaktion bei verschiedenen Aktivierungstemperaturen.

T	A (33)	A (34) Rest (34)	A (35) Umsatz (35)	A (38) Umsatz (38)	A (39) Umsatz (39)
60 °C	2.40	0.00	0.51	1.28	0.16
		0%	26%	32%	8%
70 °C	2.40	0.20	0.46	1.03	0.13
		10%	28%	26%	7%
Rückfluss	2.40	0.95	0.66	0.00	0.31
		48%	33%	0%	16%

### 7.2.6. Amidierung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (37) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (32)



**Abbildung 7–7:** Amidierung des Triethylammonium-ATMO-Salzes (37) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von Carbonyldiimidazol (32) als Kopplungsreagenz.

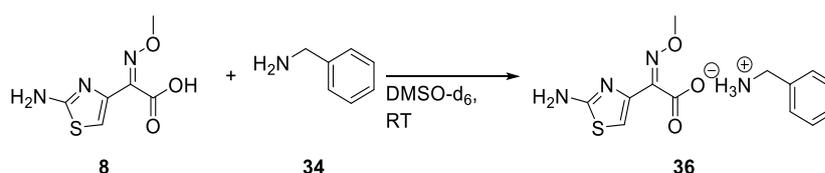
Es wird das Triethylammonium-ATMO-Salz (37, 60.8 mg, 0.201 mmol) in Ethylacetat (5 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Carbonyldiimidazol (32, 39.0 mg, 0.240 mmol) wird 30 Minuten bei 55 °C und zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. 7-ACA (3, 54.2 mg, 199 μmol) wird mit Triethylamin (56 μL, 402 μmol) in Ethylacetat (2 mL) suspendiert und zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Reaktionslösung gegeben. Nach 18 Stunden Rühren wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit deuteriertem Dimethylsulfoxid suspendiert und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht. Es können in der leicht trüben Probe die Signale den Verbindungen Cefotaxim (1), ATMO-Säure (8), 7-ACA (3), Triethylamin und Imidazol (33) zugeordnet werden.

**Tabelle 7-2:** Zusammensetzung des Reaktionsgemisches am Ende der Reaktion.

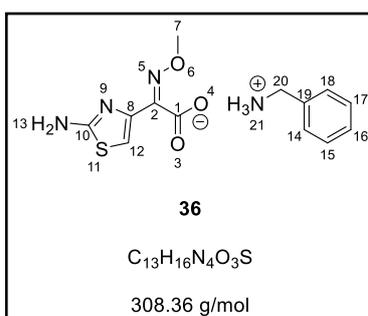
Substanz	A	Umsatz
Imidazol ( <b>33</b> )	2.40	
Cefotaxim ( <b>1</b> )	0.03	3%
7-ACA ( <b>3</b> )	0.98	

## 7.3. Anhydride von Phosphorsäuren als Kopplungsreagenzien

### 7.3.1. Untersuchung der Neutralisationsreaktion von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) unter Bildung des Benzylammonium-ATMO-Salzes (**36**)



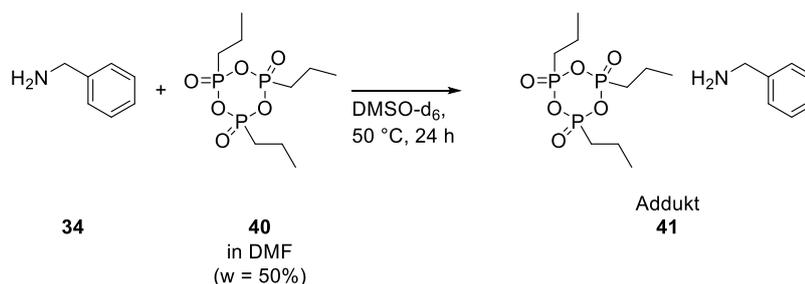
**Abbildung 7–8:** Neutralisationsreaktion zwischen ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**).



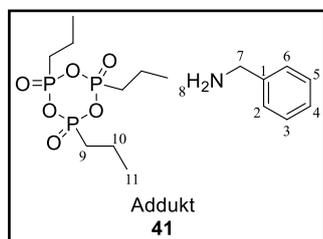
ATMO-Säure (**8**, 6.7 mg, 33.3  $\mu$ mol) wird in deuteriertem Dimethylsulfoxid (0.7 mL) gelöst und mit Benzylamin (**34**, 5  $\mu$ L, 45.9  $\mu$ mol) versetzt und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

$^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.43 (m, 2H, **H**14-18), 7.36 (m, 2H, **H**14-18), 7.30 (m, 1H, **H**14-18), 7.00 (s, 2H, **H**13), 6.53 (s, 1H, **H**12), 6.53 (s, 3H, **H**21), 3.89 (s, 2H, **H**20), 3.69 (s, 3H, **H**7).

### 7.3.2. Untersuchung der Hintergrundreaktion von Benzylamin (34) mit T3P® (40)



**Abbildung 7–9:** Reaktion zwischen Benzylamin (34) und T3P® (40) unter Bildung eines unbekanntes Adduktes.



Benzylamin (34, 10.9 mg, 0.1 mmol) wird in deuteriertem Dimethylsulfoxid (0.7 mL) gelöst und mit T3P®-Lösung in DMF (40, w = 50%, 71.6 µL, 0.12 mmol) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei 50 °C wird ein Teil der Reaktionslösung (0.6 mL) abgenommen und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht,

wobei neben den Signalen von DMF ein Signalsatz eines unbekanntes Adduktes 41 gefunden wird.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.40 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H, **H**2-6), 7.35 (ddd, *J* = 9.0, 3.9, 2.4 Hz, 1H, **H**2-6), 4.25 (s, 2H, **H**7), 1.51 (m, 12H, **H**9-11), 0.93 (s, 9H, **H**9-11).

### 7.3.3. Versuch der Kopplung von Benzylamin (34) und ATMO-Säure (8) unter Verwendung von T3P® (40)

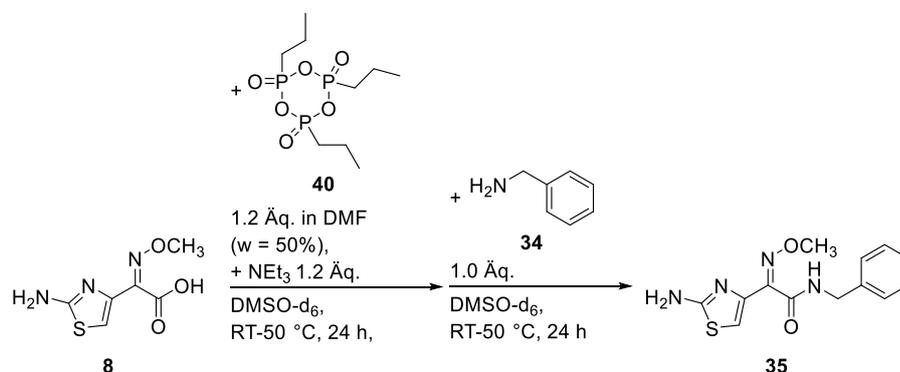
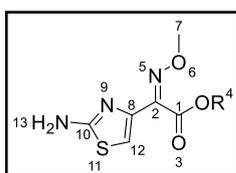


Abbildung 7–10: Versuch der Kopplung von ATMO-Säure (8) und Benzylamin (34) mit T3P® (40).

ATMO-Säure (8, 20.1 mg, 0.1 mmol) wird mit Triethylamin (16.7 µL, 0.12 mmol) in deuteriertem DMSO (3 mL) gelöst und mit T3P®-Lösung in DMF (40, w = 50%, 71.6 µL, 0.12 mmol) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur und 50 °C wird ein Teil der Reaktionslösung (0.6 mL) abgenommen und mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht, wobei beide Spektren dieselben Signalsätze aufweisen. Neben den Signalsätzen von T3P®, DMF und Triethylamin werden zwei Signalsätze gefunden, die der ATMO-Säure (8) oder Derivaten zugeordnet werden können.



Signalsatz 1:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.21 (s, 2H, **H13**), 6.82 (s, 1H, **H12**), 3.83 (s, 3H, **H7**).

Signalsatz 2:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.21 (s, 2H, **H13**), 6.74 (s, 1H, **H12**), 3.84 (s, 3H, **H7**).

Anschließend wird Benzylamin (34, 8.7 µL, 0.08 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und von einem Teil ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum gemessen, wobei beide Spektren dieselben Signalsätze aufweisen.

Neben den Signalsätzen von T3P®, DMF und Triethylamin werden zwei weitere Signalsätze gefunden, die der ATMO-Säure (8) oder Derivaten zugeordnet werden können. Darüber hinaus kann ein Signalsatz dem Benzylamin-T3P®-Addukt 41 und ein Signalsatz Benzylamin oder einem Derivat zugeordnet werden.

Signalsatz 1, ATMO-Säure oder Derivat von dieser:

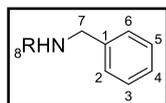
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 7.21 (s, 2H, **H13**), 6.82 (s, 1H, **H12**), 3.83 (s, 3H, **H7**).

Signalsatz 2, ATMO-Säure oder Derivat von dieser:

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta = 7.21$  (s, 2H, **H13**), 6.74 (s, 1H, **H12**), 3.84 (s, 3H, **H7**).

Signalsatz 3, Benzylamin-T3P<sup>®</sup>-Addukt **41**:

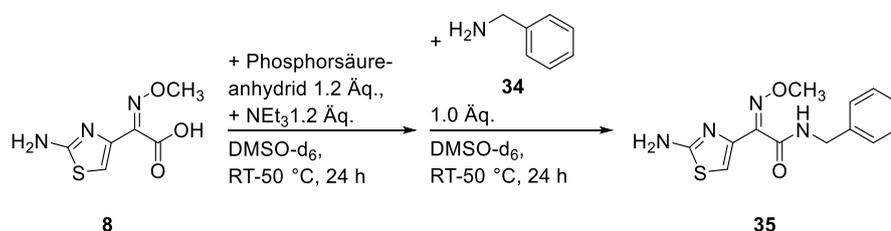
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta = 7.38$  (m, 5H, **H2-6**), 4.24 (s, 2H, **H7**), 1.47 (m, 12H, **H8-10**), 0.92 (s, 9H, **H8-10**).



Signalsatz 4, Benzylamin oder Derivat von diesem:

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta = 7.49$  (m, 2H, **H2-6**), 7.38 (m, 3H, **H2-6**), 4.24 (s, 2H, **H7**).

### 7.3.4. Versuch der Kopplung von Benzylamin (**34**) und ATMO-Säure (**8**) unter Verwendung verschiedener Phosphorsäureanhydride



**Abbildung 7–11:** Kopplung von ATMO-Säure (**8**) und Benzylamin (**34**) mit verschiedenen Phosphorsäureanhydriden.

ATMO-Säure (**8**, 0.1 mmol) wird mit Triethylamin (16.7  $\mu\text{L}$ , 0.12 mmol) in deuteriertem DMSO (3 mL) gelöst und mit einem der drei Phosphorsäureanhydride Natriumpyrophosphat (**42**), Kaliumpyrophosphat (**43**) oder Natriumhexametaphosphat (**44**) (0.12 mmol) versetzt. Nach Rühren über 24 Stunden bei Raumtemperatur und 50 °C wird ein Teil der Reaktionslösung (0.6 mL) abgenommen und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht, wobei alle Spektren dieselben Signalsätze aufweisen, die identisch mit dem Triethylammonium-ATMO-Salz (**37**) sind (Kapitel 7.2.1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta = 6.98$  (s, 2H, **H13**), 6.55 (s, 1H, **H12**), 3.68 (s, 3H, **H7**), 2.83 (s, 6H, **H15**), 1.10 (t,  $J = 7.3$  Hz, 9H, **H16**).

Anschließend wird Benzylamin (**34**, 8.7  $\mu\text{L}$ , 0.08 mmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und von einem Teil ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen, wobei alle Spektren neben einem Signalsatz von Triethylamin einen mit dem Signalsatz des Benzylammonium-ATMO-Salzes (**36**) identischen Signalsatz aufweisen (Kapitel 7.3.1).

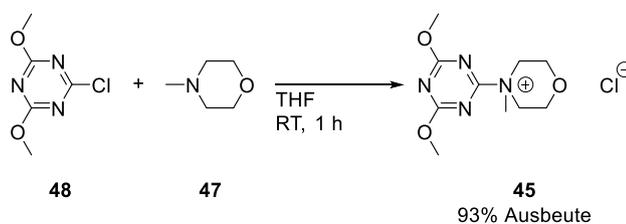
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.43 (m, 2H, **H14-18**), 7.37 (m, 2H, **H14-18**), 7.31 (m, 1H, **H14-18**), 6.98 (s, 2H, **H13**), 6.53 (s, 1H, **H12**), 3.90 (s, 2H, **H20**), 3.68 (s, 3H, **H7**).

**Tabelle 7-3:** Kopplung von Benzylamin (**34**) und ATMO-Säure (**8**) unter Verwendung verschiedener Phosphorsäureanhydride.

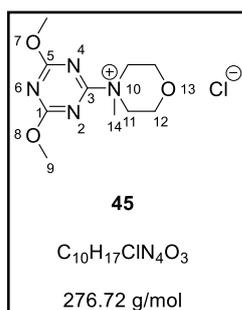
Eintrag	Phosphorsäure-anhydrid	m( <b>8</b> )	m <sub>ist</sub> (Phosphorsäure-anhydrid)	T
1	<b>42</b>	20.3 mg	32.2 mg	RT
2	<b>42</b>	19.8 mg	32.6 mg	50 °C
3	<b>43</b>	20.3 mg	41.5 mg	RT
4	<b>43</b>	19.8 mg	40.0 mg	50 °C
5	<b>44</b>	20.3 mg	76.7 mg	RT
6	<b>44</b>	20.3 mg	73.2 mg	50 °C

## 7.4. DMT-MM (**45**) als Kopplungsreagenz

### 7.4.1. Darstellung von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**)<sup>[92]</sup>



**Abbildung 7-12:** Synthese von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**) ausgehend von 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**) und *N*-Methylmorpholin (**47**).



2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (**48**, 965 mg, 5.50 mmol) wird in Tetrahydrofuran (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von *N*-Methylmorpholin (**47**, 0.550 mL, 2.00 mmol) wird die Lösung trüb. Nach einer Stunde wird die Suspension filtriert und der Feststoff mit weiterem Tetrahydrofuran gewaschen. Es wird 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid (**45**) als farbloser Feststoff (1.29 mg, 4.67 mmol, 93% Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 4.54 (m, 2H, **H12**), 4.18 (s, 6H, **H9**), 4.07 (m, 2H, **H12**), 3.86 (m, 4H, **H11**), 3.53 (s, 3H, **H14**).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 4.62 (m, 2H, **H12**), 4.15 (s, 6H, **H9**) 4.14 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H, **H12**), 3.87 (m, 4H, **H11**), 3.52 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H, **H14**).

#### 7.4.2. Etablierung einer HPLC-Analytik

Für die Etablierung einer HPLC-Analytik wird eine C18-Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und Puffer mit einem Gradienten (Tabelle 7-4) verwendet. Zur Erstellung des Puffers wird Kaliumhydroxid (2.57 g, 45.8 mmol) in Wasser (900 mL) gelöst. Es wird mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 4.6 eingestellt und mit Wasser aufgefüllt (1000 mL). Eine Mischung aus ATMO-Säure (**8**, 21.8 mg, 108 μmol), 7-ACA (**3**, 21.7 mg, 79.8 μmol) und Cefotaxim (**1**, 19.7 mg, 43.3 μmol) wird in einer Mischung aus Wasser (10 mL) und Acetonitril (10 mL) suspendiert und mit Zugabe von Triethylamin (50 μL, 359 μmol) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (100 μL) wird mit Puffer (10 mL) verdünnt und mit der beschriebenen Methode analysiert, um die relative Extinktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-5 aufgeführt.

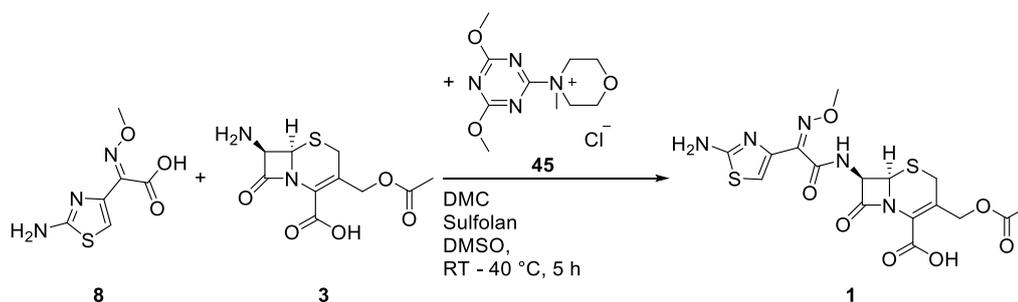
**Tabelle 7-4:** Gradient der HPLC-Analytik.

Zeit [min]	Anteil Puffer [%]	Anteil Acetonitril [%]
0	89.5	10.5
5	30.0	70.0
7	30.0	70.0
9	89.5	10.5
20	89.5	10.5

**Tabelle 7-5:** HPLC-Analytik für ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**).

Substanz	n [μmol]	Retentionszeit [min]	A	A/n	Korrekturfaktor
<b>8</b>	108.0	1.65	44.5	0.412	1.52
<b>3</b>	79.8	2.29	28.4	0.356	1.76
<b>1</b>	43.3	4.11	27.1	0.626	1.00

### 7.4.3. Amidierung von ATMO-Säure (8) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von DMT-MM (45) in verschiedenen Lösungsmitteln



**Abbildung 7-13:** Umsetzung von ATMO-Säure (8) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von DMT-MM (45) als Kopplungsreagenz.

ATMO-Säure (8, 100 µmol) wird in DMSO (2.5 mL) oder Sulfolan (2.5 mL) oder Dimethylcarbonat (2.5 mL) suspendiert. In DMSO bildet sich eine klare Lösung, während in den anderen Lösungsmitteln Suspensionen vorliegen. Nach Zugabe von 7-ACA (3, 110 µmol) und DMT-MM (45, 110 µmol) wird fünf Stunden bei Raumtemperatur oder 40 °C gerührt. Anschließend wird ein Teil der Suspension (500 µL) mit Acetonitril (2.5 mL) versetzt. Nach Zugabe von Puffer (22 mL) wird der Umsatz mittels HPLC-Analytik bestimmt.

**Tabelle 7-6:** Einwaagen für die Amidierung von ATMO-Säure (8) mit 7-ACA (3) unter Verwendung von DMT-MM (45) in verschiedenen Lösungsmitteln.

Eintrag	T	Lösungs- mittel	m(8) [mg]	m(3) [mg]	m(45) [mg]	A (8)	A (3)	A (1)	Umsatz [%]
1	RT	DMSO	20.2	29.9	30.9	29.9	11.0	40.9	47
2	RT	DMC	20.0	30.1	30.8	133.3	138.8	4.4	2
3	40 °C	DMSO	20.2	30.1	30.8	74.1	18.1	69.9	38
4	40 °C	Sulfolan	20.3	30.4	30.8	31.4	32.7	19.3	29
5	40 °C	DMC	20.5	30.1	30.6	55.7	55.7	26.1	24

## 7.5. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz

### 7.5.1. Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz

Aufgrund der Überlagerung der Signale von 4-Toluolsulfonsäure (50) und Cefotaxim (1) wird der Gradient der bereits beschriebenen Analytik (Tabelle 7-4) verändert, um diese beiden Signale zu trennen. Für die Etablierung einer qualitativen HPLC-Analytik wird eine C18-Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und Puffer mit einem Gradienten (Tabelle 7-7) verwendet. Zur Erstellung des Puffers wird Kaliumhydroxid (2.57 g, 45.8 mmol) in Wasser (900 mL) gelöst. Es wird mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 4.6 eingestellt und mit Wasser aufgefüllt (1000 mL). Eine Mischung aus ATMO-Säure (8), 7-ACA (3) und Cefotaxim (1) wird in einer Mischung aus Wasser (10 mL) und Acetonitril (10 mL) suspendiert und mit Zugabe von Triethylamin (50 µL, 359 µmol) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (100 µL) wird mit Puffer (10 mL) verdünnt und mit der beschriebenen Methode analysiert, um die relative Extinktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-8 aufgeführt.

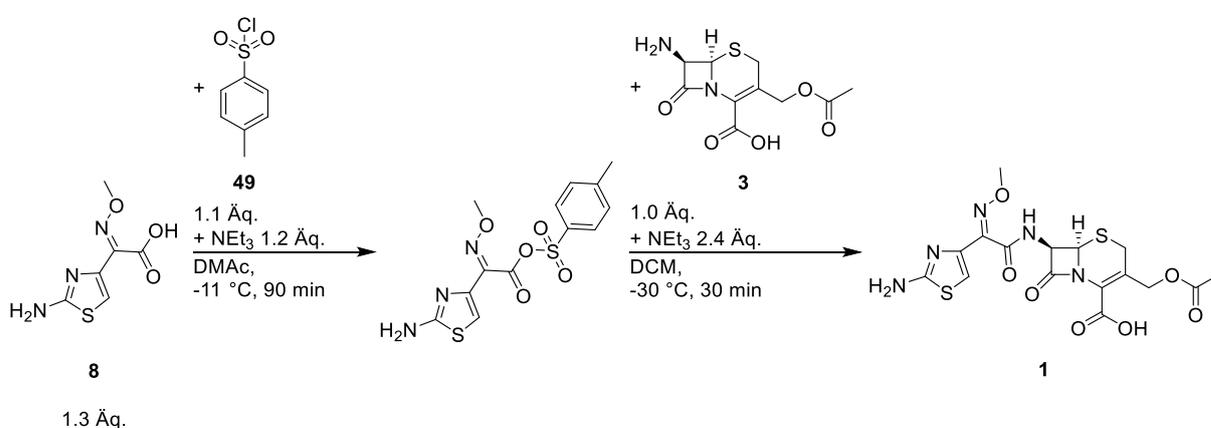
**Tabelle 7-7:** Gradient der HPLC-Analytik.

Zeit [min]	Anteil Puffer [%]	Anteil Acetonitril [%]
0	89.5	10.5
6	66.0	34.0
9	30.0	70.0
11	30.0	70.0
15	89.5	10.5
20	89.5	10.5

**Tabelle 7-8:** HPLC-Analytik für ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**).

Substanz	Retentionszeit [min]
<b>8</b>	1.67
<b>3</b>	2.27
<b>1</b>	5.11

### 7.5.2. Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz<sup>[100]</sup>

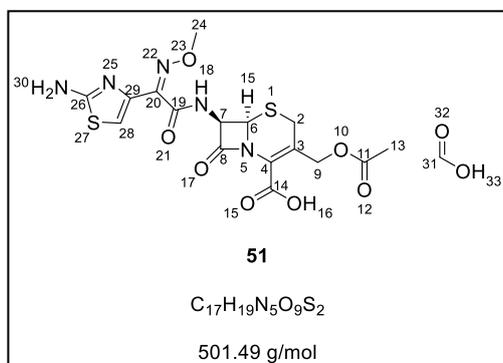


**Abbildung 7–14:** Synthese von Cefotaxim (**1**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**).

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.4 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. In einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer wird ATMO-Säure (**8**, 6.97 g, 34.6 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Dimethylacetamid (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) innerhalb von fünf Minuten zugetropft. Die Suspension wird auf -11 °C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei -11 °C gehalten wird. Die gelbe, trübe Suspension wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) in Dichlormethan (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf 0 °C wird Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugetropft. Es entsteht eine klare, orange Lösung, die auf -50 °C gekühlt wird. Im Anschluss wird bei -30 °C die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (2 µL) in Acetonitril (750 µL) und Wasser (750 µL) gelöst

und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-9) untersucht. Der Umsatz wird über die Umsetzung der verwendeten ATMO-Säure (**8**) bestimmt.

Zu der Reaktionsmischung wird eine Mischung aus Ameisensäure (14.8 mL) und Wasser (13.5 mL), die auf -5 °C vorgekühlt ist, innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Temperatur auf -12 °C ansteigt. Es wird mit Wasser (2 mL) und Dichlormethan (4 mL) die Wandung gespült und im Anschluss Wasser (15 mL) innerhalb von 14 Minuten zugetropft, wobei die Temperatur auf -5 °C ansteigt. Nach 90 Minuten Rühren wird Wasser (82.5 mL) innerhalb von 17 Minuten zugetropft und 190 Minuten bei 5 °C nachgerührt. Ein farbloser Feststoff fällt aus und wird mittels Filtration isoliert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wird das Cefotaxim-Formiataddukt **51** als farbloser Feststoff (12.40 g, 24.7 mmol, 90% Ausbeute) erhalten.



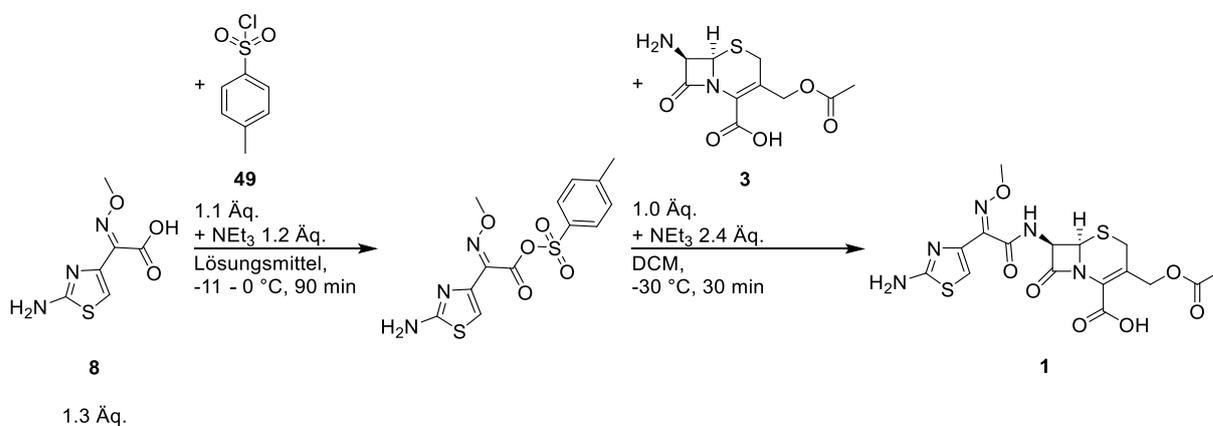
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.61 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, **H18**), 8.13 (s, 1H, **H31**), 7.23 (s, 2H, **H30**), 6.74 (s, 1H, **H28**), 5.79 (dd,  $J$  = 8.2, 4.8 Hz, 1H, **H7**), 5.15 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H, **H6**), 4.84 (dd,  $J$  = 152.0, 12.8 Hz, 2H, **H9**), 3.84 (s, 3H, **H24**), 3.56 (m, 2H, **H2**), 2.04 (s, 3H, **H13**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit einem Referenzprodukt überein.

**Tabelle 7-9:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	5.4	8.3
<b>1</b>	36.1	36.1
Umsatz		100%

### 7.5.3. AAV 1: Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Austausch von Dimethylacetamid<sup>[100]</sup>



**Abbildung 7–15:** Synthese von Cefotaxim (1) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Ersatz von Dimethylacetamid.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (49, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in verschiedenen Lösungsmitteln suspendiert. Nach kurzer Zeit soll eine klare Lösung erhalten werden. In einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer wird ATMO-Säure (8, 7.0 g, 34.8 mmol) in dem identischen Lösungsmittel (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Lösungsmittel (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Nach Spülen der Wandungen mit dem Lösungsmittel (2.0 mL) wird die Suspension auf -11 °C heruntergekühlt. Bei Lösungsmitteln, mit denen diese Temperatur nicht erreicht werden kann, wird bei einer entsprechend höheren Temperatur gearbeitet. Bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur konstant gehalten wird. Die gelbe, trübe Lösung wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel 7-ACA (3, 7.5 g, 27.5 mmol) in Dichlormethan (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf 0 °C wird Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugetropft. Es entsteht eine klare Lösung, die auf -50 °C gekühlt wird. Im Anschluss wird bei -30 °C die Reaktionsmischung des gemischten Anhydrids innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (2 µL) in Acetonitril (750 µL) und Wasser (750 µL) gelöst und mittels HPLC-Analytik untersucht. Der Umsatz wird über die Umsetzung der verwendeten ATMO-Säure (8) bestimmt.

### 7.5.3.1. Dimethylformamid als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylformamid (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 6.99 g, 34.7 mmol) wird in Dimethylformamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine trübe, farblose Suspension mit viel Feststoff erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe Lösung zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.49 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-10) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-10:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Dimethylformamid als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	24.3	11.8
<b>1</b>	11.8	45.0
Umsatz		30%

### 7.5.3.2. N-Methyl-2-pyrrolidon als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.4 mmol) wird in N-Methyl-2-pyrrolidon (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in N-Methyl-2-pyrrolidon (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine trübe, gelbe Suspension erhalten. Da die Suspension bei -11 °C sehr hochviskos ist, wird weiteres N-Methyl-2-pyrrolidon (10.5 mL) zugegeben. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht trübe, gelbe, hochviskose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-11) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-11:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit *N*-Methyl-2-pyrrolidon als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	13.9	21.3
<b>1</b>	45.0	45.0
Umsatz	85%	

### 7.5.3.3. Acetonitril als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Acetonitril (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.00 g, 34.8 mmol) wird in Acetonitril (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-12) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-12:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Acetonitril als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	52.6	80.5
<b>1</b>	6.9	6.9
Umsatz	10%	

#### 7.5.3.4. Tetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.5 mmol) wird in Tetrahydrofuran (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.8 mmol) wird in Tetrahydrofuran (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.50 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-13) untersucht.

**Tabelle 7-13:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Tetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	63.6	97.3
<b>1</b>	6.7	6.7
Umsatz		8%

#### 7.5.3.5. Methyltetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in Methyltetrahydrofuran (9.75 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.01 g, 34.8 mmol) wird in Methyltetrahydrofuran (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.5 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-14) untersucht.

**Tabelle 7-14:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methyltetrahydrofuran als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	54.7	83.7
<b>1</b>	4.3	4.3
Umsatz		6%

#### 7.5.3.6. Aceton als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.4 mmol) wird in Aceton (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.01 g, 34.8 mmol) wird in Aceton (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.50 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-15) untersucht.

**Tabelle 7-15:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Aceton als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	93.9	143.7
<b>1</b>	9.5	9.5
Umsatz		8%

#### 7.5.3.7. Methyl-*iso*-butylketon als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in Methyl-*iso*-butylketon (9.75 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.01 g, 34.8 mmol) wird in Methyl-*iso*-butylketon (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin

(4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.5 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-16) untersucht.

**Tabelle 7-16:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methyl-*iso*-butylketon als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	102.6	157.0
<b>1</b>	10.4	10.4
Umsatz		8%

#### 7.5.3.8. Ethylacetat als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.04 g, 31.7 mmol) wird in Ethylacetat (9.75 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.04 g, 35.0 mmol) wird in Ethylacetat (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine farblose Suspension mit viel Feststoff zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-17) untersucht.

**Tabelle 7-17:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Ethylacetat als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	65.0	99.5
<b>1</b>	0	0
Umsatz	0%	

#### 7.5.3.9. Tetramethylharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in Tetramethylharnstoff (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Tetramethylharnstoff (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei 0 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht gelbe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.50 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-18) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-18:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Tetramethylharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	24.3	37.2
<b>1</b>	24.8	24.8
Umsatz	50%	

### 7.5.3.10. Dimethylpropylenharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in Dimethylpropylenharnstoff (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylpropylenharnstoff (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine leicht gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei 0 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe, hoch viskose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-19) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-19:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Dimethylpropylenharnstoff als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	17.6	26.9
<b>1</b>	32.1	32.1
Umsatz		69%

### 7.5.3.11. Dimethylcarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.4 mmol) wird in Dimethylcarbonat (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 6.98 g, 34.8 mmol) wird in Dimethylcarbonat (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei 0 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht gelbe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.54 g, 27.7 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-20) untersucht.

**Tabelle 7-20:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Dimethylcarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	19.3	29.5
<b>1</b>	0	0
Umsatz	0%	

#### 7.5.3.12. Propylencarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in Propylencarbonat (13 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 6.98 g, 34.8 mmol) wird in Propylencarbonat (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine braune Lösung zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.54 g, 27.7 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die braune Lösung des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-21) untersucht.

**Tabelle 7-21:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Propylencarbonat als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	29.7	45.4
<b>1</b>	27.5	27.5
Umsatz	48%	

#### 7.5.3.13. ε-Caprolacton als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.98 g, 31.4 mmol) wird in ε-Caprolacton (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.00 g, 34.8 mmol) wird in ε-Caprolacton (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine

farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei 0 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht gelbe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.47 g, 27.4 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-22) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-22:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit  $\epsilon$ -Caprolacton als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	13.6	20.8
<b>1</b>	27.8	27.8
Umsatz		72%

#### 7.5.3.14. Cyrene als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.99 g, 31.4 mmol) wird in Cyrene (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Cyrene (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei 0 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe, hoch viskose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.50 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-23) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-23:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Cyrene als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	55.7	85.2
<b>1</b>	29.4	29.4
Umsatz		32%

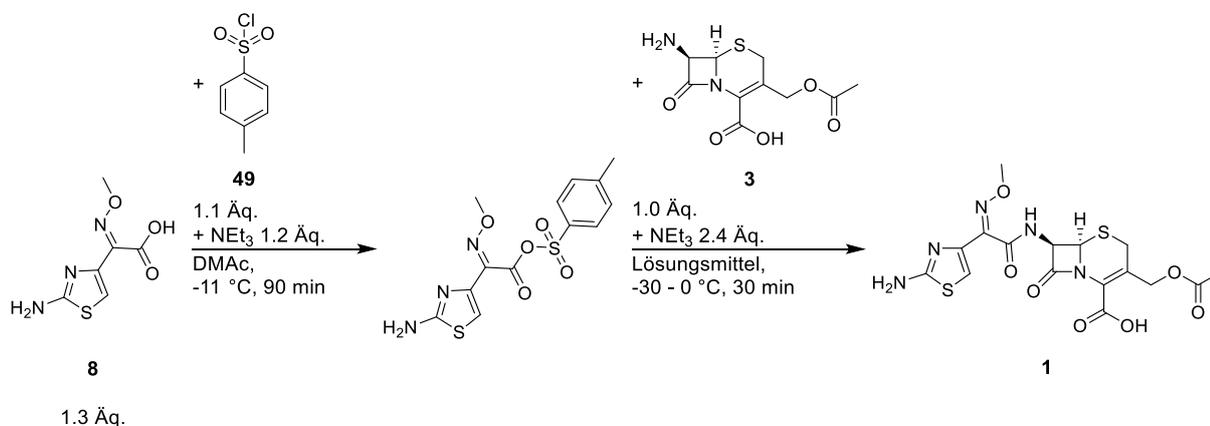
#### 7.5.3.15. 1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat als Ersatz für Dimethylacetamid

Es wird analog zu AAV 1 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in 1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat (22.75 mL) suspendiert. Es wird dabei eine leicht gelbe Suspension mit viel Feststoff erhalten. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in 1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine farblose Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugegeben, wobei etwas Feststoff nicht transferiert werden kann. Es wird 90 Minuten gerührt und eine gelartige, gelbe, fadenziehende Suspension zu erhalten. Es wird Dichlormethan (30 mL) zugegeben, um eine tropfbare Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-24) untersucht.

**Tabelle 7-24:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat als Ersatz für Dimethylacetamid.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	29.8	45.6
<b>1</b>	13.8	13.8
Umsatz		29%

### 7.5.4. AAV 2: Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Austausch von Dichlormethan<sup>[100]</sup>



**Abbildung 7–16:** Synthese von Cefotaxim (1) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) unter Ersatz von Dichlormethan.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. In einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer wird ATMO-Säure (**8**, 7.0 g, 34.8 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Dimethylacetamid (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Nach Spülen der Wandungen mit Dimethylacetamid (2.0 mL) wird die Suspension auf -11 °C heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei -11 °C gehalten wird. Die gelbe, trübe Suspension wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel 7-ACA (**3**, 7.5 g, 27.5 mmol) im Lösungsmittel (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf 0 °C wird Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugetropft. Es entsteht eine klare, orange Lösung, die auf -50 °C gekühlt wird. Im Anschluss wird bei -30 °C die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel finden die genannten Schritte im Eisbad statt. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (2 µL) in Acetonitril (750 µL) und Wasser (750 µL) gelöst und mittels HPLC-Analytik untersucht.

#### 7.5.4.1. Methanol als Ersatz für Dichlormethan

Es wird analog zu AAV 2 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.03 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine leicht gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe, hoch viskose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Methanol (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-25) untersucht.

**Tabelle 7-25:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als Ersatz für Dichlormethan.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	16.2	24.8
<b>1</b>	75.8	75.8
Umsatz		95%

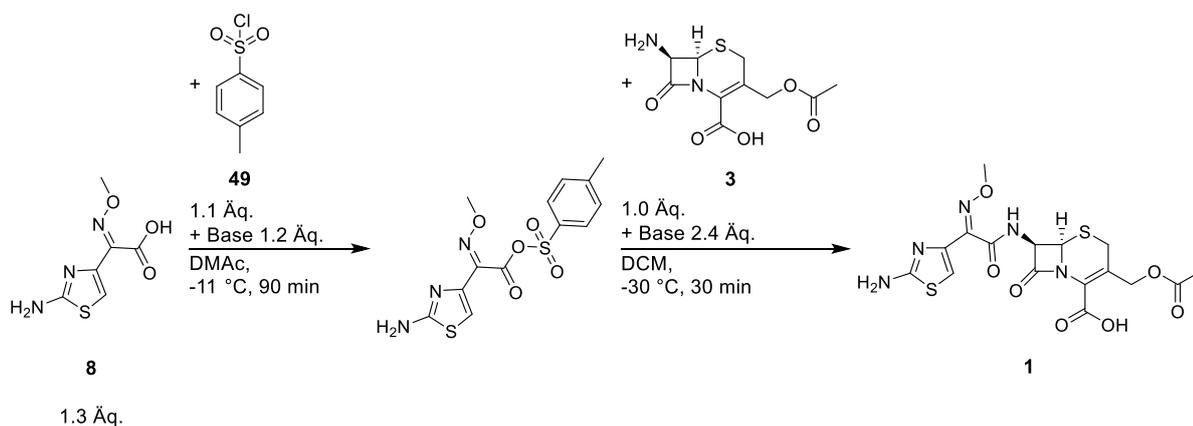
#### 7.5.4.2. Wasser als Ersatz für Dichlormethan

Es wird analog zu AAV 2 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) gelöst. ATMO-Säure (**8**, 7.00 g, 34.8 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) wird eine leicht gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe, hoch viskose Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.51 g, 27.6 mmol) wird in Wasser (62 mL) unter Zugabe von Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-26) untersucht.

**Tabelle 7-26:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Wasser als Ersatz für Dichlormethan.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	27.8	42.5
<b>1</b>	52.9	52.9
Umsatz	70%	

### 7.5.5. AAV 3: Synthese von Cefotaxim (**1**) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) unter Austausch von Triethylamin



**Abbildung 7–17:** Synthese von Cefotaxim (**1**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) unter Ersatz von Triethylamin.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. In einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer wird ATMO-Säure (**8**, 7.0 g, 34.8 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Dimethylacetamid (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird eine organische Base (33.7 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Nach Spülen der Wandungen mit Dimethylacetamid (2.0 mL) wird die Suspension auf -11 °C heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei -11 °C gehalten wird. Die gelbe, trübe Lösung wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel 7-ACA (**3**, 7.5 g, 27.5 mmol) in Dichlormethan (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf 0 °C wird die organische Base (9.4 mL, 67.4 mmol)

zutropft. Es wird auf -50 °C gekühlt und bei -30 °C das gemischte Anhydrid innerhalb von 30 Minuten zutropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (2 µL) in Acetonitril (750 µL) und Wasser (750 µL) gelöst und mittels HPLC-Analytik untersucht.

#### 7.5.5.1. DBU als Ersatz für Triethylamin

Es wird analog zu AAV 3 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.01 g, 34.8 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von DBU (5.0 mL, 33.7 mmol) wird eine gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zutropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe Lösung zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von DBU (10.0 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt, wobei eine orange-braune Lösung erhalten wird. Die gelbe Lösung des gemischten Anhydrids wird zutropft, nachgerührt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-27) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-27:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit DBU als Ersatz für Triethylamin.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	5.7	8.7
<b>1</b>	2.6	2.6
Umsatz		29%

#### 7.5.5.2. Tetramethylguanidin als Ersatz für Triethylamin

Es wird analog zu AAV 3 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.03 g, 31.6 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Tetramethylguanidin (4.2 mL, 33.7 mmol) wird eine leicht gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zutropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht gelbe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Tetramethylguanidin (8.5 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt, wobei eine orange Lösung erhalten wird. Die gelbe Lösung des gemischten Anhydrids wird zutropft und

nachgerührt. Die gelb-bräunliche Suspension wird mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-28) untersucht. Es konnten neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) weitere unbekannte Signale detektiert werden.

**Tabelle 7-28:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Tetramethylguanidin als Ersatz für Triethylamin.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	34.6	52.9
<b>1</b>	22.8	22.8
Umsatz		38%

### 7.5.5.3. Di-*iso*-propylamin als Ersatz für Triethylamin

Es wird analog zu AAV 3 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.03 g, 31.6 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Di-*iso*-propylamin (4.75 mL, 33.7 mmol) wird eine gelbe Suspension mit farblosem Feststoff erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe Suspension mit farblosem Feststoff zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Di-*iso*-propylamin (9.5 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt, wobei eine orange Lösung erhalten wird. Die gelbe Lösung des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und die orange Suspension mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-29) untersucht. Es konnte neben den Signalen von ATMO-Säure (**8**), 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) noch ein weiteres unbekanntes Signal detektiert werden.

**Tabelle 7-29:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Di-*iso*-propylamin als Ersatz für Triethylamin.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	44.2	67.6
<b>1</b>	16.2	16.2
Umsatz		24%

#### 7.5.5.4. Dicyclohexylamin als Ersatz für Triethylamin

Es wird analog zu AAV 3 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.03 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Dicyclohexylamin (6.7 mL, 33.7 mmol) wird eine gelbe, trübe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine gelbe, trübe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.49 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Dicyclohexylamin (13.4 mL, 67.4 mmol) gelöst und auf -30 °C gekühlt, wobei eine klare, orange Lösung erhalten wird, die nach kurzer Zeit trüb wird. Die gelbe Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und die orange Suspension mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-30) untersucht.

**Tabelle 7-30:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Dicyclohexylamin als Ersatz für Triethylamin.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	16.6	25.4
<b>1</b>	56.2	56.2
Umsatz		87%

#### 7.5.5.5. Pyridin als Ersatz für Triethylamin

Es wird analog zu AAV 3 verfahren. 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. ATMO-Säure (**8**, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (insgesamt 21 mL) suspendiert. Nach Zugabe von Pyridin (2.72 mL, 33.7 mmol) wird eine leicht gelbe Suspension erhalten. Die Lösung des Säurechlorids **49** wird bei -11 °C zugetropft und 90 Minuten gerührt, um eine leicht gelbe Suspension zu erhalten. 7-ACA (**3**, 7.49 g, 27.5 mmol) wird in Dichlormethan (62 mL) unter Zugabe von Pyridin (5.44 mL, 67.4 mmol) suspendiert. Nach 20 Minuten Rühren kann keine Lösung erhalten werden, sodass Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugegeben wird, um eine klare, orange Lösung zu erhalten, die auf -30 °C gekühlt wird. Die gelbe Suspension des gemischten Anhydrids wird zugetropft, nachgerührt und die orange Suspension mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-31) untersucht.

**Tabelle 7-31:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Pyridin als Ersatz für Triethylamin.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	20.5	31.4
<b>1</b>	6.8	6.8
Umsatz		22%

## 7.6. Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Plattformprozess

### 7.6.1. Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49)

Für die Etablierung einer HPLC-Analytik wird eine C18-Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und verdünnter Trifluoressigsäurelösung (TFA, 0.05%) mit einem Gradienten (Tabelle 7-32) verwendet. Eine Mischung aus ATMO-Säure (**8**, 41.4 mg, 206  $\mu\text{mol}$ ), AMCA (**53**, 41.2 mg, 169  $\mu\text{mol}$ ) und Cefpodoxim (**4**, 40.0 mg, 93.5  $\mu\text{mol}$ ) wird in Wasser (25 mL) unter Zugabe von Triethylamin (0.1 mL) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (200  $\mu\text{L}$ ) wird mit Wasser (1.3 mL) verdünnt und mit der beschriebenen Methode analysiert, um die relative Extinktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-33 aufgeführt.

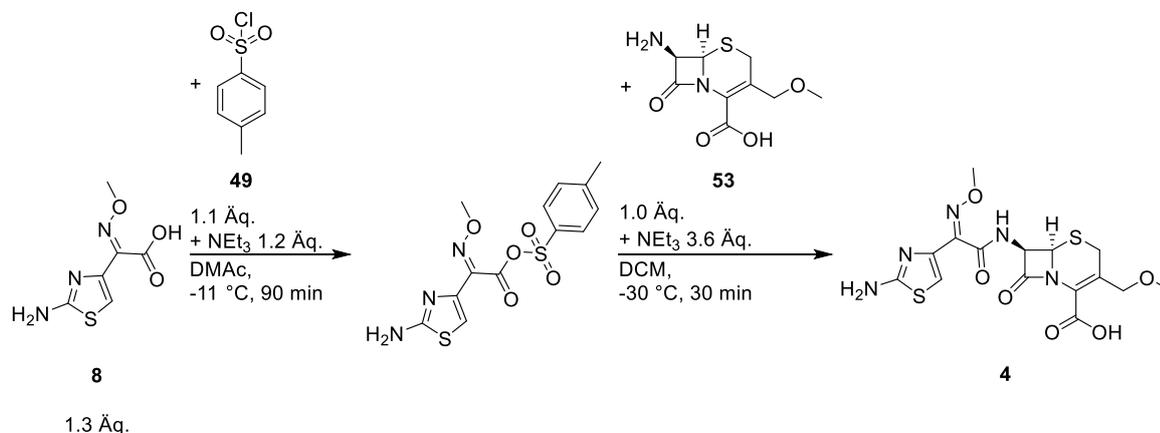
**Tabelle 7-32:** Gradient der HPLC-Analytik.

Zeit [min]	Anteil TFA-Lösung [%]	Anteil Acetonitril [%]
0	97	3
1	97	3
4	88	12
8	75	25
10	70	30
16	35	65
23	97	3
30	97	3

**Tabelle 7-33:** HPLC-Analytik für ATMO-Säure (**8**), AMCA (**53**) und Cefpodoxim (**4**).

Substanz	n [ $\mu\text{mol}$ ]	Retentionszeit [min]	A	A/n	Korrekturfaktor
<b>8</b>	206	1.87	63.2	0.307	1.36
<b>53</b>	169	2.26	30.3	0.179	2.34
<b>4</b>	93.5	8.73	39.2	0.419	1.00

## 7.6.2. Synthese von Cefpodoxim (4) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz



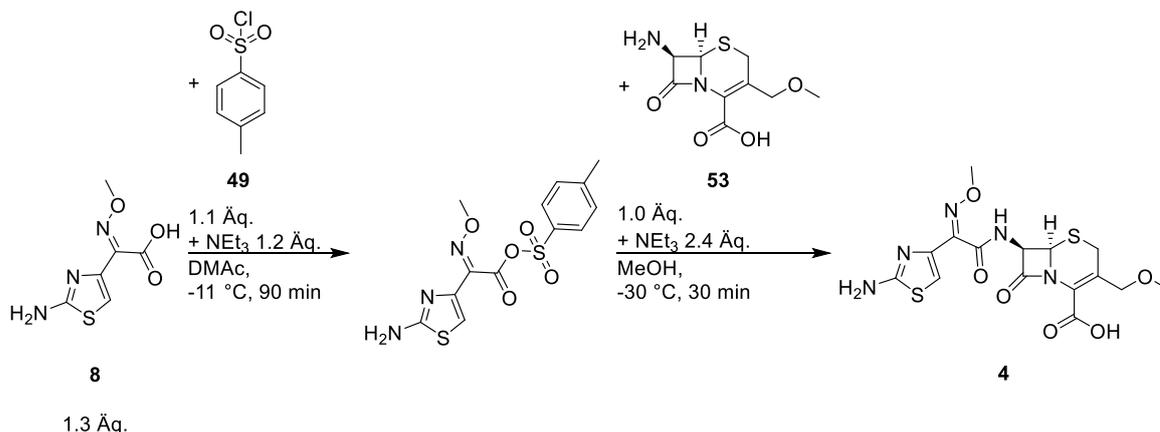
**Abbildung 7–18:** Synthese von Cefpodoxim (**4**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**).

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. Es wird ATMO-Säure (**8**, 7.00 g, 34.8 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Lösungsmittel (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Nach Spülen der Wandungen mit Dimethylacetamid (2.0 mL) wird die Suspension auf  $-11\text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei  $-11\text{ }^\circ\text{C}$  gehalten wird. Die gelbe, trübe Lösung wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel AMCA (**53**, 6.74 g, 27.6 mmol) in Dichlormethan (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  wird Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugetropft. Da keine klare Lösung entstanden ist, wird weiteres Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) zugetropft. Es entsteht eine trübe, orange Suspension mit wenig Feststoff, die auf  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt wird. Im Anschluss wird bei  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung ( $2\text{ }\mu\text{L}$ ) in Acetonitril ( $500\text{ }\mu\text{L}$ ) und Wasser ( $500\text{ }\mu\text{L}$ ) gelöst und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-34) untersucht.

**Tabelle 7-34:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoxim (**4**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	31.4	42.7
<b>4</b>	76.6	76.6
Umsatz		81%

### 7.6.3. Synthese von Cefpodoxim (**4**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel



**Abbildung 7–19:** Synthese von Cefpodoxim (**4**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.02 g, 31.6 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. Es wird ATMO-Säure (**8**, 7.03 g, 34.9 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Lösungsmittel (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (4.7 mL, 33.7 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Die Suspension wird auf -11 °C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei -11 °C gehalten wird. Die gelbe, trübe Suspension wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel AMCA (**53**, 6.70 g, 27.4 mmol) in Methanol (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf 0 °C wird Triethylamin (9.4 mL, 67.4 mmol) zugetropft. Die klare, orange Lösung wird auf -50 °C gekühlt und im Anschluss wird bei -30 °C die Suspension

des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (2  $\mu\text{L}$ ) in Acetonitril (500  $\mu\text{L}$ ) und Wasser (500  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-35) untersucht.

**Tabelle 7-35:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoxim (**4**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>8</b>	31.1	42.3
<b>4</b>	91.3	91.3
Umsatz	86%	

#### 7.6.4. Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**)

Für die Etablierung einer HPLC-Analytik wird eine C18-Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und *Sörensen*-Puffer mit einem Gradienten (Tabelle 7-36) verwendet. Der *Sörensen*-Puffer wird durch Lösen von Kaliumdihydrogenphosphat (4.35 g, 32.0 mmol) und Dinatriumhydrogenphosphat (182 mg, 1.28 mmol) in Wasser (1000 mL) erhalten. Eine Mischung aus der Seitenkette (*Z*)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-(((1-*tert*-butoxy)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)oxy)imino)-essigsäure (**54**, 21.26 mg, 64.5  $\mu\text{mol}$ ), des  $\beta$ -Lactams PYCA-Hydroiodidmonohydrat (**55**, 16.08 mg, 36.8  $\mu\text{mol}$ ) und Cefprozil (**52**) als Trisolvat von Wasser, Methanol und Dichlormethan (20.08 mg, 27.2  $\mu\text{mol}$ ) wird in einer Mischung aus Acetonitril (5 mL) und Wasser (1 mL) unter Zugabe von Triethylamin (50  $\mu\text{L}$ ) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (200  $\mu\text{L}$ ) wird mit Acetonitril (1.2 mL) verdünnt und mit der beschriebenen Methode analysiert, um die relative Extinktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-37 aufgeführt.

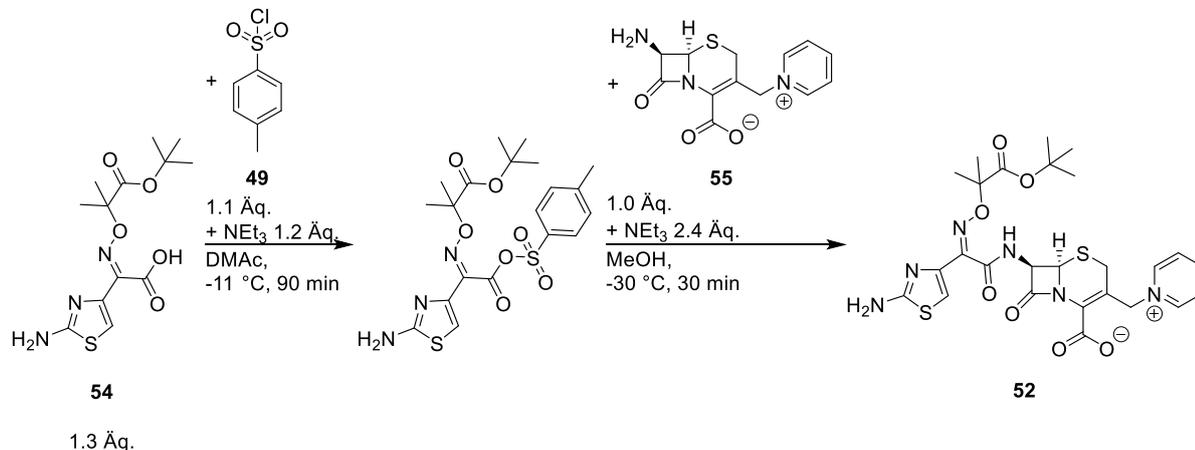
**Tabelle 7-36:** Gradient der HPLC-Analytik.

Zeit [min]	Anteil Sørensen- Puffer [%]	Anteil Acetonitril [%]
0	93.8	6.2
20	44.5	55.5
26	44.5	55.5
27	93.8	6.2
30	93.8	6.2

**Tabelle 7-37:** HPLC-Analytik für die Seitenkette **54**, PYCA (**55**) und Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**).

Substanz	n [ $\mu$ mol]	Retentionszeit [min]	A	A/n	Korrekturfaktor
<b>54</b>	64.6	11.81	72.3	1.119	2.22
<b>55</b>	36.8	1.78	62.8	1.707	1.46
<b>52</b>	27.2	13.11	67.7	2.489	1.00

### 7.6.5. Synthese von Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel



**Abbildung 7–20:** Synthese von Ceftazidim-*tert*-butylester (**52**) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 4.00 g, 21.0 mmol) wird in Dimethylacetamid (4.4 mL) suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. Es wird die Seitenkette **54** (7.63 g, 23.2 mmol) in Dimethylacetamid (7 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Lösungsmittel (7 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (3.13 mL, 22.6 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Nach Spülen der Wandungen mit Dimethylacetamid (1.0 mL) wird die Suspension auf  $-11\text{ °C}$  heruntergekühlt. Bei dieser Temperatur wird die Lösung des Säurechlorids **49** innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei  $-11\text{ °C}$  gehalten wird. Die farblose, trübe Suspension wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel PYCA-Hydroiodidmonohydrat (**55**, 8.00 g, 18.3 mmol) in Methanol (42 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer suspendiert wird. Nach Kühlen auf  $0\text{ °C}$  wird Triethylamin (6.3 mL, 45.4 mmol) zugetropft. Es entsteht eine orange Lösung, die auf  $-50\text{ °C}$  gekühlt wird. Im Anschluss wird bei  $-30\text{ °C}$  die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (20  $\mu\text{L}$ ) in Acetonitril (1 mL) gelöst und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-38) untersucht.

**Tabelle 7-38:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefprozid-*tert*-butylester (**52**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>54</b>	24.3	53.9
<b>52</b>	116.0	116.0
Umsatz		86%

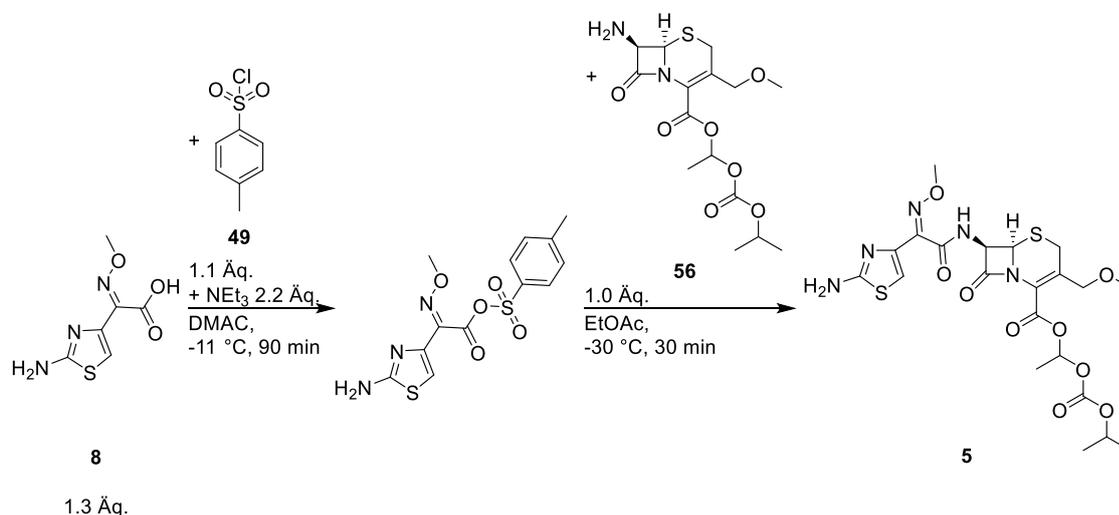
### 7.6.6. Etablierung einer HPLC-Analytik für die Synthese von Cefprozidproxetil (**5**) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**)

Für die Etablierung einer HPLC-Analytik wird eine C18-Säule mit einem Gemisch aus Acetonitril und Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) mit einem Anteil von 40% Acetonitril verwendet. Eine Mischung aus AMCA-Proxetil (**56**, 20.5 mg, 54.8 µmol) und Cefprozidproxetil (**5**, 20.4 mg, 36.6 µmol) wird in Acetonitril (10 mL) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (200 µL) wird mit Acetonitril (1.2 mL) verdünnt und mit der beschriebenen Methode analysiert, um die relative Extinktion zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-39 aufgeführt.

**Tabelle 7-39:** HPLC-Analytik für AMCA-Proxetil (**56**) und Cefprozidproxetil (**5**).

Substanz	n [µmol]	Retentionszeit [min]	A	A/n	Korrekturfaktor
<b>56</b>	54.8	8.50 + 9.08	68.1	1.243	3.06
<b>5</b>	36.6	11.56 + 12.86	139.4	3.809	1.00

### 7.6.7. Synthese von Cefpodoximproxetil (5) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz mit Ethylacetat als zweitem Lösungsmittel



**Abbildung 7–21:** Synthese von Cefpodoximproxetil (5) über die Ausbildung eines gemischten Anhydrids mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) mit Ethylacetat als zweitem Lösungsmittel.

4-Toluolsulfonsäurechlorid (49, 6.01 g, 31.5 mmol) wird in Dimethylacetamid (6.5 mL) suspendiert. Nach kurzer Zeit wird eine klare Lösung erhalten. Es wird ATMO-Säure (8, 7.00 g, 34.8 mmol) in Dimethylacetamid (11 mL) suspendiert. Nach fünf Minuten Rühren wird weiteres Lösungsmittel (10 mL) zugegeben. Nach fünf Minuten weiterem Rühren wird Triethylamin (8.3 mL, 59.9 mmol) innerhalb von zehn Minuten zugetropft. Die Suspension wird auf -11 °C heruntergekühlt und bei dieser Temperatur die Lösung des Säurechlorids 49 innerhalb von 15 Minuten zugetropft, wobei die Innentemperatur bei -11 °C gehalten wird. Die gelbe, trübe Suspension wird 90 Minuten bei dieser Temperatur nachgerührt, wobei parallel AMCA-Proxetil (56, 6.70 g, 27.4 mmol) in Ethylacetat (62 mL) in einem Dreihalskolben mit KPG-Rührer gelöst wird. Die klare Lösung wird auf -50 °C gekühlt und im Anschluss wird bei -30 °C die Suspension des gemischten Anhydrids mit feinem Feststoff innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Nach 30 Minuten Rühren wird ein Teil der Reaktionsmischung (10 µL) in Acetonitril (1000 µL) gelöst und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-40) untersucht. Bei dieser Reaktion wird der Umsatz bezogen auf AMCA-Proxetil (56) bestimmt.

**Tabelle 7-40:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoximproxetil (**5**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Ethylacetat als zweitem Lösungsmittel.

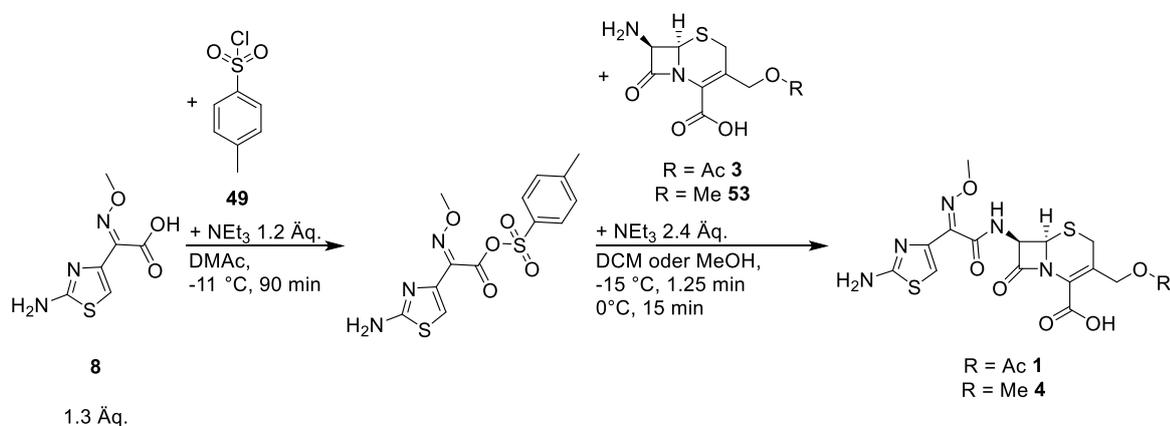
Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
<b>56</b>	8.4	25.7
<b>5</b>	114.8	114.8
Umsatz		82%

## 7.7. Kopplung mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als *Flow*-Reaktion

### 7.7.1. Versuchsaufbau

Für die Lösung des  $\beta$ -Lactambausteins und die Suspension des gemischten Anhydrids wird jeweils ein Silikonschlauch in die peristaltische Pumpe eingelegt und über ein Schlauchverbinder mit einem weiteren Schlauch (0.5 m, 4 mm Innendurchmesser) aus Perfluorethylenpropylen verbunden. Ein Ende des jeweiligen Perfluorethylenpropylen-schlauches wird jeweils für die entsprechend vorbereitete Komponente bereitgelegt. Die zweiten Enden der beiden Perfluorethylenpropylen-schläuche werden jeweils am Ende zu einer Windung (ca. 15 cm Durchmesser) aufgewickelt und an ein gemeinsames Y-Schlauchverbindungsstück angeschlossen. An das dritte Ende des Y-Verbindungsstücks wird ein weiterer Schlauch (1 m, 4 mm Innendurchmesser) aus Perfluorethylenpropylen angesteckt, der zu Windungen (ca. 15 cm Durchmesser) aufgewickelt wird. Die aufgewickelten Windungen vor und nach dem Y-Schlauchverbindungsstück werden an einem Metallring fixiert und in einem Kryostaten platziert.

## 7.7.2. AAV 4: Synthese von Cefotaxim (1) und Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als *Flow*-Reaktion



**Abbildung 7–22:** Synthese von Cefotaxim (1) und Cefpodoxim (4) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als *Flow*-Reaktion.

ATMO-Säure (**8**, 6.98 g, 34.7 mmol) wird in Dimethylacetamid (70 mL) gelöst. Nach Zutropfen von Triethylamin (4.7 mL, 33.9 mmol) und fünf Minuten Rühren wird die Suspension auf  $-11\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Bei dieser Temperatur wird langsam eine Lösung aus 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 6.00 g, 31.5 mmol) in Dimethylacetamid (20 mL) zu der Suspension gegeben. Es wird 90 Minuten bei  $-12\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. In dieser Zeit wird der  $\beta$ -Lactambaustein (27.4 mmol) (7-ACA (**3**) für Cefotaxim (**1**) und AMCA (**53**) für Cefpodoxim (**4**)) in Methanol oder Dichlormethan (90 mL) suspendiert und im Eisbad gekühlt. Nach Zutropfen von Triethylamin (9.4 mL, 67.8 mmol) wird nach kurzem Rühren eine orange Lösung des  $\beta$ -Lactambausteins erhalten. Nach 90 Minuten Rühren der gemischten Anhydridlösung wird ein Schlauch der Schlauchpumpe in der Suspension mit dem gemischten Anhydrid und ein Schlauch in der Lösung des  $\beta$ -Lactambausteins platziert. Der Kryostat hat eine Temperatur von  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Schlauchpumpe wird mit einer Geschwindigkeit von 4.9 mL pro Minute betrieben, was einer Reaktionszeit von ca. 1.25 Minuten entspricht. Wenn keine Luft mehr im System ist, wird der Vorlauf gesammelt und für fünf Minuten aufgefangen. Anschließend können Proben der Reaktion genommen werden. Ein Teil der Reaktionsmischung (4  $\mu\text{L}$ ) wird direkt in Acetonitril (750  $\mu\text{L}$ ) und Wasser (750  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mittels HPLC-Analytik untersucht. Die Reaktionsmischung wird aufgefangen und 15 Minuten bei  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend eine weitere Probe mittels HPLC-Analytik untersucht. Die Umsätze werden über das Verhältnis von 7-ACA (**3**) und Cefotaxim (**1**) bzw. AMCA (**53**) und Cefpodoxim (**4**) bestimmt.

### 7.7.2.1. Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Flow-Reaktion mit Dichlormethan als zweitem Lösungsmittel

Es wird analog zu AAV 4 verfahren. ATMO-Säure (8, 7.04 g, 35.0 mmol) wird in Dimethylacetamid (70 mL) gelöst, mit Triethylamin (4.7 mL, 33.9 mmol) versetzt und auf -11 °C gekühlt. Es wird eine Lösung aus 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49, 6.02 g, 31.6 mmol) in Dimethylacetamid (20 mL) zu der Suspension gegeben und 90 Minuten bei -12 °C gerührt. 7-ACA (3, 7.52 g, 27.6 mmol) wird in Dichlormethan (90 mL) suspendiert und Triethylamin (9.4 mL, 67.8 mmol) zugetropft, um eine orange Lösung zu erhalten. Die Reaktion wird wie beschrieben durchgeführt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-41) untersucht.

**Tabelle 7-41:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (1) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Kopplungsreagenz mit Dichlormethan als zweitem Lösungsmittel.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
Zeit [min]		0		15
3	10.4	18.3	0	0
1	38.8	38.8	66.3	66.3
Umsatz		68%		100%

### 7.7.2.2. Synthese von Cefotaxim (1) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49) als Flow-Reaktion mit Methanol als zweitem Lösungsmittel

Es wird analog zu AAV 4 verfahren. ATMO-Säure (8, 7.02 g, 34.9 mmol) wird in Dimethylacetamid (70 mL) gelöst, mit Triethylamin (4.7 mL, 33.9 mmol) versetzt und auf -11 °C gekühlt. Es wird eine Lösung aus 4-Toluolsulfonsäurechlorid (49, 6.00 g, 31.5 mmol) in Dimethylacetamid (20 mL) zu der Suspension gegeben und 90 Minuten bei -12 °C gerührt. 7-ACA (3, 7.50 g, 27.5 mmol) wird in Methanol (90 mL) suspendiert und Triethylamin (9.4 mL, 67.8 mmol) zugetropft, um eine orange Lösung zu erhalten. Die Reaktion wird wie beschrieben durchgeführt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-42) untersucht.

**Tabelle 7-42:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefotaxim (**1**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
Zeit [min]		0		15
<b>3</b>	10.6	18.7	3.8	6.7
<b>1</b>	29.2	29.2	64.4	64.4
Umsatz		61%		91%

### 7.7.2.3. Synthese von Cefpodoxim (**4**) mit 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als *Flow*-Reaktion mit Methanol als zweitem Lösungsmittel

Es wird analog zu AAV 4 verfahren. ATMO-Säure (**8**, 6.98 g, 34.7 mmol) wird in Dimethylacetamid (70 mL) gelöst, mit Triethylamin (4.7 mL, 33.9 mmol) versetzt und auf -11 °C gekühlt. Es wird eine Lösung aus 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**, 5.98 g, 31.4 mmol) in Dimethylacetamid (20 mL) zu der Suspension gegeben und 90 Minuten bei -12 °C gerührt. AMCA (**53**, 6.69 g, 27.4 mmol) wird in Methanol (90 mL) suspendiert und Triethylamin (9.4 mL, 67.8 mmol) zugetropft, um eine orange Lösung zu erhalten. Die Reaktion wird wie beschrieben durchgeführt und mittels HPLC-Analytik (Tabelle 7-43) untersucht.

**Tabelle 7-43:** HPLC-Analytik für die Synthese von Cefpodoxim (**4**) unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäurechlorid (**49**) als Kopplungsreagenz mit Methanol als zweitem Lösungsmittel.

Verbindung	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]	Fläche [mV · min]	Korrigierte Fläche [mV · min]
Zeit [min]		0		15
<b>53</b>	3.3	7.7	2.3	5.4
<b>4</b>	17.9	17.9	47.4	47.4
Umsatz		70%		90%

## 7.8. Diastereomere von Cefpodoximproxetil (5)

### 7.8.1. Darstellung einer Lösung von 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**) in Toluol<sup>[130]</sup>

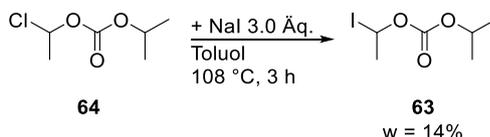
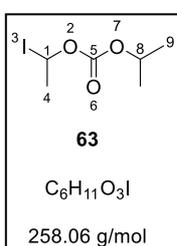


Abbildung 7–23: Darstellung einer 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonatlösung (**63**).



Natriumiodid (4.87 g, 32.5 mmol) wird in Toluol (18 mL) suspendiert und auf 108 °C erhitzt. Innerhalb von sechs Minuten wird 1-Chlorethyl-*iso*-propylcarbonat (**64**, 1.6 mL, 10.7 mmol) zutropft. Während der folgenden drei Stunden Rühren färbt sich die Lösung tief violett. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Wasser (9 mL) zugegeben. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat- (4.5 mL) und gesättigter Natriumthiosulfatlösung (4.5 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**) als farblose Lösung in Toluol (18 mL, *w* = 14%) erhalten. Von einem Teil (100 mg) dieser Lösung werden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Als Rückstand (14 mg) wird 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.79 (qd,  $J$  = 6.1, 1.6 Hz, 1H, **H1**), 4.97 (pd,  $J$  = 6.3, 1.6 Hz, 1H, **H8**), 2.26 (dd,  $J$  = 6.2, 1.6 Hz, 3H, **H4**), 1.36 (ddd,  $J$  = 10.4, 6.3, 1.6 Hz, 6H, **H9**).

## 7.8.2. Darstellung von AMCA-Proxetil (**56**)<sup>[47]</sup>

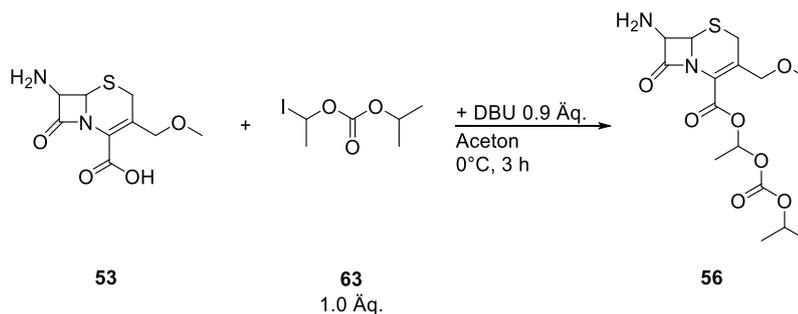
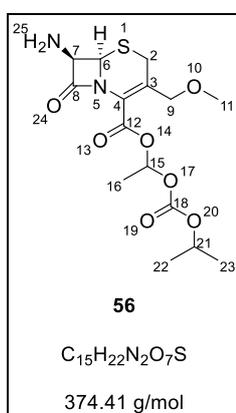


Abbildung 7–24: Synthese von AMCA-Proxetil (**56**).



AMCA (**53**, 5.02 g, 20.6 mmol) wird in Aceton (50 mL) suspendiert und auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Nach Zugabe von DBU (2.82 mL, 18.9 mmol) wird zwei Stunden bei  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Bei  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird eine Toluollösung von 1-Iodethyl-*iso*-propylcarbonat (**63**, 39.8 g,  $w = 14\%$ , 21.6 mmol) zugegeben. Es wird drei Stunden im Eisbad gerührt und anschließend der farblose Feststoff aus der gelben Lösung abgesaugt. Das Filtrat wird zu einer eisgekühlten Mischung von Wasser (70 mL) und konzentrierter Salzsäure (6.55 mL) gegeben und 30 Minuten gerührt. Nach Abtrennen der

wässrigen Phase wird die organische Phase mit Wasser (10 mL) extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Toluol (3 x 10 mL) gewaschen und mit Aktivkohle (1.28 g) versetzt. Nach zehn Minuten Rühren wird die Aktivkohle filtriert und der Rückstand mit Wasser (15 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Mutterlaugen werden mit Ethylacetat (100 mL) versetzt und mit Natronlauge (6 M) auf einen pH-Wert von 8.2 eingestellt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (25 mL) und Wasser (25 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und AMCA-Proxetil (**56**) als braunes, hochviskoses Öl (7.37 g, 19.7 mmol, 96% Ausbeute) erhalten. Das Diastereomerenverhältnis beträgt 51/49 *S/R*.

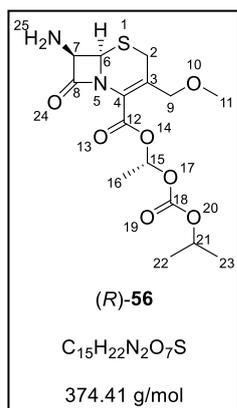
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 6.93$  (dq,  $J = 43.6, 5.4$  Hz, 1H, **H15**), 4.91 (m, 2H, **H6+21**), 4.74 (dd,  $J = 7.8, 5.0$  Hz, 1H, **H7**), 4.28 (m, 2H, **H9**), 3.51 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H, **H2**), 3.30 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H, **H11**), 1.56 (d,  $J = 5.4$  Hz, 3H, **H16**), 1.30 (m, 6H, **H22+23**).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 8.45 min ((*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**)), 9.05 min ((*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**)).

### 7.8.3. Isolierung der AMCA-Proxetil-Diastereomere

Es wird AMCA-Proxetil (**56**, 200 mg, 534  $\mu\text{mol}$ ) mit der *Biotage Isolera One* (Cyclohexan/Ethylacetat, 12% bis 100% Ethylacetat) getrennt. Es werden (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**, 40 mg, 107  $\mu\text{mol}$ ), (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**, 56 mg, 150  $\mu\text{mol}$ ) und eine Mischfraktion (68 mg) erhalten.

#### 7.8.3.1. (*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.90 (tt,  $J$  = 6.5, 3.3 Hz, 1H, **H15**), 4.93 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, **H6**), 4.89 (m, 1H, **H21**), 4.75 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1H, **H7**), 4.30 (s, 2H, **H9**), 3.53 (s, 2H, **H2**), 3.32 (s, 3H, **H11**), 1.83 (s, 2H, **H25**), 1.57 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 3H, **H16**), 1.30 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 6H, **H22+23**).

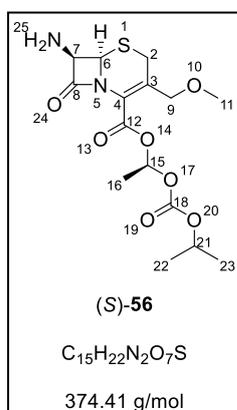
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 169.0 (**C8**), 159.8 (**C12**), 152.5 (**C18**), 130.3 (**C3**), 124.0 (**C4**), 92.4 (**C15**), 72.9 (**C21**), 70.6 (**C9**), 63.9 (**C7**), 59.0 (**C6**), 58.3 (**C11**), 25.8 (**C2**), 21.8 (**C22+23**), 21.8 (**C22+23**), 19.4 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 375 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 397 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 397.1040 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ , berechnet), 397.1046 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 8.96 min.

#### 7.8.3.2. (*S*)-AMCA-Proxetil ((*S*)-**56**)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 6.98 (m, 1H, **H15**), 4.93 (m, 1H, **H6**), 4.91 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, **H21**), 4.74 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, **H7**), 4.28 (s, 2H, **H9**), 3.52 (s, 2H, **H2**), 3.31 (s, 3H, **H11**), 1.82 (s, 2H, **H25**), 1.57 (dd,  $J$  = 5.5, 1.5 Hz, 3H, **H16**), 1.32 (ddd,  $J$  = 12.2, 6.3, 1.6 Hz, 6H, **H22+23**).

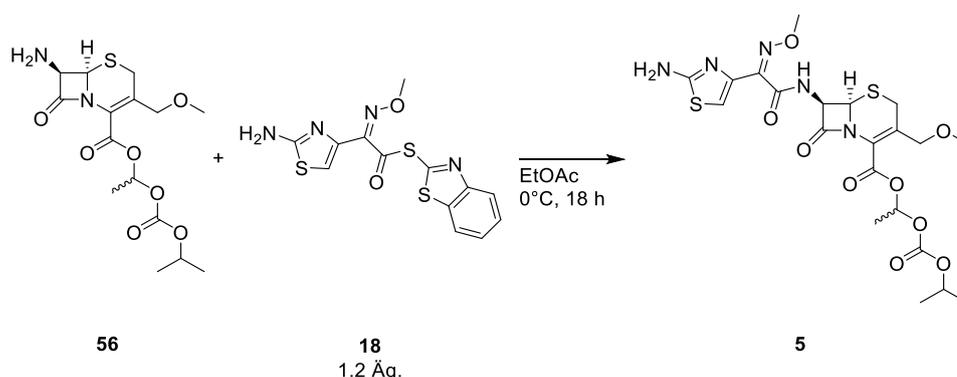
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 168.7 (**C8**), 160.0 (**C12**), 152.7 (**C18**), 129.9 (**C3**), 124.1 (**C4**), 91.8 (**C15**), 73.1 (**C21**), 70.6 (**C9**), 63.8 (**C7**), 59.1 (**C6**), 58.3 (**C11**), 25.7 (**C2**), 21.8 (**C22+23**), 21.8 (**C22+23**), 19.5 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 375 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 397 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 397.1040 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ , berechnet), 397.1048 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 8.45 min.

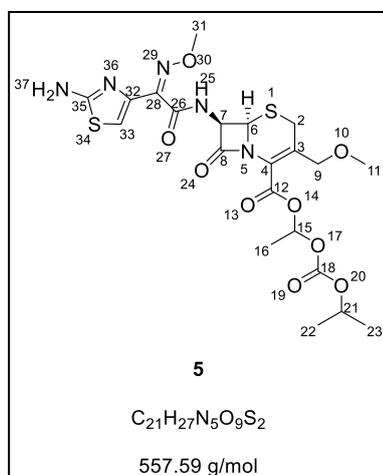
#### 7.8.4. AAV 5: Amidierung von AMCA-Proxetil (56) unter Verwendung von MAEM (18)<sup>[21–23,27,28]</sup>



**Abbildung 7–25:** Darstellung von Cefpodoximproxetil (5) ausgehend von AMCA-Proxetil (56) mit dem Aktivester MAEM (18).

AMCA-Proxetil (56, 1.0 Äq.) wird in Ethylacetat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von MAEM (18, 1.2 Äq.) wird 18 Stunden bei 0 °C gerührt. Die erhaltene Suspension wird filtriert. Der Filterkuchen wird mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mit der *Biotage Isolera One* (Cyclohexan/Ethylacetat, 12% bis 100% Ethylacetat) aufgereinigt.

##### 7.8.4.1. Darstellung von Cefpodoximproxetil (5)



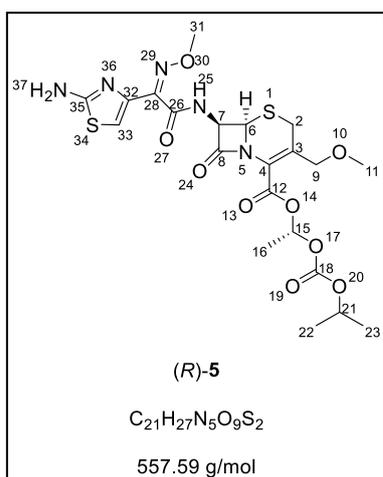
AMCA-Proxetil (56, 512 mg, 1.37 mmol) wird mit MAEM (18, 582 mg, 1.66 mmol) in Ethylacetat (13.5 mL) analog zu AAV 5 umgesetzt. Das Diastereomeregemisch Cefpodoximproxetil (5) wird als leicht gelber Feststoff (538 mg, 0.965 mmol, 70% Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.60 (dd, *J* = 29.9, 9.1 Hz, 1H, H25), 6.93 (dq, *J* = 39.9, 5.4 Hz, 1H, H15), 6.84 (s, 1H, H33), 6.01 (ddd, *J* = 15.6, 8.9, 4.8 Hz, 1H, H7), 5.60 (s, 2H, H37), 5.07 (dd, *J* = 6.0, 4.9 Hz, 1H, H6), 4.89 (m, 1H, H21), 4.35 (m,

2H, H9), 4.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, H31), 3.57 (t, *J* = 2.9 Hz, 2H, H2), 3.33 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H, H11), 1.58 (m, 3H, H16), 1.32 (dd, *J* = 7.6, 5.9 Hz, 6H, H22 + H23).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 11.53 min ((*S*)-Cefpodoximproxetil ((*S*)-**5**)), 12.88 min ((*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**)).<sup>[114]</sup>

#### 7.8.4.2. Darstellung von (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**)



(*R*)-AMCA-Proxetil ((*R*)-**56**, 50.0 mg, 134  $\mu$ mol) wird mit MAEM (**18**, 57.2 mg, 163  $\mu$ mol) in Ethylacetat (1 mL) analog zu AAV 5 umgesetzt. (*R*)-Cefpodoximproxetil ((*R*)-**5**) wird als leicht gelber Feststoff (63 mg, 113  $\mu$ mol, 69% Ausbeute) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.77 (m, 1H, **H25**), 6.88 (m, 1H, **H15**), 6.77 (m, 1H, **H33**), 6.03 (m, 1H, **H7**), 5.55 (s, 2H, **H37**), 5.07 (m, 1H, **H6**), 4.89 (m, 1H, **H21**), 4.34 (m, 2H, **H9**), 4.06 (m, 3H, **H31**), 3.56 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 2H, **H2**), 3.32 (s, 3H, **H11**), 1.56 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 3H, **H16**), 1.30 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H, **H22** + **H23**).

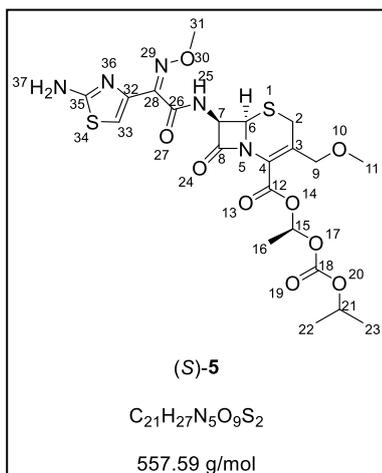
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 168.3 (**C35**), 165.1 (**C8**), 162.7 (**C26**), 159.4 (**C12**), 152.5 (**C18**), 147.3 (**C28**), 142.5 (**C32**), 132.4 (**C3**), 123.4 (**C4**), 111.9 (**C33**), 92.4 (**C15**), 73.0 (**C21**), 70.6 (**C9**), 63.3 (**C31**), 58.8 (**C7**), 58.6 (**C11**), 57.7 (**C6**), 26.3 (**C2**), 21.8 (**C22** + **C23**), 21.6 (**C22** + **C23**), 19.4 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 558 ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 580 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 558.1323 ( $\text{M} + \text{H}^+$ , berechnet), 558.1333 ( $\text{M} + \text{H}^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 12.96 min.

### 7.8.4.3. Darstellung von (S)-Cefpodoximproxetil ((S)-5)



(S)-AMCA-Proxetil ((S)-56, 42.1 mg, 112  $\mu$ mol) wird mit MAEM (**18**, 48.6 mg, 139  $\mu$ mol) in Ethylacetat (1 mL) analog zu AAV 5 umgesetzt. (S)-Cefpodoximproxetil ((S)-5) wird als leicht gelber Feststoff (41 mg, 74  $\mu$ mol, 66% Ausbeute) erhalten.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.67 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, **H25**), 6.97 (q,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, **H15**), 6.78 (s, 1H, **H33**), 6.01 (m, 1H, **H7**), 5.46 (s, 2H, **H37**), 5.06 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, **H6**), 4.91 (m, 1H, **H21**), 4.34 (q,  $J$  = 13.8 Hz, 2H, **H9**), 4.04 (s, 3H, **H31**),

3.56 (s, 2H, **H2**), 3.32 (s, 3H, **H11**), 1.57 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3H, **H16**), 1.31 (dd,  $J$  = 6.5 Hz, 6H, **H22** + **H23**).

$^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 168.2 (**C35**), 164.7 (**C8**), 162.6 (**C26**), 159.6 (**C12**), 152.7 (**C18**), 147.3 (**C28**), 142.5 (**C32**), 132.6 (**C3**), 123.6 (**C4**), 112.2 (**C33**), 91.9 (**C15**), 73.2 (**C21**), 70.7 (**C9**), 63.3 (**C31**), 58.9 (**C7**), 58.6 (**C11**), 57.9 (**C6**), 26.4 (**C2**), 21.8 (**C22** + **C23**), 21.8 (**C22** + **C23**), 19.6 (**C16**).

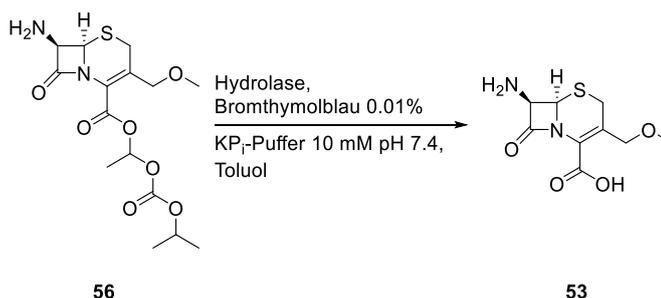
ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 558 ( $M + H^+$ ), 580 ( $M + Na^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 558.1323 ( $M + H^+$ , berechnet), 558.1317 ( $M + H^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 11.55 min.

## 7.9. Hydrolasen-Screening für die Hydrolyse von Cefpodoximproxetil (5) und AMCA-Proxetil (56)

### 7.9.1. Screening für die Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für AMCA-Proxetil (56)



**Abbildung 7–26:** Screening zur Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für AMCA-Proxetil (56).

Es wird eine Lösung von Bromthymolblau (10.9 mg) in Kaliumphosphatpuffer (100 mL, 10 mM, pH 7.4) und eine Lösung von AMCA-Proxetil (56, 53.6 mg, 143  $\mu\text{mol}$ ) in Toluol (1.14 mL) hergestellt. Die zu testenden Enzyme (ca. 50 mg) werden in Puffer soweit möglich suspendiert. Eine 96-well plate wird vorbereitet und alle gewünschten Vertiefungen mit einem Teil der Bromthymolblau-Lösung (180  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Nach Zugabe der jeweiligen Enzymlösungen (20  $\mu\text{L}$ ) in jeweils zwei Vertiefungen wird fünf Minuten gewartet. Enzymlösungen, die bereits dann einen Farbumschlag von blau nach hellgrün oder gelb aufweisen, werden erneut verdünnt und neu eingefüllt. Anschließend wird die Substratlösung (56, 20  $\mu\text{L}$ ) zu jeweils einer der Enzymlösungen zugegeben. Die Probe ohne Substrat wird durchgeführt, um falsch positive Testergebnisse anzuzeigen. Es wird nach sieben Stunden das Experiment beendet, wobei auch innerhalb dieser Zeit mehrfach die Veränderungen zwischen Substratprobe und Negativkontrolle untersucht werden. Die Ergebnisse der Substratproben und der Negativkontrollen nach sieben Stunden sind in Tabelle 7-44 aufgeführt.

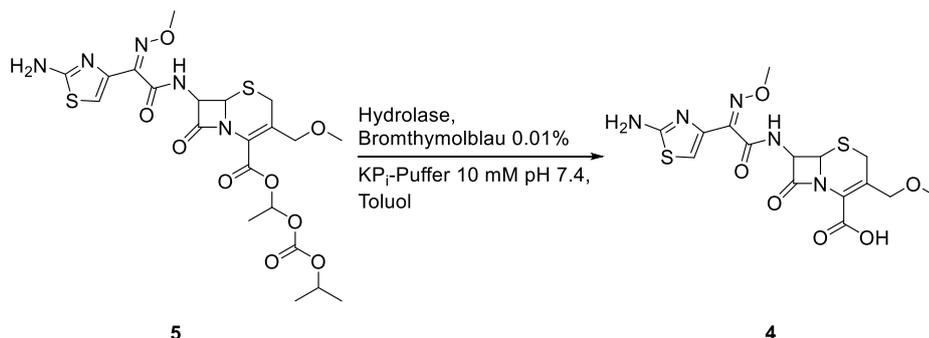
**Tabelle 7-44:** Screening zur Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für AMCA-Proxetil (56).

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
1	Lipase Typ II ( <i>Porcine Pancreas</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	52.8	-	Nein
2	Lipase L 5	<i>Amano</i>	52.2	-	Nein
3	Lipase immobilisiert	<i>Toyobo</i>	51.3	-	Nein
4	Lipase AYG	<i>Amano</i>	6 Kugeln	-	Ja
5	Lipase A ( <i>Aspergillus niger</i> )	<i>Amano</i>	51.7	-	Nein
6	Lipase ( <i>Hog Pancreas</i> )	<i>Fluka</i>	52.4	-	Nein
7	Esterase Isoenzym 6 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	52.2	1:10	Nein
8	Lipase PS SD	<i>Amano</i>	53.1	-	Nein
9	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	<i>Amano</i>	49.8	1:10	Nein
10	Lipase AK	<i>Amano</i>	51.8	1:100	Nein
11	Lipase B immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>C-LEcta</i>	4 Kugeln	-	Ja
12	Esterase Isoenzym 3 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	50.4	1:10	Nein
13	Esterase Isoenzym 4 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	47.6	1:10	Nein
14	Esterase Isoenzym 2 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	48.7	1:10	Nein
15	Esterase Isoenzym 1 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	48.9	1:10	Nein
16	Lipase B lyophilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>C-LEcta</i>	52.7	-	Ja
17	Lipase AP6	<i>Amano</i>	50.6	-	Ja
18	Lipase PS ( <i>Pseudomonas cepacian</i> )	<i>Amano</i>	49.7	-	Nein
19	Lipase ( <i>Penicillium camperti</i> )	unbekannt	49.2	-	Nein

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
20	Lipase AYS	<i>Amano</i>	51.0	-	Nein
21	Lipase D 20	<i>Amano</i>	54.2	-	Nein
22	Lipase PS auf Toyonite	<i>Amano</i>	Spatelspitze	-	Nein
23	Lipase PS IM	<i>Amano</i>	47.8	-	Nein
24	Lipase GC 4	<i>Amano</i>	53.8	-	Nein
25	Lipase AY 30	<i>Amano</i>	50.2	-	Nein
26	Lipase N Conc	<i>Amano</i>	48.5	-	Nein
27	Lipase R 10	<i>Amano</i>	52.3	-	Nein
28	Lipase PS auf Diatonite	<i>Amano</i>	51.7	-	Nein
29	Lipase M-AP 10	<i>Amano</i>	52.7	-	Nein
30	Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	Spatelspitze	-	Ja
31	Lipase F-AP 15	<i>Amano</i>	49.6	-	Nein
32	Esterase Isoenzym 5 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	50.0	1:10	Nein
33	Ronozyme HiPhos (L)	<i>Novozymes</i>	54.0	-	Nein
34	Trypsin	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	52.1	-	Ja
35	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	53.7	-	Nein
36	$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine Pancreas</i> )	<i>Fluka</i>	56.1	1:10	Ja
37	Penicillin Amidase	<i>Fluka</i>	52.5	-	Nein
38	Protease ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	53.5	-	Nein
39	Lipozym	unbekannt	Spatelspitze	-	Nein
40	Protease ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	55.3	-	Nein
41	Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	<i>Fluka</i>	52.3	1:10	Ja
42	Penicillin G Amidase immobilisiert	<i>Fluka</i>	50.8	-	Ja

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
43	Protease ( <i>Bacillus species</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	52.0	-	Ja
44	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Fluka</i>	52.9	-	Nein
45	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Amano</i>	51.7	-	Nein
46	Protease A	<i>Amano</i>	53.0	-	Nein
47	Protease M	<i>Amano</i>	55.0	-	Ja
48	Protease Typ 1 ( <i>Bovine Pancreas</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	52.1	1:10	Nein
49	Protease ( <i>Rhizopus species</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	51.7	-	Nein
50	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	57.0	-	Nein
51	Protease B	<i>Amano</i>	51.0	-	Nein
52	Protease N	<i>Amano</i>	51.0	-	Ja
53	Protease S	<i>Amano</i>	48.6	1:10	Ja
54	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Boehringer</i> <i>Mannheim</i>	57.0	-	Nein
55	Newlase II	<i>Amano</i>	54.4	-	Nein
56	Proleather	<i>Amano</i>	50.3	-	Ja
57	Protease B	<i>Amano</i>	50.3	-	Ja
58	Newlase	<i>Amano</i>	53.4	-	Nein
59	Protease ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	51.0	-	Nein
60	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	49.7	-	Nein
61	Lipase CE 5	<i>Amano</i>	54.8	-	Nein
62	Lipase R 10	<i>Amano</i>	52.7	-	Ja

## 7.9.2. Screening für die Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für Cefpodoximproxetil (5)



**Abbildung 7–27:** Screening zur Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für Cefpodoximproxetil (5).

Es wird eine Lösung von Bromthymolblau (10.9 mg) in Kaliumphosphatpuffer (100 mL, 10 mM, pH7.4) und eine Lösung von Cefpodoximproxetil (5, 83.4 mg, 0.149 µmol) in Toluol (1.19 mL) hergestellt. Die getesteten Enzyme (ca. 50 mg) werden in Puffer soweit möglich suspendiert. Eine 96-well plate wird vorbereitet und alle gewünschten Vertiefungen mit einem Teil der Bromthymolblau-Lösung (180 µL) versetzt. Nach Zugabe der jeweiligen Enzymlösungen (20 µL) in jeweils zwei Vertiefungen wird fünf Minuten gewartet. Enzymlösungen, die bereits dann einen Farbumschlag von blau nach hellgrün oder gelb aufweisen werden erneut verdünnt und neu eingefüllt. Anschließend wird die Substratlösung (5, 20 µL) zu jeweils einer der Enzymlösungen zugegeben. Die Probe ohne Substrat wird durchgeführt, um falsch positive Testergebnisse anzuzeigen. Es wird nach sieben Stunden das Experiment beendet, wobei auch innerhalb dieser Zeit mehrfach die Veränderungen zwischen Substratprobe und Negativkontrolle untersucht werden. Die Ergebnisse der Substratproben und der Negativkontrollen nach sieben Stunden sind in Tabelle 7-45 aufgeführt.

**Tabelle 7-45:** Screening zur Hydrolyse-Aktivität verschiedener Hydrolasen für Cefpodoximproxetil (5).

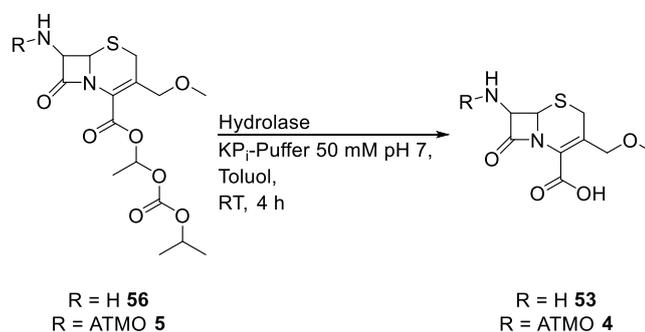
Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
1	Lipase Typ II ( <i>Porcine Pancreas</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	50.8	1:10	Ja
2	Lipase L 5	<i>Amano</i>	51.5	-	Nein
3	Lipase immobilisiert	<i>Toyobo</i>	50.8	-	Nein

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
4	Lipase AYG	<i>Amano</i>	7 Kugeln	-	Ja
5	Lipase A ( <i>Aspergillus niger</i> )	<i>Amano</i>	50.7	-	Nein
6	Lipase ( <i>Hog Pancreas</i> )	<i>Fluka</i>	51.3	-	Ja
7	Esterase Isoenzym 6 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	50.2	1:10	Nein
8	Lipase PS SD	<i>Amano</i>	53.6	1:100	Nein
9	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	<i>Amano</i>	50.8	1:10	Nein
10	Lipase AK	<i>Amano</i>	51.1	-	Nein
11	Lipase B immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>C-LEcta</i>	4 Kugeln	-	Nein
12	Esterase Isoenzym 3 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	50.3	1:10	Nein
13	Esterase Isoenzym 4 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	52.9	1:10	Nein
14	Esterase Isoenzym 2 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	54.0	1:10	Nein
15	Esterase Isoenzym 1 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	54.0	1:10	Nein
16	Lipase B lyophilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>C-LEcta</i>	49.2	-	Nein
17	Lipase AP6	<i>Amano</i>	53.9	-	Nein
18	Lipase PS ( <i>Pseudomonas cepacian</i> )	<i>Amano</i>	50.5	-	Nein
19	Lipase ( <i>Penicillium camperti</i> )	unbekannt	54.3	-	Nein
20	Lipase AYS	<i>Amano</i>	51.8	-	Nein
21	Lipase D 20	<i>Amano</i>	53.1	-	Nein
22	Lipase PS auf Toyonite	<i>Amano</i>	Spatelspitze	-	Ja
23	Lipase PS IM	<i>Amano</i>	52.2	-	Nein
24	Lipase GC 4	<i>Amano</i>	52.5	-	Nein
25	Lipase AY 30	<i>Amano</i>	49.2	-	Nein

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
26	Lipase N Conc	<i>Amano</i>	53.5	1:10	Ja
27	Lipase R 10	<i>Amano</i>	48.6	-	Nein
28	Lipase PS auf Diatonite	<i>Amano</i>	54.9	-	Ja
29	Lipase M-AP 10	<i>Amano</i>	48.5	-	Nein
30	Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	Spatelspitze	-	Ja
31	Lipase F-AP15	<i>Amano</i>	48.6	-	Nein
32	Esterase Isoenzym 5 ( <i>Pig liver</i> )	unbekannt	50.0	1:10	Nein
33	Ronozyme HiPhos (L)	<i>Novozymes</i>	54.0	-	Nein
34	Trypsin	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	52.1	-	Ja
35	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	53.7	-	Nein
36	$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine pancreas</i> )	<i>Fluka</i>	56.1	1:10	Ja
37	Penicillin Amidase	<i>Fluka</i>	52.5	-	Nein
38	Protease ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	53.5	-	Nein
39	Lipozym	unbekannt	Spatelspitze	-	Nein
40	Protease ( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	55.3	-	Nein
41	Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	<i>Fluka</i>	52.3	1:10	Ja
42	Penicillin G Amidase immobilisiert	<i>Fluka</i>	50.8	-	Ja
43	Protease ( <i>Bacillus species</i> )	<i>Sigma</i> <i>Aldrich</i>	52.0	-	Ja
44	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Fluka</i>	52.9	-	Nein
45	Acylase ( <i>Aspergillus melleus</i> )	<i>Amano</i>	51.7	-	Nein
46	Protease A	<i>Amano</i>	53.0	-	Nein

Eintrag	Enzym	Hersteller	Einwaage [mg]	Verdünnung	Aktivität
47	Protease M	<i>Amano</i>	55.0	-	Ja
48	Protease Typ 1 ( <i>Bovine Pancreas</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	52.1	1:10	Nein
49	Protease ( <i>Rhizopus species</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	51.7	-	Nein
50	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	57.0	-	Nein
51	Protease B	<i>Amano</i>	51.0	-	Nein
52	Protease N	<i>Amano</i>	51.0	-	Nein
53	Protease S	<i>Amano</i>	48.6	1:10	Ja
54	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Boehringer Mannheim</i>	57.0	-	Nein
55	Newlase II	<i>Amano</i>	54.4	-	Nein
56	Proleather	<i>Amano</i>	50.3	-	Nein
57	Protease B	<i>Amano</i>	50.3	-	Ja
58	Newlase	<i>Amano</i>	53.4	-	Nein
59	Protease ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	51.0	-	Nein
60	Protease ( <i>Bacillus polymyxa</i> )	<i>Sigma Aldrich</i>	49.7	-	Nein
61	Lipase CE 5	<i>Amano</i>	54.8	-	Nein
62	Lipase R 10	<i>Amano</i>	52.7	-	Nein

### 7.9.3. Biotransformationen zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) in Toluol



**Abbildung 7–28:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (**56**) und Cefpodoximproxetil (**5**) in Toluol.

Es wird jeweils eine Lösung aus AMCA-Proxetil (**56**, 10 mg/mL) und Cefpodoximproxetil (**5**, 15 mg/mL) in Toluol erstellt. Jeweils ein Teil (2 mL) dieser Lösung wird mit Kaliumphosphatpuffer (2 mL, 50 mmol/L, pH 7) versetzt und nach Zugabe des Enzyms (10 mg) für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt. Das Diastereomerenverhältnis wird unter Betrachtung der Signale des Protons am Stereozentrum im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ermittelt. Die Ergebnisse sind für AMCA-Proxetil (**56**) in Tabelle 7-46 und für Cefpodoximproxetil (**5**) in Tabelle 7-47 dargestellt.

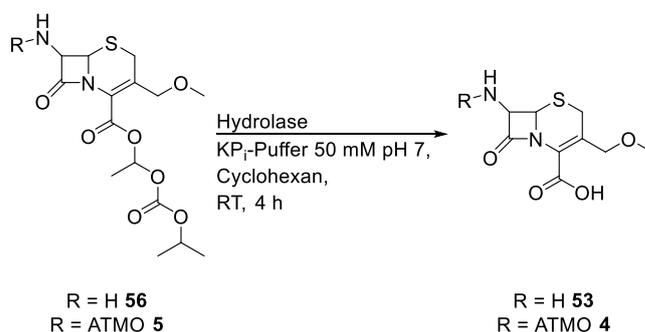
**Tabelle 7-46:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (**56**) in Toluol.

Enzym	Einwaage Enzym [mg]	Diastereomeren- verhältnis Aus- gangsmaterial ( <i>S</i> : <i>R</i> )	Diastereomeren- verhältnis ( <i>S</i> : <i>R</i> )
Ohne Enzym	-	51:49	51:49
Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.4	51:49	52:48
Lipase B lyophilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.2	51:49	55:45
Lipase AYG	10.5	51:49	51:49
Lipase AP6	10.7	51:49	52:48
Trypsin	10.0	51:49	51:49
$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine Pancreas</i> )	10.3	51:49	51:49
Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	10.6	51:49	51:49
Penicillin G-Amidase immobilisiert	11.0	51:49	52:48
Protease S	10.2	51:49	51:49
Protease ( <i>Bacillus species</i> )	10.0	51:49	52:48
Protease M	10.8	51:49	51:49
Protease N	10.8	51:49	50:50
Proleather	10.1	51:49	50:50
Protease B	9.9	51:49	50:50
Lipase R 10	10.2	51:49	50:50
Lipase B immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.4	51:49	50:50

**Tabelle 7-47:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von Cefpodoximproxetil (5) in Toluol.

Enzym	Einwaage Enzym [mg]	Diastereomeren- verhältnis Aus- gangsmaterial (S:R)	Diastereomeren- verhältnis (S:R)
Ohne Enzym	-	52:48	52:48
Lipase Typ II ( <i>Porcine Pancreas</i> )	10.4	52:48	52:48
Lipase AYG	10.2	52:48	52:48
Lipase ( <i>Hog Pancreas</i> )	10.6	52:48	53:47
Lipase PS auf Toyonite	10.4	52:48	52:48
Lipase PS auf Diatonite	10.6	52:48	52:48
Lipase N Conc	10.5	52:48	53:47
Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.3	52:48	52:48
Trypsin	10.1	52:48	53:47
$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine pancreas</i> )	10.3	52:48	52:48
Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	10.2	52:48	52:48
Penicillin G-Amidase immobilisiert	10.9	52:48	51:49
Protease M	10.3	52:48	52:48
Protease ( <i>Bacillus species</i> )	10.9	52:48	52:48
Protease S	10.9	52:48	52:48
Protease B	10.1	52:48	52:48

### 7.9.3.1. Biotransformationen zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (56) und Cefpodoximproxetil (5) in Cyclohexan



**Abbildung 7–29:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (56) und Cefpodoximproxetil (5) in Cyclohexan.

Es wird jeweils eine Lösung aus AMCA-Proxetil (56, 10 mg/mL) und Cefpodoximproxetil (5, 15 mg/mL) in Dichlormethan erstellt. Jeweils ein Teil (2 mL) dieser Lösung wird im Vakuum eingengt und mit Cyclohexan (2 mL) und Kaliumphosphatpuffer (2 mL, 50 mmol/L, pH 7) versetzt. Es wird nach Zugabe des Enzyms (10 mg) für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt. Das Diastereomerenverhältnis wird unter Betrachtung der Signale des Protons am Stereozentrum im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ermittelt. Die Ergebnisse sind für AMCA-Proxetil (56) in Tabelle 7-48 und für Cefpodoximproxetil (5) in Tabelle 7-49 dargestellt.

**Tabelle 7-48:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von AMCA-Proxetil (56) in Cyclohexan.

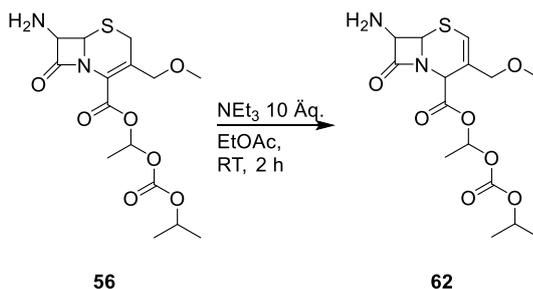
Enzym	Einwaage Enzym [mg]	Diastereomeren- verhältnis Aus- gangsmaterial (S:R)	Diastereomeren- verhältnis (S:R)
Ohne Enzym	-	51:49	52:48
Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.4	51:49	50:50
Lipase B lyophilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.2	51:49	69:31
Lipase AYG	10.5	51:49	52:48
Lipase AP6	10.7	51:49	52:48
Trypsin	10.2	47:53	49:51
$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine Pancreas</i> )	10.1	47:53	48:52
Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	10.5	47:53	49:51
Penicillin G-Amidase immobilisiert	10.2	47:53	48:52
Protease S	10.5	51:49	50:50
Protease ( <i>Bacillus species</i> )	10.8	51:49	50:50
Protease M	10.4	47:53	50:50
Protease N	10.3	47:53	48:52
Proleather	10.3	47:53	47:53
Protease B	10.0	47:53	48:52
Lipase R 10	10.9	51:49	51:49
Lipase B immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.3	47:53	46:54

**Tabelle 7-49:** Biotransformation zur Abspaltung der Proxetilgruppe von Cefpodoximproxetil (5) in Cyclohexan.

Enzym	Einwaage Enzym [mg]	Diastereomeren- verhältnis Aus- gangsmaterial (S:R)	Diastereomeren- verhältnis (S:R)
Ohne Enzym	-	51:49	51:49
Lipase Typ II ( <i>Porcine Pancreas</i> )	10.6	51:49	52:48
Lipase AYG	10.5	51:49	51:49
Lipase ( <i>Hog Pancreas</i> )	10.2	51:49	51:49
Lipase PS auf Toyonite	9.9	51:49	51:49
Lipase PS auf Diatonite	10.2	51:49	50:50
Lipase N Conc	10.8	51:49	51:49
Lipase A immobilisiert ( <i>Candida antarctica</i> )	10.0	51:49	51:49
Trypsin	10.3	51:49	51:49
$\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>Bovine Pancreas</i> )	10.9	51:49	51:49
Lipase ( <i>Rhizopus niveus</i> )	10.7	51:49	51:49
Penicillin G-Amidase immobilisiert	11.0	51:49	51:49
Protease M	10.8	51:49	51:49
Protease ( <i>Bacillus species</i> )	10.6	51:49	51:49
Protease S	10.4	51:49	50:50
Protease B	10.8	51:49	51:49

## 7.10. Untersuchungen der $\Delta^2$ -Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56)

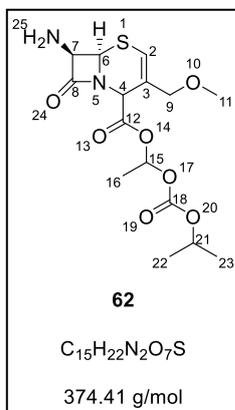
### 7.10.1. AAV 6: Darstellung von $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (62) mittels Isomerisierung von AMCA-Proxetil (56)



**Abbildung 7–30:** Darstellung von  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) ausgehend von AMCA-Proxetil (**56**).

AMCA-Proxetil (**56**, 1 Äq.) wird in Ethylacetat gelöst und mit Triethylamin (10 Äq.) versetzt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur werden alle flüchtigen Stoffe der braunen Lösung im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit der *Biotage Isolera One* (Cyclohexan/Ethylacetat, 12% bis 100% Ethylacetat) aufgereinigt. Es wird  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) als leicht gelber Feststoff erhalten.

#### 7.10.1.1. Darstellung von $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (62)

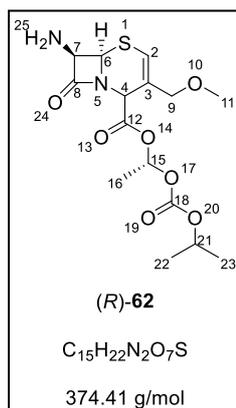


Analog zu AAV 6 wird AMCA-Proxetil (**56**, 581 mg, 1.55 mmol) in Ethylacetat (10 mL) mit Triethylamin (2.15 mL, 15.5 mmol) zu  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) umgesetzt. Es wird  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) als leicht gelber Feststoff (201 mg, 0.537 mmol, 35% Ausbeute) erhalten.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 6.76 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, **H15**), 6.36 (s, 1H, **H2**), 5.21 (dd,  $J$  = 4.2, 14.9 Hz, 1H, **H6**), 5.01 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, **H4**), 4.89 (pd,  $J$  = 1.5, 6.3 Hz, 1H, **H21**), 4.61 (dd,  $J$  = 1.7, 4.1 Hz, 1H, **H7**), 3.98 (m, 2H, **H9**), 3.27 (d,  $J$  = 1.1 Hz 3H, **H11**), 1.55 (dd,  $J$  = 5.4, 6.9 Hz, 3H, **H16**), 1.31 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 6H, **H22+23**).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 7.00 min.

### 7.10.1.2. Darstellung von (R)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((R)-62)



Analog zu AAV 6 wird (R)-AMCA-Proxetil ((R)-56, 113 mg, 303  $\mu$ mol) in Ethylacetat (5.6 mL) mit Triethylamin (414  $\mu$ L, 2.99 mmol) zu (R)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((R)-62) umgesetzt. Es wird (R)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((R)-62) als leicht gelber Feststoff (34 mg, 91  $\mu$ mol, 30% Ausbeute) erhalten.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 6.76 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, **H15**), 6.36 (s, 1H, **H2**), 5.19 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, **H6**), 5.00 (s, 1H, **H4**), 4.89 (hept,  $J$  = 6.1 Hz, 1H, **H21**), 4.60 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, **H7**), 3.97 (dd,  $J$  = 92.6, 12.1 Hz, 2H,

**H9**), 3.27 (s, 3H, **H11**), 1.79 (s, 2H, **H25**), 1.54 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3H, **H16**), 1.31 (d,  $J$  = 6.7, 6H, **H22+23**).

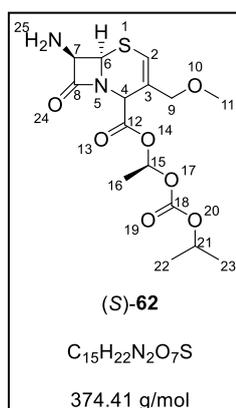
$^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 168.8 (**C8**), 166.0 (**C12**), 152.5 (**C18**), 121.4 (**C3**), 119.7 (**C2**), 92.2 (**C15**), 74.4 (**C9**), 73.3 (**C21**), 65.0 (**C7**), 57.9 (**C11**), 55.0 (**C6**), 49.6 (**C4**), 21.8 (**C22+23**), 21.7 (**C22+23**), 19.6 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 397 ( $M + Na^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 397.1040 ( $M + Na^+$ , berechnet), 397.1045 ( $M + Na^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 6.99 min.

### 7.10.1.3. Darstellung von (S)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((S)-62)



Analog zu AAV 6 wird (S)-AMCA-Proxetil ((S)-56, 112 mg, 301  $\mu$ mol) in Ethylacetat (5.6 mL) mit Triethylamin (414  $\mu$ L, 2.99 mmol) zu (S)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((S)-62) umgesetzt. Es wird (S)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((S)-62) als leicht gelber Feststoff (55 mg, 148  $\mu$ mol, 49% Ausbeute) erhalten.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 6.76 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, **H15**), 6.35 (s, 1H, **H2**), 5.23 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, **H6**), 5.01 (s, 1H, **H4**), 4.89 (hept,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, **H21**), 4.61 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, **H7**), 3.95 (dd,  $J$  = 113.5, 12.2 Hz, 2H,

**H9**), 3.27 (s, 3H, **H11**), 1.56 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3H, **H16**), 1.31 (d,  $J$  = 6.3, 6H, **H22+23**).

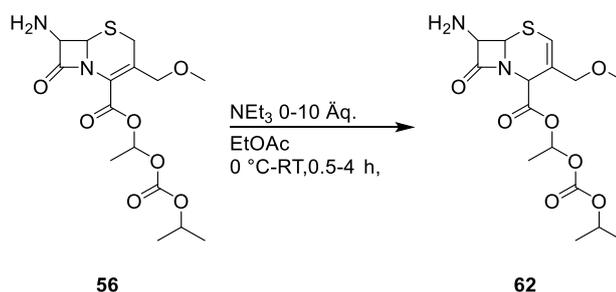
$^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 168.8 (**C8**), 166.2 (**C12**), 152.6 (**C18**), 121.3 (**C3**), 119.5 (**C2**), 92.3 (**C15**), 74.1 (**C9**), 73.2 (**C21**), 65.0 (**C7**), 57.9 (**C11**), 55.1 (**C6**), 49.5 (**C4**), 21.8 (**C22+23**), 21.7 (**C22+23**), 19.6 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z = 397 (M + Na^+)$ .

Akkurate Masse Kationen:  $m/z = 397.1040 (M + Na^+, \text{berechnet}), 397.1042 (M + Na^+, \text{gemessen})$ .

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 7.03 min.

### 7.10.2. Untersuchung der $\Delta^2$ -Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und Menge an Triethylamin



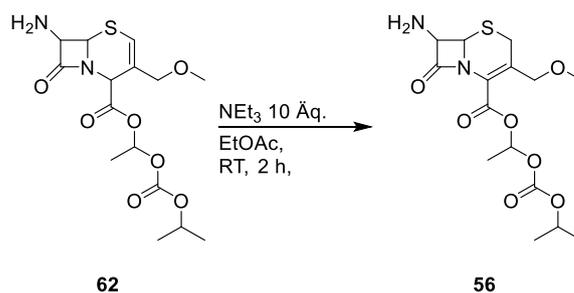
**Abbildung 7–31:** Untersuchung der  $\Delta^2$ -Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und Menge an Triethylamin.

AMCA-Proxetil (**56**, 20 mg, 53  $\mu\text{mol}$ ) wird in Ethylacetat (1 mL) gelöst und mit Triethylamin (0-74  $\mu\text{L}$ , 0  $\mu\text{mol}$ -533  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Es wird 30 Minuten, zwei und vier Stunden bei 0 °C oder Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wird der Rückstand in deuteriertem Chloroform (0.8 mL) aufgenommen. Mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wird die Menge an AMCA-Proxetil (**56**) und  $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil (**62**) bestimmt. Für die Quantifizierung wird das Proton am Stereozentrum der Proxetilgruppe verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-50 dargestellt.

**Tabelle 7-50:** Untersuchung der  $\Delta 2$ -Isomerisierung von AMCA-Proxetil (**56**) in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und der Menge an Triethylamin.

m( <b>56</b> ) [mg]	T	Zeit [h]	NEt <sub>3</sub> [Äq.]	A ( <b>56</b> )	A ( <b>62</b> )	Anteil ( <b>62</b> ) [%]
21.0	RT	0.5	10	0.343	0.403	54
20.1	RT	0.5	2	0.529	0.179	25
19.7	RT	0.5	0	0.765	0.010	1
19.5	0 °C	0.5	10	0.575	0.224	28
20.3	0 °C	0.5	2	0.725	0.060	8
20.0	RT	2.0	10	0.245	0.400	62
20.2	RT	2.0	2	0.370	0.273	42
19.5	RT	2.0	0	0.634	0.005	1
21.1	0 °C	2.0	10	0.383	0.316	45
20.1	0 °C	2.0	2	0.536	0.116	18
19.8	RT	4.0	10	0.256	0.435	63
20.3	RT	4.0	2	0.264	0.405	61
20.4	RT	4.0	0	0.679	0.009	1
21.7	0 °C	4.0	10	0.305	0.439	59
21.5	0 °C	4.0	2	0.494	0.309	38

### 7.10.3. Untersuchung der $\Delta 3$ -Isomerisierung von $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**)

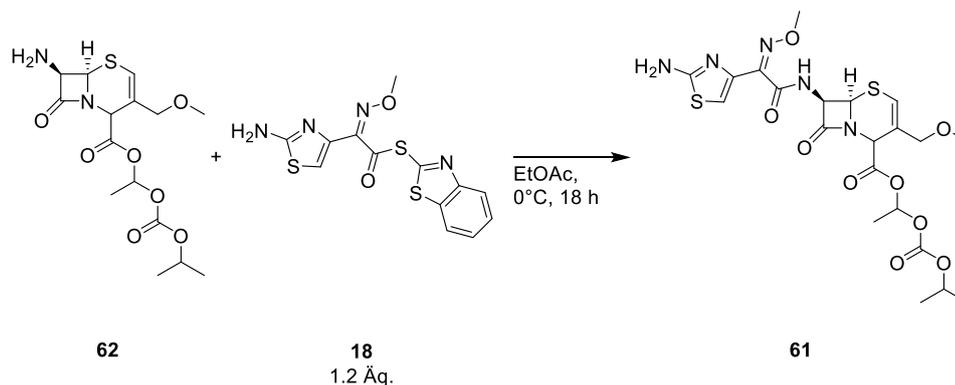


**Abbildung 7-32:** Untersuchung der  $\Delta 3$ -Isomerisierung von  $\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**) zu AMCA-Proxetil (**56**) unter basischen Bedingungen.

$\Delta 2$ -AMCA-Proxetil (**62**, 19.5 mg, 52  $\mu$ mol) wird in Ethylacetat (1 mL) gelöst und mit Triethylamin (74  $\mu$ L, 534  $\mu$ mol) versetzt. Es wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile wird der Rückstand in deuteriertem Chloroform (0.8 mL) aufgenommen. Mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie werden die Mengen an AMCA-

Proxetil (**56**) und  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) bestimmt. Für die Quantifizierung wird das Proton am Stereozentrum der Proxetilgruppe verwendet. Es wird ein Anteil von 63%  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) bestimmt.

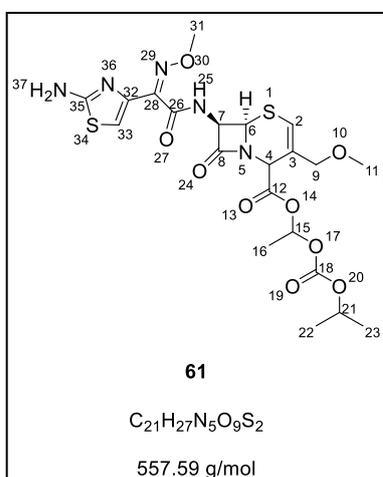
#### 7.10.4. AAV 7: Amidierung von $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) unter Verwendung von MAEM (**18**)<sup>[21–23,27,28]</sup>



**Abbildung 7–33:** Darstellung von  $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (**61**) ausgehend von  $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**) mit dem Aktivester MAEM (**18**).

$\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**, 1.0 Äq.) wird in Ethylacetat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von MAEM (**18**, 1.2 Äq.) wird 18 Stunden bei 0 °C gerührt. Die erhaltene Suspension wird filtriert. Der Filterkuchen wird mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mit der *Biotage Isolera One* (Cyclohexan/Ethylacetat, 12% bis 100% Ethylacetat) aufgereinigt.

##### 7.10.4.1. Darstellung von $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (**61**)



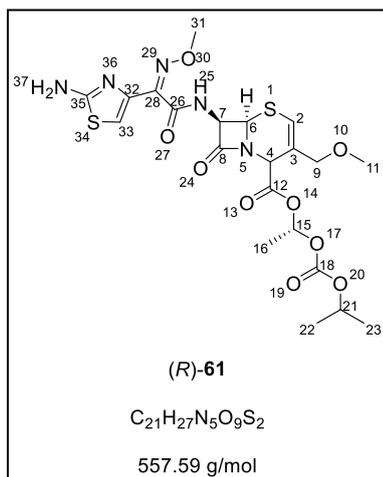
$\Delta$ 2-AMCA-Proxetil (**62**, 58.0 mg, 155  $\mu$ mol) wird mit MAEM (**18**, 67.7 mg, 193  $\mu$ mol) in Ethylacetat (3 mL) analog zu AAV 7 umgesetzt. Das Diastereomergemisch  $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil (**61**) wird als leicht gelber Feststoff (85.8 mg, 154  $\mu$ mol, 99% Ausbeute) erhalten.

$^1$ H-NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.46 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, **H25**), 6.88 (s, 1H, **H33**), 6.77 (q,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, **H15**), 6.35 (s, 1H, **H2**), 5.82 (dd,  $J$  = 8.8, 4.1 Hz, 1H, **H7**), 5.47 (s, 2H, **H37**), 5.36 (dd,  $J$  = 14.7, 4.2 Hz, 1H, **H6**), 5.05 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, **H4**),

4.90 (pd,  $J = 4.1, 6.3$  Hz, 1H, **H21**), 4.04 (s, 3H, **H31**), 3.95 (m, 2H, **H9**), 3.27 (s, 3H, **H11**), 1.56 (dd,  $J = 7.7, 5.4$  Hz, 3H, **H16**), 1.31 (m, 6H, **H22+23**).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 10.12 min.

#### 7.10.4.2. Darstellung von (*R*)- $\Delta^2$ -Cefpodoximproxetil ((*R*)-**61**)



(*R*)- $\Delta^2$ -AMCA-Proxetil ((*R*)-**62**, 21 mg, 56  $\mu$ mol) wird mit MAEM (**18**, 27 mg, 77  $\mu$ mol) in Ethylacetat (1 mL) analog zu AAV 7 umgesetzt. Es wird (*R*)- $\Delta^2$ -Cefpodoximproxetil ((*R*)-**61**) als leicht gelber Feststoff (28 mg, 50  $\mu$ mol, 89% Ausbeute) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.47$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, **H25**), 6.87 (s, 1H, **H33**), 6.77 (q,  $J = 5.4$  Hz, 1H, **H15**), 6.35 (s, 1H, **H2**), 5.82 (dd,  $J = 8.8, 4.1$  Hz, 1H, **H7**), 5.49 (s, 2H, **H37**), 5.34 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, **H6**), 5.04 (s, 1H, **H4**), 4.91 (hept,  $J = 5.2,$

4.6 Hz, 1H, **H21**), 4.05 (s, 3H, **H31**), 3.98 (dd,  $J = 87.9, 12.2$  Hz, 2H, **H9**), 3.27 (s, 3H, **H11**), 1.56 (d,  $J = 5.5$  Hz, 3H, **H16**), 1.32 (dd,  $J = 9.1, 6.2$  Hz, 6H, **H22+23**).

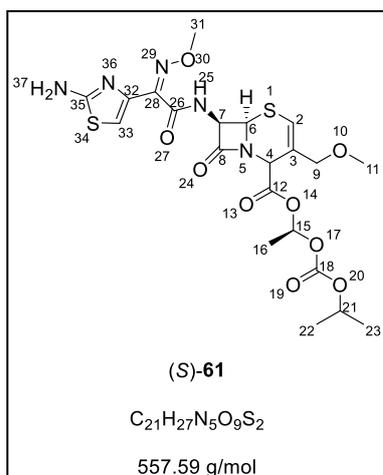
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 168.2$  (**C35**), 165.5 (**C12**), 164.3 (**C8**), 162.2 (**C26**), 152.5 (**C18**), 147.2 (**C28**), 142.4 (**C32**), 121.2 (**C3**), 119.5 (**C2**), 112.3 (**C33**), 92.3 (**C15**), 74.2 (**C9**), 73.4 (**C21**), 63.4 (**C31**), 60.0 (**C7**), 58.0 (**C11**), 53.6 (**C6**), 50.1 (**C4**), 21.8 (**C22+23**), 21.7 (**C22+23**), 19.6 (**C16**).

ESI-MS Kationen:  $m/z = 558$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ), 580 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z = 558.1323$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ , berechnet), 558.1327 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ , gemessen).

HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 10.03 min.

### 7.10.4.3. Darstellung von (S)- $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil ((S)-61)



(S)- $\Delta$ 2-AMCA-Proxetil ((S)-62, 14.6 mg, 39.0  $\mu$ mol) wird mit MAEM (**18**, 19.2 mg, 54.8  $\mu$ mol) in Ethylacetat analog zu AAV 7 umgesetzt. Es wird (S)- $\Delta$ 2-Cefpodoximproxetil ((S)-61) als leicht gelber Feststoff (14.2 mg, 25.5  $\mu$ mol, 65% Ausbeute) erhalten.

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 7.39 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, **H25**), 6.90 (s, 1H, **H33**), 6.77 (q,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, **H15**), 6.34 (s, 1H, **H2**), 5.82 (dd,  $J$  = 8.8, 4.1 Hz, 1H, **H7**), 5.42 (s, 2H, **H37**), 5.37 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, **H6**), 5.06 (s, 1H, **H4**), 4.90 (hept,  $J$  = 6.4

Hz, 1H, **H21**), 4.05 (s, 3H, **H31**), 3.91 (m, 2H, **H9**), 3.27 (s, 3H, **H11**), 1.57 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 3H, **H16**), 1.31 (dd,  $J$  = 6.3, 3.2 Hz, 6H, **H22+23**).

$^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 168.0 (**C35**), 165.7 (**C12**), 164.2 (**C8**), 162.1 (**C26**), 152.6 (**C18**), 147.1 (**C28**), 142.5 (**C32**), 121.1 (**C3**), 119.3 (**C2**), 112.5 (**C33**), 92.5 (**C15**), 74.0 (**C9**), 73.4 (**C21**), 63.4 (**C31**), 60.0 (**C7**), 58.1 (**C11**), 53.6 (**C6**), 50.1 (**C4**), 21.8 (**C22+23**), 21.7 (**C22+23**), 19.6 (**C16**).

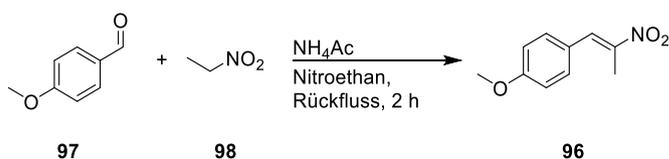
ESI-MS Kationen:  $m/z$  = 558 ( $M + H^+$ ), 580 ( $M + Na^+$ ).

Akkurate Masse Kationen:  $m/z$  = 558.1323 ( $M + H^+$ , berechnet), 558.1322 ( $M + Na^+$ , gemessen).

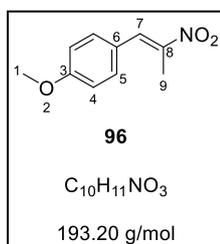
HPLC-Analytik (C18, Ammoniumacetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) / Acetonitril, 60/40, 1 mL/min): 10.23 min.

## 7.11. Synthese von (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77)

### 7.11.1. Darstellung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**)<sup>[174]</sup>



**Abbildung 7–34:** Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) in einer Henry-Reaktion ausgehend von Anisaldehyd (**97**) und Nitroethan (**98**).



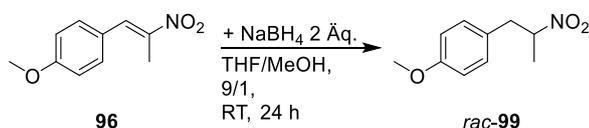
Anisaldehyd (**97**, 2.43 mL, 20.0 mmol) und Ammoniumacetat (1.54 g, 20.0 mmol) werden in Nitroethan (**98**, 40 mL, 559 mmol) vorgelegt und zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach 30 Minuten ist eine intensive Gelbfärbung der Reaktionsmischung zu beobachten. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung werden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt.

Der gelbe, ölige Rückstand wird mit Ethanol (2.5 mL) versetzt, um eine Kristallisation zu erzielen. Die Mutterlauge wird eingengt und erneut mit Ethanol (0.5 mL) versetzt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) wird in drei identischen Kristallfraktionen erhalten, die vereinigt einen gelben, kristallinen Feststoff (2.85 g, 14.8 mmol, 74% Ausbeute) ergeben.

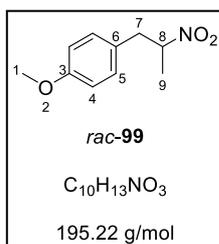
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.08 (s, 1H, **H7**), 7.43 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, **H5**), 6.98 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, **H4**), 3.87 (s, 3H, **H1**), 2.48 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 3H, **H9**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[174]</sup>

## 7.11.2. Darstellung von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) aus 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**)



**Abbildung 7–35:** Synthese von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) über eine Reduktion mit Natriumborhydrid.



Es wird 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**, 194 mg, 1.00 mmol) in einem Gemisch aus THF (9 mL) und Methanol (1 mL) vorgelegt und mit Natriumborhydrid (75.9 mg, 2.01 mmol) in kleinen Portionen versetzt. Die Suspension wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser (20 mL) hydrolysiert. Nach Extrahieren mit Dichlormethan

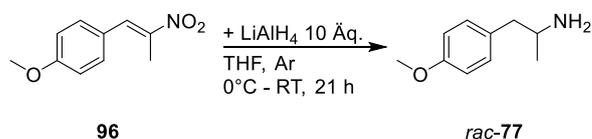
(3 x 20 mL) werden die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) wird als schwachgelbes Öl (103 mg, 0.527 mmol, 53% Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.10 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, **H5**), 6.87 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, **H4**), 4.76 (m, 1H, **H8**), 3.81 (s, 3H, **H1**), 3.25 (dd,  $J$  = 14.1, 7.5 Hz, 1H, **H7**), 2.96 (dd,  $J$  = 14.1, 6.7 Hz, 1H, **H7**), 1.56 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, **H9**).

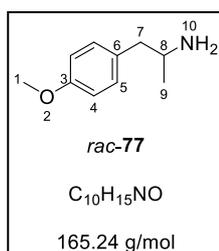
HPLC-Analytik (OD-H, CO<sub>2</sub>/Hexan/2-Propanol, 90/9/1, 1 mL/min): 14.1 min ((*S*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*S*)-**99**)), 16.1 min ((*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**99**)).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[174]</sup>

### 7.11.3. Darstellung von *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) aus 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**)



**Abbildung 7–36:** Synthese von *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) ausgehend von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) über eine Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid.



Lithiumaluminiumhydrid (398 mg, 10.0 mmol) wird gemörsert und in THF (10 mL) vorgelegt im Eisbad gekühlt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**, 194 mg, 1.0 mmol) in THF (5 mL) gelöst wird unter Eisbadkühlung langsam zutropft. Nach dem Zutropfen wird 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser (3 mL) hydrolysiert.

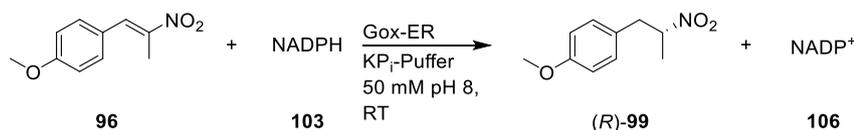
Die erhaltene Suspension wird filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der erhaltene Rückstand wird mit Dichlormethan aufgenommen und erneut filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) als farbloser Feststoff (55 mg, 0.33 mmol, 33% Ausbeute) erhalten

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, **H5**), 6.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, **H4**), 3.79 (s, 3H, **H1**), 3.12 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, **H8**), 2.65 (dd, *J* = 13.4, 5.3 Hz, 1H, **H7**), 2.45 (dd, *J* = 13.4, 8.0 Hz, 1H, **H7**), 1.67 (s, 2H, **H10**), 1.11 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, **H9**).

HPLC-Analytik (IC, Hexan/2-Propanol/DEA 94/6/0.1, 1 mL/min): 15.4 min ((*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-77)), 18.5 min ((*S*)-4-Methoxyamphetamin ((*S*)-77)).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[209]</sup>

### 7.11.4. Bestimmung der Aktivität der verwendeten Gox-En-Reduktase



**Abbildung 7–37:** Bestimmung der Aktivität der Gox-En-Reduktase für die Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).

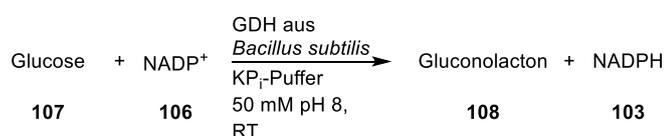
Es wird eine gesättigte Lösung von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) erstellt, indem das Substrat **96** (19.3 mg, 0.10 mmol) in Kaliumphosphatpuffer (10 mL, 50 mM, pH 8.0) suspendiert und anschließend filtriert wird. Ein Teil dieser Lösung (900 μL) wird mit einer

Lösung aus der zu testenden Gox-ER (50 µL, 2 mg/mL) in Puffer und einer Lösung aus NADPH (50 µL, 2.5 mM) in Wasser versetzt. Es wird direkt die Abnahme der Extinktion bei 340 nm am Photometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-51 aufgelistet.

**Tabelle 7-51:** Aktivitätsbestimmung für die verwendeten Gox-En-Reduktasen für **96**.

Enzym	Steigung [min <sup>-1</sup> ]	Aktivität [U/mg]
	-0.1278	0.205
Gox-ER Charge A	-0.1255	0.202
	Mittelwert	0.203
	-0.0837	0.135
Gox-ER Charge B	-0.0838	0.135
	Mittelwert	0.135

### 7.11.5. Bestimmung der Aktivität der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*



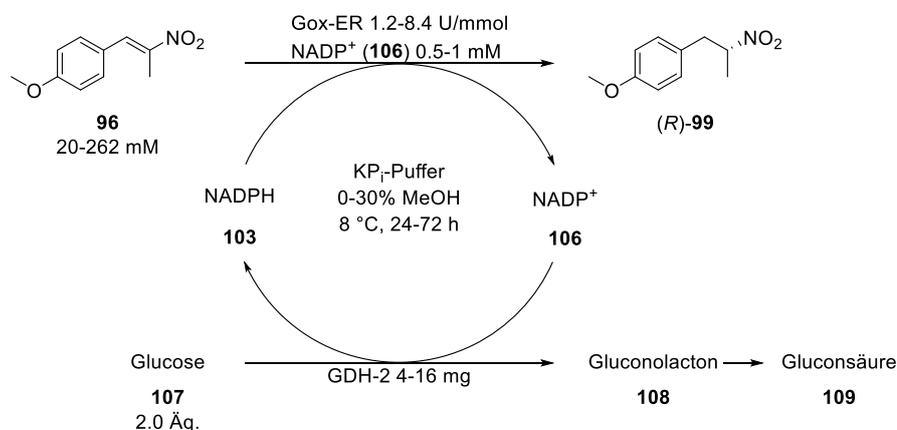
**Abbildung 7-38:** Bestimmung der Aktivität der GDH aus *Bacillus subtilis* für die Reduktion von Glucose (**107**).

Eine Glucoselösung (**107**, 900 µL, 10 mM) in Kaliumphosphatpuffer (10 mL, 50 mM, pH 8.0) wird mit einer Lösung aus der zu testenden GDH (50 µL, 1:200 verdünnt) in Puffer und einer Lösung aus NADP<sup>+</sup> (50 µL, 2.5 mM) in Wasser versetzt. Es wird direkt die Zunahme der Extinktion bei 340 nm am Photometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-52 aufgelistet.

**Tabelle 7-52:** Aktivitätsbestimmung für die verwendete GDH aus *Bacillus subtilis* für die Oxidation von Glucose **107**.

Steigung [min <sup>-1</sup> ]	Aktivität [U/mL]
0.1871	120
0.1842	118
Mittelwert	119

### 7.11.6. Untersuchung der Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**)



**Abbildung 7-39:** Untersuchung der Biotransformation für die enzymatische Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).

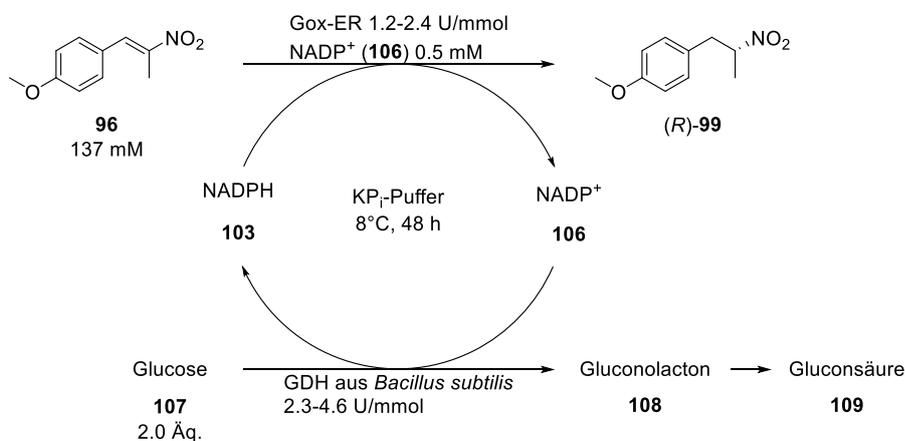
Eine auf 8 °C gekühlte Suspension von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**, 0.189-2.53 g, 0.98-13 mmol) in Kaliumphosphatpuffer (35-50 mL, 50 mM, pH 8) mit Methanol (0-15 mL) wird mit NADP<sup>+</sup> (**106**, 18.6-37.0 mg, 25-50 μmol), Glucose (**107**, 0.794-5.18 g, 4.41-28.7 mmol), GDH (4-16 mg) und Gox-ER (40-80 mg, 0.20 U/mg, 1.2-8.4 U/mmol) versetzt. Unter Zugabe von Natronlauge (2M) wird der pH-Wert konstant auf 8 gehalten. Nach 24-72 Stunden wird die Reaktion beendet. Es wird mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Umsatz über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und das Verhältnis der Diastereomere über chirale HPLC-Analytik (OD-H, CO<sub>2</sub>/Hexan/2-Propanol, 90/9/1, 1 mL/min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-53 aufgelistet.

**Tabelle 7-53:** Untersuchung der Biotransformation für die enzymatische Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**).

Eintrag	m( <b>96</b> ) [g]	m( <b>106</b> ) [mg]	m( <b>107</b> ) [g]	m(Gox-ER) [mg]	m(GDH) [mg]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%] ((R)- <b>99</b> )
1	0.189	18.8	0.802	40.4	4.1	44	100	90
2 <sup>[a]</sup>	0.387	18.9	0.794	40.0	4.0	24	77	n.b.
3	0.388	18.6	0.799	40.2	4.1	48	93	95
4	1.32	18.8	2.61	80.1	8.1	48	92	95
5	2.53	37.0	5.18	80.4	16.5	72	83	n.b.

[a] 30% MeOH als Cosolvens, n.b.: nicht bestimmt.

### 7.11.7. Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) unter Verwendung der GDH aus *Bacillus subtilis*



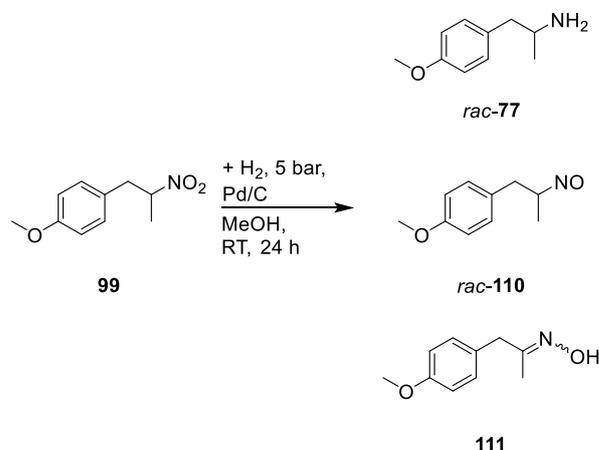
**Abbildung 7-40:** Biotransformation der enzymatischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) unter Verwendung der GDH aus *Bacillus subtilis*.

Eine auf 8 °C gekühlte Suspension von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) (1.32 g, 6.83 mmol) in Kaliumphosphatpuffer (50 mL, 50 mM, pH 8) wird mit NADP<sup>+</sup> (**106**, 18.8 mg, 25 µmol), Glucose (**107**, 2.45 g, 13.6 mmol), GDH (133-167 µL, 2.3-4.6 U/mmol) und Gox-ER (60-120 mg, 0.135 U/mg, 80-160 U) versetzt. Unter Zugabe von Natronlauge (2M) wird der pH-Wert konstant auf 8 gehalten. Nach 48 Stunden wird die Reaktion beendet. Es wird mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Umsatz über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und das Verhältnis der Diastereomere über chirale HPLC-Analytik (OD-H, CO<sub>2</sub>/Hexan/2-Propanol, 90/9/1, 1 mL/min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-54 aufgelistet.

**Tabelle 7-54:** Ergebnisse der Biotransformation der enzymatischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**96**) unter Verwendung der GDH aus *Bacillus subtilis*.

Eintrag	m( <b>96</b> ) [g]	m( <b>106</b> ) [mg]	m( <b>107</b> ) [g]	m(Gox) [mg]	V(GDH) [µL]	m(Produkt) [g]	Umsatz [%]	ee [%] ((R)- <b>99</b> )
1	1.32	18.8	2.45	60.0	133	1.25	64	92
2	1.32	18.9	2.45	120	267	1.24	93	93

**7.11.8. Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei 5 bar Wasserstoffdruck<sup>[205]</sup>**

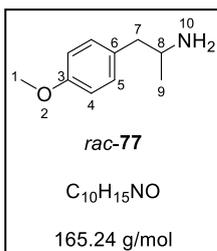


**Abbildung 7–41:** Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei 5 bar Wasserstoffdruck.

*rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99, 101 mg, 0.52 mmol) wird in Methanol (50 mL) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (10% Palladium, 25 mg) versetzt. Es wird unter Wasserstoffatmosphäre (5 bar) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand (85 mg) kann als Mischung aus vier Komponenten bestimmt werden. Neben *rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-77) werden *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan (*rac*-110) und zwei Isomere von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim (**111**) erhalten (Tabelle 7-55). Das Gemisch wird nicht weiter aufgetrennt.

**Tabelle 7-55:** Zusammensetzung des Gemisches der Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99) bei 5 bar Wasserstoffdruck.

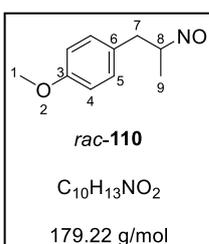
Verbindung	Anteil [%]
<i>rac</i> -4-Methoxyamphetamin ( <i>rac</i> -77)	40%
<i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan ( <i>rac</i> -110)	36%
1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim ( <b>111</b> ) Hauptisomer	17%
1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim ( <b>111</b> ) Nebenisomer	7%



*rac*-4-Methoxyamphetamin (*rac*-**77**): 40% Anteil

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.11 (m, 2H, **H5**), 6.84 (m, 2H, **H4**), 3.79 (s, 3H, **H1**), 3.16 (m, 1H, **H8**), 2.67 (dd, J = 13.4, 5.6 Hz, 1H, **H7**), 2.51 (dd, J = 13.4, 7.9 Hz, 1H, **H7**), 1.13 (d, J = 6.3 Hz, 3H, **H9**).

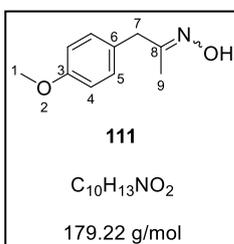
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[209]</sup>



*rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan (*rac*-**110**): 36% Anteil

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.11 (m, 2H, **H5**), 6.84 (m, 2H, **H4**), 3.79 (s, 3H, **H1**), 3.16 (m, 1H, **H8**), 2.77 (dd, J = 13.6, 7.1 Hz, 1H, **H7**), 2.59 (dd, J = 13.7, 6.4 Hz, 1H, **H7**), 1.09 (d, J = 6.4 Hz, 3H, **H9**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[205]</sup>



1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim (**111**) Hauptisomer: 17% Anteil

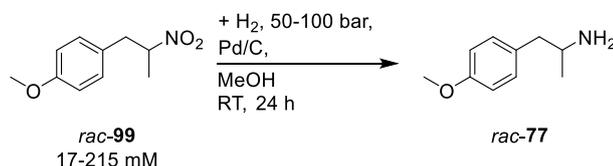
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.11 (m, 2H, **H5**), 6.84 (m, 2H, **H4**), 3.79 (s, 3H, **H1**), 3.41 (s, 2H, **H7**), 1.79 (s, 3H, **H9**).

1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim (**111**) Nebenisomer: 7% Anteil

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.11 (m, 2H, **H5**), 6.84 (m, 2H, **H4**), 3.79 (s, 3H, **H1**), 3.66 (s, 2H, **H7**), 1.77 (s, 3H, **H9**).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[205]</sup>

### 7.11.9. Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei verschiedenen Reaktionsbedingungen



**Abbildung 7–42:** Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei verschiedenen Bedingungen.

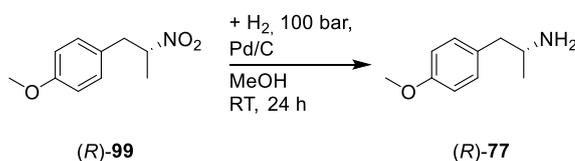
*rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**99**, 0.102-1.247 g, 0.522-6.39 mmol) wird in Methanol (30 mL) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (10% Palladium, 25% der Masse von *rac*-**99**) versetzt. Es wird unter Wasserstoffatmosphäre (50-100 bar) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum

entfernt. Der Rückstand wird mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht (Tabelle 7-56). Das Gemisch wird nicht weiter aufgetrennt. Die Signale von Produkt *rac*-77 und den Nebenprodukten *rac*-110 und 111 stimmen mit denen aus Abschnitt 7.11.8 überein.

**Tabelle 7-56:** Reduktion von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-99) unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei verschiedenen Bedingungen.

Eintrag	m( <i>rac</i> -99) [g]	[ <i>rac</i> -99] [mmol]	m(Pd/C) [mg]	p(H <sub>2</sub> ) [bar]	x( <i>rac</i> -77) [%]	x( <i>rac</i> -110) [%]	x(111) [%]
1	0.108	18	27	50	86	0	14
2	0.102	17	27	100	97	0	3
3	1.247	213	310	50	86	11	3

### 7.11.10. Reduktion von (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-99) aus der Biotransformation unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle



**Abbildung 7-43:** Reduktion des Produkts der Biotransformation (*R*)-99 unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle bei 100 bar Wasserstoffdruck.

Die Reaktionsmischung aus Kapitel 7.11.7 (Eintrag 2 in Tabelle 7-54) ((*R*)-99, 1.24 g, 93% Reinheit, 5.91 mmol, 93% *ee*) wird in Methanol (30 mL) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (10% Palladium, 311 mg) versetzt. Es wird unter Wasserstoffatmosphäre (100 bar) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration wird das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und chiraler HPLC-Analytik untersucht. (*R*)-4-Methoxyamphetamin ((*R*)-99) wird als gelbes Öl (0.942 mg, 97% Reinheit, 5.50 mmol, 93% Ausbeute, 93% *ee*) erhalten. Die Signale von Produkt (*R*)-77 und den Nebenprodukten (*R*)-110 und 111 stimmen mit denen aus Abschnitt 7.11.8 überein.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] A. Gerst, "Letter to my grandchildren", zu finden unter [https://www.esa.int/spaceinvideos/Videos/2018/12/Letter\\_to\\_my\\_grandchildren](https://www.esa.int/spaceinvideos/Videos/2018/12/Letter_to_my_grandchildren), **2018**.
- [2] H. Kim, B. Choi, *Renew. Energ.* **2010**, *35*, 157.
- [3] M. L. Weitzman, *J. Public Econ. Theory* **2012**, *14*, 221.
- [4] J. Bertling, L. Hamann, R. Bertling, *Kunststoffe in der Umwelt*, Fraunhofer UMSICHT.
- [5] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry. Theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, New York, **1998**.
- [6] K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry et al., *Green Chem.* **2008**, *10*, 31.
- [7] D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. McElroy, S. Abou-Shehada, P. J. Dunn, *Green Chem.* **2016**, *18*, 288.
- [8] R. A. Sheldon, I. Arends, U. Hanefeld, *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**.
- [9] J. Fischman, *C&EN* **2013**, *91*, 26.
- [10] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, *GERMAP 2012. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*, **2014**.
- [11] A. Fleming, *Brit. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226.
- [12] E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, *The Lancet* **1940**, *236*, 226.
- [13] R. I. Aminov, *Front. Microbio.* **2010**, *1*, 1.
- [14] J. Hamilton-Miller, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2000**, *15*, 179.
- [15] B. E. Murray, R. C. Moellering, *Annu. Rev. Med.* **1981**, *32*, 559.
- [16] H. Gröger, M. Pieper, B. König, T. Bayer, H. Schleich, *Sustainable Chem. Pharm.* **2017**, *5*, 72.
- [17] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072.
- [18] K. A. Caprile, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1988**, *11*, 1.
- [19] C. J. Harrison, D. Bratcher, *Pediatr. Rev.* **2008**, *29*, 264.
- [20] D. Mehta, A. K. Sharma, *Inventi Rapid: Mol. Pharmacol.* **2016**, *1*, 1.
- [21] W. Zuodi, CN105669701A, **2016**.

- [22] J. Zhang, Q. Liu, Y. Wang, B. Yao, J. Gao, CN102702230, **2012**.
- [23] D. Miao, L. Wang, J. Xu, X. Zeng, CN101560217, **2009**.
- [24] Z. Wu, Y. Liu, CN102286003, **2011**.
- [25] M. Fu, Y. Zhao, B. Sun, L. Xu, X. Zhu, Q. Ma, B. Zhou, L. Wang, CN105646541, **2016**.
- [26] S. Y. Ren, CN1763046, **2006**.
- [27] S. Singh, A. Srivastava, M. Dhanuka, WO2013041999, **2013**.
- [28] W. Han, X. Liang, H. Wang, S. Meng, T. Wang, M. Kong, L. Wu, CN106046024A, **2016**.
- [29] S. W. Xie, CN1709880, **2005**.
- [30] G. Zheng, C. Liu, L. Hou, L. Xu, X. Liu, CN101096364, **2006**.
- [31] Y. Grosse, D. Loomis, K. Z. Guyton, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, H. Mattock, K. Straif, *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 419.
- [32] M.-Y. Yoon, H.-B. Lee, H.-I. Shin, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 407.
- [33] I. Stark, *Chem. Unserer Zeit* **1984**, *18*, 96.
- [34] B. Gerlach, J. Ludescher, K. Totschnig, WO200063214, **2000**.
- [35] B. D. Pandurang, K. L. Parven, R. S. Prakti, S. Sivakumaran, N. G. Praveen, US2003199712, **2002**.
- [36] B. D. Pandurang, P. S. Udayam-Palayam, V. Hero, WO2005019227, **2004**.
- [37] R. Monguzzi, A. Manca, L. Marsili, M. Zenoni, US2005119244, **2004**.
- [38] H. Yamanaka, T. Chiba, K. Kawabata, H. Takasugi, T. Masugi, T. Takaya, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1738.
- [39] K. Fujimoto, E. Nakayama, H. Nakao, DE 3244457, **1983**.
- [40] Y. Kumar, N. Tewari, R. C. Aryan, B. P. Rai, H. Nizar, WO2002083634, **2002**.
- [41] Carl Roth GmbH + Co KG, *Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH), geändert mit 2015/830/E. Thioharnstoff  $\geq 99\%$  p.a.*, ACS, Karlsruhe, **2017**.
- [42] R. Bucourt, R. Heymes, A. Lutz, L. Pénasse, J. Perronnet, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2233.
- [43] R. Heymes, A. Lutz, US4152432, **1977**.
- [44] K. Taft, J. Engelking, WO2014026143, **2013**.
- [45] C. H. O'Callaghan, D. G. H. Livermore, C. E. Newall, US4258041, **1979**.
- [46] K. Atsumi, K. Sakagami, Y. Yamamoto, T. Yoshida, K. Nishihata, S. Kondo, S. Fukatsu, US4839350, **1987**.
- [47] J. Greil, J. Ludescher, K. Totsching, S. Wolf, WO9935149, **1999**.

- [48] C. Fuganti, R. Rigoni, M. Zenoni, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 1163.
- [49] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557.
- [50] S. M. Jaweed Mukarram, R. A. R. Khan, R. P. Yadav, M. Y. Khan, WO2005076694, **2004**.
- [51] M. Ochiai, O. Aki, A. Morimoto, T. Okada, Y. Matsushita, *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 3115.
- [52] S. Chatterjee, *FDA Perspective on Continuous Manufacturing*, Baltimore, **2012**.
- [53] K. Geyer, J. Codée, P. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8434.
- [54] T. Wirth, *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [55] O. Wörz, K.-P. Jäckel, T. Richter, A. Wolf, *Chem. Eng. Technol.* **2001**, *24*, 138.
- [56] O. Wörz, K.-P. Jäckel, T. Richter, A. Wolf, *Chem. Ing. Tech.* **2000**, *72*, 460.
- [57] G. Veser, *16th International Conference on Chemical Reactor Engineering* **2001**, *56*, 1265.
- [58] T. Richter, A. Wolf, K. P. Jäckel, O. Wörz, *Chem. Ing. Tech.* **1999**, *71*, 973.
- [59] N. Kockmann, M. Gottsponer, B. Zimmermann, D. M. Roberge, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7470.
- [60] R. Halder, A. Lawal, R. Damavarapu, "Topical Applications of Micro-reactor Engineering" held at AIChE Spring Conference, Orlando, Florida, USA, April 23-27, 2006, **2007**, *125*, 74.
- [61] V. Hessel, S. Hardt, H. Löwe, F. Schönfeld, *AIChE J.* **2003**, *49*, 566.
- [62] X. Zhang, S. Stefanick, F. J. Villani, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 455.
- [63] L. D. Proctor, A. J. Warr, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 884.
- [64] S. Fuse, N. Tanabe, T. Takahashi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12661.
- [65] D. Acke, C. V. Stevens, *Green Chem.* **2007**, *9*, 386.
- [66] D. Belder, M. Ludwig, L.-W. Wang, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2463.
- [67] H. A. Staab, *Angew. Chem.* **1956**, *68*, 754.
- [68] H. A. Staab, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1957**, *609*, 75.
- [69] R. Paul, G. W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596.
- [70] H. A. Staab, M. Lüking, F. H. Dürr, *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 1275.
- [71] J. S. Carey, D. Laffan, C. Thomson, M. T. Williams, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337.
- [72] P. J. Dunn, W. Hoffmann, Y. Kang, J. C. Mitchell, M. J. Snowden, *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9*, 956.

- [73] R. K. Sharma, R. Jain, *Synlett* **2007**, 603.
- [74] M. Pieper, *Masterarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2015**.
- [75] R. Ramage, B. Atrash, M. J. Parrott in *ACS Symposium Series, Vol. 171* (Hrsg.: L. D. Quin), American Chemical Soc, Washington, DC, **1981**, S. 199.
- [76] A. G. Jackson, G. W. Kenner, G. A. Moore, R. Ramage, W. D. Thorpe, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 3627.
- [77] H. Wissmann, *Phosphorus Sulfur Rel. Elem.* **1987**, *30*, 645.
- [78] H. Wissmann, H.-J. Kleiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 133.
- [79] H. Pizova, P. Bobal, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2014.
- [80] A. Llanes García, *Synlett* **2007**, 1328.
- [81] Autorenkollektiv (Hrsg.) *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Wiley, Chichester, **2010**.
- [82] K. Venkataraman, D. R. Wagle, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3037.
- [83] Z. J. Kamiński, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2901.
- [84] J. S. Cronin, F. O. Ginah, A. R. Murray, J. D. Copp, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 3491.
- [85] J. R. Dudley, J. T. Thurston, F. C. Schaefer, D. Holm-Hansen, C. J. Hull, P. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2986.
- [86] R. Menicagli, C. Malanga, P. Peluso, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2153.
- [87] E. C. Taylor, P. Gillespie, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5757.
- [88] P. A. Hippskind, J. J. Howbert, S. Cho, J. S. Cronin, S. L. Fort, F. O. Ginah, G. J. Hansen, B. E. Huff, K. L. Lobb, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7033.
- [89] G. K. Cook, W. J. Hornback, C. L. Jordan, J. H. McDonald, J. E. Munroe, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5828.
- [90] C. J. Barnett, T. M. Wilson, S. R. Wendel, M. J. Winningham, J. B. Deeter, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7038.
- [91] M. Kunishima, C. Kawachi, J. Monta, K. Terao, F. Iwasaki, S. Tani, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13159.
- [92] M. Kunishima, C. Kawachi, F. Iwasaki, K. Terao, S. Tani, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5327.
- [93] M. Kunishima, K. Hioki, A. Wada, H. Kobayashi, S. Tani, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3323.
- [94] Z. M. Jászay, I. Petneházy, L. Töke, *Synthesis* **1989**, *1989*, 745.
- [95] K. Wakasugi, A. Iida, T. Misaki, Y. Nishii, Y. Tanabe, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1209.

- [96] H. Beyer, W. Walter, W. Francke, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 23. Aufl., Hirzel, Stuttgart, **1998**.
- [97] A. Khalafi-Nezhad, A. Parhami, M. N. Soltani Rad, A. Zarea, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6879.
- [98] A. Zare, A. Hasaninejad, A. R. Moosavi-Zare, A. Parhami, A. Khalafi-Nezhad, *Chem. Asian J.* **2009**, 21, 1090.
- [99] K. I. L. Choi, J. H. O. Cha, A. N. Pae, Y. S. Cho, H.-Y. Kang, H. Y.N. Koh, M. H. O. Chang, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1375.
- [100] R. Heymes, J. Jolly, P. Rizzi, US005159070A, **1992**.
- [101] X. Zhang, CN101550150A, **2009**.
- [102] V. Stella, R. Borchardt, M. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. Tilley, *Prodrugs: Challenges and Rewards*, Springer, New York, **2007**.
- [103] H. R. Brodt, W. Stille, *Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung ; mit 121 Tabellen*, Schattauer, Stuttgart, **2012**.
- [104] E. C. Chocas, C. M. Paap, P. J. Godley, *Ann. Pharmacother.* **1993**, 27, 1369.
- [105] K. Fujimoto, S. Ishihara, H. Yanagisawa, J. Ide, E. Nakayama, H. Nakao, S.-I. Sugawara, M. Iwata, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 370.
- [106] H. Dabernat, J. L. Avril, Y. Boussougant, *AAC* **1990**, 26, 1.
- [107] J. E. Frampton, R. N. Brogden, H. D. Langtry, M. M. Buckley, *Drugs* **1992**, 44, 889.
- [108] B. Fulton, C. M. Perry, *Pediatr. Drugs* **2001**, 3, 137.
- [109] R. N. Jones, A. L. Barry, *AAC* **1988**, 32, 443.
- [110] N. Saathoff, H. Lode, K. Neider, K. M. Depperman, K. Borner, P. Koeppe, *AAC* **1992**, 36, 796.
- [111] Y. Utsui, M. Inoue, S. Mitsunashi, *AAC* **1987**, 31, 1085.
- [112] W. M. Todd, *Int. J. Antimicrob. Agents* **1994**, 4, 37.
- [113] G. Fischer, E. Defossa, U. Gerlach, R. Hörlein, N. Krass, R. Lattrell, U. Stache, T. Wollmann, D. Isert, DE4129771, **1992**.
- [114] V. K. Kakumanu, V. K. Arora, A. K. Bansal, *J. Chromatogr. B* **2006**, 835, 16.
- [115] V. K. Kakumanu, V. Arora, A. K. Bansal, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, 64, 255.
- [116] E. Defossa, G. Fischer, U. Gerlach, R. Hörlein, N. Krass, R. Lattrell, U. Stache, T. Wollmann, DE4204349, **1993**.
- [117] J. Greil, J. Ludescher, K. Totsching, S. Wolf, WO 2000066594, **2000**.
- [118] M. M. Gharpure, S. S. Dehmukh, R. D. Mahale, WO2004060896A1, **2004**.

- [119] W. E. Wright, W. J. Wheeler, V. D. Line, J. A. Frogge, D. R. Finley, *J. Antibiot.* **1979**, 32, 1155.
- [120] K. Stoeckel, W. Hofheinz, J. P. Laneury, P. Duchene, S. Shedlofsky, R. A. Blouin, *AAC* **1998**, 42, 2602.
- [121] A. N. Saab, A. A. Hussain, I. H. Patel, L. W. Dittert, *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 802.
- [122] A. N. Saab, L. W. Dittert, A. A. Hussain, *J. Pharm. Sci.* **1988**, 77, 906.
- [123] M.-J. Wang, W.-B. Zou, J. Xue, C.-Q. Hu, *Chroma* **2006**, 65, 69.
- [124] N.-A. T. Nguyen, *Pharm. Res.* **1991**, 8, 893.
- [125] P. H. Bentley, G. Brooks, I. I. Zomaya, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 3739.
- [126] W. F. Richter, Y. H. Chong, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 185.
- [127] P. W. Atkins, J. de Paula, M. Bär, A. Schleitzer, C. Heinisch, *Physikalische Chemie*, Wiley-VHC, Weinheim, **2006**.
- [128] H. Butenschön, K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore (Hrsg.) *Organische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [129] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 3. Aufl., Elsevier Spektrum Akad. Verl., München, **2004**.
- [130] P. K. Sahoo, R. Manepalli, A. K. Tiwari, K. K. Tiwari, S. Singh, IN2009DE00691, **2011**.
- [131] H. Wang, CN101768171, **2010**.
- [132] Y. Kumar, M. Prasad, K. Singh, S. Misra, WO2004011471, **2004**.
- [133] R. K. Dubey, S. Singh, M. Dhanuka, WO2010097675, **2010**.
- [134] G. S. Lee, Y. K. Chang, J. H. Lee, C. H. Park, G. S. Park, K. S. Jung, WO200134611, **2001**.
- [135] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [136] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Elsevier Science, Burlington, **1994**.
- [137] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer International Publishing, **2017**.
- [138] K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [139] N. N. Gandhi, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, 74, 621.
- [140] R. D. Schmid, L. Alberghina (Hrsg.) *GBF monograph series, Vol. 16*, Wiley-VCH, Weinheim, **1991**.

- [141] R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694.
- [142] K.-E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *15*, 29.
- [143] G. Dodson, A. Wlodawer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 347.
- [144] L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Norskov, *Nature* **1990**, *343*, 767.
- [145] P. Woolley, S. B. Petersen, *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*, Cambridge University Press, **1994**.
- [146] G. Casy, S. Phythian, M.-B. Nielsen, K. Wiggins, S. M. Roberts, C. Todd, *Biocatalysts for fine chemicals synthesis*, Wiley, Chichester, **1999**.
- [147] W. Boland, C. Fröbl, M. Lorenz, *Synthesis* **1991**, 1049.
- [148] E. Nakayama, K. Fujimoto, S. Muramatsu, J. Ide, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1193.
- [149] F. Morís-Varas, A. Shah, J. Aikens, N. P. Nadkarni, J.D. Rozzell, D. C. Demirjian, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2183.
- [150] "pH-Skala Bromthymolblau", zu finden unter  
<http://deacademic.com/dic.nsf/dewiki/201816>.
- [151] P. Narayan, C. P. Evans, T. Moon, *J. Urol.* **2003**, *170*, 498.
- [152] P. Narayan, A. Tewari, *J. Urol.* **1998**, *160*, 1701.
- [153] G. Sagratini, P. Angeli, M. Buccioni, U. Gulini, G. Marucci, C. Melchiorre, E. Poggesi, D. Giardinà, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5800.
- [154] K. Imai, K. Niigata, T. Fujikura, S. Hashimoto, T. Takenaka, EP0034432A2, **1981**.
- [155] A. Kleemann, J. Engel, *Pharmaceutical substances: syntheses, patents, applications*, 4. Aufl., Thieme, **2001**.
- [156] M. Okada, K. Yoshida, K. Takanobu, EP0257787A1, **1987**.
- [157] A. V. Reddy, S. U. Bhaskara Rao, G. L. Narasimha, P. K. Dubey, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 1451.
- [158] G. Liu, D. A. Cogan, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913.
- [159] D. Brenna, M. Pirola, L. Raimondi, A. J. Burke, M. Benaglia, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 6242.
- [160] D. Acetti, E. Brenna, C. Fuganti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 488.
- [161] R. Vardanyan, V. Hruby, *Synthesis of Best-Seller Drugs*, Elsevier Science, London, **2016**.
- [162] J. Villasante Prieto, F. Palomo Nicolau, WO20006070285, **2005**.

- [163] L. Muñoz, A. M. Rodriguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8171.
- [164] J. A. Blacker, M. J. Stirling, M. I. Page, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 642.
- [165] T. Gizur, E. Fogassy, J. Bálint, G. Egri, J. Törley, A. Demeter, I. Greiner, *Chirality* **2008**, *20*, 790.
- [166] K.-U. Baldenius, M. Breuer, K. Ditrich, V. Navickas, F. G. Mutti, T. Knaus, N. Turner, EP2963121A1, **2014**.
- [167] K. Fesko, K. Steiner, R. Breinbauer, H. Schwab, M. Schürmann, G. A. Strohmeier, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2013**, *96*, 103.
- [168] D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761.
- [169] F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227.
- [170] K. Nakamura, M. Fujii, S. Oka, A. Ohno, *Chem. Lett.* **1985**, *14*, 523.
- [171] M. Fujii, *BCSJ* **1988**, *61*, 4029.
- [172] J. Xiang, E.-X. Sun, C.-X. Lian, W.-C. Yuan, J. Zhu, Q. Wang, J. Deng, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4609.
- [173] S. Li, K. Huang, X. Zhang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8878.
- [174] Y. Kawai, Y. Inaba, N. Tokitoh, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 309.
- [175] P. Jovanovic, S. Jeremic, L. Djokic, V. Savic, J. Radivojevic, V. Maslak, B. Ivkovic, B. Vasiljevic, J. Nikodinovic-Runic, *Enzyme Microb. Technol.* **2014**, *60*, 16.
- [176] R. R. Bak, A. F. Mcanda, A. J. Smallridge, M. A. Trewhella, *Aust. J. Chem.* **1996**, *49*, 1257.
- [177] E. Burda, T. Reiß, T. Winkler, C. Giese, X. Kostrov, T. Huber, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9323.
- [178] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, *20*, 688.
- [179] H. Auterhoff, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1965**, *298*, 77.
- [180] E. Haas, *Biochem. Z.* **1938**, *298*, 378.
- [181] R. E. Williams, N. C. Bruce, *Microbiology* **2002**, *148*, 1607.
- [182] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892.
- [183] A. Scholtissek, S. R. Ullrich, M. Mühling, M. Schlömann, C. E. Paul, D. Tischler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 609.
- [184] K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27904.

- [185] T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19891.
- [186] B. V. Adalbjörnsson, H. S. Toogood, A. Fryszkowska, C. R. Pudney, T. A. Jowitt, D. Leys, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2010**, 11, 197.
- [187] D. J. Mansell, H. S. Toogood, J. Waller, J. M. X. Hughes, C. W. Levy, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ACS catal.* **2013**, 3, 370.
- [188] J. Liu, J. Wu, Z. Li, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9729.
- [189] K. Durchschein, S. Wallner, P. Macheroux, W. Schwab, T. Winkler, W. Kreis, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 4963.
- [190] N. Richter, H. Gröger, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 89, 79.
- [191] E. Shinagawa, Y. Ano, O. Adachi, K. Matsushita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, 72, 260.
- [192] B. Yin, J. Deng, L. Lim, Y. A. Yuan, D. Wei, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, 79, 410.
- [193] B. Yin, X. Yang, G. Wei, Y. Ma, D. Wei, *Mol. Biotechnol.* **2008**, 38, 241.
- [194] O. Adachi, K. Matsushita, E. Shinagawa, M. Ameyama, *J. Biochem.* **1979**, 86, 699.
- [195] P. Schweiger, H. Gross, S. Wesener, U. Deppenmeier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 80, 995.
- [196] T. Reiß, W. Hummel, S. P. Hanlon, H. Iding, H. Gröger, *ChemCatChem* **2015**, 7, 1302.
- [197] C. Breithaupt, J. Strassner, U. Breitingner, R. Huber, P. Macheroux, A. Schaller, T. Clausen, *Structure* **2001**, 9, 419.
- [198] P. A. Karplus, K. M. Fox, V. Massey, *FASEB J.* **1995**, 9, 1518.
- [199] R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32763.
- [200] W. Hummel, H. Gröger, *J. Biotechnol.* **2014**, 191, 22.
- [201] I. A. Kaluzna, J. David Rozzell, S. Kambourakis, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3682.
- [202] N. Kizaki, Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol* **2001**, 55, 590.
- [203] C. Wong, D. G. Drueckhammer, H. M. Sweers, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4028.
- [204] D. Zhu, C. Mukherjee, L. Hua, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3275.
- [205] T. Reiß, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2015**.
- [206] M. Biermann, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2016**.
- [207] E. Vázquez-Figueroa, J. Chaparro-Riggers, A. S. Bommarius, *ChemBioChem* **2007**, 8, 2295.

- [208] G. R. Fulmer, A. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.
- [209] F. Campos, M.P. Bosch, A. Guerrero, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2705.